

N° d'ORDRE :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
"HOUARI BOUMEDIENE"
FACULTE DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de **MAGISTER**
EN : **CHIMIE**

Spécialité : **METHODES INSTRUMENTALES DE CARACTERISATION**

DENANE Mahfoud

**ANALYSE DU PHENOBARBITAL DANS UNE MATRICE BIOLOGIQUE
(SANG) PAR CHROMATOGRPHIE LIQUIDE (HPLC) ET
CHROMATOGRAPHIE GAZ COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE
MASSE (GC/MS) ET VALIDATION PAR HPLC.**

Soutenue le 31 Décembre 2008, devant le Jury composé de:

| | | |
|----------------------------|---|--------------------|
| Mr. TOUABET Abdelkrim | (Professeur FC - USTHB) | Président |
| Mr. BOUDAH Soulimane | (Professeur FC - USTHB) | Directeur de thèse |
| Mr. GUERMOUCHE M.Hassan | (Professeur FC - USTHB) | Examineur |
| Mr. SEBIH Said | (Professeur FC - USTHB) | Examineur |
| Mr. AKRETCHÉ Djamel Eddine | (Professeur FC - USTHB) | Examineur |
| Mr. FERRAGH Ali | (S/Directeur de la Police Scientifique) | Invité |

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur **A. FERRAGH**, Sous Directeur de la Police Scientifique et Technique, ainsi qu'à Monsieur **M. ZEKRI**, Chef de Service Central du Laboratoire de Police Scientifique et Technique pour m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein du Laboratoire de Police Scientifique d'Alger.

Je remercie vivement Monsieur **BENALI BENZAGHOU**, Recteur de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), pour avoir rendu possible la coopération entre l'USTHB et le LCPS.

Je remercie plus particulièrement Monsieur **S BOUDAH**, Professeur à l'USTHB et responsable de ma thèse, pour m'avoir conseillé et guidé tout le long de mon stage.

Je remercie très sincèrement Messieurs **M.H. GUERMOUCHE** et **S. SEBIH** Professeurs à l'USTHB, pour leur appui et leurs conseils avisés.

Je ne saurais oublier de remercier Mrs **D.E. AKRETCHÉ** et **A. TOUABET**, Professeurs à l'USTHB.

Je voudrais remercier enfin, les personnels des Départements de toxicologie légale et des Drogues du Laboratoire Central de Police Scientifique d'Alger, pour l'aide et la gentillesse dont ils ont fait preuve tout au long de mon stage, et particulièrement :

- **Mr H.BENAISSA.**
- **Mme Z. DJEBBAR**
- **Mr D. HADOUUCHE**
- **Mme. A. IZITI**
- **Melle. N. BELAMRI**

DEDICACES

A la mémoire de ma mère ;

A mon père ;

A mes frères et sœurs en particulier Mourad ;

A ma femme et mes enfants;

A mon oncle Hadj Mohand.

ABBREVIATIONS

BB : Barbiturique
CPG: Chromatographie en phase gazeuse
CLHP: Chromatographie en phase liquide à haute performance
GC/MS : Couplage Chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse
LC/MS : Couplage Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse
Ccm : Chromatographie sur couche mince
FID : Détecteur à ionisation de flamme
NPD : Détecteur azote-phosphore
PCI : Ionisation chimique positive
NCI : Ionisation chimique négative
EI : Impact électronique
FT/IR : Infrarouge à transformée de fourrier
TGS : Sulfate de triglycine (Détecteur Spectrum One)
MCT : Mercure-cadmium-tellurium (Détecteur Auto-image)
ATR : Attenuated total reflectance
UV/Vis : Ultra violet / Visible
DBD : Détecteur à barette de diodes(Diode array detector)
ACN : Acetonitrile
SIM : Selected ion monitoring
SIFI : Mode mixte SIM et full scan
PM: Poids moléculaire
ISO : International Standardisation Organisation
ICH : International Conference on Harmony
BPL : Bonnes pratiques de laboratoire
BPF : Bonnes pratiques de fabrication
C° : Degré Celsius
CV : Coefficient de variation
Coef : Coefficient
d.i : Diamètre interne
LDD : Limite de détection
LDQ : Limite de quantification
L : Litre
mg : Milligramme
µg : Microgramme
ng : Nanogramme
ml : Millilitre
µl : Micro litre
mm : Millimètre
M : Mole
min : Minute
m.A.U : Milli absorbance unité
nm : Manomètre
R² : Coefficient de corrélation
UV : Ultra violet
V : Volume

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| <u>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES BARBITURIQUES</u> | |
| STRUCTURE CHIMIQUE | 3 |
| CLASSIFICATION | |
| HISTORIQUE | 5 |
| ETUDE DU PHENOBARBITAL | 6 |
| ASPECT ET PRESENTATION | |
| PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES | |
| COMPOSITION | |
| INDICATIONS | |
| PHARMACODYNAMIE ET PHARMACOCINETIQUE | |
| EFFETS | |
| <u>CHAPITRE II : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u> | 9 |
| <u>CHAPITRE III : PARTIE PRATIQUE</u> | |
| ANALYSE PAR CLHP | 11 |
| MATERIEL ET METHODES | |
| APPAREILLAGE ET CONDITIONS OPERATOIRES | |
| OPTIMISATION DE LA SEPARATION | 12 |
| - PHASE MOBILE : ACN/METOH/TAMPON ACETATE D'AMMONIUM | |
| - PHASE MOBILE : ACN/TAMPON PHOSPHATE PH 3.02 | |
| OPTIMISATION DE L'EXTRACTION | 23 |

INTRODUCTION

Au milieu des années 1970 les Barbituriques (BB) ont été très largement prescrits dans les pays développés en tant qu'hypnotiques ou tranquillisants. Le phénobarbital occupait un rang respectable parmi les médicaments les plus vendus [1]. Leur durée d'action différente permet leur classification en barbituriques à effets ultra-courts, brefs, intermédiaires ou prolongés.

Durant les deux dernières décennies les Barbituriques ont connu un déclin dû à leur remplacement en thérapeutique par les benzodiazépines beaucoup plus sûres. Ils sont néanmoins encore utilisés comme anesthésiques à durée d'action courte et comme anticonvulsivants dans le traitement de l'épilepsie [2].

Cette classe médicamenteuse ne joue plus désormais qu'un rôle marginal en toxicologie médico-légale.

En toxicologie médico-légale, l'origine toxique d'un décès est généralement appréciée en fonction de la concentration du xénobiotique, rapprochée des données de la littérature et des valeurs de référence des concentrations thérapeutiques, toxiques et létales.

L'objectif de notre travail est de rechercher chez un sujet ayant absorbé du phénobarbital, la concentration de ce dernier dans le sang. A cet effet, nous avons utilisé des techniques analytiques assez élaborées telles que la CLHP couplée avec un DBD, et la GC/MS.

La méthode CLHP a été inspirée de celle utilisée au Laboratoire de Police Scientifique d'Alger pour la recherche générale de toxiques organiques. Néanmoins, celle-ci présente un problème majeur du fait de l'interférence des composés endogènes du sang avec l'analyte.

Des modifications ont été effectuées afin d'y remédier, et obtenir une bonne séparation entre le phénobarbital et ces composés.

Le présent manuscrit comprend en plus de l'introduction générale trois chapitres :

Le chapitre I est consacré à des rappels théoriques sur les barbituriques en général, et le phénobarbital en particulier.

Le chapitre II contient une revue bibliographique concernant les travaux antérieurs en matière d'analyse du phénobarbital dans le sang.

Le chapitre III traite sur la partie pratique. Le matériel utilisé, la méthodologie appliquée, ainsi que les résultats et leurs interprétations sont présentés et discutés

Et enfin, une conclusion générale dans laquelle nous rappelons le but de notre travail et nous rappelons les résultats obtenus par les différentes techniques analytiques sus-citées.

CHAPITRE I

**GENERALITES SUR LES BARBITURIQUES
ETUDE DU GARDENAL**

I/ GENERALITES SUR LES BARBITURIQUES

Désignation collective pour d'anciens sédatifs, hypnotiques et anesthésiques généraux et basés sur les dérivés de l'acide barbiturique. À l'exception du Phenobarbitone (Luminal®) les barbituriques ne sont plus employés dans le traitement de l'humain, mais toujours pour le massacre de l'animal par surdosage.

Les barbituriques sont de puissants calmants qui ralentissent le système nerveux central, classifiés comme sédatifs hypnotiques.

I-1/ STRUCTURE CHIMIQUE:

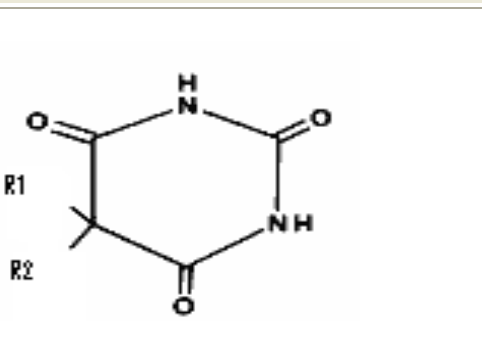
Les BB sont des composés anciens, le barbital chef de file a été introduit en pratique clinique en 1903. Sur le plan clinique, il s'agit de dérivés de l'acide barbiturique, qui est pour sa part dépourvu d'action sur le système nerveux central. L'activité sédatrice est conférée par une double substitution, par des groupements alkyl ou aryl, en C5 du noyau barbiturique (Voir tableau 1) (thiopental, thiamylal), d'action ultrarapide.

Le tableau 1 représente les structures chimiques de quelques barbituriques qui nous paraissent les plus importants.

Tableau 1 :
chimiques
barbituriques

- 3 -

I-2/

|  | R ₁ | R ₂ |
|---|-----------------------------------|---|
| L'Acide barbiturique | H- | H- |
| Barbital | CH ₃ CH ₂ - | CH ₃ CH ₂ - |
| Phénobarbital | CH ₃ CH ₂ - | Ph- |
| Pentobarbital | CH ₃ CH ₂ - | CH ₃ (CH ₂) ₄ - |

Structures
des

CLASSIFICATION DES BARBITURIQUES

En fonction de leur durée d'action, on différencie :

- Les barbituriques fonctionnant le plus longtemps : comme le Barbital (Veronal®, Medinal®), dont la concentration par jour chute seulement de 15 à 20 pour cent, avec une dose moyenne de 0.25 à 0.50 gramme

- Les barbituriques fonctionnant longtemps: comme le Phénobarbital (Luminal®, Phenaemal®) et le Méthylphenobarbital (Prominal®). Aujourd'hui, le phénobarbital est utilisé dans le traitement de l'épilepsie et surtout en anesthésiologie. La dose moyenne est comprise entre 0.1 à 0.2 gramme. Dans l'Urine la durée de preuve est jusqu'à 3 semaines.

- Les barbituriques fonctionnant de moyen à longtemps: Utilisés pour le sommeil continu. L'Heptabarbital, le Cyclobarbital, l'Aprobarbital et le Pentobarbital (Nembutal®, Medinox®), la dose moyenne varie entre 0.1 et 0.2 grammes

- Les barbituriques fonctionnant brièvement: Moyens endormis en chute, qui sont de nouveau séparés dans peu d'heures, comme l'Hexobarbital (Evipan®), la dose moyenne de 0.25 à 0.5 gramme. Dans l'Urine le temps de preuve est approximativement 24 heures.

I-3/ HISTORIQUE :

L'acide, barbiturique, le squelette chimique commun à tous les barbituriques fut synthétisé en 1864 par le chimiste allemand Adolf Von Baeyer (1835-1917), prix Nobel de chimie en 1905. M. Conrad et M. Guthzeit en isolèrent en 1882 l'un des sels, le barbital. Et ce n'est qu'en 1903 que deux médecins allemands, Joseph Von Mehring et Emil Fischer, découvrirent, à la suite d'essais sur le chien, les propriétés hypnotiques de ce dernier. Cette découverte entraîna la commercialisation du produit sous le nom de Véronal (en référence à la ville de Vérone en Italie), par les laboratoires de Friedrich Baeyer (1825-1870).

Ce médicament constitua le chef de file d'une importante famille de molécules pharmaceutiques, ayant en commun le noyau chimique malonylurée. Outre le phénobarbital commercialisé en France depuis 1912 sous la désignation de Gardéнал, et indiqué aujourd'hui dans la prévention des crises d'épilepsies, une vingtaine de dérivés du Barbital furent commercialisés entre 1903 et 1911 : allobarbital (Dial), butobarbital (Sonéryl), etc. Le thiopental (Nesdonal, penthotal), un barbiturique d'action ultra rapide, fut utilisé en narcose à partir des années 1930 aux années 1950. [3]

Les barbituriques étaient prescrits par les médecins pour le traitement de l'insomnie, l'anxiété, le stress et de l'épilepsie. Certains barbituriques étaient utilisés comme anesthésiques lors d'interventions chirurgicales de courte durée. Ils ont perdu de leur popularité lors de l'avènement des benzodiazépines, hypnotiques - anxiolytiques ayant une plus grande marge de sécurité.

Les barbituriques sont souvent utilisés pour leurs effets euphoriques. Certaines personnes en prennent pour remplacer ou accompagner l'alcool. Les toxicomanes ont parfois recours à ces substances lorsqu'ils ne peuvent pas obtenir leur drogue habituelle ou pour combattre les effets de fortes doses de stimulants tels que les amphétamines ou la cocaïne.

II/ ETUDE DU PHENOBARBITAL :

II-1/ ASPECT ET PRESENTATION :

Cristaux incolores ou poudre blanche cristalline. Est disponible en pharmacie sous forme de comprimés blancs.

Comprimé à 10mg (blanc) ;

Comprimé à 50 mg (blanc)

Comprimé à 100 mg (blanc)

II-2/ SYNONYMES :

Phénobarbital ;phenylethylmolonylurée ;gardénal ;luminal ;acide5-ethyl-5-phenyl barbiturique.

II-3/ PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES :

C'est une poudre blanche

Formule: $C_{12}H_{12}N_2O_3$

Masse molaire:232,2g.

