



HAL
open science

Mise au point d'une méthode d'extraction par les sels
QuEChERS pour l'identification et la quantification des
benzodiazépines dans les prélèvements biologiques par
chromatographie en phase liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem

Lauranne Poncelet

► To cite this version:

Lauranne Poncelet. Mise au point d'une méthode d'extraction par les sels QuEChERS pour l'identification et la quantification des benzodiazépines dans les prélèvements biologiques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01295375

HAL Id: dumas-01295375

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01295375>

Submitted on 30 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 2016

THÈSE N° 28

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE
OPTION PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement par

Lauranne PONCELET

Née le 18 Juin 1987, à Angoulême

Le 12 février 2016 à Limoges

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de
THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Mise au point d'une méthode d'extraction par les sels
QuEChERS pour l'identification et la quantification des
benzodiazépines dans les prélèvements biologiques par
chromatographie en phase liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem**

Sous la direction de Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux

JURY

Mme. le Professeur Marie-Claude Saux.....Président
M. le Professeur Franck Saint-Marcoux Juge
Mme. le Docteur Voa Ratsimbazafy Juge
M. le Docteur Christian Woloch Juge

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 2016

THÈSE N° 28

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE
OPTION PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement par

Lauranne PONCELET

Née le 18 Juin 1987, à Angoulême

Le 12 février 2016 à Limoges

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de
THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Mise au point d'une méthode d'extraction par les sels
QuEChERS pour l'identification et la quantification des
benzodiazépines dans les prélèvements biologiques par
chromatographie en phase liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem**

Sous la direction de Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux

JURY

Mme. le Professeur Marie-Claude Saux.....Président
M. le Professeur Franck Saint-Marcoux Juge
Mme. le Docteur Voa Ratsimbazafy Juge
M. le Docteur Christian Woloch..... Juge

Remerciements

À Madame le Professeur Marie-Claude Saux,

Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury. Que cette thèse soit l'expression de mon profond respect et de ma sincère admiration à votre égard.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse et maître de stage pour mon Master 2, **Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux**. Merci pour ton encadrement, tes précieux conseils et la grande disponibilité dont tu as fait preuve tout au long de ce travail. Et même si je suis « une fille », comme tu sais si bien le dire, ça a été un réel plaisir de travailler avec toi.

A Madame le Docteur Voa Ratsimbazafy, pour l'honneur que vous me faites de juger cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à la lecture de ce travail.

A Monsieur le Docteur Christian Woloch, je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Le semestre passé dans le service à tes côtés en tant qu'« esclave » m'a permis de consolider mes connaissances en pharmacologie ! Et merci pour ton aide !

A Monsieur le Professeur Pierre Marquet, pour votre accueil dans votre service en tant qu'interne en Pharmacie et, en tant que stagiaire de Master.

A Monsieur le Docteur Sylvain Dulaurent, ingénieur, qui m'a conseillé tout au long de ce travail. Merci que pour la formation que tu m'as apportée, ton support technique, ta patience, et tout le temps que tu m'as consacré. Et tu as réussi à me convaincre de remplir ces fameux tableaux pour la qualité... Bravo !

J'ai évidemment un remerciement particulier pour **Julien Morichon**, technicien de laboratoire, car même si je n'ai pas travaillé directement avec toi sur ce projet, tu as su être à mes côtés pour des explications, des conversations, ainsi que pour le développement de méthodes pour d'autres projets ! Merci, ne change rien, reste comme tu es !

A mes collègues du service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance

Merci pour votre accueil, votre sympathie et votre contribution au bon déroulement de mon stage / semestre.

A ma famille,

Tout d'abord, un grand merci à mes parents pour votre soutien tout au long de ces années d'étude, de m'avoir permis d'être la « princesse » de la maison lors des longues périodes de révisions, et d'avoir été là lors des moments de doute. Même si je sais que je parle souvent « chinois » pour vous, je vous dédie ce travail. Et oui, j'arrive enfin à la fin de mes études...

A Marie, que j'ai réussi à supporter lorsque tu aimais venir te « soulager » dans ma chambre lorsque je révisais, je râlais mais c'était une pause sympa !

A Bénédicte et Arnaud, qui eux aussi m'ont bien embêtée !

Merci à la famille De Boissésou de m'avoir si gentiment ouvert votre porte, moi la petite belge !

Aux Caennais, qui ont marqué mes années de fac : Pénélope, que la pharmacie hospitalière soit le dada de ta vie, Audrey et Anne-Sophie, j'espère qu'on gardera contact malgré la distance. Merci à Madame Beljean de m'avoir fait aimer la chimie analytique !

Aux belles rencontres de l'internat,

En débarquant à Bordeaux en novembre 2011, je ne pensais pas que je rencontrerais des gens merveilleux :

Alice, ma « femme », tu as toujours été là pour moi, j'espère que notre amitié durera encore une éternité, et qu'on partagera d'autres balades à poney ! Que les weekends entre amis se perpétuent le plus longtemps possible ! Merci à tes parents qui me considèrent un peu comme leur deuxième fille, pour leur accueil chaleureux à chaque fois que je les vois. Et merci à François également !

Laurie, ma super coloc, que ces moments passés avec toi étaient merveilleux, depuis beaucoup de choses ont changé, mais que tous ces moments partagés jusqu'à présent se reproduisent encore longtemps !

A Princesse Charlotte, ma neurologue préférée, tous ces petits moments sont à chaque fois extraordinaires !

Claire, merci pour tous ces bons moments, les escapades à Toulouse, les bons petits plats, que tout ça continue !

Et la plus belle rencontre, ce soir de février 2012 lors du gala de pharmacie... Alice me surveillait, mais j'étais entre de bonnes mains... Merci à toi Jauféré, pour tout ce

que tu me donnes chaque jour, chaque seconde passée à tes cotés est tout simplement merveilleuse. J'espère que l'on continuera longtemps cette belle histoire.

Merci à mes cointernes d'un semestre ou plus, et les préparateurs de St André qui étaient tout simplement formidables avec les bébé internes : Sébastien, Marie-Noëlle, Delphine.

Merci à mes collègues de Technologie Servier à Orléans, de m'avoir si gentiment accueillie au sein de votre département, et de m'avoir confirmé mon choix de faire de la chimie analytique ! Loïc, Christelle, Isabelle, Martine, Amélie, Laurent, Marc, Tristan et Sophie. Vive la LC2D et la spectrométrie de masse ! Est-ce MALDI ?

A mes amis,

Anaïs, pour tous ces beaux moments, que ce soit à cheval ou autres,

Marine, pour tout, que ton nouveau travail te permette de t'épanouir !

Julie, le lycée à Avranches, puis les chansons après les contrôles du samedi matin en prépa à Caen, et maintenant des moments formidables été comme hiver à Annecy !

Emilie et Jérôme, pour toutes ces belles soirées, et oui j'ai bien changé...

Table des matières

Table des illustrations	8
Table des annexes	10
Abréviations	11
Introduction	12
Première partie : contexte	15
1. Les benzodiazépines	15
1.1.Historique	15
1.2.Définition	15
1.3.Structure chimique	17
2. Epidémiologie des benzodiazépines.....	17
3. Intérêt du dosage des benzodiazépines	20
3.1Intoxications aiguës.....	21
3.2Suivi thérapeutique pharmacologique	21
3.3Contexte médico-légal	22
3.4Intoxication chronique - addictovigilance.....	22
4. Stabilité des benzodiazépines	23
5. Les échantillons biologiques : une matrice complexe	27
6. La méthode QuEChERS et ses utilisations pour les milieux biologiques.....	28
7. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	33
7.1La chromatographie en phase liquide	33
7.2La spectrométrie de masse en tandem	34
7.3Principe de l'étalon interne : molécule deutérée.....	37
Deuxième partie : Travaux personnels	38
1. Objectif des travaux	38
2. Matériel et méthode	40
2.1Principe de l'analyse	40
2.2Matériel et réactifs.....	41

2.3Préparation des échantillons et de la gamme de calibration	42
2.4Conditions chromatographiques.....	43
2.5Spectrométrie de masse en tandem	44
2.6Validation de la méthode.....	45
2.7Comparaison avec la méthode de référence.....	48
3. Résultats.....	49
3.1. Conditions d'analyse retenues	49
3.2. Validation de la méthode.....	53
3.3. Comparaison avec la méthode de référence.....	61
3.4. Contrôles.....	63
Discussion	68
Conclusion.....	71
Références bibliographiques	72
Table des annexes.....	80
Serment de Galien	98

Table des illustrations

Liste des tableaux

Tableau 1: Benzodiazépines et apparentés actuellement commercialisées en France.	16
Tableau 2: Etude bibliographique de la stabilité des BZD	26
Tableau 3: Liste et provenance des solvants et substances pures utilisées.....	41
Tableau 4: Grille de préparation de la gamme de calibration, des CQI et des échantillons pour la recherche et le dosage des benzodiazépines.....	43
Tableau 5: Gradient utilisé.....	44
Tableau 6: Transitions MRM des étalons internes, temps de rétention et groupe EI.....	50
Tableau 7: Transitions MRM des substances d'intérêt, temps de rétention et groupe EI.....	52
Tableau 8: Rendements, fidélité intermédiaire et répétabilité à 3 niveaux de concentration (LOQ, concentration intermédiaire et concentration maximale):	56
Tableau 9: Epreuve de dilution	58
Tableau 10: Accords entre matrice: plasma, urine, sang total.....	60
Tableau 11: Valeurs cibles des contrôles BZD A et BZD B	63
Tableau 12: LDD des différentes molécules	67

Liste des figures

Figure 1: Structure chimique de la classe des benzodiazépines	17
Figure 2: Répartition des indications de BZD en 2012	19
Figure 3: Consommation totale de BZD et apparentées de 2000 à 2012.....	20
Figure 4: Protocole synthétisé de la préparation d'échantillon avec la méthode QuEChERS	29
Figure 5: Principales étapes de la procédure analytique QuEChERS pour la détermination de pesticides dans les matrices alimentaires.....	31
Figure 6: Composants d'un appareil de chromatographie liquide	34
Figure 7: Schéma d'une source electrospray	35
Figure 8: Principe du filtre quadripolaire	36
Figure 9: principe de la préparation des échantillons	40
Figure 11: Système LC-MS/MS utilisé pour les travaux personnels.....	45
Figure 12: Chromatogramme obtenu (étalon 1000 µg/L) dans les conditions chromatographiques décrites précédemment (colonne PFPP) représentant les molécules d'intérêt et les EI.....	49
Figure 13: Droite de calibration obtenue pour le diazépam	53
Figure 14: Comparaison des résultats avec les deux appareils.....	61
Figure 15: Schéma comparant les cas détectés avec les 2 méthodes	62
Figure 16: Valeurs cibles du contrôle BZD A.....	64
Figure 17: Valeurs cibles du contrôle BZD B.....	65

Table des annexes

Annexe 1. Structure chimique des benzodiazépines et apparentées étudiées	81
Annexe 2. Demi-vie, concentrations sanguines thérapeutiques et toxiques, métabolisme des benzodiazépines et apparentés (d'après la société française de toxicologie analytique)	85
Annexe 3. Métabolisme et élimination des benzodiazépines	88
Annexe 4. Résumé des études utilisant les sels QuEChERS dans les milieux biologiques	89
Annexe 5. Paramètres du spectromètre de masse pour les 10 étalons internes	92
Annexe 6. Paramètres du spectromètre de masse pour les 36 molécules d'intérêt..	93
Annexe 7. Transitions MRM et abondance relative des 36 molécules d'intérêt	95
Annexe 8. Etude de la suppression ionique dans les trois matrices : urine, sérum, sang total	97

Abréviations

ACN : acétonitrile

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANSM : agence nationale de sécurité du médicament

AUC : *area under the curve* (aire sous la courbe)

BZD : benzodiazépines

CEIP-a : centres d'information et d'évaluation sur la pharmacodépendance

COFRAC : comité français d'accréditation

CV : coefficient de variation (%)

DDJ/1000hab/j : dose définie journalière (DDJ) pour 1000 habitants et par jour

dSPE : *dispersive solid phase extraction* (extraction solide liquide dispersive)

EI : étalon interne

GABA : acide gamma aminobutyrique

GCB : *graphitized carbon black* (carbone graphite noir)

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse simple

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

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

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

LLE : *liquid-liquid extraction* (extraction liquide-liquide)

LOD ou LDD : *limit of detection* (limite de détection)

LOQ ou LDQ : *limit of quantification* (limite de quantification)

MgSO₄ : sulphate de magnésium

mL : millilitre

NaCl : chlorure de sodium

NaF : fluorure de sodium

NaOAc : acétate de sodium

PSA : *primary and secondary amine phase*

qsp : quantité suffisante pour

QuEChERS : *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*

SPE : *solid-phase extraction* (extraction solide-liquide)

t_R : temps de rétention

UHPLC-UV (ou UPLC) : chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un détecteur Ultra-Violet

Introduction

La toxicologie analytique peut se définir comme la science qui vise à rechercher et doser des xénobiotiques, c'est-à-dire des médicaments ou des composés toxiques, dans des matrices biologiques ou non biologiques. Très schématiquement, ces recherches ou dosages sont très souvent effectués dans un contexte hospitalier, impliquant une demande d'analyses par un clinicien ; on parle alors de toxicologie hospitalière, ou de toxicologie biologique ou de toxicologie d'urgence. Mais, ces recherches et dosages peuvent également être effectués à la demande d'une autorité judiciaire ou d'une autorité de police ; on parle alors de toxicologie médico-légale [1], [2].

En toxicologie dite « d'urgence », quand des premiers résultats d'analyse sont attendus dans des délais extrêmement brefs, il est possible de s'appuyer sur des méthodes immunochimiques ou colorimétriques qui peuvent être mises en œuvre dans des délais courts, 7 jours sur 7, 24h/24, sans faire appel ni à de réelles compétences techniques, ni à des outils analytiques sophistiqués. Toutefois, ces méthodes, dites parfois de « dépistage d'urgence », sont le plus souvent peu spécifiques et peuvent manquer de sensibilité : faux positifs par interférences analytiques et limites de détection parfois trop élevées.

Les laboratoires de pharmacologie-toxicologie disposent usuellement de multiples coffrets (ou « trousse d'immunochimie ») permettant la recherche et/ou le dosage de médicaments tels que des antibiotiques (aminosides et glycopeptides), des immunosuppresseurs (acide mycophénolique, ciclosporine, tacrolimus) ou des antiépileptiques. Il existe également de nombreux coffrets dédiés à la recherche de « toxiques », tels que les stupéfiants (cocaïne, amphétamines, opiacés, cannabinoïdes), ou les médicaments ayant potentiellement une forte toxicité, comme le paracétamol, ou les antidépresseurs.

Alors que des améliorations significatives ont été faites depuis l'apparition des premiers coffrets, ces méthodes souffrent toujours de sérieux désavantages. La problématique n'est pas celle de la sensibilité. En effet, contrairement à d'autres disciplines de la Biologie Médicale, le dosage des médicaments ou des toxiques ne nécessite pas des sensibilités exceptionnellement basses. La plupart des molécules recherchées en toxicologie analytique circulent dans le sang à des concentrations

allant de quelques $\mu\text{g/L}$ à plusieurs mg/L . La spécificité est un problème autrement plus délicat. En effet, les coffrets dédiés à la recherche d'une famille de composés se contentent le plus souvent de mettre en évidence un antigène qui correspond à un métabolite commun à plusieurs composés d'une même famille, et non pas un composé en particulier. Par exemple, un coffret dédié à la recherche des benzodiazépines (BZD) recherche classiquement du desméthylidiazépam (ou nordazépam) qui est le métabolite de nombreuses BZD (familles comptant une quinzaine de molécules actives).

La relative incapacité à suivre l'évolution des pratiques est également un autre point faible de ces méthodes immunochimiques. Aujourd'hui, si le noyau dur des paramètres « historiques » persiste dans la plupart des laboratoires, de multiples candidats au dosage en toxicologie analytique sont apparus: des nouveaux antiépileptiques, de nouveaux anticoagulants, de nouvelles drogues (cannabinoïdes de synthèse, nouvelles amphétamines...). Cependant, face aux investissements liés au développement et à la commercialisation, les fournisseurs n'ont que très rarement proposé de nouveaux paramètres de pharmacologie-toxicologie ces dernières années. Au contraire, une disparition progressive de ceux les moins fréquemment réalisés, pour ne pas dire les moins rentables, a lieu.

Enfin, si l'acquisition d'un ou plusieurs systèmes de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) demeure encore un investissement colossal, le coût à l'analyse demeure très souvent plus élevé pour les méthodes immunochimiques. Contrairement aux idées reçues, la littérature rapporte de multiples exemples de diminution des coûts lors du passage de l'immunochimie vers la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour des paramètres de routine.

C'est ainsi que pour des applications « hospitalières » ou « médico-légales », la toxicologie analytique emploie désormais, également, des techniques de chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC) ou en phase liquide type LC-MS et LC-MS/MS.

Les techniques de routine du Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance du CHU de Limoges sont principalement basées sur des analyses de sang total, de sérum ou de plasma, et d'urine. La complexité de ces matrices biologiques oblige à réaliser une ou plusieurs étapes de préparation ou d'extraction visant à séparer les molécules d'intérêt des autres éléments de la

matrice, surtout lorsque la recherche consiste en la détermination de traces de médicaments ou de métabolites. Ces étapes sont chronophages en termes de développement, de validation et de mise en œuvre. Elles peuvent également être très coûteuses lorsqu'elles nécessitent des quantités importantes de solvants ou des cartouches d'extraction spécifiques.

Tout naturellement, le laboratoire est à la recherche de méthodes d'extraction qui puissent être à la fois plus rapides, donc compatibles avec les délais courts de rendu de résultats qui sont parfois nécessaires, mais également plus simples et meilleur marché que les méthodes d'extraction classiques, telles que les extractions liquide-liquide et les extractions en phase solide.

Dans ce travail, après avoir présenté les benzodiazépines, puis discuté de la place des benzodiazépines en toxicologie hospitalière et des particularités des matrices biologiques, nous exposerons l'état de l'art d'une méthode d'extraction alternative : les sels QuEChERS. Nous expliquerons ensuite brièvement le principe de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse en tandem. Enfin, nous présenterons l'exemple du développement d'une méthode de recherche et dosage de 36 benzodiazépines et apparentés faisant appel à une extraction à base de sels QuEChERS, qui a fait l'objet de mes travaux personnels.

Première partie : contexte

1. Les benzodiazépines

1.1. Historique

En 1957, Sternbach synthétise la première benzodiazépine (BZD) : le chlordiazépoxyde qui sera commercialisé sous le nom de Librium®. Ce médicament n'est plus commercialisé aujourd'hui ; cependant on retrouve le chlordiazépoxyde dans la spécialité Librax® en association au bromure de clidinium (ayant une action anticholinergique), dans le traitement des troubles anxieux accompagnés de troubles fonctionnels digestifs.

Rapidement d'autres BZD apparaissent sur le marché tel que le Valium® (diazépam) commercialisé par les laboratoires Roche, qui connaît un succès mondial.

Entre 1960 et 2002, plus de 3 000 BZD différentes ont été synthétisées (seulement 35 d'entre elles sont actuellement commercialisées dans le monde). Les BZD apparaissent à cette époque comme le « produit miracle » par leur marge thérapeutique importante, leur faible toxicité aiguë et leurs effets secondaires moins importants par rapport aux barbituriques qui sont alors largement utilisés.

Enfin, apparaissent sur le marché les apparentés aux BZD. Ils sont représentés par deux spécialités : le zopiclone (Imovane®) et le zolpidem (Stilnox®) ayant respectivement obtenu leur autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1984 et 1987.

1.2. Définition

Les BZD sont des molécules qui agissent sur le système nerveux central par l'intermédiaire des récepteurs GABA (GABA pour acide gamma amino-butyrique) et qui possèdent des propriétés anxiolytiques, hypnotiques, myorelaxantes et anticonvulsivantes(1),(2).

En France, elles sont indiquées et prescrites notamment dans le traitement symptomatique des manifestations anxieuses, dans les troubles du sommeil, dans le sevrage alcoolique et le traitement des épilepsies partielles ou généralisées.

D'après les données de l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM), en 2012, 22 BZD étaient commercialisées. Entre 2012 et 2013, trois BZD ont fait l'objet

de mesures particulières : le clonazépam, pour lequel des conditions d'accès restreintes ont été mises en place en France, le flunitrazépam qui a été retiré du marché français pour des raisons commerciales, le tétrazépam dont la réévaluation du rapport bénéfice / risque initiée par la France a abouti à son retrait du marché en Europe.

Les différentes BZD et apparentés commercialisés en France en 2013, ainsi que leur classe thérapeutique, leur demi-vie et l'année de première AMM sont rapportées dans le Tableau 1 (adapté de l'ANSM) [3].

Substance active	Nom des spécialités commercialisées	Année de première AMM	Demi-vie (h)
Anxiolytiques			
Alprazolam	Xanax et génériques	1982	6 - 18
Bromazépam	Lexomil et génériques	1974	8 - 20
Clobazam	Urbanyl	1974	10 - 31
Clorazépate dipotassique	Tranxène	1974	2
Clotiazépam	Veratran	1982	4
Diazépam	Valium	1973	15 - 60
Loflazépate d'ethyle	Victan	1980	73 - 119
Lorazépam	Temesta et génériques	1977	9 - 20
Nitrazépam	Nordaz	1984	17 - 48
Oxazépam	Seresta et génériques	1968	4 - 11
Prazépam	Lysanxia et génériques	1975	1.3
Hypnotiques			
Estazolam	Nuctalon	1977	10 - 31
Flunitrazépam	Rohypnol	1984	9 - 31
	Narcozep	1973	
Loprazolam	Havlane	1981	3.3 - 14.8
Lormétazépam	Noctamide	1987	10
Midazolam	Hypnovel	1986	1 - 4
	Versed	1988	
Nitrazépam	Mogadon	1965	17 - 48
Témazépam	Normison	1981	3 - 13
Apparentées aux benzodiazépines (hypnotiques)			
Zolpidem	Stilnox et génériques	1987	0.7 - 3
Zopiclone	Imovane et génériques	1984	5
Myorelaxant			
Tétrazépam	Myolastan et génériques	1974	10 - 25
Anticonvulsivant			
Clonazépam	Rivotril	1973	19 - 60
Midazolam	Buccolam	2011	1 - 4

Tableau 1: Benzodiazépines et apparentés actuellement commercialisés en France

1.3. Structure chimique

Les BZD ont une structure commune de base. Ce sont des molécules basiques et lipophiles. Elles se composent d'un cycle benzène ainsi que d'un hétérocycle à 7 atomes dont 2 azotes. La Figure 1 illustre la structure chimique générique de la classe des BZD.

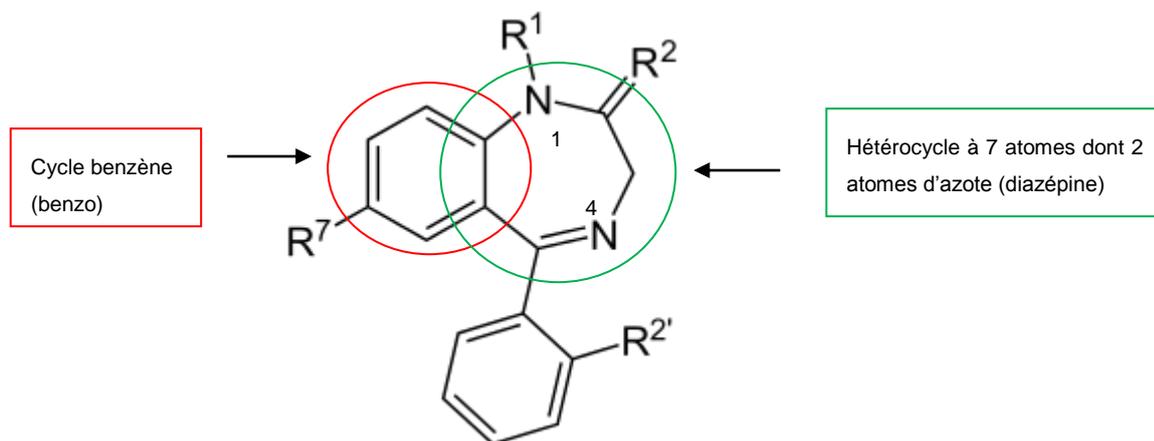


Figure 1: Structure chimique de la classe des benzodiazépines

Il existe ensuite plusieurs modulations structurales. On distingue :

- Les 1,4 benzodiazépines (suffixe « pam ») : présence des atomes d'azote en position 1 et 4.
- Les dérivés tricycliques (suffixe « azolam ») : présence des deux cycles de la structure de base, sur laquelle se fixe un troisième cycle. On distingue selon la nature du troisième cycle : les triazolo 1,4-benzodiazépines et les imidazo 1,4-benzodiazépines.

