

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2008

Sabine Mamone

*Analyse de toxiques médicamenteux
dans les fluides biologiques
par chromatographie en phase gazeuse
couplée à une trappe ionique*

Professeur

Urban Frey

Experts

Dr Christian Staub
Julien Déglon

Confidentiel / Vertraulich

☐ oui / ja ☒ non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS ca/2008/73
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student Sabine Mamone	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Urban Frey	Experts / Experten (données complètes) Dr. Christian Staub Julien Déglon	

Titre / Titel

**Analyse de toxiques médicamenteux dans les fluides biologiques
 par chromatographie en phase gazeuse couplée à une trappe ionique**

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

L'identification et la quantification de toxiques médicamenteux représentent une étape essentielle en toxicologie médico-légale. Elle doit permettre — entre autres — de différencier les teneurs thérapeutiques des teneurs toxiques, voire mortelles. Les analyses qualitatives et quantitatives débutent par une extraction soit liquide-liquide (LLE), soit sur phase solide (SPE); la séparation des composés d'intérêt est ensuite effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur azote-phosphore (NPD) ou — dans certains cas — à un détecteur de spectrométrie de masse (MSD).

L'objectif de ce travail est — dans un premier temps — de comparer deux types d'ionisations (impact électronique et ionisation chimique). Dans un second temps, il s'agit de développer une méthode qualitative et semi-quantitative par MS_n avec le mode d'ionisation le plus optimal. La dernière étape consiste à créer une bibliothèque de spectres obtenus à partir de fragments issus de la MS_n.

Ce travail académique s'inscrit dans la routine d'un laboratoire de toxicologie pourvu des équipements les plus modernes. Il donne l'occasion de découvrir les activités d'un tel laboratoire et d'appliquer les résultats obtenus à des échantillons réels liés à des expertises judiciaires.

Partie expérimentale :

- Recherche bibliographique sur les systèmes de couplage chromatographie gazeuse—spectrométrie de masse et sur l'analyse des toxiques médicamenteux dans les matrices biologiques (sang et urine principalement).
- Choix de composés d'intérêt toxicologique (benzodiazépines et antidépresseurs).
- Développement d'une méthode qualitative et semi-quantitative sans dérivation.
 - Comparaison de l'ionisation par impact électronique et ionisation chimique.
 - Développement d'une méthode MS_n.
 - Création d'une bibliothèque de données sur la base de fragments issus de la MS_n.
- Développement d'une procédure LLE/Eppendorf à partir d'échantillons biologiques (sang et urine).
- Validation de la méthode retenue pour les toxiques sélectionnés.
- Application à quelques cas rencontrés en routine.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Resp. de filière
 Studiengangsleiter:

Etudiant/Student:

Délais / Termine

 Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
 01.09.2008

 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
 21.11.2008 — 12.00

 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
 28.11.2008

 Défense orale / Mündliche Verfechtung:
 semaine/Woche 49

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats

Annalyse de toxiques médicamenteux dans des fluides biologiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à une trappe d'ion
Analyse heilsamer Gifte in biologischen Flüssigkeiten durch Gaschromatographie, die an einer Ionen Trap zusammengefügt wurde

L'objectif de ce travail de diplôme est d'identifier et de quantifier des psychotropes dans des matrices de sang. Deux types d'ionisations (impact électronique et ionisation chimique) doivent être comparées. Il s'agit aussi de développer une méthode qualitative et semi-quantitative par MSn avec le mode d'ionisation le plus optimal. Puis, créer une bibliothèque de spectres obtenus à partir de fragments issus de la MSn. Il est également question de développer une méthode de traitement des échantillons pour pouvoir les analyser par GC-MS et finalement appliquer la méthode développée sur des cas réels.

Résultats : pour l'analyse de toxique médicamenteux, il s'est avéré que l'ionisation par impact électronique est le meilleur compromis entre une fragmentation relativement douce et une bonne sensibilité. A partir de 200µl de sang il a été possible d'identifier des composés à une concentration de 10ng/ml grâce la méthode GC-MSn. L'identification se fait avec le temps de rétention, une « multi » fragmentation d'ions préalablement sélectionnés pour chaque composé et une empreinte spectrale MS₃ de référence stockée dans une bibliothèque de spectres.

Mots-clés : GC-MSn, trappe ionique, psychotropes

Das Ziel dieser Diplomarbeit besteht darin, Psychotrope in Blutmatrizen zu identifizieren und zu quantifizieren. Um dies zu erreichen müssen zwei Arten von Ionisationen (elektronische Impact und chemische Ionisation, verglichen werden. Dann wurde eine qualitative und semi-quantitative Methode durch MSn mit der optimalsten Ionisationsmethode entwickelt. Dann soll man eine Bibliothek von Spektrum, die ausgehend von erhaltenen Fragmenten, die aus MSn stamme schaffen. Es ist ebenfalls Frage, eine Methode der Probenaufbereitung zu entwickeln, um die Probe durch GC-MS analysieren zu können, und schließlich die entwickelte Methode auf wirklichen Fällen anzuwenden.

Resultate: für die Analyse von Psychotrope hat es sich erwiesen, dass die Ionisation durch Elektronische Impact der beste Kompromiß zwischen einer ziemlich zarten Zerstückelung und einer guten Empfindlichkeit ist. Ab 200µl des Blutes war es möglich, Zusammensetzungen an einer Konzentration von 10ng/ml zu identifizieren dank die Methode GC-MSn. Die Identifikation erfolgt durch Vergleich der Retentionzeiten, „multi“ Fragmentation von Ionen und eine spektrale Bibliothek von Referenzen.

Schlüsselwörter :Gc-MSn, Ionen trap, Psychotrope

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Urban Frey pour m'avoir permis de réaliser mon travail de diplôme au sein de l'unité de toxicologie de l'institut de médecine légale à Genève et le Docteur Christian Staub, responsable du laboratoire, pour m'y avoir chaleureusement accueillie.

Je souhaite remercier Julien Déglon pour son soutien, sa patience, ses précieux conseils et pour m'avoir guidée à travers ce travail de recherche.

Je remercie également, Aurélien Thomas, Docteur Christèle Widmer, et Federica Zbinden pour leurs explications et leur soutien.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Enfin je souhaite remercier mon copain, ma famille et mes amis pour m'avoir également soutenue et encouragée notamment pendant ces trois mois.

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	6
1.1. LES MEDICAMENTS PSYCHOTROPES	6
1.1.1. Les benzodiazépines.....	7
1.1.1.1. Utilité clinique.....	7
1.1.1.2. Structures	7
1.1.1.3. Mode d'action	8
1.1.1.4. toxicologie médico-légale.....	8
1.1.2. Les antidépresseurs	9
1.1.2.1. Utilité clinique.....	9
1.1.2.2. Structures	9
1.1.2.3. Mode d'action	9
1.1.2.4. toxicologie médico-légale.....	10
1.1.3. Les neuroléptiques	11
1.1.3.1. Utilité clinique.....	11
1.1.3.2. Structure	11
1.1.3.3. Mode d'action	11
1.1.3.4. toxicologie médico-légale.....	12
1.1.4. Les antiepileptiques.....	12
1.1.4.1. Utilité clinique.....	12
1.1.4.2. Structure	12
1.1.4.3. Mode d'action	12
1.1.4.4. en toxicologie médico-légale	13
1.2. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	13
1.2.1. Intérêt de la GC-MS _n	13
1.2.2. Chromatographie en phase gazeuse	13
1.2.2.1. Facteurs influençant la séparation chromatographique	14
1.2.3. Le spectromètre de masse	14
1.2.3.1. La source d'ions.....	15
1.2.4. Impact vs CI	16
1.2.5. La trappe d'ion.....	16
1.3. OBJECTIFS	18
2. PARTIE EXPERIMENTALE	18
2.1. PRODUITS CHIMIQUES, ECHANTILLONS ET APPAREILLAGE	18
2.2. METHODE GC-MS	18
2.2.1. méthode de séparation par GC.....	18
2.2.2. Comparaison entre ionisation chimique et ionisation par impact électronique	19

2.2.3.	<i>Optimisation de la méthode MS</i>	19
2.2.4.	<i>Fast-GC</i>	19
2.2.5.	<i>Méthode d'extraction</i>	19
2.2.6.	<i>analyse de cas réels</i>	20
2.2.7.	<i>Répétabilité</i>	20
2.2.8.	<i>Droite de calibration</i>	20
3.	RESULTATS	20
3.1.	METHODE DE SEPARATION GC-MS	20
3.1.1.	<i>Développement de la méthode de séparation par GC</i>	20
3.2.	COMPARAISON ENTRE IONISATION CHIMIQUE ET IONISATION PAR IMPACT ELECTRONIQUE	23
3.3.	DEVELOPPEMENT DE LA METHODE MS	26
3.3.1.	<i>Paramètres de fragmentation et de stockage MS/MS</i>	26
3.3.2.	<i>Paramètres de fragmentation MS³</i>	28
3.4.	FAST-GC.....	31
3.5.	METHODE D'EXTRACTION	31
3.6.	ANALYSE DE CAS REELS	32
3.7.	REPETABILITE DE LA METHODE.....	33
3.8.	DROITES DE CALIBRATION.....	34
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	36
5.	BIBLIOGRAPHIE	37
6.	ANNEXES	39

Liste des abréviations

AD	Antidépresseur
AE	Antiépileptique
BZD	Benzodiazépine
CI	Ionisation chimique
CV	Coefficient de variation
EI	Ionisation par impact électronique
ECD	Détecteur à capture d'électrons
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse
IMAO	Inhibiteur de la monoamine oxydase
ISRS	Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine ou de la noradrénaline
NPD	Détecteur azote-phosphore
LC-MS	Chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse
NL	Neuroleptique
NT	Neurotransmetteur
R²	Coefficient de corrélation
RIC	Nombre d'ions total pendant un scan
SI	Standard interne

1. INTRODUCTION

L'institut de toxicologie et de chimie forensique en médecine légale a pour rôle de détecter, identifier et quantifier la présence de drogues, de médicaments, de poisons, d'alcool et d'autres substances solubles dans le sang ou d'autres matrices biologiques. Les analyses se font dans le cas d'agression sexuelle, de mort suspecte, d'intoxication non-létale et lors de conduite de véhicule en présence de substances pouvant modifier le comportement de l'individu.

La démarche méthodologique pour une analyse comprend trois étapes successives :

Le dépistage, la confirmation de l'identité de la substance trouvée et la quantification du composé [1].

Pour le dépistage, la méthode d'analyse préliminaire la plus courante consiste à effectuer des tests immunologiques (ELISA, EMIT). Ce sont des techniques rapides et simples. Cependant les immunoessais ne sont pas assez sélectifs, donc si les tests se révèlent être positifs, ils doivent, dans un deuxième temps, être confirmés par une autre méthode (non-immunologique) [2][3].

Pour confirmer ou de quantifier des produits il y a la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) qui est une méthode sensible et spécifique permettant de détecter des composés polaires, thermolabiles et non volatils [4]. Cependant la LC-MS ne permet pas d'établir de bibliothèques spectrales universelles ; elle ne permet d'identifier que les composés dont un standard de référence est à disposition et pouvant être analysé individuellement par ce procédé [1].

Il y a également la chromatographie gazeuse couplée au spectromètre de masse (GC-MS) qui est le plus utilisé en toxicologie médico-légale. Cette technique réunit deux avantages : sensibilité et spécificité [5]. En effet, l'analyse d'une substance repose sur deux critères différents : le temps de rétention de la substance et son spectre de masse qui peuvent être comparé à une banque de données comme la célèbre bibliothèque Pfleger-Maurer-Weber qui contient plus de 6000 spectres de masse pour les drogues, poisons, médicaments et pesticides [1][6]. L'inconvénient étant qu'il y a, pour l'instant, soit des méthodes d'analyse passant par une étape de dérivation afin de rendre la molécule thermiquement stable, volatil ou pour obtenir en MS des fragments ioniques de plus forte masse pour être injecté par GC-MS, soit des méthodes pas assez spécifiques pour pouvoir identifier tous les psychotropes.

1.1. LES MEDICAMENTS PSYCHOTROPES

Les médicaments psychotropes comme les benzodiazépines (BZD), les antidépresseurs (AD), les neuroleptiques (NL) et les antiépileptiques (AE) sont des substances chimiques qui agissent principalement sur le système nerveux central en y modifiant les fonctions psychologiques et comportementales. Ils occupent une place importante en toxicologie clinique et médicolégale [5]. Un cas sur quatre, voire un cas sur trois en réanimation médicale concerne une intoxication aiguë. La mort toxique, quant à elle, représente 7 à 10% de l'ensemble des autopsies en milieu médicolégal, dont 90% d'entre elles sont dues aux médicaments psychotropes [5].

1.1.1. LES BENZODIAZEPINES

1.1.1.1. UTILITE CLINIQUE

Les BZD sont surtout utilisés dans les états anxieux et les troubles émotionnelles apparentées (nervosité, tension psychique, états d'excitation et d'agitation exagérés), ainsi que dans les troubles du sommeil [7]. C'est une classe de médicaments aux propriétés hypnotiques, anxiolytiques, antiépileptiques, amnésiantes et myorelaxantes. L'usage à long terme cause l'apparition d'une tolérance et d'une addiction (dépendance).

1.1.1.2. STRUCTURES

Les BZD sont des bases faibles (non-dissociées au pH physiologique) qui en général se dissolvent mal dans l'eau. Le Midazolam, par contre, est une base un peu plus forte.

La structure de ces substances est souvent définie comme suit : deux atomes d'azotes se positionnent en général en 1,4 mais certains composés plus récents portent d'autres types de structures. Les composés utilisés en thérapeutique sont des BZD dont le cycle aromatique est sur le côté f (Figure 1) [8].

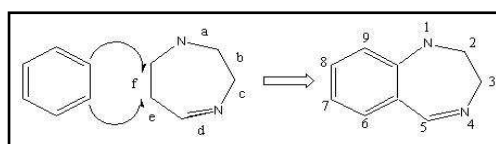


Figure 1: Système de nomenclature

La Figure 2 illustre la structure générale des BZD. Voici les noms des 1,4-BZD utilisées pour de travail (Tableau 1).

