

## Article original / Original article

# Mise en place d'une méthode semi-quantitative en toxicologie clinique par UHPLC-PDA en utilisant une extraction SPE en micro-élution

## *Establishment of a UHPLC-PDA semi-quantitative method in clinical toxicology using a SPE micro-elution extraction*

Dominique Chen<sup>1</sup>, Salim Bouchene<sup>2,\*</sup>, Nouredine Sadeg<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> UFR Biomédicale, Université Paris Descartes, Rue des Saints-Pères, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Biosciences, Uppsala University, Husargatan 3, 75123 Uppsala, Suède

<sup>3</sup> Laboratoire de Toxicologie, Centre Hospitalier René Dubos, 6 avenue d'Île de France, 95303 Pontoise, France

<sup>4</sup> AFPreMed, Groupe de Recherche Toxicologique, 9 rue du Pr Antoine Baisset, 31000 Toulouse, France

**Résumé – Objectifs :** Une méthode semi-quantitative en toxicologie clinique a été développée utilisant une extraction par micro-élution en phase solide suivie d'une analyse par un système de chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à une spectrométrie UV-visible à barrettes de diodes (PDA) (UHPLC-PDA). Cette étude a été réalisée sur 122 molécules médicamenteuses en respectant les recommandations de la norme NF EN ISO 15189. **Méthodes :** Parmi différentes cartouches SPE (*Solid-Phase Extraction*) testées, la cartouche Strata<sup>®</sup>-X a été sélectionnée pour ses meilleurs rendements d'extraction. Un protocole d'extraction manuelle à partir de plasma sanguin a été mis en place pour 3 concentrations (0,1 mg/L, 1 mg/L et 10 mg/L) avec le méthanol comme solvant d'élution. La séparation sur UHPLC a été réalisée avec un gradient de phase mobile acétate d'ammonium 5 mM/acétonitrile (ACN) (85/15 ; V/V) à pH 3,8 ± 0,05 et d'ACN sur une colonne BEH C18 1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm avec un débit de 0,45 mL/min. Les analytes ont été détectés par PDA (190–400 nm). **Résultats :** Les rendements d'extraction étaient satisfaisants de même que la précision (CV% répétabilité < 6,54 %). Les CV inter-essais étaient élevés (CV > 15 % pour certaines molécules) mais diminuaient lorsqu'ils étaient rapportés aux 2 étalons internes (flurazépam et prazépam). La semi-quantification s'est faite à l'aide de 2 facteurs de réponses et les LOD et LOQ ont été comparées aux valeurs thérapeutiques ou toxiques. **Conclusion :** La méthode décrite est simple et rapide. Les résultats ont montré la capacité de la cartouche Strata<sup>®</sup>-X à extraire des molécules appartenant à plusieurs classes pharmacologiques avec des propriétés physico-chimiques différentes.

**Mots clés :** Screening, SPE, UHPLC-PDA, toxicologie clinique, micro-élution

**Abstract – Objectives:** A semi-quantitative method in clinical toxicology was developed using an extraction with a micro-elution solid phase (SPE) followed by an analysis with an Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array system (UHPLC-PDA). The study was performed on 122 medicinal compounds according to the recommendations of the NF EN ISO 15189. **Methods:** After testing different SPE cartridges, the Strata<sup>®</sup>-X cartridge was selected based on its better extraction yields. A manual extraction protocol from plasma was set up for 3 concentrations (0.1 mg/L, 1 mg/L and 10 mg/L) with methanol as the eluting solvent. UHPLC analysis was performed with a mobile phase gradient of ammonium acetate 5 mM/Acetonitrile (ACN) (85/15, v/v) at pH 3.8 ± 0.05 and ACN on a BEH column C18 1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm. The flow rate was 0.45 mL/min and the analytes were detected by PDA (190–400 nm). **Results:** Extraction yields were satisfactory, as well as the precision (repeatability CV% < 6.54%). Inter-assay CVs were high (CV > 15% for a few molecules) but were less significant when relativized by the two internal standards (flurazepam and prazepam). The semi-quantification was achieved with the support of two endpoints, and LOD and LOQ values were compared with therapeutic or toxic values. **Conclusion:** The method described is simple

\* Correspondance : Salim Bouchene, [salim.bouchene@gmail.com](mailto:salim.bouchene@gmail.com)

and fast. The results showed the ability of the Strata<sup>®</sup>-X to extract molecules belonging to several classes of drugs with different physicochemical properties.

**Key words:** Screening, extraction, SPE, UHPLC-PDA, clinical toxicology

Reçu le 26 août 2012, accepté après modifications le 24 septembre 2013

Publication en ligne le 10 décembre 2013

## 1 Introduction

Les admissions au service des urgences pour cause d'intoxications médicamenteuses sont de plus en plus fréquentes. Les substances médicamenteuses sont à l'origine de la plupart des intoxications, qu'elles soient volontaires ou accidentelles [1] : elles peuvent être dues à une forte absorption lors de tentatives de suicide ou au non-respect des doses médicamenteuses prescrites (erreur de posologie) et souvent à une ingestion accidentelle par les enfants. Parmi les substances les plus fréquemment rencontrées dans les intoxications, deux classes de médicaments : les analgésiques (11,5 %) et les sédatifs et hypnotiques (6,0 %) [2]. De même, les intoxications constituent la seconde cause de morbidité et mortalité aux États-Unis avec plus de 2,4 millions de cas d'exposition à des toxiques chaque année [3]. Enfin un récent rapport britannique considère que les hospitalisations dues aux intoxications sont aussi nombreuses que celles dues aux infarctus du myocarde [4]. Les analyses toxicologiques ont donc un rôle essentiel lors de la prise en charge d'une intoxication médicamenteuse permettant un diagnostic précoce et une prise en charge optimisée. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes analytiques pour l'identification et la quantification de ces molécules toxiques. Le centre hospitalier de Pontoise (Val d'Oise, France) recueille annuellement environ 1000 cas d'intoxications et ce nombre est en constante augmentation. À ce jour, il existe de nombreuses techniques d'identification et de quantification de nombreuses substances médicamenteuses et drogues telles que la chromatographie liquide, gazeuse ou encore des méthodes immuno-enzymatiques avec différents types de détecteurs comme l'UV-visible, la SM et la fluorescence. Chacune de ces méthodes analytiques présente ses avantages et ses limites (rapidité, sensibilité, spécificité, coût...) et chaque laboratoire est équipé différemment selon ses moyens et ses besoins [5–11].

