

## La dérivation en chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des antidépresseurs dans le sang et les urines

Dr. Dehimi Narimene, Pr. Lalaouna Abd El Djali

Laboratoire de chimie analytique, Université Salah Boubnider de Constantine 3

La date: 03-04-2021

### 1. Introduction

- La dépression est un trouble mental courant qui touche plus de 264 millions de personnes de tous âges dans le monde, c'est la première cause d'incapacité dans le monde qui peut conduire au suicide[1].  
- Les antidépresseurs (ATDs) sont largement utilisés pour traiter les symptômes de la maladie, mais en raison de leur marge thérapeutique étroite et de la mauvaise observance des patients souffrant de dépression, les patients souffrent souvent d'intoxications dues à un surdosage ou à une mauvaise utilisation.  
- La surveillance et le contrôle périodique de la concentration en milieu biologique s'impose, c'est dans ce contexte que les méthodes de dosage analytique interviennent.  
- Plusieurs techniques analytiques sont proposées dont la GC-MS chromatographie en phase gazeuse (couplée à la spectrométrie de masse) qui est une méthode d'identification et de dosage très efficace et qui offre beaucoup d'avantages lors du dosage des ATDs, mais ces derniers nécessitent un prétraitement spécifique pour qu'il soit dosable, la dérivation est le meilleur moyen à cause de sa rapidité, sélectivité et simplicité.

#### Objectif de l'étude :

L'objectif de ce travail est de présenter l'importance de la dérivation dans le dosage des substances médicamenteuses en milieu biologique à travers un exemple pratique réalisé par Yanru Feng et al (2019). Après une présentation des bases théoriques de la technique, l'exemple, commenté et détaillé, présentera les étapes et la démarche à suivre pour le dosage dans le sang et les urines, après dérivation, de quatre ATDs.

### 2. Dérivation

La dérivation est une technique qui permet l'analyse des composés qui ne peuvent être directement analysés par GC, par réaction chimique sur le produit à analyser, on synthétise un sous-produit dont les propriétés facilitent son analyse par chromatographie, les techniques les plus utilisées sont : La silylation, l'acylation et l'estérification.

La formation de dérivés en CPG a pour but d'obtenir :

- Des produits moins polaires des produits plus stables à la température de séparation
- De faciliter la détection (spécificité et sensibilité)
- Différenciation de composés de masses moléculaires voisines.

### 3. Exemple présenté

L'exemple présenté dans ce travail est issu d'un article intitulé :

*Analysis of four antidepressants in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry combined with sensitive and selective derivatization*

Réalisé par :

Yanru Feng, Min Zheng, Xue Zhang, Kai Kang, Weijun Kang, Kaoyi Lian, Jie Yang

Publié dans le Journal of Chromatography A; Volume 1600; Pages 33-40; 30 August 2019.

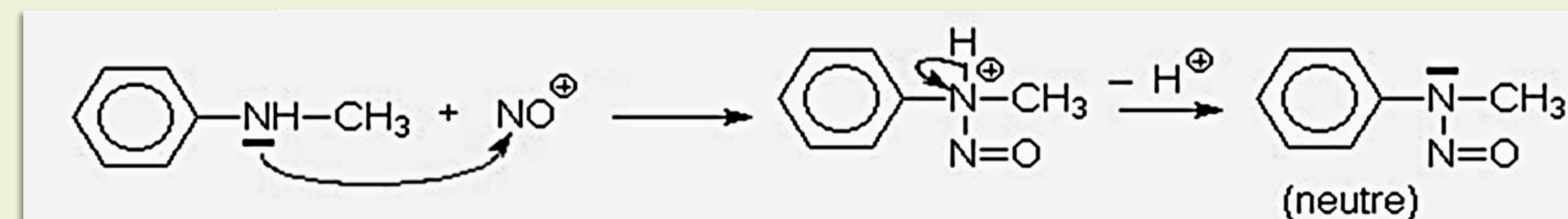
### 4. Méthode

Quatre ATDs sont dosés dans le sang et les urines des patients :

- Nortriptyline hydrochloride (Nor), Fluoxetine hydrochloride (Flu), Maprotiline hydrochloride (Map) and Paroxetine hydrochloride (Paro)

Dans ce travail, une technique innovante de dérivation est utilisée basée sur la nitrosation. Cette dernière consiste en une réaction entre une amine secondaire contenue dans le composé à doser (les quatre ATDs) et le nitrite de sodium pour former quatre dérivés de types N-nitrosamine. La nitrosation se fait en ajoutant une solution aqueuse de NaNO<sub>2</sub> (Nitrite de sodium) à une solution aqueuse froide de l'amine dans un acide dilué.

