



FÉDÉRATION ALGÉRIENNE DE PHARMACIE

Disponible en ligne sur

**ASJP**  
 Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/436>


## ARTICLE ORIGINAL

## Mise au point d'une technique de détermination urinaire de la prégabaline par CG-SM et étude de la cinétique d'élimination.

Development of a technique for urinary determination of pregabalin by GC-MS and study of elimination kinetics. (English)

Samah AOUDIA<sup>a,\*</sup>, Imene BERGOUG<sup>b</sup>, Khaled SOBHI<sup>c</sup>, Oussama NOUIS<sup>d</sup>.

<sup>a</sup> Département de pharmacie, Faculté de pharmacie d'Alger.

<sup>b</sup> Département de pharmacie, Faculté de pharmacie d'Alger.

<sup>c</sup> Laboratoire de toxicologie, Hôpital Central de l'Armée.

<sup>d</sup> Laboratoire de toxicologie, Hôpital Central de l'Armée.

## MOTS CLÉS

Prégabaline ;  
CG-SM ;  
Urine ;  
Détermination.

## Résumé

**Introduction :** La prégabaline souvent connue sous le nom de LYRICA®, est un antiépileptique, anxiolytique et analgésique, généralement utilisée pour traiter la douleur neuropathique. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) est l'une des techniques utilisées pour la détermination et la quantification de la prégabaline dans des échantillons d'urine.

**Méthodes :** La technique mise au point comprend une extraction liquide-liquide avec du dichlorométhane et de l'isopropanol, et une dérivation par BSTFA+TMCS. Le N-acétyl paroxétine a été utilisé comme étalon interne. La séparation a été atteinte sur une colonne RESTEK® RXI-5SIL MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm) couplée à un détecteur de spectrométrie de masse de type quadripôle, l'ionisation se fait par impact électronique et les données sont analysées par la technique en suivi d'ions sélectionnés (SIM).

**Résultats :** La technique montre une bonne linéarité dans la plage de concentrations de 1 à 10 µg/ml une bonne limite de quantification à 1,22 µg/ml et un rendement d'extraction satisfaisant.

**Conclusion :** La méthode est spécifique et précise.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. Tous droits réservés.

## KEYWORDS

Pregabalin;  
GC-SM;

## Abstract

**Introduction:** Pregabalin, often known as LYRICA®, is an antiepileptic, anxiolytic and analgesic, generally used to treat neuropathic pain. Gas chromatography-mass (GC-MS) is one of the techniques used for the determination and quantification of pregabalin in urine samples.

Urine;  
Détermination.

**Methods:** The technique developed includes liquid-liquid extraction with dichloromethane and isopropanol, and derivatization by BSTFA+TMCS. N-acetyl paroxetine was used as an internal standard. Separation was achieved on a RESTEK® RXI-5SIL MS column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm) coupled to a quadrupole type mass spectrometry detector, ionization is by electron impact and the data is analyzed by the selected ion monitoring (SIM) technique.

**Results:** The technique shows good linearity in the concentration range of 1 to 10 µg/ml, a good limit of quantification at 1.22 µg/ml and a satisfactory extraction yield.

**Conclusion:** The method is specific and precise.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. All rights reserved.

\* Auteur correspondant : S. AOUDIA<sup>1</sup>; I. BERGOUG<sup>2</sup>; K. SOBHI<sup>3</sup>; O. NOUIS<sup>4</sup>.

Adresse e-mail : aoudiasamah@gmail.com(1); amerbergoug9@gmail.com (2); sobhikhaled@yahoo.fr(3); nousoussama888@gmail.com (4).

## Introduction :

Une tendance toxicomanogène de type mésusage et détournement des médicaments se fait très nettement ressentir en Algérie. Les dernières statistiques fournies par l'Office National de Lutte Contre la Drogue et La Toxicomanie ont annoncé des chiffres alarmants : 4 274 615 comprimés psychotropes de différentes marques saisis ; 14 954 affaires traitées de trafic, commerce, détention et usage des médicaments psychotropes, durant le premier trimestre de l'année 2023.

La prégabaline (PGB) est le produit le plus largement recherché mais aussi consommé en raison de ses fortes propriétés euphorisantes lorsqu'il est consommé à un certain dosage (1).

L'arrêté interministériel du 2 Muharram 1443 correspondant au 11 août 2021 publié dans Journal Officiel N°61, fixe la liste des substances et médicaments ayant des propriétés psychotropes à risque avéré d'abus, de pharmacodépendance et d'usage détourné, dont la PGB fait partie de cette liste (2).

La PGB : l'acide (S)3-(aminoéthyl) -5-méthylhexanoïque est un analogue structurel du neurotransmetteur acide gamma amino-butyrique (GABA), approuvé par la Food and Drug Administration en 2007 comme antiépileptique de dernière génération. Elle a aussi des indications dans le traitement de la douleur neuropathique et les troubles anxieux généralisés chez l'adulte (3). Elle se présente sous forme d'un solide cristallin blanc, d'une masse molaire de 159,23 g/mol, très soluble dans l'eau et dans les solutions basiques et acides (4).

