

ORIGINAL RESEARCH PAPER

**TOXICOLOGICAL DRUG SCREENING BY GC-MS VERSUS
HPLC-DAD USING A COMMON EFFICIENT EXTRACTION
PROCEDURE**

**SCREENING TOXICOLOGIQUE DES MEDICAMENTS PAR
HPLC-DAD ET GC-MS: PROTOCOLE D'EXTRACTION UNIQUE**

**Seloua Elmrabeh^{1*}, Mohammed Ibriz¹, Mohammed Ghandi², Naima
Aitdaoud^{1,2}, Mouna Bentafrat², Narjis Badrane², Abdelmajid
Soulaymani¹, Rachida Soulaymani Bencheikh²**

¹*Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Département de Biologie,
Laboratoire de Génétique et Biométrie, BP 133, Kénitra, Maroc*

²*Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc, Rue Lamfadel
Cherkaoui, BP6671 - Rabat Instituts, Madinat Al Irfane, Rabat, Maroc*

*Corresponding author: seloua.elmrabeh@gmail.com

Received: February, 06, 2015

Accepted: March, 31, 2015

Abstract: This paper presents a common extraction method for toxicological drug screening by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD). Liquid-liquid extraction was performed using plasma of 104 samples at the Laboratory of Moroccan Poison Control and Pharmacovigilance Center during a period of 12 months.

The results obtained by HPLC-DAD are compared with those determined with GC-MS. 76 cases (73.08 %) were found positive for at least by one of these two techniques. HPLC-DAD identified 59.87 % of all positive results, and 10 molecules were identified only by HPLC-DAD. GC/MS identified 40.13 % of all positives, and 4 molecules were identified only by GC/MS. In order to evaluate the performance of this extraction method, an extraction yield was calculated for three classes of drugs. All the analyzed molecules were obtained in satisfactory yields (higher than 50 %) except for carbamazepine, amitriptyline and nortriptyline. Overall, the results indicate that the extraction method is well adapted for toxicological drug screening. The use of common extraction simultaneously for the two techniques can reduce workload and costs of screening, while increasing the validity and reliability of the results.

Keywords: *drug, gas chromatography-mass spectrometry, high performance liquid chromatography with diode-array detection, liquid-liquid extraction, screening*

INTRODUCTION

L'analyse toxicologique permet d'identifier et/ou de doser le toxique ingéré afin de confirmer ou d'infirmier l'éventuelle intoxication, d'évaluer sa gravité ou de surveiller l'efficacité du traitement [1 – 3]. De nombreuses méthodes d'identification et de dosage de toxiques, de plus en plus performantes, existent. Des méthodes séparatives sont plus spécifiques telles que la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) ou la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Ces deux méthodes séparatives sont les plus employées dans les laboratoires de toxicologie [4]. Elles constituent des méthodes de choix pour l'identification et/ou la quantification des médicaments en cas d'intoxication grave [2]. Cependant, ces méthodes présentent des limites. L'HPLC-DAD permet l'identification des médicaments par leur temps de rétention et leur spectre UV, cependant les composés qui possèdent des propriétés physico-chimiques proches peuvent partager ces paramètres [5]. La GC-MS est limitée aux médicaments thermostables et suffisamment volatils [4]. L'utilisation conjointe de ces deux méthodes pour la détection de différentes classes pharmacologiques et la confirmation des résultats obtenus, sont nécessaires. Dans la limite de notre recherche bibliographique les méthodes de screening par HPLC-DAD et GC-MS publiées dans la littérature utilisent des extractions (liquide-liquide) différentes pour les deux méthodes. L'utilisation d'une seule méthode d'extraction pourrait diminuer la charge et les coûts du screening et avoir une meilleure rentabilité en matière de résultats ce qui permettrait l'optimisation de l'analyse toxicologique.

L'objectif de ce travail est de mettre au point et d'évaluer l'apport de l'application simultanée de la GC-MS et l'HPLC-DAD moyennant une seule méthode d'extraction pour effectuer le screening toxicologique des médicaments au niveau des échantillons plasmatiques des intoxiqués parvenant au Laboratoire de toxicologie et pharmacologie du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (Lab-CAPM).

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Réactifs

L'ensemble des solvants et réactifs utilisés sont de qualité analytique. L'acétonitrile, l'ammoniac, le dichlorométhane, l'heptane, le triéthylamine et le phosphate monobasique sont fournis par Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Allemagne. L'ammoniac et le chlorure d'ammonium, ont été obtenus chez Panreac Quimica S.A. Barcelone, Espagne.

Les principes actifs utilisés pour préparer les solutions mères pour le calcul du rendement d'extraction sont de qualité pharmaceutique. Ils sont fournis par Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Allemagne / France/ USA).

Le tampon phosphate (20 mM) est préparé après dissolution de 13,6 g de phosphate de potassium monobasique et 2,5 mL de triéthylamine dans 100 mL d'eau déminéralisée, 10 mL de la solution préparée est diluée dans 500 mL d'eau bidistillée filtrée.