L'Annexe 1 présente les structures chimiques des différentes BZD étudiées dans ce rapport.

2. Epidémiologie des benzodiazépines

L'ANSM a publié en décembre 2013 un rapport sur l'état des lieux de la consommation des BZD en France (1).

Il en ressort que la France est, depuis de nombreuses années, l'un des plus gros consommateurs au monde de BZD. Ainsi :

- « 131 millions de boîtes de médicaments contenant des BZD ou apparentés ont été vendues en France en 2012 (dont 53.2% d'anxiolytiques et 40.5% d'hypnotiques). Ceci représente près de 4% de la consommation totale de médicaments en 2012.
- Environ 11.5 millions de français ont consommé au moins une fois une BZD en France en 2012.
- L'alprazolam devient en 2012 la molécule la plus consommée suivie par le zolpidem et le bromazépam.
- Les consommateurs de BZD âgés en moyenne de 56 ans sont principalement des femmes pour près de 2/3 d'entre eux. 33% des femmes de plus de 65 ans ont consommé une BZD anxiolytique et près d'une sur 5 (18%) une BZD hypnotique.
- Les principaux prescripteurs de BZD anxiolytiques et hypnotiques sont des médecins libéraux (90%) parmi lesquels les médecins généralistes prescrivent près de 90% des BZD anxiolytiques et hypnotiques.
- Les temps d'exposition aux BZD sont parfois très supérieurs aux recommandations de l'AMM avec une utilisation annuelle de 4 à 5 mois pour les molécules anxiolytiques et hypnotiques. A noter qu'une proportion importante de patients les utilise en continu sur plusieurs années.
- La consommation des BZD expose à certains risques bien connus en particulier neuro psychiatriques, ainsi que des risques d'abus et de pharmacodépendance notamment un phénomène de tolérance et de sevrage à l'arrêt. Les BZD accroissent également de manière significative le risque d'accident de la route. »

En résumé, ce rapport démontre l'ampleur de la consommation des BZD en France. En effet, le nombre de boîtes vendues ne cesse d'augmenter (ceci concerne les hommes, et surtout les femmes), la prescription émanant essentiellement de médecins généralistes. Cette prescription dépasse malheureusement, le plus souvent, la durée de prescription préconisée par l'ANSM, favorisant ainsi une dépendance physique (avec syndrome de sevrage) et psychique à cette classe de médicaments. Les BZD les plus consommées sont soit anxiolytiques, soit hypnotiques.

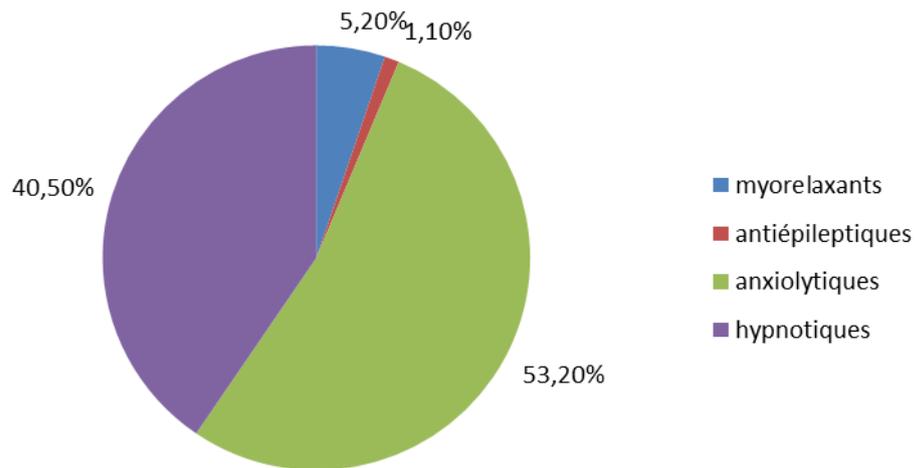


Figure 2: Répartition des indications de BZD en 2012

La [Figure 2](#) représente la répartition des indications de BZD en France en 2012. On remarque que les BZD anxiolytiques sont majoritairement prescrites, suivies de près par les BZD hypnotiques. Viennent ensuite les BZD myorelaxantes (qui sont désormais retirées du marché) et les BZD antiépileptiques.

Depuis quelques années, afin de limiter la consommation et les risques liés à la consommation des BZD, les autorités sanitaires françaises ont mis en place un certain nombre d'actions sur le plan réglementaire mais aussi en termes d'information et de communication. Ceci permet de favoriser le bon usage de ces molécules et de limiter un usage abusif ou détourné. Ces actions ont permis de diminuer sensiblement la consommation de BZD, comme le montre la [Figure 3](#). Depuis le début des années 2000, des actions ont été menées et des mesures adoptées pour favoriser le bon usage de ces molécules et limiter leur usage abusif ou détourné. La consommation totale de BZD en France ne cesse de diminuer. Toutefois, depuis 2008, cette tendance à la baisse paraît interrompue et l'on observe, en 2010 comme en 2012, une reprise de la consommation. Ainsi en 2012, la consommation globale de BZD a augmenté en raison de la progression de la consommation d'anxiolytiques et d'hypnotiques et malgré la baisse importante de la consommation de tétrazépam et de clonazépam.

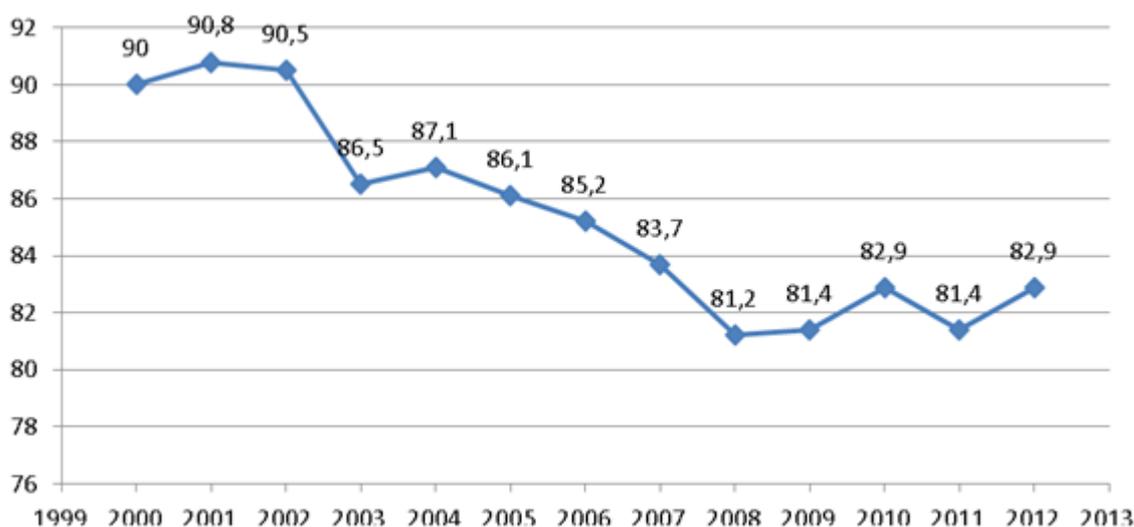


Figure 3: Consommation totale de BZD et apparentées de 2000 à 2012
(DDJ/1 000 hab./j : le nombre de patients pour 1000 habitants et par jour)

3. Intérêt du dosage des benzodiazépines

Quel que soit le contexte, l'outil analytique doit être, soit capable de confirmer l'absence de BZD (ce qui signifie que les limites de détection doivent être relativement faibles), soit capable au contraire de mesurer des concentrations très élevées (ce qui signifie que la gamme d'étalonnage doit être suffisamment étendue). A titre d'illustration, en Annexe 2 sont rapportées les concentrations habituellement observées consécutivement à l'administration de doses thérapeutiques de BZD (« zone thérapeutique »). On peut observer sur ce tableau qu'en fonction des molécules, ces dernières s'étendent de quelques $\mu\text{g/L}$ à quelques centaines de $\mu\text{g/L}$. Enfin, il faut tenir compte du fait que la plupart des BZD se métabolisent en composés actifs (noté « A » dans le tableau de l'Annexe 2) qu'il sera également important de pouvoir détecter.

L'Annexe 3 illustre le métabolisme de certaines BZD. Par exemple, le temazepam est dans un premier temps métabolisé en une autre BZD l'oxazepam, avant d'être métabolisé en dérivé conjugué inactif. Certaines BZD sont directement métabolisées en dérivé conjugué inactif, d'autres en métabolite inactif. Les BZD sont principalement éliminées par voie rénale. Par conséquent, le dosage de tous les composés actifs est nécessaire pour confirmer ou infirmer la présence de la

molécule. La présence de témazépam et d'oxazépam dans un échantillon est donc tout à fait normale, même si le patient n'a pris que du témazépam.

3.1 Intoxications aiguës

Les BZD peuvent être responsables d'intoxications aiguës ou subaiguës. Les signes cliniques d'une intoxication pure aux BZD sont les suivants : à la phase initiale, on observe des troubles du comportement avec ébriété, agitation, désinhibition et agressivité. Il existe un risque important de potentialisation des effets en cas d'association avec d'autres psychotropes et surtout avec l'alcool. Puis, dans les heures qui suivent, peuvent apparaître des phénomènes d'obnubilation, somnolence, hypotonie musculaire avec hyporéflexie, puis un coma calme hypotonique. Une dépression respiratoire modérée peut apparaître surtout avec les molécules d'action rapide. Il peut exister des troubles cardiovasculaires (hypotension artérielle modérée, tachycardie). D'une façon générale, les intoxications pures aux BZD sont d'évolution favorable en 24h-48h, mais la symptomatologie peut être plus marquée en cas de dose ingérée importante ou si la molécule est particulièrement hypnotique (loprazolam, lormétazepam ou flunitrazépam) et en cas d'associations à d'autres déprimeurs du SNC (antidépresseurs, neuroleptiques ou alcool).

Il existe un antidote lors d'intoxication aiguë aux BZD et apparentés. Il s'agit du flumazenil (Anexate®). Il ne traite pas l'intoxication mais antagonise les effets cliniques.

3.2 Suivi thérapeutique pharmacologique

Dans un contexte hospitalier, la recherche et le dosage des BZD ne se limitent pas aux cas d'intoxications aiguës qui surviennent lors des tentatives de suicide ou de surexposition accidentelle ou d'une interaction médicamenteuse. On peut rajouter les contextes suivants : surveillance de l'observance au traitement, ajustement de posologie (par exemple pour le midazolam utilisé en anesthésie, ou le clonazépam utilisé comme antiépileptique) et contrôle de l'absence de prise cachée de BZD.

3.3 Contexte médico-légal

Il existe de multiples contextes de toxicologie médico-légale dont les plus fréquents sont: conduite automobile sous l'influence de psychotropes, soumission chimique (administration à l'insu) ou recherche des causes de la mort.

3.4 Intoxication chronique - addictovigilance

Une des missions de l'ANSM consiste à surveiller les cas de dépendance et d'abus impliquant des substances psycho actives, qu'il s'agisse de médicaments ou non, à l'exception de l'alcool et du tabac. Cette surveillance repose sur l'existence de structures spécialisées dans l'addictovigilance. Il s'agit des centres d'évaluation et d'information sur la pharmacodépendance (CEIP-a). Ils recueillent, évaluent et émettent des alertes à propos des cas d'abus et de dépendance recensés.

Les BZD sont donc soumises à ce système de déclaration.

Ces molécules sont responsables de **tolérance** (diminution progressive de l'effet thérapeutique pour une même dose administrée pendant plusieurs semaines). La tolérance peut conduire à une augmentation des doses pour obtenir l'effet recherché. Elles sont également responsables de **dépendance**, surtout en cas de traitement prolongé. Leur utilisation prolongée peut entraîner un état de dépendance physique et psychique.

L'arrêt du traitement par une BZD, à posologie normale, peut entraîner un **phénomène de sevrage**. Certains symptômes du sevrage sont fréquents et d'apparence banale. On peut observer une insomnie, des céphalées, une anxiété importante, des myalgies, une tension musculaire et une irritabilité. D'autres symptômes sont plus rares : agitation voire épisode confusionnel, paresthésies des extrémités, hyperréactivité à la lumière, au bruit et au contact physique, dépersonnalisation, phénomènes hallucinatoires et convulsions. Le syndrome de sevrage peut se manifester dans les jours qui suivent l'arrêt du traitement.

4. Stabilité des benzodiazépines

La concentration des médicaments dans un échantillon est susceptible d'évoluer au cours du temps.

Dans un contexte médico-légal, il existe un impact important du délai écoulé entre la mort et le moment de prélèvement. Il faut alors prendre en compte deux phénomènes antagonistes bien connus quant à leur effet sur la concentration sanguine en BZD :

- Un phénomène de redistribution post-mortem (du tube digestif ou des organes de stockage vers le sang) responsable d'une majoration de la concentration sanguine au cours de la période post-mortem, conduisant à une surestimation de la concentration réelle au moment du décès.
- Un phénomène de dégradation, responsable d'une diminution de la concentration sanguine entre le moment du décès et l'autopsie ou l'analyse, conduisant alors à une sous-estimation de la concentration réelle au moment du décès. La dégradation peut être due à une décomposition chimique ou à un processus métabolique (activité enzymatique des bactéries).

Cette dégradation peut également se produire *in vitro*, pendant le stockage des échantillons, particulièrement lorsqu'il se passe un certain temps entre le prélèvement et l'analyse toxicologique.

De nombreuses études ont porté sur la stabilité des drogues, mais peu se sont intéressées à la stabilité des BZD dans le sang, le plasma ou l'urine. Voici les principales : le [Tableau 2](#) présente une revue de la bibliographie concernant la stabilité de certaines BZD.

Molécules étudiées	Echantillon	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Benzodiazépines	sang, bile, humeur vitrée post-mortem	25°C	24 semaines	instable	Analyse impossible (décomposition biologique, production d'interférents)	[4]
Lorazépam		-20°C ou -80°C		stable		
Lorazépam		4°C		instable	dégradation (ajout NaF permet de diminuer la dégradation du lorazépam)	
Estazolam		-80°C ; -20°C ; 4°C		stable		
Estazolam	sang post mortem	-20°C ; 4°C	24 semaines		stable malgré une diminution des concentrations de 20%	[5]
Estazolam		25°C			diminution des concentrations de 25%	
Chlordiazépoxyde		4°C ; 25°C		instable	dégradation rapide	
Chlordiazépoxyde		-20°C ; -80°C		stable		
Chlordiazépoxyde	sang post mortem	4°C ; 25°C	6 mois	instable	instable (dégradation totale au- delà de 6 mois) Sans NaF: disparition après 7 jours de stockage	[5]–[8]
Nitrazépam	plasma, sérum, sang	4°C	3 semaines	stable	dégradation à la lumière dégradation en 7- aminonitrazépam	[9] [6]
		25°C		instable		
Témazépam	sang	-20°C	12 mois	stable	Très stable (82% taux récupération)	[10]
		5°C et 25°C		instable	Diminution significative de la concentration	

Suite tableau page suivante

Molécules étudiées	Echantillon	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Nombreux médicaments	post mortem				hydrolyse et réduction des benzodiazépines sont impliquées dans leur dégradation	[11]
Nitrobenzodiazépines	stérile ou en présence de bactéries				Si échantillon stérile: composés relativement stables En présence de bactéries: pertes conséquentes en quelques heures (surtout si température élevée et absence de NaF)	[12]
Flunitrazéпам					La plus instable des nitrobenzodiazépines (rapidement converti en 7-aminoflunitrazéпам (lui-même instable))	
Clonazéпам					Disparition rapide, comme le 7-aminoclonazéпам	
Bromazéпам	plasma	-20°C ; 4°C	1 mois	stable		[13]
		25°C		instable		
Clonazéпам, Midazolam		20°C	1 an	instable	Diminution concentration de 70 à 100%	[14]
Flunitrazéпам, Oxazéпам		4°C		instable	Diminution concentration assez élevée	
		-20°C		stable	Diminution concentration de 10 à 20%	
		-80°C		stable	Diminution non significative	
Benzodiazépines	plasma, sang	4°C	240 jours		Diminution significative de la concentration	[15]

Suite tableau page suivante

Molécules étudiées	Echantillon	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Diazépam, Nordazépam Flunitrazépam	sang post mortem	-20°C	16 à 18 ans	relativement stable	Légère diminution des concentrations	[16]
Clonazépam				instable	Diminution des concentrations	

Tableau 2: Etude bibliographique de la stabilité des BZD

En conclusion de cette étude, les échantillons cliniques ou médico-légal doivent être stockés de préférence à -20°C ou -80°C car seules ces températures permettent de stabiliser les BZD dans les échantillons [4], [5], [10], [14]. Il en est de même pour toutes les solutions de travail. Toutes ces données suggèrent que les résultats quantitatifs concernant des stockages prolongés doivent être interprétés avec précaution [17], [18].

5. Les échantillons biologiques : une matrice complexe

En toxicologie analytique, la préparation d'échantillon ou prétraitement ou « extraction », est une étape essentielle d'une analyse chromatographique réussie. Elle doit permettre de diminuer la présence des interférences qui perturberont l'analyse lors des phases de séparation, de détection et de quantification. L'obtention d'extraits « propres » permet également d'augmenter la durée de vie de la colonne chromatographique.

Les échantillons biologiques analysés dans un laboratoire de toxicologie sont des matrices très complexes : sang total, urines, liquide gastrique, organes (foie, poumons, rein, cerveau...), phanères (cheveux, poils...). Ces matrices nécessitent donc des phases de prétraitement multiples et complexes. Ce prétraitement a essentiellement pour objectif de : solubiliser et homogénéiser l'échantillon, éliminer les résidus insolubles par filtration et centrifugation, rompre les liaisons protéiques, hydrolyser les formes conjuguées, stabiliser les analytes d'intérêt par dérivation.

En fait, le mode de prétraitement dépend étroitement de la matrice disponible et de sa complexité, mais également de la nature du ou des xénobiotique(s) recherché(s) et de la sensibilité de la technique analytique qui sera utilisée par la suite.

Parallèlement à l'amélioration des performances des systèmes analytiques, les procédures de prétraitement ont considérablement évolué et ont désormais comme objectifs :

- La diminution des quantités de matrices utilisées afin de réaliser un maximum d'analyses sur un même échantillon ; ce qui est particulièrement intéressant lorsque les quantités de prélèvements sont réduites,

- la simplification des modes opératoires par une uniformisation des procédures de préparation ; c'est-à-dire une même procédure d'extraction quelle que soit la matrice, voire quels que soient les composés cibles,
- un gain de temps en automatisant tout ou partie de l'extraction ; c'est-à-dire la mise au point de procédures de préparation d'échantillons en ligne ou « *on line* ».

6. La méthode QuEChERS et ses utilisations pour les milieux biologiques

QuEChERS est un acronyme pour QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged, and Safe. Il s'agit donc d'une méthode d'extraction qui se veut rapide, facile, bon marché, robuste et fiable. Elle a vraisemblablement été utilisée pour la première fois il y a une dizaine d'années pour l'analyse de résidus de pesticides dans les fruits et légumes [19]. Brièvement, il s'agit d'une méthode de préparation des échantillons qui consiste à rajouter des sels dits « QuEChERS » à la matrice d'intérêt qui aura été mélangée au préalable dans un solvant apolaire.

La méthode telle qu'initialement proposée par Anastassiades et al. [19] comprenait deux étapes présentées dans la [Figure 4](#) (3).

- Une étape « *extraction partitioning* » consistant à mettre la matrice d'intérêt en solution dans de l'acétonitrile (ACN), puis à rajouter un mélange de sels de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et de chlorure de sodium (NaCl). L'objectif est de séparer l'échantillon en une phase aqueuse et une phase organique (ACN), puis de « sécher » la phase aqueuse par des sels avant de récupérer la phase organique.
- Une étape « dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction) » ou « Clean-up » consistant à éliminer les impuretés présentes dans la phase organique à l'aide d'adsorbants tels que le Primary Secondary Amine (PSA), le carbone graphite noir (GCB) ou les particules C_{18} , en présence de sels. Il se forme à nouveau 2 phases, et la phase organique est récupérée.

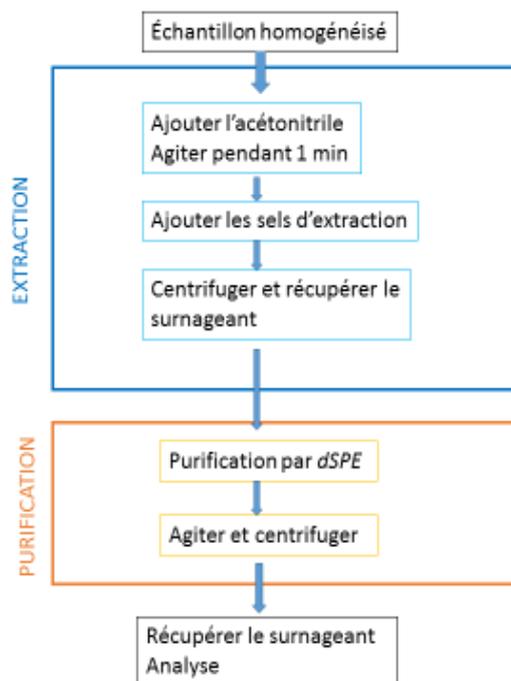


Figure 4: Protocole synthétisé de la préparation d'échantillon avec la méthode QuEChERS

En effet, l'ACN et l'eau sont des liquides miscibles, dans leur état pur, à température ambiante. Il est connu qu'une mixture homogène de ces deux solvants (comme tout autre système binaire homogène contenant de l'eau et un solvant organique) peut être séparé en deux phases hétérogènes par l'addition de sels [20], [21]. Ce phénomène a lieu car la dissolution des sels altère les propriétés du système, particulièrement la force ionique et la pression de vapeur des composants individuels des solvants [21]. Il a été montré que la solubilité du sel dans chaque solvant est un facteur clé : la séparation la plus efficace est réalisée avec des sels hautement solubles dans l'eau et insolubles (ou très peu solubles) dans les solvants organiques [21]. Ce phénomène de séparation de l'ACN et de l'eau est appelé « salting-out ».

Plusieurs solvants d'extraction ont été testés: acétone [19], [22], ACN [19], [23], [24] et acétate d'éthyle [25]–[27]. Dans une étude dédiée au dosage de pesticides, il a été montré que ces solvants permettent tous un bon rendement d'extraction. L'acétone est facilement miscible à l'eau, mais la séparation de l'eau à partir de ce solvant n'est pas possible sans l'addition d'un solvant non polaire. L'acétate d'éthyle est partiellement miscible à l'eau, ce qui rend superflue l'addition de solvant non polaire pour le séparer de l'eau. Les extraits à base d'ACN contiennent moins de substances

interférentes que les extraits à base d'acétate d'éthyle ou d'acétone, et l'ACN peut être séparé assez facilement de l'eau. C'est pour cette raison que l'ACN a finalement été retenu dans la méthode QuEChERS.

Au fur et à mesure de l'extension de l'utilisation de cette méthode, il est apparu évident que la force et la quantité des sels utilisés ne pouvaient pas être la même pour toutes les applications. Aujourd'hui, il existe au moins trois variantes de la méthode QuEChERS en fonction des sels utilisés:

- La méthode d'origine (décrite ci-dessus) : 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl
- La méthode « EN 15662 » : 1g citrate trisodique dihydraté + 0.5 g hydrogénéocitrate disodique sesquihydraté + 1 g NaCl + 4 g $MgSO_4$
- La méthode « AOAC 2007.01 » : 6 g $MgSO_4$ + 1.5 g acétate de sodium

Ces quantités de sels sont disponibles sous la forme de kits prêts à l'emploi, utilisés pour l'extraction des pesticides avec un volume de solvant de 10 à 12 mL et 10 grammes d'échantillon.