L'analyse et le dosage de xénobiotiques au laboratoire de Biochimie-Toxicologie du centre hospitalier de Pontoise se fait par HPLC couplée à une spectrométrie de masse en tandem. Pour une recherche globale de toxiques, la technique analytique utilisée est l'UHPLC couplée à la spectrophotométrie UV-visible à barrettes de diodes (PDA). Ces deux méthodes sont précédées d'une étape d'extraction en phase solide (SPE). En effet, l'une des étapes les plus importantes dans le processus analytique est la préparation des échantillons. Ces derniers subissent souvent un traitement avant analyse afin d'isoler les toxiques des autres constituants présents dans les liquides biologiques. L'objectif est de réduire au maximum les interférents afin d'éviter que la matrice n'influe sur le rapport signal/bruit de fond et la qualité des pics chromatographiques, les valeurs de limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ). Cette étape d'extraction permet de purifier et de concentrer

les analytes avant leur injection dans la colonne chromatographique [7, 8]. L'extraction en phase solide est une méthode performante de préparation des échantillons. Elle est de plus en plus utilisée dans les laboratoires surtout pour les analyses toxicologiques du fait notamment de son faible coût, sa rapidité et sa facilité d'utilisation [9]. À ce titre, les industriels s'engagent davantage dans l'innovation de nouveaux supports pour des recherches larges ou des recherches de plus en plus ciblées de toxiques et ce, pour diverses matrices. Ainsi, des cartouches permettant une extraction-concentration sans étape d'évaporation ont été mises au point [12, 13]. Ces cartouches utilisent la méthode de la micro-élution avec un volume de prise d'essai du spécimen biologique qui est plus important que le volume de solvant d'élution. Les laboratoires de biologie médicale sont soumis à la norme NF EN ISO 15 189, notamment, la SH GTA 04 – SH FORM 43 qui oblige chaque laboratoire à valider et/ou à vérifier les méthodes analytiques utilisées [14–16]. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de mettre en place une méthode d'analyse semi-quantitative par UHPLC rapide et efficace afin d'apporter une aide au clinicien dans son diagnostic. La mise en place de cette méthode semi-quantitative a nécessité, tout d'abord, de définir le protocole de préparation des échantillons. L'étude a porté sur un total de 122 molécules médicamenteuses.

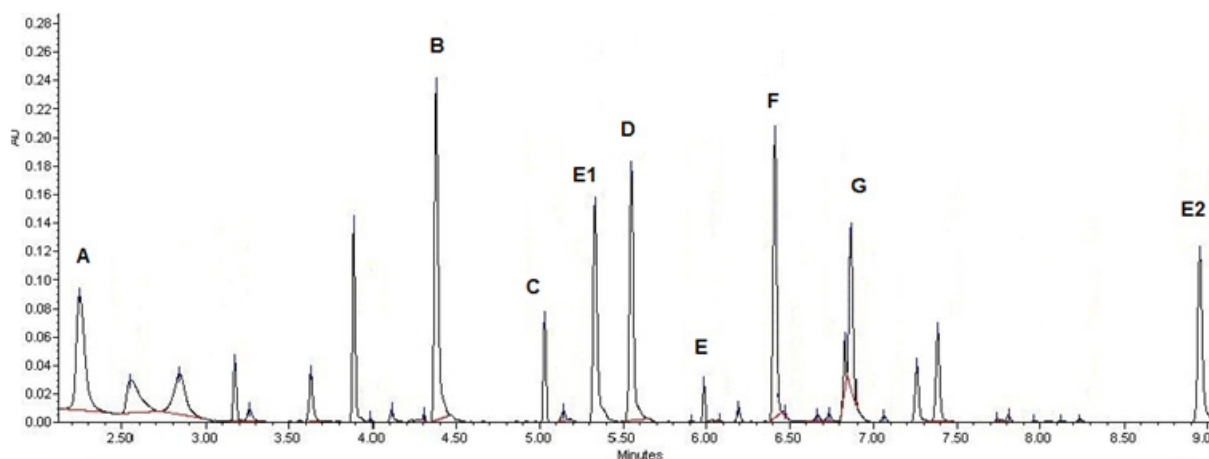
## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Choix des substances

D'après le registre des examens de toxicologie du laboratoire de Biochimie-Toxicologie de l'hôpital de Pontoise, les toxiques les plus fréquemment retrouvés au cours des quatre dernières années sont les benzodiazépines, les barbituriques, les antidépresseurs, le paracétamol, les phénothiazines (neuroleptiques), ainsi que les stupéfiants. La liste des molécules utilisées dans cette étude se base sur ce registre.

### 2.2 Matériels et réactifs

Les solvants utilisés pour la préparation des solutions et pour l'analyse chromatographique sont tous de qualité HPLC, LC-MS : méthanol (VWR Prolabo<sup>®</sup>, France), eau (VWR Prolabo<sup>®</sup>, France), ACN (VWR Prolabo<sup>®</sup>, France). Les pools de sérum et plasma utilisés proviennent de patients dont l'absence de molécules d'intérêt a été au préalable vérifiée par UHPLC après une extraction en phase solide avec Oasis HLB<sup>®</sup>. Les substances médicamenteuses analysées proviennent de LGC Standards<sup>®</sup> (Molsheim, France). Ces substances sont les suivantes : 11 OH THC, 6 MAM, 7-amino clonazépam, 7-amino



**Fig. 1.** Exemple d'un chromatogramme avec 7 molécules étudiées à 1 mg/L et les 2 étalons internes E1 et E2, obtenu par PDA Max Plot 190–800 nm. A : Benzoylécgonine ; B : Papaverine ; C : Fentanyl ; D : Chlordiazépoxide ; E : Sécobarbital ; F : Alprazolam ; G : Naproxène.

flunitrazépam, 9-OH rispéridone, acébutolol, alimémazine,  $\alpha$ -OH alprazolam,  $\alpha$ -OH midazolam, alprazolam, amisulpride, amitriptyline, amphétamine, aripiprazole, aténolol, benzoylécgonine, bétaxolol, bipéridène, bisoprolol, bromazépam, buflo médil, buprénorphine, carbamazépine, chlordiazépoxide, chloroquine, citalopram, clobazam, clomipramine, clonazépam, clotiazépam, clozapine, cocaéthylène, cocaïne, codéine, cyamémazine, désipramine, desméthyl flunitrazépam, dexchlorphéniramine, dextropropoxyphène, diacétylmorphine, diazépam, dihydrocodéine, diltiazem, dompéridone, doxylamine, duloxétine, éphédrine, estazolam, éthylmorphine, fentanyl, flunitrazépam, fluoxétine, flurbiprofène, fluvoxamine, furosémide, glibornuride, gliclazide, halopéridol, hydrochlorothiazide, hydroquinidine, hydroxyzine, ibuprofène, imipramine, kétamine, levomépromazine, lidocaïne, lorazépam, lormétazépam, loxapine, maprotiline, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, médifoxamine, méprobamate, metamphétamine, méthadone, méthylphénidate, miansérine, midazolam, milnacipran, mirtazapine, modafinil, N-desméthyl clomipramine, nadolol, naproxène, nicotine, nitrazépam, norbuprénorphine, nordazépam, nortriptyline, olanzapine, oxazépam, papavérine, paroxétine, phénobarbital, pholcodine, propranolol, quinine, rispéridone, scopolamine, sécobarbital, sertraline, spironolactone, sufentanyl, sulphuride, témazépam, tétrazépam, théophylline, thiopental, tianeptine, triazolam, trimétazidine, trimipramine, urapidil, valproate, venlafaxine, viloxazine, zolpidem, zopiclone et zuclopenthixol.

### 2.3 Préparation des échantillons

Les molécules sont soit achetées dissoutes dans du méthanol et de l'acétonitrile selon leur stabilité de conservation soit achetées en poudre puis dissoutes dans le méthanol (VWR Prolabo<sup>®</sup>, France) lors de la phase de préparation des échantillons. La concentration des solutions mères est de 1 mg/mL ou 0,1 mg/mL et sont conservées à la température de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les solutions de travail sont préparées à partir des solutions mères à 1 mg/mL ou 0,1 mg/mL. Avec un nombre important de molécules à tester, les solutions de travail ont été préparées

à partir de mélanges de plusieurs molécules à trois concentrations : 0,1 mg/L, 1 mg/L et 10 mg/L. Ces molécules ont été choisies en fonction de leur temps de rétention afin d'éviter les phénomènes de co-élution (figure 1).