Instrumentation

HPLC-DAD: le screening est effectué sur une chaîne HPLC Agilent série 1100 équipée d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) et d'une colonne HYPERSIL ODS 5 μm , 100 mm x 2 mm précédée d'une précolonne 20 x 2 mm. La température de l'enceinte thermostatée est de 40 °C. La phase mobile est un mélange de tampon phosphate et d'acétonitrile (85 : 15 % (v/v)). Le tampon phosphate est à une concentration de 20 mM, son pH est de 3,2. L'élution est réalisée en mode gradient à un débit de 0,4 mL·min⁻¹ (Tableau 1) [6].

Tableau 1. Gradient d'élution pour la méthode HPLC-DAD

Temps [min]	Tampon [%]	Acétonitrile [%]	Débit [mL·min ⁻¹]
0	85	15	0,4
6,50	55	45	0,4
13,00	25	75	0,4
15,00	20	80	0,4
19,00	85	15	0,4

GC-MS: L'analyse des composés est réalisée par GC-MS, le couplage GC-MS utilisé est un spectromètre de masse PerkinElmer, Clarus® SQ 8C couplé à un chromatographe en phase gazeuse Clarus® 680 GC-PerkinElmer. La colonne capillaire est une Colonne Rxi®-5ms 5 % diphényle / 95 % diméthyle polysiloxane (30 m x 0,25 mm de D.I., 0,25 μm d'épaisseur de film). L'injecteur est à une température de 280 °C il est utilisé dans le mode splitless. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixe à 1 mL·min⁻¹. Initialement, la colonne se trouve à une température de 40 °C, cette température est maintenue durant une minute après l'injection. La température finale de 300 °C est atteinte à raison d'une augmentation de 15 °C·min⁻¹ puis maintenue à 300 °C pendant 5 minutes. La détection est réalisée en impact électronique à 70 eV en mode scan.

Traitement des données chromatographiques et spectrales

Les données HPLC-DAD sont traitées par le logiciel HP Chemstation for LC, version B02 qui permet la détermination de la concordance du spectre élué à son homologue en spectrothèque. Cette concordance est évaluée par le match factor entre les molécules, celui-ci est accepté à une valeur supérieure ou égale à 990/1000. Les longueurs d'onde d'acquisition utilisées sont de l'ordre de 210, 230, 254 nm.

L'exploitation des données GC-MS a été réalisée à l'aide du logiciel Turbomass version 6.0 et la bibliothèque NIST version 2008. Le logiciel Turbomass donne le degré de concordance entre le spectre à identifier et ceux de la bibliothèque spectrale.

Un R. Match (indication du logiciel Turbomass) de 1000 correspond à une identification parfaite.

Méthodes

L'échantillon de sang est prélevé dans des tubes héparinés ou EDTA. Le sang est centrifugé pendant dix minutes à grande vitesse (3000 tours·min⁻¹). Le plasma obtenu après centrifugation est conservé à une température constante et moyenne d'environ 4 °C. La réalisation de l'extraction nécessite l'utilisation de 1 mL de plasma.

Méthode d'extraction

Le protocole d'extraction est le même pour les deux méthodes (HPLC-DAD et GC-MS). L'échantillon subit une extraction liquide- liquide. Le prazépam est utilisé comme étalon interne. Le solvant d'extraction est un mélange dichlorométhane, propanol-2, heptane (25,10, 65, v / v / v). L'extrait est évaporé sous azote à 40 °C. Le résidu sec est repris par 100 µL de méthanol, 50 µL est mise dans un vial pour l'analyse par GC-MS. 20 µL de H₂O est ajouté au reste, tout le volume est mis dans un vial pour l'analyse par HPLC-DAD.

Calcul du rendement d'extraction

Les 26 médicaments retenus pour le calcul du rendement d'extraction appartiennent à trois familles médicamenteuses (benzodiazépines, antidépresseurs et antiépileptiques). Des solutions mères à 0,5 g·L⁻¹ sont préparées après dissolution de 10 mg de médicaments en poudre dans 20 mL de méthanol. Ces solutions mères sont diluées au centième (1/100), la concentration finale été donc de 5 mg·L⁻¹.

Les standards de médicaments à 5 mg/L ont subi la même extraction décrite ci-dessus. Le rendement d'extraction a été calculé selon le rapport de l'aire de l'analyte analysée par HPLC-DAD ou GC-MS après extraction rapportée à l'aire du même analyte déterminée par HPLC-DAD ou GC-MS avant extraction [7].