Tableau 1 : Structure des 1,4-BZD [9]

BZD	R1	R2	R3	R5	R7
Bromazepam (Lexotanil®)	H	=O	H	2'-pyridyl	Br
Diazepam (Valium®)	CH ₃	=O	H	Phenyl	Cl
Flunitrazepam (Rohypnol®)	CH ₃	=O	H	2-F-phenyl	NO ₂
Flurazepam (Dalmador®)		=O	H	2-F-phenyl	Cl
Prazepam (Demetrin®)		=O	H	Phenyl	Cl

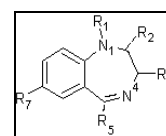


Figure 2 :
Structure générale

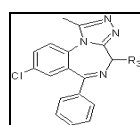


Figure 3: Alprazolam

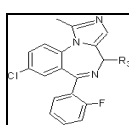


Figure 4 : Midazolam

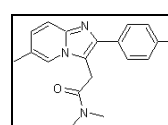


Figure 5 : Zolpidem

(Xanax®)

(Dormicum®)

(Stilnox®)

1.1.1.3. MODE D'ACTION

Les BZD agissent au niveau des neurones en se liant au récepteur GABA (Figure 6) dont l'activation par des GABA tempère l'activité des neurones. Elles augmentent ainsi la fréquence d'ouverture des canaux au chlore ce qui engendre une diminution de l'activité neuronale. Consécutivement à cette action inhibitrice, la production cérébrale de neurotransmetteurs (NT) comme la noradrénaline, la sérotonine, l'acétylcholine et la dopamine sont réduites : c'est l'effet anxiolytique. Les NT étant nécessaires à la maintenance d'une vigilance normale, de la mémoire, de la tonicité musculaire, de la coordination, des réponses émotionnelles, des sécrétions de glandes endocrines, de la fréquence cardiaque et du contrôle de la pression sanguine entre autres, l'administration des BZD peut sérieusement détériorer ces facultés[4].

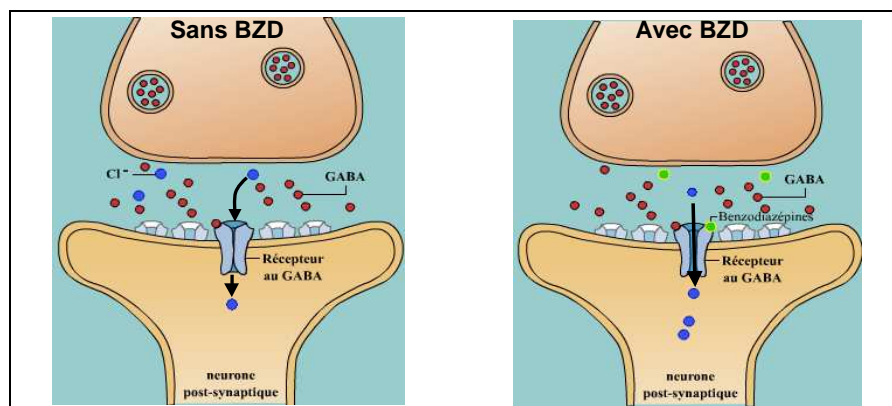


Figure 6: Action des BZD

L'action de plusieurs substances pharmacologiques peut moduler l'action du GABA en se fixant sur son récepteur. Ces substances comme les BZD, les barbituriques, certains stéroïdes ou l'alcool vont se fixer sur le récepteur à des endroits différents [10].

1.1.1.4. TOXICOLOGIE MEDICO-LEGALE

Ces psychotropes sont les plus fréquemment rencontrés dans les situations médico-légales, et ce dans plusieurs cadres : intoxication aiguë, dépendance et toxicomanie, trouble amnésiques et réactions paradoxales [5]. Une d'entre elles, le Flunitrzepam, est détournée de son effet thérapeutique pour être utilisé comme stupéfiant (une drogue « récréative ») [11]. Les effets d'un traitement aux BZD:

- diminue le niveau d'anxiété et d'insomnie et peut induire une baisse de la vigilance, des sensations d'euphorie et de somnolence qui peuvent être préjudiciables au conducteur de véhicule ou à l'utilisateur de machine.
- cause une aggravation des fonctions de la mémoire et le risque d'amnésie aiguë et de trous de mémoire est prédominant avec les produits à courte durée.
- peut accentuer les effets léthargiques lors de l'usage prolongé.

- peut, s'ils ont mélangés à l'alcool ou à d'autres déprimeurs du système nerveux central, provoquer des effets imprévisibles comme la dépression pulmonaire [12].
- C'est pour ces raisons que les BZD sont analysés en médecine-légale lors d'agression sexuelle, de mort suspecte, d'intoxication non-létale et lors de conduite de véhicule.

1.1.2. LES ANTIDEPRESSEURS

1.1.2.1. UTILITE CLINIQUE

Les AD sont utilisés pour traiter les troubles profonds de l'humeur qui provoquent la perturbation de la pensée et du comportement. Les conséquences d'un abaissement persistant de l'humeur sont ; la tristesse, l'anxiété, une perte d'intérêt et de plaisir, l'anorexie, des troubles du sommeil. Cela peut aussi engendrer un syndrome maniaque [13].

1.1.2.2. STRUCTURES

Il s'agit d'un ensemble de composés hétérogènes sur le plan structural.

Il existe la famille des tricycliques dont voici quelques unes d'entre elles (Tableau 2):

Tableau 2: Famille des tricycliques

Noms	R ₁	R ₂
Imipramine (Tofranil®)	H	H
Trimipramine (Surmontil®)	CH ₃	H
Clomipramine (Anafranil®)	H	Cl

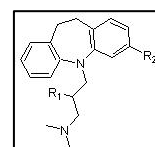


Figure 7: Tricycliques

Il y a également les tetracycliques comme la Miansérine (Figure 8) et la Mirtazapine (Figure 9), les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine comme le Citalopram (Figure 10), la Sertraline (Figure 11), la Fluoxetine (Figure 12) et la Fluvoxamine (Figure 13).

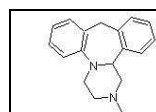


Figure 8:
Miansérine
(Tolvon®)

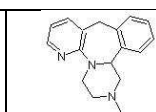


Figure 9:
Mirtazapine
(Remeron®)

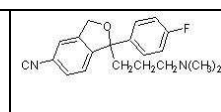


Figure 10 :
Citalopram
(Seropram®)

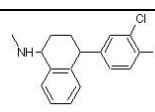


Figure 11 :
Sertraline
(Gladem®)

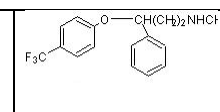


Figure 12 :
Fluoxetine
(Fluctine®)

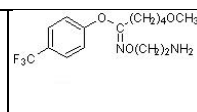


Figure 13 :
Fluvoxamine
(Floxyfral®)

1.1.2.3. MODE D'ACTION

Les tricycliques : agissent principalement en bloquant les pompes à recapture des synapses sérotoninergiques et noradrénergiques (Figure 14). Ce qui implique davantage de sérotonine ou de noradrénaline de disponible dans la fente synaptique [13].

Les tetracycliques : agissent de façon similaire aux tricycliques mais le blocage de la sérotonine et de la noradrénaline se fait en amont du récepteur. Cela implique également une augmentation des NT dans la fente synaptique.

Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine ou de la noradrénaline (ISRS) : les ISRS diminuent la recapture de la sérotonine dans le neurone pré-synaptique. Davantage de NT restent donc dans la fente synaptique plus longtemps, ce qui permet de compenser pour le taux de sérotonine plus bas chez certaines personnes déprimées. Les ISRS diffèrent des tricycliques car ils ne bloquent que les pompes à recapture de la sérotonine ou de la noradrénaline. Ils occasionnent moins d'effets secondaires que les tricycliques ou les IMAO.

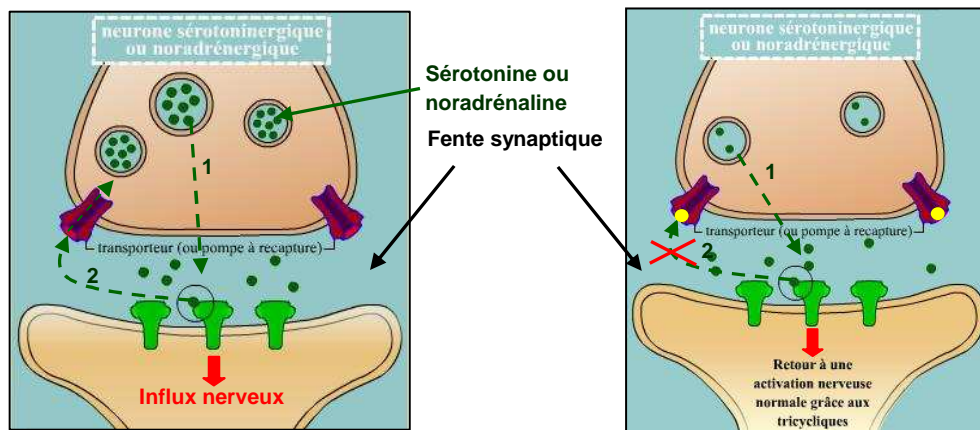


Figure 14: Mécanismes des AD tricycliques. 1) Passage des NT (sérotonine et noradrénaline) d'un neurone à l'autre. 2) « recyclage » ou pas des NT par les pompes à recapture
A : Activité d'une personne normale
B : Activité d'une personne souffrant de dépression

Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) : pour comprendre comment agissent ces molécules, il faut d'abord savoir que les monoamines sont des NT comme la sérotonine et la noradrénaline impliqués entre autre dans le contrôle de l'humeur. Or ceux-ci sont métabolisés par une enzyme que l'on appelle monoamine oxydase. Les IMAO, comme leur nom l'implique, vont bloquer cette enzyme, permettant ainsi à une plus grande quantité de sérotonine et de noradrénaline de demeurer disponible.

Les IMAO sont moins utilisés de nos jours comme antidépresseurs de première ligne à cause de leurs effets secondaires et les dangers associés à leur combinaison avec d'autres médicaments.

1.1.2.4. TOXICOLOGIE MEDICO-LEGALE

Les problèmes de détournements et de conduites toxicomaniaques sont négligeables avec ce type de psychotrope mis à part avec la Fluoxétine [5].

La plupart des effets indésirables observés lors de prise d'AD se présentent pendant le traitement par des AD tricycliques. Les réactions sont notamment des vertiges, un état confusionnel et de la somnolence. Les autres AD présentent moins d'effets secondaires que ceux-ci. Ils ont tous des interactions en cas de consommation avec d'autres médicaments,

de l'alcool (potentialisation de son effet) ou d'autres psychotropes [14]. Autant d'effets qui peuvent altérer la conduite de véhicules par exemple.

La toxicologie des AD reste dominée par des intoxications aiguës, lors de surdosage ou de tentative de suicide, qui est fréquente et grave. Elle représente environ la moitié des admissions en réanimation pour intoxication médicamenteuse [5].

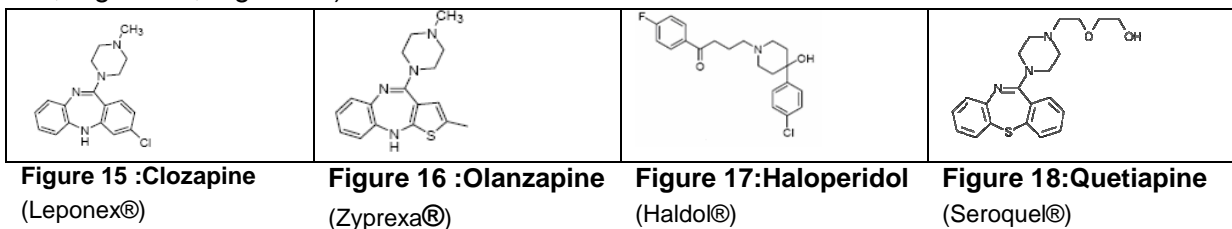
1.1.3. LES NEUROLEPTIQUES

1.1.3.1. UTILITE CLINIQUE

Les NL sont des psychotropes ayant la propriété de réduire certains troubles psychotiques comme la schizophrénie [15]. Ils permettent de contrôler les hallucinations et le délire. Ils sont aussi de très puissants tranquillisants agissant sur l'état maniaque, l'agitation anxieuse, l'agressivité et les troubles du caractère et du comportement mal contrôlables.

1.1.3.2. STRUCTURE

Voici la structure des neuroleptiques utilisés lors de ce travail de diplôme (Figure 15, Figure 16, Figure 17, Figure 18) :



1.1.3.3. MODE D'ACTION

Ils existent deux types de NL :

- Les NL classiques agissent principalement par antagonisme aux récepteurs à la dopamine. (Figure 19)
- Les NL atypiques agissent principalement par antagonisme des récepteurs à la dopamine et la sérotonine [16].

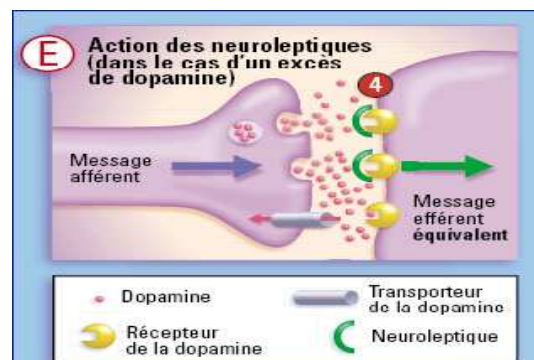


Figure 19: Action des neuroleptiques classiques

L'équilibre sérotonine/dopamine n'étant pas le même dans les différentes voies cérébrales, la double action des neuroleptiques atypiques permet d'obtenir des résultats différents. Ainsi, par exemple, un neuroleptique atypique va augmenter l'activité dopaminergique dans une zone du cerveau alors qu'il la réduira ailleurs (contrairement aux neuroleptiques classiques qui réduisent cette activité dans toutes les voies). Ceci induit moins d'effets secondaires pour les atypiques [15].

1.1.3.4. TOXICOLOGIE MEDICO-LEGALE

Bien que les NL aient de nombreux effets physiologiques, les problèmes d'addiction et de sevrage sont très peu importants et les observations d'intoxications mortelles sont exceptionnelles. Il existe encore une sous-estimation très vraisemblable de la prévalence de ces intoxications, liées à leur dépistage pour la toxicologie d'urgence en milieu hospitalier [5]. Les NL peuvent avoir des effets sur la réactivité ce qui peut entraver la capacité à conduire un véhicule ou à manipuler une machine ou des outils.

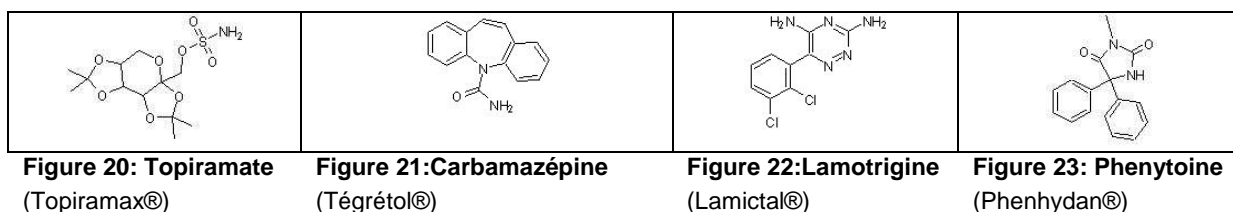
1.1.4. LES ANTIEPILEPTIQUES

1.1.4.1. UTILITE CLINIQUE

Les AE ou anticonvulsivants sont des médicaments qui suppriment voire réduisent la fréquence des crises d'épilepsie, ainsi que leur gravité. L'épilepsie se définit comme un trouble de la fonction cérébrale, caractérisée par des crises brutales et brèves d'altération de la conscience, d'activité motrice, de phénomènes sensoriels ou de comportement inadaptés, symptômes isolés ou associés, selon les différents types d'épilepsie [17][18].