Point de fusion:176c°.

Solubilité : Soluble dans l'éthanol, le méthanol, le chloroforme et l'éther diéthylique.

II-4/ COMPOSITION:

Phénobarbital (DCI)

Excipients : amidons de blé et de pomme de terre, dextrine, stéarate de magnésium, carbonate de calcium.

II-5/ INDICATIONS :

Adulte et enfant :

Soit en monothérapie, soit en association à un autre traitement antiépileptique :

- Traitement des épilepsies généralisées : crises cloniques, toniques, tonicocloniques.
- Traitement des épilepsies partielles : crises partielles avec ou sans généralisation secondaire.

II-6/ PHARMACODYNAMIE :

Antiépileptique, le Gardéнал est constitué par du phénobarbital ; le phénobarbital est un barbiturique. Il présente des propriétés anticonvulsivantes, sédatives et hypnotiques.

II-7/ PHARMACOCINETIQUE :

Environ 80% du phénobarbital administré par voie orale sont absorbés par le tractus gastro-intestinal ; le pic plasmatique est atteint en 8h environ chez l'adulte et en 4h chez l'enfant.

Le phénobarbital est partiellement lié aux protéines plasmatiques (50% chez l'adulte et 60% chez l'enfant).

La demi-vie plasmatique est de 50 à 140h chez l'adulte et de 40 à 70h chez l'enfant.

Elle augmente en cas d'insuffisance hépatique ou rénale et chez le sujet âgé.

Le phénobarbital diffuse dans tout l'organisme, notamment dans le cerveau, en raison de sa liposolubilité; il traverse la barrière placentaire et passe dans le lait maternel.

Il est à la fois métabolisé dans le foie(en un dérivé hydroxylé inactif, qui est ensuite glucoro ou sulfoconjugué) et excrété par le rein sous forme inchangée (d'autant plus que les urines sont alcalines).

II-8/ EFFETS DU GARDENAL :

II-8-1/ LES EFFETS A COURT TERME :

L'effet d'une dose unique apparaît rapidement et s'estompe au bout de quelques heures. Une faible dose (50mg.) peut soulager l'anxiété et la tension. Une dose plus forte (100 à 200mg.), dans une ambiance calme, conduit habituellement au sommeil. Une forte dose produit typiquement une respiration ralentie, superficielle et irrégulière et peut aboutir à la mort par arrêt respiratoire. Il peut être extrêmement dangereux de mélanger des barbituriques avec d'autres déprimeurs du système nerveux central comme l'alcool, les tranquillisants ou les opiacés.

II-8-2/ LES EFFETS A LONG TERME :

Les effets à long terme des barbituriques s'apparentent à l'état de l'alcoolique chronique. Les symptômes comprennent :

- L'affaiblissement de la mémoire et de la capacité de jugement ;
- la dépression ;
- les sautes d'humeur ;
- l'épuisement chronique et l'intensification de troubles affectifs déjà présents, le tout pouvant aboutir à la paranoïa et aux idées suicidaires.

II-9/ CONCENTRATIONS THERAPEUTIQUES, TOXIQUES ET LETALES

Dosage toxique : 500 mg chez l'adulte

20 mg/Kg chez l'enfant

Concentration thérapeutique :

15-40 mg/l

Concentration toxique >50mg/l

Concentration létale : 120 mg/l

CHAPITRE II

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La mesure de concentration du Phénobarbital dans le plasma est très utilisée dans les milieux cliniques [4].

Il y'a plusieurs méthodes CLHP reportées pour la détermination du Phénobarbital dans le plasma [10-15]. Meyler et Al [5]

Une méthode simple utilisant la CLHP à phase inverse a été développée pour l'analyse du phénobarbital dans le sérum humain sur une colonne NOVA PAK C18 et élué avec une phase mobile représentée par un tampon phosphate ajusté à PH 7. Le détecteur UV à 210 nm est employé pour la détection. La limite de quantification est de 0,2 µg/ml. La méthode a été évaluée en termes de linéarité, exactitude, précision, sélectivité, sensibilité et spécificité à partir du sérum humain.[6].

Il a été mis au point une méthode très utile pour déterminer la concentration du PB dans le plasma d'un nouveau né (le PB est transmis par le lait, de la mère au nourrisson)[7-9].

Le Phénobarbital est largement utilisé comme une drogue cliniquement anticonvulsive bien que l'influence de la lactation sur les concentrations du Phénobarbital a été examinée chez des patients épileptiques [12].

Il a été examiné récemment l'influence de la grossesse et la lactation sur la concentration du PB dans le sang chez les rats [13-14].

Il est connu que les drogues anticonvulsives passent de la mère à l'enfant à travers le placenta ou à travers le lait maternel [15]. Il est nécessaire de mesurer les concentrations du PB dans plusieurs foetus pour examiner l'influence de cette drogue anticonvulsive administrée chez la femelle rat portant un foetus [16].

Le développement de méthodes d'identification et de quantification de barbituriques par HPLC [17-23] et par GC [20-22, 24-28] a pris de l'ampleur dans les milieux chimiques et biomédicaux.

Les méthodes utilisant l'extraction en phase solide (SPE) et l'extraction liquide liquide (LLE) pour l'analyse des barbituriques dans le sérum, le plasma et l'urine ont été reportées (publiés) par la littérature. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse utilisant l'impact électronique ou l'ionisation chimique a été largement utilisée dans l'analyse de drogues donnant lieu à des abus tels que les barbituriques [20-24, 26-28]. Plus récemment la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) a commencé à supplanter la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) parce qu'elle ne nécessite pas de dérivation des échantillons et possède par ailleurs une bonne sensibilité, répétabilité et spécificité pour une large gamme d'analytes [29]. Deux études analysant les barbituriques par LC/MS ont été publiées, l'une utilisant l'ionisation par thermospray [19] et l'autre utilisant l'impact électronique et l'ionisation chimique (EIC) [18]. Cependant l'ionisation avec thermospray possède des limitations car elle requiert un contrôle critique du vaporisateur de température durant l'analyse, de même il est possible d'avoir une dégradation thermique des molécules labiles. L'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI) ont montré des réponses non linéaires pour des analyses quantitatives [31].

La technologie électrospray est actuellement largement utilisée pour l'analyse des drogues dans les matrices biologiques.

Il a été déterminé qu'à un PH compris entre 9 et 10, les barbituriques sont chargés négativement sur l'oxygène se trouvant à la 4^{ème} position des 6 centres [31] ce qui les rend mieux détectables à l'aide d'ionisation négative. Dans cette étude, la SPE et la LC-ESI MS/MS utilisant le barbital comme étalon interne, avec addition de post colonne pour ajuster le PH, a été utilisé pour quantifier plusieurs barbituriques communément utilisés dans le sérum humain[30].

CHAPITRE III/PARTIE PRATIQUE

- ANALYSE PAR CLHP**
- ANALYSE PAR GCMS**
- VALIDATION DE LA CLHP**

I/ ANALYSE PAR CLHP

I-1/ MATERIELS ET METHODES :

I-1-1/ REACTIFS, SOLVANTS ET ACCESSOIRES :

L'acétonitrile de qualité HPLC fourni par Panreac.

Le méthanol de qualité HPLC fourni par Merck.

Acétate d'ammonium fourni par Merck.

Eau désionisée

Les solvants d'extraction :

Acide perchlorique 70% fourni par Fluka.

Ether diéthylique fourni par Marck.

Chloroforme fourni par Merck.

Sang total fourni par l'intéressé.

Solutions étalons

On prépare une solution mère de phénobarbital (fourni par le Laboratoire Dolder Ltd/suisse) dans le méthanol à 1mg/ml soit 1µg/µl soit 1000ng/ µl

De la solution mère, on prépare des solutions filles à 200ng/µl, 100ng/ µl, 50ng/ µl, 20ng/ µl, 10ng/ µl, 5ng/ µl.

Elles sont conservées à 10°C, et à l'abri de la lumière.

I-1-2/ APPAREILLAGE ET CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES:

L'équipement de chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (CLHP/DBD) (Agilent 1100series) utilisé est composé des éléments suivants:

- Injecteur automatique
- Détecteur UV/Visible à barrette diode
- Colonne ZORBAX SB C18 (AGILENT) (150mm x 4,6mm di, 3,5 µm granulométrie).
- Four à colonne thermostatée, la température était réglée à 30°C.

I-2/ OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE :

Afin d'optimiser les conditions d'analyse du phénobarbital par la méthode CLHP, utilisant une colonne C18 et un détecteur à barrettes diode, nous avons testé différentes compositions de phases mobiles.

I-2-1/ Phase mobile : Acétonitrile (ACN)/ Tampon Phosphate à pH=3.02

Conditions opératoires :

- Phase mobile : Tampon Phosphate KH_2PO_4 0.02 M à PH=3,02/ACN (Voir détail de gradient dans le tableau 2)
- Débit : 0.5 ml/mn
- Volume injecté : 1 µl
- Temps d'analyse: 15 mn -Etalon Interne : Ethyl paraben dans un solvant S1 à 30 mg/l
- S1: Eau ultra pure/ACN/Acide acétique (70/26/4)

L'éluion du phénobarbital, utilisant la phase mobile acétonitrile/tampon phosphate à différentes compositions a donné les résultats qui sont reportés dans le tableau 2

Le chromatogramme résultant est illustré sur la figure 1.

| Temps (mn) | %ACN | %Tampon | Débit(ml/mn) |
|------------|------|---------|--------------|
| 0 | 10 | 90 | 0.5 |
| 10 | 55 | 45 | 0.5 |
| 15 | 55 | 45 | 0.5 |

Tableau 2: Détail du gradient d'éluion de la phase mobile ACN/Tampon phosphate

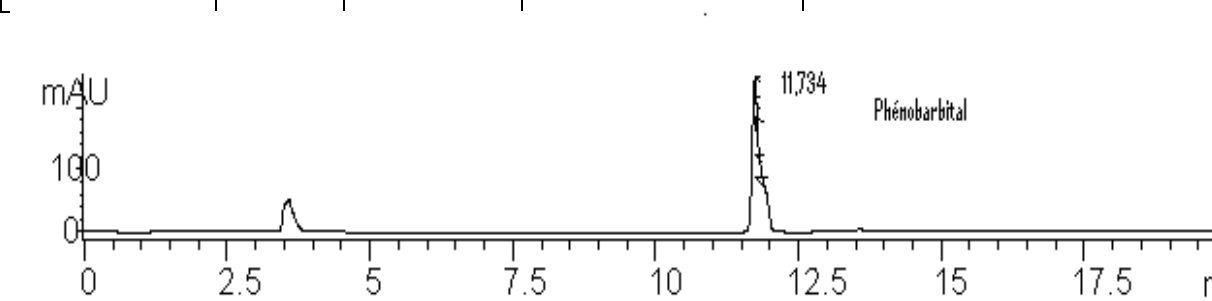


Fig 1 : Chromatogramme obtenu avec la phase mobile ACN/Tampon Phosphate PH=3.02

A travers les résultats obtenus, nous remarquons que les temps de rétention sont longs, dépassant parfois les 15 minutes pour certaines compositions de la phase mobile.

Afin d'optimiser le temps d'analyse et la résolution, nous avons changé la composition de la phase mobile, en changeant la nature du mélange tampon et en ajoutant un solvant polaire

I-2-2/ Phase mobile: ACN/MetOH/Tampon acétate d'ammonium:

La méthode utilisée au niveau du laboratoire de police scientifique pour la recherche des toxiques organiques en général emploie une phase mobile composée de :

Acétonitrile /méthanol /tampon acétate d'ammonium (30/30/40) (v/v/v)

- Colonne : ZORBAX SB C18 (AGILENT) (150mm x 4,6mm di, 3,5 µm granulométrie).
- Débit : 1 ml/mn
- Volume injecté : 10µl
- Détection : UV 254 nm

Dans ces conditions on obtient une très bonne résolution du phénobarbital, le temps de rétention est de 2 minutes comme le montre la figure 2.

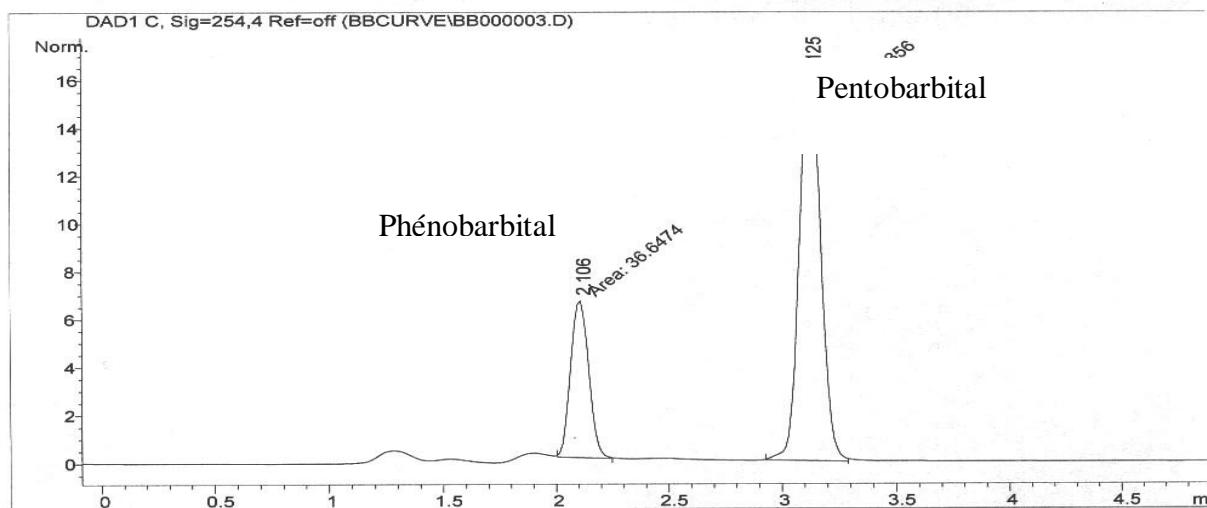


Fig 2 : Chromatogramme en solution méthanolique avec le pentobarbital (tr=3.125 mn) comme SI

Néanmoins dans la matrice biologique ce pic interfère avec un composé endogène du plasma comme le montre le chromatogramme représenté sur la figure 3.

