

CHROM. 6202

UNE MÉTHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'URINE POUR LE DIAGNOSTIC DE CONSOMMATION D'HÉROÏNE

A. VIALA ET M. ESTADIEU

Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, Marseille-5 (France)

(Reçu le 24 avril 1972)

SUMMARY

A chromatographic method of urine analysis for the diagnosis of heroin consumption

A method was developed for urine analysis of heroin addicts involving direct extraction of non-conjugated morphine and O⁶-monoacetylmorphine, and extraction of total morphine after acidic or enzymatic (*Helix pomatia* extract: β -glucuronidase + sulphatase) hydrolysis. Extractions are carried out at pH 9 with chloroform-isoamyl alcohol (9.5:0.5). The extracted compounds are then separated by thin-layer bidimensional chromatography on activated Silica Gel G, using methanol-chloroform-ammonia (85:15:0.7) for development in the first direction and hydrated diethyl ether-acetone-diethylamine (85:8:7) for the second direction. The plate, after being dried in warm air, is examined under UV light at 350 nm (morphine results in a blue fluorescent spot) and sprayed first with diluted iodoplatinate reagent, then with 50 % sulphuric acid. Morphine could be detected in the range of 0.2 μ g/10 ml of urine by UV examination and 1 μ g/10 ml by treatment with the iodoplatinate reagent. The technique is selective for morphine in cases of heroin or morphine addiction, overdose or intoxication; other opium alkaloids and derivatives, cocaine, quinine, nicotine and its major metabolite cotinine, and many psychotropic drugs do not interfere.

INTRODUCTION

Jusqu'à une date encore assez récente le problème de la "drogue" en France se posait essentiellement en terme de trafic entre les régions productrices du Moyen-Orient ou d'Extrême-Orient et les États-Unis. Mais actuellement le nombre des drogués français ne fait qu'augmenter, particulièrement à Marseille et dans le Sud-Est de notre pays, où il est fait surtout usage d'héroïne. La législation française prévoit des cures de désintoxication dans des établissements de soins pour les toxicomanes qui se présenteraient spontanément ou sous l'injonction de l'autorité judiciaire. Chez ces individus, la preuve de consommation d'héroïne pourra être fournie par l'examen médical. Dans de nombreux cas, cependant, elle devra être confirmée par l'analyse de l'urine. Par ces moyens on pourra également dépister les "rechutes" auxquelles peuvent succomber les héroïnomanes alors même qu'ils subissent ou viennent de subir un traitement de sevrage.

Des études réalisées sur la cinétique et le métabolisme des stupéfiants¹⁻⁷ il résulte que l'héroïne, introduite dans l'organisme humain, subit une désacétylation rapide en O⁶-monoacétylmorphine, cette dernière se transformant ensuite un peu plus lentement en morphine. L'héroïne disparaît très rapidement du sang après injection intraveineuse et, par la suite, les taux sanguins d'O⁶-monoacétylmorphine, voire de morphine, semblent relativement bas. La morphine fait à son tour l'objet de biotransformations qui conduisent essentiellement au conjugué glucuronique en position 3; les mécanismes de transformation en codéine par O-méthylation et en normorphine par N-déméthylation, ainsi que ceux de sulfo-conjugaison et de glucurono-conjugaison sur l'hydroxyle en position 6, sont très accessoires, pour ne pas dire négligeables. L'élimination se fait surtout par l'urine et dans une moindre mesure avec les matières fécales. Chez l'homme le principal métabolite urinaire de l'héroïne est le glucurono-3-conjugué de la morphine; il est accompagné de morphine libre et d'O⁶-monoacétylmorphine. Il est difficile d'indiquer les pourcentages de métabolites éliminés par rapport aux doses d'héroïne consommées. Même pour les auteurs qui ont travaillé sur la morphine elle-même, les avis divergent: l'excrétion urinaire porterait sur 25 à 70 % de la dose injectée par voie sous-cutanée ou intraveineuse, un à deux cinquièmes étant représentés par la morphine libre, le reste se trouvant sous la forme de morphine conjuguée; les deux-tiers de la quantité totale de morphine excrétée par voie rénale passeraient dans l'urine des 8 h qui suivent l'injection et l'élimination serait presque terminée en 24 h; l'excrétion fécale ne représenterait que 1 à 5 % de la dose de morphine administrée quotidiennement.

Compte tenu de la faiblesse des concentrations sanguine et fécale d'une part, et pour des raisons de commodité de prélèvement d'autre part, c'est l'urine qui offre les meilleures possibilités pour l'identification des métabolites de l'héroïne, que le stupéfiant ait été utilisé en prises nasales, injecté par voie intraveineuse ou introduit dans l'organisme par une autre voie. C'est d'ailleurs ce liquide qu'ont retenu la plupart des auteurs qui se sont préoccupés de la question. Certaines des méthodes décrites s'appliquent cependant au plasma sanguin et au liquide céphalo-rachidien. En ce qui concerne l'urine, la recherche porte habituellement sur la morphine, provenant de l'alcaloïde lui-même ou considérée comme un métabolite de l'héroïne, accessoirement de la codéine. Il serait fastidieux de passer en revue tous les travaux relatifs à la détermination qualitative et quantitative de la morphine dans les milieux biologiques. Une étude exhaustive du sujet a été faite par TAYLOR⁸ dans un excellent article, accompagné d'une bibliographie arrivant jusqu'aux années 1969-1970. Nous ne ferons donc que présenter un schéma général de la recherche en ne mentionnant que quelques références prises surtout parmi les plus récentes.