1.1.4.2. STRUCTURE

La structure des antiépileptiques divergent beaucoup voici ceux utilisés lors du travail (Figure 20, Figure 21, Figure 22 et Figure 23) :



1.1.4.3. MODE D'ACTION

La membrane des neurones est polarisée lorsqu'elle est au repos. Quand elle est soumise à une stimulation électrique ou à l'action d'un NT chimique, elle se dépolarise en laissant une certaine quantité de Na^+ pénétrer dans la cellule avant qu'une égale quantité d'ions K^+ n'en sorte. L'équilibre est temporairement rompu jusqu'à l'apparition d'un potentiel d'actions permettant à la membrane d'inverser le processus et de retrouver son niveau de repos. C'est un moyen de « communication » avec les autres cellules. [18]

L'épilepsie, quant à elle, provoque une dépolarisation excessive au niveau des neurones qui peut ensuite se propager ou non à l'ensemble du cerveau. Pour éviter cette tendance à la dépolarisation, on renforce la polarisation cellulaire, soit en inhibant l'entrée de sodium, soit en favorisant l'entrée de chlorure grâce aux AE [19].

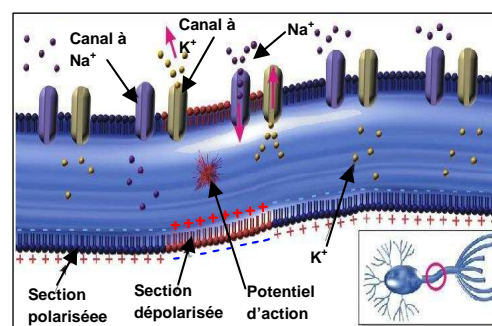


Figure 24: Activité du neurone

Les inhibiteurs des canaux sodiques : Ces AE inhibent les canaux sodium. Ils diminuent l'excitabilité cellulaire en réduisant la pénétration du sodium.

Les GABA modulateurs, par canal chlorure : Les barbituriques, les BZD diminuent l'excitabilité en favorisant l'entrée de chlorure dans la cellule (c.f. 1.1.2.3).

L'acide valproïque est un AE à double mécanisme d'action : il diminue l'entrée du sodium et augmente celle du chlorure [20].

1.1.4.4. EN TOXICOLOGIE MEDICO-LEGALE

Les personnes souffrant d'épilepsie ne sont pas autorisées à conduire des véhicules sauf dans certains cas où le médecin l'autorise.

1.2. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

En toxicologie médico-légale, plusieurs types de détecteurs sont couplés avec la GC dont notamment le détecteur à ionisation de flamme (FID) qui est considéré comme universelle pour l'analyse de composés organiques. Il y a également le détecteur à capture d'électrons (ECD) surtout utilisé pour les molécules électrophiles (ex. les BZD), puis le détecteur utilisé pour la majorité des drogues et des médicaments qui est le détecteur azote-phosphore (NPD) [1]. Cependant, la décennie écoulée a vu la mise sur le marché de systèmes analytiques de plus en plus performants tant sur le plan de la sensibilité que sur celui de la spécificité. La spectrométrie de masse est désormais devenue importante en matière d'expertise toxicologique.

1.2.1. INTERET DE LA GC-MS_n

La fiabilité des résultats en toxicologie médico-légale dépend de la possibilité d'identifier sans ambiguïté la présence d'un composé, spécialement dans des matrices biologiques. Seul, le temps de rétention d'une molécule en GC ou LC n'est pas suffisant pour être incontestable. L'intérêt de la GC-MS_n est donc éminent. Elle permet d'identifier une substance grâce au temps de rétention mais aussi à l'aide des fragments très spécifiques de chaque molécule obtenus par spectrométrie de masse en tandem. En effet, chaque molécule a une « empreinte » spectrale qui lui est propre.

1.2.2. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La GC est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Elle est constituée de trois modules: un injecteur, une colonne dans un four et un détecteur.

L'injecteur : c'est la partie de l'appareil où l'échantillon en solution est introduit dans le chromatographe. Il vaporise et entraîne les analytes, mélangés au gaz vecteur, en tête de colonne. L'injection se fait à haute température.

Il existe plusieurs types d'injecteurs : les injecteurs « split/splitless », les injecteurs à température programmable (PTV) et les injecteurs à froid dans la colonne [21].

Le four et la colonne : le four permet une programmation de température ajustable de 20°C (-100°C pour certains systèmes) à 400°C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide. La colonne (capillaire ou remplie), placée dans le four, est l'élément sur lequel les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire [22]. Les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont fonctions de la température. Elle permet, en l'augmentant, de favoriser l'élution des composés et ainsi de diminuer les temps d'analyse [23].

Le détecteur : Certains sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d'autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules. Il y existe plusieurs types de détecteur dont ceux cités précédemment (c.f.1.2 page 13).

1.2.2.1. FACTEURS INFLUENÇANT LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Pour exprimer la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, le facteur de résolution R_s (Eq. **Erreur ! Signet non défini.**) est calculé à partir d'un chromatogramme.

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4}}_1 \underbrace{\sqrt{N}}_2 \underbrace{\left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{1+k}{k} \right)}_3 = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{l_2 + l_1} \right)$$

Eq.

Cette équation contient trois termes :

1. Efficacité N
2. Sélectivité α
3. Facteur de capacité k

Température : La température (T), en modifiant la tension de vapeur des composés, donc leur volatilité, intervient sur le partage des molécules entre les deux phases.

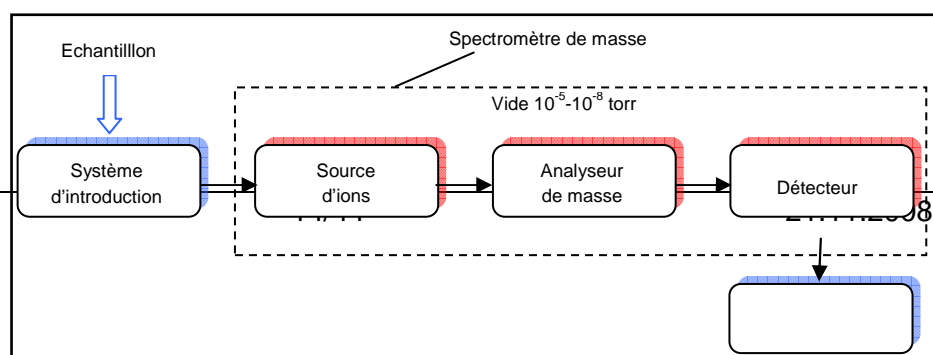
$\Rightarrow T \uparrow, k \downarrow, t_R \downarrow$ (Eq. 2). (Eq. 3) (Eq. 4) (Eq. 5) [24].

$K = \frac{[A]_S}{[A]_M}$	$[A]$: concentration de l'analyte	Eq. 2
$\ln K = \frac{\Delta G^\circ}{RT}$	V_M : Volume de la phase mobile	
$t_R = t_M \left(1 + \frac{K}{V_M/V_S} \right)$	V_S : Volume de la phase stationnaire	Eq. 3
$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	t_R : Temps de rétention du soluté	
	t_M : Temps mort	
	ΔG° : Différence d'énergie libre de dissolution du soluté entre les deux phases	Eq. 4
	K : coefficient de partage	
	k : facteur de rétention	Eq. 5
	l : largeur du pic à la base	

1.2.3. LE SPECTROMÈTRE DE MASSE

Le spectromètre de masse fournit des informations sur les masses des molécules séparées par chromatographie. Il permet la quantification et

Sabine Mamone



l'identification des analytes [23]. En effet, une petite partie des molécules est transformées en espèces porteuses de charges par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons, etc). Les ions sont alors soumis, sous un vide, à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport masse/charge [25].

Il existe de nombreux types de spectromètres de masse; tous ont en commun trois éléments illustrés sur la une source, un analyseur et un détecteur.

Figure 25: Les différentes parties du spectromètre de masse

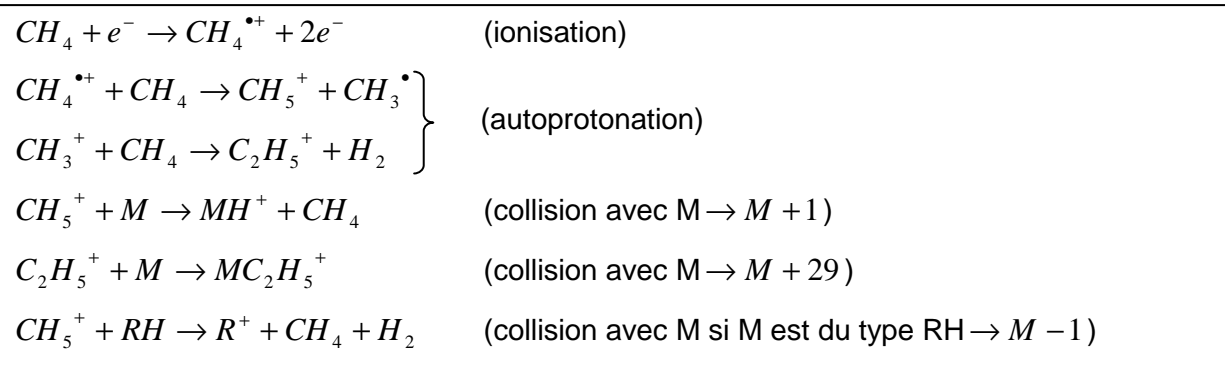
1.2.3.1. LA SOURCE D'IONS

La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. Il existe plusieurs types de source à pression atmosphérique pour la LC ou sous vide pour la GC comme :

Ionisation par impact électronique (EI) : la source à impacte électronique est constituée d'un filament chauffé qui émet des électrons. Ceux-ci sont accélérés vers une anode et entrent en interaction avec les molécules gazeuses de l'échantillon. A chaque électron est associé une longueur d'onde qui vaut 1.4\AA pour une énergie cinétique de 70 eV. Quand cette longueur d'onde est de l'ordre de grandeur des longueurs de liaisons, l'onde est perturbée et devient une onde composée. Si l'une des fréquences a une énergie correspondant à une transition dans la molécule, il peut se produire un transfert d'énergie qui conduit à divers états d'excitations électroniques. Si l'énergie est suffisante, un électron peut être expulsé. La quantité d'énergie interne stockée est supérieure à l'énergie d'ionisation ce qui peut causer la fragmentation [26][27][28].

Ionisation chimique (CI) : la CI est plus sélective que la EI et toutes les molécules éluées ne sont pas ionisées. L'analyte n'est pas directement ionisé par les électrons. Il est ionisé par collision avec des ions produits par bombardement d'électrons d'un gaz réactif introduit en excès dans la source. En général, des ions positifs sont utilisés; cependant lorsque l'analyte contient des atomes très électronégatifs, l'ionisation chimique négative est utilisée [23].

Le méthane comme gaz ionisant : Si du méthane est introduit dans la boîte d'ionisation chimique, la réaction primaire avec les électrons sera celle, classique, de l'impact électronique, puis le gaz ionisé entre en collision avec les analytes :



1.2.4. IMPACT VS CI

La raison pour laquelle ces deux types d'ionisation sont comparés est que d'une part la CI offre à priori une fragmentation plus douce du composé par rapport à l'EI, le fragment $M+1$ (MH^+) est obtenu, ce qui est avantageux. D'autre part, le nombre élevé de pics obtenus par EI permet une identification sans ambiguïté.

1.2.5. LA TRAPPE D'ION

Cette partie consiste à apporter des précisions sur le principe de fonctionnement de la trappe ionique « à ionisation externe » puisque c'est ce type de spectromètre de masse qui a été utilisé pour l'ensemble du travail de diplôme.

Avant d'entrer dans la trappe, les analytes sont ionisés « en mode externe ». Cette étape a lieu dans un volume d'ions situé en dehors de la trappe ionique, ils sont ensuite transférés et injectés à l'intérieur de celle-ci à l'aide de trois lentilles. La première d'entre elle permet d'extraire les ions positifs, la deuxième contrôle leur entrée dans la trappe et la troisième les accélère afin d'obtenir une bonne pénétration dans la trappe.

La trappe ionique (IT), quant à elle, est constituée de trois électrodes métalliques : une électrode dite « annulaire » et deux électrodes dites « chapeaux » situées aux deux extrémités, une étant l'entrée et l'autre la sortie. Des « spacers » en quartz formant des anneaux jouent le rôle d'isolants électriques entre ces électrodes (Figure 26 A et B).

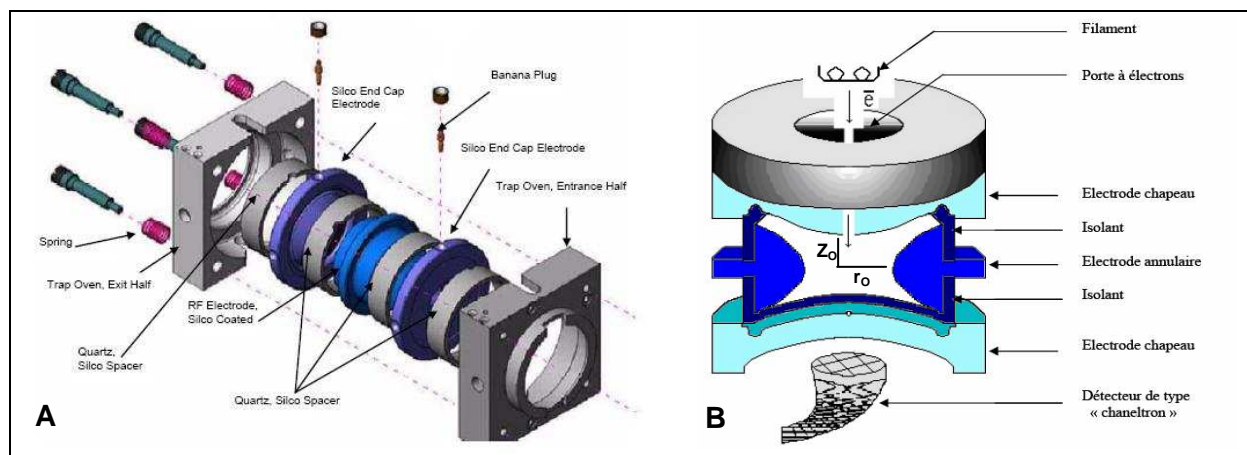


Figure 26: Trappe ionique

Le « trappage » des ions se fait grâce à une radiofréquence (RF) appliquée sur l'électrode annulaire qui produit un champ au sein duquel chaque ion acquiert un mouvement oscillant formant une sorte de huit à trois dimensions (trajectoire de Lissajous) (Figure 27) [29] Ceci permet de garder les ions captifs (« trappés ») à l'intérieur. Le mouvement qu'ils font peut être décrit mathématiquement par l'équation de Matthieu (Eq. 6) [1][29]:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$$

Eq. 6

u : représente les axes de coordonnées x,y et z

ξ : paramètre sans dimension égal à $\Omega t / 2$ où Ω et t sont la fréquence angulaire et le temps. Ω est la fréquence radiale du potentiel RF appliqué sur l'électrode annulaire.
 a_u et q_u : paramètres de Mathieu sans dimension