L'emploi des sels QuEChERS a été principalement décrit pour la recherche et le dosage des résidus de pesticides dans des matrices alimentaires ou environnementales [28]–[30]. Pour ces applications, il a été montré que le $MgSO_4$ accompagné de NaCl était le meilleur choix pour l'extraction des pesticides. Le $MgSO_4$ permet de séparer l'eau du solvant organique, le NaCl permet de contrôler la polarité. Dans la deuxième étape du protocole, il a été montré que le PSA permet de supprimer de nombreux acides organiques polaires de l'extrait, ainsi que des pigments polaires, des sucres et des acides gras. Le GCB permet essentiellement de supprimer les stérols et les pigments tels que la chlorophylle, alors que le C_{18} permet d'éliminer des substances interférentes apolaires comme les lipides. La [Figure 5](#) présente le protocole tel que proposé par Wilkowska et al. [28] pour la recherche et le dosage de pesticides.

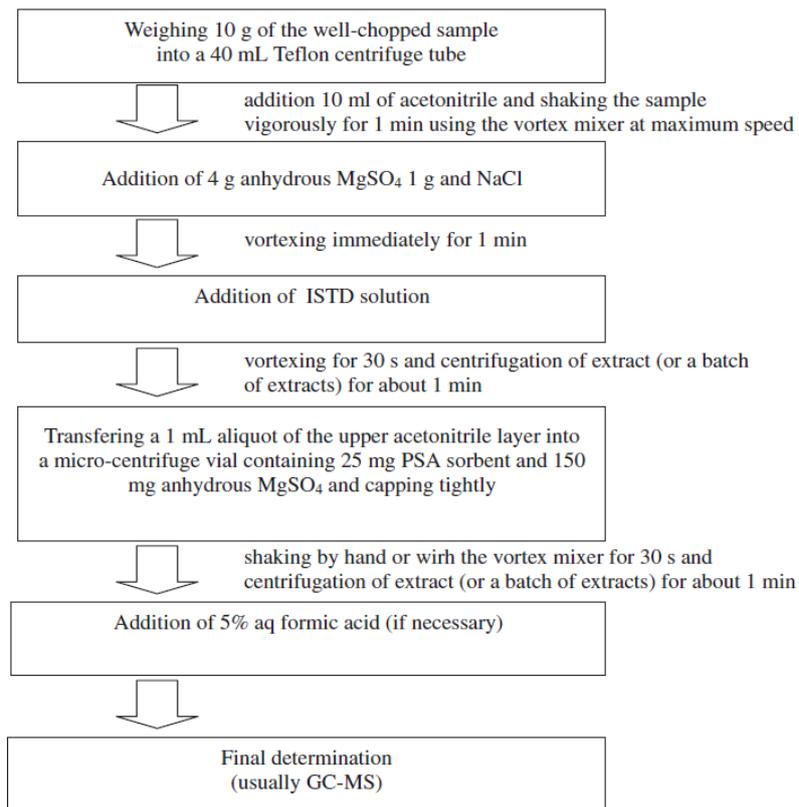


Figure 5: Principales étapes de la procédure analytique QuEChERS pour la détermination de pesticides dans les matrices alimentaires. (D'après [31])

Ce protocole a également été appliqué dans de nombreuses études sur les pesticides, dont celles de Walorczyk [31], Lesueur [32], et Nguyen [33].

Les méthodes de dosage des pesticides au sein du laboratoire du CHU de Limoges concernent trois grandes familles de pesticides: les organophosphorés, les organochlorés et les carbamates, qui constituent environ 90% des molécules sur le marché. Seul le Mix I (soit 1g citrate trisodique dihydraté + 0.5 g hydrogenocitrate disodique sesquihydraté + 1 g NaCl + 4 g MgSO₄) est utilisé pour extraire la plupart des pesticides, qui ont des formules chimiques, des polarités et des charges extrêmement variables.

La plupart des pesticides peuvent être extraits avec les sels QuEChERS, sauf le paraquat, le diquat et le chlormequat.

Si les méthodes d'extractions à base de sels QuEChERS ont d'abord été utilisées pour la recherche de pesticides dans des matrices alimentaires ou environnementales, la littérature rapporte depuis 2 ou 3 ans quelques exemples d'applications dans des matrices biologiques.

Nous avons effectué une recherche bibliographique dans la base de données Pubmed, ainsi que dans la base Web of Science. Les résultats de cette recherche sont résumés dans le tableau de l'Annexe 4.

Les applications approchant les objectifs de nos travaux sont encore assez peu nombreuses. Voici toutefois quelques détails sur les études que nous avons jugé les plus pertinentes :

Plössl et al. [34] ont développé une méthode de GC-MS pour la recherche de 40 médicaments appartenant à des familles variées, comme des BZD, des neuroleptiques, des hormones, des antiépileptiques, des antalgiques, des anesthésiques... dans le but d'évaluer les rendements d'extraction. A 1 mL de sang, ils ont ajouté 500 mg de $MgSO_4$, 250 mg de NaCl, et 2 mL d'ACN, puis ont procédé à une étape de *clean-up* (PSA et $MgSO_4$). La validation de la méthode a porté sur 8 composés différents. Les rendements ont tous été évalués à plus de 80% avec un coefficient de variation inférieur à 10%. Les limites de détection étaient en accord avec les utilisations de la méthode.

Matsuta et al. [35] ont étudié 13 analytes (amphétamines, BZD, antiépileptiques, neuroleptiques) à la fois par GC-MS et LC-MS. Après avoir optimisé les quantités de sels et de solvants, les auteurs ont retenu les conditions suivantes : 100 μL de sang, auxquels sont ajoutés 100 mg de $MgSO_4$ et 50 mg de NaCl ainsi que 500 μL d'ACN contenant 0.2% d'acide acétique. Une étape d'évaporation a été ajoutée. Les rendements ont été évalués entre 59 et 93%. Les limites de détection étaient là-aussi satisfaisantes et la méthode a été favorablement comparée à une méthode de LLE déjà mise en place par ces auteurs.

Anzillotti et al. [36] ont validé une méthode pour la recherche et le dosage de BZD ainsi que de drogues (opiacés, cocaïne, LSD, amphétamines) par LC-MS/MS à partir d'1 mL de sang (préalablement hydrolysé si besoin).

Usui et al. [37-39] ont développé une méthode comprenant plus de 90 composés (médicaments et drogues, tels que des BZD, des neuroleptiques, des antiépileptiques, des anesthésiques...). Cette méthode a été appliquée à un contexte de médico-légale et les auteurs rapportent un temps de préparation des échantillons de quelques minutes, contre presque une heure avec une préparation classique de SPE.

7. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

7.1 La chromatographie en phase liquide

La chromatographie est une technique de séparation pouvant être couplée à un détecteur en vue d'une analyse qualitative et/ou quantitative. En chromatographie, l'échantillon contenant un ou plusieurs solutés est entraîné par un courant de phase mobile (liquide ou gaz) à travers une phase stationnaire. La séparation est fondée sur le partage des solutés entre ces deux phases. En effet, chaque soluté se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques physico-chimiques et de celles de ces deux phases. Il existe deux types de chromatographie en phase liquide : en phase normale (phase stationnaire polaire et phase mobile apolaire) et en phase inverse (phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire). La technique en phase normale est peu utilisée dans le domaine biologique, alors que la deuxième technique est très utilisée pour les xénobiotiques, notamment les BZD en raison de leur caractère apolaire. Ces solutés ont donc une plus grande affinité pour la phase stationnaire que des composés polaires.

Ensuite, la phase mobile usuelle en LC-MS/MS est composée d'un mélange de tampon formiate d'ammonium et d'ACN et/ou méthanol. Ces solvants sont très utilisés car ils sont très facilement volatilisables et ionisables dans la source électrospray d'un spectromètre de masse. De plus, le mélange de plusieurs solvants permet d'ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile, et donc de jouer sur la rétention et la séparation d'un mélange complexe. C'est pourquoi, dans la littérature, l'utilisation d'un gradient d'éluion est systématique pour analyser des BZD [40].

Le principe est le suivant : la phase mobile contenant l'échantillon est injectée à travers la phase stationnaire qui est contenue dans un fin capillaire appelé colonne de chromatographie. Selon leurs propriétés, les molécules sont plus ou moins retenues et mettent plus longtemps à traverser le capillaire. Chaque molécule traverse la colonne avec un temps qui lui est propre, appelé temps de rétention (t_R). Dans des conditions standardisées, ce temps est caractéristique de la molécule d'intérêt et contribue à son identification. L'injection des composés étudiés dans le système de chromatographie nécessite leur extraction préalable de l'échantillon biologique.

L'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) est une chromatographie en phase liquide qui utilise une colonne de très faible porosité dans laquelle l'échantillon doit être injecté à haute pression. Cette caractéristique la rend plus discriminante et permet d'améliorer la résolution du système.

L'appareil de chromatographie se compose d'un système permettant l'injection de l'échantillon, d'une pompe permettant l'entrée de l'analyte en solution dans la colonne, de la colonne elle-même, le tout couplé à un détecteur (par exemple un spectromètre de masse ou un détecteur UV-visible), ainsi qu'un système informatique permettant de visualiser puis traiter les données. La [Figure 6](#) résume la composition du système.

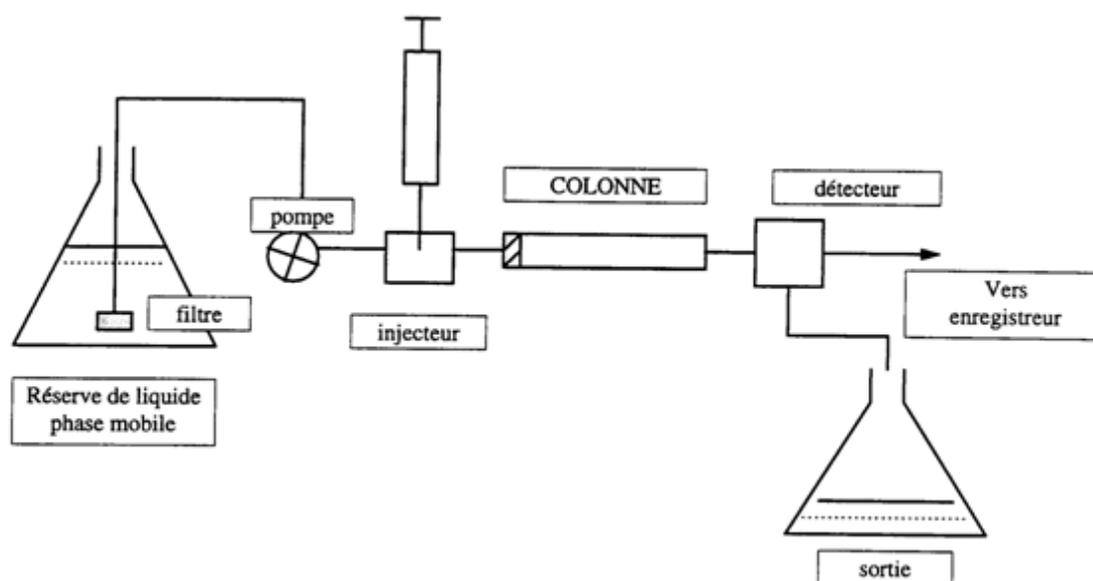


Figure 6: Composants d'un appareil de chromatographie liquide (d'après [44])

7.2 La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem est une technique permettant la détection et l'identification de molécules chargées par mesure de leur rapport masse sur nombre de charge (m/z). C'est un détecteur universel, très sensible et sélectif qui peut être couplé à la chromatographie [41–43].

Tout d'abord, les solutés sont ionisés dans la source du spectromètre de masse. Son rôle n'est pas seulement d'ioniser les molécules d'intérêt mais également d'évaporer le solvant. Pour un couplage avec la chromatographie en phase liquide, il existe différents types de sources pouvant être utilisés à pression atmosphérique : électrospray (ESI) ou ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

En électrospray, la phase mobile contenant les molécules d'intérêt est introduite dans un capillaire métallique soumis à un potentiel électrique (négatif ou positif), ce qui crée un aérosol ionisé. Grâce à la température élevée de la source, les gouttelettes sont désolvatées puis explosent à cause de la trop grande densité de charge générant des ions pseudo-moléculaires (voir [Figure 7](#), [44]). Si la source est utilisée en mode positif, cela crée des ions protonés de forme $[M+H]^+$. Si elle est utilisée en mode négatif, on crée des ions de forme $[M-H]^-$.

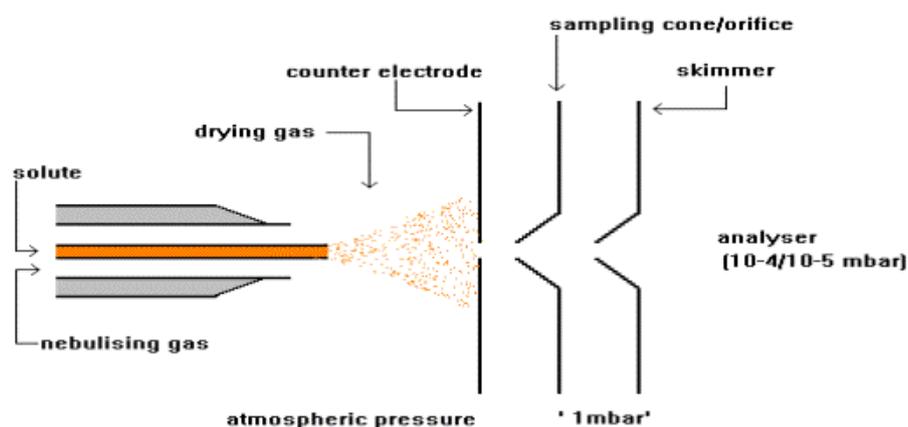


Figure 7: Schéma d'une source électrospray

En APCI, les composés élués par la phase mobile sont introduits dans un tube en matière inerte (céramique) hautement chauffé qui les volatilise. De plus, une aiguille corona réalise des décharges électriques provoquant l'ionisation d'un gaz réactant présent dans la source. Les collisions entre le gaz réactant ionisé et les composés à l'état gazeux conduisent à des ions d'intérêt multichargés de type $[M+nH]^{n+}$.

Ensuite, les ions traversent deux analyseurs disposés en série. Ces derniers peuvent être de même nature ou de nature différente. Les spectromètres de masse en

tandem pouvant être utilisés dans le service de Pharmacologie-Toxicologie et Pharmacovigilance sont constitués de trois quadripôles en ligne.

Un quadripôle (ou quadrupôle) est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique, ou cylindrique. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et soumises au même potentiel. Les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels de même valeur, mais de signe opposé. Entre ces électrodes, les ions ont une trajectoire oscillante. Mais seuls ceux dont la trajectoire est mise en résonance traversent l'analyseur et sont détectés par un multiplicateur d'électrons qui transforme le signal chimique en signal électrique. Les quadripôles permettent donc de « filtrer » les différents ions. Dans le cas de la spectrométrie de masse en tandem, les ions pseudo-moléculaires, appelés également ions parents, sont sélectionnés dans le premier quadripôle. Ils sont ensuite fragmentés dans le deuxième qui est une cellule de collision. Les fragments ou ions fils sont filtrés dans le dernier quadripôle. On observe donc la transition entre un ion parent et un de ses fragments. La [Figure 8](#) [45] illustre le principe du filtre quadripolaire.

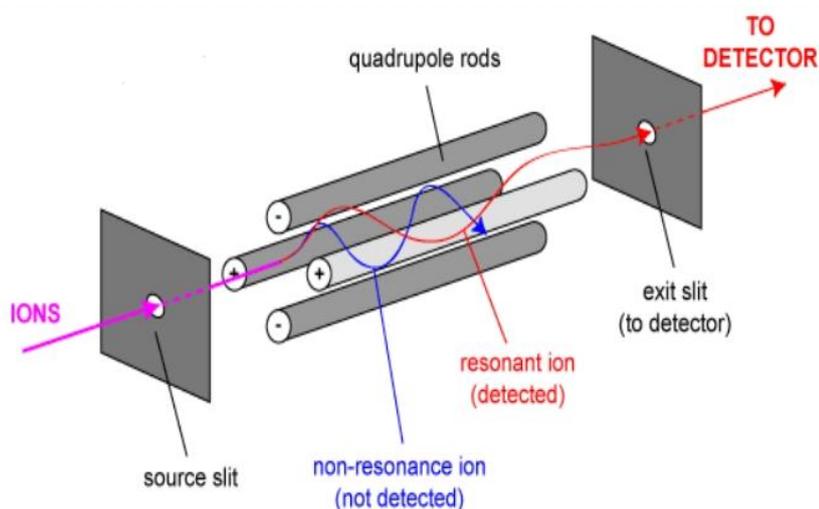


Figure 8: Principe du filtre quadripolaire

Le principe de l'acquisition scannée des données est de diviser le temps imparti à la détection en « scan » : au cours de chaque balayage, le spectre de masse de l'analyte est enregistré et le résultat est une succession de très nombreux spectres de masse. Plus le nombre de scans par minute est élevé, plus la résolution des pics chromatographiques est importante. Le mode d'acquisition de transitions multiples (MRM, *multiple reaction monitoring*), adapté au quantitatif, est utilisé lors d'une

recherche d'un grand nombre de molécules dans un échantillon. Pour chaque molécule, on suit au minimum 2 transitions : une seule est utilisée pour la quantification, la deuxième participe à l'identification de la substance.

Une fois la méthode développée, l'acquisition des données sera effectuée en « *schedule MRM* ». Ce mode permet de scanner les transitions caractéristiques d'un composé uniquement autour de son temps de rétention. Ainsi, le nombre de transitions devant être observées en même temps est plus faible, ce qui augmente le nombre de scans par transition. Par conséquent, les pics chromatographiques seront davantage résolus. Le résultat est un gain en sensibilité.

7.3 Principe de l'étalon interne : molécule deutérée

Afin de s'affranchir des variations liées aux étapes de préparation d'échantillon (extraction par exemple), on rajoute dans l'échantillon initial un étalon interne (EI) [46]. Il s'agit d'un composé très similaire à l'analyte et n'ayant pas d'interactions avec celui-ci. Il doit présenter des propriétés physico-chimiques et structurales très proches du composé d'intérêt, afin d'être extrait, séparé et détecté de la même façon que lui. Cet étalon interne ajouté en début d'analyse subit alors les mêmes étapes que l'analyte étudié. Etant ajouté en concentration connue dans les échantillons biologiques et dans la gamme en début d'analyse, le rapport des aires sous les courbes des signaux de l'étalon interne et de l'analyte permet ainsi de s'affranchir des pertes liées aux différentes étapes analytiques (préparation d'échantillon, extraction...).

Il est usuel d'utiliser comme étalon interne des isotopes deutérés des différentes molécules à rechercher, c'est-à-dire contenant un ou plusieurs atomes de deutérium à la place d'un atome d'hydrogène. Le deutérium (symbole 2H ou D) est un isotope naturel de l'hydrogène. Ainsi, l'étalon interne diffère de la molécule d'intérêt d'au moins une unité de masse atomique. Il possède toutes les qualités nécessaires à un étalon interne, mais sa masse plus élevée le différencie de l'analyte à doser en spectrométrie de masse.

Deuxième partie : Travaux personnels

1. Objectif des travaux

Depuis leur introduction en 2003 par Anastassiades et al. (Article cité plus de 1000 fois dans la littérature), les sels QuEChERS ont principalement été utilisés pour la recherche et le dosage des résidus de pesticides dans les matrices alimentaires. Cependant, ces dernières années ont été développées des méthodes de dosage de médicaments dans les milieux biologiques, comme par exemple le sang, l'urine ou le foie. Toutefois, ces applications restent encore limitées, comme en témoignent le peu d'articles publiés sur ce sujet dans les revues scientifiques.

C'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux : le développement d'une méthode de recherche et dosage des BZD (psychotropes utilisés comme hypnotiques, anxiolytiques, anticonvulsivant, myorelaxants). Une telle méthode existait déjà dans le laboratoire du CHU de Limoges, mais basée sur de « vieilles » procédures d'extraction, coûteuses et chronophages, et mise en œuvre sur d'anciens systèmes de LC-MS/MS.

L'objectif de mon travail était le développement d'une méthode de recherche et de dosage par LC-MS/MS de 36 benzodiazépines et apparentés en utilisant une extraction à base de sels QuEChERS.

La méthode devait permettre d'obtenir des limites de détection basses, de l'ordre de 5 µg/L, en utilisant si possible des conditions analytiques identiques à d'autres méthodes utilisées en routine au laboratoire (phases mobiles et colonne de chromatographie). En effet, d'un point de vue pratique, cette méthode devait pouvoir s'insérer dans le panel des méthodes du laboratoire, c'est à dire un temps de préparation des échantillons et un temps d'analyse compatible avec une utilisation en routine

La méthode devait être applicable dans les différents contextes déjà mentionnés: ajustement de posologie, suivi de l'observance, contextes de ML, soumission chimique...

Une autre contrainte, très pratique mais importante, est qu'il fallait que pour un même système LC-MS/MS, plusieurs méthodes coexistent, c'est-à-dire pouvoir enchaîner différentes méthodes sans devoir changer de colonne ou de phase

mobile. Il fallait donc faire appel à des conditions identiques à d'autres méthodes utilisées sur ce système, ceci en vue d'améliorer la vitesse de rendu des résultats.

2. Matériel et méthode

2.1 Principe de l'analyse

La **Figure 9** illustre les étapes de préparation des échantillons avant injection dans le système chromatographique.

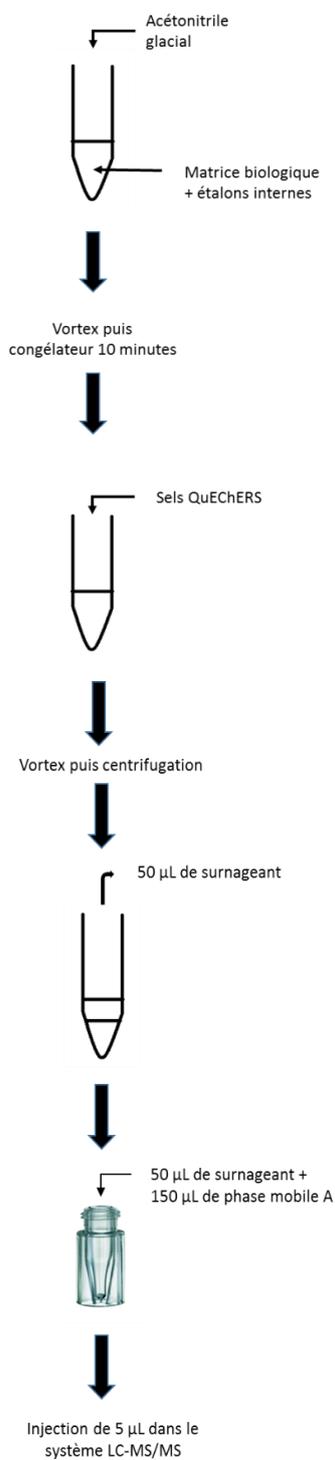


Figure 9: principe de la préparation des échantillons

2.2 Matériel et réactifs

Une liste des solvants et substances pures est présentée dans le [Tableau 3](#).

