

Dépistage des stupéfiants, amphétamines et barbituriques dans les urines des toxicomanes en traitement méthadone¹

Trinh Vu Duc et André Vernay

Institut de médecine sociale et préventive (Directeur: Prof. A. Delachaux)

Laboratoires des recherches expérimentales² (Médecin-chef: Dr S. Neukomm, P.D.)

Résumé

Un procédé de screening des stupéfiants, amphétamines et barbituriques est décrit permettant leur identification dans les urines des toxicomanes. Après extraction par le chloroforme à pH déterminé, les extraits sont concentrés et analysés par chromatographie sur couche mince. Les cas «positifs» révélés sont confirmés une deuxième fois par chromatographie en phase gazeuse. Les méthodes employées permettent de détecter les drogues à la concentration de 1 à 5 $\mu\text{g/ml}$ d'urine.

Introduction

Il était établi que les drogués soumis à la maintenance à la méthadone font encore usage des produits tels que les amphétamines, les barbituriques ou d'autres substances pharmaceutiques susceptibles d'emploi abusif [1]. Le contrôle des urines des toxicomanes stabilisés à la méthadone se révèle nécessaire pour constater les tricheries et apporte un élément supplémentaire quant à l'appréciation et l'évaluation des résultats obtenus en cours de route par ce mode de traitement.

Les méthodes d'analyses des «drogues» dans les urines doivent allier la simplicité et la rapidité à la rigueur. La présente communication décrit la procédure appliquée dans notre laboratoire pour l'identification des stupéfiants, amphétamines et barbituriques dans les urines, basée sur la chromatographie sur couche mince (CCM) et confirmation des cas «positifs» par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Matériels

a) Chromatographie sur couche mince

L'équipement CCM est celui fourni par la maison CAMAG (Muttens, Suisse). Les plaques sont de dimension standard 20 × 20 cm,

¹ Basé sur une présentation lors de la Journée d'exposés scientifiques de la Société suisse de médecine sociale et préventive, Berne, 27 juin 1973.

² Route de la Clochette, 1052 Le Mont sur Lausanne.

d'épaisseur 250 μ . L'adsorbant Silica gel DF-5 provient de la même firme. Pour la préparation de 5 plaques, on mélange 25 g de silica gel à 55 ml d'eau.

Les solvants sont de qualité Merck pro analysi.

Les substances de référence sont à la concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

b) Chromatographie en phase gazeuse

L'appareil est un modèle 2201 de la firme Carlo Erba (Milan). On utilise un détecteur à ionisation de flamme (0,9 kg H₂ et 1,3 kg d'air). Les colonnes sont en verre, silanisées au diméthylchlorosilane (10%) dans du toluène. Les trois colonnes servant au screening ont les caractéristiques ci-dessous:

- 180 × 0,4 cm, 3% OV-1 sur Supelcoport 80–100 mesh,
- 180 × 0,2 cm, 3% SP-2250 sur Supelcoport 100–120 mesh,
- 215 × 0,4 cm, 10% Apiezon L-10% KOH sur Chromosorb G 80–100 mesh, AW-DMCS.

Méthodes

a) *Barbituriques*: 10 ml d'urine sont acidifiés à pH 5 par l'acide chlorhydrique 1-n puis extraits par un même volume de chloroforme dans un tube à centrifuger à fond cône. On agite sur un agitateur Vortex et on centrifuge à 3000 tours pendant 5 minutes. La phase supérieure est enlevée par aspiration et le chloroforme est évaporé à 100 μl .

b) *Amphétamines*: On rend fortement alcaline par la soude 2-n 10 ml d'urine dans un tube à centrifuger effilé en son extrémité et on ajoute 0,1 ml de chloroforme. Après 2 minutes d'agitation, on centrifuge comme précédemment et on prélève l'extrait chloroformique à travers la phase aqueuse pour l'application sur les plaques d'adsorbant ou pour l'injection au chromatographe.

c) *Stupéfiants et alcaloïdes*: L'urine à contrôler (10–25 ml) est ajustée à pH 9 (en vue de favoriser la récupération de la morphine)

par la soude 1-n. On y ajoute 1 ml de chloroforme-isopropanol (9:1). Après agitation et centrifugation à 3000 tours, 5 minutes, on sépare les phases et on évapore la phase organique à sec. Le résidu est repris dans 100 μ l de chloroforme.

Résultats

Développement chromatographique et détection. Avec une microsiringue, on applique 30 μ l de chaque extrait sur les plaques d'adsorbant et on fait migrer sur 10 cm dans des «chambres sandwich» non saturées. Après le développement à l'aide de systèmes de solvants appropriés, les plaques sont séchées au fœhn. On révèle les barbituriques en vaporisant à 20 cm de distance la solution de diphénylcarbazone-chlorure mercurique. Les barbituriques apparaissent sous forme de taches blanches sur fond rose. Après 1 à 2 heures, le fond s'estompe et on voit nette-

Tabl. 1 $R_f \times 100$ des barbituriques

	S _a	S _b	S _c	S _d	S _e	S _f
Barbital	35	25	5	45	75	83
Allobarbital	55	28	5	56	72	87
Butobarbital	59	30	10	58	72	84
Amobarbital	58	32	12	63	70	87
Pentobarbital	54	30	12	63	66	85
Secobarbital	44	40	11	69	76	88
Aprobarbital	54	33	12	61	67	82
Hexobarbital	58	46	14	73	69	80
Mephobarbital	63	55	13	80	70	81
Cyclobarbital	56	35	12	60	69	80
Phenobarbital	37	28	9	55	66	80

S_a: chloroforme-isopropanol-NH₃ (85:10:10).

