

OFFICE DES NATIONS UNIES CONTRE LA DROGUE ET LE CRIME  
Vienne

**Méthodes recommandées  
pour la détection et le dosage de l'héroïne,  
des cannabinoïdes, de la cocaïne, de l'amphétamine,  
de la méthamphétamine et des dérivés amphétaminiques  
substitués au niveau du noyau aromatique  
dans les échantillons biologiques**

MANUEL À L'USAGE DES LABORATOIRES NATIONAUX



NATIONS UNIES  
New York, 2007

Le présent document a été élaboré sur la base des délibérations du Groupe d'experts sur la détection et le dosage des drogues placées sous contrôle dans les échantillons biologiques qui s'est réuni à Singapour du 25 au 29 septembre 1989 et à Madrid du 1<sup>er</sup> au 5 octobre 1990. Les vues exprimées ne reflètent pas nécessairement celles de l'ONU. Il n'a fait l'objet d'aucune révision officielle en vue de la publication.

La version originale anglaise du présent document a été publiée en 1995. Les entités mentionnées s'appellent maintenant Office des Nations Unies contre la drogue et le crime et Section scientifique et du laboratoire. Pour toute correspondance:

Section scientifique et du laboratoire  
Office des Nations Unies contre la drogue et le crime  
Centre international de Vienne  
B.P. 500  
A-1400 Vienne  
Autriche

Télécopie: +43-1-26060-5967  
Courrier électronique: [lab@unodc.org](mailto:lab@unodc.org)

ST/NAR/27

## Table des matières

| Chapitre  | Page |
|---|------|
| Introduction.....   | 1    |
| I. Aspects généraux du dosage des drogues placées sous contrôle contenues dans des échantillons biologiques.....                          | 5    |
| A. Objectif et stratégie.....   | 5    |
| B. Directives générales concernant le prélèvement et le dépôt des spécimens destinés à l'analyse aux fins de la détection de drogues..... | 5    |
| C. Prélèvement des spécimens: procédure détaillée.....  | 6    |
| D. Confidentialité des résultats.....   | 9    |
| E. Protection du personnel des laboratoires.....  | 9    |
| F. Aperçu des règles de sécurité.....   | 9    |
| G. Méthodologie.....  | 9    |
| H. Assurance de la qualité.....   | 13   |
| I. Interprétation des résultats.....  | 14   |
| II. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'héroïne (morphine) dans les échantillons biologiques.....                   | 15   |
| A. Types communs de produits illicites à base d'opium, de morphine et d'héroïne.....  | 15   |
| B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage des métabolites de l'héroïne.....                       | 20   |
| C. Méthodes de détection.....   | 22   |
| D. Méthodes chromatographiques de confirmation.....   | 24   |
| E. Analyse CG-SM de la monoacétylmorphine comme indicateur de la consommation d'héroïne.....  | 28   |
| F. Interprétation des résultats.....  | 29   |
| III. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage des cannabinoïdes dans les échantillons biologiques.....                        | 31   |
| A. Types communs de produits à base de cannabis.....  | 31   |
| B. Description des produits illicites à base de cannabis.....   | 34   |
| C. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage du 9-carboxy-THC.....                                   | 39   |
| D. Méthodes de détection.....   | 40   |
| E. Méthodes chromatographiques de confirmation.....   | 42   |
| F. Interprétation des résultats.....  | 46   |
| IV. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de la cocaïne dans les échantillons biologiques.....                             | 47   |

| <i>Chapitre</i>   | <i>Page</i> |
|---|-------------|
| A. Types communs de produits illicites à base de coca .....   | 47          |
| B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage de la cocaïne et de ses métabolites .....   | 49          |
| C. Méthodes de détection .....  | 52          |
| D. Méthodes chromatographiques de confirmation .....  | 54          |
| E. Interprétation des résultats .....   | 57          |
| F. Analyse et interprétation dans d'autres matrices biologiques .....   | 58          |
| V. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'amphétamine et de la méthamphétamine dans les échantillons biologiques .....                             | 59          |
| A. Introduction .....   | 59          |
| B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage de l'amphétamine, de la méthamphétamine et de leurs métabolites .....               | 60          |
| C. Méthodes de détection .....  | 63          |
| D. Méthodes chromatographiques de confirmation .....  | 66          |
| E. Interprétation des résultats .....   | 69          |
| VI. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique dans les échantillons biologiques ..... | 71          |
| A. Introduction .....   | 71          |
| B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique .....          | 72          |
| C. Méthodes de détection .....  | 74          |
| D. Méthodes chromatographiques de confirmation .....  | 76          |
| E. Interprétation des résultats .....   | 80          |
| Références .....  | 81          |

# Introduction

## A. Historique

Au cours de la dernière décennie, la production et l'offre de drogues illicites ont considérablement augmenté, ainsi qu'en témoignent, d'une part, les quantités énormes (et en progression constante) saisies par les autorités nationales et internationales et, d'autre part, le développement des toxicomanies et, partant, celui de la demande de drogues illicites. En effet, parmi les substances saisies ne figurent pas seulement les drogues traditionnelles déjà placées sous contrôle national ou international, mais aussi les nouvelles drogues ou combinaisons de drogues illicites élaborées par des chimistes dans des laboratoires clandestins. On observe également une progression de l'usage impropre et de l'abus des médicaments, notamment les barbituriques et les benzodiazépines.

Les pays industrialisés ne sont plus seuls concernés par la toxicomanie. Ce problème touche aussi les pays en développement. De nos jours, aucune nation n'est à l'abri de cette menace.

L'étendue et la diversité des abus ont amené les pays à intensifier leurs efforts de réglementation et, pour certains, à introduire une législation rigoureuse, lourde de conséquences pour les contrevenants. L'impact de ces législations dépend, au bout du compte, des résultats des tests de laboratoire. De ce fait, les laboratoires nationaux sont de plus en plus sollicités: ils doivent non seulement identifier les substances saisies, mais aussi détecter l'abus de drogues. Jusqu'ici, on ne leur demandait le plus souvent que des analyses qualitatives; ils doivent désormais fournir aussi des résultats quantitatifs fiables.

En matière d'abus de drogues, les laboratoires doivent être en mesure de traiter un plus grand nombre de substances et d'utiliser de méthodes de détection et d'analyse à la fois plus rapides, plus précises et plus spécifiques. L'analyse d'échantillons biologiques, tels que l'urine et le sang, se trouve compliquée par la nécessité de séparer les substances cibles des substances interférentes, dont les matrices biologiques sont complexes.

En outre, la dimension internationale de l'abus de drogues exige l'échange rapide des données d'analyse, non seulement entre les laboratoires, mais aussi entre les laboratoires et les services de répression, aux niveaux national et international. La conception de méthodes de détection et de dosage internationalement acceptables contribuerait beaucoup à la réalisation de ces objectifs.

En 1986, les participants à un Groupe d'experts réuni à Kuala Lumpur [1] pour étudier les méthodes recommandées pour l'analyse des échantillons de cannabis et d'amphétamine/méthamphétamine saisis reconnurent que la mise au point de méthodes d'analyse des drogues objets d'abus et de leurs métabolites dans les fluides corporels prenait un caractère d'urgence. Ils recommandèrent à l'ONU d'étudier les moyens les mieux aptes à faire face au problème.

En février 1987, à sa trente-deuxième session, la Commission des stupéfiants entérina cette proposition et invita le Laboratoire de l'ONU à prêter son concours aux États Membres en élaborant des directives sur les méthodes d'analyse des substances contrôlées dans les liquides corporels.

En réponse à cette suggestion, la Division des stupéfiants convoqua, en 1987, un Groupe d'experts chargé de définir des directives en vue de l'établissement de laboratoires et de programmes nationaux de détection dans les liquides corporels de drogues objets d'abus. Après avoir évalué les besoins mondiaux dans ce domaine spécifique, les participants estimèrent que la liste des drogues soumises à dépistage devrait inclure, au minimum, les opiacés (héroïne,

morphine, codéine), les cannabinoïdes, la cocaïne, la méthadone, la méthaqualone, l'amphétamine, la méthamphétamine et la phencyclidine; ils recommandèrent "la publication de manuels pratiques sur ce sujet, qui serviraient de guides pour l'établissement de laboratoires et l'élaboration de programmes", ainsi que "la constitution d'un groupe d'experts qui se réunirait périodiquement pour réviser la méthodologie et les procédures de dépistage des drogues" [2].

À sa dixième session extraordinaire, la Commission des stupéfiants approuva les recommandations du Groupe et insista, en particulier, sur "l'élaboration de méthodes recommandées d'analyse en laboratoire et de critères internationaux pour les programmes nationaux de dépistage dans les liquides organiques, y compris les essais d'efficacité et la validation des méthodes et des procédures" [3].

De même, la Conférence internationale sur l'abus et le trafic illicite de drogues fut d'avis que "La Division des stupéfiants devrait, en collaboration avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Organisation internationale du Travail (OIT), favoriser et coordonner les actions menées sur le plan national et, pour cela, mettre au point des principes directeurs, des critères et des méthodes de laboratoire internationalement acceptables qui aident à réaliser les programmes nationaux de dépistage. La Conférence suggéra aussi la création d'une source centrale de normes de référence sur les principaux métabolites liés à la drogue ayant pour vocation d'aider les laboratoires nationaux" [4].

Pour donner suite à la requête de la Commission et à l'invitation du Gouvernement de Singapour, la Division des stupéfiants convoqua une réunion du Groupe d'experts sur la détection et le dosage des drogues placées sous contrôle dans les échantillons biologiques et les méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'héroïne, de la morphine et des cannabinoïdes dans les fluides corporels. Une seconde réunion fut organisée, à Madrid, sur les méthodes de détection et de dosage de la cocaïne, de l'amphétamine, de la méthamphétamine et des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique dans les échantillons biologiques.

## **B. Objet du présent manuel**

Cette version révisée est une synthèse du manuel sur les *Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'héroïne et des cannabinoïdes dans les échantillons biologiques* [5] et du manuel sur les *Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de la cocaïne, de l'amphétamine, de la méthamphétamine et des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau benzénique dans les échantillons biologiques* [6]. Elle met tout spécialement l'accent sur les bonnes procédures de prélèvement, de transport et de conservation des échantillons, et sur le strict respect de la chaîne de responsabilité. Il faut impérativement que les directives concernant la procédure d'échantillonnage soient rigoureusement respectées lors du dosage des spécimens biologiques, les résultats obtenus pouvant avoir de graves conséquences judiciaires pour les individus mis en cause.

Le présent manuel, élaboré par la Section du Laboratoire du Service de l'appui technique du Programme des Nations Unies pour le contrôle international des drogues (aujourd'hui Section scientifique et du laboratoire de l'Office des Nations Unies contre la drogue et le crime), reflète les conclusions des groupes d'experts et a été conçu pour servir de guide pratique aux autorités nationales et aux analystes; il décrit, à l'intention des laboratoires de toxicologie et de criminologie, des méthodes recommandées de détection et de dosage de l'héroïne et de la morphine, des cannabinoïdes, de la cocaïne, de l'amphétamine, de la méthamphétamine et des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique dans les échantillons biologiques.

En procédant à la sélection des méthodes, les experts n'ignoraient pas que, de nos jours, de nombreux laboratoires ne se contentaient pas de satisfaire aux exigences réglementaires mais allaient bien au-delà; ils étaient également conscients des grandes disparités dans la structure des programmes nationaux, des équipements et des méthodes utilisées en laboratoire pour détecter l'abus de drogues. L'objet principal du présent manuel est de promouvoir et d'harmoniser les initiatives nationales en proposant des directives internationalement acceptables et un choix de méthodes à l'usage des laboratoires. Il vise surtout à aider les laboratoires qui n'ont pas forcément à leur disposition les équipements qui leur permettraient d'appliquer des méthodes de pointe. Chacune des méthodes recommandées est utilisée depuis de longues années déjà par des laboratoires réputés et garantit des résultats fiables. Bien entendu, les experts n'ignoraient pas qu'il existait de nombreuses autres méthodes utiles et acceptables.

### **C. Utilisation du Manuel**

Les méthodes recommandées dans le manuel ont été choisies pour leur fiabilité avérée, condition des plus importantes dès lors que les résultats sont utilisés à des fins légales ou répressives. C'est à l'analyste qu'il appartiendra, en dernier ressort, de décider de la procédure et de la méthodologie à suivre, compte tenu des instruments et des matériaux de référence dont il dispose dans le pays où il se trouve, ainsi que du niveau de formation de ses collaborateurs. Cependant, pour établir la consommation illicite de drogues, il est recommandé d'appliquer deux méthodes: celle du test de détection (habituellement une méthode de dosage immunologique), suivie par une méthode de confirmation faisant appel à différents principes chimiques ou physiques (le plus souvent une technique chromatographique). Quand la chromatographie sur couche mince (CCM) est la seule méthode disponible, nous recommandons une seconde procédure CCM utilisant un mélange de solvants différent.

Quelles que soient les méthodes choisies, il importe de veiller au bon entretien de l'équipement et à la maîtrise des conditions de travail, notamment en ce qui concerne le transport et l'entreposage des réactifs instables, et de ne se fier qu'à des auxiliaires compétents. Il importe également de pouvoir consulter des manuels sur l'abus des drogues et les techniques d'analyse. En outre, l'analyste doit se tenir informé de l'évolution de l'analyse toxicologique en lisant ce qui est publié sur ce sujet. Parmi les manuels des Nations Unies dont nous recommandons la lecture, citons, en particulier, ceux qui traitent des méthodes recommandées pour l'identification de l'héroïne [7], de l'opium et de la morphine brute [8], du cannabis [9], de la cocaïne [10], de l'amphétamine et de la méthamphétamine [11] et les dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique [12]. Bien qu'initialement conçus pour l'analyse des saisies, ils contiennent des informations utiles pour l'analyse des échantillons biologiques.

La Section scientifique et du laboratoire serait heureuse que les lecteurs lui communiquent leurs observations et suggestions sur le contenu et l'utilité du présent manuel à l'adresse suivante:

Section scientifique et du laboratoire  
Office des Nations Unies contre la drogue et le crime  
Centre international de Vienne  
B.P. 500  
A-1400 Vienne  
Autriche  
Télécopie: +43-1-26060-5967  
Courrier électronique: [lab@unodc.org](mailto:lab@unodc.org)





# **I. Aspects généraux du dosage des drogues placées sous contrôle contenues dans des échantillons biologiques**

## **A. Objectif et stratégie**

L'analyse des liquides ou spécimens biologiques vise généralement deux catégories d'objectifs:

Des objectifs criminologiques, comme, par exemple, la recherche de drogues placées sous contrôle dans des échantillons biologiques. Un résultat d'analyse positif déclenche généralement l'ouverture d'une action judiciaire pouvant déboucher sur la condamnation du sujet.

Des objectifs de diagnostic, de traitement et de réinsertion, comme l'analyse d'échantillons cliniques pour déterminer la cause d'une intoxication ou établir si le sujet s'est abstenu de prendre de la drogue pendant les quelques jours précédents. Dans ce contexte, un résultat positif n'entraîne pas forcément l'ouverture d'une action judiciaire mais peut servir d'indicateur fiable pour le traitement médical du sujet.

Des résultats positifs pouvant entraîner une condamnation, il va de soi que les procédures et méthodes d'analyse doivent répondre à des normes strictes, fondées sur les principes de la toxicologie médico-légale. Il est généralement recommandé de pratiquer un test initial de détection puis, en cas de résultat positif, un test de confirmation.

Pour la détection initiale, les laboratoires devraient envisager le recours aux techniques immunologiques telles que le dosage radio-immunologique, le dosage immuno-enzymatique, le dosage immunologique par polarisation de fluorescence et le test d'inhibition de l'agglutination au latex. Ces techniques permettent d'éliminer rapidement les spécimens négatifs. Toute analyse positive devrait être suivie d'une analyse de confirmation fondée sur un principe chimique ou physique différent: chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) ou chromatographie en phase gazeuse (CG).

## **B. Directives générales concernant le prélèvement et le dépôt des spécimens destinés à l'analyse aux fins de la détection de drogues**

L'objet de ces directives est de décrire les procédures propres à garantir une fiabilité optimale des résultats. Conformément aux recommandations du Groupe d'experts de Bruxelles, l'urine devrait être le spécimen biologique de prédilection du fait qu'elle peut être prélevée de manière non invasive et que la plupart des métabolites sont excrétés dans l'urine et y sont détectables plus longtemps que dans le sang. L'analyse du sang et d'autres matières biologiques, telles que les cheveux, la salive et la sueur pour établir la consommation illicite de drogues n'est pas encore généralement acceptée.

Pour assurer la validité des résultats des analyses dans le contexte criminologique, il convient de **surveiller** tout particulièrement le prélèvement, le transport et la conservation des échantillons. Cette surveillance doit être confiée à des auxiliaires qualifiés qui comprennent bien les implications juridiques de la procédure et doit se faire par observation visuelle directe. Cette surveillance doit être constante, mais il importe de veiller au respect de l'intimité et de la dignité du sujet. Le surveillant devra également veiller à ce qu'aucune substance contaminante ou réactive ne soit introduite dans l'échantillon d'urine. Quand il est nécessaire d'envoyer les échantillons à un laboratoire d'analyse, il faut observer les consignes de sécurité et assurer une chaîne de responsabilité ininterrompue.

Ces directives s'appliquent quand le prélèvement d'urine est effectué sur un site éloigné du laboratoire d'analyse. Peut-être sera-t-il nécessaire de les adapter ou de les modifier selon le contexte national ou local, en ce qui concerne, par exemple, la conservation des échantillons. En l'absence d'installations de congélation, l'analyste devrait prévoir des tests de stabilité dans son programme de contrôle de la qualité.

### **C. Prélèvement des échantillons: procédure détaillée**

#### ***1. Sur le site de prélèvement***

- Sur le **site de prélèvement**, le personnel est responsable des opérations de prélèvement, d'étiquetage, de conditionnement et de transport des échantillons; il doit faire en sorte que les procédures de prélèvement et de conservation donnent lieu à l'établissement de la documentation voulue et veiller à ce que les consignes de sécurité soient appliquées.
- Tous les collaborateurs associés aux opérations de prélèvement doivent avoir reçu une formation qui les rende aptes à comprendre le processus, ainsi que son importance pour la fiabilité des résultats d'analyse.
- Toutes les opérations de prélèvement doivent être surveillées et validées par des spécialistes agréés.
- Des lieux d'aisances convenables doivent être mis à la disposition des sujets auxquels des échantillons d'urine sont demandés.
- Il faut s'assurer que le sujet ne trouvera dans le local aucune substance pouvant lui servir à adultérer l'échantillon; les distributeurs de savon et les produits d'entretien sont à proscrire.

#### **Méthodes utilisées pour adultérer ou détruire un échantillon d'urine**

Ajout de diverses substances chimiques à l'échantillon. Le sel de table, les détergents ou certains produits ménagers d'usage courant, tels que l'eau de javel, peuvent détruire les drogues ou fausser les résultats de l'analyse.

Dans certains cas, introduction de substances illicites dans l'urine pour obtenir des résultats positifs.

Perçage du fond du flacon à l'aide d'une épingle pour provoquer une fuite.

Utilisation d'une poire placée sous l'aisselle du sujet et reliée par un tuyau à l'organe génital. En pressant sur cette poire, le sujet peut libérer de l'eau ou d'autres substances pour diluer ou adultérer l'urine.

Recours, par le sujet, à l'urine d'un ami qui, lui, ne consomme pas de drogue.

Ajout à l'urine, pour la diluer, d'eau prélevée dans la cuvette des WC.

- L'échantillon d'urine doit être recueilli dans deux flacons de 50 ml qui doivent être remplis au moins aux deux tiers. On évitera autant que possible les récipients en matière plastique et

les bouchons en caoutchouc car les drogues non polaires et leurs métabolites, comme les cannabinoïdes, sont très facilement absorbés par certaines matières plastiques, ainsi que par la plupart des revêtements en caoutchouc. Si, pour des raisons d'ordre pratique, on se sert de récipients en plastique jetables, le laboratoire devra les soumettre à des tests pour s'assurer qu'ils ne modifient pas la composition ou la concentration de la (ou des) drogue(s) ou métabolite(s) dans les urines.

- Immédiatement après le prélèvement, la température (32 °C-38 °C dans un délai de 4 minutes) et le pH de l'échantillon doivent être mesurés et consignés. En cas de doute concernant une possible adultération, le laboratoire doit en être informé. Dans ce cas, un examen visuel attentif est recommandé (couleur, précipitation, mousse, etc.), ainsi qu'un contrôle de la créatinine (180 ± 80 mg/100 ml: "normal"; 10-30 mg/100 ml: "probablement dilué"; < 10 mg/100 ml: "dilué") et de la gravité spécifique (1,007-1,035 "normal") [13, 14]
- Les flacons doivent être hermétiquement bouchés, scellés et étiquetés. Des dispositions doivent être prises pour assurer l'intégrité de l'échantillon (cachet de cire sur le goulot portant le sceau du service, ou tout autre dispositif permettant de déceler une manipulation indue, par exemple). Il est important que le sujet assiste à l'opération et signe ou paraphe le sceau ou l'étiquette.
- L'étiquette doit être collée sur le flacon contenant le spécimen et non sur le bouchon afin de prévenir toute substitution accidentelle ou intentionnelle du spécimen et/ou de l'identification.

**L'étiquette doit fournir au moins les indications suivantes:**

|   |
|---|
| <b>Nom:</b> _____                           |
| <b>Numéro de la carte d'identité:</b> _____ |
| <b>Date et heure du prélèvement:</b> _____  |
| <b>Lieu du prélèvement:</b> _____           |
| <b>Nom du surveillant:</b> _____            |
| <b>Droque(s) cible(s):</b> _____            |
| <b>Numéro de l'échantillon:</b> _____       |

- Un formulaire de demande d'analyse fournit des renseignements complémentaires sur le donneur du spécimen. Ce formulaire accompagne le spécimen jusqu'au laboratoire.
- Le donneur du spécimen ne doit en aucun cas participer aux opérations qui suivent le prélèvement (étiquetage, conditionnement, transport jusqu'au laboratoire).
- Des mesures de sécurité rigoureuses doivent aussi être observées pour l'entreposage et la gestion des récipients vides, des formulaires de demande d'analyse, des étiquettes et des accessoires servant au conditionnement.

## *2. Transport et entreposage*

- Une fois rempli, le formulaire de demande d'analyse est remis avec l'échantillon à la personne chargée de les faire parvenir au laboratoire. Les échantillons doivent être tenus à l'abri de toute source directe de lumière ou de chaleur pendant le transport et l'entreposage. Ils doivent donc être tenus au frais, de préférence dans une caisse tapissée d'un matériau isolant et contenant de la glace ou des blocs réfrigérants.

**Important: Entre le prélèvement et le début de l'analyse, les échantillons doivent être conservés au froid et dans l'obscurité.**

- Pour éviter toute manipulation indue, la personne chargée d'expédier les échantillons au laboratoire doit surveiller toutes les étapes de leur acheminement et remplir les documents attestant le respect de la chaîne de responsabilité.

## *3. Au laboratoire*

- Au laboratoire, une personne dûment accréditée doit réceptionner et soigneusement contrôler les échantillons et les documents qui les accompagnent. Un seul flacon de chaque échantillon d'urine doit être utilisé pour l'analyse, l'autre étant conservé dans un congélateur pour le cas où un complément d'analyse serait nécessaire.
- Après avoir contrôlé les échantillons et les formulaires de demande d'analyse, le préposé doit établir un accusé de réception, le signer et le remettre au livreur.
- Le laboratoire doit tenir à jour des registres détaillés et prendre des mesures de sécurité rigoureuses pour garantir l'intégrité des échantillons et la confidentialité des résultats.
- Si l'analyse est reportée au-delà de plus d'un ou deux jours, les spécimens doivent être conservés dans un congélateur verrouillé, si possible. Congelés, les échantillons peuvent généralement se conserver plusieurs mois.

## *4. Formulaire de demande d'analyse*

- Le formulaire de demande d'analyse qui accompagne chaque échantillon permet au laboratoire de contrôler l'identité du donneur et de s'assurer que tous les échantillons prélevés lui sont bien parvenus.
- Le formulaire doit indiquer, au minimum, l'identité du sujet, celle de la personne qui a surveillé le prélèvement et celle du responsable de l'expédition, le numéro de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement, ainsi que la température et le pH de l'échantillon frais.
- Le formulaire peut également préciser la ou les drogues à rechercher dans l'échantillon et, le cas échéant, exprimer des doutes quant à sa fiabilité.
- Une fois rempli, le formulaire doit être signé par une personne dûment habilitée qui doit y apposer un tampon officiel.

## **D. Confidentialité des résultats**

**Il importe de garantir en tout temps une sécurité et une confidentialité absolues.**

- Toutes les informations concernant le sujet et les résultats des analyses doivent être gardées sous clef et en lieu sûr.
- Seules des personnes dûment habilitées peuvent consulter les comptes rendus d'analyse.

## **E. Protection du personnel des laboratoires**

La manipulation de matériaux biologiques fait courir aux laborantins des risques d'infection, en particulier par les virus de l'hépatite et du SIDA. Ils doivent donc prendre toutes les précautions nécessaires et respecter les consignes de sécurité, et notamment porter des gants et des vêtements de protection.

## **F. Aperçu des règles de sécurité**

- Des règles de sécurité fort strictes s'imposent, non seulement en ce qui concerne les échantillons, mais aussi en ce qui concerne l'entreposage et la gestion des récipients vides, des formulaires de demande d'analyse, des étiquettes et des accessoires utilisés pour le conditionnement.
- Le donneur du spécimen ne doit en aucun cas participer aux manipulations qui suivent le prélèvement (étiquetage, conditionnement et transport au laboratoire).
- Il est important que le donneur assiste au cachetage du récipient et en signe ou paraphe le sceau ou l'étiquette.
- Il convient de consigner avec précision, et dans le détail, le nom de toutes les personnes qui ont participé au prélèvement, à la conservation et au transport du spécimen d'urine.
- L'étiquette doit être collée sur le récipient d'urine et non sur le bouchon pour éviter toute substitution accidentelle ou intentionnelle du spécimen et/ou de l'étiquette permettant de l'identifier.
- Les informations concernant le donneur du spécimen et les résultats de l'analyse sont strictement confidentielles et ne peuvent être consultées que par des personnes agréées.

## **G. Méthodologie**

Ainsi que nous l'avons précédemment indiqué, un test de détection et un test de confirmation s'imposent.

Le test de détection doit permettre d'établir avec beaucoup de fiabilité la présomption de positivité. Ce test doit être sensible, rapide et peu onéreux. Les dosages immunologiques répondent généralement à ces critères, mais les anticorps utilisés sont relativement peu spécifiques et peuvent entraîner une réactivité croisée. Tous les résultats positifs ainsi obtenus doivent être confirmés par un second test faisant appel à des principes chimiques différents. La chromatographie sur couche mince (CCM) peut également servir au test de détection.

Le test de confirmation doit avoir une sensibilité au moins égale à celle du test de détection mais il doit être plus spécifique. On fait généralement appel à des techniques chromatographiques: chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie en phase

gazeuse (CG), chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) et couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM).

### 1. Méthodes des dosages immunologiques

Les dosages immunologiques sont recommandés quand il s'agit de doser un grand nombre d'échantillons en peu de temps. Les tests de détection de l'abus de drogues peuvent être effectués à l'aide de trousse vendues dans le commerce. Les plus courantes de ces méthodes sont le dosage radio-immunologique, le dosage immuno-enzymatique, le dosage immunologique par polarisation de fluorescence et le test d'inhibition de l'agglutination au latex. Le dosage radio-immunologique, le dosage immuno-enzymatique, le dosage immunologique par polarisation de fluorescence et le test d'inhibition de l'agglutination au latex (méthode instrumentale Online) nécessitent un appareillage assez coûteux. L'une ou l'autre de ces méthodes peut être appliquée par les laboratoires qui en ont la possibilité.

Le choix de la technique utilisée dépendra le plus souvent du nombre d'échantillons que le laboratoire doit analyser quotidiennement. Les techniques par dosage immuno-enzymatique et dosage radio-immunologique, par exemple, sont applicables en deux versions: test unique ou tests multiples. Les laboratoires qui n'ont qu'une petite charge de travail pourront appliquer la version test unique ou le test d'inhibition de l'agglutination au latex (méthode non instrumentale, sur place), mais ces analyses ont un coût unitaire élevé. Quand le nombre d'analyses à effectuer est important, le dosage immuno-enzymatique multi-tests ou le dosage immunologique par polarisation de fluorescence est plus approprié.

Pour réduire au minimum les risques de faux résultats, il importe de veiller au bon entretien du matériel, à la maîtrise de l'environnement (stabilité de la température) et aux conditions d'approvisionnement et d'entreposage (à basse température) de réactifs relativement instables permettent de réduire au minimum le risque d'obtenir des résultats erronés. L'adultération des spécimens par des agents modificateurs du pH (vinaigre, acide ascorbique, jus de citron, etc.), oxydants (chlorhydrate de sodium) ou tensio-actifs (détergents, savons, etc.), par des inhibiteurs enzymatiques (glutaraldéhyde), par des médicaments (notamment gouttes nasales ou oculaires à base de tétrahydrozoline), par des édulcorants (saccharine) ou par du chlorure de sodium, par exemple, peut également être à l'origine de faux résultats. L'adultération des spécimens d'urine peut être d'origine endogène (absorption excessive de liquide, de diurétiques) ou exogène (dilution par addition d'eau). Il peut aussi y avoir des échanges ou des substitutions.

Certaines techniques de dosage immunologique peuvent être exécutées par des auxiliaires moins qualifiés ou moins expérimentés, ce qui facilite le recrutement, mais seulement sous la surveillance d'analystes hautement compétents.

Les caractéristiques des principaux tests immunologiques sont présentées au tableau I.1.

**Tableau I.1. Caractéristiques générales des tests immunologiques**

| Caractéristique                                    | Radio-immunologique | Immuno-enzymatique                | Polarisation de fluorescence | Agglutination au latex                                  |
|--|---------------------|-----------------------------------|------------------------------|---|
| Nécessité d'un appareillage spécial                | Oui                 | Oui                               | Oui                          | Non <sup>c</sup> /Oui <sup>d</sup>                      |
| Stabilité des réactifs                             | 3-4 semaines        | Plusieurs mois                    | Plusieurs mois               | > 1 année <sup>c,d</sup>                                |
| Coûts des réactifs                                 | +                   | +++ <sup>a</sup> /++ <sup>b</sup> | ++(+)                        | +++ <sup>c,d</sup>                                      |
| Possibilité d'automatisation                       | Oui                 | Oui                               | Oui                          | Non <sup>c</sup> /oui <sup>d</sup>                      |
| Nombre de tests par technicien, équipe de 8 heures | 200-400             | 100-400 <sup>b</sup>              | 250-300                      | 200-350 <sup>c</sup> / <sup>&gt;</sup> 500 <sup>d</sup> |

<sup>a</sup> Test unique.

<sup>b</sup> Dosage des drogues dans l'urine, multi-tests.

<sup>c</sup> Méthode non instrumentale sur place.

<sup>d</sup> Méthode instrumentale Online.

## **2. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les méthodes CCM demandent peu d'investissements en biens d'équipement et autres frais d'installation, mais exigent beaucoup de main-d'œuvre et sont généralement moins sensibles que d'autres. Il faut une très grande expérience pour les appliquer avec précision, vu le caractère subjectif de l'interprétation des résultats. Elles sont recommandées comme test de confirmation des résultats des dépistages immunologiques, et comme test initial quand les coûts salariaux revêtent moins d'importance que les dépenses en capital, à la condition de disposer d'un personnel qualifié.

Quand, faute de ressources, le laboratoire doit s'en tenir à la seule méthode CCM, les résultats du dosage d'un spécimen ne doivent pas constituer la preuve unique de la présence ou de la consommation d'une drogue, vu que cela risque d'être lourd de conséquences pour la personne concernée. Si le laboratoire ne dispose pas d'un appareillage plus perfectionné, mieux vaut procéder à un test de confirmation à l'aide d'un autre mélange de solvants au moins et/ou d'un réactif de détection.