Les échantillons injectés tels quels dans l'UHPLC sont dilués dans de l'eau LCMS à des concentrations de 1 mg/L et 10 mg/L. Avant la phase d'extraction solide (SPE), les échantillons sont dilués dans du plasma humain aux trois concentrations mentionnées ci-dessus, puis laissés au repos pendant une heure avant centrifugation (Thermo Scientific Heraeus<sup>®</sup> Pico 17) à 7500 rpm durant 10 min.

À partir des solutions mères à 1 mg/mL, une solution constituée de deux étalons internes a été préparée par dilution du flunitrazépam et du prazépam au  $1/20^{\circ}$  dans du méthanol, soit à une concentration de 50 mg/L. Les étalons internes sont ajoutés à raison de 20  $\mu\text{L}$  par échantillon, soit une concentration unique à 1 mg/L.

Les solutions mères et les étalons internes sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le pourcentage de méthanol dans les échantillons ne doit pas dépasser 10 % du volume total.

### 2.4 L'extraction SPE

Deux systèmes d'extraction en phase solide basés sur le même principe ont été utilisés : le système d'extraction utilisé pour les tests avec Oasis HLB<sup>®</sup> sur plaque est un système manuel par pression négative (Waters<sup>®</sup>, USA) relié à une pompe à vide. Il est composé d'une plaque 96 puits, d'un support et d'une plaque collectrice. Pour les différents types de cartouches utilisés lors des essais, un système d'extraction manuel par pression négative (Supelco Visiprep DL, pompe à vide Gast DOA-V161-BN, MFG.Corp., USA) a été utilisé. Celui-ci est composé d'une cuve en verre avec un couvercle percé d'orifices sur lesquels sont fixées les cartouches. Afin de sélectionner la cartouche SPE utilisée pour l'étude des 122 molécules, plusieurs adsorbants ont été testés et comparés. S'agissant d'une analyse globale de toxiques, un protocole unique a été établi pour toutes les cartouches, se limitant aux SPE de types polymériques en phase inverse. Les différents supports solides utilisés sont : Oasis HLB<sup>®</sup> (Waters, USA), 2 mg,

**Tableau I.** Gradient d'élution. L'éluant A1 est un tampon acétate (contenant 5 mM d'acétate d'ammonium et d'acétonitrile (85/15) (v/v), ajusté à pH 3,8 ± 0,05 par de l'acide chlorhydrique). L'éluant B1 est de l'acétonitrile.

<i>t</i> (min)	Débit (mL/min)	A1 (%)	B1 (%)
2,40	0,45	100,0	0,0
2,80	0,45	89,0	11,0
11,0	0,45	25,0	75,0
13,0	0,45	25,0	75,0
13,5	0,45	100,0	0,0
16,5	0,45	100,0	0,0

30 µm ; Sola® (Thermo Scientific, USA), 10 mg ; Strata®-X RP (Phenomenex, France), 10 mg, 33 µm et Strata®-X-N Drug RP (Phenomenex, France), 10 mg, 100 µm.

Lors de la procédure d'extraction la colonne est conditionnée par 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau avec une aspiration rapide. Un volume de 700 µL d'échantillon est alors déposé dans la cartouche. L'aspiration se fait lentement car l'échantillon doit passer goutte à goutte dans la cartouche afin que l'extraction soit efficace. La colonne est ensuite rincée et séchée à forte aspiration (-15 mmHg) pendant 3 min. Enfin, l'échantillon est élué 2 fois avec 100 µL de méthanol LC-MS. L'extrait est collecté dans un flacon transparent et prêt à être analysé par UHPLC-PDA.

## 2.5 L'analyse UHPLC-PDA

L'Acquity® (Waters, USA) utilise un système de détection à barrettes de diodes PDA. La séparation des composés s'est faite sur une colonne Acquity® UHPLC BEH C18 1,7 µm 2,1 mm × 150 mm (Waters, USA). L'élution des composés s'est faite avec un gradient de phase mobile détaillé dans le tableau I. L'identification des composés s'est faite par comparaison des spectres des composés élués ainsi que leur temps de rétention avec ceux des standards stockés dans une bibliothèque interne. Le détecteur PDA mesure l'absorbance des molécules sur tout le spectre UV-visible (190–400 nm pour cette méthode).

La colonne est chauffée à 50 °C, le débit est de 0,45 mL/min, la durée d'une analyse de 16 min et le volume de solution injecté de 5 µL. Le système d'acquisition et le traitement de toutes les données ont été réalisés avec le logiciel Empower pro 2® (Waters, USA).

Afin de sélectionner la cartouche d'extraction en SPE micro-élution, un pool de plasma contenant 7 molécules à une concentration de 1 mg/L (milnacipran, venlafaxine, flurazépam, imipramine, clobazam, diazépam et prazépam) a été constitué. L'évaluation de la performance d'extraction de 4 cartouches SPE a été menée en se basant sur le rendement d'extraction avec la méthode d'extraction avec Oasis HLB® comme référence. Les tests ont été réalisés comme indiqué dans le tableau II. Des facteurs de concentration comparables (rapport : Volume de prise d'essai/Volume d'élution) ont été choisis pour toutes les extractions, soit un facteur de concentration de 3,75 pour l'Oasis HLB et 3,5 pour les autres.

Les rendements d'extraction ont été calculés comme le rapport de l'aire de la molécule extraite sur l'aire de la

**Tableau II.** Protocole d'extraction Oasis HLB®, Sola® et Strata®.

Adsorbant SPE	Oasis HLB®	Sola®/Strata-X®/ Strata-X-N Drug®
Matrice	Plasma 1 mg/L	Plasma 1 mg/L
Volume prise d'essai	300 µL	700 µL
Eau distillée	300 µL	
EXTRACTION		
Conditionnement	Méthanol 1 volume	Méthanol 1 mL
Équilibration	Eau 1 volume	Eau 1 mL
Chargement	Plasma préparé	Plasma préparé
Lavage	Eau 1 volume	Eau 1 mL
Élution	2 × 40 µL de méthanol	2 × 100 µL de méthanol
Injection	5 µL	5 µL

molécule non extraite multiplié par le facteur de concentration. Le résultat est alors multiplié par 100 afin d'obtenir un pourcentage. Les aires des 2 étalons internes ont également été utilisées dans le développement de cette méthode de semi-quantification. Ces derniers permettent de vérifier la répétabilité de l'injection mais aussi la qualité de l'extraction. Leurs aires doivent être supérieures à 100 000 (en unité d'absorbance). Cette valeur limite a été fixée après plusieurs essais d'extraction et témoigne de la qualité d'extraction. La semi-quantification a été caractérisée par des facteurs de réponse (FR) (équations 1 et 2) plutôt que des courbes d'étalonnage. Ces facteurs de réponse sont calculés en se basant sur les 3 extraits à 1 mg/L, de la manière suivante :

$$FR1 = \text{Aire de la molécule} / \text{Aire du flurazépam} \quad (1)$$

$$FR2 = \text{Aire de la molécule} / \text{Aire du prazépam} \quad (2)$$

À partir des FR calculés (tableau IV), il est alors possible d'estimer la concentration d'une molécule *i* (équations (3) et (4)) dans un échantillon plasmatique de la manière suivante :

$$C_i \text{ échantillon} = (FR1_i \text{ échantillon} / FR1_i) \times 1 \text{ mg/L} \quad (3)$$

$$C_i \text{ échantillon} = (FR2_i \text{ échantillon} / FR2_i) \times 1 \text{ mg/L} \quad (4)$$

Avec *i*, étant le nom de la molécule présente dans un échantillon plasmatique dont on cherche à estimer la concentration.

