

ORIGINAL ARTICLE



Determination of cocaine and its metabolites in blood by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS)

Soumia DALEM¹, Radia ZAMOUM^{1,2}, Rym SEDDI¹, Salma KADDOUR^{1,2}

¹ Service de Toxicologie du CHU de Bab El Oued, Alger - Algérie

² Faculté de Pharmacie-Université d'Alger 1, Algérie

ABSTRACT

Introduction. This article aims to present a simple and sensitive chromatographic method, carried out in the gas phase using detection by mass spectrometry to identify and quantify cocaine and its metabolites in the blood, notably Benzoyllecgonine and Ecgonine Methyl ester. **Methods.** This method involves liquid-liquid extraction using a mixture of solvents, consisting of chloroform and isopropanol, followed by silylation. The separation was carried out using an xi-5ms column (Restek®) of 30 m in length, 0.25 mm in internal diameter and 25 µm in film thickness. **Results.** Blood level quantification of Benzoyllecgonine and Methylester Ecgonine was possible with respective quantification limits of 18 and 39 ng/mL. The method is linear over a range of 75 to 1000 ng/mL and the extraction yields range between 81% and 97%. Regarding the intra- and inter-run precision and the accuracy of the method, the coefficients of variation and biases at the three concentration levels (150, 300 and 750 ng/mL) are well below 15%. This method can easily be applied to blood samples, both in emergency toxicology and in forensic toxicology, to confirm any previous, voluntary, or accidental intake of cocaine.

ARTICLE HISTORY

Received 13 Nov 2023
Accepted 07 Feb 2024

KEYWORDS

Cocaine, Quantitative analysis, Benzoyllecgonine, Ecgonine Methylester, GC-MS.

CORRESPONDING AUTHOR

Soumia Dalem
soumia.dalem@outlook.fr

1. INTRODUCTION

La cocaïne est de plus en plus répandue à travers le monde devenant plus accessible et moins coûteuse. Elle a connu une montée en puissance rapide sur la scène mondiale des drogues au cours de ces dernières années, bien que le cannabis demeure la substance psychoactive illicite la plus largement consommée [1]. Cette tendance est alarmante, étant donné la nature très addictive de la cocaïne et ses conséquences néfastes sur la santé individuelle et la société dans son ensemble.

La cocaïne peut exacerber une variété de dysfonctionnements systémiques au sein de l'organisme, donnant lieu à une présentation clinique principalement caractérisée par une toxicité organique. Parmi les complications les plus graves associées à son utilisation, on recense notamment la survenue de crises convulsives, d'accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et ischémiques, d'infarctus du myocarde, de dissections aortiques, de rhabdomyolyse, d'ischémie mésentérique, de lésions rénales aiguës, ainsi que de défaillances multi-viscérales [2].

Le chlorhydrate de cocaïne, obtenu à partir de la transformation des feuilles de coca par divers processus chimiques, se présente sous forme d'une poudre fine, blanche, inodore, amère, soluble dans l'eau et l'alcool [3].

Il existe deux grands modes traditionnels d'administration du chlorhydrate de cocaïne ; celui de la voie nasale (sniff ou «snorting» en anglais) ou celui de la voie intraveineuse. Cependant, la voie respiratoire demeure la voie de consommation la plus fréquente. L'inhalation se fait sous forme de cocaïne base (Crack ou Free-base). Les formes d'usagers révèlent également l'existence d'une consommation per os, sous forme de « Parachute», en enveloppant une dose de cocaïne dans du papier à cigarettes et en la «gobant». La voie anale dite « plug » reste une voie de consommation confidentielle [4].

Les deux principaux métabolites de la cocaïne sont la Benzoylécgonine (BZE) et le Méthylester Ecgonine (EME). La BZE, largement utilisée comme indicateur de la consommation de la cocaïne, présente une demi-vie d'élimination plasmatique de 4 à 7 heures. De son côté, l'EME, un autre métabolite important, connaît une demi-vie d'élimination plasmatique entre 3,5 et 5,5 heures [5]. Ces valeurs sont essentielles pour évaluer la durée pendant laquelle ces métabolites restent présents dans le corps et sont détectables.

