# Extraction en ligne, application au screening des stupéfiants par Turboflow

A. KNAPP, O. DA SILVA, I. ETTING, J.-C. ALVAREZ Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, AP-HP Hôpital, Raymond Poincaré 104 Boulevard Raymond Poincaré,92380 GARCHES





# Les Techniques de screening Online

- Echantillons à analyser = diversité de milieux
   +/- complexes (plasma, urine, sang total, sang laqué...)
- Préparation d'échantillons : étape importante
  - Petit volume
  - Rendement le plus élevé possible
  - Extrait propre pour limiter les effets matrice
  - Le plus rapidement possible

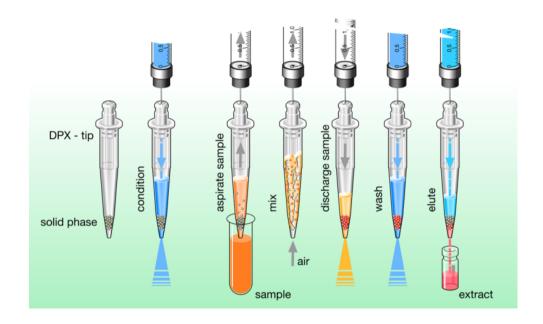
## Les techniques de préparation d'échantillon Online

- Extraction Liquide Liquide (LLE)
  - Encore très limitée
  - Existence de techniques automatisées mais offline
- Extraction en Phase Solide (SPE):
  - Échantillons liquides
  - Colonnes d'extraction, microplaques, cartouches
  - Phases stationnaires classiques, Restricted Access Material (RAM), colonnes monolithiques,...
  - Usage unique ou multiple
  - Phases de différentes affinités
  - Couplage possible avec GC ou LC

- SPME : Solid Phase Micro Extraction
  - Matrice liquide ou gazeuse
  - Phase stationnaire greffée sur une fibre de silice fondue
  - Plusieurs phases stationnaires, plusieurs épaisseurs
  - Couplage possible avec GC ou LC
- MEPS: Micro Extraction by Packed Sorbent
  - Cartouche réutilisable
  - Couplage possible avec GC ou LC



• DPX : Disposable Pipette Extraction : SPE dans embout de pipette



• DPX - QuEChERS :
Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
Méthode d'extraction combinant l'utilisation de
solvants, de sels (MgSO4) et de dispersive SPE (Amine
secondaire : PSA)

## Équipement de préparation d'échantillon Online

- Passeurs d'échantillons
  - Modulable
  - Rapide
  - Précision de pipetage
  - Plusieurs modes de préparations possibles : SPE,
     SPME,...



## Équipement de préparation d'échantillon Online

- Systèmes spécifiques:
  - Online SPE Analyzer, Waters:
    - · Rack de 96 cartouches à usage unique
    - Plusieurs phases stationnaires disponibles
    - Directement contrôlé par MassLynx
  - Co-Sense pour LC-MS, Shimadzu :
    - Système multi-colonnes
    - Déprotéinistation par un système d'exclusion de taille et d'interaction avec la phase stationnaire
    - Colonnes réutilisables
  - Agilent Automated Card Extraction Dried Blood Spot LC/MS (AACE DBS LC/MS)
  - Turboflow, Thermo

## Les techniques de préparation d'échantillon Online

- Avantage de la préparation « Online »
  - Rapidité
  - Automatisation
  - Répétabilité et reproductibilité
  - Limitation de l'utilisation de solvants
  - Minimisation de l'intervention humaine et donc diminution du risque d'erreur
  - Gain de temps technicien

## Les techniques de préparation d'échantillon Online

- Limites de l'automatisation :
  - Limites liées aux techniques elles-mêmes :
    - échantillons difficiles : sang total, sang laqué : incompatible avec la SPE, nécessité d'un prétraitement
    - · Spécificité des phases stationnaires d'extraction
  - Développement parfois difficile
  - Instrumentation et consommables coûteux :
     investissement