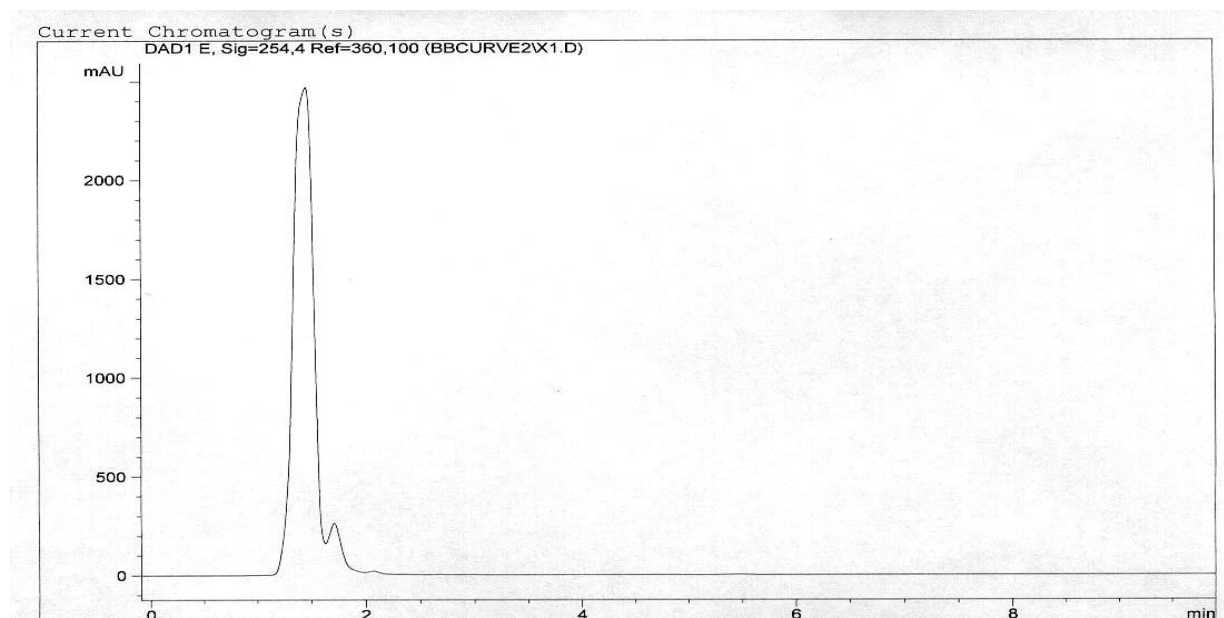


Fig 3 : Chromatogramme obtenu avec un sang blanc et qui présente des pics (tr voisin de 2, 0 mn) pouvant interférer avec celui du phénobarbital.

Afin d'éliminer les phénomènes d'interférence qui peuvent intervenir lors de l'élution du phénobarbital, nous avons agi sur la composition de la phase mobile. Pour cela nous avons préparé une série de phases mobiles constituées du mélange Acétonitrile/ Méthanol/ Tampon Acétate d'Ammonium à différentes compositions.

Le tableau 3 regroupe les différentes compositions de la phase mobile testées, et les temps de rétention obtenus du phénobarbital.

| Composition de la phase (Ac/Met/Tampon) | tr (min) |
|---|-------------|
| 70/10/20 | 1,57 |
| 30/30/40 | 2,3 |
| 30/10/60 | 2,8 |
| 40/20/40 | 2,121 |
| 40/10/50 | 2,81 |
| 20/20/60 | 4,13 |

Tableau 3 : Temps de rétention correspondant aux différentes compositions de la phase mobile

Les chromatogrammes correspondants sont représentés sur les figures 4, 5, 6, 7, 8 et 9 respectivement