RÉSULTATS

Les caractéristiques épidémiologiques des patients inclus dans cette étude figurent dans le Tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques générales des patients étudiés

Variable		Effectifs	Pourcentage [%]
Villes	Rabat	86	82,69
	Casablanca	11	10,58
	Marakkech	3	2,89
	Témara	2	1,92
	Taza	2	1,92
Services	Urgences	27	25,96
	Réanimation	19	18,27
	Pédiatrie	19	18,27
	Autres services	14	13,46
	Non précisé	25	24,04
	Total	104	100
Age par tranches	[0-15]	16	15,39
	[15-20]	6	5,77
	[20-50]	22	21,15
	[50-60]	2	1,92
	≥ 60	4	3,85
	Non précisé	54	51,92
	Total	104	100
Sexe	Hommes	54	51,92
	Femmes	50	48,08
	Total	104	100

Les deux méthodes chromatographiques ont montré que sur les 104 cas analysés, 76 cas (73,08 %) ont été identifiés au moins par l'une des deux méthodes et 28 cas (26,92 %) n'ont pas été identifiés. Pour les 76 cas identifiés une discordance de résultats entre les deux techniques a été enregistrée dans 52 cas (68,42 %). Cette discordance a concerné la positivité de l'une des deux méthodes dans 39 échantillons soit 75% des cas (Tableau 3) et la nature de la molécule détectée dans 9 échantillons soit 17,31 % des cas (Tableau 4).

Tableau 3. Résultats de screening toxicologique en fonction de la méthode utilisée:
cas de discordance de positivité enregistrée entre HPLC-DAD et GC-MS

Cas	Résultats HPLC-DAD	Résultats GC-MS
1	Non identifié	Caféine
2	Caféine, Paracétamol	Non identifié
3	Ibuprofène	Non identifié
4	Bromazépam	Non identifié
5	Bromazépam	Non identifié
6	Dextropropoxyphène	Non identifié
7	Bromazépam	Non identifié
8	Carbamazépine	Non identifié
9	Ibuprofène	Non identifié
10	Bromazépam, Zopiclone	Non identifié
11	Diazépam, Phénobarbital	Non identifié
12	Témazépam	Non identifié
13	Phénobarbital	Non identifié
14	Thiopental	Non identifié
15	Oméprazole	Non identifié
16	OH Oxcarbazépine	Non identifié
17	NDM diazépam	Non identifié
18	Non identifié	Acide valproïque, Acide tiaprofénique
19	Non identifié	Amitriptyline, Nortriptyline
20	Témazépam	Non identifié
21	Bromazépam	Non identifié
22	Midazolam	Non identifié
23	Bromazépam	Non identifié
24	Ibuprofène	Non identifié
25	NDM diazépam	Non identifié
26	Kétamine	Non identifié
27	Bromazépam	Non identifié
28	Non identifié	Thiopental, Midazolam
29	Bromazépam, Norpropoxyphène	Non identifié
30	Ibuprofène, NDM diazépam, Chlorpromazine	Non identifié
31	Norpropoxyphène	Non identifié
32	Non identifié	Amitriptyline, Nortriptyline
33	Escitalopram, Métoclopramide, Olanzapine	Non identifié
34	Non identifié	Tramadol
35	Témazépam	Non identifié
36	Oméprazole	Non identifié
37	Dextropropoxyphène	Non identifié
38	Oxcarbazépine	Non identifié
39	Oxcarbazépine	Non identifié

NDM diazépam: N- desméthyl diazépam

Tableau 4. Discordance entre les résultats de l'HPLC-DAD et la GC-MS liée à la nature des molécules identifiées

Cas	Résultats HPLC-DAD			Résultats GC-MS			
	Molécules identifiées	TR	MF	Molécules identifiées	TR	Probabilité	R. Match
1	Chlorpromazine	11,5	998,06	Acide valproïque Caféine	6,24 15,62	86 94	850 829
2	Oméprazole	7,287	996,45	Propofol	8,51	67,6	849
3	NDM diazépam	8,706	998,99	Nordiazépam	27,53	73	738
4	NDM diazépam	8,706	999,44	Lidocaine	16,66	41	832
5	Bromazépam	7,5	999,06	Amitriptyline	22,26	78	917
6	Métabolite zopiclone	7,154	997,65	Sertraline Caféine	25,04 15,70	98 92,2	849 866
7	Ibuprofène	8,55	998,96	Acide tiaprofénique	16,74	96	906
	Dompéridone	9,424	995,25	Sertraline	25,05	98,3	892
8	NDM diazépam	8,706	998,79	Amitriptyline Nortriptyline	22,27 22,58	80 85	898 917
9	Oméprazole	7,287	998,69	Propofol	8,53	80,40	925

TR: temps de rétention

MF: match facteur

R. Match: indication du logiciel Turbomass

Pour quatre (7,69 des cas) on a identifié les mêmes molécules avec des molécules de plus différentes au niveau de l'HPLC-DAD et au niveau de la GC-MS (Tableau 5).

Tableau 5. Cas présentant une discordance et une concordance des résultats obtenus par HPL-DAD et GC-MS moyennant la même méthode d'extraction

Cas	Résultats HPLC-DAD			Résultats GC-MS			
	Molécules identifiées	TR	MF	Molécules identifiées	TR	Probabilité	R. Match
1	Caféine Diazépam	11,2 1,433	997,98 999,70	Caféine Amitriptyline Kétamine	22,24 16,25 15,16	86 98 94	928 914 988
2	Phénobarbital Diazépam	4,6 4,559	997,65 998,08	Phénobarbital Amitriptyline Nortriptyline	22,23 22,54 18,38	83,2 89 41	928 890
3	Thiopental Propofol	14,094 9,655	996,78 998,21	Thiopental Midazolam	28,74 16,32	91,7 58	887 859
4	Phénobarbital NDM diazépam Caféine	4,559 8,706 1,433	998,37 999,22 995,45	Phénobarbital	18,29	80	884

Les Figures 1 et 2 donnent des exemples de chromatogrammes obtenus par HPLC-DAD et GC-MS pour deux cas différents. Le bromazépam est identifié pour le cas analysé par

HPLC-DAD (Figure 1). L'analyse par GC-MS a permis l'identification de l'imipramine et de la désipramine (Figure 2).