L'urine peut être traitée directement^{9, 9-20}, mais très souvent elle est soumise à une hydrolyse préalable, soit par un acide, l'acide chlorhydrique en général, parfois l'acide sulfurique, à la température de l'ébullition^{19, 27-29} ou à l'autoclave^{15, 30-33}, soit à l'aide d'une préparation enzymatique comme la β -glucuronidase^{14, 34}, de façon à libérer la morphine de ses conjugués; les autres liquides biologiques ou les tissus ne font pas l'objet habituellement de traitement hydrolytique^{25, 26, 35-38}. Le milieu est amené à un pH compris entre 8 et 10 et l'alcaloïde en est extrait par un solvant approprié, qui parfois est l'éther ou l'acétate d'éthyle, mais plus fréquemment le chloroforme, ou le dichloréthane, additionnés ou non d'un alcool aliphatique (éthanol, isopropanol, butanol, alcool isoamylique) ou d'acétone. Une purification peut être

effectuée par retour en phase acide suivi d'une réextraction par solvant non miscible. Certains auteurs préfèrent recourir à la séparation sur colonne^{17, 20, 29} ou par échange d'ions^{3, 14, 18, 19, 21-23, 30} préalablement à l'éluion et à l'isolement par des moyens adéquats. L'identification de la morphine repose sur la réalisation de réactions de coloration ou de cristallisation^{12, 20, 25, 32} ou sur la mise en oeuvre de procédés physico-chimiques tels que l'électrophorèse³⁰, la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince mono-dimensionnelle^{3, 9-14, 17-19, 21-24, 27, 28, 31-34, 36} ou parfois bidimensionnelle⁴⁰, la chromatographie en phase gazeuse^{3, 15, 16, 25, 26, 29, 31, 34, 35, 38}, la spectrométrie dans l'ultra-violet³⁰, la spectrofluorimétrie^{21, 22, 31, 36, 37}. Pour le dosage on peut appliquer, entre autres, des techniques colorimétriques²⁰, polarographiques⁴, spectrofluorimétriques^{36, 37} ou chromatographiques en phase gazeuse^{3, 15, 16, 25, 26, 29, 38}. L'emploi de morphine marquée au ¹⁴C (ref. 24) ou de techniques immuno-chimiques⁴¹⁻⁴³ est également envisagé.

Notre laboratoire, qui s'intéresse de très près au problème de la "drogue", a déjà été amené à mettre au point des procédés de recherche qualitative, voire quantitative, de la morphine et ses dérivés acétylés (diamorphine, O³- et O⁶-mono-acétylmorphine), de la codéine, de l'acétylcodéine, et de plusieurs autres alcaloïdes opiacés, dans les poudres — diluées ou non — livrées par le commerce clandestin ou trouvées sur les toxicomanes⁴⁴⁻⁴⁹. Compte tenu de l'acquit apporté par ces travaux et des données recueillies dans la bibliographie, il nous a paru opportun d'entreprendre des essais en vue de proposer une méthode suffisamment sensible et sélective pour assurer l'identification des métabolites de l'héroïne dans l'urine des drogués en évitant les interférences dues à la fumée de tabac et/ou à l'absorption de divers produits médicamenteux.

PROTOCOLE ANALYTIQUE

Principe

La méthode repose sur l'extraction directe de la morphine non conjuguée et de l'O⁶-monoacétylmorphine à partir de l'urine et sur l'extraction de la morphine totale après traitement hydrolytique. Les composés extraits sont ensuite séparés et identifiés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice.

Réactifs

Tous les réactifs répondent à la qualification "pour analyse":

Chloroforme; alcool méthylique; alcool isoamylique; acétone; éther éthylique; ammoniacque concentrée, $d = 0.92$ (23 %); diéthylamine pure; acide sulfurique au demi (p/v); acide chlorhydrique concentré; acide chlorhydrique 0.1 N.

Tampon à pH 9: "Titrisol" (Merck) à base d'acide borique, de chlorure de potassium et de solution d'hydroxyde de sodium.

Tampon de Mc Ilvaine à pH 5.4: à 44.25 ml de solution d'acide citrique 0.1 M ajouter 55.75 ml de solution de phosphate disodique 0.2 M.

Ferricyanure de potassium 0.4 mM (ref. 37) en tampon pH 9.

Réactif iodoplattinique dilué: à 3 ml de solution de chlorure de platine à 10 %, ajouter 97 ml d'eau distillée et 100 ml de solution d'iodure de potassium à 6 % (conserver en flacon coloré); diluer au tiers au moment de l'emploi dans l'acide chlorhydrique N^{44, 48}.

Suc d'*Helix pomatia* titré à 100.000 U Fishmann de β -glucuronidase et 800.000 U Roy de sulfatase par millilitre.

Silica Gel G (Merck)."

Solutions étalons à 5 mg/ml: morphine base dans le mélange méthanol-chloroforme à parties égales; codéine et acétylcodéine (bases) dans le chloroforme; chlorhydrate d'O⁶-monoacétylmorphine et chlorhydrate de diacétylmorphine dans l'éthanol; chlorhydrate de nalorphine dans l'éthanol* (un témoin global, avec ou sans nalorphine, peut être préparé en mélangeant des volumes égaux de chaque solution étalon).

Extraction directe

Dans un tube à centrifuger bouchant émeri, introduire 10 ml d'urine, amener au voisinage de pH 5 par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0.1 N, ajouter 10 ml de chloroforme et agiter mécaniquement pendant 15 min. Centrifuger et rejeter le chloroforme. Ajouter à la phase aqueuse 8 ml du mélange chloroforme-alcool isoamylique (9.5:0.5), quelques gouttes d'ammoniaque pour amener aux environs de pH 9 et 3 ml de tampon à pH 9. Boucher et agiter mécaniquement pendant 15 min. Centrifuger pendant 5 min à 4500 tours par minute et prélever la phase organique inférieure au moyen d'une seringue munie d'une longue aiguille. Renouveler l'extraction sur la phase aqueuse avec 8 ml de solvant. Réunir les extractifs organiques et les concentrer sous pression réduite et à température inférieure à 50° au volume de 50 à 150 μ l.

