

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur

Département de Chimie Industrielle



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du
diplôme de Master

Spécialité : Procédés de Traitement et Protection de l'Environnement

Thème

EVALUATION ET DEVELOPPEMENT DES PARAMETRES
D'UNE METHODE D'ANALYSE LC/MS/MS
DE LA BUPRENORPHINE DANS LE SANG

Par

RAIAH Kenza

Proposé par :

M^r B. Bouzid

maitre de conférences à l'U.S.D.B

Blida, Octobre 2011

RESUME

La buprénorphine est une substance proche de la morphine qui se prend sous forme de comprimés à laisser fondre sous la langue. Chez le sujet dépendant, elle supprime le syndrome de manque tout en produisant un effet de bien-être. Compte tenu de ses caractéristiques biologiques, la buprénorphine possède un potentiel de détournement de son usage thérapeutique. L'extraction de la buprénorphine est réalisée selon un protocole d'extraction en phase solide (SPE) en utilisant une colonne d'extraction C₁₈. L'analyse de cette substance est effectuée par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec une colonne PFP Propyl en gardien d'élution de phase mobile constituée de méthanol/ Formiate d'ammonium à 20 mM, la détection est réalisée avec un spectromètre de masse équipé d'une source électrospray et opérant en mode MRM. La courbe de calibration est linéaire pour des concentrations plasmatiques en buprénorphine comprises entre 1 et 10ng/ml avec une limite de détection égale à 0.5 ng/ml et limite de quantification égale à 1ng /ml. Les résultats de précision et d'exactitude ont été satisfaisants et aucune interférence endogène n'a été signalée. Cette méthode convient pour la détermination de la buprénorphine dans le plasma humain.

Mots clés :

Plasma, buprénorphine, extraction, SPE, LC/MS/MS.

ABSTRACT

Buprenorphine is a substance similar to morphine taken orally in tablets dissolved under the tongue. In addicted patients, withdrawal symptoms are suppressed while producing an effect of well-being. Given its biological characteristics, buprenorphine has a potential for misuse of its therapeutic use. The extraction of buprenorphine was performed according to a protocol of solid phase extraction (SPE) using a C₁₈ extraction column. Analysis of this substance was performed by liquid chromatography-mass spectrometry with a PFP Propyl column in a gradient elution mode with a methanol / ammonium formate 20 mM solution. The detection is performed with a mass spectrometer equipped with an electrospray source operated in MRM mode. The calibration curve is linear in the range 1 to 10ng/ml for plasma concentrations of buprenorphine with a detection limit equal to 0.5 ng/ml and a limit of quantification equal to 1 ng/ml. Precision and accuracy were satisfactory and no endogenous interference were reported. This method is suitable for the determination of buprenorphine in human plasma.

Key words:

Plasma, buprénorphine, extraction, SPE, LC-MS/MS.

ملخص

يعد البوبرينورفين كمادة قريبة من المورفين التي يتم تناولها على شكل أقراص تذوب تحت اللسان. تقوم هذه المادة لدى الأشخاص المدمنين بإزالة أعراض الاحتياج و تخلق انطباع جيد. نظرا لخصائصها البيولوجية، فإن البوبرينورفين تمتلك القدرة على تغيير استعمالها العلاجي. يتم استخراج البوبرينورفين من البلازما بتنفيذ طريقة استخراج المرحلة الصلبة و ذلك باستعمال عمود الاستخراج (Bond Elut C18) . تحليل هذه المادة يتم باستعمال جهاز الكروماتوغرافيا السائلة المزودة بمطياف الكتلة و ذلك باستعمال عمود PFP PROPYL. مرحلة الشطف المتنقلة متكونة من الميثانول/ فورمات الألمونيوم بـ 20ملم، الكشف يكون من خلال استعمال مطياف الكتلة المجهز بمصدر الإلكتروسبراي (electrospray) الذي يعمل بنظام MRM. لقد اتضح لنا بأن منحى القياس خطيا و هذا في فاصل تركيز البلازما بالبوبرينورفين ما بين 1 و 10 ن غ /ملل، مع حد الكشف يقدر بـ 0,5 ن غ /ملل و الحد الكمي يقدر بـ 1 ن غ /ملل . نتائج الدقة و الصحة المتحصل عليها مرضية، لم يحصل أي تداخل ذاتي. هذه الطريقة المثلى التي تصلح لتحديد البوبرينورفين في بلازما الإنسان.

الكلمات الرئيسية:

البلازما، البوبرينورفين، استخراج، المرحلة الصلبة، الكروماتوغرافيا، سائلة، مزودة بمطياف الكتلة.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	10
1. GENERALITES SUR LA BUPRENORPHINE	12
1.1. Introduction	12
1.2. Propriétés physicochimiques	12
1.3. Pharmacodynamie	13
1.4. Pharmacocinétiques	13
2. METHODE D'EXTRACTION	15
2.1. Introduction	15
2.1. Principe	15
2.3. Choix de la phase d'extraction	17
3. METHODE D'ANALYSE	18
3.1. Introduction	18
3.2. La chromatographie liquide haute performance	18
3.3. La spectrométrie de masse	20
3.4. Analyse de la buprénorphine	24
4. METHODE DE VALIDATION	25
4.1. Introduction	25
4.2. Spécificité	25
4.3. Linéarité	26
4.4. Fidélité	26
4.5. Justesse ou exactitude	26

4.6. Limites de détection	27
4.7. Limite de quantification	27
5. ETUDE EXPERIMENTALE	28
5.1. Introduction	28
5.2. Méthodes et techniques expérimentales	28
5.3. Résultats et discussion	32
CONCLUSION	39
REFERENCES	43

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation

BUP : buprénorphine.

BUP-D4 : buprénorphine D4.

HPLC : chromatographie liquide haute performance.

ISO: International Organization for Standardization.

k : récepteur kappa.

LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem.

LD : limite de détection.

LQ : limite de quantification.

MRM : multiple réaction monitoring.

MS/MS : la spectrométrie de masse tandem.

Q : quadripôle.

RSD : relative standard deviation (en anglais) est souvent défini comme la valeur absolue du coefficient de variation exprimée en pourcentage.

S/N : rapport signal sur le bruit de fond.

SNC : système nerveux central.

SPE : extraction en phase solide.

UV : ultra violet.

μ : récepteur mu.

REFERENCES

1. A. Verster et E. Buning, « La buprénorphine : Examen des questions critiques » Quest for Quality BV, Euro-Methwork, Amsterdam, 2005, p22-23.
2. P. Kintz, « Toxicologie et pharmacologie médico-légales », Ed scientifique et médicales Elsevier, France, 1998, p366-372.
3. V. Fontaa, « Le médecin et le toxicomane : guide pratique », Ed heures de France 4^{ème} Edition, France, 2003, p161-172.
4. B. Millet, J.M. vanelle et J. benyaya, « Prescrire les psychotropes », Ed Masson, France, 2008, p100-101.
5. fr.wikipedia.org/wiki/Buprénorphine.
6. S. Brissette, S. Marsan et M. Provost « la buprénorphine dans le traitement de la dépendance aux opioïdes », Collège des médecins du Québec et de l'Ordre des pharmaciens du Québec, juin 2009, p6.
7. B. Roques, « la dangerosité des drogues », Ed Jodile Jacob, France, 1999, p236.
8. P. Cerba, « Guide des analyses spécialisées », Ed Elsevier 5^{ème} Ed, France, 2007, p225-226.
9. D. Fletcher et M. Chauvin, « Douleurs aiguës », Ed Arnette, France, 2006, p21-22.
10. P. Beaulieu, « Pharmacologie de la douleur », les presses de l'université de Montréal, (Mars 2006), p65-66
11. S. Oechsler et G. Skopp, «Buprenorphine and major metabolites in blood specimens collected for drug analysis in law enforcement purposes», Elsevier Forensic Science International, 195, (2010), p73–77.
12. P. Angel et É. Chagnard, « Toxicomanies », Ed Masson, 2^{ème} édition, France, 2005, p131.
13. J. Calop, S. Limat et C. Fernandez, « Pharmacie clinique et thérapeutique », Ed Masson, 3^{ème} édition, France, 2008, p35.
14. P. Valérie, « Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques », Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation, TA2, (2006), P1420.
15. J. Mendham, « Analyse chimique quantitative de Vogel », 6^{ème} Ed Boeck, Belgique, 2006, p214, 215, 262.

16. L. Humbert, « Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications », *Toxicologie Analytique*, 22(2), (2010), p61-68.
17. M.J. Telepchak, G. Chaney et T.F. August, «Forensic and clinical applications of solid phase extraction», Ed Humane Press, USA, 2004, p139-160
18. G. Miller, « Manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires: Analyse des pesticides dans les laboratoires de contrôle de la qualité des aliments », FAO, Italie, 1997, p35-40, 44.
19. Y. Barbier, « Les radiopharmaceutiques: guide pratique du contrôle de qualité en radiopharmacie », EDP science, France, 2009, p67.
20. F. Chapuis¹, V. Pichon¹ et M.C. Hennion¹, « Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières », *Oil & Gas Science and Technology*, 60(6), (2005), p899-912.
21. F.C. Hugon et V. Pichon, « Utilisation d'outils sélectifs pour l'analyse de traces dans des échantillons complexes », *Toxicologie Analytique*, 22(2), (2010), p97-101.
22. J.P GOULLÉ et C. LACROIX, « l'addiction en milieu professionnel : quelles techniques de confirmation après l'immunoanalyse? » *Toxicologie Analytique*, 14(1), (2002), p27-32..
23. T. Selden, M. Roman, H. Druid et R. Kronstrand, «LC–MS–MS analysis of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood from suspected drug users», *Forensic Science International*, (2011).
24. M. Concheiro, H. Jones, R.E. Johnson, D.M. Shakleya et M.A. Huestis, « Confirmatory analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and glucuronide metabolites in plasma by LCMSMS. Application to umbilical cord plasma from buprenorphine-maintained pregnant women», *Journal of Chromatography B*, 878, (2010), p13–20.
25. H. Yue, M.R. Borenstein, S.A. Jansen et R.B. Raffa, «Liquid chromatography–mass spectrometric analysis of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in rat brain tissue and plasma», *Pharmacological and Toxicological Methods*, 52, (2005), p314 – 322.
26. G. OURISSON, « Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes » ; Ed Masson 3ème édition, France, 1997, p43-53,
27. M.Caude et A.Jardy, «Chromatographie en phase liquide- appareillage et application », *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation*, (1995), P1456.
28. M. Caude, A. Jardy, « Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation », *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation*, (1994), P1455.

