

UNIVERSITE DE LIEGE

Faculté de Médecine
Département de Pharmacie



Service de Chimie Analytique
Professeur Ph. HUBERT

**OPTIMISATION ET VALIDATION
DE DEUX MÉTHODES DE DOSAGE
DANS LE CADRE DE LA MISE AU POINT
D'UN DISPOSITIF INTRA-UTÉRIN
À LIBÉRATION HORMONALE CONTRÔLÉE**

Cédric Hubert

Licencié en Sciences Chimiques

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
D.E.A. en Sciences Pharmaceutiques
Année Académique 2005-2006

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier vivement et chaleureusement Monsieur le Professeur Philippe Hubert pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Mais plus encore, je tiens à lui témoigner ma sincère gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée ainsi que pour les conseils, les idées et le soutien constant dont j'ai pu bénéficier. J'ai pu apprécier sa rigueur scientifique et sa grande compétence tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur Robert Lejeune, Docteur en Sciences Pharmaceutiques, pour ses conseils judicieux, son expérience et sa disponibilité.

Il m'est aussi agréable de remercier la société Mithra Pharmaceuticals S.A. pour leur support financier ainsi que pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire.

Plus particulièrement, je remercie vivement Monsieur Francis Frankenne, Docteur en Sciences Chimiques, pour l'écoute et le soutien constant dont il m'a fait profiter tout au long de notre collaboration.

Par l'intermédiaire de ces remerciements, je tiens à témoigner ma gratitude à Monsieur Bruno Streel, Maître en Sciences Pharmaceutiques, Directeur de la société Galephar M/F S.A., sans qui une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée. Je lui exprime également ma reconnaissance pour les idées et les conseils judicieux qu'il m'a dispensés. Pour ces mêmes raisons, il m'est également agréable de remercier Madame Renilde Sibenaler de la société SMB.

Mes remerciements s'adressent également à Madame et Messieurs les Membres du Jury, qui me font l'honneur de juger ce mémoire.

Il me tient également à cœur de remercier chaleureusement tous les membres du Services de Chimie Analytique pour leur aide, leur soutien et leur disponibilité.

Enfin, je tiens à adresser mes sincères remerciements à toute ma famille et en particulier à ma copine, Anaïs, qui m'ont non seulement soutenu, mais également aidé durant la réalisation et la rédaction de ce mémoire. Leurs encouragements constants ont été pour moi une réelle source de motivation.

Cédric Hubert.

Sommaire

Sommaire

<i>Remerciements</i>	5
<i>Sommaire</i>	8
<i>Introduction</i>	12
<i>I.1. La polarographie</i> ^[2,3]	14
<i>I.1.1. Le polarographe</i> ^[3]	15
<i>I.1.2. Les électrodes</i> ^[3-4]	16
<i>I.1.2.1. L'électrode de travail</i>	17
<i>I.1.2.1.1. Le mode DME (Dropping Mercury Electrode)</i>	17
<i>I.1.2.1.2. Le mode SMDE (Static Mercury Drop Electrode)</i>	17
<i>I.1.2.1.3. Le mode HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode)</i>	18
<i>I.1.2.2. L'électrode de référence</i>	18
<i>I.1.2.3. L'électrode auxiliaire</i>	18
<i>I.1.3. Principe de la polarographie</i> ^[3-5]	18
<i>I.1.4. Les différentes techniques polarographiques</i> ^[3-5]	20
<i>I.1.4.1. La polarographie conventionnelle</i>	20
<i>I.1.4.2. La polarographie à tension sinusoïdale surimposée</i>	20
<i>I.1.4.3. La polarographie impulsionnelle normale et impulsionnelle différentielle</i>	21
<i>I.1.4.4. La redissolution (stripping) anodique ou cathodique</i>	23
<i>I.2. La bioanalyse</i>	24
<i>I.2.1. La préparation des échantillons biologiques</i> ^[6-13]	24
<i>I.2.1.1. Le couplage SPE – LC</i>	25
<i>I.2.1.1.1. Le couplage « off-line »</i>	27
<i>I.2.1.1.2. Le couplage « at-line »</i>	28
<i>I.2.1.1.3. Le couplage « on-line »</i>	28
<i>I.2.1.2. Les phases d'extraction en SPE</i>	28
<i>I.2.2. L'analyse des échantillons biologiques</i> ^[13-19]	29
<i>I.2.2.1. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)</i>	29
<i>I.2.2.1.1. Le concept de l'APCI</i>	30
<i>I.2.2.2. L'analyseur : le quadripôle</i>	31
<i>I.2.2.2.1. Le concept de l'analyseur quadripôle</i>	31
<i>I.2.2.2.2. Le couplage MS/MS (le triple quadripôle)</i>	32
<i>I.3. La validation des méthodes analytiques</i> ^[20-25]	33
<i>Buts du travail</i>	39

1. Matériels et méthodes	42
1.1. Dosage polarographique.....	42
1.1.1. Extraction de l'étain en phase aqueuse.....	42
1.1.2. L'analyse polarographique.....	43
1.1.3. Paramètres finaux de la méthode polarographique.....	43
1.1.4. Validation de la méthode.....	44
1.1.4.1. Préparation des standards de calibration (SC).....	45
1.1.4.2. Préparation des standards de validation (SV).....	45
1.1.5. Réactifs généraux.....	46
1.1.6. Autre équipement.....	46
1.2. Dosage plasmatique	46
1.2.1. Préparation des échantillons.....	46
1.2.2. Extraction sur phase solide.....	47
1.2.3. Séparation par chromatographie liquide.....	50
1.2.4. Détection par spectrométrie de masse	51
2. Spéciation et dosage de l'étain stannique	53
2.1. Extraction en milieu aqueux des ions stanneux et stanniques	54
2.1.1. L'extraction liquide / liquide	54
2.1.2. L'influence du procédé d'extraction.....	56
2.1.3. Optimisation du temps nécessaire à une extraction quantitative.....	57
2.2. L'électrolyte de support	59
2.2.1. Le complexant.....	59
2.2.1.1. Les ions fluorures	59
2.2.1.2. Les ions malonates.....	61
2.2.2. L'influence du pH sur l'intensité de la réponse.....	62
2.3. Choix du mode de travail.....	64
2.4. Validation de la méthode de dosage	67
2.4.1. La justesse de la méthode.....	72
2.4.2. La fidélité de la méthode.....	72
2.4.3. La linéarité des résultats.....	73
2.4.4. Les limites de quantification et de détection.....	74
2.5. Perspectives envisagées afin d'améliorer la méthode de dosage	74
2.6. Conclusions	75
3. Dosage plasmatique du lévonorgestrel	78
3.1. Optimisation de l'extraction sur phase solide.....	79
3.1.1. Présélection du support d'extraction par LC/DAD.....	79
3.1.2. Sélection du support d'extraction en milieu plasmatique	80
3.2. Mise au point du couplage LC/MS-MS	85
3.2.1. Choix de la phase mobile et de la température du quartz	85
3.2.2. Choix de la transition suivie en MS-MS.....	91
3.3. Prévalidation du dosage SPE/LC/MS-MS	93
3.4. Conclusions	96

<i>Conclusions et perspectives</i>	98
<i>C.1. Conclusions</i>	98
<i>C.2. Perspectives</i>	101
<i>Bibliographie</i>	104
<i>Annexe A : Monographie du lévonorgestrel^[62]</i>	111
<i>Annexe B : Données de validation du dosage de l'étain stannique</i>	114
<i>Annexe C : Données de récupération et données de validation du dosage plasmatique du LNG</i>	117

Introduction

Introduction

Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement d'un dispositif intra-utérin (IUD) générique à libération hormonale prolongée. Au terme du développement, un dossier de mise sur le marché sera introduit auprès des autorités compétentes du pays dans lequel ce dispositif sera commercialisé. Ceci constitue, bien évidemment, l'étape ultime du développement d'un produit pharmaceutique. Ce dossier doit contenir la description et les informations résultantes du développement de la spécialité pharmaceutique allant de l'élaboration du dispositif en lui-même à son contrôle lors de la libération du produit fini, en passant par des étapes telles que la mise au point galénique, les études pharmacologiques ou de biodisponibilité, l'étude toxicologique, l'étude de stabilité,... Sans oublier la partie analytique qui constitue le domaine que nous abordons dans ce mémoire.

Le dispositif intra-utérin étudié au cours notre travail est essentiellement constitué de quatre parties (figure 1) :

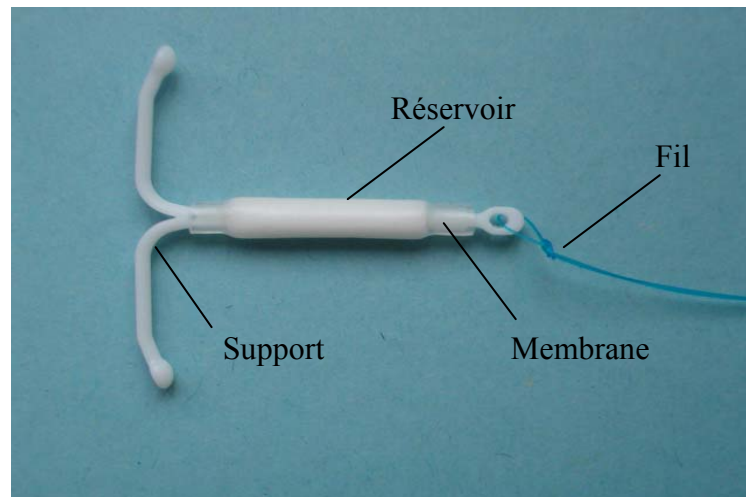


Figure 1 : Photographie de l'IUD.

- **Le support en forme de T**

Il est constitué de polyéthylène renfermant 22 % de sulfate de baryum (agent radio-opaque). Comme son nom l'indique, il sert de support à l'ensemble membrane / réservoir contenant le principe actif. Sa charge en sulfate de baryum va permettre au gynécologue, par l'intermédiaire d'une radiographie, de vérifier si le dispositif est correctement positionné dans l'utérus.

- **Le réservoir**

Il se compose d'un mélange 50/50 de polydiméthylsiloxane catalysé à l'étain et du principe actif, le lévonorgestrel (LNG, figure 2, Annexe A). Il constitue le « cœur » du dispositif. En effet, la quantité nécessaire à la libération contrôlée de l'hormone sur une période de 5 ans y est totalement contenue.

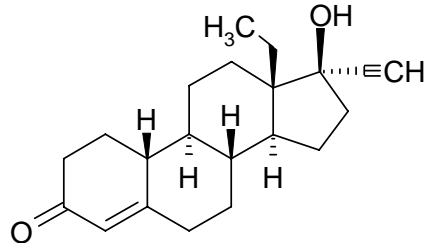


Figure 2 : Structure du lévonorgestrel.

- **La membrane**

Elle est formée exclusivement de polydiméthylsiloxane catalysé au platine. Cette partie du dispositif permet de contrôler la libération de l'hormone au sein de la cavité utérine. Afin de délivrer une quantité journalière définie, un développement galénique, basé sur la longueur du réservoir et essentiellement sur l'épaisseur de la paroi de la membrane, a été conduit.

- **Le fil**

C'est un fil de polyamide muni d'un colorant bleu. Ainsi que le montre la figure 1, il est directement attaché sur la partie inférieure du support afin de permettre le retrait aisé du stérilet en fin d'utilisation ou en cas de nécessité.

D'autres accessoires tels que le tube d'insertion, le poussoir ou encore l'anneau font parties du dispositif commercial.

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés particulièrement à deux aspects analytiques complexes du développement du dispositif intra-utérin : la synthèse du réservoir contenant le LNG et le dosage plasmatique de ce dernier qui sera réalisé au terme de l'étude clinique du dispositif.

Le polydiméthylsiloxane contenu dans le réservoir se présente initialement en un kit de trois parties : la base siliconée, l'agent réticulant (le tétra-n-propyl silicate) et le catalyseur (l'octanoate d'étain). La réaction de polymérisation est basée sur une réaction d'addition. Un mélange correctement proportionné de catalyseur, d'agent réticulant et d'heptane (rhéofluidifiant) est ajouté à température ambiante avec un autre mélange de base siliconée et d'hormones, et agité pendant quelques minutes. Le tout est ensuite moulé et pressé à 80 °C et sous une pression de 100 bars. Le catalyseur de la réaction constitue un des éléments clés de la polymérisation de par son espèce active, l'étain stanneux (Sn(II)). Celle-ci est complexée par l'octanoate afin de rester sous sa forme réduite et d'éviter son oxydation en étain stannique (Sn(IV)). Cette modification du

catalyseur empêcherait par la suite son utilisation lors de la polymérisation. A la lumière de cette explication, il devient évident que la vérification de l'état de dégradation du catalyseur avant son mélange avec les autres constituants et essentiellement avec le LNG devient capital d'un point de vue économique.

Le lévonorgestrel est une substance hormonale proche de la progestérone essentiellement utilisée à des fins contraceptives ou pour le traitement des métrorragies [1]. Dans le cas d'un dispositif tel que celui envisagé dans notre travail, le mode d'action est localisé (cavité utérine) et non systémique. En conséquence, il est important de vérifier, au moyen d'une étude clinique, que cette hormone ne se retrouve pas ou peu dans la circulation générale. Pour ce faire, un dosage plasmatique permettant d'atteindre des concentrations sanguines faibles de l'ordre de quelques dizaines de pg/mL doit être développé.

Dans cette partie introductive, nous nous limitons à la présentation sommaire des aspects théoriques des techniques analytiques envisagées dans le cadre de ce mémoire. Nous nous penchons, dans un premier temps, sur la polarographie en accordant une attention particulière à la polarographie impulsionnelle différentielle. Ensuite, nous abordons les principes de l'extraction sur phase solide (SPE) ainsi que de la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Enfin, nous terminons par les aspects de validation de ces deux dosages.

I.1. La polarographie [2,3]

La polarographie est classée parmi les méthodes dites voltammétriques ou encore voltampérométriques. Ce terme englobe un ensemble de méthodes électroanalytiques basées sur l'interprétation des courbes intensité – potentiel relevées au niveau d'une (micro)électrode de travail. Le courant d'électrolyse, peu intense, ne modifie pas la composition de la solution analysée. On appelle donc polarographie une voltammétrie utilisant une (micro)électrode à goutte tombante de mercure (par exemple : la SMDE = Static Mercury Drop Electrode ou la DME = Dropping Mercury Electrode).

A l'origine, l'électrode à goutte de mercure a été développée pour étudier les variations de la tension superficielle du mercure en fonction du potentiel. Elle fut conçue par le Professeur G. Kucera à l'université Charles (Prague) vers 1900. Il suggéra à Heyrovsky d'étudier les « anomalies » qu'il avait observées lors de ses recherches sur cette électrode.

Suite à son étude de la DME, vers 1920, le chimiste tchèque Jaroslav Heyrovsky mit au point la première méthode polarographique, mais ce n'est qu'en 1925 qu'Heyrovsky et Shikata inventèrent le polarographe. En effet, cet instrument était indispensable pour l'exploitation de leur nouvelle méthode analytique. Il permettait également l'enregistrement automatique des courbes intensité – potentiel.

Dès sa découverte, la polarographie a été utilisée pour l'analyse des métaux. Elle fut ensuite employée pour l'analyse d'autres ions inorganiques. A l'époque, l'intérêt qu'on lui manifestait a grandi lorsqu'on a découvert les grandes possibilités de cette méthode dans de vastes domaines comme notamment celui de la chimie organique.

Entre 1955 et 1965, l'enthousiasme porté à cette méthode est retombé. En effet, les performances de la polarographie classique avaient atteint ses limites par rapport aux exigences analytiques alors que la spectrométrie d'absorption atomique (AAS) connaissait un franc succès pour le dosage des éléments inorganiques et ce, notamment, grâce à sa sélectivité très élevée et à sa bonne sensibilité. De plus, c'est vers la fin de cette même période que, la chromatographie en phase gazeuse a commencé à remporter un vif succès pour le dosage des composés organiques.

Néanmoins, la polarographie a pu s'adapter assez rapidement avec l'essor fulgurant de l'électronique moderne. Ainsi, de nouvelles techniques ont été mises au point : polarographie à tension sinusoïdale surimposée, polarographie à ondes carrées polarographie impulsionnelle normale et impulsionnelle différentielle. Tout en repoussant fortement les limites de détection, ces techniques ont permis de considérer l'étude de nouveaux paramètres essentiels à l'interprétation des mécanismes réactionnels.

Pour ces raisons, la polarographie reste à l'heure actuelle, une technique très intéressante. Celle-ci est rapide, sensible, peu coûteuse et appropriée à de nombreux domaines de la chimie analytique. En effet, elle offre une grande flexibilité d'utilisation en microanalyse, pouvant atteindre du point de vue quantitatif des concentrations extrêmement faibles. De plus, cette technique permet la spéciation, problème qui nous concerne dans le cadre de notre travail. Enfin, la technique est tout à fait adaptable aux analyses de routine ou aux déterminations automatisées.

I.1.1. Le polarographe [3]

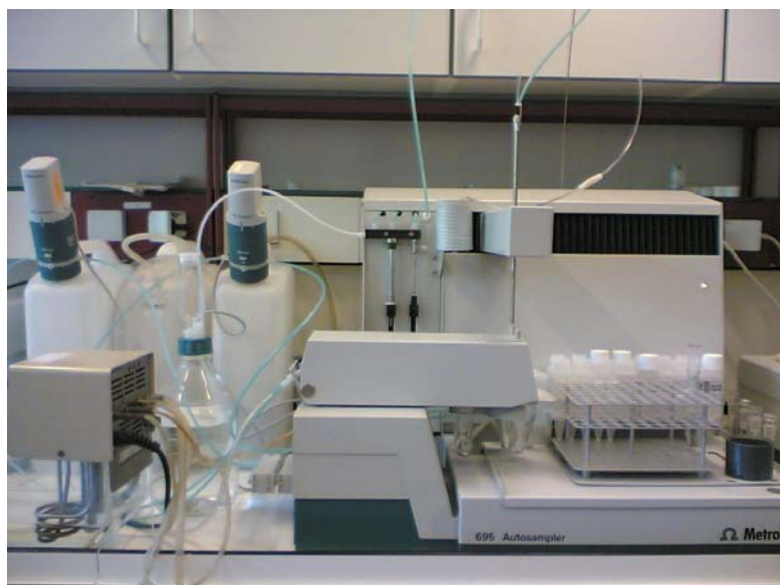


Figure 3 : Photographie du polarographe utilisé lors de cette étude.

De nombreux appareils commerciaux très sensibles et très précis, tel celui que nous avons utilisé (figure 3), permettent l'obtention des courbes polarographiques de manière automatisée. Les polarographes modernes se composent principalement d'une cellule polarographique et d'un potentiostat. Ce dernier impose une différence de potentiel déterminée entre une électrode de travail et une électrode de référence afin de quantifier le courant d'électrolyse qui circule entre l'électrode de travail et une électrode auxiliaire. Nous présenterons ultérieurement ces différentes électrodes.

Les systèmes potentiostatiques à trois électrodes (figure 4) sont compatibles avec des milieux peu conducteurs, peu chargés en sels ou préparés dans des solvants à faible constante diélectrique.

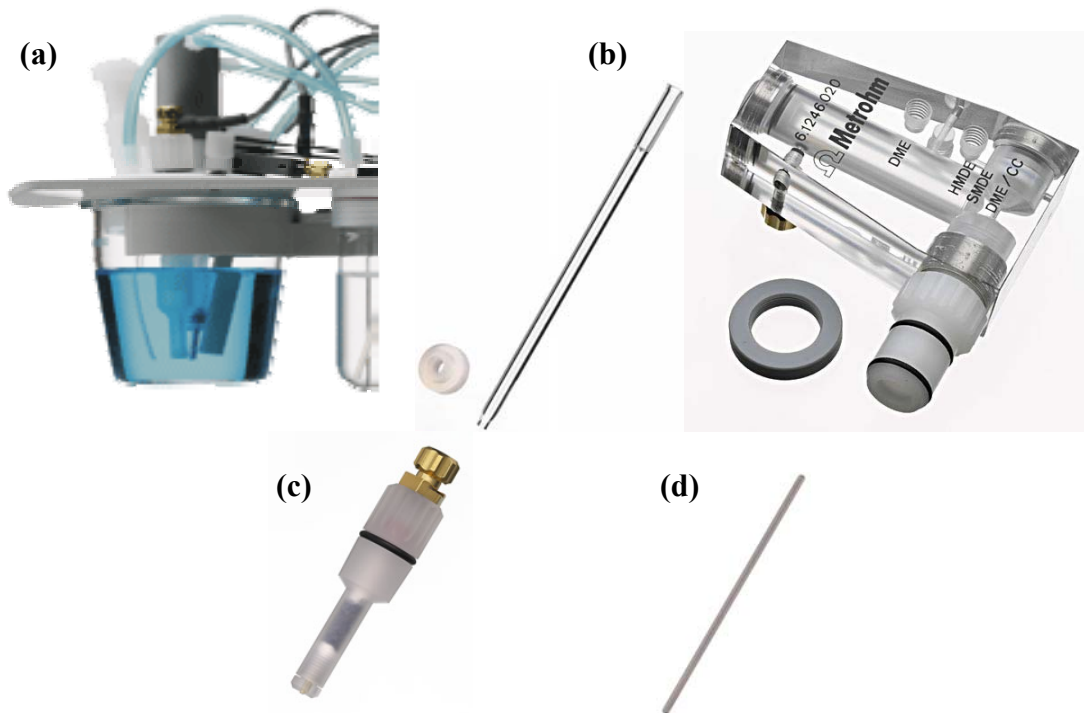


Figure 4 : Cellule polarographique accompagnée des trois électrodes composant le système potentiostatique. (a) La cellule, (b) l'électrode de travail, (c) l'électrode de référence et (d) l'électrode auxiliaire.

1.1.2. Les électrodes ^[3-4]

Comme nous venons de le mentionner, la cellule polarographique se compose de trois électrodes de types différents. L'électrode de travail, l'électrode de référence et l'électrode auxiliaire.

I.1.2.1. L'électrode de travail

En polarographie, l'électrode de travail est constituée principalement d'un réservoir de mercure surplombant un capillaire. Celui-ci permet de débiter, par l'intermédiaire d'une pression suffisante d'azote, une goutte de mercure. Trois modes sont généralement utilisés.

I.1.2.1.1. Le mode DME (Dropping Mercury Electrode)

C'est le mode classique en polarographie. Le mercure tombe goutte à goutte à un rythme contrôlé. Il est le plus utilisé en analyse polarographique et permet d'appliquer des potentiels très négatifs avant d'observer la réduction des protons contrairement aux électrodes solides. Sa limitation principale vient du fait que l'oxydation du mercure limite rapidement l'utilisation de tensions positives. Cependant, on peut facilement exploiter une échelle de potentiel allant de + 0,2 V à - 1,8 V par rapport à E.C.S. (E.C.S. = électrode au calomel saturé, électrode de référence).

Les électrodes de travail au mercure se sont bien différenciées des autres électrodes conductrices solides par leurs propriétés particulières. Les principaux avantages de l'utilisation d'électrode au mercure sont :

- le mercure est liquide à température ordinaire,
- le renouvellement des fines gouttes de mercure au bout du fin capillaire permet d'obtenir une microélectrode très reproductible. De plus, à chaque goutte de mercure correspond constamment une nouvelle électrode, ne gardant pas mémoire du phénomène électrochimique qui a affecté les gouttes précédentes. Ceci permet d'obtenir des courbes reproductibles,
- le mercure peut former des amalgames avec de nombreux métaux,
- le mercure reste inaltéré en milieu acide et basique,
- il est possible de relever une courbe intensité – potentiel d'espèces difficilement réductibles,
- enfin, ce type d'électrode est instantanément polarisable avec des courants très faibles. Seule une petite partie de la substance électroactive subit la réaction électrochimique. La concentration reste donc inchangée. Ainsi, l'électrolyse peut être répétée un grand nombre de fois avec une même solution.

I.1.2.1.2. Le mode SMDE (Static Mercury Drop Electrode)

Ce mode est utilisé pour les analyses polarographiques directes. Des microvalves qui contrôlent l'écoulement du mercure sont montées directement sur le capillaire. Pendant la mesure, la surface de la goutte de mercure reste constante et statique malgré qu'elle soit remplacée régulièrement (une à deux fois par seconde) comme dans le cas du mode DME.

Le mode SMDE permet l'établissement d'une ligne de base plus stable que dans le cas du mode DME, ce qui permet une augmentation du rapport signal sur bruit. Malheureusement, l'intensité du signal enregistré par l'intermédiaire de ce mode est généralement plus faible qu'en DME.

I.1.2.1.3. Le mode HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode)

Ce mode utilise une goutte de mercure suspendue au capillaire en verre, à laquelle est imprimé tout le balayage de tension.

Ce mode à goutte pendante est spécialement utilisé dans les méthodes voltammétriques de redissolution et dans la voltammétrie cyclique.

Chaque nouvelle mesure est réalisée avec une « nouvelle » électrode, c'est-à-dire avec une goutte fraîche de mercure. Le principal atout de l'HMDE est donc la persistance de l'électrode pendant l'ensemble du processus. Ceci permet de réaliser une préconcentration avant la mesure et donc d'améliorer la sensibilité de la méthode. Cette électrode est surtout utilisée pour le dosage des traces tant organiques qu'inorganiques.

I.1.2.2. L'électrode de référence

C'est une électrode dont le potentiel est remarquablement stable même lorsqu'elle débite de faibles courants. Comme son nom l'indique, elle sert de référence au potentiostat afin d'appliquer une différence de potentiel exacte entre cette électrode et l'électrode de travail, et ainsi de faire varier de façon exacte et connue le potentiel appliqué à l'électrode de travail. Par le passé, l'électrode au calomel saturé était la plus souvent utilisée. Elle est constituée d'une solution de KCl saturé en Hg_2Cl_2 en contact avec du mercure. Actuellement, l'électrode au colomel saturé est remplacée par l'électrode d'argent en raison de la consommation déjà élevée de mercure au sein de l'électrode multi-mode et de sa grande toxicité.

I.1.2.3. L'électrode auxiliaire

Celle-ci sert à boucler le circuit et est constituée d'un barreau de platine ou de carbone.

I.1.3. Principe de la polarographie^[3-5]

Le principe même de la polarographie est le suivant : dans une cellule d'électrolyse, trois électrodes sont disposées et plongent dans la solution à étudier. Les trois électrodes sont comme nous venons de le voir : une électrode de référence, une électrode auxiliaire et une électrode de travail, en général une électrode à goutte de mercure. Un potentiel décroissant est appliqué au niveau de la goutte de mercure, ce qui permet l'observation de l'intensité d'un courant dû à l'oxydation ou à la réduction des composés présents dans le milieu en fonction de ce potentiel appliqué.

En présence d'un composé électroactif dans la solution, le courant augmente rapidement lorsque le potentiel arrive à une valeur seuil capable de réduire ou oxyder la substance. La courbe obtenue se présente sous une forme sigmoïdale (une courbe en « S ») qui est appelée vague polarographique. La hauteur de la vague est proportionnelle à la concentration et le potentiel de la vague est représentatif du composé électrolysé. Ce potentiel est défini par le « potentiel de demi-vague » ou « potentiel de demi-palier » c'est-à-dire le potentiel auquel le courant atteint la moitié de sa valeur limite.

La relation d'Ilkovic (1) permet de déterminer l'intensité du courant résultant de la réduction ou de l'oxydation de l'espèce électroactive :

$$i_d = 605 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \quad (1)$$

Où i_d = courant de diffusion durant la vie de la goutte (μA)
605 = constante tenant compte de la valeur de π , de la constante de Faraday et de la densité du mercure
 n = nombre d'électrons échangés
 D = coefficient de diffusion du dépolarisant (cm^2/sec)
 C = concentration en dépolarisant (mmol/L)
 m = masse de mercure s'écoulant à travers le capillaire (mg/sec)
 t = temps de vie d'une goutte (s)

De par cette équation, on voit qu'à température constante, pour une substance dans un milieu donné, la valeur du courant limite de diffusion obtenue avec un capillaire donné débitant sous une pression constante de mercure est proportionnelle à sa concentration.

Il est donc possible non seulement d'identifier mais aussi de déterminer la concentration de quelques ou toutes les substances oxydables ou réductibles présentes dans une solution. De cette manière, une solution peut être analysée de façon quantitative et qualitative. Dans certains cas favorables, il est possible de détecter et d'identifier 5 à 6 substances présentes dans une solution à partir d'une seule courbe intensité - potentiel. La méthode est adaptée pour les petites concentrations (de 10^{-2} M à 10^{-7} M selon les cas) et le volume requis pour l'analyse peut être faible. De plus, la méthode est tout aussi applicable à la majorité des éléments inorganiques qu'à la détermination d'une grande variété de substances organiques.

Il peut être parfois difficile de séparer certains mélanges dans les milieux conventionnels. C'est pourquoi on fait appel à des complexants tels que l'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA), l'ammoniac (NH_3), l'ion cyanure (CN^-), etc... En complexant un ion, son potentiel de demi-vague polarographique est rejeté vers les potentiels plus négatifs. Ce potentiel est d'autant plus déplacé que le complexe formé est stable. Cette propriété des complexants peut également être mise à profit pour la spéciation de substances dont les formes oxydées et réduites sont caractérisées par des potentiels proches mais par des constantes d'instabilité très différentes. Le rejet vers des potentiels plus négatifs de la vague de la forme la plus complexée permet la spéciation.

Il faut également ajouter que l'élimination de l'oxygène dissout dans la solution est indispensable. En effet, la réduction de l'oxygène se traduit par la formation de deux vagues polarographiques, l'une réversible à -0,2 V, l'autre irréversible vers -1,0 V. Ces deux vagues réduisent donc considérablement le domaine d'analyse en termes de potentiel. L'oxygène peut en outre altérer la réponse quantitative d'un élément analysé. Pour ce faire, le barbotage d'azote (le plus fréquemment utilisé pour des raisons budgétaires) ou d'un gaz inerte permet d'éliminer toute trace d'oxygène.

I.1.4. Les différentes techniques polarographiques [3-5]

Dans cette partie, nous présentons les principales techniques polarographiques utilisées. Nous nous attardons plus particulièrement sur la polarographie impulsionnelle différentielle, technique que nous comptons utiliser lors de cette étude.

I.1.4.1. La polarographie conventionnelle

Dans la polarographie classique (ou D.C. : direct current polarography), un potentiel qui augmente linéairement et lentement avec le temps (2 à 10 mV/s) est appliqué à l'électrode de travail. Le courant résultant est alors mesuré. Le polarogramme obtenu montre le courant mesuré en fonction du potentiel appliqué.

L'électrode de travail en polarographie conventionnelle est une électrode à goutte tombante de mercure (DME) utilisée avec une électrode de référence.

Dans le cas particulier de la polarographie D.C.T. (direct current tast), une sensibilité se situant vers 10^{-5} M est atteinte. La polarographie DCT permet de n'enregistrer le courant que pendant une courte période (en fin de vie de la goutte) contrairement à la polarographie conventionnelle où le courant est enregistré pendant toute la vie de la goutte.

La résolution de la polarographie DC est de 100 mV si une réaction biélectronique est considérée. Ce pouvoir de résolution permet l'identification de 2 composés à condition que leur potentiel de demi-vague soit séparé de 150 à 200 mV. De plus, dans le cas des phénomènes réversibles, le potentiel de demi-vague est identique au potentiel normal. Il est donc possible de mettre cette propriété à profit, lorsqu'une substance présente plusieurs étages d'oxydation caractérisés par des potentiels normaux différents, afin de faire de la spéciation.

I.1.4.2. La polarographie à tension sinusoïdale surimposée

Le principe de la polarographie à tension sinusoïdale surimposée (ou ACP : alternating current polarography) est le suivant : à la tension continue utilisée en polarographie classique, on surimpose une tension alternative sinusoïdale de petite amplitude (10 à 100 mV) et de basse fréquence (5 à 1000 Hz). Cette tension surimposée provoque un courant total traversant la cellule polarographique, qui comprend une composante continue de même type qu'en polarographie DC et une composante alternative. La composante alternative est transmise à l'enregistreur après que le courant

continu ait été filtré. Le polarogramme obtenu se présente donc sous forme de pics. Le potentiel à l'intensité maximale du pic correspondant, en très bonne approximation, au potentiel de demi vague.

Le pouvoir de résolution de cette technique (40-50mV) est de loin supérieur à celui de la polarographie classique où il devait y avoir au moins 150mV d'écart entre les potentiels de demi-vague de deux composés pour permettre leur identification. De plus, la sensibilité de la méthode est augmentée grâce à l'annulation du courant capacitif, tout en gardant le courant faradique important. Il est aussi possible de réaliser des déterminations quantitatives pour des concentrations allant de 10^{-6} à 10^{-7} M lorsque la réaction à l'électrode est réversible. Toutefois, dans le cas contraire, la sensibilité peut être réduite considérablement (jusqu'à 1/100).

I.1.4.3. La polarographie impulsionnelle normale et impulsionnelle différentielle

Ces techniques sont basées sur le principe de surimposer un signal périodique consistant en une impulsion de potentiel de forme carrée à la fin de vie de la goutte, c'est-à-dire au moment où celle-ci est la plus grosse possible et où sa surface ne varie plus.

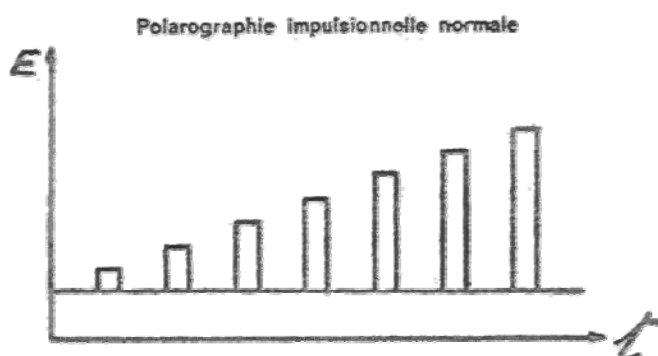


Figure 5 : Evolution du potentiel appliqué à l'électrode de travail au cours du temps pour la polarographie impulsionnelle normale.

La polarographie impulsionnelle normale (ou NPP : normal pulse polarography) a été développée par Barker et Gardener. Dans cette méthode, l'électrode de travail est soumise à un potentiel continu constant, pour lequel aucune réaction électrochimique ne se réalise, ensuite une impulsion de courte durée dont l'amplitude varie lentement et linéairement au cours du temps, est appliquée (figure 5). A la fin de l'impulsion, la mesure du courant se fait. Finalement, on provoque artificiellement la chute de la goutte pour faciliter la synchronisation des mesures.

C'est cette méthode qui sera utilisée pour établir la méthode analytique de spéciation des ions stanneux et stanniques dans l'octanoate d'étain.

I.1.4.4. La redissolution (stripping) anodique ou cathodique

L'étape initiale consiste à déposer électrochimiquement sur une électrode de mercure ou une électrode solide une partie de la substance à analyser. Ensuite la substance est redissoute (stripped) au moyen d'une variation de potentiel, en sens opposé à celle du dépôt, puis la courbe intensité - potentiel est enregistrée.