La PGB est rapidement absorbée lorsqu'elle est administrée à jeun, les pics plasmatiques apparaissent dans l'heure suivant l'administration

d'une dose unique ou de doses multiples. La biodisponibilité orale de la prégabaline est estimée comme étant supérieure à 90% et est indépendante de la dose. Elle ne se lie pas aux protéines plasmatiques et a un volume de distribution de 0,5 L/Kg, son métabolisme hépatique est négligeable, elle est éliminée de la circulation générale principalement par voie rénale sous forme inchangée (98%) et sa demi-vie d'élimination est d'environ 6h (5).

De nombreuses méthodes d'analyses ont été détaillées dans la littérature ; certaines sont qualitatives et d'autres sont quantitatives. En cas de suspicion d'usage abusif ou d'intoxication aiguë par la PGB, l'analyse toxicologique se déroule en deux étapes (6). Un dépistage urinaire à l'aide des méthodes immunochimiques qui permettent une identification rapide, exemple de : *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)* et à flux latéral (LFIA) qui ont une limite de détection de 500 ng/ml, suivi d'une confirmation par méthodes chromatographiques (UPLC-SM-SM, LC-SM-SM et HPLC-DAD), d'électrophorèse capillaire et de spectrophotométrie(3,7-10)

Les rapports épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation préoccupante du mésusage de la PGB. Pour cela, la PGB doit être incluse dans le panel des substances psychoactives à rechercher systématiquement. Cependant, on est toujours confronté à des pénuries de tests immunochimiques de détection de cette molécule. Aussi, les automates disponibles sur le marché algérien n'assurent pas le dépistage de la PGB.

À cet effet, l'objectif principal de ce travail est la mise au point d'une technique de détermination urinaire de la prégabaline, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, comme alternative en cas de manque de tests

immunochimiques au niveau du laboratoire de toxicologie de l'Hôpital Central de l'Armée. Comme objectif secondaire, l'application de cette technique pour l'étude de la cinétique d'élimination urinaire de la prégabaline chez des volontaires sains.

## Matériels :

### REACTIFS ET STANDARDS ANALYTIQUES

**Reactifs :** Le méthanol (99,8%), acétonitrile (99,8%), 2-propanol (99,8%), dichlorométhane (99,8%), acétone (99,8%) et phosphate monopotassique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (98%) sont issus du laboratoire PANREAC®. Le N,o-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (99%) + triméthylchlorosilane (1%) (BSTFA-TMCS) de chez SUPELCO®.

**Standards analytiques :** La PGB utilisée dans l'optimisation de la technique est reprise à partir de gélule de 150 mg fabriquée par le laboratoire PHARMALLIANCE® en récupérant la totalité de la poudre par 150 ml du méthanol pour obtenir une solution stock de 1mg/ml.

L'étalon interne est le N-acétyl-paroxétine de concentration de 200 mg/l préparé dans le laboratoire de toxicologie de l'HCA à partir d'une acétylation de la paroxétine qui est fournie par le laboratoire A2S®.

### MATERIEL BIOLOGIQUE

Le milieu biologique utilisé pour la mise au point de notre méthode est une urine exempte de PGB, c'est l'urine des sujets dont le résultat de la recherche immunologique s'est avéré négatif. Elle est utilisée pour la préparation des mixtures de standards analytiques utilisées au cours de l'optimisation de la technique.

Nous avons choisi l'urine comme matrice biologique pour les raisons suivantes :

- Des concentrations en prégabaline plus grandes que celles du sang et donc idéales pour la recherche et l'identification du médicament.
- Le médicament reste détectable pendant une période beaucoup plus longue dans l'urine que dans le sang.

### ÉQUIPEMENTS

#### **Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG-SM)**

Le chromatographe en phase gazeuse de la marque SHIMADZU® NEXIS GC-2030, couplé à un spectromètre de masse type quadripôle, de la marque SHIMADZU® NEXIS GCMS-QP2030 NX, utilisé pour l'optimisation de la méthode d'analyse, équipé d'une colonne RESTEK® RXI-5SIL MS (30m ; 0,25mm ; 0,25µm) et un logiciel de

traitement des données GC-MS REAL TIME ANALYSIS®.

### AUTRES MATERIELS

- Balance de précision (SARTORIUS®).
- Hotte d'aspiration de marque : ERLAB®, CAPTAIR SMART 321.
- Rotateur de marque : SNIJDERS SCIENTIFIC® 34528.
- Centrifugeuse de marque : EPPENDORF® centrifuge 5702 RH.
- Thermobloc de laboratoire électronique : STUART EQUIPMENT® SBH200D/3
- Vortex de marque : WHIRLIMIXER™. LABORATORY FSA SUPPLIES®.
- Micropipettes de marque PIPET4U® de différents volumes ;
- Micro-volume Vial inserts en verre de 200µl, Vials en verre 2ml ;
- Tubes en verre coniques 10 ml, Tubes en verre ronds 10 ml, Tubes 5 ml ;
- Fiole de 50 ml, Bécher, Éprouvette de 10ml.