## **3. Chromatographie en phase gazeuse (CG) et chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)**

La CG et la CLHP sont extrêmement sensibles et spécifiques pour la confirmation de résultats positifs des tests présomptifs, mais elles exigent un appareillage plus coûteux que la CCM ou le dosage immunologique. Vu leur haute technicité, elles requièrent aussi un personnel très qualifié et expérimenté.

## **4. Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM)**

Le couplage CG - SM est la méthode la plus sensible et la plus spécifique de confirmation de la présence d'une drogue dans un spécimen biologique. C'est celle qui exige le plus d'investissements en capital, en formation et en entretien, mais c'est également celle qui risque le moins d'être contestée devant un tribunal. Elle doit être considérée comme un atout essentiel des programmes nationaux quand le laboratoire de contrôle est l'ultime recours pour la confirmation des dosages contestés.

## **5. Préparation des échantillons**

En général, les tests initiaux de dosage immunologique exigent peu de préparation. Il n'est pas nécessaire d'hydrolyser les échantillons d'urine car les titrages immunologiques permettent de mesurer les quantités de drogues et/ou de leurs métabolites, tant à l'état libre que sous forme de composés. Il peut être nécessaire d'ajuster le pH ou de centrifuger l'urine pour en éliminer la turbidité. Suivre les instructions du fabricant permet d'optimiser les résultats.

Pour les procédures chromatographiques, il est extrêmement important de bien préparer les échantillons car l'urine est un milieu complexe où abondent de nombreux composés organiques et inorganiques, parmi lesquels l'analyte cible est présent en quantités infimes. La préparation des échantillons consiste généralement à hydrolyser l'urine, à en extraire les analytes

et à les purifier. La procédure doit être performante, car d'une bonne extraction dépend la récupération des petites quantités d'analytes présents, mais aussi sélective pour garantir l'élimination des substances interférentes.

Pour les méthodes CG et CG-SM, la préparation des échantillons implique souvent la préparation de dérivés chimiques des analytes cibles. Bien que cette opération supplémentaire prenne du temps et soit onéreuse, vu le coût des réactifs utilisés, l'obtention de dérivés est fréquemment recommandée pour les raisons suivantes:

Elle assure une plus grande sensibilité.

Les composés dérivés sont thermiquement plus stables que les non-dérivés.

Les propriétés chromatographiques sont améliorées (forme des pics, temps de rétention et de séparation, par exemple).

Les spectres de masse contiennent des ions qui se prêtent mieux à la CG-SM en mode SIM (Selected Ion Monitoring) que ceux des composés non dérivés.

## 6. Analyses quantitatives

Pour établir l'usage illicite de drogues, il n'est pas absolument nécessaire de procéder à des analyses quantitatives; mais quantifier les drogues et leurs métabolites détectés lors du test préliminaire présente de nombreux avantages, surtout lorsqu'un problème d'interprétation se pose.

En général, les méthodes chromatographiques assurent une quantification fiable des analytes. Les méthodes CCM peuvent être appliquées mais elles nécessitent un lecteur de plaques ou un densitomètre et peuvent se révéler peu fiables ou peu rentables. En outre, les dosages immunologiques ne donnent généralement pas une quantification fiable dans ce contexte, en raison de la possibilité inhérente de présence dans l'échantillon de substances non identifiées susceptibles de provoquer des réactions croisées.

L'analyse quantitative par CG, CLHP or CG-SM nécessite l'adjonction d'un standard interne à l'échantillon avant extraction. Ce standard permet aussi de mesurer les temps relatifs de rétention. Le standard interne doit ressembler à l'analyte cible de manière à ce qu'on puisse l'extraire, en obtenir des dérivés et l'analyser dans les mêmes conditions que l'analyte, tout en étant facilement différenciable pendant la procédure chromatographique. Il faut toutefois éviter d'utiliser des substances susceptibles d'être présentes dans l'urine, telles que des drogues ou des éléments endogènes.

Pour les analyses quantitatives par CG-SM, mieux vaut, en général, utiliser comme standard interne un analogue deutéré de l'analyte, mais ces analogues sont onéreux et il peut être difficile de se les procurer. D'autres analogues du composé cible peuvent également faire l'affaire.

Si l'on décide d'appliquer une méthode quantitative, il est indispensable d'en vérifier l'exactitude et la précision (voir ci-après). Le coefficient de variation d'une méthode chromatographique doit être inférieur à 10 %, et de préférence à 5 %.

La concentration d'un analyte peut se calculer à l'aide de la formule générale suivante:

$$\text{Concentration de l'analyte X} = \left[ \frac{A_X/A_{IS} \text{ chromatogramme échantillon}}{A_{RS}/A_{IS} \text{ chromatogramme échantillon}} \right] \bullet C_{RS}$$

Où:

$$A_X = \text{Aire de pic de l'analyte X dans le chromatogramme de l'échantillon}$$



|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| $A_{IS}$ chromatogramme échantillon | = Aire de pic du standard interne dans le chromatogramme de l'échantillon  |
| $A_{RS}$                            | = Aire de pic du standard de référence dans le chromatogramme du standard  |
| $A_{IS}$ chromatogramme standard    | = Aire de pic du standard interne dans le chromatogramme du standard       |
| $C_{RS}$                            | = Concentration de l'analyte $X$ dans la solution du standard de référence |

## H. Assurance de la qualité

Un personnel qualifié et compétent est indispensable à l'obtention de résultats fiables. Le respect des bonnes pratiques de laboratoire, le recours à des procédures opératoires normalisées et le recyclage régulier du personnel contribuent à maintenir la qualité et la fiabilité des prestations du laboratoire.

### 1. Contrôle interne de la qualité

Un programme d'assurance de la qualité bien conçu et bien documenté doit faire partie intégrante du laboratoire d'analyse des drogues et lui donner, à tout le moins, les moyens de contrôler la précision et l'exactitude de toutes les analyses effectuées. La précision des méthodes doit être évaluée en soumettant les spécimens à des analyses multiples et/ou en recourant à un nombre suffisant de spécimens de contrôle (présentant différentes concentrations de la drogue ou du métabolite dans le liquide organique analysé). Cette façon de procéder permet à l'analyste d'effectuer des évaluations statistiques précises, par lots, sur une certaine période.

### 2. Contrôle externe de la qualité

Dans la mesure du possible, le laboratoire devrait participer à un programme externe d'essais d'aptitude. L'idéal serait que ce programme soit organisé par une institution extérieure indépendante, telle que l'ONU, qui inviterait les laboratoires des États Membres à y participer. En l'absence d'un tel programme, les laboratoires d'un même pays peuvent adopter la stratégie ci-après:

Programme d'essais d'aptitude interlaboratoires: les laboratoires échangent des échantillons pour analyse et contrôle réciproque de leurs résultats respectifs.

Le laboratoire central est désigné comme laboratoire de référence et envoie à tous les autres laboratoires, pour analyse, des échantillons contenant différentes concentrations d'analyte(s). C'est lui aussi qui procédera à l'évaluation des résultats.

## **I. Interprétation des résultats**

L'analyse qualitative ou quantitative d'un échantillon biologique apporte la preuve qu'un sujet a ou n'a pas consommé une drogue placée sous contrôle. La présence de métabolites peut révéler qu'une drogue a été absorbée par l'organisme.

Lorsqu'un test de détection donne un résultat positif, cela indique la présence dans l'urine d'une drogue ou d'un métabolite de cette drogue à un taux de concentration égal ou supérieur au niveau critique. L'élimination d'une drogue par l'organisme et sa concentration dans l'urine dépendent de facteurs tels que la voie d'absorption, la fréquence et la durée de l'abus, le fonctionnement des organes, le taux de métabolisme de la drogue, la condition physique du sujet, son âge, son sexe, son régime alimentaire, l'heure du prélèvement, la dilution endogène, etc. Il convient de souligner que l'état de conscience du sujet ne peut en aucun cas laisser préjuger la concentration de drogue dans ses urines.

## II. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'héroïne (morphine) dans les échantillons biologiques

### A. Types communs de produits illicites à base d'opium, de morphine et d'héroïne [7, 8]

#### 1. Opium

L'opium est un produit naturel obtenu par incision de la capsule du pavot non encore parvenu à maturité. Le latex laiteux qui suinte des incisions est raclé à la main et séché à l'air pour obtenir une gomme, l'opium brut, mélange complexe qui contient des sucres, des protéines, des lipides, d'autres substances gommeuses et de l'eau, de sorte que la fraction alcaloïde active ne représente que 10 à 20 % du poids total. Une quarantaine d'alcaloïdes ont été recensés, dont quatre ou cinq peuvent être considérés comme les principaux constituants. Ils relèvent de deux grandes catégories: celle des phénanthrènes, représentée par la morphine, la codéine et la thébaïne, et celle des isoquinoléines, représenté par la papavérine et la narcotine (noscapine).

Les quantités relatives de ces différents alcaloïdes dépendent beaucoup de facteurs tels que le climat, l'altitude, la fertilité du sol, l'hygrométrie, l'âge de la plante, l'époque de l'incision et la variété de *Papaver somniferum*.

La morphine est le principal alcaloïde de l'opium; sa concentration va de 4 à 21 %, la moyenne se situant entre 8 et 14 %. L'opium brut licitement produit, connu sous le nom d'opium indien, ne contient pas moins de 9,5 % de morphine (morphine anhydre).

La narcotine occupe la deuxième place, avec une concentration de 2 à 8 %. La narcotine n'a pas de principe stupéfiant. Parfois présente dans la morphine brute, elle est considérée comme une impureté.

La concentration de la codéine dans l'opium brut se situe entre 0,7 et 3 %. Sa présence, considérée comme une impureté dans la morphine brute utilisée pour la préparation de l'héroïne, provoque la formation d'acétylcodéine.

La thébaïne est un alcaloïde mineur présent dans *Papaver somniferum* dans la proportion de 0,2 à 1 %.

La concentration de papavérine varie entre 0,5 et 1,3 %.

Une autre substance caractéristique de l'opium est l'acide méconique, qui peut atteindre une concentration de 15 %. Cette substance, dont la concentration dépend de la technique d'extraction, influe sur la pureté de la morphine brute tirée de l'opium.

#### a) Opium brut

Frais, l'opium brut est une substance visqueuse d'un brun foncé ressemblant à du goudron; il peut être moulé et se présenter sous diverses formes selon le mode de conditionnement adopté dans le pays d'origine. Sa consistance change avec le temps, il devient dur et cassant. Son odeur de réglisse caractéristique s'accroît lorsqu'il est dissous dans de l'eau. L'opium est une substance non homogène qui contient des fragments de capsules de pavot et parfois des adultérants, comme la pulpe de banane ou la colophane. Généralement protégé par des feuilles végétales, il est ensuite emballé dans du plastique, puis ficelé.

### *b) Opium préparé*

L'opium préparé, également appelé "chandoo" en Asie du Sud-Est, est extrait de l'opium brut par diverses méthodes, dont la dissolution dans l'eau, suivie du filtrage et de l'évaporation. Ce traitement est destiné à obtenir un produit fumable.

### *c) Dross d'opium*

On appelle *dross* le résidu de l'opium fumé dans une pipe. Du fait d'une combustion et d'une volatilisation incomplètes, il possède encore certaines caractéristiques de l'opium, dont une forte concentration de morphine. Des mélanges de *dross* et d'opium brut et préparé ont été signalés en Asie du Sud-Est.

### *d) Opium médicinal*

L'opium médicinal, également appelé opium en poudre, est obtenu par dessiccation à température modérée. Le produit obtenu est réduit en une poudre plus ou moins fine dont la teneur en morphine est ajustée aux prescriptions de la pharmacopée (entre 9,5-10,5 %) par addition de lactose en poudre, d'écales de fèves de cacao ou d'amidon de riz. Généralement, la poudre obtenue est de couleur brun clair. Elle est composée de particules jaunâtres ou rougeâtres tirant sur le brun et a l'odeur caractéristique de l'opium.

D'un point de vue chimique, il existe fort peu de différence entre tous ces produits.

## **2. Morphine brute**

La qualité de la morphine brute provenant du marché illicite peut être excellente ou médiocre selon les procédés de purification utilisés, la destination du produit et les habitudes, les connaissances et les compétences professionnelles du chimiste.

## **3. Héroïne**

Soulignons d'emblée que deux échantillons d'héroïne n'auront jamais exactement le même aspect. Obtenue à partir d'un produit naturel hautement variable au moyen d'un procédé par lots se prêtant à de multiples variations, et soumise par la suite à des adultérations et à des transformations aux fins du trafic, il n'est pas surprenant que l'héroïne se présente sous une telle multitude de formes. Celles que nous recensons ici ne représentent qu'une sélection des plus communes. Si un échantillon soumis à une analyse ne ressemble en rien à l'une quelconque des formes décrites dans le présent manuel, cela ne signifie pas pour autant qu'il ne s'agit pas d'héroïne ou d'un produit en contenant.

### *a) Deux types d'héroïne de l'Asie du Sud-Ouest*

*Type 1:* De couleur et de consistance très variable, elle va du beige au brun foncé. Elle se présente presque toujours sous la forme d'une poudre, souvent fine, qui contient parfois de petits granules mous qui s'écrasent facilement. Ce type est de loin le plus courant dans la région. Cette diversité d'aspects a pour corollaire un large éventail de compositions chimiques, mais les échantillons provenant de saisies plus récentes révèlent la fabrication de produits plus homogènes. Le produit typique est une poudre de couleur brun clair avec une odeur caractéristique d'opium, dont la teneur en héroïne pure est ordinairement de 60 %; elle contient tous les alcaloïdes et dérivés sous forme de bases, dont les teneurs types sont les suivantes:

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| acétylcodéine .....                | 5 %  |
| O <sup>6</sup> -monoacétylmorphine | 3 %  |
| narcotine.....                     | 10 % |
| papavérine .....                   | 4 %  |

*Type 2:* Poudre fine et sèche de couleur blanche, blanchâtre ou crème ayant une odeur moins prononcée que le type 1; sa pureté en héroïne (présente sous forme de chlorhydrate) est de l'ordre de 80-90 %. Certains échantillons sont de "qualité pharmaceutique". Les teneurs types en autres alcaloïdes et dérivés sont les suivantes:

|                                    |              |
|------------------------------------|--------------|
| acétylcodéine .....                | 3 %          |
| O <sup>6</sup> -monoacétylmorphine | 2 %          |
| narcotine.....                     | NON DÉTECTÉE |
| papavérine .....                   | NON DÉTECTÉE |

#### *b) Deux types d'héroïne du Moyen-Orient*

*Type 1:* Poudre fine de couleur beige ou brun très clair contenant rarement des granulés. Les échantillons contenant plus de 70 % d'héroïne sont rares; la pureté moyenne est d'environ 50 %. Les alcaloïdes et dérivés sont présents sous forme de chlorhydrates. Les teneurs en autres alcaloïdes et dérivés sont les suivantes:

|                                    |              |
|------------------------------------|--------------|
| acétylcodéine .....                | 3 %          |
| O <sup>6</sup> -monoacétylmorphine | 2 %          |
| narcotine.....                     | NON DÉTECTÉE |
| papavérine .....                   | NON DÉTECTÉE |

Ce type contient très fréquemment un adultérant, souvent un produit pharmaceutique tel que la procaine.

*Type 2:* Fine poudre de couleur blanche ou blanchâtre. La teneur en héroïne de certains échantillons se situe entre 70 et 80 %, alors que d'autres semblent être une dilution du produit très pur contenant une quantité équivalente de caféine, réduisant la teneur en héroïne à 30-40 %. Les alcaloïdes et dérivés sont présents sous forme de chlorhydrates. Ces formes diluées ne contiennent que des traces d'acétylcodéine, de O<sup>6</sup>-monoacétylmorphine, de papavérine et de narcotine mais, habituellement, les formes les plus pures contiennent:

|  |       |
|--|-------|
| acétylcodéine .....                      | 2-3 % |
| O <sup>6</sup> -monoacétylmorphine ..... | 2 %   |

#### *c) Deux types d'héroïne d'Asie du Sud-Est*

##### *Héroïne fumable "Chinoise n° 3"*

Granulés durs de 1 à 5 mm de diamètre qui, contrairement à ceux contenus dans l'héroïne d'Asie du Sud-Ouest, ne s'écrasent pas facilement; très petite quantité de poudre. Les granulés sont le plus souvent gris ou brunâtres. Il existe une variété spéciale dite "Penang Pink" dont les granulés sont rouges ou roses. Une analyse donnera les résultats suivants:

Substance grise ou brunâtre: héroïne 20 %, caféine 40 %, traces des autres alcaloïdes dans un produit de production récente, bien que dans ce type d'héroïne puisse rapidement se former (par hydrolyse) jusqu'à 5 % de O<sup>6</sup>-monoacétylmorphine. Les alcaloïdes peuvent être présents sous forme de chlorhydrates ou de bases; dans certains échantillons ils peuvent se présenter sous forme de chlorhydrates et de bases, ce qui signifie qu'il n'y a pas eu addition d'acide chlorhydrique en quantité stœchiométrique.

Substance rouge ou rose: les résultats de l'analyse sont les mêmes que pour les substances grises ou brunâtres, mais la barbitone remplace la caféine.

#### *Héroïne injectable "Chinoise n°4"*

Fine poudre blanche ayant une très faible odeur et ne contenant pas de granulés. Le produit contient presque exclusivement de l'héroïne. Ni la narcotine ni la papavérine ne sont décelables; la teneur en O<sup>6</sup>-monoacétylmorphine est généralement inférieure à 3 %. La teneur en acétylcodéine est habituellement sensiblement plus élevée que dans le produit équivalant de grande pureté originaire d'Asie du Sud-Ouest. Tous les alcaloïdes sont présents sous forme de chlorhydrates.

Il convient de noter que pour tous les types d'héroïne, quelle qu'en soit l'origine, la teneur en O<sup>6</sup>-mono-acétylmorphine peut être supérieure aux valeurs indiquées. Dans le cas d'échantillons de mauvaise qualité, un phénomène d'hydrolyse est fréquent, avec pour résultat une conversion de l'héroïne en O<sup>6</sup>-monoacétylmorphine. Une addition non stoechiométrique (habituellement excessive) d'acide chlorhydrique est la cause la plus fréquente d'une telle hydrolyse.

Il est rare que l'hydrolyse élève grandement la teneur en morphine, à tout le moins dans le cas de l'héroïne illicite sous forme compacte. Les teneurs élevées en morphine détectées dans des échantillons de saisies récentes révèlent très probablement de médiocres procédés de fabrication.

Lors de l'analyse en laboratoire de divers échantillons biologiques pour y déceler la présence d'héroïne ou de dérivés opiacés, tels que la morphine et la codéine, les composés ci-après doivent être recherchés (voir figure II.1 pour les structures):

Héroïne (diacétylmorphine, DAM)

Morphine

O<sup>6</sup>-Monoacétylmorphine (MAM)

Codéine

Acétylcodéine.

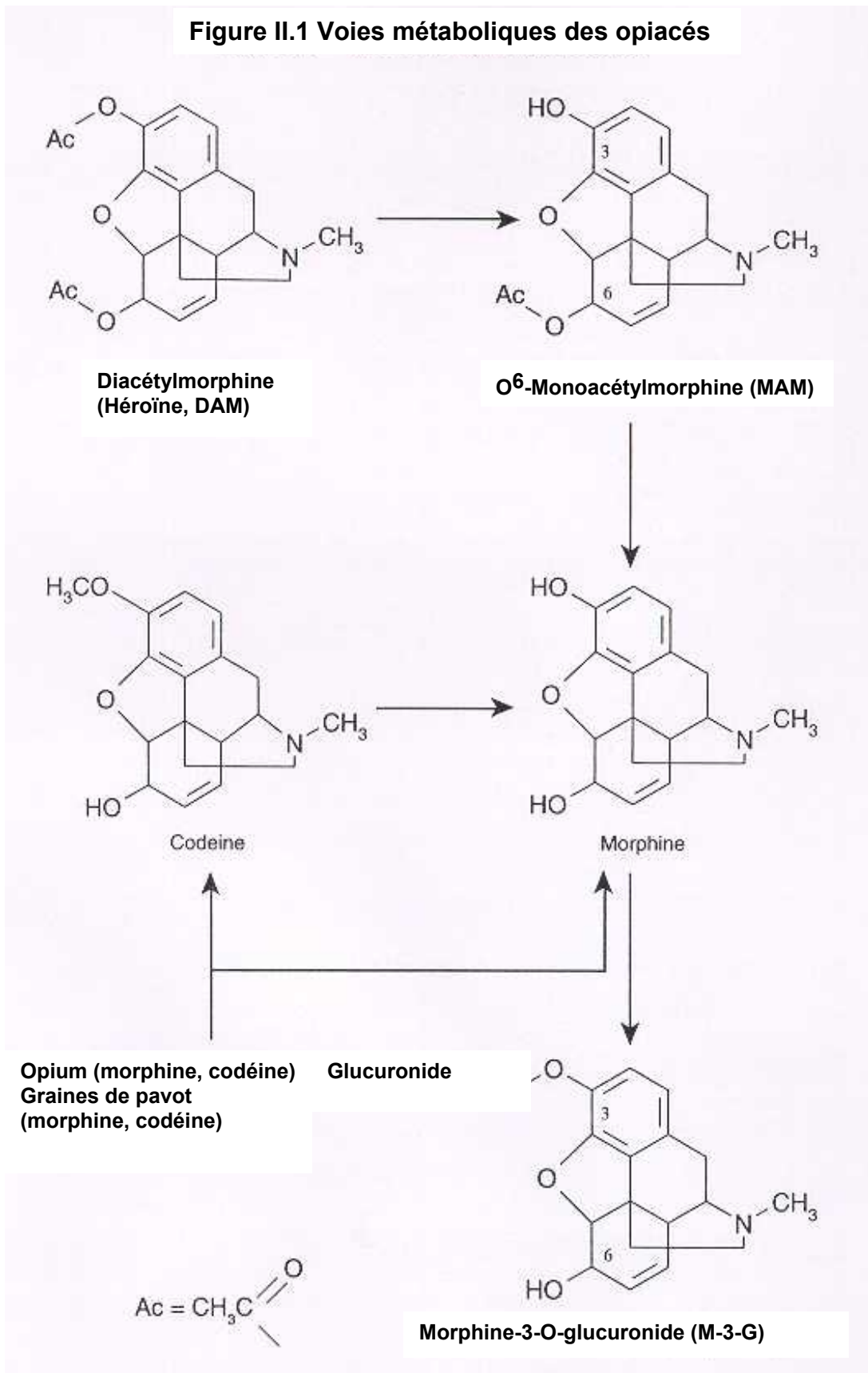
En outre, les divers O-glucuronides de la morphine (voir figure II.1) sont d'un très grand intérêt pour l'analyste, étant donné que la plus grande partie de l'héroïne est excrétée dans l'urine sous forme de:

morphine-3-O-glucuronide (M-3-G)

morphine-6-O-glucuronide (M-6-G)

morphine-3,6-O-diglucuronide.

**Figure II.1 Voies métaboliques des opiacés**



#### **4. Modes de consommation**

L'héroïne peut être notamment inhalée, prise, fumée ou injectée par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Aux fins de la consommation par injection, l'héroïne en poudre est d'abord diluée dans de l'eau, processus souvent accéléré par chauffage et acidification.

#### **5. Métabolisme et excrétion**

Après administration, l'héroïne est rapidement désacétylée en MAM [15, 16], puis hydrolysée plus lentement en morphine. Les voies métaboliques sont indiquées à la figure II.1. Les principaux métabolites de l'héroïne détectés dans les urines entre 20 et 40 heures après une injection intraveineuse sont: M-3-G (38,2 % de la dose), morphine libre (4,2 %), MAM (1,3 %) et héroïne non transformée (0,1 %). D'autres glucuronides de la morphine et de la normorphine [17] peuvent être détectés comme métabolites secondaires de l'héroïne. On décèle souvent de la codéine dans les urines des consommateurs d'héroïne illicite, bien que cette substance ne soit pas un métabolite de l'héroïne mais plutôt le résultat de la désacétylation de l'acétylcodéine, impureté souvent présente dans l'héroïne illicite.

La concentration de morphine dans l'urine après administration thérapeutique peut atteindre 10 µg/ml; elle peut être encore bien plus élevée dans les cas d'une surdose mortelle d'héroïne; Ainsi, dans un cas particulier, on a décelé un niveau de 86 µg/ml [18]. La morphine (ainsi que la codéine) est aussi excrétée dans l'urine après l'ingestion de graines de pavot [19].

L'héroïne étant rapidement métabolisée, il n'est pas possible de l'identifier directement dans les liquides biologiques humains (demi-vie: 2-3 mn [18]); aussi procède-t-on au dosage de la morphine, son principal métabolite dans l'urine. La consommation d'héroïne peut également être confirmée en déterminant la présence de MAM dans l'urine, mais ce métabolite spécifique n'est détectable que peu de temps après l'absorption (entre 2 et 8 heures [19]) car il se métabolise assez rapidement en morphine (demi-vie: 0,6 heures [19]). La détection de la MAM exige une procédure d'extraction modifiée et un appareillage perfectionné, mais elle est rarement nécessaire.

### **B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage des métabolites de l'héroïne**

Se référer aux procédures générales d'échantillonnage décrites au chapitre I (sections C et G.5).

#### **1. Préparation des échantillons pour le dosage immunologique**

En général, les dosages immunologiques n'exigent que de peu de préparation, voire aucune (voir aussi chapitre I, section G.5). Il n'est pas nécessaire d'hydrolyser les échantillons d'urine, vu que les dosages immunologiques permettent de mesurer à la fois les formes libres et conjuguées de la drogue et/ou des métabolites. Il peut être nécessaire d'ajuster le pH ou de centrifuger l'urine pour en éliminer la turbidité. Pour optimiser les résultats, les instructions du fabricant doivent être strictement suivies.

#### **2. Préparation des échantillons pour la chromatographie**

Le volume d'urine nécessaire à l'analyse dépend de la technique chromatographique envisagée. Le volume recommandé pour la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse (CG) par la technique de la colonne à remplissage est de 10 ml; pour les autres techniques chromatographiques, il est de 5 ml.



## a) Hydrolyse

### *Hydrolyse acide*

Dans un tube à essai à raccordement rapide de 50 ml, ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré à 10 ml d'urine, fermer non hermétiquement le tube et incuber à 100 °C pendant 60 minutes environ.

### *Hydrolyse enzymatique*

Si l'échantillon d'urine (5 à 10 ml) est alcalin, l'amener à pH 7 avec de l'acide acétique, puis ajouter 0,1 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium - acide acétique (0,1 M, pH 5,5) et 0,02 ml de  $\beta$ -glucuronidase (75 unités/ml) par ml d'urine. Incuber pendant 24 heures à 37 °C ou 1 heure à 55 °C. S'assurer que la température n'excède pas 55 °C pour ne pas dénaturer l'enzyme. Procéder à l'extraction de la morphine libre selon la méthode décrite ci-après.

### *Avertissement*

L'hydrolyse acide et enzymatique peut provoquer une désacétylation de la MAM en morphine.

## b) Extraction

### *Extraction liquide-liquide*

Amener le pH de l'urine à 8,5-9,0 et extraire à l'aide de deux fois le volume de l'un quelconque des solvants organiques suivants:

Chloroforme – isopropanol (9:1, v/v)

Dichlorométhane - isopropanol (9:1, v/v)

Acétate d'éthyle.

Il faut s'assurer que la couche aqueuse se sépare complètement de la couche de solvant avant de recueillir l'extrait, et ce pour éviter d'entraîner de l'eau. Si un problème d'émulsion se pose, on peut filtrer l'extrait à l'aide de papier traité à la silicone (papier pour séparation de phase); freiner l'émulsion par sonication. Si l'on a besoin d'un extrait d'une plus grande pureté, procéder à une réextraction de la solution organique à l'aide de 6 ml d'acide chlorhydrique 0,5 M. Jeter la couche organique et amener la solution aqueuse à pH 8,5-9,0, puis extraire de nouveau avec l'un des solvants précités. Séparer les couches organiques, les réunir, filtrer la solution sur une petite quantité de sulfate de sodium sec, laver le filtre avec 5 ml de la phase organique. Réduire la solution à 1-2 ml et faire évaporer à siccité le reste du solvant sous un jet d'azote. Dissoudre le résidu dans 0,1 ml de méthanol ou de méthanol - chloroforme (9:1) pour l'analyse par CCM ou CG.

### *Phase solide*

Si l'on dispose de l'équipement nécessaire, on peut recourir à la procédure d'extraction en phase liquide sur un support de célite [20]. La méthode d'extraction en phase solide à l'aide de silice C-18 est aussi recommandée [21].

Avant d'utiliser les colonnes, les laver avec 5 ml de méthanol, 3 ml d'eau distillée et une solution tampon de borax (1 ml à 0,05 M, pH 9,0). Mélanger à 1 ml de l'échantillon d'urine 50 ml (= 50 ng) d'un standard interne de nalorphine et 1,0 ml de solution tampon (pH 9,0) et verser dans une colonne de silice C-18. Laver la colonne avec 100 ml de méthanol aqueux à 80 %, puis éluer la morphine avec 0,5 ml de méthanol.

### c) Standards internes

Les standards internes doivent répondre aux critères énumérés au chapitre I, section G. 6. La nalorphine convient pour la CG. Pour la méthode CG-SM, les standards internes préconisés sont les analogues deutérés de la morphine ou de composés voisins. À défaut, l'un des standards indiqués ci-dessus pour la CG devra être utilisé. Le *l*- $\alpha$ -acétylméthadol – HCl est un standard interne qui convient pour la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

### d) Standards d'étalonnage

Pour la CG, préparer des solutions mères de morphine et de nalorphine dans du méthanol à une concentration de 1 mg/ml. À partir de ces solutions mères, préparer des standards d'étalonnage aqueux contenant de la morphine (0 à 10  $\mu$ g/ml morphine plus 5  $\mu$ g/ml de nalorphine).

Pour la CLHP, *l*- $\alpha$ -acétylméthadol - HCl, DAM, MAM et solutions mères de morphine à 1 mg/ml sont préparés dans du méthanol et entreposés dans un réfrigérateur. Les standards d'étalonnage sont obtenus en diluant la solution mère dans du méthanol - acétonitrile (20:80, v/v).

## C. Méthodes de détection

### 1. Dosages immunologiques

Il est recommandé aux laboratoires qui ont accès à ces techniques de recourir pour la détection initiale aux dosages immunologiques, notamment aux dosages radio-immunologiques, immuno-enzymatiques, par polarisation de fluorescence et par inhibition de l'agglutination au latex. Les anticorps pour dosages immunologiques contenus dans les trousseaux du commerce sont ciblés sur la morphine, mais peuvent avoir des réactions croisées avec d'autres opiacés [22]. On trouvera au tableau II.1 un résumé des réactivités croisées de certains dosages du commerce.

**Tableau II.1. Réactivités croisées de dosages immunologiques vendus dans le commerce pour la détection de la morphine**

| Dosage           | Réactivité croisée (%)   |          |          |           |
|------------------|--------------------------|----------|----------|-----------|
|                  | Morphine                 | MAM      | M-3-G    | Codéine   |
| Coat-A-Count     | 84 (300) <sup>a,b</sup>  | 0 (100)  | 1 (618)  | 0.1 (600) |
| Abuscreen-RIA    | 85 (300) <sup>a,b</sup>  | 15 (100) | 52 (618) | 198 (300) |
| EMIT-d.a.u.      | 86 (300) <sup>a,b</sup>  | 16 (100) | 45 (618) | 330 (300) |
| FPIA-TDx         | 90 (300) <sup>a,b</sup>  | 93 (50)  | 64 (185) | 111 (300) |
| Abuscreen-Ontrak | 100 (300) <sup>c,d</sup> | —        | 86 (350) | 171 (175) |
| Abuscreen-Online | 100 (300) <sup>c,d</sup> | 97 (311) | 62 (480) | 134 (255) |

<sup>a</sup> Réactivité croisée apparente = concentration apparente/concentration cible x 100 (entre parenthèses, concentration à laquelle la réactivité croisée a été déterminée, ng/ml).

<sup>b</sup> Voir Edwards [14].

<sup>c</sup> Réactivité croisée = concentration cible (300 ng/ml)/ concentration équivalant à 300 ng/ml de morphine x 100 (entre parenthèses, équivalents ng/ml).