Différentes électrodes sont utilisées pour cette méthode. Mais, en général, cette technique est réalisée grâce à une microélectrode pendante fixe de mercure (HMDE), sur laquelle se fait le dépôt cathodique ou anodique. Les mesures voltammétriques permettent de suivre la redissolution anodique ou cathodique respectivement.

Cette méthode est la plus sensible des méthodes électroanalytiques. Elle permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur de 10^3 à 10^4 par rapport à la méthode polarographique classique. Il est possible de réaliser des dosages de solution allant jusqu'à 10^{-9} M et même 10^{-12} M en utilisant une électrode à film de mercure (MFE).

Le tableau 1 présente une synthèse des principales techniques polarographiques utilisées et présentées dans cette partie introductive.

Nom	- Sensibilité - Résolution	Avantages et/ou inconvénients
Direct current tast (D.C.T.)	10^{-5} M 100 mV	- Courant enregistré pendant une courte période (en fin de vie de la goutte). - Si phénomène réversible, $E_{1/2} = E^0 \rightarrow$ spéciation possible.
Polarographie à tension sinusoïdale surimposée (ACP)	10^{-6} M 40-50 mV	- Polarogramme sous forme de pic \rightarrow sommet = $E_{1/2}$ en bonne approximation. - Permet l'annulation du courant capacitif en gardant un courant faradique important dans le cas d'une réaction réversible.
Polarographie impulsionnelle différentielle	10^{-7} M 20-30 mV	- Elimination des effets perturbateurs dus au courant capacitif. - Polarogramme sous forme de pic. - Résolution supérieure à toutes les autres méthodes. - Propice à la spéciation.
Redissolution anodique ou cathodique	$10^{-9} - 10^{-12}$ M	- Méthode très sensible.

Tableau 1 : Synthèse des principales techniques polarographiques utilisées.

I.2. La bioanalyse

Plusieurs techniques séparatives sont fréquemment utilisées lors des dosages de substances médicamenteuses dans les fluides biologiques. On y retrouve notamment l'électrophorèse capillaire, la chromatographie gazeuse ou encore les immunodosages, mais la plus répandue est sans conteste la chromatographie liquide à polarité de phase inversée (L.C. : Liquid Chromatography). En effet cette technique permet d'allier à la fois sélectivité et sensibilité suivant le détecteur qui lui sera associé. Ceux-ci sont nombreux et variés. On peut citer, par exemple, le fluorimètre, le spectrophotomètre UV – Visible, l'ampéromètre, le spectromètre de masse,... Le choix du détecteur dépendra donc des caractéristiques physicochimiques de la substance médicamenteuse analysée, mais également de la sensibilité requise pour le dosage envisagé. Cependant l'emploi de la LC en bioanalyse impose un traitement de l'échantillon afin d'éliminer les protéines et les autres constituants endogènes qui ont tendance à précipiter sur les microparticules du support chromatographique, entraînant une importante perte d'efficacité et dans certains cas même le colmatage de la colonne. Ce nettoyage de l'échantillon est également nécessaire pour la spectroscopie de masse afin d'éviter un encrassement trop rapide de la source. C'est notamment pour ces raisons que les méthodes préparatives sont très largement utilisées en bioanalyse.

I.2.1. La préparation des échantillons biologiques ^[6-13]

Lingeman et *coll.* [6] distinguent deux groupes parmi ces méthodes de préparation : les traitements non sélectifs et les traitements sélectifs. Lors de cette introduction nous aborderons uniquement les traitements sélectifs et en particulier l'extraction liquide – solide (SPE : Solid Phase Extraction) employée au cours de ce mémoire.

Autours des années 50, l'utilisation de résines échangeuses d'ions dans le but d'extraire des substances basiques contenues dans des matrices biologiques jeta les bases de la SPE. Plus tard, les supports d'extraction impliquant des phénomènes d'adsorption apparaissent avec les travaux de Meole et *coll.* [8] qui utilisent un support d'extraction à base de charbon de bois pour isoler plusieurs médicaments et leurs métabolites dans l'urine. Ce n'est qu'au cours des années 70 que sont introduites les cartouches à base de silice vierge et ensuite de silice greffée pour extraction sur phase solide. La première cartouche vu le jour en 1978 tandis que celle au format de seringue comme nous la connaissons actuellement est apparue en 1979. Les pré-colonnes utilisées lors des couplages « on-line » avec la chromatographie liquide trouveront leur essor au début des années 80. Cependant, la SPE ne connut pas directement un véritable engouement. En effet, l'extraction liquide – liquide resta pendant plusieurs années la technique préférée et spécialement lors des dosages environnementaux. L'envol à proprement parler de la SPE ne s'effectua qu'au début des années 90 grâce à l'apparition de différents types de formats (courtes colonnes, cartouche-seringue, plaques 96 puits, ...), de l'automatisation et de l'introduction de nouvelles phases extractives.

1.2.1.1. Le couplage SPE – LC

L'extraction sur phase solide repose sur l'échange sélectif de la substance cible entre une phase solide et la phase liquide la renfermant. Certains composés endogènes pouvant créer des interférences lors du dosage chromatographique pourront ensuite être éliminés avant d'entamer l'étape d'élution permettant l'obtention sélective du composé.

Classiquement, une méthode SPE consiste en quatre étapes fondamentales (figure 8) :

- **Conditionnement :**

Cette étape est généralement exécutée en deux temps. Le premier conditionnement permet le mouillage du support d'extraction. En effet, ce type d'extraction est habituellement réalisé par l'intermédiaire de cartouche remplie d'un support sec. Le deuxième conditionnement permet de laver la cartouche de l'excès de solvant amené lors de la première partie de cette étape, d'activer les sites d'interaction avec l'analyte et/ou de prévenir la précipitation de la matrice contenant l'échantillon.

- **Chargement :**

L'objectif de cette étape est la rétention sélective (figure 9A) et totale de l'analyte sur la colonne SPE par rapport aux interférences dues à la matrice.

- **Lavage :**

Une fois l'analyte retenu sur la cartouche, le lavage du support d'extraction peut permettre d'enlever la majorité des interférences. Cependant, si les interactions entre l'analyte et le sorbant sont faibles, une attention particulière est requise afin d'éviter d'éluer l'analyte durant cette étape.

- **Elution :**

L'étape finale d'un processus classique d'extraction sur phase solide consiste en l'élution quantitative (figure 9B) de l'analyte retenu sur la cartouche. Celle-ci est parfois exécutée en deux étapes distinctes permettant une récupération plus efficace que si elle avait été réalisée par l'intermédiaire d'une seule fraction contenant le même volume.

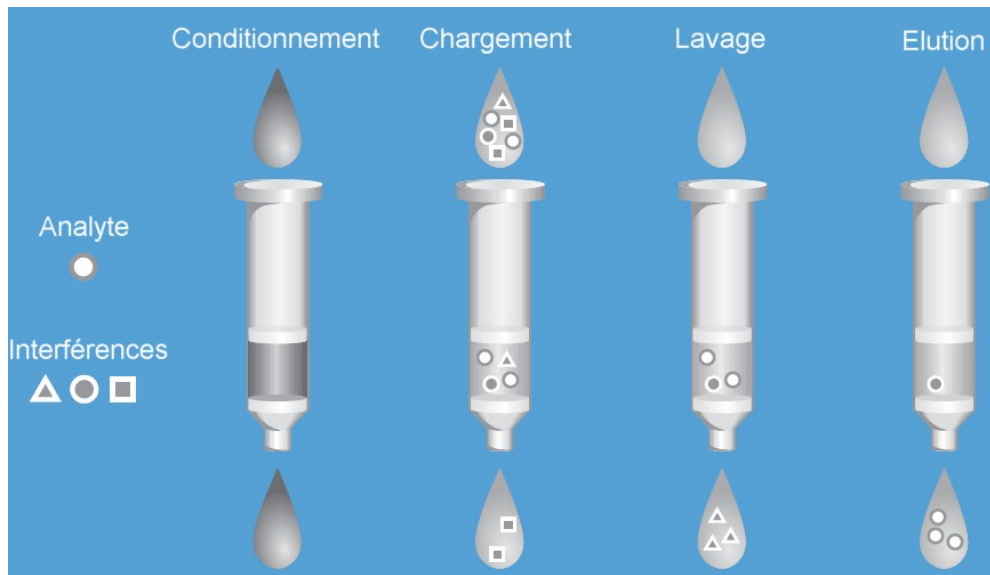


Figure 8 : Schéma représentatif des quatre étapes fondamentales d'une extraction sur phase solide.

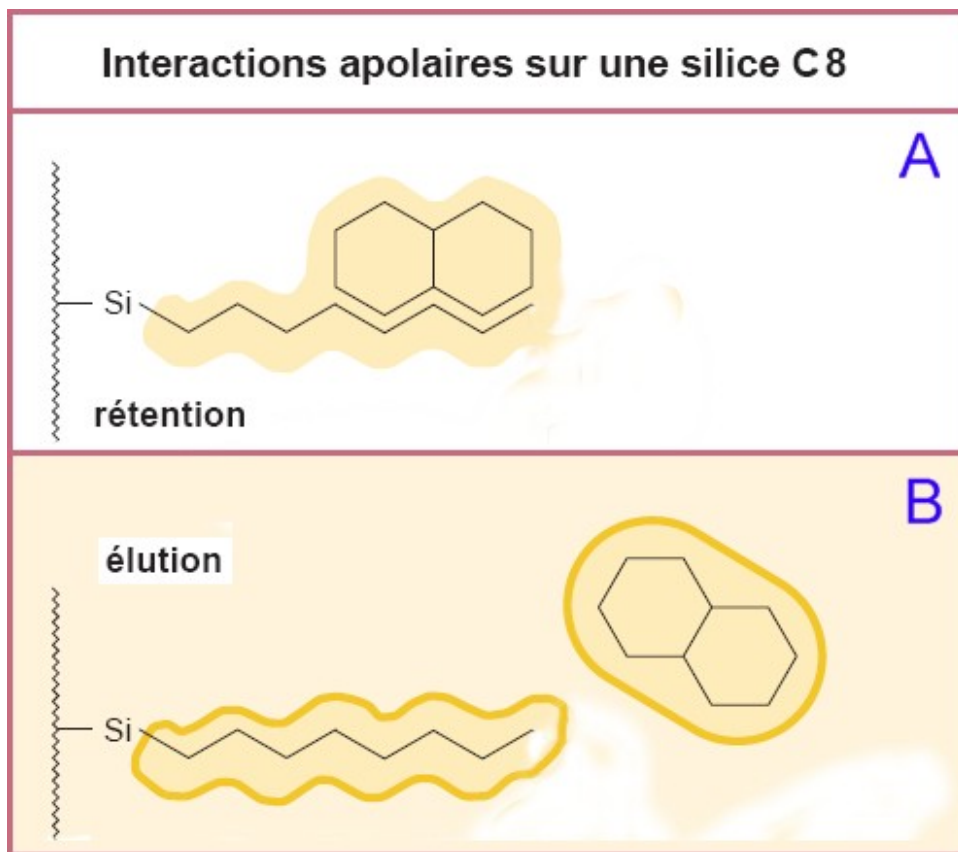


Figure 9 : Représentation des interactions apolaires dans le cas d'une silice greffée C8 lors de la rétention (A) et de l'élution (B).

Il faut cependant garder à l'esprit que, même s'il existe une analogie de nature entre les phases liquides et solides utilisées dans ce procédé d'extraction et celles employées en LC, il ne s'agit en aucun cas d'un processus chromatographique. En effet, la SPE repose, comme nous venons de la dire, sur les principes de la rétention totale et d'élution totale, tandis que la LC est basée sur la rétention partielle. Par là même, un couplage avec la chromatographie liquide, par exemple, doit donc être envisagé. Trois

grands types de couplage se sont développés au cours des années : le couplage « off-line », « at-line » et « on-line ».

I.2.1.1.1. Le couplage « off-line »

Une méthode de traitement est qualifiée d'« off-line », lorsque la préparation des échantillons est réalisée manuellement ou automatiquement sans couplage direct avec le système analytique. Ces méthodes de traitement peuvent s'avérer rapidement fastidieuses quand le nombre d'échantillons à analyser est important.

Cependant, au cours des années 90 les laboratoires de recherches Pfizer ont développé un format d'extraction basé sur une plaque contenant 96 puits (figure 10). Ceci a permis une augmentation considérable du nombre d'échantillons pouvant être traités simultanément. Ce support d'extraction est à la frontière entre le couplage de type « off-line » et « at-line » car il fut également par la suite utilisé de manière automatisée.



Figure 10 : Exemple d'un support d'extraction de type plaque 96 puits.

Nous envisageons un couplage de type « off-line » lors de cette étude à l'aide d'un GILSON ASPEC XL4 (figure 11).



Figure 11 : Photographie d'un robot ASPEC XL4 de la marque Gilson.

I.2.1.1.2. Le couplage « at-line »

Ce procédé repose sur l'utilisation d'un système automatisé, tel qu'un robot à bras maniables capable d'effectuer la quasi-totalité de la procédure (ex.: Autotrace et Rapid Trace de Zymark) ou un robot semi-flexible muni d'un bras qui se déplace dans les trois dimensions de l'espace afin de réaliser des tâches bien définies (ex.: ASPEC de Gilson). Ces robots reproduisent les gestes de l'homme et utilisent des cartouches d'extraction conventionnelles. De plus, à l'heure actuelle, ils sont généralement capables d'effectuer l'extraction de plusieurs cartouches en parallèle et ceci indépendamment de l'analyse. Ce type de couplage est toujours couplé au système analytique.

I.2.1.1.3. Le couplage « on-line »

Ces systèmes permettent, grâce à la commutation de colonnes, de coupler la SPE à la chromatographie liquide (LC) et ainsi d'éluer et de transférer les composés d'intérêt du support d'extraction vers le système de séparation par l'intermédiaire de la phase mobile. L'intervention de l'opérateur s'en trouve donc fortement minimisée. Ce qui permet de réduire les sources d'erreurs potentielles. La sensibilité, la précision et l'exactitude de la méthode sont améliorées également par le fait que la totalité de l'échantillon extrait est analysée.

Il existe deux types de systèmes à commutation de colonnes :

- les automates tels le Prospekt de Spark Holland ou l'OSP 2 de Merck couplés à un chromatographe en phase liquide,
- les systèmes à commutation de colonnes n'utilisant qu'un chromatographe en phase liquide muni d'une vanne de commutation.

La principale différence entre ces deux systèmes à commutation de colonnes repose sur la nature et le format du matériel d'extraction. Les automates utilisent généralement des cartouches d'extraction conventionnelles à usage unique qui sont remplacées automatiquement après chaque purification. Etant donné que le remplacement automatique du support d'extraction n'est pas assuré avec un simple chromatographe, l'utilisation de précolonnes remplies avec des phases stationnaires capables de tolérer l'injection directe et répétée de matrices complexes est requise avec le deuxième système à commutation de colonnes. Parmi ces différents matériaux d'extraction, les phases à accès restreint (RAM), les phases à empreintes moléculaires (MIP) et les phases à larges particules (LPS) sont les plus populaires.

I.2.1.2. Les phases d'extraction en SPE

Il existe bien évidemment plusieurs types de phases d'extraction en SPE. Nous comptons nous limiter, dans ce travail, à les citer car leur évaluation mérite une attention dépassant largement le cadre de cette introduction théorique.

Historiquement, nous pouvons citer le charbon, la célite, l'alumine, la silice, les résines échangeuses d'ions ou encore l'amberlite XAD-2 (copolymère de polystyrène et de divinylbenzène). Des groupements fonctionnels greffés à la silice afin de permettre

des interactions plus spécifiques avec l'analyte firent leur apparition par la suite (alkyle, phényle, amino, cyanopropyl, diol, ...). Ainsi que de nombreuses phases polymériques présentant l'avantage d'élargir la gamme de pH d'utilisation des cartouches. A l'heure actuelle, les supports les plus employés sont les silices greffées (octyle, octadecyl, cyano-propyl, etc), les phases à accès restreint (RAM), et les supports à grandes particules (LPS).

I.2.2. L'analyse des échantillons biologiques [13-19]

Apparue dans les années 1970, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC ou LC) ne connaîtra son essor qu'à l'avènement du spectrophotomètre UV/Visible à barrette de diodes (DAD) début des années 80. L'implantation de la LC débutera alors dans les laboratoires de bioanalyse. Malgré ses bonnes performances analytiques, la LC-UV/DAD souffre de quelques limitations dont les principales sont une applicabilité restreinte aux composés non chromogènes et une relativement faible sensibilité. La solution à ces limitations passa alors par l'utilisation d'un autre détecteur reconnu comme plus performant et déjà associé à la chromatographie en phase gazeuse (GC) : le spectromètre de masse (MS). En effet, sa haute sensibilité, sa grande sélectivité ainsi que son universalité ont rapidement séduit le monde de la bioanalyse. Cependant ; ce n'est que depuis une dizaine d'années, avec l'apparition des sources d'ionisation à pression atmosphérique (API), que la LC-MS connaît un essor fulgurant. Aujourd'hui, elle est devenue indubitablement une technique incontournable pour l'analyse de composés médicamenteux dans les matrices biologiques. Un spectrophotomètre de masse se compose principalement de deux parties : la source d'ionisation et l'analyseur à proprement parlé. Cette partie de l'introduction se déclinera suivant le même ordre, mais se limitera au matériel utilisé lors de la réalisation de ce mémoire.

I.2.2.1. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

Trois difficultés majeures ont été rencontrées lors du couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse :

- l'introduction d'un haut débit de liquide provenant de la LC vers le haut vide de la MS. En effet, 1 mL/min de phase mobile à pression atmosphérique équivaut à un débit de phase vapeur compris entre 0,5 et 1 L/min, en fonction de la composition du liquide,
- l'évaporation d'additifs (tampons, sels, ...) non volatils couramment employés dans les phases mobiles LC,
- l'ionisation de composés non-volatils et/ou thermolabiles.

Pour remédier à ces problèmes, plusieurs techniques d'ionisation, dont l'APCI, ont été développées durant ces 30 dernières années.

Les travaux de Horning et coll. [14] ont permis l'apparition, dans les années 70, de l'APCI. Ce groupe de chercheurs a, dans un premier temps, utilisé une source de Ni⁶³ afin d'ioniser à pression atmosphérique les analytes contenus dans une phase liquide préalablement nébulisée sous l'action d'un gaz chauffé. Le remplacement de la source

de Ni^{63} par une électrode de décharge, appelée décharge corona a permis une augmentation de l'efficacité de l'ionisation se traduisant par une sensibilité accrue.

Une dizaine d'année plus tard, Henion et *coll.* [16] apportent leur contribution à l'avancée de l'APCI en utilisant un système permettant la division du flux liquide avant l'entrée dans la source d'ionisation afin de diriger 1% de l'effluent vers la source où il est nébulisé à l'aide d'un gaz de nébulisation. Le nébulisat formé est alors évaporé à l'intérieur d'un tube entouré d'une résistance électrique permettant d'appliquer des températures de l'ordre de 300 °C sur les parois. Après évaporation du solvant, les ions sont formés via une aiguille à décharge corona à pression atmosphérique puis transférés dans le spectromètre. Enfin en 1992, Duffin et *coll.* [17] développent une source APCI munie d'une interface de type capillaire chauffée compatible avec les débits de phase mobile conventionnels.

I.2.2.1.1. Le concept de l'APCI

L'aérosol obtenu après nébulisation en APCI se retrouve dans un conduit chauffé (300 – 400 °C) nommé vaporisateur (« Heater ») qui permet alors une évaporation quasi complète du liquide. L'ionisation chimique se fait ensuite par l'intermédiaire de la décharge corona qui génère des électrons amorçant ainsi le processus d'ionisation du gaz formé après évaporation de la phase liquide (figure 12). La décharge corona présente des tensions de 5 – 10 kV et un courant de décharge de l'ordre de 1 – 10 μA .

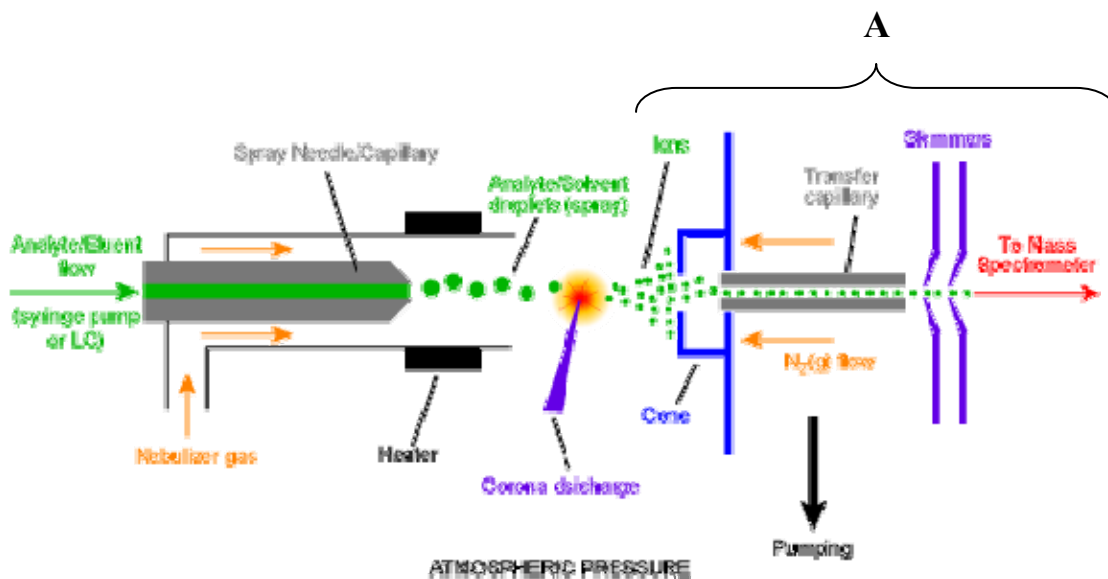


Figure 12 : Représentation schématique des composants d'une source d'ionisation APCI.

L'APCI étant une source d'ionisation en phase gazeuse, elle se révèle capable d'ioniser des molécules moyennement polaires à polaires. En outre, produisant uniquement des ions monochargés, l'APCI est limitée à des molécules ne dépassant pas 1500 – 2000 Da.

De par son mode de fonctionnement en phase gazeuse, l'APCI est peu sujet à la formation d'adduits et également généralement peu sensible aux effets de matrice dus aux phénomènes de suppression d'ionisation.

Les paramètres principaux de cette source d'ionisation sont la température du vaporisateur, le courant appliqué par la décharge corona et le débit du gaz de nébulisation. En fonction du type de source commercialisé, d'autres paramètres peuvent intervenir tels que le débit du gaz auxiliaire, la température et le débit du gaz de séchage et éventuellement la tension appliquée entre l'aiguille de nébulisation et l'entrée du spectromètre de masse.

1.2.2.2. L'analyseur : le quadripôle

Une fois les ions formés au niveau de la décharge corona, ils sont acheminés dans le haut vide du spectromètre de masse où ils sont accélérés et focalisés jusqu'à l'analyseur par un jeu de lentilles électrostatiques (figure 12 – Partie A). C'est au niveau de l'analyseur que les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Un vide de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} mbar est requis afin d'éviter que les ions générés par la source n'entrent en collision avec les molécules résiduelles contenues dans l'air et l'eau atmosphérique. Ce qui résulterait à une diminution de la sensibilité causée par des réactions de fragmentation et de déviation de trajectoire des ions.

Il existe actuellement sur le marché trois types d'analyseurs : le quadripôle, l'analyseur à temps de vol (TOF) et la trappe d'ions. Nous ne considérons, ici, que le quadripôle qui est utilisé lors de notre travail.

1.2.2.2.1. Le concept de l'analyseur quadripôle

Un analyseur quadripôle est constitué essentiellement de quatre barreaux métalliques, cylindriques ou hyperboliques, équidistants et parallèles qui servent d'électrodes (figure 13).

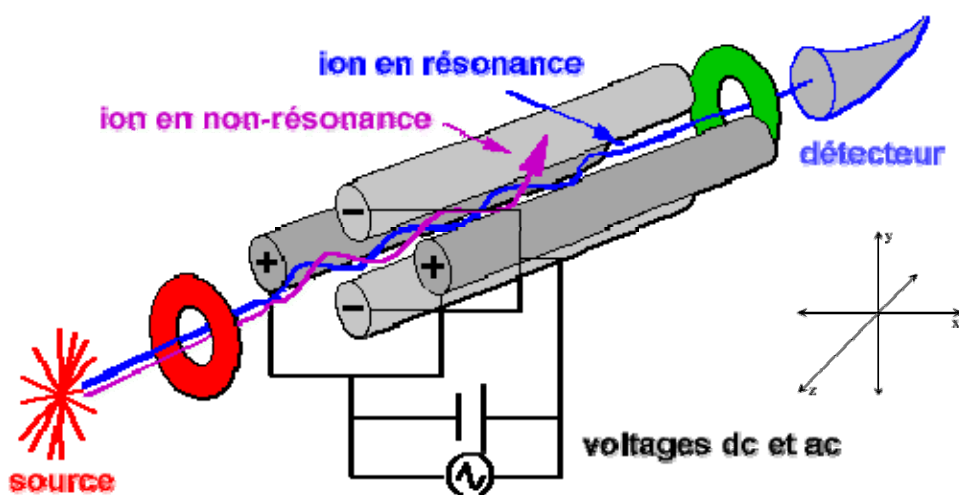


Figure 13 : Schéma représentant un analyseur quadripôle.

Les barreaux opposés sont connectés électriquement deux à deux sur la borne positive et négative d'une source de tension continue. En outre, des tensions alternatives sont appliquées sur chaque paire. Les ions arrivant de la source et focalisés selon l'axe z oscillent dans le plan x et y du champ électrique quadripolaire. Lorsque les paramètres des composantes continues et alternatives du système électriques sont fixés, les ions ayant un rapport m/z adéquat rentrent en « résonance » et poursuivent leur chemin sur une trajectoire dite stable afin d'atteindre le détecteur. Les autres ions sortent de l'analyseur et ne sont pas détectés. Ces paramètres peuvent être fixés dans le but de détecter un ou plusieurs ions provenant de la source. Ce mode de fonctionnement est appelé SIM (single ion monitoring). En SIM, le quadripôle fonctionne comme un filtre. Il est également possible de faire varier ces paramètres dans un domaine de potentiel afin de balayer un domaine de rapports m/z permettant ainsi de détecter les ions provenant de la source. L'analyseur procède alors en mode balayage.

En mode SIM, les résultats sont visualisés à l'aide de plusieurs tracés chromatographiques correspondants au(x) rapport(s) m/z recherché(s). En mode balayage, un spectre de masse sur une gamme de rapports m/z prédéfinie du chromatogramme LC est produit.

Nous n'entrons pas ici dans plus de détails car l'explication physico-mathématique de ce phénomène sort largement du cadre de cette introduction.

1.2.2.2.2. Le couplage MS/MS (le triple quadripôle)

Lorsqu'une spécificité accrue est requise, l'analyste se voit contraint de recourir à l'utilisation de deux spectromètres de masse en série (MS/MS). Ce couplage induit le plus souvent une amélioration du rapport signal sur bruit (S/N) engendrant par la même occasion une amélioration de la sensibilité analytique.

Dans le cas de l'utilisation d'un analyseur quadripôle, le couplage de deux MS conduit à l'utilisation d'un analyseur triple quadripôle. Dans ce type d'appareil, le premier et le dernier quadripôle, appelé respectivement Q1 et Q3, sont des spectromètres de masse. Dans le quadripôle central (Q2), un gaz de collision est introduit à une pression telle qu'un ion entrant dans celui-ci subira une ou plusieurs collisions (figure 14). Si le gaz est inerte, on transfère de l'énergie à l'ion en convertissant une fraction de l'énergie cinétique en énergie interne. L'ion se fragmente alors et les fragments sont analysés par le quadripôle Q3. Si le gaz est réactif, on peut provoquer des réactions ion-molécule dont les produits de réaction seront analysés également par le Q3.

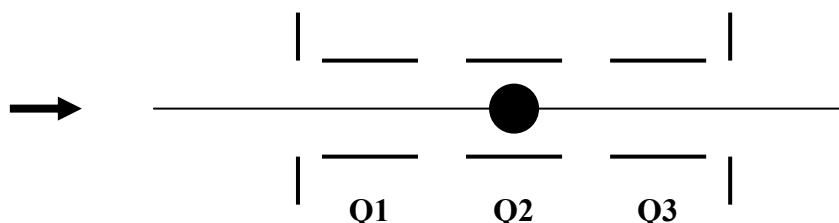


Figure 14 : Schéma d'un appareil dit « à triple quadripôle ».

Le mode utilisé lors de la réalisation de ce mémoire est le mode de suivi de réactions multiples (MRM : Multiple Reaction Monitoring). Celui-ci consiste en la

fragmentation, en Q2, de (ou des) l'ion(s) sélectionné(s) suivant le rapport m/z dans le quadripôle Q1, pour ensuite être analysé(s) dans le quadripôle Q3 suivant un rapport m/z défini (figure 15). C'est donc une transition bien définie entre l'ion parent et l'ion fille qui est analysé.

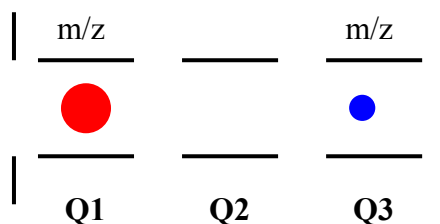


Figure 15 : Schéma représentant le mode de suivi de réaction (Reaction Monitoring).

I.3. La validation des méthodes analytiques ^[20-25]

Au cours des années, plusieurs protocoles ont été élaborés afin de répondre aux textes réglementaires liés à la validation des méthodes. Cependant d'un point de vue statistique, tous ceux-ci présentent certaines insuffisances, notamment le manque de considération de la prise de décision en fonction de limites d'acceptation définies *a priori* et du risque relatif à l'usage futur de la méthode. Afin de résoudre ce problème, une nouvelle approche fut récemment développée. Cette nouvelle stratégie de validation repose sur le profil d'exactitude.

Rappelons que l'objectif principal d'une méthode analytique de dosage est de pouvoir quantifier le plus justement (erreur systématique – biais) et le plus précisément (erreur aléatoire – variabilité) possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à évaluer. Tandis que l'objectif de la validation est de donner au laboratoire et aux autorités des garanties suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec cette méthode seront proches de la « vérité ». L'objectif principal est donc de minimiser les risques du producteur et du consommateur.

A ce stade, il est important de définir certains termes fréquemment rencontrés en validation :

- **La justesse :**

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (ex. : standard international, standard d'une pharmacopée). Elle donne une indication sur les erreurs systématiques des méthodes et est représentée par le biais.

- **La fidélité :**

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (**résultats d'essais**

indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité donne une indication sur les erreurs aléatoires des méthodes et est représentée par la variabilité. De plus, Elle est présente à trois niveaux : la répétabilité (intra-laboratoire), la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoire).

- **L'exactitude :**

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de référence et la valeur trouvée. Elle donne une indication sur l'erreur totale des méthodes (figure 16).

$x_i = \mu_T + \text{justesse} + \text{fidélité}$ $x_i - \mu_T = \text{justesse} + \text{fidélité}$ $x_i - \mu_T = \text{exactitude (ISO)}$ $x_i - \mu_T = \text{erreur totale}$ $ x_i - \mu_T < \lambda \Leftrightarrow \text{erreur totale} < \lambda$ <p><u>où :</u> x_i = la valeur mesurée μ_T = la valeur de référence λ = limite d'acceptation</p>
--

Figure 16 : Démonstration du concept de l'erreur totale par rapport à l'exactitude.

- **L'intervalle de dosage :**

L'intervalle de dosage représente le domaine de concentration exploré lors de la validation des méthodes. Celui-ci doit prendre en considération tous les résultats futurs possibles. En effet, si lors de l'utilisation en routine de la méthode, les quantités inconnues que le laboratoire aura à doser se trouvent en dehors de l'intervalle de dosage, les résultats fournis ne pourront être considérés comme fiables.

Ceci étant dit, il en va de même pour le type de matrice contenant l'analyte. Un dosage plasmatique validé ne pourra être par la suite réalisé en considérant l'urine comme matrice, qu'uniquement après avoir été validé à nouveau dans ces conditions.

- **La fonction de réponse :**

La fonction de réponse est la fonction mathématique reliant la quantité de l'analyte contenue dans la solution analysée avec la réponse fournie par l'équipement utilisé. Elle permet alors de recalculer la concentration théorique en fonction de la totalité des expériences réalisées. Elle peut être de plusieurs types : droite de régression (avec ou sans pondération), droite de régression après transformation, modèle quadratique (avec ou sans pondération), ... Elle permet également l'obtention du profil d'exactitude.

- **Le profil d'exactitude :**

Le profil d'exactitude est un outil qui permet à l'analyste d'appréhender le comportement futur de sa méthode à partir des résultats obtenus lors d'un exercice de validation. En effet, il permet non seulement de représenter graphiquement l'exactitude d'une méthode par l'intermédiaire du biais et de la variabilité de ses résultats mais aussi de prédire son comportement futur par le calcul de l'intervalle de tolérance β (β -expectation tolerance interval). Par conséquent, lorsque l'on incorpore à ce profil des limites d'acceptation ($\pm \lambda$) fixées *a priori*, il devient un outil décisionnel puissant et d'une grande clarté (figure 17).

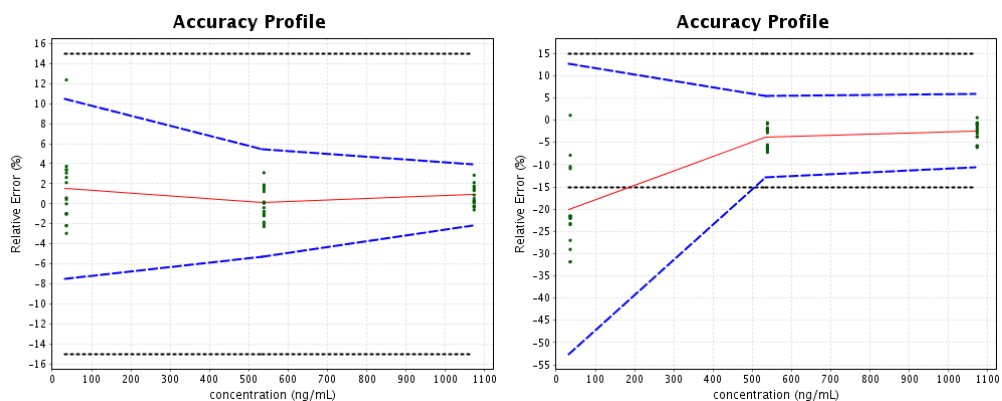


Figure 17 : Exemple de deux profils d'exactitude dans le cas d'un dosage de la diffusion du lévonorgestrel à partir d'une matrice polymérique.