### Préparation des solutions stocks et solutions de travail :

Une solution stock (S.S) à 1mg/ml a été préparée dans le méthanol pour la PGB. Par la suite, des solutions de travail ont été préparées à partir des solutions stocks, en solubilisant :

- 5µL de S.S qsp 5mL méthanol pour les molécules à 1µg/ml.
- 25µL de S.S qsp 5mL méthanol pour les molécules à 5µg/ml.
- 50µL de S.S qsp 5mL méthanol pour les molécules à 10µg/ml.

### Méthodes

#### OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DERIVATISATION

La technique de dérivation a été adaptée à partir de la méthode de United Chemical Technologies « Clinical and Forensic APPLICATIONS MANUAL » qui utilise un mélange d'éthyle acétate et de BSTFA 99% + TMCS 1% (11).

**Essai 1 :** Mettre 2mL de la solution de travail à 10µg/ml dans un tube conique en verre à vis de 10mL, évaporer sous faible débit d'azote à 40°C. Ajouter 60µL d'éthyle acétate et 40µL de BSTFA 99%+TMCS 1% au résidu d'évaporation, boucher (à vis), agiter puis mettre à l'étuve à 70°C pendant 30 minutes. Refroidir et injecter 1µL dans le système CG-SM.

**Essai 2 :** Il s'agit d'une modification de la technique en remplaçant l'éthyle acétate par l'acétonitrile.

Afin d'identifier la PGB, nous nous sommes basés sur les critères suivants :

- La recherche des fragments spécifiques après dérivation de la molécule par le BSTFA 99%+TMCS 1%, qui sont obtenus par fragmentation des ions moléculaires, dans la source d'ionisation avec une énergie de collision dans le cas de cette méthode de -70 électrons-volts (eV) (6)
- Le spectre de masse : en comparant le spectre de l'échantillon avec les bibliothèques disponibles dans la base de données de la CG-SM : Forensic toxicology 1\_e1, Forensic toxicology\_v2.

### CHOIX DE L'ÉTALON INTERNE

L'utilisation d'un étalon interne dans une analyse par CG-SM après extraction permet de corriger les variations instrumentales, de compenser les pertes d'échantillon, et d'améliorer ainsi la précision et la fiabilité des mesures effectuées. Dans notre cas on a choisi le N-Acétyl Paroxétine (NAP), synthétisé par acétylation de la paroxétine au niveau du laboratoire de toxicologie de l'HCA, et qui présente l'avantage de ne pas être un métabolite biologique de la paroxétine.

### OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

L'optimisation de la méthode a porté sur le programme de la température du four : température initiale, palier de température et température maximale.

Un mode d'injection en splitless à 250°C, un débit d'hélium (gaz vecteur) à 1,34 ml/mn, et un mode d'ionisation par impact électronique avec une énergie de collision de -70 eV ont été maintenus lors de tous les tests d'optimisation. Le volume injecté est de 1 µL.

L'optimisation s'est faite par injection des solutions de travail en mode SCAN et SIM. Les concentrations des solutions de travail testées sont : PGB à 5 µg/ml, NAP à 50µg/ml.

#### Programme N° 1 :

On a testé les conditions chromatographiques proposées par le fournisseur SHIMADZU pour l'analyse médico-légale par CG-SM, qui sont :

- Programme du four : 60°C (2min) → palier 10°C/ min → 320°C (7 min).
- Températures : Ligne de transfert à 240°C ; détecteur à 200°C.

- Start time : 3 minutes avec un temps d'analyse de 35 min.

#### Programme N°2 :

On a gardé les mêmes conditions sauf le palier de température qui a été modifié :

- Programme du four : 60°C (2min) → palier 20°C/ min → 320°C (7 min).
- Start time : 3 minutes avec un temps d'analyse de 22 min.

### OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION

Deux techniques d'extraction ont été testées : l'extraction en phase solide (SPE) et l'extraction liquide-liquide (ELL).

**Essai SPE :** Une extraction sous vide en phase solide SPE sur des cartouches DISCOVERY® DSC MCAX SPE 100 mg adaptée à partir d'une technique publiée par United Chemical Technologies visant la recherche urinaire par CG-SM des benzodiazépines (12).