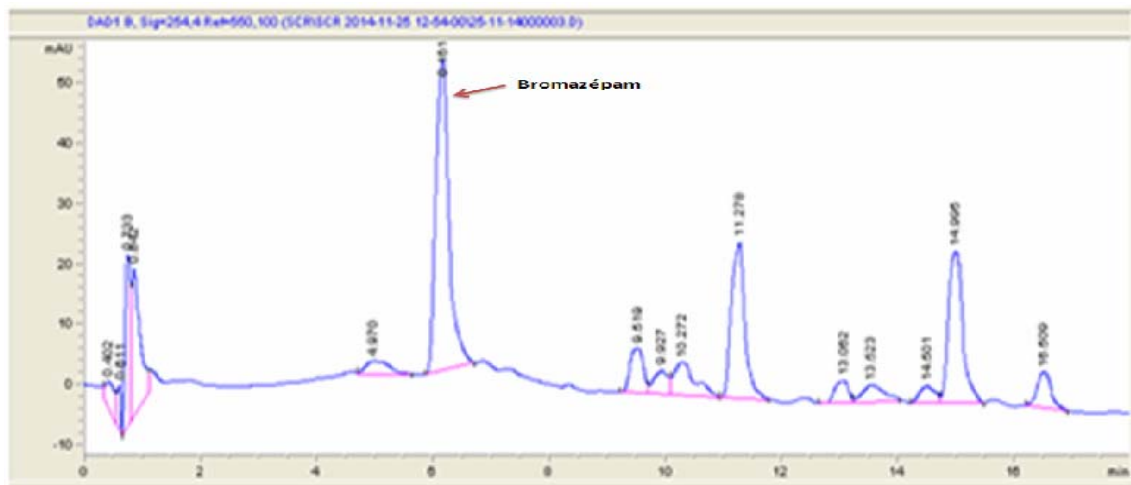


Figure 1. Chromatogramme obtenu par HPLC- DAD à 254 nm.
Exemple du bromazépam (temps de rétention = 6,161 min)