- **La limite de détection (LoD) :**

La limite de détection d'un dosage est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

- **La limite de quantification (LoQ) :**

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude (justesse + fidélité) définie. La limite de quantification n'a de sens que si son exactitude a été démontrée. De plus, cette notion ne tient pas compte de l'objectif de la méthode. En effet, si l'on fixe une limite d'acceptation à $\pm 20\%$ il est possible d'obtenir une LoQ plus basse que si λ est fixé à $\pm 5\%$.

Fréquemment, la notion de limite de quantification inférieure (LLoQ) et supérieure (ULoQ) est considérée. Celles-ci proviennent du fait qu'une méthode peut être valide, pour une limite d'acceptation définie, qu'uniquement dans un domaine restreint de l'intervalle de dosage. Ainsi, la limite LLoQ définit la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée et la ULoQ, la plus grande (figure 18).

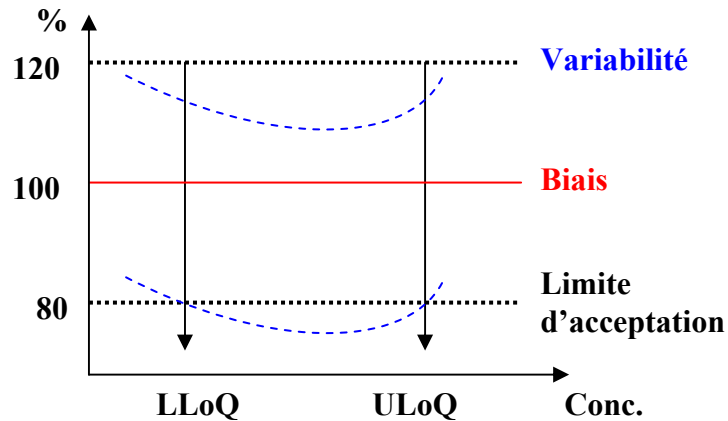


Figure 18 : Schéma représentant un profil d'exactitude théorique possédant une LLoQ et une ULoQ.

- **Les standards de calibration (SC) :**

Les standards de calibration sont des solutions préparées aux niveaux de concentration choisis lors de l'exercice de validation soit hors de la matrice, soit avec la matrice. Ils servent de références connues et supposées exactes afin d'établir la relation entre l'analyte et la réponse fournie par l'équipement utilisé.

- **Les standards de validation (SV) :**

Les standards de validation sont des solutions préparées de sorte à mimer le plus exactement possible les futurs échantillons analysés en routine. Ils sont donc obligatoirement préparés à l'aide de la matrice contenant l'analyte dosé.

Le guide SFSTP 2003 renseigne plusieurs protocoles de validation adaptés suivant les connaissances préalables du laboratoire effectuant la validation de la méthode envisagée. Un arbre décisionnel basé sur un éventuel effet de matrice connu, une prévalidation effectuée antérieurement et le souhait de réaliser une courbe d'étalonnage à un seul niveau de concentration, permet le choix d'une procédure de validation.

Le choix du design expérimental dépendra fortement de l'utilisation de la méthode en routine, il pourrait cependant devoir être modifié en fonction des ressources du laboratoire effectuant la validation. En effet, un minimum de trois séries d'expérience est requis afin d'aboutir à un jeu de données suffisamment varié pour établir une statistique représentative du dosage effectué ultérieurement en routine. En conséquence, un laboratoire possédant les ressources nécessaires au changement de l'opérateur et de l'équipement pour chaque série permettra l'incorporation d'une plus grande variabilité dans le jeu de données. Il faut garder également à l'esprit que ce laboratoire pourra alors utiliser en routine les trois équipements définis lors de la validation. Ce dernier point soulevé, il nous paraît important d'insister sur le fait que l'intégralité des équipements et des étapes inhérents au dosage doit être validé, de la pesée initiale au traitement mathématique du résultat final.

Classiquement lorsque l'effet matrice ne doit pas être considéré, un protocole à cinq niveaux de concentration tant pour les standards de validation que pour les standards de calibration est construit. Deux et quatre indépendants sont préparés respectivement pour les SC et les SV. Si un effet de matrice doit être envisagé, une courbe de calibration préparée dans la matrice sera préférée à une courbe obtenue par l'intermédiaire d'une préparation des SC's en solution pure.

Buts du travail

Buts du travail

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la mise au point d'un dispositif intra-utérin à libération hormonale contrôlée. La mise sur le marché d'une spécialité pharmaceutique demande l'élaboration d'un dossier extrêmement complet et détaillé comprenant une importante partie analytique.

Au cours de ce mémoire, nous envisagerons plus particulièrement le développement de deux techniques analytiques complexes :

- la spéciation des ions stanniques et stanneux suivie du dosage de ces premiers. L'étain (IV) représente en effet le produit de dégradation (oxydation) du catalyseur servant à la réaction de polymérisation du réservoir,
- le dosage plasmatique du lévonorgestrel à de très faibles concentrations (≈ 50 pg/mL). Cette méthode de dosage sera utilisée au terme de l'étude clinique.

La spéciation et le dosage des ions stanniques

Au fil de son utilisation et au cours de sa conservation, le catalyseur se dégrade. L'espèce active (ion stanneux) se retrouve alors, en partie, sous sa forme la plus oxydée. Dans l'éventualité où la proportion en Sn(IV) deviendrait trop importante, la catalyse ne pourrait plus s'effectuer. Afin de pouvoir contrôler la teneur en Sn(IV), il nous faudra donc développer une méthode permettant le dosage des ions stanniques en présence des ions stanneux. Pour ce faire, nous envisagerons successivement la spéciation et le dosage des ions stanniques au moyen de la polarographie impulsionnelle différentielle en présence d'un complexant approprié. La sélection de ce dernier constituera certainement l'étape critique de la mise au point de cette méthode.

Auparavant, il nous sera nécessaire de développer une technique de séparation des ions octanoates et des espèces ioniques de l'étain. De plus, celle-ci ne devra évidemment pas altérer le rapport initial entre Sn(IV) et Sn(II). En effet, ce point est capital car il est fort probable que les ions stanneux soient, plus ou moins rapidement, oxydés en ions stanniques par l'intermédiaire notamment de l'oxygène. Une attention toute particulière devra être apportée cet aspect de la technique d'extraction.

Finalement, nous envisagerons la validation de la méthode sur un intervalle de dosage couvrant obligatoirement de faibles concentrations en Sn(IV) et ce, de part l'objectif même de la méthode.

Le dosage plasmatique du lévonorgestrel

Dans le cas de l'utilisation d'un système intra-utérin, l'action hormonale souhaitée est locale. Afin de s'en assurer, une étude clinique sur des volontaires devra être réalisée. Au cours de celle-ci, des prélèvements sanguins réguliers seront réalisés dans le but de doser la concentration systémique en hormone au cours du temps. Celle-ci devrait, en toute logique, être extrêmement faible.

Pour cette raison, nous développerons une méthode de dosage associant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en mode tandem. Les conditions analytiques devront être optimisées afin de pouvoir garantir à cette méthode à la fois sélectivité et sensibilité.

La mise au point d'un dosage plasmatique en LC/MS-MS nécessite, quasi inévitablement, le recours à une préparation de l'échantillon. Nous envisagerons à cette fin l'extraction sur phase solide. Il nous faudra pour cette étape sélectionner le support d'extraction qui nous garantira la meilleure récupération tout en assurant une sélectivité satisfaisante. En effet, le taux de récupération est, dans le cas présent, un facteur plus important que la sélectivité puisque nous disposerons en aval d'un spectromètre de masse.

Dans un dernier temps, nous tenterons de valider notre méthode sur un intervalle de dosage relativement large tout en gardant à l'esprit que ses performances en termes de justesse, de fidélité et d'exactitude aux faibles concentrations (quelques dizaines de pg/mL) seront cruciales.

Partie 1 :

Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes

1.1. Dosage polarographique

1.1.1. Extraction de l'étain en phase aqueuse

Lors de la mise au point de l'extraction de l'étain, trois solvants organiques ont été étudiés : le N,N-diméthylacétamide (DMA), le tétrahydrofurane (THF) et l'heptane. Le DMA provient de la société Fluka Chemie (Buchs, Suisse) et est un solvant de qualité pour HPLC ($\geq 99,8\%$ (GC) – lot n° 1202929). L'heptane et le THF, proviennent quant à eux de la société Merck (Darmstadt, Allemagne) et sont respectivement de qualité pour la spectroscopie ($99,3\%$ (GC) – lot n° I295166) et extra pur ($99,0\%$ (GC) – lot n° K30144914).

La phase aqueuse est une solution d'acide chlorhydrique 2 M réalisée à partir d'acide chlorhydrique fumant de grade pour analyse (37% - lot n° K35859617) de la société Merck. Lors de la préparation de cette solution, de l'eau déminéralisée à l'aide d'un système Milli-Q_{plus} 185 ($18,2\text{ M}\Omega/\text{cm}$, traitement sous UV à 185 nm) de la société MILLIPORE (Mulshain, France) a été utilisée comme solvant de dilution. Dans la suite de ce mémoire, nous avons nommé cette eau, l'eau Milli-Q.

Un dispositif permettant une extraction liquide / liquide sous atmosphère inerte a été mis au point. Grâce à celui-ci, une mise en contact intime des deux phases (50 mL chacune) a été assurée afin de procéder à l'extraction de l'étain. L'utilisation d'azote, provenant de la société Air liquide (Liège, Belgique) de grade Alphagaz 1, nous a permis de prévenir l'altération du rapport initial entre les deux formes oxydées et réduites de l'étain (figure 19).

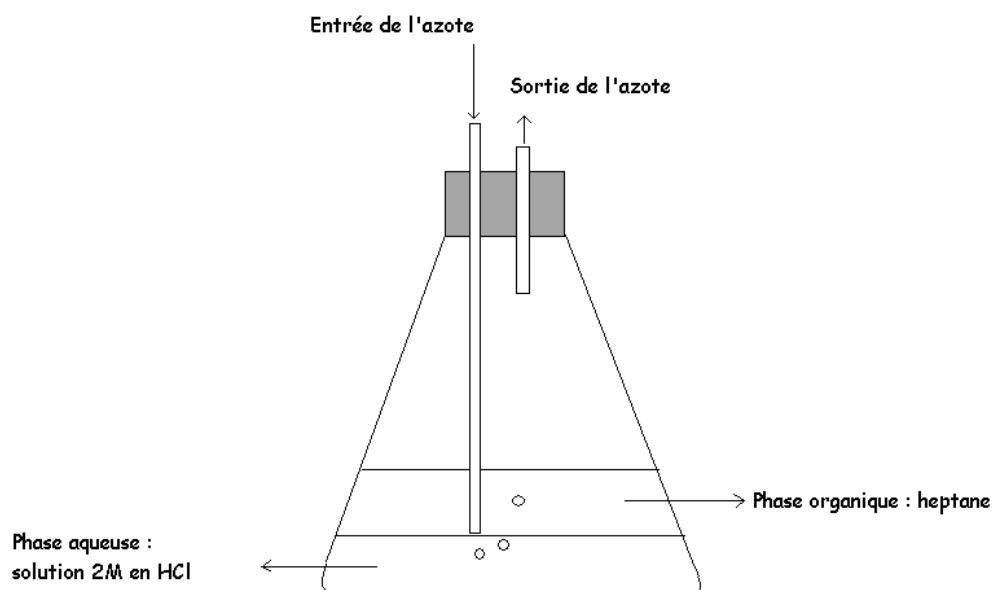
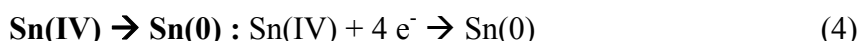
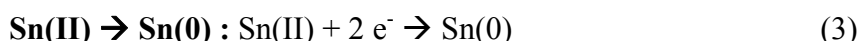
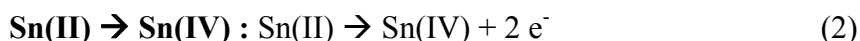


Figure 19 : Schéma du dispositif permettant l'extraction liquide / liquide de l'étain à partir de l'octanoate d'étain.

1.1.2. L'analyse polarographique

Lors de l'analyse polarographique, un complexant a été utilisé afin de permettre la spéciation de l'étain. Il semble important, à ce niveau, de préciser que l'étain peut être présent en solution sous deux formes ioniques. L'ion stanneux (Sn(II)) et l'ion stannique (Sn(IV)). Ce premier présente, sous des conditions permettant la spéciation, une vague polarographique d'oxydation en Sn(IV) et une de réduction en Sn(0). L'ion stannique présente quant à lui une seule vague de réduction en Sn(0) (équations (2) à (4)).



Dans un premier temps, l'ion fluorure a été envisagé comme complexant sous la forme de son sel potassique ou sodique. Tous deux proviennent de la société Merck et sont de grade pour analyse. Lors de cette partie du travail, l'électrolyte de support contenait également du nitrate de sodium (NaNO₃ – réactif pur – lot n° 3202) de la société Riedel-de Haën (Sleeze, Allemagne) et de l'acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique (HEPES - grade réactif biochimique – lot n° 7187490N), un tampon zwitterionique. C'est deux composants ont été utilisés à une concentration respective de 0,1 M et de 0,01 M.

Finalement, le malonate de sodium de grade pour analyse (99 % - lot n° A0229254), provenant de la société Acros (Geel, Belgique) a été retenu à la concentration de 0,5 mol/L. Afin de maintenir le pH des solutions analysées à 10, un tampon carbonate / bicarbonate de sodium à une concentration de 0,2 M a été utilisé pour la préparation de chaque solution soumise à l'analyse. Pour ce faire, nous avons dissout respectivement 0,85 g et 1,06 g de ces deux constituants, à l'aide d'eau Milli-Q, dans un jaugé de 50 mL qui contient la solution à analyser. Les composants du tampon proviennent de la société Riedel-de Haën (Sleeze, Allemagne) et sont de grades ACS, ISO, Ph. Eur. (lot n° 4031A (Na₂CO₃) et 43300 (NaHCO₃)). L'ajustement du pH a été fait par l'intermédiaire de deux solutions d'hydroxyde de sodium à 2 M ou 5 M. Le NaOH utilisé provient également de la société Merck et est de grade pour analyse (99 % - lot n° B752898).

Au cours du développement de la méthode de spéciation de l'étain, des solutions de chlorure stanneux ont été préparées à partir d'étain métallique provenant de la société UCB (Bruxelles, Belgique) de grade Pharmacopée Européenne.

1.1.3. Paramètres finaux de la méthode polarographique

La méthode polarographique utilisée dans le cadre de ce travail est la polarographie différentielle impulsionnelle. Ses principes sont expliqués dans la partie introductive (cf. point I.1.4.3.).

Les conditions analytiques retenues sont les suivantes :

- Mode utilisé : SMDE
- Vitesse de balayage (mV/s) : 10
- Potentiel initial (mV) : 1000
- Potentiel final (mV) : 1450
- Amplitude d'impulsion (mV) : -50
- Potentiel d'impulsion (mV) : 6
- Durée de l'impulsion (ms) : 10
- Temps entre chaque impulsion (s) : 0,6
- Pression en azote (bar) : 1,2
- Durée de la mesure (ms) : 5

1.1.4. Validation de la méthode

L'octanoate d'étain (CAT-02) utilisé afin de réaliser les standards de validation provient de la société Nusil Technology (Carpinteria, CA, United States – lot n° 36471). Il ne possède pas de grade spécifique, c'est le réactif utilisé lors de la synthèse des réservoirs du stérilet.

Les standards de calibration (SC) ont quant à eux été préparés à partir d'une solution étalon de chlorure stannique à 1 g/L dans l'HCl 2 M provenant de la société Merck et de grade CertiPUR® (N° de lot : OC677790).

Leurs concentrations sont respectivement de 3 (SC1), 6 (SC2), 12 (SC3), 40 (SC4) et 50 mg/L (SC5). Dans le cas des standards de validation (SV), des niveaux de concentration identiques ont été envisagés. Nous les avons nommés SV1 à SV5. Afin de posséder un jeu de données suffisant à l'analyse statistique effectuée lors de l'exercice de validation, les SC sont répétés trois fois, tandis que les SV sont quant à eux répétés quatre fois.

Les paramètres envisagés lors de cette validation sont les effets opérateur, équipement et jour. Ce qui nous permet d'établir un protocole de validation en trois séries comme l'illustre le tableau suivant :

Opérateur	1	2	2
Équipement	1	1	1
Jour	1	2	3
Série	1	2	3

Tableau 2 : Protocole de validation suivi pour ce dosage.

1.1.4.1. Préparation des standards de calibration (SC)

Les niveaux SC4 et SC5 ont respectivement été préparés par une dilution au vingt-cinquième et au vingtième de la solution mère dans un jaugé constitué par l'électrolyte de support. Les trois autres niveaux (SCN1 à SCN3) ont quant à eux été respectivement préparés au moyen de solutions filles à 30 (SCN1), 60 (SCN2) et 120 mg/L (SCN3). Celles-ci ont été réalisées à l'aide d'une solution chlorhydrique 2 M. Une dilution supplémentaire de chacune d'elles, au dixième, à l'aide de l'électrolyte de support a ensuite été effectuée afin d'atteindre les concentrations souhaitées. Préalablement à l'analyse polarographique, chaque jaugé a été ajusté à pH = 10 et puis mis au trait à l'aide d'eau Milli-Q. L'analyse polarographique a été effectuée sur 10 mL de solution.

1.1.4.2. Préparation des standards de validation (SV)

La préparation des standards de validation a été réalisée en deux temps. Premièrement, et ce, pour chaque niveau de concentration, nous avons pesé 200 mg d'octanoate d'étain dans l'erlenmeyer d'extraction et nous y avons ajouté 50 mL d'heptane désoxygéné. Dans un second temps, nous avons ajouté la phase aqueuse, préparée différemment pour chaque niveau des standards de validation.

En effet l'octanoate d'étain présente une dégradation naturelle. C'est-à-dire qu'un produit n'ayant jamais été utilisé présente toujours un faible pourcentage d'étain (IV) dans l'étain (II). Nous avons utilisé la méthode des ajouts dosés afin d'estimer la teneur initiale en ions stanniques dans la matrice.

Afin d'estimer le plus précisément possible la quantité d'ions stanniques déjà présents dans le catalyseur, quatre extractions ont été réalisées sans ajout d'une quantité connue d'Sn(IV). Pour ce faire, la phase aqueuse utilisée lors de l'extraction est une solution désoxygénée d'acide chlorhydrique 2 M. L'extraction a été conduite durant 5 minutes sous un flux constant d'azote. Ensuite, 5 mL de la phase aqueuse ont été prélevés et dilués au dixième par l'intermédiaire de l'électrolyte de support. Avant l'analyse de la solution finale, celle-ci a été amenée à pH 10. L'intensité moyenne du pic obtenue lors de ces analyses constitue l'intensité de réponse qui sera retirée au pic dû aux ions stanniques lors de l'analyse des standards de validation.

Comme nous venons de l'expliquer, chaque standard de validation a été préparé au moyen d'un aliquote de 200 mg de catalyseur solubilisé dans l'heptane ainsi que par une phase aqueuse contenant la quantité désirée d'ions stanniques. Les cinq niveaux de concentration ont été préparés suivant le même schéma. Nous avons dilué la solution standard d'étain (IV) par une prise de 50 (SV5), 40 (SV4), 12 (SV3), 6 (SV2) et 3 mL (SV1) toujours dans une solution d'acide chlorhydrique 2 M. 50 mL de chacun de ces niveaux ont servis à l'extraction maintenue pendant 5 minutes sous un flux constant d'azote. Ensuite, 5 mL de la phase aqueuse ont été prélevés et dilués au dixième par l'intermédiaire de l'électrolyte de support. Avant l'analyse de la solution finale, celle-ci a été amenée à une valeur de pH égale à 10.

1.1.5. Réactifs généraux

Un étalonnage journalier du pH-mètre est nécessaire à son utilisation. Pour ce faire, trois solutions tampons aux pH 4,01, 7,00 et 9,21 \pm 0,02 provenant de la société Mettler-Toledo (Urdorf, Suisse) ont été utilisées (N° de lot : 1R017A, 1R034A et 1R038A, respectivement).

Le polarographe utilisé dans le cadre de notre travail est couplé à un passeur d'échantillon. A l'aide de ce système, il nous est possible d'effectuer un nettoyage automatisé de la cellule par une solution d'eau Milli-Q contenant 0,1 ou 0,2 % d'acide chlorhydrique.

1.1.6. Autre équipement

Au cours de la réalisation de notre travail, nous avons utilisé une balance analytique de marque Mettler-Toledo AE 163 (Greifensee, Suisse). Cette balance est englobée dans le système qualité du laboratoire et est calibrée journallement. Une vérification de la balance se fait toutes les quinze semaines. Ces deux contrôles sont réalisés par l'intermédiaire de 6 poids respectivement de 100 mg, 1 g, 5 g, 10 g, 20 g et 50 g, calibrés annuellement (Certificats DKD n° G1-355-DKD-K-11801-06-01 (100 mg) et G1-356-DKD-K-11801-06-01 (autres poids)).

1.2. Dosage plasmatique

1.2.1. Préparation des échantillons

Afin de déterminer les conditions optimales d'extraction, une solution de LNG dans un tampon phosphate à pH = 7,4 a été préparée. Notons encore que d'autres solutions de LNG (hors matrice) ont été réalisées dans différents milieux dans le cadre de l'optimisation des paramètres lors du dosage en LC/MS-MS (cf ci-après). Cependant, il est difficile de décrire dans cette partie du mémoire la préparation de chacune d'entre-elles sans entamer la discussion inhérente au développement de cette méthode. Nous pouvons tout de même signaler que pour la réalisation de toutes les concentrations envisagées, nous sommes invariablement partis d'une solution mère méthanolique de lévonorgestrel (Chemoiberica – Barcelone, Espagne : grade pharmacopée européenne, lot n° 050748) à la concentration de 1 mg/mL. De la même manière, nous avons réalisé une solution mère méthanolique de l'étalon interne (SI), la méthyltestostérone, à la concentration de 1 mg/mL (Diosynth – Apeldoorn, Pays-Bas – Ph. Eur).

En vue d'étudier le pourcentage de récupération au terme de l'extraction liquide – solide, nous avons à la fois préparé des blancs plasmatiques (nommés T0) ainsi que des plasmas dopés (nommés, ci-après, récup).

Les blancs plasmatiques ont été préparés comme suit :

- 1000 μL de plasma,
- 1000 μL d'acide phosphorique dilué à 4 % provenant de la société Merck et de grade pour analyse (85 % (acidimétrie) – lot n° K33963073),
- 200 μL de SI à 2,5 ng/mL (concentration finale en SI = 500 pg/mL).

Les plasmas dopés avec du LNG aux concentrations finales respectives de 50 (récup1), 100 (récup2), 250 (récup3), 500 (récup4) et 1000 pg/mL (récup5) ont quant à eux été préparés de la manière suivante :

- 950 μL de plasma,
- 50 μL d'une solution de LNG respectivement à 1 (récup1), 2 (récup2), 5 (récup3), 10 (récup4) et 20 ng/mL (récup5),
- 1000 μL d'acide phosphorique dilué à 4 %,
- 200 μL de SI à 2,5 ng/mL.

A cette fin, le plasma a tout d'abord été décongelé à température ambiante (Température de conservation = $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), puis a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ à l'aide d'une centrifugeuse de table modèle 5804 R de la société Ependorf (Hamburg, Allemagne).

En ce qui concerne la phase de prévalidation, quatre niveaux de concentration ont été envisagés : 50 pg/mL, 100 pg/mL, 500 pg/mL et 1000 pg/mL. Tant les SC que les SV ont été préparés de la même façon que les plasmas « récup ».

1.2.2. Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide du lévonorgestrel à partir de la matrice plasmatique a été envisagée de manière très classique. En effet, les conditions d'extraction ont été basées sur les quatre étapes fondamentales de la SPE : conditionnement, chargement, lavage, élution (cf. point I.2.1.1.). Le système automatisé d'extraction sur phase solide à quatre aiguilles (ASPEC XL4) que nous avons utilisé provient de la société Gilson Medical Electronics (Villiers-le-Bel, France). Celui-ci permet de réaliser l'extraction sur de petites cartouches à usage unique ou DEC (Disposable Extraction Cartridges) et de récolter l'extrait obtenu dans un tube collecteur. Celui-ci est constitué d' (de) :

- un diluteur Gilson modèle 404 équipé de 4 seringues de 10 mL,
- un casier permettant de placer 4 solvants différents ainsi que le liquide de rinçage,
- un casier contenant les échantillons à extraire,
- quatre casiers permettant la récolte des différentes fractions de lavage,
- quatre casiers permettant la récolte de la fraction d'élution,
- quatre casiers mobiles supportant les DEC's et déplacés par le bras robotique afin de voyager entre les casiers de récolte des fractions de lavage et des fractions d'élution,
- une interface informatisée munie d'un logiciel Gilson permettant le contrôle du système d'extraction XL4.

Lors du développement de la phase de préparation de l'échantillon plasmatique, nous avons utilisé des cartouches d'extraction de type CH(EC) (EC = recouvert), C₈, C8(EC), C18, C18(EC) et MFC18 (MF = monofonctionnel), toutes de 50 mg et d'une capacité de 1 mL provenant de la société IST Isolute (Glamorgan, Angleterre). Nous avons également utilisé des cartouches Oasis HLB de 30 mg et d'une capacité de 1 mL (Waters, Zellik, Belgique). Le liquide de rinçage du système était constitué d'eau pour la chromatographie LiChrosolv (eau LC) additionnée de 5 % de Méthanol gradient grade (MeOH), tous les deux de la société Merck. Lors de l'extraction, quatre solvants ont été utilisés :

- A = MeOH,
- B = eau LC,
- C = eau LC + 10 % de MeOH,
- D = acide formique à 0,1 % (HCOOH) dans l'eau LC.

L'acide formique provient de la société Merck et est de qualité pour analyse (98 - 100 % (acidimétrie), lot n° K34749064).

Les paramètres d'extraction finaux envisagés lors de notre travail sont les suivants :

- Conditionnement :

Conditionnement 1	Solvant A
Volume de solvant (mL)	1
Volume d'air poussé (mL)	0,3
Débit de distribution du solvant (mL/min)	6
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	24

Conditionnement 2	Solvant B
Volume de solvant (mL)	1
Volume d'air poussé (mL)	0,6
Débit de distribution du solvant (mL/min)	6
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	24

- Chargement :

	Echantillon
Volume de solvant (mL)	2
Volume d'air poussé (mL)	0,8
Débit de distribution du solvant (mL/min)	0,36
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	3

- Lavage :

Lavage 1	Solvant B
Volume de solvant (mL)	1
Volume d'air poussé (mL)	0,8
Débit de distribution du solvant (mL/min)	6
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	24

Lavage 2	Solvant C
Volume de solvant (mL)	1
Volume d'air poussé (mL)	2,0
Débit de distribution du solvant (mL/min)	6
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	24

- Elution :

Elution 1	Solvant A
Volume de solvant (mL)	0,45
Volume d'air poussé (mL)	0,5
Débit de distribution du solvant (mL/min)	1,5
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	3

Elution 2	Solvant A
Volume de solvant (mL)	0,45
Volume d'air poussé (mL)	0,8
Débit de distribution du solvant (mL/min)	1,5
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	3

- Addition :

	Solvant D
Volume de solvant (mL)	0,1
Débit de distribution du solvant (mL/min)	6
Débit d'aspiration du solvant (mL/min)	24

Lors de cette étape additionnelle, le solvant ne passe pas par la cartouche d'extraction, il est directement délivré dans le tube récolteur afin de reconstituer les proportions des constituants de la phase mobile.

- Mélange :

Volume de la fraction d'élution (mL)	0,8
Débit de distribution / aspiration du liquide (mL/min)	3
Nombre de cycle	2

Cette dernière manipulation a pour objectif de garantir l'homogénéité du liquide qui est ensuite introduit dans le système LC/MS-MS.

A cette fin, l'extrait récolté dans les différents tubes a été transféré dans des vials pour HPLC provenant de la société Merck.

1.2.3. Séparation par chromatographie liquide

Nous avons utilisé lors du développement de la méthode, deux systèmes chromatographiques de type Agilent Series 1100 constitués des éléments suivants :

- un dégazeur en ligne (G1322A),
- une pompe binaire (G1312A),
- un passeur d'échantillon muni d'un rack réfrigéré (G1313A),
- un four pour la colonne de type Peltier (G1316A).

Et soit :

- un détecteur à barrette de diode (DAD) (G1315),
- ou un spectromètre de masse (décrit ultérieurement dans ce chapitre).

La colonne analytique utilisée est une Luna® phenyl-hexyl de la société Phenomenex (Torrance, CA, United States) de 150 mm de longueur par 4,6 mm de diamètre interne avec une taille de particule de 5 µm. Une pré-colonne constituée de la même phase stationnaire et de dimension 1 cm (L) x 4,6 mm (ID) a également été utilisée.

Au cours du développement, nous avons optimisé la phase mobile. En effet, selon sa nature, nous avons remarqué une différence d'intensité dans la réponse obtenue en spectrométrie de masse due au pouvoir d'ionisation de cette phase. L'acetonitrile (ACN) gradient grade (Merck), le MeOH, l'acide formique (HCOOH) et l'acétate d'ammonium (NH₄Ac - pour analyse – Merck) et ce, dans différentes proportions ont été testés lors de cette étude.

Finalement, les conditions chromatographiques suivantes ont été utilisées pour la séparation du lévonorgestrel, de l'étalon interne et des autres constituants endogènes extraits de la matrice plasmatique :

- phase stationnaire : phenyl-hexyl (5 µm),
- phase mobile : MeOH/acide formique 0,1 % (90 / 10),
- débit : 0,8 mL/min,
- température : 35 °C,
- volume d'injection : 100 µL,
- température de conservation des échantillons : 4 °C,
- durée d'analyse (run) : 7 minutes.

1.2.4. Détection par spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse que nous avons utilisé au cours de ce travail est un Applied Biosystems API 3000 (Foster City, CA, États-Unis). La source d'ionisation est une source de type APCI utilisée en mode positif. De plus, grâce à la méthode MRM (Multiple Reaction Monitoring), nous avons pu suivre deux transitions.

Au cours du développement de la méthode de dosage, l'ion fragment suivi pour le LNG a été modifié afin de permettre un dosage plus spécifique de cette substance lors des analyses dans la matrice biologique. En effet, comme nous en discuterons ultérieurement, la transition initialement choisie, entraînait la détection d'un grand nombre de composé endogène, perturbant ainsi le dosage de l'hormone (tableau 3).

Substance	Nature	Précurseur (m/z)	Fragment (m/z)
Développement			
LNG	Analyte	313,3	109,3
Méthyltestostérone	Étalon interne	303,5	97,3
Conditions finales			
LNG	Analyte	313,3	245,1
Méthyltestostérone	Étalon interne	303,5	97,3

Tableau 3 : Transitions spécifiques suivies en MS-MS (mode MRM).

Les différents paramètres fixes, inhérents à la spectrométrie de masse, sont repris ci-dessous :

- température de la source (APCI) (°C) : 400
- type de gaz de nébulisation : Air
- débit du gaz de nébulisation (L/min) : 1,2
- pression du gaz de nébulisation (bar) : 4
- type de gaz rideau : Azote
- débit du gaz rideau (L/min) : 1,0
- pression du gaz rideau (bar) : 3
- type de gaz auxiliaire : Azote
- débit du gaz auxiliaire (L/min) : 8,0
- pression du gaz auxiliaire (bar) : 6
- courant appliqué pour la décharge corona (μA) : 3

Les différents paramètres optimisés en fonction du lévonorgestrel (transition : 313,3/245,1) sont repris ci-dessous :

- type de gaz de collision en Q2 : azote
- énergie de collision en Q2 (eV) : 24
- potentiel de l'orifice (V) : 60

Partie 2 :

*Spéciation et dosage de l'étain
stannique*

2. Spéciation et dosage de l'étain stannique

L'octanoate d'étain se présente sous la forme d'un sel d'étain stanneux et d'acide octanoïque déprotoné (figure 20). En milieu aqueux, il est naturellement dissocié sous forme d'ions métalliques Sn(II) et d'anions octanoates.

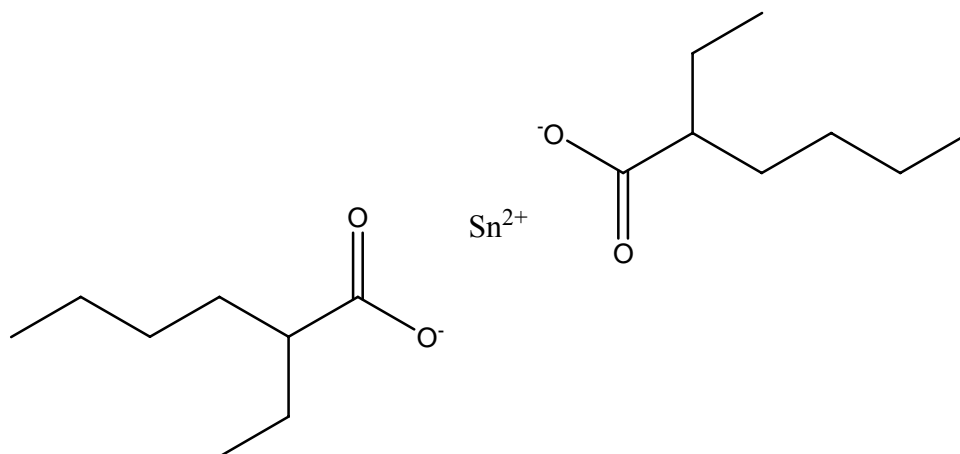


Figure 20 : Structure développée de l'octanoate d'étain.

Ce composé est utilisé en tant que catalyseur lors de réactions de polymérisation du réservoir. L'espèce active est l'ion stanneux. La principale difficulté rencontrée lors de son utilisation, réside dans le fait que cet ion peut être relativement rapidement oxydé sous forme d'ions stanniques, notamment par l'intermédiaire de l'oxygène contenu dans l'air ou dans le milieu réactionnel. Ceci a pour conséquence de changer le rapport Sn(IV)/Sn(II) compromettant dès lors la catalyse.

L'activité du catalyseur dépend donc de son degré d'oxydation/dégradation et de la quantité mise en œuvre lors de la réaction de polymérisation même si celui-ci est toujours mis en excès. Par conséquent, un stockage sous atmosphère inerte d'une part, et la connaissance préalable du rapport Sn(IV)/Sn(II) d'autre part, sont indispensables. En effet, l'octanoate d'étain est l'élément clef dans le cadre de la fabrication de réservoirs qui, rappelons-le, renferme 50 % de lévonorgestrel. Il est dès lors hautement souhaitable de s'assurer de ses performances avant d'amorcer le processus de réticulation et ceci, tant pour des raisons économiques qu'écologiques.

Par conséquent, les ions stanniques apparaissent comme des impuretés dans ce type d'utilisation. C'est pourquoi, une fois la spéciation obtenue, nous nous focaliserons sur leur dosage. En effet, il est plus commode de doser un élément qui apparaît que de suivre la disparition progressive d'un autre. En d'autres termes, il est, dans le cadre de notre étude, plus aisé de doser l'apparition d'étain (IV) plutôt que la disparition de l'étain (II).