Extraction après hydrolyse acide

Chauffer au bain-marie bouillant pendant 2 h 10 ml d'urine additionnés de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après refroidissement, amener vers pH 5 au moyen d'ammoniaque, agiter longuement avec 10 ml de chloroforme et rejeter la phase chloroformique. Ajouter à la solution aqueuse 8 ml du solvant d'extraction chloroforme-alcool isoamylique (9.5:0.5), alcaliniser aux environs de pH 9 par addition d'ammoniaque, ajouter 3 ml de tampon à pH 9, puis extraire et évaporer comme précédemment.

Extraction après hydrolyse enzymatique

À 10 ml d'urine ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0.1 N pour obtenir un pH voisin de 5, puis 3 ml de tampon de Mc Ilvaine à pH 5.4 et 0.1 ml de suc d'*Helix pomatia*. Maintenir le mélange à la température de 37° pendant 12 h**. Après refroidissement, laver le liquide par agitation prolongée avec 10 ml de chloroforme, rejeter la phase organique, ajouter à la phase aqueuse 8 ml du mélange chloroforme-alcool isoamylique (9.5:0.5), amener le pH au voisinage de 9 avec de l'ammoniaque, stabiliser à pH 9 par addition de 3 ml de tampon et procéder aux extractions et à l'évaporation comme précédemment.

Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince

Le résidu d'évaporation terminal (50 à 150 μ l) est déposé en totalité dans l'angle inférieur gauche (à 1.5 cm de chacun des deux bords) d'une plaque de verre de

* Le témoin de nalorphine peut être utile car cette substance est souvent utilisée comme antagoniste des morphiniques, notamment dans les cas d'intoxication ou de surdosage s'accompagnant de dépression respiratoire.

** Si l'on est pressé par le temps, la durée de l'incubation peut être réduite à 5 ou 6 h.

20 × 20 cm enduite d'une couche de Gel de Silice G (selon Merck) de 0.25 mm d'épaisseur, préalablement activée. 10 µl du mélange témoin sont déposés aux angles inférieur droit et supérieur gauche de la plaque. Les développements ont lieu en cuves sursaturées par les vapeurs des solvants. La migration dans la première direction est effectuée sur 15 cm au moins, à l'aide du solvant méthanol-chloroforme-ammoniaque à 23 % (85:15:0.7); après 10 min de séchage sous courant d'air froid, la migration dans la direction perpendiculaire est conduite, également sur 15 cm, avec le solvant éther éthylique saturé d'eau-acétone-diéthylamine (85:8:7). La plaque est alors séchée sous courant d'air chaud pendant 1 h environ et davantage si possible, puis examinée en lumière ultra-violet à 350 nm: dans ces conditions la morphine, l'Op-monoacétylmorphine, la diamorphine, de même que la nalorphine, fournissent des taches de fluorescence bleutée, alors que la codéine et l'acétylcodéine ne sont pas apparentes. Si nécessaire la fluorescence de la tache de morphine dans l'ultraviolet (350 nm) peut être intensifiée par exposition aux vapeurs d'ammoniaque suivie d'un séchage prolongé; la pulvérisation de ferricyanure de potassium 0.4 mM, qui fait virer transitoirement les fluorescences au jaune-vert (la plaque étant examinée encore humide), améliore aussi le repérage*. La plaque, desséchée, est ensuite pulvérisée au réactif iodoplatinique dilué qui donne avec tous les composés précités des taches de coloration variable (Tableau I), dont l'intensité peut être augmentée par pulvérisation d'acide sulfurique au demi.

DISCUSSION DES PARAMÈTRES OPÉRATOIRES

Extraction

Des essais d'extraction ont été effectués sur la morphine, principal métabolite urinaire de l'héroïne, isolable directement ou après hydrolyse des conjugués. Nous avons opéré sur des solutions aqueuses de chlorhydrate de morphine, exactement titrées à 30 et 60 µg de morphine base par millilitre. Des volumes mesurés de chaque liquide ont été tamponnés à des pH compris entre 8 et 11, puis agités avec des volumes égaux des solvants suivants: acétate d'éthyle-isopropanol (9:1); chloroforme-éthanol (9:1); chloroforme-isopropanol (3:1); chloroforme-isopropanol (9:1); chloroforme-*n*-butanol (9:1); chloroforme-alcool isoamylique (9:1); chloroforme-alcool isoamylique (9.5:0.5).

Les phases organiques ont été séparées par centrifugation et la morphine y a été dosée par spectrophotométrie dans l'ultra-violet (commode à employer pour des essais de ce type malgré sa faible sensibilité), par comparaison avec une gamme étalon préparée en dissolvant des quantités déterminées de morphine base dans le solvant étudié. Les mesures de densité optique ont été faites à 287 nm contre un blanc préparé en agitant le solvant essayé avec la solution aqueuse tamponnée ne renfermant pas de morphine. Les rendements les plus élevés ont été obtenus avec les mélanges de chloroforme et d'alcool isoamylique (90 % avec le mélange 9:1; 86 % avec le mélange 9.5:0.5). Bien que le pourcentage de récupération moyen soit légèrement plus fort avec la première de ces formules, c'est le second mélange (chloroforme-alcool isoamylique (9.5:0.5)) que nous avons finalement retenu, parce qu'il s'évapore plus rapidement et fournit un résidu plus facile à déposer sur les couches chromatographiques.

* Après dessiccation les fluorescences redeviennent bleues.

La saturation préalable des phases aqueuses par le sulfate d'ammonium ou par le chlorure de sodium, préconisée par certains auteurs, n'améliore pas sensiblement le rendement. Quant à la déshydratation des liquides organiques (par le sulfate de sodium anhydre par exemple) et aux opérations de reprise en phase acide suivie d'une réextraction à pH alcalin, elles ne sont pas nécessaires si l'analyse ultérieure est menée telle que nous l'avons décrite, dans un but uniquement qualitatif. En revanche, les lavages préliminaires au chloroforme en milieu acide permettent de réaliser une purification qui n'est pas négligeable.