# SCREENING CIBLÉ STUPÉFIANTS PAR SYSTÈME TURBOFLOW

#### 44 molécules et 17 EI deutérés

#### **Amphétamines**

Amphétamine Méthamphétamine

MDA MDMA MEA

Phenylpropanolamine

Ephédrine

Pseudoéphédrine

**PMA** 

Méthylphénidate

4-Fluoroamphétamine

**BDB** 

#### **Opiacés**

Morphine Codéine

Hydrocodone Dihydrocodéine Codéthyline

Hydromorphone

6-MAM Pholcodine

Dextrométhorphane

Oxycodone Nalorphine Naltrexone

#### Cocaïnique

Cocaïne BZE EME AEME Cocaéhtylène

#### **Cathinones**

Cathine Cathinone

Methylcathinone

Méphédrone

4-MEC MDPV

Méthylone Butylone

Fléphédrone

#### **Autres NPS**

Benzylpipérazine

mCPP TFMPP 2 CI

2 CE

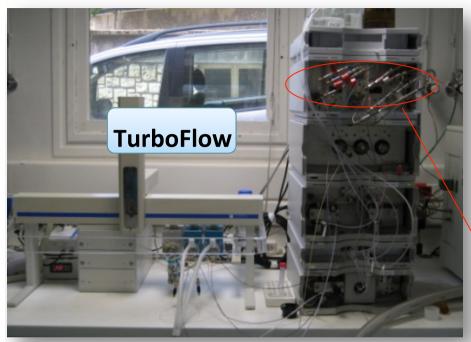
Methoxétamine

## Préparation d'échantillon:

- 200 μL de sang
- 50 μL d'EI dans du méthanol
- 20 μL de ZnSO4 1M
- Vortexer, centrifuger (14.000x g, 10 min)
- Injecter le surnageant

Système d'extraction en ligne Turboflow :

- Flux turbulent généré par haut débit de phase mobile, particules irrégulières et de grandes tailles : augmentation de la rapidité de l'extraction
- Exclusion de taille : élimination rapide des grosses molécules (ex : protéines)
- Affinité chromatographique : choix de la colonne d'extraction en fonction des besoins

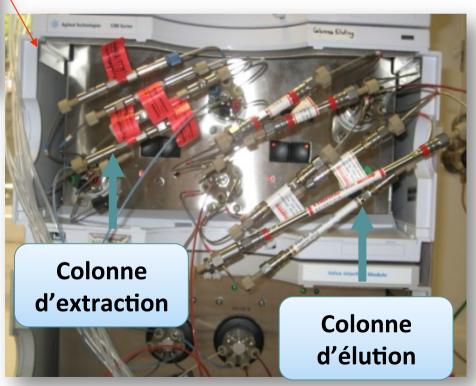


Extraction : pompe quaternaire Elution : pompe binaire

Colonne d'extraction : Cyclone Max

Colonne d'élution : Hypersil

gold (C18)



#### **Extraction:**

Voie A : Acide formique 0,1 %

Voie C : Acétate d'ammonium

10 mM pH 9

Voie D : Acétonitrile

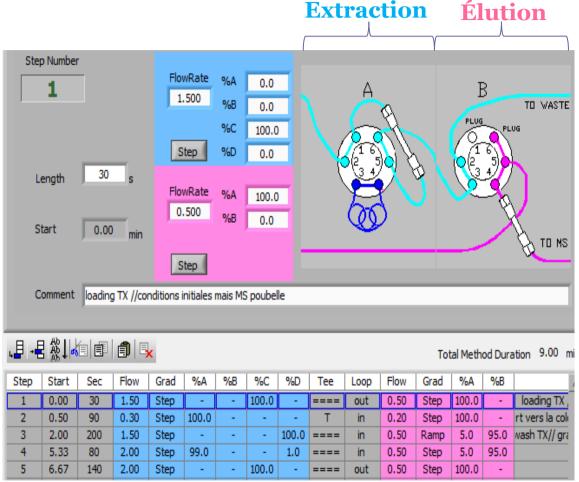
#### **Elution:**

Voie A: tampon formiate

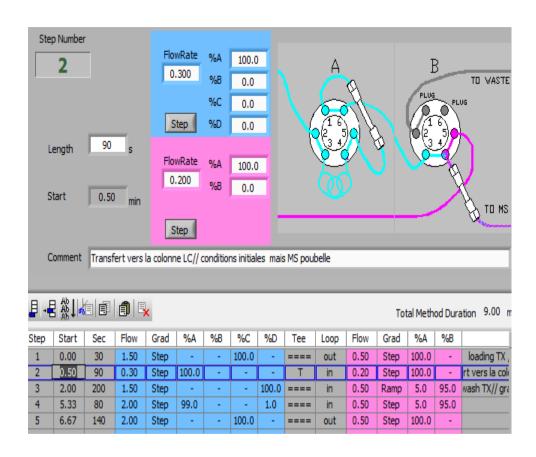
Voie B : Acétonitrile



100 % d'acétate d'ammonium pH 9, débit à 1,5 mL/min, l'échantillon est chargé sur la colonne d'extraction en ligne, boucle d'élution préalablement chargée d'un mélange 99% d'acide formique 0,1 % et 1% d'acétonitrile