<sup>d</sup> Indications du fabricant.

## 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

### Technique standard

Les matériels et procédures CCM standard sont décrits dans le manuel des Nations Unies intitulé *Méthodes recommandées pour l'identification de l'opium et de la morphine brute* [8]. Ils conviennent pour l'analyse des spécimens biologiques aux fins de la détection de morphine.

### Plaques CCM

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Imprégnation:           | Gel de silice activé G. On peut aussi utiliser un gel de silice contenant un additif qui devient fluorescent sous l'effet de la lumière UV, longueur d'ondes 254 nm. |
| Épaisseur de la couche: | 0,25 mm  |
| Dimensions des plaques: | Plaques en verre 20 x 20 cm, 20 x 10 cm or 10 x 5 cm. La distance de migration optimale est d'environ 10 cm.   |

### Solutions standard

Morphine.

Codéine.

Amener toutes les solutions standard à une concentration de 1 mg/ml dans du méthanol et appliquer 5 à 10 µl de chacune sur la plaque. On peut utiliser soit un sel soit une base étant donné que les composés se déplacent toujours comme des bases libres sur les plaques CCM.

### Procédure

Déposer des taches de l'extrait (25 et 50 µl) (voir chapitre II, section B.d.) sur la plaque et la développer dans l'un des mélanges de solvants ci-après:

### Solvants de développement [8, 23]

|            |                  |    |
|------------|------------------|----|
| Mélange A: | Toluène          | 45 |
|            | Acétone          | 45 |
|            | Éthanol          | 7  |
|            | Ammoniaque conc. | 3  |
| Mélange B: | Acétate d'éthyle | 85 |
|            | Méthanol         | 10 |
|            | Ammoniaque conc. | 5  |

### Examen visuel

Les plaques doivent d'abord être séchées, soit à température ambiante soit, plus rapidement, dans un four à 120 °C pendant 10 minutes, ou à l'air chaud pulsé. Pour obtenir un bon développement des couleurs, il faut éliminer de la plaque toutes les traces d'ammoniaque ou d'autres bases. Les méthodes d'examen visuel ci-après sont recommandées [7, 8, 24]:

UV à 254 nm.

Réactif de Dragendorff.

Mélanger 2 g de sous-nitrate de bismuth (oxynitrate de bismuth), 25 ml d'acide acétique (glacial) concentré et 100 ml d'eau pour obtenir la solution A; dissoudre 40 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau pour obtenir la solution B. Mélanger 10 ml de la solution A, 10 ml de la solution B, 20 ml d'acide acétique (glacial) concentré et 100 ml d'eau pour obtenir le réactif de Dragendorff.

Réactif d'iodoplatinate de potassium acidifié.

Dissoudre 0,25 g de chlorure de platine et 5 g d'iodure de potassium dans de l'eau, pour obtenir 100 ml. Pour acidifier ce réactif d'iodoplatinate de potassium, ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique concentré.

Réactif de fluorescence [24].

- i) Tampon AMP: ajouter 105 mg de 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol à 18,8 ml d'acide chlorhydrique concentré et diluer dans de l'eau pour obtenir 1000 ml (pH  $9,3 \pm 0,2$ ).
- ii) Solution de ferrocyanure de potassium: dissoudre 58 mg de ferrocyanure de potassium dans 100 ml d'eau distillée et conserver au réfrigérateur (une semaine au maximum).

Commencer par observer la plaque à la lumière ultraviolette (UV). La morphine donne des taches oranges sur fond jaune avec le réactif de Dragendorff, des taches bleues/violettes quand on pulvérise le réactif d'iodoplatinate; elle devient fluorescente à l'exposition aux UV avec le réactif de fluorescence.

## Résultats

**Tableau II.2 Valeurs  $R_f \times 100$  [8]**

| Composé  | Système de développement |    |
|----------|--------------------------|----|
|          | A                        | B  |
| Morphine | 19                       | 20 |
| Codéine  | 40                       | 35 |

## D. Méthodes chromatographiques de confirmation

### 1. Chromatographie en phase gazeuse (CG)

#### a) Dérivatisation de l'échantillon

#### Silylation

Le spécimen d'urine est évaporé à siccité sous un jet d'azote et le résidu est dérivé avec 20  $\mu$ l de *N,O*-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA) ou de *N,O*-bis-triméthylsilylacétamide (BSA) dans une fiole fermée chauffée à 85 °C pendant 15 minutes. Une autre procédure consiste à utiliser un mélange du réactif de silylation et de pyridine (1:1, v/v) plutôt que des réactifs de silylation purs. Le mélange est directement injecté dans le chromatographe.

Si l'on se sert d'un détecteur azote - phosphore (DAP), on peut procéder à la silylation en utilisant un réactif volatil tel que le *N*-méthyl-*N*-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) ou un mélange d'hexa-méthylidisilane (HMDS), de triméthylchlorosilane (TMCS) et de pyridine. Les extraits dérivés peuvent être évaporés à siccité et le spécimen reconstitué dans un solvant sec, comme le toluène, avant injection (1-2  $\mu$ l) dans la colonne CG.

Les dérivés doivent être préparés peu de temps avant l'analyse, compte tenu du fait que les dérivés obtenus par silylation ne sont pas très stables.

#### Acylation

Ajouter 50  $\mu$ l d'anhydride pentafluoropropionique (APFP) au spécimen d'urine et chauffer le mélange pendant 30 minutes à 65 °C dans un tube scellé. Évaporer l'excès de réactif APFP à

l'aide d'un jet d'azote et reconstituer le résidu avec 50 µl d'acétate d'éthyle. Les dérivés restent stables pendant des mois dans le réactif, et au moins 24 heures après évaporation du réactif.

*b) Technique de la colonne à remplissage [8]*

*Conditions de travail*

Détecteur: DIF

**Note:** *Pour améliorer la sensibilité et la spécificité, il est recommandé d'utiliser un détecteur azote - phosphore; les paramètres de travail doivent correspondre aux recommandations du fabricant. Choisir des procédures de préparation et de dérivation des échantillons qui ne nécessitent pas l'utilisation de solvants ou de réactifs azotés dans la solution finalement injectée dans le chromatographe.*

Colonne: 2 m x 2-4 mm diam. int.  
Remplissage: a) Diméthylsilicone (SE-30, OV-1)  
b) Phénylméthylsilicone, 50 % phényle (OV-17)  
Gaz porteur: Azote à 70 ml/mn  
Températures  
de fonctionnement: Injecteur: 275 °C  
Four: 230 °C  
Détecteur: 275 °C

**Note:** *Toutes les colonnes à remplissage doivent être conditionnées avant utilisation. Normalement, la température de conditionnement doit être d'au moins 30 °C supérieure à celle prévue pour l'analyse, sauf si cela implique un dépassement de la température limite spécifiée par le fabricant, auquel cas il faut réduire l'écart de température et allonger sensiblement la durée du conditionnement. Cette opération se déroule habituellement pendant la nuit (15 heures au minimum).*

**Pendant le conditionnement, le gaz porteur circule normalement mais la colonne est déconnectée du détecteur.**

**Précautions à prendre:**

- *Silaniser fréquemment les colonnes de verre pour éviter l'adsorption de la morphine pendant les déterminations CG.*
- *Nettoyer régulièrement l'orifice d'injection et le détecteur pour éviter la décomposition des échantillons et une perte de sensibilité du détecteur.*
- *Manipuler les réactifs de silylation avec précaution car ils sont très sensibles, en particulier à l'humidité.*

*c) Technique de la colonne de gros diamètre*

*Conditions de travail*

Détecteur: DIF  
Colonne: Silice fondue, 10 m x 0,53 mm diam. int. avec phase stationnaire  
2,6 µm diméthylsilicone chimiquement liée; OV-1 par exemple.  
Gaz porteur: Hélium à 25 ml/mn  
Températures  
de fonctionnement: Injecteur: 280 °C  
Four: 260 °C  
Détecteur: 300 °C

**Note:** Une autre procédure avec colonne capillaire, également appropriée, est décrite dans le manuel des Nations Unies sur les Méthodes recommandées pour l'identification de l'opium et de la morphine brute [8]. Selon les moyens dont on dispose, les dimensions de la colonne capillaire, la phase stationnaire, son épaisseur, le gaz porteur et le débit utilisés peuvent être différents de ceux que nous indiquons ci-dessus,. Toutefois, il est généralement possible (et recommandé) d'utiliser une colonne non polaire pour l'analyse des échantillons biologiques. Les conditions de travail optimales doivent être choisies compte tenu des recommandations du fabricant.

## 2. Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM)

### a) Analyse qualitative

#### Conditions de travail

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Colonne:                        | Silice fondue, 25 m x 0.31 mm diam. int. avec phase stationnaire 0,17 $\mu\text{m}$ 5 % phénylméthylsilicone réticulée. |
| Gaz porteur:                    | Hélium à 1,8 ml/mn  |
| Températures de fonctionnement: | Injecteur: 280 °C<br>Four: 230 °C   |
| Ionisation:                     | Mode EI à 75 eV.  |

Les principaux ions présents dans le spectre de masse des dérivés triméthylsilyl de la morphine et de la nalorphine, utilisés pour le mode SIM, sont indiqués au tableau II.3 ci-après.

**Tableau II.3 Principaux ions dans le spectre de masse des standards internes, de la MAM, de la morphine et de la codéine (dérivés TMS et TFA, SIM)**

| <i>Composé</i>                        | <i>Principaux ions fragments m/z</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Morphine-diTMS                        | 414, 429                             |
| Nalorphine-diTMS                      | 441, 455                             |
| Morphine-diTFA                        | 364, 477                             |
| <i>d</i> <sub>3</sub> -Morphine-diTFA | 367, 480                             |
| MAM-TFA                               | 311, 364, 423                        |
| <i>d</i> <sub>3</sub> -MAM-TFA        | 367, 426                             |
| Codéine-TFA                           | 282, 395                             |
| <i>d</i> <sub>3</sub> -Codéine-TFA    | 285, 398                             |

### b) Analyse quantitative [25]

#### Conditions de travail

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Colonne:                        | Silice fondue, 12 m x 0,2 mm diam. int. avec phase stationnaire 0,33 $\mu\text{m}$ 100 % diméthylpolysiloxane réticulée. |
| Gaz porteur:                    | Hélium à 1,9 ml/mn   |
| Températures de fonctionnement: | Injecteur: 250 °C<br>Four: 150-300 °C à 12 °C/mn   |
| Technique d'injection:          | Sans division de flux.   |
| Ionisation:                     | Mode EI à 75 eV  |

Ions: SIM, dérivés TFA (voir tableau II.3 ci-dessus).

### *Quantification*

Étalonnage à un point sur la base des coefficients ioniques des analytes et standards internes deutérés correspondants. Codéine 395/398; morphine 364/367; MAM 423/426.

### *Extraction*

Amener 1 ml d'urine au pH 7,0 en ajoutant 3 ml de solution tampon de pH 7,00. Ajouter 100 µl de solution de 1 mg/ml de  $d_3$ -codéine,  $d_3$ -morphine et  $d_3$ -MAM et centrifuger le tout. Passer l'urine dans une colonne SPE (Bond-Elut Certify) préconditionnée avec 3 ml de méthanol et 3 ml d'eau distillée. Laver successivement la colonne avec 3 ml d'eau, 3 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) et 3 ml de méthanol. Après séchage de la colonne (sous vide, 1-2 mn), éluer les analytes avec 3 ml de dichlorométhane - isopropanol - ammoniacque concentré (80:20:2) (nouvellement préparé).

### *Dérivatisation*

Dérivés TFA: le résidu de l'éluent évaporé ( $N_2$ , 50-60 °C) est reconstitué avec 200 µl de chloroforme et 100 µl d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) centrifugé et chauffé à 70 °C pendant 15 mn. Après refroidissement et évaporation à siccité ( $N_2$ , 50-60 °C), le résidu est à nouveau dissous dans 100 µl de chloroforme et une fraction de 2 µl est injectée dans l'appareil CG-SM.

## **3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)**

Plusieurs méthodes CLHP de dosage de la morphine ont fait l'objet de publications. Diverses techniques de détection, telles que l'absorbance et la fluorescence UV sont utilisées. Certaines manquent de sensibilité ou exigent une préparation fastidieuse des échantillons. La détection électrochimique est une technique de rechange commode et sensible. Nous décrivons ci-dessous deux méthodes.

### *Conditions de travail*

#### *Méthode A [16]*

|               |   |
|---------------|---|
| Colonne:      | Silice (LiChrosorb Si-60 ou équivalent), 5 µm, 30 cm x 4 mm diam. int.        |
| Phase mobile: | Acétonitrile - méthanol - solution A - solution B (75:25:0.04:0.216, v/v/v/v) |
| Solution A:   | Mélange d'ammoniacque concentré et de méthanol (1:2, v/v)                     |
| Solution B:   | Mélange d'acide acétique glacial et de méthanol (1:1, v/v)                    |
| Débit:        | 1,3 ml/mn   |
| Détection:    | UV à 218 nm   |

#### *Méthode B [26, 27]*

|               |   |
|---------------|---|
| Colonne:      | Silice octadécyle, phase inversée, 5 µm, 25 cm x 4,6 mm diam. int.  |
| Phase mobile: | 100 ml d'acétonitrile et 900 ml de perchlorate de sodium 0,2 M/solution tampon de citrate de sodium 0,005 M (préalablement filtré à l'aide d'une membrane de 0,5 µm). |

Débit: 1,9 ml/mn  
Détection: Electrochimique (ECD), électrode de carbone vitreux.

**Note:** La méthode de détermination de la morphine-3-O-glucuronide (M-3-G) et de la morphine-6-O-glucuronide (M-6-G) dans l'urine par CLHP et détection électrochimique ou UV est mentionnée ailleurs [28, 29].

### **E. Analyse CG-SM de la monoacétylmorphine comme indicateur de la consommation d'héroïne**

Il existe plusieurs méthodes CG-SM de détection et/ou de détermination quantitative de quantités très faibles (nanogrammes) de O<sup>6</sup>-monoacétylmorphine (MAM) dans les échantillons d'urine provenant de consommateurs d'héroïne. L'une de ces méthodes [30] consiste à détecter la MAM par extraction en phase solide dans de l'urine à pH alcalin à l'aide d'une colonne octadécyle, suivie d'une transformation en dérivé pentafluoropropionyl (PFP). Le pentafluoropropionate de monoacétylmorphine est séparé et identifié par CG-SM en mode SIM, la nalorphine ou la d<sub>3</sub>-morphine servant de standards internes. Une autre méthode CG-SM [25] à base de dérivés TFA en mode SIM est décrite au chapitre II, section D.2. L'identification de la MAM permet de faire la distinction entre l'abus d'héroïne et celui de morphine, de codéine, d'opium ou de graines de pavot.

#### **1. Préparation et dérivation des échantillons**

**Note:** Ne pas hydrolyser les échantillons d'urine avant de procéder à cette analyse car leur hydrolyse - acide ou enzymatique - peut provoquer l'hydrolyse de la MAM en morphine

Ajouter 1 ml de solution tampon (pH 9) à 10 ml d'urine dans un tube à centrifugation de 25 ml. S'assurer que le pH se situe entre 8 et 9. Utiliser une colonne C-18 SPE conditionnée par lavages successifs avec 5 ml de méthanol et 5 ml d'eau distillée. Faire passer l'échantillon d'urine dans la colonne.

Laver deux fois la colonne à l'eau distillée. Ajouter une goutte d'ammoniaque concentré, puis laver à nouveau la colonne à l'eau distillée. Sécher la colonne à l'air pulsé (5 mn). Récupérer la MAM et la morphine en éluant la colonne par deux fois avec 0,75 ml de dichlorométhane et d'acétone (1:1, v/v). Évaporer l'éluat dans un tube à essai de 2 ml à 60 °C. Dissoudre le résidu dans 100 µl de dichlorométhane et d'acétone (1:1, v/v) et transvaser la solution dans un tube de 1,5 ml. Évaporer délicatement sous un jet d'azote à 65 °C.

Ajouter 50 µl d'anhydride pentafluoropropionique (PFPA). Maintenir le mélange pendant 30 mn à 65 °C dans un tube scellé. Évaporer le surplus de réactif PFPA sous un jet d'azote. Reconstituer le résidu avec 50 µl d'acétate d'éthyle. En injecter 1 µl dans l'appareil CG-SM.

Une autre technique d'extraction faisant appel à un seul solvant est décrite ailleurs [31].

#### **2. Conditions de travail**

Les conditions de travail sont les mêmes que celles décrites au chapitre II, section D.2. Pour la détection des dérivés PFP de la morphine, de la codéine et de la MAM, les ions ci-après sont contrôlés: m/z 361, 414, 445, 473 et 577. L'ion à m/z 603 est utilisé pour le standard interne.



## F. Interprétation des résultats

Lorsqu'une détection initiale par dosage immunologique donne un résultat positif, cela indique la présence d'un opiacé dans l'urine à un niveau supérieur ou égal au seuil de concentration détectable. Ce résultat doit être confirmé par une méthode sensible mais plus spécifique que le test initial. La rétention d'opiacés dans le corps et les concentrations réelles dans l'urine dépendent de facteurs tels que le métabolisme de ces drogues, la condition physique du sujet, la quantité de liquide absorbée et le mode de consommation. En général, en procédant comme indiqué précédemment, on peut détecter des opiacés dans l'urine jusqu'à trois jours après leur absorption.

L'héroïne, l'opium, la codéine ou la morphine empruntant les mêmes voies métaboliques, chacune de ces substances peut être à l'origine de la présence de morphine et de morphine-3-glucuronide dans l'urine. En outre, d'autres opiacés, notamment l'éthylmorphine, la pholcodine et la nicomorphine, peuvent également être des sources de morphine [18]. Il en découle que la présence de morphine dans un spécimen d'urine ne permet pas pour autant de savoir à quel opiacé on a affaire.

Quand les résultats de l'analyse laissent planer un doute quant à la source de la morphine, la détection et/ou la quantification du composé de départ et le profil d'excrétion d'autres métabolites majeurs peuvent fournir des informations plus précises sur la drogue consommée. Ainsi, la détection de MAM peut être considérée comme la preuve d'une consommation d'héroïne [19, 30, 32].

Dans le cas de la codéine, il est généralement admis, malgré certaines réserves, que si le ratio concentration totale de codéine/ concentration totale de morphine est inférieur à 0,5 et si la concentration totale de morphine dans l'urine est supérieure à 200 ng/ml, on peut exclure la codéine comme source de la morphine détectée [33, 34].



### III. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage des cannabinoïdes dans les échantillons biologiques

#### A. Types communs de produits à base de cannabis [9]

##### 1. Herbe de cannabis (*marijuana*)

Le cannabis (*Cannabis sativa L.*) est une plante largement répandue dans les zones tempérées et tropicales du monde entier, et la plupart des pays en ont signalé la culture et le trafic illégaux. La culture illicite à grande échelle de la plante de cannabis pour en tirer des produits à base d'herbe est pratiquée en Amérique du Nord et du Sud, dans les Caraïbes, en Afrique et en Asie du Sud-Est. Aux fins du trafic illicite, l'herbe de cannabis prend les formes les plus diverses; sa présentation varie d'une région à l'autre, mais aussi à l'intérieur des pays de chaque région.

On considère traditionnellement que seules les sommités florifères et fructifères et les feuilles de la plante de cannabis contiennent d'importantes quantités d'éléments psychoactifs (le tétrahydrocannabinol ou THC, par exemple). Vu la réputation dont elles jouissent, seules ces parties de la plante sont habituellement vendues sur les marchés illicites. Elles peuvent être récupérées sur la plante tandis que celle-ci poursuit sa croissance; ni la tige centrale ni les tiges latérales ne sont cueillies et elles ne jouent aucun rôle dans la production des substances illicites à base de cannabis. Une autre méthode consiste à couper la tige centrale au-dessous des tiges latérales feuillues les plus proches du sol. Pour le séchage à l'air ambiant, les plantes entières, ou les parties qui en ont été séparées, sont alors étalées sur le sol ou, s'il s'agit de petites quantités, dans des récipients peu profonds. Dans certains cas, les plantes entières sont suspendues la tête en bas et les parties renfermant les substances psychoactives sont récupérées après séchage. Les produits à base d'herbe se présentent sous des formes très diverses selon le traitement subi par la matière première: briques de cannabis obtenues par compression (Afrique de l'Ouest et Caraïbes); herbe en vrac (les échantillons provenant de certains pays d'Afrique centrale et australe et d'Asie du Sud-Ouest et du sud-Est se présentent souvent sous cette forme); et, plus rarement, herbe roulée en forme d'épi de maïs et enveloppée d'une fibre végétale grossière (région centrale de l'Afrique australe).

Seules les sommités fructifères et florifères sont utilisées pour les produits de qualité supérieure faisant l'objet d'un trafic. Le plus souvent, ces sommités sont ficelées autour d'une tige de bambou pour obtenir des "bâtonnets" d'un poids d'environ 2 grammes (poids brut), longs de quelque 8 centimètres, appelés "bâtonnets de Bouddha"; on les trouve sur les marchés illicites de l'Asie du Sud-Est. Lors des saisies, on les trouve fréquemment par paquets d'une vingtaine. Autre présentation courante: un petit rouleau de sommités florales enveloppé dans du papier kraft (Afrique du Sud). Ces rouleaux sont beaucoup plus petits que ceux de l'Asie du Sud-Est. Habituellement, ils contiennent moins de 0,5 grammes de cannabis et presque pas de graines, parfois aucune.

On peut obtenir un produit de haute qualité en tamisant les feuilles et les tiges de cannabis pour séparer les éléments dont la teneur en cannabinoïdes est faible, voire nulle. Cette opération permet essentiellement d'éliminer les graines et la plus grosse partie des débris végétaux. Les matières qui passent au travers du tamis proviennent des sommités fructifères et florifères de la plante. Le produit obtenu ressemble à de l'herbe finement hachée; appelé "Kif" sur le marché illicite, c'est une spécialité de l'Afrique du Nord. Sa teneur en résine de cannabis est élevée et il peut être compressé en plaquettes dont l'aspect *peut* rappeler les plaquettes de résine de cannabis produites dans la même région. Toutefois, lorsqu'elles sont examinées au microscope, ces

plaquettes présentent essentiellement les caractéristiques de l'herbe. Ce produit, en vrac ou compressé, présente les mêmes caractéristiques cannabinoïdes que les plaquettes de résine de cannabis confectionnées dans la même région.

Autre produit de qualité supérieure: la *Sinsemilla*. Dérivé de deux mots espagnols, ce vocable, signifie "sans graine". Pour obtenir la *Sinsemilla*, on ôte les plantes mâles poussant au voisinage des plantes femelles avant qu'elles ne libèrent leur pollen. On empêche ainsi la pollinisation et, partant, la production de graines par les plantes femelles. Ceux qui se livrent à la culture illicite du cannabis affirment que les parties résineuses de ces plantes ont une teneur plus élevée en substances chimiques psychoactives (THC, par exemple) que les plantes femelles normalement pollinisées. Les analyses semblent corroborer cette affirmation: on trouve de plus fortes concentrations de cannabinoïdes -notamment de THC- dans la *Sinsemilla*.

Il est intéressant de noter que l'enlèvement des plantes mâles du voisinage des plantes femelles avant la pollinisation est une pratique ancienne dans le sous-continent indien, par exemple, qui permet d'empêcher les plantes femelles de monter en graine. On obtient ainsi une meilleure récolte de "ganja", mais il subsiste invariablement quelques sommités florifères porteuses de graines; ce phénomène est dû au fait que le cannabis n'est pas une plante totalement *dioïque* et qu'il y aura toujours dans un champ de cannabis des plantes *monoïques*, c'est-à-dire capables de produire des gamètes mâles et femelles.

La *Sinsemilla* est exclusivement cultivée sur le continent américain; tous les produits saisis sur d'autres continents avaient la même provenance.

## 2. Produits à base de résine (*haschisch*)

La production de résine de cannabis est essentiellement concentrée dans deux régions du monde: les pays qui bordent la Méditerranée au sud et à l'est, et le sous-continent indien. Diverses méthodes de production existent dans ces deux régions mais, d'une manière générale, elles sont très semblables dans les pays d'une même région, d'où la présence de deux "familles" de résines de cannabis, l'une originaire des pays riverains de la Méditerranée, au sud et à l'est, et l'autre du sous-continent indien. On relève toutefois de grandes similitudes entre les méthodes de production de la résine de cannabis dans ces deux régions, notamment en matière de tamisage.

La résine originaire d'un pays d'une de ces deux régions se rapprochera beaucoup plus par son *aspect* de celle d'un autre pays de la même région que de la résine provenant d'une autre région. (La teneur des résines en cannabinoïdes peut être sensiblement différente d'une région à l'autre).

### a) Résine de cannabis des pays méditerranéens

L'herbe est battue, souvent contre un mur, pour séparer les parties qui produisent de la résine de celles qui n'en produisent pas et qui sont pauvres en éléments psychoactifs. Les particules de résine, les feuilles et les graines se détachent des parties plus fibreuses, qui sont jetées. Le reste est tamisé (les graines et les petits déchets fibreux sont éliminés). La matière ainsi obtenue a déjà une teneur élevée en résine. À ce stade, les caractéristiques végétales ne sont plus guère décelables à l'œil nu, mais un bon nombre sont encore observables au microscope. La matière se présente sous l'aspect d'une poudre fine qui est alors compressée en plaquettes. Dans certains pays (Méditerranée orientale), la matière est mise dans des sacs de toile avant d'être compressée; dans d'autres (Afrique du Nord), elle est emballée dans de la cellulose avant compression. Dans un secteur (Nord-Est de la Méditerranée), cette poudre est parfois vendue telle quelle sur le marché illicite.

### *b) Résine de cannabis du sous-continent indien*

Dans le sous-continent indien, les méthodes de production sont différentes. Les sommités fructifères et florifères des plantes de cannabis cultivées dans cette région ont une si forte teneur en résine qu'elles sont poisseuses au toucher. Lorsqu'on frotte la plante entre les mains, la résine reste collée à la paume.

De ce fait, dans les pays du sous-continent indien, la résine de cannabis est obtenue par diverses méthodes de frottage et de malaxage, et non par battage. Les méthodes décrites ci-après sont caractéristiques.

Une méthode lente et laborieuse consiste à frotter entre les paumes des mains les parties de la plante porteuses de résine. Une mince couche de résine se dépose peu à peu sur les paumes. Quand toute la résine a été extraite, le reste est jeté (on le conserve parfois, notamment pour en faire des infusions). La résine accumulée sur les paumes est recueillie à l'aide d'un grattoir en métal et placée dans un récipient. L'opération est répétée plusieurs fois et, peu à peu, le récipient se remplit. La matière obtenue est alors compressée pour confectionner des plaquettes, des bâtonnets, des boulettes, ou tout autre forme, selon les préférences des consommateurs locaux.

Une autre méthode consiste à frotter les sommités florifères et fructifères sur une surface en caoutchouc. La résine s'y dépose et est recueillie à l'aide d'un grattoir; elle sert à confectionner des plaquettes. Une variante consiste pour le récoltant à arpenter un champ de cannabis revêtu d'une casaque de caoutchouc, de cuir ou autre matériau comparable. La résine s'agglutine sur sa casaque à chaque frottement des sommités occasionné par son passage. Elle est ensuite récupérée et façonnée (voir ci-dessus).

On peut ramasser les sommités florifères et fructifères suivant le même procédé que celui utilisé pour la production de l'herbe de cannabis. On les laisse sécher, puis on les écrase entre les doigts pour les réduire en une poudre grossière qui est alors tamisée pour lui donner une finesse comparable à celle de la poudre produite dans la région méditerranéenne. Cette poudre fine, de couleur verte, est alors entreposée dans des sacs de cuir pendant quatre à cinq mois, jusqu'au retour de la saison chaude. Elle est alors brièvement exposée au soleil, juste le temps qu'il faut pour que la résine fonde. Elle est de nouveau entreposée pendant quelques jours dans des sacs de cuir avant d'être récupérée, puis pétrie à l'aide de baguettes de bois jusqu'à l'apparition en surface d'une substance huileuse. Le pétrissage est poursuivi jusqu'à l'obtention d'une matière dont la consistance se prête au pressage en plaquettes.

Dans certaines localités du sous-continent indien, on use d'une méthode complètement différente, qui ne donne que de petites quantités de résine. La plante, à l'exception des tiges principales, est plongée dans de l'eau bouillante. La résine se sépare des sommités florifères et fructifères (procédé comparable à celui par lequel les graisses animales sont séparées de la chair lorsqu'on fait bouillir de la viande). Le cannabis ainsi extrait est jeté (on le conserve parfois à des fins culinaires). Quand le bouillon refroidit, une couche de résine solidifiée se forme à la surface. Cette résine est récupérée et façonnée (plaquettes ou toute autre forme, selon la demande). L'inconvénient de cette méthode est que de l'eau se mêle à la résine et que, souvent, les plaquettes moisissent avec le temps.

### **3. Cannabis liquide (huile de haschisch)**

Le cannabis liquide est extrait de l'herbe ou de la résine de la plante; il est souvent concentré avant d'être écoulé sur le marché illicite. C'est précisément cette possibilité de concentration des éléments psychoactifs (le THC, par exemple) qui motivent les trafiquants, car ils peuvent dissimuler de plus grandes quantités de produit dans un volume réduit et se servir de cachettes dans lesquelles il serait difficile d'introduire de l'herbe ou de la résine. En outre, il est

plus facile de sceller hermétiquement les conteneurs et, ce faisant, d'amoindrir les risques d'une détection par l'odeur.

Le cannabis liquide, extrait de l'herbe ou de la résine, est obtenu selon un procédé de percolation comparable à celui qui permet de faire du café. On peut aussi comparer ce procédé à l'extraction par Soxhlet effectuée en laboratoire pour séparer les substances chimiques des matières solides, avec reflux continu du solvant d'extraction.

## **B. Description des produits illicites à base de cannabis**

### ***1. Noms et synonymes***

Les synonymes des produits illicites tirés du cannabis sont si nombreux que leur énumération exhaustive déborderait le cadre du présent manuel. Il est conseillé au lecteur de se reporter à la publication de l'ONU sur ce sujet, intitulée *Dictionnaire multilingue des stupéfiants et des substances psychotropes placés sous contrôle international* (ST/NAR/1/Rev.2).

### ***2. Aspect et caractéristiques chimiques des produits illicites à base de cannabis***

Soulignons d'emblée qu'il n'existe pas deux produits dérivés du cannabis qui aient exactement la même apparence. Tirés d'une matière première naturelle extrêmement variable, traités par lots selon les procédés les plus divers, puis transformés selon les besoins du marché illicite, il n'est guère surprenant que ces produits se présentent sous des formes aussi multiples. Nous ne décrivons dans le présent document que les plus courants. Le fait qu'un spécimen soumis à une analyse en laboratoire ne ressemble en rien à l'un des produits décrits ci-dessous ne signifie pas pour autant qu'il ne s'agit pas de cannabis ou d'un produit dérivé.

#### ***a) Herbe de cannabis (Marie-Jeanne ou Marijuana)***

##### ***Cannabis des régions tempérées***

Le cannabis cultivé en Europe, en Amérique du Nord et dans les régions australes de l'hémisphère Sud est d'un vert vif pendant la pousse. Une fois récolté, il peut virer au jaune, plus rarement au brun. En général, ses sommités florifères et fructifères ne contiennent pas de résine et, à la différence de celles du sous-continent indien, elles ne sont pas poisseuses si on les presse dans le creux de la main, ce qui explique qu'il soit difficile de les compresser en plaquettes, comme on le fait de celles qui proviennent d'Afrique de l'Ouest, par exemple. On constate invariablement la présence de graines. Le cannabis européen a plus de feuilles que le cannabis d'Amérique du Nord, caractérisé par une prédominance des sommités florifères et fructifères.

Caractéristiques chimiques: elles sont très variables du fait que les graines ont été importées, souvent illicitement, de nombreuses régions du monde où le cannabis pousse à l'état sauvage. Ces espèces ont des teneurs en cannabinoïdes différentes, avec et sans CBD ou THV.