29. D.A. Skoog, D.M. West et F.J. Holler, « Chimie analytique », 7^{ème} Ed de boeck, Belgique, 1997, p702-713.
30. G. Bouchoux et M. Sablier, « Spectrométrie de masse Principe et appareillage », Techniques de l'Ingénieur, (2005), P 2645.
31. D.A. Skoog, F.J. Holler et T.A. Nieman, « Principes d'analyse instrumentale », 5^{ème} Ed de Boeck, Belgique, 2003, p511-524.
32. B. Monégier, « Électrospray », Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, (1997), PE 3350.
33. D. Cheillan, S. Cognat, C. Vianey-Saban, I. Maire et C. Dorche, « la spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme : le point sur les utilisations actuelles », Biologie Clinique. 62, (2004), p3, 269-277.
34. R. Borriello, L. Gargiulo et P. Cassandro « Buprenorphine and norbuprenorphine determination by GC/MS in putrefied biological samples: evaluation of a buprenorphine related death », Toxicologie Analytique, 20 (3), (2008), p117-119.
35. R. Kronstrand R, T.G. Seldén et M. Josefsson « Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography-mass spectrometry », Toxicologie Analytique, 27(7), (2003), p464-470.
36. I. Papoutsis, D. Nikolaou, A. Athanaselis, M. Pistos, A. Spiliopoulou et P. Maravelias, « Development and validation of a highly sensitive GC/MS method for the determination of buprenorphine and nor-buprenorphine in blood », Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 54 (3), (2011), p588-591.
37. Y.S. Wang, DL Lin, S.C. Yang, M.Y Wu, R.H Liu, L.W Su, P.S Cheng, C Liu et M.R. Fuh, « Issues pertaining to the analysis of buprenorphine and its metabolites by gas chromatography-mass spectrometry », Chromatography A, 1217(10), (2010), p1688-1694.
38. H. Hoja, P. Marquet, B. Verneuil, H. Lotfi, L. Dupuyj, M.F. Dreyfuss et G.Lachatre, « Dosage de buprénorphine et de norbuprénorphine dans l'urine et le sérum par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation de type électrospray (LC/ES/MS) », Analisis, 24 (4), (1996), p104-107.
39. S. Hegstd, H.Z. Khiabali, E.L. Oiestad, T. Berg et A.S. Christophersen, « Rapid quantification of buprenorphine-glucuronide and norbuprenorphie- glucuronide in human urine by LC-MS-MS », Toxicologie Analytique, 31, (2007), p214-219.

40. M. Feinberg, « Validation interne des méthodes d'analyse », Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, (2001), P224.
41. D. Ferrand, « Guide sur la vérification et la validation des méthodes d'essais et d'étalonnage selon l'ISO/CEI 17025 », Version 04, (2008), p1-8.
42. S. Amarouche, « Caractérisation d'une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation », Techniques de l'Ingénieur, (2010), SL1 040.
43. C. Moore, C. Coulter et K. Crompton, « Determination of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine using LC/MS/MS », Agilent Technologies, (2007), p1-8.

INTRODUCTION

Découverte en 1973 par John W Lewis, la buprénorphine a tout d'abord été utilisée pour ses propriétés analgésiques (Temgésic®), avant d'être mise à disposition pour traiter les pharmacodépendances aux opiacés sous le nom de Subutex®. La buprénorphine haut-dosage (comprimés sublinguaux dosés à 0,4 mg, 2 mg, 8 mg) est ainsi utilisée dans les traitements de substitution depuis 1996.

La buprénorphine est une substance proche (formule et effet pharmacologique) de la morphine qui se prend sous forme de comprimés à laisser fondre sous la langue. Chez le sujet dépendant, elle supprime le syndrome de manque tout en produisant un effet de bien-être. Compte tenu de ses caractéristiques biologiques, la buprénorphine possède un potentiel de détournement de son usage thérapeutique.

Le détournement de ce médicament, d'une grande fréquence, pose un véritable problème de santé publique. Certains toxicomanes cumulent les prescriptions ou s'injectent un filtrat de comprimés.

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné, comme par exemple dans le cadre de notre travail le dosage de la buprénorphine dans le sang. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon. Les méthodes adoptées (modifiées) pour l'ajustement au besoin du laboratoire doivent suivre généralement deux phases :

- une phase de sélection des conditions opératoires ;
- une phase de validation sur site.

Afin de structurer notre travail nous avons opté pour la démarche suivante :

- Une partie théorique, dans laquelle sont regroupés :

- Un ensemble d'informations scientifiques concernant la buprénorphine d'une manière générale suivi d'un aperçu sur les méthodes d'extractions et d'analyses utilisées.

- Une partie expérimentale dans laquelle est abordée :

- La méthode expérimentale utilisée et la caractérisation des performances de cette méthode d'analyse en évaluant les paramètres suivants: la linéarité, l'exactitude, la précision, la spécificité, les limites de détection et de quantification.

CHAPITRE 1

GENERALITES SUR LA BUPRENORPHINE

1.1. Introduction

La buprénorphine est un agoniste partiel (activité opiacée intrinsèque faible) qui présente une haute affinité pour les récepteurs d'opiacés mu (μ) et est également un antagoniste des récepteurs opiacés kappa (κ). La buprénorphine produit des effets semblables aux opiacés, empêche le manque et réduit les effets des autres opiacés, sans produire d'euphorie marquée. Elle a une longue durée d'action et un profil de sevrage léger. Les effets secondaires de la buprénorphine sont similaires à ceux des autres opiacés, mais elle induit moins de transpiration et moins de dépression respiratoire [1-4].

1.2. Propriétés physicochimiques

La buprénorphine(DCI) est une poudre cristalline presque blanche, de dénomination chimique 21-cyclopropyl-7 alpha-[(S)-1-hydroxy-1,2,2-triméthylpropyl]-6,14-endo-éthano-6,7,8,14-tétrahydronoropivavine, sa formule moléculaire $C_{29}H_{41}NO_4$ de composition C 74,48 %, H 8,84 %, N 3 %, O 13,69 %, de masse molaire $467,6401 \pm 0,0275\text{g/mol}$ [5,2]. La figure 1.1 illustre sa formule structurale.

La buprénorphine est très peu soluble dans l'eau, facilement dans l'acétone, soluble dans le méthanol, difficilement dans le cyclohexane, son pKa est 8,31 (25 °C) et sa Température de fusion est de 209 °C.

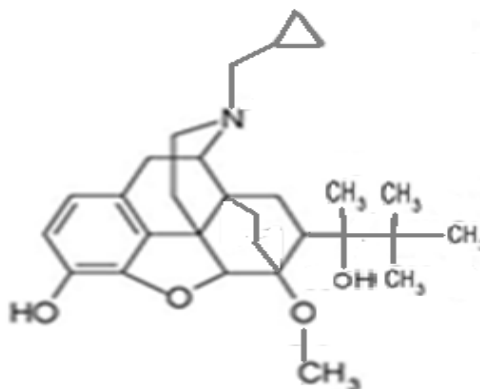


Figure 1.1 : Structure de la buprénorphine [5]

1.3. Pharmacodynamie

La buprénorphine est un opioïde synthétique qui possède des caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques qui la distinguent des autres médicaments de cette classe.

La buprénorphine a une plus grande affinité pour les récepteurs mu et kappa que la plupart des opioïdes couramment utilisés ou consommés. Elle empêche donc les autres opioïdes de se lier à ces récepteurs et en bloque ainsi les effets. Par contre, lorsque prise de façon concomitante avec d'autres déprimeurs du système nerveux central (SNC) (alcool, benzodiazépines, etc.), les risques de surdosage sont importants [2, 6, 7].

1.4. Pharmacocinétique

1.4.1. Absorption

L'administration par voie orale inactive 80% de la dose, par effet de passage hépatique. L'administration sous forme de comprimés sublinguaux permet une meilleure biodisponibilité, de l'ordre de 35 à 55% [6, 8-10].

Par voie intramusculaire, la biodisponibilité est proche de 90% et le délai de survenue du pic plasmatique est de l'ordre de 2 à 5 minutes. Le pic de concentration plasmatique est de 0,4 ng/ml après une dose de 0,3 mg. La courbe de décroissance des concentrations plasmatiques est bi-exponentielle [2, 9]. Le pic sérique est atteint en 90 minutes. La fixation tissulaire est forte et une partie de la buprénorphine est encore fixée aux récepteurs alors que les taux circulants ont presque disparus. Le taux thérapeutique sérique est de 1 à 4 ng/ml et la dose toxique est au-delà de 5 ng/ml [2, 8].

1.4.2. Métabolisme

La buprénorphine est métabolisée au niveau hépatique par deux voies; une N-désalkylation (système enzymatique) à la norbuprénorphine et une glucuroconjugaison conduisant à la buprénorphine conjuguée et la N-désalkyl buprénorphine conjuguée (figure 1.2). Les métabolites de la buprénorphine ont une activité agoniste faible des récepteurs mu (quasiment inactif) [2, 6, 8, 10].

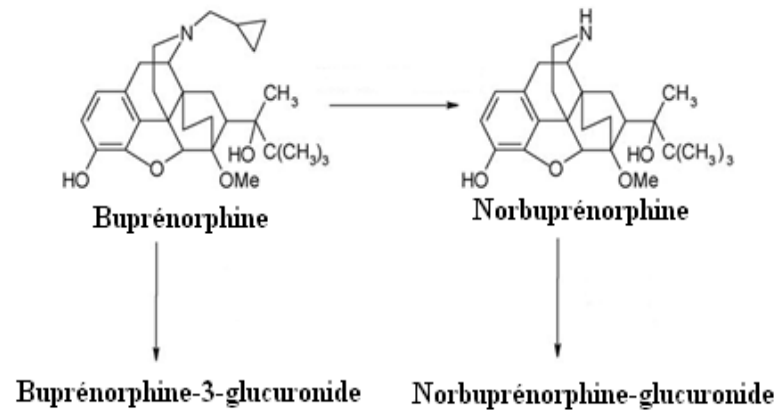


Figure 1.2 : Métabolites de la buprénorphine [11]

1.4.3. Elimination

L'élimination de la buprénorphine se fait principalement par voie digestive. La phase d'élimination terminale est longue, de 20 à 25 heures, en raison d'une réabsorption de la buprénorphine après hydrolyse intestinale du dérivé conjugué, et du caractère hautement lipophile de la molécule. L'excrétion de la buprénorphine s'effectue essentiellement (80%) dans la bile et les selles et 20% dans les urines [2, 3, 8, 10, 12].

La durée d'action est de 6 à 8 heures pour la voie intramusculaire et intraveineuse et de 8 à 12 heures pour la voie sublinguale [13].