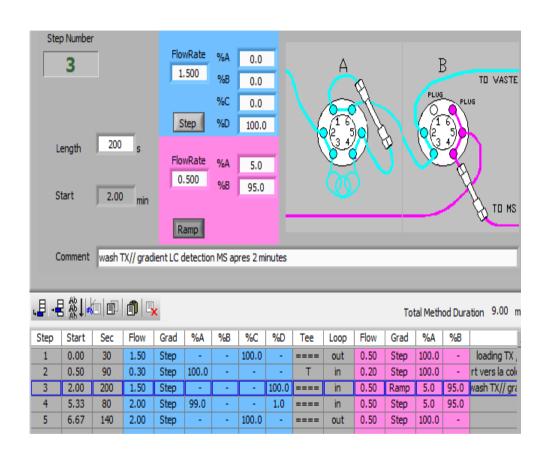


**Extraction** 



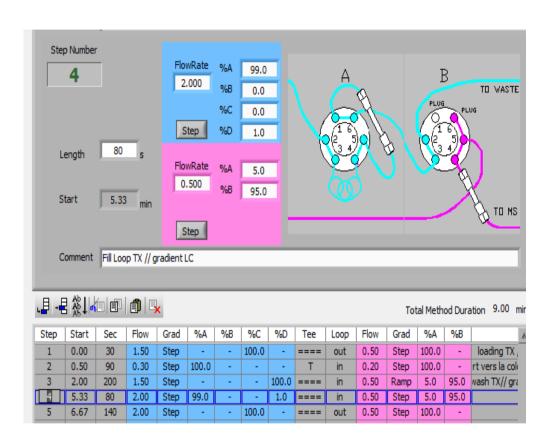
## $2^{\text{ème}}$ étape :

Passage en 100% d'acide formique 0,1 % : entraine le contenu de la boucle vers la colonne => décrochage des analytes de la colonne d'extraction vers la colonne d'élution



## $3^{\text{ème}}$ étape :

Rinçage de la colonne d'extraction par de l'acétonitrile, séparation des analytes sur la colonne d'élution



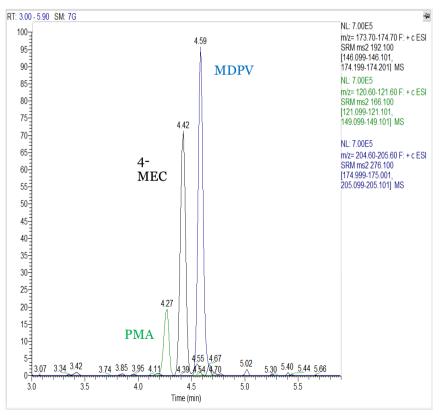
4<sup>ème</sup> étape : Remplissage de la boucle pour l'analyse suivante

- Détection : triple quadripôle TSQ Acces Max
- ESI mode positif, mode de détection MRM
- 2 transitions recherchées par molécule
- 1 transition par étalon interne deutéré
- Linéaire de 5 à 500 ng/mL
- Durée du run : 9 minutes



Méthode validée, accréditée, utilisée en routine

- Homme de 46 ans, contexte de pharmacopsychose, suspicion des prises IV de nouvelles drogues de synthèse
- Prélèvement urinaire



PMA ParaMéthoxyAmphétamine: 420 ng/mL 4-MEC 4-MéthylEthcathinone : 100 ng/mL MDPV MethyleneDioxyPyroValerone: 220 ng/mL

- Femme de 54 ans retrouvée décédée au sol de sa cuisine
- Dépistage urinaire positif en opiacés (693 ng/mL)
- Screening ciblé stupéfiants :

Oxycodone: 1320 ng/mL dans le sang

26700 ng/mL dans l'urine

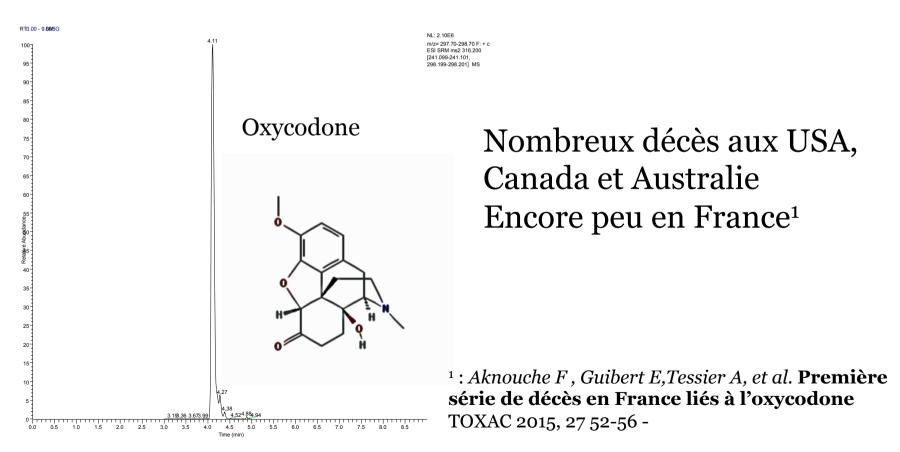
Thérapeutiques : 20-50 ng/mL

Létales: 600 ng/mL

## Également retrouvé:

- oxazépam : 750 ng/mL
- paroxétine 738 ng/mL
- alimémazine : 20 ng/mL

• Oxycodone : antalgique agoniste opioïde pur, 2 fois plus puissant que la morphine



## Conclusion

- Gain de temps : délai d'analyse, temps technicien
- Idéal sur prélèvements « propres »

## Mais:

- Difficulté sur les prélèvements post-mortem
- Appareillage +/- complexe : maintenances, développement de méthode



# MERCI POUR VOTRE ATTENTION