La réaction de nitrosation se fait en deux étapes :

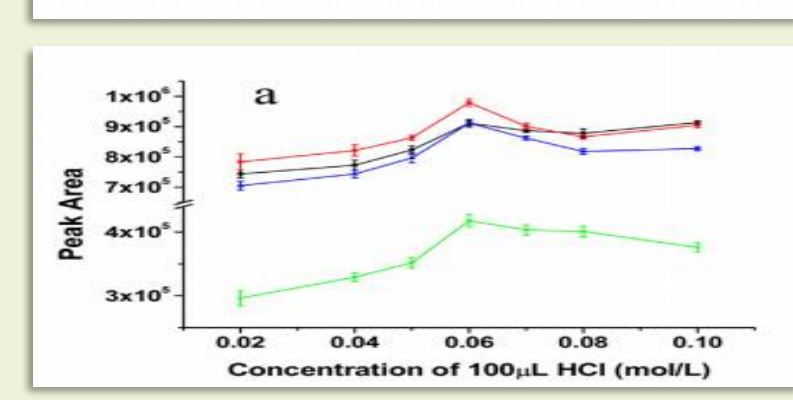


### 5. Conditions expérimentales

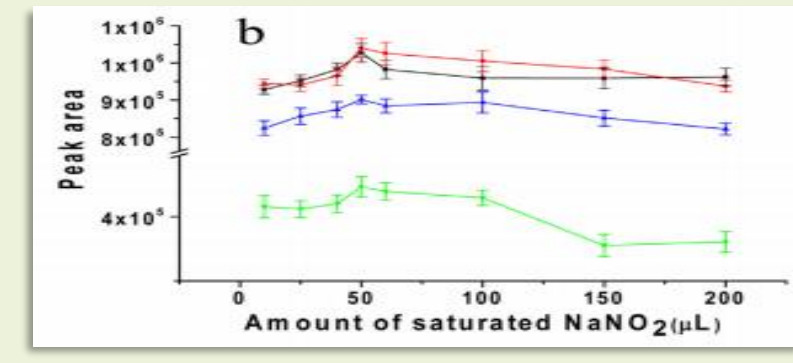
#### 5.1. Réaction de dérivation

##### Optimisation de la réaction de dérivation

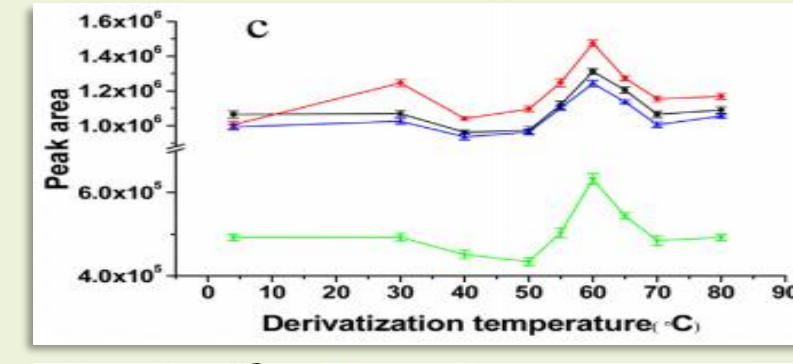
■ Flu ■ Nor ▲ Map ▼ Paro



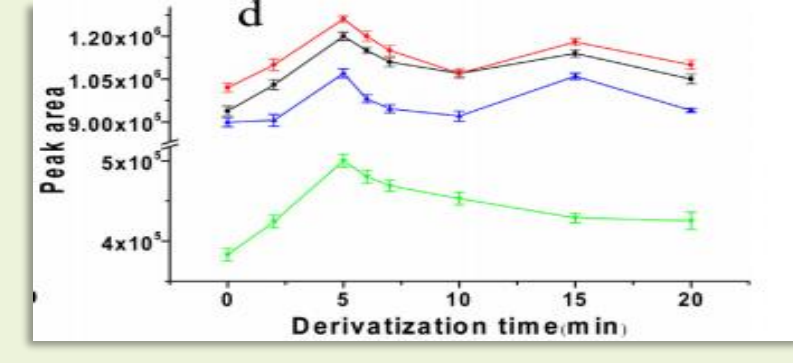
100 µl d'HCl 0,06 mol L<sup>-1</sup> ont été retenus comme condition d'acidification optimale