CHAPITRE 2

METHODE D'EXTRACTION

2.1. Introduction

Malgré la mise en œuvre de techniques de séparation performantes associées à des modes de détection de plus en plus sensibles et spécifiques, l'efficacité de la procédure analytique est encore limitée par l'étape de préparation de l'échantillon. L'extraction en phase solide (SPE) est devenue depuis quelques années une technique de préparation d'échantillons de plus en plus utilisée en toxicologie analytique : extraction de psychotropes (benzodiazépines, antidépresseurs et opiacés) et de pesticides (organochlorés, organophosphorés). De très nombreuses méthodes analytiques ont été développées sur les matrices biologiques habituelles : le sérum, le plasma ou les urines mais également dans des matrices plus complexes comme les cheveux [14-17].

Les avantages de cette méthode comparée à l'extraction liquide-liquide traditionnelle sont: la faible consommation de solvant, un gain de temps considérable, la possibilité d'automatisation et elle permet des extractions de plus en plus ciblées [14-17].

2.2. Principe

Son principe de base est analogue à celui de la chromatographie de partage. Le support solide jouant le rôle de phase stationnaire et l'échantillon puis l'éluant jouant successivement le rôle de phase mobile. L'extraction se déroule généralement en quatre étapes [15, 18]. La figure 2.1 illustre les étapes constituant une extraction en phase solide.

2.2.1. Conditionnement

La première étape est le conditionnement de l'adsorbant contenu dans la cartouche d'extraction. Cette étape permet de mouiller le support et d'activer les sites de rétention, siège des interactions moléculaires. Ainsi un support hydrophobe est tout d'abord mouillé par un solvant organique, puis initié par un solvant de polarité similaire à celle du solvant constituant l'échantillon, généralement l'eau (ou un mélange eau-solvant organique) [15-23].

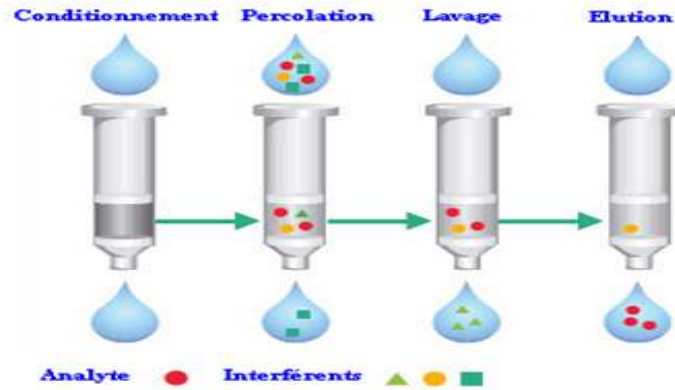


Figure 2.1 : Les quatre étapes constituant une extraction en phase solide [16]

2.2.2. Percolation

Lors de la seconde étape, on procède à la percolation de l'échantillon sur le support. Le but est de provoquer une rétention quantitative des analytes d'intérêts sur la phase stationnaire et en même temps le maximum d'interférents sont éliminés simplement par non rétention. Pour un maximum d'efficacité, la vitesse d'écoulement de l'échantillon doit être modérée [15-23].

2.2.3. Lavage

L'étape suivante est le lavage. Elle n'est pas systématique ; elle a pour but d'éliminer des interférents faiblement retenus. Il faut choisir des solvants de faibles forces éluantes (exemple : solution méthanol/eau) pour n'éluer que les interférents tout en gardant fixés les composés d'intérêt. Il est recommandé à la fin de cette étape d'assécher le support pour évaporer les traces de solvant de lavage. Cette étape améliore le rendement d'extraction [15-23].


2.2.4. Elution

La dernière étape est celle de l'élution. Il est préférable d'utiliser le solvant de la plus faible force éluante possible pour rompre les interactions mises en jeu entre les analytes d'intérêt et le support solide en évitant, dans la mesure du possible, d'éluer des composés interférents fortement retenus sur le support. Le choix du solvant est aussi guidé par sa facilité d'évaporation ou sa compatibilité avec la technique analytique utilisée par la suite. Il doit néanmoins être le plus efficace possible ; son volume doit être faible de manière à obtenir un facteur de préconcentration très important. La vitesse d'écoulement du solvant doit être lente pour favoriser l'élution [15-23].

2.3. Choix de la phase d'extraction

Depuis son apparition, de nombreuses phases stationnaires ont été développées par les industriels, permettant des extractions de plus en plus ciblées, ou bien adaptées pour l'extraction d'un grand nombre de substances de natures chimiques variées. De par la diversité des phases stationnaires elle permet l'extraction de composés polaires difficilement extractibles auparavant par les solvants organiques [16]. Tableau 2.1 illustre un exemple de quelques phases stationnaires classées en fonction de leurs polarités.

Tableau 2.1 : Exemple de quelques phases stationnaires classées en fonction de leurs polarités [16]

C ₁₈ Octadecyl		PHASES APOLAIRES
C ₂ Éthyl		
CH Cyclohexyl		
PH Phényl		Polarité croissante
CN Cyanopropyl		
2OH Diol		
NH ₂ Aminopropyl		PHASES POLAIRES
Si Silica		

Le choix de la phase d'extraction dépend d'abord de la matrice de l'échantillon. Puisque la phase est aqueuse, comme dans la majorité des échantillons biologiques, des supports hydrophobes conviennent parfaitement puisque l'eau est, sur ce type de phase, la phase mobile la moins éluante. Dans un deuxième temps, le choix de la phase va dépendre des caractéristiques physico-chimiques des solutés recherchés et notamment de leur appartenance de groupements fonctionnels chargés, solubilité, poids moléculaire et polarité. La polarité d'un soluté est difficile à définir, mais elle peut être toutefois reliée à la notion d'hydrophobie. C'est en fonction de ces conditions s'effectuer la sélection des supports. [16, 21].

CHAPITRE 3

METHODE D'ANALYSE

3.1. Introduction

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse constitue cependant la technique de choix utilisée par la majorité des laboratoires qui en sont équipés. Outre le fait qu'il s'agit d'un dosage sans dérivation sa sensibilité est meilleure. Le premier critère de choix d'un système (en dehors du prix) reste probablement sa sensibilité, dans la mesure où la LC-MS/MS est utilisée en toxicologie pour la recherche et le dosage de molécules faiblement concentrées (buprénorphine, LSD, benzodiazépines, neuroleptiques, etc.) [22-25].

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse correspond à l'association de deux instruments analytiques qui sont la chromatographie liquide (LC) et la spectrométrie de masse (MS). Chacun de ses instruments sont couramment utilisés pour la séparation (LC) et l'identification (MS) des substances chimiques dans des milieux complexes.

3.2. La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie en phase liquide, souvent appelée du nom de son abréviation en langue anglaise HPLC est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés allant de l'analyse de fluides biologiques à celui des produits pétroliers lourds [15, 26-28].

3.2.1. Conception générale d'un appareil de HPLC

Un appareil de chromatographie en phase liquide comporte quatre parties : système de pompage, injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer. La figure 3.1 illustre le principe d'un chromatographe en phase liquide [15, 26, 27].

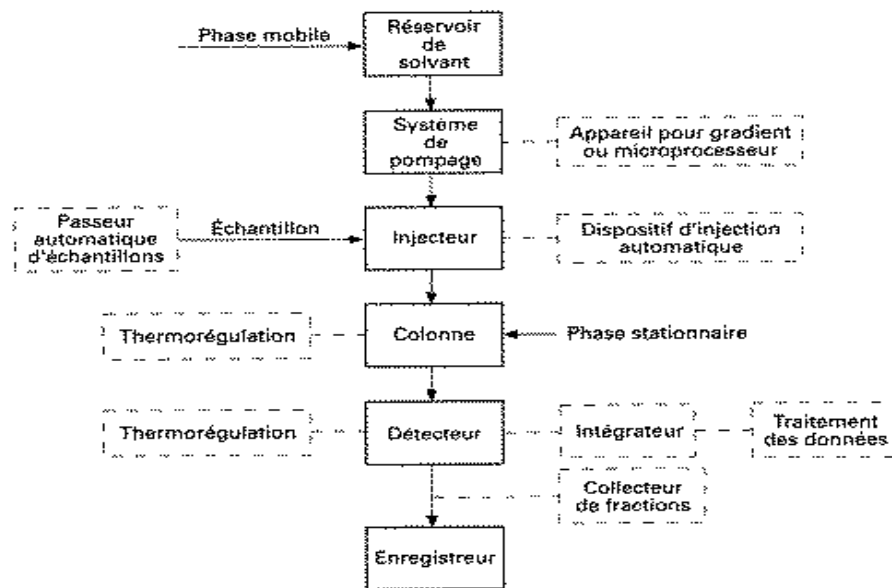


Figure 3.1 : Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide [27]

3.2.1.1. Système de pompage

Toute installation de HPLC comporte une ou plusieurs pompes pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne, muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse ;
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant [26, 27,29].

3.2.1.2. Injecteur

Les pressions élevées en tête de colonne, pouvant atteindre 300 bars, interdisent l'utilisation d'une injection par seringue à travers un septum comme en chromatographie en phase gazeuse. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, pièces mécaniques de précisions, manuelle ou motorisée, montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne [26, 27, 29].

3.2.1.3. Colonne

Le choix, la construction et le remplissage de la colonne chromatographique revêtent une grande importance, car il ne faut jamais oublier que, quel que soit le degré de sophistication du chromatographe, la qualité d'une séparation est toujours fonction de celle de la colonne qui constitue le cœur du système [15, 26, 27, 29].

3.2.1.4. Détecteur

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule [26, 27].

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190 - 800 nm) relié à la sortie de colonne [15]. Il existe d'autres détecteurs : réfractomètre différentiel, UV à barrette de diodes, électrochimique et fluorimétrique, ainsi que différents types de couplage : Spectrométrie infrarouge, Spectrométrie de masse et Résonance Magnétique Nucléaire [15, 26, 27].

3.3. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet d'identifier et de doser une substance ou un élément chimique. Elle apporte également des informations sur la composition, la structure et la masse moléculaire de l'échantillon. Enfin, le spectromètre de masse est un outil permettant d'étudier la chimie des ions en phase gazeuse sous ses divers aspects (cinétiques, énergétiques et mécanistiques) [26, 30].

3.3.1. Conception générale d'un appareil de spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse comporte quatre éléments : un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ions, un analyseur et un ensemble de détection d'ions. Le pilotage de l'instrument et le traitement des données sont réalisés à l'aide d'un micro-ordinateur [15,30, 31]. La figure 3.4 présente le schéma de principe d'un spectromètre de masse.