Par ailleurs, le rapport (FR<sub>*i*</sub> échantillon / FR<sub>*i*</sub>) a été multiplié par la concentration de 5 mg/L pour les 5 molécules suivantes : cocaïne, héroïne, maprotiline, sécobarbital et sulpiride. Si les aires obtenues sont supérieures à un million (en unité d'absorbance), une nouvelle analyse par UHPLC est effectuée en diluant l'échantillon et en diminuant le volume d'injection.

La limite de détection (LOD) est la plus petite concentration d'analytes pouvant être détectée et identifiée par l'Acquity® mais non quantifiée par la méthode de dosage développée dans cette étude. La limite de quantification (LOQ) est quant à elle la plus petite concentration pouvant être quantifiée par la méthode de dosage développée. Elle est égale à une aire de 10 000 (en unité d'absorbance), car correspondant aux limites instrumentales acceptables du PDA.

**Tableau III.** Résultats en pourcentage des rendements (RE%) d'extraction de 7 molécules par Oasis HLB<sup>®</sup>, Sola<sup>®</sup>, Strata-X<sup>®</sup> et Strata-X-N Drug<sup>®</sup>.

	Oasis HLB <sup>®</sup>	Sola <sup>®</sup>	Strata-X <sup>®</sup>	Strata-X-N Drug <sup>®</sup>
	RE %	RE %	RE %	RE %
Milnacipra	>100		>100	>100
Venlafaxin	>100	>100	>100	>100
Flurazépam	92,3	>100	>100	>100
Imipramine	>100	34,2	>100	97,8
Clobazam	>100	>100	>100	>100
Diazépam	>100	>100	>100	>100
Prazépam	>100	>100	>100	>100

### 3 Résultats

Toutes les molécules sont extraites et détectées avec l'Oasis HLB<sup>®</sup> et les Strata<sup>®</sup> (tableau III). En revanche, une perte de milnacipran est apparue lors de la phase d'extraction Sola<sup>®</sup>. La cartouche Strata<sup>®</sup>-X a montré le meilleur rendement d'extraction pour toutes les molécules tests. Par conséquent, l'étude des 122 molécules a été réalisée en utilisant la Strata<sup>®</sup>-X pour l'extraction des échantillons.

Les rendements d'extraction ont été calculés à partir des échantillons plasmatiques à 1 mg/L ( $n = 3$ ) et à 10 mg/L ( $n = 1$ ). Une moyenne absolue des aires a été calculée pour la concentration à 1 mg/L. Les rendements d'extractions pour chaque molécule sont présentés dans le tableau IV. L'extraction sur SPE avec la cartouche Strata<sup>®</sup>-X RP a permis d'extraire la majorité des molécules avec des rendements d'extractions satisfaisants à l'exception des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (flurbiprofène, ibuprofène, naproxène) et l'aripiprazole (52,19 % à 1 mg/L et 22,27 % à 10 mg/L). Certaines molécules telles qu'aténolol, bipéridène, cocaïne, héroïne, maprotiline et sulpiride n'ont pas été détectées à 1 mg/L. Elles ont ainsi été réétudiées à 5 mg/L.

La répétabilité (reproductibilité intra-essai) a été évaluée en répliquant l'analyse ( $n = 3$ ) à partir d'un même extrait à 1 mg/L.

La reproductibilité inter-essais a été déterminée en répliquant l'analyse sur 3 extraits différents ( $n = 3$ ) à 1 mg/L (ou à 5 mg/L pour 5 des molécules étudiées mentionnées ci-dessus). Ces 2 paramètres sont quantifiés par un coefficient de variation (CV) considéré comme acceptable jusqu'à 15 %. Les résultats obtenus pour les molécules testées dans cette étude sont dans l'ensemble acceptables avec des CV intra-essai variant de 0,07 à 6,54 %. En revanche, les CV inter-essais sont plus variables dépassant pour certaines molécules la limite d'acceptation de 15 % (tableau IV).

La moyenne et les coefficients de variation (CV) ont été calculés pour les FR1 et FR2 pour chaque molécule testée (tableau IV).

Les résultats sont acceptables pour la plupart des molécules sauf pour 11OHTHC, aripiprazole, cocaïne, désipramine, duloxétine, fentanyl, flurbiprofène, loxapine, méthadone, phénobarbital, sécobarbital et triazolam.

Concernant le citalopram ( $Tr$  (min) :  $5,46 \pm 25$  %), seul le FR2 est calculé car cette molécule co-éluee avec l'étalon interne 1, le flurazépam ( $Tr$  (min) :  $5,56 \pm 25$  %).

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont présentées dans le tableau IV.

### 4 Discussion

Les inconvénients de la SPE avec un système d'extraction manuel sont les débits de percolation, d'élution et le séchage des cartouches qui sont difficilement contrôlables. Ceci peut expliquer les variations d'extractions observées d'où l'intérêt d'utiliser des étalons internes qui permettent de s'en affranchir. En effet, les variations absolues des aires sont parfois importantes comme en témoignent les CV inter-essais (CV > 15 % pour 30 molécules) mais sont moins importantes lorsque l'on normalise par les aires des étalons internes (CV pour l'un des deux FR > 15 % pour 17 molécules et CV pour les deux FR > 15 % pour 8 molécules).

Les rendements à 1 mg/L et 10 mg/L pour chaque molécule sont majoritairement similaires et supérieurs à 100 %. Le fait de procéder en deux fois à l'étape d'élution permet d'améliorer le rendement d'extraction. D'autre part, le volume récupéré après élution des composés d'intérêt n'est pas identique pour chaque extraction et est toujours inférieur au volume d'élution qui est de 200  $\mu$ L. Ceci peut contribuer à surestimer le rendement d'extraction obtenu lors du dosage des échantillons. Ainsi, il est difficile de comparer les rendements d'extraction obtenus dans ce travail avec ceux trouvés dans la littérature car de nombreux protocoles d'extraction diffèrent de celui employé dans cette étude. Dans le cas présent, l'extrait recueilli après élution est injecté tel quel dans la colonne UHPLC alors que dans la littérature, l'échantillon à injecter nécessite souvent une préparation au préalable (évaporation de l'extrait puis reprise dans un solvant avec un volume défini) [18, 20, 22]. Ainsi, le protocole de micro-élution développé dans cette étude, permet d'extraire les analytes dans la phase d'élution avec un volume inférieur à celui de la prise d'essai. Il s'agit donc d'une extraction-concentration. La SPE a pour avantage d'être automatisable, ce qui n'est pas le cas des méthodes d'extraction liquide-liquide. Ainsi il serait possible de pallier aux problèmes liés aux systèmes manuels et permettre une meilleure reproductibilité à chaque étape de la phase d'extraction [20]. Au final, la colonne Strata<sup>®</sup>-X a été préférée à l'Oasis HLB<sup>®</sup>, dans sa configuration micro-élution pour une raison majeure : l'absence de colmatage de la cartouche Strata<sup>®</sup>-X lors des essais réalisés avec du sang de cadavre ou du sérum ou du plasma présentant un aspect propice à un bouchage de la cartouche. Dans un travail antérieur [20], cet avantage était plutôt retrouvé pour la cartouche Oasis HLB<sup>®</sup>, mais dans sa configuration conventionnelle et non celle en micro-élution. Le méprobamate, le valproate et la nicotine ne figurant pas dans la bibliothèque interne, ont été dilués dans du méthanol à 10 mg/L et analysés par UHPLC. Cependant, ces trois molécules n'ont pas pu être détectées. Le méprobamate et le valproate sont des molécules non aromatiques qui absorbent dans le proche infrarouge et non pas dans l'UV [21, 25]. Pour la nicotine, l'hypothèse est faite qu'elle présente un temps de rétention assez court qui fait qu'elle est éluee assez tôt de la colonne et n'est ainsi pas détectée du fait des co-élutions avec les composants organiques du sérum/plasma tels que les acides organiques. Les valeurs obtenues pour LOD et LOQ