Opérations d'hydrolyse

Les métabolites de l'héroïne existant dans l'urine sous forme libre peuvent être isolés par extraction directe, mais habituellement la sensibilité de la détection est améliorée si l'on procède à l'hydrolyse préalable des conjugués. Le choix de la technique d'hydrolyse est guidé par des impératifs de commodité, de rapidité, de "propreté" des extractifs terminaux et de prix de revient. L'autoclavage en milieu acide est rapide, mais peut présenter des difficultés de réalisation. Quant à la β -glucuronidase pure, son emploi s'avère assez coûteux. C'est pourquoi nous avons étudié plus spécialement l'hydrolyse chlorhydrique au bain-marie bouillant et l'hydrolyse par le suc d'*Helix pomatia*, préparation enzymatique dont le prix de revient est relativement bas. Des essais comparatifs, effectués sur de mêmes échantillons d'urines d'héroïnomanes par estimation de la surface et de l'intensité de fluorescence ou de coloration de la tache de morphine obtenue après extraction et chromatographie sur couche mince, indiquent une efficacité pratiquement similaire pour les deux procédés; toutefois le "ballast" des impuretés urinaires, qui peut gêner l'interprétation des chromatogrammes, est nettement plus important dans le cas du traitement chlorhydrique que dans celui de l'hydrolyse enzymatique. En outre, en faisant subir à des solutions aqueuses titrées de chlorhydrate de morphine les opérations d'hydrolyse et d'extraction et en déterminant la morphine dans la phase organique finale par spectrophotométrie ultra-violette, nous avons constaté que le pourcentage de récupération est supérieur dans le cas de l'hydrolyse enzymatique. Pour toutes ces raisons nous avons donné la préférence au suc d'*Helix pomatia*, nous réservant la possibilité de faire appel à l'hydrolyse chlorhydrique lorsque nous étions pressés par le temps.

Chromatographie sur couche mince

Des essais ont été tout d'abord conduits en technique mono-dimensionnelle sur gel de silice activé avec le solvant éther éthylique saturé d'eau-acétone-diéthylamine (85:8:7) en vue d'adapter à l'examen de l'urine les conditions chromatographiques antérieurement mises au point pour l'analyse des poudres à base d'héroïne ou de morphine^{44-46, 48, 49}. Mais l'interprétation des chromatogrammes ainsi obtenus était rendue délicate par l'existence d'un "ballast" urinaire important et par la présence fréquente de bases organiques, médicamenteuses ou autres, risquant de provoquer des confusions.

Pour pallier ces inconvénients, le recours à la technique bidimensionnelle s'imposait. Comme cela a déjà été précisé à propos de l'analyse des préparations illicites pulvérulentes renfermant des alcaloïdes opiacés et/ou leurs dérivés acétylés^{44-46, 49}, il convient d'utiliser obligatoirement pour la migration dans la première direction le mélange méthanol-chloroforme-ammoniacque (85:15:0.7), qui sépare

les composés envisagés en trois groupes (Fig. 3 et 4) correspondant respectivement, par ordre de R_f croissant: l'un à la morphine et à la codéine, le second à l'héroïne, à l'O⁶-monoacétylmorphine et à l'acétylcodéine, le dernier à la nalorphine. Le solvant éther éthylique saturé d'eau-acétone-diéthylamine (85:8:7), utilisé pour la migration dans la deuxième direction, permet d'individualiser tous les composants (Fig. 3 et 4).

La nature du support de la couche chromatographique influe également sur la qualité des chromatogrammes. Bien que plus fragiles que les couches toutes prêtes sur feuilles plastiques, les couches sur verre sont à recommander plus particulièrement, car elles présentent l'avantage de rendre les détections plus sensibles.

Sensibilité de la technique

La sensibilité de la technique a été déterminée sur des échantillons de 10 ml d'urine humaine, provenant de sujets non fumeurs n'ayant absorbé aucun médicament au cours de la semaine précédente, additionnés de quantités connues de chlorhydrate de morphine comprises entre 0.1 μg et 10 μg (exprimées en base). Chaque échantillon a été soumis aux opérations d'extraction, d'hydrolyse enzymatique et de chromatographie bidimensionnelle sur couche mince, telles que nous les avons décrites au chapitre PROTOCOLE ANALYTIQUE. La meilleure sensibilité a été obtenue par examen des plaques en lumière ultra-violette dans les conditions déjà précisées: il est alors possible de déceler jusqu'à 0.2 μg de morphine (base) dans 10 ml d'urine. Avec le réactif iodoplatinique (sensibilisé par l'acide sulfurique au demi) la limite de la détection avoisine 1 μg de morphine pour 10 ml d'urine.

Sélectivité de la technique

Pour identifier de façon certaine la morphine, voire l'O⁶-monoacétylmorphine, il était essentiel d'étudier les interférences possibles de la part de médicaments (et