S_b: chloroforme-acétone (9:1).

S_c: hexane-éthanol (9:1).

S_d: chloroforme-acétate d'éthyle (3:2).

S_e: chloroforme-isopropanol (8:2).

S_f: éther-chloroforme (9:1).

Révélateur: Diphénylcarbazone (DPC)-chlorure mercurique: mélange 1:1 de 0,2 % de DPC (Fluka) dans l'alcool absolu et de 2 % de H₂Cl₂ dans le même solvant.

Tabl. 2 $R_f \times 100$ et séquence de révélation des amphétamines et stupéfiants

	$R_f \times 100$			UV ₃₆₆	UV ₂₅₄	Ninhydrine + UV	I ₂ 1 %	Iodoplatinate
	S ₁	S ₂	S ₃					
Amphétamine	50	17	54			rose-violacé	jaune-brun	
Méthamphétamine	35	10	48				jaune-brun	
Ephédrine	36	4	40		rose		jaune-brun	
Nicotine	58	30	61		rose		jaune-brun	bleu
Codéine	41	26	45				jaune-brun	gris-brun
Morphine	43	9	30		rose		jaune-brun	bleu
Quinine	55	25	51	bleu			jaune-brun	gris-brun
Cocaïne	67	41	75		rose		jaune-brun	violet
Méthadone	50	28	67				jaune-brun	brun
Méthad. metab. 1 ¹	21	20	67		rose		jaune-brun	brun
Méthad. metab. 2 ¹	98	55	90		rose	rose	jaune-brun	brun
Péthine	56	39	63				jaune-brun	brun
Ritaline	63	38	55	bleu			jaune-brun	brun
Chlorpromazine	53	46	63		rose		jaune-brun	bleu

¹ métabolite 1: 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine;

métabolite 2: 2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphényl-1-pyrrolidine.

Révélateurs: a) solution d'iode à 1 % dans du méthanol.

b) ninhydrine: dissoudre 0,4 g dans l'acétone et diluer à 100 ml. Se garde à froid une semaine.

c) iodoplatinate: dissoudre 0,25 g de H₂PtCl₆·6H₂O et 5 g KI dans 100 ml d'eau.

Ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique conc. Ce réactif se garde à froid dans un flacon brun.

S₁: méthanol-NH₃ conc. (100:1,5); S₂: CHCl₃-méthanol (9:1); S₃: acétate d'éthyle-méthanol-NH₃ (85:10:10).

ment des auréoles roses se dessiner sur fond blanc.

Comme on peut le constater sur le tab. 1, aucun des systèmes de solvants ne permet une séparation à proprement parler des barbituriques. L'établissement de leur différence de migration dans des systèmes croisés, allié à leur coloration au diphénylcarbazon-chlorure mercurique donnent une idée de leur présence. Toutefois, il est nécessaire de le confirmer par CPG.

Les extraits pouvant contenir les amphétamines et ceux des stupéfiants et alcaloïdes sont appliqués sur la même plaque. On intercale entre chaque extrait les références des substances à identifier. La plaque est observée sous UV₃₆₆ et UV₂₅₄ puis révélée selon la séquence: 1) ninhydrine + 10 minutes sous la lumière UV; 2) iode à 1%; 3) iodoplatinate. On notera après chaque vaporisation les différentes apparitions et les changements de couleur. Le tab. 2 illustre la séquence suivie. Identification par chromatographie en phase gazeuse. On injecte 1 à 5 µl des extraits concentrés au chromatographe. Les temps de rétention des diverses substances obtenus sur la colonne OV-1 sont groupés dans le tab. 3. L'identification se fait par comparaison des temps de rétention.

Discussion

La chromatographie sur couche mince ainsi utilisée sert davantage à éliminer les cas négatifs surtout dans la série des barbituriques où une séparation par ce procédé n'est pas réalisable. La récupération dans les conditions expérimentales décrites est d'environ 20%, 86%, 73% pour les barbital, pentobarbital et hexobarbital respectivement.

En ce qui concerne les amphétamines, nous avons suivi le procédé proposé par Ramsey et Campbell [2]. Ces auteurs citent des taux de récupération de l'ordre de 80%. Le grand avantage de cette technique réside dans son

Tabl. 3 Temps de rétention sur colonne OV-1.