Réactif	Fournisseur
Substances pures :	
<p><u>EI</u>: 7 aminoclonazepam D4 ; 7 aminoflunitrazepam D7 ; alprazolam D5 ; clonazepam D4 ; desalkylflurazepam D4 ; desmethylflunitrazepam D4 ; diazepam D5 ; flunitrazepam D7 ; triazolam D4 zopiclone D4</p> <p><u>Molécules d'intérêt</u> : 2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine ; 3-OH-bromazépam ; 7-aminoclonazépam ; 7-aminoflunitrazépam ; 7-aminonitrazépam ; ACP; alprazolam ; bromazépam ; chlordiazepoxide ; clobazam ; clonazepam ; clotiazepam ; desalkylflurazepam ; diazepam ; estazolam ; flunitrazepam ; flurazepam ; loflazepate d'ethyle ; lorazepam ; lormetazepam ; midazolam ; nitrazepam ; norclobazam ; nordazepam ; OH-alprazolam ; oxazepam ; temazepam ; triazolam ; zolpidem ; zopiclone</p>	LGC Standard® ou équivalent
1-OH midazolam ; desmethylflunitrazepam ; 3-OH flunitrazepam ; 4-OH midazolam ; loprazolam ; tetrazepam ;	Lipomed®
Solvants	
Méthanol	Fischer Chemical®
Acétonitrile	Biosolve Chemical®
Eau désionisée et purifiée	Obtenu <i>in situ</i> par passage sur système Millipore®
Substances pures	
Formiate d'ammonium	Biosolve Chemical®

Tableau 3: Liste et provenance des solvants et substances pures utilisées

Une solution mère à 5 mg/L était préparée avec les 35 BZD (toutes sauf ACP (2-amino 5-chloropyridine) car cette molécule ne fait l'objet que d'une recherche qualitative) et apparentés dans un mélange méthanol / ACN (50/50 v/v), et conservée au congélateur à -20°C. Des solutions filles à 0.5 mg/L et 0.05 mg/L étaient préparées extemporanément dans de l'ACN.

Une solution à 1 mg/L contenant les 10 EI était préparée dans une solution méthanol / ACN (50/50 v/v) et conservée au congélateur à -20°C.

2.3 Préparation des échantillons et de la gamme de calibration

L'extraction était basée sur l'utilisation de sels QuEChERS. Le protocole retenu était le suivant : à 100 µL de matrice sont ajoutés 200 µL d'ACN glacial (stocké à -20°C). Après agitation au vortex, la solution repose ensuite 10 minutes au congélateur. L'équivalent d'une spatule de sels QuEChERS Mix I (soit environ 40 mg ; voir paragraphe discussion) était ajoutée, puis la solution était agitée au vortex et mise à centrifuger pendant 10 minutes à 13000 tours/min environ. Finalement, 50 µL de surnageant était dilué dans 150 µL de phase mobile A, avant injection de 5 µL dans le système LC-MS/MS.

La gamme d'étalonnage était réalisée dans du plasma selon la procédure décrite dans le [Tableau 4](#).

Concentration (µg/L)	Gamme de calibration									CIQ		Echantillon à analyser
	0	5	10	50	100	200	500	1000	2000	Niveau 1	Niveau 2	Inconnue
Matrice vierge (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-	100
Solution BZD 5 mg/L (µL)	-	-	-	-	-	-	10	20	40	-	-	-
Solution BZD 0.5 mg/L (µL)	-	-	-	10	20	40	-	-	-	-	-	-
Solution BZD 0.05 mg/L (µL)	-	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solution CIQ (µL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-
Solution EI 1 mg/L (µL)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
ACN -20°C (µL)	200	190	180	190	180	160	190	180	160	200	200	200

Tableau 4: Grille de préparation de la gamme de calibration, des CQI et des échantillons pour la recherche et le dosage des benzodiazépines (BZD : benzodiazépines ; CIQ : contrôle interne de qualité ; EI : étalon interne)

2.4 Conditions chromatographiques

Le système chromatographique en phase liquide associait deux pompes Nexera X2 LC-30AD, un four CTO-20AC et un passeur d'échantillons Nexera X2 SIL-30AC (Shimadzu, France).

Après avoir testé différentes colonnes chromatographiques et différentes conditions de gradient d'élution, les conditions suivantes ont été retenues :

La séparation chromatographique était assurée par une colonne Pinnacle DB PFPP (Restek®) de dimension 50 mm x 2.1 mm et de granulométrie 1.9 µm. Il s'agit d'une colonne de phase inverse de type PFP (pentafluorophenyl).

La phase mobile A était constituée d'un mélange de formiate d'ammonium 5 mM dans de l'eau désionisée avec 0.1 % d'acide formique (v/v) et la phase mobile B d'un

mélange méthanol / ACN (80/20 v/v) additionné de 0.1 % d'acide formique (v/v). Le débit était de 0.474 mL/min, et la température du four de 50°C.

Le gradient utilisé est présenté dans le [Tableau 5](#):

Temps (min)	Pompe A : tampon formiate 5 mM + 0.1% acide formique (%)	Pompe B : méthanol / acétonitrile (80/20 v/v) +0.1% acide formique (%)
0	75	25
0.16	75	25
0.65	65	35
0.70	55	45
5	45	55
5.05	5	95
5.20	5	95
5.25	75	25
6.3	75	25

Tableau 5: Gradient utilisé

2.5 Spectrométrie de masse en tandem

La détection était réalisée au moyen d'un spectromètre de masse 8050 (Shimadzu®, France). L'ionisation par électrospray en mode positif a été mise en œuvre pour toutes les BZD recherchées.

Les principaux paramètres optimisés de la source électrospray étaient les suivants :

- Interface de voltage : valeurs obtenues lors de la calibration de l'appareil ;
- *nebulizing gas flow*: 3 L/min;
- *heating gas flow*: 10 L/min;
- *interface temperature*: 300°C;

- *DL (desolvation line) temperature: 250 °C;*
- *heat block temperature: 400°C;*
- *drying gas flow: 10 L/min*

L'acquisition des données par un mode de balayage MRM (*multiple reaction monitoring*) permettait de détecter plusieurs couples ion parent / ion fragment.

Les transitions MRM ont été sélectionnées après injection de solutions pures de chaque composé et des 10 étalons internes (EI) sélectionnés.

Toutes les transitions étaient scannées pendant 0,7 minute autour de leur temps de rétention de référence.

La [Figure 10](#) rapporte une photo du système LC-MS/MS.



Figure 10: Système LC-MS/MS utilisé pour les travaux personnels

2.6 Validation de la méthode

Le laboratoire de pharmacologie et toxicologie du CHU de Limoges travaille pour partie sous accréditation COFRAC (Comité Français d'Accréditation) (n° 8-2607), en portée flexible. Avant de pouvoir être utilisée en routine, toute méthode analytique nouvellement développée doit être validée selon la norme ISO 15189.

Il existe ainsi au sein du laboratoire et, pour répondre aux exigences du COFRAC, une procédure de validation des méthodes analytiques. La méthode nouvellement développée a donc suivi cette procédure de validation propre au laboratoire.

34 molécules (toutes sauf OH-alprazolam et ACP) subissent la procédure de validation (cf résultats).

Les paramètres étudiés sont les suivants :

La linéarité est la capacité d'obtenir des signaux directement proportionnels à la concentration en substance à analyser de l'échantillon. L'étude de la linéarité s'étend sur **six jours en réalisant six gammes comportant un blanc et à trois niveaux de concentrations**(5, 500 et 2000 µg/L) répartis sur le domaine de mesure. La gamme de calibration a été préparée avec 8 niveaux de concentration et un blanc. Les 3 niveaux (5, 500 et 2000 µg/L) sont là pour vérifier la répétabilité et la reproductibilité. La linéarité est vérifiée par le coefficient de détermination R^2 qui doit être supérieur à 0,99.

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon dans des conditions définies. Elle s'exprime par la mesure de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire. La **répétabilité** mesure la variabilité intra-jour des résultats. Elle a consisté en **six répétitions des trois niveaux de concentration** (5, 500 et 2000 µg/L).

La fidélité intermédiaire mesure la variabilité inter-jour des résultats. **Pendant six jours différents, une gamme d'étalonnage et un point pour chacun des trois niveaux de concentration ont été réalisés.**

Ces deux critères sont évalués par le calcul du coefficient de variation et du biais (ils doivent être inférieurs à 20%).

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de référence et la valeur expérimentale obtenue en appliquant la procédure d'analyse plusieurs fois. Elle fournit une indication sur les erreurs systématiques.

La limite de quantification est la plus faible concentration pour laquelle la fidélité et l'exactitude ont été démontrées et qui répond à la relation : signal / bruit ≥ 10 . En pratique, elle est définie comme la plus petite valeur quantifiable pour laquelle on obtient un CV et un biais inférieurs à 20%.

Les épreuves de dilution ont consisté à préparer des échantillons (n=6) à une concentration correspondant à 1,5 fois le point le plus haut de la gamme, puis à

réaliser des dilutions au demi, au quart et au dixième. Le biais a été calculé entre la valeur attendue et la valeur calculée.

Les accords entre matrice ont été évalués dans l'urine, le sang total et le sérum/plasma pour les 34 molécules. Pour cela, **une gamme de calibration a été effectuée dans la matrice contrôle (sérum), puis 6 points de répétabilité sont effectués dans chacune des autres matrices à 3 niveaux de concentration (5, 500 et 2000 µg/L)**. Il est considéré qu'il existe un bon accord entre matrice si le coefficient de variation ainsi que le biais par rapport à la valeur cible sont inférieurs à 20%.

L'étude de **la suppression ionique ou effet de matrice** (coélution des composés de la matrice avec les analytes d'intérêt pouvant altérer leur ionisation) a été effectuée grâce à six urines différentes, 6 plasmas et sang totaux ainsi que de l'eau purifiée. Toutes ces matrices ont été enrichies à 750 µg/L avec tous les composés, puis l'extraction QuEChERS a été effectuée. La suppression ionique (ou l'amélioration potentielle du signal) a été explorée par comparaison du signal de chaque molécule d'intérêt dans la matrice et dans l'eau purifiée.

Les rendements d'extraction ont été déterminés à **deux niveaux de concentration (5 et 2000 µg/L) en comparant le rapport des aires analyte / EI obtenus après extraction** d'échantillons surchargés (n=6) avec ceux d'extraits de matrice vierge dopés avant injection (n=3).

2.7 Comparaison avec la méthode de référence

Les résultats obtenus pour la procédure complète ont été comparés à ceux obtenus avec la procédure utilisée jusqu'alors en routine dans le service. Il s'agissait également d'une méthode de LC-MS/MS (validée selon la norme ISO 15189) : séparation chromatographique par une colonne Kinetex C18 (2.6 µm, 50 mm x 3.0 mm) et détection par un système API 3200 QTRAP (AB SCIEX, France). Cette méthode recherchait 32 molécules.

L'étude a porté sur la comparaison des échantillons de 50 patients. Les analyses ont été effectuées les mêmes jours sur les 2 appareils.

3. Résultats

3.1. Conditions d'analyse retenues

La [Figure 11](#) représente le chromatogramme obtenu pour une solution surchargée comportant les 35 BZD à une concentration de 1000 µg/L et les 10 étalons internes. Le temps d'analyse total est de 6.3 minutes. Les molécules sont éluées entre 0.9 minute (7-aminonitrazépam) et 5.1 minutes (flurazépam).

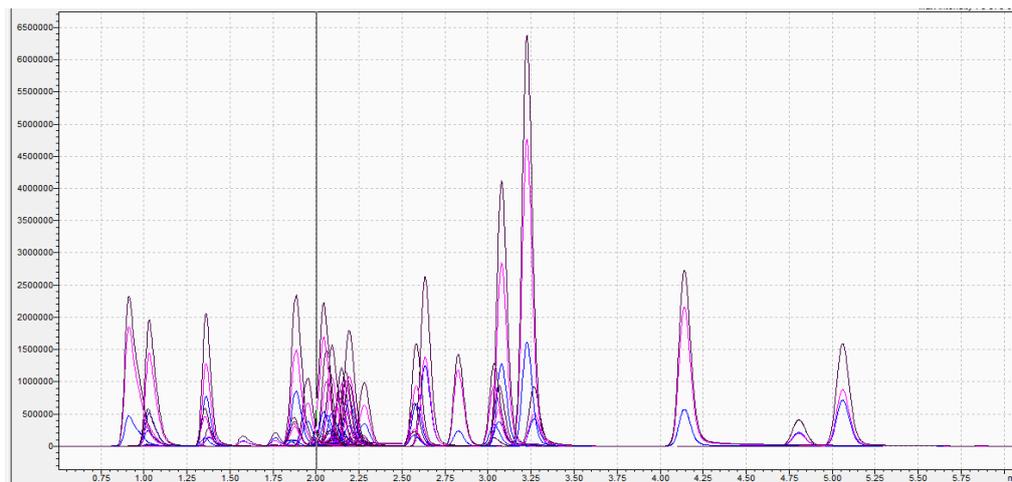


Figure 11: Chromatogramme obtenu (étalon 1000 µg/L) dans les conditions chromatographiques décrites précédemment (colonne PFPP) représentant les molécules d'intérêt et les EI

Les temps de rétention attendus de chacun des composés, BZD et étalons internes, ainsi que leurs transitions MRM, sont présentés dans le [Tableau 6](#) et le [Tableau 7](#). Chaque BZD est associée à un étalon interne spécifique qui est utilisé lors des étapes de quantification.

Substance	Ion parent (m/z)	Ions fragments de première génération (m/z)	Temps de rétention (min)	N° EI
7 aminoclonazepam D4	289.90	121.35 226.40	1.044	6
7 aminoflunitrazepam D7	291.10	138.40 230.35	1.346	3
alprazolam D5	314.10	286.40 210.35	2.138	7
clonazepam D4	319.90	274.15 218.15	2.104	8
desalkylflurazepam D4	293.00	140.30 230.40	2.074	2
desmethylflunitrazepam D4	304.00	258.25 202.35	2.006	1
diazepam D5	289.80	198.25 227.30	2.586	9
flunitrazepam D7	321.10	275.45 246.45	2.263	5
triazolam D4	346.90	312.40 243.35	2.099	4
zopiclone D4	393.00	245.20 217.20	2.202	10

Tableau 6: Transitions MRM des étalons internes, temps de rétention et groupe EI

Substance	Ion parent (m/z)	Ions fragments de première génération (m/z)	Temps de rétention (min)	EI associé
1-OH-midazolam	341.90	324.20 168.20	3.040	3
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	278.80	78.15 106.20	2.057	1
3-OH-bromazepam	333.80	289.00 78.15	1.373	1
3-OH-flunitrazepam	329.90	284.20 238.20	1.959	1
4-OH-midazolam	341.90	297.10 234.15	3.273	6
7-aminoclonazepam	285.90	250.20 195.15	1.027	6
7-aminoflunitrazepam	284.00	227.25 240.20	1.354	3
ACP	129.00	76.2 112.2	0.789	-
alprazolam	308.90	281.25 274.30	2.149	7
bromazepam	316.00	182.35 209.25	1.582	3
chlordiazepoxide	299.90	282.25 227.20	2.646	3
clobazam	300.90	259.20 224.25	2.044	5
clonazepam	315.90	214.35 241.35	2.112	8
clotiazepam	318.90	291.20 218.15	3.071	5
desalkylflurazepam	289.00	140.25 165.25	2.097	2
desmethylflunitrazepam	300.00	198.35 225.30	2.008	1
diazepam	284.90	193.30 154.30	2.597	9
estazolam	294.90	267.20 205.30	1.900	1
flunitrazepam	314.00	268.40 239.30	2.283	2
flurazepam	388.10	317.30 288.20	5.088	6
loflazepate d'ethyle	361.00	259.20 289.35	2.840	5
loprazolam	464.90	111.30 85.20	4.812	3
lorazepam	320.90	275.00 229.10	1.872	9
lormetazepam	335.00	289.10 177.15	2.182	2

suite tableau page suivante

Substance	Ion parent (m/z)	Ions fragments de première génération (m/z)	Temps de rétention (min)	EI associé
midazolam	326.00	291.20 223.20	4.177	3
nitrazepam	282.00	180.35 207.30	2.107	1
nordazepam	271.00	140.30 208.30	2.225	2
OH-alprazolam	325.00	252.00 216.15	1.852	11
oxazepam	286.90	241.20 104.20	1.875	1
temazepam	301.00	255.35 177.30	2.138	5
triazolam	343.00	308.25 239.30	2.098	4
zolpidem	308.10	235.35 263.40	3.245	6
zopiclone	389.00	245.30 217.25	2.205	10
tetrazepam	288.90	225.35 197.35	3.061	5

Tableau 7: Transitions MRM des substances d'intérêt, temps de rétention et groupe EI

Les paramètres spécifiques du spectromètre de masse sont présentés dans les Annexes 5 et 6.

L'Annexe 7 présente les transitions MRM des différentes molécules ainsi que l'abondance relative (%) de la deuxième transition (transition de confirmation).

Nous avons obtenu pour toutes les molécules un modèle quadratique avec une pondération en $1/x$ car ce modèle nous donnait les meilleurs résultats. En effet avec des rapports de 1 à 400 entre la plus faible et la plus forte concentration, certaines courbes de calibration présentent un profil quadratique plus que linéaire. Tous les R^2 étaient supérieurs à 0,990. La [Figure 12](#) ci-dessous représente un exemple de courbe de calibration obtenue pour le diazépam.

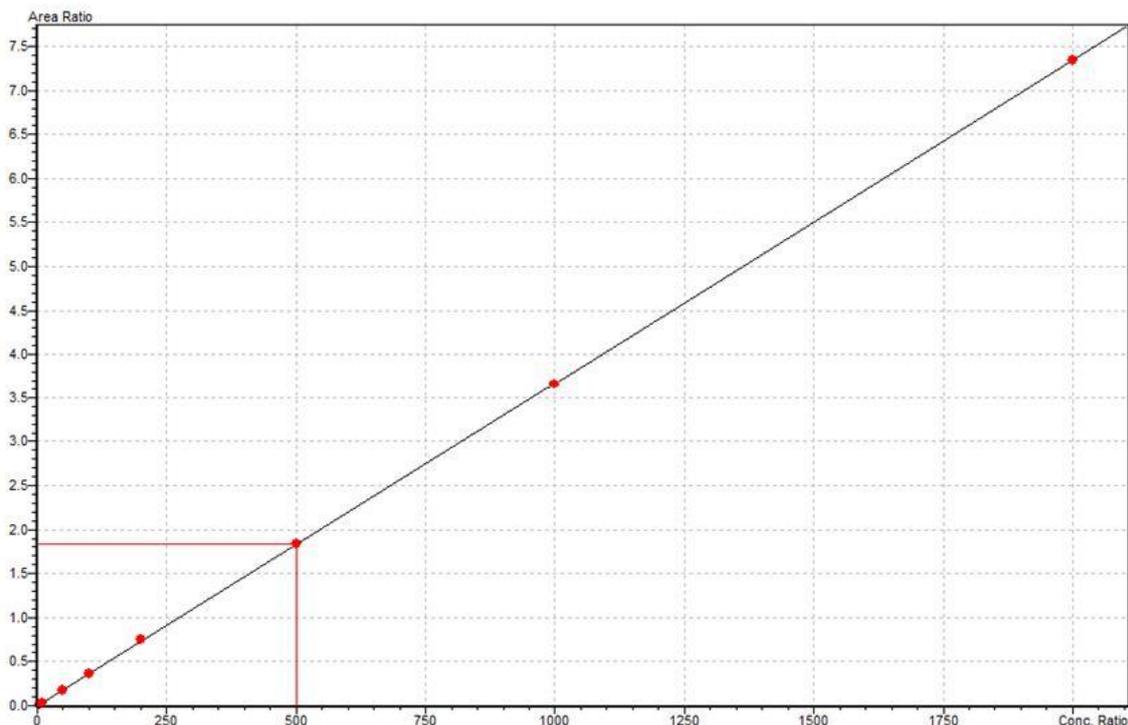


Figure 12: Droite de calibration obtenue pour le diazépam

3.2. Validation de la méthode

Les résultats de la procédure de validation sont donnés dans les Tableaux 8, 9 et 10, les résultats de l'étude de la suppression ionique étant disponibles en Annexe 8. Aucune suppression ionique n'a été observée.

Le [Tableau 8](#) rapporte les valeurs des rendements, les calculs de la fidélité intermédiaire et de la répétabilité aux 3 niveaux de concentration.

Remarque 1 : l'hydroxyalprazolam ainsi que l'ACP (produit de dégradation du zopiclone) n'ont pas fait l'objet de la procédure de validation. Ces deux molécules sont donc recherchées, mais aucun résultat quantitatif ne peut être rendu.

En effet, en ce qui concerne l'ACP, seules ses transitions sont suivies dans la méthode. Le zopiclone étant très labile, le fait de suivre son produit de dégradation permet de soit confirmer ou infirmer une présence de zopiclone, soit de prouver une prise de zopiclone malgré la non présence de zopiclone.

L'OH-alprazolam a suivi la procédure de validation, mais comme l'accord entre matrice à la plus faible concentration n'a pas été satisfaisant, nous avons décidé de ne pas rendre de résultat quantitatif sur cette molécule. Sa présence permet de confirmer la présence ou la prise d'alprazolam.

Remarque 2 : les rendements d'extraction observés à 5 µg/L se situent entre 37 et 49%, ce qui est assez faible. Cependant, il est habituel d'observer ce phénomène vers les limites basses de quantification, alors que ce résultat est habituellement haut vers les valeurs hautes de quantification. Dans la procédure interne de validation, il est indiqué que « la moyenne des rendements d'extraction aux 2 niveaux de concentration doit être supérieure ou égale à 50%. Cependant, des rendements d'extraction plus faibles peuvent être considérés comme acceptables à la condition que le CV de répétabilité des rendements soit $\leq 20\%$. ». Nos résultats sont donc satisfaisants.