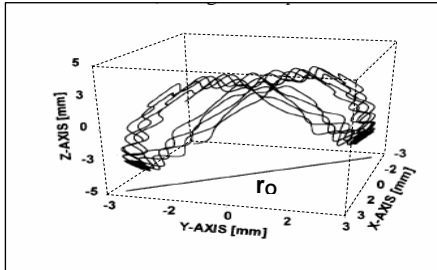


Figure 27: Mouvement des ions faisant une trajectoire de Lissajous

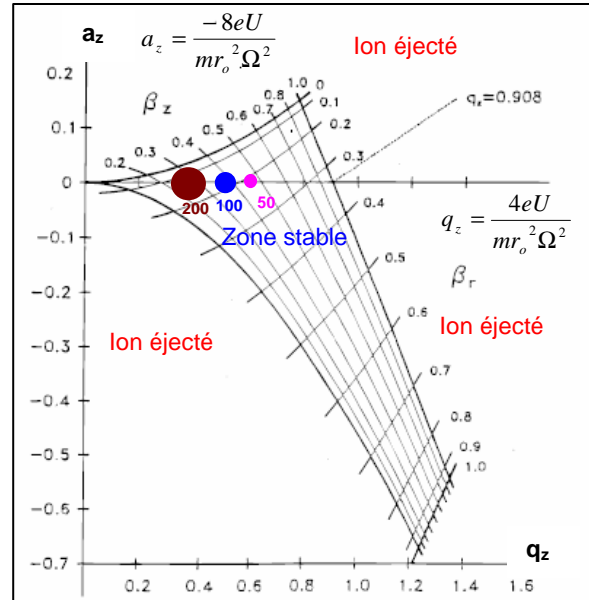


Figure 28: Diagramme de stabilité

Les ions de chaque masse oscillent suivant r et z (Figure 26B) à des fréquences qui leur sont propres. L'axe z correspond à la droite qui passe par les orifices des électrodes d'entrée et sortie. En superposant à la RF une tension alternative (AC) de même fréquence que celle des ions d'une masse donnée, on transfère de l'énergie sélectivement à ces ions. Leur trajectoire suivant z est déstabilisée ce qui provoque leur expulsion de la trappe. D'après l'équation de Mathieu, chaque tension de l'électrode annulaire correspond à l'éjection d'un m/z particulier.

Pour la spectrométrie de masse en tandem ou MS_n l'ion d'intérêt («ion majoritaire») doit être isolé dans la trappe, avant d'être fragmenté (voir diagramme de stabilité de stockage Figure 28) et les autres ions sont éjectés. Les électrodes "endcap" sont donc utilisées pour appliquer la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt (ion isolation RF voltage). L'objectif est de faire résonner l'ion d'intérêt tout en le conservant dans le volume de la trappe. L'ion résonne et percute l'hélium présent dans la trappe avec une énergie suffisante pour induire des fragmentations. Ceux-ci, n'ont pas la même fréquence de résonance que celle de l'ion majoritaire. Ils n'entrent donc pas en résonance et sont immédiatement focalisés au centre de la trappe grâce à la RF. L'hélium qui est introduit en continu dans la trappe permet de freiner les ions et d'augmenter l'efficacité de piégeage de la trappe. Les trappes permettent de reproduire plusieurs fois l'étape d'isolation et d'excitation (Figure 29). Cette propriété permet de réaliser des MS_n [30].

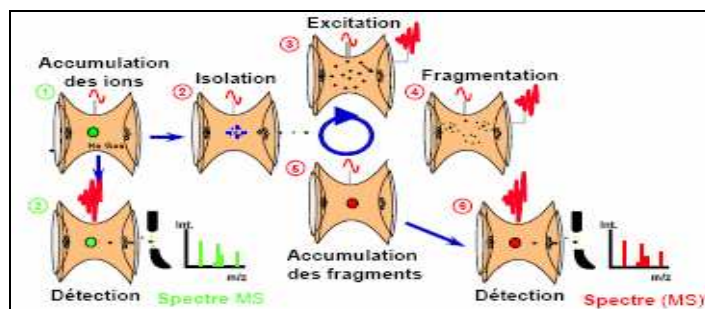


Figure 29: Fragmentation MSn

1.3. OBJECTIFS

L'objectif de ce travail de diplôme a pour but d'identifier et quantifier des psychotropes dans des matrices de sang en toxicologie médico-légale.

Pour ce faire, il faut comparer deux types d'ionisations (impact électronique et ionisation chimique) afin de déterminer laquelle des deux offre la fragmentation la plus adaptée pour la suite du travail. Puis, il s'agit de développer une méthode qualitative et semi-quantitative par MS_n avec le mode d'ionisation le plus optimal. Puis, créer une bibliothèque de spectres obtenus à partir de fragments issus de la MS_n. Il est également question de développer une méthode de traitement des échantillons pour pouvoir les analyser par GC-MS et finalement appliquer la méthode développée sur des cas réels [31].

2. PARTIE EXPERIMENTALE

2.1. PRODUITS CHIMIQUES, ECHANTILLONS ET APPAREILLAGE

Le méthanol (≥98.5%), le chlorure de butyle (>99.0%), le n-hexane (≥98.5%), et l'ammoniaque (32% puriss) proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

Les principes actifs proviennent de chez Certiliant (Molsheim, France). (Buchs, Suisse)

Des échantillons de sang O ont été utilisés pour toutes les analyses nécessitant une matrice de sang. Les cas réels proviennent de sang venant d'autopsies ou de contrôle de la route.

Les produits sont évaporés par le système Speedvac (Farmingdale, NY, USA) et centrifugé par la centrifugeuse Biofuge 17RS Heraeus AG. Les analyses ont été faites par le 4000 ion trap équipé de l'autosampler CP-4800 et de la partie chromatographique CP-3800 GC (Varian, Walnut Creek, USA).

2.2. METHODE GC-MS

2.2.1. METHODE DE SEPARATION PAR GC

Méthode : Le volume d'injection de l'échantillon est de 2µl. La température d'injection est de 250°C en mode splitless. L'hélium à 99% est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1ml/min avec une colonne capillaire (DB5MS, 15m X 0.25mm X 0.25µm, J&W Scientific (Foldon, USA)). La température initiale est de 90°C maintenu pendant 1min, augmentation de 25°C/min jusqu'à 210°C, maintenu pendant 3min, augmentation de 2°C/min jusqu'à

230°C, maintenu pendant 5.20min, augmentation de 15 °C/min jusqu'à 260°C, augmentation de 25°C/min jusqu'à 280°C maintenu pendant 1.40min. La ionisation externe se fait par impact électronique et l'acquisition est faite en mode fullscan.

Echantillon : Les solutions standards sont préparées à partir de solutions mères à 1mg/ml dans du méthanol. Elles sont prélevées, évaporées par speedvac et reprises dans de l'hexane. La concentration finale est de 10µg/ml.

2.2.2. COMPARAISON ENTRE IONISATION CHIMIQUE ET IONISATION PAR IMPACT ELECTRONIQUE

La méthode est la même que sous le point 2.2.1 pour l'impact électronique. Pour la ionisation chimique en mode externe, le gaz ionisant utilisé est du méthane.

2.2.3. OPTIMISATION DE LA METHODE MS

Le gradient de température utilisé se fait comme suit : température initiale est de 90°C maintenu pendant 1min, augmentation de 40°C/min jusqu'à 280°C, maintenu 4.50min. Chaque composé est injecté individuellement à une concentration de 10µg/ml.

Méthode MS/MS : des amplitudes d'excitation de 0.0 à 3.0volts sont testées graduellement lors d'une analyse.

Méthode MS³ : des amplitudes d'excitation de 1.0 à 3.0volts sont testées individuellement lors d'une analyse.

2.2.4. FAST-GC

La méthode ainsi que la préparation des échantillons sont les mêmes que sous le point 2.2.1 pour l'impact électronique. Des débits d'hélium entre 1.0 et 1.5ml/min ont été testés avec une colonne capillaire (VF-5ms, 10m X 0.15mm X 0.15µm, Varian (Middelburg, Hollande)). Différents gradients de températures ont également été testés.

2.2.5. METHODE D'EXTRACTION

Méthode : La température initiale est de 90°C maintenu pendant 1min, augmentation de 15°C/min jusqu'à 210°C, maintenu pendant 3min, augmentation de 4°C/min jusqu'à 220°C, maintenu pendant 3.0min, augmentation de 25°C/min jusqu'à 240°C, maintenu 1min, augmentation de 40°C/min jusqu'à 290°C maintenu pendant 4.45min.

Echantillon :

1. 10µl, d'une solution standard contenant les composés à analyser, sont prélevés dans un eppendorf de 1.5ml. La solution est évaporée à sec par speedvac
2. 1ml de sang O est ajouté, la solution est agitée au vortex et 200 µl sont prélevé dans un deuxième eppendorf.*
3. 10µl de standard interne (Prazepam) à 10µg/ml sont ajoutés et la solution est agitée au vortex
4. Pour la solution basique : 10µl d'NH₃ 32% sont ajoutés et la solution est agitée au vortex

Pour la solution neutre : pas d'ajout de NH₃

5. 1ml de chlorure de butyle est ajouté et la solution est agitée pendant 5min
6. La solution est centrifugée à 5000tours/min pendant 10min
7. La phase supérieure est prélevée et évaporée à sec au speedvac
8. 50µl d'hexane sont ajoutés

*Les concentrations sont de 0.5µg/ml et elles sont préparées à double

2.2.6. ANALYSE DE CAS REELS

La méthode GC-MS utilisée ainsi que la préparation des échantillons de sang sont les mêmes que sous le point 2.2.5. Sauf qu'il n'y a pas d'ajout d'ammoniaque afin de basifier le sang.

Dans ce chapitre, un composé non sélectionné jusqu'ici a été ajouté, l'Oxazepam, pour les besoins du laboratoire. Une méthode MS² a été ajoutée pour ce composés. Les paramètres MS/MS ont été ajoutés dans le Tableau 4 chapitre 3.3.2 page 28.

Le gradient de température utilisé pour l'Oxazepam se fait comme suit : température initiale est de 90°C maintenu pendant 1min, augmentation de 30°C/min jusqu'à 290°C, maintenu 2.33min. Chaque composé est injecté individuellement à une concentration de 10µg/ml.

2.2.7. REPETABILITE

La méthode utilisée ainsi que la préparation des échantillons de sang sont les mêmes que sous le point 2.2.5. Sauf qu'il n'y a pas d'ajout d'ammoniaque afin de basifier le sang.

La concentration à 0.5µg/ml a été préparée trois fois pour le test de répétabilité.

2.2.8. DROITE DE CALIBRATION

La méthode utilisée ainsi que la préparation des échantillons de sang sont les mêmes que sous le point 2.2.5. Sauf qu'il n'y a pas d'ajout d'ammoniaque afin de basifier le sang.

Des concentrations de 5, 1, 0.5, 0.2, 0.05 et 0.01µg/ml ont été préparées trois fois pour chaque concentration.

3. RESULTATS

3.1. METHODE DE SEPARATION GC-MS

Les résultats montrent l'optimisation de la séparation des composés en appliquant différents gradients de température pour la partie GC et la comparaison de deux modes d'ionisation pour la partie MS.

3.1.1. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE DE SEPARATION PAR GC

La Figure 30 est un chromatogramme représentant la séparation optimum des composés choisis. Les classes de médicaments ont été injectées les une après les autres. Leurs temps de rétention ont été superposés afin de visualiser une seule injection avec tous les analytes.

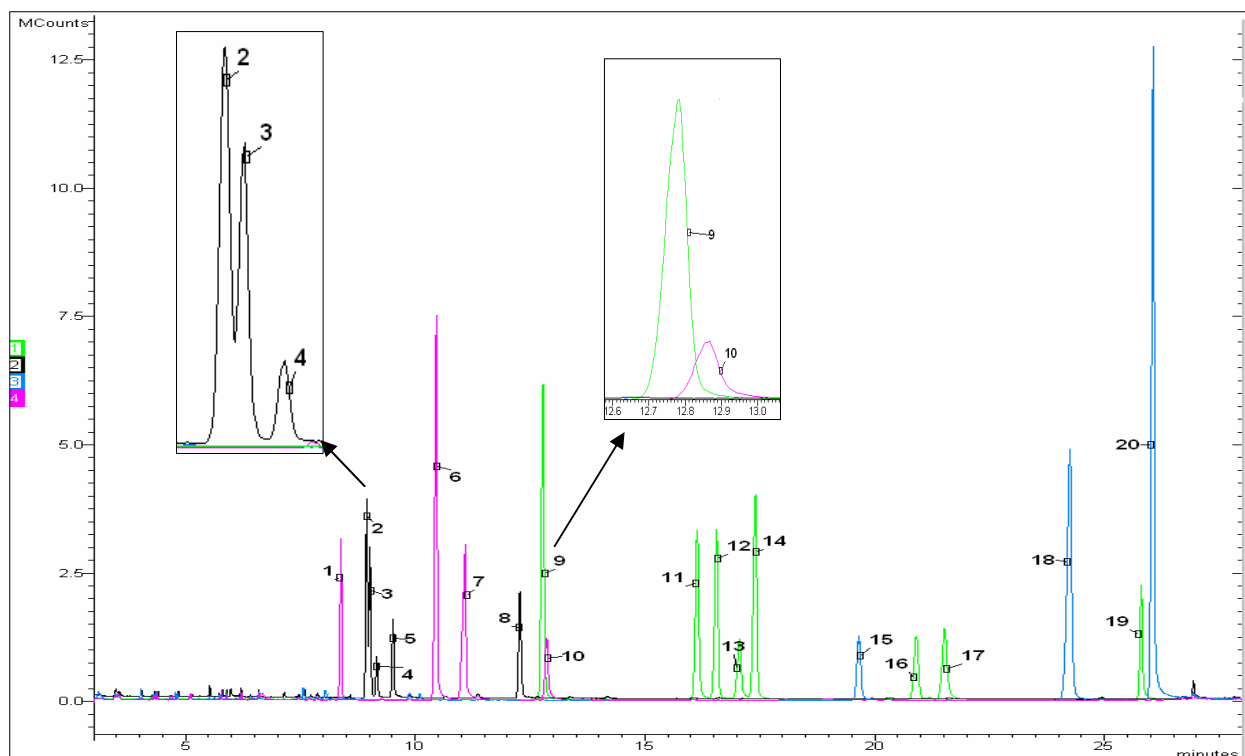


Figure 30: Chromatogrammes des quatre classes de composés à 10 µg/ml. (1) Topiramate, (2) Mianserine, (3) Trimipramine, (4) Imipramine, (5) Mirtazapine, (6) Carbamazépine, (7) Phénytoïne, (8) Sertraline, (9) Diazepam, (10) Lamotrigine, (11) Midazolam, (12) Flunitrazepam, (13) Bromazepam, (14) Prazepam, (15) Olanzapine, (16) Flurazepam, (17) Zolpidem, (18) Clozapine, (19) Alprazolam, (20) Halopéridol

L'analyse montre une bonne séparation générale des composés, à l'exception de la Mianserine et la Trimipramine ($R_s=0.5$ pour la Mianserine et la Trimipramine). C'est également le cas pour le Diazepam et la Lamotrigine, $R_s=0.7$. Un $R_s < 0.8$ indique que la séparation est insuffisante [32]. De plus, une résolution inférieure à 0.8 pour deux composés ne permet pas d'établir des paramètres optimaux pour la MS/MS ou la MS₃. En effet, pour un laps de temps donné la trappe d'ions ne permet de sélectionner qu'un ion précurseur pour ensuite le fragmenter, stocker l'ion produit et le fragmenter à nouveau. C'est une séparation temporelle et non spatiale comme avec des quadripôles successifs. C'est donc dans ces conditions que la Lamotrigine a été supprimée pour le reste des analyses afin de privilégier le Diazepam.