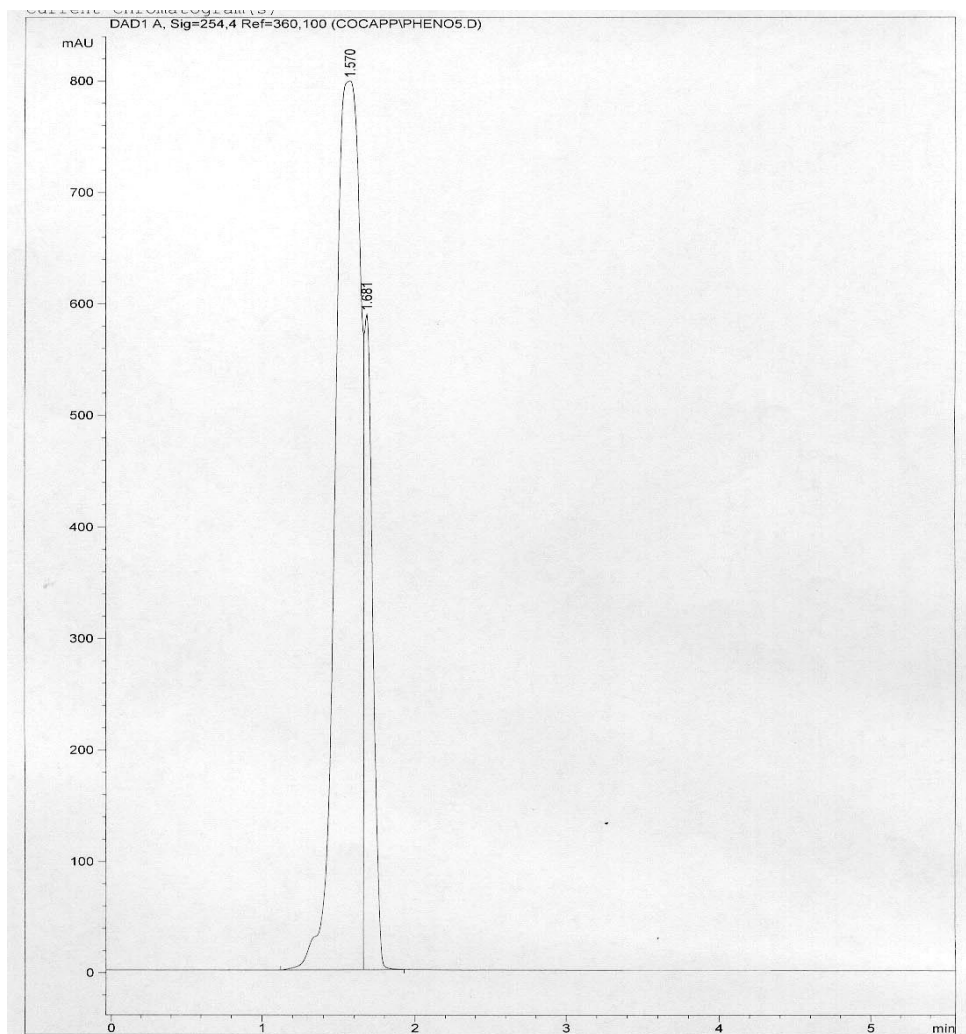


Fig 4 : Chromatogramme obtenu avec la composition 70/10/20

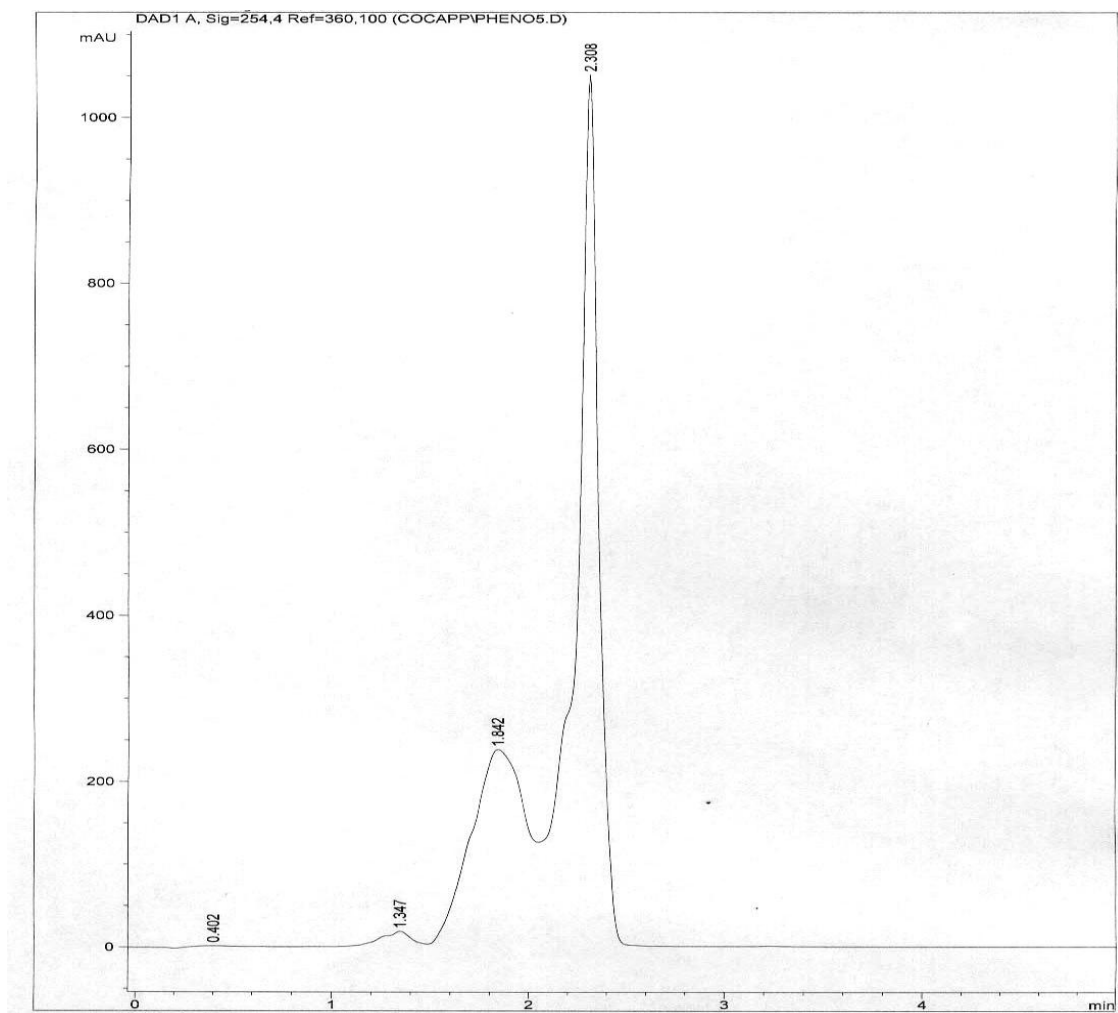


Fig 5: Chromatogramme obtenu avec la composition 30/30/40

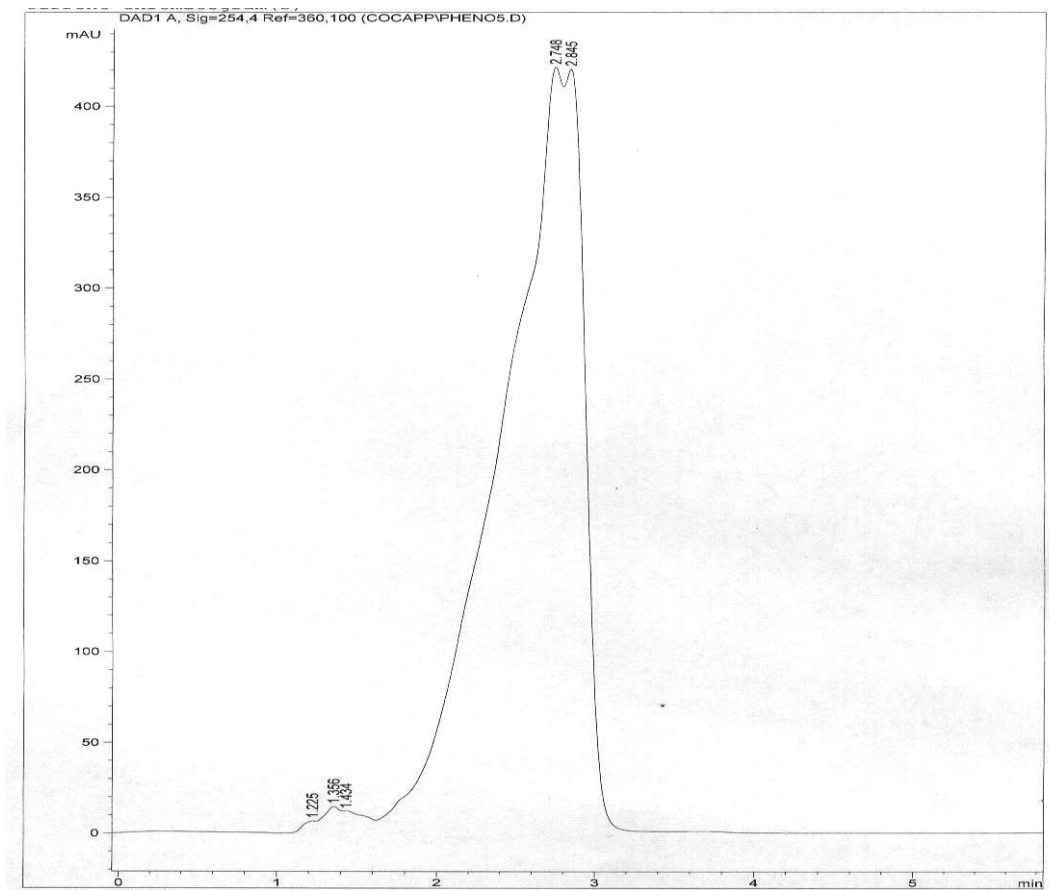


Fig 6: Chromatogramme obtenu avec la composition 30/10/60

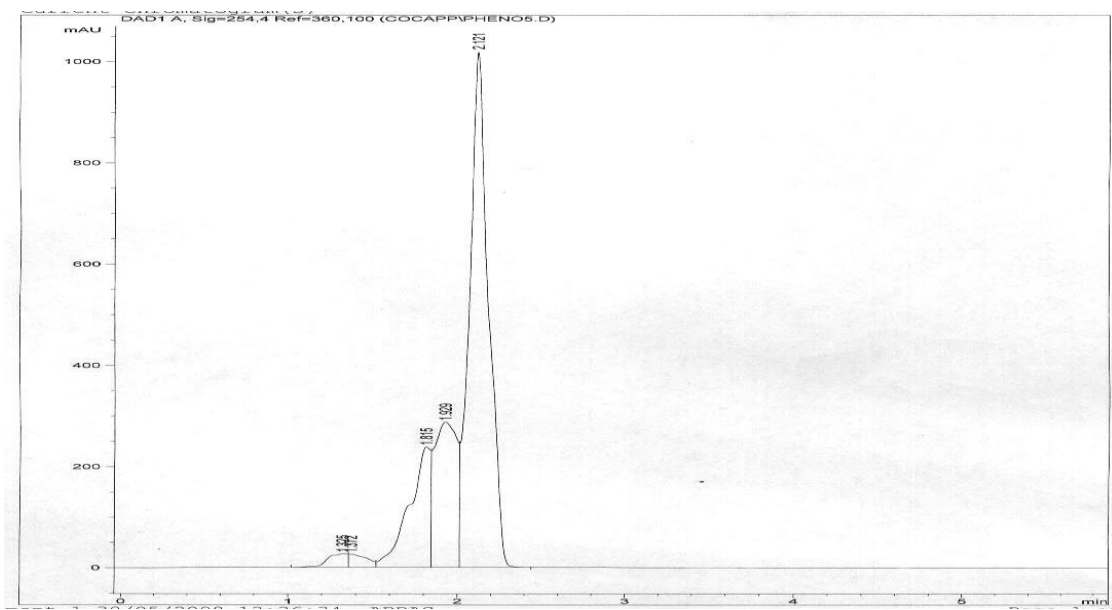


Fig 7: Chromatogramme obtenu avec la composition 40/20/40

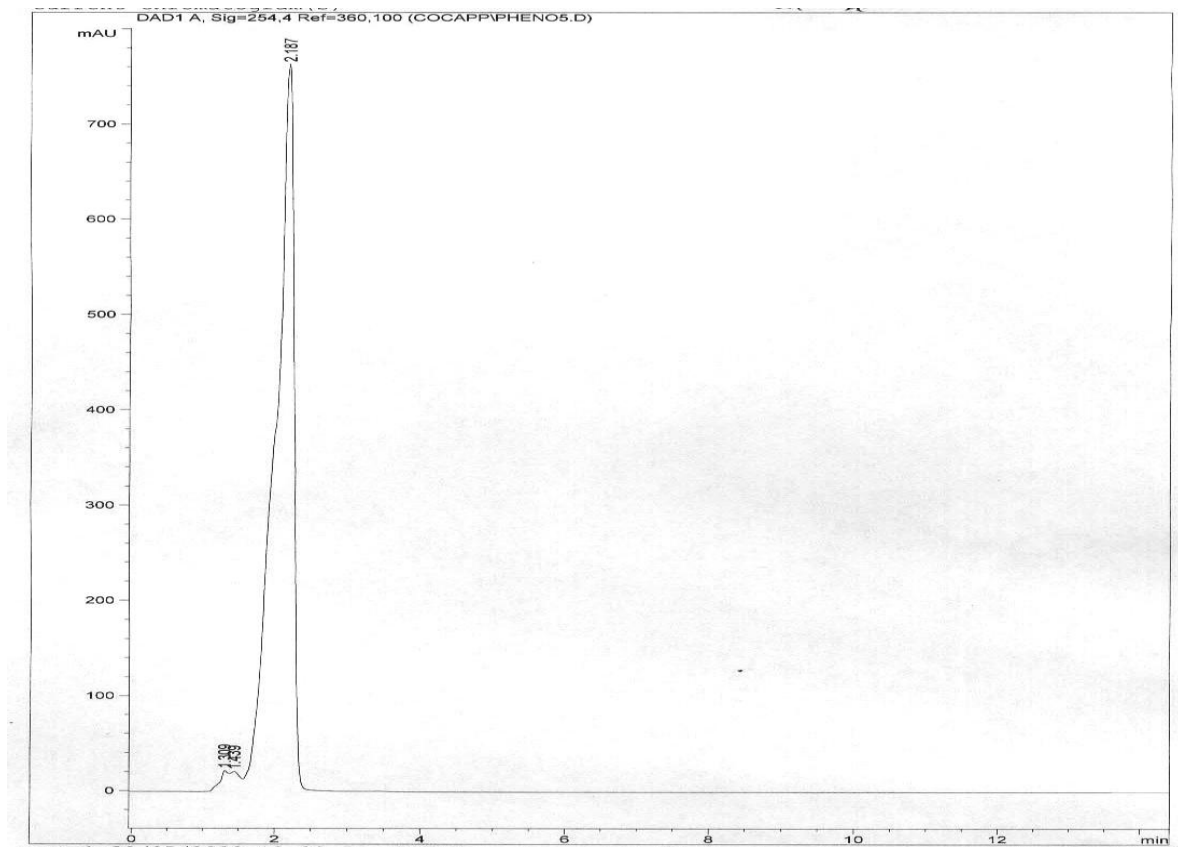


Fig 8 : Chromatogramme obtenu avec la composition 40/10/50

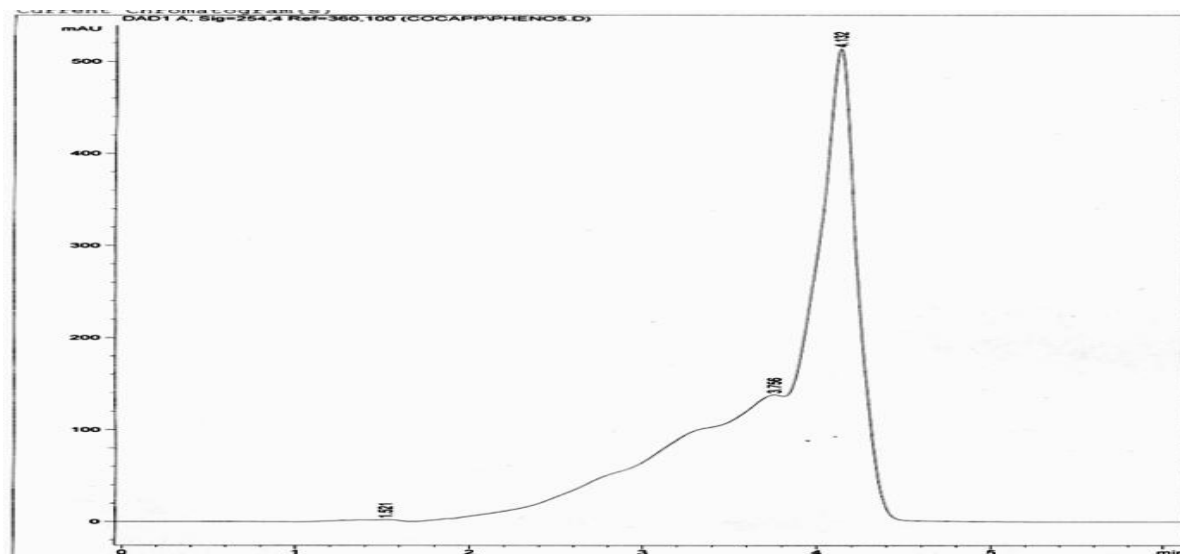


Fig 9 : Chromatogramme obtenu avec la composition 20/20/60

Discussion :

Nous avons déterminé les résolutions entre le pic du phénobarbital et le pic du composé endogène pour l'ensemble des phases mobiles étudiées.

Le tracé des courbes donnant la résolution (R) en fonction du pourcentage en acétonitrile, en méthanol, et en tampon acétate dans la phase mobile est représenté par les histogrammes composant les figures 10, 11, et 12 respectivement.

Le tableau N°4 contient les valeurs de la résolution obtenues pour les différents pourcentages d'acétonitrile (ACN).

| | | | | |
|--------------|----|-----|-----|------|
| R | 5 | 0,6 | 0,2 | 0.34 |
| % ACN | 20 | 30 | 40 | 70 |

Tableau 4: Valeurs de la résolution en fonction du pourcentage en acétonitrile (ACN)

La figure 10 correspond à la représentation graphique de la résolution en fonction du pourcentage d'acétonitrile (ACN).

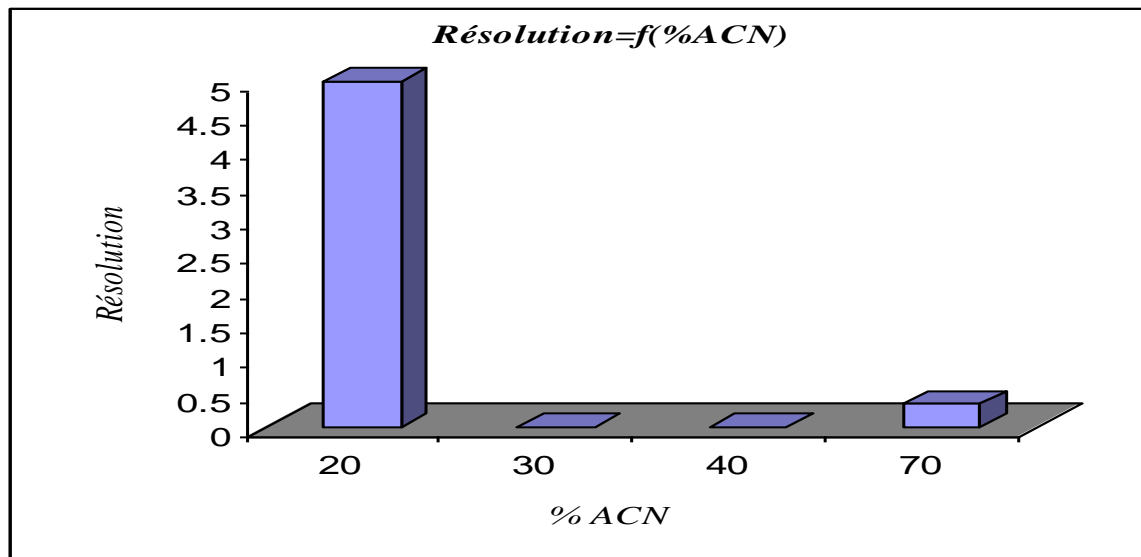


Fig 10 : Résolution en fonction du pourcentage d'ACN

Le tableau N°5 représente les variations de la résolution en fonction du pourcentage du tampon d'acétate d'ammonium contenu dans la phase mobile

| | | | | |
|-----------------|------|------|-----|----|
| R | 0,34 | 0,40 | 0,2 | 5 |
| % Tampon | 20 | 40 | 50 | 60 |

Tableau 5: Variations de la résolution en fonction du pourcentage du tampon d'acétate d'ammonium

La figure 11 illustre la résolution en fonction du pourcentage du tampon d'acétate d'ammonium

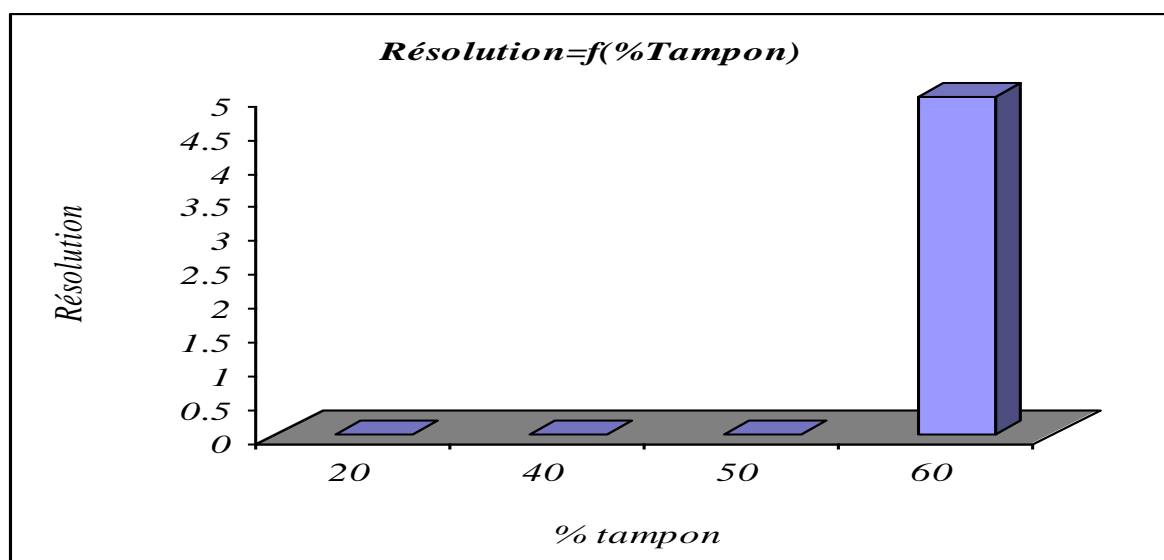


Fig 11 : Variation de la résolution en fonction du pourcentage de la solution tampon acétate

Le tableau N°6 contient les valeurs de la résolution calculées en fonction du pourcentage en méthanol dans la phase mobile..

| | | | |
|-------------------|------|-----|------|
| R | 0,63 | 5,0 | 0,48 |
| % Méthanol | 10 | 20 | 30 |

Tableau 6 : Variations de la résolution en fonction du pourcentage en méthanol

La figure 12 représente la variation de la résolution en fonction du pourcentage en méthanol.