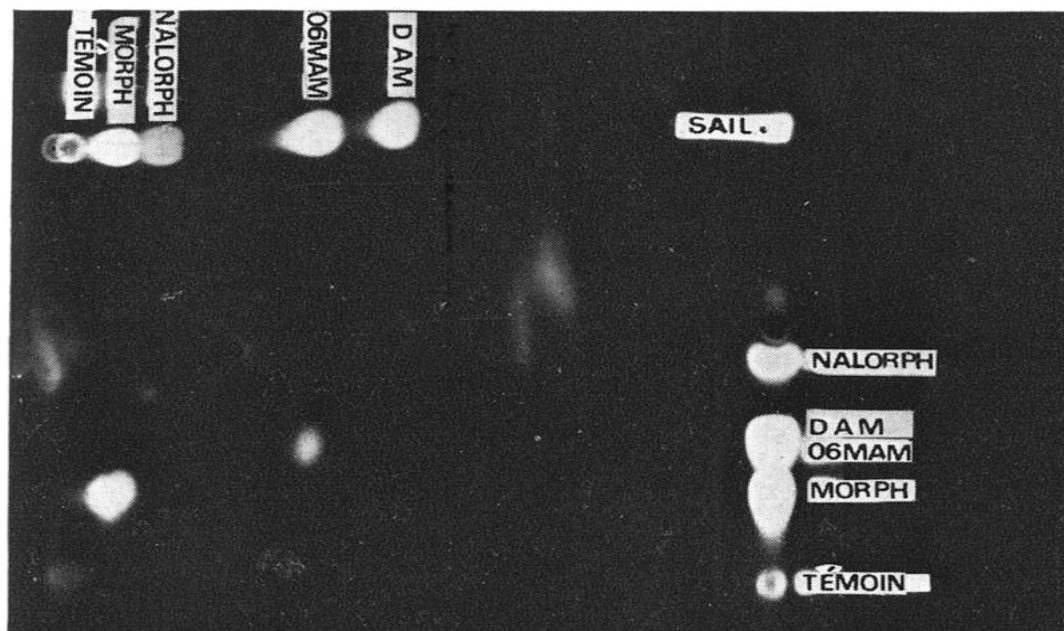


Fig. 1. Chromatographie bidimensionnelle d'une urine de "drogué" soumise à l'extraction directe; la photographie sous ultra-violet permet de distinguer nettement les taches de morphine et d'O⁶-monoacétylmorphine. Témoins: Morph = morphine, O⁶ MAM = O⁶-monoacétylmorphine, DAM = diacétylmorphine, Nalorph = nalorphine.

de leurs métabolites) ou d'autres substances pouvant exister dans l'urine examinée. En effet, il est rare que les toxicomanes n'utilisent qu'une seule drogue; ils consomment volontiers, outre l'héroïne, des médicaments (barbituriques, hypnotiques non

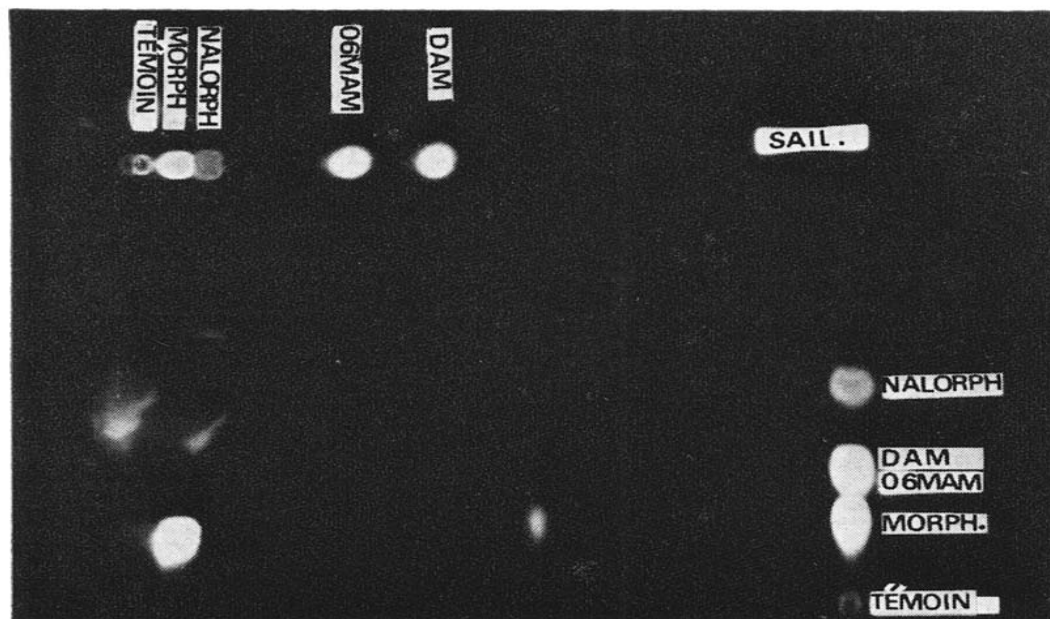


Fig. 2. Chromatographie bidimensionnelle de la même urine soumise à l'extraction après hydrolyse (photographie sous ultra-violet). La tache d'O⁶-monoacétylmorphine a disparu, la tache de morphine est notablement plus importante; des taches traduisant la présence d'autres bases organiques sont apparentes. Témoins: Morph = morphine; O⁶ MAM = O⁶-monoacétylmorphine; DAM = diacétylmorphine; Nalorph = nalorphine.

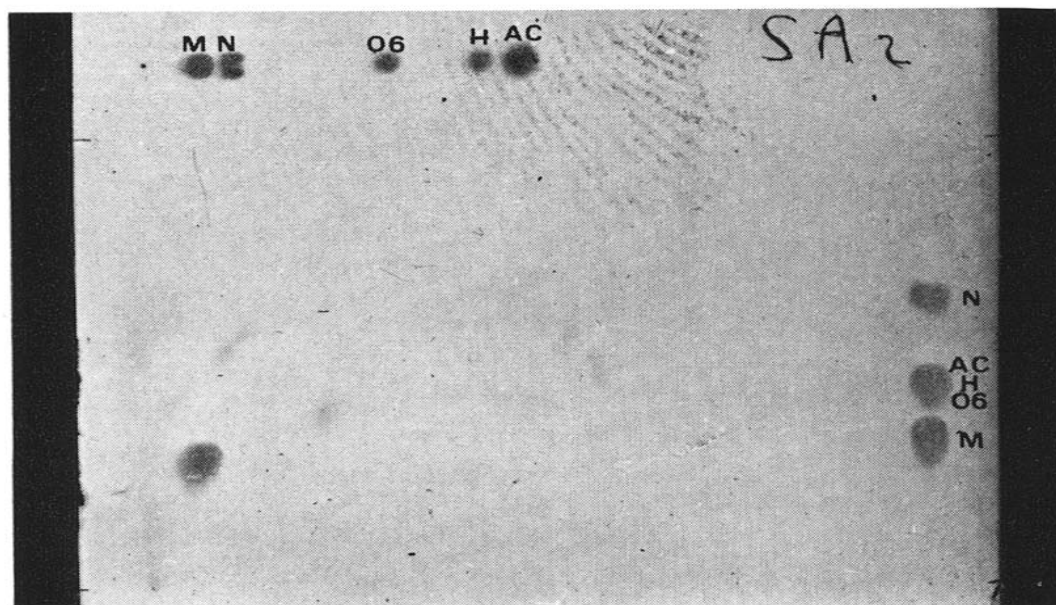


Fig. 3. Chromatographie bidimensionnelle de la même urine soumise à l'extraction après hydrolyse (photographie après révélation iodoplatinique). Témoins: M = morphine; O⁶ = monoacétylmorphine; H = diacétylmorphine; AC = acétylcodéine; N = nalorphine. SA 2 est une indication concernant le malade dont l'urine a donné lieu aux analyses. Pour l'explication des taches voir la légende de Fig. 2.