L'identification et la quantification de cette substance sont des aspects cruciaux de la toxicologie d'urgence et médico-légale, car elles peuvent fournir des informations vitales pour déterminer les causes d'altérations de l'état de santé ou de décès. Dans cette optique, une méthode d'analyse quantitative du sang a été mise au point pour détecter la présence de la cocaïne et évaluer les niveaux de ses métabolites dans le sang.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Réactifs et étalons

Les solutions « étalon » sont procurés sous forme de poudre auprès de l'ONU DC de marque LIPOMED® : Benzoylécgonine (BZE ; lot n° : 204.1B6.1) et l'Ecgonine Méthylester (EME lot n° : 205.1B6.1) qui ont été généreusement fournis. La Cocaïne est de marque RESTEK® (lot n° : A123743) acheté de chez ESCLAB (Algérie).

Tandis que les autres réactifs sont de spécifications suivantes : phosphate de sodium dibasique Riedel-de-Haën® (Na₂HPO₄) de

pureté > 98, et hydroxyde de sodium CARLO ERBA reagents S.A.S® (NaOH) de pureté > 97.

Matériel biologique

Le sang utilisé dans ce travail a été obtenu du centre de transfusion sanguine (CTS) du Centre Hospitalo-Universitaire de Bab El Oued, en utilisant des poches de sang total provenant de donneurs sains d'âge et de sexe différents, dont l'anonymat a été respecté.

Système d'analyse

L'analyse chromatographique a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse, couplé à la spectrométrie de masse (CPG- SM) de marque Shimadzu® constitué d'une chaîne GCSM-QP2020 et d'un échantillonneur AOC 600D, piloté par un système d'acquisition des données Labsolutions® version 4.52. La séparation a été effectuée en mode gradient sur une Chloroforme CARLO ERBA reagents S.A.S® (CHCl₃) de pureté >99%, Isopropanol FLUKA® (C₃H₈O) de pureté > 99.8 % et de densité de 0.785, Méthanol Riedel-de-Haën® (CH₃OH) de pureté 99.9% et de densité de 0.79, Acétate d'éthyle MERCK® (C₄H₈O₂) de pureté 99,8% et de densité 0,9. N,O-bis-Triméthylsilyl) SUPELCO® ; Trifluoroacétamide + Triméthylchlorosilane (99:1) SUPELCO® ; BSTFA-1%TMCS est de marque SUPELCO® ; colonne Restek® Rxi-5ms avec une épaisseur du film de 0.25 µm, de 30 m de longueur et de 0.25 mm de diamètre interne. En effet, une température de 80°C a été initialement maintenue pendant une minute, puis augmentée à 230°C par un palier de 35°C/mn, avant de finir avec une température de 290°C pendant 10mn en l'augmentant par un palier de 10°C toutes les minutes.

Le mode d'injection était en splitless avec un volume d'injection de 1µL et une température d'injection de 260°C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1mL/mn. Les températures de la source d'ion, de l'interface étaient respectivement de 230°C et 280°C. La durée d'analyse a été de 21.29 mn. L'identification et la quantification des analytes sont basées sur l'identification de fragments ions obtenus à partir des molécules d'intérêt, ainsi que les temps de rétention leur correspondant, comme le montre le Tableau 1.

Tableau 1. Fragments et temps de rétention correspondant aux molécules.

Molécule	Tr (min)	Ions caractéristiques
COC	9.5	82/182/303
BZE-TMS	9.96	82/240/361
EME-TMS	5.8	82/96/271

Les fragments soulignés sont ceux utilisés pour la quantification des deux métabolites d'intérêt.

Préparation des solutions

La Cocaïne (COC), la Benzoylécgonine (BZE), l'Ecgonine Méthylester (EME) se présentent sous forme de solutions méthanoliques à 1000 mg/L, à partir desquelles deux solutions à 100 mg/L et à 10 mg/L sont préparées. Ces dernières ont servi à préparer deux solutions de travail à 1 et à 10 mg/L diluées dans du méthanol, contenant chacune une mixture des trois analytes (COC, BZE, EME). Enfin, des solutions « matrice » à 75, 150, 200, 300, 500, 750 et à 1000 mg/L sont préparées en supplémentant le sang avec des volumes adéquats des solutions de travail (1 et 10 mg/L).