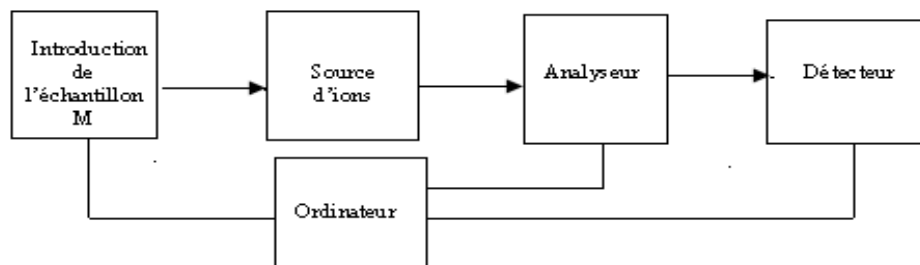


Figure 3.4 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse [30]

Les ions produits dans la source doivent pouvoir être extraits puis parcourir l'analyseur et être finalement collectés sans subir de collisions avec des molécules résiduelles, ce qui aurait pour effet de dévier leurs trajectoires ou de provoquer leur dissociation. C'est pourquoi les parties source, analyseur et collecteur du spectromètre de masse sont maintenues sous vide par un système de pompage fonctionnant en permanence[30].

3.3.1.1. Introduction de l'échantillon

Le système d'introduction de l'échantillon permet d'introduire la substance M à analyser directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque MALDI) ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse) [15, 30, 31].

3.3.1.2. Source d'ions

La source d'ions a pour rôle de vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Il existe actuellement de nombreuses méthodes d'ionisation, chacune étant adaptée à la nature de l'échantillon et au type d'analyse à effectuer, son choix est donc crucial :

- l'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI) et la désorption-ionisation chimique (DCI) ;
- le bombardement par atomes rapides (FAB), atomes métastables (MAB) ou ions (LSIMS) ;
- le couplage plasma inductif (ICP) ;
- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) ;
- la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS) ;
- l'ionisation-désorption par interaction avec espèces métastables (DART) ; [30]
- l'électronébulisation ou électrospray (ESI). Particulièrement adaptée aux composés polaires et thermosensibles (non vaporisable), le cas du couplage LC/MS, ce mode d'ionisation s'effectue à la pression atmosphérique et à température ambiante.

La figure 3.5 explique le mécanisme d'ionisation en électrospray. Au début, il y a formation d'ions en phase gazeuse à partir de gouttelettes liquides chargées, puis une évaporation du solvant avec une succession d'explosions coulombiennes provoquent une diminution de la taille des gouttelettes. A la fin, la valeur du champ électrique est telle qu'il y a éjection de nanogouttelettes ou de molécules chargées parfois encore partiellement solvatées [32].

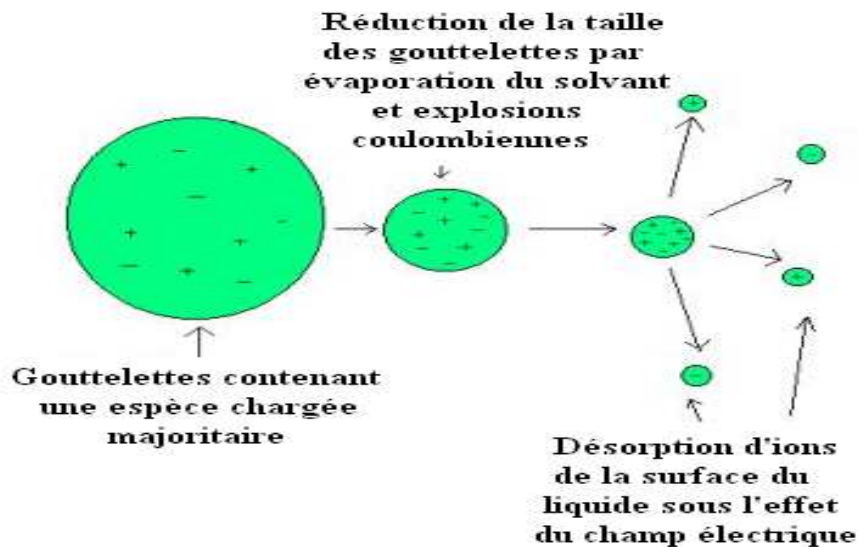


Figure 3.5 : Mécanisme d'ionisation en électrospray [32].

3.3.1.3. Analyseur

L'analyseur a pour but de trier les ions en fonction de leur rapport masse/charge ; ce tri est réalisé par l'application et le balayage d'un champ magnétique ou électrique. Il existe des analyseurs basse résolution : le quadripôle (Q), le piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT), et des analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes: le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap. Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments [15, 30, 31]. La figure 3.6 schématise un spectromètre de masse en tandem.

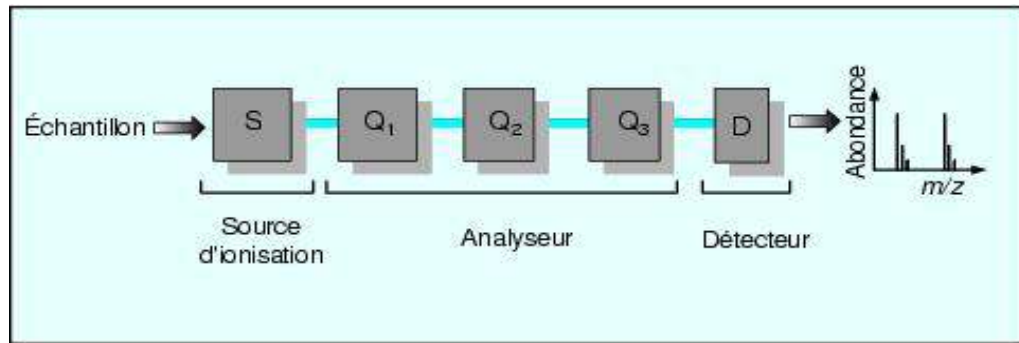


Figure 3.6 : Schéma d'un spectromètre de masse en tandem. Q₁, Q₂ et Q₃ représentent les trois quadripôles placés en série qui composent l'analyseur [33].

L'analyse en MS/MS peut se faire selon quatre modes différents en fonction des molécules à étudier: le balayage des ions fragments (product ion scan), Le balayage des ions parents (precursor ion scan), Le balayage en perte neutre (neutral loss scan) et le multi réaction monitoring (MRM)

Le mode multi réaction monitoring (MRM) permet de trier une ou plusieurs molécules ayant un ion précurseur et un ion fragment spécifique. On obtient ainsi des couples ions parents/ions fils très spécifiques d'une molécule. En utilisant ce mode, il est possible de quantifier simultanément de très nombreux composés ayant des structures chimiques différentes [33]. La figure 3.7 représente l'analyse MS/MS en mode MRM.

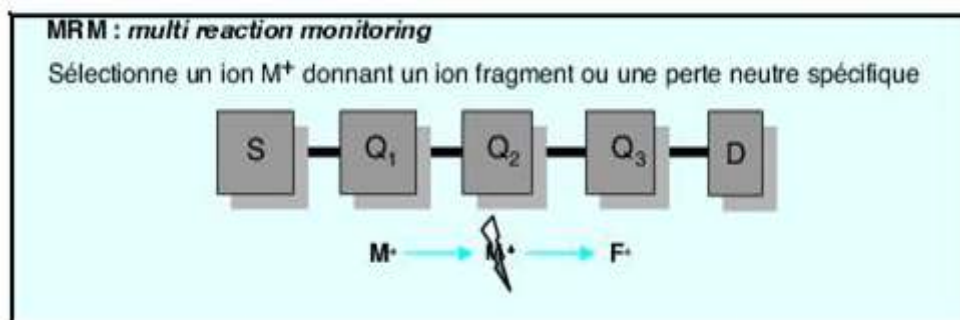


Figure 3.7 : L'analyse MS/MS en mode MRM. [33]

3.3.1.4. Détecteur

Le détecteur recueille les ions séparés par l'analyseur de manière à produire un courant électrique proportionnel au nombre d'ions ; il est constitué d'un collecteur et d'un ensemble électronique de mesure et d'amplification du signal. Il existe différents types de détecteurs : les plaques photographiques sont le détecteur historique, le multiplicateur d'électrons est le détecteur le plus courant le cylindre de Faraday et le multiplicateur de photons est dérivé du multiplicateur d'électrons [15, 30].

3.4. Analyse de la buprénorphine

L'analyse de la buprénorphine dans le sang est difficile a cause de sa faible concentration plasmatique (entre 1 et 4 ng/ml), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été utilisé pour la détermination de la buprénorphine ainsi que ces métabolites dans différentes matrices (sang, urine, bile, foie et cheveux) [34-37], mais cette technique nécessite une étape de dérivation avant l'analyse, et le temps d'analyse est long, par conséquent il y a eu tendance à délisser la chromatographie gazeuse pour la chromatographie liquide. Plusieurs études présentent la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem comme méthode de choix pour l'identification et la quantification de la buprénorphine et ces métabolites dans les liquides biologiques [11, 22-25, 38, 39], a cause de sa spécificité et de sa sensibilité élevée ; la limite de détection de la buprénorphine dans le sang est égale à 0,2 ng/ml [11] et dans les urines est égale à 0,05ng/ml [38].

CHAPITRE 4

METHODE DE VALIDATION

4.1. Introduction

Avant d'être utilisé pour analyser une substance, toute méthode doit d'abord subir une validation interne. Les méthodes mise au point ailleurs doivent être vérifiées et il faut s'assurer qu'elles donnent des résultats fiables dans les conditions du laboratoire, même si elles ont déjà été soumises à une validation interlaboratoires poussée par des instances spécialisées. Il s'agit de vérifier que les caractéristiques des performances obtenu au laboratoire coïncident avec celles établies lors de la validation interlaboratoires [18].

Il est assez facile de se mettre d'accord sur une définition de la validation d'une méthode d'analyse. Comme l'indique la norme ISO/IEC 17025 [1] : « Le laboratoire doit valider des méthodes [...] pour confirmer [qu'elles] conviennent à l'emploi prévu. La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins dans l'application ou le domaine d'application donné ». Valider, c'est apporter des preuves que la méthode est adaptée à ses objectifs [40].

Les principales caractéristiques pour la validation d'une méthode analytique sont : la spécificité, la linéarité, la fidélité, la répétabilité, la reproductibilité, la justesse ou exactitude, les limites de détection et de quantification [42].

4.2. Spécificité

La définition de la spécificité retenue par la norme AFNOR XPT90-210 Décembre 1999 est la suivante :

« Capacité d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte [41, 42].

4.3. Linéarité

Selon la norme AFNOR XP T90-210 Décembre 1999 la linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour le laboratoire.

Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de grandeurs entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu[41].