Composé	Rendement (% , n=6) (CV%)		Fidélité intermédiaire (CV%, n=6) (%biais)			Répétabilité (CV%, n=6) (%biais)		
	5 µg/L	2000 µg/L	5 µg/L	500 µg/L	2000 µg/L	5 µg/L	500 µg/L	2000 µg/L
1-OH midazolam	46.7 (6)	116 (12.0)	8.7 (-8.9)	6.8 (-3.8)	3.7 (-1.8)	7.5 (7.4)	2.8 (-1.9)	3.2 (-0.9)
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	45.0 (17.5)	89.7 (4.3)	4.8 (8.6)	9.3 (-5.4)	3.3 (-0.3)	8.4 (18.5)	6.5 (-6.0)	4.5 (-4.2)
3-OH bromazepam	40.7 (8.0)	92.2 (4.2)	11.1 (8.3)	9.1 (-7.1)	2.3 (0.7)	10.8 (19.5)	7.9 (-4.9)	4.2 (-3.1)
3-OH flunitrazepam	44.1 (5.4)	89.7 (4.6)	11.4 (2.5)	11.2 (-3.6)	3.6 (-1.2)	4.7 (11.5)	5.8 (-3.7)	4.5 (-2.1)
4-OH midazolam	42.2 (5.4)	70.6 (3.5)	12.4 (-4.5)	12.7 (-4.2)	4.6 (-4.2)	11.0 (9.6)	6.1 (5.3)	5.6 (-9.9)
7-aminoclonazepam	43.8 (2.7)	106.0 (1.3)	11.3 (-3.4)	10.7 (-2.3)	4.4 (-2.7)	4.7 (7.0)	4.5 (3.5)	4.4 (3.3)
7-aminoflunitrazepam	41.4 (2.9)	104.0 (7.1)	14.1 (-4.7)	10.8 (-1.7)	3.4 (-1.7)	4.2 (17.8)	3.1 (-0.7)	3.6 (-0.7)
7-aminonitrazepam	43.0 (1.7)	95.9 (2.5)	11.7 (-7.4)	11.5 (-3.3)	5.0 (-3.2)	8.4 (9.0)	3.2 (5.1)	2.3 (-3.4)
Alprazolam	46.3 (7.1)	90.8 (6.7)	8.6 (1.9)	8.3 (-1.5)	6.2 (+0.6)	6.7 (12.8)	4.9 (-1.6)	12.9 (1.2)
Bromazepam	57.5 (11.4)	83.4 (2.5)	7.7 (-7.9)	13.2 (-1.6)	4.9 (-1.5)	10.1 (17.5)	4.3 (2.6)	3.1 (-0.8)
chlordiazepoxide	44.0 (3.2)	91.2 (3.7)	5.3 (18.8)	3.1 (-0.9)	3.6 (-1.7)	3.0 (19.3)	-1.7 (14.3)	0.5 (18.0)
Clobazam	42.3 (3.2)	86.7 (5.2)	13.1 (-1.4)	12.5 (-2.5)	6.5 (-1.1)	6.2 (17.1)	5.8 (-0.4)	5.7 (-4.5)
Clonazepam	45.1 (6.4)	89.9 (3.4)	13.5 (-7.6)	12.1 (-4.7)	9.1 (-3.4)	10.3 (17.6)	3.2 (-4.3)	4.2 (-1.3)
Clotiazepam	41.4 (3.3)	105.6 (3.2)	11.6 (-0.9)	11.7 (-3.5)	5.2 (-1.2)	7.6 (14.9)	4.3 (-0.8)	4.1 (-6.4)
Desalkylflurazepam	47.5 (9.5)	103.7 (6.3)	15.1 (-5.3)	8.5 (0.2)	5.7 (-5.1)	11.9 (-8.4)	3.6 (6.8)	3.6 (-2.4)
Desmethylflunitrazepam	48.8 (7.8)	103.9 (10.8)	16.6 (-0.8)	10.3 (-0.8)	2.3 (0.0)	19.5 (3.8)	3.7 (-0.7)	3.3 (-2.7)
Diazepam	44.5 (3.9)	90.4 (1.5)	11.1 (-2.9)	11.1 (-2.1)	3.6 (-2.7)	8.2 (17.7)	3.3 (-1.9)	1.6 (-1.3)
Estazolam	39.4 (4.3)	106.2 (4.0)	18.0 (-4.5)	10.3 (-1.2)	2.3 (-0.5)	11.1 (17.5)	4.8 (-3.2)	2.9 (-2.4)

Flunitrazepam	47.9 (9.5)	116.6 (13.5)	16.6 (-11.1)	11.0 (0.1)	7.3 (-6.9)	14.2 (-9.4)	2.9 (4.4)	3.3 (-4.8)
Flurazepam	42.8 (2.6)	114.1 (5.7)	8.1 (-6.5)	10.7 (-3.1)	2.7 (-3.9)	9.1 (8.8)	5.4 (1.4)	3.8 (-8.3)
loflazepate d'ethyle	40.9 (3.7)	116.4 (2.3)	13.9 (-3.9)	12.5 (-3.3)	6.1 (-1.8)	9.3 (5.6)	4.6 (0.8)	3.8 (-6.5)
Loprazolam	44.9 (3.4)	91.2 (3.1)	13.5 (-3.3)	10.9 (-1.2)	5.1 (-2.9)	2.0 (18.9)	3.1 (-1.1)	2.8 (-2.1)
Lorazepam	48.6 (4.8)	88.0 (2.3)	14.7 (-2.1)	11.3 (-1.0)	6.1 (-3.7)	5.9 (10.1)	2.9 (7.6)	2.1 (-4.8)
Lormetazepam	43.2 (5.3)	114.1 (10.6)	5.4 (2.9)	5.4 (0.9)	7.4 (-7.2)	9.5 (3.7)	4.7 (2.9)	3.7 (-7.3)
Midazolam	44.0 (2.1)	112.5 (1.4)	11.6 (-1.9)	11.1 (-1.6)	3.9 (-2.3)	6.8 (16.1)	2.9 (-1.3)	3.5 (-2.5)
Nitrazepam	48.1 (6.8)	91.9 (3.6)	12.0 (5.9)	11.9 (-2.1)	3.4 (-0.6)	5.5 (15.7)	4.7 (-0.1)	3.5 (-0.9)
Norclobazam	41.9 (3.6)	106.9 (4.1)	16.5 (3.5)	10.7 (-3.6)	5.6 (0.7)	17.3 (10.4)	5.5 (-4.9)	3.4 (6.1)
Nordazepam	46.1 (5.1)	89.0 (3.7)	14.6 (1.5)	8.1 (-0.5)	6.0 (-6.1)	11.2 (4.9)	3.8 (6.4)	4.0 (-2.2)
Oxazepam	45.2 (6.6)	91.7 (5.2)	9.1 (-3.6)	10.6 (-2.7)	4.0 (-0.3)	9.0 (8.7)	4.4 (-5.5)	4.4 (-2.0)
Temazepam	37.1 (3.7)	89.1 (3.6)	11.1 (-3.9)	10.7 (-3.8)	5.5 (-0.4)	8.3 (9.7)	5.8 (-1.6)	3.6 (-8.7)
Tetrazeepam	41.7 (4.8)	90.0 (4.4)	10.6 (1.4)	12.3 (-5.1)	6.9 (0.7)	13.2 (9.2)	4.3 (-1.1)	4.7 (-7.0)
Triazolam	41.5 (4.5)	85.9 (3.6)	8.0 (-3.1)	9.5 (-3.3)	8.0 (0.4)	12.6 (9.0)	4.8 (4.6)	4.1 (-0.5)
Zolpidem	43.8 (3.7)	74.6 (3.3)	12.5 (-2.9)	10.3 (-3.8)	8.2 (-0.1)	9.7 (16.3)	5.4 (2.6)	4.4 (-8.0)
Zopiclone	42.9 (6.9)	89.4 (1.8)	18.9 (-0.9)	10.5 (0.3)	4.0 (0.0)	12.9 (6.8)	3.2 (-0.7)	2.0 (-2.8)

Tableau 8: Rendements, fidélité intermédiaire et répétabilité à 3 niveaux de concentration (LOQ, concentration intermédiaire et concentration maximale):

Les CV des rendements d'extraction n'excédaient pas 17,5% et étaient inférieurs à 10% pour la plupart des composés. Les CV de fidélité intermédiaire étaient tous inférieurs à 20%. Tous les résultats des épreuves de répétabilité étaient satisfaisants. Le **Tableau 9** rapporte les résultats des épreuves de dilution. Toutes les valeurs observées au cours de cette étude étaient satisfaisantes.

composé	Epreuve de dilution (CV%, n=6) (%biais)		
	1500 µg/L (1.5 Cmax / 2)	750 µg/L (1.5 Cmax / 4)	300 µg/L (1.5 Cmax / 10)
1-OH midazolam	8.1 (4.9)	3.3 (1.6)	1.1 (8.9)
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	3.7 (15.7)	3.8 (0.0)	4.9 (3.6)
3-OH bromazepam	0.9 (11.1)	2.5 (-0.8)	4.0 (8.4)
3-OH flunitrazepam	11.1 (6.9)	3.6 (1.5)	7.4 (3.8)
4-OH midazolam	-0.6 (11.1)	1.6 (7.1)	4.1 (1.0)
7-aminoclonazepam	5.5 (5.1)	3.4 (5.1)	0.8 (7.5)
7-aminoflunitrazepam	8.2 (7.9)	2.2 (4.3)	1.3 (9.8)
7-aminonitrazepam	6.1 (4.3)	1.6 (3.3)	2.1 (8.9)
Alprazolam	4.9 (5.3)	3.3 (0.9)	6.0 (12.3)
Bromazepam	7.5 (3.7)	2.2 (2.9)	7.2 (8.6)
Chlordiazepoxide	5.2 (8.1)	1.9 (4.3)	0.7 (8.8)
Clobazam	5.1 (9.8)	4.1 (3.0)	2.6 (7.4)
Clonazepam	7.2 (1.5)	4.1 (-0.3)	10.4 (5.0)
Clotiazepam	6.3 (12.9)	1.9 (4.7)	3.3 (7.1)
Desalkylflurazepam	8.4 (2.1)	2.9 (-0.3)	1.4 (7.3)
Desmethylflunitrazepam	7.2 (5.1)	3.9 (0.7)	3.7 (7.8)
Diazepam	7.2 (5.5)	4.4 (4.7)	1.6 (3.9)
Estazolam	2.9 (7.9)	0.6 (2.0)	3.9 (9.5)
Flunitrazepam	8.9 (4.4)	7.3 (0.9)	1.9 (8.3)
Flurazepam	8.4 (5.9)	1.4 (4.4)	0.8 (6.5)

Suite tableau page suivante

composé	Epreuve de dilution (CV%, n=6) (%biais)		
	1500 µg/L (1.5 Cmax / 2)	750 µg/L (1.5 Cmax / 4)	300 µg/L (1.5 Cmax / 10)
Loflazepate d'ethyle	8.1 (6.6)	3.8 (0.7)	1.9 (7.6)
Loprazolam	9.8 (6.8)	3.7 (0.6)	0.6 (8.0)
Lorazepam	10.4 (6.3)	3.6 (3.3)	1.7 (3.2)
Lormetazepam	9.1 (6.7)	6.1 (5.5)	4.0 (7.4)
Midazolam	8.5 (6.8)	1.5 (6.7)	0.3 (9.6)
Nitrazepam	5.0 (11.0)	3.1 (3.1)	4.3 (13.9)
Norclobazam	4.0 (11.9)	2.2 (1.7)	4.6 (6.9)
Nordazepam	4.5 (7.8)	4.8 (2.6)	4.5 (7.2)
Oxazepam	7.2 (10.7)	1.7 (3.2)	4.2 (9.7)
Temazepam	4.5 (12.7)	1.6 (4.5)	4.1 (6.7)
Tetrazepam	6.6 (17.5)	6.7 (6.1)	3.9 (4.6)
Triazolam	11.8 (5.2)	0.8 (4.7)	2.6 (4.9)
Zolpidem	8.9 (3.5)	3.9 (8.5)	0.6 (6.2)
Zopiclone	6.4 (11.2)	2.8 (4.1)	1.2 (8.1)

Tableau 9: Epreuve de dilution

Les résultats des épreuves d'accord entre matrices sont présentés dans le [Tableau 10](#).

Pour 6 épreuves réalisées à une concentration de 5 µg/L, les valeurs de CV ou de biais n'étaient pas satisfaisantes (valeurs grisées dans le Tableau 10). Dans ces cas-là, l'accord entre matrice a été vérifié pour une concentration de 10 µg/L.

composé	Accord entre matrice (% CV, %biais) URINE				Accord entre matrice (% CV, %biais) SANG			
	5 µg / L	10 µg / L	500 µg / L	2000 µg / L	5 µg / L	10 µg / L	500 µg / L	2000 µg / L
1-OH midazolam	14.2 (2.6)		6.9 (2.5)	5.8 (18.9)	9.0 (2.4)		3.0 (6.2)	2.6 (7.6)
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	36.7 (38.3)	13.1 (12.5)	7.8 (4.1)	3.8 (6.7)	18.6 (18.7)		6.6 (3.7)	3.9 (7.6)
3-OH bromazepam	27.8 (56.4)	18.1 (13.7)	5.4 (13.4)	4.4 (8.9)	15.2 (25.2)	11.4 (16.3)	4.4 (-3.2)	3.2 (-3.4)
3-OH flunitrazepam	11.1 (3.8)		10.1 (9.4)	3.4 (8.0)	17.2 (10.9)		4.3 (16.2)	4.4 (8.4)
4-OH midazolam	8.4 (8.9)		5.2 (-3.5)	6.2 (-10.1)	8.6 (-3.7)		5.3 (-6.7)	5.1 (-11.8)
7-aminoclonazepam	12.6 (-8.1)		6.9 (-4.5)	3.9 (-0.5)	7.3 (-4.9)		4.5 (3.8)	3.2 (5.6)
7-aminoflunitrazepam	9.8 (-0.5)		6.4 (-4.8)	2.8 (-0.6)	7.8 (1.2)		3.7 (4.8)	1.8 (2.9)
7-aminonitrazepam	13.2 (4.3)		7.3 (-1.8)	5.9 (7.1)	11.8 (8.9)		5.4 (1.1)	2.6 (5.7)
Alprazolam	18.8 (-14.6)		9.7 (0.0)	4.5 (10.7)	12.0 (-16.9)		4.9 (3.5)	8.4 (15.9)
Bromazepam	12.75 (-1.3)		3.8 (3.2)	5.6 (11.9)	11.3 (-3.9)		5.7 (-2.7)	4.6 (8.2)
Chlordiazepoxide	17.9 (-3.6)		7.4 (3.4)	2.2 (8.4)	11.9 (1.6)		3.7 (8.1)	2.8 (6.1)
Clobazam	17.4 (9.3)		8.7 (0.0)	6.2 (6.4)	7.5 (12.4)		4.5 (2.5)	4.3 (10.7)
Clonazepam	19.5 (-14.0)		7.1 (-7.9)	3.4 (-1.9)	19.1 (-12.6)		4.9 (1.7)	5.3 (3.5)
Clotiazepam	11.8 (-0.4)		8.8 (3.2)	5.1 (5.2)	6.6 (-0.5)		6.7 (4.1)	5.3 (5.3)
Desalkylflurazepam	19.8 (-3.6)		3.4 (-1.4)	5.2 (-0.6)	16.8 (9.9)		5.7 (8.9)	6.6 (3.9)
Desmethylflunitrazepam	15.5 (12.2)		8.8 (0.9)	4.6 (-1.3)	18.4 (15.7)		4.4 (8.9)	4.2 (0.2)
Diazepam	16.6 (-11.6)		6.0 (-3.4)	1.5 (0.6)	8.1 (-13.2)		3.4 (4.8)	1.6 (2.2)
Estazolam	9.9 (2.9)		11.3 (4.9)	4.2 (5.1)	13.7 (18.1)		4.7 (18.3)	5.3 (8.3)
Flunitrazepam	10.4 (10.1)		3.6 (4.8)	6.8 (4.8)	11.9 (-5.7)		5.9 (19.6)	6.8 (11.9)
Flurazepam	13.2 (14.7)		5.6 (15.8)	3.6 (18.2)	8.2 (5.2)		4.7 (11.1)	3.5 (12.4)
loflazepate d'ethyle	15.9 (-6.6)		8.0 (-2.4)	5.8 (3.1)	8.0 (0.3)		6.1 (-0.7)	3.4 (5.8)
Loprazolam	10.7 (17.8)		6.3 (5.7)	3.9 (10.4)	10.9 (2.6)		3.9 (7.7)	2.6 (7.9)
Lorazepam	17.4 (2.7)		4.7 (5.5)	3.7 (12.8)	6.6 (4.9)		2.8 (3.5)	1.2 (7.4)
Lormetazepam	10.9 (-2.7)		3.2 (6.1)	6.6 (4.7)	18.9 (-10.4)		5.3 (15.1)	5.9 (7.8)
Midazolam	11.4 (19.6)		5.7 (9.7)	3.5 (17.6)	7.7 (11.2)		4.3 (10.4)	2.1 (10.1)
Nitrazepam	16.4 (2.9)		7.0 (-1.1)	4.4 (2.8)	16.5 (-6.5)		4.2 (9.2)	5.2 (5.7)
Norclobazam	68.6 (-31.5)	19.8 (-1.3)	10.4 (-8.4)	5.5 (-7.8)	33.3 (-18.4)	16.1 (-16.5)	7.8 (1.1)	5.4 (0.1)
Nordazepam	18.2 (-17.9)		5.0 (2.5)	6.8 (2.4)	19.5 (-12.0)		7.2 (11.7)	6.9 (5.9)
Oxazepam	9.7 (10.2)		8.4 (9.7)	3.7 (13.3)	14.6 (0.5)		4.7 (7.9)	4.6 (7.8)
Temazepam	19.6 (-3.9)		8.0 (1.8)	6.5 (5.2)	18.3 (-19.1)		6.9 (1.1)	3.2 (4.1)
Tetrazepam	12.5 (-1.9)		8.9 (-1.2)	4.6 (3.0)	8.0 (1.1)		7.3 (-1.2)	6.3 (0.4)

Triazolam	27.3 (-16.4)	12.1 (-0.1)	7.9 (-4.4)	1.9 (-8.0)	19.8 (-5.8)	11.8 (2.3)	6.0 (3.1)	2.6 (-7.4)
Zolpidem	8.6 (12.8)		6.5 (18.2)	4.2 (19.7)	10.5 (10.5)		4.3 (15.8)	3.1 (15.8)
Zopiclone	19.1 (8.1)		6.7 (-3.7)	2.4 (2.6)	16.8 (7.6)		2.3 (5.9)	2.1 (6.3)

Tableau 10: Accords entre matrice: plasma, urine, sang total

3.3. Comparaison avec la méthode de référence

Les résultats sont donnés dans la Figure 13. Cette figure exprime le nombre de cas où une BZD a été détectée seulement avec la technique sur le 3200 (ancienne méthode), ou seulement avec la technique sur le 8050 (nouvelle méthode), ou alors la BZD en question a été détectée avec les deux méthodes.

Pour plusieurs cas de patients, la nouvelle méthode a permis de détecter des composés qui n'étaient jusqu'alors pas recherchés (le norclobazam et les 2 métabolites du bromazépam, notés * sur la figure).

Pour d'autres, la nouvelle méthode a permis de détecter certaines molécules à de faibles concentrations, alors que ces molécules n'avaient pas été détectées initialement par la méthode de référence (aucune BZD détectée avait été rendu comme résultat).

Aucun cas n'a permis de détecter une BZD avec l'ancienne méthode alors que la molécule n'était pas détectée avec la nouvelle méthode.

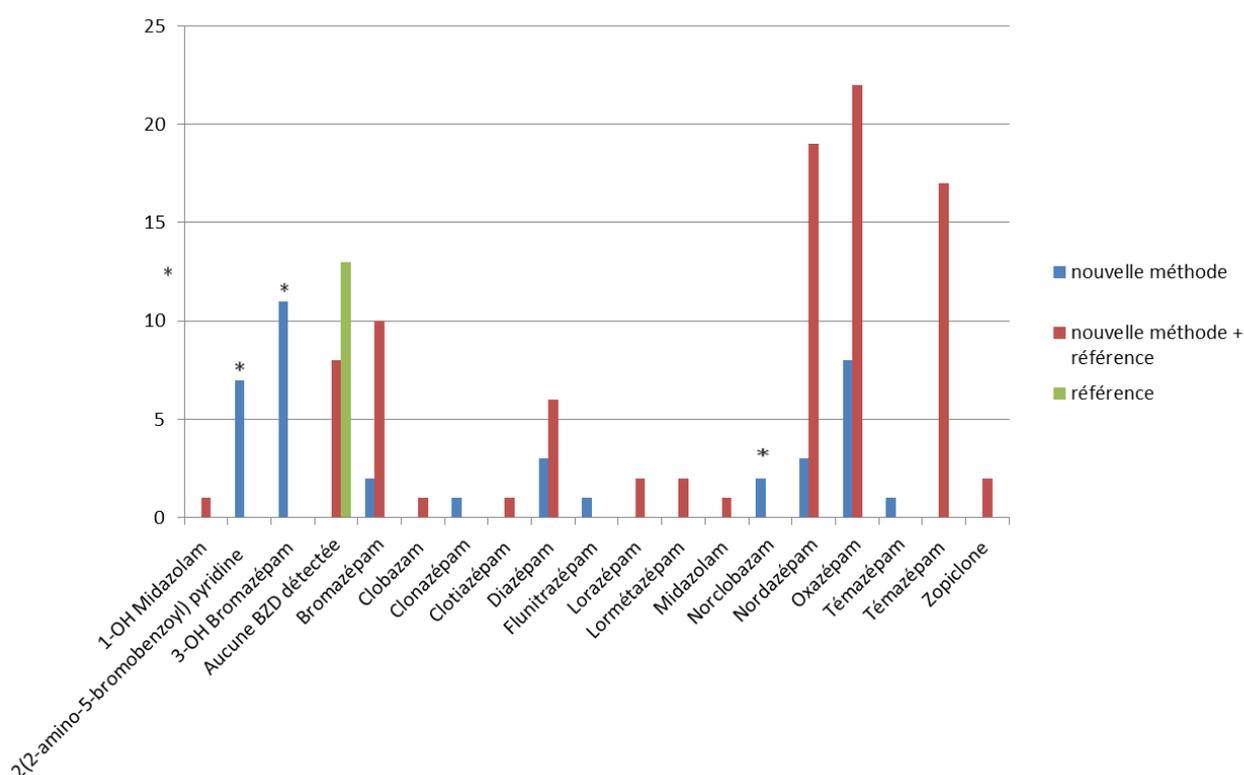


Figure 13: Comparaison des résultats avec les deux appareils

La Figure 14 représente le nombre de cas, pour les molécules détectées dans les échantillons patient, où la molécule a été détectée seulement sur le 8050, seulement sur le 3200, ou alors avec les deux techniques. Les deux métabolites du bromazépam ainsi que le norclobazam n'ont été recherchés qu'avec la nouvelle méthode. Pour 13 cas patients, « aucune BZD détectée » a été le résultat rendu avec les deux techniques.

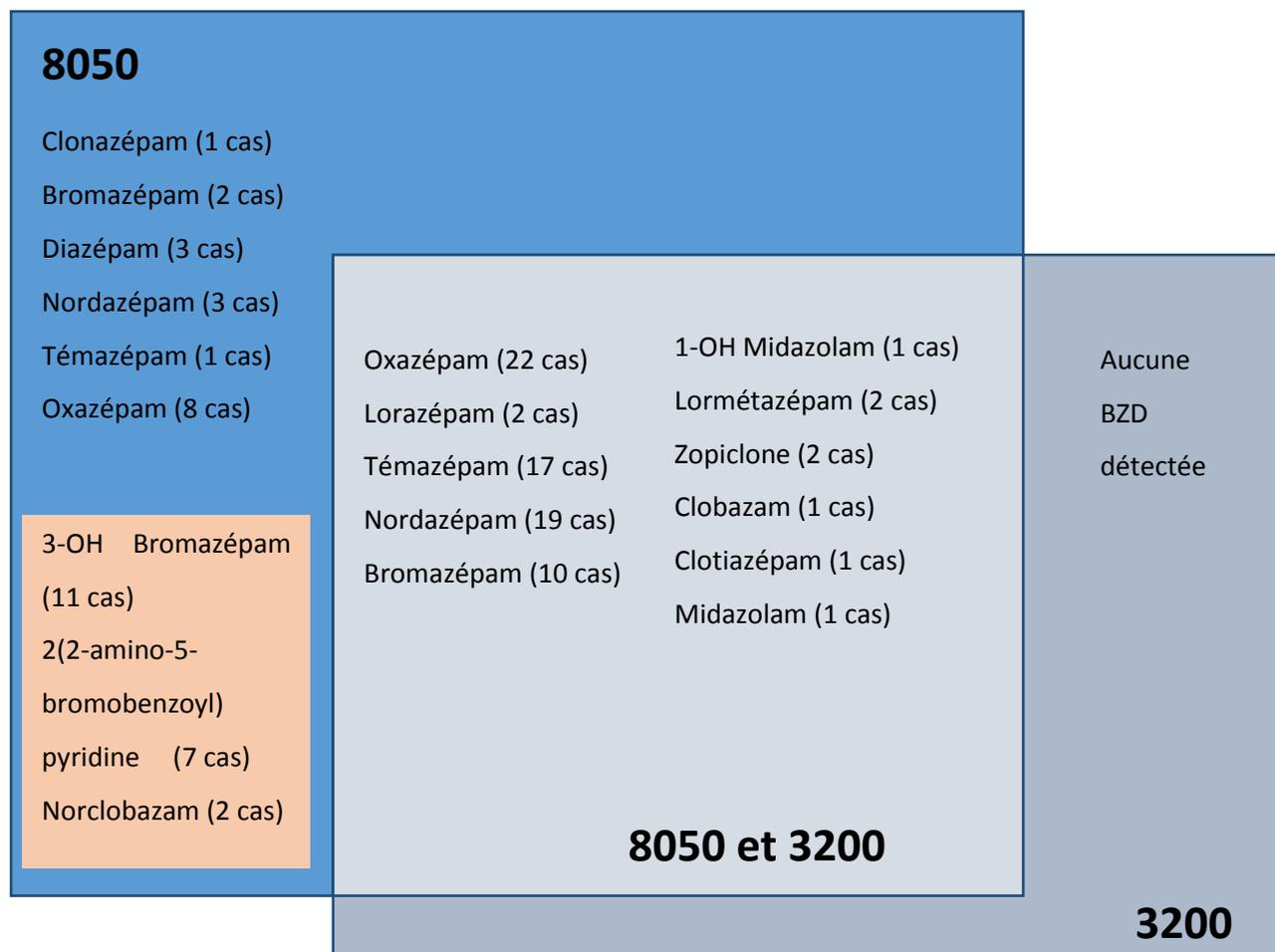


Figure 14: Schéma comparant les cas détectés avec les 2 méthodes

Enfin nous pouvons remarquer que pour chaque patient, plusieurs BZD pouvaient être détectées et quantifiées. Dans ce cas, chaque BZD représente un cas, même si c'est chez le même patient.