De la même manière, des solutions de validation ont été préparées dans le sang à trois niveaux de concentration : 150, 300 et 750 ng/mL.

La solution tampon (1M, pH= 8.4) requise pour l'étape de prétraitement et préparée dans de l'eau distillée, est constituée d'un mélange de deux solutions ; une solution A de phosphate monosodique (NaH₂PO₄, 0.2 M) et une solution B de phosphate disodique hydraté (Na₂H₂PO₄, 0.2 M).

Protocole d'extraction

À 2mL du sang total, sont ajoutés successivement 2 mL du tampon phosphate qu'on mélange au vortex pendant quelques secondes, puis 8mL de la phase organique extractive renfermant du chloroforme et de l'isopropanol (9:1, V/V). Après agitation pendant 5mn au vortex, et centrifugation à 3500 g pendant 10 mn, la phase organique est récupérée puis évaporée sous jet d'azote à 40°C. La silylation est effectuée en utilisant 100µL d'un mélange de BSTFA TMCS 1% et d'acétate d'éthyle (1:1, V/V) pendant 20min à 70 °C. Enfin, 1 µL est injecté sur la colonne analytique.

Validation de la méthode

La méthode a été validée selon un protocole interne qui s'appuie sur les lignes directrices de : EMA. 2011 [6] ; ICH Q2 (R) – Guideline. 2005 [7] ; SFSTP 2003 [8]

L'objectif fixé pour cette étude est de = 95%, ce qui représente un niveau de confiance de 95% et une limite d'acceptation de 5%. Ainsi, l'erreur totale sur une mesure individuelle ne doit pas dépasser 5% de la valeur vraie ce qui signifie que 95% des valeurs sont situées à moins de deux écarts-types, une indication d'une distribution des résidus idéale. Les critères de validation étudiés étaient : le rendement d'extraction, la spécificité et la sensibilité, la sélectivité, la fidélité, la limite de quantification, la fonction de réponse, la linéarité et la justesse.

- Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été déterminé à quatre niveaux de concentration avec deux répétitions pour chaque niveau, en rapportant les surfaces après extraction à celles obtenues avant extraction.

- Spécificité et sensibilité

Au total, 21 échantillons de sang exempts des analytes étudiés et 21 autres supplémentés ont été analysés. La spécificité est estimée par le calcul du nombre d'échantillons négatifs par rapport au nombre total d'échantillons « blanc » analysés. Tandis que la sensibilité est calculée à partir des résultats de l'analyse des échantillons supplémentés.

- Sélectivité

Il s'agit de la sélectivité chromatographique représentée par le facteur de sélectivité chromatographique α , qui correspond au rapport des temps de retentions des molécules étudiées et des autres molécules identifiées dans les mêmes conditions opératoires, la valeur du facteur de sélectivité (α) doit être supérieure à 1.

- Fidélité

- ✓ Répétabilité

Déterminée par le calcul du coefficient de variation de la surface sous la courbe et du temps de rétention d'un même échantillon, répété 6 fois, évaluée dans des conditions opératoires identiques. L'essai de répétabilité est validé pour une valeur de CV inférieure à 15%.

- ✓ Fidélité intermédiaire

Déterminée par le calcul du coefficient de variation de la surface sous la courbe et du temps de rétention d'un même échantillon, répété 6 fois, évaluée dans des conditions opératoires différentes (2 analystes différents, 3 jours différents). Le critère de fidélité intermédiaire est évalué par un CV calculé de la même façon que pour la répétabilité et exprimé en pourcentage. L'essai de fidélité intermédiaire est validé si la valeur de CV calculé est inférieure à 15%.

- ✓ Limite de quantification

L'approche tenant compte de la droite d'étalonnage a été adoptée, calculée à partir de la pente en utilisant l'écart type résiduel (E_r) de la droite $Y=aX+b$.