2.1. Extraction en milieu aqueux des ions stanneux et stanniques

Comme nous l'avons précédemment souligné, le dosage de substances telles que l'étain, présentant des formes oxydées et réduites caractérisées par des potentiels proches, est rendu possible par l'intermédiaire d'un complexant. En effet, dans l'hypothèse où les deux formes sont définies par des constantes d'instabilité différentes, avec le complexant choisi, leur vague respective s'en verront décalées. En conséquence, le rejet vers des potentiels plus négatifs de la vague de la forme la plus complexée devrait permettre la spéciation.

L'octanoate est lui-même un complexant de l'étain. Cependant, celui-ci est peu soluble dans l'eau (Solubilité : 25 mg/L) [26,27]. De plus, il ne permet pas l'établissement d'un signal correct et quantitativement interprétable des vagues polarographiques dues aux différents étages d'oxydation de l'étain. Il nous est donc apparu important de mettre au point une méthode conduisant à une séparation quantitative entre l'étain et cet anion au moyen d'un complexant plus approprié à la spéciation et au dosage du catalyseur.

2.1.1 L'extraction liquide / liquide

Considérant les différences de solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques de l'octanoate d'étain, des ions octanoates et de l'étain à l'état ionique, il est possible d'imaginer un système permettant la séparation de l'octanoate dans une phase organique et de l'étain dans une phase aqueuse.

Plusieurs solvants organiques tels que le tétrahydrofurane (THF), le diméthylacétamide (DMA) ou encore l'heptane permettent une solubilisation appropriée du catalyseur. Gardons cependant à l'esprit que l'oxygène entraîne rapidement un changement d'étage d'oxydation de l'étain et par là, une modification du rapport Sn(II)/Sn(IV) initialement présent dans le produit. Il est donc nécessaire de désoxygéner correctement tous les solvants utilisés. A cette fin nous avons retenu un bullage à l'azote. Or, celui-ci demande du temps et provoque, surtout pour des solvants ayant un point d'ébullition bas, une évaporation. Notre choix a donc été influencé par ce dernier critère.

Les températures d'ébullition des trois solvants initialement retenus sont les suivantes : THF = 66 °C, DMA = 163 °C – 164 °C et heptane = 98,4 °C. Il nous est d'emblée apparu que le THF était un solvant trop volatil pour être utilisé dans ce contexte.

Il semble donc que les deux autres solvants conviennent. Cependant, notre choix s'est tourné, tout naturellement, vers l'heptane car celui-ci fait partie intégrante du processus de fabrication du dispositif intra-utérin. Il est utilisé en tant que rhéofluidifiant du mélange entre le catalyseur et l'agent réticulant. Il se trouve donc totalement englobé dans le système de contrôle qualité du projet.

En ce qui concerne la phase aqueuse, le choix est beaucoup plus aisé. Un complexant usuel, tel que les ions chlorures, devrait suffire à maintenir les ions stanneux et stanniques dans la phase aqueuse. Les ions octanoates, quant à eux, devraient passer dans la phase organique de part leur plus grande solubilité. Notre choix s'est porté sur les ions chlorures ($pK_a = 1,7$) car les solutions standards d'ions stanniques disponibles dans le commerce sont généralement des solutions de chlorure d'étain (IV) en milieu chlorhydrique 2 M. Ceci va donc nous permettre d'anticiper un éventuel effet de matrice (SC versus SV).

Revenons sur la problématique critique de l'élimination de l'oxygène. Nous avons développé un dispositif maintenu sous atmosphère inerte et permettant, de plus, une extraction liquide / liquide du catalyseur. Ce procédé permet la mise en contact intime des deux phases afin d'effectuer l'extraction de l'étain sous ses deux formes. Il est également important d'insister sur le fait que la mise en place d'un environnement inerte permet la récupération des deux espèces ioniques de l'étain dans un rapport inaltéré. Chaque phase mise en jeu dans ce processus à un volume de 50 mL (figure 21).

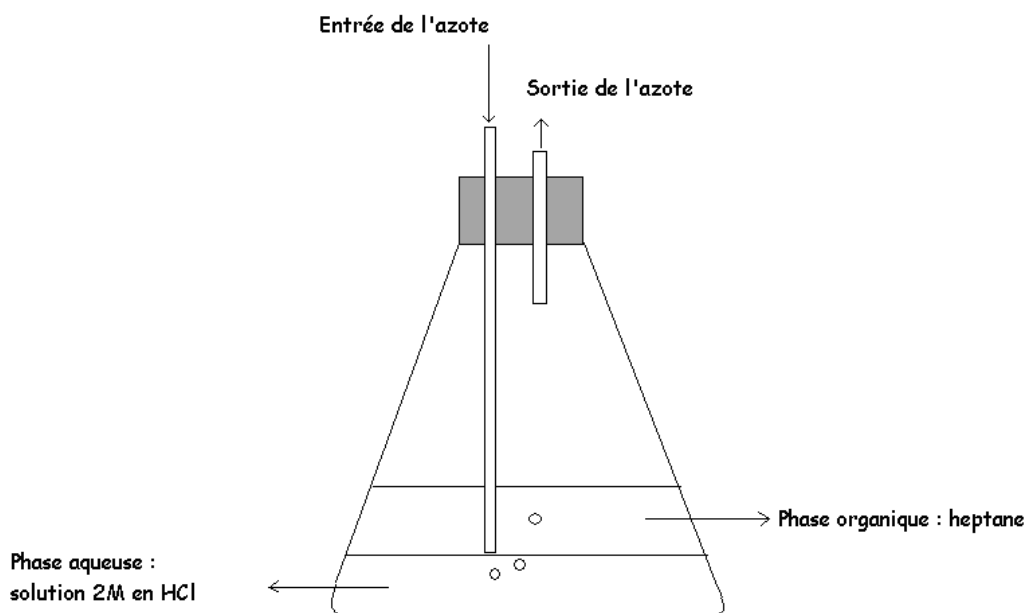


Figure 21 : Schéma du dispositif permettant l'extraction liquide / liquide de l'étain à partir de l'octanoate d'étain par bullage d'azote.

Le premier tube en verre permet un bullage d'azote à la frontière entre les deux phases, ce qui entraîne une augmentation de la surface d'échange entre les deux phases. Le second permet l'échappement du gaz incorporé dans le système.

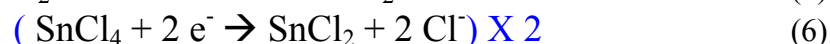
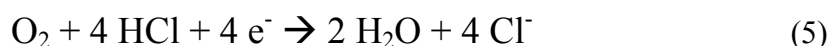
Une fois le principe d'extraction en lui-même élaboré, nous avons étudié deux paramètres importants : l'influence éventuelle de ce procédé sur les ions stanneux (oxydation) et la durée d'extraction.

2.1.2. L'influence du procédé d'extraction

Au cours de ce point, nous présenterons des résultats ultérieurs au choix de l'électrolyte de support (présenté au point 2.2.) et nécessitant l'explication du signal polarographique obtenu pour une solution contenant de l'étain II et IV (spéciation). Cependant pour des raisons de fluidité, nous avons choisi de présenter cette section ainsi que la suivante (2.1.3) de manière anticipative.

Retenons simplement, pour l'instant, que l'étain stanneux, dans les conditions optimales de spéciation, engendre deux vagues polarographiques proches (-600 mV et -800 mV) et que l'étain stannique n'en provoque qu'une seule à un potentiel inférieur (-1200 mV).

Comme nous l'avons déjà évoqué, le risque le plus important lié à l'extraction liquide / liquide est l'oxydation des ions stanneux. En effet, vu que celle-ci conduit aux ions stanniques (cf. équations 5 à 7), plus aucune conclusion sur le degré de dégradation de l'octanoate d'étain ne pourrait être envisagée par leur dosage. Comme nous en avons déjà discuté, le barbotage d'azote de l'intégralité des solutions envisagées, ainsi que lors du processus d'extraction, est mis en place afin de prévenir ce problème.



Afin de vérifier que le bullage d'azote est suffisant à l'établissement d'un milieu inerte, nous avons préparé une solution de chlorure stanneux à la concentration finale de 4.10^{-5} M. L'extraction a ensuite été réalisée à partir de 100 ml d'une solution $1,96.10^{-4}$ M en Sn(II) (phase aqueuse) en présence de 100 mL d'heptane (phase organique). Une aliquote de 10 mL de la phase aqueuse extraite pendant 2H est enfin diluée dans un jaugé de 50 mL contenant le tampon et le complexant. N'ayant aucune connaissance sur ce sujet, ce temps d'extraction avait initialement été sélectionné. Son optimisation sera discutée au cours du point suivant. Nous avons ajusté chacune des solutions à un pH de 10 unités grâce à une solution de NaOH 5 M. Les mises au trait ont été faites à l'aide d'eau Milli-Q également désoxygénée.

De plus, nous avons également effectué une vérification avec une solution d'étain stannique afin de s'assurer que l'étain n'avait pas tendance à passer dans la phase organique. Cet essai a été conduit à l'aide d'une solution d'étain stannique à la concentration de $6,74.10^{-5}$ M préparée à partir d'une solution étalon à 1000 ppm.

Sn(II) → Sn(IV) (vague à - 600 mV) :

	Intensité du pic d'oxydation (nA)	Recouvrement (%)
Solution ayant subi l'extraction	89,7	101
Solution n'ayant pas subi l'extraction	88,2	

Tableau 4 : Recouvrement d'extraction pour le pic d'oxydation de l'étain stanneux.

Sn(IV) → Sn(0) (vague à - 1200 mV) :

	Intensité du pic de réduction (nA)	Recouvrement (%)
Solution ayant subi l'extraction	38,2	100
Solution n'ayant pas subi l'extraction	38,2	

Tableau 5 : Recouvrement d'extraction pour le pic de réduction de l'étain stannique.

Les résultats obtenus (tableaux 4 et 5) montrent un recouvrement proche ou égal à 100 %. Nous pouvons donc conclure que la méthode d'extraction envisagée n'entraîne pas une oxydation de l'étain stannique. Toutefois, lors du développement de la méthode, nous avons remarqué que, dans certaines solutions, l'analyse polarographique révélait la présence d'une faible quantité d'Sn(IV) dans des solutions ne devant normalement pas en contenir. Lors d'investigations ultérieures, nous avons pu identifier que cette apparition d'étain stannique était due aux dilutions successives réalisées sans toutes les précautions de désoxygénation nécessaires. Ceci nous a donc permis de confirmer l'importance de la désoxygénation des solutions. Nous avons dès lors adapté le mode opératoire de la préparation des solutions afin d'éviter le plus de dilution possible et donc l'oxydation indésirable de l'étain.

2.1.3. Optimisation du temps nécessaire à une extraction quantitative

Ayant démontré que le processus d'extraction n'avait pas d'influence sur le rapport Sn(II)/Sn(IV), nous nous sommes attachés à optimiser le temps d'extraction afin de diminuer la durée globale de l'analyse d'un échantillon. En effet, celui-ci est beaucoup trop long (2 h) tant au niveau de la routine que de l'évaluation des performances de la variance (effet « jour ») en phase de validation.

Préalablement à cette optimisation, nous avons évalué l'impact de la diminution du temps d'extraction sur la récupération de solution reconstituée. Nous n'avons observé aucune différence significative de récupération entre un échantillon extrait 2 h, 1 h ou 30 minutes.

Notre optimisation, se base sur l'extraction de plusieurs aliquotes de 200 mg provenant d'un même échantillon du catalyseur. A cette fin, nous avons délibérément choisi un catalyseur plus ancien afin d'être certain qu'il contienne un pourcentage d'étain stannique suffisant à sa détection. Notre analyse se base donc sur l'intensité (en nA) de la vague polarographique due à Sn(IV). Nous avons pesé approximativement exactement 200 mg de catalyseur, mais vu sa viscosité, nous avons normalisé cette intensité à une prise d'essai de 200 mg en considérant une relation linéaire.

Les extractions ont été réalisées dans 50 mL d'heptane en présence de 50 mL d'une solution chlorhydrique 2M. Consécutivement à l'extraction, 5 mL de la phase aqueuse ont été dilués dans l'électrolyte de support contenant une concentration en malonate de 0,5 M et de 0,2 M en tampon bicarbonate / carbonate.

Sur la base des résultats précédents, différents temps d'extraction (≤ 30 minutes) ont été choisis arbitrairement afin de conduire cet essai. Nous avons respectivement considéré 5, 15 et 30 minutes d'extraction ainsi qu'un essai sans bullage. Ce dernier correspond simplement à la mise en contact des deux phases dans le système d'extraction auxquelles nous appliquons deux à trois mouvements de rotation afin d'amorcer l'extraction.

	Intensité (nA)	Intensité normalisée (nA)	masse de catalyseur (mg)
0'	10,90	10,39	209,8
5' (Essai 1)	15,24	15,22	200,2
5' (Essai 2)	18,84	18,57	202,9
15'	15,65	15,51	201,8
30'	17,66	17,35	203,6
	15' vs 30'	5' (moy) vs 30'	0' vs 30'
Recouvrement (%)	89,4	97,4	59,9

Tableau 6 : Résultats de l'optimisation du temps d'extraction (considérant 0, 5, 15 et 30 minutes d'extraction).

Compte tenu du fait qu'au moment de cet essai, nous n'avions pas encore évalué l'influence du pH, et son importance comme nous le verrons par la suite, sur l'intensité de la réponse du pic dû aux ions stanniques, une relativement grande variabilité a été observée. Cependant, comme nous le montre le tableau 6, le recouvrement entre les différents temps d'extraction (5, 15 et 30 minutes) peut être considéré comme semblable (recouvrement compris entre 89 % et 110 %). De plus, cette étude nous a permis de confirmer la nécessité du processus d'extraction. En effet, un recouvrement de l'ordre de 60 % est obtenu lors de la simple mise en contact des deux phases. Une analyse visuelle des polarogrammes obtenus après 5 minutes de bullage (figure 22B) et en son absence (figure 22A) l'illustre clairement. Cette différence est d'autant plus significative que la concentration de l'échantillon B était inférieure à celle de l'échantillon A.

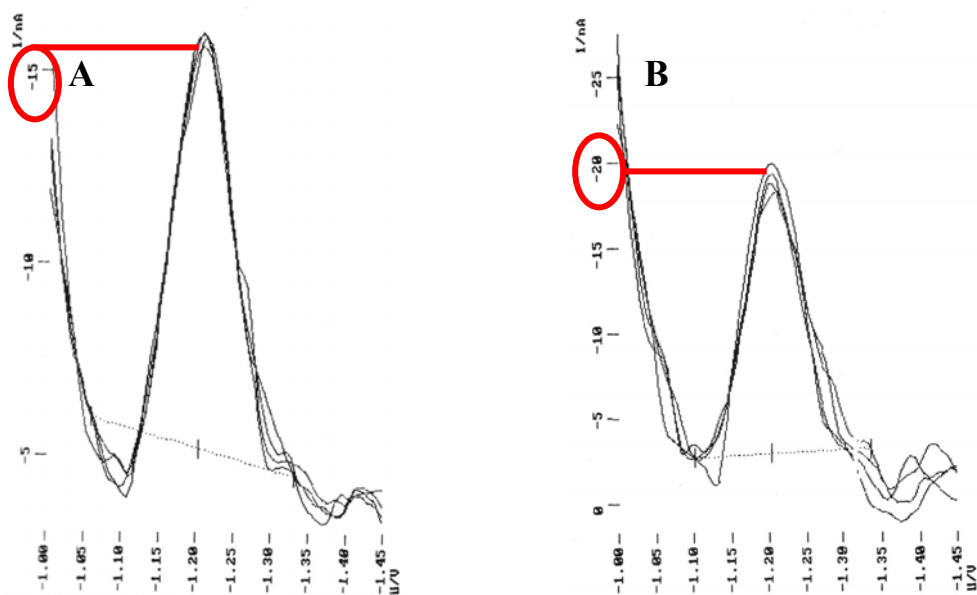


Figure 22 : Polarogrammes montrant le pic dû à l'étain stannique dans le cas d'une extraction de 0' (A) et de 5' (B).

Sur la base de ces résultats nous avons décidé de limiter le temps de bullage et donc d'extraction à 5 minutes pour les prochaines manipulations. Cette étude nous a donc permis de diminuer très significativement le temps consacré à cette étape du dosage.

2.2. L'électrolyte de support

De manière générale, l'électrolyte de support est composé d'un complexant permettant la séparation de vagues polarographiques, d'un même élément ou de plusieurs, possédant le même potentiel de demi-vague.

Ce dernier est généralement accompagné d'un tampon. Classiquement, nous en rencontrons deux types : les zwitterions et les couples acide / base. Pour rappel, les zwitterions sont des composés neutres possédant en nombre égal des charges électriques formelles d'une unité et de signes opposés.

Dans certains cas, il est possible que le milieu électrolytique soit additionné d'un sel neutre afin d'augmenter le nombre de charges positives et négatives en solution dans le but d'assurer une conductivité suffisante et de limiter le courant de migration.

2.2.1. Le complexant

2.2.1.1. Les ions fluorures

Dans un premier temps, nous nous sommes basés sur les travaux de Lejeune et coll. [28] rapportant la détermination polarographique d'étain stanneux dans des échantillons contenant de l'étain stannique tels que des kits radiopharmaceutiques de 99m-Techetium. Durant cette première partie du développement de la méthode le mode de travail choisi a été le mode DME.

Afin de déterminer si le complexant choisi permettrait la séparation des vagues polarographiques dues aux ions stanneux et stanniques (cf. point 1.1.2.), nous avons préparé deux solutions contenant uniquement de l'étain (IV) à une concentration de $1,37 \cdot 10^{-5}$ M et de $1,35 \cdot 10^{-4}$ M ainsi que deux autres contenant, cette fois-ci, uniquement de l'étain (II) à une concentration de $1 \cdot 10^{-5}$ M et $1 \cdot 10^{-4}$ M.

Dans chacune des solutions analysées, nous avons introduit du fluorure de sodium à une concentration de 0,7 M et du nitrate de sodium à 0,1 M. L'HEPES (tampon zwitterionique) est quant à lui présent à raison de 0,1 mol/L. Le pH des solutions stanneuses est de 7,83 et 7,94 et celui des solutions stanniques est de 8,11 et 8,04.

Comme nous nous y attendions, la solution d'étain stanneux à $1 \cdot 10^{-4}$ M (figure 23A) présente une vague polarographique à -720 mV due à la réduction de l'étain (II) en étain métallique. Un deuxième pic vers -1050 mV est également apparu. Cependant, nous n'avons pu en définir son origine. Il nous semblait raisonnable de penser que celui-ci puisse être dû à la vague d'oxydation de l'étain (II). Mais étant donné que celle-ci n'évolue pas en fonction de la concentration en Sn(II), elle ne peut

pas lui être reliée et resterait ininterprétable. La deuxième solution préparée à une concentration de 1.10^{-5} M, n'a pas permis l'observation d'un pic du fait de sa trop faible concentration (figure 23B).

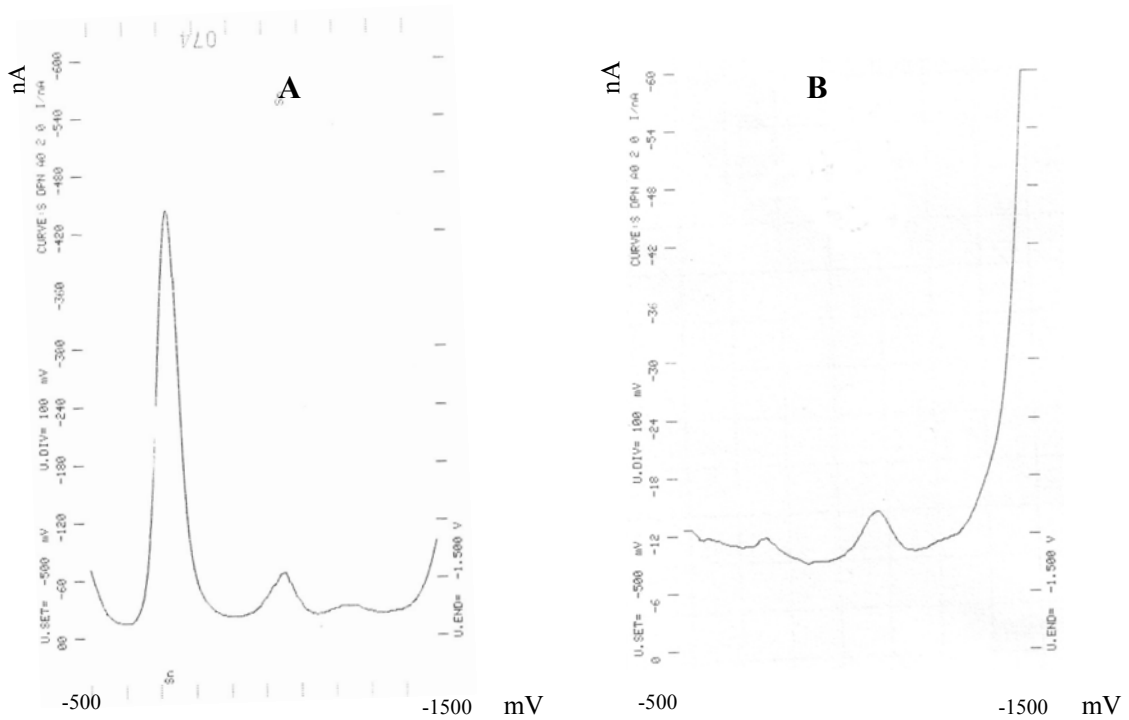


Figure 23 : Polarogramme des solutions d'étain (II) complexées par les fluorures à 1.10^{-4} M (A) et 1.10^{-5} M (B).

Les solutions ne contenant que de l'étain sous sa forme la plus oxydée ont donné lieu à des polarogrammes tous identiques ne contenant aucun pic (figure 24).

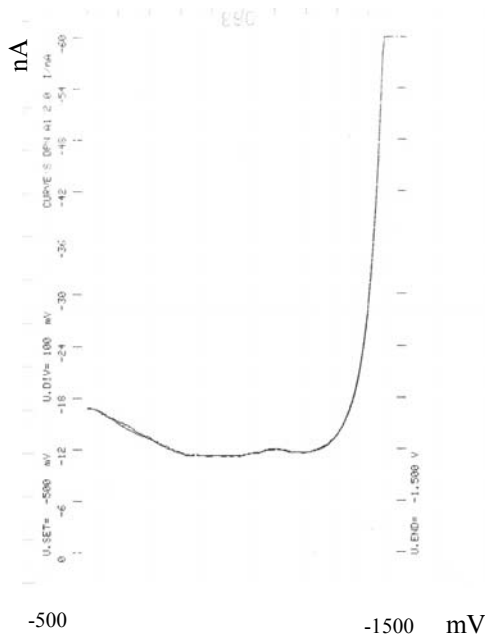


Figure 24 : Polarogramme représentatif d'une solution d'étain (IV) complexé par les fluorures.

À la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que l'utilisation des fluorures permet bien la spéciation des deux espèces ioniques de l'étain. En effet les solutions d'Sn(II) montrent au moins un pic alors que celles d' Sn(IV) n'en montrent aucun.

Pour rappel, les objectifs du dosage sont, d'une part, la spéciation et le dosage des ions stanniques, d'autre part. Or il paraît évident au terme de ces expériences que nous ne pourrions pas y arriver par l'intermédiaire d'une complexation par les fluorures. D'autres complexants de l'étain ont donc été envisagés [29,31]. Notre choix s'est arrêté sur les ions malonates.

2.2.1.2. Les ions malonates

A l'instar de ce que nous avons fait lors de l'essai avec les fluorures, nous avons préparé trois solutions contenant une quantité d'étain stannique respectivement à $2,5 \cdot 10^{-4}$ (1), $1 \cdot 10^{-4}$ (2) et $1 \cdot 10^{-5}$ M (3). Nous avons également préparé une solution identique, mais ne contenant pas d'Sn(IV) (blanc). La composition de l'électrolyte de support est expliquée au point 1.1.2.

L'analyse polarographique des solutions (1) et (2) a permis de mettre en évidence un pic vers -1200 mV. Celui-ci semble augmenter « normalement / linéairement » avec la concentration. La solution (3) ainsi que le blanc ne présente aucun pic (figure 25).

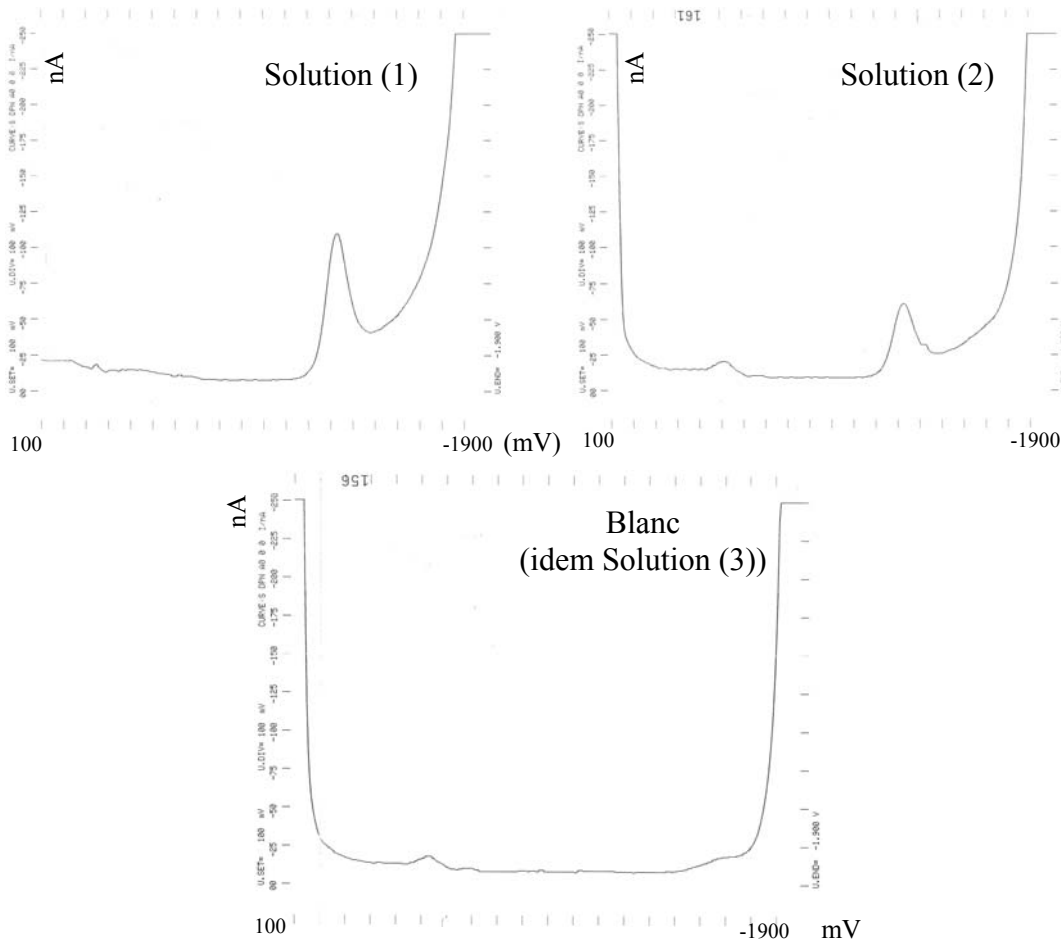


Figure 25 : Polarogrammes obtenus lors de l'analyse de solutions (1), (2) et du blanc.

Nous pouvons donc conclure de cet essai que dans ces conditions une vague polarographique due à l'étain stannique est visible. De plus, les conditions envisagées n'entraînent pas de pic parasite pouvant gêner la détermination de l'étain.

Dans un second temps, nous avons préparé deux solutions stanneuses à $2,5 \cdot 10^{-4}$ M et $1 \cdot 10^{-4}$ M afin de vérifier que, dans les mêmes conditions, ces ions donnaient une ou plusieurs vagues polarographique distinctes. Autrement dit, que la spéciation, et *a fortiori* le dosage des ions stanniques, était réalisable. La préparation de l'électrolyte de support restait identique.

Comme nous le montre la figure 26, les résultats sont concluants. En effet les ions stanneux donnent lieu à deux vagues. Un d'oxydation à -600 mV et une de réduction à -800 mV. Il est donc possible, dans ces conditions, de réaliser la spéciation de l'étain ainsi que le dosage spécifique des ions stanniques.

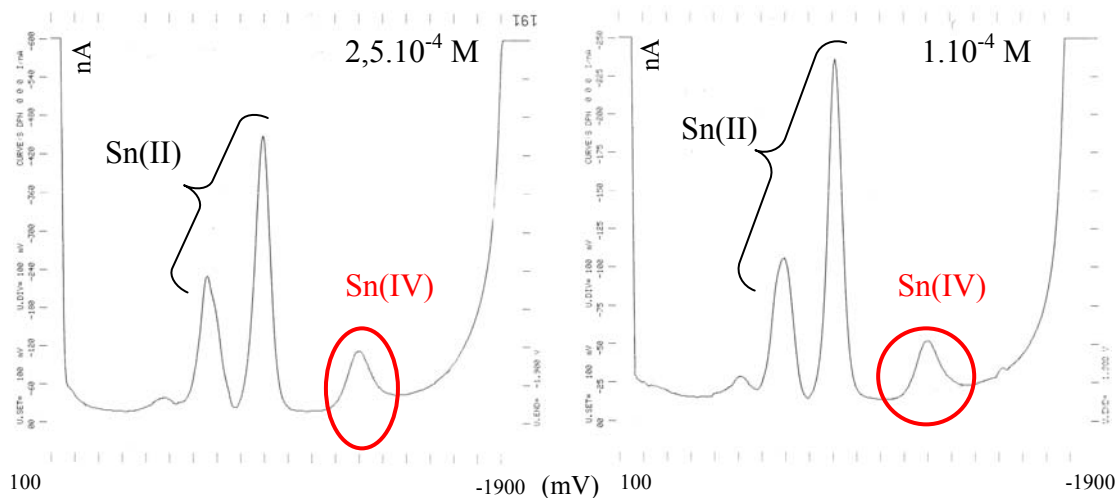


Figure 26 : Polarogrammes des solutions stanneuses complexées grâce aux malonates.

Remarquons que les deux polarogrammes de la figure 26 montrent également un troisième pic. Celui-ci est dû à une dégradation de la solution en Sn(IV). En effet, à ce stade du développement nous n'avons pas encore affiné la préparation des solutions stanneuses.

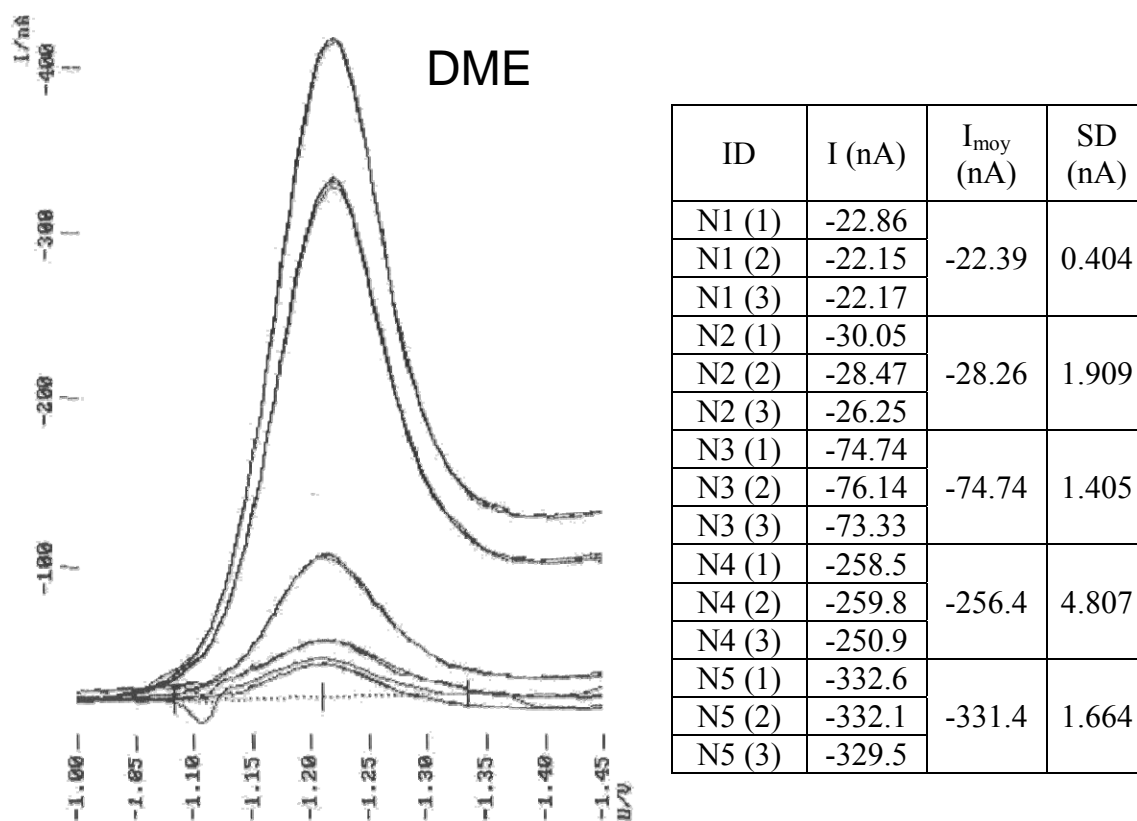
2.2.2. L'influence du pH sur l'intensité de la réponse

Au cours de la mise au point de la méthode de dosage, nous avons remarqué une variabilité non négligeable de l'intensité de la réponse du pic d'Sn(IV) en fonction du pH de la solution analysée. Une étude du comportement de ce pic en fonction du pH d'une solution unique a alors été envisagée. Quatre aliquotes de 10 mL chacun ont été prélevés à partir de 50 mL d'une solution à $5 \cdot 10^{-5}$ M en Sn(IV) complexée et tamponnée. Le pH initial des quatre solutions était de 9,52. Celles-ci ont respectivement été ajustées dans la cellule polarographique à pH : 9,81, 9,59, 9,40, 9,22 à l'aide soit d'acide chlorhydrique 5 M, soit d'hydroxyde de sodium 5 M (tableau 7). Les quantités de base ou d'acide ajoutées afin d'ajuster le pH sont largement négligeables par rapport au volume de la solution analysée et ont donc une influence minimale (voir négligeable) sur la concentration en ions stanniques.

2.3. Choix du mode de travail

La détermination des ions stanniques peut être conduite suivant deux modes légèrement différents, soit le mode de travail DME, soit le mode SMDE. L'utilisation du mode SMDE devrait nous permettre d'obtenir une meilleure reproductibilité de la réponse. En effet, pour ce type d'électrode, chaque mesure s'effectue sur une goutte dont la surface reste constante, améliorant à la fois la variabilité des résultats et le rapport signal sur bruit (S/N). En contre partie, ce mode nous conduit à une légère perte de sensibilité.