**Tableau IV.** Résultats obtenus pour les 122 molécules : rendements d'extraction (RE%), LOD, LOQ, précision (intra et inter-essais CV%, FRI CV% et FR2 CV%) et facteurs de réponse (FRI et FR2).

Tr (min) ± 25	Molécule	Concentrations thérapeutiques/ toxiques* (mg/L)	RE% 1 mg/L ou 5 mg/L**	RE% 10 mg/L	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Intra-essai CV%	Inter-essais CV%	FRI CV%	FR2 CV%
10,33	11 OH THC		>100	>100	0,3	1	0,130	12,2	0,880	23,0
1,51 et 1,59	6 MAM		56,1	48,1	0,3	1	1,39	14,2	0,340	5,52
3,77	7-Amino		>100	>100	0,03	0,1	1,64	3,90	1,00	6,86
	Clonazépam									
4,11	7-Amino Flunitrazépam		>100	>100	0,03	0,1	0,240	14,8	1,23	6,77
4,11	9-OH Risperidone	0,011-0,14	>100	>100	0,1	1	0,490	10,9	0,520	9,00
3,33	Acébutolol	Létale > 13	>100	>100	0,1	1	0,290	5,45	1,20	1,64
6,37 et 6,29	Alimémazine	0,050-0,40	>100	99,3	0,1	1	0,110	13,8	0,540	14,0
5,89	α-OH Alprazolam		>100	>100	0,03	0,1	0,0700	4,26	1,37	4,35
5,93	α-OH Midazolam		>100	>100	0,1	1	1,02	9,30	0,940	1,51
6,52	Alprazolam	0,020-0,055	>100	>100	0,03	0,1	0,530	20,6	1,03	3,09
2,12	Amisulpride	0,050-0,60	>100	59,1	0,3	1	2,50	17,9	0,340	9,97
6,49	Amtripyline	0,075-0,225	>100	>100	0,2	1	1,71	13,3	0,620	7,17
1,65	Amphétamine	0,020-0,050	>100	>100	0,1	1	0,220	5,54	0,630	5,44
6,21	Aripiprazole	0,00010-0,00025	52,2	22,3	0,3	1	3,04	21,3	0,0490	16,2
0,92	Aténolol	0,20-0,60	-	>100						
2,29	Benzoyllecgonine		>100	>100	0,03	0,1	0,830	20,0	1,07	2,56
5,37	Bétaxolol		87,3	>100	0,3	1	0,120	15,7	0,190	12,9
6,32	Bipéridène		-	>100						
4,77	Bisoprolol		>100	>100	0,3	1	0,370	2,97	0,320	1,86
5,33	Bromazépam	0,10-0,20	>100	>100	0,03	0,1	0,180	4,50	1,17	0,280
3,94	Buflomédil		>100	>100	0,1	1	0,410	7,12	0,640	0,960
6,44	Buprénorphine	0,00050-0,0010 ; 0,0010-0,029*	>100	92,2	0,1	1	3,45	22,9	0,120	14,2
5,72	Carbamazépine	4,0-12	>100	>100	0,03	0,1	0,270	8,79	1,23	10,0
6,28	Chlordiazépoxide	1,0-2,0 ; 5,5*	>100	>100	0,03	0,1	0,620	16,2	1,08	2,66
1,48	Chloroquine	0,12-0,34	>100	97,7	0,3	1	0,270	13,3	0,640	4,55
5,46	Citalopram	0,030-0,13	>100	>100	0,1	1	0,730	6,43		0,720
7,06	Clobazam	0,50-1,2	>100	>100	0,03	0,1	0,380	3,00	1,61	5,37
7,08	Clomipramine	0,10-0,25	>100	>100	0,1	1	1,72	23,4	0,120	15,2
6,41	Clonazépam	0,030-0,080	>100	>100	0,1	1	1,83	8,00	0,830	2,56
8,47	Clofazépam	0,10-0,70	>100	>100	0,1	1	0,380	4,77	0,760	3,10
5,52	Clozapine	0,084-1,09	>100	>100	0,1	1	0,0400	3,69	0,740	2,44
4,73	Cocaéthylène		>100	>100	0,1	1	0,920	8,42	0,360	2,96
4,04	Cocaine	>1,0* >1,1*	>100**	>100	0,5	5	0,520**	11,1**	4,51**	33,5
1,29	Codéine (méthylmorphine)		42,0	>100	0,1	1	2,73	20,8	0,196	11,2
2,38	Codéthylène (éthylmorphine)		>100	>100	0,1	1	3,74	21,6	0,159	10,9
6,22	Cyamémazine	1,8*	>100	>100	0,03	0,1	0,480	13,7	0,400	4,98
6,13	Désipramine	0,12-0,30	>100	>100	0,1	1	0,400	22,6	0,270	23,0
5,95	Desméthyl Flunitrazépam		>100	>100	0,1	1	0,800	6,17	0,850	4,22
4,77	Dexchlorphéniramine		>100	>100	0,1	1	0,280	23,1	0,690	13,4
6,54	Dextropropoxyphène	0,20	>100	>100	0,1	1	0,250	7,75	0,250	16,5
3,82	Diacétylmorphine (Héroïne)	0,010-0,50	62,3**	90,8	0,5	5	0,640**	34,2**	1,46**	17,6

Tableau IV. Continued.