- ✓ Fonction de réponse

Les valeurs du signal obtenues pour chaque point de la courbe et pour les trois répétitions d'analyse ont été extrapolées sur la courbe moyenne.

- ✓ Linéarité
- ✓ La linéarité a été vérifiée en étudiant les points suivants :
- ✓ Équation de la droite de régression
- ✓ Coefficient de détermination R2
- ✓ Homogénéité des variances
- ✓ Adéquation du modèle linéaire
- ✓ Comparaison de l'ordonnée à l'origine à zéro
- ✓ Justesse

Exprimée en termes de biais absolu (mg/mL), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

3. RESULTATS

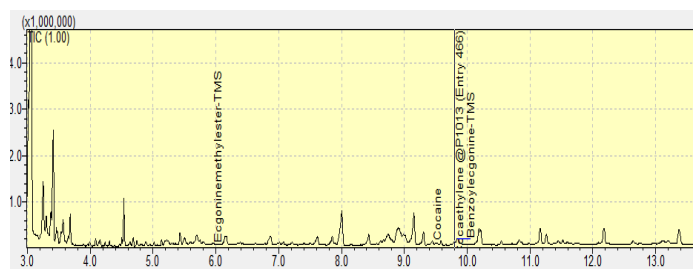


Figure 1. Chromatogrammes (TIC) en Full-SCAN à 1µg/ML.

4. DISCUSSION

La GC-MS en mode d'ionisation par impact électronique est de loin la technique analytique la plus rapportée pour la détection et la quantification des cocaïnes [09]. Bien que l'équipement GC-MS soit assez coûteux, il est considéré comme la norme de référence des techniques de dépistage des drogues, car il fournit une identification spectrale et une détection sensible et sélective des molécules et leurs métabolites.

Dans ce travail, trois analytes ont pu être identifiés : COC, BZE et EME. Les deux derniers ont bénéficié d'une quantification. Ainsi, les performances analytiques de la méthode quantitative sont considérées comme satisfaisantes (Tableau 2), mettant en évidence une sensibilité élevée qui permet la détection de concentrations minimales de BZE et d'EME dans les échantillons, avec des limites de détection qui sont établies à 5,44 et 11,8 ng/mL pour la BZE et l'EME respectivement, tandis que les limites de quantification sont à 18 ng/mL pour la BZE et à 39

ng/mL pour l'EME. La BZE, métabolite de la cocaïne est utilisé comme un bon indicateur d'une consommation de cette drogue. Il a été quantifié à une valeur supérieure à celle proposée par un groupe d'experts de la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA). En effet, selon Gaillard Y. [10], des seuils de quantification minimaux par CPG-SM à 20 ng/mL ont été établis par ce groupe, dans une étude commune datant de 1996.

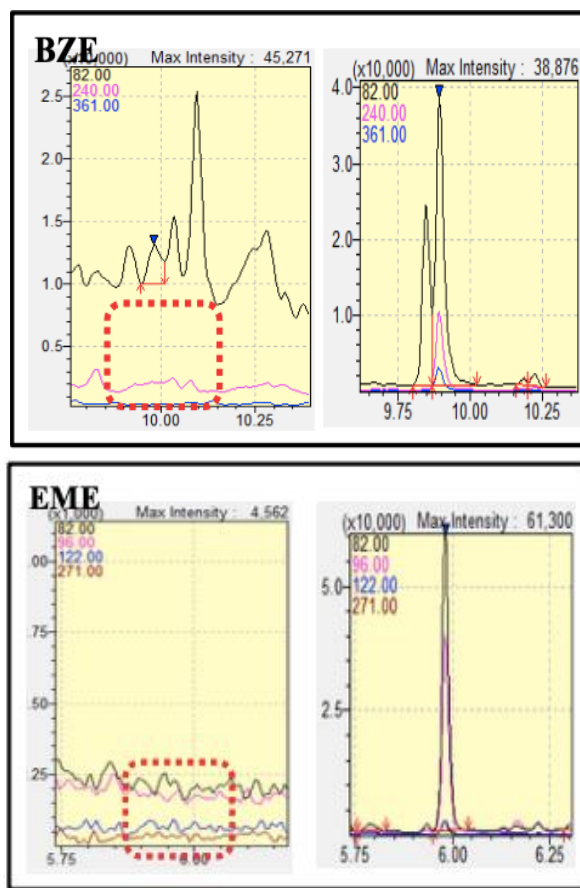


Figure 2. Résultats de l'étude de spécificité pour l'EME et BZE.