3.4. Contrôles

Sur les quatre séries de patient, deux contrôles commerciaux (BZD A et BZD B) ont également été analysés selon la procédure développée. Le [Tableau 11](#) résume les quatorze molécules recherchées ainsi que les concentrations cibles. Les résultats des contrôles sont représentés dans les [Figure 15](#) et [Figure 16](#).

BZD A			
Molécule	Valeur cible	Intervalle	Unité
Alprazolam	10	7,5 - 12,5	µg/L
Bromazépam	100	75 - 125	µg/L
Clonazépam	20	15 - 25	µg/L
Diazépam	100	72 - 125	µg/L
Nordazépam	100	75 - 125	µg/L
Flunitrazépam	10	7,5 - 12,5	µg/L
7-Aminoflunitrazépam	10	7,5 - 12,5	µg/L
Desmethylflunitrazépam	10	7,5 - 12,5	µg/L
Lorazépam	20	15 - 25	µg/L
Midazolam	50	37,5 - 62,5	µg/L
Oxazépam	100	75 - 125	µg/L
Témazépam	100	75 - 125	µg/L
Zolpidem	100	75 - 125	µg/L
Zopiclone	10	7,5 - 12,5	µg/L

BZD B			
Molécule	Valeur cible	Intervalle	Unité
Alprazolam	50	37,5 - 62,5	µg/L
Bromazépam	400	320 - 480	µg/L
Clonazépam	100	75 - 125	µg/L
Diazépam	600	480 - 720	µg/L
Nordazépam	600	480 - 720	µg/L
Flunitrazépam	50	37,5 - 62,5	µg/L
7-Aminoflunitrazépam	50	37,5 - 62,5	µg/L
Desmethylflunitrazépam	50	37,5 - 62,5	µg/L
Lorazépam	100	75 - 125	µg/L
Midazolam	200	160 - 240	µg/L
Oxazépam	600	480 - 720	µg/L
Témazépam	400	320 - 480	µg/L
Zolpidem	400	320 - 480	µg/L
Zopiclone	50	37,5 - 62,5	µg/L

Tableau 11: Valeurs cibles des contrôles BZD A et BZD B

Il serait important de mettre en place des contrôles internes, à au moins deux niveaux de concentration, pour toutes les molécules (20) qui ne sont pas présentes dans les contrôles commerciaux. Ceci serait à réaliser à chaque gamme, en plus des deux contrôles commerciaux.

Valeurs cibles du contrôle A

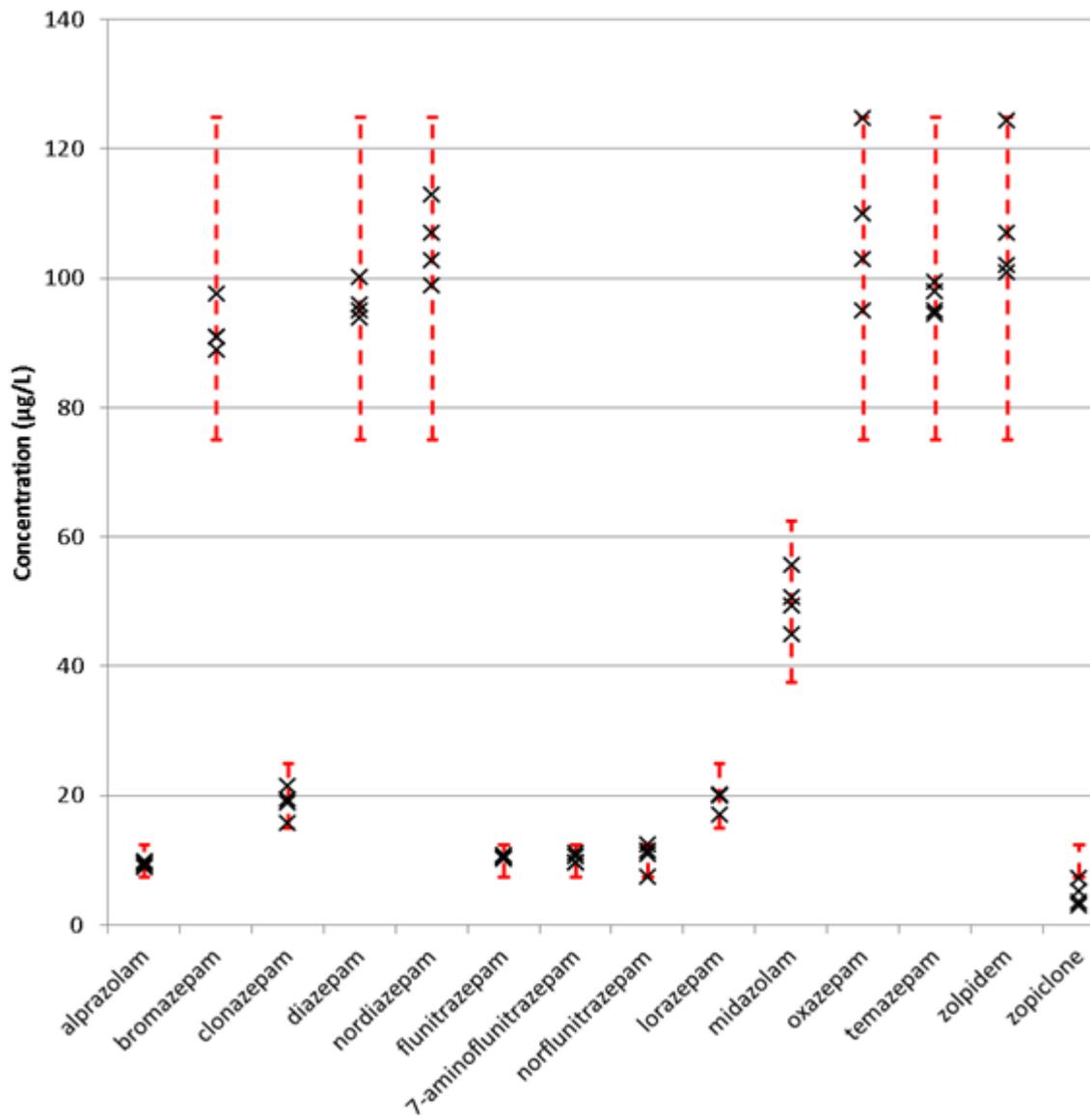


Figure 15: Valeurs cibles du contrôle BZD A

Valeurs cibles du contrôle B

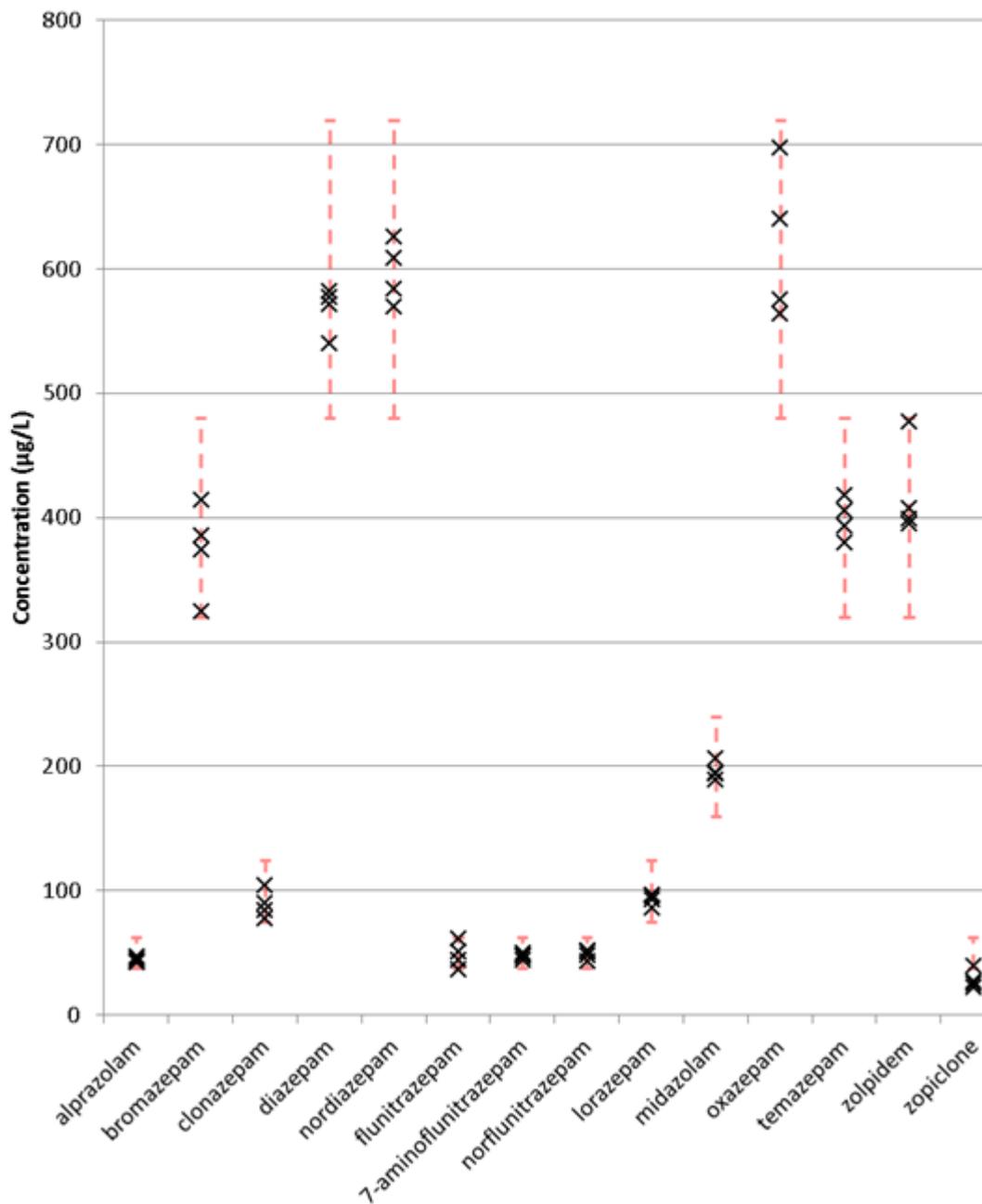


Figure 16: Valeurs cibles du contrôle BZD B

Ainsi, chaque valeur (représenté par une croix noire sur les Figure 15 et 16) pour toutes les molécules des quatre séries de contrôle sont dans des valeurs acceptables (représenté par la barre verticale en rouge), sauf le zopiclone. Cette BZD est particulièrement connue pour sa labilité, comme le sont les autres molécules de cette classe [47], [48]. Ceci peut s'expliquer par le fait que la solution contrôle n'a pas été analysée immédiatement après reconstitution (alors que c'est recommandé par le fabricant). Les autres contrôles sont acceptables pour les molécules concernées.

3.5. Etude des LDD

Nous avons étudié les limites de détection pour toutes les molécules de la méthode ayant suivi le processus de validation. Nous avons réalisé 5 points à 3 concentrations différentes : 3 µg/L, 2 µg/L et 1 µg/L. Nous considérons que la LDD est satisfaisante si pour les 5 points, nous avons un rapport signal/bruit supérieur à 3.

Ces résultats sont résumés dans le [Tableau 12](#).

Molécule	LDD (µg/L)
1-OH-midazolam	1
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	1
3-OH-bromazepam	3
3-OH-flunitrazepam	2
4-OH-midazolam	1
7-aminoclonazepam	1
7-aminoflunitrazepam	1
7-aminonitrazepam	1
alprazolam	1
bromazepam	5
chlordiazepoxide	1
clobazam	1
clonazepam	5
clotiazepam	1
desalkylflurazepam	3
desmethylflunitrazepam	5
diazepam	1
estazolam	1
flunitrazepam	3
flurazepam	1
loflazepate d'ethyle	1
loprazolam	2
lorazepam	3
lormetazepam	2
midazolam	1
nitrazepam	2
norclobazam	5
nordazepam	2
oxazepam	2
temazepam	2
tetrazepam	1
triazolam	1
zolpidem	1
zopiclone	3

Tableau 12: LDD des différentes molécules

Discussion

Nous avons développé et validé une méthode de LC-MS/MS précédée d'une procédure d'extraction faisant appel aux sels QuEChERS pour la recherche et le dosage de BZD.

L'utilisation des sels QuEChERS pour la préparation des échantillons a été peu décrite dans les milieux biologiques. Cependant, cette méthode a déjà été mise récemment en application au sein du laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Limoges pour la recherche et le dosage de stupéfiants (cocaïne, amphétamines, opiacés et cannabinoïdes ; travaux publiés dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [49]). Avant le développement de la méthode dédiée aux BZD, nous avons effectué une étude de l'influence de la quantité de sels sur les rendements d'extraction. Plus précisément, nous avons comparé l'impact de 3 quantités de sels (10, 40 et 70 mg) sur les rendements d'extraction de 40 stupéfiants (travaux publiés dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry*). Ces 3 valeurs correspondaient aux valeurs de pesées extrêmes et à la moyenne, observées parmi tous les opérateurs du service lorsque ceux-ci préparent une « spatule » de sels. Il a ainsi été montré que la quantité n'avait pas ou très peu d'influence sur les rendements d'extraction. C'est ainsi que lors de la préparation, il n'est pas nécessaire de réaliser une pesée exacte de la quantité de sels.

L'utilisation des sels QuEChERS permet objectivement un gain de temps par rapport à la procédure de SPE utilisée jusqu'alors. Parmi les opérateurs du service, il a été observé que la réalisation de 6 points de gamme, 2 contrôles et 10 échantillons de patients, nécessite entre 1h30 et 2 heures de travail, alors que seulement 30 à 45 minutes sont nécessaires avec la méthode utilisant les sels QuEChERS.

L'élution des 35 BZD et des 10 étalons internes nécessite un temps d'analyse de 6.3 minutes. Ce dernier est compatible avec une utilisation en routine clinique. On peut estimer que le temps nécessaire à la réalisation d'une série d'analyses comportant 10 échantillons de patients, nécessite moins de 3 heures (préparation des points de gamme, des contrôles, des échantillons de patients, puis analyse). Dans le contexte d'une urgence toxicologique, il est usuel d'analyser l'échantillon du patient et un

contrôle. Ceci suggère qu'un résultat puisse être rendu dans des délais très brefs (moins d'une heure, raisonnablement).

Dix étalons internes (EI) ont été introduits dans la méthode. Il s'agit d'isotopes deutérés (dits également isotopes greffés au deutérium) de certaines BZD. De tels composés possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques que leurs homologues non deutérés, ce qui fait qu'ils se comportent de la même façon que leurs analogues non deutérés lors des phases d'extraction, de séparation chromatographique et d'ionisation. Bien entendu, l'idéal est de pouvoir associer à chaque substance recherchée son étalon deutéré. Mais, ce dernier n'est pas toujours disponible et, il faut également tenir compte des coûts associés à l'achat de ces composés. Classiquement, pour toutes les BZD ne possédant pas leur propre EI, les différents EI disponibles ont été testés et celui offrant le meilleur résultat pour la droite d'étalonnage a été retenu.

Il a été décidé de réaliser une gamme s'étendant de 5 µg/L à 2000 µg/L. Une telle gamme permet de satisfaire aux concentrations habituellement observées pour les molécules d'intérêt. La limite de détection a été arbitrairement fixée à une valeur similaire à la limite de quantification. Cette valeur de LDD est satisfaisante quel que soit le contexte de la demande d'analyse.

La validation de la méthode a été satisfaisante pour 34 molécules, des résultats quantitatifs peuvent donc être rendus. Pour les 2 autres, seuls des résultats qualitatifs seront acceptés. De plus, pour les 4 molécules (3OH bromazépam, 2(2-amino-5-chlorobenzoyl)pyridine, norclobazam, triazolam) dont l'accord entre matrice n'a été satisfaisant qu'à partir de 10 µg/L (sang total et urine), les dosages quantitatifs dans ces deux matrices ne pourront être validés que si le résultat est supérieur à 10 µg/L. Cependant, dans le sérum ou plasma, des valeurs entre 5 et 10 µg/L pourront être rendues. Ceci est mentionné dans la procédure utilisée au laboratoire.

Les capacités de la nouvelle méthode à détecter des BZD ont été comparées à celles de la méthode jusqu'alors utilisée dans le service, au travers d'une étude de 50 cas de patients. Les résultats sont globalement satisfaisants ; les deux dosages sont comparables sur un plan qualitatif. Toutefois, l'intérêt de l'ajout de métabolites a été démontré au travers de plusieurs cas.

Depuis une quinzaine d'années, les laboratoires de pharmacologie-toxicologie ont peu à peu introduit la LC-MS/MS dans leur pratique quotidienne [50]. L'annuaire 2014 des analyses de pharmacologie-toxicologie du groupe STP de la société française de pharmacologie et de thérapeutique (SFPT) dénombre environ 850 paramètres différents réalisés dans une quarantaine de sites hospitaliers [Accessible en août 2015 à <http://www.pharmacol-fr.org/index.php/groupes-de-travail/suivi-therapeutique-pharmacologique>]. Parmi eux, près de 30% le sont par une méthode de LC-MS/MS.

Dans des applications s'approchant de nos travaux, Xiong et al. [51] ont étudié des opioïdes et des BZD en utilisant une source ESI et un mode d'acquisition MRM. Laloup et al.[52] ont également utilisé cette source d'ionisation et ce mode d'acquisition pour la détermination de 26 BZD. Birkler et al. [53] ont utilisé une source ESI avec un TOF-MS pour réaliser un screening contenant des BZD. Dussy et al. [54] ont préféré la source APCI pour la quantification des BZD en MS/MS. Kratzsch et al. [48] ont utilisé une source APCI suivi d'une quantification en mode SIM (single ion monitoring).

Conclusion

La LC-MS/MS est une technique analytique utilisée depuis une quinzaine d'années dans les laboratoires de pharmacologie-toxicologie. De nombreux progrès ont été réalisés, que ce soit sur la partie chromatographie, ou que ce soit sur la partie spectrométrie de masse. Les systèmes développés aujourd'hui sont de plus en plus sensibles et de plus en plus spécifiques et ont permis de réduire considérablement les temps des « runs » chromatographiques. Un gain de temps et de qualité peut encore être obtenu en optimisant les phases de préparation des échantillons.

Dans la présente application, après optimisation des conditions d'analyses spectrales à l'aide de solutions pures, le gradient d'élution pour effectuer la séparation de 46 BZD et apparentés (36 substances d'intérêt + 10 étalons internes) a été défini sur la colonne chromatographique qui nous semblait être la plus adaptée. Pour la phase pré-analytique, le protocole finalement retenu, consiste à réaliser une extraction avec de l'ACN et des sels QuEChERS. Cette méthode a permis d'obtenir des limites de quantification de 5 µg/L. Surtout, elle a permis de diminuer très significativement le temps d'analyse.

Cette méthode a été entièrement validée selon les exigences de la norme ISO 15189 opposable au laboratoire. Elle est désormais mise en application en routine dans le service de pharmacologie toxicologie du CHU de Limoges.

Cette méthode est donc très utile pour le service. J'ai développé une méthode, rapide, simple, qui rend des résultats rapidement, et qui couvre une grande majorité des BZD qui ont été ou qui sont sur le marché. J'ai donc fait un travail utile sur un appareil sensible et puissant !

Cette méthode a permis un gain d'argent au laboratoire : diminution du temps technicien, moindre consommation de solvant. Les sels QuEChERS sont environ 200 fois moins chers que les cartouches d'extraction SPE (2.37€ la cartouche SPE contre 0.011€ pour 40 mg de sel QueChERS).

Références bibliographiques

- [1] F.-L. Sauvage, N. Picard, F. Saint-Marcoux, J.-M. Gaulier, G. Lachâtre, and P. Marquet, "General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and constraints," *J. Sep. Sci.*, vol. 32, no. 18, pp. 3074–3083, Sep. 2009.
- [2] F.-L. Sauvage, F. Saint-Marcoux, B. Duretz, D. Deporte, G. Lachatre, and P. Marquet, "Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry," *Clin. Chem.*, vol. 52, no. 9, pp. 1735–1742, Sep. 2006.
- [3] ANSM, "Etat des lieux de la consommation de benzodiazépines en France," décembre 2013.
- [4] P. Melo, M. L. Bastos, and H. M. Teixeira, "Benzodiazepine stability in postmortem samples stored at different temperatures," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, no. 1, pp. 52–60, Feb. 2012.
- [5] G. Pepin, N. Dubourvieux, and Y. Gaillard, "Difficulté d'interprétation des taux des benzodiazépines et molécules apparentées dans le sang de cadavre prélevé à l'autopsie: étude de leur dégradation in vitro après conservation pendant 6 mois à différentes températures," in *Journal de médecine légale droit médical*, 1998, vol. 41, pp. 341–355.
- [6] J. B. Lloyd and D. A. Parry, "Forensic applications of the determination of benzodiazepines in blood samples by microcolumn cleanup and high-performance liquid chromatography with reductive mode electrochemical detection," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 13, no. 3, pp. 163–168, Jun. 1989.
- [7] B. Levine, R. V. Blanke, and J. C. Valentour, "Postmortem stability of benzodiazepines in blood and tissues," *J. Forensic Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 102–115, Jan. 1983.
- [8] N. Entwistle, P. Owen, D. A. Patterson, L. V. Jones, and J. A. Smith, "The occurrence of chlordiazepoxide degradation products in sudden deaths associated with chlordiazepoxide overdose," *J. - Forensic Sci. Soc.*, vol. 26, no. 1, pp. 45–54, Feb. 1986.

- [9] H. Kelly, A. Huggett, and S. Dawling, "Liquid-chromatographic measurement of nitrazepam in plasma," *Clin. Chem.*, vol. 28, no. 7, pp. 1478–1481, Jul. 1982.
- [10] K. A. al-Hadidi and J. S. Oliver, "Stability of temazepam in blood," *Sci. Justice J. Forensic Sci. Soc.*, vol. 35, no. 2, pp. 105–108, Jun. 1995.
- [11] G. Skopp, "Preanalytic aspects in postmortem toxicology," *Forensic Sci. Int.*, vol. 142, no. 2–3, pp. 75–100, Jun. 2004.
- [12] M. D. Robertson and O. H. Drummer, "Postmortem drug metabolism by bacteria," *J. Forensic Sci.*, vol. 40, no. 3, pp. 382–386, May 1995.
- [13] H. Le Solleu, F. Demotes-Mainard, G. Vinçon, and B. Bannwarth, "The determination of bromazepam in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 11, no. 8, pp. 771–775, Aug. 1993.
- [14] A. El Mahjoub and C. Staub, "Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 23, no. 6, pp. 1057–1063, Nov. 2000.
- [15] G. Skopp, L. Pötsch, I. König, and R. Mattern, "A preliminary study on the stability of benzodiazepines in blood and plasma stored at 4 degrees C," *Int. J. Legal Med.*, vol. 111, no. 1, pp. 1–5, 1998.
- [16] R. Karinen, W. Andresen, A. Smith-Kielland, and J. Mørland, "Long-term storage of authentic postmortem forensic blood samples at -20°C: measured concentrations of benzodiazepines, central stimulants, opioids and certain medicinal drugs before and after storage for 16-18 years," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 38, no. 9, pp. 686–695, Dec. 2014.
- [17] A. El Mahjoub and C. Staub, "Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 23, no. 6, pp. 1057–1063, Nov. 2000.
- [18] P. Melo, M. L. Bastos, and H. M. Teixeira, "Benzodiazepine stability in postmortem samples stored at different temperatures," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 36, no. 1, pp. 52–60, Feb. 2012.