barbituriques type méthaqualone ou mécloqualone, tranquillisants, etc.) ou d'autres stupéfiants (cocaïne). Certaines bases, comme la quinine, peuvent être apportées par des échantillons illicites d'héroïne où elle est ajoutée comme adjuvant. La nicotine et ses métabolites (cotinine essentiellement) sont présents dans les urines de fumeurs de tabac*. De plus, des hypnotiques, des neuroleptiques (phénothiaziniques ou autres), des anxiolytiques, employés au cours des "cures de désintoxication", peuvent être retrouvés, ainsi que leurs produits de biotransformation, dans les urines des toxicomanes ainsi traités. On doit aussi tenir compte d'un possible traitement de "substitution" par la méthadone.

Les barbituriques, d'une façon générale, ne sont isolables dans les solvants organiques qu'en milieu acide; ils sont d'ailleurs en grande partie éliminés par le lavage chloroformique à pH acide. Il en est de même, quoique dans une moindre mesure, pour des composés phénothiaziniques. Ces derniers, administrés parfois à doses relativement élevées lors des traitement de sevrage, pourraient gêner l'inter-

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES DE QUELQUES SUBSTANCES SUSCEPTIBLES D'ÊTRE TROUVÉES DANS L'URINE DES DROGUÉS

No.	Substance	Fluorescence UV		Réactif iodoplatinique
		254 nm	350 nm	
1	Morphine	jaunâtre faible	bleue	gris-bleu
2	Codéine	—	—	rose-violacé
3	O ⁶ -Monoacétylmorphine	jaunâtre faible	bleue	gris-violacé
4	Diacétylmorphine	jaunâtre faible	bleue	gris-bleu
5	Acétylcodéine	—	—	gris-bleu
6	Nalorphine	jaunâtre faible	bleue	gris-bleu
7	Cocaïne	—	—	violacé
8	Quinine	bleue	bleue	brun-violacé
9	Nicotine	—	—	gris-bleu
10	Cotinine	—	—	ocre-rose
11	Méthaqualone	—	—	ocre-rose
12	Diphénhydramine ^a	—	—	violet
13	Mécloqualone	—	—	ocre-rose
14	Hydrochlorbenzéthylamine ^b	—	—	violet
15	N-Déméthyl diazépam ^c	jaunâtre faible	jaunâtre faible	gris-violacé
16	Oxazépam ^c	jaunâtre	jaunâtre faible	ocre-pâle
17	Méthadone	—	—	rouge-violacé
18	Amphétamine	—	—	grisâtre
19	Méthylamphétamine	—	—	grisâtre

^a Associé à la méthaqualone dans le "Mandrax" (N.D.).

^b Associé à la mécloqualone dans la "Dormalone" (N.D.).

^c Métabolite du chlorazépate dipotassique ("Tranxène" N.D.).

* Toutefois, ces composés peuvent être partiellement ou totalement entraînés par volatilisation au cours des opérations d'évaporation.

prétation des chromatogrammes par les fluorescences qu'ils présentent dans l'ultra-violet et les réactions positives qu'ils fournissent avec le réactif iodoplatinique, mais leurs R_F ainsi que ceux de leurs métabolites, sont pour la plupart supérieurs à celui de la morphine dans les solvants de migration retenus. Pour un certain nombre d'autres substances nous indiquons ci-après (Fig. 4 et Tableau I) les caractéristiques chromatographiques par rapport à celles de la morphine et des composés apparentés. Ces données montrent que la morphine, en particulier, se distingue très facilement des autres substances expérimentées en chromatographie bidimensionnelle, et par la position de la tache qu'elle fournit, et par sa réactivité vis à vis des moyens de révélation.