La méthode s'est avérée sélective pour les trois molécules testées. Aucun pic d'interférence n'a été observé dans les extraits d'échantillons exempts des molécules recherchées. La méthode est très spécifique pour les molécules étudiées, avec une spécificité à 100%. La Figure 2 montre le chromatogramme d'un blanc sanguin comparé à un échantillon sanguin supplémenté à la concentration de validation.

Tableau 2. Résultats de l'étude des performances analytiques de la méthode d'analyse.

Analyse	Gamme moyenne		Existence d'une pente significative		Homogénéité des variances		Validité des ajustements		Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro	
	Equation	R ²	F _{cal}	F _{theo}	C _{calc}	C _{theo}	F _{calc}	F _{theo}	T _{calc}	T _{theo}
BZE	Y=77,512X+921,52	0,999	5364,06		0,13		3,17		1,80	
EME	Y=439,36X+4214,6	0,999	4472,91	4,67	0,58	0,68	1,77	3,71	1,65	2,16

Critères de validation	Performances analytiques	
	BZE	EME
Rendement d'extraction	83,36 %	94,35%
Intervalle de dosage	[0-1000] ng /mL	[0-1000] ng /mL
Linéarité		
Équation de la droite	Y=77,512X+921,52	Y=439,36X+4214,6
Coefficient de corrélation	R ² = 0,999	R ² =0,999
Limite de détection	5,44 ng/mL	11,82 ng/mL
Limite de quantification	18,12 ng/mL	39,41 ng/mL
Exactitude		
CV répétabilité	2,41%	3,93%
CV fidélité intermédiaire	2,04 %	2,87%
Justesse		
Recouvrement moyen %	101,96%	101,61%
Biais relatif	1,96	1,61

La linéarité de la méthode s'étend sur une plage satisfaisante de concentrations, allant de 75 à 1000 ng/mL et se distingue par des coefficients de corrélation R² atteignant 0,99. Tous les tests statistiques ont donné des valeurs comprises dans les limites d'acceptation. Ainsi, les gammes d'étalonnage sont conformes en termes de linéarité :

Tableau 3 : Résultats de l'étude des performances analytiques de la méthode d'analyse.

Analyte	Gamme moyenne		Existence d'une pente significative		Homogénéité des variances		Validité des ajustements		Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro	
	Equation	R ²	F _{cal}	F _{theo}	C _{calc}	C _{theo}	F _{calc}	F _{theo}	T _{calc}	T _{theo}
BZE	Y= 77,512X+921,52	0,999	5364,06		0,13		3,17		1,80	
EME	Y=439,36X+4214,6	0,999	4472,91	4,67	0,58	0,68	1,77	3,71	1,65	2,16

Critères de validation	Performances analytiques	
	BZE	EME
Rendement d'extraction	83,36 %	94,35%
Intervalle de dosage	[0-1000] ng /mL	[0-1000] ng /mL
Linéarité		
Équation de la droite	Y=77,512X+921,52	Y=439,36X+4214,6
Coefficient de corrélation	R ² = 0,999	R ² =0,999
Limite de détection	5,44 ng/mL	11,82 ng/mL
Limite de quantification	18,12 ng/mL	39,41 ng/mL
Exactitude		
CV répétabilité	2,41%	3,93%
CV fidélité intermédiaire	2,04 %	2,87%
Justesse		
Recouvrement moyen %	101,96%	101,61%
Biais relatif	1,96	1,61

- Coefficient de détermination acceptable de 0,99.
- Pente comparable à 1 au risque 5%. L'intervalle des rendements moyens d'extraction retrouvé pour les deux molécules est satisfaisant. Il se situe entre 83% et 94%,

indiquant des performances satisfaisantes de la méthode d'extraction utilisée. En effet, nos résultats rejoignent ceux de nombreuses études notamment celles de Gaillard et al, de Pellegrini et al, et de Pujol et al, où les résultats variaient entre 60.2% et 98% [11-12].