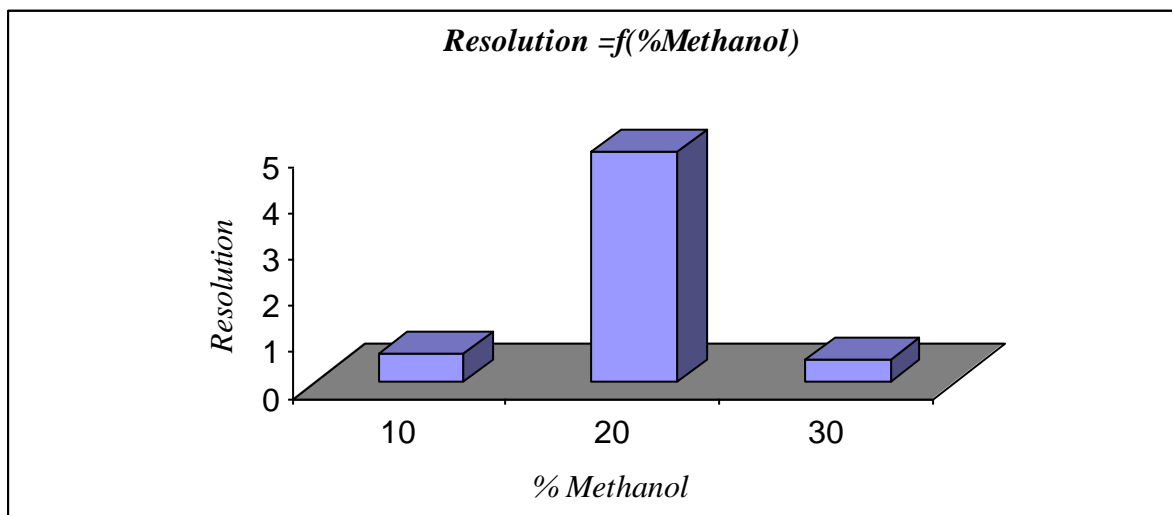


Fig 12: Résolution en fonction du pourcentage en méthanol

Interprétation : L'examen des figures 10, 11 et 12 montre que la meilleure résolution est obtenue avec la composition de la phase mobile

% Acétonitrile (ACN) : 20

%Méthanol : 20

% Tampon acétate d'ammonium : 60

Nous avons alors retenu cette composition pour la suite de notre travail.

Après avoir obtenu les conditions optimales d'analyse du phénobarbital par CLHP, à savoir :

-Colonne microbondapack C18

-Déecteur UV/Vis à barrettes diode

-Phase mobile constituée de **20%Acétonitrile + 20%Méthanol + 60%Tampon Acétate d'ammonium.**

Nous avons procédé à l'analyse, d'un toxique organique, le phénobarbital, dans le sang.

Il est connu que pour procéder au dosage d'un analyte dans un milieu biologique, une préparation de l'échantillon, qui consiste à extraire le composé d'intérêt, est indispensable.

L'extraction liquide liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE), sont des méthodes toutes indiquées pour la préparation des échantillons à partir d'un milieu biologique.

Dans le cadre de notre travail nous avons opté pour l'extraction liquide liquide (LLE).

Plusieurs mélanges de solvants d'extraction ont été testés.

Nous donnons ci-dessous le principe de la méthode et les paramètres qui peuvent influencer le rendement de l'extraction

I-3/ EXTRACTION DE LA MATRICE BIOLOGIQUE:

I-3-1/ PRINCIPE DE L'EXTRACTION LIQUIDE - LIQUIDE :

La première étape analytique consiste à extraire les analytes de la matrice biologique (sang dans notre cas) sur la base d'une séparation suivant des paramètres physico-chimiques.

Les deux principaux paramètres qui peuvent influencer une extraction liquide liquide sont:

- La nature du solvant d'extraction.
- Le pH d'extraction.

L'ajustement du pH d'extraction a pour but d'amener la molécule sous une forme neutre afin de faciliter son extraction du milieu biologique par le solvant organique retenu.

La nature du solvant intervient en fonction de la polarité des composés ; en effet un composé apolaire sera extrait par des solvants apolaires contrairement à un composé plus hydrophile qui sera extrait par des solvants polaires.

I-3-2/ CHOIX DU PROCEDE D'EXTRACTION :

Il s'agit de déterminer le **PH et le solvant** donnant un **rendement maximal**.

Calcul du rendement d'extraction: Le rendement d'extraction a été calculé à l'aide de l'expression suivante :

$$R\% = R_1/R_2 \times 100$$

tels que :

R₁: représente la surface de l'analyte dans la matrice biologique

R₂: représente la surface du même analyte à la même concentration

I-3-2-1/ Extraction liquide-liquide par solvant organique à pH 1~6

Afin de rechercher les conditions optimales d'extraction du phénobarbital présent dans la matrice biologique, nous avons procédé au choix du solvant et du pH du milieu. Pour cela nous avons choisi une série de solvants doués de polarités différentes. Nous avons par la suite fixé une gamme de pH allant de 1 à 6. Le choix de cette gamme de pH est dicté par le fait que l'extraction de phénobarbital n'est possible qu'en milieu acide.

Dans une première étape, nous avons utilisé l'éther diéthylique, solvant connu pour avoir été utilisé dans l'extraction de plusieurs toxiques organiques présents dans un milieu biologique.

Nous avons par la suite déterminé la valeur du pH donnant le meilleur rendement de l'extraction

Le tableau 7 représente les valeurs des rendements de l'extraction obtenues par l'éther diéthylique à différents PH

Résultats : Le tableau 7 comprend les valeurs des rendements calculés à différents PH

| PH | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------|-------|-------|--------|---------------|--------|-------|
| R₁ | 2,562 | 5,441 | 11,981 | 14,144 | 10,816 | 7,155 |
| R₂ | 16,64 | 16,64 | 16,64 | 16,64 | 16,64 | 16,64 |
| R(%) | 15,4 | 32,7 | 72,0 | 85,0 | 65,0 | 43,0 |

Tableau 7 : Rendements d'extraction en fonction du PH

La figure 13 illustre les variations du rendement d'extraction par le diéthyl éther en fonction du PH

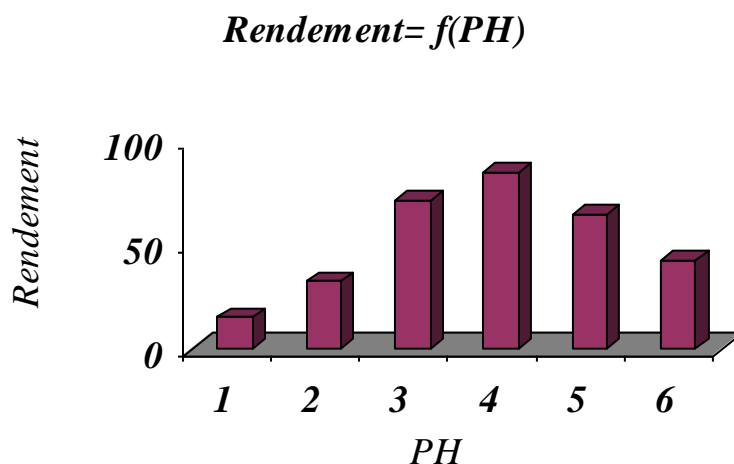


Fig 13 : Variation du rendement de l'extraction en fonction du pH

Interprétation : Les Valeurs des rendements de l'extraction obtenues par le diéthyléther à différents pH, (tableau 7), montrent que le **rendement optimal (85%)**, pour les différentes concentrations, est atteint lorsque **le PH est égal à 4** .

Pour la détermination du rendement maximum de l'extraction par l'acide perchlorique, par l'hexane, solvants apolaires, et par le chloroforme, solvant moyennement polaire, nous avons fixé le pH à 4

Résultats : Le tableau 8 regroupe les valeurs des rendements d'extraction obtenues avec différents solvants

| Solvant | Acide perchlorique 60% | Hexane | Chloroforme | Ether diéthylique |
|---|------------------------|---------|-------------|--------------------------|
| R₁ | 9,1218 | 7,0745 | 11,1602 | 13,1345 |
| R₂ | 15,2031 | 14,7386 | 14,6845 | 15,4524 |
| R(%)=R₁/R₂ | 60,0 | 48,0 | 76,0 | 85,0 |

Tableau 8 : Rendements d'extraction des différents solvants à pH=4

Interprétation : A partir des valeurs reportées dans le tableau 8, nous remarquons que l'hexane et le chloroforme donnent des taux de rendements inférieurs au taux obtenu par l'éther diéthylique. Ce résultat est en accord avec les différents travaux publiés dans la littérature

La figure 14 représente le diagramme de la variation du rendement en fonction du solvant

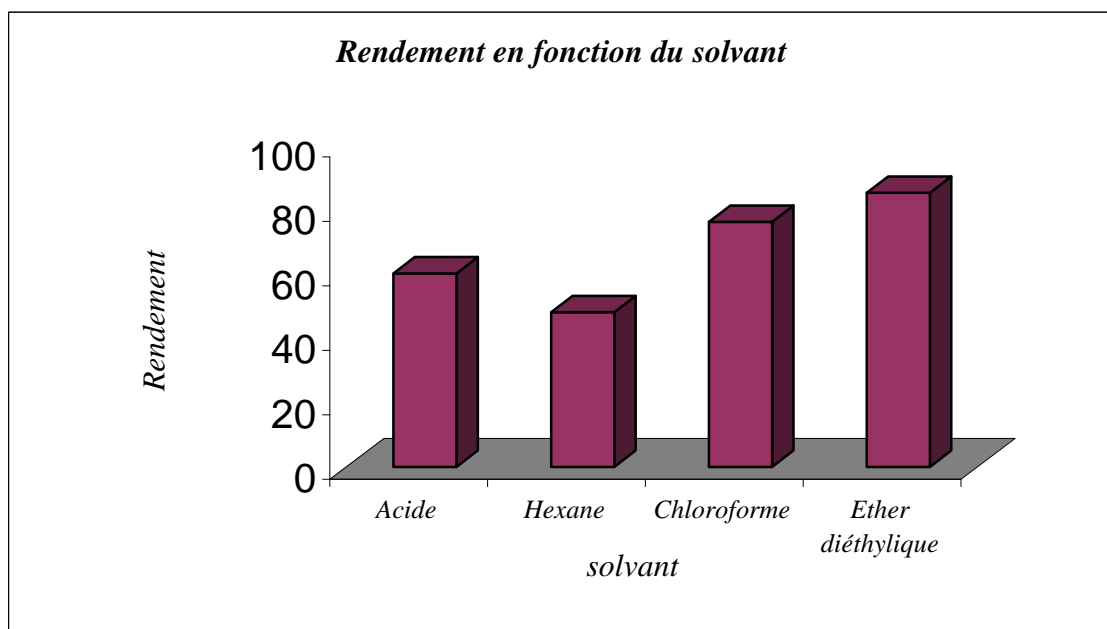


Fig 14: Représentation graphique de la variation du rendement d'extraction en fonction du solvant utilisé

Discussion : Compte tenu des résultats obtenus :

PH, solvant d'extraction, et rendement de l'extraction égal à 85%

Nous avons retenu, comme solvant d'extraction l'éther diéthylique à PH = 4.

Nous avons adopté pour la suite de notre travail le protocole d'extraction représenté dans la figure 15

SCHEMA DU PROTOCOLE RETENU

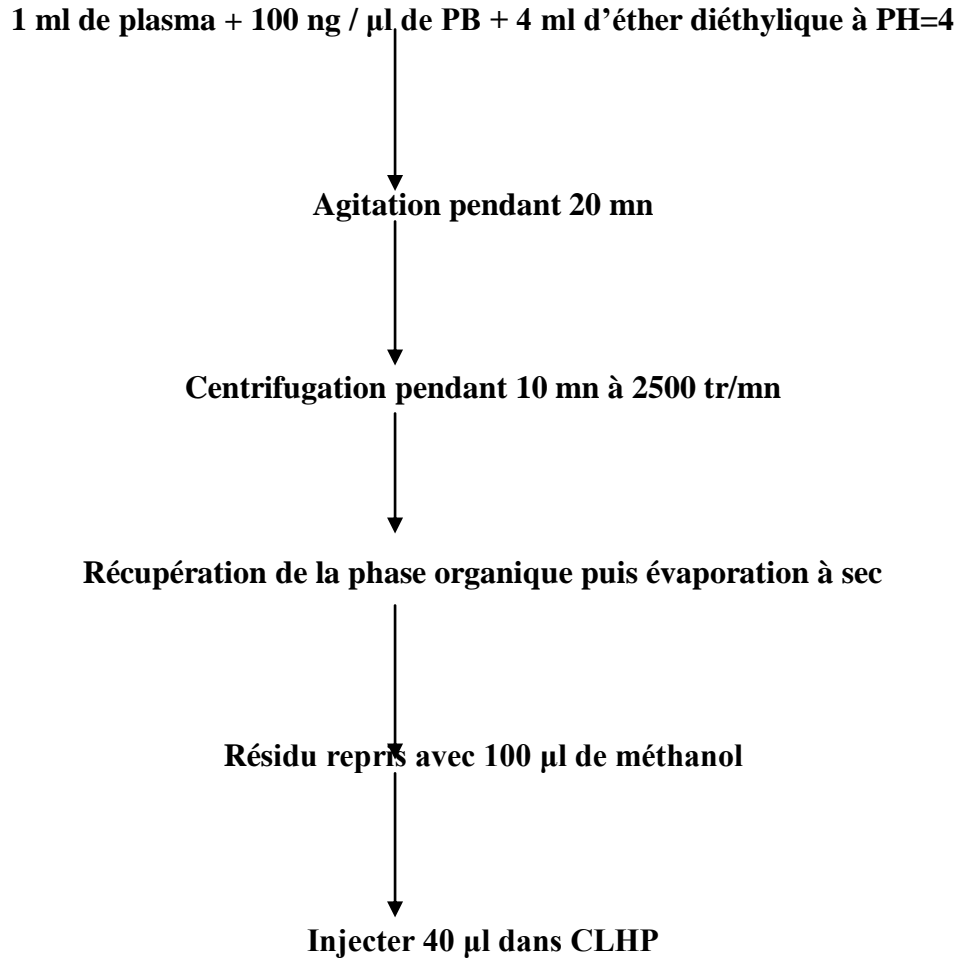


Fig 15: Schéma du protocole d'extraction retenu

En application à notre travail nous avons analysé plusieurs échantillons de sang contaminés par le phénobarbital. L'analyse qualitative a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette diode.