##### ***Cannabis des zones tropicales***

###### ***Cannabis d'Afrique du Nord***

Il fait rarement l'objet d'un trafic à l'extérieur de la région; il se présente sous la forme d'une herbe hâchée menu, de couleur vert clair ou vert jaunâtre, qui ne contient ni graines ni matières fibreuses.

Caractéristiques chimiques: elles sont identiques à celles de la résine produite dans la région, c'est-à-dire que la teneur en THV et en CBD est faible par rapport à la teneur en THC.

### *Cannabis d'Afrique de l'Ouest et des Caraïbes*

Sur pied, le cannabis est vert; une fois récolté et séché il vire au brun, mais certains échantillons conservent leur couleur verte; ce phénomène est plus courant pour le cannabis des Caraïbes que pour celui de l'Afrique de l'Ouest, dont il est rare de trouver des échantillons séchés qui ne soient pas de couleur brune. À part leur couleur, ces deux types de cannabis ont un aspect et des caractéristiques chimiques très proches. Dans certains échantillons ouest-africains, les sommités florifères et fructifères ont été détruites en cours de traitement; de nombreuses graines d'un brun foncé sont visibles dans le produit comprimé.

Jusqu'à ces dernières années, le cannabis des Caraïbes était de médiocre qualité car il comportait beaucoup de brindilles contenant peu d'éléments psychoactifs, voire aucun. On note une tendance récente à la production de *Sinsemilla* mais les échantillons saisis à ce jour n'étaient jamais complètement débarrassés de graines, même s'ils contenaient très peu d'éléments non psychoactifs et si leur teneur en sommités florifères et fructifères était parfois comparable à celle des échantillons de *Sinsemilla* en provenance d'Amérique du Nord.

Caractéristiques chimiques: Aucun des deux types ne contient de CBD et le rapport THV-THC est faible.

### *Cannabis d'Afrique centrale*

La plupart des échantillons de cannabis en provenance de cette région sont comparables à ceux de l'Afrique de l'Ouest, mais quelques-uns ressemblent à ceux de l'Afrique australe.

Caractéristiques chimiques: Pour ce qui est de la teneur en cannabinoïdes, les échantillons de couleur brune sont comparables à ceux de l'Afrique de l'Ouest et les échantillons de couleur verte à ceux de l'Afrique australe.

### *Cannabis d'Afrique australe*

Séché et préparé pour le marché illicite, le cannabis d'Afrique australe ressemble généralement au cannabis cultivé dans les zones tempérées. Il est beaucoup plus vert et contient plus de feuilles que le cannabis ouest-africain.

Caractéristiques chimiques: pas de CBD; quantités à peu près égales de THV et de THC.

### *Cannabis d'Amérique du Sud*

Il est comparable au cannabis des Caraïbes; les échantillons sont d'une qualité extrêmement variable: certains contiennent une forte proportion de matières fibreuses sans éléments psychoactifs, tandis que d'autres, du type *Sinsemilla*, sont constitués exclusivement de sommités florifères et fructifères.

Caractéristiques chimiques: comparables à celles du cannabis des Caraïbes. Il arrive qu'un échantillon contienne une petite quantité de CBD.

### *Cannabis du sous-continent indien*

Trois variétés font l'objet d'un trafic illicite: 1) produit à base de sommités florifères et fructifères, de couleur brune, riche en résine et poisseux au contact des doigts; 2) variété d'un vert foncé brunâtre semblable à certains échantillons de l'Afrique de l'Ouest; et 3) variété de couleur verte, principalement à base de feuilles, sans sommités florifères ou fructifères.

Caractéristiques chimiques: 1) présence de CBD, de THC et de THV en quantités à peu près égales; 2) ressemblance avec le cannabis ouest-africain et; 3) caractéristiques similaires à celles de la variété 1, mais faible teneur en cannabinoïdes.

### *Cannabis d'Asie du Sud-Est*

“Bâtonnets de Bouddha” — voir chapitre III, section A.1

Caractéristiques chimiques: ne contient habituellement que du THC; pas de CBD; quantité négligeable de THV.

## *b) Produits à base de résine de cannabis*

### *Résine de cannabis nord-africaine*

Minces plaquettes rectangulaires d'un brun jaunâtre enveloppées de cellophane portant rarement une marque, mais parfois un sceau.

Récemment est apparu un produit qui rappelle la résine de cannabis originaire du sous-continent indien: en surface, la plaquette est presque noire, elle est d'un brun jaunâtre plus soutenu à l'intérieur. Ce produit se présente sous la forme d'une savonnette entourée de cellophane qui ne porte aucune marque (certains échantillons portent un sceau).

Caractéristiques chimiques: la teneur en CBC est habituellement faible par rapport au THC; très peu de THV. Les quantités d'acides cannabinoïdes varient d'une saisie à l'autre.

### *Résine de cannabis de la zone orientale du bassin méditerranéen*

D'un brun rougeâtre et pulvérulente. Sur le marché illicite, elle se présente toujours emballée dans de la toile, invariablement de couleur blanche, portant occasionnellement un marquage au tampon encreur. Depuis quelques années, la toile peut être de couleur vive, avec ou sans marquage au tampon encreur. Les plaquettes peuvent peser jusqu'à 500 grammes, voire un kilo. Une fois déballée, la résine porte l'empreinte de la toile.

Caractéristiques chimiques: aucune autre résine de cannabis ne contient autant de CBD. La teneur en THV est très faible. Des acides, essentiellement de l'acide cannabiodiolique, sont également présents, et en plus grandes quantités que dans n'importe quelle autre résine de cannabis.

### *Résine de cannabis de la zone nord-est du bassin méditerranéen*

Poudre d'un brun verdâtre ou (rarement) petites gaufrettes minces et friables enveloppées de cellophane.

Caractéristiques chimiques: beaucoup moins de CBD que de THC. Faible teneur en THV. Présence d'acides en grandes quantités.

### *Résine de cannabis du sous-continent indien*

La production est très variée. Quantitativement, les plaquettes rectangulaires, noires en surface et d'un brun foncé à l'intérieur, originaires du nord-ouest du sous-continent, l'emportent sur toutes les autres variétés. Elles portent fréquemment en surface une marque en relief et sont souvent enveloppées de cellophane de couleur foncée avant d'être mises sur le marché illicite. Quelques-unes sont carrées. L'épaisseur des plaquettes va de 5 à 20 mm; fraîches, elles sont odorantes et souples. Avec le temps, elles perdent leur odeur et deviennent friables. Leur poids est habituellement de 250 g, 500 g ou 1 kg, mais il arrive qu'elles soient plus lourdes. Les plaquettes produites dans le nord du sous-continent sont souvent moisies et s'effritent facilement.

La résine de cannabis du sous-continent indien peut aussi se présenter sous forme de bâtonnets (souvent en paquets), de boulettes (1 cm de diamètre), de boules (8 cm de diamètre), ou de morceaux disparates. Tous ces produits sont noirs ou brun foncé en surface et vert foncé ou brun foncé à l'intérieur.

Caractéristiques chimiques: aussi variées que l'aspect. En général, la teneur en acide cannabinoïde est plus faible que pour la résine de cannabis du bassin méditerranéen. La variété en plaquettes contient moins de cannabidiol que la résine de la Méditerranée orientale, mais davantage que celle d'Afrique du Nord; la teneur en cannabidiol peut être très faible, voire nulle, dans d'autres variétés. Habituellement, la teneur en THV est faible, mais certaines variétés



contiennent plus de THC que toute autre résine de cannabis et sont donc vendues plus cher sur le marché illicite.

### c) Cannabis liquide (huile de haschisch)

Le cannabis liquide est une huile visqueuse, de couleur sombre, à l'odeur caractéristique. Dilué aux solvants organiques, il donne une solution de couleur verte ou brune. La couleur n'est pas nécessairement une indication d'origine car elle peut varier selon la maturité de la plante et le solvant utilisé. En général, le cannabis liquide qui donne une solution verte une fois dilué a été préparé à partir de l'herbe et celui qui donne une solution brune est dérivé de la résine. Le cannabis liquide n'est pas soluble dans l'eau; si l'on ajoute de l'eau à du cannabis liquide qui a été dilué avec de l'éthanol, par exemple, on obtient une émulsion.

Lorsque le cannabis liquide n'est pas concentré avant d'être mis sur le marché illicite, il a la consistance (et souvent l'odeur) d'un solvant organique de couleur verte ou brune.

Caractéristiques chimiques: à une importante différence près, à savoir qu'il ne contient pas d'acides cannabinoïdes, le cannabis liquide a une teneur en cannabinoïdes semblable à celle de l'herbe ou de la résine dont il a été extrait. Les principaux producteurs sont les pays du bassin méditerranéen et du sous-continent indien également producteurs de résine de cannabis et ceux des Caraïbes producteurs d'herbe de cannabis. La teneur en cannabinoïdes neutres du cannabis liquide originaire de ces pays est semblable à celle de la résine ou de l'herbe de même origine. Toutefois, les cannabinoïdes constituent une portion bien plus importante de la substance.

Les teneurs types en THC de ces trois produits illicites tirés du cannabis sont:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Herbe de cannabis:  | 0,5–5 % |
| Résine de cannabis: | 2–10 %  |
| Cannabis liquide:   | 10–30 % |

Il est à noter que ces valeurs ne sont qu'indicatives des niveaux auxquels l'analyste peut s'attendre. Bien souvent, la teneur en THC des échantillons d'herbe, de résine ou de cannabis liquide sera supérieure.

Indépendamment des cannabinoïdes neutres, les spécimens saisis pourront contenir, dans des proportions très variables, les acides cannabinoïdes correspondants. Bien qu'il ne semble pas y avoir de relation constante entre l'origine du produit et sa composition et sa teneur réelles en acides cannabinoïdes, le chimiste aura peut-être, selon la législation de son pays, à démontrer la présence de ces acides ou à en déterminer la teneur respective dans l'échantillon étudié.

Le lecteur pourra aussi se reporter aux divers manuels et articles spécialisés qui traitent en détail de la chimie des cannabinoïdes [35-37].

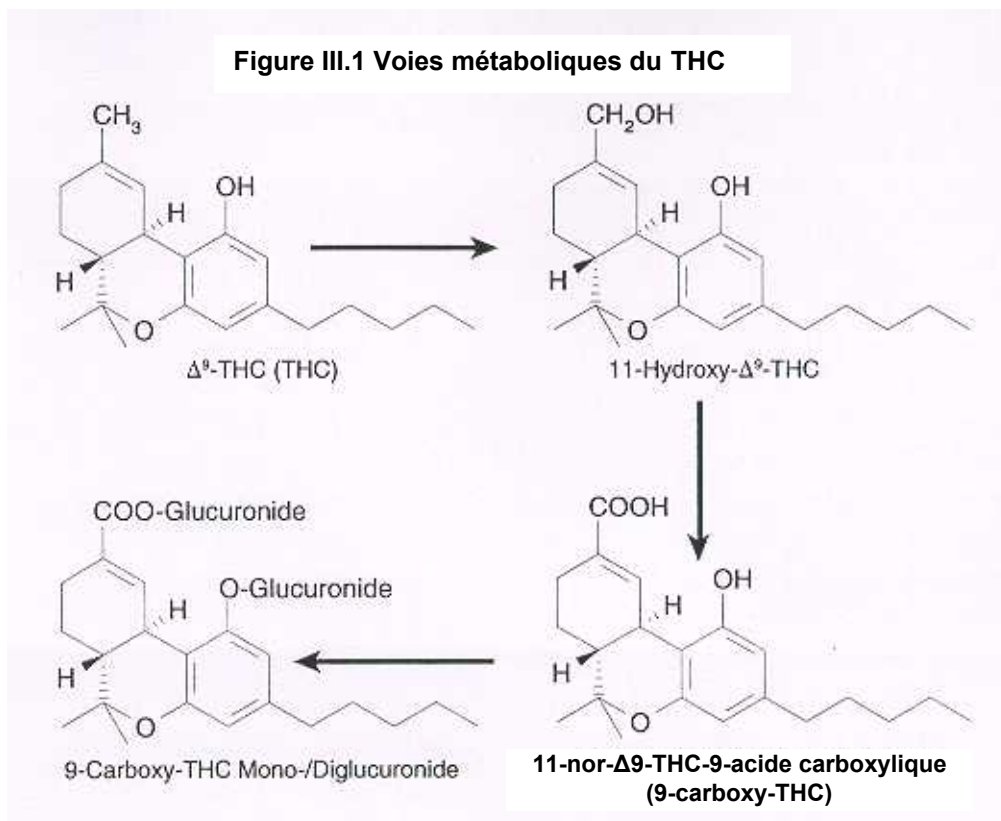
Le cannabis contient un mélange complexe de nombreuses substances chimiques spécifiques appelées cannabinoïdes. Les quatre principaux sont les suivants:

- Δ-9-tétrahydrocannabinol (THC)
- Cannabinol (CBN)
- Cannabidiol (CBD)
- Cannabichromène (CBCh).

C'est essentiellement au THC que les produits tirés du cannabis doivent leurs effets psychiques caractéristiques; aussi est-il le seul cannabinoïde intéressant dans le présent contexte.

### 3. Modes de consommation, métabolisme et excrétion du THC [38, 39]

Les produits illicites extraits du cannabis sont le plus souvent fumés, parfois ingérés. Une bonne part du THC est métabolisée dans l'organisme et moins de 1 % se retrouve, non transformé, dans les urines. Chez les fumeurs d'herbe de cannabis, le métabolisme commence dans les poumons; chez ceux qui l'ingèrent, il commence dans le foie. Les voies métaboliques du THC sont décrites à la figure III.1.



Dans les 72 heures qui suivent l'inhalation, environ 50 % du THC est excrété sous forme de métabolites et les 50 % restants se dispersent à travers le corps, où ils sont en grande partie absorbés par les tissus graisseux et excrétés lentement en quelques jours, principalement dans l'urine (25 %) et les matières fécales (65 %).

Bien qu'on ait identifié à ce jour plus d'une vingtaine de métabolites du THC, les principaux composés apparaissant dans les urines résultent de l'oxydation à la position C-11 et de la glucuronidation. Le principal métabolite acide est le 11-nor- $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol-9-acide carboxylique (9-carboxy-THC), qui est converti en conjugués mono- et di-glucuronides, principales formes de métabolites excrétés dans l'urine. De ce fait, la détection de 9-carboxy-THC dans l'urine est considérée comme le meilleur indice de la consommation de cannabis.

La concentration plasmatique du THC diminue rapidement du fait qu'il est métabolisé et emmagasiné dans les tissus. Toutefois, sa demi-vie dans l'organisme est longue, puisqu'elle est habituellement de plus de 20 heures. De ce fait, le THC reste présent dans le corps pendant des heures, voire des jours, et l'excrétion de 9-carboxy-THC prend un certain temps. Le schéma d'excrétion urinaire du fumeur occasionnel est différent de celui du fumeur chronique. Chez le premier, le métabolite est détectable dans l'urine pendant un à trois jours, selon la méthode d'analyse appliquée, tandis que chez le second, il reste détectable une semaine après la dernière ingestion, voire davantage.

## **C. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage du 9-carboxy-THC**

Se référer aux procédures d'échantillonnage décrites au chapitre I, sections C et G.5.

### *Précautions à prendre*

Certaines précautions s'imposent lors du dosage du 9-carboxy-THC dans les échantillons d'urine. Les métabolites des cannabinoïdes se dégradent assez rapidement à la chaleur et la teneur en 9-carboxy-THC, le principal métabolite, peut grandement diminuer, même à température ambiante, en une semaine, voire baisser jusqu'à 45 % en six mois [40, 41]. Cette dégradation dépend de facteurs tels que l'oxydation, la quantité d'urine et le récipient utilisé. On signale également l'absorption irréversible de 9-carboxy-THC par divers types de récipients qui sont source de déperditions considérables.

### **1. Préparation des échantillons pour le dosage immunologique**

En général, le dosage immunologique requiert fort peu de préparation, voire aucune (voir aussi chapitre I, section G.5).

### **2. Préparation des échantillons pour la chromatographie**

#### *a) Hydrolyse*

Le métabolite cannabinoïde excrété (9-carboxy-THC) se retrouve dans une proportion de plus de 80 % dans l'urine, sous la forme d'un conjugué glucuronide. Pour libérer le métabolite, il faut hydrolyser l'urine par un procédé alcalin ou enzymatique. L'hydrolyse alcaline est considérée comme plus efficace et mieux reproductible que l'hydrolyse acide ou enzymatique [42, 43].

À l'aide d'une pipette, prélever 10 ml d'urine dans le récipient d'origine et transvaser dans tube à opercule de verre. Pour les méthodes nécessitant un standard interne (CG, CG-SM, CLHP), celui-ci devra également être introduit dans le tube. Ajouter 2 ml d'hydroxyde de potassium 10 N, fermer le tube et maintenir à 50 °C pendant 20 minutes en remuant de temps à autre.

À ce stade, on peut procéder à une seule extraction à l'aide d'une solution de 20 ml de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (7:1, v/v) à des fins de nettoyage, surtout avant analyse par CG, CG-SM et CLHP, afin d'éliminer toutes les impuretés neutres et basiques.

#### *b) Extraction*

La procédure d'extraction devra être efficace et sélective. Il faut absolument obtenir un bon taux de récupération des cannabinoïdes car leur concentration dans les échantillons est très faible. Un haut degré de sélectivité permettra d'éliminer les substances dont la présence dans l'urine brouille les résultats.

L'extraction du 9-carboxy-THC de l'urine hydrolysée est effectuée à un pH acide pour que le métabolite soit soluble dans les solvants organiques utilisés. Les solvants ou mélanges de solvants couramment utilisés pour les méthodes d'extraction liquide-liquide et ayant fait l'objet de publications sont l'éther de pétrole, l'hexane, l'éther, le chloroforme et les mélanges d'hexane et d'acétate d'éthyle. Diverses méthodes d'extraction en phase solide ont également été proposées dans la littérature.

#### *Extraction liquide-liquide*

Une fois l'échantillon refroidi après l'hydrolyse, amener son pH à 2 à l'aide de 2 N HCl ou de 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ajouter 15 ml d'un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (7:1, v/v) et extraire la solution par agitation mécanique pendant 10 minutes. Enlever la couche organique et la filtrer au travers d'une petite quantité de sulfate de sodium sec dans un tube conique, laver le filtre avec 5 ml de solvant et évaporer à siccité à température ambiante sous un jet d'air ou d'azote. Dissoudre à nouveau le résidu obtenu dans 0,2 ml de méthanol ou un mélange acétonitrile - méthanol (3:1, v/v) par agitation ou sonication.

### *Phase solide*

L'extraction peut aussi être effectuée en phase solide. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un adsorbant chimiquement lié à phase inversée (silice modifiée), en suivant strictement les instructions du fabricant. Selon certaines publications, ces méthodes donnent des taux de récupération élevés [44, 45]; l'une d'elle est décrite ci-après.

Préparer les colonnes en les rinçant lentement, avec des doses de 3 ml de méthanol et d'eau, alternativement et par deux fois, une seringue en matière plastique d'une contenance de 10 ml attachée à la colonne faisant office de réservoir. Mettre sous vide peu poussé pour accélérer le débit. Faire passer l'urine hydrolysée (2 ml) dans la colonne et laver avec 10 ml de HCl 0,1 N et 25 ml d'acide phosphorique 50 mM dans de l'acétonitrile 10 %. Éluer le 9-carboxy-THC avec 1 ml d'acétone. Évaporer le solvant sous un jet d'azote et dissoudre à nouveau le résidu obtenu dans 0,1 ml de méthanol.

Une nouvelle procédure, simple et rapide, de préparation et de purification des échantillons pour les méthodes CG et CG-SM utilisant le disque d'extraction en phase solide (microcolonne) et la dérivation sur disque (ODD) est décrite ailleurs [46].

### *c) Standards internes*

Les standards internes doivent correspondre aux critères énumérés au chapitre II, section G.6. Le cannabinoïde (CBN), l'oxyphénbutazone ou le kétoprofène conviennent pour la plupart des méthodes CG. Pour la méthode CG-SM, il est recommandé d'utiliser des analogues du 9-carboxy-THC deutérés (d<sub>3</sub> ou d<sub>6</sub>) si l'on peut s'en procurer. Le cannabinoïde et le n-octyl-p-hydroxybenzoate conviennent pour la CLHP.

Préparation de solutions standard internes:

Préparer une solution mère dans de l'éthanol à 100 % contenant 1 mg/ml de cannabinoïde. Transvaser 1 ml de cette solution dans une fiole standard de 200 ml et compléter jusqu'au repère avec de l'éthanol à 100 % (1 ml de solution standard interne = 5 µg de cannabinoïde).

### *d) Solution standard*

La quantification n'étant habituellement pas nécessaire, la solution de 9-carboxy-THC disponible est utilisée pour l'identification du métabolite dans l'urine.

## **D. Méthodes de détection**

### ***1. Méthodes des dosages immunologiques***

Il est recommandé aux laboratoires qui ont accès à ces techniques de recourir pour la détection initiale aux dosages immunologiques. Divers types de trousse de dosages immunologiques sont vendues dans le commerce pour la détection de cannabinoïdes dans l'urine [47, 48]. Tous les dosages immunologiques détectent le 9-carboxy-THC et ont une réactivité croisée moyenne à élevée avec d'autres métabolites urinaires du THC à noyau dibenzopyranne (tels que 11-hydroxy-THC) [49, 50]. Tous les résultats positifs doivent être confirmés par un second dosage du spécimen original faisant appel à des méthodes fondées sur des techniques et

des principes chimiques différents. Ces dosages devront être plus spécifiques et au moins aussi sensibles. On trouvera au tableau III.1 un résumé des réactivités croisées de certains dosages du commerce.

**Tableau III.1 Réactivités croisées de dosages immunologiques vendus dans le commerce pour la détection du cannabis**

| Dosage           | Réactivité croisée (%)   |                |           |            |
|------------------|--------------------------|----------------|-----------|------------|
|                  | 9-Carboxy-THC            | 11-Hydroxy-THC | THC       | CBN        |
| EMIT-d.a.u       | 100 (50) <sup>a,d</sup>  | 56 (90)        | ---       | ---        |
| FPIA-TDx         | 100 (100) <sup>b,c</sup> | 36 (277)       | 15 (655)  | 11 (899)   |
| Abuscreen-Ontrak | 100 (100) <sup>b,d</sup> | 40 (250)       | 14 (714)  | 1 (10 640) |
| Abuscreen-Online | 100 (100) <sup>b,d</sup> | >100 (50)      | 3 (3 000) | 5 (2 000)  |

<sup>a,b</sup> Réactivité croisée = concentration cible (50a/100b ng/ml)/ concentration équivalant à 50a/100b ng/ml) de 9-carboxy-THC x 100 (entre parenthèses, équivalents ng/ml).

<sup>c</sup> M. A. ElSohly [50].

<sup>d</sup> Indications du fabricant.

## 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

### Technique standard

Les matériels et procédures CCM standard sont décrits en détail dans le manuel des Nations Unies intitulé *Méthodes recommandées pour l'identification du cannabis* [9]. Ils conviennent pour l'analyse des spécimens biologiques aux fins de la détection du 9-carboxy-THC.

### Plaques CCM

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Imprégnation:           | Gel de silice activé G. On peut aussi utiliser un gel de silice contenant un additif devenant fluorescent sous l'effet de la lumière UV, longueur d'onde 254 nm. |
| Épaisseur de la couche: | 0,25 mm  |
| Dimensions des plaques: | Plaques en verre de 20 x 20 cm, 20 x 10 cm ou 10 x 5 cm. La distance de migration optimale est d'environ 10 cm.  |

### Procédure

Une solution reconstituée à 25-50 µl est déposée sur la plaque, ainsi qu'une solution standard de 9-carboxy-THC. On procède alors au développement à l'aide des mélanges de solvants suivants:

### Solvants de développement

|                 |                  |     |
|-----------------|------------------|-----|
| Mélange A [51]: | Acétate d'éthyle | 12  |
|                 | Méthanol         | 5   |
|                 | Ammoniaque conc. | 1   |
|                 | Eau              | 0,5 |
| Mélange B [52]: | Chloroforme      | 70  |

Méthanol 30  
Ammoniaque conc. 2

### Examen visuel

Les plaques doivent d'abord être séchées, soit à température ambiante soit, plus rapidement, dans un four à 120 °C pendant 10 minutes, ou à l'air chaud pulsé. Pour obtenir un bon développement des couleurs, il faut éliminer de la plaque toutes les traces d'ammoniaque ou d'autres bases. Les méthodes d'examen visuel ci-après sont recommandées:

Réactif à vaporiser:

Solution aqueuse à 0,1 % de sel de bleu solide B. Cette solution doit être fraîche; il est conseillé de la préparer une fois par jour.

Pour obtenir un bon développement des couleurs, il faut alcaliniser la plaque CCM. À cet effet, on peut l'exposer à des vapeurs d'ammoniaque ou de diéthylamine après vaporisation. La plaque est alors séchée à l'air chaud. Le 9-carboxy-THC apparaît sous la forme d'une tache rose pâle ou rose foncé ayant la même valeur  $R_f$  que la tache standard de 9-carboxy-THC.

**Note:** Selon certains experts, le sel de bleu solide B serait carcinogène et le sel de bleu solide BB moins suspect [53]. On pourrait donc de préférence vaporiser la plaque avec une solution fraîchement préparée de sel de bleu solide BB dans de l'hydroxyde de sodium 0,1 M (0,75 mg/10 ml) puis sécher pour permettre un développement satisfaisant de la coloration et obtenir une bonne stabilité.

### Résultats

**Tableau III.2 Valeurs  $R_f$  x 100**

| Composé       | Système de développement |       |
|---------------|--------------------------|-------|
|               | A                        | B     |
| 9-Carboxy-THC | 35-40                    | 25-38 |

Ces valeurs peuvent varier selon les conditions de manipulation en laboratoire (humidité, température, courants d'air) et autres paramètres (comme la qualité des matériaux utilisés).

## E. Méthodes chromatographiques de confirmation

### 1. Chromatographie en phase gazeuse (CG)

#### a) Dérivatisation de l'échantillon

Le spécimen d'urine est évaporé à siccité sous un jet d'azote et 50 µl de N,O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA) et de triméthylchlorosilane (TMCS) sont ajoutés dans le tube, qui est centrifugé et chauffé à 60 °C pendant 10 minutes. On peut aussi utiliser un mélange MSTFA/TMCS [39, 54] ou MTBSTFA/ TBDMS [55, 56]. Le t-butyldiméthylsilyl-trifluoroacétamide (MTBSTFA) est plus réactif et les dérivés TBDMS obtenus sont plus stables et se montrent plus sensibles lorsque la méthode CG-SM est celle appliquée.

Vu le dérivé diméthylé du 9-carboxy-THC, on peut procéder d'une autre façon, en utilisant de l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) [57, 58]. Dans ce cas, on ajoute au résidu sec 70 µl de TMAH-diméthylsulfoxyde à 10 % (1:20, v/v) puis, après 2 minutes, 5 µl d'iodure de méthyle; 10 minutes plus tard, on ajoute 200 µl d'acide chlorhydrique 0,1 N et on extrait la solution avec 2 ml d'isooctane. La couche d'isooctane est séparée et évaporée sous un jet

d'azote. Le résidu est reconstitué dans 50 µl de solvant; 1 à 2 µl de la solution dérivée est injectée.

*b) Technique de la colonne à remplissage [57]*

*Conditions de travail*

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Détecteur:                      | DIF   |
| Colonne:                        | 2 m x 2 mm diam. int.   |
| Remplissage:                    | a) 3 % diméthylsilicone (OV-1)<br>b) 3 % phénylméthylsilicone, 50 % phényle (OV-17) |
| Gaz porteur:                    | Azote ou hélium à 30 ml/mn  |
| Températures de fonctionnement: | Injecteur: 260 °C<br>Four: 255 °C<br>Détecteur: 275 °C                              |

**Note:** *Toutes les colonnes à remplissage doivent être conditionnées avant utilisation. Normalement, la température de conditionnement doit être supérieure d'au moins 30 °C à celle prévue pour l'analyse, sauf si cela implique un dépassement de la température limite spécifiée par le fabricant, auquel cas il faut réduire l'écart de température et allonger sensiblement la durée du conditionnement. Cette opération se déroule habituellement pendant la nuit (15 heures au minimum).*

**Pendant le conditionnement, le gaz porteur circule normalement mais la colonne est déconnectée du détecteur.**

**Précautions à prendre:**

- *Silaniser fréquemment les colonnes de verre pour éviter l'adsorption de la morphine pendant les déterminations CG.*
- *Nettoyer régulièrement l'orifice d'injection et le détecteur pour éviter la décomposition des échantillons et une perte de sensibilité du détecteur.*
- *Manipuler les réactifs de silylation avec précaution car ils sont très sensibles, en particulier à l'humidité.*

*c) Technique de la colonne de gros diamètre [58]*

*Conditions de travail*

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Détecteur :                     | DIF   |
| Colonne:                        | Silice fondue, 10 m x 0,52 mm diam. int. avec phase stationnaire 2,6 µm diméthylsilicone chimiquement liée, OV-1 par exemple. |
| Gaz porteur:                    | Hélium à 2 ml/mn  |
| Technique d'injection:          | Avec/sans division de flux  |
| Températures de fonctionnement: | Injecteur: 290 °C<br>Four: 240 °C<br>Détecteur: 290 °C  |

**2. Chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse (CG-SM)**

*Conditions de travail [46, 56, 59, 60]*

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Colonne:                    | Silice fondue, 10-30 m x 0,18-0,25 mm diam. int. avec phase stationnaire 0,25 $\mu$ m phénylméthyle ou diméthylpolysiloxane chimiquement liée. |
| Gaz porteur:                | Hélium à 2 ml/mn   |
| Température de la colonne:  | 150-220 °C à 270-290 °C à 5-25 °C/mn   |
| Température de l'injecteur: | 250-260 °C, sans division de flux  |
| Ionisation:                 | Mode EI ou CI  |

#### *Standards internes*

Analogues du 9-carboxy-THC deutérés ( $d^3$  ou  $d^6$ ) ou standards non isotopiques (acide méclofénamique, par exemple)

#### *Extraction*

En phase solide [46, 59, 60] ou liquide/liquide [56].

#### *Dérivatisation*

Avec BSTFA ou MSTFA (dérivés TMS) [46, 59], MTBSTFA (dérivés TBDMS) [56] ou hydroxyde de triméthylammonium (dérivés méthylés) [60].



**Tableau III.3 Principaux ions présents dans les spectres de masse des dérivés du 9-carboxy-THC (SIM)**

| <i>Composé</i>                 | <i>Principaux fragments ioniques (m/z)</i> |
|--------------------------------|--|
| Dérivé 9-Carboxy-THC diméthyle | 372 (M+), 357, 313                         |
| 9-Carboxy-THC-diTMS            | 488 (M+), 473, 371                         |
| 9-Carboxy-THC-diTMSa           | 489 (M+), 399, 371                         |
| 9-Carboxy-THC-diTBDMS          | 572 (M+), 557, 515, 413                    |

<sup>a</sup> (Mode CI, isobutane comme gaz réactif).

### **3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)**

La CLHP sur colonne à phase inversée avec détection aux UV [61] ou électrochimique [55, 62] est d'une haute sensibilité et suffisamment spécifique pour confirmer les résultats positifs d'un test immunologique. Elle permet la détection rapide de 9-carboxy-THC au niveau ng/ml, sans dérivatisation préalable. Pour effectuer une analyse quantitative reproductible, il est recommandé d'utiliser un standard interne (le cannabinoïde, par exemple [55, 61]).

#### *Conditions de travail*

##### *Méthode A [61]*

|                     |   |
|---------------------|---|
| Colonne:            | Octylsilice (Spherisorb C-8 ou équivalent), 5 µm, 25 cm x 4,6 mm diam. int.       |
| Phase mobile:       | Acétonitrile - acide phosphorique 50 mM (65:35, v/v)                              |
| Débit:              | 1,5 ml/mn   |
| Détection:          | UV à 211 nm (gamme de balayage 200-350 nm si l'on se sert d'un détecteur à diode) |
| Volume d'injection: | 10-15 µl  |
| Standard interne:   | Cannabinoïde  |

##### *Méthode B [62]*

|                     |  |
|---------------------|--|
| Colonne:            | Octylsilice (Zorbax C-8 ou équivalent), 5 µm, 25 cm x 4,6 mm diam. int.                    |
| Phase mobile:       | Acétonitrile - méthanol - acide sulfurique 0,02 N (35:15:50, v/v/v)                        |
| Débit:              | 1,1 ml/mn  |
| Détection:          | Détecteur à capture d'électrons 110 mV (Ag/AgCl) (électrode de travail en carbone vitreux) |
| Volume d'injection: | 5-10 µl  |
| Standard interne:   | n-Octyl-p-hydroxybenzoate  |

Pour d'autres techniques HPLC, voir Dixit & Dixit [63].