- [19] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and 'dispersive solid-phase extraction' for the determination of pesticide residues in produce," *J. AOAC Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 412–431, Apr. 2003.
- [20] J. A. Renard, "The Ternary Systems. Water-2 Chloroethanol-Salt and Water-Tetrahydrofurfuryl Alcohol-Salt.," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 7, no. 2, pp. 203–205, Apr. 1962.
- [21] J. A. Renard and A. G. Oberg, "Ternary Systems: Water-Acetonitrile-Salts.," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 10, no. 2, pp. 152–155, Apr. 1965.
- [22] M. Luke, J. Froberg, and H. Masumoto, "Extraction and Cleanup of Organochlorine, Organophosphate, Organonitrogen, and Hydrocarbon Pesticides in Produce for Determination," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 58, no. 5, pp. 1020–1026, 1975.
- [23] K. Mastovska and S. J. Lehotay, "Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues," *J. Chromatogr. A*, vol. 1040, no. 2, pp. 259–272, Jun. 2004.
- [24] F. J. Schenck, P. Callery, P. M. Gannett, J. R. Daft, and S. J. Lehotay, "Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods," *J. Aoac Int.*, vol. 85, no. 5, pp. 1177–1180, Oct. 2002.
- [25] H. G. J. Mol, A. Rooseboom, R. van Dam, M. Roding, K. Arondeus, and S. Sunarto, "Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, no. 6, pp. 1715–1754, Nov. 2007.
- [26] K. Banerjee, D. P. Oulkar, S. Dasgupta, S. B. Patil, S. H. Patil, R. Savant, and P. G. Adsule, "Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1173, no. 1–2, pp. 98–109, Nov. 2007.
- [27] K. Banerjee, D. P. Oulkar, S. B. Patil, S. H. Patil, S. Dasgupta, R. Savant, and P. G. Adsule, "Single-Laboratory Validation and Uncertainty Analysis of 82 Pesticides Determined in Pomegranate, Apple, and Orange by Ethyl Acetate

Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry," *J. Aoac Int.*, vol. 91, no. 6, pp. 1435–1445, Dec. 2008.

- [28] A. Wilkowska and M. Biziuk, "Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology," *Food Chem.*, vol. 125, no. 3, pp. 803–812, Apr. 2011.
- [29] M. C. Bruzzoniti, L. Checchini, R. M. De Carlo, S. Orlandini, L. Rivoira, and M. Del Bubba, "QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 17, pp. 4089–4116, Jul. 2014.
- [30] O. Golge and B. Kabak, "Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes," *Food Chem.*, vol. 176, pp. 319–332, Jun. 2015.
- [31] S. Walorczyk, "Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty," *Talanta*, vol. 120, pp. 106–113, Mar. 2014.
- [32] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, and M. Fuerhacker, "Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method," *Food Control*, vol. 19, no. 9, pp. 906–914, Sep. 2008.
- [33] T. D. Nguyen, J. E. Yu, D. M. Lee, and G.-H. Lee, "A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry," *Food Chem.*, vol. 110, no. 1, pp. 207–213, Sep. 2008.
- [34] F. Plössl, M. Giera, and F. Bracher, "Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood," *J. Chromatogr. A*, vol. 1135, no. 1, pp. 19–26, Nov. 2006.
- [35] S. Matsuta, K. Nakanishi, A. Miki, K. Zaitso, N. Shima, T. Kamata, H. Nishioka, M. Katagi, M. Tatsuno, K. Tsuboi, H. Tsuchihashi, and K. Suzuki, "Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of

forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 232, no. 1–3, pp. 40–45, Oct. 2013.

- [36] L. Anzillotti, S. Odoardi, and S. Strano-Rossi, “Cleaning up blood samples using a modified ‘QuEChERS’ procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS(☆),” *Forensic Sci. Int.*, vol. 243, pp. 99–106, Oct. 2014.
- [37] K. Usui, M. Hashiyada, Y. Hayashizaki, Y. Igari, T. Hosoya, J. Sakai, and M. Funayama, “Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis,” *Forensic Toxicol.*, vol. 32, no. 1, pp. 139–147, Jan. 2014.
- [38] K. Usui, Y. Hayashizaki, M. Hashiyada, and M. Funayama, “Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method,” *Leg. Med. Tokyo Jpn.*, vol. 14, no. 6, pp. 286–296, Nov. 2012.
- [39] K. Usui, Y. Hayashizaki, T. Minagawa, M. Hashiyada, A. Nakano, and M. Funayama, “Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Leg. Med. Tokyo Jpn.*, vol. 14, no. 6, pp. 309–316, Nov. 2012.
- [40] D. Montenarh, M. Hopf, H. H. Maurer, P. Schmidt, and A. H. Ewald, “Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 3, pp. 803–818, Jan. 2014.
- [41] Rouessac et al., *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales*, Dunod. .
- [42] “AB Sciex TM 3200 QTRAP, LC/MS/MS System.” 2005.
- [43] Hoffmann, Stroobant, *Spectrométrie de masse*, Dunod. 2005.
- [44] *Schéma d’une source électrospray*. .
- [45] *Principe du filtre quadripolaire*. .

- [46] Marie-Claude Menet, "Principes de la spectrométrie de masse," *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 41, no. 437, pp. 41–53, décembre 2011.
- [47] F. E. Dussy, C. Hamberg, and T. A. Briellmann, "Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum," *Int. J. Legal Med.*, vol. 120, no. 6, pp. 323–330, Nov. 2006.
- [48] C. Kratzsch, O. Tenberken, F. T. Peters, A. A. Weber, T. Kraemer, and H. H. Maurer, "Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization," *J. Mass Spectrom. JMS*, vol. 39, no. 8, pp. 856–872, Aug. 2004.
- [49] S. Dulaurent, S. El Balkhi, L. Poncelet, J.-M. Gaulier, P. Marquet, and F. Saint-Marcoux, "QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 5, pp. 1467–1474, Feb. 2016.
- [50] F. Saint-Marcoux, "[Some thoughts on the links between LC-MS/MS and therapeutic drug monitoring]," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 73, no. 1, pp. 49–53, Feb. 2015.
- [51] L. Xiong, R. Wang, C. Liang, X. Teng, F. Jiang, L. Zeng, H. Ye, C. Ni, X. Yuan, Y. Rao, and Y. Zhang, "Determination of co-administrated opioids and benzodiazepines in urine using column-switching solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1395, pp. 99–108, May 2015.
- [52] M. Laloup, M. del M. Ramirez Fernandez, G. De Boeck, M. Wood, V. Maes, and N. Samyn, "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.*, vol. 29, no. 7, pp. 616–626, Oct. 2005.
- [53] R. I. D. Birkler, R. Telving, O. Ingemann-Hansen, A. V. Charles, M. Johannsen, and M. F. Andreasen, "Screening analysis for medicinal drugs and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)--toxicological findings in cases of alleged sexual assault," *Forensic Sci. Int.*, vol. 222, no. 1–3, pp. 154–161, Oct. 2012.

- [54] F. E. Dussy, C. Hamberg, and T. A. Briellmann, "Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum," *Int. J. Legal Med.*, vol. 120, no. 6, pp. 323–330, Nov. 2006.
- [55] A. V. Yeudakimau, A. A. Provatas, C. R. Perkins, and J. D. Stuart, "Solid Phase Extraction and QuEChERS Sample Preparation Methods for Rapid Screening of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Avian Blood and Egg Tissue by UPLC-UV," *Anal. Lett.*, vol. 46, no. 6, pp. 999–1011, Apr. 2013.
- [56] J. L. Westland and F. L. Dorman, "QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices," *J. Pharm. Anal.*, vol. 3, no. 6, pp. 509–517, Dec. 2013.
- [57] P. D. DeArmond, M. K. Brittain, G. E. Platoff, and D. T. Yeung, "QuEChERS-based approach toward the analysis of two insecticides, methomyl and aldicarb, in blood and brain tissue," *Anal Methods*, vol. 7, no. 1, pp. 321–328, 2015.
- [58] D. Vudathala, M. Cummings, and L. Murphy, "Analysis of Multiple Anticoagulant Rodenticides in Animal Blood and Liver Tissue Using Principles of QuEChERS Method," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 34, no. 5, pp. 273–279, Jun. 2010.
- [59] D. Y. Bang, S. K. Byeon, and M. H. Moon, "Rapid and simple extraction of lipids from blood plasma and urine for liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1331, pp. 19–26, Feb. 2014.

Indexation des sites internet

(1) www.sante.gouv.fr

(2) Etat des lieux en 2013 de la consommation des benzodiazépines en France -
Point d'Information

<http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Etat-des-lieux-en-2013-de-la-consommation-des-benzodiazepines-en-France-Point-d-Information>

(3) <http://www.polyintell.fr/produits-applications-analytiques/quechers/>

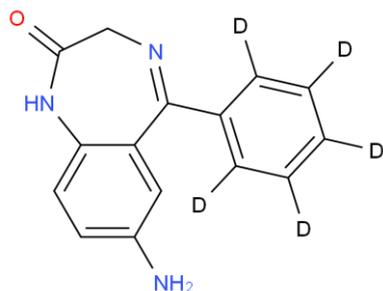
Table des annexes

Annexe 1. Structure chimique des benzodiazépines et apparentées étudiées	81
Annexe 2. Demi-vie, concentrations sanguines thérapeutiques et toxiques, métabolisme des benzodiazépines et apparentés (d'après la société française de toxicologie analytique)	85
Annexe 3. Métabolisme et élimination des benzodiazépines	88
Annexe 4. Résumé des études utilisant les sels QuEChERS dans les milieux biologiques	89
Annexe 5. Paramètres du spectromètre de masse pour les 10 étalons internes	92
Annexe 6. Paramètres du spectromètre de masse pour les 36 molécules d'intérêt..	93
Annexe 7. Transitions MRM et abondance relative des 36 molécules d'intérêt	95
Annexe 8. Etude de la suppression ionique dans les trois matrices : urine, sérum, sang total	97

Annexe 1. Structure chimique des benzodiazépines et apparentées étudiées

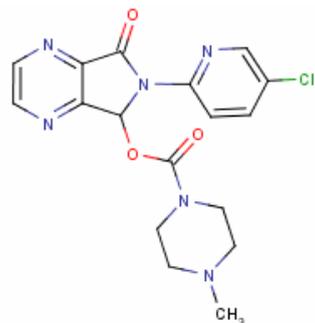
7 aminonitrazépam ($C_{15}H_{13}N_3O$)

MM = 251,28 g.mol⁻¹



Zopiclone ($C_{17}H_{17}ClN_6O_3$)

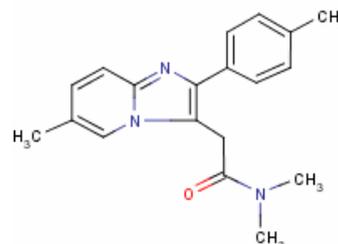
MM = 388,81 g.mol⁻¹



Zolpidem ($C_{19}H_{21}N_3O$)

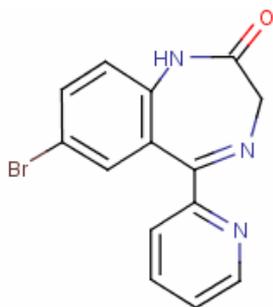
M.M. = 307,40 g.mol⁻¹ (+½

Hémitartrate = ½ $C_4H_6O_6$), MM
totale = 382 g.mol⁻¹



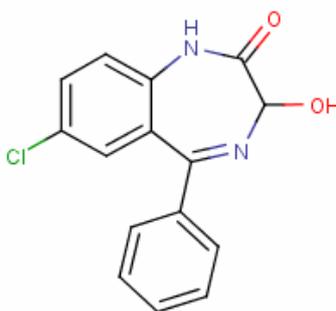
Bromazépam ($C_{14}H_{10}BrN_3O$)

M.M. = 316,16 g.mol⁻¹



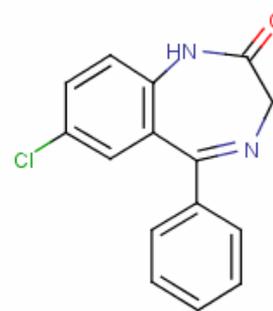
Oxazépam ($C_{15}H_{11}ClN_2O_2$)

M.M. = 286,72 g.mol⁻¹



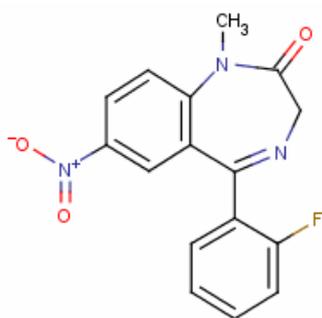
Nordazépam ($C_{15}H_{11}ClN_2O$)

M.M. = 270,72 g.mol⁻¹



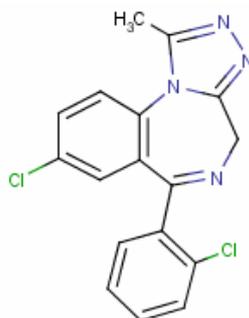
Flunitrazépam ($C_{16}H_{12}FN_3O_3$)

M.M. = 313,29 g.mol⁻¹



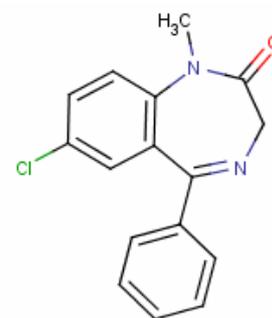
Triazolam ($C_{17}H_{12}Cl_2N_4$)

M.M. = 343,21 g.mol⁻¹

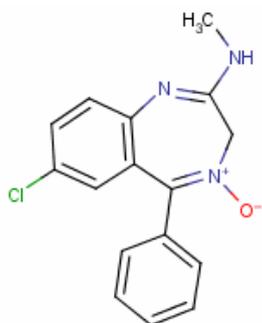


Diazépam ($C_{16}H_{13}ClN_2O$)

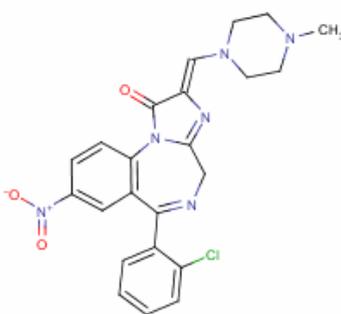
M.M. = 284,74 g.mol⁻¹



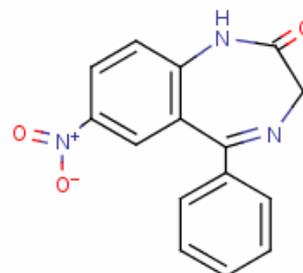
Chlordiazépoxyde (C₁₆H₁₄ClN₃O)
M.M. = 299,76 g.mol⁻¹



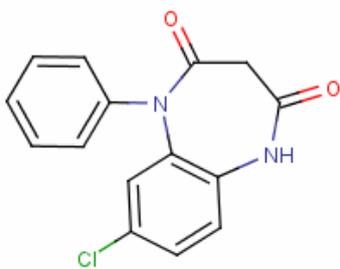
Loprazolam (C₂₃H₂₁ClN₆O₃)
M.M. = 464,91 g.mol⁻¹
(méthanesulfonate monohydraté =
CH₄O₃S.H₂O, MM totale = 578,9 g.
mol⁻¹)



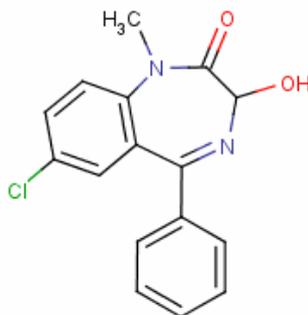
Nitrazépam (C₁₅H₁₁N₃O₃)
M.M. = 281,27 g.mol⁻¹



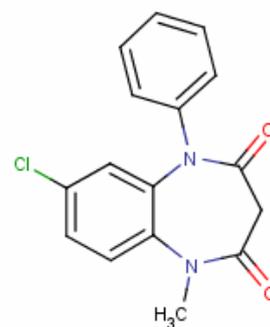
DM-Clobazam (C₁₅H₁₁ClN₂O₂)
M.M. = 286,72 g.mol⁻¹



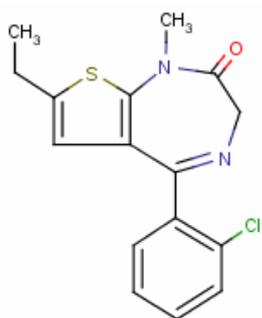
Témazépam (C₁₆H₁₃ClN₂O₂)
M.M. = 300,74 g.mol⁻¹



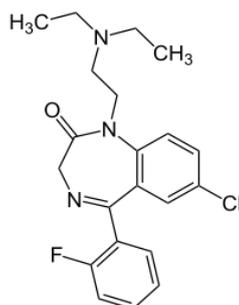
Clobazam (C₁₆H₁₃ClN₂O₂)
M.M. = 300,74 g.mol⁻¹



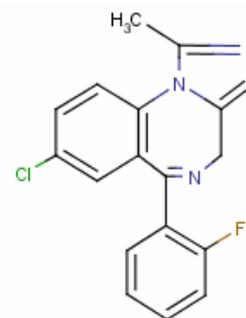
Clotiazépam (C₁₆H₁₅ClN₂OS)
M.M. = 318,83 g.mol⁻¹



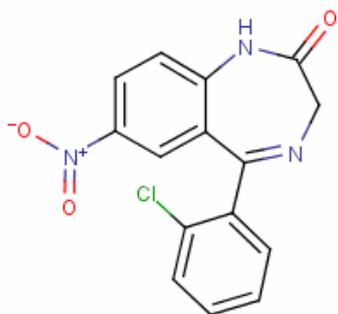
Flurazépam (C₂₁H₂₃ClN₃O)
M.M. = 387,88 g.mol⁻¹



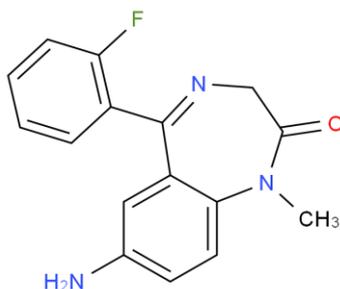
Midazolam (C₁₈H₁₃ClFN₃)
M.M. = 325,77 g.mol⁻¹



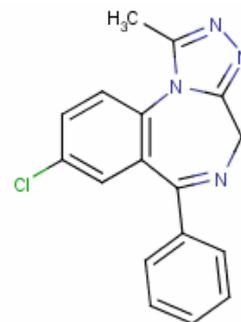
Clonazépam (C₁₅H₁₀ClN₃O₃)
M.M. = 315,72 g.mol⁻¹



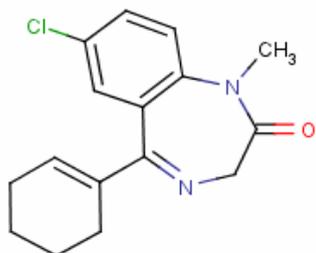
7 aminoflunitrazépam (C₁₆H₁₄FN₃O)
M.M. = 288,77 g.mol⁻¹



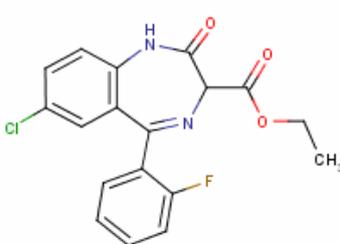
Alprazolam (C₁₇H₁₃ClN₄)
M.M. = 308,77 g.mol⁻¹



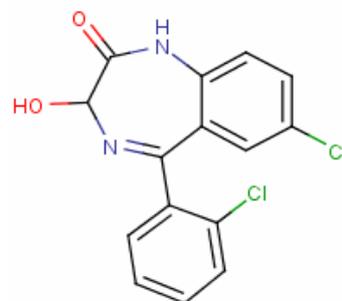
Tétrazépam (C₁₆H₁₇ClN₂O)
M.M. = 288,78 g.mol⁻¹



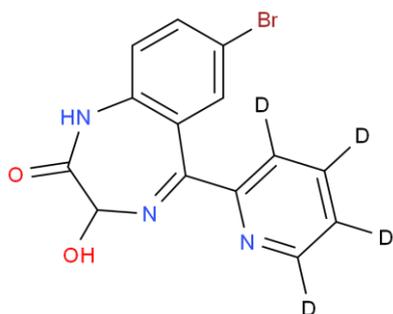
Loflazépate d'éthyle
(C₁₈H₁₄ClFN₂O₃)
M.M. = 360,77 g.mol⁻¹



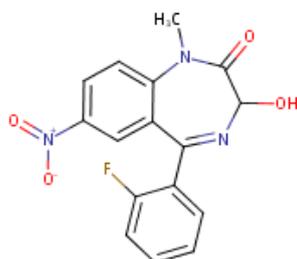
Lorazépam (C₁₅H₁₀Cl₂N₂O₂)
M.M. = 321,16 g.mol⁻¹



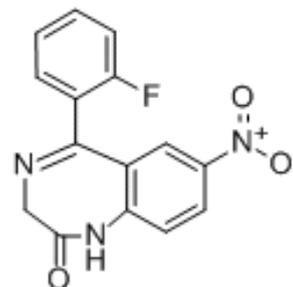
3-OH bromazépam (C₁₄H₁₀BrN₃O₂)
M.M. = 332,15 g.mol⁻¹



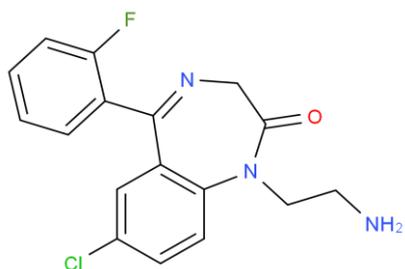
3-OH flunitrazépam
(C₁₆H₁₂FN₃O₄)
M.M. = 328,9 g.mol⁻¹



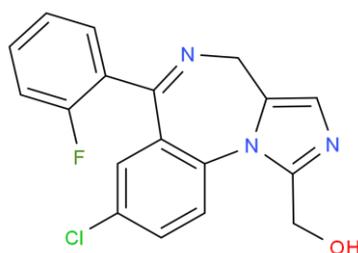
Desmethyflunitrazépam
(C₁₅H₁₀FN₃O₃)
M.M. = 299,26 g.mol⁻¹



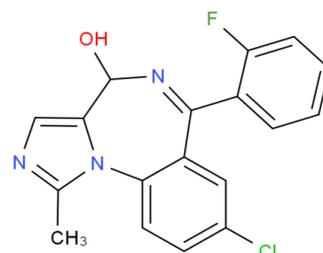
Desalkylflurazépam (C₁₇H₁₅ClFN₃O)
M.M. = 331,09 g.mol⁻¹



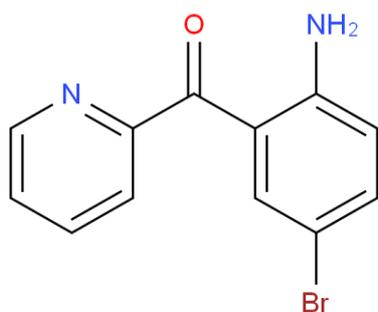
1-OH midazolam (C₁₈H₁₃ClFN₃O)
M.M. = 341,77 g.mol⁻¹



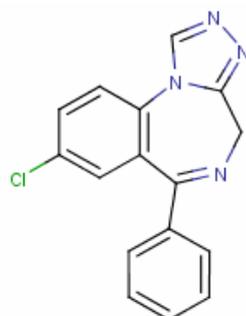
4-OH midazolam
(C₁₈H₁₃ClFN₃O)
M.M. = 341,07 g.mol⁻¹



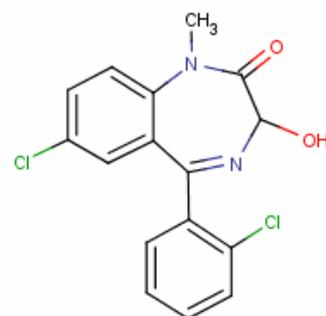
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine
(C₁₂H₉BrN₂O)
M.M. = 277,12 g.mol⁻¹



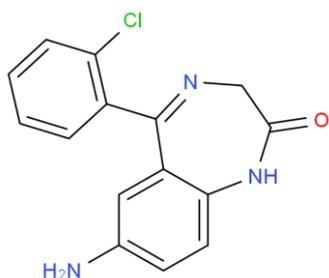
Estazolam (C₁₆H₁₁ClN₄)
M.M. = 294,74 g.mol⁻¹



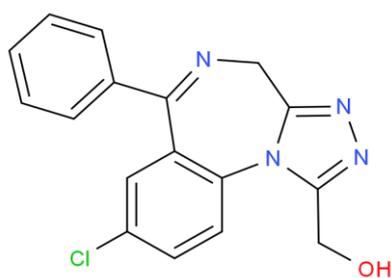
Lormétazépam (C₁₆H₁₂Cl₂N₂O₂)
M.M. = 335,19 g.mol⁻¹