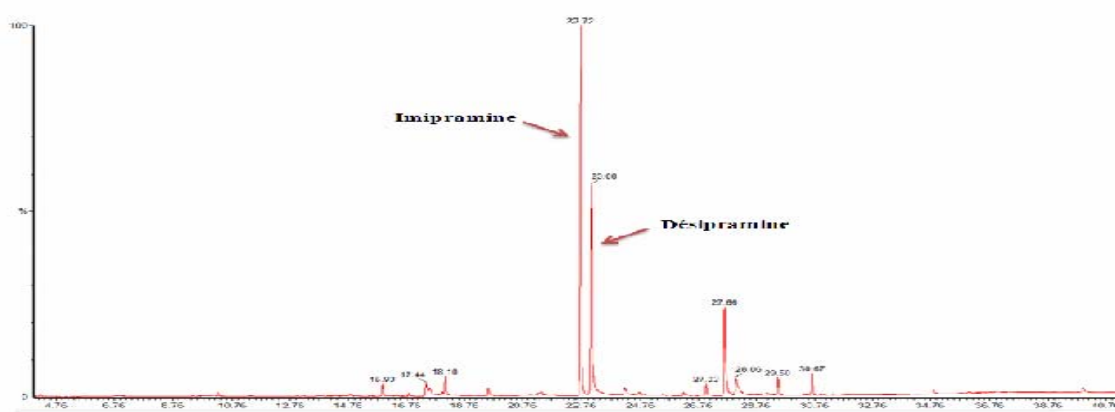


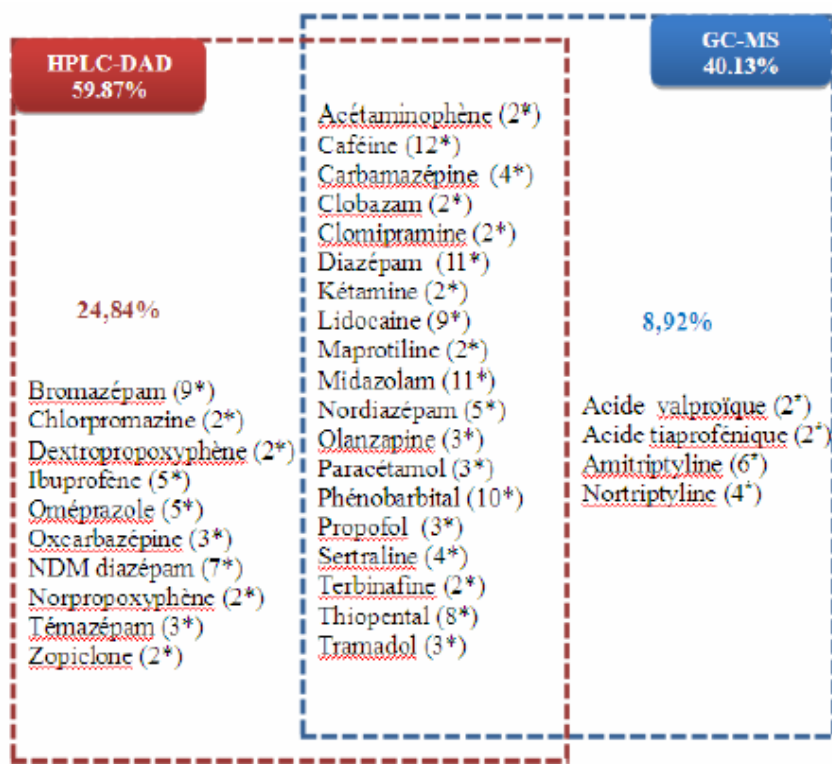
Figure 2. Chromatogramme obtenu par couplage GC-MS.
Exemple de deux molécules: l'imipramine (temps de rétention = 22,72 min)
et la désipramine (temps de rétention = 23,08 min)

Par ailleurs, la méthode d'extraction utilisée a permis:

- L'identification de 157 molécules par les deux méthodes (HPLC-DAD et/ou GC-MS) dont 59,87 % détectés en HPLC-DAD et 40,13 % en GC-MS.
 - L'identification de 4 molécules par GC-MS non identifiées par HPLC-DAD et le cas inverse pour 10 autres molécules. La Figure 3 illustre les résultats obtenus.
- Les 19 molécules restantes ont par contre été détectées simultanément par les deux méthodes chromatographiques.

L'analyse des résultats obtenus par HPLC-DAD, des différentes familles, a montré que les benzodiazépines (48,89 %) sont les médicaments les plus identifiés par HPLC-DAD

suivis par les antiépileptiques (12,22 %), les anesthésiques (11,11 %), les antidépresseurs (5,55 %) alors que le reste des familles médicamenteuses occupent un pourcentage de 22,23 % (Figure 4).



(*) - Nombre d'occurrences

Figure 3. Comparaison des résultats d'analyses toxicologiques obtenus par les méthodes HPLC-DAD et GC-MS moyennant une seule méthode d'extraction

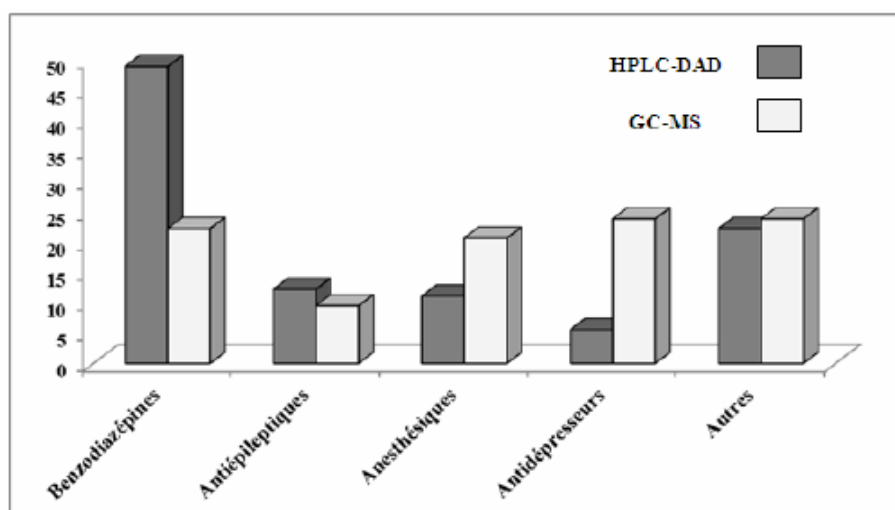


Figure 4. Répartition des familles de médicaments responsables des intoxications (Cas HPLC-DAD et GC-MS)

La répartition des intoxications médicamenteuses, identifiés par GC-MS en termes de familles médicamenteuses a montré que les antidépresseurs représentent un pourcentage de 23,81 % suivis par les benzodiazépines (22,22 %), les anesthésiques (20,64 %), les antiépileptiques (9,52 %) et les autres classes (23,81 %) (Figure 4).