Pour des questions d'intérêt thérapeutique, l'analyte tel que la Trimipramine a également été retiré afin de pouvoir optimiser la détection de la Mianserine et de l'Imipramine. Un des

neuroleptiques, la Quétiapine, n'a pas pu être détecté à chaque analyse. Ce composé est instable avec la programmation de la température utilisée lors de ces analyses.

3.2. COMPARAISON ENTRE IONISATION CHIMIQUE ET IONISATION PAR IMPACT ELECTRONIQUE

Le but, dans ce travail est de déterminer lequel des modes d'ionisation donnent la fragmentation la plus adéquate afin de pouvoir procéder à une analyse MSⁿ, c'est-à-dire, une fragmentation donnant des ions de masse (m/z) assez élevés, soit d'environ 100. Les ions inférieurs à 100 ne sont pas spécifiques à un type de molécule et ne donnent aucunes informations particulières sur l'analyte à identifier. Il s'agit également de trouver le mode d'ionisation donnant une sensibilité suffisamment élevée pour pouvoir ensuite analyser des concentrations allant jusqu'à 10ng/ml.

Le Tableau 3 résume les fragments obtenus par EI et CI. Seuls les quatre premiers fragments les plus intenses ont été reportés dans le tableau lorsqu'ils sont supérieurs à 10%. L'ion majoritaire est souligné.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des fragments obtenus par EI et CI

Analytes	MM [g/mol]	TR [min]	Ions en EI [m/z]	Rapport signal/ bruit [-]	Ions en CI [m/z]	Rapport signal/ bruit [-]
Diazepam	284	12.84	<u>256.6</u> , 283(98%), 257(54%), 221(46%)	10380	<u>285</u> , 287(39%), 313(23%), 286(18%)	387
Midazolam	325	16.26	<u>310</u> , 312(41%), 311(20%), 325(12%)	2650	<u>326</u> , 328(39%), 327(24%), 354(20%)	836
Flunitrazepam	313	16.60	<u>286</u> , 312(91%), 285(54%), 267(41%)	1953	<u>314</u> , 315(15%)	2110
Bromazepam	316	17.05	<u>317</u> , 315(85%), 236(85%), 288(65%)	419	<u>316</u> , 318(70%), 170(43%), 317(22%)	112
Flurazepam	387	20.83	<u>86</u>	3029	<u>388</u> , 390(33%), 387(12%), 315(10%)	1030
Zolpidem	307	21.61	<u>235</u> , 236(27%), 307(20%), 219(12%)	1082	<u>308</u> , 336(26%), 309(23%), 235(20%)	1230
Alprazolam	308	25.85	<u>273</u> , 279(53%), 308(27%), 204(22%)	6320	<u>309</u> , 311(23%), 337(21%), 339(15%)	345
Prazepam^c	324	17.45	<u>270</u> , 295(74%), 296(49%), 241(39%)	1231	<u>325</u> , 327(33%), 326(25%), 353(19%)	709
Topiramate	339	8.37	<u>324</u> , 189(37%), 127(26%), 59(25%)	2163	<u>184</u> , 264(55%), 185(30%), 224(24%)	597

Analytes	MM [g/mol]	TR [min]	Ions en EI [m/z]	Rapport signal/b ruit [-]	Ions en CI [m/z]	Rapport signal/br uit [-]
Carbamazépine	236	10.40	<u>193</u> , 192(31%), 236(30%), 165(18%)	3334	<u>237</u> , 238(23%), 265(16%), 194(14%)	1431
Phenytoin	252	11.05	<u>209</u> , 180(97%), 223(44%), 104(28%)	734	<u>253</u> , 175(20%), 281(16%)	234
Lamotrigine	255	12.83	<u>255</u> , 185(93%), 257(67%), 187(59%)	386	<u>256</u> , 258(57%), 257(22%), 255(17%)	151
Olanzapine	312	19.61	<u>242</u> , 229(83%), 213(38%), 243(45%)	1969	<u>313</u> , 229(32%), 170(22%), 314(18%)	203
Halopéridol	375	26.00	<u>224</u> , 237(79%), 84(53%), 123(39%)	10299	<u>376</u> , 358(38%), 165(26%), 378(21%)	19476
Quetiapine	383	-	Non détecté	-	Non détecté	-
Citalopram	324	-	Non détecté	-	Non détecté	-
Fluoxetine	309	-	Non détecté	-	Non détecté	-
Paroxetine	329	-	Non détecté	-	Non détecté	-
Sertraline	305	11.34	<u>57</u> , 274(60%), 276 (48%), 149(45%)	40	Non détecté	-
Fluvoxamine	318	-	Non détecté	-	Non détecté	-
Miansérine	264	8.92	<u>193</u> , 220(64%), 264(62%), 221(36%)	1535	<u>265</u> , 264(36%), 263(27%), 170(23%)	84
Imipramine	280	9.13	<u>234</u> , 235(82%), 195(47%), 194(40%)	272	Non détecté	-
Mirtazapine	265	9.47	<u>195</u> , 194(19%), 208(19%), 196(13%)	1434	<u>265</u> , 264(36%), 263(27%), 170(23%)	34
Clomipramine	314	12.26	<u>268</u> , 269(92%), 270(48%), 271(31%)	857	<u>170</u> , 169(56%), 210(55%), 315(49%)	16

Comme attendu, la CI permet généralement d'obtenir l'ion pseudo moléculaire (M+1) comme ion majoritaire ce qui n'est pas le cas en mode EI. Cependant, l'impact électronique offre également une fragmentation « douce » des composés permettant de procéder à une analyse MS_n par la suite. Des fragments m/z supérieurs à 100 ont été obtenus pour la plupart des analytes. En effet, les cas du Flurazepam et de la Sertraline n'ont pas été concluants en EI. Les fragments majoritaires respectivement à 86 m/z et 57 m/z, sont très bas et ne représentent donc pas des ions significatifs pour une identification spectrale précise.

En ce qui concerne la sensibilité, l'ensemble des résultats montre que, pour chaque classe de composés, elle est globalement plus élevée par EI que par CI. La Figure 31 illustre bien cette différence pour les antidépresseurs. Ces analytes nécessiteraient de procéder à une étape de dérivation pour être mieux détectés. Seuls les composés tétracycliques comme la Miansérine et la Mirtazapine, ainsi que les composés tricycliques comme l'Imipramine et la Clomipramine ont pu être identifiés par EI-GC-MS. Leur rapport signal sur bruit reste quand même trop faible par CI, surtout si des concentrations 100 fois inférieures sont injectées.

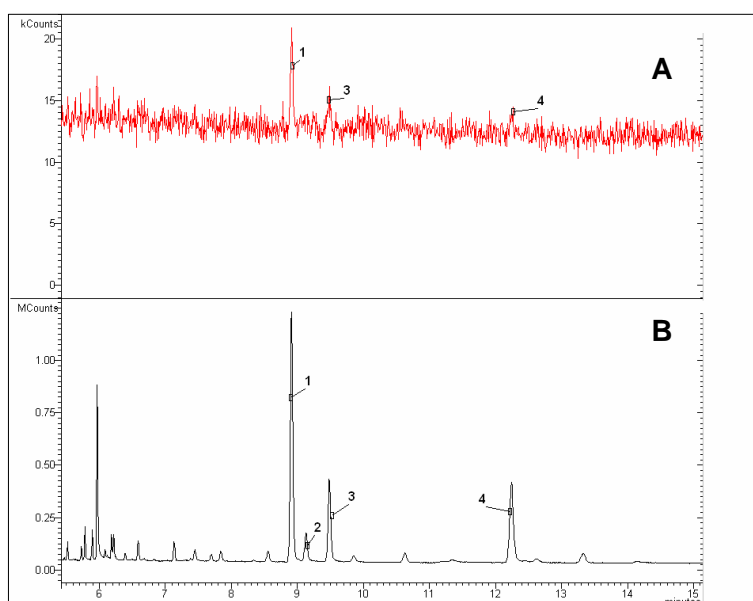


Figure 31: Chromatogrammes des AD 10 µg/ml. (1) Miansérine, (2) Imipramine, (3) Mirtazapine, (4) Clomipramine.

A : spectre produit par CI

B : spectre produit par EI

Le mode d'ionisation par impact électronique s'est révélé être le meilleur pour ces classes de composés. Le développement de la méthode MS_n se fera donc que par EI malgré le fait que quelques composés comme l'Halopéridol, le Flunitrazepam et le Zolpidem ont une sensibilité supérieure par CI. En effet, le 4000 ne permet pas de passer de la ionisation chimique à l'impact électronique au sein d'un même « run » lorsqu'il est configuré en mode d'ionisation externe.

En outre, pour les deux composés ayant leur ion majoritaire en-dessous de 100 par EI, il ne sera pas possible de les analyser avec cette méthode par MS_n. Comme il a été dit précédemment un ion inférieur à 100 ne donnerait que des fragments m/z plus petits. Ils ont donc été écartés pour le reste des opérations. Méthode d'analyse

3.3. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE MS

Les résultats ci-dessous représentent l'optimisation des paramètres de fragmentation MS/MS et MS³.

3.3.1. PARAMETRES DE FRAGMENTATION ET DE STOCKAGE MS/MS

Afin de développer la méthode MS₃ plusieurs paramètres ont été testés pour fragmenter les molécules ; le mode résonnant et non-résonnant, ainsi que différentes amplitudes d'excitation.

La Figure 32 illustre la fragmentation MS/MS de l'ion m/z à 224.1 de l'Halopéridol en mode non-résonnant à 50V et la Figure 33 à 60V.

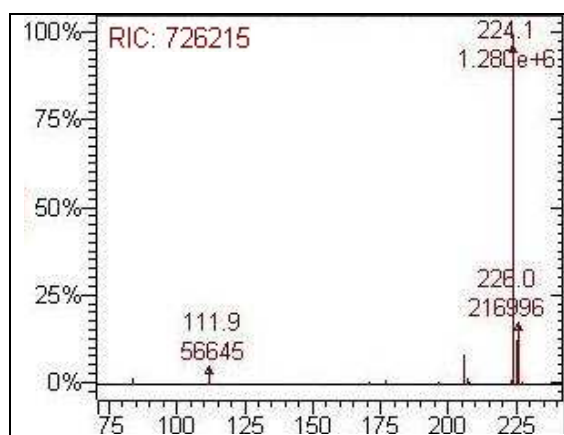


Figure 32: Spectre MS/MS de l'Haloperidol en mode non-résonnant à 50V

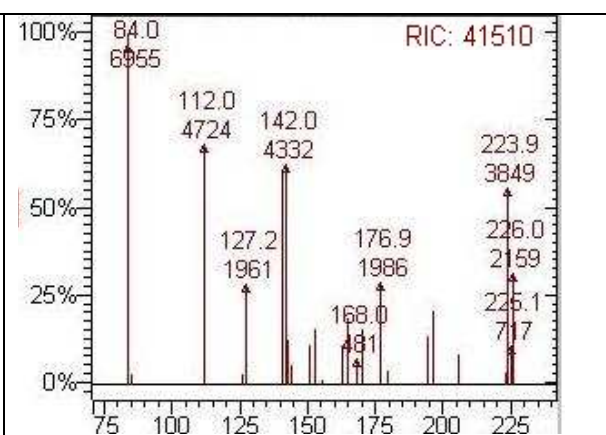


Figure 33 : Spectre MS/MS de l'Haloperidol en mode non-résonnant à 60V

Ce mode d'ionisation ne permet pas d'aboutir à une fragmentation adéquate. A 50V l'ion m/z à 224.1 ne se fragmente pas et à 60V, il y a une multitude de fragments dont le majoritaire qui est 84 m/z . Choisir un ion produit dans ces conditions (à 60V) engendrerait une trop grande perte de sensibilité.

Le mode résonnant a aussi été testé. Les Figure 34, Figure 35 et Figure 36 représentent les spectres obtenus à une amplitude d'excitation respectivement de 0.50, 2.50 et 1.20 volts.

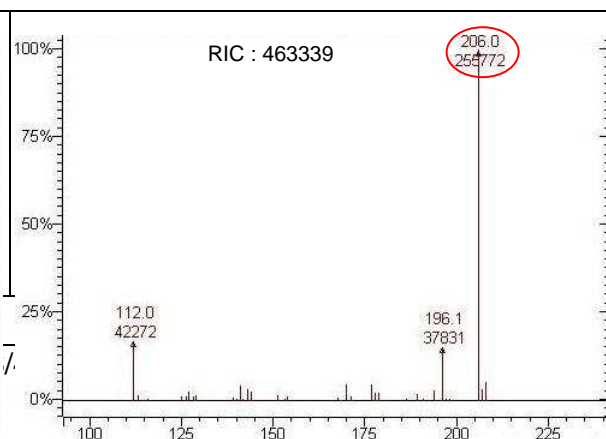
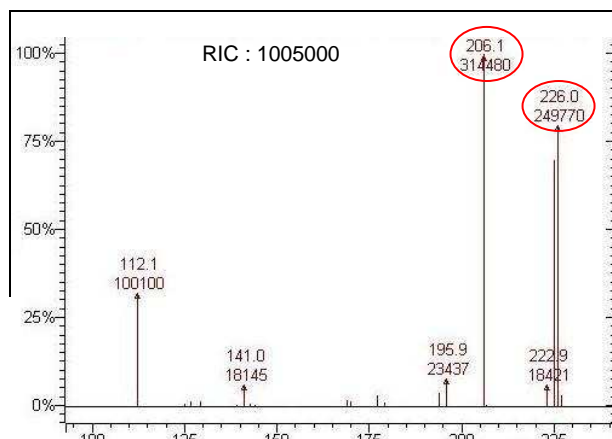


Figure 34 : Spectre MS/MS de l'Haloperidol en mode résonnant à 0.50V	Figure 35 : Spectre MS/MS de l'Haloperidol en mode résonnant à 2.50V

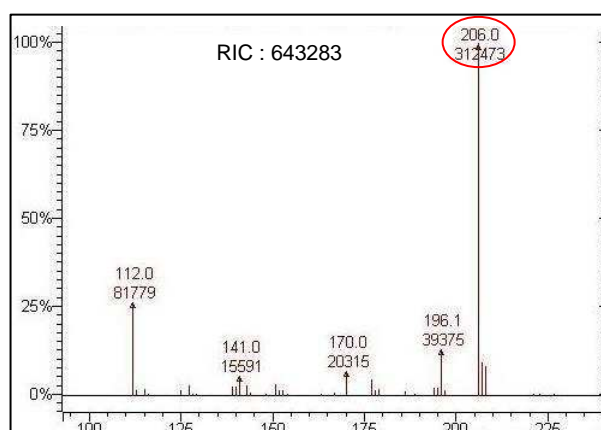


Figure 36 : Spectre MS/MS de l'Haloperidol en mode résonnant à 1.20V

La Figure 34 montre qu'une amplitude d'excitation de 0.50 volts permet d'avoir une bonne sensibilité, soit un nombre d'ions total durant un scan (RIC) élevé puisqu'il est de $1 \cdot 10^6$. Cependant, il y a encore la présence du ion à 226 m/z, le fragment isotopique du 224 m/z, dû à la présence du ^{37}Cl et le fragment à 206 m/z, ils représentent respectivement 25 et 31% du RIC. En sélectionner un des deux pour procéder à une étape de fragmentation supplémentaire engendrerait une énorme perte de sensibilité, dû à la perte de l'autre ion. Cette amplitude d'excitation n'est donc pas optimale.