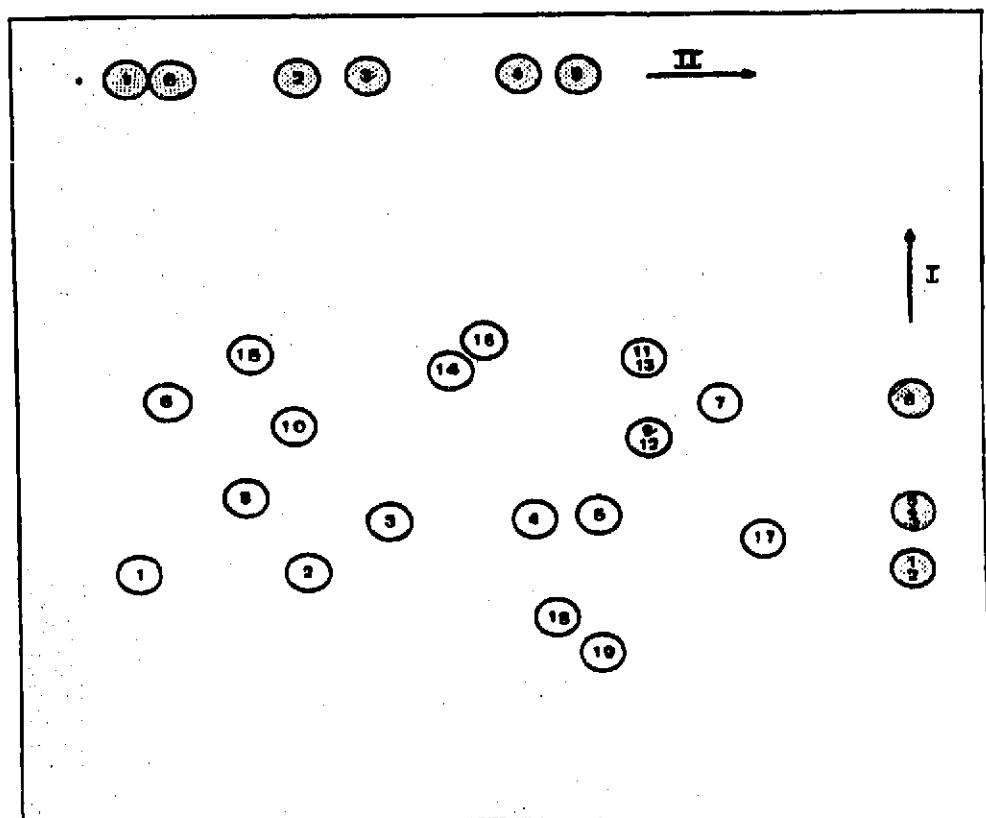


Fig. 4. Schéma de séparation par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice de la morphine, de la codéine et de certains de leurs dérivés, et de quelques autres composés susceptibles d'être trouvés dans l'urine des "drogués". Solvant I: méthanol-chloroforme-ammoniaque (85:15:0.7); solvant II: ether saturé d'eau-acétone-diéthylamine (85:8:7). La nature des substances correspondant aux chiffres est indiquée dans le Tableau I.

RÉSULTATS

Nous avons analysé selon le protocole précédemment exposé près de 300 échantillons d'urine prélevés chez 160 individus soupçonnés d'avoir consommé de l'héroïne. Il s'agissait de sujets de la région marseillaise, où les poudres récupérées sur les toxicomanes sont généralement des dilutions de chlorhydrate de diamorphine dans du lactose, contenant également une petite quantité d'acétylcodéine et souvent

des traces d'O⁶-monoacétylmorphine comme impuretés^{44-47, 49}. Les résultats furent positifs dans le tiers des cas environ, mais il n'a pas été possible de connaître le délai séparant le prélèvement de la prise de stupéfiant.

Dans les échantillons soumis à l'extraction directe, sans traitement hydrolytique, nous avons mis en évidence la morphine et parfois l'O⁶-monoacétylmorphine (Fig. 1) mais, contrairement aux observations d'ADVENIER *et al.*⁵⁰, nous n'avons jamais caractérisé de diacétylemorphine inchangée, même chez les individus intoxiqués à la suite de surdosage; nous n'avons jamais détecté non plus d'acétylcodéine ni de codéine. Dans les échantillons hydrolysés préalablement à l'extraction, seule la morphine a été décelée (Fig. 2 et 3). Ce résultat est normal car, comme nous avons pu l'observer en opérant sur des solutions aqueuses de produits purs, aussi bien l'hydrolyse acide que l'hydrolyse enzymatique provoquent la désacétylation totale des composés acétylés de la morphine (diacétylmorphine, O⁶-monoacétylmorphine) et de la codéine (acétylcodéine).

Nous avons eu également l'occasion d'appliquer la technique proposée à quelques échantillons de sang. Les essais furent négatifs, même chez les sujets qui répondaient positivement à la recherche de la morphine dans l'urine. Un manque de sensibilité de la méthode est peut être à incriminer, compte tenu du volume nécessairement réduit du prélèvement sanguin susceptible d'être traité, ou bien ce résultat est-il dû à la métabolisation intense que subit l'héroïne dans l'organisme humain et à la rapidité de la décroissance des taux sanguins du produit lui-même et/ou de ses métabolites, le prélèvement ayant pu alors être fait trop tardivement.

Par contre il n'est pas interdit de penser que le procédé que nous avons indiqué puisse être étendu à la recherche dans l'urine d'autres composés, stupéfiants ou non, voire de leurs métabolites, tels que ceux auxquels nous nous sommes intéressés au cours des essais de sélectivité.