Cependant, en évaluant vingt schémas d'extraction liquide-liquide (ELL) pour l'analyse de la COC, de la BZE et en les comparant aux résultats de ceux obtenus après une extraction en phase solide (SPE), Clauwaert et al. [13] ont constaté que la SPE offrait une récupération du résidu sec plus importante et une qualité supérieure des chromatogrammes.

En ce qui concerne l'exactitude, les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont obtenus à 2,41% et 2,04% respectivement pour la BZE. Pour ce qui est de l'EME, ces coefficients de variation sont à 3,39% et 2,87%.

En matière de justesse, le recouvrement moyen s'établit à 102% pour les deux molécules, avec des biais relatifs de 1,96 pour la BZE et de 1,61 pour l'EME.

5. CONCLUSION

Cette méthode chromatographique qui combine l'extraction liquide-liquide et la dérivation avec le réactif BSTFA-TMS à 1% se révèle être une approche efficace et intéressante pour la détermination qualitative de la cocaïne mais aussi qualitative et quantitative des métabolites de la cocaïne dans le sang humain. Les performances analytiques satisfaisantes, y compris des limites de quantification basses, une linéarité étendue, de bons rendements d'extraction et une précision élevée, font de cette méthode un outil prometteur pour les analyses de routine et de recherche dans le domaine de la toxicologie.

DECLARATION D'INTERETS

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

REMERCIEMENTS

Nos chaleureux remerciements s'adressent au Pr Salma KADDOUR qui a permis la réalisation de ce travail au niveau du Service de Toxicologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Bab El Oued.

6. REFERENCES

1. ONUDC. Résumé analytique. Rapport mondial sur les drogues. Publication des Nations Unies, 2022.
2. Zimmerman, JL Intoxication à la cocaïne. Clinique de soins critiques. 2012, 28, 517– 526.
3. Sweetman SC, editor. Martinale the complete drug reference. Thirty-six. Pharmaceutical Press. 2009. Vol. 53, 1689–1699 p.
4. Beck F, et al. Rapport national France 2014. Réseau REITOX. OFDT et EMCDDA (<http://www.ofdt.fr/BDD/publications/docs/efnxofub.pdf>).
5. Cunha-Oliveira, T.; Rego, A.C.; Carvalho, F.; Oliveira, C.R. Chapter 17-Medical Toxicology of Drugs of Abuse. In Principles of Addiction, Miller, P.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; pp. 159–175.
6. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. Rev. 1 Corr. 2 Committee for Medicinal Products for Human Use. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. 2011.
7. ICH Harmonization tripartite. Guideline of Validation of analytical procedures: text and methodologies Q2 (R1) 2005.
8. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches- partie I volume 13- NO 3 2003.
9. Levine Barry S., Kerrigan S. Principles of Forensic Toxicology Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1>Clinical Chemistry Inc., Washington, DC, USA, 2003.
10. Gaillard Y, Pépin G, Marquet P, Kintz P, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage de la benzoylecgonine, cocaïne, méthylecgonine-ester, codéine, morphine et 6- acétylmorphine dans le sang total. Toxicorama 1996.
11. Pellegrini M, Casá A, Marchei E, Pacifici R, Mayné R, Barbero V, Garcia-Algar O, Pichini S. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth. J Pharm Biomed Anal. 2006 Feb 24;40(3):662-8. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.07.003
12. Pujol MJ, Tritsch PJ , Cirimele V, Kintz P. Dépistage de quatre classes de stupéfiants dans les cheveux par technique ELISA à l'aide du test One-StepTM et confirmation par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Anal Toxicol, 18 4. 2006 p291-296
13. Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E. and De Leenheer A.P., J. Chromatogr. Sci., 35 (1997) 321.