- Traitement de l'échantillon : dans un tube mettre 2mL d'urine, ajouter 3mL de tampon phosphate 0,1 M pH 6. Agiter.
- Conditionnement des cartouches SPE : faire passer 3mL de méthanol et d'eau successivement puis 1mL d'une solution tampon phosphate 0,1 M, pH 6.
- Dépôt de l'échantillon : faire passer l'échantillon traité à une vitesse de 1ml/minute.
- Rinçage : faire passer 3mL d'ACN à 20% dans le tampon phosphate préparé, en récupérant dans un tube sec.
- Évaporation de la solution de rinçage récupérée sous faible débit d'azote à 40°C.
- Dérivation puis injection de 1µL dans le CG-SM.

**Essai ELL :** Dans l'ELL puisqu'il s'agit d'une molécule fortement hydrosoluble et qui passe difficilement en phase organique lors de son extraction par un solvant apolaire, nous avons, alors, été amenés à tester les méthodes d'extraction faisant appel à des mélanges de solvants de propriétés différentes (polaires et apolaires).

Les deux essais ont été établis selon le protocole suivant : 2mL d'urine surchargée de PGB + 10mL du mélange de solvants ; Mélanger et dégazer ; Rotation pendant 10 min ; Centrifuger pendant 20min (3000 tours/min) et récupération de l'extractum ; Ajouter l'étalon interne (NAP) puis

évaporer sous flux d'azote à 40°C ; Dérivatisation puis injection de 1µL dans le CG-SM.

ELL a été faite à pH neutre

Pour les deux techniques, nous avons gardé les mêmes conditions chromatographiques et le même protocole de dérivation.

#### ELL 1 : (Dichlorométhane /Isopropanol, 8/2, V/V)

Après, on s'est référé à la technique de Persona *et al* (2015) destinée à la détermination des benzodiazépines dans les échantillons biologiques, et on a testé un mélange de solvants de propriétés différentes (polaire et apolaire) (dichlorométhane /isopropanol, 8/2, V/V) (13). Cette méthode a été choisie étant donné que les deux molécules partagent la même propriété d'hydrosolubilité.

#### ELL 2 : (Dichlorométhane/ Acétone/ Isopropanol, 4/4/2, V/V)

Nous avons mis l'apparition du pic chromatographique correspondant à la PGB dans l'essai précédent sur le compte de l'utilisation d'un solvant polaire, l'isopropanol, ce qui nous a conduit à augmenter sa proportion dans le mélange et d'ajouter un autre solvant polaire, l'acétone, afin de vérifier son impact sur l'extraction.

#### DETERMINATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES

Après avoir optimisé toutes les étapes de la technique d'analyse de la PGB, on a appliqué cette dernière pour déterminer certaines de ses performances analytiques, à savoir : spécificité, linéarité, limite de détection/quantification et rendement d'extraction.

**SPECIFICITE :** On a testé la spécificité de la technique en injectant plusieurs échantillons d'urine provenant de différents sujets, afin de détecter d'éventuelles interférences avec les molécules endogènes. Aussi, on a appliqué cette technique sur de nombreux échantillons d'urine revenues positives pour d'autres substances psychoactives.

**LINEARITE :** La linéarité de la technique a été déterminée par l'analyse des échantillons urinaires surchargés par la PGB à des concentrations (10, 5 et 1 µg/ml) selon le protocole optimisé.

#### LIMITE DE DETECTION (LOD)/LIMITE DE QUANTIFICATION (LOQ) :

L'estimation des limites de détection et de quantification de notre technique est basée sur l'approche graphique du guide de validation des méthodes d'analyses SFSTP'1992 (14), selon laquelle ces limites sont estimées à partir du bruit de fond de l'enregistrement graphique sur un échantillon, selon les équations suivantes :

$$LOD = 3 * h_{max} * R$$

$$LOQ = 10 * h_{max} * R$$

**h<sub>max</sub> :** Hauteur maximale du bruit de fond sur une fenêtre correspondant à 10 largeurs du pic à mi-hauteur de part et d'autre du temps de rétention.

**R :** Facteur de réponse quantité/signal, exprimé en quantité matière/hauteur.

Ces estimations peuvent être validées par l'analyse des urines surchargées à des concentrations proches des limites calculées.

**RENDEMENT D'EXTRACTION :** Le rendement d'extraction est utilisé pour mesurer l'efficacité d'un processus d'extraction. Il indique la quantité ou le pourcentage de substance extraite avec succès par rapport à la quantité totale présente. Le calcul du rendement d'extraction (ρ) se fait par l'équation suivante :(15)

$$\rho(\%) =$$

$$\frac{\text{Surface du pic de la PGB après extraction d'une urine à } 5 \mu\text{g/ml}}{\text{Surface du pic de la PGB sans extraction d'une solution méthanolique à } 5 \mu\text{g/ml}} \times 100$$

#### ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'ÉLIMINATION DE LA PGB CHEZ DES SUJETS SAINS

Afin de suivre la cinétique d'élimination urinaire, une dose thérapeutique unique de 300 mg de PGB (LYRICA® en gélule) a été administrée par voie orale à des volontaires sains : une femme de 23 ans et un homme de 34 ans.