## **F. Interprétation des résultats**

### **1. Limite temporelle de détection**

La limite temporelle de détection d'un métabolite dépend de la méthode de dosage immunologique appliquée et du seuil de concentration choisi pour la détection initiale. En

général, on peut déceler une consommation intensive (moins de deux fois par semaine) dans les urines du sujet dans un délai de 2 à 3 jours, si l'on a choisi un seuil de concentration d'environ 100 ng/ml (ou moins). S'il s'agit d'un sujet qui consomme régulièrement de la marijuana depuis longtemps, la limite de détection peut être sensiblement plus longue du fait que le THC est absorbé par les tissu adipeux et s'y accumule. Dans ce cas, il peut être possible de détecter du 9-carboxy-THC dans un délai d'une à plusieurs semaines [39, 64].

## **2. Inhalation passive**

L'inhalation passive ou involontaire de fumée de marijuana est parfois invoquée pour expliquer le résultat positif d'une analyse d'urine. Encore que cela se soit parfois produit, métaboliser une dose détectable de THC de cette manière est difficile et improbable dans la plupart des cas. S'il est procédé à des dosages initiaux à un seuil de concentration de 20 ng/ml, des résultats positifs sont possibles, mais peu fréquents. À un seuil de concentration de 100 ng/ml, la possibilité d'un résultat positif dû à une inhalation passive est quasi nulle [43, 65-68].

## **3. Variation des concentrations**

Les concentrations de drogue dans l'urine peuvent être influencées par divers facteurs, principalement par l'ingestion de liquide. Cette concentration peut varier dans un rapport de 1 à 10 en quelques heures. Il faut donc interpréter tout résultat positif avec beaucoup de prudence, notamment s'il est constaté après un résultat négatif, lorsqu'un sujet est soumis à des tests quotidiens. Ces variations sont particulièrement sujettes à caution dans le cas d'une drogue telle que le THC, dont la demi-vie d'élimination est probablement de plusieurs jours, mais dont la concentration peut varier très sensiblement par rapport au seuil limite. Un résultat positif suivant un résultat négatif ne signifie pas forcément que le sujet a repris de la marijuana.

## IV. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de la cocaïne dans les échantillons biologiques

### A. Types communs de produits illicites à base de coca [10]

#### 1. Feuille de coca

Différentes espèces d'*Erythroxylon* produisent des feuilles de taille et d'apparence variables. Dans toutes les espèces, la face supérieure est plus foncée; la face inférieure, parfois vert-de-gris, présente, parallèlement à la nervure centrale, deux lignes considérées comme caractéristiques de la feuille de coca.

#### 2. Cocaïne

Bien qu'extraits d'une matière première naturelle très diversifiée et produits par lots, d'où la possibilité de grandes variations, les échantillons de cocaïne illicite varient assez peu comparés, par exemple, à ceux d'héroïne. Pourtant, on n'en trouve pas deux exactement semblables. Il s'agit le plus souvent d'une poudre blanche ou blanchâtre, généralement fine et rarement humide, dotée d'une odeur caractéristique.

La pâte de coca est une poudre blanchâtre, crème ou beige à l'odeur caractéristique. Rarement fine, elle est souvent granuleuse et généralement humide. Si les granulés ne sont pas cristallins (ce qui est rare), ils s'écrasent facilement entre les doigts.

Il peut arriver que certains échantillons contiennent de gros cristaux, parfois incolores, plutôt durs ("cailloux"). D'une manière générale, une partie, sinon la majeure partie, de ces échantillons consiste en une substance semblable à la "poudre" ordinaire de cocaïne.

L'adultération est relativement rare dans les pays producteurs; la cocaïne faisant l'objet d'un trafic international a souvent une pureté de 80 à 90 % (chlorhydrate de cocaïne). L'adultération et la transformation pour les besoins du trafic interviennent ultérieurement, dans les pays industrialisés, en général par l'ajout d'un anesthésique local de synthèse non soumis à contrôle (lidocaïne, procaïne ou benzocaïne, par exemple), ou d'un glucide (mannitol, lactose ou glucose, par exemple). Dans un cas comme dans l'autre, l'aspect de la substance n'est que légèrement modifié, presque tous ces adultérants étant eux-mêmes des poudres fines, blanches et sèches.

La pureté de la cocaïne issue du trafic dans les pays industrialisés est généralement d'environ 30 %; il y a à peu près trois fois autant d'adultérant que de cocaïne.

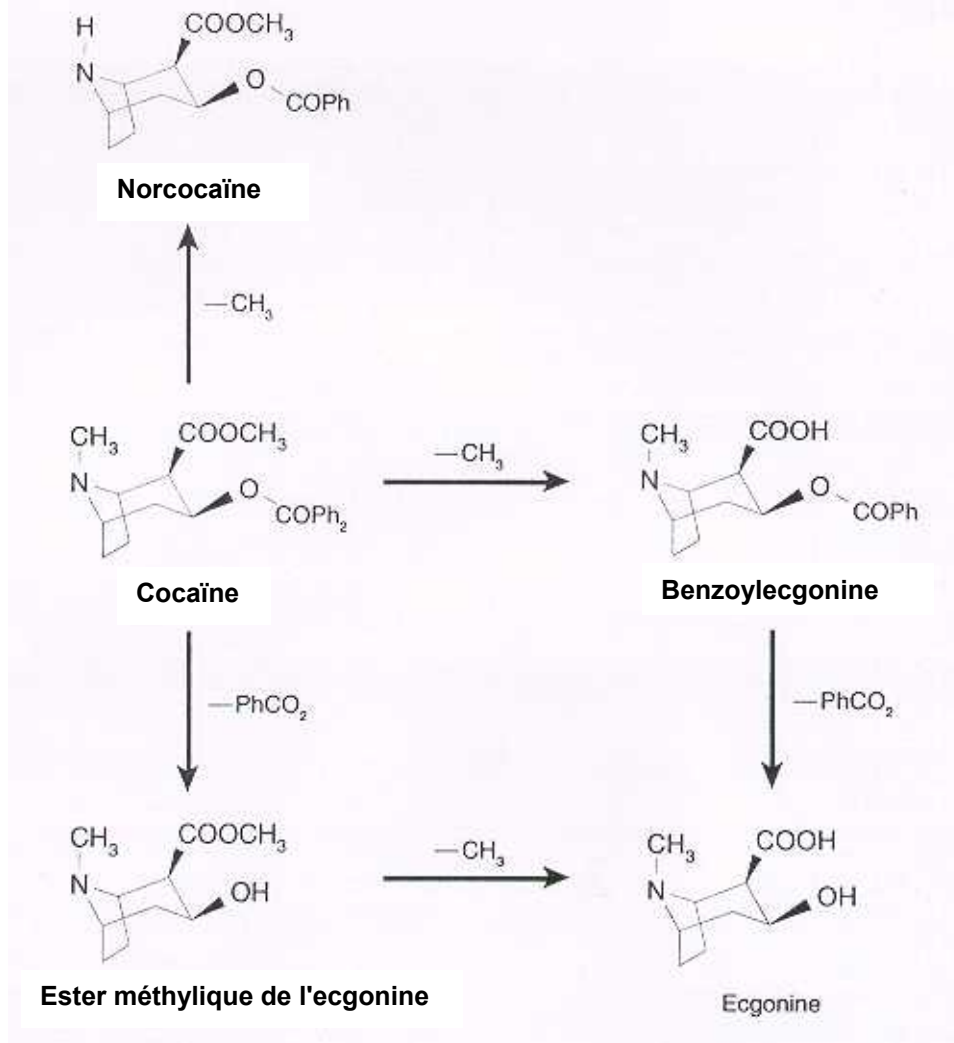
Outre les adultérants et impuretés susmentionnés, le chlorhydrate de cocaïne peut aussi contenir, entre autres, de l'amidon, de l'acide borique, de l'hydrogénocarbonate de sodium et de la dipyrone.

De nouveaux produits ont été mis sur le marché, notamment des bases libres (cocaïne épurée et "crack"). On peut y trouver des résidus de solvants, ainsi que des anesthésiques locaux utilisés comme adultérants. L'un des mélanges les plus courants est le "speed-ball" (cocaïne plus héroïne).

Le lecteur pourra se reporter aux articles spécialisés qui traitent en détail de la chimie des alcaloïdes de la coca [69-72]. Pour l'analyse en laboratoire de divers spécimens biologiques pour la détection de la cocaïne, les composés indiqués ci-après revêtent de l'intérêt (pour les structures, voir la figure IV.1):

- Cocaïne
- Benzoylécgonine
- Ester méthylique de l'écgonine
- Ecgonine

Figure IV.1 Voies métaboliques de la cocaïne



### 3. Modes de consommation

La cocaïne peut être absorbée par le nez (reniflée ou “sniffée”, c’est la voie la plus courante) ou injectée par voie intraveineuse ou intramusculaire. Elle peut également être absorbée par voie orale, sublinguale, vaginale ou rectale, ou bien fumée. La poudre de cocaïne destinée à être “sniffée” est disposée en ligne étroite sur une surface plane avant d’être aspirée à l’aide d’une paille ou d’un bout de papier roulé en tube. La longueur d’une “ligne” de cocaïne est habituellement de 3 à 5 centimètres; elle contient entre 10 et 100 mg de poudre. La fumée de la cocaïne base et du crack est inhalée à l’aide d’accessoires spécialement conçus pour cet usage. Traditionnellement, dans certaines régions du monde, les feuilles de coca sont mâchées après avoir été mélangées à de la terre alcaline.

La biodisponibilité de la cocaïne varie selon le mode de consommation (voir tableau IV.1) [73].

**Tableau IV.1. Biodisponibilité de la cocaïne selon le mode de consommation**

| <i>Mode de consommation</i> | <i>Biodisponibilité (%)</i> |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Voie orale                  | 20-30                       |
| Voie nasale                 | 20-30                       |
| Inhalation de la fumée      | 6-32                        |
| Injection intraveineuse     | 100                         |

#### **4. Métabolisme et excrétion**

La cocaïne est transformée en deux métabolites majeurs: la benzoylecgonine et l'ester méthylique de l'ecgonine [74]. Quelques métabolites mineurs, dont la norcocaïne, ont été récemment détectés dans des spécimens d'urine [75]. Les voies métaboliques sont résumées à la figure IV.1. La cocaïne est partiellement éliminée, telle quelle, dans les urines (1 à 9 % de la dose) et sous forme de benzoylecgonine (35-54 %) et d'ester méthylique de l'ecgonine(32-49 %) [76]. Les analytes cibles dont la détection est recommandée sont la cocaïne et ses métabolites, la benzoylecgonine et l'ester méthylique de l'ecgonine.

Le pic plasmatique de la cocaïne est rapidement atteint après l'absorption par voie intranasale, intrapulmonaire ou intraveineuse. Les effets psychotropes et physiologiques maximaux se manifestent, eux aussi, très rapidement. Les effets euphorisants s'atténuent dans un délai compris entre 30 minutes et une heure (20 minutes en cas d'inhalation de la fumée). La demi-vie d'élimination plasmatique de la cocaïne après absorption par voie intraveineuse ou intrapulmonaire est de 38 à 39 minutes [77].

### **B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage de la cocaïne et de ses métabolites**

Se référer aux procédures générales d'échantillonnage décrites au chapitre I, sections C et G.5.

#### *Précautions à prendre*

Certaines précautions s'imposent pour le dosage de la cocaïne et de ses métabolites dans les échantillons d'urine. Les analytes cibles ont une faible stabilité hydrolytique, surtout dans des conditions alcalines [78, 79]. Dans toute la mesure du possible, les échantillons doivent être conservés au froid et dans l'obscurité. On a observé qu'à pH 8, les concentrations de cocaïne dans les échantillons d'urine diminuaient dans la proportion de 40 à 70 % lors d'un entreposage de 21 jours à 4 °C. Il est donc conseillé d'ajuster les échantillons à pH 5 avec de l'acide acétique dilué: l'ester méthylique de l'ecgonine, par exemple, peut rester stable pendant trois ans dans un spécimen d'urine dont le pH se situe entre 3 et 5 s'il est entreposé à une température se situant entre 4 et 5 °C [80]. On notera aussi que c'est dans du fluorure et à pH 5 que les spécimens de sang destinés au dosage de la cocaïne et de ses métabolites se conservent le mieux.

#### **1. Préparation des échantillons pour le dosage immunologique**

Au besoin, on centrifugera l'urine pour la clarifier. Le pH de l'urine devra être ajusté entre 6,5 et 8,0, si nécessaire. Toutes les autres instructions du fabricant devront être strictement suivies.

#### **2. Préparation des échantillons pour la chromatographie**

### *a) Hydrolyse*

L'hydrolyse n'est pas nécessaire.

### *b) Extraction*

#### *Extraction liquide-liquide*

Extraire du spécimen d'urine 1 à 20 ml, selon la procédure sélectionnée. Ajuster l'échantillon à pH 9 (entre 8 et 9,5) à l'aide de l'une ou l'autre des solutions tampons ci-après [89]:

Borax (pH 9-9,6): solution contenant 19,07 g de tétraborate de sodium ( $\text{Na}_2 \text{B}_4\text{H}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) dans un litre d'eau.

Ammoniaque (pH 9,5): dissoudre du chlorure d'ammonium (10,7 g) dans de l'ammoniaque aqueux (5 M; 40 ml) et ajouter de l'eau pour obtenir un litre de solution.

L'échantillon est alors extrait au moins deux fois à l'aide de volumes égaux de solvant. On peut utiliser un mélange dichlorométhane - isopropanol (85:15, v/v) ou chloroforme - isopropanol (50:50, v/v). Il faut veiller à ce que la couche aqueuse (supérieure) se sépare entièrement de la couche de solvant (inférieure) avant de recueillir l'extrait pour éviter d'entraîner de l'eau. Si un problème d'émulsion se pose, on peut filtrer l'extrait à l'aide de papier filtre traité à la silicone (papier pour séparation de phase). Filtrer les couches organiques au travers d'une petite quantité de sulfate de sodium sec (sur le filtre) et rincer le filtre avec 5 ml de solvant. Évaporer l'extrait à siccité, sous vide ou sous un jet d'azote.

#### *Phase solide*

##### *Terre de diatomées*

Pour les procédures d'extraction faisant appel à la terre de diatomées, il convient d'observer les recommandations du fabricant (Extrelut®, par exemple).

La procédure type est la suivante [90-92].

Amener un échantillon d'urine (20 ml) à pH 9 à l'aide d'une solution tampon saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ , le transvaser dans une colonne de chromatographie en phase liquide contenant 20 grammes de terre de diatomées et laisser reposer pendant 10-15 minutes. Éluer la colonne avec 40 ml de dichlorométhane - isopropanol (85:15, v/v); 25 ml environ d'éluat est récupéré. Recueillir l'éluat organique et l'évaporer à siccité.

##### *Silice modifiée*

Les méthodes d'extraction en phase solide utilisant des cartouches de silice modifiée sont aussi recommandées [82, 93, 94]. Elles permettent de gagner du temps, nécessitent de moindres volumes de solvants et évitent les problèmes d'émulsion qui se posent parfois pendant l'extraction liquide-liquide, le seul inconvénient étant que les cartouches sont onéreuses. Deux procédures types d'extraction en phase solide sont décrites ci-après. D'autres matériels peuvent être utilisés, mais il faut suivre attentivement les procédures recommandées par les fabricants.

*Procédure A:* Utiliser une cartouche de silice modifiée (Bond Elut Certify®, par exemple), qui permet à la fois des interactions ioniques et non polaires entre les analytes et l'adsorbant [85].

Les cartouches d'extraction sont insérées dans une station de travail sous vide et conditionnées par lavage avec du méthanol (2 ml), puis une solution tampon de phosphate (0,1 M; pH 7; 2 ml). Il ne faut pas sécher les cartouches après le conditionnement.

Les échantillons d'urine sont centrifugés et des parties aliquotes (2,5 ml) sont mélangées à la solution de standard interne, si nécessaire, et au tampon de phosphate (0,1 M; pH 7; 1 ml). Le pH est vérifié et ajusté, si nécessaire, à pH 7.

Les échantillons d'urine sont ensuite transférés aux cartouches et lentement aspirés sous vide.

Les cartouches sont lavées avec de l'eau désionisée (3 ml), de l'acide chlorhydrique aqueux (0,1 M; 3 ml) et du méthanol (9 ml).

Les analytes sont élués avec un mélange chloroforme - isopropanol - ammoniacque concentré (80:20:2, v/v/v; 2 ml).

Les éluats sont évaporés à siccité.

*Procédure B:* Utiliser une colonne de cyclodextrane (Cyclobond I, par exemple) qui donne un extrait propre de benzoylecgonine avec un rendement de récupération de 50 % [85].

Les colonnes de cyclodextrane (500 mg/3 ml) sont utilisées sans conditionnement.

L'urine (5 ml) est introduite dans une colonne et lentement aspirée sous vide.

La colonne est lavée à l'eau (10 ml) et séchée par centrifugation, ou par un courant d'air pendant 10 minutes.

La colonne est ensuite lavée à l'acétone (2,5 ml), puis séchée sous vide.

La benzoylecgonine est éluee avec une solution chloroforme - éthanol (8:2, v/v; 2 ml) en exerçant une légère pression au sommet de la colonne à l'aide d'une poire en caoutchouc.

L'éluat est évaporé à siccité.

Une méthode améliorée d'extraction en phase solide de la benzoylecgonine, rapide et efficace (taux de récupération 90-100 %) a été décrite par Anderson [95]. D'autres ouvrages [96] décrivent une nouvelle procédure CG et CG-SM, simple et rapide, de préparation et d'épuration des échantillons utilisant le disque d'extraction en phase solide (microcolonne) et la dérivatisation sur disque.

#### *c) Standards internes*

Dans la mesure du possible, le standard interne devra répondre aux critères généraux indiqués au chapitre II, section G.6. Les standards internes préconisés pour l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites par chromatographie en phase gazeuse relèvent de trois catégories:

Un analogue de la benzoylecgonine, la propylbenzoylecgonine, par exemple [81].

Un alcaloïde opiacé, le levallorphan, [82], la nalorphine [83], l'éthylmorphine [84] ou la codéine, par exemple [85].

Des substances diverses, le *n*-tétracosane, le tétraphényléthylène (DIF seulement) ou le butylantraquinone, par exemple [86].

Pour la CG-SM, le mieux est d'utiliser comme standards internes des analogues deutérés de la cocaïne et de ses métabolites ou, à défaut, l'un des standards ci-dessus pour la CG. Les standards internes convenant pour la CLHP sont la lidocaïne [87] et la tropacocaïne (benzoyltropine) [88].

#### *d) Standards d'étalonnage*

Préparer des solutions mères dans du méthanol contenant 1 mg/ml de cocaïne, de benzoylecgonine, d'ester méthylique de l'ecgonine et de standard interne. À partir de ces solutions, préparer des standards d'urine contenant entre 0 et 5 µg/ml de cocaïne, entre 0 et 25 µg/ml de benzoylecgonine et d'ester méthylique de l'ecgonine, et le standard interne à une concentration de 25 µg/ml. Une série d'échantillons d'urine étalonnés doit être analysée en même temps que les spécimens à tester.

## C. Méthodes de détection

### 1. Dosages immunologiques

Le dosage radio-immunologique, le dosage immunologique par polarisation de fluorescence, le dosage immuno-enzymatique et le test d'inhibition de l'agglutination au latex sont recommandés aux laboratoires qui disposent des moyens et appareillages nécessaires (voir chapitre I, section G.1). Les limites de détection par dosage radio-immunologique et dosage immunologique par polarisation de fluorescence sont en général de 50 ng/ml ou moins, alors que qu'avec le procédé EMIT, elles sont de 300 ng/ml. Les anticorps contenus dans les trousseaux du commerce sont ciblés pour le dépistage de la benzoylécgonine, mais diverses réactions croisées peuvent se produire avec la cocaïne et ses autres métabolites [97]. On trouvera au tableau IV.2 un résumé des réactivités croisées de certains dosages du commerce.

**Tableau IV.2. Réactivités croisées de dosages immunologiques vendus dans le commerce pour la détection de la cocaïne et de ses métabolites**

| Dosage           | Réactivité croisée (%)    |                |                                |               |
|------------------|---------------------------|----------------|--------------------------------|---------------|
|                  | Benzoylécgonine           | Cocaïne        | Ester méthylique de l'écgonine | Ecgonine      |
| Coat-A-Count     | 104 (300) <sup>a,b</sup>  | 7 259 (50)     | 1,3 (5 000)                    | --            |
| Abuscreen-RIA    | 108 (300) <sup>a,b</sup>  | 215 (300)      | 0,6 (5 000)                    | --            |
| EMIT-d.a.u.      | 100 (300) <sup>c,d</sup>  | 0,15 (200 000) | --                             | 1,5 (20000)   |
| EMIT-s.t.        | pos. (300) <sup>b</sup>   | nég. (5 000)   | nég. (5 000)                   | --            |
| FPIA-TDx         | 95,7 (300) <sup>a,b</sup> | 1,2 (5 000)    | 0,1 (5 000)                    | --            |
| Abuscreen-Ontrak | 100 (300) <sup>c,d</sup>  | 10 (3 000)     | < 0,01 (> 100 000)             | 0,75 (40 000) |
| Abuscreen-Online | 100 (300) <sup>c,d</sup>  | 0,97 (30 928)  | 0,31 (96 774)                  | 1,2 (25 000)  |

<sup>a</sup> Réactivité croisée apparente = concentration apparente/concentration cible x 100 (entre parenthèses, concentration à laquelle la réaction croisée a été déterminée, ng/ml).

<sup>b</sup> E. Wallace [86].

<sup>c</sup> Réactivité croisée = concentration cible (300 ng/ml)/concentration équivalant à 300 ng/ml de benzoylécgonine x 100 (entre parenthèses, équivalents ng/ml).

<sup>d</sup> Indications du fabricant.

### 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Extraire entre 5 et 20 ml d'urine. La CCM conventionnelle a une limite de détection de la cocaïne et de la benzoylécgonine de 1 mg/ml d'urine. La CLHP a une limite de détection de la benzoylécgonine d'environ 0,3 mg/ml d'urine et elle est préférable si on dispose de l'équipement nécessaire.

#### *Technique standard*

Des précisions sur les matériels et les procédures CCM standard sont fournies dans un autre ouvrage [10] et sont valables pour l'analyse des extraits biologiques.



### *Plaques CCM*

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Imprégnation:           | Gel de silice activé G contenant un additif qui devient fluorescent sous l'effet de la lumière UV, longueur d'onde 254 nm. |
| Épaisseur de la couche: | 0,25 mm  |
| Dimension des plaques:  | Plaques en verre 20 x 20 cm, 20 x 10 cm ou 10 x 5 cm. La distance de migration optimale est d'environ 10 cm                |

### *Plaques CCMHP*

Plaques du commerce: 10 x 10 cm, normalement développées sur 5 cm.

### *Solutions standard*

Cocaïne  
Benzoylecgonine  
Ester méthylique de l'ecgonine.

Préparer des solutions standard à une concentration de 1 mg/ml dans du méthanol et appliquer 5 µl de chaque solution sur la plaque.

### *Procédure*

Les extraits d'urine (voir chapitre IV, section B.c) sont évaporés à siccité dans un tube à essai et à nouveau dissous dans du méthanol (50 µl). La totalité de l'extrait est déposée sur la plaque.

### *Solvants de développement*

|                         |                  |     |
|-------------------------|------------------|-----|
| Mélange A (CCM) [10]:   | Méthanol         | 100 |
|                         | Ammoniaque conc. | 1,5 |
| Mélange B (CCM) [98]:   | Chloroforme      | 50  |
|                         | Méthanol         | 50  |
| Mélange C (CCMHP) [99]: | Acétate d'éthyle | 15  |
|                         | Méthanol         | 15  |
|                         | Dichlorométhane  | 5   |
|                         | Ammoniaque conc. | 3   |

### *Examen visuel*

Les plaques doivent d'abord être séchées, soit à température ambiante soit, plus rapidement, à l'air chaud pulsé ou dans un four à 120 °C, pendant 10 minutes. Pour obtenir un bon développement des couleurs, il faut éliminer de la plaque toutes les traces d'ammoniaque ou d'autres bases. Les méthodes d'examen visuel ci-après sont recommandées:

UV à 254 nm.

Réactif d'iodoplatinate de potassium acidifié. (Pour la préparation voir chapitre II, section C.2).

Réactif de Dragendorff. (Pour la préparation voir chapitre II, section C.2)

Une vaporisation de chlorure ferrique acidifié peut améliorer la visualisation [100].

Réactif à vaporiser: ajouter soigneusement de l'acide sulfurique concentré (1 ml) à une solution aqueuse de chlorure ferrique (5 %, w/v; 10 ml) et mélanger.

## Résultats

**Tableau IV.3. Valeurs de  $R_f \times 100$**

| Composé                        | Système de développement |    |
|--------------------------------|--------------------------|----|
|                                | A                        | B  |
| Cocaïne                        | 59                       | 61 |
| Benzoylécgonine                | 25                       | 28 |
| Ester méthylique de l'écgonine | 65                       | —  |

**Tableau IV.4. Aspect des taches selon la méthode de l'examen visuel**

| Composé                        | Système de développement |                      |                     |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|
|                                | UV                       | Iodoplatinate        | Dragendorff         |
| Cocaïne                        | Sombre                   | Violet               | Orange <sup>a</sup> |
| Benzoylécgonine                | Sombre                   | Négatif <sup>b</sup> | Orange <sup>a</sup> |
| Ester méthylique de l'écgonine | Négatif                  | Bleu                 | Orange <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> La couleur est la même avant et après vaporisation d'une solution de chlorure ferrique acidifié.

<sup>b</sup> Les taches > 1 µg donnent une tache pourpre sur un fond pourpre légèrement plus clair [85].

## D. Méthodes chromatographiques de confirmation

### 1. Chromatographie en phase gazeuse (CG)

#### a) Dérivatisation de l'échantillon

Pour pouvoir détecter les métabolites de la cocaïne, il faut dériver l'extrait d'urine (voir aussi les notes du chapitre I, section G.5).

#### *Alcoylation/acylation (dérivés PFP, convenant pour le DIF et le DNP) [83]*

Évaporer l'extrait d'urine à siccité et ajouter de l'anhydride pentafluoropropionique (50 µl) et du pentafluoropropanol (25 µl). Chauffer le mélange à 90 °C pendant 15 minutes. Les réactifs de dérivatisation sont évaporés et le résidu est de nouveau dissous dans de l'acétate d'éthyle (25 µl). Les dérivés PFP formés sont stables dans le réactif pendant plusieurs mois et au moins 24 heures après évaporation du réactif.

#### *Silylation (dérivés TMS ou TBDMS, convenant pour le DIF)*

Évaporer l'extrait d'urine à siccité et le reconstituer dans de l'acétonitrile (25 µl). Ajouter un réactif de silylation, par exemple 25 µl de *N*-méthyl-*N*-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) pour les dérivés TMS, ou de *N*-méthyl-*N*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)trifluoroacétamide (MTBSTFA) [88] pour les dérivés TBDMS, et laisser la réaction s'effectuer à 50-60 °C pendant

30 minutes. Le mélange est injecté directement dans le chromatographe. Les dérivés doivent être préparés peu de temps avant l'analyse par CG ou CG-SM. Ils ne sont stables dans le réactif que pendant quelques jours.

#### *b) Technique de la colonne à remplissage [10]*

##### *Conditions de travail*

Détecteur: DIF, hydrogène à 30 ml/mn, air à 450 ml/mn

**Note:** *Pour plus de sensibilité et de spécificité, on recommande l'utilisation d'un détecteur azote-phosphore (NPD): les paramètres de fonctionnement doivent correspondre à ceux conseillés par le fabricant. Il faut choisir des procédures de préparation et de dérivatisation qui évitent les solvants et les réactifs contenant de l'azote dans la solution finale injectée dans le chromatographe.*

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Colonne:                        | 2 m x 2-4 mm diam. int.  |
| Remplissage:                    | a) Diméthylsilicone (SE 30, OV-1)<br>b) Phénylméthylsilicone, 50 % phényle (OV-17) |
| Gaz porteur:                    | Azote à 30 ml/mn   |
| Températures de fonctionnement: | Injecteur: 220 °C<br>Four: 220 °C<br>Détecteur: 300 °C                             |

Conditionnement des colonnes à remplissage:

**Note:** *Toutes les colonnes à remplissage doivent être conditionnées avant utilisation. Normalement, la température de conditionnement doit être d'au moins 30 °C supérieure à celle prévue pour l'analyse, sauf si cela implique un dépassement de la limite supérieure spécifiée par le fabricant, auquel cas il faut réduire l'écart de température et allonger sensiblement la durée du conditionnement. Cette opération se déroule habituellement pendant la nuit (15 heures au minimum).*

**Pendant le conditionnement, le gaz porteur circule normalement mais la colonne est déconnectée du détecteur.**

##### **Précautions à prendre:**

- *Silaniser fréquemment les colonnes de verre pour éviter l'adsorption de la morphine pendant les déterminations CG.*
- *Nettoyer régulièrement l'orifice d'injection et le détecteur pour éviter la décomposition des échantillons et une perte de sensibilité du détecteur.*
- *Manipuler les réactifs de silylation avec précaution car ils sont très sensibles à l'humidité.*
- 

#### *c) Technique de la colonne capillaire*

##### *Conditions de travail*

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Détecteur:                      | DIF ou DNP (voir la note sous "Détecteur")  |
| Colonne:                        | Silice fondue, 25 m x 0,32 mm diam. int., avec phase stationnaire 0,15 µm (méthylsilicone) non polaire chimiquement liée. |
| Gaz porteur:                    | Hélium ou hydrogène à 2 ml/mn   |
| Températures de fonctionnement: | Injecteur: 250 °C   |

Four: 150 °C à 280 °C, à 9 °C/mn  
DéTECTEUR: 280 °C

**Note:** Selon les moyens dont on dispose, les dimensions de la colonne capillaire, la phase stationnaire, son épaisseur, le gaz porteur et le débit utilisés peuvent être différents de ceux que nous indiquons ci-dessus. Toutefois, il est généralement possible (et recommandé) d'utiliser une colonne non polaire pour l'analyse des échantillons biologiques. Les conditions de travail optimales pour le système doivent être choisies compte tenu des recommandations du fabricant.

## 2. Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CG-SM)

Lorsqu'on se sert d'un spectromètre de masse comme détecteur, les principaux ions ( $m/z$ ) des spectres  $EI^+$  sont ceux indiqués au tableau IV.5. Pour les procédures CG-SM détaillées en mode SIM, voir les autres ouvrages cités en référence [95, 101].

**Tableau IV.5. Principaux ions dans les spectres de masse de la cocaïne et de ses métabolites**

| Composé                        | Principaux ions fragments ( $m/z$ ) |                 |                 |               |
|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
|                                | Non dérivés                         | Dérivés PFP     | Dérivés TMS     | Dérivés TBDMS |
| Cocaïne                        | 82,105,182,303                      | (non formés)    | (non formés)    | (non formés)  |
| Benzoylécgonine                | 82,93,124,168                       | 272,300,316,421 | 82,240,361      | 282,346,403   |
| Ester méthylique de l'écgonine | 82,96,168,199                       | 119,182,345     | 82,83,96,98,182 | 82,256,313    |

## 3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

### Procédure

Les extraits d'urine sont évaporés à siccité, reconstitués dans de l'acétonitrile ou la phase mobile (50-100  $\mu$ l) et 1 à 20  $\mu$ l sont injectés.