Afin de le vérifier, nous avons effectué une comparaison de ces deux techniques afin de sélectionner le mode de travail qui sera utilisé lors de la validation de la méthode et donc lors des dosages effectués en routine. Cet essai a été réalisé en considérant l'intervalle de dosage à valider. Cinq standards de calibration ont été sélectionnés : 3 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 40 mg/L et 50 mg/L. Lorsque nous considérons une prise d'essai d'octanoate d'étain de 200 mg, ces concentrations correspondent respectivement à une dégradation du produit de 2,6 %, 5,1 %, 10,2 %, 34,1 %, 42,7 % (figure 28 et figure 29).



Intensité du pic d'Sn(IV) (DME)

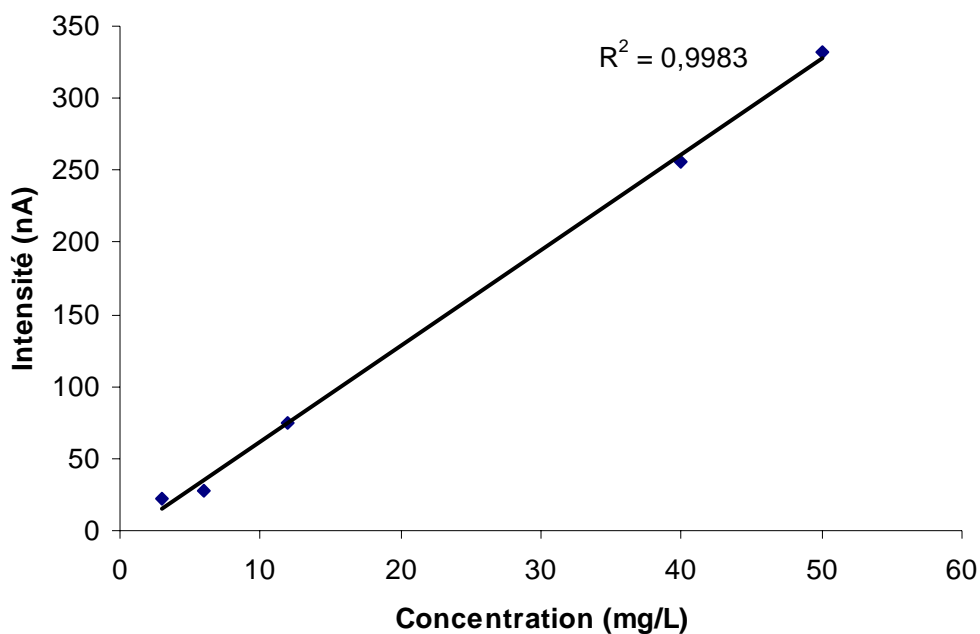
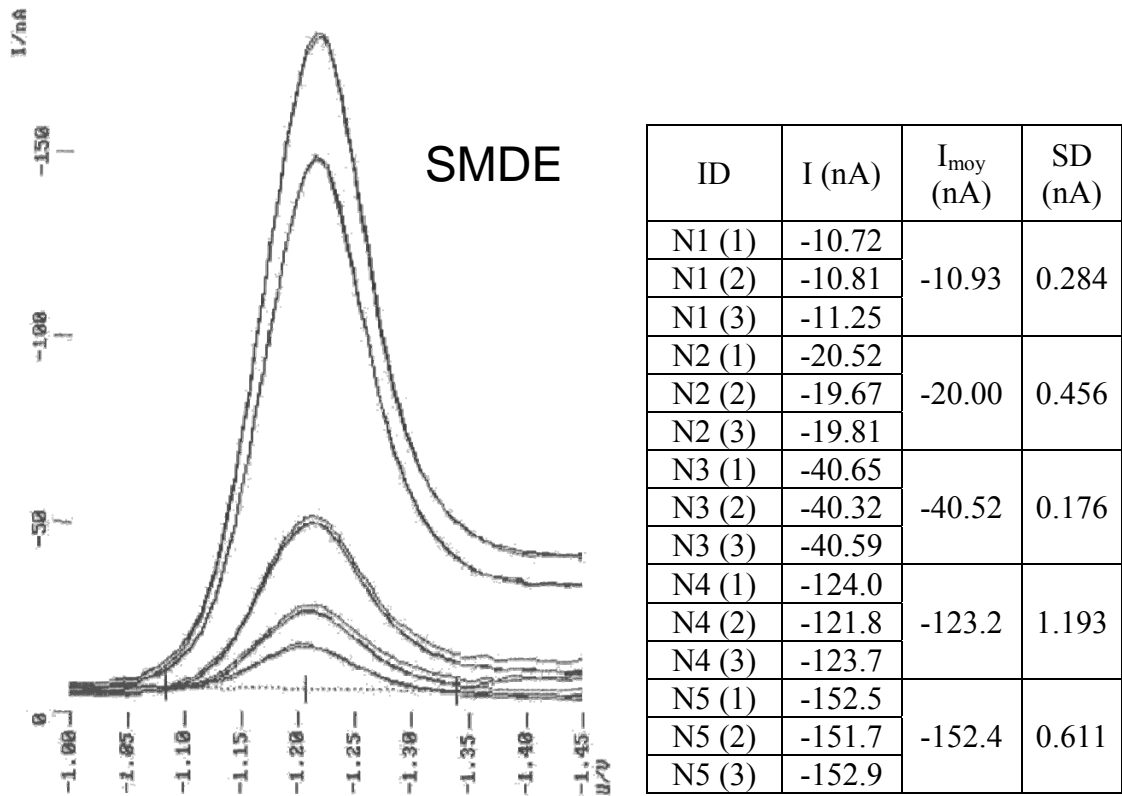


Figure 28 : Résultats de l'analyse polarographique, en DME, des cinq standards de calibration sur l'intervalle de dosage à valider.



Intensité du pic d'Sn(IV) (SMDE)

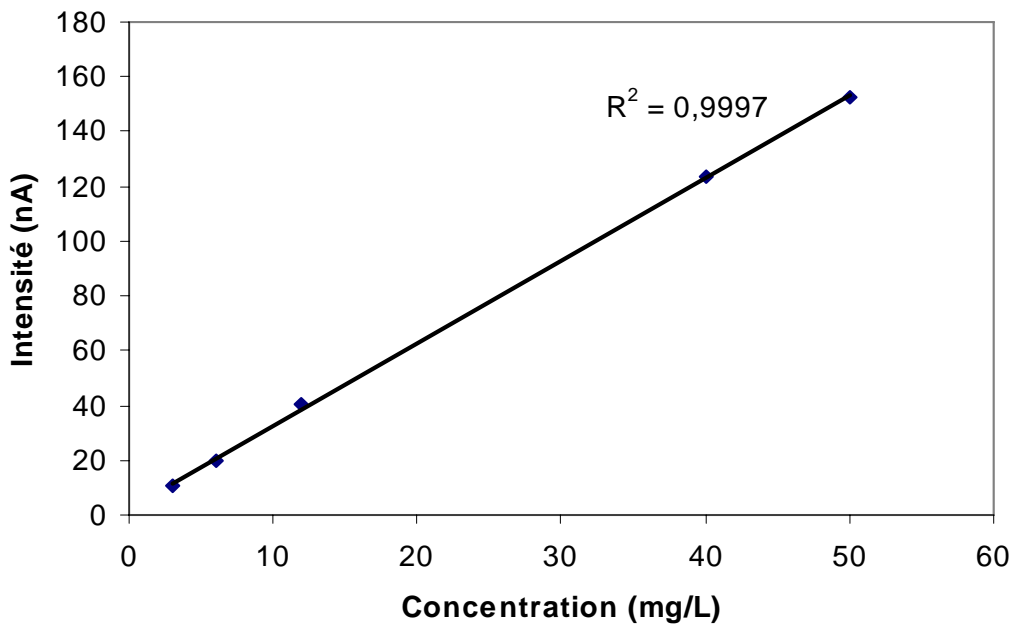


Figure 29 : Résultats de l'analyse polarographique, en SMDE, des cinq standards de calibration sur l'intervalle de dosage à valider.

Bien que nous ayons constaté une réduction de l'intensité du pic lors de l'utilisation du mode SMDE, la détermination de l'ion stannique à la concentration la plus faible était toujours possible. De plus, par cette expérience, nous avons pu démontrer que ce mode diminuait apparemment la variabilité des résultats. Nous avons dès lors décidé de travailler en mode SMDE pour les analyses de routine et d'en vérifier les performances lors de la validation.

2.4. Validation de la méthode de dosage

Comme nous l'avons signalé dans la partie introductive, l'intervalle de dosage à considérer en phase de validation doit inclure tous les futurs résultats.

Rappelons par ailleurs que le catalyseur utilisé dans la réaction de polymérisation du polydiméthylsiloxane est vérifié afin de contrôler sa pureté en Sn(II). Sur base de l'expérience acquise lors des réactions préliminaires de polymérisation, il semble qu'un degré de dégradation des ions stanneux supérieur à 10 % affecte l'efficacité du catalyseur. En revanche, en deçà de ce pourcentage, l'octanoate d'étain remplit pleinement son rôle de catalyseur. Une fois la méthode validée, nous pourrions affirmer cette estimation par une étude de dégradation progressive du catalyseur couplé à son utilisation lors d'essai de réticulation du polymère chargé en LNG. Considérant tous ces éléments, nous avons fixé l'intervalle de dosage entre 2,5 % et 40 % de dégradation. Pour ce faire, cinq niveaux de concentration en Sn(IV) ont été envisagés : 3 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 40 mg/L et 50 mg/L. Ces niveaux représentent respectivement une dégradation de 2,6 %, 5,1 %, 10,2 %, 34,1 % et 42,7 % en considérant une prise d'essai initiale de 200 mg de catalyseur.

Etant donné la nature complexe de la matrice, mais également du processus d'extraction en termes de reproductibilité (expérience acquise lors du développement de la méthode), des limites d'acceptation ont été fixées à 30 % (erreur totale).

Le traitement des données de validation nous permettra de tracer un profil d'exactitude sur ces cinq niveaux envisagés en considérant un risque α de 5 %. Ce risque signifie que nous acceptons qu'à l'avenir 5 valeurs sur 100 soient en dehors des limites d'acceptation fixées. Ainsi que le montre le tableau 9, différents modèles de régression ont été évalués sur la base des données générées lors de l'exercice de validation.

Partie 2 : Spéciation et dosage de l'étain stannique

Modèle	Index d'exactitude	LLoQ et ULoQ (mg/L)	Index d'intervalle de dosage	Index de précision	Index de justesse
Quadratic Regression	0.7701	[8.509 , 50.00]	0.8828	0.5983	0.8648
Weighted (1/X) Quadratic Regression	0.7580	[9.724 , 50.00]	0.8569	0.5560	0.9139
Linear Regression after LOGARITHM transformation	0.7438	[8.654 , 50.00]	0.8797	0.5150	0.9084
Weighted (1/X ²) Linear Regression	0.7395	[9.943 , 50.00]	0.8523	0.5136	0.9239
Weighted (1/X) Linear Regression	0.7389	[9.673 , 50.00]	0.8580	0.5173	0.9089
Linear Regression after SQUARE ROOT transformation	0.7368	[9.372 , 50.00]	0.8644	0.5195	0.8908
Linear Regression	0.7333	[9.859 , 50.00]	0.8541	0.5237	0.8815
Weighted (1/X ²) Quadratic Regression	0.7312	[11.03 , 50.00]	0.8292	0.5140	0.9171
Linear Regression Through 0 fitted with the level 3.0 only	0.6734	[10.57 , 50.00]	0.8390	0.4786	0.7603
Linear Regression Through 0 fitted with the level 5 only	0.5956	[14.62 , 50.00]	0.7528	0.3598	0.7801

Tableau 9 : Tableau de classement des différents modèles de calibration.

Ce tableau classe sur la base de l'index d'exactitude et ce, par ordre décroissant, ces différents modèles de régression. L'index d'exactitude est la moyenne géométrique des autres index correspondant aux différents critères de performance d'une méthode analytique.

En fonction des index d'exactitude, les modèles quadratiques, pondéré ou non, semblent être les plus adéquats. Cependant, gardons à l'esprit qu'une méthode polarographique doit normalement donner une réponse linéairement proportionnelle à la concentration introduite et ce, sans transformation mathématique de la réponse. En effet, si la justification d'un modèle quadratique peut trouver son origine au niveau du procédé d'extraction, en revanche celle étayant l'utilisation d'une transformation de type logarithmique nous paraît difficile et donc non fondée. Par ailleurs, nous avons constaté que quel que soit le modèle choisi, aucun de ceux-ci ne permet un dosage couvrant tout l'intervalle envisagé. Par conséquent, nous avons choisi l'index de justesse comme outil de décision. Celui-ci nous montre que trois modèles de calibration

(en bleu) se révèlent intéressants. Leur profil respectif est présenté dans les figures 30, 31 et 32.

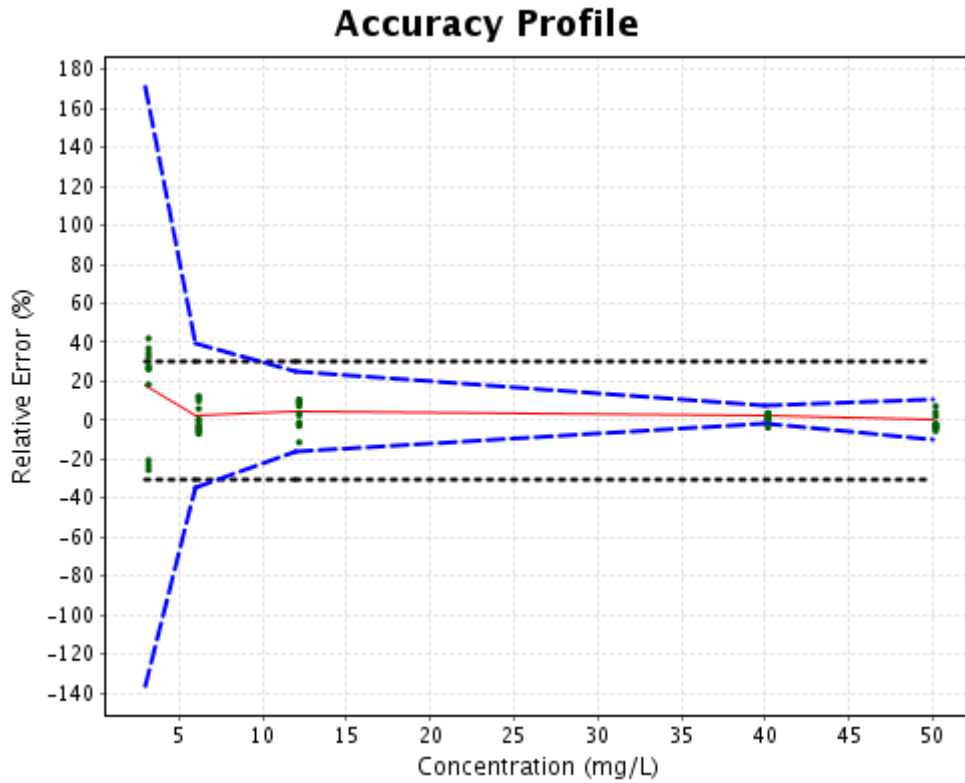


Figure 30 : Profil d'exactitude suivant le modèle de régression linéaire pondéré ($1/X^2$) considérant un risque α de 5 %.

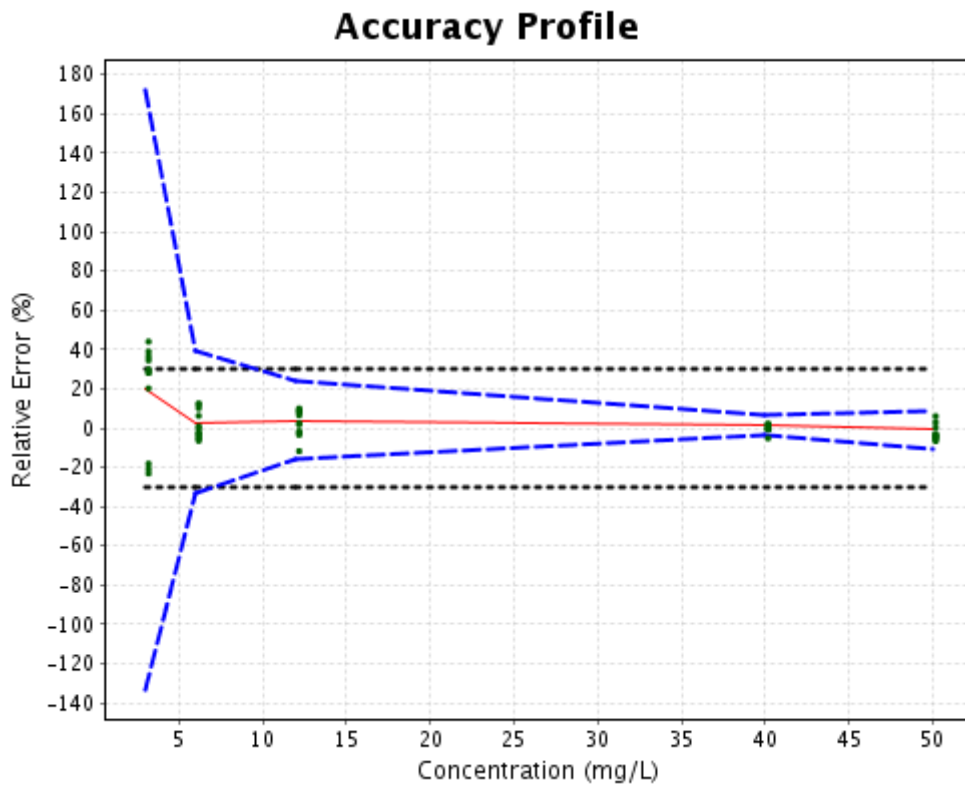


Figure 31 : Profil d'exactitude suivant le modèle de régression linéaire pondéré ($1/X$) considérant un risque α de 5 %.

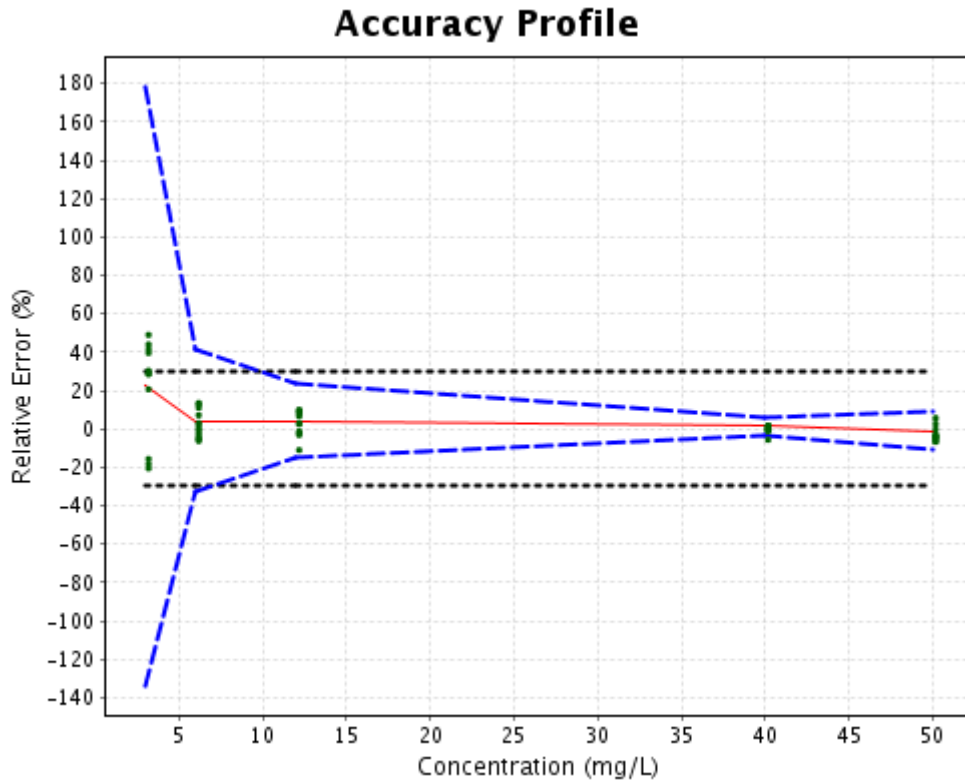


Figure 32 : Profil d'exactitude suivant le modèle de régression linéaire simple considérant un risque α de 5 %.

Ces profils nous montrent qu'il ne nous est pas permis de déterminer exactement la teneur en ions stanniques aux deux premiers niveaux de concentration sélectionnés. En effet, on constate, qu'à ces concentrations, la méthode présente une variabilité ainsi qu'un biais trop importants. Il serait donc bon d'envisager d'adapter notre méthode de dosage lorsque nous sommes en présence de faibles concentrations. Nous reviendrons un peu plus tard dans ce chapitre sur les améliorations envisageables dans ce contexte.

En attendant, nous avons retraité les données de validation en considérant un risque α de 10 %. En raison de l'objectif final de la méthode et de sa complexité, il nous semble que cette option consiste en un bon compromis. Dans cette optique le modèle de calibration le plus adéquat est le modèle de régression linéaire pondérée ($1/X^2$) (tableau 10) et dont le profil d'exactitude est illustré dans la figure 33.

Modèle	Index d'exactitude	LLOQ et ULOQ (mg/L)	Index d'intervalle de dosage	Index de précision	Index de justesse
Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	0.8072	[5.944 , 50.00]	0.9374	0.6074	0.9239

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des index décisionnels du modèle de calibration choisi.

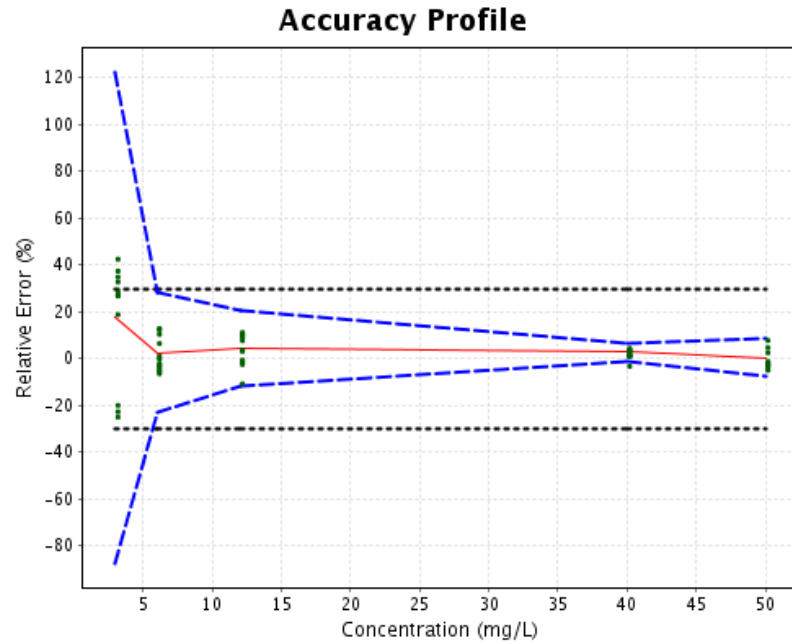


Figure 33 : Profil d'exactitude suivant le modèle de régression linéaire pondérée ($1/X^2$) considérant un risque α de 10 %.

Sur la base de ce profil d'exactitude, nous pouvons dire qu'il nous est maintenant permis de doser l'élément ciblé jusqu'à une concentration d'approximativement 6 mg/L. Nous avons dès lors décidé de limiter l'intervalle de dosage aux niveaux 2 à 5 (6 à 50 mg/L) et de retraiter les données. Cette modification de l'intervalle de dosage ne bouleverse naturellement pas le choix du modèle de calibration optimal (figure 34). Les résultats statistiques correspondant des différents critères de validation ont ensuite été calculés et présentés ci-après. Nous commencerons par la justesse de la méthode, suivie par les données de fidélité (tableau 11 et tableau 12). Ensuite, nous parlerons de la linéarité des résultats pour terminer par les limites de quantification et de détection.

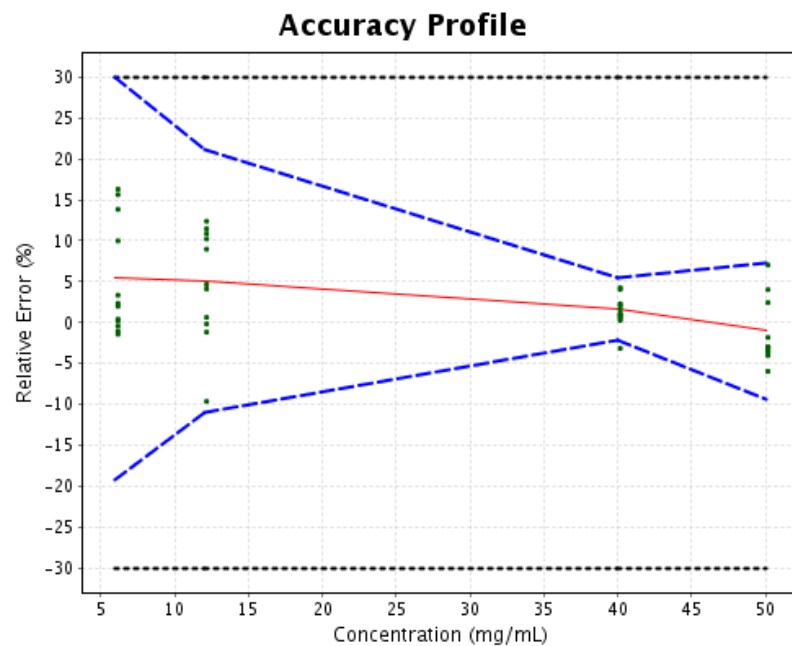


Figure 34 : Profil d'exactitude pour les niveaux N2 à N5 suivant le modèle de régression linéaire pondérée ($1/X^2$) considérant un risque α de 10 %.

2.4.1. La justesse de la méthode

Niveau de concentration	Moyenne des concentrations introduites (mg/L)	Moyenne des concentrations recalculées (mg/L)	Biais absolu (mg/L)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
2.0	6.0	6.3	0.32	5.4	105.4
3.0	12.0	12.6	0.61	5.1	105.1
4.0	40.0	40.7	0.66	1.7	101.7
5.0	50.0	49.5	-0.50	-1.0	99.00

Tableau 11 : Résultats de validation en termes de justesse.

Par l'intermédiaire de tableau 11, nous pouvons constater que le biais introduit par la méthode de dosage est tout à fait acceptable pour les quatre niveaux de concentration envisagés puisqu'il n'excède pas 5,4 %.

2.4.2. La fidélité de la méthode

La fidélité de la méthode peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité des mesures et la fidélité intermédiaire. Les résultats correspondants sont repris dans le tableau suivant :

Niveau de concentration	Moyenne des concentrations introduites (mg/L)	Répétabilité (RSD%)	Fidélité intermédiaire (RSD%)
2.0	6.0	2.2	7.9
3.0	12.0	5.4	7.3
4.0	40.0	2.0	2,0
5.0	50.0	3.6	4.1

Tableau 12 : Résultats de validation en termes de fidélité.

De nouveau, nous pouvons remarquer que les quatre niveaux de concentration présentent de bons résultats tant en termes de répétabilité des mesures (CV < 5,4 %), qu'en termes de fidélité intermédiaire (CV < 7,9 %).

2.4.3. La linéarité des résultats

La linéarité des résultats va nous permettre d'évaluer notre méthode dans sa globalité.

La figure 35, ainsi que l'équation (8) nous présentent les données de linéarité obtenues pour le modèle de calibration choisi.

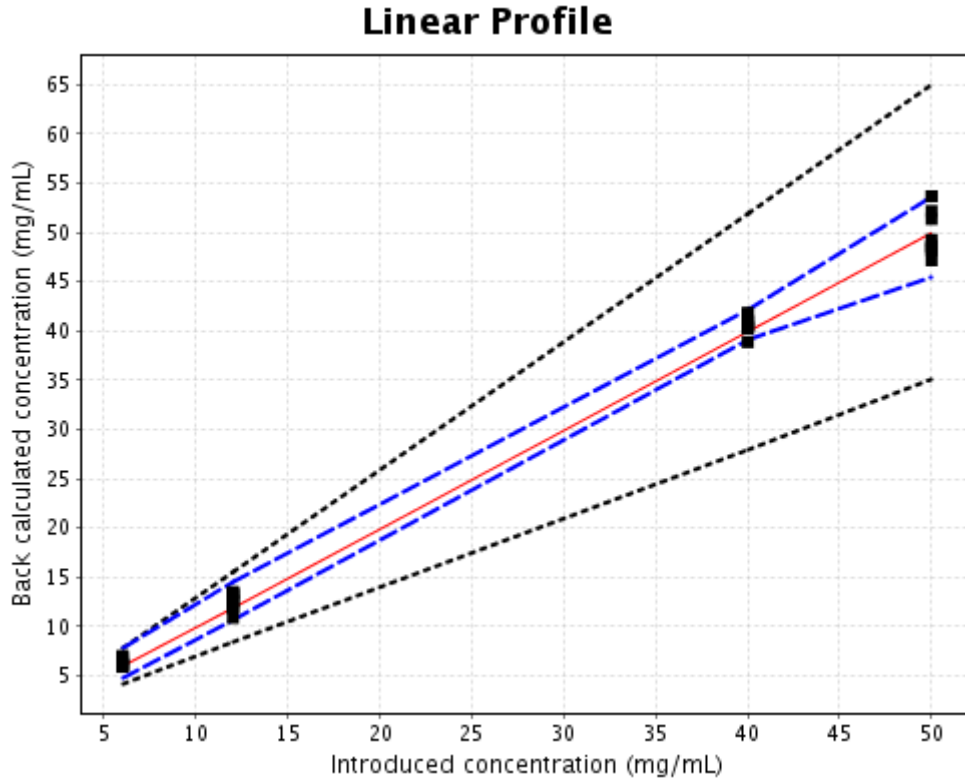


Figure 35 : Relation linéaire entre les concentrations introduites et recalculées pour le modèle de calibration choisi.

$$Y = 0,6330 + 0,9865.X \quad (8)$$

La ligne pleine représente un ajustement parfait ($Y = X$) où tous les points devraient se trouver dans le cas d'une méthode sans biais et dont les mesures successives conduiraient invariablement à la même réponse. Les lignes en pointillés larges bleus correspondent au profil d'exactitude tel que nous l'avons déjà introduit. Les lignes en pointillés noirs représentent la limite d'acceptation fixée à 30 % et exprimée en concentration. Le domaine de concentration où la méthode est alors considérée comme valide correspond à la zone où les lignes en pointillés larges bleus se trouvent à l'intérieur des lignes en pointillés noirs.

D'après ces résultats et malgré une ordonnée à l'origine légèrement supérieure à zéro, nous pouvons considérer que le modèle que nous avons choisi est adéquat et que la méthode est valide sur le domaine de concentration testé.

2.4.4. Les limites de quantification et de détection

Les limites de quantification sont facilement définissables grâce au profil d'exactitude. Dans un cas comme celui-ci, où le profil d'exactitude se trouve inclus à l'intérieur des limites d'acceptation, la limite de quantification inférieure et la limite de quantification supérieure sont définies par le niveau de concentration le plus bas et le plus haut. Elles sont donc respectivement de 6 mg/L et de 50 mg/L.

Le programme de validation nous renseigne également sur une valeur de limite de détection qu'il calcule lui-même. Celle-ci est de 1,2 mg/L et a été calculée sur la base du modèle de régression retenu [24].

2.5. Perspectives envisagées afin d'améliorer la méthode de dosage

Au moyen des données de validation complètes (N1 à N5) et sur base de l'analyse de leur variance, plusieurs conclusions peuvent être déduites. Notamment, il nous est possible de détecter un effet jour en analysant les rapports de variance inter- / intra-séries pour chaque niveau de concentration (tableau 13).

Niveau de concentration	Concentration moyenne introduite (mg/L)	Rapport des variances (inter- / intra-séries)
1.0	3.0	64.15
2.0	6.0	13.09
3.0	12.0	0.8237
4.0	40.0	0
5.0	50.0	0.2597

Tableau 13 : Vérification de l'effet jour en fonction du niveau de concentration au moyen des rapports de variance (inter- versus intra-séries).

En effet, lorsque la méthode développée ne présente pas d'effet jour particulièrement prononcé, le rapport des variances (valeur sans unité) n'est pas supérieur à approximativement 3-4. On constate donc que dans notre cas, les niveaux 1 et 2 montrent une valeur largement supérieure à cette limite. Nous en déduisons donc, qu'à ces niveaux de concentration, la méthode de dosage développée est entachée d'un effet jour non négligeable.

Il nous semble que cette observation peut être expliquée par le rôle que joue, ou plutôt que ne devrait pas jouer, l'oxygène dans notre méthode. En effet, nous avons précédemment constaté et démontré que la réaction entre l'oxygène et les ions stanneux est extrêmement rapide. Il en résulte une production d'ions stanniques. Or, à chaque niveau envisagé la concentration en Sn(II) introduite est relativement constante (elle dépend de la prise d'essai). Par contre, la concentration en ions stanniques est, en toute logique, fortement différente. Nous pouvons dès lors très facilement admettre, vu la complexité du dosage, que d'un jour à l'autre les diverses manipulations inhérentes à la

méthode de dosage puissent légèrement varier et donc amener une dégradation faible et différente en fonction du jour. En conséquence, cet apport supplémentaire d'ions stanniques influence de façon beaucoup plus importante les niveaux de concentration les plus faibles.

Nous étayons cette hypothèse sur les résultats obtenus lors du premier jour de validation, montrant l'effet prononcé de l'oxygène. Celui-ci a d'ailleurs dû être écarté lors du traitement des données. Lors de cet essai initial, nous avons utilisé une pissette d'eau désoxygénée à l'azote afin d'effectuer la mise au trait du jaugé contenant la solution à analyser. Au fil de la journée, l'eau s'est chargée en oxygène au fur et mesure de son utilisation montrant une augmentation significative de la teneur en Sn(IV).

Sur la base de ces observations, nous pourrions, afin d'améliorer les performances de notre méthode, partir d'une prise d'essai d'octanoate d'étain plus importante ce qui permettrait d'analyser des solutions plus concentrées en Sn(IV). En effet, la solubilité de celui-ci dans l'heptane n'est pas une étape limitative. De plus, d'après notre expérience ce n'est pas la concentration en Sn(II) qui est problématique, mais bien la concentration en oxygène des solutions contenant cet élément. Enfin, une concentration en Sn(IV) plus importante est moins perturbée par un faible apport d'Sn(II). Il devrait donc être possible, en gardant la même vigilance par rapport à la désoxygénation des solutions, d'obtenir un dosage moins sujet à l'effet jour et ce, même pour les faibles concentrations en ions stanniques.

2.6. Conclusions

En premier lieu, il nous paraît important d'insister sur le fait que l'analyse polarographique que nous avons développée permet la spéciation des ions stanniques et ce, en présence d'ions stanneux. En regard du dosage ultérieur (Sn(IV) dans Sn(II)), cette étape était évidemment capitale.

Nous avons ensuite imaginé un dispositif à la fois simple et original d'extraction liquide / liquide sous atmosphère d'azote afin d'éviter l'oxydation des ions stanneux.

