



Université  
de Liège

**Université de Liège**  
**FACULTE DE MEDECINE**



Département de Biologie clinique

Service de Toxicologie Clinique et Médico-légale,  
de l'Environnement et en Entreprise

Professeur Corinne CHARLIER

**INTERET CLINIQUE ET ECONOMIQUE DU SUIVI  
THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE POUR DES  
MEDICAMENTS HABITUELLEMENT NON CONTROLES**

Raphaël DENOZ

Pharmacien Biologiste

Thèse déposée en vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2009-2010

## Remerciements

---

*Je tiens ici à saluer et remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail de thèse de doctorat en me prodiguant conseils et soutien, et bien plus encore.*

*Je tiens en premier lieu à remercier vivement le Professeur Corinne Charlier pour m'avoir donné l'opportunité de concrétiser mon intérêt pour la Toxicologie par ce travail de doctorat. La confiance qu'elle m'a accordée dès le début de mon assistantat en biologie clinique, depuis bientôt 10 ans, m'a permis de rapidement m'épanouir dans le Service de Toxicologie. En m'accordant la responsabilité du Laboratoire de Toxicologie Clinique et de Toxicologie Médico-légale, elle m'a permis d'approfondir différents domaines de cette discipline, dont celui du suivi thérapeutique pharmacologique. Je tiens à lui exprimer par ces quelques mots ma sincère reconnaissance, pour son soutien, ses encouragements, sa grande disponibilité, ses précieux conseils. Je lui suis également très reconnaissant de m'avoir dégagé de quelques responsabilités professionnelles pour me permettre de finaliser le travail de rédaction.*

*Pour le temps qu'il a consacré afin de corriger les erreurs, les omissions ou approfondir l'explication de certaines parties, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Guy Plomteux. Les très nombreuses discussions que nous avons pu avoir m'ont permis de progresser et de mieux appréhender certaines difficultés. Son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit doit être soulignée et je ne peux que l'en remercier.*

*Je tiens à remercier également les Professeurs L. Angenot, J. Crommen, Ph. Hubert, M. Meurisse et A. Scheen pour avoir accepté de constituer mon jury de thèse. Leurs conseils et encouragements lors de mes différents comités de thèse m'ont permis d'évoluer avec confiance dans mon travail de doctorant. Enfin, les professeurs M. Lhermitte et P. Wallemacq, qui constituent les lecteurs extérieurs de ce travail, trouveront également dans ces quelques lignes l'expression de ma reconnaissance.*

*Je profite de ces quelques remerciements pour exprimer toute ma reconnaissance au Professeur G. Lachâtre, ainsi qu'à toute son équipe, et particulièrement à Magali Merceroles, avec qui j'ai eu l'occasion de partager les joies, interrogations et doutes du doctorant. L'amitié qui lie les limougeauds aux liégeois n'est pas un vain mot !*

*Je désire remercier Frédéric Frippiat pour sa collaboration chaleureuse et souhaite poursuivre nos travaux entamés dans le domaine de l'infectiologie.*

*Un remerciement particulier pour la plus que précieuse assistance éditoriale de Bernadette Cornet, ainsi que pour son grand soutien et ses encouragements lors des moments plus difficiles.*

*Je tiens également à remercier pour son aide Nathalie Dubois, sans pouvoir cependant en préciser réellement l'impact sur ce travail, tant Nathalie joue un rôle important dans les développements analytiques de notre laboratoire. Il est vrai que nos constantes discussions, tant en accord qu'en désaccord, nous permettent très certainement de progresser dans ce merveilleux et complexe domaine qu'est la Toxicologie. Je tiens à l'assurer que je suis bien conscient que mon travail de rédaction a certainement engendré pour elle un surplus de travail, et je ne l'oublierai pas lorsque son tour viendra!*

*Je tiens bien évidemment à remercier le personnel du Service de Toxicologie, avec une attention particulière pour ceux et celles qui ont pu m'aider de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Je préfère ne citer aucun nom afin de n'oublier personne, mais saurai vous remercier autrement...*

*Bien que je suis parti du nid depuis bien longtemps déjà, je ne peux finaliser ces remerciements sans penser à mes parents, qui depuis toujours ont été là pour me soutenir et m'encourager dans mes études, mais bien plus encore. Et je m'en voudrais d'oublier mon frère et sa « petite » famille, ainsi qu'Annie et mes beaux-parents.*