Les systèmes CLHP ci-après peuvent être appliqués:

### Conditions de travail

#### Méthode A [87]

Colonne: Colonne silice octadécyle, phase inversée, 3  $\mu$ m, 10 cm x 3,2 mm diam. int.  
Phase mobile: Tampon de phosphate (0,01 M; pH 2,1) contenant de l'hydroxyde de tétrabutylammonium (0,2 mM) et de l'acétonitrile (6 %, v/v).  
Débit: 1,5 ml/mn  
Détection: UV à 233 nm.

#### Méthode B [88]

Colonne: Colonne silice octadécyle, phase inversée, 3  $\mu$ m, 15 cm x 4,6 mm diam. int. + précolonne.  
Phase mobile: Acétonitrile - eau (17,5:82,5, v/v) contenant de l'acide phosphorique (8,5 g/l) et de l'hexylamine (0,28 ml/l), pH 3.  
Débit: 1,2 ml/mn

Détection: UV à 230 nm.

*Méthode C [94]*

Colonne: Colonne silice octadécyle, phase inversée, 25 cm x 4,6 mm diam. int. + précolonne.

Phase mobile: Initiale: 10 % d'acétonitrile dans un tampon de phosphate de potassium (0,05 M; pH 3,2). Cette proportion est portée à 50 % d'acétonitrile en 15 minutes et le composé final est maintenu pendant 5 minutes. Il faut un temps de rééquilibrage de 5 minutes entre les injections.

Débit: 1,5 ml/mn

Détection: UV à 200 nm.

## **E. Interprétation des résultats**

### ***1. Limite temporelle de détection***

Après une dose unique de cocaïne, la drogue peut être détectée, telle quelle, pendant 24 heures, et ses métabolites (benzoylecgonine et ester méthylique de l'ecgonine) pendant 48 heures [102-104]. Après une consommation chronique, la période peut être plus longue (cinq jours ou plus) [105, 106].

Les différences entre les quantités relatives de métabolites excrétées après la prise de cocaïne par voie nasale, par voie intraveineuse ou par inhalation de fumée sont minimales [107].

En général, les concentrations urinaires de cocaïne et de ses métabolites ne permettent pas de tirer des conclusions quant à la quantité de drogue absorbée, au temps écoulé depuis la dernière dose ou à l'intensité des effets.

### ***2. Précautions à prendre***

L'ester méthylique de l'ecgonine est formé par l'action de la pseudocholinestérase. Des anomalies de l'activité de cette enzyme dues à des raisons génétiques [108] ou découlant de l'ingestion délibérée et simultanée d'inhibiteurs de la cholinestérase, tels que des pesticides organophosphorés, peuvent modifier le schéma d'excrétion des métabolites.

De l'ester éthylique de la benzoylecgonine (cocaéthylène), homologue de la cocaïne, et d'autres produits mineurs de transformation peuvent être détectés après la prise simultanée de cocaïne et d'éthanol [99, 109].

La consommation de breuvages à base de thé contenant des feuilles de coca ("Health Inca Tea") peut entraîner l'ingestion de cocaïne et l'excrétion dans les urines de benzoylecgonine, à des concentrations de plusieurs milligrammes par litre d'urine [110].

L'ester méthylique d'anhydroecgonine peut être détecté après l'inhalation de fumée de cocaïne base ("crack") [111].

## **F. Analyse et interprétation dans d'autres matrices biologiques**

Les concentrations plasmatiques de cocaïne et de benzoylecgonine après l'administration thérapeutique de cocaïne sont généralement inférieures à 0,5 et 0,1 µg/ml, respectivement. Dans les cas de surdose, les niveaux de concentration sanguine à l'autopsie sont de l'ordre de 1 à 20, et de 1 à 10 µg/ml, respectivement [76, 112].

Comme on l'a vu précédemment (chapitre IV, section B), la cocaïne et ses métabolites sont peu stables à l'hydrolyse (tant enzymatique que non enzymatique). Les échantillons de sang et de plasma doivent être recueillis dans des tubes contenant du fluorure de sodium et le pH doit être ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique (10 %, v/v). Ils peuvent alors être conservés au réfrigérateur à 4 °C ou, si possible, au congélateur, pendant quelques mois [78, 79, 113].

On a pu observer que les échantillons de cheveux et de salive de cocaïnomanes contenaient de la cocaïne [114-118]. Si l'interprétation quantitative des concentrations de cocaïne dans les cheveux n'est pas encore tout à fait au point, les niveaux de concentration de cocaïne détectés dans la salive et le plasma semblent bien correspondre.

## V. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'amphétamine et de la méthamphétamine dans les échantillons biologiques

### A. Introduction

L'amphétamine et la méthamphétamine illicites sont essentiellement des produits de synthèse fabriqués dans des laboratoires clandestins; des quantités moindres, encore qu'assez importantes, proviennent du détournement ou du mésusage de substances produites légalement. On relève une très nette démarcation géographique: l'amphétamine est très présente en Europe, tandis que la méthamphétamine prédomine aux États-Unis d'Amérique, au Japon et en Asie du Sud-Est.

Les méthodes de production, les caractéristiques chimiques et l'aspect physique de l'amphétamine et de la méthamphétamine illicites, déjà décrits en détail dans le manuel des Nations Unies intitulé *Méthodes recommandées pour l'identification de l'amphétamine et de la méthamphétamine* [119], ne seront pas répétés dans le présent ouvrage. Toutefois, depuis la publication de ce manuel, est apparue une forme pure de chlorhydrate de (+)- méthamphétamine appelée "ice" en raison de ses cristaux feuilletés translucides [120].

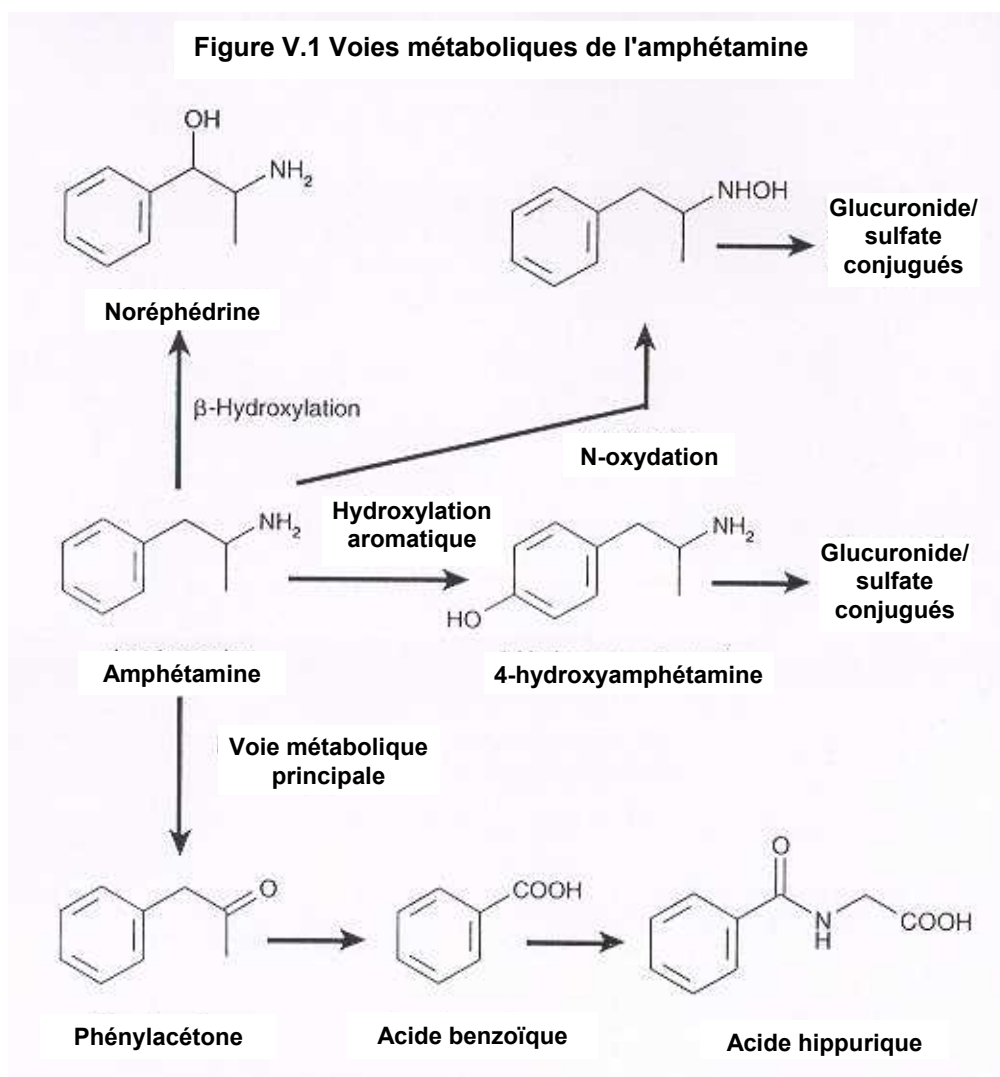
#### 1. Modes de consommation

L'amphétamine (sulfate ou phosphate) est le plus souvent absorbée par voie orale ou nasale (auquel cas elle est prise) à des doses allant de 5 à 15 mg chez les utilisateurs occasionnels, et de 100 à 2 000 mg par jour chez les utilisateurs chroniques [121]. Le chlorhydrate de méthamphétamine ("ice") est le plus souvent destiné à être injecté ou fumé [120], mais on le trouve aussi sous forme de comprimés.

#### 2. Métabolisme et excrétion

Après l'absorption d'amphétamines par voie orale à des doses allant de 2,5 à 15 mg, des pics de concentration plasmatique de 30 à 170 µg/ml sont atteints en deux heures, la demi-vie allant de 8 à 12 heures. En cas de décès, les concentrations sanguines sont généralement supérieures à 500 µg/ml [106].

L'amphétamine et la méthamphétamine commencent à apparaître dans les urines dans les 20 minutes qui suivent la prise. L'amphétamine est excrétée inchangée (habituellement entre 20 et 30 % de la dose), ainsi que sous forme de métabolites désaminés (acide hippurique et acide benzoïque) et hydroxylés, en partie sous forme de conjugués (habituellement 25 % de la dose). Le taux d'excrétion et la fraction de la dose excrétée telle quelle varient selon le pH des urines. Dans des urines alcalines, 45 % de la dose environ sont excrétés en 24 heures, 2 % inchangés, tandis que dans des urines acides, jusqu'à 78 % de la dose peuvent être excrétés en 24 heures, dont 68 % sans transformation [122]. Les analytes cibles recommandés sont donc les drogues elles-mêmes. Les voies métaboliques principales et secondaires de l'amphétamine sont résumées à la figure V.1.



La méthamphétamine est partiellement excrétée sans transformation (44 %) sous la forme de ses principaux métabolites amphétaminiques (6-20 %) et de 4-hydroxyméthamphétamine (10 %) [123]. Les voies métaboliques de la méthamphétamine sont résumées à la figure V.2. Comme pour l'amphétamine, les urines acides augmentent à la fois le taux d'excrétion et le pourcentage de la drogue excrétée sans transformation.

On a pu observer chez des utilisateurs invétérés des concentrations urinaires de 1 à 90 µg/ml d'amphétamine et de 25 à 300 µg/ml de méthamphétamine [124].

### **B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage de l'amphétamine, de la méthamphétamine et de leurs métabolites**

Se référer aux procédures générales et aux précautions à prendre décrites au chapitre I, sections C et G.5, qui valent aussi pour le dosage de l'amphétamine et de la méthamphétamine.

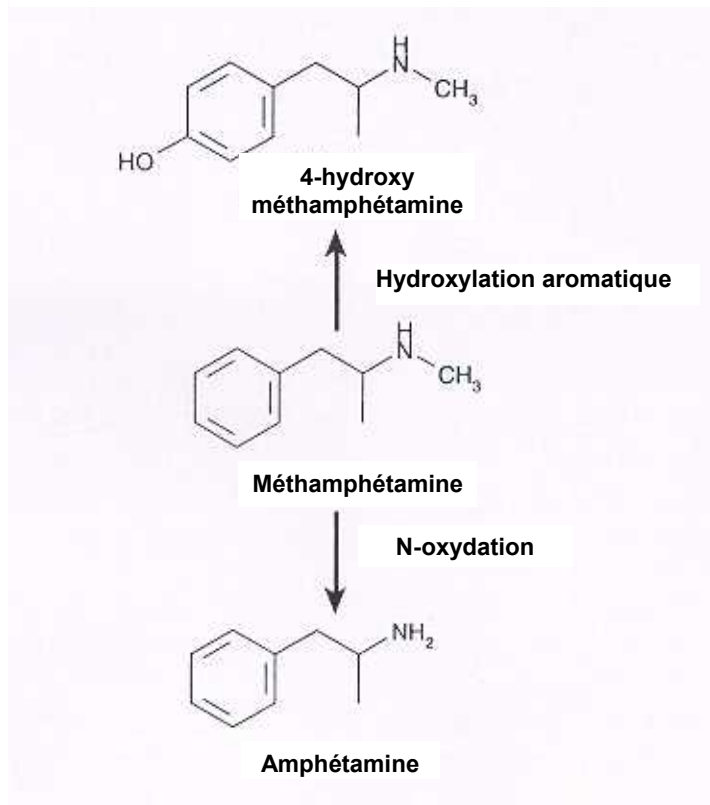
#### *Précautions à prendre*

Il faut procéder avec précaution lorsqu'il s'agit de concentrer par évaporation des extraits contenant de l'amphétamine et de la méthamphétamine, étant donné le risque de perdre les bases



libres pendant l'évaporation du solvant. On peut éviter ces pertes en ajoutant à l'extrait de l'acide chlorhydrique méthanolique (méthanol: acide chlorhydrique concentré (9:1, v/v; 50 µl)) pour obtenir les chlorhydrates correspondants des drogues avant d'évaporer le solvant.

**Figure V.II. Voies métaboliques de la méthamphétamine**



### ***1. Préparation des échantillons pour le dosage immunologique***

En général, les tests de dépistage immunologique nécessitent fort peu de préparation des échantillons. Il n'est pas nécessaire d'hydrolyser les urines car les dosages immunologiques mesurent à la fois les formes libres et conjuguées de la drogue et/ou de ses métabolites. Il peut être nécessaire d'ajuster le pH ou de centrifuger les urines pour en éliminer la turbidité. Pour optimiser les résultats, mieux vaut suivre les instructions du fabricant.

### ***2. Préparation des échantillons pour la chromatographie***

#### *a) Hydrolyse*

L'hydrolyse n'est pas nécessaire.

#### *b) Extraction*

##### *Extraction liquide-liquide*

L'amphétamine et la méthamphétamine sont extraites des urines à un pH alcalin quand le groupe amino est électriquement neutre. Les valeurs  $\text{pK}_a$  des deux drogues sont de 9,9 et 10,1, respectivement; pour une récupération optimale, ajuster les urines au pH 11. On peut procéder comme suit [125]:

À l'aide d'une pipette, introduire 2 ml d'urine dans un tube à fond conique d'une contenance de 50 ml et le standard interne (solution de 2-méthyl-phényléthylamine; 8 µg/ml; 0,25 ml); ajouter une solution d'hydroxyde de sodium (1 M; 2 ml), de l'eau (5 ml) et du dichlorométhane (20 ml). Boucher le tube, agiter et centrifuger à petite vitesse pendant 5 minutes, jeter la couche supérieure.

S'il faut davantage purifier l'extrait, procéder à une étape supplémentaire fondée sur une réextraction dans l'acide.

Ajouter à l'extrait de l'acide sulfurique (0,15 M; 2 ml); boucher, agiter et centrifuger le tube comme précédemment. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un tube à fond rond d'une contenance de 15 ml et ajouter une solution d'hydroxyde de sodium (1 M; 1 ml) et du 1-chlorobutane ou du dichlorométhane (2,5 ml). Boucher le tube, agiter vigoureusement et centrifuger. Transférer le solvant organique dans un tube propre. Ajouter de l'acide chlorhydrique méthanolique (9:1, v/v; 50 µl) et évaporer l'extrait à siccité.

### *Phase solide*

Cette méthode présente divers avantages: elle permet de gagner du temps, de réduire le volume de solvants nécessaire et d'éviter les problèmes provoqués par la formation d'une émulsion qui se posent parfois pendant l'extraction liquide-liquide. Son inconvénient est que les cartouches sont onéreuses.

Les cartouches appropriées contiennent de la terre de diatomées ou de la silice substituée par des groupes non polaires (silice octadécyle) [126], des groupes échangeurs de cations ou un mélange de substituants non polaires et échangeurs d'ions [127]. Il faut suivre les instructions du fabricant relatives aux cartouches utilisées.

La procédure ci-après est représentative:

Conditionner sous vide, dans une station de travail sous vide, des cartouches fortement échangeuses de cations (benzène-sulphonylpropylsilice, capacité de 1 ml) avec du méthanol (2 ml), de l'eau (1 ml) et de l'acide phosphorique (10 mM; 0,5 ml). Bien mélanger l'urine (1 ml) et l'acide phosphorique (10 mM; 0,5 ml) dans un tube et appliquer le mélange sur la cartouche, sécher cette dernière à l'air pendant 30 secondes environ et la laver avec de l'acide phosphorique (10 mM; 1 ml), de l'acide acétique (0,1 M; 0,5 ml) et du méthanol (1 ml). Sécher à nouveau la colonne à l'air pendant 30 secondes environ et éluer les analytes avec du méthanol ammoniacal (3 %, v/v; 2 ml). L'extrait est évaporé à siccité, sous vide ou sous un jet d'azote, en prenant les précautions indiquées au chapitre V, section B.2.b.)

### *c) Standards internes*

Dans la mesure du possible, le standard interne devra répondre aux critères généraux indiqués au chapitre I, section G.6. Les standards internes préconisés pour l'analyse des amphétamines dans l'urine par CG ou CLHP sont la phentermine, la propylamphétamine et autres analogues de l'amphétamine. Pour la CG-SM, ce sont des analogues deutérés de l'amphétamine et de la méthamphétamine; à défaut, l'un des standards ci-dessus pour la CG peut être utilisé.

### *d) Standards d'étalonnage*

Préparer séparément des solutions mères dans du méthanol contenant 1 mg/ml d'amphétamine, de méthamphétamine et de standard interne. À partir de ces solutions mères, préparer des standards d'urine contenant entre 0 et 5 µg/ml d'amphétamine et de méthamphétamine et une concentration de 5 µg/ml de standard interne. Une série de standards d'étalonnage devra être analysée en même temps que les échantillons à tester.

## C. Méthodes de détection

### 1. Dosages immunologiques

Comme on l'a vu au chapitre I, section G.1, les techniques de dosage immunologique peuvent être utilisées aux fins de la détection, tout résultat positif devant être confirmé par une méthode différente, plus spécifique. C'est particulièrement important dans l'analyse de l'amphétamine et de la méthamphétamine car il existe un grand nombre de drogues analogues à l'amphétamine, dont certaines peuvent avoir des réactions croisées avec des anticorps ciblés sur l'amphétamine et la méthamphétamine (voir aussi le chapitre VI, section C.1). On trouve dans le commerce des trousse qui permettent le dosage immunologique de l'amphétamine et de la méthamphétamine au moyen des techniques suivantes: dosage immuno-enzymatique, dosage immunologique par polarisation de fluorescence, test d'inhibition de l'agglutination au latex et dosage radio-immunologique. La spécificité de ces techniques est très variable selon l'anticorps utilisé. On trouvera au tableau V.1 un résumé de certaines caractéristiques des dosages immunologiques existants.

**Tableau V.1. Réactivités croisées de dosages immunologiques vendus dans le commerce pour la détection de l'amphétamine (A) et de la méthamphétamine (MA)**

| Dosage                                       | Réactivité croisée (%)     |            |             |               |             |
|--|----------------------------|------------|-------------|---------------|-------------|
|  | <i>d-A</i>                 | <i>l-A</i> | <i>d,l</i>  | <i>d-MA</i>   | <i>l-MA</i> |
| EMIT-d.a.u. monoclonal                       | 100 (300) <sup>a,b</sup>   | 10 (2 900) | 60 (500)    | 100 (1 000)   | 14 (7 000)  |
| FPIA-TDx amphétamine                         | 91 (1 000) <sup>c,d</sup>  | 61 (1 000) | 100 (1 000) | 123 (1 000)   | 115 (1 000) |
| FPIA-TDx amphétamine/<br>méthamphé-tamine II | 100 (1 000) <sup>c,d</sup> | 57 (1 000) | 165 (1 000) | 98 (1 000)    | 7 (1 000)   |
| Abuscreen-Online                             | 100 (1 000) <sup>a,b</sup> | --         | 66 (1 517)  | 0,5 (219 298) | --          |

<sup>a</sup> Réactivité croisée = concentration cible (300 ou 1 000 ng/ml)/ concentration équivalent à 300 ou 1 000 ng/ml de *d*-amphétamine ou 1 000 ng/ml de *d*-méthamphétamine x 100 (entre parenthèses, équivalents ng/ml).

<sup>b</sup> Indications fournies par le fabricant.

<sup>c</sup> Réactivité croisée = concentration apparente (mesurée)/concentration réelle x 100 (entre parenthèses, concentration à laquelle la réaction croisée a été déterminée, ng/ml).

<sup>d</sup> J. T. Cody [128].

### 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

#### Technique standard

On trouvera au chapitre I, section G.2, des observations générales sur l'application de la chromatographie sur couche mince comme technique de détection. Des précisions sur les matériels et procédures CCM standard sont fournies dans d'autres publications [10] et s'appliquent à l'analyse des extraits biologiques.

#### Plaque CCM

Imprégnation: Gel de silice activé G contenant un additif qui devient fluorescent sous l'effet de la lumière UV, longueur d'onde 254 nm.

Épaisseur de la couche : 0,25 mm

Dimension des plaques: 20 x 20 cm, 20 x 10 cm ou 10 x 5 cm; la distance de migration optimale est d'environ 10 cm.

### *Solutions standard*

Amphétamine  
Méthamphétamine.

Amener toutes les solutions standard à une concentration de 5 mg/ml dans du méthanol et appliquer 1 µl de chaque sur la plaque.

### *Procédure*

Les extraits d'urine sont évaporés à siccité dans un tube à essai (voir à ce sujet les précautions recommandées au chapitre V, section B.2.b), puis dissous à nouveau dans du méthanol (50 µl). La totalité de l'extrait est déposée par taches sur la plaque à l'aide d'un capillaire en verre.

### *Solvants de développement [129]*

|            |                  |     |
|------------|------------------|-----|
| Mélange A: | Méthanol         | 100 |
|            | Ammoniaque conc. | 1,5 |
| Mélange B: | Acétate d'éthyle | 85  |
|            | Méthanol         | 10  |
|            | Ammoniaque conc. | 5   |

### *Examen visuel*

Les plaques doivent d'abord être séchées, soit à température ambiante, soit dans un four à 120 °C pendant 10 minutes ou, plus rapidement, à l'air chaud. Pour obtenir un bon développement des couleurs, il faut éliminer toutes les traces d'ammoniaque de la plaque. Les méthodes d'examen visuel ci-après sont recommandées:

Réactif Fast Black K [130-132].

Solution A: 1 % sel de Fast Black K dans de l'eau.

Solution B: hydroxyde de sodium 1 M.

Vaporiser la solution A sur les plaques et observer toute tache colorée. Les amines secondaires, dont la méthamphétamine, produisent immédiatement des taches. Si l'on vaporise la solution B, on obtient une tache colorée pour l'amphétamine (et tout autre substitut amphétaminique). Sécher les plaques à l'air et vaporiser une nouvelle fois la solution A. On obtient des taches d'une coloration plus intense, pouvant aller du violet pour les amines primaires au presque rose pour les amines secondaires, dont la méthamphétamine. Les limites de détection pour l'amphétamine et la méthamphétamine sont de 0,1 and 0,05 µg, respectivement [130].

Réactif à la ninhydrine.

Préparer une solution à 10 % dans de l'éthanol.

Vaporiser le réactif à la ninhydrine et chauffer dans un four à 120 °C pendant au moins 15 minutes. Les amines primaires, dont l'amphétamine, donnent des taches violettes ou roses et les amines secondaires, dont la méthamphétamine, des taches d'une coloration plus intense.

Réactif à la fluorescamine (Floram).

Préparer une solution de 10 mg de fluorescamine dans 50 ml d'acétone.

Vaporiser le réactif à la fluorescamine. Sécher la plaque à l'air chaud pulsé. Observer la plaque aux UV à 365 nm. L'amphétamine donne une tache fluorescente d'un jaune vif. La limite de détection est d'environ 10 ng pour l'amphétamine et autres amines primaires. La méthamphétamine n'est pas détectée.

Réactif Simons

Solution A: Solution aqueuse de carbonate de sodium à 20 %.

Solution B: Solution aqueuse de nitroprussiate de sodium à 1 %.

Vaporiser sur la plaque la solution A puis la solution B. Placer la plaque dans une cuve de développement vide, ainsi qu'un becher contenant de l'acétaldéhyde. Couvrir la cuve. Sous l'effet des vapeurs d'acétyldéhyde, une tache de méthamphétamine prend une couleur d'un bleu intense. La limite de détection de la méthamphétamine dans l'urine est d'environ 0,1 µg/ml. L'amphétamine et autres amines primaires donnent des taches de couleur rose pâle à rouge et la réaction est moins sensible.

*Résultats*

**Tableau V.2 Valeurs  $R_f$  x 100**

| <i>Composé</i>  | <i>Système de développement</i> |          |
|-----------------|---------------------------------|----------|
|                 | <i>A</i>                        | <i>B</i> |
| Amphétamine     | 44                              | 66       |
| Méthamphétamine | 33                              | 63       |

### **3. Test colorimétrique**

La littérature fait état d'un test sensible et spécifique permettant la détection de la méthamphétamine dans l'urine [133].

*Préparation des cartouches d'adsorption*

À l'aide d'un aspirateur, remplir de silice octadécyle (ODS-silica; 0,13 g) un tube en polyéthylène (35 mm x 4 mm diam. int.) étiré en une pointe fine (environ 2 mm diam. int.).

*Préparation du réactif Simons modifié*

Mélanger de l'acétaldéhyde (25 ml) contenant de l'acide acétique à 1,5 % avec du méthanol (25 ml) et conserver la solution au réfrigérateur. Avant utilisation, en mélanger un volume à un volume de solution aqueuse de nitroprussiate de sodium à 1 %.

*Procédure*

Commencer par activer chaque cartouche d'adsorption en y faisant passer un mélange méthanol - acide chlorhydrique 0,1 M (9:1, v/v; 2 ml), puis de l'eau distillée (3 ml). Mélanger une partie de l'échantillon d'urine (5 ml) avec le tampon (0,5 M, pH 8,0; 2,5 ml) et passer lentement la solution dans la cartouche d'adsorption, à l'aide d'une seringue jetable. Laver la cartouche avec une solution aqueuse d'acétone (20 %, v/v; 4 ml) et faire passer le réactif Simons modifié (0,4 ml) à travers l'adsorbant. Recueillir l'éluant en quatre fractions de trois gouttes et ajouter à chaque fraction une goutte d'une solution de carbonate de sodium (1 %, w/v). La présence de méthamphétamine est révélée par l'apparition d'une coloration bleue, le plus souvent dans la troisième fraction, mais aussi dans la deuxième et la quatrième s'il y a une forte concentration de méthamphétamine dans l'urine. En l'absence de méthamphétamine, la coloration est orange pâle. La limite de détection est de 1 µg/ml de méthamphétamine dans les urines et le test peut être réalisé en trois minutes.

## **D. Méthodes chromatographiques de confirmation**

### ***1. Chromatographie en phase gazeuse (CG)***

#### *a) Dérivatisation de l'échantillon*

*Anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) [134]:*

Ajouter au résidu sec 50 µl de HFBA. Boucher le tube, agiter et incuber à 75 °C pendant 20 minutes. Déboucher le tube et sécher à l'air ou à l'azote à 30 °C. Dissoudre le contenu dans 50 µl d'acétate d'éthyle, et injecter 1 à 2 µl sur la colonne CG.

*Variante [135]:*

Ajouter au résidu sec de l'hydroxyde de potassium (0,5 M; 50 µl) puis 500 µl de toluène. Après avoir mélangé et centrifugé, transférer la couche organique dans un tube à essai propre et ajouter 5 µl de HFBA. Mélanger soigneusement la solution et ajouter immédiatement en continuant à mélanger du bicarbonate de soude (10 %, w/v; 500 µl). Centrifuger le tube et injecter 1 µl de la couche (supérieure) de toluène sur la colonne CG.

*Anhydride trifluoroacétique (TFAA) [125, 136]:*

Ajouter au résidu sec de l'acétate d'éthyle (100 µl) et du TFAA (50 µl). Agiter le tube et incuber à 60 °C pendant 20 minutes. Évaporer soigneusement et délicatement le mélange sous un jet d'air ou d'azote à température ambiante pour obtenir 50 µl de volume final, puis injecter 1 à 2 µl sur la colonne CG.

*N-Méthyl-N-tert-butyltriméthylsilyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) [137]:*

Ajouter au résidu sec 100 µl d'acétonitrile et 150 µl de MTBSTFA. Boucher la fiole et chauffer à 90 °C pendant 15 minutes, puis laisser à température ambiante pendant deux heures ou plus. Ajouter 500 µl d'acétonitrile, mélanger et utiliser la solution pour une procédure CG ou CG-SM.

#### *b) Méthode sans dérivation*

*Conditions de travail*

Détecteur: DIF, DNP

Colonnes: Colonnes à remplissage en verre (2 m x 3-4 mm diam. int.) avec phases stationnaires liquides diméthylsilicone ( OV-1, SE-30, par ex.) ou méthylphénylsilicone (OV-17, par ex.).

Gaz porteur: Azote à 30 ml/mn

Des colonnes capillaires en silice fondue avec phases stationnaires non polaires chimiquement liées (SE-54, par ex.) peuvent utilement remplacer les colonnes à remplissage. Le gaz porteur est alors l'hélium, à un débit de 1 ml/mn.

Températures de fonctionnement:

Injecteur: 250-280 °C

Four: 90-280 °C (la programmation dépend de la colonne utilisée)

Détecteur: 280-300 °C

*c) Méthode avec dérivation*

*Conditions de travail*

Détecteur: DIF, DNP, DEC ou SM avec ionisation EI, mode SIM.

Colonnes et températures: Voir ci-dessus la méthode sans dérivation.

*Résultats*

**Tableau V.3. Données sur la rétention d'amphétamine et de méthamphétamine et de leurs dérivés**

| Composé         | Colonne                          |                                      |                                   |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
|                 | SE-30<br>non dérivé <sup>a</sup> | 3 % OV-17<br>TFA dérivé <sup>a</sup> | SE-54<br>HFBA dérivé <sup>b</sup> |
| Amphétamine     | 1 129                            | 1 536                                | 2,74                              |
| Méthamphétamine | 1 176                            | 1 722                                | 3,61                              |

<sup>a</sup> Indices de rétention.

<sup>b</sup> Temps de rétention (mn) sur une colonne capillaire SE-54, 25 m x 0,3 mm diam. int., épaisseur du film 0,17 µm, température programmée de 120 °C (1 mn) à 280 °C à 10°/mn.

**2. Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM) [125, 134, 136, 137]**

Lorsqu'on se sert d'un spectromètre de masse comme détecteur, les principaux ions (m/z) des spectres EI+, en mode SIM, sont ceux indiqués au tableau V.4.

**Tableau V.4. Principaux ions dans le spectre de masse de l'amphétamine, de la méthamphétamine et de leurs dérivés**

| Composé         | Principaux ions fragments (m/z) |                                 |                            |                              |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                 | Non dérivés                     | HFBA<br>Non dérivé <sup>a</sup> | TFA<br>dérivé <sup>a</sup> | TBDMS<br>dérivé <sup>b</sup> |
| Amphétamine     | 44, 65, 91                      | 91, 118, 240                    | 91, 118, 140               | 73, 100, 158, 192            |
| Méthamphétamine | 58, 91, 134                     | 91, 118, 254                    | 110, 118, 154              | 73, 172, 173, 206            |

### 3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

Deux méthodes sont indiquées ci-dessous pour le dosage de l'amphétamine et de la méthamphétamine dans l'urine par CLHP [138-141].