A 2.50 volts, il n'y a plus qu'un ion majoritaire mais la sensibilité générale, un RIC égale à 463339, est nettement plus basse qu'à 0.50volts.

La Figure 36 semble être un bon compromis entre une fragmentation donnant un seul ion majoritaire, représentant 49% du RIC, et une sensibilité acceptable pour accéder à la MS^3 .

3.3.2. PARAMETRES DE FRAGMENTATION MS^3

La principale différence entre l'optimisation des paramètres MS/MS et MS^3 est qu'en MS/MS, il est possible de tester plusieurs amplitudes d'excitation en une seule analyse ce qui n'est pas le cas en MS^3 .

Les critères de fragmentation testés sont pratiquement les mêmes que pour la MS/MS. C'est-à-dire, différentes amplitudes d'excitation en mode résonnant et le niveau de stockage des ions. Les paramètres optimaux sont reportés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Paramètres GC- MS^3

Analytes	Temps pour l'acquisition [min]	Ions [m/z]	Mode de résonance [-]	Niveau de stockage [m/z]	Amplitude d'excitation [volts]
Alprazolam	24.50-25.79	273.4	Résonnant	170.0	2.0
		245	Résonnant	93.4	2.0
		218			
Bromazepam	16.70-17.04	288.3	Résonnant	109.9	2.5
		207.1	Résonnant	78.9	2.0
		179			

Flunitrazepam	16.20-16.70	286.4	Résonnant	170.0	1.8
		240	Résonnant	91.5	2.0
		183			
Analytes	Temps pour l'acquisition [min]	Ions [m/z]	Mode de résonnance [-]	Niveau de stockage [m/z]	Amplitude d'excitation [volts]
Midazolam	15.80-16.20	310	Résonnant	170.0	2.6
		275.1	Résonnant	90.9	3.0
		247			
Zolpidem	21.00-23.45	235.2	Résonnant	163.9	1.2
		220.1	Résonnant	96.9	1.0
		219			
Prazepam	17.04-19.25	269.6	Résonnant	170.0	2.6
		241.1	Résonnant	91.9	2.0
		213			
Olanzapine	19.25-21.00	229	Résonnant	135.0	1.5
		196	Résonnant	50.0	2.0
		194			
Haloperidol	25.79-26.60	224.2	Résonnant	150.0	1.2
		206	Résonnant	70.0	1.4
		177			
Clozapine	23.45-24.50	243	Résonnant	169.4	1.5
		208	Résonnant	91.6	2.0
		181			
Carbamazépine	10.10-10.75	236	Résonnant	164.5	1.0
		193	Résonnant	85.0	2.0
		191			
Diazepam	12.50-15.80	56.6	Résonnant	120.0	1.5
		221.1	Résonnant	70.0	1.3
Topiramate	8.00-8.70	324	Résonnant	120.0	1.0
		188.9	Résonnant	44.0	1.0
		109			
Phénytoïne	10.75-12.00	209	Résonnant	145.6	1.0
		180	Résonnant	85.2	3.0
		152			
Miansérine	8.70-8.97	193	Résonnant	134.4	2.4
		165	Résonnant	81.8	3.0
		163			
Imipramine	8.97-9.30	234	Résonnant	134.4	1.5
		219	Résonnant	96.5	3.0
		216			
Mirtazapine	9.30-10.10	195	Résonnant	135.8	3.0
		167	Résonnant	82.8	3.0
		139			
Clomipramine	12.00-12.50	268	Résonnant	170.0	3.0
		232	Résonnant	97.1	3.0
		217			
Oxazepam*	6.89-10.00	267.4	Résonnant	73.5	1.5
		239			

*Analysé en MS² avec une autre méthode cf....

Pour pouvoir traiter chaque composé, il est nécessaire de créer des « segments », c'est-à-dire des laps de temps, durant l'analyse, pendant lesquels le spectromètre de masse applique un à un chaque paramètre de stockage de l'ion précurseur, d'amplitude d'excitation, de stockage de l'ion produit d'intérêt, de refragmentation de celui-ci et de stockage de tous les ions produits lors de cette dernière étape. D'où l'utilité des temps d'acquisition notés dans le tableau. Pour les créer, il est nécessaire d'effectuer une analyse en mode fullscan pour obtenir les temps de rétention de chaque composé.

Chaque spectre réalisé en MS³ est enregistré dans une bibliothèque comme spectre de référence pour être identifié par le système informatique lors d'une analyse de sang. La Figure 37 illustre ce cas.

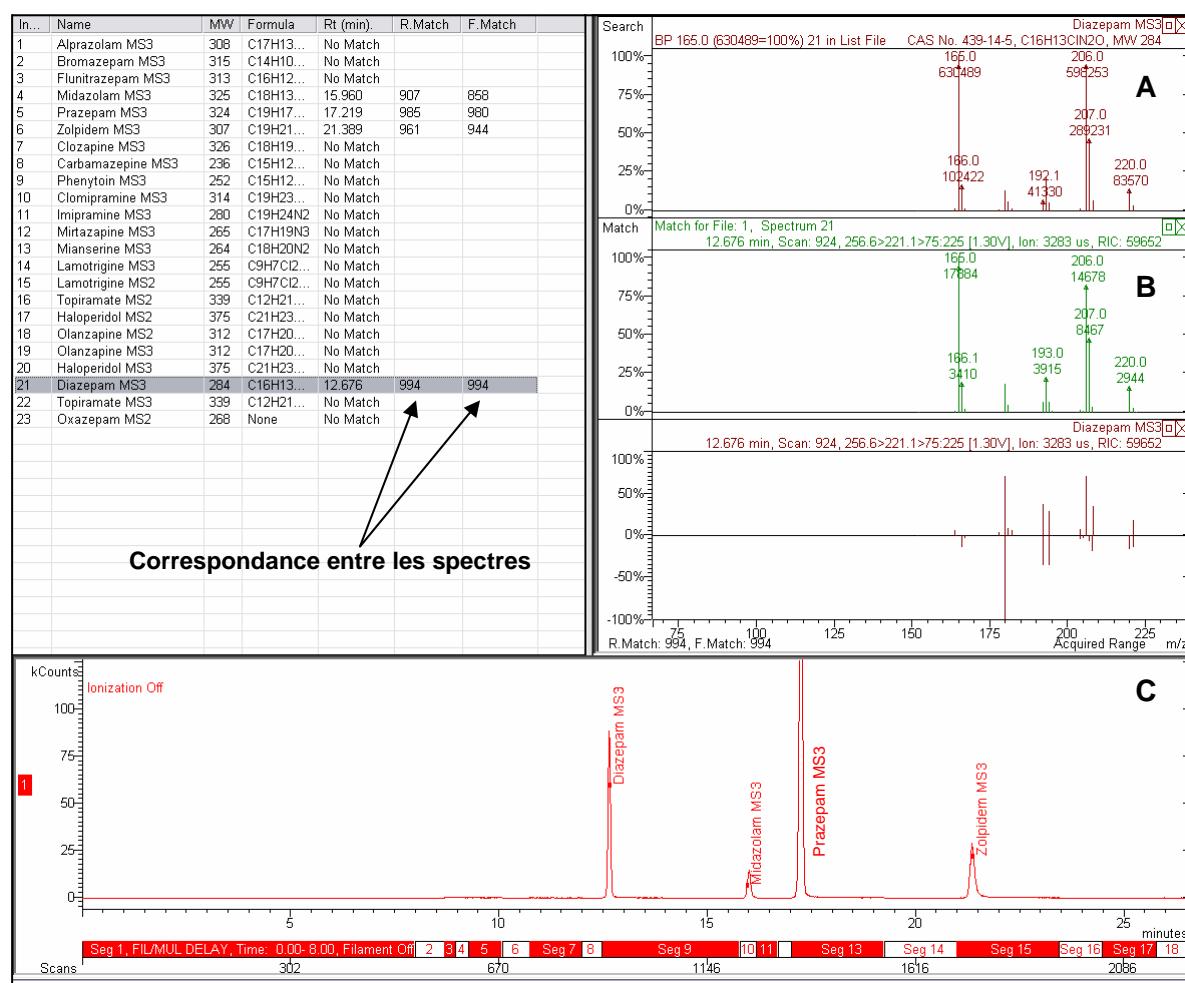


Figure 37: Exemple d'une identification de composés dans le sang

A : Spectre de la bibliothèque

B : Spectre du composé dans le sang

C : Identification des composés contenus dans le sang

La Figure 37 montre qu'après avoir injecté un échantillon de sang contenant des résidus médicamenteux, l'outil informatique permet d'identifier clairement les spectres des analytes « inconnus » grâce à ceux qui sont enregistrés dans la bibliothèque spectrale.

3.4. FAST-GC

Afin de réduire le temps d'analyse, une colonne de 10m a été testée. Après avoir tenté d'améliorer la résolution du chromatogramme en changeant le débit d'hélium, en augmentant le gradient de température, les résultats se sont avérés inutilisables. En effet, il a été impossible d'améliorer la séparation des composés. Deux chromatogrammes sont visibles à l'Annexe I page 40.

A la vue des résultats médiocres observés, la colonne de 15m a été réinstallée. Malheureusement, les paramètres initiaux utilisés sous le point 2.1 à la page 18 n'ont pas donné les mêmes résultats d'un point de vue chromatographique. En effet, il est observé que les pics en fin d'analyse commencent à « s'aplatir » ce qui rend leurs séparations difficiles. La méthode GC a donc dû être adaptée mais dans ces conditions l'Halopéridol et le Bromazepam ont été abandonnés au profit de l'Alprazolam et du standard interne, le Prazepam.

3.5. METHODE D'EXTRACTION

Dans le Tableau 5 la moyenne des aires du composé sur le standard interne a été faite sur deux mesures. Le rendement a été calculé à partir d'une analyse faite dans une solution de méthanol, évaporée à sec est reprise dans de l'hexane.

Tableau 5: Rendements d'extraction

Nom	Moyenne Rapport des aires en milieu basique	Moyenne Rapport des aires en milieu neutre	Rapport des aires en milieu méthanoïque	Rendement en milieu basique [%]	Rendement en milieu neutre [%]
Alprazolam	0.63	0.92	1.30	48.2	70.7
Clozapine	1.29	1.81	2.14	60.1	84.6
Zolpidem	6.89	9.42	10.34	66.6	91.2
Olanzapine	0.04	0.07	0.09	44.3	72.4
Flunitrazepam	0.40	0.62	0.99	40.4	62.9
Midazolam	0.75	0.97	2.31	32.7	42.2
Diazepam	2.70	4.01	10.53	25.7	38.1
Clomipramine	3.57	5.46	12.21	29.2	44.7
Phénytoïne	0.02	0.22	0.34	4.7	64.0
Carbamazépine	0.52	0.75	1.53	34.1	49.1
Mirtazapine	3.01	4.57	11.84	25.5	38.6
Imipramine	1.95	2.87	5.63	34.6	51.0
Miansérine	4.28	6.38	19.13	22.4	33.3
Topiramate	0.01	0.03	0.24	2.6	11.2

Les résultats obtenus montrent qu'en milieu neutre le rendement d'extraction est supérieur à celui en milieu basique. Cependant, cinq composés ont quand même un rendement inférieur à 50% en milieu neutre.

3.6. ANALYSE DE CAS REELS

Dans cette étape, quelques cas réels ont été traités afin de tester la fiabilité de l'identification et de la préparation de l'échantillon.

La Figure 38 représente un cas identifié et dosé au laboratoire par GC-ECD contenant du Diazepam à une concentration de 180ng/ml.

La Figure 39 illustre un cas également identifié et dosé au laboratoire par GC-MS contenant de la Miansérine à une concentration de 31ng/ml.

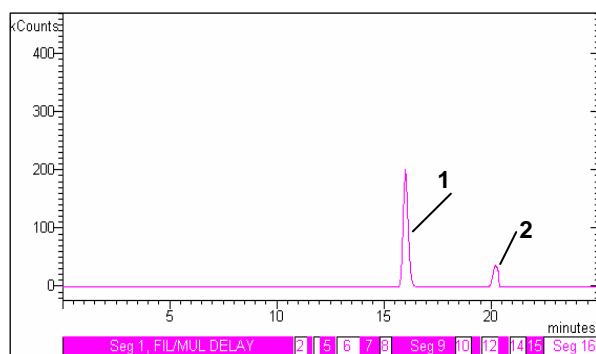


Figure 38 : Cas contenant de Diazepam et le standard interne. (1) Diazepam, (2) SI

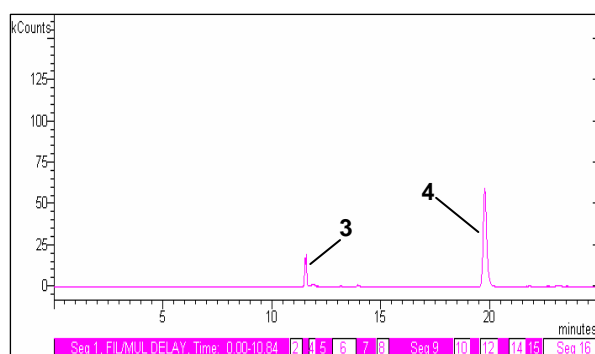


Figure 39 : Cas contenant de la Miansérine et le standard interne. (3) Miansérine, (4) SI

La Figure 38 et la Figure 39 montrent que grâce à la méthode GC-MS₃ développée, il est possible d'identifier respectivement les résidus de Diazepam et de Miansérine dans des échantillons de sang, même à des basses concentrations. Ils ont pu être détectés grâce aux temps de rétention et en comparant leur spectre avec ceux de la bibliothèque spectrale spécialement créée. En effet, les analytes dans le sang ont le même ion parent, ion fils, ion petit-fils ainsi que la même empreinte spectrale de la fragmentation du ion fils que la référence.