Les chromatogrammes obtenus, pour un échantillon de sang non chargé et un échantillon de sang chargé de phénobarbital sont respectivement représentés par les figures 16 et 17

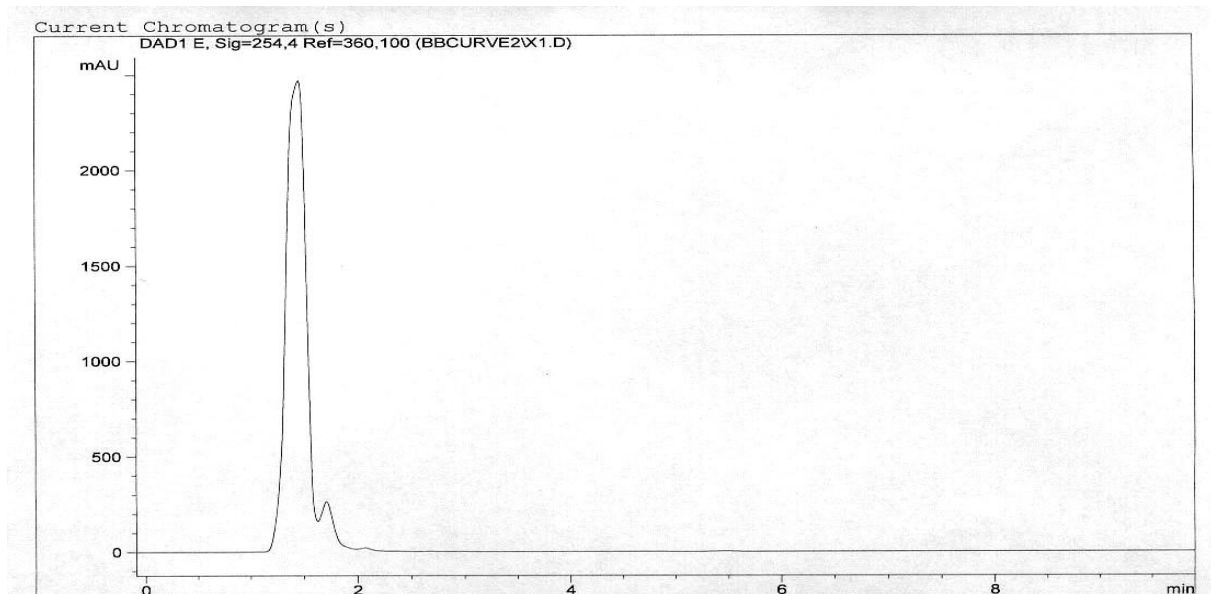


Fig 16: Chromatogramme obtenu après analyse du sang blanc non surchargé du produit, détection à 254 nm.

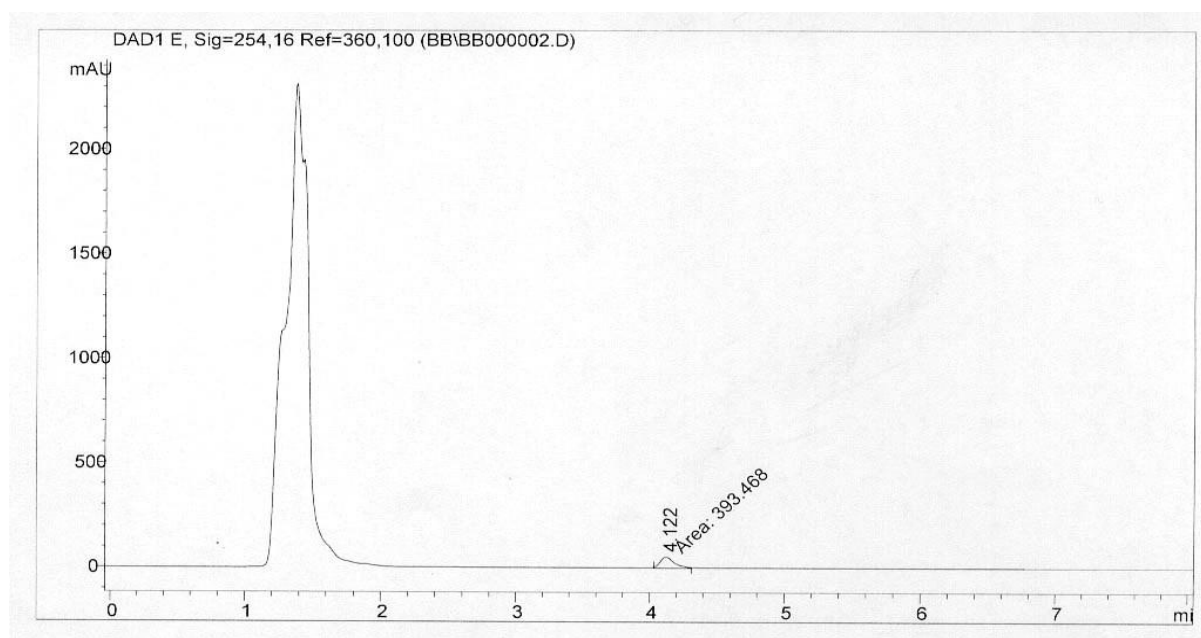


Fig 17: Chromatogramme obtenu après analyse du sang blanc surchargé du produit
Détection à 254 nm, montrant le **pic du PB à tr=4.122 mn**

II/ ANALYSE DU PHENOBARBITAL PAR GC/MS :

Nous avons aussi utilisé la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) dans l'analyse du phénobarbital.

Nous avons cherché les conditions chromatographiques idéales en agissant sur les paramètres importants qui permettent l'optimisation de l'analyse.

Les conditions opératoires optimales sont :

Appareillage : Perkin Elmer GC/MS modèle CLARUS 500

Pour la méthode GC :

Temp inj : 250°C

Débit Hélium : 1 ml/mn

Mode : Split

Colonne : Elite PE 5 (5% diphenyl / 95% diméthylpolysiloxanne)

30 m x 0.25 mm x 0.25µm épaisseur de la phase stationnaire.

Programmation : Tinit=100°C-rampe : 8°C/mn → 290°C(20mn)

Pour la méthode SM :

Mode d'ionisation : Impact électronique

Analyseur : Quaripôle.

Temp source : 200°C.

Energie d'ionisation : 70eV

Mode Full scan : 20 - 470 dalton

Délai de solvant : 5,90 mn

Nous avons élué séparément les mêmes solutions étalons préparées lors de l'analyse du phénobarbital par la méthode CLHP.

La figure 18 représente le chromatogramme, le spectre de masse et la recherche dans la librairie:

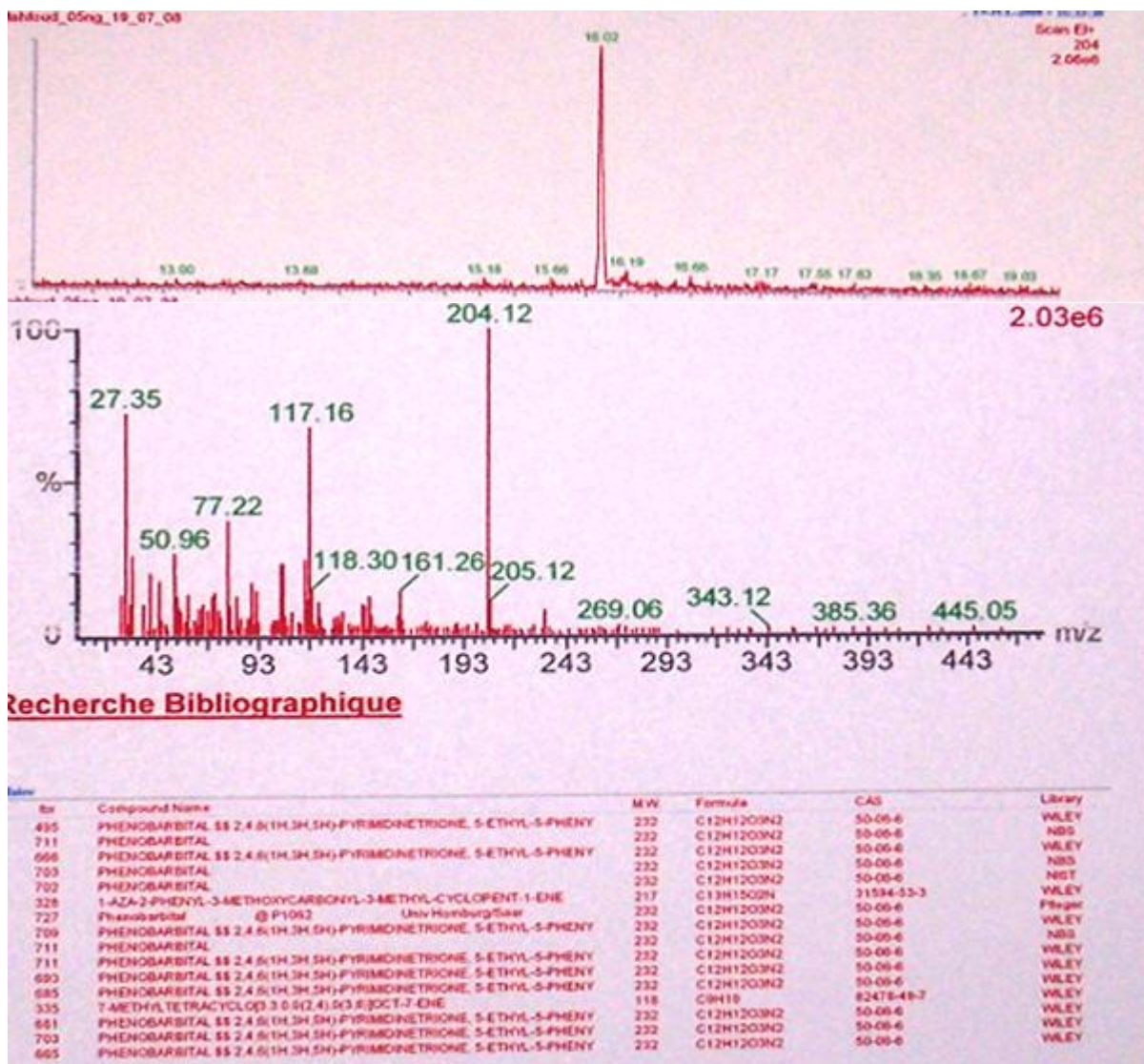


Fig 18: Chromatogramme et spectre de masse du PB

Résultat : le phénobarbital est élué avec un $t_r = 15,98$

II-2/ ETALONNAGE DE L'APPAREIL :

Nous avons injecté successivement les solutions étalons suivantes : 5, 10, 100, 200 ng/μl, correspondant aux doses thérapeutiques et léthales.

Nous avons calculé les aires des pics chromatographiques correspondants.

Le tableau 9 regroupe les aires des pics chromatographiques des solutions étalons injectées à différentes concentrations.

| Concentration ng/µl | Aire |
|---------------------|-----------|
| 5 | 18714.3 |
| 10 | 195310.5 |
| 100 | 1868354 |
| 200 | 4057861.8 |

Tableau 9 : Aires correspondants aux différentes concentrations du PB

Le tracé de la courbe d'étalonnage donnant la surface des pics chromatographiques en fonction de la concentration en phénobarbital est représenté sur la figure 19

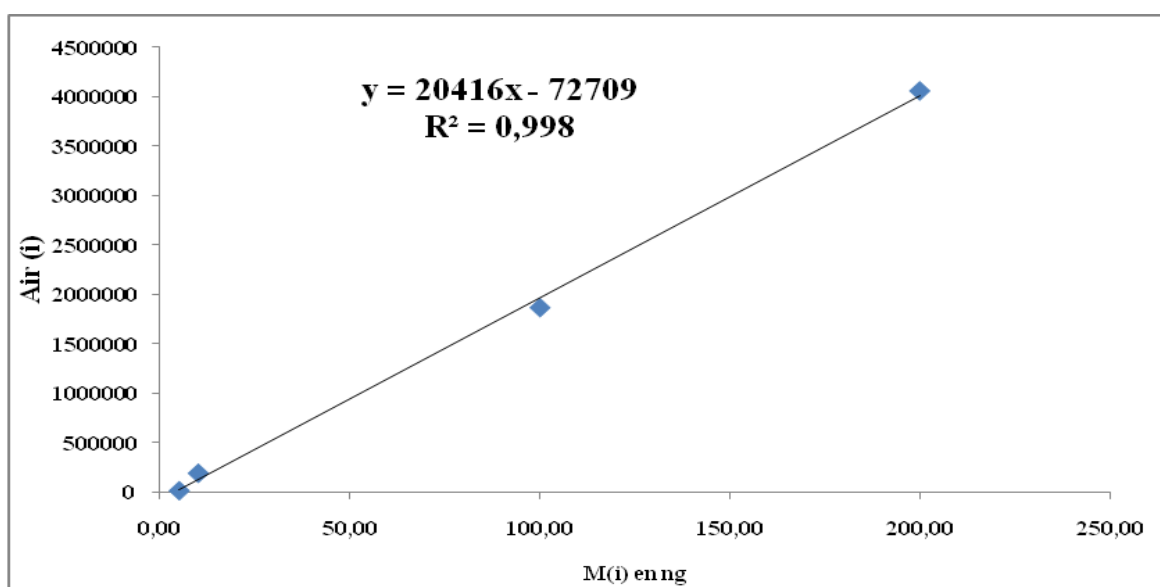


Fig 19: Courbe de linéarité du phénobarbital

Résultat:

La courbe de linéarité du phénobarbital est une droite ayant un coefficient de régression égal à 0.998.

Les paramètres de la courbe sont consignés dans le tableau 10

| | |
|---------------------------|----------------------|
| Equation | $y = 20416x - 72709$ |
| Coefficient de régression | 0,9998 |

Tableau 10 : Paramètres de la courbe de linéarité du PB

Interprétation :

Le domaine de linéarité comprend les concentrations thérapeutiques et léthales.