#### a) Méthode sans dérivation [138]

##### Préparation des échantillons

Le procédé d'extraction des échantillons est le même que celui décrit précédemment (chapitre V, section B), la phentermine servant de standard interne. Les extraits sont évaporés à siccité sous un jet d'azote (voir à ce sujet les précautions recommandées au chapitre V, section B.2.), puis de nouveau dissous dans 50-100 µl d'acétonitrile ou dans la phase mobile.

##### Solutions standard

Préparer les solutions standard en dissolvant le matériau de référence dans de l'acétonitrile pour obtenir une concentration de 0,01 mg/ml.

##### Conditions de travail

|                     |  |
|---------------------|--|
| Colonne:            | Silice octadécyle (Spherisorb ODS-1 ou équivalent), 3 ou 5 µm, 12,5 cm x 4,0 mm diam. int. + précolonne.   |
| Phase mobile:       | Acétonitrile - eau (57:943, w/w) + acide phosphorique (8,5 g/l) + hexylamine (0,28 ml/l). Selon le type de colonne utilisé, on peut optimiser les valeurs de k' en modifiant la proportion acétonitrile - eau. |
| Débit:              | 0,8 ml/mn  |
| Détection:          | UV à 190 nm  |
| Volume d'injection: | 10 µl  |
| Quantification:     | Par aire des pics, au moyen de la méthode du standard interne.   |

##### Résultats

Temps de rétention pour la phentermine (standard interne):

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| Amphétamine     | 0,64          |
| Méthamphétamine | 0,93          |
| Phentermine     | 1,00 (8,1 mn) |

#### b) Méthode avec dérivation [141]

##### Préparation des échantillons

Extraire les échantillons selon la méthode décrite précédemment (chapitre V, section B), la phentermine servant de standard interne. Préparer les solutions standard en dissolvant le matériau de référence dans de l'urine neutre pour obtenir une concentration de 5 µg/ml, puis les soumettre aux mêmes opérations que les échantillons d'urine à tester. Évaporer les extraits à siccité sous un jet d'azote (voir à ce sujet les précautions recommandées au chapitre V, section B.2.), puis les dissoudre à nouveau dans du bicarbonate de soude (2 %, w/v; 200 µl) et ajouter un volume égal de β-naphthoquinone-4-sulphonate de sodium. Chauffer dans un four à 60 °C pendant 30 minutes, puis extraire la solution aqueuse avec de l'hexane - diéthyléther (2:1, v/v) à l'aide



d'un agitateur-mélangeur (1 mn). Transférer la couche organique dans un tube propre et évaporer à siccité sous un jet d'azote. Dissoudre le résidu dans de l'acétonitrile (100 µl).

#### *Conditions de travail*

Colonne: Silice octadécyle (m-Bondapack C-18 ou équivalent), 3 ou 5 µm, 15 cm x 3,9 mm diam. int.  
Phase mobile: Acétonitrile - méthanol - acide sulfurique 0,01 M (20:20:60, v/v/v)  
Débit: 0,8 ml/mn  
Température: 40 °C  
Détecteur: UV à 248 nm ou détecteur électrochimique à 0,0 V versus Ag/AgCl  
Volume d'injection: 5-10 µl  
Quantification: Par aire des pics, au moyen de la méthode du standard interne.

#### *Résultats*

Temps de rétention pour la phentermine (standard interne):

|                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| Amphétamine     | 0,57            |
| Méthamphétamine | 0,70            |
| Phentermine     | 1,00 (25,12 mn) |

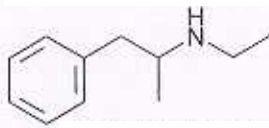
### **E. Interprétation des résultats**

De l'amphétamine inchangée a été détectée dans des urines jusqu'à 29 heures après ingestion par voie orale d'une dose unique de 5 mg. On a également détecté de la méthamphétamine inchangée jusqu'à 23 heures après la prise d'une dose unique par voie orale. Un résultat d'amphétamine positif indique généralement la prise d'amphétamine ou de méthamphétamine au cours des 24 ou 48 heures précédant l'analyse.

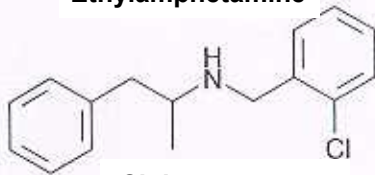
Il faut tenir compte de trois autres considérations. En premier lieu, divers médicaments génériques utilisés comme décongestionnants et anorexiantes contiennent de l'éphédrine et de la phénylpropanolamine et peuvent induire des résultats positifs avec les tests EMIT et RIA s'ils sont présents dans les urines en concentrations importantes. Deuxièmement, divers médicaments prescrits sur ordonnance, tels que la benzphétamine, la fenfluramine, la méphentermine, la phenmétrazine et la phentermine peuvent également induire des résultats positifs avec les dosages immunologiques. Enfin, certains médicaments se métabolisent en amphétamine et en méthamphétamine dans l'urine (figure V.4). En cas de doute quant à la provenance d'amphétamine ou de méthamphétamine décelée dans un échantillon d'urine, il faut absolument procéder à une nouvelle analyse pour détecter la présence des drogues mères.

Figure V.4 Drogues métabolisant l'amphétamine ou la méthamphétamine

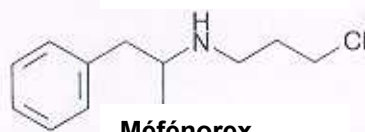
Métabolite amphétaminique



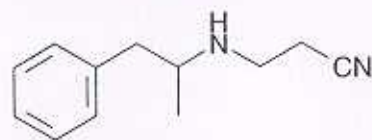
Éthylamphétamine



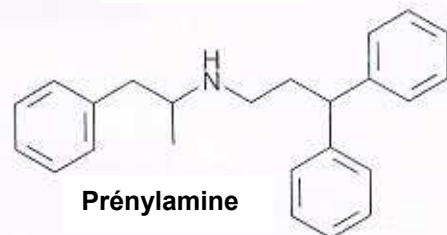
Clobenzorex



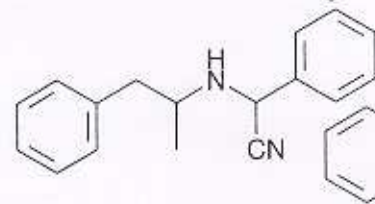
Méfénorex



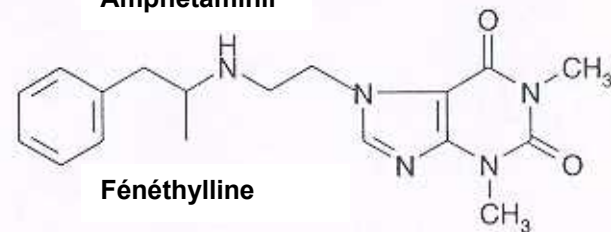
Fenproporex



Prénylamine

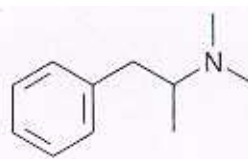


Amphétaminil

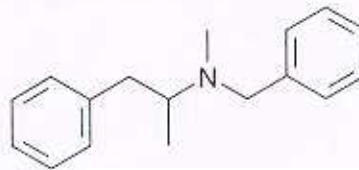


Fénéthylline

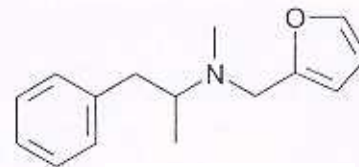
Métabolite méthamphétaminique



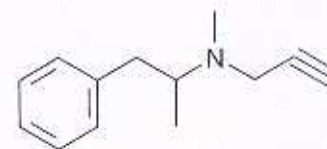
Diméthylamphétamine



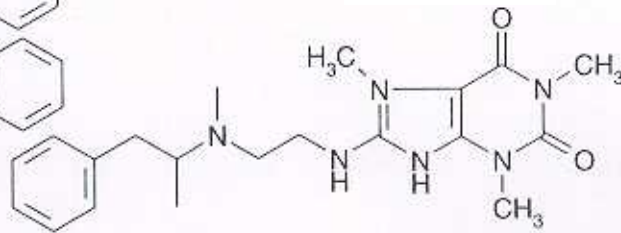
Benzphétamine



Furfénorex



Sélégiline



Fencamine

## VI. Méthodes recommandées pour la détection et le dosage des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique dans les échantillons biologiques

### A. Introduction

Les dérivés amphétaminiques illicites substitués au niveau du noyau aromatique sont plus rares que l'amphétamine et la méthamphétamine, dont ils diffèrent d'un point de vue chimique et pharmacologique, et auxquels s'appliquent d'autres méthodes d'analyse. Dans le présent manuel, il sera question des substances suivantes:

|   |                |
|---|----------------|
| 3,4-Méthylènedioxyamphétamine           | MDA            |
| 3,4-Méthylènedioxyméthamphétamine       | MDMA, Ecstasy  |
| 3,4-Méthylènedioxyéthylamphétamine      | MDE, MDEA      |
| 5-Méthoxy-3,4-méthylènedioxyamphétamine | MMDA           |
| 4-Méthoxyamphétamine                    | PMA            |
| 4-Méthoxyméthamphétamine                | PMMA           |
| 2,5-Diméthoxyamphétamine                | DMA            |
| 2,5-Diméthoxy-4-méthylamphétamine       | DOM, STP       |
| 2,5-Diméthoxy-4-éthylamphétamine        | DOET           |
| 3,4,5-Triméthoxyamphétamine             | TMA            |
| 4-Bromo-2,5-diméthoxyamphétamine        | DOB, Bromo-STP |

Nombre d'autres analogues de l'amphétamine et de la méthamphétamine ont été synthétisés, dont certains, notamment la 3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine et la *N,N*-diméthylamphétamine, ont été illicitement écoulés à petite échelle à certains endroits. À l'exception de la PMMA, ils figurent aussi parmi les substances inscrites aux Tableaux de la Convention sur les substances psychotropes (1971). Le lecteur trouvera des informations sur la genèse, les propriétés physiques et chimiques de ces dérivés dans le manuel des Nations Unies sur les méthodes recommandées pour l'identification des dérivés amphétaminiques illicites substitués au niveau du noyau aromatique [129]. Il pourra aussi se procurer des informations complémentaires sur la pharmacologie et la toxicologie dans la littérature spécialisée de publication récente [142-144].

#### 1. Modes de consommation

Pratiquement toutes les substances illicites contiennent la drogue sous forme de chlorhydrate. Elles se présentent sous forme de poudres blanches ou blanchâtres, en comprimés ou en capsules. La DOB, quant à elle, fait l'objet d'une imprégnation sur papier buvard aux fins de l'administration par voie orale. Toutes ces substances peuvent cependant être injectées par voie intraveineuse, ou être fumées, comme c'est le cas pour l'"ice" (voir le chapitre V, section A.2). La dose habituelle de MDA ou de MDMA va de 80 à 125 mg. La DOM et la DOB sont généralement absorbées par voie orale, à des doses allant de 15 à 25 mg.

#### 2. Métabolisme et excrétion

La plupart des dérivés de l'amphétamine sont rapidement absorbés par le tractus gastro intestinal et franchissent facilement la barrière hémato-encéphalique. Les effets psychotropes sont tout aussi rapides.

Chez l'être humain, le métabolisme des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique n'a pas fait l'objet d'études approfondies. Toutefois, certaines généralisations peuvent être formulées à partir des données disponibles sur l'être humain et des résultats des études métaboliques effectuées sur des animaux de laboratoire [144-153]. Pour toutes les drogues, une proportion importante de la dose est excrétée inchangée dans les urines. Les analytes cibles pour la détection de la consommation de ces drogues au moyen de l'analyse d'urine sont donc les composés de départ.

Le tableau VI.1 résume ce que l'on sait du métabolisme de ces substances. On n'en sait guère plus sur la demi-vie plasmatique de ces dérivés ou sur leur excrétion dans l'urine. Toutefois, des études publiées sur la DOM et la DOET indiquent que jusqu'à 20 % de la première et entre 10 et 40 % de la seconde sont excrétés inchangés dans l'urine au cours des 24 premières heures. L'excrétion urinaire maximale se situe entre 3 et 6 heures pour ces deux substances [150, 151].

Lors d'une étude clinique contrôlée, on a pu observer, pour une concentration de MDMA de 1,5 mg/kg de poids corporel, des pics de niveau plasmatique de l'ordre de 0,33 µg/ml après 2 heures, avec une demi-vie plasmatique de 8 heures. De petites quantités de MDA, le métabolite *N*-déméthylé de la MDMA, étaient observables dans le plasma. Les niveaux moyens de MDMA dans l'urine étaient d'environ 1,4, 14 et 23 µg/ml après 1, 5, 10 et 22 heures, respectivement. Les principaux métabolites urinaires étaient la 4-hydroxy-3-méthoxyméthamphétamine et la 3,4-dihydroxyméthamphétamine, toutes deux excrétées sous forme de glucuronides [153].

**Tableau VI.1. Métabolisme de dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique**

| <i>Composé</i> | <i>Espèce</i> | <i>Cible</i> | <i>Autres métabolites</i>   | <i>Références</i>      |
|----------------|---------------|--------------|---|------------------------|
| MDA            | Rat           | MDA          | 4-Hydroxy-3-méthoxyamphétamine  | 145                    |
| MDMA           | Humain        | MDMA         | 4-Hydroxy-3-méthoxyméthamphétamine<br>3,4-Dihydroxyméthamphétamine (conjug.)<br>3,4-Méthylènedioxyamphétamine | 146, 153<br>153<br>153 |
| PMA            | Humain        | PMA          | 4-Hydroxyamphétamine  | 147                    |
| DOM            | Humain        | DOM          | 4-Carboxy-2,5-diméthoxyamphééamine  | 148-150                |
| DOET           | Humain        | DOET         |   | 151                    |
| DOB            | Humain        | DOB          |   | 152                    |

### **B. Procédures d'échantillonnage et de préparation des échantillons pour le dosage des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique**

Se référer aux procédures générales et aux précautions à prendre décrites au chapitre I, sections C et G.5, qui valent également pour le dosage des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique.

#### *Précautions à prendre*

Il faut procéder avec précaution lorsqu'il s'agit de concentrer par évaporation des extraits contenant des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique, étant donné le risque de perdre les bases libres pendant l'évaporation du solvant. On pourra éviter ces pertes en ajoutant à l'extrait de l'acide chlorhydrique méthanolique (méthanol - acide chlorhydrique concentré (9:1, v/v; 50 ml)) pour obtenir les chlorhydrates correspondants des drogues avant d'évaporer le solvant.

## ***1. Préparation des échantillons pour le dosage immunologique***

En général, les tests de dépistage immunologique nécessitent fort peu de préparation des échantillons. Il n'est pas nécessaire d'hydrolyser les urines car les dosages immunologiques mesurent à la fois les formes libres et conjuguées de la drogue et/ou de ses métabolites. Il peut être nécessaire d'ajuster le pH ou de centrifuger l'urine pour en éliminer la turbidité. Pour optimiser les résultats, il importe de respecter les instructions du fabricant.

## ***2. Préparation des échantillons pour la chromatographie***

### *a) Hydrolyse*

Pour les dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique, une hydrolyse n'est généralement pas nécessaire, sauf lorsque de faibles concentrations des métabolites mono- ou di-hydroxylés (de MDMA, par exemple) doivent être analysés [153].

### *b) Extraction*

Les analytes cibles sont les dérivés amphétaminiques inchangés substitués au niveau du noyau aromatique extraits des urines au moyen de procédures analogues à celles décrites pour l'amphétamine et la méthamphétamine (chapitre V, section B). On notera que certains métabolites des substances de ce groupe peuvent contenir à la fois des groupements acides (carboxylique et phénolique) et basiques (amine). Si ces métabolites doivent être analysés, il faut choisir soigneusement les conditions d'extraction, en particulier le pH.

Diverses procédures d'extraction de la MDMA en phase solide, utilisant des sorbants mélangés [154] ou échangeurs d'ions [138, 153], ont été proposées. La méthode suivante est recommandée.

Mélanger l'urine (2 ml) au standard interne (0,25 ml d'une solution à 8 µg/ml du standard interne choisi) à une solution tampon de phosphate (0,1 M, pH 6; 2 ml) [154]. Le pH est ajusté à pH 5 à 7 avec de l'hydroxyde de sodium (0,1 M) ou de l'acide chlorhydrique (0,1 M) si nécessaire. Conditionner des cartouches d'extraction en phase solide (d'une capacité de 5 ml, remplies de silice modifiée contenant un mélange de groupements non polaires et échangeurs de cations, par exemple Bond Elut Certify®) avec du méthanol (2 ml) et un tampon de phosphate (0,1 M, pH 6; 2 ml). Faire lentement passer les échantillons d'urine au travers des cartouches pendant au moins 2 minutes. Laver les cartouches à l'acide acétique (1 M; 1 ml) puis sécher à l'air sous vide intégral pendant 5 minutes. Rincer à nouveau les cartouches au méthanol (6 ml) et les sécher une nouvelle fois pendant 2 minutes. Éluer les analytes avec de l'acétate d'éthyle contenant de l'ammoniaque concentré à 2 % (fraîchement préparé; 2 ml). L'éluat est soigneusement évaporé sous un jet d'azote à une température inférieure à 40 °C. Notons qu'il n'est pas indiqué d'ajouter de l'acide chlorhydrique méthanolique à ces extraits pour éviter la perte d'analyte par évaporation (voir chapitre VI, section B ci-dessus) car il en résulterait une précipitation de chlorure d'ammonium. Si nécessaire, les extraits peuvent être purifiés, en fonction de la méthode d'analyse qui sera appliquée, par séparation du résidu en hydroxyde de sodium aqueux (1 M; 1 ml) et chlorobutane (2,5 ml). La couche organique supérieure est transvasée dans un tube de verre propre et soigneusement évaporée à siccité. Dans ce cas, on peut ajouter de l'acide chlorhydrique méthanolique avant d'évaporer le solvant.

### *c) Standards internes*

Dans la mesure du possible, le standard interne devra répondre aux critères généraux indiqués au chapitre I, section G. Les standards internes préconisés pour l'analyse des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique dans l'urine par CG ou CLHP sont la phentermine, la propylamphétamine, la méthylènedioxypropylamphétamine et autres

analogues de l'amphétamine. Pour la CG-SM, ce sont des analogues deutérés des analytes cibles; à défaut, l'un des standards ci-dessus pour la CG peut être utilisé.

#### d) Standards d'étalonnage

Préparer une solution mère de chaque analyte cible ainsi que du standard interne dans du méthanol, à une concentration de 1 mg/ml. À partir de ces solutions mères, préparer des standards d'urine contenant le (ou les) composé(s) cible(s) (de 0 à 5 µg/ml) et du standard interne à la concentration de 5 µg/ml. Une série de standards d'étalonnage devra être analysée en même temps que les échantillons à tester.

### C. Méthodes de détection

#### 1. Dosages immunologiques

Des observations d'ordre général sur la sélection et l'utilisation des immunodosages figurent au chapitre I, section G.1. La plupart des dosages pour la détection des drogues de type amphétamine sont conçus pour détecter l'amphétamine et/ou la méthamphétamine, mais on observe pour certains d'importantes réactions croisées avec des membres de la famille des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique. Ces dosages n'étant pas spécifiques, tout résultat positif doit être confirmé par une deuxième méthode, plus spécifique.

Aucun seuil de concentration ou de limite de détection n'a été établi pour les amphétamines substituées au niveau du noyau aromatique. Toutefois, les données relatives aux réactions croisées peuvent être comparées aux niveaux de réactions croisées et aux seuils de concentration pour l'amphétamine et la méthamphétamine et permettent de se faire une idée des seuils concernant les dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique (voir tableau VI.2.)

**Tableau VI.2. Réactivités croisées des dosages immunologiques vendus dans le commerce pour la détection des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique**

| Dosage                                  | Réactivité croisée (%)     |             |            |               |             |             |             |
|---|----------------------------|-------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
|   | MDA                        | MDMA        | MDE        | DMA           | TMA         | DOB         | DOM         |
| EMIT-d.a.u. monoclonal                  | 147 (1 000) <sup>a,b</sup> | 74 (1 000)  | --         | --            | --          | --          | --          |
| FPIA-TDx amphétamine                    | 15(1 000) <sup>c,d</sup>   | 25 (1 000)  | 32 (1 000) | 0,6 (5 000)   | 0,4 (5 000) | 0,5 (5 000) | 0,6 (5 000) |
| FPIA-TDx amphétamine/méthamphétamine II | 148(1 000) <sup>c,d</sup>  | 97 (1 000)  | 43 (1 000) | 7 (5 000)     | 3 (5 000)   | 5 (5 000)   | 4 (5 000)   |
| Abuscreen-Online                        | 41(1 000) <sup>a,b</sup>   | 0,2 (1 000) | 66 (1 517) | 0,5 (219 298) | --          | --          | --          |

<sup>a</sup> Réaction croisée = concentration cible (1 000 ng/ml) / concentration équivalent à 1 000 ng/ml de d-amphétamine x 100 (entre parenthèses, équivalents ng/ml).

<sup>b</sup> Indications du fabricant.

<sup>c</sup> Réaction croisée = concentration apparente (mesurée) / concentration réelle x 100 (entre parenthèses, concentration à laquelle la réaction croisée a été déterminée, ng/ml).

<sup>d</sup> Voir J. T. Cody [128].

## 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

### CCM standard

On trouvera au chapitre I, section G.2, des observations générales sur l'application de la CCM comme technique de détection. Des précisions sur les matériels et les procédures CCM standard sont fournies dans d'autres publications [10] et s'appliquent à l'analyse des extraits biologiques.

### Plaques CCM

Imprégnation: Gel de silice activé G contenant un additif qui devient fluorescent sous l'effet de la lumière UV, longueur d'onde 254 nm.  
Épaisseur de la couche: 0,25 mm  
Dimension des plaques: Plaques de verre 20 x 20 cm, 20 x 10 cm or 10 x 5 cm; la distance de migration optimale est d'environ 10 cm.

### Solutions standard

Amener toutes les solutions standard à une concentration de 1 mg/ml dans du méthanol et appliquer 5 µl de chaque sur la plaque.

### Procédure

Les extraits d'urine sont évaporés à siccité dans un tube à essai (à ce sujet, voir les précautions recommandées au chapitre VI, section B) puis dissous à nouveau dans du méthanol (50 µl). La totalité de l'extrait est déposé sur la plaque à l'aide d'un capillaire en verre.

### Solvants de développement[129]

|            |                  |     |
|------------|------------------|-----|
| Mélange A: | Méthanol         | 100 |
|            | Ammoniaque conc. | 1,5 |
| Mélange B: | Acétate d'éthyle | 85  |
|            | Méthanol         | 10  |
|            | Ammoniaque conc. | 5   |

### Examen visuel

Les plaques doivent d'abord être séchées, soit à température ambiante, soit dans un four à 120 °C pendant 10 minutes ou, plus rapidement, à l'air chaud pulsé. Pour obtenir un bon développement des couleurs, il faut éliminer toutes les traces d'ammoniaque de la plaque.

Réactif Fast Black K [129-132]. (Pour la préparation voir chapitre V, section C.2)

Réactif à la ninhydrine. (Pour la préparation, voir chapitre V, section C.2)

Réactif à la fluorescamine (Fluram). (Pour la préparation voir chapitre V, section C.2)

Pour la détection de faibles concentrations d'amines primaires, l'utilisation du réactif à la fluorescamine (Fluram) est recommandée (voir chapitre V, section C.2).

**Tableau VI.3 Valeurs  $R_f \times 100$**

| Composé | Système de développement |    |
|---------|--------------------------|----|
|         | A                        | B  |
| MDA     | 41                       | 62 |
| MDMA    | 31                       | 62 |
| PMA     | 41                       | 62 |
| DMA     | 37                       | 65 |
| DOM     | 35                       | 63 |
| DOET    | 36                       | 61 |
| DOB     | 37                       | 62 |

#### D. Méthodes chromatographiques de confirmation

##### 1. Chromatographie en phase gazeuse (CG)

###### a) Dérivatisation de l'échantillon

###### *Anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) [134]*

Ajouter au résidu sec 50 µl de HFBA. Boucher le tube, agiter et incuber à 75 °C pendant 20 minutes. Déboucher le tube et sécher à l'air ou à l'azote à 30 °C. Dissoudre le contenu dans 50 µl d'acétate d'éthyle, et injecter 1 à 2 µl sur la colonne CG.

###### *Variante [135]*

Ajouter au résidu sec de l'hydroxyde de potassium (0,5 M; 50 µl), puis 500 µl de toluène. Après avoir mélangé et centrifugé, transférer la couche organique dans un tube à essai propre et ajouter 5 µl de HFBA. Mélanger soigneusement la solution et ajouter immédiatement, en continuant à mélanger, du bicarbonate de soude (10 %, w/v; 500 µl). Centrifuger le tube et injecter 1 µl de la couche (supérieure) de toluène sur la colonne CG.

###### *Anhydride trifluoroacétique (TFAA) [125, 136]*

Ajouter au résidu sec de l'acétate d'éthyle (100 µl) et du TFAA (50 µl). Agiter le tube et incuber à 60 °C pendant 20 minutes. Évaporer soigneusement et avec précaution le mélange sous un jet d'air ou d'azote à température ambiante pour obtenir 50 µl de volume final, puis injecter 1 à 2 µl sur la colonne CG.

###### b) Méthode sans dérivation: technique de la colonne à remplissage

###### *Conditions de travail*

Détecteur: DIF, DNP

Colonnes: Colonnes à remplissage en verre (2 m x 3-4 mm diam. int.) avec phases stationnaires liquides diméthylsilicone (par ex. OV-1, SE-30) ou méthylphénylsilicone (par ex. DB-1, OV-17).

Gaz porteur: Azote à 30 ml/mn

Des colonnes capillaires en silice fondue avec phases stationnaires non polaires chimiquement liées (par ex. SE-54) peuvent utilement remplacer les colonnes à remplissage. Le gaz porteur est alors l'hélium, à un débit de 1 ml/mn.



Températures de travail: Injecteur: 250-280 °C  
 Four: 90-280 °C (la programmation dépend de la colonne utilisée)  
 Détecteur: 280-300 °C

*c) Méthode avec dérivation*

*Conditions de travail*

Détecteur: DIF, DNP, DEC ou SM avec ionisation EI, mode SIM.

Colonnes et

températures: Voir ci-dessus la méthode sans dérivation.

*Résultats*

**Tableau VI.4. Données sur la rétention des amphétamines substituées au niveau du noyau aromatique et de leurs dérivés**

| <i>Composé</i> | <i>Colonne</i>                              |                                    |                                      |
|----------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|
|                | <i>OV-1 ou SE-30 non dérivé<sup>a</sup></i> | <i>DB-1 non dérivé<sup>a</sup></i> | <i>SE-54 HFBA dérivé<sup>b</sup></i> |
| MDA            | 1 477                                       | 1 444                              | 5,77                                 |
| MDMA           | 1 585                                       | 1 501                              | 6,87                                 |
| PMA            | 1 412                                       | 1 346                              | 4,77                                 |
| DMA            | 1 558                                       | 1 527                              | 6,24                                 |
| DOM            | 1 618                                       | 1 593                              | 6,65                                 |
| DOET           | 1 654                                       | 1 654                              | 7,23                                 |
| DOB            | 1 809                                       | 1 786                              | 8,70                                 |

<sup>a</sup> Indices de rétention.

<sup>b</sup> Temps de rétention (mn) sur une colonne capillaire SE-54, 25 m x 0,3 mm diam. int., épaisseur du film 0,17 µ.m, température programmée de 120 °C (1 mn) à 280 °C à 10°/mn Le temps de rétention de l'amphétamine sur ce système est de 2,74 mn.

**2. Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CG-SM)**

Lorsqu'on se sert d'un spectromètre de masse comme détecteur, les principaux ions (m/z) des spectres EI sont ceux indiqués au tableau VI.5.

**Tableau VI.5. Principaux ions dans le spectre de masse des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique**

| <i>Composé</i> | <i>Principaux fragments ioniques (m/z)</i> |                         |
|----------------|--|-------------------------|
|                | <i>Non dérivés</i>                         | <i>HFBA dérivés</i>     |
| MDA            | 44, 135, 136                               | 135, 162, 240           |
| MDMA           | 58, 77, 135, 136                           | 135, 162, 254           |
| PMA            | 44, 78, 122                                | 121, 148, 240           |
| PMMA           | 58, 77, 78, 121                            | --                      |
| DMA            | 44, 72, 91                                 | 151, 178, 240           |
| DOM            | 44, 151, 166                               | 91, 135, 165, 193, 405  |
| DOET           | 44, 165, 180                               | 179, 206, 240           |
| DOB            | 44, 215, 217, 230, 232                     | 229, 231, 256, 258, 240 |

### 3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

Deux méthodes sont indiquées ci-après pour le dosage des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique dans l'urine par CLHP [138-141].

#### a) Méthode sans dérivatisation [138]

##### *Préparation des échantillons*

Le procédé d'extraction des échantillons est le même que celui décrit précédemment (chapitre VI, section B), la phentermine servant de standard interne. Les extraits sont évaporés à siccité sous un jet d'azote (voir à ce sujet les précautions recommandées au chapitre VI, section B.2), puis de nouveau dissous dans 100 µl d'acétonitrile ou dans la phase mobile.

##### *Solutions standard*

Préparer les solutions standard en dissolvant le matériau de référence dans de l'acétonitrile pour obtenir une concentration de 0,01 mg/ml.

##### *Conditions de travail*

- Colonne: Silice octadécyle (Spherisorb ODS-1 ou équivalent), 3 ou 5 µm, 12,5 cm x 4,0 mm diam. int. + précolonne.
- Phase mobile: Acétonitrile - eau (57:943, w/w) + acide phosphorique (8,5 g/l) + hexylamine (0,28 ml/l). Selon le type de colonne utilisé, on peut optimiser les valeurs de k' en modifiant la proportion acétonitrile - eau.
- Débit: 0,8 ml/mn
- Détection: UV à 190 nm
- Volume d'injection: 10 µl
- Quantification: Par aire des pics, au moyen de la méthode du standard interne.

## b) Méthode avec dérivation [141]

### Préparation des échantillons

Extraire les échantillons selon la méthode décrite précédemment (chapitre VI, section B), la phentermine servant de standard interne. Évaporer les extraits à siccité dans une fiole en verre sous un jet d'azote, puis les dissoudre à nouveau dans une solution aqueuse de bicarbonate de soude (2 %, w/v; 200 µl) et ajouter une solution aqueuse de sodium β-naphthoquinone-4-sulphonate (0,5 %, w/v; 200 µl). Boucher la fiole et la chauffer à 60 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement, extraire la solution aqueuse avec de l'hexane - diéthyléther (2:1, v/v) à l'aide d'un agitateur-mélangeur (1 mn). Transférer la couche organique et évaporer à siccité sous un jet d'azote. Dissoudre le résidu dans de l'acétonitrile (100 µl).

### Solutions standard

Préparer les solutions standard en dissolvant le matériau de référence dans de l'urine neutre pour obtenir une concentration de 5 µg/ml.

### Conditions de travail

|                     |   |
|---------------------|---|
| Colonne:            | Silice octadécyle (µ-Bondapak C-18 ou équivalent), 3 or 5 µm, 15 cm x 3,9 mm diam. int. |
| Phase mobile:       | Acétonitrile - méthanol- acide sulfurique 0,01 M (20:20:60, v/v/v)                      |
| Débit:              | 0,8 ml/mn   |
| Température:        | 40 °C   |
| Détecteur:          | UV à 248 nm ou détecteur électrochimique à 0,0 V.                                       |
| Volume d'injection: | 5-10 µl.  |
| Quantification:     | Par aire au moyen de la méthode du standard interne.                                    |

### Résultats

**Tableau VI.6. Temps de rétention des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique par rapport à la phentermine (I.S.)**

| Composé     | Méthode sans dérivation             | Méthode avec dérivation |
|-------------|-------------------------------------|-------------------------|
| MDA         | 0,83                                | 0,49                    |
| MDMA        | 1,19                                | --                      |
| PMA         | 0,90 a                              | 0,57                    |
| PMMA        | --                                  | 0,76                    |
| Phentermine | 1,00 (8,1 mn; 3,4 mn <sup>a</sup> ) | 1,00 (25,12 mn)         |
| DMA         | 1,88                                | --                      |
| DOM         | 2,15a                               | 1,44                    |
| DOET        | 4,06a                               | --                      |
| DOB         | 2,59a                               | 1,72                    |

<sup>a</sup> Déterminé avec une phase mobile acétonitrile - eau (182:816, w/w) + acide phosphorique (8,5 g/l) + hexylamine (0,28 ml/l).