L'efficacité maximale de dérivation a été obtenue à 50 µL de solution saturée de nitrite de sodium



L'efficacité la plus élevée a été obtenue à 60 °C



Une bonne efficacité de dérivation a été obtenue à 5 min

##### Protocole de la dérivation

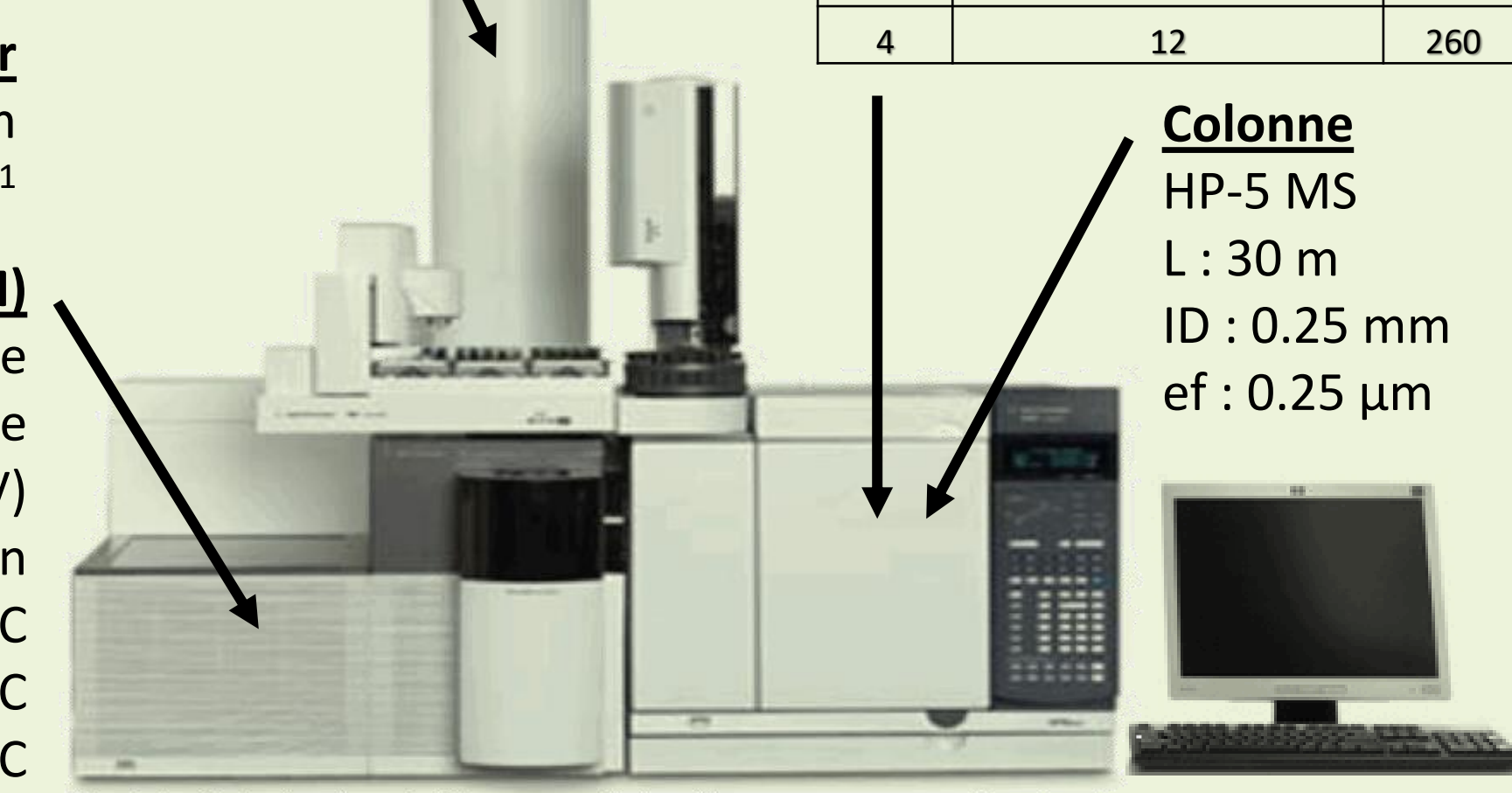
- Dans un tube de 10 mL, on ajoute 2 mL de chaque solution standard et de l'échantillon avec 100 µl d'HCl 1 mol L<sup>-1</sup>
- Après agitation, 50 µl de solution saturée de nitrite de sodium sont ajoutés.
- La solution est chauffée à 60 °C pendant 5 min.
- Après refroidissement, l'extraction est réalisée avec 2 mL de dichlorométhane.
- La solution est vortexée pendant 1.5 min.
- Après 5 min de décantation, la solution est centrifugée à 15000 rpm.
- 1,2 mL de phase organique est séché à l'azote à 50 °C.
- Le résidu est dissous dans 50 µL de dichlorométhane et placé dans un bain de glace pour empêcher la volatilisation du dichlorométhane.