III/ Validation de la méthode CLHP:

Nous avons tenté de valider la méthode CLHP.

La validation de cette méthode consiste en la détermination des paramètres suivants :

- La spécificité ;
- La linéarité ;
- La stabilité ;
- La répétabilité ;
- Les limites de détection et de quantification.

III-1/ Spécificité de la méthode:

La spécificité est la capacité de la méthode à mesurer un analyte particulier dans un échantillon sans que cette mesure soit faussée par d'autres composants de l'échantillon.

Nous avons injecté séparément les différents produits de la famille des barbituriques que sont : le barbital, l'allobarbital, le phénobarbital, le pentobarbital, et le secobarbital. Ensuite, nous avons élué le mélange, constitué de leur mélange:

Les conditions opératoires pour ces injections sont les mêmes citées précédemment, à savoir :

- Appareil : CLHP Agilent, modèle 1100 équipé d'un DBD.
- Colonne : ZORBAX SB C18 (AGILENT) (150mm x 4,6mm di, 3,5 µm granulométrie).
- Débit : 1 ml/mn
- Volume injecté : 10µl
- Détection : UV 254 nm

Résultats : les chromatogrammes correspondants sont représentés sur les figures 20 et 21.

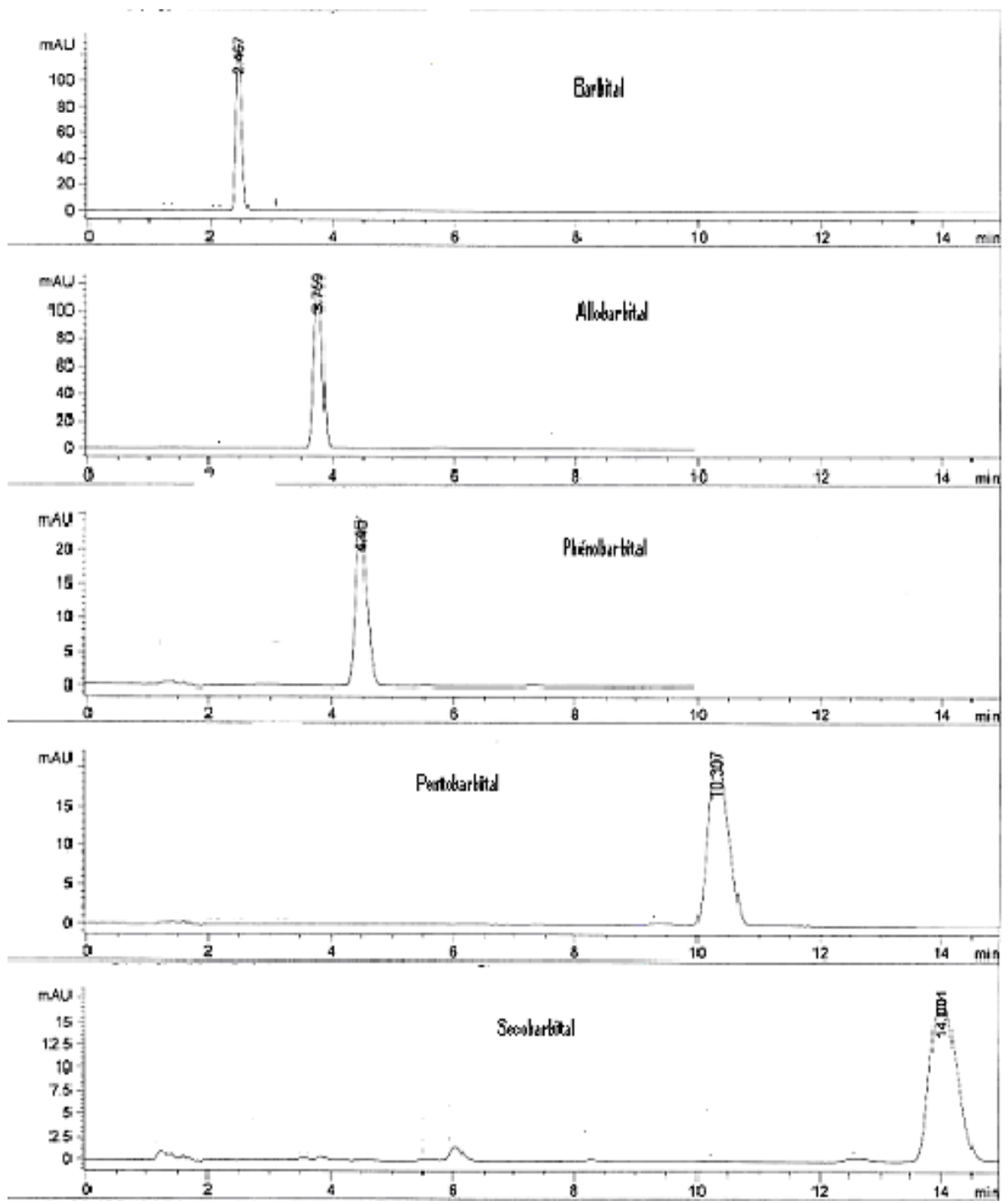


Fig 20: Chromatogrammes des différents étalons barbituriques

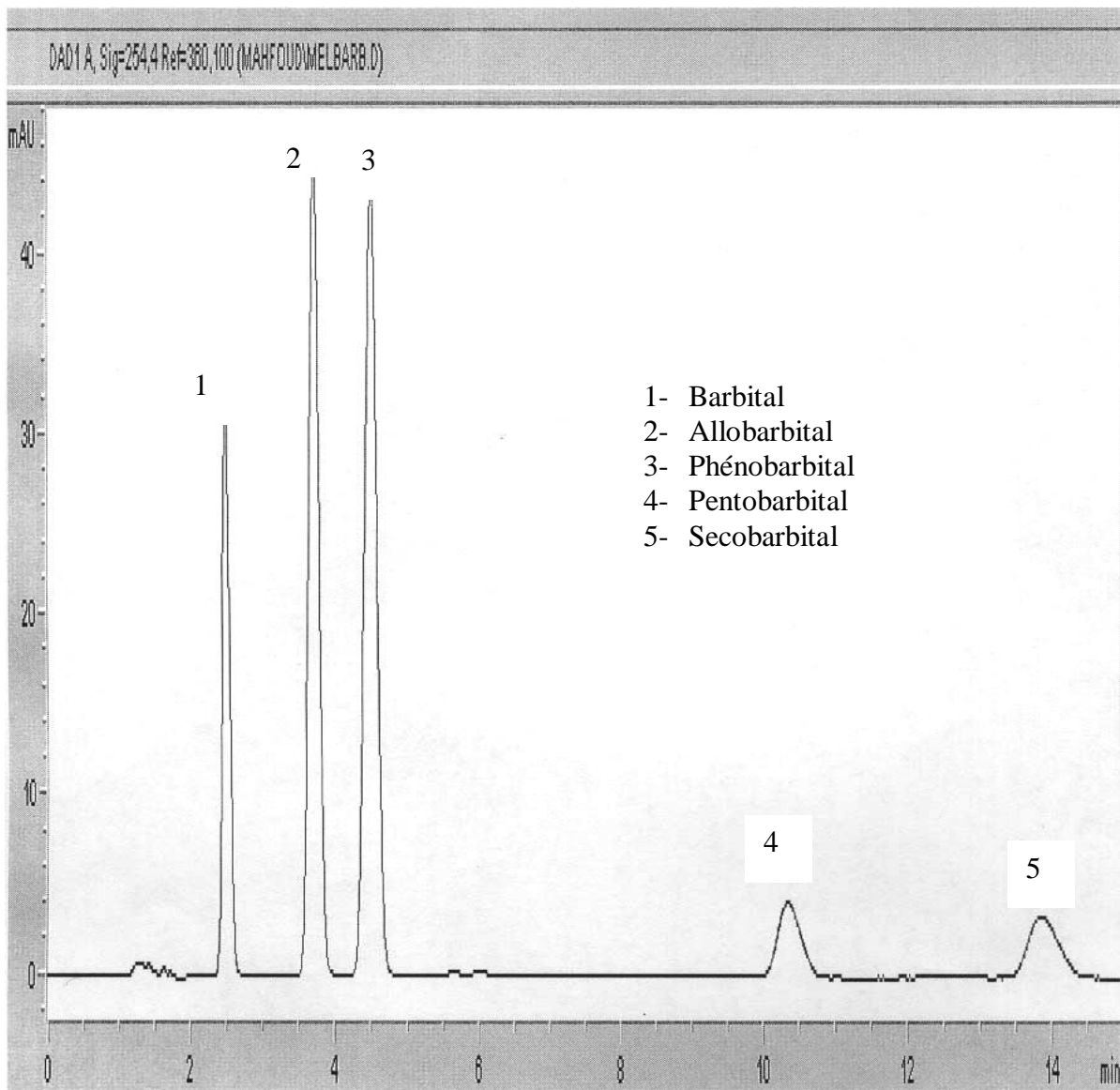


Fig 21 : Chromatogramme du mélange étalons de barbituriques

Interprétation :

Les figures 20 et 21 montrent que les temps de rétention des différents barbituriques sont tous distincts, et les pics bien résolus. Nous pouvons donc conclure à une bonne spécificité de la méthode.

III-2/ La linéarité:

C'est la capacité de la méthode dans une plage donnée, de fournir une corrélation linéaire acceptable entre les résultats et la concentration d'analyte dans l'échantillon. En choisissant Pour une gamme de concentration allant de 5 à 200 ng/μl (on a tenu compte de la concentration thérapeutique et létale), nous avons déterminé les aires des pics chromatographiques pour chaque concentration, les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau 11.

| Concentration (ng/μl) | Aires |
|------------------------------|--------------|
| 5 | 16,64813 |
| 10 | 34,22427 |
| 20 | 68,13165 |
| 50 | 149,85579 |
| 100 | 297,64365 |
| 200 | 610,53369 |

Tableau 11 : Aires correspondant aux différentes concentrations du PB

La courbe d'étalonnage du PB est représentée sur la figure 22

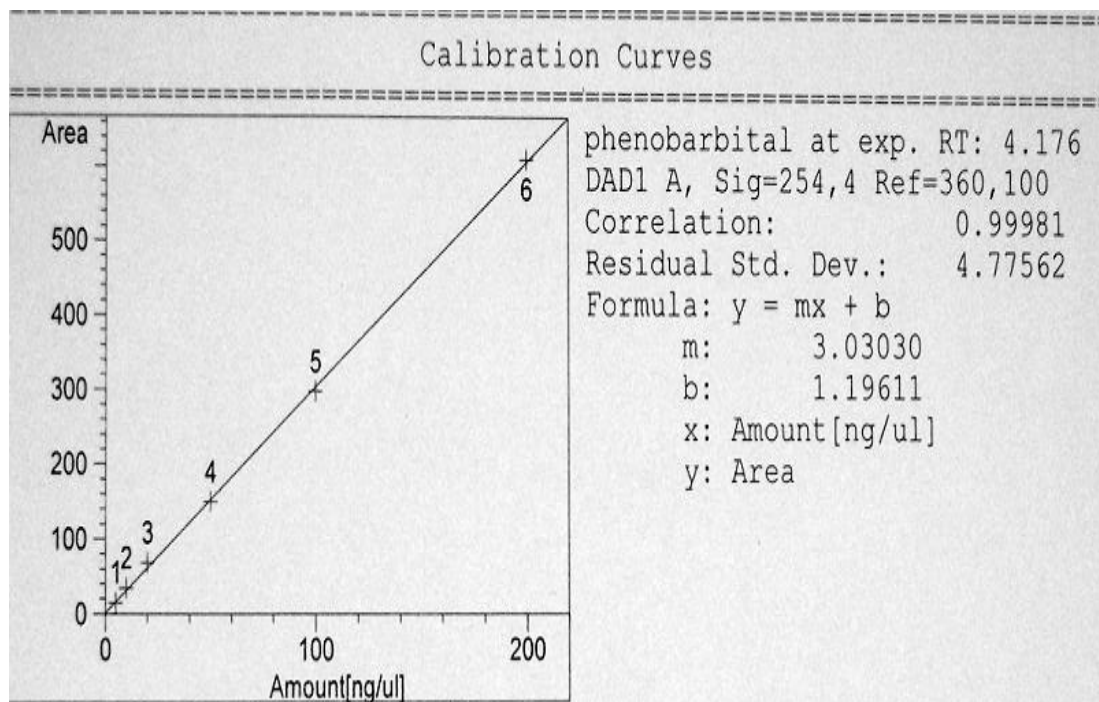


Fig 22: Courbe de linéarité du phénobarbital

Résultat :

La courbe de linéarité du phénobarbital est une droite dont les paramètres sont indiqués dans le tableau 12.

| | |
|----------------------------------|---------------------------|
| Equation | $Y = 3,03030 x + 1,19611$ |
| Coefficient de régression | 0,99981 |

Tableau 12 : Paramètres de la courbe de linéarité du PB

Interprétation :

Une bonne linéarité dans les domaines thérapeutique et létal est obtenu avec cette méthode.

III-3/ Stabilité des composés:

L'ensemble des solutions préparées (méthanolique et sanguine).sont contrôlées sur une durés d'un mois

A) Solution méthanolique :

La solution étalon préparée à 5 ng/μl est conservée à la température ambiante, au sein de notre laboratoire (+25°C) et à -5°C dans un congélateur pendant un mois.

Nous avons, ensuite, procédé à des prélèvements périodiques de 10μl de la solution étalon que nous avons injectés dans le chromatographe en phase liquide

Le tableau 13 regroupe les résultats de la stabilité, exprimés par la mesure des aires des pics chromatographiques obtenues en fonction des jours :

| Jour | 25°C | -5°C |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | 14,64813 | 15,32915 |
| 8 | 15,31617 | 15,4573 |
| 15 | 15,4368 | 14.8794 |
| 22 | 14.8721 | 15.3217 |
| 30 | 14.7024 | 14.49321 |
| Moyenne ± Ecart type | 14.99512 ± 0.305092 | 15.096152 ± 0.2082 |
| CV | 2.03% | 1.38% |

Tableau 13: Résultats de la stabilité des échantillons en solution méthanolique à +25°C et -5°C.