Tr (min) ± 25	Molécule	Concentrations thérapeutiques/ toxiques* (mg/L)	RE% 1 mg/L ou 5 mg/L**	RE% 10 mg/L	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Intra-essai CV%	Inter-essais CV%	FR1 CV%	FR2 CV%	FR2 CV%	
7,80	Diazépam	0,5-2,5 ; 5,0-20*	>100	>100	0,03	0,1	0,410	4,20	1,10	7,32	1,16	9,06
1,45	Dihydrocodéine		>100	>100	0,1	1	0,570	7,89	1,50	4,68	1,88	6,07
5,64 et 4,87	Diltiazem	0,050-0,20	>100	>100	0,1	1	1,67	14,79	0,580	1,70	0,650	2,59
4,57	Dompéridone		>100	>100	0,03	0,1	0,200	16,66	2,10	6,97	2,46	8,18
4,063	Doxylamine	0,070-0,20	>100	>100	0,03	1	1,87	5,27	0,350	3,62	0,400	5,71
6,19	Duloxétine		>100	>100	0,1	1	1,11	27,32	0,360	31,6	0,390	31,2
1,30	Éphédrine	0,020-0,080	>100	>100	0,1	1	0,600	10,57	0,440	7,07	0,460	5,34
6,23	Estazolam	0,055-0,20	>100	>100	0,03	0,1	0,410	8,72	1,26	3,72	1,59	4,81
5,05	Fentanyl	0,0010-0,010 (analgésie) ; > 0,020*	>100	>100	0,1	1	2,04	34,93	0,265	20,3	0,319	17,8
6,68	Flunitrazépam	0,0025-0,015 ; 0,020-0,050*	>100	>100	0,1	1	1,69	6,01	0,630	11,6	0,720	10,8
6,67	Fluoxétine	0,040-0,15 ; > 3,0*	>100	>100	0,1	1	6,54	15,9	0,620	5,02	0,700	2,27
7,90	Flurbiprofène	50 mg 8,0-9,4	22,9	60,1	0,1	1	0,270	10,4	0,0900	17,3	0,100	19,3
6,30	Fluvoxamine		>100	>100	0,1	1	0,220	14,0	0,270	6,14	0,280	7,86
4,99	Furosémide	1,0-2,0	>100	>100	0,03	0,1	0,140	14,1	1,31	7,83	1,54	10,9
8,24	Glibornuride		>100	>100	0,1	1	0,430	9,65	0,320	9,96	0,350	10,3
7,50	Gliclazide		>100	>100	0,1	1	0,500	3,78	0,360	2,44	0,410	2,84
5,66	Halopéridol	0,0060-0,044	>100	>100	0,1	1	0,910	9,34	0,260	2,50	0,330	3,45
1,51	Hydrochlorothiazide	2,0	70,8	68,6	0,1	1	1,038	11,88	0,523	5,77	0,675	9,13
4,05	Hydroquinidine		>100	>100	0,1	1	0,160	9,73	0,590	10,4	0,660	12,4
6,34	Hydroxyzine		>100	>100	0,1	1	0,250	10,0	0,320	5,45	0,380	5,73
8,74	Ibuprofène	>20*	-	>100								
6,22	Imipramine	0,15-0,25	>100	>100	0,1	1	2,13	10,5	0,250	1,58	0,280	0,600
2,82	Kétamine	Voie IV 4 mg/kg 6,3	>100	>100	0,1	1	1,02	2,11	1,17	7,33	1,35	6,82
6,47	Levomépromazine	0,030-0,15	86,3	69,9	0,1	1	0,26	3,35	0,340	7,82	0,370	7,29
3,16	Lidocaine	1,5-5,0	>100	>100	0,1	1	2,04	10,9	1,76	0,480	1,88	2,53
6,34	Lorazépam	0,050-0,24 ; 1,2*	>100	>100	0,03	0,1	0,880	4,39	0,930	2,13	1,00	2,54
7,15	Lormétazépam	0,0010-0,020	>100	>100	0,03	0,1	1,29	15,0	1,17	2,42	1,33	4,73
6,05	Loxapine		>100	>100	0,1	1	0,330	22,1	0,240	18,1	0,290	13,9
6,34	Maprotiline	0,20-0,60	>100**	>100	0,5	1	0,620**	21,7**	4,29**	8,18	4,91**	8,66
3,20	MBDB		>100	>100	0,1	1	0,260	6,06	1,63	1,31	1,87	3,72
1,77	MDA		>100	>100	0,04	0,1	0,990	9,57	1,98	4,13	2,22	3,54
2,63	MDEA		87,7	>100	0,04	0,1	0,230	11,4	1,38	15,6	1,59	14,4
2,01	MDMA (ecstasy)		>100	>100	0,04	0,1	0,590	9,43	1,94	3,31	2,44	4,28
5,84	Médifoxamine		>100	>100	0,1	1	1,95	27,4	0,129	11,8	0,146	13,0
1,93	Metamphétamine	0,020-0,030	>100	>100	0,04	0,1	0,230	19,3	0,570	10,6	0,660	12,7
6,92	Méthadone	0,10-0,75 ; > 2,0*	>100	>100	0,3	1	52,4	60,6	0,260	68,1	0,300	70,3
3,497	Méthylphénidate	0,0050-0,040	69,3	>100	0,3	1	5,23	2,73	0,170	6,40	0,200	8,54
5,54	Miansérine	0,10 ; > 0,50*	>100	>100	0,1	1	0,400	14,3	0,550	8,27	0,610	6,53
6,70	Midazolam	0,080-0,25	>100	>100	0,1	1	0,210	6,94	0,880	6,74	0,940	7,11
4,37	Milnacipran	0,10-0,30	>100	>100	0,1	1	0,480	0,48	0,530	5,82	0,660	6,15
4,10	Mirtazapine	0,010-10	>100	>100	0,1	1	1,63	22,1	0,739	11,8	0,789	10,6
5,22	Modafinil		>100	>100	0,1	1	0,190	10,9	1,49	11,5	1,80	16,0

Tableau IV. Continued.