#### 5.2. Analyse chromatographique par GC-SM

**Injecteur**  
Volume : 1 µl  
250 °C  
split ratio 5:1

**Gaz vecteur**  
Helium  
Débit : 1.2 mL min<sup>-1</sup>

**Spectromètre de masse (SM)**  
Quadrupole  
Ionisation : impact électronique (EI, 70 eV)  
Mode: Full scan  
ion source température : 230 °C  
MS quadrupole température : 150 °C  
MS transfer line température : 280 °C



Agilent Gas chromatograph 7890A

Tableau I. Programmation de la température du four

| Etape | Gradient de T° (°C.min <sup>-1</sup> ) | T° (°C) | Maintien (min) |
|-------|----------------------------------------|---------|----------------|
| 1     | -                                      | 130     | 0              |
| 2     | 10                                     | 240     | 2              |
| 3     | 8                                      | 250     | 0              |
| 4     | 12                                     | 260     | 10             |

**Colonne**  
HP-5 MS  
L : 30 m  
ID : 0.25 mm  
ef : 0.25 µm

GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; ID : diamètre interne ; ef : épaisseur du film

### 6. Résultats et discussion

#### 6.1. Avantages de la méthode

##### A. Rendement de la réaction

Chaque substance a réagi avec succès avec le nitrite de sodium :

- Chaque substance a réagi avec les nitrites => présence des pics des dérivés « N-Nitrosamine ».
- Absence des pics des composés non dérivés.
- Pas de composés intermédiaires ou secondaires d'où une forte intensité des pics.
- Les composés formés sont stables => un seul pic pour chaque dérivé.