Les urines des jours suivant la prise sont collectées dans des récipients en plastique propres, et analysées selon le protocole optimisé.

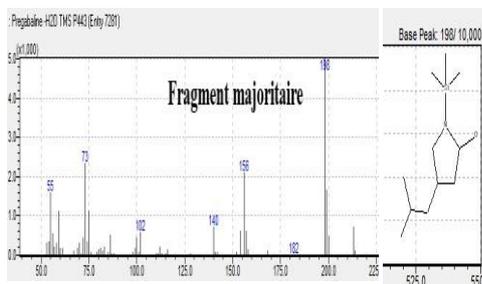
#### RESULTATS ET DISCUSSION

##### OPTIMISATION DE LA DERIVATISATION

L'utilisation de l'éthyle acétate comme solvant de dérivation du résidu d'évaporation, n'a pas permis la dérivation de la prégabaline. Les propriétés physico-chimiques de la prégabaline nous ont conduit à remplacer l'éthyle acétate par

un solvant plus polaire l'acétonitrile qui a permis la dérivation de la molécule en un dérivé Triméthylsilylé hydraté (PGB-H<sub>2</sub>O-TMS) (Fig. 1).

Figure 1 : Spectre de masse de la PGB-H<sub>2</sub>O-TMS.



Les fragments de la PGB-H<sub>2</sub>O-TMS retenus pour l'identification sont 198 (fragment majoritaire retenu, aussi, pour la quantification), 140 et 156.

### OPTIMISATION DES CONDITIONS

#### CHROMATOGRAPHIQUES

On a opté pour le premier programme four qui a donné de bons résultats, des pics chromatographiques de bonnes allures, avec temps de rétention (Tr) de 12,76min (PGB) et de 28,5 min (NAP) comme montre le chromatogramme suivant (Fig. 2).

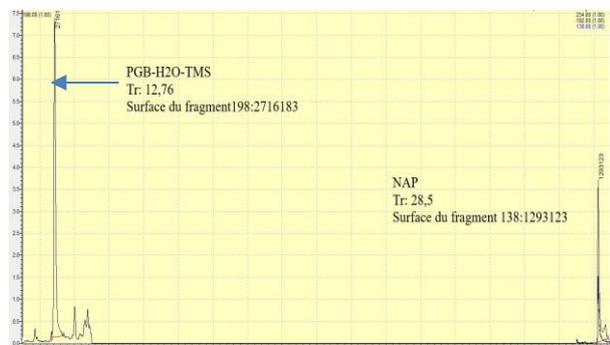


Figure 2 : Chromatogramme de la PGB-H<sub>2</sub>O-TMS et NAP.

#### OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION

Nous avons testé l'extraction en phase solide de la prégabaline sans étalon interne, qui a permis d'obtenir un chromatogramme nettement meilleur que celui de l'ELL. Le pic chromatographique obtenu était d'aspect gaussien et de grande surface. L'SPE a permis un temps d'extraction plus court avec une utilisation de faibles volumes de solvants. Avec l'SPE, l'extractum était plus propre et claire que celui de l'ELL ce qui a permis d'augmenter le volume d'échantillon et par conséquent la sensibilité de la technique.

Mais, le choix de la technique a été orientée vers celle de l'ELL, car malgré les avantages de la SPE, l'indisponibilité des cartouches nous a poussé à favoriser l'ELL qui utilise un matériel basique disponible dans le laboratoire.

Dans l'ELL qui utilise les trois solvants (*Dichlorométhane/ Acétone/ Isopropanol, 4/4/2, V/V*), l'ajout de l'acétone au mélange de solvants d'extraction a donné une nette amélioration du résultat mais avec une durée de manipulation plus longue due à l'évaporation très lente des solvants polaires. Ce qui nous a poussé à choisir le mélange de deux solvants (*Dichlorométhane /Isopropanol, 8/2, V/V*).

#### Protocole final de la technique de détermination de la PGB dans les urines

Le tableau 1 résume toutes les étapes retenues dans le protocole de détermination de la PGB dans les urines :

Tableau N°1 : Récapitulatif des résultats d'optimisation de la méthode de détermination urinaire de la PGB par CG-SM.