Par la suite, plusieurs paramètres tels que le temps d'extraction, l'électrolyte de support, le pH de la solution à analyser et le mode de travail ont été optimisés. Les conditions de dosage suivantes ont finalement été sélectionnées :

L'extraction de 200 mg du catalyseur est réalisée entre 50 mL d'heptane et 50 mL d'une phase chlorhydrique 2 M et conduite pendant 5 minutes sous un flux constant d'azote. Cinq millilitres de la phase aqueuse sont ensuite ajoutés dans un jaugé de 50 mL contenant l'électrolyte de support composée de malonate de sodium à 0,7 mol/L et d'un tampon carbonate / bicarbonate à 0,2 mol/L. La solution est ensuite amenée à un pH égal à 10 et mise au trait. Dix millilitres de cette solution sont ensuite analysés en polarographie impulsionnelle différentielle à l'aide du mode de travail SMDE. Toutes les solutions intervenant dans ce procédé sont désoxygénées par l'intermédiaire d'un bullage important d'azote.

Finalement, la méthode a été validée sur un intervalle de dosage de 3 mg/L (2,6 % de dégradation) à 50 mg/L (42,7 %). Cette validation a permis de mettre en évidence que la méthode est acceptable pour un domaine de concentration s'étendant entre 6 mg/mL (5,2 %) et 50 mg/mL (42,7 %) pour autant que le laboratoire accepte une erreur totale de 30 % et un risque α de 10 % sur les futurs résultats. En vertu de l'objectif de la méthode de dosage, il nous semble que ces conditions sont acceptables.

Cependant, en vue de permettre la détermination sur un intervalle de concentration plus faible en Sn(IV), nous pensons partir à l'avenir d'une prise d'essai plus importante, *a priori*, un gramme d'octanoate d'étain. Ce qui nous permettrait d'obtenir une méthode de dosage adéquate à l'analyse d'un catalyseur contenant un pourcentage d'ions stanniques plus faible.

Partie 3 :

Dosage plasmatique du
lévonorgestrel

3. Dosage plasmatique du lévonorgestrel

Le principe même du dosage plasmatique d'une substance dont l'action revendiquée est locale, dans notre cas la cavité intra-utérine, conduit obligatoirement l'analyste au développement d'une méthode non seulement sélective, mais aussi et surtout très sensible. En effet, une action locale est généralement recherchée afin d'éviter le passage du principe actif dans la circulation systémique. Il est dès lors nécessaire de le vérifier, ou tout au moins, de montrer que la teneur en principe actif dans le sang est limitée. Dans le cas de la spécialité pharmaceutique étudiée, des concentrations de l'ordre de quelques picogrammes par millilitre (± 50 pg/mL) peuvent être raisonnablement attendues.

Relativement peu de techniques sont communément envisagées pour des dosages plasmatiques dans un tel domaine de concentration (du ng/mL au pg/mL). Citons les deux principales, les radio-immuno dosages [32] et les dosages par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse [33,34]. Dans le cadre de notre travail, nous avons retenu la spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) car elle offre une meilleure sélectivité/spécificité et permet dès lors de répondre aux exigences actuelles des autorités réglementaires.

Ce type de détecteur est toujours couplé à un système chromatographique en amont. La littérature nous renseigne sur les différentes méthodes séparatives envisageables telles que la chromatographie gazeuse [35] ou la chromatographie liquide [36,37] sous toutes ses déclinaisons : la chromatographie à ultra performance (UPLC) [38], la chromatographie capillaire ou la nano LC [39], ou encore la chromatographie à flux turbulents [40].

Nous avons également consulté la littérature scientifique au sujet des méthodes de préparation des échantillons envisagées lors de dosage requérant à la fois une grande sensibilité et une grande spécificité. Le couplage « on line » de la SPE à la chromatographie liquide est actuellement le plus souvent rencontré. Les phases les plus utilisées sont des phases à accès restreint [41-43] ou de type standard (C_8 , $C_{18(ec)}$,...) [44-49].

A cette occasion, nous avons pu également observer que ces techniques sont utilisées dans le cadre de dosages plasmatiques [50-53] ou environnementaux [54-57] du LNG. Nous avons également rencontré une méthode de dosage du LNG dans le sérum à l'aide d'un détecteur voltamétrique [58].

Cependant, à notre connaissance, un dosage plasmatique par SPE/LC/MS-MS permettant d'atteindre des concentrations de l'ordre de quelques picogrammes par millilitre n'a pas encore été développé à ce jour. Afin de mettre au point notre dosage, nous nous sommes basés sur une publication de Theron et *coll.* [50] se rapprochant de notre objectif. Ceux-ci ont mis au point une méthode de dosage plasmatique du lévonorgestrel par chromatographie liquide couplée à deux détecteurs de spectrométrie de masse en séries, précédée par une extraction liquide / liquide. Cette méthode ne permet toutefois pas de quantifier des concentrations plasmatiques inférieures à 265 pg/mL.

3.1. Optimisation de l'extraction sur phase solide

Le lévonorgestrel est une molécule de type neutre et non polaire. Les interactions avec le support d'extraction seront donc préférentiellement de nature hydrophobe. D'emblée, nous avons donc exclu les cartouches échangeuses d'ions.

3.1.1. Présélection du support d'extraction par LC/DAD

Sur la base des considérations précédentes, nous avons pris l'option de réaliser un screening sur sept types de phases stationnaires différentes (DEC). Les phases retenues sont les suivantes :

- CH(EC) - 50 mg - 1 mL,
- C8 - 50 mg - 1 mL,
- C8(EC) - 50 mg - 1 mL,
- C18 - 50 mg - 1 mL,
- C18(EC) - 50 mg - 1 mL,
- MFC18 - 50 mg - 1 mL,
- Oasis® HLB - 30 mg - 1 mL.

Les six premières cartouches sont de type silice greffée tandis que la dernière contient une phase polymérique.

Pour cette étape du développement, nous avons analysé les résultats au moyen d'un système HPLC/DAD. Nous avons fixé la longueur d'onde d'analyse à 242 nm, correspondant au maximum d'absorption du LNG (figure 36).

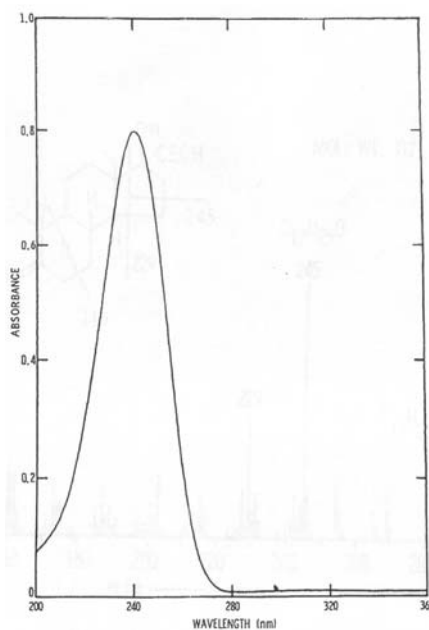


Figure 36 : Spectre UV du lévonorgestrel de 200 nm à 360 nm [59].

Les solutions soumises à l'extraction sont préparées suivant le protocole présenté au point 1.2.2., conduisant à une concentration finale en LNG de 40 ng/mL :

- 950 µL de tampon phosphate 0,01 M (K₂HPO₄) à pH 7,4,
 - 50 µL d'une solution de LNG à 1 µg/mL préparée dans MeOH / HCOOH 0,1 % (90 / 10),
 - 20 µL d'H₃PO₄,
 - 200 µL d'une solution MeOH / HCOOH 0,1 % (90 / 10),
 - 300 µL d'eau.
- 1,2 mL de la solution préparée sont déposés sur les cartouches.
 - Les autres paramètres d'extraction restent identiques.

De plus, afin de déterminer les pourcentages de récupération du lévonorgestrel en fonction de la nature des cartouches envisagées, nous avons injecté les éluats ainsi que cette même solution directement dans le système chromatographique (Rapport des surfaces – tableau 14). Nous avons également collecté chaque fraction du processus d'extraction afin de vérifier que le LNG ne soit pas élué avant ou après l'étape d'éluion. Nous n'avons pas détecté la présence de celui-ci dans aucune des autres fractions.

Signalons que cet essai préliminaire avait essentiellement pour but de sélectionner les supports qui présentaient les taux de récupération les plus élevés. Par conséquent, les DEC permettant une récupération supérieure à 50 % sont sélectionnés lors de la dernière étape de mise au point de la SPE.

Type d'échantillon	Réponse (aire)	Pourcentage d'extraction (%)
Solution de calibration	18,06	N/A
Elution de la cartouche CH(EC)	8,77	48,6 %
Elution de la cartouche C8	11,28	62,5 %
Elution de la cartouche C8(EC)	9,33	51,7 %
Elution de la cartouche C18	7,74	42,9 %
Elution de la cartouche C18(EC)	6,90	38,2 %
Elution de la cartouche MFC18	11,89	65,8 %
Elution de la cartouche Oasis® HLB	16,01	88,6 %

Tableau 14 : Résultats du screening sur les différents types de support d'extraction en termes de pourcentage d'extraction par rapport à une solution de calibration.

3.1.2. Sélection du support d'extraction en milieu plasmatique

Nous avons travaillé sur des plasmas dopés à cinq niveaux de concentration : 50 pg/mL, 100 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL et 1000 pg/mL (cf. point 1.2.2, pour la préparation). Chacun des niveaux est répété deux fois. Leur préparation est réalisée de manière indépendante. Précisons que les résultats présentés ci-après ont été obtenus en considérant les conditions optimales du couplage LC/MS-MS (exposées au point 3.2.).

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

Ainsi que l'illustre la figure 37, si on considère la zone de temps de rétention entre 3 et 4 minutes (temps de rétention du LNG \approx 3,6 minutes), nous constatons que les quatre types de cartouches envisagés semblent permettre le nettoyage du blanc plasmatique de manière relativement efficace.

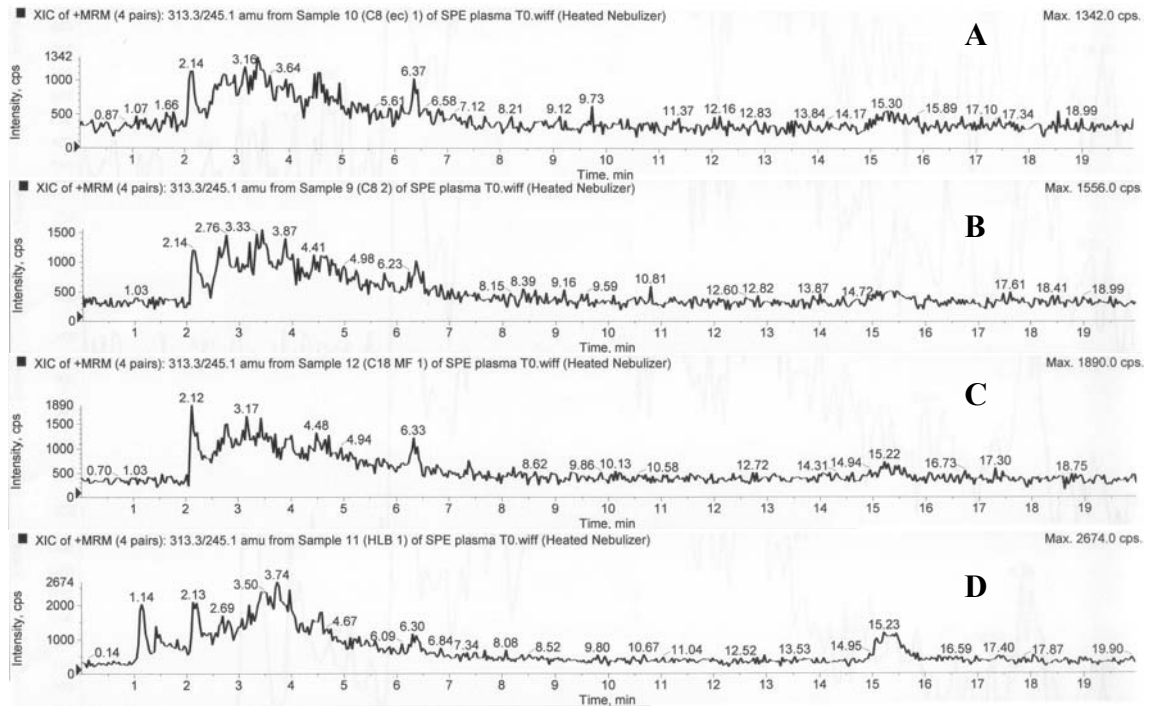


Figure 37 : Blancs plasmatiques issus des quatre types de cartouches retenues (A) : C8(EC) ; (B) : C8 ; (C) : MFC18 ; (D) : HLB.

Cependant, l'analyse des résultats pour le niveau de concentration le plus bas (50 pg/mL), nous montre que les cartouches de type MFC18 et Oasis® HLB ne permettent pas la détection et, *a fortiori*, la quantification du LNG. Ces deux cartouches sont donc écartées (figure 38).

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

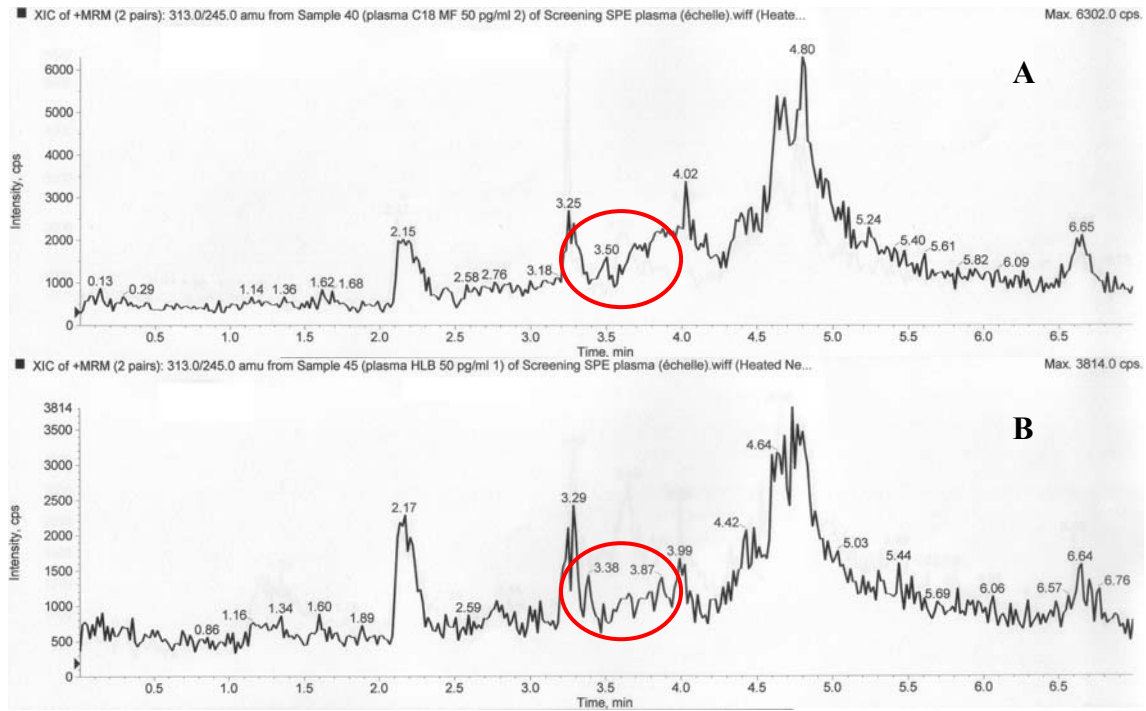


Figure 38 : Chromatogrammes représentant l'analyse d'un plasma supplémenté par 50 pg/mL de LNG après extraction sur un cartouche (A) : MFC18 et (B) : HLB.

En revanche, il nous a été donné de constater qu'à ce niveau de concentration (50 pg/mL), les cartouches C8(EC) ont permis une récupération légèrement plus importante que les C8 et ce, pour chacune des deux répétitions. De plus, afin d'éviter une interaction entre les silanols libres du support d'extraction et un composé endogène aminé potentiellement présent, nous avons retenu ce type de cartouches. Nous ne présentons donc ci-après que les résultats obtenus pour le support d'extraction C8(EC). La figure 39 présente les chromatogrammes obtenus lors de l'extraction de plasmas dopés aux cinq niveaux de concentration considérés (50 pg/mL à 1000 pg/mL). Le tableau 15 nous montre quant à lui les résultats détaillés de cet essai. Pour terminer, la figure 40 illustre la droite de calibration tracée grâce à ces résultats.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

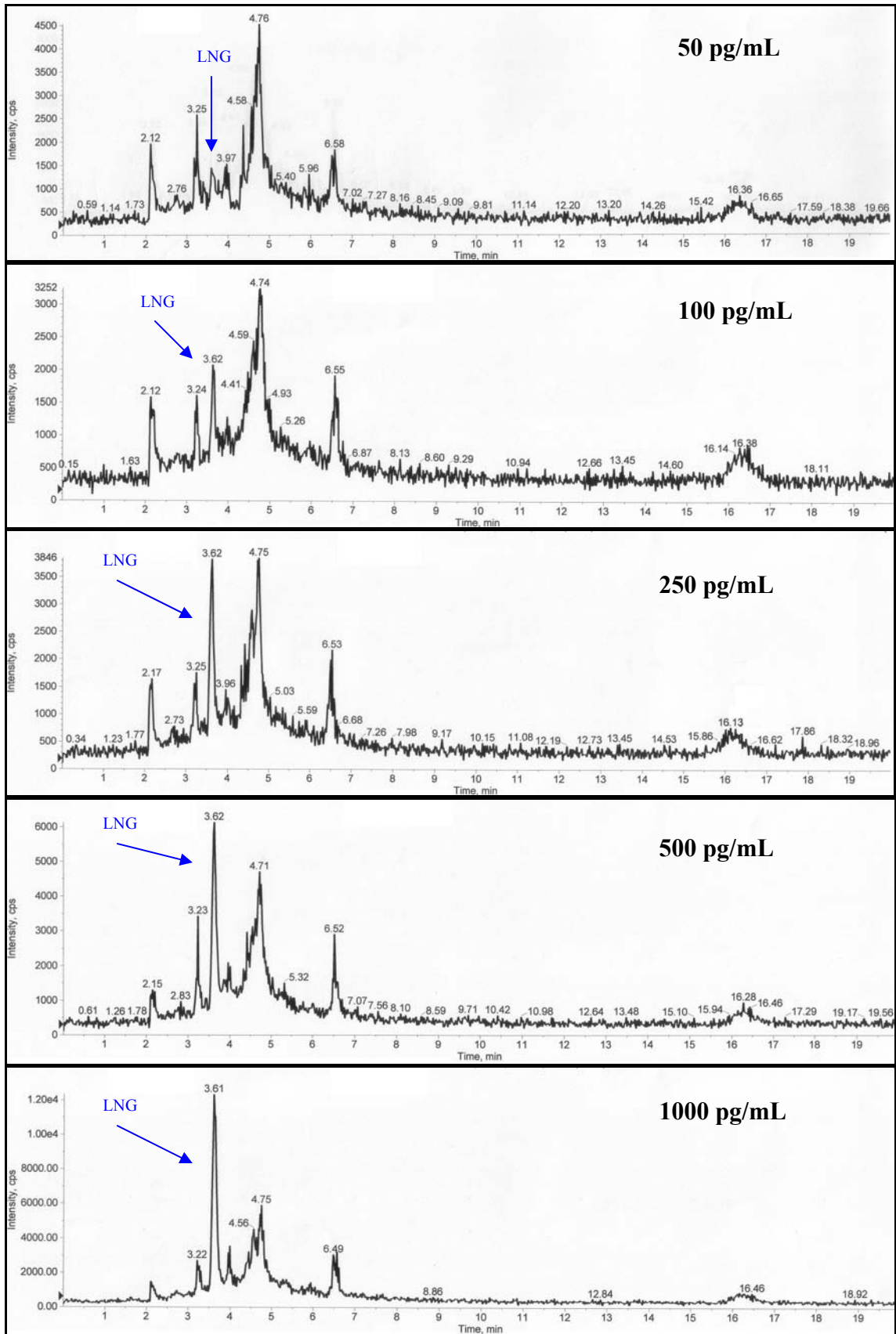


Figure 39 : Chromatogrammes obtenus lors de l'extraction de plasma sur C8(EC) dopés aux cinq niveaux de concentrations envisagés.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

Echantillon	Concentration (pg/mL)	Réponse LNG (aire)	Réponse IS (aire)	Concentration recalculée (pg/mL)	Exactitude (%)
Plasma N1/1	50	2505,7	59947	52,35	104,7
Plasma N1/2	50	3480,8	80412	53,60	107,2
Plasma N2/1	100	7213,6	76701	96,41	96,4
Plasma N2/2	100	5470,9	66399	86,58	86,6
Plasma N3/1	250	18889	66142	257,96	103,2
Plasma N3/2	250	17781	64288	250,36	100,2
Plasma N4/1	500	31412	46953	581,35	116,3
Plasma N4/2	500	32473	66283	433,74	86,7
Plasma N5/1	1000	75805	65876	987,64	98,8
Plasma N5/2	1000	64452	29585	N/A	N/A

Tableau 15 : Résultats obtenus lors de l'essai visant à la sélection du support d'extraction.

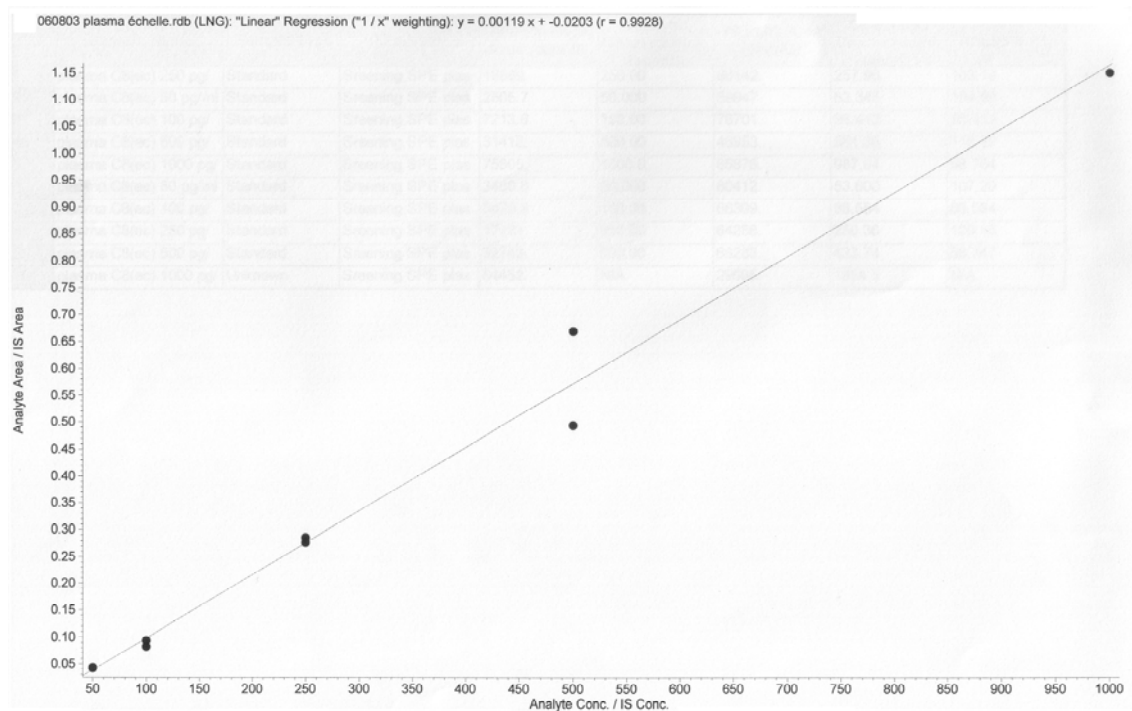


Figure 40 : Courbe de calibration obtenue sur base des résultats obtenus lors de l'essai visant à la sélection du support d'extraction.

Malgré une forte variabilité sur le niveau de concentration à 500 pg/mL, ces résultats sont très encourageants. Notre choix se porte donc définitivement sur une extraction à partir d'un support de silice greffée par des groupements octyles recouverts (C8(EC)).

Afin de confirmer les performances, mais également de connaître le pourcentage de récupération moyen du lévonorgestrel sur ce type de cartouche, nous avons extrait, d'une part, des blancs plasmatiques et, d'autre part, des plasmas supplémentés afin d'obtenir les différentes concentrations en lévonorgestrel considérées. Lors de cet essai, nous avons étudié quatre niveaux de concentrations que nous avons répétés à deux reprises et ce, de manière indépendante. Deux niveaux bas proches de la concentration

que nous appréhendons comme la limite de quantification : 50 pg/mL (N1) et 100 pg/mL (N2), ainsi qu'un niveau de concentration moyen (500 pg/mL – N3) et un niveau haut (1000 pg/mL – N4). A chaque concentration, nous avons comparé le pourcentage de récupération entre les plasmas chargés avant et après extraction.

Nous présentons les résultats détaillés de cet essai de récupération au sein de l'annexe C sous le point « Récupération SPE ». En voici les conclusions (tableau 16) :

Niveau	Concentration cible en LNG (pg/mL)	Concentration effective en LNG (pg/mL)	Pourcentage de récupération (%)	SD (%)	n =
N1	50	49,05	83,2	± 15,4	7
N2	100	98,10	96,7	± 5,3	7
N3	500	490,50	97,4	± 4,4	8
N4	1000	981,00	99,8	± 7,4	7
		MOYENNE (%)	94,3	± 7,5	

Tableau 16 : Pourcentage d'extraction du LNG à partir des cartouches C8(EC)

Nous obtenons donc, avec ce type de cartouche, une très bonne récupération pour chaque niveau de concentration. La récupération moyenne est quant à elle de 94,3 % ± 7,5 %. Cet excellent résultat, tant au niveau de la variabilité que du pourcentage de récupération, confirme l'adéquation du support d'extraction retenu.

3.2. Mise au point du couplage LC/MS-MS

Dans un premier temps, nous nous sommes attardés sur deux paramètres importants du couplage LC/MS-MS, permettant l'obtention d'un signal de grande intensité : la composition de la phase mobile et la température de la source d'ionisation. En effet, suivant la composition de la phase mobile, le composé à doser se voit plus ou moins facilement ionisé influençant dès lors l'intensité de la réponse. L'augmentation de la température de la source d'ionisation a, quant à elle, la même influence. Les essais, permettant le choix de la phase mobile et de la température de la source d'ionisation, ont été effectués grâce à des solutions de lévonorgestrel à une concentration de 100 ng/mL préparées dans la phase mobile considérée.

Au cours du point 3.2.2., nous discutons du changement de transition que nous avons opéré lors du développement de notre dosage.

3.2.1. Choix de la phase mobile et de la température du quartz

A cette fin, nous nous sommes tout d'abord basés sur l'article de Theron et coll. [50]. En règle générale, chaque essai est répété, et ce de façon indépendante. La phase mobile utilisée est un mélange d'acétonitrile (ACN), de méthanol (MeOH) et d'acide formique à 0,1 % dans un rapport 45 / 35 / 20 (ϕ_{mob} 1). Nous testons ensuite le mélange ACN / MeOH / NH₄Ac à pH = 4 (45 / 35 / 20) (ϕ_{mob} 2). Ces deux premiers essais sont réalisés avec une température de la source d'ionisation de 300 °C.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévorgestrel

Nature de la phase	Concentration effective en LNG (ng/mL)	T° de la source (°C)	Intensité de la réponse (coups)			
			Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne
$\varphi_{\text{mob}} 1$	99,13	300	24000	23000	N/A	23500
$\varphi_{\text{mob}} 2$	99,13	300	4296	4249	4177	4241

Tableau 17 : Résultats de l'optimisation de la réponse considérant deux phases mobiles.

Comme nous le montre le tableau 17, l'acide formique permet l'obtention de meilleurs résultats que l'acétate d'ammonium. Nous gardons donc pour l'instant cette phase mobile. Jugeons maintenant de l'effet de la température de la source d'ionisation sur l'intensité de la réponse en l'augmentant de 300 °C et à 400 °C (tableau 18).

Nature de la phase	Concentration en LNG (ng/mL)	T° de la source (°C)	Intensité de la réponse (coups)			
			Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne
$\varphi_{\text{mob}} 1$	99,13	300	24000	23000	N/A	23500
$\varphi_{\text{mob}} 1$	99,13	350	29000	N/A	N/A	29000
$\varphi_{\text{mob}} 1$	99,13	400	37000	34000	36000	35667

Tableau 18 : Résultats de l'optimisation de la réponse considérant trois T° du quartz.

Grâce à cet essai, nous pouvons démontrer que l'augmentation de la température d'ionisation de la source permet un accroissement de l'intensité de la réponse.

Suite à ces nouveaux résultats, nous avons décidé d'explorer deux autres phases mobiles. Nous avons utilisé des mélanges binaires : ACN / HCOOH 0,1 % (70 / 30) ($\varphi_{\text{mob}} 3$) et MeOH / HCOOH 0,1 % (90 / 10) ($\varphi_{\text{mob}} 4$) afin de simplifier la méthode et d'essayer d'améliorer encore la sensibilité de celle-ci. Nous avons gardé, bien évidemment, la température de la source à 400 °C pour ces essais (tableau 19).

Nature de la phase	Concentration en LNG (ng/mL)	T° de la source (°C)	Intensité de la réponse (coups)		
$\varphi_{\text{mob}} 3$	99,13	400	25000	26000	28000
$\varphi_{\text{mob}} 4$	99,13	400	53000	55000	56000

Tableau 19 : Résultats de l'optimisation de la réponse considérant une T° du quartz à 400 °C et deux nouvelles phases mobiles.

Suivant ces nouveaux résultats, il nous apparaît clairement qu'un mélange binaire à base de méthanol permet l'obtention d'une réponse plus importante.

La figure 41 montre très clairement l'évolution de l'intensité de la réponse entre les conditions de départ ($\varphi_{\text{mob}} 1$ et $T^{\circ}_{\text{source}} = 300$ °C) et les conditions finalement sélectionnées ($\varphi_{\text{mob}} 4$ et $T^{\circ}_{\text{source}} = 400$ °C).

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

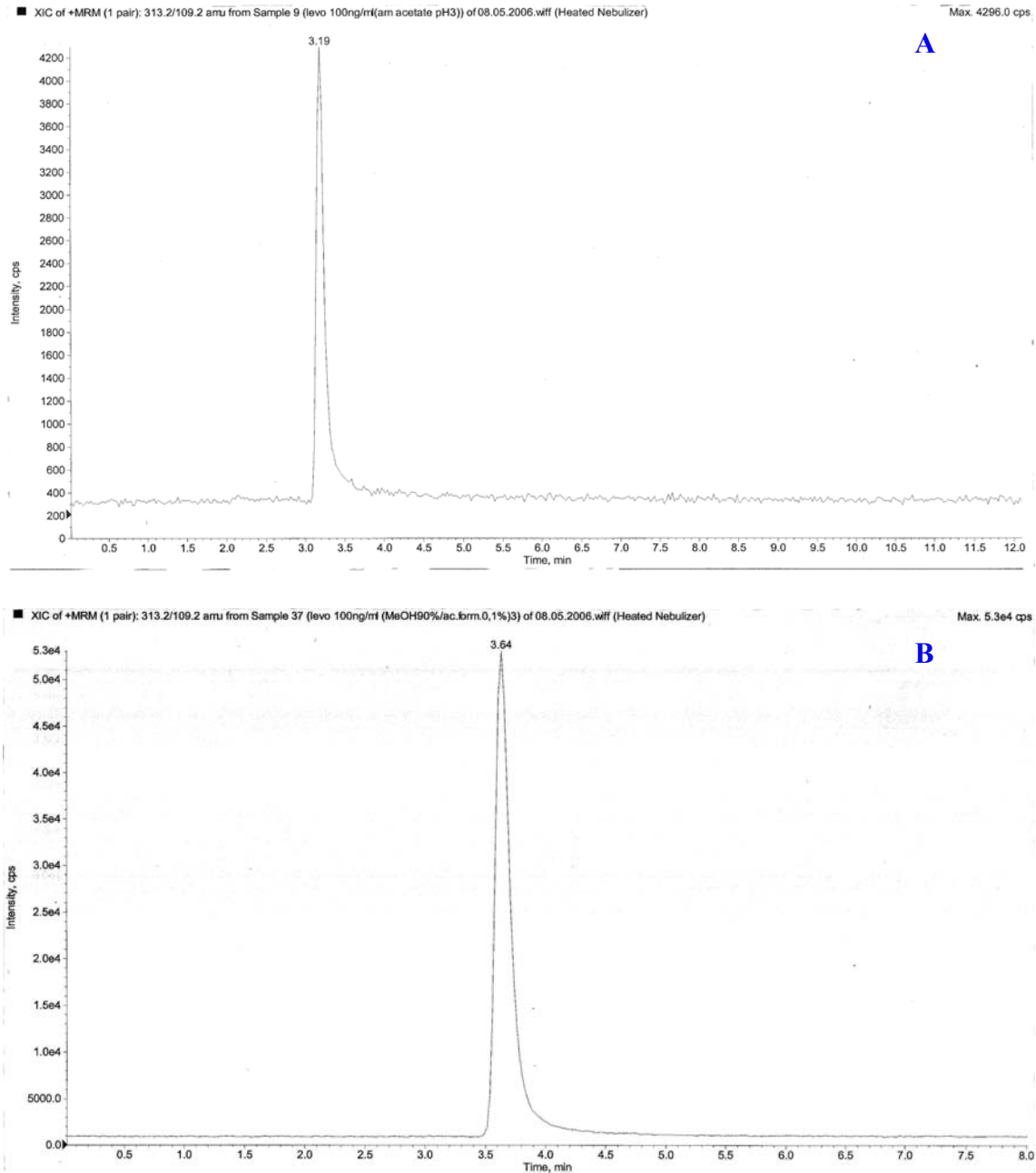


Figure 41 : Chromatogrammes montrant les conditions extrêmes testées.

A : $\phi_{\text{mob}} 1$ et $T^{\circ}_{\text{source}} = 300^{\circ}\text{C}$ et B : $\phi_{\text{mob}} 4$ et $T^{\circ}_{\text{source}} = 400^{\circ}\text{C}$.