Le dernier cas, la Figure 40, démontre comment il a été possible d'infirmer la présence de l'Oxazepam dans un échantillon de sang. Un résultat qui avait été traité comme positif par GC-ECD. Ici, l'analyse a été faite par MS/MS au lieu de la MS₃ étant donné que l'intensité du pic de l'Oxazepam n'était pas très élevée. De plus dans le cas présent, cette fragmentation a suffi à affirmer une réponse sans ambiguïté.

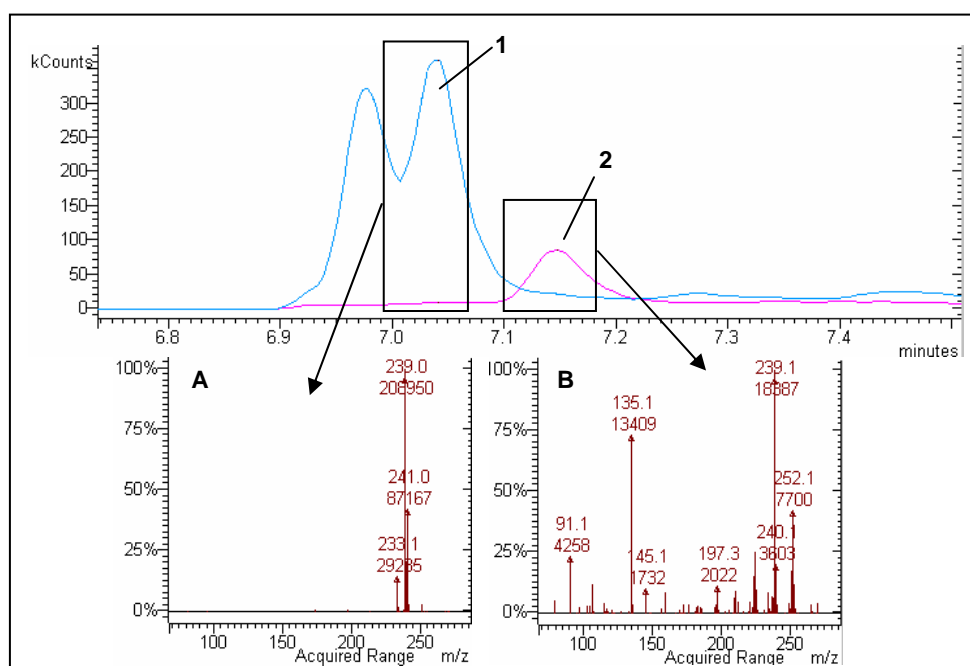


Figure 40: Confirmation de l'absence d'Oxazepam dans l'échantillon de sang par MS/MS. (1) Oxazepam présent dans un échantillon de sang O (témoin), (2) Substance présente dans l'échantillon du cas à analyser.

A : Spectre de l'oxazepam

B : Spectre d'un composé dans le sang

Dans cette analyse, il est difficile d'exclure la présence d'Oxazepam juste avec le temps de rétention qui est décalé. En faisant une fragmentation MS/MS, les spectres produits montrent tous les deux un ion majoritaire à 239 m/z mais le reste des fragments, pour la Figure 40B, est bien différent de ceux de la Figure 40A. Il est donc à exclure la présence du même composé. La correspondance avec le spectre de l'Oxazepam en MS/MS de la bibliothèque a donné une correspondance de 224/1000 pour l'échantillon du cas traité et 990/1000 pour le témoin, ce qui confirme bien le résultat.

3.7. REPETABILITE DE LA METHODE

Ici, il est question de déterminer la répétabilité de la méthode afin de pouvoir ensuite quantifier les différentes substances dans des matrices de sang. Le rapport de l'aire du composé sur le standard interne est reporté dans le Tableau 6. L'écart-type et le coefficient de variation (CV) sont calculés sur les trois répétitions.

Tableau 6 : Répétabilité de la méthode

Nom	Moyenne du rapport des aires	Ecart-type	CV [%]
Alprazolam	2.90	0.31	10.7
Clozapine	7.35	0.80	10.9
Zolpidem	32.02	3.07	9.6
Olanzapine	0.76	0.04	5.6
Flunitrazepam	0.93	0.10	10.9

Nom	Moyenne du rapport des aires	Ecart-type	CV [%]
Midazolam	3.44	0.33	9.8
Diazepam	11.92	0.80	6.7
Clomipramine	15.54	1.05	6.8
Phénytoïne	0.04	0.01	18.3
Carbamazépine	2.63	0.06	2.4
Mirtazapine	12.86	0.58	4.5
Imipramine	8.23	0.19	2.3
Miansérine	12.08	0.95	7.9
Topiramate	0.02	0.00	11.9

Les résultats montrent que cinq substances sont en dessus de 10%. Dont la Phénytoïne qui a un CV de 18.3% ce qui est relativement mauvais.

3.8. DROITES DE CALIBRATION

Une droite de calibration a été faite pour chaque produit avec la concentration dans le sang en fonction du rapport des aires entre le composé et le standard interne. Trois répétitions ont été faites sur chaque concentration dans un domaine allant de 5.0 à 0.01 µg/ml. Les résultats sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7: Droites de calibration

	Domaine de calibration [µg/ml]	Ion quantifié [m/z]	R ²	Equation de la droite
Alprazolam	5.0-0.01	218	0.9990	y = 0.84x + 0.06
Clozapine	5.0-0.01	181	0.9980	y = 1.28x + 0.18
Zolpidem	5.0-0.01	219	0.9999	y = 0.16x - 0.14
Olanzapine	5.0-0.2	194	0.9906	y = 0.04x - 0.02
Flunitrazepam	5.0-0.01	183	0.9961	y = 0.50x + 0.10
Midazolam	5.0-0.01	247	0.9920	y = 0.79x + 0.16
Diazepam	5.0-0.01	165	0.9911	y = 2.65x + 0.72
Clomipramine	5.0-0.01	217	0.9991	y = 4.99x + 0.38
Phénytoïne	5.0-0.01	152	0.9747	y = 0.17x + 0.07
Carbamazépine	5.0-0.01	191	0.9952	y = 0.64x + 0.11
Mirtazapine	5.0-0.01	139	0.9999	y = 4.52x + 0.02
Imipramine	5.0-0.01	216	0.9993	y = 3.44x - 0.22
Miansérine	5.0-0.01	163	0.9999	y = 6.53x + 0.03
Topiramate	5.0-0.01	109+131	0.9932	y = 0.07x - 0.02

Lors de cette étape, il était impossible de tenir compte des trois valeurs mesurées pour chaque concentration. En effet, seule la première mesure a été prise en considération. La Figure 41 illustre le phénomène rencontré.

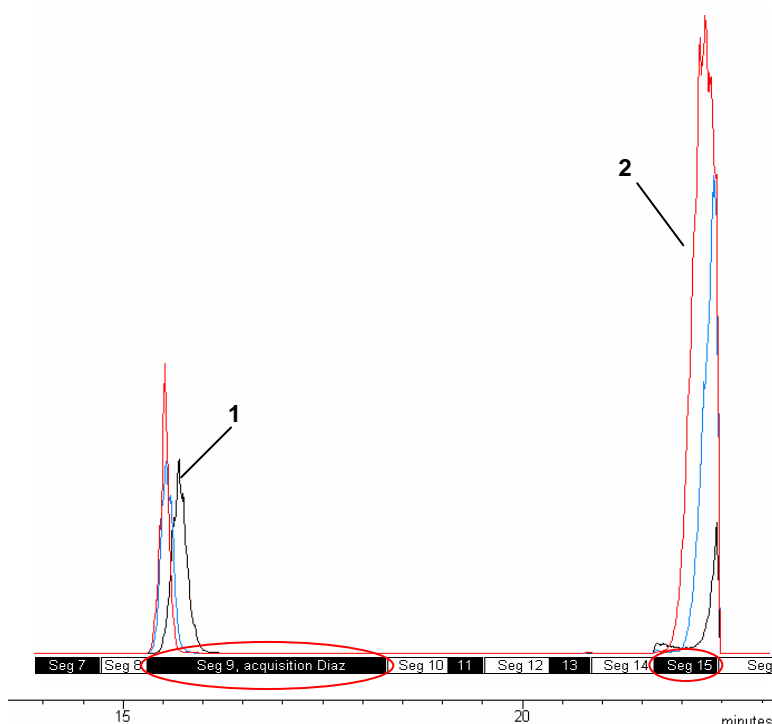


Figure 41 : Décalage du temps de rétention des composés. (1) Diazepam, (2) Clozapine

Dans ces analyses, une première série de mesures pour chaque concentration a été traitée, puis la deuxième répétition et la troisième. Petit à petit les temps de rétentions de chaque produit se sont décalés. Pour des analytes ayant un segments de temps relativement long (exemple le segment 9), cela n'a pas porté préjudice mais pour ceux ayant un segments très court, comme la Clozapine (segment 15), l'aire du produit n'est plus répétable dès la deuxième mesure. En effet, pour une trappe ionique, il est nécessaire de créer ces segments mais ceux-ci restent fixes et sont donc indépendant du moment où le produit sort de la colonne.

Malgré tout, une bonne linéarité a pu être réalisée pour chaque produit sur la première série de mesures. Il est a constaté que la Phénytoïne a donné le coefficient de corrélation le plus bas, cela s'explique en observant déjà les résultats sur la répétabilité de ce composé. En effet, le coefficient de variation est de 18.3% (c.f. Tableau 6) ce qui est élevé. En ce qui concerne l'Olanzapine, il n'a pas été possible d'atteindre des concentrations inférieures à 0.2 µg/ml.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour l'analyse de toxique médicamenteux, il s'est avéré que l'ionisation par impacte électronique est le meilleur compromis entre une fragmentation relativement douce et une bonne sensibilité. La méthode développée par GC-MS_n, quant à elle, offre des possibilités d'identification irréfutable. Ceci grâce au temps de rétention, une « multi » fragmentation d'ions préalablement sélectionnés pour chaque composé et une empreinte spectrale MS₃ de référence stockée dans une bibliothèque de spectres. De plus, cette technique d'analyse permet de reconnaître une substance « inconnue » parmi les quatre classes de composés étudiés jusqu'à des concentrations sanguines atteignant les 10ng/ml, c'est-à-dire en dessous des doses toxiques, voire même thérapeutiques pour certain. Elle présente également une bonne répétabilité des mesures pour la plupart des composés et ne nécessite pas une préparation d'échantillon très longue ce qui n'est pas insignifiant pour une application en routine.

Malgré tout, cette méthode d'analyse présente un inconvénient non négligeable. En effet, comme la trappe ionique permet une fragmentation temporelle, elle exige de fixer des périodes de temps pendant lesquelles elle doit appliquer les paramètres de stockage et de fragmentation propres à un type d'ion à la fois. Cela implique que, si une modification chromatographique survient au cours de l'analyse au niveau des temps de rétention, ou, que la résolution entre les pics n'est pas suffisante, l'acquisition des données peut se révéler être inutilisable.

Cependant, pour pallier à ce désagrément et pour pouvoir appliquer cette méthode en routine, il est envisageable de créer plusieurs méthodes, c'est-à-dire, dans le cas présent, une méthode pour chaque classe de composés ou une pour des substances ayant des temps de séjour court dans la colonne et une autre pour ceux qui ont plus d'affinité pour celle-ci. Ainsi le temps d'application des données appartenant à un produit devient plus long et cela évite donc des changements trop rapides.

La méthode GC-MS_n a été développée pour des toxiques médicamenteux dans des matrices de sang. Il est tout à fait concevable d'élargir le champ d'application sur des échantillons d'urine ou pour d'autres substances ne nécessitant pas d'étape de dérivation.