Les rendements d'extraction ont été évalués pour 26 molécules. Les rendements d'extraction obtenus pour chaque molécule sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Rendements d'extraction des classes médicamenteuses testées

Classe médicamenteuse	Molécule	Rendement d'extraction [%]	
		HPLC-DAD	GC-MS
Benzodiazépines	Bromazépam	99,22	
	Clobazam	58,76	51,78
	Clonazépam	86,29	79,81
	Diazépam	52,63	94,32
	Estazolam	57,97	50,60
	Midazoalm	89,76	49,96
	NDM Diazépam	53,58	–
	Nordiazépam	90,01	89,74
	Oxazépam	69,73	54,36
	Témazépam	61,67	51,08
Antidépresseurs	Amitriptyline	–	35,09
	Amoxapine	70,89	85,35
	Colmipramine	65,04	71,81
	Désipramine	92,36	63,67
	Imipramine	63,12	61,99
	Maprotiline	62,83	66,21
	Miansérine	71,02	68,26
	Nortriptyline	–	22,35
	Sertraline	59,14	59,85
	Tianeptine	65,84	60,11
Antiépileptiques	Carbamazépine	34,41	49,99
	Acide valproïque	–	57,62
	Oxcarbazépine	61,67	66,81
	Phénytoïne	60,08	–
	Ethosuximide	69,88	70,28
	Phénobarbital	78,51	66,12

Le rendement d'extraction des benzodiazépines a été évalué pour: bromazépam, clonazépam, clobazam, diazépam, estazolam, midazolam, NDM diazépam, nordiazépam, oxazépam et témazépam. Les rendements d'extraction calculés pour HPLC-DAD sont supérieurs à ceux calculés pour GC-MS à l'exception du diazépam.

Les rendements d'extraction obtenus pour les antidépresseurs sont comparables et sont compris entre 59,14 % et 92,36 % pour HPLC-DAD et entre 59,85 % et 91,99 % pour GC-MS à l'exception de la nortriptyline et l'amitriptyline qui présentent des rendements relativement faibles (22,35 et 35,09 %). Globalement les antiépileptiques testées ont donné des rendements d'extraction comparables et sont compris entre 61,67 % et 78,51 % pour HPLC-DAD et entre 57,62 % et 70,28 % pour la GC-MS sauf exception

du carbamazépine. La phénytoïne n'a pas été détectée par GC-MS à une concentration de 5 mg·L⁻¹.

DISCUSSION

Les méthodes chromatographiques prennent une part de plus en plus importante dans le screening toxicologique. Cette démarche de screening s'accompagne d'une étape d'extraction afin d'isoler les substances toxiques des autres constituants présents dans les matrices biologiques. Notre méthode d'extraction, est une extraction liquide-liquide, le choix de ce type d'extraction est fonction de plusieurs intérêts à savoir [8].

Le coût de l'extraction liquide-liquide, ce type d'extraction n'exige pas de grandes dépenses d'investissement en matériels et en réactifs; de plus cette extraction permis d'extraire une gamme de molécules appartenant à différentes classes chimiques, contrairement à l'extraction en phase solide qui est ciblée pour une molécule donnée, ce type d'extraction permis également la concentration des échantillons car l'utilisation d'un solvant organique volatil permet la concentration du soluté par évaporation.

Pour évaluer l'efficacité de notre méthode d'extraction, des rendements d'extraction ont été évalués pour trois familles médicamenteuses (représentées par 26 molécules), on a choisi ces familles de médicaments car elles sont les plus incriminées dans les intoxications au Maroc [9]. Dans nos conditions d'expérimentation, les rendements d'extraction varient entre 34,41 % (carbamazépine) et 99,22 % (pour le bromazépam). La plupart des molécules ont des rendements d'extraction supérieurs à 50 % (Tableau 6). Seul la carbamazépine (34,41 %), l'amitriptyline (35,09 %) et la nortriptyline (22,35 %) ont des rendements d'extraction inférieurs à 50. Le faible rendement d'extraction peut être expliqué par les pertes produites lors de l'étape de redissolution [10]. La phénytoïne n'a pas été extraite par GC-MS et cela peut être expliqué par sa forte polarité et sa faible volatilité ce qui rend l'analyse par GC difficile sans dérivation [11].

Notre étude porte sur l'analyse de 104 cas d'intoxications médicamenteuses. La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes (HPLC-DAD et GC-MS) a montré une discordance dans 52 cas. Ces discordances trouvent leur explication dans les principes chromatographiques différents des méthodes utilisées. La méthode d'extraction utilisée et le couplage GC-MS ont permis d'identifier 4 médicaments (acide valproïque, l'amitriptyline, la nortriptyline, l'acide tiaprofénique) non identifiés par HPLC-DAD.

Pour qu'une molécule soit analysable par HPLC, elle doit être soluble dans la phase mobile et capable d'absorber la lumière UV [4]. Or, l'acide valproïque ne remplit pas cette dernière condition.

Les détections de l'amitriptyline et de la nortriptyline par HPLC-DAD ont révélé des résultats négatifs. Comme la GC, l'HPLC, ne peut pas séparer tous les antidépresseurs tricycliques. En effet, l'HPLC est moins sensible et surtout moins spécifique pour cette classe médicamenteuse [12].

L'acide tiaprofénique ne figure pas dans notre bibliothèque spectrale HPLC-DAD.

En général, certaines molécules ont une structure inadaptée à la détection par GC-MS en raison de leur forte polarité, thermolabilité et/ou leur haut poids moléculaire (généralement supérieur à 500 daltons) [4].

Dans notre étude les molécules suivantes: bromazépam, NDM diazépam, témazépam, dextropropoxyphène, norpropoxyphène, chlorpromazine, oxcarbazepine, ibuprofène, oméprazole et zopiclone n'ont pas été détectées par la méthode GC-MS. Plusieurs précisions peuvent être apportées pour expliquer cette absence de détection.