Nous avons ensuite vérifié que dans ces conditions, la méthyltestostérone fournissait un signal suffisamment intense pour une concentration voisine de celle que nous envisagerons lors du dosage en routine (100 pg/mL). Comme nous le montre la figure 42, l'étalon interne donne une très bonne réponse. Toutefois, il est chromatographié en même temps que le lévonorgestrel : $\approx 3,7$ minutes (SI) pour $\approx 3,6$ minutes (LNG). Cependant, ceci ne pose pas de problème vu la différence entre les transitions suivies pour les deux composés.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

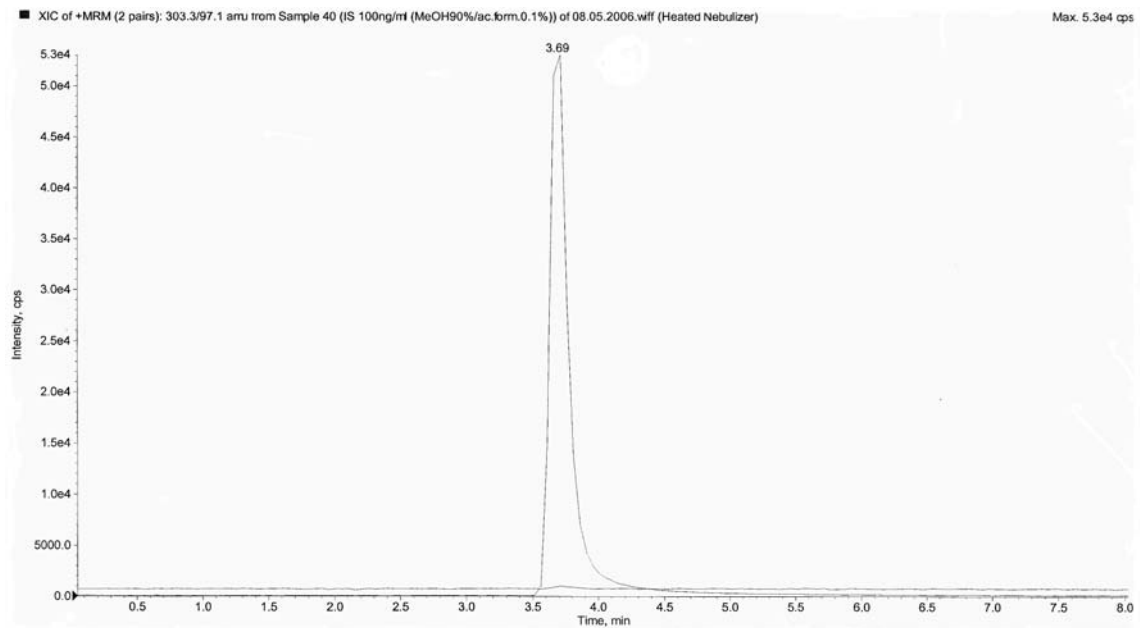


Figure 42 : Chromatogramme d'une solution de standard interne à 100 ng/mL dans les conditions optimales.

Enfin, nous avons réalisé une échelle de concentration de LNG à 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 et 100 ng/mL en présence de standard interne à 10 ng/mL. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 20.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

Echantillon	Concentration (ng/mL)	Réponse LNG (aire)	Réponse IS (aire)	Concentration recalculée (pg/mL)	Exactitude (%)
SP 0,1 A	0,10042	1445	71297	0,14054	140,0
SP 0,1 B	0,10042	970	63639	0,07580	75,5
SP 0,1 C	0,10042	996	73770	0,05329	53,1
SP 0,2 A	0,20084	1851	68838	0,22595	112,5
SP 0,2 B	0,20084	2345	69787	0,31874	158,7
SP 0,2 C	0,20084	2057	69825	0,25894	129,0
SP 0,5 A	0,50210	3204	70898	0,46169	92,0
SP 0,5 B	0,50210	3063	69857	0,44445	88,5
SP 0,5 C	0,50210	3256	70638	0,47338	94,3
SP 1 A	1,0042	5638	67398	0,95735	95,3
SP 1 B	1,0042	5445	67351	0,92125	91,7
SP 1 C	1,0042	5462	67194	0,92692	92,3
SP 2 A	2,0084	10434	63264	2,0048	99,8
SP 2 B	2,0084	10347	65771	1,9066	94,9
SP 2 C	2,0084	11010	65528	2,0446	101,8
SP 5 A	5,021	25512	65916	4,867	96,9
SP 5 B	5,021	24416	64414	4,764	94,9
SP 5 C	5,021	25369	65824	4,846	96,5
SP 10 A	10,042	51727	65611	10,039	100,0
SP 10 B	10,042	51376	65512	9,985	99,4
SP 10 C	10,042	49459	62947	10,005	99,6
SP 20 A	20,084	92974	59753	19,930	99,2
SP 20 pg B	20,084	93723	61024	19,671	97,9
SP 20 pg C	20,084	91594	61284	19,139	95,3
SP 50 pg A	50,21	248170	65484	48,72	97,0
SP 50 pg B	50,21	253110	65178	49,92	99,4
SP 50 pg C	50,21	252030	64240	50,44	100,5
SP 100 pg A	100,42	488980	63496	100,70	100,3
SP 100 pg B	100,42	482490	60927	101,93	101,5
SP 100 pg C	100,42	466530	58515	102,62	102,2

Tableau 20 : Résultats de l'échelle de concentrations en LNG de 0,1 à 100 ng/mL en présence de l'étalon interne, la méthyltestostérone.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

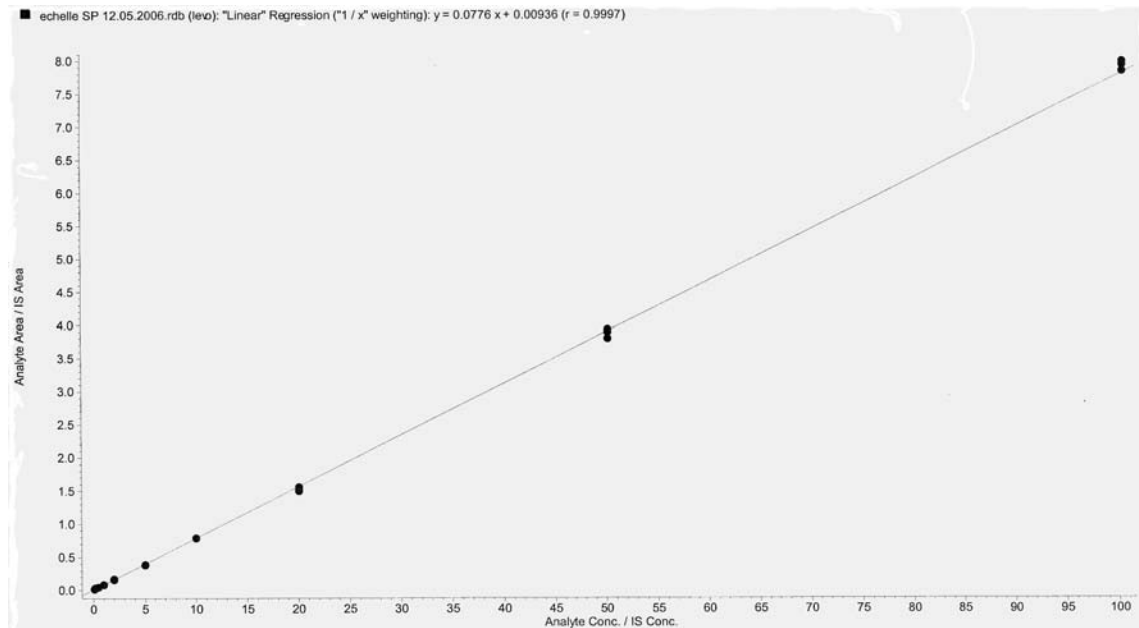


Figure 43 : Solution méthanolique de LNG (0,1 ng/mL à 100 ng/mL). Résultats obtenus avec l'API 300. Droite de calibration construite avec le modèle de régression linéaire pondérée (1/X).

Si nous regardons l'exactitude d'un point lorsque celui-ci est recalculé par rapport à la droite obtenue sur l'ensemble des points (exactitude > 20 %), nous nous apercevons que cette méthode fournit des résultats tout à fait acceptables entre 0,5 ng/mL et 100 ng/mL (tableau 20 et figure 43). Cependant, dans l'état actuel, notre méthode ne nous permettra pas d'atteindre une concentration de 50 pg/mL, niveau auquel nous espérons pouvoir accéder.

Signalons que les résultats dont nous venons de discuter ont été obtenus par l'intermédiaire d'un spectromètre de masse API 300. Ce dernier est un spectrophotomètre d'une ancienne génération et est donc pourvu d'une moins bonne sensibilité que l'API 3000. La source d'ionisation utilisée lors de tous nos essais est quant à elle toujours une source de type APCI.

Pour terminer cette discussion, nous montrons par l'intermédiaire de la figure 44, le résultat obtenu, par un spectromètre de masse API 3000, pour une solution méthanolique de LNG à 50 pg/mL. Il semble donc que l'API 3000 devrait nous permettre d'atteindre la concentration de 50 pg de lévonorgestrel par millilitre de plasma après purification et concentration de l'échantillon.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

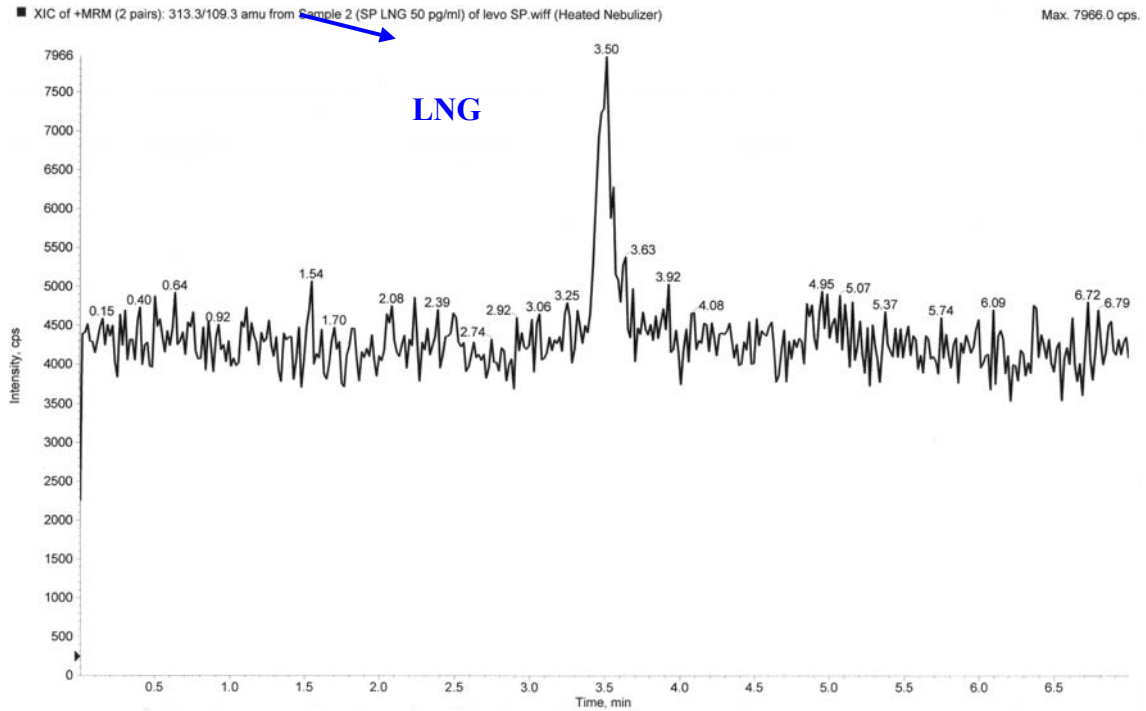


Figure 44 : Chromatogramme obtenu avec une solution méthanolique de LNG à la concentration de 50 pg/mL sur l'API 3000.

3.2.2. Choix de la transition suivie en MS-MS

Lorsque nous avons envisagé l'analyse d'un plasma non supplémenté dans les conditions optimales, tant du point de vue de la SPE que du couplage LC/MS-MS, nous avons remarqué que la transition initialement suivie pour le LNG (313,3/109,3) entraînait la détection d'un trop grand nombre de composés endogènes également élués lors de la préparation de l'échantillon (figure 45A). Malheureusement, le chromatogramme en notre possession ne permet pas de bien visualiser les pics parasites présents aux alentours du temps de rétention du LNG.

Nous avons donc envisagé de sélectionner, sur base du spectre de masse du lévonorgestrel (figure 46), un autre fragment de même abondance pouvant constituer une autre transition que nous pourrions suivre. Nous constatons, via la figure 45B, que cette transition réduit considérablement le nombre de composé endogène détecté. Bien évidemment, nous nous assurons qu'avec cette transition le LNG donne toujours un signal acceptable dans la gamme de concentration qui nous intéresse. La figure 47, nous permet de le vérifier sur une solution méthanolique de lévonorgestrel à 250 pg/mL.

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

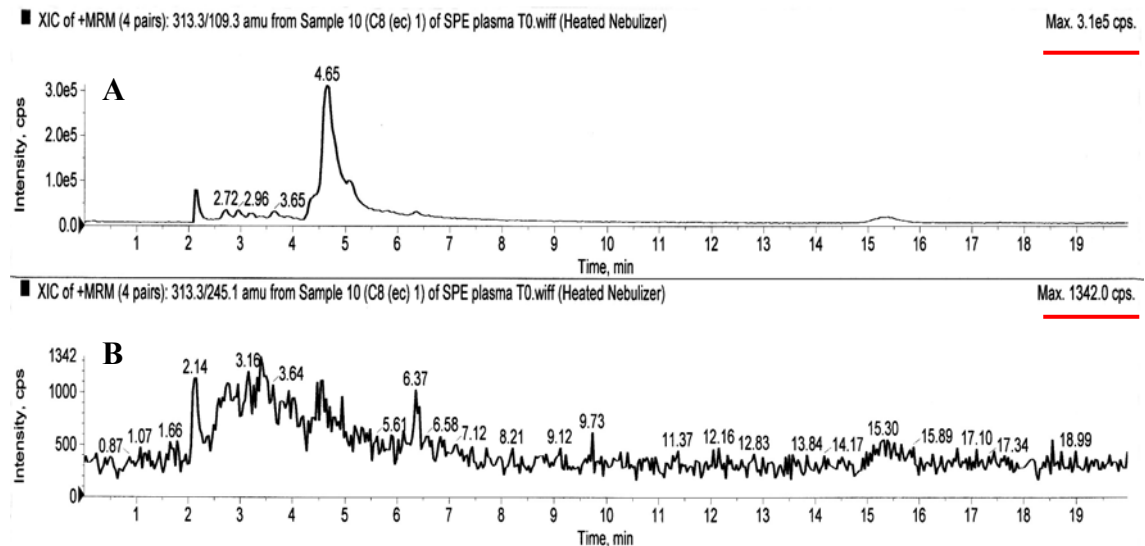


Figure 45 : Blanc plasmatique considérant : (A) le premier fragment choisi à 313,3/109,3 et (B) le second fragment sélectionné à 313,3/245,1.

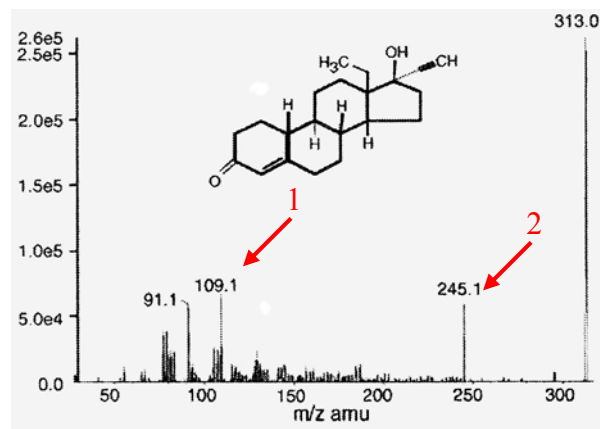


Figure 46 : spectre de masse du LNG (1 : premier fragment choisi, 2 : le second fragment sélectionné).

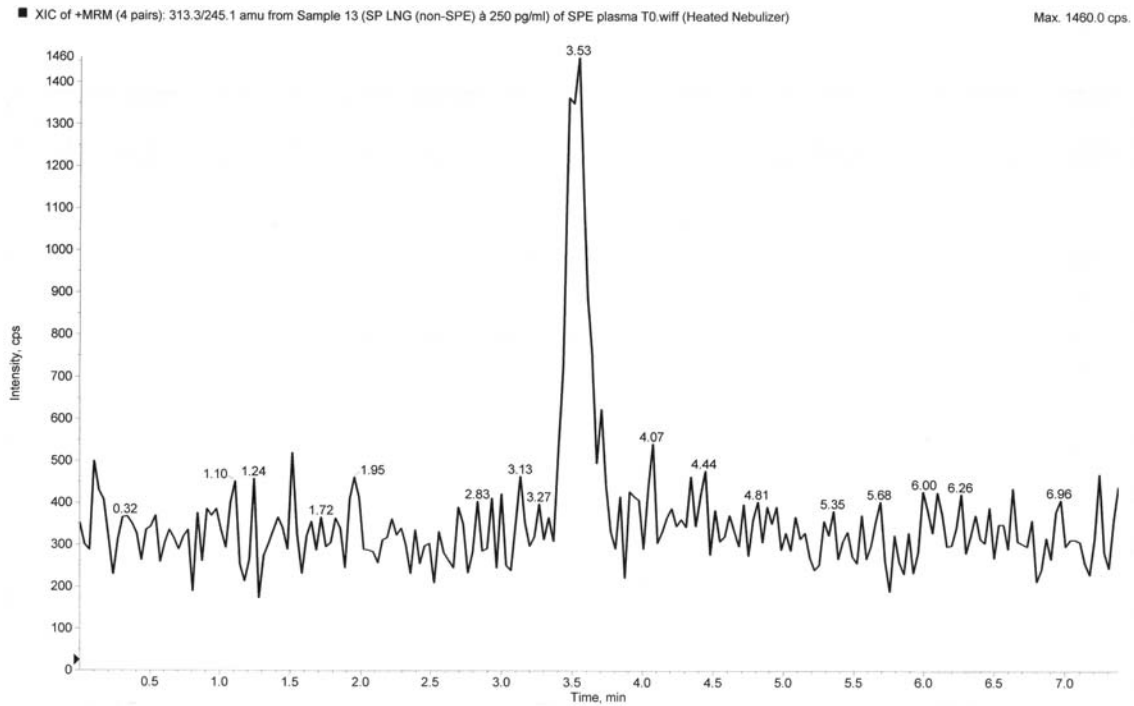


Figure 47 : Chromatogramme obtenu en utilisant la transition 313,3/245,1 pour une solution méthanolique de LNG à la concentration de 250 pg/mL.

3.3. Prévalidation du dosage SPE/LC/MS-MS

Faute de temps, nous n'avons pas pu envisager une validation formelle [60], mais nous tenions néanmoins à éprouver la faisabilité de la méthode. A cette fin, nous avons réalisé une prévalidation et ce, sur l'intégralité de l'intervalle de dosage envisagé. Celui-ci n'a pas été choisi au hasard. En effet Lockhat et coll. [61] ont publié des résultats d'un dosage sérique du LNG, par radio-immuno dosage, chez des femmes portant un dispositif intra-utérin à libération hormonale contrôlée, montrant que les concentrations moyennes de LNG dans le plasma après 1 mois, 3 mois et 6 mois sont de, respectivement, $459,2 \pm 100,2$ pg/mL, $368,2 \pm 51,8$ pg/mL et $357 \pm 53,0$ pg/mL. Nous savons dès lors que notre intervalle de dosage devrait au moins couvrir un domaine de 250 à 750 pg/mL. Toutefois afin d'augmenter la fiabilité des résultats et de se prémunir des problèmes liés à la variabilité inter-sujets, nous avons décidé de couvrir des concentrations allant de 50 à 1000 pg/mL. Nous avons toutefois inséré un point à 100 pg/mL dans l'éventualité où la limite de quantification inférieure ne pourrait pas atteindre la concentration de 50 pg/mL.

Conformément à la réglementation en vigueur [60], les limites d'acceptation ont été fixées à 20 %. L'outil de décision que nous avons utilisé en phase de prévalidation est le profil d'exactitude [24] qui se base sur une analyse statistique de l'erreur totale.

Les données brutes relatives à cet exercice de prévalidation sont reprises dans l'annexe C. Celles-ci nous permettent d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 21. Celui-ci classe sur la base de l'index d'exactitude et ce, par ordre décroissant, les différents modèles de régression qui ont été testés. L'index d'exactitude

Partie 3 : Dosage plasmatique du lévonorgestrel

est la moyenne géométrique des autres index correspondant aux différents critères de performance d'une méthode bioanalytique.

Modèle	Index d'exactitude	LLOQ et ULOQ (mg/L)	Index d'intervalle de dosage	Index de précision	Index de justesse
Weighted (1/X ²) Linear Regression	0.7199	[49.05 , 981.0]	1.000	0.3759	0.9924
Linear Regression after SQUARE ROOT transformation	0.6658	[72.53 , 981.0]	0.9748	0.3604	0.8400
Weighted (1/X) Linear Regression	0.6633	[49.05 , 878.3]	0.8898	0.3331	0.9844
Weighted (1/X) Quadratic Regression	0.6409	[49.05 , 818.8]	0.8260	0.3212	0.9921
Quadratic Regression	0.6379	[56.67 , 838.5]	0.8389	0.3168	0.9769
Linear Regression	0.6350	[63.90 , 850.9]	0.8445	0.3164	0.9584
Weighted (1/X ²) Quadratic Regression	0.6124	[49.05 , 751.9]	0.7542	0.3115	0.9773
Linear Regression after LOGARITHM transformation	0.3709	[404.0 , 934.3]	0.5690	0.1606	0.5582
Linear Regression Through 0 fitted with the level 5 only	0	[315.8 , 852.9]	0.5763	0.1365	0
Linear Regression Through 0 fitted with the level 4.0 only	0	[286.7 , 736.4]	0.4825	0.1114	0

Tableau 21 : Classification des modèles de calibration pour la prévalidation du dosage plasmatique du LNG.

A la vue de ce tableau, notre choix ne paraît pas difficile. En effet, seul le modèle de calibration considérant une régression linéaire pondérée à $1/X^2$ permet un dosage sur tout l'intervalle. De plus, ce modèle présente un indice de précision et de justesse supérieurs à tous les autres. Le profil d'exactitude obtenu par ce modèle est présenté dans la figure suivante :

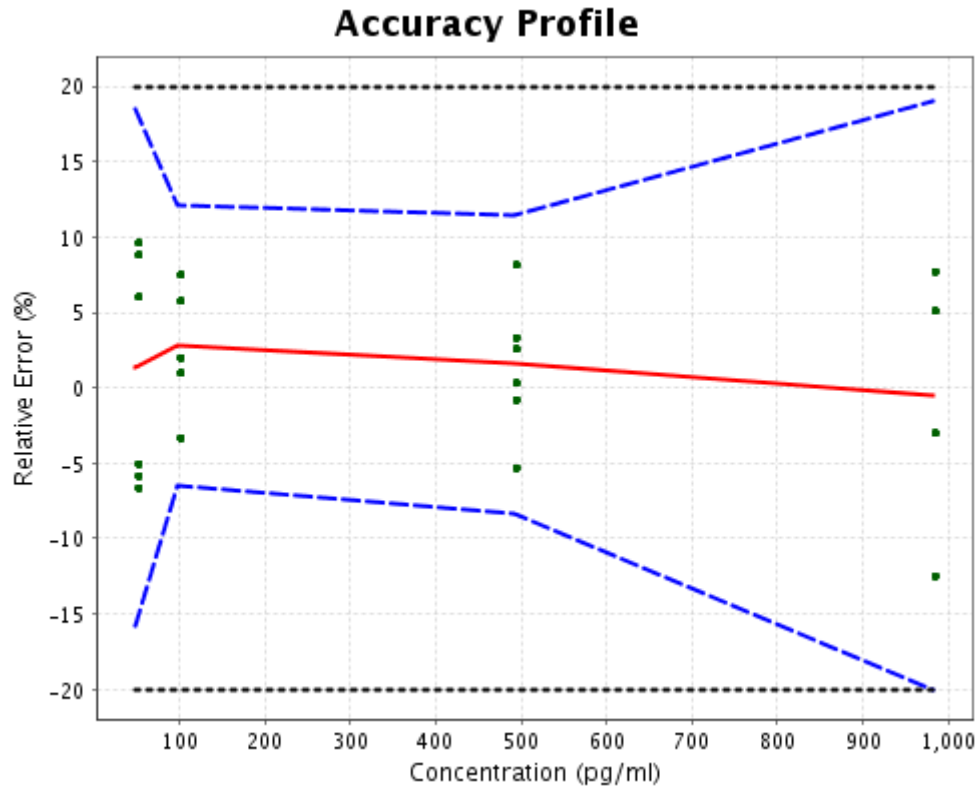


Figure 48 : Profil d'exactitude obtenu lors de la prévalidation de la méthode.

Niveau de concentration en LNG	Répétabilité (CV %)	Biais relatif (%)
N1	7,4	1,3
N2	4,0	2,8
N3	4,3	1,6
N4	8,0	-0,5

Tableau 22 : Tableau reprenant les résultats de justesse et de précision (prévalidation).

Nous pouvons remarquer que cette méthode ne provoque pour ainsi dire pas de biais (justesse) ($< 2,8\%$) confirmant de la sorte la parfaite adéquation du modèle de régression sélectionné. En ce qui concerne la fidélité (précision) de la méthode, celle-ci est tout à fait acceptable ($CV < 8,4\%$) (tableau 22). Insistons sur le fait que, lors de cette prévalidation, le nombre de répétitions est très faible ($n = 4, 5$ ou 6 suivant le niveau). Dans ce cas, le calcul des composantes de la variance est donc fort peu puissant d'un point de vue statistique. Or, le calcul du profil d'exactitude incorpore cette variance dans l'intervalle de tolérance. Par conséquent, celui-ci est d'autant plus important que le nombre de répétitions est petit et ce, très logiquement afin de laisser une marge de sécurité suffisante pour la prédiction des futurs résultats. Il n'est donc pas irraisonnable de penser qu'une fois que nous aurons accumulé plus de données, le profil d'exactitude s'affinera tout en restant dans les limites d'acceptation fixées *a priori*.

3.4. Conclusions

Au terme de cette partie de notre travail, nous pouvons dire que nous sommes parvenus à :

- Sélectionner le support d'extraction et démontrer sa sélectivité. Celui-ci est constitué de silice greffée par des groupements octyl recouvert (C8(EC)). Ces cartouches nous ont permis d'obtenir une excellente récupération (> 94 %).
- Optimiser l'intensité du signal obtenu en spectrométrie de masse en adaptant la composition de la phase mobile et de la température de la source d'ionisation. Nous avons ainsi démontré qu'un mélange binaire de méthanol et d'acide formique à 0,1 % (90 / 10) ainsi qu'une température fixée à 400 °C ont conduit à l'obtention d'un signal très important.
- Sélectionner la transition, suivie en spectrométrie de masse, menant à une meilleure sélectivité. Nous avons pu démontrer que le passage de la transition 313,3/109,3 à la transition 313,3/245,1 a permis d'éviter la détection d'un trop grand nombre de composés endogènes au temps de rétention du lévonorgestrel.
- Prévalider la méthode de dosage. Cette technique a montré un très bon comportement malgré la relative pauvreté du jeu de données. En effet, le profil d'exactitude (figure 48) obtenu est compris dans les limites d'acceptation fixées à 20 %.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

C.1. Conclusions

La mise sur le marché d'une spécialité pharmaceutique demande l'élaboration d'un dossier extrêmement complet et détaillé. Celui-ci doit non seulement présenter la description du produit mais aussi toutes les informations relatives à son développement, allant de son mode de fabrication aux techniques de dosage utilisées pour attester de sa qualité. La contribution analytique à l'élaboration d'un tel dossier est donc considérable. En effet, que le produit soit un antidépresseur ou un dispositif intra-utérin, l'analyse du principe actif et de ses impuretés et/ou produits de dégradation, de ses excipients ainsi que le dosage de ce même principe actif au terme des études cliniques ou de stabilité sont autant d'éléments indispensables à la constitution de ce dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM)..

La partie analytique du développement du dispositif intra-utérin qui nous incombait représente donc un vaste travail qui n'est pas encore complètement finalisé à ce jour.

Cette spécialité se compose des constituants suivants nécessitant tous une analyse individuelle :

- le support en polyéthylène,
- le réservoir en polydiméthylsiloxane dont la polymérisation est catalysée à l'étain et renfermant le principe actif (lévonorgestrel),
- la membrane en polydiméthylsiloxane catalysée quant à elle au platine,
- le fil en polyamide,
- le poussoir en polypropylène,
- le tube d'insertion en polyéthylène haute densité,
- l'anneau en chlorure de polyvinyle.

Il était également de notre ressort de vérifier l'adéquation du produit fini en lui-même ainsi que d'analyser le principe actif et le rhéofluidifiant permettant l'enfilage de la membrane au-dessus du réservoir. Pour finir, comme nous venons de le signaler, une méthode de dosage en milieu biologique qui sera utilisée au terme de l'étude clinique était aussi requise.

Bien que la Pharmacopée Européenne [60] décrive un grand nombre de méthodes analytiques, l'analyse de plusieurs des excipients et des accessoires du dispositif ont nécessité la mise au point de monographies spécifiques et donc de méthodes de dosage appropriées.

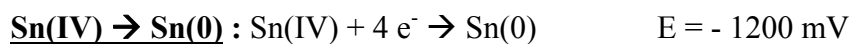
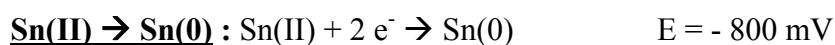
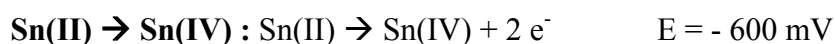
Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi de présenter les résultats afférents au développement de deux techniques analytiques complexes : la méthode de spéciation et de dosage de l'ion stannique par polarographie impulsionnelle différentielle (Sn(IV) représentant l'impureté de l'octanoate d'étain) et celle du dosage plasmatique du lévonorgestrel à un faible niveau de concentration par SPE/LC/MS-MS.

La mise au point de la spéciation a tout d'abord nécessité l'élaboration d'une technique simple et originale permettant l'isolement de l'étain de sa matrice. A cette fin, une extraction liquide / liquide via un bullage à l'azote et impliquant l'heptane et une solution d'acide chlorhydrique 2 M a été envisagée. En effet, nous avons pu rapidement mettre en évidence que la réalisation de cette extraction ne pouvait pas être réalisée sans un barbotage au moyen d'un gaz inerte (azote) sous peine d'une rapide oxydation des ions stanneux.

Nous avons dès lors étudié l'influence du procédé d'extraction sur la dégradation de l'étain (II) tout en évaluant la récupération de l'étain (IV). Nous avons obtenu d'excellents résultats puisque le pourcentage de récupération est respectivement de 101 % pour l'étain (II) et 100 % pour l'étain (IV) .

Une optimisation du temps d'extraction a également été conduite. A la suite de celle-ci, nous n'avons pas observé une différence significative entre les extractions conduites pendant 30, 15 ou 5 minutes. En effet, les récupérations obtenues en considérant ces trois temps sont toutes comprises entre 89 % et 110 %. Cette étude nous a par ailleurs permis de confirmer la nécessité du processus d'extraction. En effet, un taux de récupération de l'ordre de 60 % est obtenu lors de la simple mise en contact des deux phases. La durée du processus a été fixée à 5 minutes.

Avant de considérer le dosage des ions stanniques, il nous a tout d'abord fallu déterminer les conditions expérimentales permettant la séparation polarographique des deux espèces ioniques, en d'autres termes la spéciation. Pour ce faire, nous avons étudiés le comportement de deux complexants de l'étain ayant des constantes de complexation fort différentes : les ions fluorures, d'une part, et les ions malonates, d'autre part. Tous deux permettent la spéciation. Cependant les fluorures forment un complexant tellement stable avec les ions stanniques que la vague polarographique due à ce composé est rejetée dans un domaine de potentiel inférieur à -1,9 V. A ce potentiel, aucun dosage n'est envisageable car des ions tels que le sodium et le potassium, présents en grande quantité dans toutes solutions aqueuses, sont également réduits. En revanche, les ions malonates ont permis la détection des trois vagues polarographiques représentatives de l'étain (II) et de l'étain (IV) :



Lors de cette étude, nous avons également observé que l'intensité du pic d'étain (IV) variait fortement en fonction du pH de la solution soumise à l'analyse et constaté que plus celui-ci était élevé, plus l'intensité de la réponse était grande. Cet accroissement du signal dépassait les 25 % pour des valeurs de pH allant de 9,22 à 9,59 mais s'amenuisait à l'approche d'un pH égal à 10 (< 3,5%). Nous avons dès lors décidé d'effectuer les analyses à cette dernière valeur de pH au moyen d'un tampon bicarbonate/carbonate à 0,2 M.

Par la suite, nous avons étudié l'incidence du mode polarographique utilisé (mode DME versus mode SMDE). Nous avons ainsi constaté que bien qu'ayant une diminution de l'intensité du pic lors de l'utilisation du mode SMDE, il nous était toujours possible de détecter les ions stanniques à la concentration la plus faible (3 mg/L). De plus, nous avons confirmé que ce mode avait bien un effet favorable sur la variabilité des résultats. Le mode SMDE a donc été retenu pour la validation des conditions expérimentales qui seront utilisées en routine.

Finalement, nous avons donc réalisé la validation de la méthode de dosage de l'étain stannique dans l'octanoate d'étain. L'intervalle de dosage considéré allait de 3 mg/L (2,6 % de dégradation du catalyseur) à 50 mg/L (32,7 %). Les limites d'acceptation des performances de la méthode en termes d'erreur totale avaient été arbitrairement fixées à 30 % avec un risque α de 5 %. L'analyse du profil d'exactitude obtenu dans ces conditions nous a conduit à une limite de quantification inférieure de l'ordre de 10 mg/L. Cependant, en raison de l'objectif final de la méthode, de sa complexité et dans l'attente d'une éventuelle amélioration ultérieure (cf. perspectives), nous avons porté ce risque à 10 %. Le modèle de calibration le plus adéquat restait le modèle linéaire pondéré ($1/X^2$) mais le dosage de l'étain stannique était cette fois possible jusqu'à un seuil de concentration de 6 mg/L et ce, avec un biais relatif maximal de 5,4 % et une fidélité intermédiaire inférieure à 8 %.

En conclusion, nous pouvons dire que la spéciation et donc le dosage de **l'étain stannique** en présence d'étain stanneux (catalyseur) est réalisable avec une bonne fiabilité grâce au couplage d'une extraction liquide / liquide **sous atmosphère inerte** à une analyse par polarographie impulsionnelle différentielle en **mode SMDE** utilisant les **ions malonates** comme agents complexants. Signalons encore, qu'à notre connaissance, cette méthode est tout à fait originale.

En ce qui concerne la mise au point de la méthode de dosage du levonorgestrel dans le plasma, nous avons tout d'abord sélectionné un type de cartouche d'extraction sur la base de deux critères : sa sélectivité et son taux de récupération.

Notre choix s'est effectué à partir de 7 cartouches de silice greffée (CH(EC), C8, C8(EC), C18, C18(EC) et MFC18) ainsi qu'une cartouche de type polymérique (Oasis HLB). Nous avons démontré à cette occasion que, sur l'intégralité de l'intervalle de dosage, la cartouche de type C8(EC) permettait l'obtention des meilleurs résultats avec un pourcentage d'extraction moyen supérieur à 94 %.