Tr (min) ± 2.5	Molécule	Concentrations thérapeutiques/ toxiques* (mg/L)	RE% 1 mg/L ou 5 mg/L**	RE% 10 mg/L	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Intra-essai CV%	Inter-essais CV%	FR1 CV%	FR2 CV%
6,74	N-Desméthyl Clomipramine		>100	>100	0,1	1	0,510	9,96	0,130	0,150
1,69	Nadolol		>100	>100	0,03	0,1	1,32	9,18	1,72	1,98
7,01	Naproxène	>0,050	44,2	28,7	0,1	1	0,850	14,8	0,630	0,760
6,11	Nitrazépam	0,030-0,12	>100	>100	0,03	0,1	0,840	7,53	0,910	1,03
4,33	Norbuprénorphine		>100	>100	0,03	1	0,530	4,13	0,940	1,06
7,01	Nordazépam	0,10-0,50	>100	>100	0,03	0,1	1,44	16,6	1,45	1,55
6,60	Nortriptyline	0,050-0,15	>100	>100	0,1	1	0,340	23,0	0,280	0,350
3,69	Olanzapine	0,0020-0,12	49,3	>100	0,1	1	0,900	11,4	0,210	0,220
6,16	Oxazépam	0,20-1,4	>100	>100	0,03	0,1	0,210	15,3	1,47	1,66
4,38	Papavérine		>100	>100	0,03	0,1	2,40	20,5	1,31	1,58
6,02	Paroxétine	0,070-0,15 ; 1,0*	>100	>100	0,3	1	3,72	26,5	0,0700	0,0700
4,40	Phénobarbital	15-40 ; 40-60*	>100	>100	0,3	1	0,450	11,9	0,810	12,3
0,72	Pholcodine	0,50	>100	>100	0,3	1	0,300	2,30	0,540	0,610
5,05	Propranolol	0,030-0,20	>100	>100	0,03	0,1	0,150	12,4	1,14	1,29
4,42	Quinine	2,5-9,6	>100	>100	0,03	0,1	0,380	16,7	0,530	7,13
4,76	Risperidone	0,0050-0,027	>100	>100	0,1	1	2,07	9,00	0,190	0,200
1,77	Scopolamine	0,00089	>100	>100	0,1	1	0,900	7,67	0,410	0,510
5,97	Séobarbital	3,0-5,0	>100**	>100	0,5	1	0,800**	9,66**	2,49**	11,3
6,89	Sertraline	0,030-0,19	67,9	>100	0,1	1	5,55	13,6	0,500	10,7
7,93	Spironolactone		>100	>100	0,1	1	0,520	8,49	0,380	0,440
5,97	Sufentanyl	0,00050-0,0010	>100	>100	0,1	1	1,31	12,0	0,230	0,240
1,059	Sulpuride	0,40-0,60	>100**	>100	0,5	2	0,470**	1,79**	5,80**	22,5
6,92	Témazépam	0,30-0,90	>100	>100	0,1	1	0,390	1,73	1,22	2,29
8,79	Tétrazépam	0,050-0,60	>100	>100	0,1	1	0,160	15,7	0,770	0,900
1,07	Théophylline	5,0-10	-	>100						
6,77 et 6,91	Thiopental	En respiration spontanée, toxique > 7,0 ; en ventilation assistée toxique > 100	> 100	> 100	0,1	1	0,270	3,35	1,05	3,42
6,65	Tianeptine		>100	>100	0,1	1	0,630	10,8	0,570	11,7
6,61	Triazolam	0,0040-0,017 ; 0,0070-0,080*	>100	>100	0,03	0,1	0,880	8,84	1,28	1,54
2,39	Trimétazidine		>100	>100	0,03	0,1	0,630	5,15	1,41	1,54
6,68	Trimipramine	0,15-0,25	>100	>100	0,1	1	3,32	12,6	0,270	0,280
3,30	Urapidil		>100	>100	0,1	1	0,140	14,0	1,02	3,33
4,56	Venlafaxine	0,20-0,40	>100	>100	0,1	1	0,480	12,9	0,660	0,830
3,64	Viloxazine		>100	>100	0,1	1	0,290	6,52	1,02	0,200
4,72	Zolpidem	0,060-0,12 ; 0,90-3,3*	>100	>100	0,03	0,1	0,957	18,4	1,40	7,69
3,45	Zopiclone	0,070-0,13 ; 0,70-3,5*	92,0	>100	0,1	1	0,210	9,84	0,190	0,200
7,26 et 7,43	Zuclopenthixol	2,8-12 µg/L ; dose orale 20 mg/j	>100	93,6	0,1	1	0,450	1,64	0,340	0,370
	Méprobamate	10-25 ; 80-120*								
	Nicotine	>0,050*								
	Valproate	50-150								

\* : Concentrations toxiques (mg/L).

\*\* : Les valeurs sont calculées pour une concentration de 5 mg/L et non pas de 1 mg/L. Les cases vides indiquent l'absence de données.

Étalons internes :

E1 : Tr-Flurazépam (min) : 5,56.

E2 : Tr-Prazépam (min) : 9,17.



des molécules qui co-éluent, notamment au début du chromatogramme, sont faibles. Du fait de cette co-élution, l'aténolol n'a pas pu être détecté. Ces obstacles auraient pu être levés par l'utilisation d'une détection par spectrométrie de masse. Cependant, le choix d'une détection en UV-PDA a été délibérément opéré dans l'optique d'une utilisation en routine 24 h/24 h par l'ensemble du personnel.

La qualité des pics chromatographiques était satisfaisante avec des pics fins et séparés pour la majorité des molécules. Cependant, les pics obtenus pour olanzapine, codéthyline, codéine et amisulpride étaient dédoublés. L'ensemble des molécules était dilué dans du plasma humain et non dans un solvant tel que le méthanol ou l'eau. La première explication possible de ce dédoublement est que ces molécules pourraient être liées à un contre ion (par exemple Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) modifiant ainsi leur solvatation et donc leur élution. Dans ces cas, l'aire prise en compte pour le calcul des rendements et des FR est la somme des aires des deux pics. D'autre part, un pic dédoublé peut indiquer une mauvaise séparation des molécules. Ainsi, il se peut que pour ces molécules, il y ait un mélange de deux composés de structures voisines tels que des isomères altérant la qualité des pics chromatographiques. D'autant plus que la colonne chromatographique utilisée dans le cadre de cette étude n'est pas une colonne chirale, donc les énantiomères ne sont pas séparés.

Hydrochlorothiazide et 6 MAM ont été co-éluées avec des composés présents dans le plasma notamment avec les métabolites de la caféine. Leurs temps de rétention sont assez proches : 1,51 min pour 6 MAM, 1,59 min pour hydrochlorothiazide et 1,51 min et 1,40 min, pour les métabolites caféine. L'ensemble des plasmas utilisés dans cette analyse contenait des métabolites de la caféine en quantité plus ou moins importante. De ce fait, afin de calculer le rendement et les FR de ces molécules, elles ont été diluées dans de l'eau puis extraites suivant le même protocole d'extraction. Les pics chromatographiques obtenus à 1 mg/L étaient dédoublés. Il n'a pas été possible d'investiguer davantage sur ce problème car cela aurait nécessité une modification complète du protocole d'extraction (en changeant par exemple la composition et le volume des solvants, le pH et les solutions tampons) ce qui n'était pas l'objectif premier de cette étude. En effet, il ne s'agissait pas dans ce travail d'optimiser une méthode pour une molécule en particulier ou une classe de molécules. Le but était plutôt de travailler avec un protocole unique sur un grand nombre de molécules ayant des propriétés physico chimiques différentes et voir ainsi quels composés étaient extraits avec la Strata<sup>®</sup>-X. De plus, le problème de dédoublement des pics n'était observé que pour 6 molécules sur un total de 119 molécules testées.

Le détecteur PDA mesure simultanément l'absorbance sur plusieurs longueurs d'ondes et permet une identification des molécules en comparant le temps de rétention et le spectre acquis avec les données stockées dans la bibliothèque interne. Cependant, il présente des difficultés à identifier des composés co-élués et à différencier distinctement une molécule de ses métabolites (en particulier si ces derniers ont un temps de rétention proche ou un spectre similaire). De ce fait, lors des essais les molécules ont judicieusement été choisies (en fonction des temps de rétention) pour constituer les solutions de travail afin de s'affranchir d'éventuelles co-élutions sur le tracé

chromatographique. Les 7 molécules utilisées pour évaluer la performance des 4 cartouches SPE ont été choisies pour cette même raison.

De plus, la semi-quantification ne serait pas possible en présence de ces phénomènes de co-élution. Pour certaines molécules (alprazolam, carbamazépine, furosémide, paroxétine, tétrazépam), la LOD et la LOQ obtenues étaient supérieures aux concentrations thérapeutiques ou aux concentrations toxiques [23,24]. Des méthodes plus sensibles utilisant la spectrométrie de masse pourraient remédier à ces problèmes et permettraient notamment l'identification des molécules co-éluées, leur quantification et la diminution des LOD et LOQ [25–28].

Dans la littérature, plusieurs procédures analytiques utilisant la SPE ont porté leur choix sur la cartouche Strata<sup>®</sup>-X du fait des meilleurs résultats obtenus par rapport aux autres cartouches SPE. Cependant, il est difficile de comparer ces résultats obtenus avec ceux obtenus dans la présente étude du fait de la différence de matrice [29, 30].