	Traitement de l'échantillon.
Extraction Liquide-Liquide	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2mL d'urine surchargée de PGB + 10 mL du mélange de solvant (Dichlorométhane/Isopropanol,8/2, V/V) ;</li> <li>- Mélanger + Dégazer ;</li> <li>- Rotation pendant 10 min ;</li> <li>- Centrifuger pendant 20min (3000 tours/min) et récupération de l'extractum ;</li> <li>- Ajouter l'étalon interne (NAP) puis évaporer sous flux d'azote à 40°C.</li> </ul>
Dérivatisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajouter 60 µL d'acétonitrile et 40µL de BSTFA 99%+TMCS 1% au résidu d'évaporation ;</li> <li>- Agiter puis mettre dans le thermo bloc à 70°C pendant 30 minutes.</li> </ul>
Condition	<b>Injecter 1µL dans le système CG-SM.</b>

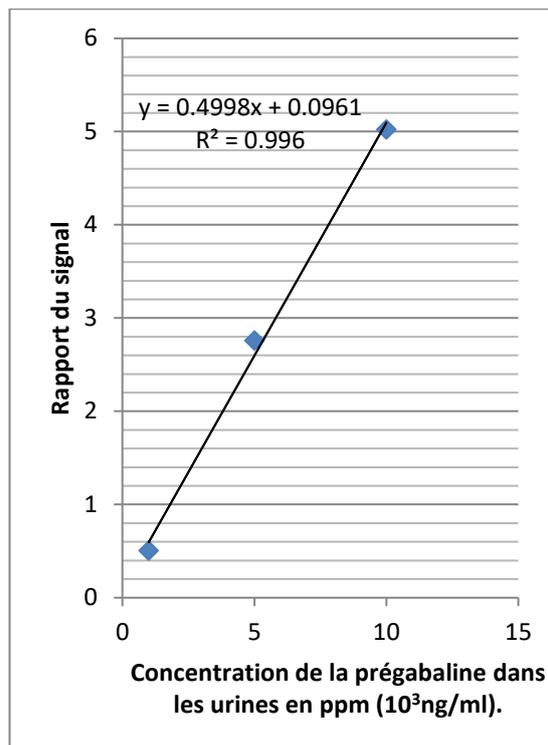
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Température de l'injecteur : 250°C splitless ;</li> <li>- Programme du four : 60°C (2min) → palier 10°C/min → 320°C (7 min) ;</li> <li>- Température de la ligne de transfert : 240°C ;</li> <li>- Gaz (hélium) : 1,34 ml / minute ;</li> <li>- Volume injecté : 1 µL ;</li> <li>- Start time : 3 minutes ;</li> <li>- Temps d'analyse : 35 minutes.</li> </ul>
<b>Détecteur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Température du détecteur : 200°C ;</li> </ul> <p>Spectromètre de masse de type quadripôle ; Ionisation par impact électronique ; Les données sont analysées en mode SIM avec les fragments : <b>198, 140 et 156.</b></p>

En appliquant ce protocole, on a déterminé les performances analytiques de la technique.

**DETERMINATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES**

**SPECIFICITE :** On n'a pas eu de pic au Tr de la PGB, confirmant ainsi l'absence d'interférence avec les molécules endogènes ou les substances psychoactives testées.

**LINEARITE :** La technique montre une bonne linéarité avec un coefficient de corrélation R<sup>2</sup>=0,996 (Fig. 3).



**Figure 3 :** Courbe présentant l'intensité du signal en fonction des concentrations de la PGB dans les urines.

**ESTIMATION DES LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION :** Le tableau 2 montre les limites de détection et de quantification estimées par approche graphique selon le guide de validation des méthodes d'analyses SFSTP1992, après analyse d'une urine surchargée à 1000 ng/ml de PGB.

**Tableau 2 :** Estimation de la LOD/LOQ de la technique par approche graphique après ELL optimisée.

Concentration de PGB (ng/ml)	Signal en hauteur du 1000 ng/ml (nm)	R	h <sub>max</sub> (nm)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1 000	94694	0,0105	11 557	<b>366,1</b>	<b>1222,4</b>

La valeur 1222,4ng/ml de LOQ fait partie de la gamme d'étalonnage et elle est supérieure au premier point de la courbe (1ppm), cela est justifié par le manque de précision de l'approche graphique. La LOD calculée est inférieure au seuil de positivité exigé pour les techniques immunochimiques (500ng/ml) ce qui montre que notre technique peut être une alternative de choix pour le dépistage urinaire direct de la PGB ou pour la confirmation des tests immunochimiques revenus positifs pour la PGB.

**RENDEMENT D'EXTRACTION :** Après le calcul du rendement d'extraction, on a obtenu un rendement satisfaisant de 32 % et qui a permis

d'atteindre des LOD/LOQ acceptables.

$$\rho (\%) = \frac{1\,959\,161}{6168200} * 100 = 32 \%$$

Ce rendement assure un bon signal car la PGB, à cause de sa grande hydrophilie, est éliminée à 98% dans les urines, donc sa concentration dans ce milieu sera élevée et un rendement d'extraction de 32% est largement suffisant pour permettre une identification de la molécule.

**COMPARAISON AVEC D'AUTRES TECHNIQUES CG-SM**

La comparaison avec d'autres techniques CG-SM de la littérature montre que les LOD et LOQ obtenues par notre technique sont nettement supérieures, conséquence de la microextraction en phase utilisée par les autres techniques qui permet d'obtenir de meilleurs résultats avec des rendements d'extraction plus importants (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Comparaison avec d'autres technique CG-SM.