5. BIBLIOGRAPHIE

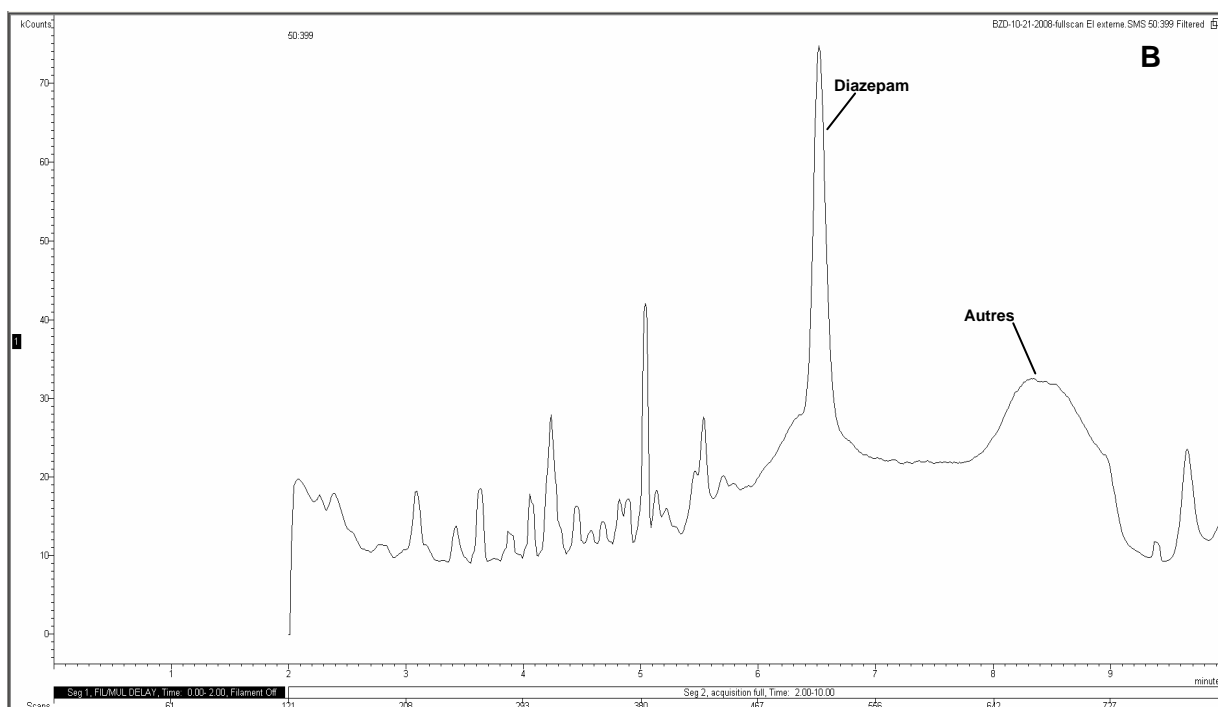
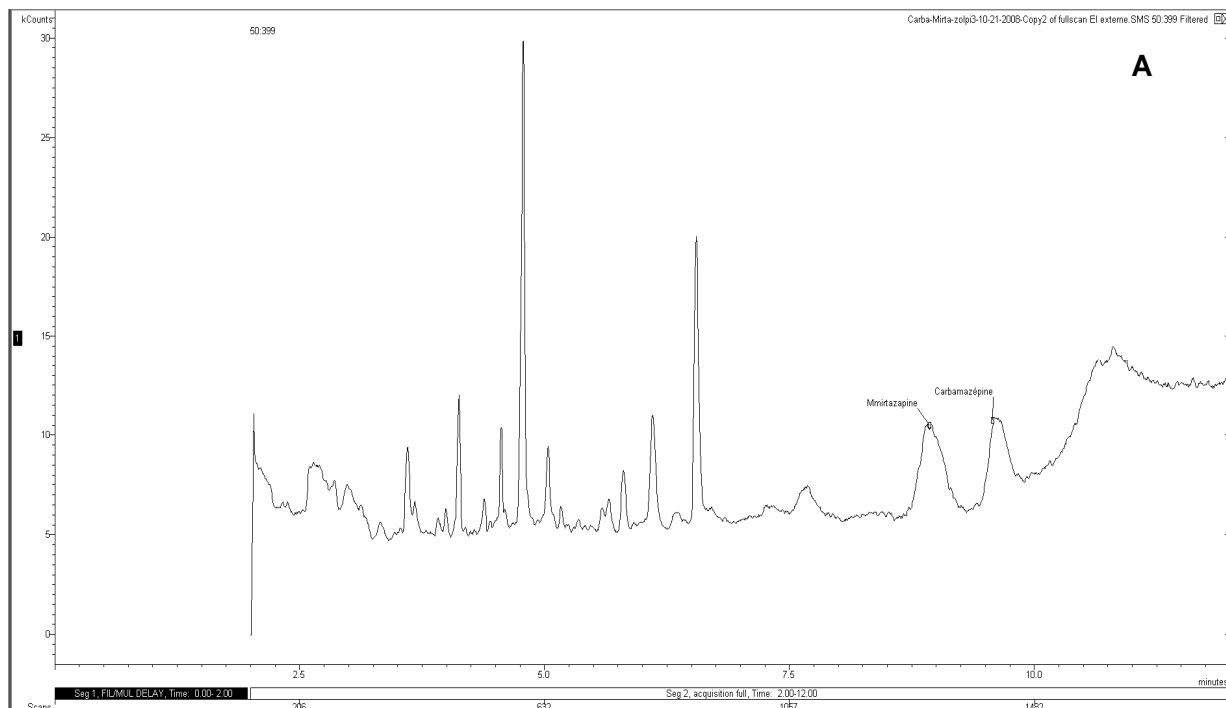
- [1] E. Cognard, Utilisation et apport de la trappe ionique pour l'analyse de xénobiotiques dans les matrices biologiques en toxicology forensique, Th Faculté des sciences, Genève, 2005
- [2] R. Moeller *et al.*, Determination of drugs of abuse in blood dans Journal of Chromatography B 713, p. 91-109, 1998
- [3] T. Stimpfl, W. Vycudilik, Automatic screening in post-mortem toxicology dans Forensic Science International 142, p. 115-125, 2004
- [4] A. Bugey, Utilisation de phases stationnaires monolithiques pour analyse de benzodiazépines dans les matrices biologiques: de la préparation de l'échantillon à l'analyse par LC-MS, Th Faculté des sciences, Genève, 2007
- [5] P. Kintz, Toxicologie et pharmacologie médico-légales, Elsevier, 1998, p.233-274
- [6] H. Pfleger, H.H. Maurer, A. Weber, Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites, part 1-4, Weinheim, 2000
- [7] M. Schorderet *et al.*, Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 3^{ème} Ed., Frison-Roche et Slatkine, p. 355-371, 1998
- [8] Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques, faculté de pharmacie de Lyon http://ispb.univ-lyon1.fr/ms/volume1/13-les_benzodiazepines.pdf
- [9] O.H. Drummer, Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples dans Journal of chromatography B 713, p. 201-225, 1998
- [10] B. Dubuc, Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) : Institut des neurosciences, de la santé mentale et des toxicomanies, http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_03/i_03_m/i_03_m_par/i_03_m_par_benzodiazepines.html (20.10.08)
- [11] C. Garcia *et al.*, De l'art de transformer les médicaments en substances illicites, THS (toxicomanie, hépatite et sida) la revue des addictions, vol.4, n°15, p831-837, 2002
- [12] Hôpitaux universitaires de Genève, Département de psychiatrie, Service d'addictologie, internetz, Médicaments (benzo, etc.) http://abusdesubstances.hug-ge.ch/substances_addiction/medicaments.html (24.09.08)
- [13] B. Dubuc, Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) : Institut des neurosciences, de la santé mentale et des toxicomanies, http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_08/i_08_m/i_08_m_dep/i_08_m_dep_tricycliques.html #3 (02.11.08)
- [14] M. Schorderet *et al.*, Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 3^{ème} Ed., Frison-Roche et Slatkine, p. 387-413, 1998

- [15] M. Schorderet *et al.*, Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 3^{ème} Ed., Frison-Roche et Slatkine, p. 373-387, 1998
- [16] J.L. Senon, Université de Poitiers, Faculté de médecine, les neuroléptiques, <http://pagesperso-orange.fr/senon/Documentation/telechargement/2cycle/moduleD/neuroleptiques.pdf> (23.10.08)
- [17] P. Alain, Pharmacorama connaissance des médicaments, http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Sodium_a3_3.php (25.09.2008)
- [18] M. Schorderet *et al.*, Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 3^{ème} Ed., Frison-Roche et Slatkine, p. 436-444, 1998
- [19] E. Harvey-Girard, Neurone, Le génie des neurones 102: Repos et action http://www.apteronote.com/revue/neurone/article_80.shtml (25.09.2008)
- [20] M. Esnault, Glioblastome Association Michèle Esnault, Les antiépileptiques, <http://gfme.free.fr/therap/antiepileptique.html> (27.09.2008)
- [21] F.Rouessac, A.Rouessac, Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, Cours et exercices corrigés, 6ème Ed, Dunod, 2004, p.62-87
- [22] Wikimedia Foundation, Inc., Wikipedia Encyclopédie libre, http://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_en_phase_gazeuse (04.09.08).
- [23] S. Bouchonnet et D. Libong, le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, <http://www.dcmr.polytechnique.fr/moyens/couplage.pdf> (27.08.08)
- [24] M. Wüst, Chromatographie en phase gazeuse-Gaschromatographie, Polycopié, Hes-so Valais, Institut Technologie du vivant, Chimie analytique, Analyse instrumentale II, 2006
- [25] F.Rouessac, A.Rouessac, Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, Cours et exercices corrigés, 6ème Ed, Dunod, 2004, p.315-355
- [26] E. Hoffmann, V. Stroobant, Spectrométrie de masse, 3^{ème} Ed., Dunod, Paris, p. 12-25, 2005
- [27] E. Constantin *et al.*, Spectrométrie de masse, Principes et applications, 2ème Ed., Technique & Documentation, p.5-13 , 1996
- [28] U.Frey, Bioanalytique (I), Polycopié, Hes-so Valais, Institut Technologie du vivant, Chimie analytique, 2005/2006
- [29] R.E. March, An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry in Journal of mass spectrometry, vol.32, p.351-369, 1997
- [30] E. Hoffmann, V. Stroobant, Spectrométrie de masse, 3^{ème} Ed., Dunod, Paris, p. ,89-103, 2005
- [31] U. Frey, C. Staub et D. Julien, Données du travail de diplôme, cahier des charges Hes-so Valais, 2008

-
- [32] R. Ciccirelli, Chromatographie en phase liquide, Polycopié, Hes-so Valais, Institut Technologie du vivant, Chimie analytique, 2007

6. ANNEXES

Annexe I. Chromatogramme avec la colonne de 10m



A : Carbamazépine, Mirtazapine, Zolpidem 10µg/ml débit 1.5ml/min

B : Alprazolam, Bromazepam, Diazepam, Midazolam, Prazepam, Zolpidem, Flunitrazepam
10µg/ml débit 1,0ml/min

Annexe II : Concentrations thérapeutiques

Analytes	Ions	Concentration thérapeutique
	[m/z]	[µg/ml]
Alprazolam	273.4 245 218	0.025-0.102
Bromazepam	288.3 207.1 179	0.01-0.2
Flunitrazepam	286.4 240 183	0.06-0.052
Midazolam	310 275.1 247	0.08-0.25
Zolpidem	235.2 220.1 219	0.029-0.272
Prazepam	269.6 241.1 213	0.01-0.04
Olanzapine	229 296 194	0.009-0.023
Haloperidol	224.2 206 177	0.006-0.245
Clozapine	243 208 181	0.009-0.023
Carbamazépine	236 193 191	1.4-12
Lamotrigine	255 185 114	2-19
Topiramate	324 188.9 109	2-19

Annexe III : Droites de calibration

	Aire 5µg/ml	Aire 1µg/ml	Aire 0.5µg/ml	Aire 0.2µg/ml	Aire 0.05µg/ml	Aire 0.01µg/ml	Rapport des aires 5µg/ml	Rapport des aires 1µg/ml	Rapport des aires 0.5µg/ml	Rapport des aires 0.2µg/ml	Rapport des aires 0.05µg/ml	Rapport des aires 0.01µg/ml	R ²	Où pente l'origin e
Alprazolam	1404000	369749	190287	66880	22418	5268	4.25	1.05	0.46	0.21	7.40E-02	1.78E-02	0.9990	0.84 0.06
Clozapine	2165000	564419	440119	134572	35270	7306	6.56	1.60	1.06	0.43	1.16E-01	2.47E-02	0.9980	1.28 0.18
Zolpidem	10400000	2089851	1196000	357065	126334	3132	31.50	5.94	2.87	1.13E+00	4.17E-01	1.06E-02	0.9999	0.16 -0.14
Olanzapine	63246	926	182	76	nd	nd	0.19	2.63E-03	4.37E-04	2.40E-04	nd	nd	0.9906	0.04 -0.02
Flunitrazepam	841571	250871	170938	70023	13209	1144	2.55	0.71	0.41	0.22	4.36E-02	3.87E-03	0.9961	0.50 0.10
Midazolam	1333000	461322	269554	78358	20477	4461	4.04	1.31	0.65	0.25	6.76E-02	1.51E-02	0.9920	0.79 0.16
Diazepam	4516000	1599000	996618	382162	94268	13736	13.68	4.54	2.40	1.21	3.11E-01	4.64E-02	0.9911	2.65 0.72
Clomipramine	8311000	2140000	1301000	377143	107110	27312	25.17	6.08	3.13	1.19	3.53E-01	9.23E-02	0.9991	4.99 0.38
Phénytoïne	297090	72679	83193	72460	3966	2830	0.90	0.21	0.20	0.23	1.31E-02	9.57E-03	0.9747	0.17 0.07
Carbamazépine	1083000	345127	189849	71022	14247	2924	3.28	0.98	0.46	0.22	4.70E-02	9.89E-03	0.9952	0.64 0.11
Mirtazapine	7472000	1635000	867536	328338	75304	12461	22.63	4.64	2.09	1.04	2.49E-01	4.21E-02	0.9999	4.52 0.02
Imipramine	5629000	1038000	482382	174638	53855	10768	17.05	2.95	1.16	0.55	1.78E-01	3.64E-02	0.9993	3.44 -0.22
Miansérine	10790000	2388000	1212000	470150	126350	22393	32.68	6.78	2.91	1.49	4.17E-01	7.57E-02	0.9999	6.53 0.03
Topiramate	114270	9401	5645	690	86	16	0.35	2.67E-02	1.36E-02	2.18E-03	2.84E-04	5.41E-05	0.9932	0.07 -0.02
SI	330136	352113	416012	316194	303012	295795								

Annexe IV : Répétabilité

Nom	Aire 0.5ug/ml	Aire 0.5ug/ml	Aire 0.5ug/ml	Rapport des aires	Rapport des aires	Rapport des aires	Moyenne	Ecart-type	Déviation standard	CV [%]
Alprazolam	231542	152472	171645	3.25	2.65	2.80	2.90	0.31	0.18	10.7
Clozapine	530358	467182	398620	7.44	8.11	6.51	7.35	0.80	0.46	10.9
Zolpidem	2352000	1987000	1750000	32.98	34.49	28.59	32.02	3.07	1.77	9.6
Olanzapine	51344	43482	49241	0.72	0.75	0.80	0.76	0.04	0.02	5.6
Flunitrazepam	57793	56041	60923	0.81	0.97	1.00	0.93	0.10	0.06	10.9
Midazolam	261218	175743	219852	3.66	3.05	3.59	3.44	0.33	0.19	9.8
Diazepam	849082	641481	779226	11.91	11.14	12.73	11.92	0.80	0.46	6.7
Clomipramine	1099000	959461	891118	15.41	16.65	14.56	15.54	1.05	0.61	6.8
Phénytoïne	3302	2740	2053	0.05	0.05	0.03	0.04	0.01	0.00	18.3
Carbamazépine	185799	155651	157920	2.61	2.70	2.58	2.63	0.06	0.04	2.4
Mirtazapine	963596	713995	775115	13.51	12.39	12.66	12.86	0.58	0.34	4.5
Imipramine	588407	484636	491702	8.25	8.41	8.03	8.23	0.19	0.11	2.3
Miansérine	918226	634946	755180	12.88	11.02	12.34	12.08	0.95	0.55	7.9
Topiramate	1480	946	1207	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	11.9
SI	71306	57608	61213							

Annexe V : Rendements

Nom	Aire 0.5ug/ml basique	Aire 0.5ug/ml basique	Aire 0.5ug/ml	Aire 0.5ug/ml	Aire 0.5ug/ml MeOH	Moyenne Rapport des aires basique	Moyenne Rapport des aires	Rapport des aires MeOH	Rdt basique	Rdt
Alprazolam	85448	65573	99393	48688	57041	0.63	0.92	1.30	48.2	70.7
Clozapine	162874	145526	213782	85212	94104	1.29	1.81	2.14	60.1	84.6
Zolpidem	888806	763689	1066000	461951	453916	6.89	9.42	10.34	66.6	91.2
Olanzapine	5441	4520	8003	3184	4111	0.04	0.07	0.09	44.3	72.4
Flunitrazepam	52567	43381	70108	30474	43355	0.40	0.62	0.99	40.4	62.9
Midazolam	96609	84218	122081	42635	101218	0.75	0.97	2.31	32.7	42.2
Diazepam	331118	314932	484961	183700	462538	2.70	4.01	10.53	25.7	38.1
Clonipramine	438835	415611	683106	239802	536157	3.57	5.46	12.21	29.2	44.7
Phénytoïne	2277	1650	28197	9356	15085	0.02	0.22	0.34	4.7	64.0
Carbamazépine	63623	61272	86770	36130	67245	0.52	0.75	1.53	34.1	49.1
Mirtazapine	359351	359300	532898	217305	519625	3.01	4.57	11.84	25.5	38.6
Imipramine	241687	224995	351337	129542	247304	1.95	2.87	5.63	34.6	51.0
Miansérine	500177	518398	795026	281172	839726	4.28	6.38	19.13	22.4	33.3
Topiramate	728	724	2867	1376	10428	0.01	0.03	0.24	2.6	11.2
SI	128971	110960	114331	48502	43905					