Les benzodiazépines peuvent être analysées par GC-MS, toutefois il reste difficile d'identifier certaines benzodiazépines très polaires telle que le bromazépam, ou les thermolabiles telles que le témazépam et le NDM diazépam [13, 14]. Il est à noter que le pourcentage des benzodiazépines identifiées par HPLC-DAD est deux fois plus grand que celui fournis par GC-MS. Ainsi, l'HPLC-DAD constitue la méthode de choix pour l'analyse des médicaments non volatils ou qui ne peuvent pas être rendus volatils par dérivation tel est le cas de certaines benzodiazépines [15].

Les antalgiques opiacés, dextropropoxyphène et son principale métabolite le norpropoxyphène se sont révélés négatifs par GC-MS. En effet, le dextropropoxyphène se décompose thermiquement au cours de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse [16].

Les phénothiazines dont la chlorpromazine sont analysées par différentes méthodes chromatographiques telles que la GC-MS, l'HPLC et la LC-MS. Le résultat négatif obtenu est conforme aux résultats retrouvés dans la littérature rapportant que l'analyse des phénothiazines par GC est relativement simple mais moins sensible [17].

L'ibuprofène, zopiclone, l'oméprazole et l'oxcarbazepine sont thermolabiles. En effet l'ibuprofène subit des dégradations importantes sous l'effet de la température [4] et que l'HPLC est plus appropriée pour l'analyse de zopiclone que la GC [18].

La plus part des études rapportent un screening par HPLC-DAD et GC-MS en utilisant une méthode d'extraction différente pour chaque méthode. Saint-Marcoux et al. ont essayé d'évaluer la performance de la LC-MS par comparaison des résultats de screening large obtenus par cette technique et par l'HPLC-DAD et la GC-MS [19]. Ils ont utilisé une extraction en phase solide commune pour les trois méthodes. La confrontation de nos résultats d'identification par HPLC-DAD et GC-MS avec ceux du Saint-Marcoux et al. montre une concordance de 71 %.

Nous avons développé une méthode d'extraction pour l'identification des médicaments appartenant à différentes familles médicamenteuses, ce qui distingue notre méthode d'extraction des autres méthodes est le fait qu'elle est appliquée simultanément à deux types de méthodes chromatographiques. Par apport aux travaux publiés et qui utilisent des extractions propres à chaque méthode chromatographique, notre méthode d'extraction se caractérise par une grande rapidité et par un nombre restreint de manipulations, cette méthode nous a permis non seulement de réduire le temps d'analyse et le temps de transmission des résultats mais aussi de travailler avec un faible volume d'échantillon, et avec un millilitre de plasma on peut réaliser l'extraction et avoir d'excellents résultats avec deux méthodes chromatographiques.

Aucune des deux méthodes ne peut être considérée comme universelle. L'HPLC présente de nombreux avantages dont la simplicité de mise en œuvre, puisque l'analyse par cette méthode ne nécessite pas une étape de dérivation chimique de l'échantillon, elle est généralement de plus courte durée que GC-MS [20]. Les détecteurs U.V. (classique ou à barrette de diodes), utilisés en HPLC fournissent des réponses plus stables au cours du temps qu'un spectromètre de masse [21]. L'inconvénient majeur de l'HPLC-DAD réside dans le chevauchement des pics et l'appauvrissement de la résolution [5].

La GC-MS présente une grande sensibilité pour la détection des molécules volatiles mais l'utilisation de cette méthode impose de dériver les analytes dont la nature est plutôt polaire ou peu volatile [21].

L'HPLC-DAD et la GC-MS représentent deux méthodologies de recherche différentes qui sont à la fois additives et complémentaires, la combinaison de ces deux méthodes élargit le panneau des molécules identifiées [10].

CONCLUSIONS

L'analyse des résultats montre que le protocole d'extraction utilisé a permis l'obtention de bons rendements d'extraction. Notre extraction semble très utile pour la réalisation du screening toxicologique d'urgence. De plus, l'utilisation d'une seule méthode d'extraction nous a permis de minimiser les dépenses en matériels et en réactifs, d'utiliser un volume d'échantillon assez réduit. Elle nous a permis également de diminuer la charge de travail et le délai de transmission des résultats aux patients ce qui est compatible avec le principe de l'urgence clinique. L'éventail des molécules identifiables par une seule méthode n'est jamais complet, l'utilisation conjointe de l'HPLC-DAD et la GC-MS nous a permis d'élargir considérablement le nombre de molécules médicamenteuses identifiées, d'augmenter la fiabilité et la validité des résultats obtenus.