4.4. Fidélité

La fidélité est définie par la norme ISO 5725-1:1994 :

« Etroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées (méthode, individus d'essai, laboratoire, opérateur, équipement et temps) » [41, 42].

4.4.1. Répétabilité

La répétabilité c'est la fidélité sous des conditions de répétabilité selon la norme ISO 5725-1:1994. Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps [41, 42].

4.4.2. Reproductibilité

La reproductibilité c'est la fidélité sous des conditions de reproductibilité selon la norme ISO 5725-1:1994. Conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents [41].

4.5. Justesse ou exactitude

La définition de la justesse proposée par la norme ISO 5725-1:1994 est la suivante :

« Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée » [41, 42].

4.6. Limite de détection

Selon la norme AFNOR XP T90-210 Décembre 1999, la limite de détection (LOD) est la plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon, pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc (avec une probabilité donnée) mais non nécessairement quantifiée [41].

4.7. Limite de quantification

La limite de quantification (LOQ) définit par la norme AFNOR XP T90-210 Décembre 1999 comme suit:

« La limite de quantification est la plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie » [40].

CHAPITRE 5

ETUDE EXPERIMENTALE

5.1. Introduction

L'objectif fondamental de cette étude est l'évaluation des performances d'une méthode d'extraction et le développement d'autres conditions d'une méthode d'analyse par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS/MS) de la buprénorphine dans le sang. Dans ce contexte, la démarche suivie pour aboutir à l'objectif désiré se résume comme suit :

- Une première partie : qui consiste à choisir la méthode de prétraitement des échantillons ainsi que les conditions d'analyse chromatographique.
- Une deuxième partie : ayant pour but de caractériser les performances de cette méthode d'analyse en évaluant les caractéristiques suivants: la spécificité, la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la répétabilité, les limites de détection et de quantification.

5.2. Méthodes et techniques expérimentales

5.2.1. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques utilisés pour l'extraction ou pour la préparation de la phase mobile sont regroupés dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Réactifs chimiques utilisés

Réactif chimique	Fournisseur	Qualité
Méthanol	MERCK	HPLC
Dichlorométhane	MERCK	HPLC
2-Propanol	Panreac Quimica SA	HPLC
Ammoniaque (25%)	MERCK	analyse
Acide chlorhydrique (37%)	VWR International PROLABO	analyse
hydrogénophosphate dipotassium	MERCK	-
dihydrogénophosphate de potassium	VWR International PROLABO	-
Formiate d'ammonium	VWR International PROLABO	-
Colonne SPE C ₁₈ (1GM6ML)	VARIAN	-
Solution étalon buprénorphine (100µg/ml)	Cerlliant Round Rock, TX	-
Solution étalon buprénorphine-D4 (100µg/ml)	Cerlliant Round Rock, TX	-

5.2.2. Spécimens biologiques

Les échantillons sanguins proviennent du service de toxicomanie du CHU de BLIDA. Le sang est prélevé sur héparinate de lithium, le plasma est récupéré après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 minutes.

5.2.3. Conditions instrumentales

Les analyses LC/MS/MS sont effectuées avec un système chromatographique PerkinElmer 200 constitué de deux micro pompes Séries 200, d'un dégazeur de solvant et d'un passeur d'échantillon Séries 200, le Spectromètre de masse est un 3200 Qtrap (Applied Biosystems/MDS-SCIEX) équipé avec un électrospray interface, le Spectromètre de masse fonctionne en mode multiple réaction monitoring (MRM), les informations sont gérées avec le logiciel Analysis Software 1.5.

L'analyse des échantillons est réalisée selon le protocole d'analyse cité dans la référence bibliographique [43], à l'exception du choix de la colonne d'analyse qui s'est porté sur une colonne PFP Propyl au lieu d'une colonne C₁₈ utilisée initialement dans cette méthode.

5.2.3.1. Conditions de la Chromatographie liquide

Colonne :	PFP Propyl(Pentafluorophenyl propyl)
Dimension :	2.1 mm x 50 mm x 5 µm
Température de la colonne :	30°C
Volume d'injection :	30 µl
Débit de la phase mobile :	0.8ml/min

Programmation d'élution :

Temps (min)	% Formiate d'ammonium à 20mM(A)	% Méthanol (B)
0	40	60
2.5	40	60
5	0	100
8.5	0	100
10	40	60

5.2.3.2. Conditions du Spectromètre de masse

Opération :	Electrospray (ESI) en mode positive
Température du gaz :	300°C
Débit du gaz (N ₂) :	6 l/min
Pression du nébuliseur :	50 psi
Voltage du capillaire :	4500 V

Les conditions de transition MRM de la buprénorphine et de l'étalon interne buprénorphine-D4 sont illustrées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 Transitions MRM de la BUP et BUP-D4

Composé	Ion père	Ion fragment	CE (V)
Buprénorphine	468.4	414.4	35
	468.4	396.1	55
Buprénorphine D4	472.5	400.4	45

5.2.4. Préparations des échantillons

La préparation des échantillons est réalisée avec le mode d'extraction solide liquide selon le protocole d'extraction cité dans la référence bibliographique [23], à l'exception du choix de la colonne qui s'est porté sur une octadecyl C₁₈ au lieu d'une colonne Certify utilisée initialement dans cette méthode.

- 1-On procède au mélange de 500 µl de plasma, 3 ml de tampon phosphate (pH=6,1) et 100 µl de l'étalon interne standard BUP-D4 (1µg/ml) dans un tube à essai,
- 2- le conditionnement de la colonne SPE est réalisé par 2ml de méthanol, 2 ml d'eau pure et 2ml de tampon phosphate (pH=6,1),
- 3- la percolation de l'échantillon se fait à une vitesse de 2 ml/min,
- 4- le lavage de la colonne SPE est effectué avec 2 ml eau pure et 2 ml d'acide chlorhydrique (0,1M), séchage pendant 10 min à 5-10 in. Hg,
- 5- l'élution des analytes est réalisée avec un mélange dichlorométhane/ 2-propanol/ammoniaque (80/20/2), suivi d'une évaporation à sec à 40°C et reconstitution avec 100 µl de la phase mobile.

5.2.5. Validation de la méthode

Les échantillons analysés sont préparés avec un mélange du plasma négatif chargé à des concentrations de Buprénorphine en présence de l'étalon interne Buprénorphine-D4. Le calcul de concentration se fait à partir du rapport de surface du pic BUP sur la surface du pic BUP-D4.

5.2.5.1. Limites de détection et de quantification

Les Limite de détection (LOD) et limite de Quantification (LOQ) sont estimées lorsque l'analyse d'échantillon à une concentration plasmatique connue donne respectivement un signal trois et dix fois plus grand que le signal du bruit de fond. Les solutions du sang chargé avec différentes concentrations sont analysées, le calcul et la comparaison au signal du bruit de fond sont effectués avec l'intégrateur du logiciel. Une fois la concentration de la limite de quantification estimée, elle est préparée six fois et analysée pour calculer l'écart type relatif (% RSD), qui doit être inférieur à 20%.

5.2.5.2. Linéarité

Les échantillons de plasmas négatifs chargés à sept différentes concentrations sont préparés trois fois et analysés. La courbe d'étalonnage est tracée par la méthode des moindres carrés. La pente, l'ordonnée à l'origine, les coefficients de corrélation et de détermination sont estimés.

5.2.5.3. Spécificité

Six différents échantillons de plasmas négatifs sont préparés et analysés, aucun pic ne doit apparaître au temps de rétention de la Buprénorphine ou la Buprénorphine D4 avec une surface plus grande que la limite de quantification.

5.2.5.4. Rendement d'extraction

Les échantillons de plasmas négatifs chargés à la concentration minimale, moyenne et maximale de la courbe d'étalonnage sont analysés, les rapports de surface des pics obtenus sont comparés aux rapports de surface des pics des solutions étalons de la même concentration, puis le pourcentage du rendement d'extraction est calculé.

5.2.5.5. Exactitude

Le plasma négatif chargé à la concentration minimale, moyenne et maximale de la courbe d'étalonnage est analysé. L'exactitude est calculée à partir de la relation suivante :

$$Exactitude = \left(\frac{C_1 - C_2}{C} \right) \times 100 \quad \text{Eq 5.1}$$

C_1 : Concentration du plasma chargé.

C_2 : Concentration du plasma négatif.

C : Concentration ajoutée.

5.2.5.6. Fidélité et répétabilité

Le plasma négatif chargé à la concentration moyenne est préparé six fois et analysés le jour même pour avoir la fidélité, la procédure est répétée pendant cinq jours différents pour avoir la répétabilité. Le calcul du %RSD est effectué. Il faut qu'il soit inférieur à 15% et même à 20% selon certains auteurs [23].

5.3. Résultats et discussion

5.3.1. Choix des conditions chromatographiques

L'analyse d'un échantillon d'étalon Buprénorphine et d'étalon interne Buprénorphine D4 s'est effectuée avec les trois colonnes chromatographiques suivantes : C₁₈ BDS Hypersil 100 x 4 mm 3µm, ODS Hypersil 100 x 2.1 mm 5 µm et la PFP Propyl 50 x 2.1 mm 5 µm a donné les chromatogrammes illustré dans la figure 5.1.