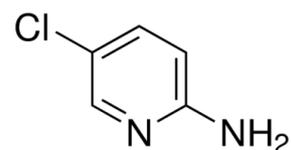
7 aminoclonazépam (C₁₅H₁₂ClN₃O)
M.M. = 285,73 g.mol⁻¹



OH-alprazolam (C₁₇H₁₃ClN₄O)
M.M. = 324,76 g.mol⁻¹



ACP (C₅H₅ClN₂)
M.M. = 128,56 g.mol⁻¹



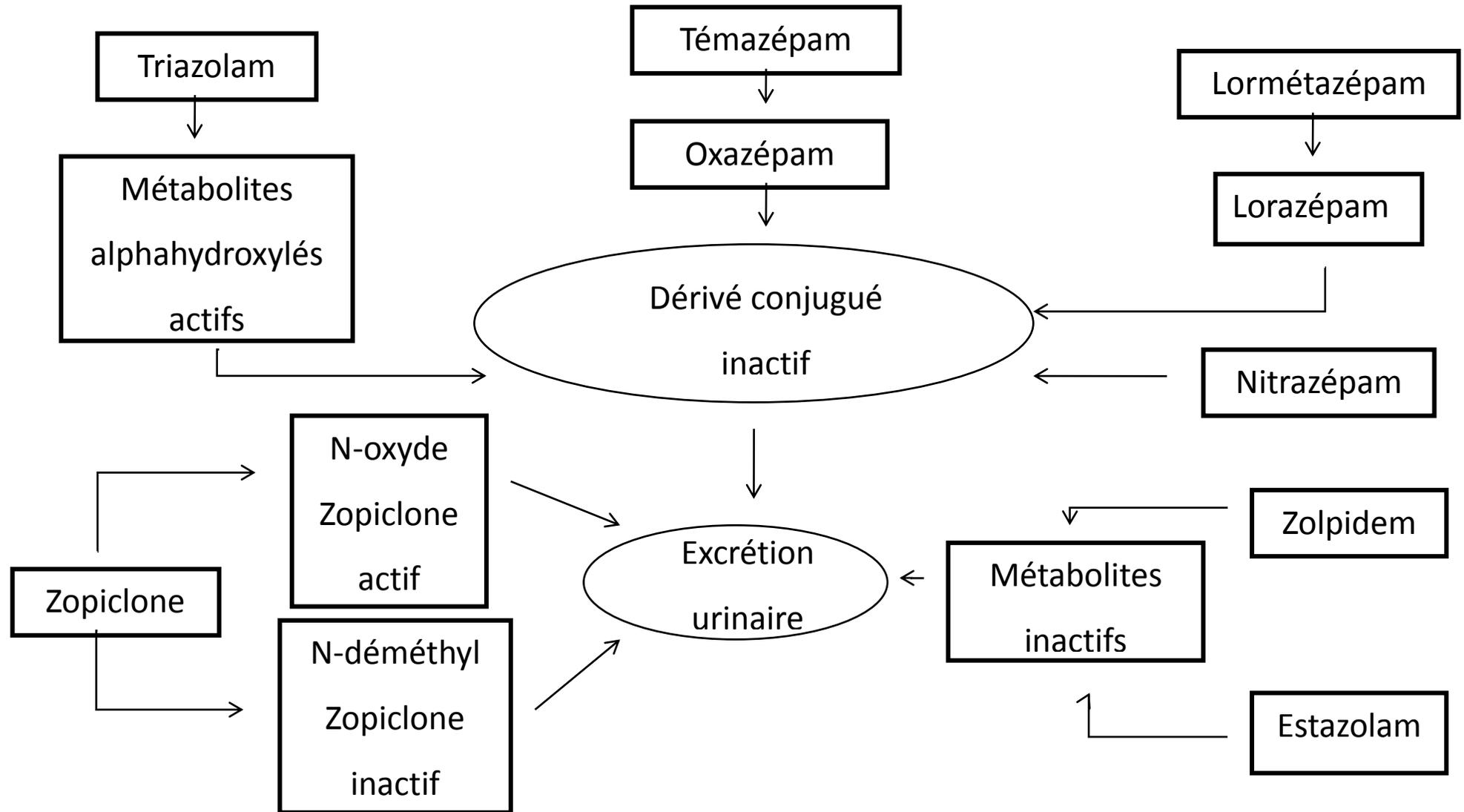
Annexe 2. Demi-vie, concentrations sanguines thérapeutiques et toxiques, métabolisme des benzodiazépines et apparentés (d'après la société française de toxicologie analytique)

Principe actif	Spécialité pharmaceutique	Demi vie (heures)	Concentration thérapeutique (µg/L)	Concentration toxique (µg/L)	Métabolite A : actif
Alprazolam	Xanax	6-18	5-50 (100)	100-400	Alpha-hydroxyalprazolam A 4-hydroxyalprazolam A, 4-dihydroxyalprazolam
Bromazepam	Lexomil	8-20	80-170	300-400	3-hydroxybromazépam A 2-(2-amino-3-hydroxy-5-bromobenzoyl) pyridine
Chlordiazepoxide	Librax	6-27	400-4000	3000-10000	Desméthylchlordiazépoxyde A Demoxépam A Desmethyldiazépam (nordazépam) A Oxazépam A
Clobazam	Urbanyl	10-31	100-400		Desméthylclobazam (norclobazam) A 4-hydroxyclobazam 4-hydroxydesméthylclobazam
Clonazepam	Rivotril	19-60	20-70	100	7-aminoclonazépam A 7-acétamidoclonazépam 3-hydroxy-7-aminoclonazépam 3-hydroxy-7-acétamidoclonazépam
Chlorazepate dipotassique*	Tranxene	2	200-800	1500-2000	N-Desméthyl-diazépam (nordazépam) A Oxazépam A
Clotiazepam	Veratran	4	100-700		N-Desméthylclotiazépam A Hydroxycloctiazépam
Diazepam	Valium	15-60	125-1500	1500	N-Desméthyl-diazépam (nordazépam) A Oxazépam A 3-hydroxydiazépam

					(témazépam) A
Estazolam	Nuctalon	10-31	55-200		5 métabolites hydroxylés à cycle triazolé ouvert
Loflazépatate d'éthyle	Victan	73-119	49-72		2-fluoro-clorazépatate 2-fluoro-N-desméthyl-diazépam
Flunitrazépam	Rohypnol	9-30	5-15	50	Desméthylflunitrazépam A 7-aminoflunitrazépam A 3-hydroxyflunitrazépam A 3-hydroxy-desméthylflunitrazépam 7-acétamidoflunitrazépam 7-acétamido-3OH-flunitrazépam 7-amino-desméthylflunitrazépam 7-amino-3 OH-desméthylflunitrazépam 7-amino-3 OH-flunitrazépam
Flurazépam	Fluraz	40-250	0.5 -		Desalkylflurazépam
Loprazolam	Havlane	3.3-14.8	3-10		Loprazolam-N-oxyde Acétamidoloprazolam Hydroxyloprazolam
Lorazépam	Temesta	9-20	20-250	300-600	Hydroxylorazépam
Lormetazépam	Noctamide	10	1-20		N-desméthyl-lormétazépam (lorazépam) A
Midazolam	Hypnovel	1-4	80-250	1000-1500	Alpha-hydroxymidazolam A 4-hydroxymidazolam 1,4-dihydroxymidazolam
Nitrazépam	Mogadon	17-48	30-120	200-500	7-aminonitrazépam 7-acétylaminonitrazépam Hydroxynitrazépam 7-acétamido-nitrazépam
Nordazépam	Nordaz	31-97	200-800	1500-2000	Oxazépam A
Oxazépam	Seresta	4-11	500-2000	2000	
Temazépam	Normison	3-13	300-900	1000	Desméthyltémazépam (oxazépam) A

Tetrazepam	Myolastan	10-25	50-600		3-hydroxytétrazépan
Triazolam	Halcion	1.8-3.9	2-20		Alpha-hydroxytriazolam A 4-hydroxytriazolam (peu)
Zolpidem	Stilnox	0.7-3.5	150-250		
Zopiclone	Imovane	5	50-100		

Annexe 3. Métabolisme et élimination des benzodiazépines



Annexe 4. Résumé des études utilisant les sels QuEChERS dans les milieux biologiques

Référence	Matrice	Contexte	Volume / quantité d'échantillon	solvants	Extraction partitioning	Clean-up	Traitement supplémentaire	Technique analytique
Usui et al. 2014 [37]	foie	Analyses toxicologiques médico-légales	0,5 g	ACN	0,5 g d'un mélange 4 :1 MgSO ₄ / acétate de sodium	PSA + C ₁₈	/	LC-MS/MS
Yeudakim au et al. 2013 [55]	Sang d'origine aviaire oeuf	Screening des hydrocarbures polycycliques aromatiques	5 g	ACN + 1% d'acide acétique	7,5 g d'acétate de sodium anhydre et de MgSO ₄ (ratio 1 :4)	MgSO ₄ PSA C ₁₈	/	UPLC-UV
Plössl et al. 2006 [34]	sang	40 médicaments	1 mL	ACN	250 mg NaCl 500 mg MgSO ₄	PSA MgSO ₄	/	GC-MS
DeArmond et al. 2014 [57]	Sang Tissu cérébral	2 insecticides	100 µL	ACN	0.2g mélange QuEChERS (4 :1 MgSO ₄ / NaOAc)	/	/	LC-MS/MS
Matsuta et al. 2013 [35]	sang	13 médicaments	100 µL	ACN	300 mg MgSO ₄ 150 mg NaCl	/	Evaporation sous flux d'azote	GC-MS LC-MS/MS

Vudathala et al. 2010 [58]	Sang foie	Anticoagulants rodenticides	1 mL / 1 g	ACN	/	PSA MgSO ₄ silicate de magnésium (Floridil®) alumine basique (+ C18 pour le foie)	Evaporatio n à sec	HPLC-UV HPLC- fluorescence
Westland et al. 2013 [56]	Sang urine	benzodiazépines	10 mL	ACN	4 g MgSO ₄ 1 g NaCl	MgSO ₄ GCB	/	GC-MS LC-MS/MS
Bang et al. 2013 [59]	Sang Urine	lipides	100 µL 1 mL	4 solvants testés : ACN méhanol Méthanol / trichlorométhane (1 :2 v/v) Methyl-tert-butyl ether / methanol (2 :1 v/v)	0.15 g de sels pré emballés (125 mg MgSO ₄ , 25 mg AcONa) 1.5 g de sels	PSA GCB Silice C18 SAX (échangeur d'anions)	/	LC-MS/MS

Anzillotti et al. 2014 [36]	sang	Benzodiazépines Drogues (opiacés, LSD, amphétamines)	1 mL	Acétate d'éthyle	Cartouche SupelcleanQuE PSA	/	Hydrolyse enzymatique en condition acide à 40°C	UPLC- MS/MS
Usui et al. 2012 [38]	Sang	médicaments	0.5 mL	ACN ou Methanol	0.5 g de sels	dSPE pour les composés basiques	/	LC-MS/MS
Usui et al. 2012 [39]	Sang urine	2 insecticides	0.5 mL sang ou urine	ACN	0.5 g de sels	MgSO4 PSA	/	LC-MS/MS

Annexe 5. Paramètres du spectromètre de masse pour les 10 étalons internes

molécule	ion parent (m/z)	ions fils (m/z)	Q1 (V)	CE (V) énergie de collision	Q3 (V)
7-aminoclonazepam D4	289.90	121.35	-14.0	-33.0	-23.0
		226.40	-14.0	-26.0	-15.0
7-aminoflunitrazepam D7	291.10	138.40	-14.0	-30.0	-14.0
		230.35	-14.0	-31.0	-16.0
desmethylflunitrazepam D4	304.00	258.25	-15.0	-26.0	-17.0
		202.35	-15.0	-40.0	-21.0
desalkylflurazepam D4	293.00	140.30	-11.0	-32.0	-14.0
		230.40	-11.0	-28.0	-16.0
triazolam D4	346.90	312.40	-10.0	-29.0	-22.0
		243.35	-10.0	-42.0	-17.0
clonazepam D4	319.90	274.15	-16.0	-27.0	-30.0
		218.15	-16.0	-39.0	-23.0
zopiclone D4	393.00	245.20	-14.0	-19.0	-17.0
		217.20	-14.0	-35.0	-23.0
alprazolam D5	314.10	286.40	-15.0	-28.0	-20.0
		210.35	-15.0	-43.0	-14.0
flunitrazepam D7	321.10	275.45	-12.0	-28.0	-19.0
		246.45	-12.0	-36.0	-17.0
diazepam D5	289.80	198.25	-14.0	-34.0	-21.0
		227.30	-14.0	-30.0	-24.0

Annexe 6. Paramètres du spectromètre de masse pour les 36 molécules d'intérêt

molécule	ion parent (m/z)	ions fils (m/z)	Q1 (V)	CE (V) énergie de collision	Q3 (V)
7-amino-nitrazepam	252.10	121.30	-13.0	-27.0	-22.0
		94.25	-13.0	-39.0	-17.0
norclobazam	287.20	245.00	-22.0	-22.0	-25.0
		210.00	-22.0	-33.0	-20.0
7-aminoclonazepam	285.90	250.20	-14.0	-23.0	-26.0
		195.15	-14.0	-31.0	-21.0
7-aminoflunitrazepam	284.00	227.25	-11.0	-26.0	-24.0
		240.20	-11.0	-36.0	-16.0
3-OH-bromazepam	333.80	289.00	-12.0	-22.0	-20.0
		78.15	-12.0	-36.0	-29.0
bromazepam	316.00	182.35	-12.0	-31.0	-12.0
		209.25	-12.0	-28.0	-14.0
lorazepam	320.90	275.00	-12.0	-23.0	-29.0
		229.10	-12.0	-36.0	-24.0
estazolam	294.90	267.20	-11.0	-25.0	-18.0
		205.30	-11.0	-39.0	-14.0
3-OH-flunitrazepam	329.90	284.20	-12.0	-20.0	-20.0
		238.20	-12.0	-31.0	-25.0
oxazepam	286.90	241.20	-14.0	-23.0	-25.0
		104.20	-14.0	-35.0	-20.0
clonazepam	315.90	214.35	-12.0	-40.0	-22.0
		241.35	-12.0	-35.0	-17.0
desmethylflunitrazepam	300.00	198.35	-15.0	-40.0	-21.0
		225.30	-15.0	-35.0	-15.0
nitrazepam	282.00	180.35	-14.0	-39.0	-19.0
		207.30	-14.0	-35.0	-14.0
clobazam	300.90	259.20	-11.0	-21.0	-17.0
		224.25	-11.0	-34.0	-15.0
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	278.80	78.15	-10.0	-32.0	-30.0
		106.20	-10.0	-18.0	-20.0
desalkylflurazepam	289.00	140.25	-14.0	-29.0	-26.0
		165.25	-14.0	-29.0	-30.0
triazolam	343.00	308.25	-17.0	-28.0	-21.0
		239.30	-17.0	-43.0	-16.0
temazepam	301.00	255.35	-14.0	-23.0	-18.0
		177.30	-14.0	-39.0	-12.0
lormetazepam	335.00	289.10	-17.0	-22.0	-20.0
		177.15	-17.0	-40.0	-19.0
zopiclone	389.00	245.30	-14.0	-20.0	-17.0
		217.25	-14.0	-35.0	-15.0

alprazolam	308.90	281.25	-15.0	-26.0	-19.0
		274.30	-15.0	-26.0	-19.0
nordazepam	271.00	140.30	-14.0	-29.0	-14.0
		208.30	-14.0	-28.0	-14.0
flunitrazepam	314.00	268.40	-16.0	-27.0	-19.0
		239.30	-16.0	-35.0	-16.0
diazepam	284.90	193.30	-14.0	-33.0	-13.0
		154.30	-14.0	-28.0	-16.0
chlordiazepoxide	299.90	282.25	-11.0	-25.0	-19.0
		227.20	-11.0	-26.0	-15.0
loflazepate d'ethyle	361.00	259.20	-13.0	-32.0	-18.0
		289.35	-13.0	-22.0	-20.0
zolpidem	308.10	235.35	-30.0	-37.0	-16.0
		263.40	-30.0	-27.0	-18.0
1-OH-midazolam	341.90	324.20	-17.0	-23.0	-23.0
		168.20	-17.0	-40.0	-30.0
tetrazepam	288.90	225.35	-19.0	-31.0	-15.0
		197.35	-19.0	-33.0	-13.0
clotiazepam	318.90	291.20	-16.0	-23.0	-30.0
		218.15	-16.0	-27.0	-23.0
4-OH-midazolam	341.90	297.10	-17.0	-30.0	-21.0
		234.15	-17.0	-25.0	-25.0
midazolam	326.00	291.20	-30.0	-28.0	-30.0
		223.20	-30.0	-38.0	-15.0
flurazepam	388.10	317.30	-19.0	-21.0	-22.0
		288.20	-19.0	-26.0	-20.0
loprazolam	464.90	111.30	-17.0	-26.0	-20.0
		85.20	-17.0	-26.0	-15.0
OH-alprazolam	325.00	252.00	-12.0	-28.0	-27.0
		216.50	-12.0	-42.0	-15.0
ACP	129.00	76.20	-10.0	-34.0	-29.0
		112.20	-10.0	-26.0	-22.0

Annexe 7. Transitions MRM et abondance relative des 36 molécules d'intérêt

Composés	m/z→m/z Transition 1*		m/z→m/z Transition 2* (abondance relative) **	
	Ion parent	Ion fils	Ion parent	Ion fils
1-OH-midazolam	341,90	324,20	341,90	168,20 (38%)
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	278,80	78,15	278,80	106,20 (47%)
3-OH-bromazepam	333,80	289,00	333,80	78,15 (90%)
3-OH-flunitrazepam	329,90	284,20	329,90	238,20 (55%)
4-OH-midazolam	341,90	297,10	341,90	234,15 (77%)
7 aminoclonazepam D ₄	289,90	121,35	289,90	226,40 (83%)
7 aminoflunitrazepam D ₇	291,10	138,40	291,10	230,35 (32%)
7-aminoclonazepam	285,90	250,20	285,90	195,15 (36%)
7-aminoflunitrazepam	284,00	227,25	284,00	240,20 (166%)
7-aminonitrazepam	252,10	121,30	252,10	94,25 (25%)
ACP	129,00	76,20	129,00	112,20 (70%)
alprazolam	308,90	281,25	308,90	274,30 (33%)
alprazolam D ₅	314,10	286,40	314,10	210,35 (104%)
bromazepam	316,00	182,35	316,00	209,25 (120%)
chlordiazepoxide	299,90	282,25	299,90	227,20 (75%)
clobazam	300,90	259,20	300,90	224,25 (32%)
clonazepam	315,90	214,35	315,90	241,35 (71%)
clonazepam D ₄	319,90	274,15	319,90	218,15 (36%)
desalkylflurazepam	289,00	140,25	289,00	165,25 (24%)
desalkylflurazepam D ₄	293,00	140,30	293,00	230,4 (48%)
desmethylflunitrazepam	300,00	198,35	300,00	225,3 (110%)
desmethylflunitrazepam D ₄	304,00	258,25	304,00	202,35 (22%)
diazepam	284,90	193,30	284,90	154,30 (65%)
diazepam D ₅	289,80	198,25	289,80	227,30 (64%)
estazolam	294,90	267,20	294,90	205,30 (64%)
flunitrazepam	314,00	268,40	314,00	239,30 (63%)
flunitrazepam D ₇	321,10	275,45	321,10	246,45 (25%)
flurazepam	388,10	317,30	388,10	288,20 (71%)
loflazepate d'ethyle	361,00	259,20	361,00	289,35 (18%)
loprazolam	464,90	111,30	464,90	85,20 (108%)
lorazepam	320,90	275,00	320,90	229,10 (31%)
lormetazepam	335,00	289,10	335,00	177,15 (15%)
midazolam	326,00	291,20	326,00	223,20 (27%)
nitrazepam	282,00	180,35	282,00	207,30 (114%)
norclobazam	287,20	245,00	287,20	210,00 (30%)
nordazepam	271,00	140,30	271,00	208,30 (80%)
OH-alprazolam	325,0	352,00	325,00	216,15 (300%)

OH-triazolam D4	363,00	176,25	363,00	282,30 (32%)
oxazepam	286,90	241,20	286,90	104,20 (29%)
temazepam	301,00	255,35	301,00	177,30 (17%)
tetrazeepam	288,90	225,35	288,90	197,35 (67%)
triazolam	343,00	308,25	343,00	239,30 (51%)
zolpidem	308,10	235,35	308,10	263,40 (310%)
zopiclone	389,00	245,30	389,00	217,25 (70%)
zopiclone D4	293,00	245,20	293,00	217,20 (61%)
triazolam D4	346,90	312,40	346,90	243,35 (80%)
clotiazepam	318,90	291,20	318,90	218,15 (42%)

Annexe 8. Etude de la suppression ionique dans les trois matrices : urine, sérum, sang total

molécule	écart moyen de signal (%) urine	écart moyen de signal (%) sang total	écart moyen de signal (%) sérum
1-OH-midazolam	7,6	8,5	9,5
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine	1,2	6,2	11,9
3-OH-bromazepam	5,7	3,9	3,3
3-OH-flunitrazepam	11	5,6	13,4
4-OH-midazolam	2	2,8	4,3
7-aminoclonazepam	-18,8	-4,1	-4,6
7-aminoflunitrazepam	-11,5	1,6	4
7-aminonitrazepam	-14,1	-2,1	3,8
alprazolam	4,5	3,8	12,8
bromazepam	8,5	-3,2	1,4
chlordiazepoxide	-2	7,5	7,1
clobazam	10,4	7,8	11,9
clonazepam	9,5	12,4	12,7
clotiazepam	11,3	7,4	12,4
desalkylflurazepam	8,6	6	12,7
desmethylflunitrazepam	5,6	3,9	7,7
diazepam	3,8	4,2	7,8
estazolam	3,5	6,4	14
flunitrazepam	5,1	6,7	10,4
flurazepam	11,3	5,7	12,1
loflazepate d'ethyle	8,6	7	14,1
loprazolam	12,9	8,8	13,2
lorazepam	8,1	4,9	9,9
lormetazepam	9,9	8,5	12,9
midazolam	10,8	7	11,8
nitrazepam	1,7	0,04	4,2
norclobazam	-12,3	0,8	3,1
nordazepam	4	9,9	15,5
oxazepam	10,8	7,9	14,8
temazepam	9,8	9,1	9,6
tetrazepam	10,4	9,4	10,8
triazolam	8,2	12,8	12,5
zolpidem	15,9	12,9	19,7
zopiclone	6,7	8,2	15,9



UNIVERSITÉ
BORDEAUX
S E G A L E N

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque

PONCELET Lauranne

TITRE : Mise au point d'une méthode d'extraction par les sels QuEChERS pour l'identification et la quantification des benzodiazépines dans les prélèvements biologiques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

RESUME : Ce travail rapporte la mise au point d'une méthode d'identification et de quantification dans trois matrices différentes (sérum, sang total, urine) de 36 benzodiazépines par LC-MS/MS, après extraction liquide-liquide par l'acétonitrile, puis l'ajout de sels QuEChERS. Une validation complète a été réalisée selon la norme ISO 15189 et la procédure satisfait aux exigences d'une utilisation en routine clinique au sein du laboratoire.

MOTS-CLES : LC-MS/MS, benzodiazépines, sels QuEChERS

TITLE : Development of an extraction method using QueChERS salts for the determination of benzodiazepines in biological samples by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

ABSTRACT : We report the development of a LC-MS/MS method for the identification and the quantification of 36 benzodiazepines in blood, serum and urine, where the extraction step is based on QuEChERS salts. The entire procedure validated according to the so-called "norme ISO 15189". Its performances are suitable for clinical routine activity.

KEYWORDS : LC-MS/MS, benzodiazepines, QuEChERS salts

DISCIPLINE: Pharmacie – Toxicologie analytique

UFR des Sciences Pharmaceutiques – Université de Bordeaux

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux Cedex