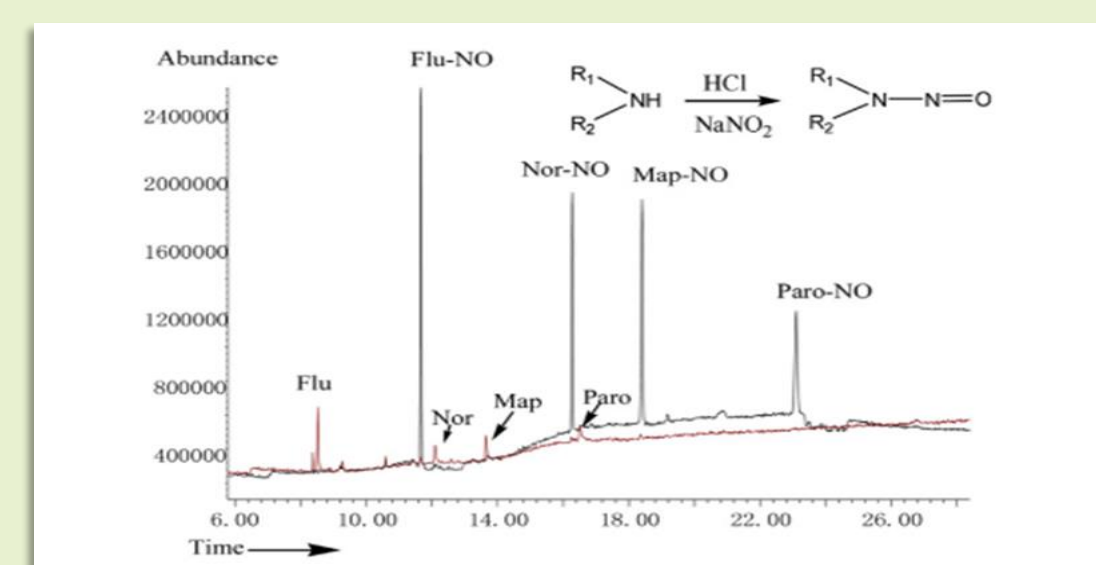


Figure 01 .Les deux chromatogrammes du Flu, Nor, Map et Paro avant et après dérivation

##### B. Amélioration de la volatilité

Les valeurs de log P montrent que la dérivation diminue la polarité et par conséquent la volatilité des substances.

Tableau I. Valeurs du log P estimées (ChemBioDraw-verion13.0.2.3021) avant (Av) et après (Ap) la dérivation.

| Log P | Flu  |      | Map  |     | Nor  |      | Paro |     |
|-------|------|------|------|-----|------|------|------|-----|
|       | Av   | Ap   | Av   | Ap  | Av   | Ap   | Av   | Ap  |
|       | 3,88 | 4,48 | 4,34 | 4,8 | 3,75 | 4,46 | 2,63 | 3,7 |

##### C. Sensibilité

Les pics chromatographiques sont plus intenses et plus fins après dérivation.

La sensibilité de la méthode a été évaluée en déterminant la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) pour les quatre ATDs.

##### D. Justesse et fidélité de la méthode

Les résultats (Tableau III) indiquent que la méthode est précise, fiable et adaptée à la détection de la Flu, du nor, de la Map et du paro dans le plasma et l'urine.

#### 6.2. Inconvénients de la méthode

##### A. Temps de l'analyse

Les valeurs des temps de rétention avant et après la dérivation montre un allongement du temps de l'analyse qui s'avère un inconvénient de la méthode suivie

Tableau IV . Valeurs des temps de rétention avant et après dérivation

| ATD  | Tr av dérivation | Tr ap dérivation |
|------|------------------|------------------|
| Flu  | 8,5              | 11,7             |
| Nor  | 12,1             | 16,2             |
| Map  | 13,7             | 18,3             |
| Paro | 16,6             | 23,2             |

##### B. Dangerosité des réactifs employés

Les nitrosamines sont probablement cancérigènes [6].

Tableau V . Valeurs de la CMR (cancérogène, mutagène et reprotoxique) estimées (ChemBioDraw-verion13.0.2.3021) avant (Av) et après (Ap) la dérivation.

|        | Flu    | Map    | Nor    | Paro   |
|--------|--------|--------|--------|--------|
| CMR Av | 7,9984 | 8,8354 | 8,5996 | 8,8464 |
| CMR Ap | 8,5455 | 9,3825 | 9,1467 | 9,3935 |

Tableau III . Justesse et précision de la méthode de dosage des trois concentrations du Flu, Nor, Map et Paro dans l'urine et le plasma