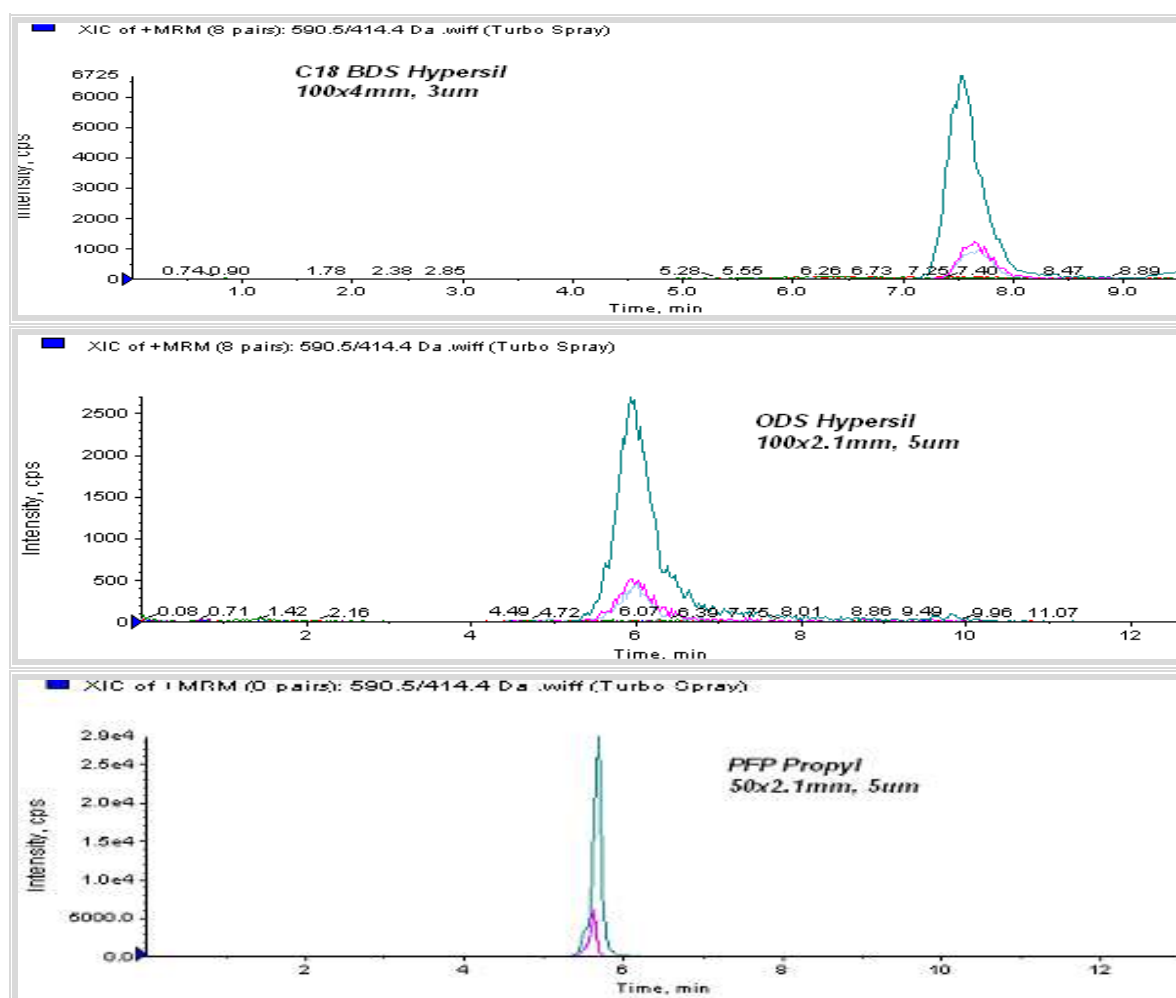


Figure 5.1 : Chromatogrammes du mélange d'étalon BUP et d'étalon interne BUP-D4 analysé avec les trois colonnes C₁₈ BDS, ODS et PFP Propyl.

L'efficacité d'une colonne de chromatographie peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques qu'elle possède. Plus le nombre de plateau est élevé, plus la colonne est efficace.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad \text{Eq 5.2}$$

t_r : temps de rétention ;

w: largeur du pic à la base.

Le tableau 5.3 regroupe le temps de rétention, la largeur du pic à la base et le nombre de plateaux théoriques pour les trois colonnes utilisées.

Tableau 5.3 : résultats de calcul du nombre de plateaux théoriques.

Colonne	t_r (min)	w (min)	N
ODS Hypersil	5,95	0,75	1007
C ₁₈ BDS Hypersil	7,45	0,45	4385
PFP Propyl	5,58	0,11	41172

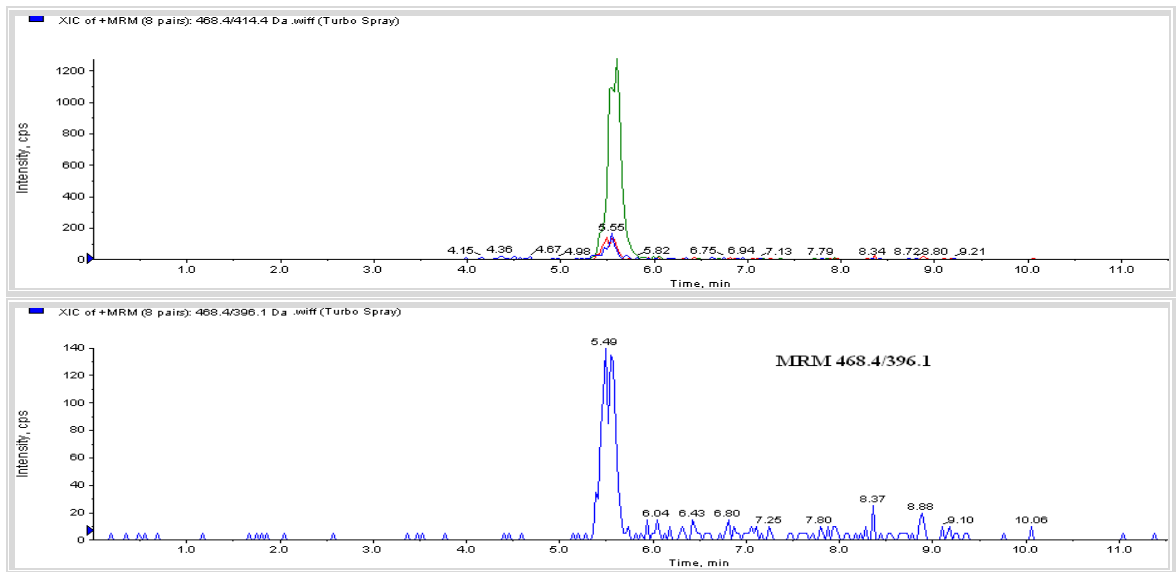
Au vu de ces résultats La colonne PFP Propyl a donné la plus grande efficacité, et par conséquent pour le reste de notre travail nous avons opté pour la colonne PFP Propyl.

5.3.2. Choix de la phase d'extraction

Deux échantillons de plasmas négatifs chargés à une concentration de 1ng/ml de buprénorphine sont préparés selon le protocole décrit dans le paragraphe 5.2.4 en utilisant deux colonnes d'extractions SPE C₈ et C₁₈, puis analysés. La figure 5.2 illustre deux chromatogrammes des deux échantillons extraits avec les deux phases C₈ et C₁₈.

La comparaison entre les deux surfaces du pic buprénorphine des deux échantillons extraits avec les deux colonnes d'extraction C₈ et C₁₈, nous a permis de constater que la phase C₁₈ a donné un meilleur rendement d'extraction.

a



b

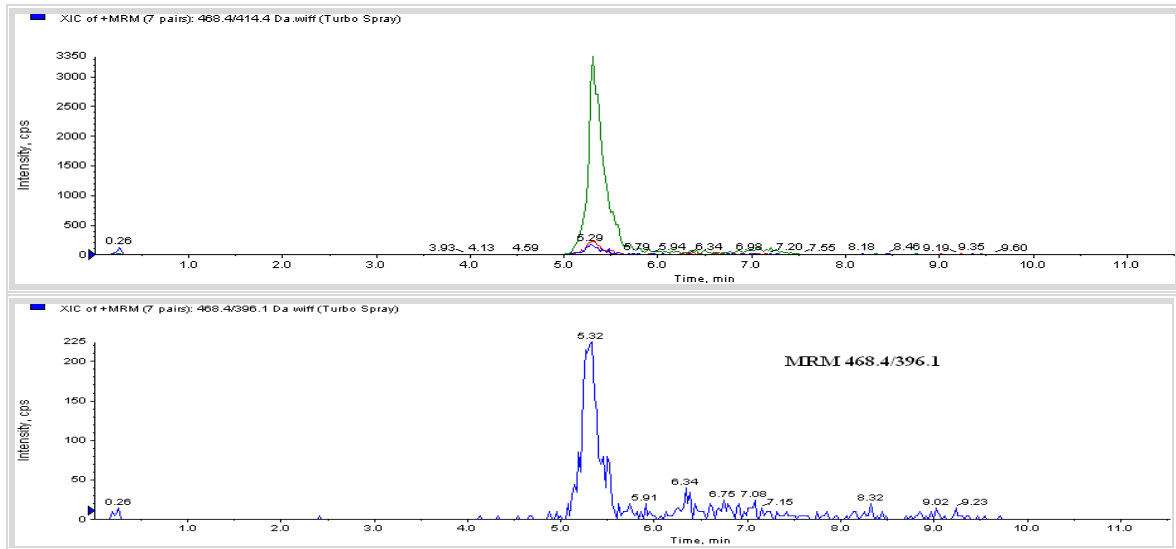


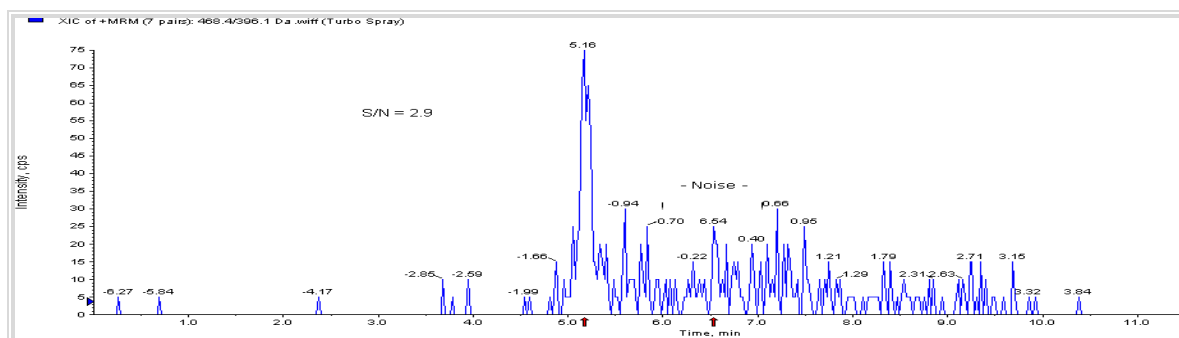
Figure 5.2 : Chromatogramme d'échantillons extraits avec la phase C₈ (a) et C₁₈ (b)

5.3.3. Validation de la méthode

5.3.3.1. Limites de détection et de quantification

L'analyse des échantillons de plasma chargé aux concentrations égales à 2, 1 et 0,5ng/ml, nous a permis le calcul et la comparaison du signal par rapport au bruit de fond (S/N), en utilisant l'intégrateur du logiciel. L'estimation de S/N est illustrée dans la figure 5.3.

a



b

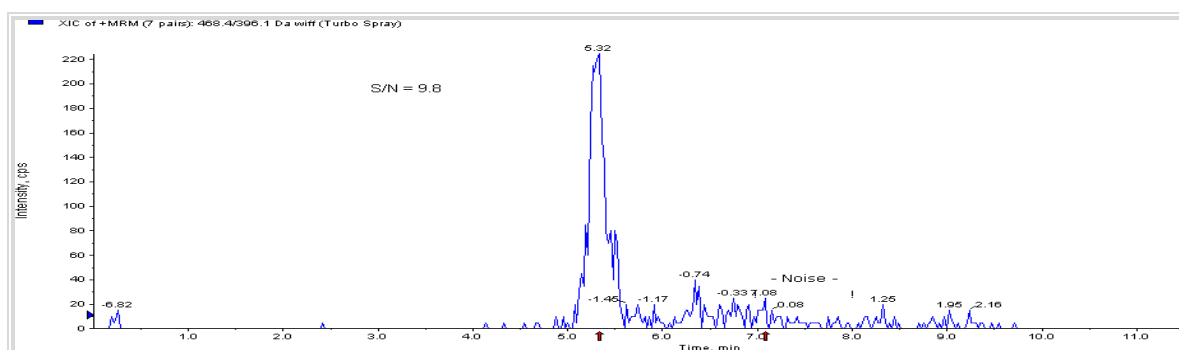


Figure 5.3 : Chromatogrammes de la limite de détection (a) et la limite de quantification (b).