Aut eur	Condi tions chrom atogra phiques	Extract ion	Dériba-tisation	Perfor mance s analyti ques	Réfé-renc e
Mud iam et al 201 2	Colonne capillaire Elite 5MS 60m 0.25µm d'épaisseur. Impact électronique.	Microex traction en phase solide. Trichlor éthylène (TCF) comme solvant	Chloroforme d'éthyle (ECF)	LOD: 0,02µg /ml LOQ: 0,06µg /ml ρ : 83 à 98%	(16)
Mud iam et al 201 2	Colonne capillaire Elite 5MS 60m 0.25µm d'épaisseur. Impact électronique.	Microex traction liquide dispersive. Trichlor éthylène (TCF) comme solvant.	Chloroforme d'éthyle (ECF).	LOD: 0,02µg /ml LOQ: 0,07µg /ml ρ : 84 à 98%	(16)
P.M oham madi et al 202 0	Colonne capillaire Agilent HP 5MS 30m*0. 25mm* 0.25µm Impact électronique.	Microex traction dispersive en phase solide assisté par un solvant Méthanol agent dispersant du sorbant Sorbant :	/	LOD: 0,11ng /ml LOQ: 0,4ng/ml ρ : 93,1 à 102,2 %	(17)

		FeO@Si O <sub>3422</sub> magnétique.			
Kale kin et al 2020	Colonne capillaire Agilent HP-5MS 30m*0. 25mm* 0.25µm Impact électronique	Extraction liquide-liquide Solvants : Chlorure de sodium et l'isobutanol	Agent de dérivation : Iodure d'ammonium MSTFA et éthylmercaptan en ajoutant l'acétonitrile comme solvant. Température :80° C pendant 30 min	/	(18)
<b>Notre technique 2023</b>	Colonne capillaire RESTEK® RX1-5SIL MS, 30 mètres * 0.25 mm id, 0.25 µm df. Impact électronique.	Extraction liquide-liquide Solvants : dichlorométhane et isopropanol.	60 µL d'acétonitrile et 40µL de BSTFA 99%+TMCS 1%. Température 70°C pendant 30min	LOD: 0,36µg /ml LOQ: 1,22µg /ml ρ : 32%	/

**ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'ÉLIMINATION URINAIRE DE LA PGB**

Dans l'étude de la cinétique chez les deux volontaires sains, la PGB était détectable jusqu'au cinquième jour. D'après Spigset O et al (2013), il semble très peu probable qu'un échantillon soit positif après 5 à 6 jours de la prise de la prégabaline chez les sujets dont la fonction rénale est normale, ce qui concorde avec les résultats issus de notre travail (19). La courbe de la femme a montré que la PGB est restée positive jusqu'au 5ème jour tandis que l'homme, les prélèvements ont été arrêtés au 3ème jour pour des contraintes personnelles (Fig. 4 et 5).

En ce qui concerne la courbe représentant la surface des pics en fonction des heures des prélèvements du premier volontaire sain, on remarque une partie ascendante qui représente la phase d'absorption, ceci peut être expliqué par les prélèvements urinaires qui ont été faits dans les premières heures après la prise.

Pour le deuxième volontaire, on remarque une partie ascendante qui reflète la phase d'élimination. On milieu de la courbe on trouve une

légère augmentation de la concentration urinaire, ceci est relié à l'état d'hydratation de l'organisme, moins le corps est hydraté plus l'urine est concentrée.

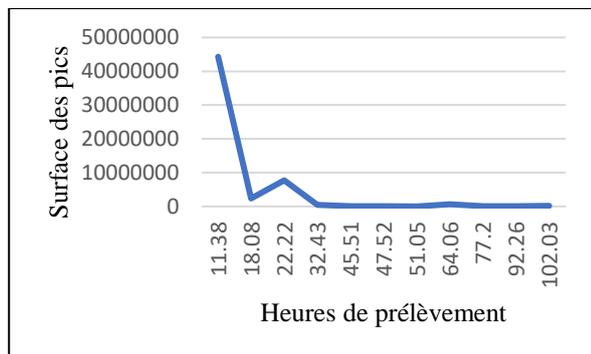


Figure 4 : Cinétique de la PGB chez une femme (23 ans) après une prise thérapeutique de 300 mg.

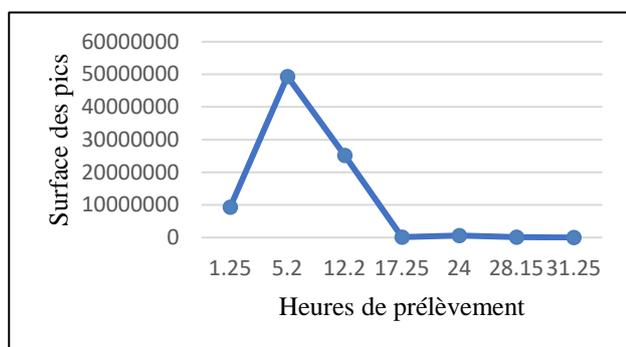


Figure 5 : Cinétique de la PGB chez un homme (34 ans) après une prise thérapeutique de 300 mg.