REFERENCES

1. Mégarbane, B., Donetti, L., Blanc, T., Chéron, G., Jacobs, F.: Intoxications Graves par Médicaments et Substances Illicites en Réanimation, *Réanimation*, **2006**, 15 (5), 332-342;
2. Compagnon, P., Danel, V., Goullé, J.P.: Place des analyses toxicologiques, *Réanimation*, **2006**, 15 (5), 370-373;
3. Vincent, F., Vincent, D.: Quelle Collaboration Clinico-Biologique pour la Prise en Charge des Intoxications Aiguës?, *Annales de Toxicologie Analytique*, **2000**, 12 (4), 267-273;
4. Humbert, L., Lhermitte, M.: Molécules Indétectables par Chromatographie en Phase Gazeuse, *Annales de Toxicologie Analytique*, **2005**, 17 (1), 57-63;
5. Mathieu, O., Gutknecht, S., Barnay, F., Berthezene, J.M., Bongrand, A.F., Mathffiu-Daude, J.C.: Screenings Toxicologiques par LC-MS Simple-Quad versus HPLC-DAD: bilan après un an de pratique en urgence hospitalière, *Annales de Toxicologie Analytique*, **2005**, 17 (1), 21-26;
6. Elmrabeh, S., Ibriz, M., Zalah, F., Bentafrat, M., Birich, B., Khaya, M., Idrissi, M., Badrane, N., Soulaymani, A., Soulaymani Bencheikh, R.: Place du Screening Toxicologique par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un Détecteur à Barrette de Diodes (HPLC-DAD) dans le Diagnostic des Intoxications Médicamenteuses, *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **2014**, 8 (1), 357-363;
7. Sturm, S.: A General Unknown Screening for Drugs and Toxic Compounds in Human Serum - Dissertation, *Natural sciences*, University of Basel, Switzerland, **2005** - Tiré de http://edoc.unibas.ch/295/1/DissB_7295.pdf;
8. Abe, E., Delyle, S.G., Alvarez, G.C.: Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés, *Annales de Toxicologie Analytique*, **2010**, 22 (2), 51-59;
9. Badrane, N.: Rapports Spécifiques de Toxicovigilance - Intoxications par les Médicaments, *Toxicologie Maroc*, **2011**, 20 (1), 9-14;
10. Nicolas, O., Robert, D., Kelly, M.T., Bressolle, F.: Traitements de l'échantillon Biologique avant l'analyse Chromatographique. Applications à la Pharmacocinétique et à la Toxicologie, *Annales de Toxicologie Analytique*, **2004**, 16 (3), 14-22;

11. Song, S.M., Marriott, P., Kotsos, A., Drummer, O.H., Wynne, P.: Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography With Time-Of-Flight Mass Spectrometry (GC×GC-TOFMS) for Drug Screening and Confirmation, *Forensic Science International*, **2004**, 143 (2-3), 87-101;
12. Uttam, G.: Chromatographic techniques for the analysis of the Antidepressants in: *Advances in Chromatographic Techniques for Therapeutic Drug Monitoring* (Editor: Amitava, D.), CRC Press, Boca Raton, **2009**, 191-206;
13. Schonberg, V.L.: Development of a Screening System for the Determination of Compounds in Urine by Automated On-line Extraction HPLC-DAD for Toxicological Analysis – Dissertation, *Natural Sciences I / Life Sciences*, Martin-Luther University, Halle-Wittenberg, **2008** - Tiré de <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/08/08H303/prom.pdf>;
14. Kostakis, C., Harpas, P., Stockham, P.: Forensic Toxicology in: *Liquid Chromatography–Applications* (Editors: Fanali, S. et al.), Elseviers, Amsterdam, **2013**, 249-294;
15. Ruiz, P., Strain, E.C., Langrod, J.: *The Substance Abuse Handbook*, 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2007**, 191-199;
16. Harvey, D.J.: The use of Mass Spectrometry in Pharmacokinetic and Drug-metabolism Studies in: *Mass Spectrometry, Volume 7* (Editor: Johnstone, R.A.W.), Royal Society of Chemistry, London, **1984**, 293-299;
17. Ichii, A., Katsumata, Y.: Phenothiazines in: *Drugs and Poisons in Humans - A Handbook of Practical Analysis* (Editors: Suzuki, O., Watanabe, K.), Springer Science & Business Media, New York, **2006**, 255-270;
18. Kraemer, T., Maurer, H.H.: Sedatives and hypnotics in: *Handbook of Analytical Separations, Volume 6, Forensic Science* (Editors: Bogusz, M.J., Smith, R.), Elsevier, Amsterdam, **2008**, 243-286;
19. Saint-Marcoux, F., Lachâtre, G., Marquet, P.: Evaluation of an Improved General Unknown Screening Procedure Using Liquid-Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry by Comparison with Gas Chromatography and High-Performance Liquid-Chromatography – Diode Array Detection, *American Society for Mass Spectrometry*, **2003**, 14, 14–22;
20. Fraser, A.D.: Psychotropic agents: The Benzodiazepines in: *The Clinical Toxicology Laboratory: Contemporary Practice of Poisoning Evaluation* (Editors: Shaw, L.M., Kwong, T.C.), American Association for Clinical Chemistry, Washington, **2001**, 210-222;
21. Bouchonnet, S.: *La Spectrométrie de Masse en couplage avec la Chromatographie en Phase Gazeuse*, Éditions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, **2009**, 5-8.