Le calcul de S/N en utilisant le logiciel a révélé qu'à la concentration de 0,5 ng/ml, le S/N est égal à 2,9 et à la concentration de 1 ng/ml S/N est égal à 9,8, ce qui nous amène par conséquent à estimer la limite de détection comme étant égale à 0,5 ng/ml et la limite de quantification comme étant égale à 1 ng/ml.

Les résultats d'analyse de six différents échantillons de plasma chargé à la concentration de 1ng/ml (LOQ), avec le rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4 sont regroupés dans le tableau 5.4.

Tableau 5.4 : Résultats d'analyse de limite de quantification.

Echantillon	1	2	3	4	5	6
S _{BUP}	3753,4295	5054,6571	1810,4642	1614,7104	3848,8228	5517,92079
S _{BUP-D4}	39489	48007	16414	13064	41909	51665
Y	0,09505	0,10529	0,1103	0,1236	0,09183762	0,10680191

S_{BUP} : Surface du pic buprénorphine.

S_{BUP-D4} : Surface du pic d'étalon interne standard buprénorphine-D4

Y : rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4.

La limite de quantification estimée à travers le calcul de l'écart type relatif.

% RSD est égal à 10,79% (< 20%).

5.3.3.2. Linéarité

L'analyse d'une série répétée trois fois d'échantillons de plasma chargé aux concentrations comprises entre 1 et 10 ng/ml a donné les surfaces du pic de la buprénorphine (BUP) et les surfaces du pic buprénorphine D4 (BUP-D4). Les résultats sont regroupés dans le tableau 5.5.

Tableau 5.5 : Résultats de linéarité

X	Echantillon 1		Echantillon 2		Echantillon 3	
	S_{BUP}	S_{BUP-D4}	S_{BUP}	S_{BUP-D4}	S_{BUP}	S_{BUP-D4}
0	73,7808	38832	81,0634	36847	78,4852	34124
1	3753,4295	39489	5054,6571	48007	1810,4642	16414
2,5	9700,4304	40368	16089	67124	18952	75779
4	32161	78467	38320	88477	39455	86838
5	16957	30753	5652,8011	10305	8119,5325	15583
6,5	14506	21614	11215	16023	14747	21671
9	20305	19806	20157	20774	25369	26988
10	21047	19845	32961	28424	11032	10419

X (ng/ml) : concentration plasmatique en buprénorphine.

En utilisant les résultats du tableau 5.5 nous pouvons calculer le rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4, la moyenne de ces rapports, l'écart type et %RSD. Les résultats de calcul figurent dans le tableau 5.6.

Y_1 , Y_2 et Y_3 : les trois résultats de rapport de surface du pic BUP sur la surface du d'étalon interne BUP-D4.

Y_{moy} : la moyenne des rapports de surface.

Tableau 5.6 : Résultats de calcul de linéarité

X (ng/ml)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y _{moy}	Ecart type	%RSD
0	0,0019	0,0022	0,0023	0,0021	0,0002	9,7578
1	0,0951	0,1053	0,1103	0,1036	0,0077	7,4800
2,5	0,2403	0,2397	0,2501	0,2434	0,0058	2,3992
4	0,4099	0,4331	0,4543	0,4324	0,0222	5,1355
5	0,5514	0,5485	0,5211	0,5403	0,0167	3,0943
6,5	0,6711	0,6999	0,6805	0,6838	0,0147	2,1477
9	1,0252	0,9703	0,94	0,9785	0,0432	4,4137
10	1,1066	1,1596	1,0588	1,1083	0,0504	4,5494

La courbe d'étalonnage représentée en figure 5.4 correspond à la régression linéaire entre le rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4 et la concentration plasmatique en buprénorphine avec un coefficient de corrélation égal à $R = 0.9993$ et un coefficient de détermination $R^2 = 0.9987$.

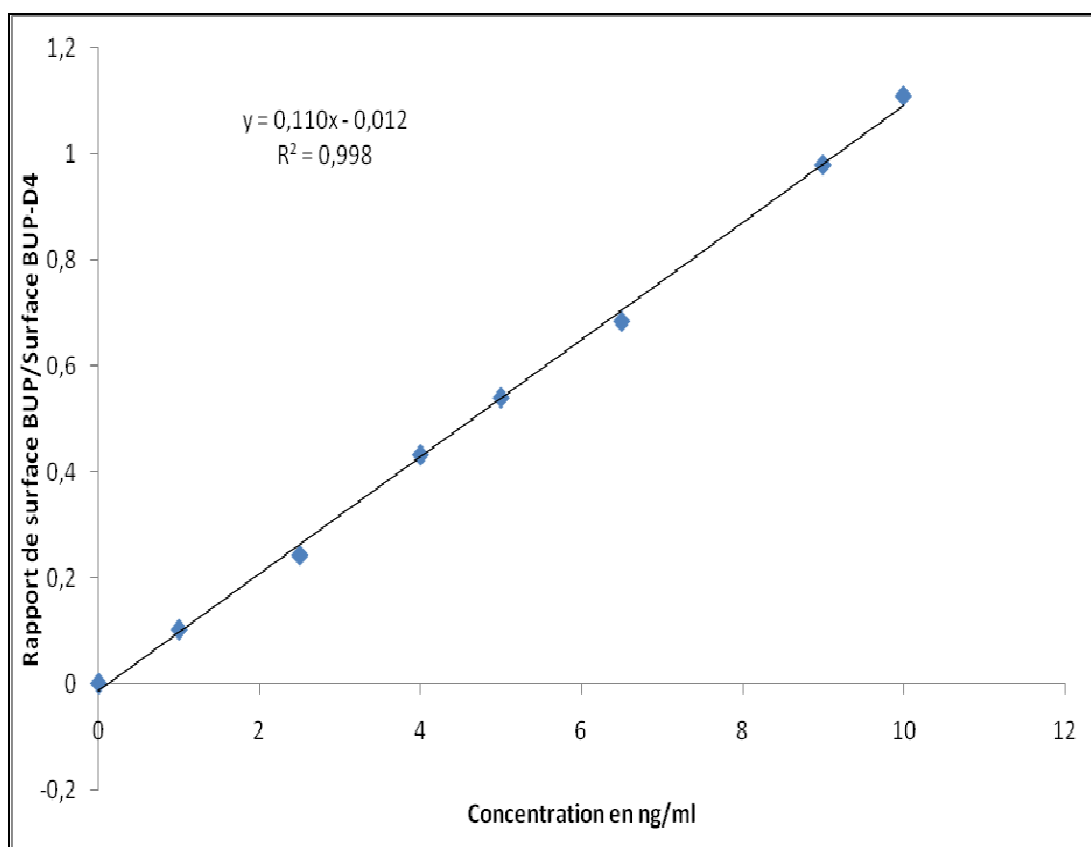


Figure 5.4 : Courbe d'étalonnage

L'équation de linéarité est représentée par la relation :

$$Y = a X + b \quad \text{Eq 5.3}$$

a (pente) = 0.1103

b (ordonnée à l'origine) = -0.0124

Y : rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4.

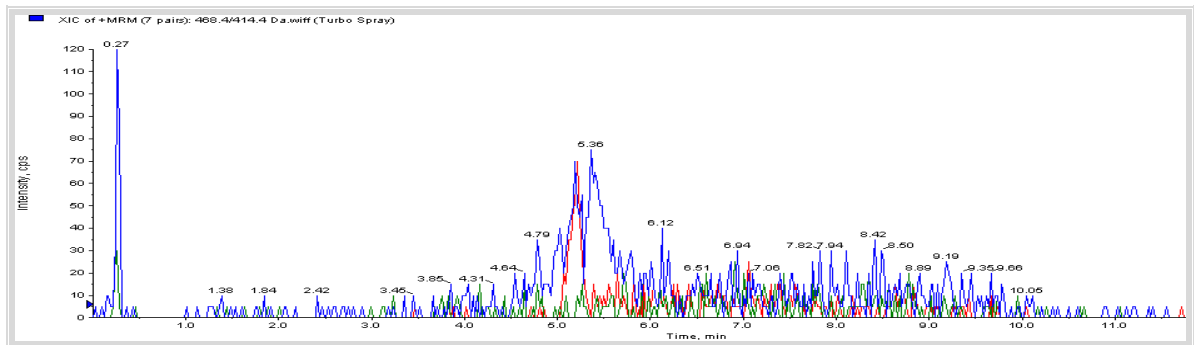
X : concentration plasmatique en buprénorphine (ng/ml).

Nous avons obtenu une bonne linéarité dans l'intervalle de concentration plasmatique entre 1 à 10 ng/ml ($R^2 = 0.9987$).

5.3.3.3. Spécificité

La spécificité est évaluée en analysant six différents négatifs plasmas. La figure 5.5 illustre le chromatogramme d'un plasma négatif et d'un plasma chargé avec une concentration égale à 1ng/ml de buprénorphine.

a



b

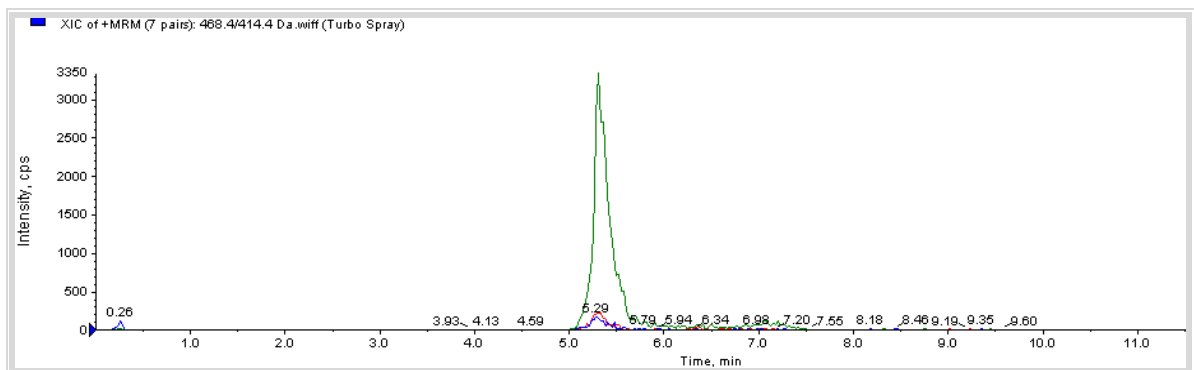


Figure 5.5 : Chromatogrammes d'un plasma négatif(a), et d'un plasma chargé (b).