## CONCLUSION

En Algérie, la consommation croissante de la PGB par les sujets cherchant un sentiment d'euphorie, continue à préoccuper les autorités nationales. Pour cela, la PGB doit être recherchée systématiquement lors du dépistage urinaire des substances psychoactives.

L'objectif de notre travail était de mettre au point une technique de détermination urinaire de la prégabaline par CG-SM. La technique optimisée utilise une extraction liquide-liquide par un mélange de solvants polaire et apolaire suivie d'une silylation par BSTFA-TMCS et une détection après ionisation par impact électronique. La technique montre une bonne linéarité, de bonnes limites de détection et de quantification avec un rendement d'extraction satisfaisant. Notre technique peut être appliquée pour le dépistage urinaire direct de la PGB ou pour confirmer les résultats revenus positifs des tests immunochimiques.

Bien que la technique soit assez sensible et spécifique pour la recherche et l'identification de la PGB, une validation dans un but de quantification est nécessaire.

## Références

1. [https://onlcdt.mjustice.dz/onlcdt\\_fr/donnees\\_statistiques/bilan\[2023\].pdf](https://onlcdt.mjustice.dz/onlcdt_fr/donnees_statistiques/bilan[2023].pdf).

2. Journal Officiel, 2021. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 61.

3. Rodríguez J, Castañeda G, Muñoz L. Direct determination of pregabalin in human urine by nonaqueous CE-TOF-MS: CE and CEC. ELECTROPHORESIS [Internet]. mai 2013 [cité 4 oct 2022];34(9-10):1429-36. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201200564>

4. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971> (accessed 9.22.22).

5. EMA EMA. European Medicines Agency. 2018 [cité 22 sept 2022]. Pregabalin Mylan. Disponible sur : <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pregabalin-mylan>

6. Qriouet Z, Qmichou Z, Bouchoutrouch N, Mahi H, Cherrah Y, Sefrioui H. Analytical Methods Used for the Detection and Quantification of Benzodiazepines. J Anal Methods Chem. 5 sept 2019;2019:1-11.

7. Dahl SR, Olsen KM, Strand DH. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butanediol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. J Chromatogr B. févr 2012;885-886:37-42.

8. Heltsley R, DePriest A, Black DL, Robert T, Caplan YH, Cone EJ. Urine Drug Testing of Chronic Pain Patients. IV. Prevalence of Gabapentin and Pregabalin. J Anal Toxicol. 1 juill 2011;35(6):357-9.

9. Naguib IA, Ali NA, Elroby FA, Elghobashy MR. Green HPLC-DAD and HPTLC Methods for Quantitative Determination of Binary Mixture of Pregabalin and Amitriptyline Used for Neuropathic Pain Management. J Chromatogr Sci. 20 mai 2021;59(6):536-47.

10. Zergui A, Chefirat B, Bendjamaa A, Benabdelouahab S, Rezk-kallah H. Qualitative determination of pregabalin in urine by spectrophotometric method. Toxicol Anal Clin. mai 2023;S2352007823001051.

11. Telepchak, M.J., August, T.F., Chaney, G., 2004. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction. Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-292-0>.

12. Telepchak MJ, August TF, Chaney G. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2004 [cité 9

juill 2023]. Disponible sur:  
<http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-292-0>

13. Persona K, Madej K, Knihnicki P, Piekoszewski W. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* sept 2015;113:239-64.

14. LOD LOQ.pdf.

15. Abe E, Delye SG, Alvarez JC. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. *Ann Toxicol Anal.* 2010;22(2):51-9.

16. Mudiam MKR, Chauhan A, Jain R, Ch R, Fatima G, Malhotra E, et al. Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J Pharm Biomed Anal.* nov 2012;70:310-9.

17. Mohammadi P, Masrournia M, Es'haghi Z, Pordel M. Determination of four antiepileptic drugs with solvent assisted dispersive solid phase microextraction - Gas chromatography-mass spectrometry in human urine samples. *Microchem J.* déc 2020;159:105542.

18. Kalekin RA, Saltykova OV, Rodionova GM, Gegechkori VI, Orlova AM. On the issue of the detection of pregabalin and lorazepam in the cases of their joint presence for the purpose of chemical toxicological studies. *Sud-Meditsinskaya Ekspertiza.* 2020;63(1):36.

19. Spigset O, Westin AA. Detection Times of Pregabalin in Urine After Illicit Use: When Should a Positive Specimen Be Considered a New Intake? *Ther Drug Monit.* 2013;35(1).