## E. Interprétation des résultats

La littérature scientifique aborde peu la gamme des concentrations auxquelles on peut s'attendre chez les consommateurs occasionnels ou chroniques de dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau aromatique.

Après une prise unique de MDA, on signale des concentrations plasmatiques et urinaires de la drogue inchangée inférieures à 0,4 et 10  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. Pour la PMA, ces concentrations sont inférieures à 0,2 et 5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement [84].

Dans les cas d'abus, on a observé des niveaux plasmatiques et urinaires de MDA de l'ordre de 5 à 25 et 50 à 150  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. Pour la PMA, les chiffres correspondants sont de 0,3 à 2  $\mu\text{g/ml}$  et 5 à 200  $\mu\text{g/ml}$  [84].

Après la prise de MDMA dans la proportion de 1,5 mg par kg de poids corporel, des maxima plasmatiques de l'ordre de 0,33  $\mu\text{g/ml}$  ont été observés, tandis que des concentrations urinaires d'environ 1,4, 14 et 23  $\mu\text{g/ml}$  étaient observables après 1,5, 10 et 22 heures, respectivement [153].

Dans des cas de décès liés à ces drogues, des concentrations sanguines et urinaires de MDA de l'ordre de 2,3 à 26  $\mu\text{g/ml}$  et de 46 à 175  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement, ont été observées [154-156]. Pour cinq décès dus à la MDMA et à la MDEA, des concentrations sanguines de l'ordre de 0,9 à 2  $\mu\text{g/ml}$  [157] ont été décelées. Pour neuf décès dus à la PMA, des concentrations sanguines et urinaires de l'ordre de 0,3 à 1,9 et 6,0 à 175  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement ont été détectées [158].

## Références

- 1 Rapport du Groupe d'experts sur les méthodes d'analyse recommandées pour le cannabis et les amphétamines et les méthamphétamine, E/CN.7/1987/8.
- 2 Rapport du Groupe d'experts chargé de définir des directives en vue de l'établissement de laboratoires et de programmes nationaux de dépistage dans les liquides organiques des drogues qui font l'objet d'abus, E/CN.7/1988/CRP.5, par. 42.
- 3 Commission des stupéfiants, rapport sur la dixième Session extraordinaire, E/1988/13-E/CN.7/1988/14, par. 236 b).
- 4 Rapport de la Conférence internationale sur l'abus et le trafic illicite des drogues (Publication des Nations Unies, numéro de vente F.87.1.18), par. 84.
- 5 Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de l'héroïne et des cannabinoïdes dans les échantillons biologiques, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/23, Nations Unies, 1993.
- 6 Méthodes recommandées pour la détection et le dosage de la cocaïne, de l'amphétamine, de la méthamphétamine et des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau benzénique dans les échantillons biologiques, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/24, Nations Unies, 1993.
- 7 Méthodes recommandées pour l'identification de l'héroïne, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/6, Nations Unies, 1986.
- 8 Méthodes recommandées pour l'identification de l'opium et de la morphine brute, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/11, Nations Unies, 1987.
- 9 Méthodes recommandées pour l'identification du cannabis, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/8, Nations Unies, 1987.
- 10 Méthodes recommandées pour l'identification de la cocaïne, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/7, Nations Unies, 1986.
- 11 Méthodes recommandées pour l'identification de l'amphétamine et de la méthamphétamine, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/9, Nations Unies, 1987.
- 12 Méthodes recommandées pour l'identification des dérivés amphétaminiques substitués au niveau du noyau benzénique, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/12, Nations Unies, 1987.
- 13 B. Needleman, M. Porvaznik & D. Ander, Creatinine analysis in single collection urine specimens, *J. Forens. Sci.* 37, 1125-1133 (1992).
- 14 C. Edwards, M. J. Fyfe, R. H. Liu & A. S. Walia, Evaluation of common urine specimen adulteration indicators, *J. Anal. Toxicol.* 17, 251-252 (1993).
- 15 R. C. Baselt, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, Vol.1, Biomedical Publications, Canton, Connecticut 06019, 1978, p. 10.
- 16 J. G. Umans, T. S. K Chiu, R. A Lipman, M. F. Schultz, S-U. Shin & C. E Inturrisi, Determination of heroin and its metabolites by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 233, 213-225 (1982).
- 17 S. Y. Yeh, C. W. Gorodetzky and R. L. McQuinn, Urinary excretion of heroin and its metabolites in man, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196, 249-256 (1976).

- 18 Opiatnachweis im Harn, DFG/TIAFT Mitt. XXI. Verlag Chemie, Weinheim, 1993.
- 19 E. J. Cone and W. D. Darwin, Rapid assay of cocaine, opiates and metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 580, 43-61 (1992).
- 20 K. Bjerver, J. Jonsson, A. Nilsson, J. Schuberth and J. Schuberth, Morphine intake from poppy seed food, *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 798-801 (1982).
- 21 R. H. Drost, R. D. Van Ooijen, T. Ioescu & R. A. A. Maes, Determination of morphine in serum and cerebrospinal fluid by gas chromatography and selected ion monitoring after reversed phase column extraction, *J. Chromatogr.* 310, 193-198 (1984).
- 22 E. J. Cone, S. Dickerson, B. D. Paul & J. M. Mitchell, Forensic drug testing for opiates. IV. Analytical sensitivity, specificity, and accuracy of commercial urine opiate immunoassays, *J. Anal. Toxicol.* 16, 72-78 (1992).
- 23 Thin-Layer Chromatography RValues of Toxicologically-Relevant Substances in Standardised Systems, DFG/TIAFT Mitt. XVII. Verlag Chemie, Weinheim, 1992.
- 24 L. R. Goldbaum, P. Santinga & A. M. Dominguez, A procedure for the rapid analysis of large numbers of urine samples for drugs, *Clin. Toxicol.* 5, 369-379 (1972).
- 25 D. C. Fuller & W. H. Anderson, A simplified procedure for the determination of free codeine, free morphine, and 6-acetylmorphine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 315-318 (1992).
- 26 P. M. Kabra & L. J. Marton, *Clinical Liquid Chromatography*, Vol. 1, Analysis of Exogenous Compounds, CRC Press, 1984, pp. 153-157.
- 27 C. Kim & T. Kats, Rapid and sensitive analysis of morphine in serum by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Anal. Toxicol.* 8, 135- 137 (1984).
- 28 J.-O. Svensson, Determination of morphine, morphine-6-glucuronide and normorphine in plasma and urine with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 375, 174-178 (1986).
- 29 J. Gerostamoulos, K. Crump, I. M. McIntyre & O. H. Drummer, Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 617, 152-156 (1993).
- 30 J. Fehn and G. Megges, Detection of 06-monoacetylmorphine in urine samples by GC/MS as evidence for heroin use, *J. Anal. Toxicol.*, 9, 134-138 (1985).
- 31 R. W. Romberg & V. E. Brown, Extraction of 6-monoacetylmorphine from urine, *J. Anal. Toxicol.* 14, 58-59 (1990).
- 32 E. J. Cone, P. Welch, J.M. Mitchell & B. D. Paul, Forensic drug testing for opiates: I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times, *J. Anal. Toxicol.* 15, 1-7 (1991).
- 33 M. C. Dutt, D. S.-T. Lo, D. L. K. Ng & S. Woo, Gas chromatographic study of the urinary codeine-to-morphine ratios in controlled codeine consumption and in mass screening for opiate drugs, *J. Chromatogr.* 267, 117-124 (1983).
- 34 M. A. ElSohly & A. B. Jones, Morphine and codeine in biological fluids: Approaches to source differentiation, *Forens. Sci. Rev.* 1, 13-21 (1989).
- 35 R. Mechoulam, Marijuana Chemistry, *Science*, 168, 1159-1166 (1970).
- 36 R. Mechoulam, Marijuana, Academic Press, New York and London, 1973.

- 37 C. E. Turner, Constituents of *Cannabis sativa* L., XVII: A Review of the natural constituents, *J. Nat. Prod.* 43, 169-234 (1980).
- 38 M. M. Halldin, S. Carlsson, S. L. Kanter, M. Widman & S. Agurell, Urinary metabolites of *delta*-9-tetrahydrocannabinol in man, *Arzneim.-Forsch.* 32, 764-768 (1982).
- 39 T. S. Baker, J. V. Harry, J. W. Russell & R. L. Myers, Rapid method for the GC/MS confirmation of 11-nor-9-carboxy-*delta*-9-tetrahydrocannabinol in urine, *J. Anal. Toxicol.* 8, 255-259 (1984).
- 40 A. S. Christophersen, Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: Plastic versus glass containers, *J. Anal. Toxicol.* 10, 129-131 (1986).
- 41 J. R. Johnson, T. A. Jennison, M. A. Peat and R. L. Foltz, Stability of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in blood and plasma, *J. Anal. Toxicol.* 8, 202-204 (1984).
- 42 P. L. Williams, A. C. Moffat & L. J. King, Combined high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay method for the analysis of  $\Delta$ -tetrahydrocannabinol metabolites in human urine, *J. Chromatogr.* 186, 595 (1979).
- 43 E. J. Cone, R. E. Johnson, W. D. Darwin, D. Yousefnejad, L. D. Mell, B. D. Paul & J. Mitchell, Passive inhalation of marijuana smoke: Urinalysis and room levels of *delta*-9-tetrahydrocannabinol, *J. Anal. Toxicol.* 11, 89-96 (1987).
- 44 K. Verebey, D. Jukofsky & S. J. Mule, Evaluation of a new TLC confirmation technique for positive EMIT cannabinoid urine samples, *Res. Comm. Subst. Abuse* 6, 1-9 (1985).
- 45 R. C. Parry, L. Nolan, R. E. Shirey, G. D. Wachob and D. J. Gisch, Pretreatment of urine samples for the analysis of 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.* 14, 39-44 (1990).
- 46 A. H. B. Wu, N. Liu, Y.-J. Cho, K. G. Johnson and S. S. Wong, Extraction and simultaneous elution and derivatization of 11-nor-9-carboxy- $\Delta$ -tetrahydrocannabinol using Toxi-Lab SPEC® prior to GC/MS analysis of urine, *J. Anal. Toxicol.* 17, 215-217 (1993).
- 47 J. Irving, B. Leeb, R. L. Foltz, C. E. Cook, J. T. Bursey & R. E. Willette, Evaluation of immunoassays for cannabinoids in urine, *J. Anal. Toxicol.* 8, 192-196 (1984).
- 48 D. L. Black, B. A. Goldberger, D. S. Isenschmid, S. M. White & Y. H. Caplan, Urine cannabinoid analysis: An integrated multi-method approach, *J. Anal. Toxicol.*, 8, 224-227 (1984).
- 49 A. B. Jones, H. N. ElSohly & M. A. ElSohly, Analysis of the major metabolite of *delta*-9-tetrahydrocannabinol in urine. V. Cross-reactivity of selected compounds in a radioimmunoassay, *J. Anal. Toxicol.*, 8, 252-254 (1984).
- 50 M. A. ElSohly, A. B. Jones & H. N. ElSohly, Cross-reactivity of selected compounds in the Abbott TDx® cannabinoid assay, *J. Anal. Toxicol.* 14, 277-279 (1990).
- 51 M. J. Kogan, E. Newman & N. J. Wilson, Detection of the marijuana metabolite 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by bonded-phase adsorption and thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.* 306, 441-443 (1984).
- 52 K. K. Kaistha & R. Tadrus, Semi-quantitative thin-layer mass screening detection of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxy acid in human urine, *J. Chromatogr.* 237, 528-533 (1982).
- 53 R. B. Hughes and R. R. Kessler, Increased safety and specificity in the thin-layer chromatographic identification of marihuana, *J. Forens. Sci.* 24, 842-846 (1979).

- 54 M. Congost, R. de la Torre and J. Segura, Optimization of the quantitative analysis of the major Cannabis metabolite (11-nor-9-COOH- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol) in urine by gas chromatography/mass spectrometry, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 367-372 (1988).
- 55 D. Bourquin and R. Brenneisen, Confirmation of Cannabis abuse by the determination of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Chromatogr.* 414, 187-191 (1987).
- 56 R. Clouette, M. Jacob, P. Koteel and M. Spain, Confirmation of 11-nor- $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol in urine as its *t*-butyldimethylsilyl derivative using GC/MS, *J. Anal. Toxicol.* 17, 1-4 (1993).
- 57 J. D. Whiting & W. W. Manders, Confirmation of a tetrahydrocannabinol metabolite in urine by GC, *J. Anal. Toxicol.* 6, 49-52 (1982).
- 58 M. Hanke & G. Megges, Routine-Nachweis des THC-Metaboliten 11-Nor-*delta*-9-THC-9-Carbonsäure in der forensischen Praxis, *Z. Rechtsmed.* 90, 105-108 (1983).
- 59 R. C. Parry & D. J. Gisch, Confirmation of 11-nor-  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using solid-phase extraction pretreatment, *LC-GC Int.* 3, 29-35 (1990).
- 60 G. R. Nakamura, R. D. Meeks & W. J. Stall, Solid-phase extraction, identification, and quantitation of 11-nor-*delta*-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, *J. Forens. Sci.* 35, 792- 796 (1990).
- 61 D. Bourquin & R. Brenneisen, Determination of the major *delta*-9-tetrahydrocannabinol metabolite in urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *Anal. Chim. Acta* 198, 183-189 (1987).
- 62 Y. Nakahara, H. Sekine & SE. Cook, Confirmation of Cannabis use II. Determination of tetrahydrocannabinol metabolites in urine and plasma by HPLC with ECD, *J. Anal. Toxicol.* 13, 22-24 (1989).
- 63 V. Dixit & V. M. Dixit, A unique solid phase extraction column for isolation of 11-nor-D-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine, *J. Liq. Chromatogr.* 13, 3313-3325 (1990).
- 64 P. Kelly & R. T. Jones, Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users, *J. Anal. Toxicol.* 16, 228-235 (1992).
- 65 A. C. Moffat, Monitoring urine for inhaled cannabinoids, *Arch. Toxicol., Suppl.* 9, 103-110 (1986).
- 66 B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, R. I. Gleadle & L. J. King, Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of Cannabis resin, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 289-294 (1984).
- 67 B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, L. J. King & V. Marks, Passive inhalation of cannabis smoke, *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 578-581 (1984).
- 68 R. H. Liu, Important considerations in the interpretation of forensic urine drug test results, *Forens. Sci. Rev.* 4, 51-65 (1992).
- 69 L. D. Baugh & R. H. Liu, Sample differentiation: Cocaine example, *Forens. Sci. Rev.* 3, 101-115 (1991).
- 70 J. F. Casale & R. F. X. Klein, Illicit production of cocaine, *Forens. Sci. Rev.* 5, 95-107 (1993).
- 71 J. M. Moore, R. P. Meyers, M. D. Jimenez, The anatomy of a cocaine comparison case: A prosecutorial and chemistry perspective, *J. Forens. Sci.* 38, 1305-1325 (1993).
- 72 J. F. Casale & J. M. Moore, 3',4',5'-Trimethoxy-substituted analogues of cocaine, cis-/trans-cinnamoylcocaine and tropacocaine: Characterization and quantitation of new alkaloids in coca leaf, coca paste and refined illicit cocaine, *J. Forens. Sci.* 39, 462-472 (1994).



- 73 K. Verebey & M. S. Gold, From coca leaves to crack: The effects of dose and routes of administration in abuse liability, *Psychiatr. Ann.* 18, 513-520 (1988).
- 74 T. Inaba, Cocaine: Pharmacokinetics and biotransformation in man, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 1154-1157 (1989).
- 75 J. Jue Zhang & R. L. Foltz, Cocaine metabolism in man: Identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine, *J. Anal. Toxicol.* 14, 201-205 (1990).
- 76 R. C. Baselt (Ed.) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man: Cocaine*, Biomed. Public., Davis, California (1982), pp. 193-198.
- 77 D. S. Isenschmid, M.W. Fischman, R. W. Foltin & Y. H. Caplan, Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine, *J. Anal. Toxicol.* 16, 311-314 (1992).
- 78 R. C. Baselt, Stability of cocaine in biological fluids, *J. Chromatogr.* 268, 502-505 (1983).
- 79 D. S. Isenschmid, B. S. Levine & Y. H. Caplan, A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites, *J. Anal. Toxicol.* 13, 250-256 (1989).
- 80 J. Vasiliades, Long-term stability of ecgonine methyl ester in urine, *J. Anal. Toxicol.* 17, 253 (1993).
- 81 J. Ambre, T. I. Ruo, J. Nelson & S. Belknap, Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in humans, *J. Anal. Toxicol.* 12 301-306 (1988).
- 82 J. Ortuno, R. de la Torre, J. Segura & J. Cami, Simultaneous detection in urine of cocaine and its main metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8, 911-914 (1990).
- 83 K. Verebey & A. DePace, Rapid confirmation of enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT®) cocaine positive samples by capillary gas-liquid chromatography/nitrogen phosphorus detection (GLC/NPD), *J. Forensic Sci.* 34, 46-52 (1989).
- 84 R. C. Baselt, *Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology*, 2<sup>nd</sup> Ed., PSG Publishing, Mass. (1987).
- 85 L. K. Thompson, D. Yousefnejad, K. Kumor, M. Sherer & E. J. Cone, Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use, *J. Anal. Toxicol.* 11, 36-38 (1987).
- 86 J. E. Wallace, H. E. Hamilton, J. G. Christenson, E. L. Shimek, P. Land & S. C. Harris, An evaluation of selected methods for determining cocaine and benzoylecgonine in urine, *J. Anal. Toxicol.* 1, 20-26 (1977).
- 87 J. A. Sandberg & G. D. Olsen, Microassay for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 525, 113-121 (1990).
- 88 D. Bourquin & R. Brenneisen, Determination of cocaine and cocaine metabolites in urine using HPLC and photodiode array detection, *Proceed. Ann. Meeting Am. Acad. Forens. Sci. (AAFS)*, Las Vegas (1989).
- 89 A. C. Moffat, J.V. Jackson, M.S. Moss & B. Widdop (Eds.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2<sup>nd</sup> Ed., Pharmaceutical Press, London (1986).
- 90 J. Breiter, R. Helger & H. Lang, Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs, *Forens. Sci.* 7, 131-140 (1976).
- 91 G. Gübitz & R. Wintersteiger, Identification of drugs of abuse by high performance thin-layer chromatography, *J. Anal. Toxicol.* 4, 141-144 (1980).

- 92 K. Matsubara, C. Maeda & Y. Fukui, Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction, *Forens. Sci. Int.* 26, 181-192 (1994).
- 93 J. Sherma, J.E. Bernard & M.H. Higgs, Screening of benzoylecgonine in urine with Cyclobond solid phase extraction and high performance TLC, *J. Liq. Chromatogr.* 11, 3135- 3143 (1988).
- 94 B. K. Logan, D. T. Stafford, I. R. Tebbett & C. M. Moore, Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection, *J. Anal. Toxicol.* 14, 154-159 (1990).
- 95 R. E. Anderson & G. L. Nixon, Isolation of benzoylecgonine from urine using solid-phase extraction, *J. Anal. Toxicol.* 17, 432-433 (1993).
- 96 Toxi-Lab Inc., Manufacturer's documentation: Toxi-Lab SPEC-VC-MP1 Extraction of Benzoylecgonine from Urine Using On-Disc Derivatization (1992)
- 97 E. J. Cone & J Mitchell, Validity testing of commercial urine cocaine metabolite assays: II. Sensitivity, specificity, accuracy and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Forens. Sci.* 34, 32-45 (1989).
- 98 M. J. Kogan, D. J. Pierson, M. M. Durkin, & N. J. Wilson, Thin layer chromatography of benzoylecgonine: A rapid qualitative method for confirming the EMIT urine cocaine metabolite assays, *J. Chromatogr.* 490, 236-242 (1989).
- 99 F. K. Rafla and R. L. Epstein, Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol, *J. Anal. Toxicol.* 3, 59-63 (1979).
- 100 S. Goenechea & M. Franke, Kokain, *Mitteilung der Senatskommission für Klinische Toxikologische Analytik, DFG* (1993).
- 101 J. Gerlits, GC/MS quantitation of benzoylecgonine following liquid-liquid extraction of urine, *J. Forens. Sci.* 38, 1210-1214 (1993).
- 102 R. L. Hawks & C. N. Chiang (Eds.) *Urine Testing for Drugs of Abuse, NIDA Res. Monogr.* 73, 93 (1986).
- 103 J. Ambre, M. Fischman & Tsuen-Ih Ruo, Urinary excretion of ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine in humans, *J. Anal. Toxicol.* 8, 23-25 (1984).
- 104 J. Ambre, The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: A kinetic analysis of published data, *J. Anal. Toxicol.* 8, 241-245 (1985).
- 105 E. J. Cone & W. W. Washington, Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use., *J. Anal. Toxicol.* 13, 56-68 (1989).
- 106 Am. Assoc. for Clin. Chem. Special Report, Critical issues in urinalysis of abused sub-stances: Report of the substance-abuse testing committee, *Clin. Chem.* 34, 605-632 (1988).
- 107 C. Cook, R. Jeffcoat & M. Perez Reyes, Pharmacokinetic Studies of Cocaine and Phencyclidine in Man, in G. Barnett and C. N. Chiang (Eds.) *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychoactive Drugs, Biomed. Publ.*, (1985) pp. 48-74.
- 108 P. Jatlow, P. Barash, C. Van Dike, J. Roddnig & R. Byck, Cocaine and succinylcholine: A new caution, *Anesth. Anal.* 58, 235-238 (1979).
- 109 R. M. Smith, Ethyl esters of arylhydroxymethoxy cocaines in the urines of simultaneous cocaine and ethanol users, *J. Anal. Toxicol.* 8, 38-42 (1984).
- 110 G. F. Jackson, J. J. Saady & A. Poklis, Urinary excretion of benzoylecgonine following ingestion of Health Inca Tea, *Forens. Sci. Int.* 49, 57-64 (1991).

- 111 J. Osterloh, Testing for drugs of abuse—Pharmacokinetic considerations for cocaine in urine, *Clin. Pharmacokin.* 24, 355-361 (1993).
- 112 K. K. Redda, in A. Walker and G. Barnett (Eds.) *Cocaine, Marijuana and Designer Drugs: Chemistry, Pharmacology and Behaviour*, CRC Press (1989) p. 72.
- 113 Y. Liu, R. D. Budd & E. C. Griesemer, Study of the stability of cocaine and benzoylecgonine, its major metabolite, in blood samples, *J. Chromatogr.* 248, 318-320 (1982).
- 114 M. R. Harkey & G. L. Henderson, Hair analysis for drugs of abuse, in R.C. Baselt (Ed.) *Adv. Anal. Toxicol.*, Vol. II, Year Book Medical Publishers (1989) pp. 298-329.
- 115 E. J. Cone, K. Kumor, L. K. Thompson & M. Sherer, Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects, *J. Anal. Toxicol.* 12, 200-206 (1988).
- 116 L. K. Thompson, D. Yousefnejad, K. Kumor, M. Sherer & E. J. Cone, Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use, *J. Anal. Toxicol.* 11, 36-38 (1987).
- 117 M. R. Harkey, G. L. Henderson & C. Zhou, Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 15, 260-265 (1991).
- 118 W. Schramm, P. A. Craig, R.H. Smith & G.E. Berger, Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum, and urine, *Clin. Chem.* 39, 481-487 (1993).
- 119 Méthodes recommandées pour l'identification de l'amphétamine et de la méthamphétamine, Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/9, Nations Unies, 1987.
- 120 A. K. Cho, Ice: A new dosage form of an old drug, *Science* 249, 631-634 (1990).
- 121 R. De Cresce, A. Mazura, M. Lifshitz & J. Tilson, *Drug Testing in the Workplace*, American Society of Clinical Pathology Press, Chicago (1989), p. 108.
- 122 L. G. Dring, R. L. Smith & R. T. Williams, The fate of amphetamine in man and other mammals, *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 402-405 (1966).
- 123 J. Caldwell, L. G. Dring & R. T. Williams, Metabolism of [<sup>14</sup>C] methamphetamine in man, the guinea pig and the rat, *Biochem. J.* 129, 11-22 (1972).
- 124 A. H. Beckett & M. Rowland, Urinary excretion kinetics of methamphetamine in man, *J. Pharm. Pharmacol.* 17/Suppl., 109s-114s (1965).
- 125 C. L. Hornbeck & R. J. Czarny, Quantitation of methamphetamine and amphetamine in urine by capillary GC/MS. Part I. Advantages of trichloroacetyl derivatisation, *J. Anal. Toxicol.* 13, 251-262 (1989).
- 126 K. Shimosato, M. Tomita & I. Ijiri, Urinary excretion of p-hydroxylated methamphetamine metabolites in man. I. A method for determination by high-performance liquid chromatography-electrochemistry, *Arch. Toxicol.* 59, 135-140 (1986).
- 127 X. Chen, J. Wijsbeek, J. Van Veen, J. P. Franke & R. A. de Zeeuw, Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify, *J. Chromatogr.* 529, 161-166 (1990).
- 128 J. T. Cody & R. Schwarzhoff, Fluorescence polarization immunoassay detection of amphetamine, methamphetamine, and illicit amphetamine analogues, *J. Anal. Toxicol.* 17, 26-30 (1993).
- 129 Méthodes recommandées pour l'identification des dérivés amféaminiques illicites substitués au niveau du noyau benzénique: Manuel à l'usage des laboratoires nationaux de stupéfiants, ST/NAR/12, Nations Unies, 1987.

- 130 I. Ojanperä, K. Wähälä & T.A. Hase, Fast Black K salt: A versatile thin-layer chromatographic visualisation reagent for the differentiation of aliphatic amines, *Analyst* 115, 263-267 (1990).
- 131 P. Lillsunde & T. Korte, Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification, *J. Anal. Toxicol.* 15, 71-81 (1991).
- 132 I. Ojanperä, P. Lillsunde & T. Korte, Detection of amphetamine analogues by thin layer chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Proceed. Int. Congress on Clin. Toxicol., Poison Control and Analytical Toxicology, LUX TOX'90, 1990, Luxembourg, Bull. Soc. Sci. Med. Luxembourg* 127, 88-92 (1990).
- 133 Y. Nakahara & H. Sekine, A high selective screening test for methamphetamine in human urine, *Forensic Sci. Int.* 26, 277-282 (1984).
- 134 R. W. Taylor, S. D. Le, S. Philip & N. C. Jain, Simultaneous identification of amphetamine and methamphetamine using solid phase extraction and gas chromatography/nitrogen phosphorus detection or gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 13, 293-295 (1989).
- 135 P. Lillsunde & T. Korte, Determination of ring- and N-substituted amphetamines as heptafluorobutyryl derivatives, *Forens. Sci. Int.* 49, 205-213 (1991).
- 136 K. Hara, T. Nagata & K. Kimura, Forensic toxicological analysis of methamphetamine and amphetamine in body materials by gas chromatography/mass spectrometry, *Z. Rechtsmed.* 96, 93-104 (1986).
- 137 R. Melgar & R.C. Kelly, A novel GC/MS derivatization method for amphetamines, *J. Anal. Toxicol.* 17, 399-402 (1993).
- 138 H.-J. Helmlin & R. Brenneisen, Determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in biological matrices by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection, *J. Chromatogr.* 593, 87-94 (1992).
- 139 B. M. Farrell & T. M. Jefferies, An investigation of HPLC methods for the analysis of amphetamines, *J. Chromatogr.* 272, 111-128 (1983).
- 140 Y. Nakahara & Y. Takeda,  $\beta$ -Naphthaquinone sulfonate as electrochemical labelling reagent for high-sensitivity LC analysis of drugs in biological fluids, *Chromatographia* 26, 363-368 (1988).
- 141 Y. Nakahara, A. Ishigami & Y. Takeda, Electrochemical label for high-performance liquid chromatography. I.  $\beta$ -Naphthoquinone-4-sulphonate as an electrochemical detection labelling reagent of amines, *J. Chromatogr.* 489, 371-376 (1989).
- 142 K. Asghar & E. De Souza (Eds.), *Pharmacology and Toxicology of Amphetamine and Related Designer Drugs*, NIDA Res. Monogr. 94, 1989.
- 143 K. K. Redda, C. A. Walker & G. Barnett (Eds.), *Cocaine, Marijuana, Designer Drugs: Chemistry, Pharmacology, and Behaviour*, CRC Press, Florida (1989).
- 144 *Manual on Designer Drugs, An Information Booklet on New Types of Drugs of Abuse-Analogues of Controlled Substances*, WHO/PSA/90.5 (1991).
- 145 G. M. Marquardt, V. DiStefano & L. L. Ling, Metabolism of  $\beta$ -3,4-methylene-dioxyamphetamine in the rat, *Biochem. Pharmacol.* 27, 1503-1505 (1978).
- 146 H. K. Lim & R. L. Foltz, Identification of metabolites of 3,4-(methylenedioxy)-methamphetamine in human urine, *Chem. Res. Toxicol.* 2, 142-143 (1989).
- 147 I. Kitchen, J. Trembley, J. Andre, L. G. Dring, J. R. Idle, R. L. Smith & R. T. Williams, Interindividual and interspecies variation in the metabolism of the hallucinogen 4-methoxyamphetamine, *Xenobiotica* 9, 397-404 (1979).

- 148 S. H. Snyder, L. A. Faillace & H. Weingartner, DOM (STP), a new hallucinogenic drug, and DOET: Effects in normal subjects, *Am. J. Psychiat.* 125, 357-364 (1968).
- 149 B.-T. Ho, V. Estevez, L. W. Tansey, L. F. Englert, P. J. Creaven & W. M. McIsaac, Analogs of amphetamine. 5. Excretory metabolites of 1-(2,5-dimethoxy-4-methylphenyl)-2-aminopropane (DOM) in rats, *J. Med. Chem.* 14, 158-160 (1971).
- 150 S. H. Snyder, L. A. Faillace & L. E. Hollister, 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine (STP): A new hallucinogenic drug science, *Science* 158, 669-670 (1967).
- 151 S. H. Snyder, L. A. Faillace & H. Weingartner, A new psychotropic agent. Psychological and physiological effects of 2,5-dimethoxy-4-ethylamphetamine (DOET) in man, *Arch. J. Gen. Psychiat.* 21, 95-101 (1969).
- 152 T. Sargent, D. A. Kalbhen, A. T. Shulgin, G. Braun, H. Stauffer & N. Kusubor, In vivo human pharmacodynamics of the psychodysleptic 4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl-isopropylamine labeled with bromine-82 or bromine-77, *Neuropharmacol.* 14, 165-174 (1975).
- 153 H. J. Helmlin, K. Bracher, S. J. Salamone & R. Brenneisen, Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in human plasma and urine by HPLC-DAD, GC/MS and Abuscreen-Online, *Proceed. SOFT/CAT Meeting, Phoenix* (1993).
- 154 B. K. Gan, D. Baugh, R. H. Liu & A. S. Walia, Simultaneous analysis of amphetamine, methamphetamine, and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in urine samples by solid-phase extraction, derivatisation, and gas chromatography/mass spectrometry, *J. Forens. Sci.* 36, 1331-1341 (1991).
- 155 G. Cimbura, 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA): Analytical and forensic aspects of fatal poisoning, *J. Forens. Sci.* 23, 329-323 (1972).
- 156 A. Poklis, M. A. MacKell & W. K. Drake, Fatal intoxication from 3,4-methylenedioxyamphetamine, *J. Forens. Sci.* 79, 70-75 (1978).
- 157 G. P. Dowling, E. T. McDonough II & R.O. Bost, "Eve" and "Ecstasy": A report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA, *J. Am. Med. Assoc.* 257, 1615-1617 (1987).
- 158 G. Cimbura, PMA deaths in Ontario, *Can. Med. Assoc. J.* 110, 1263-1267 (1974).