## 5 Conclusion

Ce travail a permis de mettre au point une méthode d'analyse semi-quantitative simple et rapide à mettre en œuvre. Les solvants utilisés pour la préparation des échantillons avant analyse par UHPLC-PDA sont l'eau et le méthanol. À l'exception de trois composés (méprobamate, valproate et nicotine) qui ne sont pas détectés à l'UHPLC-PDA, toutes les molécules testées ont été extraites avec des rendements d'extraction satisfaisants et ce, avec un protocole unique.

La méthode décrite a montré une reproductibilité intra-essai et inter-essais satisfaisante après normalisation par les deux étalons internes. La semi-quantification se fait avec deux facteurs de réponses calculés pour chaque molécule et comparés aux valeurs thérapeutiques ou toxiques. Les niveaux de concentrations données aux cliniciens se feront avec un système de « + ». L'étude des molécules a montré la capacité de la cartouche Strata<sup>®</sup>-X à extraire un large éventail de molécules (stupéfiants, benzodiazépines, antidépresseurs, neuroleptiques, antiarythmiques, antalgiques, antidiabétiques, diurétiques) aux propriétés physicochimiques différentes. Ceci constitue un des points essentiels dans le screening toxicologique. Afin de valider cliniquement la méthode, il faudrait effectuer des tests avec des sérums contrôles qualité titrés et avec des échantillons plasmatiques de patients en pratique réelle.

## Références

1. Goullé JP, Lhermitte M, Bartholi M, Boyer JC, Capolaghi B, Charlier C, Danel V, Desch G, Feuillu A, Flouvat B, Mathieu B, Nisse P, Sadeg N, Szymanowicz A. Biomarqueurs de toxicité et anomalies métaboliques dans les principales intoxications graves. *Symptomatologie clinique et toxique. Le prélèvement conservatoire.* Ann Toxicol Anal. 2003; 15(3): 208–212.
2. Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR Jr, Green JL, Rumack BH, Dart RC. *2010 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 28th Annual Report.* Clin Toxicol (Phila). 2011; 49: 910–941.

3. Marraffa JM, Cohen V, Howland MA. Antidotes for toxicological emergencies: a practical review. *Am J Health Syst Pharm.* 2012; 69: 199–212.
4. Jackson G, Bateman DN. National Poisons Information Service Annual Report 2010/2011. [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1317130944236](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317130944236).
5. Capolaghi B, Moulsmas M, Houdret N, Baud FJ. Stratégies analytiques en toxicologie d'urgence. *Ann Toxicol Anal.* 2000; 12(4): 274–281.
6. Sadeg N, François G, Petit B, Dutertre-Catella H, Dumontet M. Automated liquid-chromatographic analyzer used for toxicology screening in a general hospital: 12 months' experience. *Clin Chem.* 1997; 43(3): 498–504.
7. Wilimowska J, Gomólka E, Pasich A, Jenner B, Szpak D. Comparison of fluorescence polarization immunoassay and high performance liquid chromatography for determination of carbamazepine concentration in blood of poisoned patients. *Przegl Lek.* 2005; 62(6): 595–598.
8. Alvarez JC. Le dépistage immunochimique des médicaments substitutifs de l'héroïne et autres opioïdes. *Ann Toxicol Anal.* 2009; 21(1): 13–19.
9. Cohen S, Manat A, Dumont B, Bévalot F, Manchon M, Berny C. Screening toxicologique sanguin par Remedi et GC-MS. *Ann Biol Clin.* 2010; 68(2): 163–172.
10. Kiss B, Bogdan C, Pop A, Loghin F. A rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, methadone and EDDP in human, rat and rabbit plasma. *Talanta.* 2012; 99: 649–659.
11. Strano Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Frison G, Zancanaro F, Chiarotti M. UHPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS identification of zolpidem and zopiclone main urinary metabolites and method development for their toxicological determination. *Drug Test Anal.* 2013. doi: 10.1002/dta.1470.
12. Pichon V. Extraction sur phase solide pour l'analyse de traces de composés organiques. *Techniques de l'ingénieur.* 2006.
13. Humbert L. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Ann Toxicol Anal.* 2010; 22(2): 61–68.
14. COFRAC SH GTA 04 Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. *Révision : #00 - 04/2011.*
15. Dingeon B, Dreyfuss MF, Gaillard Y, Le Bouil A, Lhermitte M, Mazzega S, Moulsmas M, Pépin G, Perrin M, Plesse J, Roussel O, Thevenot MT, Vinner E, Deveaux M. Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique. *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(suppl): 1–20.
16. Groupe de travail pluridisciplinaire SFTA-SFBC-STC-SRLF-SFMU-CNBH « Toxicologie et biologie clinique », Bartoli M, Berny C, Danel V, Delahaye A, Desch G, Guitton J, Lacarelle B, Lapostolle F, Mathieu D, Mégarbane B, Nisse P, Szymanowicz A, Capolaghi B. Recommandations pour la prescription, la réalisation et l'interprétation des examens de biologie médicale dans le cadre des intoxications graves. *Ann Toxicol Anal.* 2012; 24(4): 193–208.
17. McDonald PD. SPE: Citius, Altius, Fortius ISC '98 Roma. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/pmpisc98.pdf>.
18. Mancebo M, Perrin M. Solid phase extraction of 22 drugs of interest in the forensic toxicology field. *Ann Toxicol Anal.* 2008; 20(1): 39–45.
19. Akerman KK, Jolkkonen J., Parviainen M, Penttilä I. Analysis of low-dose benzodiazepines by HPLC with automated solid-phase extraction. *Clin Chem.* 1996; 42(9): 1412–1416.
20. Sadeg N, Dumontet M. Intérêt de l'extraction en phase solide en toxicologie : exemple d'extraction de 15 substances toxiques et médicamenteuses par 7 colonnes SPE différentes par un protocole unique. *Ann Toxicol Anal.* 2001; 13(1): 35–40.
21. <http://www.chemspider.com>.
22. Laloup M, Ramirez Fernandez Mdel M, De Boeck G, Wood M, Maes V, Samyn N. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(7): 616–626.
23. Leikin JB, Paloucek FP. *Poisoning & toxicology handbook.* 2nd edition. AphA Lexi-comp Inc. 1996–1997.
24. Ellenhorn MJ. *Ellenhorn's Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* 2nd edition. Williams & Wilkins (Eds.), 1996.
25. Mathieu O, Gutknecht S, Barnay F, Berthezene JM, Bongrand AF, Mathieu-Daude JC. Screenings toxicologiques par LC-MS simple-Quad versus HPLC-DAD : bilan après un an de pratique en urgence hospitalière. *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(1): 21–26.
26. Schneider S, Panarotto E, Wennig R. A comparative study of 5 different extraction methods for systematic toxicological analysis of serum. *Ann Toxicol Anal.* 2001; 13(4): 253–259.
27. Capolaghi B, Moulsmas M, Houdret N, Baud FJ. Stratégies analytiques en toxicologie d'urgence. *Ann Toxicol Anal.* 2000; 12(4): 274–281.
28. Maurer HH. Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(1): 13–18.
29. Lendoiro E, Quintela O, de Castro A, Cruz A, López-Rivadulla M, Concheiro M. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. *Forensic Sci Int.* 2012; 217(1-3): 207–215.
30. Mutavdžić Pavlović D, Babić S, Dolar D, Asperger D, Kosutić K, Horvat AJ, Kastelan-Macan M. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC-diode array detection. *J Sep Sci.* 2010; 33(2): 258–267.