Afin de permettre le dosage de concentrations plasmatiques de l'ordre de quelques dizaines de pg/mL, nous avons optimisé la nature de la phase mobile et la température de la source d'ionisation (APCI). Nous avons ainsi montré que le mélange méthanol / acide formique permettait une meilleure ionisation de la molécule avec un accroissement substantiel de la sensibilité et que l'augmentation de la température (400 °C) agissait dans le même sens.

Par la suite, nous avons montré que plusieurs composés endogènes élués à un temps de rétention proche de celui du lévonorgestrel donnaient également une réponse en spectrométrie de masse avec la transition 313,3/109,3 initialement choisie, ce qui rend, par là même, difficile la détection du LNG à de très faibles concentrations. Sur base du spectre de masse du LNG, nous avons dès lors sélectionné un autre fragment de même abondance ($m/z = 245,1$) ce qui nous a permis d'améliorer significativement la sélectivité de la méthode tout en gardant une sensibilité équivalente.

Enfin, faute de temps, nous n'avons pu envisager que la prévalidation de la méthode ainsi développée. Conformément à la réglementation en vigueur, les limites d'acceptation des performances de la méthode en termes d'erreur totale ont été fixées à 20 % avec un risque α de 5 %. L'analyse des profils d'exactitude obtenus nous a permis de sélectionner le modèle de régression linéaire pondéré ($1/X^2$). Il est, en effet, le seul à couvrir l'ensemble de l'intervalle de dosage souhaité. Ces premiers résultats sont très encourageants. Notre méthode présente un biais (justesse) assez faible, confirmant de la sorte la parfaite adéquation du modèle de régression sélectionné, ainsi qu'une fidélité, en terme de répétabilité, tout à fait acceptable ($CV < 8,4\%$). Rappelons que le nombre d'expériences en phase de prévalidation est assez faible et que, dans ces conditions, l'estimation des composantes de la variance est fort peu puissante. Par conséquent, il n'est pas impossible que la fidélité puisse encore s'améliorer avec l'acquisition de données supplémentaires.

En conclusion et même si une validation formelle est encore requise, il nous paraît fondé d'affirmer que le **dosage plasmatique du lévonorgestrel** à des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de **picogrammes par millilitre** est tout à fait réalisable. Cette méthode repose sur une extraction en phase solide (SPE) au moyen de cartouches de type **C8(EC)** suivie d'une analyse en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (LC/MS-MS). Signalons également qu'à notre connaissance aucune méthode LC/MS-MS publiée n'autorise le dosage plasmatique du levonorgestrel à un tel niveau de concentration.

C.2. Perspectives

Étant donné que lors le dosage des ions stanniques nous avons dû considérer en phase de validation un risque de 10 % afin d'atteindre une limite de quantification inférieure de 6 mg/L, nous envisageons une amélioration principalement ciblée sur la prise d'essai initiale du catalyseur. Rappelons que nous avons mis en évidence que la méthode était entachée d'un effet jour non négligeable aux niveaux de concentration les plus bas (3 mg/L et 6 mg/L). Il nous semble raisonnable de penser que l'oxygène est à l'origine du problème. En effet, même si l'oxygène ne provoque qu'une faible production d'ions stanniques, plus la concentration recherchée en ions stanniques est faible, plus l'impact sera grand.

Afin de remédier à cette situation, nous pourrions partir d'une prise d'essai d'octanoate d'étain plus importante (1 g). Ceci nous permettra d'analyser des solutions plus concentrées en Sn(IV) correspondant aux mêmes degrés de dégradation du produit. En effet, la solubilité de celui-ci dans l'heptane n'est pas une étape limitative du développement. De plus, d'après notre expérience, ce n'est pas la concentration en Sn(II) qui est problématique, mais bien la concentration en oxygène des solutions

contenant cet élément. Enfin, une concentration en Sn(IV) plus importante sera moins perturbée par un faible apport d'Sn(IV) dû à l'oxydation d'une partie de l'Sn(II). Il devrait donc être possible, en gardant la même vigilance par rapport à la désoxygénation des solutions, d'obtenir un dosage moins sujet à l'effet jour et ce, même pour de plus faibles concentrations en Sn(IV).

En ce qui concerne le dosage plasmatique du levonorgestrel, les données de prévalidation obtenues lors de notre étude préliminaire laissent présager d'un très bon comportement ultérieur de la méthode, et ce, même pour la concentration la plus faible (50 pg/mL). La prochaine étape pourrait donc être la validation formelle de cette méthode.

Toutefois, nous pourrions encore, préalablement à cette validation, envisager d'augmenter la sensibilité de cette procédure de dosage. En effet, le volume de solvant utilisé pour assurer l'élution du LNG de la cartouche n'a pas été optimisé. Il est actuellement d'un millilitre. La possibilité d'obtenir une aussi bonne récupération avec un volume moindre d'éluant (par exemple 500 ou 250 μ l) n'est, en effet, pas irréaliste. Une alternative qui pourrait également être testée consisterait en l'évaporation complète de l'éluat et la reprise du résidu par 250 μ L de la phase mobile. Nous pourrions ainsi théoriquement abaisser la limite de quantification d'un facteur quatre, soit une concentration de l'ordre de 15 pg/mL.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] Banque de Données Automatisée sur les Médicaments (BIAM), <http://www.biam2.org/www1/Sub1053.html>
- [2] I. M. Kolthoff and J. J. Lingane, Polarography, second edition, Volume 1, Interscience publishers, Inc, New-York (1952).
- [3] B. Gilbert, “Méthodes électrochimique d’analyse”, Faculté des Sciences, Université de Liège (1997).
- [4] P. Rach and H. Seiler in collaboration with F. Oehme, Polarography and voltametry in trace analysis, Heidelberg, Hüthig (1987).
- [5] G.J. Patriarche, J-C Viré, J-M Kauffmann, J.L. Vandenbalk, M.G. Chateau-Gosselin, *Electrochimie - Electroanalyse Applications aux médicaments*, Université libre de Bruxelles.
- [6] H. Lingeman, R.D. McDowall, U.A.Th. Brinkman, Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.*, 10, 48-59 (1991).
- [7] Ph. Hubert, A. Ceccato, P. Chiap, B. Toussaint et J. Crommen, Préparation des échantillons d’origine biologique préalable à leur analyse chromatographique, *STP Pharma Pratiques*, 9, 160-180 (1999).
- [8] J.M. Meole, M. Vanko, Use of charcaol to concentrate drugs from urine before drug analysis, *Clin. Chem.*, 20, 184-187 (1974).
- [9] J.R. Veraart, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, Coupling of biological handling and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 856, 483-514 (1999).
- [10] P. Chiap, Association de la dialyse à la chromatographie liquide pour le dosage automatisé de médicaments dans le plasma, mémoire présenté en vue de l’obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, année académique 1999-2000.
- [11] M.-C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 856, 3-54 (1999).
- [12] F. Lecomte, Contribution à l’évaluation de deux polymères à empreintes moléculaires pour le dosage du méthotrexate dans le plasma, mémoire présenté en vue de l’obtention du D.E.A. en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, année académique 2004-2005.
- [13] S. Souverain, Extraction en ligne sur support solide pour l’analyse de composés pharmaceutiques contenus dans des matrices biologiques par chromatographie liquide – spectrométrie de masse, thèse présentée en vue de l’obtention du grade de docteur en Sciences, mention Sciences Pharmaceutiques, Université de Genève, année académique 2003-2004.

- [14] E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure, *Analytical Chemistry*, 45, 936-943 (1973).
- [15] D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele, E. C. Horning, Atmospheric pressure ionization mass spectrometry, Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system, *Analytical Chemistry*, 47, 2369-2373 (1975).
- [16] J. Henion, B. A. Thomson, P. H. Dawson, Determination of sulfa drugs in biological fluids by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 54, 451-456 (1982).
- [17] K. L. Duffin, T. Wachs, J. Henion, Atmospheric pressure ion-sampling system for liquid chromatography/mass spectrometry analyses on a benchtop mass spectrometer, *Analytical Chemistry*, 64, 61-68 (1992).
- [18] D. Zhong, X. Chen, J. Gu, X. Li, J. Guo, Applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in drug and biomedical analyses, *Clinica Chimica Acta*, 313, 147-150 (2001).
- [19] E. De Hoffmann, J. Charrette, V. Stroobant, Spectrométrie de masse – Cours et exercices corrigés, Dunod (ed.), Seconde ed., Paris, 49-52 (1999).
- [20] Ph. Hubert, “Validation des méthodes analytiques”, Faculté de Médecine, Département de Pharmacie, Université de Liège (2006).
- [21] PAT Initiative, FDA, <http://www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm>.
- [22] ICH guidelines Q9, EMEA, <http://www.emea.eu.int/Inspections/docs/ICHQ9Step4QRM.pdf>.
- [23] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Validation des procédures analytiques quantitatives - Harmonisation des démarches, *STP Pharma Pratiques*, 13, 101-138 (2003).
- [24] Ph. Hubert et al, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal - part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.* Vol. 36, 579 (2004).
- [25] R. Marini Djang'eing'a, Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytique, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, année académique 2005 – 2006.

- [26] The Metal Carboxylates Coalition A SOCMA Affiliated Consortium, Tin bis(2-ethylhexanoate) Test Plan, *U.S. High Production Volume (HPV) Chemical Challenge Program*, 201-15606A, 1-8 (2004).
- [27] M. Patel, A.R. Skinner, A. Chaudhry, N.C. Billingham, B. Mathieu, Impact of thermal ageing on the tin catalyst species in room temperature vulcanised polysiloxane rubbers, *Polymer Degradation and Stability*, 83, 157-161 (2004).
- [28] R. Lejeune, J. Thunus, L. Thunus, Polarographic determination of Sn(II) in samples containing Sn(IV) such as in 99m-Techneium radiopharmaceutical kits, *Analytica Chimica Acta*, 332, 67-71 (1996).
- [29] L. Qiong, L. Guanghan, W. Heng, W. Xiaogang, Determination of trace tin in foods by single-sweep polarography, *Food Chemistry*, 64, 129-132 (1999).
- [30] V. Pérez-Herranz, M. García-Gabaldón, J.L. Guiñón, J. García-Antón, Effect of citric acid and hydrochloric acid on the polarographic behaviour of tin. Application to the determination of tin(II) in presence of tin(IV) in the activating solutions of the electroless plating of polymers, *Analytica Chimica Acta*, 484, 243-251 (2003).
- [31] L. Meites, P. Zuman, E. B. Rupp, T. L. Fenner, A. Narayanan, Handbook series in inorganic electrochemistry, Volume VII: Se-Tm, CRC Press, Boca Raton ; 48-122 (1986).
- [32] J. F. Dorgan, T. R. Fears, R. P. McMahon, L. A. Friedman, B. H. Patterson, S. F. Greenhut, Measurement of steroid sex hormones in serum: comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry, *Steroids*, 67, 151-158 (2002).
- [33] M. J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, Review – Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment, *Journal of Chromatography A*, 1000, 503-526 (2003).
- [34] M. Petrovic, E. Eljarrat, M. J. López de Alda, D. Barceló, Review – Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples, *Journal of Chromatography A*, 974, 23-51 (2002).
- [35] S. M. R. Wille, K. E. Maudens, C. H. Van Peteghem, W. E. E. Lambert, Development of a solid phase extraction for 13 ‘new’ generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis, *Journal of Chromatography A*, Article in press (2005).
- [36] X. Chen, S. Ren, F. Meng, Y. Zhang, D. Zhong, Determination of methacycline in human plasma by liquid chromatography couplet o tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Article in press (2005).
- [37] K. Heinig, F. Bucheli, Fast liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS-MS) determination of metformin in plasma samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 1005-1011 (2004).

- [38] R. Li, L. Dong, J. Huang, Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma, *Analytica Chimica Acta*, 546, 167-173 (2005).
- [39] I. Hoes, W. Van Dongen, F. Lemièrè, E. L. Esmans, D. Van Boskstaale, Z. N. Berneman, Comparison between capillary and nano liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the analysis of minor DNA-melphalan adducts, *Journal of Chromatography B*, 748, 197-212 (2000).
- [40] U. Celglarek, J. Lembcke, G. M. Fiedler, M. Werner, H. Witzigmann, J. P. Hauss, J. Thiery, Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry, *Clinica Chimica Acta*, 346, 181-190 (2004).
- [41] P. Chiap, O. Rbeidan, B. Christiaens, Ph. Hubert, D. Lubda, K.-S. Boos, J. Crommen, Use of novel cation-exchange restricted –access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 975, 145-155 (2002).
- [42] A. Vintiloiu, W. M. Mullett, R. Papp, D. Lubda, E. Kwong, Combining restricted access material (RAM) and turbulent flow for the rapid on-line extraction of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples, *Journal of Chromatography A*, 1082, 150-157 (2005).
- [43] B. Christiaens, M. Fillet, P. Chiap, O. Rbeida, A. Ceccato, B. Streel, J. De Graeve, J. Crommen, Ph. Hubert, Fully automated method for the liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of cyproterone acetate in human plasma using restricted access material for on-line sample clean-up, *Journal of Chromatography A*, 1056, 105-110 (2004).
- [44] B. A. Sinnaeve, J. F. Van Bocxlaer, Evaluation of nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a column-switching setup for the absolute quantification of peptides in the picomolar range, *Journal of Chromatography A*, 1058, 113-119 (2004).
- [45] A. Holm, P. Molander, E. Lundanes, S. Øvrebø, T. Greibrokk, Fast and sensitive determination of urinary 1-hydroxypyrene by packed capillary column-switching liquid chromatography coupled to micro-electrospray time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 794, 175-183 (2003).
- [46] E. Bourgoigne, C. Grivet, G. Hopfgartner, Determination of talinolol in human plasma using automated on-line solid phase extraction combined with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 820, 103-110 (2005).
- [47] M. Li, Y. Alnouti, R. Leverence, H. Bi, A. I. Gusev, Increase of the LC-MS/MS sensitivity and detection limits using on-line sample preparation with large volume plasma injection, *Journal of Chromatography B*, 825, 152-160 (2005).

- [48] T. Uno, N. Yasui-Furukory, M. Shimizu, K. Sugawara, T. Tateishi, Determination of rabeprazole and its active metabolite, rabeprazole thioether in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic study, *Journal of Chromatography B*, 824, 238-243 (2005).
- [49] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. López de Alda, D. Barceló, Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1045, 85-92 (2004).
- [50] H. B. Theron, C. Coetzee, F. C. W. Sutherland, J. L. Wiesner, K. J. Swart, Selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of lévonorgestrel in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 813, 331-336 (2004).
- [51] I. Sivin, L. Wan, S. Ranta, F. Alvarez, V. Brache, D. R. Mishell Jr., Ph. Darney, A. Biswas, S. Diaz, O. Kiriwat, M. P. Anant, C. Klaisle, M. Pavez, J. Schechter, Levonorgestrel concentrations during 7 years of continuous use of Jadelle contraceptive implants, *Contraception*, 64, 43-49 (2001).
- [52] E. Weiner, E. D. B. Johansson, Plasma levels of d-norgestrel, estradiol and progesterone during treatment with silastic implants containing d-norgestrel, *Contraception*, 14, 81-92 (1976).
- [53] K. Kook, H. Gabelnick, G. Duncan, Pharmacokinetics of Levonorgestrel 0.75 mg tablets, *Contraception*, 66, 73-76 (2002).
- [54] M. J. López de Alda, D. Barceló, determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 892, 391-406 (2000).
- [55] M. J. López de Alda, D. Barceló, use of solid-phase extraction in various of eats modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water, *Journal of Chromatography A*, 938, 145-153 (2001).
- [56] M. Petrovic, S. Tavazzi, D. Barceló, Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample clean-up and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediments, *Journal of Chromatography A*, 971, 37-45 (2002).
- [57] M. J. López de Alda, D. Barceló, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 911, 203-210 (2001).

- [58] M. M. Ghonein, W. Baumann, E. Hammam, A. Tawfik, Voltammetric behaviour and assay of the contraceptive drug lévonorgestrel in bulk tablets, and human serum at a mercury electrode, *Talanta*, 64, 857-864 (2004).
- [59] A. M. Sopirak, L. F. Cullen, Norgestrel, Analytical Profiles of Drug Substance, Vol. 4, Academic Press, Klaus Flory, New Jersey ; 294-318 (1975).
- [60] Guidance document, FDA, <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.htm>
- [61] F. B. Lockhat, J. E. Emembolu, J. C. Konje, Serum and peritoneal fluid levels of lévonorgestrel in women with endometriosis who were treated with an intrauterine contraceptive device containing lévonorgestrel, *Fertility and Sterility*, 83, 398-404 (2005).
- [62] Direction de la Qualité du Médicament du Conseil de l'Europe (DEQM), Pharmacopée Européenne, cinquième édition, Aubin, Ligugé ; 2057-2058 (2004).

Annexe A :

Monographie du lévonorgestrel

A. Monographie du lévonorgestrel^[62]

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 5.0

Lévonorgestrel

Détection : spectrophotomètre à 210 nm.

Équilibrage : environ 30 min.

Injection : 10 µl.

Rétention relative par rapport à la levométhadone :
dextrométhadone = environ 1,4.

Conformité du système : solution à examiner :

- **nombre de plateaux théoriques** : au minimum 2000 calculé pour le pic dû à la levométhadone,
- **facteur de symétrie** : au maximum 3 pour le pic dû à la levométhadone.

Limites :

- **dextrométhadone** : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenue avec la solution témoin (0,5 pour cent).

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 100-105 °C sur 1,000 g de chlorhydrate de levométhadone.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de chlorhydrate de levométhadone.

DOSAGE

Dissolvez 0,300 g de chlorhydrate de levométhadone dans un mélange de 40 ml d'eau R et de 5 ml d'acide acétique R. Titrez par le nitrate d'argent 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20) en utilisant une électrode indicatrice d'argent.

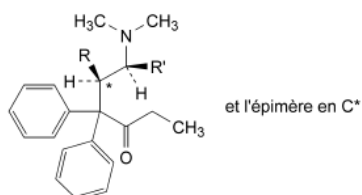
1 ml de nitrate d'argent 0,1 M correspond à 34,59 mg de C₂₁H₂₈ClNO.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

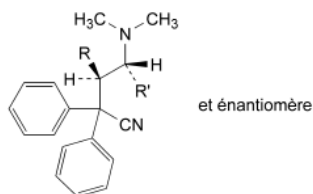
IMPURETÉS

Impuretés spécifiées : A, B, C, D, E, F.



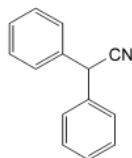
A. R = H, R' = CH₃ : (6S)-6-(diméthylamino)-4,4-diphénylheptan-3-one,

D. R = CH₃, R' = H : (5RS)-6-(diméthylamino)-5-méthyl-4,4-diphénylhexan-3-one,

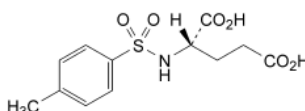


B. R = H, R' = CH₃ : (4RS)-4-(diméthylamino)-2,2-diphénylpentanenitrile,

C. R = CH₃, R' = H : (3RS)-4-(diméthylamino)-3-méthyl-2,2-diphénylbutanenitrile,



E. diphenylacetonitrile,

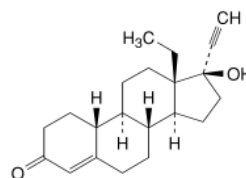


F. acide (2S)-2-[(4-méthylphényl)sulfonyl]amino]pentanedioïque (acide N-p-tosyl-L-glutamique).

01/2005:0926

LÉVONORGESTREL

Levonorgestrelum

C₂₁H₂₈O₂

M, 312,5

DÉFINITION

Le lévonorgestrel contient au minimum 98,0 pour cent et au maximum l'équivalent de 102,0 pour cent de 13-éthyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17α-prégn-4-én-20-yn-3-one, calculé par rapport à la substance desséchée.

CARACTÈRES

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans l'alcool.

IDENTIFICATION

- Le lévonorgestrel satisfait à l'essai du pouvoir rotatoire spécifique (Voir Essai).
- Examinez le lévonorgestrel par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24), en comparant avec le spectre obtenu avec le lévonorgestrel SCR.

ESSAI

Pouvoir rotatoire spécifique (2.2.7). Dissolvez 0,200 g de lévonorgestrel dans du chloroforme R et complétez à 10,0 ml avec le même solvant. Le pouvoir rotatoire spécifique est de -30 à -35.

Substances apparentées. Opérez par chromatographie sur couche mince (2.2.27) en utilisant une plaque recouverte de gel de silice G R.

Solution à examiner. Dissolvez 0,2 g de lévonorgestrel dans du chloroforme R et complétez à 10 ml avec le même solvant.

Solution témoin (a). Prélevez 1 ml de solution à examiner et complétez à 10 ml avec du chlorure de méthylène R. Prélevez 1 ml de solution et complétez à 20 ml avec du chlorure de méthylène R.

Solution témoin (b). Prélevez 4 ml de solution témoin (a) et complétez à 10 ml avec du chlorure de méthylène R.

Solution témoin (c). Dissolvez 5 mg de *lévonorgestrel SCR* et 5 mg d'*éthinylestrodiol SCR* dans du *chlorure de méthylène R* et complétez à 50 ml avec le même solvant.

Déposez séparément sur la plaque 10 µl de chaque solution. Développez sur un parcours de 15 cm avec un mélange de 20 volumes d'*acétate d'éthyle R* et de 80 volumes de *chlorure de méthylène R*. Laissez sécher la plaque à l'air. Pulvérisez une solution d'*acide phosphomolybdique R* à 100 g/l dans de l'*alcool R*, chauffez à 100-105 °C pendant 15 min et examinez immédiatement. S'il apparaît d'autres taches que la tache principale dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner, aucune d'entre elles n'est plus intense que la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,5 pour cent) et deux d'entre elles au plus peuvent être plus intenses que la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent). L'essai n'est valable que si le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) présente 2 taches nettement séparées.

Perte à la dessiccation (2.2.32). Déterminée à l'étuve à 100-105 °C sur 1,000 g de lévonorgestrel, la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 0,5 pour cent.

Cendres sulfuriques (2.4.14). Déterminé sur 1,0 g de lévonorgestrel, le taux des cendres sulfuriques n'est pas supérieur à 0,1 pour cent.

DOSAGE

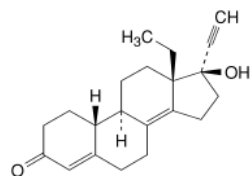
Dissolvez 0,200 g de lévonorgestrel dans 45 ml de *tétrahydrofurane R*. Ajoutez 10 ml d'une solution de *nitrate d'argent R* à 100 g/l. Après 1 min, titrez par l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20). Effectuez un titrage à blanc.

1 ml d'*hydroxyde de sodium 0,1 M* correspond à 31,25 mg de $C_{21}H_{28}O_2$.

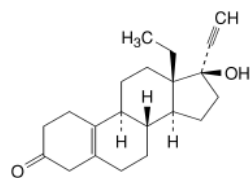
CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

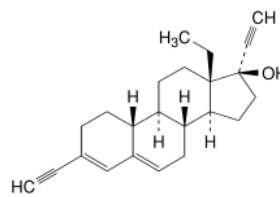
IMPURETÉS



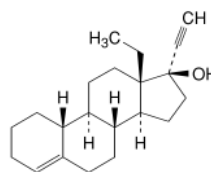
A. 13-éthyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -prégn-4,8(14)-dién-20-yn-3-one,



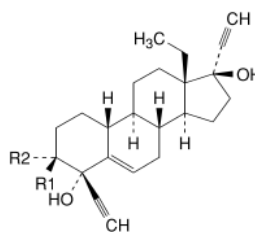
B. 13-éthyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -prégn-5(10)-én-20-yn-3-one,



C. 13-éthyl-3-éthynyl-18,19-dinor-17 α -prégn-3,5-dién-20-yn-17-ol,



D. 13-éthyl-18,19-dinor-17 α -prégn-4-én-20-yn-17-ol,



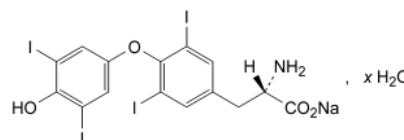
E. R1 = OH, R2 = C \equiv CH : 13-éthyl-3,4-diéthynyl-18,19-dinor-17 α -prégn-5-én-20-yn-3 β ,4 α ,17-triol,

F. R1 = C \equiv CH, R2 = OH : 13-éthyl-3,4-diéthynyl-18,19-dinor-17 α -prégn-5-én-20-yn-3 α ,4 α ,17-triol.

01/2005:0401

LÉVOTHYROXINE SODIQUE

Levothyroxinum natricum



$C_{15}H_{16}I_4NNaO_4 \cdot xH_2O$

M_r 799 (substance anhydre)

DÉFINITION

La lévothyroxine sodique contient au minimum 97,0 pour cent et au maximum l'équivalent de 102,0 pour cent de (2S)-2-amino-3-[4-(4-hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodophenyl]propanoate de sodium, calculé par rapport à la substance desséchée. La lévothyroxine sodique contient une quantité variable d'eau.

CARACTÈRES

Poudre sensiblement blanche ou faiblement jaune-brun ou poudre cristalline, fine, très peu soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool. La lévothyroxine sodique se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

IDENTIFICATION

Première identification : A, B, E.

Annexe B :

*Données de validation du dosage
de l'étain stannique*

Réponses polarographiques obtenues lors de l'exercice de validation (nA)**Standards de calibration (J1) :**

	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5
	11,81	20,69	42,32	141,2	169,4
	11,66	20,58	40,63	141,7	168,7
	11,94	21,30	41,91	141,1	VA
Moyenne	11,80	20,86	41,62	141,33	169,05
Ecart-type	0,14	0,39	0,88	0,32	0,49
CV (%)	1,19	1,86	2,12	0,23	0,29

Standards de validation (J1) :

	SV01	SV02	SV03	SV04	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5
	14,47	12,59	15,49	15,27	29,03	36,73	62,64	157,9	184,6
	17,28	13,68	17,45	15,02	29,86	36,36	62,26	157,6	184,6
	15,02	14,11	17,70	15,65	29,84	36,02	61,74	156,2	VA
	16,67	13,62	17,62	15,95	30,02	36,23	61,22	155,1	183,5
Moyenne	15,86	13,50	17,07	15,47	29,69	36,34	61,97	156,70	184,23
Ecart-type	1,33	0,64	1,06	0,41	0,45	0,30	0,62	1,30	0,64
CV (%)	8,39	4,78	6,18	2,65	1,50	0,82	1,00	0,83	0,34

Standards de calibration (J2) :

	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5
	17,38	31,99	58,81	205	VA
	16,44	31,3	57,49	198,1	254,9
	16,67	31,52	58,55	209,7	253,8
Moyenne	16,83	31,60	58,28	204,27	254,90
Ecart-type	0,49	0,35	0,70	5,83	0,78
CV (%)	2,91	1,12	1,20	2,86	0,31

Annexe B : Données de validation du dosage de l'étain stannique

Standards de validation (J2) :

	SV01	SV02	SV03	SV04	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5
	VA	25,82	24,53	28,03	48,63	57,85	93,35	231,4	270,5
	VA	25,66	23,52	27,86	47,5	57,42	81,06	236,6	284,2
	VA	25,12	23,96	26,64	47,87	58,43	89,63	236,2	VA
	VA	26,35	24,17	27,47	47,19	58,73	89,29	221,8	268,1
Moyenne	N/A	25,74	24,05	27,50	47,80	58,11	88,33	231,50	274,27
Ecart-type	N/A	0,51	0,42	0,62	0,62	0,59	5,19	6,88	8,69
CV (%)	N/A	1,97	1,75	2,25	1,30	1,01	5,87	2,97	3,17

Standards de calibration (J3) :

	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5
	13,05	23,92	46,15	155,1	190,7
	13,42	23,85	45,53	154,1	191,7
	13,13	23,19	46,12	VA	189,2
Moyenne	13,20	23,65	45,93	154,60	190,53
Ecart-type	0,19	0,40	0,35	0,71	1,26
CV (%)	1,47	1,70	0,76	0,46	0,66

VA = Valeur aberrante.
N/A = Non applicable.

Standards de validation (J3) :

	SV01	SV02	SV03	SV04	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5
	23,59	VA	21,47	22,19	32,7	49,53	VA	VA	221,6
	23,86	22,58	20,81	21,67	33,26	48,97	69,59	177,3	227,3
	24,71	22,27	22,23	22,27	32,96	49,38	69,96	176,9	210,5
	22,8	21,89	20,63	22,68	VA	48,09	69,14	176,5	207,4
Moyenne	23,74	22,25	21,29	22,20	32,97	48,99	69,56	176,90	216,70
Ecart-type	0,79	0,35	0,73	0,41	0,28	0,65	0,41	0,40	9,33
CV (%)	3,32	1,55	3,41	1,87	0,85	1,32	0,59	0,23	4,31

Annexe C :

*Données de récupération et
données de validation du dosage
plasmatique du LNG*

Récupération SPE

Extraction d'un plasma blanc puis ajout d'une concentration connue en LNG :

ID	Concentration en LNG (pg/mL)	Aire du LNG (coups)	Aire du SI (coups)	Rapport aires	Moyenne
T0 1 1	49,05	2088,3	170450	0,0123	0,0120
T0 1 2	49,05	1091,2	93116	0,0117	
T0 2 1	98,10	6820,0	170630	0,0400	0,0381
T0 2 2	98,10	6198,1	171310	0,0362	
T0 3 1	490,50	38623,0	157600	0,2451	0,2451
T0 3 2	490,50	VA			
T0 4 1	981,00	79342,0	163590	0,4850	0,4861
T0 4 2	981,00	74911,0	153730	0,4873	

Extraction d'un plasma dopé avec une concentration connue en LNG :

ID	Concentration en LNG (pg/mL)	Aire du LNG (coups)	Aire du SI (coups)	Rapport aires	Récupération (%)
Récup 1 1	49,05	VA			N/A
Récup 1 2	49,05	VA			N/A
Récup 1 3	49,05	627,8	70307	0,0089	74,5
Récup 1 4	49,05	1848,7	150700	0,0123	102,4
Récup 1 5	49,05	1793,5	157880	0,0114	94,8
Récup 1 6	49,05	501,3	61204	0,0082	68,3
Récup 1 7	49,05	1500,5	124000	0,0121	101,0
Récup 1 8	49,05	1329,1	158690	0,0084	69,9
Récup 1 9	49,05	957,5	111890	0,0086	71,4
Récup 2 1	98,10	4172,1	115340	0,0362	95,0
Récup 2 2	98,10	VA			N/A
Récup 2 3	98,10	5113,8	130950	0,0391	102,6

Annexe C : Données de récupération et données de validation du dosage plasmatique du LNG

Récup 2 4	98,10	3934,2	117610	0,0335	87,9
Récup 2 5	98,10	4584,9	126640	0,0362	95,1
Récup 2 6	98,10	VA			N/A
Récup 2 7	98,10	2926,8	75022	0,0390	102,5
Récup 2 8	98,10	4105,4	114970	0,0357	93,8
Récup 2 9	98,10	3676,1	96498	0,0381	100,1
Récup 3 1	490,50	21430,0	93255	0,2298	93,8
Récup 3 2	490,50	VA			N/A
Récup 3 3	490,50	37811,0	162210	0,2331	95,1
Récup 3 4	490,50	29226,0	122500	0,2386	97,4
Récup 3 5	490,50	22966,0	88928	0,2583	105,4
Récup 3 6	490,50	24202,0	107880	0,2243	91,5
Récup 3 7	490,50	25175,0	106830	0,2357	96,2
Récup 3 8	490,50	26790,0	109640	0,2443	99,7
Récup 3 9	490,50	26563,0	107950	0,2461	100,4
Récup 4 1	981,00	53916,0	105760	0,5098	104,9
Récup 4 2	981,00	68202,0	148280	0,4600	94,6
Récup 4 3	981,00	50585,0	106090	0,4768	98,1
Récup 4 4	981,00	52662,0	101900	0,5168	106,3
Récup 4 5	981,00	62676,0	146510	0,4278	88,0
Récup 4 6	981,00	58964,0	123920	0,4758	97,9
Récup 4 7	981,00	VA			N/A
Récup 4 8	981,00	VA			N/A
Récup 4 9	981,00	58604,0	110580	0,5300	109,0

Annexe C : Données de récupération et données de validation du dosage plasmatique du LNG

Pourcentage de récupération en LNG (SPE) :

Niveau	Concentration en LNG (pg/mL)	Moyenne T0 (rapport aires)	Moyenne Récup (rapport aires)	Pourcentage de récupération (%)	SD (%)	n =
N1	49,05	0,0120	0,0100	83,2	± 15,4	7
N2	98,10	0,0381	0,0368	96,7	± 5,3	7
N3	490,50	0,2451	0,2388	97,4	± 4,4	8
N4	981,00	0,4861	0,4853	99,8	± 7,4	7
			MOYENNE (%)	94,3	± 7,5	

VA = Valeur aberrante. N/A = Non applicable.

Annexe C : Données de récupération et données de validation du dosage plasmatique du LNG

Validation du dosage

Standards de calibration (SC) :

ID	Niveau	Aire du LNG (coups)	Aire du SI (coups)	Rapport aires
SC 50 pg/mL	N1	627,8	70307	0,0089
SC 100 pg/mL	N2	5113,8	130950	0,0391
SC 500 pg/mL	N3	37811,0	162210	0,2331
SC 1000 pg/mL	N4	50585,0	106090	0,4768

Standards de validation (SV) :

ID	Niveau	Aire du LNG (coups)	Aire du SI (coups)	Rapport aires
SV 50 pg/mL 1	N1	1848,7	150700	0,0123
SV 50 pg/mL 2	N1	1793,5	157880	0,0114
SV 50 pg/mL 3	N1	501,3	61204	0,0082
SV 50 pg/mL 4	N1	1500,5	124000	0,0121
SV 50 pg/mL 5	N1	1329,1	158690	0,0084
SV 50 pg/mL 6	N1	957,5	111890	0,0086
SV 100 pg/mL 1	N2	3934,2	117610	0,0335
SV 100 pg/mL 2	N2	4584,9	126640	0,0362
SV 100 pg/mL 3	N2	VA		
SV 100 pg/mL 4	N2	2926,8	75022	0,0390
SV 100 pg/mL 5	N2	4105,4	114970	0,0357
SV 100 pg/mL 6	N2	3676,1	96498	0,0381
SV 500 pg/mL 1	N3	29226,0	122500	0,2386
SV 500 pg/mL 2	N3	22966,0	88928	0,2583
SV 500 pg/mL 3	N3	24202,0	107880	0,2243
SV 500 pg/mL 4	N3	25175,0	106830	0,2357
SV 500 pg/mL 5	N3	26790,0	109640	0,2443
SV 500 pg/mL 6	N3	26563,0	107950	0,2461
SV 1000 pg/mL 1	N4	52662,0	101900	0,5168
SV 1000 pg/mL 2	N4	62676,0	146510	0,4278
SV 1000 pg/mL 3	N4	58964,0	123920	0,4758
SV 1000 pg/mL 4	N4	VA		
SV 1000 pg/mL 5	N4	VA		
SV 1000 pg/mL 6	N4	58604,0	110580	0,5300

VA = Valeur aberrante.