| Analyte | C théoriques (µg L <sup>-1</sup> ) | C mesurée (µg L <sup>-1</sup> ) (n=3) | Recouvrement (%) | RSD (%)          |                  |
|---------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|         |                                    |                                       |                  | Intra-jour (n=6) | inter-jour (n=6) |
| Plasma  |                                    |                                       |                  |                  |                  |
| Flu     | 2                                  | 2,13±0,02                             | 105,47           | 5,26             | 5,87             |
|         | 20                                 | 17,64±0,07                            | 88,2             | 3,88             | 6,78             |
|         | 65                                 | 57,35±0,09                            | 88,22            | 3,22             | 4,28             |
| Nor     | 2                                  | 2,21±0,24                             | 110,34           | 4,97             | 5,89             |
|         | 20                                 | 19,53±0,41                            | 99,58            | 3,62             | 7,87             |
|         | 65                                 | 55,92±0,66                            | 86,03            | 2,03             | 5,74             |
| Map     | 5                                  | 4,94±0,80                             | 98,84            | 5,12             | 6,12             |
|         | 50                                 | 42,94±2,07                            | 85,88            | 4,06             | 7,03             |
|         | 162,5                              | 154,13±0,88                           | 94,85            | 3                | 4,92             |
| Paro    | 10                                 | 11,82±1,20                            | 118,21           | 4,31             | 7,01             |
|         | 100                                | 93,50±2,32                            | 93,5             | 5,28             | 6,73             |
|         | 325                                | 320,28±5,83                           | 98,55            | 4,71             | 5,74             |
| Urine   |                                    |                                       |                  |                  |                  |
| Flu     | 2                                  | 2,16±0,02                             | 108,08           | 3,11             | 3,9              |
|         | 20                                 | 18,83±0,07                            | 94,17            | 4,64             | 6,09             |
|         | 65                                 | 60,07±0,09                            | 92,42            | 3,63             | 4,84             |
| Nor     | 2                                  | 2,17±0,05                             | 108,73           | 2,7              | 3,33             |
|         | 20                                 | 19,55±0,69                            | 97,73            | 1,08             | 1,82             |
|         | 65                                 | 57,64±0,25                            | 88,67            | 3,72             | 4,48             |
| Map     | 5                                  | 4,53±0,57                             | 90,69            | 3,79             | 4,03             |
|         | 50                                 | 40,32±2,01                            | 80,64            | 1,78             | 2,82             |
|         | 162,5                              | 134,96±0,96                           | 83,05            | 3,68             | 3,8              |
| Paro    | 10                                 | 11,31±1,42                            | 113,07           | 4,93             | 5,29             |
|         | 100                                | 88,91±1,29                            | 88,91            | 3,3              | 4,39             |
|         | 325                                | 342,58±4,20                           | 105,41           | 2                | 3,78             |

### 7. Conclusion

L'exemple présenté montre l'intérêt et l'importance de dérivation. La technique offre plusieurs avantages :

- Peu couteuse : elle ne nécessite pas des réactifs chers (le nitrite de sodium qualité ACS reagent. Ph. Eur. >99% de "Sigma-Aldrich" coûte 27.60 euro/100 g).
- Simple et rapide : elle ne nécessite pas un prétraitement des échantillons biologiques complexes (sang et urine).
- Très sensible : les limites de détection et de dosage sont très basses de l'ordre de 1 microg/L.
- Spécifique : la réaction de dérivation améliore la spécificité de la méthode par la formation des dérivés N-nitrosamines.

La méthode présente, néanmoins, quelques inconvénients comme l'allongement du temps d'analyse et la toxicité des dérivés formés qui nécessite de prendre des précautions particulières

### 8. Références bibliographiques

- Principaux repères sur la dépression [Internet]. [cité 25 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/depression>
- Feng Y, Zheng M, Zhang X, Kang K, Kang W, Lian K, et al. Analysis of four antidepressants in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry combined with sensitive and selective derivatization. Journal of Chromatography A. août 2019;1600:33-40
- Gao G, Li S, Li S, Wang Y, Zhao P, Zhang X, et al. A combination of computational-experimental study on metal-organic frameworks MIL-53(AI) as sorbent for simultaneous determination of estrogens and glucocorticoids in water and urine samples by dispersive micro-solid-phase extraction coupled to UPLC-MS/MS. Talanta. avr 2018;180:358-67.
- Chaves AR, Chiericato Júnior G, Queiroz MEC. Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples. Journal of Chromatography B. mars 2009;877(7):587-93.
- Lian K, Zhang P, Niu L, Bi S, Liu S, Jiang L, et al. A novel derivatization approach for determination of ketamine in urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. nov 2012;1264:104-9.
- OMS | Note d'information de l'OMS [Internet]. WHO. World Health Organization; [cité 25 mars 2021]. Disponible sur: [http://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote\\_nitrosamine-impurities/fr/](http://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_nitrosamine-impurities/fr/)
- Blau K, Halket JM, éditeurs. Handbook of derivatives for chromatography. 2nd ed. Chichester : New York: Wiley; 1993. 369 p.