RÉSUMÉ

La méthode proposée a été mise au point dans le but d'analyser l'urine des héroïnomanes. Elle comprend l'extraction directe de la morphine non conjuguée et de l'O⁶-monoacétylmorphine, et l'extraction de la morphine totale après hydrolyse acide ou enzymatique (suc d'*Helix pomatia*: β -glucuronidase + sulfatase). Les extractions sont effectuées à pH 9 à l'aide du solvant chloroforme-alcool isoamylique (9.5:0.5). Les composés extraits sont ensuite séparés par chromatographie bidimensionnelle sur Gel de Silice G activé en utilisant comme solvants le mélange méthanol-chloroforme-ammoniaque (85:15:0.7) pour la première direction et le mélange éther éthylique saturé d'eau-acétone-diéthylamine (85:8:7) pour la seconde. La plaque, longuement séchée sous courant d'air chaud, est examinée dans l'ultraviolet à 350 nm (la morphine donne ainsi une tache de fluorescence bleue) et pulvérisée d'abord avec du réactif iodoplatinique dilué, puis avec de l'acide sulfurique à 50 %. La limite de la détection pour la morphine est de l'ordre de 0.2 $\mu\text{g}/10$ ml d'urine par examen en lumière ultra-violette et de 1 $\mu\text{g}/10$ ml par révélation iodoplatinique. La technique est sélective de la morphine dans les cas de toxicomanies à l'héroïne ou à la morphine, de surdosages ou d'intoxications; d'autres alcaloïdes de l'opium et leurs dérivés, la cocaïne, la quinine, la nicotine et son métabolite principal la cotinine, et divers médicaments psychotropes n'interfèrent pas.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. M. FUJIMOTO ET E. L. WAY, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 121 (1957) 340.
 - 2 S. J. MULÉ, dans D. H. CLOUET (Éditeur), *Narcotic Drugs—Biochemical Pharmacology*, Plenum Press, New York-London, 1971, p. 99.
 - 3 K. OGURI, S. IDA, H. YOSHIMURA ET H. TSUKAMOTO, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 18 (1970) 2414.
 - 4 P. PAAERREGAARD, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 14 (1957) 38 et 53.
 - 5 J. T. SCRAFANI ET D. H. CLOUET, dans D. H. CLOUET (Éditeur), *Narcotic Drugs—Biochemical Pharmacology*, Plenum Press, New York-London, 1971, p. 137.
 - 6 E. L. WAY, *Ass. Res. Nerv. Dis.*, 46 (1968) 13.
 - 7 E. L. WAY ET T. K. ADLER, *Bull. WHO*, 25 (1961) 227.
 - 8 J. F. TAYLOR, dans D. H. CLOUET (Éditeur), *Narcotic Drugs—Biochemical Pharmacology*, Plenum Press, New York-London, 1971, p. 17.
 - 9 D. J. BERRY, J. GROVE, B. WIDDOP ET J. H. P. WILLIS, *Bull. Stupéfiants*, 22 (1970) 33.
 - 10 D. J. BERRY ET J. GROVE, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 111.
 - 11 D. A. L. BOWEN, D. M. GURR ET G. B. OPPENHEIM, *Clin. Toxicol.*, 3 (1970) 89.
 - 12 J. R. BROICH, D. B. HOFFMAN, S. ANDRYAUSKAS, L. GALANTE ET C. J. UMBERGER, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 95.
 - 13 B. DAVIDOW, N. LI PETRI, B. QUAME, B. SEARLE, E. FASTLICH ET J. SAVITZKY, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 46 (1966) 58.
 - 14 V. P. DOLE, W. K. KIM ET I. EGLITIS, *J. Amer. Med. Ass.*, 198 (1966) 349.
 - 15 H. W. ELLIOTT, K. D. PARKER, M. CRIM, J. A. WRIGHT ET N. NOMOF, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 12 (1971) 806.
 - 16 F. FISH ET W. D. C. WILSON, *J. Chromatogr.*, 40 (1969) 164.
 - 17 J. M. FUJIMOTO ET R. I. H. WANG, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16 (1970) 186.
 - 18 A. M. HEATON ET A. G. BLUMBERG, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 367.
 - 19 K. K. KAISTHA ET J. H. JAFFE, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 83.
 - 20 C. MC MARTIN, P. SIMPSON ET N. THORPE, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 72.
 - 21 V. MARKS ET D. FRY, *Proc. Ass. Clin. Biochem.*, 5 (1968) 95.
 - 22 V. MARKS, D. FRY, P. A. L. CHAPPEL ET G. GRAY, *Br. Med. J.*, 2 (1969) 153.
 - 23 J. G. MONTALVO, JR., E. KLEIN, D. EYER ET B. HARPER, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 542.
 - 24 S. J. MULÉ, *J. Chromatogr.*, 39 (1969) 302.
 - 25 H. V. STREET, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 68.
 - 26 H. V. STREET, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 358.
 - 27 J. COCHIN ET J. W. DALY, *Experientia*, 18 (1962) 294.
 - 28 R. J. COUMBIS, C. C. FULTON, J. P. CALISE ET C. RODRIGUEZ, *J. Chromatogr.*, 54 (1971) 245.
 - 29 N. IKEKAWA, K. TAKAYAMA, E. HOSOYA ET T. OKA, *Anal. Biochem.*, 28 (1969) 156.
 - 30 L. R. GOLDBAUM ET M. A. WILLIAMS, *J. Forensic Sci.*, 2 (1968) 253.
 - 31 S. J. MULÉ, *J. Chromatogr.*, 55 (1971) 255.
 - 32 M. ONO, B. F. ENGELKE ET C. FULTON, *Bull. Stupéfiants*, 21 (1969) 31.
 - 33 K. D. PARKER ET C. H. HINE, *Bull. Stupéfiants*, 19 (1967) 49.
 - 34 E. P. J. VAN DER SLOOTEN, H. J. VAN DER HELM ET P. J. GEERLINGS, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 131.
 - 35 N. C. JAIN ET P. L. KIRK, *Microchem. J.*, 12 (1967) 229.
 - 36 H. KUPFERBERG, A. BURKHALTER ET E. L. WAY, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 145 (1964) 247.
 - 37 A. E. TAKEMORI, *Biochem. Pharmacol.*, 17 (1968) 1627.
 - 38 G. B. WILKINSON ET E. L. WAY, *Biochem. Pharmacol.*, 18 (1969) 1435.
 - 39 R. C. BASELT ET L. J. CASARETT, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 139.
 - 40 S. J. MULÉ, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1907.
 - 41 R. K. LEUTE, E. F. ULLMAN, A. GOLDSTEIN ET L. A. HERZENBERG, Communication de "Syva Corporation", Palo Alto (U.S.A.), 1971.
 - 42 S. SPECTOR, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 178 (1971) 253.
 - 43 S. SPECTOR ET C. W. PARKER, *Science*, 168 (1970) 1347.
 - 44 J. CATALIN, *Thèse Pharmacie (État)*, Marseille, 1970.
 - 45 A. VIALA, J. CATALIN ET F. GOUZO, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, à paraître.
 - 46 A. VIALA, F. GOUZO ET J. CATALIN, *Méd. Lég. Domm. Corpor.*, 2 (1969) 21.
 - 47 A. VIALA, F. GOUZO, J. CATALIN ET J. P. CANO, *J. Eur. Toxicol.*, 4 (1971) 375.
 - 48 L. VIGNOLI, J. GUILLOT, F. GOUZO ET J. CATALIN, *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 9 (1965) 291.
 - 49 L. VIGNOLI, J. GUILLOT, F. GOUZO ET J. CATALIN, *Ann. Pharm. Fr.*, 24 (1966) 461 et 529.
 - 50 C. ADVENIER, F. BUNEAUX, J. P. DUPEYRON ET P. FABIANI, *Ann. Biol. Clin.*, 29 (1971) 427.
- J. Chromatogr.*, 72 (1972) 127-138