Interprétation : Les résultats obtenus montrent qu'en solution méthanolique, le phénobarbital est stable au moins pendant 01 mois, à +25°C et à -5°C.

B) Solution sanguine :

Nous avons étudié la conservation d'un échantillon sanguin contenant du PB à 5ng/μl pendant 01 mois à -5°C.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 14

| Jour | Aire |
|-----------------------------|--------------------|
| 1 | 502.254 |
| 8 | 485.317 |
| 15 | 510.103 |
| 22 | 498.341 |
| 30 | 490.257 |
| Moyenne ± Ecart type | 497.2544 ± 7.57392 |
| CV | 1.52% |

Tableau 14 : Résultats de la stabilité des échantillons en solution sanguine à -5°C.

Interprétation :

Les résultats obtenus montrent que la stabilité du phénobarbital, présent dans un échantillon sanguin, est bonne pendant au moins 01 mois, le CV 1.52% < 5%.

III-4/ REPETABILITE/

A) LA REPETABILITE INTRA JOURNEE

Les essais de repetabilité ont été effectués selon le protocole analytique mis au point.

Nous avons analysé, le même jour, six fois le même extrait de sang blanc surchargé de phénobarbital à différentes quantités (5, 10, 20, 50,100, 200, ng/μl).

Les tableaux 15 et 16 regroupent les valeurs des aires, et les moyennes et les coefficients de variation respectivement.

| Essais Conc | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 5 | 14.648 | 14.703 | 15.102 | 14.611 | 15.305 | 14.530 |
| 10 | 34.224 | 34.507 | 35.602 | 33.874 | 34.198 | 34.374 |
| 20 | 68.132 | 67.834 | 68.467 | 69.103 | 68.476 | 67.856 |
| 50 | 149.856 | 151.354 | 148.934 | 150.312 | 149.738 | 148.784 |
| 100 | 297.644 | 294.387 | 298.533 | 299.411 | 297.738 | 300.211 |
| 200 | 610.534 | 598.306 | 615.701 | 595.847 | 603.911 | 595.807 |

Tableau 15: valeurs des aires calculées à différents essais

| concentrations | Moyenne+Ecart type | Coefficient de variation |
|----------------|--------------------|--------------------------|
| 5 | 14.816 ± 0.267 | 1.73 % |
| 10 | 34.463 ± 0.394 | 1.14 % |
| 20 | 68.311 ± 0.345 | 0.5 % |
| 50 | 149.83 ± 0.68 | 0.46 % |
| 100 | 297.987 ± 3.94 | 1.32 % |
| 200 | 603.350 ± 6.698 | 1.11 % |

Tableau 16: Moyennes et coefficients de variations

Interprétation: Les valeurs du coefficient de variation sont toutes inférieures à 5%, donc on peut conclure à une bonne répétabilité intra journée.

B) Repetabilite inter journée à des concentrations allant de 5 à 200 ng/ul:

Elle exprime la fidélité de la méthode pour un même analyste, un même équipement, les mêmes réactifs, et des opérations analytiques effectuées sur un long laps de temps (d'une journée à l'autre).

La répétabilité inter journée est réalisée en injectant six répliques à intervalle de temps (jours) différents du composé analysé. Les résultats sont présentés dans les tableaux 17 et 18

Résultats : Les tableaux 17 et 18 regroupent les valeurs des aires, et les moyennes et les coefficients de variation respectivement

| | Jour 1 | Jour 3 | Jour 7 | Jour 15 | Jour 21 | Jour 30 |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 5 | 14.648 | 14.309 | 15.101 | 14.809 | 15.213 | 14.723 |
| 10 | 34.224 | 33.901 | 35.017 | 34.107 | 34.431 | 35.121 |
| 20 | 68.132 | 68.734 | 69.4206 | 67.973 | 67.816 | 68.412 |
| 50 | 149.856 | 150.131 | 149.903 | 148.757 | 151.317 | 149.736 |
| 100 | 297.644 | 298.967 | 296.533 | 297.533 | 298.017 | 297.514 |
| 200 | 610.534 | 605.171 | 612.303 | 604.379 | 617.232 | 608.714 |

Tableau 17 : Valeurs des aires à six essais

| concentrations | Moyenne+Ecart type | Coefficient de variation |
|----------------|--------------------|--------------------------|
| 5 | 14.801 ± 0.241 | 1.63 % |
| 10 | 34.467 ± 0.184 | 0.5 % |
| 20 | 68.379 ± 0.4 | 0.6 % |
| 50 | 149.98 ± 0.516 | 0.3 % |
| 100 | 297.663 ± 0.553 | 0.19 % |
| 200 | 609.722 ± 3.63 | 0.6 % |

Tableau 18: Moyenne et coefficient de variation

Interprétation : Les valeurs des coefficients de variation sont dans les normes (<5%). On peut donc conclure à une bonne répétabilité inter journée.

III-5/ LIMITE DE DETECTION:

La limite de détection (LOD) correspond à la fois à la plus petite quantité injectée dont la hauteur du pic d'éluion est 3 fois la bande du bruit de fond (HPLC) .

Le protocole consiste à injecter dans les conditions chromatographiques identiques, des quantités de plus en plus petites.

La limite de détection (LOD) se situe à 0,5 ng/µl comme le montre la figure 23

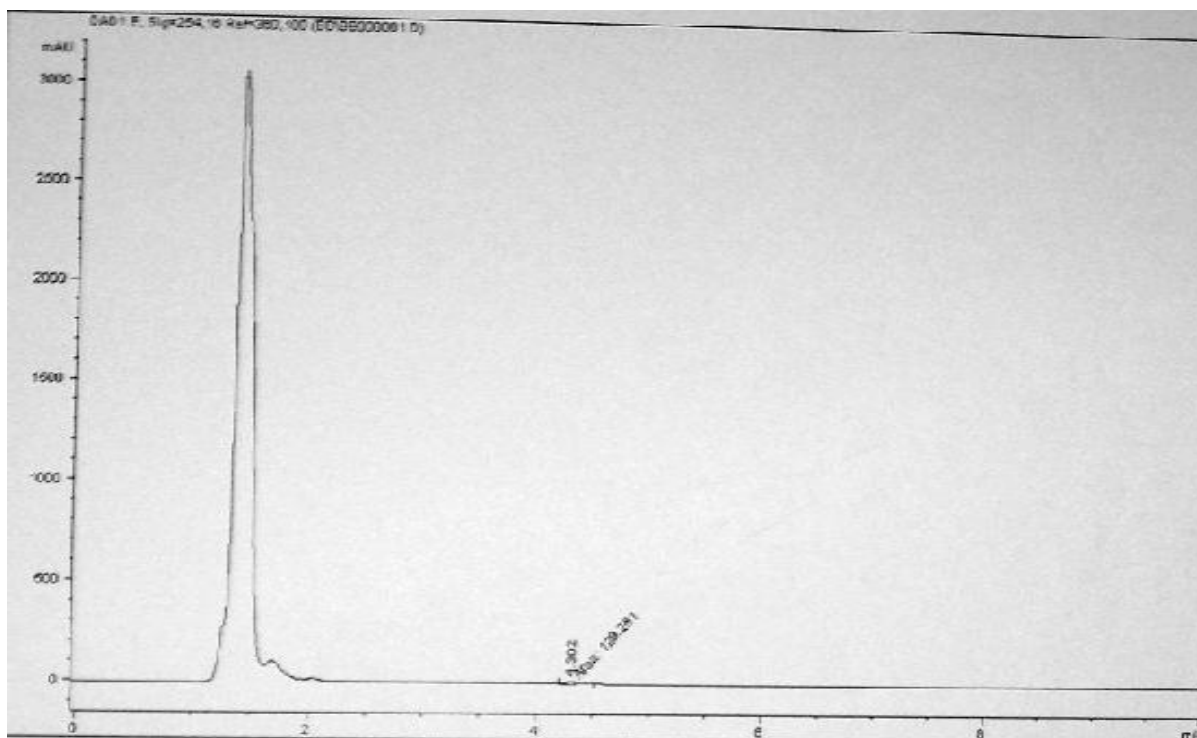


Fig 23 : Limite de détection du PB par la méthode utilisée

III-6/ LA LIMITE DE QUANTIFICATION:

Elle se déduit de la limite de détection dont elle vaut environ 3 fois la valeur. La limite de quantification (LOQ) est estimée à 1,5 ng/μl.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons tenté d'apporter une contribution à l'analyse du phénobarbital dans le sang. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes techniques analytiques, comme la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), outils analytiques connus pour leurs grandes efficacités et fiabilités.

Les résultats obtenus, dans le cadre de notre travail, nous permettent de conclure que:

1- La méthode C.L.H.P a pu séparer le phénobarbital des composés endogènes du sang, et ce en optimisant les conditions de séparation chromatographiques comme :

- La composition de la phase mobile, constituée de 20% Acétonitrile + 20% Méthanol + 60% Tampon Acétate d'ammonium ;
- l'extraction à l'aide d'éther diéthylique à PH = 4 ;
- la colonne chromatographique, une microbondapack C18 zorbax ;
- un système de détection UV à barrettes diode à 254 nm.

2- L'extraction liquide liquide du xénobiotique à partir de la matrice biologique (sang dans notre cas) a été optimisée en choisissant un pH=4 et l'éther diéthylique comme solvant. Le rendement de l'extraction avoisine les 85%

3- La G.C/M.S grâce à sa haute résolution, nous a permis de séparer et d'identifier le phénobarbital dans l'extrait sanguin. Par ailleurs, il a été possible d'étalonner l'appareil avec une gamme étalons de barbituriques de concentrations s'étalant entre les domaines thérapeutique et létal.

4- La méthode C.L.H.P a été validée pour le phénobarbital à 254 nm. En effet, la spécificité, la linéarité (domaine de concentrations thérapeutique et létale), la répétabilité (intra et inter journée), la stabilité des solutions, la détermination des limites de détection et de quantification ont été vérifiées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Blackwell B. Psychotropic drugs in use today-the role of diazepam in medical practice. JAMA 1973;225:1637-1641
- [2] Pr Gabriel Nahas-la drogue, bilan scientifique et médical-1994-p212
- [3] Dictionnaire des Drogues et des dépendances, Denis Richard, Jean Louis Senon, Marc Valleur-2004-p83
- [4] M.J. EADIE, Br.J.Clin Pharmacol. 52 (2001) 11s-20s.
- [5] P.Kishore.K.Rajnarayama.M.S.Reddy.J.Vidyasagar.
D.R. Krishna. Arsemeittelforschung 53 (2003) 763-768.
- [6] Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 39(2005)181-186
- [7]Journal of chromatography B, 723(1999)301-305
- [8] H. levert.P.Odou.H.Robert. Biomed Chromatogr.16 (2002) 19-24.
- [9] L.A. Romanyshyn.J.K Wichmann.N.Kucharezyk.RC.Shumakev.D.Wavd.R.D. Sufia. Ther Drug Monit.16 (1994) 90-99.
- [10] Y Kouno.C.Ishikura.M.Homma.K.OKA.J.Chromatogr.622 (1993) 47-52.
- [11] M.Meyler.M.Kelly.MSmyth. Chromatographia 36 (1993) 27-32.
- [12] Y.Gomita, K.Furuno, Y.Araki, Y.Yamatogi, S.ohtawara, Am.J.Therapeutics.2 (1995) 968.
- [13] M.Moriyama, H.Domoto, S. Yamashita, K. Furuno,R. Oishi,H.Kawasaki, Y.Gomita,Acta Med. Okayama 49 (1995) 237.
- [14] M.Moriyama, S.Yamashita, K.Furuno, T.Sato, H.Domoto, Y.Yamotogi, H.Kawasaki, Y.Gomita, Jpn.J.Pharmacol.73 (1997) 191.
- [15] H.Nau, D.rating, I.Hauser, S.Koch, H.Helge, EUR.J.Clin.Pharmacol.18 (1980) 31.
- [16] C.L Devane, J.W.Simpfines, S.A.Stout, Epilepsia 32 (1991) 250.
- [17] M.Moriyama, KFuruno, R.Oishi, Y. Gomita, J. Pharm.SCI.83 (1994) 1751.
- [18] T. Ryan, J.Liq.Chrom. 17, 867 (1994)
- [19] I.Lurie, D.Cooper and I. Krall, J. Chomatogr. 629, 143 (1993).

- [20] Y. Gaillard and G. Pepin, *J Chromatogr. A* 762, 251 (1997).
- [21] O.Aloba, P.Adusumilli and A. Nigalaye, *J. Pharm. Biomed.Anal.* 9,335 (1991).
- [22] M.Lopez- Rivadulla, P. Fernandez, P. Rodriguez, A. Bermejo and L. Concheiro, *Anal.Lett.* 21, 2253 (1988)
- [23] M.Drast and L.Walter, *J.Anal. Toxicol.* 12, 322 (1988).
- [24] U. Laakkonen, A.Leinonen and L.Savonen, *Analyst* 119,2695 (1994).
- [25] R. Liu, A.Mckeehan, B. Cinnamon, G.foster, W.Bensley, J.Langner and A.Walia, *J. Forensic SCI* 39,1504(1994)
- [26] X.Hu.Y.luo and J.Feng, *Sepu.* 13, 178 (1995)
- [27] P.Gerhards and J.Szigan, *Labor Praxis* 18, 47 (1994)
- [28] B.Hall and Brodbelt, *J.Chromatogr.A.* 777, 275 (1997)
- [29] R.Voyksner, in *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, R.Cole (ED), p.323, Wiley, New York (1997).
- [30] J.Watson, in *Introduction to Mass Spectrometry*, M.Placito and M.Bioler (Eds), p.402, Lippincott-Raven, Philadelphia (1997).
- [31] L.Yang.A.Harrata and C.Lee, *Anal.Chem.* 69, 1820 (1997).