En comparant le signal attribué aux temps de rétention de la buprénorphine ou de l'étalon interne buprénorphine D4 pour les deux chromatogrammes de plasma négatif et de plasma chargé à une concentration égale à 1 ng/ml, nous remarquons qu'aucun pic significatif par rapport à limite de détection (LOQ est égale à 1ng/ml) n'est observé. Cette recherche montre que la méthode est spécifique.

5.3.3.4. Rendement d'extraction et exactitude

Les essais du rendement d'extraction et d'exactitude sont réalisés avec un plasma négatif, un plasma négatif chargé à la concentration minimale, moyenne et maximale de la courbe d'étalonnage et d'échantillons d'étalons a des concentrations similaires aux plasmas chargés, les résultats sont regroupés dans le tableau 5.7 et le tableau 5.8.

Tableau 5.7 : Résultats d'analyse de plasma négatif chargé

X	Echantillon 1		Echantillon 2		Echantillon 3	
	S _{BUP}	S _{BUP-D4}	S _{BUP}	S _{BUP-D4}	S _{BUP}	S _{BUP-D4}
0	73,7808	38832	81,0634	36847	78,4852	34124
1	3753,4295	39489	5054,6571	48007	1810,4642	16414
5	16957	30753	5652,8011	10305	8119,5325	15583
10	21047	19845	32961	28424	11032	10419

Tableau 5.8 : Résultats d'échantillons d'étalons

X	Echantillon 1		Echantillon 2		Echantillon 3	
	S _{BUP}	S _{BUP-D4}	S _{BUP}	S _{BUP-D4}	S _{BUP}	S _{BUP-D4}
1	2422,5051	22083	3436,8808	28451	3551,483	33410
5	8687,1768	15198	16599	30197	23906	42371
10	20890	18420	28949	25947	13301	11642

A titre de rappel, les équations utilisées pour le calcul de l'exactitude sont :

$$Exactitude = \left(\frac{(C_1 - C_2)}{C} \right) \times 100 \quad \text{Eq 5.1}$$

C_1 : Concentration du plasma chargé.

C_2 : Concentration du plasma négatif.

C : Concentration ajoutée.

$$Y = a X + b$$

Eq 5.3

a (pente) = 0.1103

b (ordonnée à l'origine) = -0.0124

Y : rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4.

X : concentration plasmatique en buprénorphine (ng/ml).

En utilisant les résultats qui figurent dans les tableaux 5.7 et 5.8, ainsi que les deux équations 5.1 et 5.3 nous avons calculé le rendement d'extraction et l'exactitude. Les résultats sont illustrés dans le tableau 5.9.

Tableau 5.9 : Résultats de calcul du rendement d'extraction et d'exactitude

X (ng/ml)	Y _{moy}	ET	% R	C	Exactitude
0	0,0021	-	-	0,13179066	-
1	0,1036	0,1123	92,25	1,05187457	92,01
5	0,5403	0,5618	96,17	5,01050159	97,57
10	1,1083	1,1307	98,02	10,1593455	100,28

Y_{moy} : la moyenne du rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4 (échantillon de plasma négatif chargé).

ET: la moyenne du rapport de surface du pic d'échantillon d'étalon buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4 (échantillon d'étalon).

% R : pourcentage du rendement d'extraction.

C : concentration théorique calculée en utilisant l'équation 5.3.

Exactitude : calculée en utilisant l'équation 5.1.

Au vu des résultats nous pouvons affirmer que nous avons obtenu un bon rendement d'extraction avec la procédure d'extraction en phase solide (>90%), avec exactitude supérieur à 90%.

5.3.3.5. Fidélité et répétabilité

Les résultats des analyses de plasma négatif chargé à la concentration moyenne préparée six fois nous ont permis de calculer le rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4. Le tableau 5.10 sont regroupés les résultats de la répétabilité.

Tableau 5.10 : Résultats la répétabilité.

Echantillon	1	2	3	4	5	6
S _{BUP}	16957	5652,8011	8119,5325	24058	22601	12992
S _{BUP-D4}	30753	10305	15583	45419	44256	24190
Y	0,5514	0,5485	0,5211	0,5297	0,5107	0,5371

En utilisant les résultats du tableau 5.10 nous pouvons calculer la moyenne des rapports, l'écart type et % RSD.

La moyenne des rapports est égale à 0.5331.

L'écart type est égal à 0.016.

Le % RSD est égal à 2.96%.

Les résultats des analyses de plasma négatif chargé à la concentration moyenne préparée six fois nous pendant cinq jours ont permis de calculer le rapport de surface du pic buprénorphine sur la surface de l'étalon interne buprénorphine D4. Le tableau 5.11 sont regroupés les résultats de la fidélité inter journalière.

Tableau 5.11 : Résultats de la fidélité inter journalière.

	Echantillon	1	2	3	4	5	6
Jour 1	S _{BUP}	16957	5652,8011	8119,5325	24058	22601	12992
	S _{BUP-D4}	30753	10305	15583	45419	44256	24190
	Y	0,5514	0,5485	0,5211	0,5297	0,5107	0,5371
Jour 2	S _{BUP}	19304	17103	14904	17865	22601	18452
	S _{BUP-D4}	33192	30558	25249	31256	40153	35753
	Y	0,5816	0,5597	0,5903	0,5716	0,5629	0,5161
Jour 3	S _{BUP}	20541	13093	24547	10838	18216	14459
	S _{BUP-D4}	40258	23941	42302	19807	33853	25751
	Y	0,5102	0,5469	0,5803	0,5472	0,5381	0,5615
Jour 4	S _{BUP}	9366,9579	20342	14834	22376	8164,5785	19940,237
	S _{BUP-D4}	18381	36305	29247	43391	16803	33952
	Y	0,5096	0,5603	0,5072	0,5157	0,4859	0,5284
Jour 5	S _{BUP}	15522	7782,5791	17246	25229	17121	13752
	S _{BUP-D4}	26847	15248	30903	50168	31284	25491
	Y	0,5782	0,5104	0,5581	0,5029	0,5473	0,5395

En utilisant les résultats du tableau 5.11, nous pouvons calculer, la moyenne des rapports, l'écart type et % RSD.

La moyenne des rapports est égale à 0.5350.

L'écart type est égal à 0.0398.

Le % RSD est égal à 7.45%.

L'écart type relatif pour les résultats de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire est inférieur à 10%. Nous avons obtenus des résultats de la fidélité et répétabilité satisfaisants.

5.3.3.6. Reproductibilité

Les essais de la reproductibilité auraient nécessité un travail en conjonction avec un autre laboratoire muni d'un même équipement, ce qui n'était pas possible de le réaliser dans les conditions actuelles.

CONCLUSION

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure qu'après l'évaluation des performances de cette méthode d'analyse LC-MS/MS, qu'elle peut être appliquée pour l'analyse de la buprénorphine dans le plasma humain. Les caractéristiques principales peuvent être récapitulées comme suit :

- Une bonne sensibilité avec une limite de détection LOD égale à 0,5 ng/ml et une limite de quantification LOQ égale à 1 ng/ml avec un % RSD inférieur à 20%
- Une bonne linéarité dans l'intervalle de concentrations comprises entre 1 et 10 ng/ml avec un coefficient de détermination R^2 égal à 0,998.
- Une fidélité et répétabilité satisfaisantes avec un écart type relatif inférieur à 10%.

A partir des résultats de la spécificité, du rendement d'extraction et d'exactitude, nous pouvons conclure que l'extraction en phase solide SPE utilisée est une méthode d'extraction spécifique pour la buprénorphine dans le plasma humain puisque aucune interférence endogène n'a été signalée, avec un bon rendement d'extraction supérieur à 90% et une exactitude supérieur à 92%.

L'identification de la buprénorphine dans le plasma humain après extraction en phase solide SPE et l'analyse par LC/MS/MS équipée d'une source d'ionisation électrospray, nous permet de conclure qu'au moment du crime si l'individu était sous l'effet de la buprénorphine ou non.

Enfin, il est important de signaler qu'il reste à valider une méthode pour la détermination de la buprénorphine et son majoritaire métabolite norbuprénorphine dans les urines pour mettre en évidence la consommation de la buprénorphine.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1. Structure de la buprénorphine	12
Figure 1.2. Métabolites de la buprénorphine	14
Figure 2.1. Les quatre étapes constituant une extraction en phase solide	16
Figure 3.1. Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide	19
Figure 3.2. Schéma de principe d'un spectromètre de masse	20
Figure 3.3. Mécanisme d'ionisation en électrospray	22
Figure 3.4. Schéma d'un spectromètre de masse en tandem	23
Figure 3.5. L'analyse MS/MS en mode MRM	23
Figure 5.1. Chromatogrammes du mélange Standard BUP et Standard interne BUP-D4 analysé avec les trois colonnes C ₁₈ BDS, ODS et PFP Propyl.	32
Figure 5.2. Chromatogramme d'échantillons extraits avec la phase C ₈ et C ₁₈	34
Figure 5.3. Chromatogrammes de la limite de détection et la limite de quantification	35
Figure 5.4. Courbe de linéarité	37
Figure 5.5. Chromatogrammes d'un plasma négatif et d'un plasma chargé	38
Tableau 2.1. Exemple de quelques phases stationnaires classées en fonction de leurs polarités	17
Tableau 5.1. Réactifs chimiques utilisés	28
Tableau 5.2. Transitions MRM de la BUP et BUP-D	30
Tableau 5.3. Résultats de calcul du nombre de plateau théorique	33
Tableau 5.4. Résultats d'analyse de limite de quantification	35
Tableau 5.5. Résultats de linéarité	36

Tableau 5.6. Résultats de calcul de linéarité	37
Tableau 5.7. Résultats d'analyse de plasma négatif chargé	39
Tableau 5.8. Résultats d'analyse des échantillons d'étalons	39
Tableau 5.9. Résultats de calcul du rendement d'extraction et d'exactitude	40
Tableau 5.10. Résultats de la répétabilité	41
Tableau 5.11. Résultats de la fidélité inter journalière	41