Barbituriques	t _R min.	t _R *'
Barbital (Véronal)	2,15	0,39
Allobarbital (Dial)	2,80	0,50
Aprobarbital (Alurate)	3,30	0,60
Butabarbital (Butisol)	4,00	0,72
Amobarbital (Amytal)	5,10	0,92
Pentobarbital (Nembutal)	5,50	1,00
Secobarbital (Seconal, Quinal)	6,75	1,22
Hexobarbital (Ortal, Evipan)	8,75	1,59
Méphobarbital (Mébaral, Prominal)	10,25	1,86
Phénobarbital (Luminal)	13,55	2,46
Cyclobarbital	14,40	2,61
Amphétamines et amines sympathomimétiques		
dl-Amphétamine	1,40	1,00
Méthamphétamine	2,45	1,75
Ephédrine	3,65	2,60
Phénémétrazine	4,70	3,35
Ritaline	18,83	13,45
Stupéfiants et alcaloïdes		
Péthidine	0,90	0,17
Méthadone	2,40	0,47
Cocaïne	2,60	0,51
Codéine	4,20	0,83
Morphine	5,05	1,00
Chlorpromazine	5,70	1,12
Quinine	12,65	2,50
Papavérine	14,35	2,84

* t_R' : temps de rétention relatif par rapport au pentobarbital, dl-amphétamine et morphine respectivement pour les barbituriques, amphétamines et stupéfiants.

Conditions expérimentales: débit de gaz porteur: 60 ml d'azote, la température de l'injecteur et du détecteur est de 30° C supérieure à celle de la colonne. La température de la colonne est de 130° C, 160° C et 230° C respectivement pour les amphétamines, barbituriques et stupéfiants.

extrême rapidité puisqu'elle épargne l'étape d'évaporation. Les conditions d'extraction adoptées pour les stupéfiants visent à favoriser principalement la récupération de la morphine sous sa forme libre [3]. La limite de détection sur la plaque chromatographique est de 2 µg pour les barbituriques, 2 µg pour la morphine et 1 à 2 µg pour les amphé-

tamines. La limite pour les substances de référence est encore plus basse (0,5 µg pour la morphine).

Il est à noter que les nombreux médicaments absorbés par les toxicomanes compliquent la tâche de l'opérateur dans son identification; d'où les nombreuses «recettes» utilisées pour révéler les drogues, basées sur la position des R_f , les temps d'apparition, les changements de couleur [4, 5]. Très souvent, des tests complémentaires de confirmation sont appliqués après la séparation [6]. Une revue de l'application de la CCM en analyses toxicologiques et de ses limitations a été présentée par *Berman* [7]. A partir de ces considérations, les résultats obtenus ici avec la CCM servent principalement de guide et n'ont d'utilité réelle que dans le cadre interne d'un laboratoire. Dans le nôtre, la vérification des cas positifs est faite par chromatographie en phase gazeuse sur colonne non polaire; la phase polaire SP-2250 sert à reconfirmer les cas limites. Plus spécialement pour les amines sympathomimétiques, on utilisera la colonne Apiézon L-KOH. La confirmation de la CCM par la CPG apporte ainsi une plus grande rigueur dans l'identification des drogues urinaires.

Zusammenfassung

Es wird über ein Verfahren von Dünnschicht-Chromatographie für die qualitative Bestimmung von Rauschgiftmitteln, Amphetaminen und Barbituraten im Harn berichtet. Wenn der Test «positiv» ist, wird er durch Gaschromatographie noch einmal bestätigt. Mit dieser Methode ist die Empfindlichkeit in der Größenordnung von 1 bis 5 µg/ml Harn.

Summary

A method based on thin-layer chromatography is used to identify drugs in the urines of narcotic addicts. Confirmation of "positives" is then made by gas liquid chromatography. Sensitivity is in the range of 1—5 µg/ml of urine.

Références bibliographiques

- [1] *Einstein Stanley*, ed.: Methadone maintenance. Marcel Dekker, Inc., New York 1971.
- [2] *Ramsey J.* and *Campbell D.B.*: An ultra rapid method for the extraction of drugs from biological fluids. *J. Chromatog.* 63, 303 (1971).
- [3] *Viala A.* et *Estadieu M.*: Une méthode d'analyse chromatographique de l'urine pour le diagnostic de consommation d'héroïne. *J. Chromatog.* 72, 127 (1972).
- [4] *Berry D.J.* and *Grove J.*: Improved chromatographic techniques and their interpretation for the screening of urine from drug-dependent subjects. *J. Chromatog.* 61, 111 (1971).
- [5] *Mulé S.J.*: Routine identification of drugs of abuse in human urine. I. Application of fluorometry, thin-layer and gas-liquid chromatography. *J. Chromatog.* 55, 255 (1971).
- [6] *Coumbis R.J.*, *Fulton C.C.*, *Calise J.P.* and *Rodriguez C.*: The necessity of elution and identification of drugs indicated by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 54, 245 (1971).
- [7] *Berman E.*: Applications of thin-layer chromatography to clinical toxicological analyses. *J. Chromatog. Sci.* 10, 350 (1972).

Adresse des auteurs:

Dr T. Vu Duc, A. Vernay, Institut de médecine sociale et préventive, Laboratoires des recherches expérimentales, Route de la Clochette, 1052 Le Mont sur Lausanne