*La réalisation de travaux scientifiques, et plus encore d'une thèse de doctorat, peut à certains moments être excitante, et à d'autres, déprimante! La chance dans ces moments de pouvoir compter sur le soutien de son conjoint est primordiale et à mes yeux indispensable. Pour tout cela, et ce qui ne peut s'écrire, je te remercie Sandrine. Notre petite Emy, sans le savoir, a été également une source de motivation incommensurable.*

## Table des matières

---

<b>I.</b>	<b>PREAMBULES</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1.</b>	<b>Le suivi thérapeutique pharmacologique</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2.</b>	<b>Le suivi thérapeutique pharmacologique dont l'objectif est d'atteindre une efficacité pharmacologique optimale</b> .....	<b>5</b>
I.2.1.	Les antivitamines K.....	5
I.2.2.	La méthadone .....	8
<b>I.3.</b>	<b>Le suivi thérapeutique pharmacologique dont l'objectif est d'éviter la toxicité des traitements</b> .....	<b>12</b>
I.3.1.	Le bupropion .....	12
I.3.2.	Le GHB.....	14
I.3.3.	Les sulfamidés hypoglycémiants .....	17
<b>I.4.</b>	<b>Le suivi thérapeutique pharmacologique dont l'objectif est de réduire les coûts des traitements</b> .....	<b>21</b>
<b>II.</b>	<b>BUT DU TRAVAIL</b> .....	<b>27</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>29</b>
<b>III.1.</b>	<b>Les antivitamines K</b> .....	<b>31</b>
<b>III.2.</b>	<b>La méthadone</b> .....	<b>32</b>
III.2.1.	Analyse de la méthadone et de son principal métabolite, l'EDDP, par HPLC-DAD.....	32
III.2.2.	Analyse de la méthadone et de son principal métabolite, l'EDDP, par GC-MS .....	33

<b>III.3. Le bupropion</b> .....	<b>34</b>
<b>III.4. Le GHB</b> .....	<b>35</b>
<b>III.5. Les sulfamidés hypoglycémiants</b> .....	<b>36</b>
<b>III.6. Les <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	<b>37</b>
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>39</b>
<b>IV.1. Les antivitamines K</b> .....	<b>40</b>
<b>IV.2. La méthadone</b> .....	<b>47</b>
<b>IV.3. Le bupropion</b> .....	<b>55</b>
<b>IV.4. Le gamma-hydroxybutyrate (GHB)</b> .....	<b>70</b>
<b>IV.5. Les sulfamidés hypoglycémiants</b> .....	<b>81</b>
<b>IV.6. Les <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	<b>88</b>
<b>V. DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>106</b>
<b>V.1. Les antivitamines K</b> .....	<b>107</b>
<b>V.2. La méthadone</b> .....	<b>110</b>
<b>V.3. Le bupropion</b> .....	<b>112</b>
<b>V.4. Le GHB</b> .....	<b>113</b>
<b>V.5. Les sulfamidés hypoglycémiants</b> .....	<b>115</b>
<b>V.6. Les <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	<b>117</b>
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>119</b>

# **I. PREAMBULES**

- I.1. Le suivi thérapeutique pharmacologique**
- I.2. Le suivi thérapeutique pharmacologique  
dont l'objectif est d'atteindre une efficacité pharmacologique optimale**
- I.3. Le suivi thérapeutique pharmacologique  
dont l'objectif est d'éviter la toxicité des traitements**
- I.4. Le suivi thérapeutique pharmacologique  
dont l'objectif est de réduire les coûts des traitements**

## **I.1. Le suivi thérapeutique pharmacologique**

On sait depuis longtemps qu'une même dose de médicament administrée à différents patients peut provoquer des effets pharmacologiques de nature et d'intensité très variables. Cette réponse inconstante peut dans certains cas entraîner une inefficacité thérapeutique et dans d'autres être responsable de manifestations indésirables.

Ces manifestations indésirables ou cette inefficacité pharmacologique sont très souvent la conséquence d'une variabilité de la pharmacocinétique des médicaments – absorption, distribution, métabolisation et élimination – entraînant une modification de leur biodisponibilité. Il en résulte alors, chez certains patients, des différences significatives dans la quantité de médicaments se retrouvant au niveau des tissus cibles avec pour conséquence des effets pharmacologiques modifiés. La base du suivi thérapeutique pharmacologique repose sur le fait que l'on considère que la concentration du médicament dans le sang périphérique est en bonne corrélation avec la concentration au niveau des cibles cellulaires.

Dès lors, une des activités importantes d'un laboratoire de Toxicologie clinique concerne le suivi thérapeutique pharmacologique, c'est-à-dire la mesure *ex vivo* de la concentration sanguine des médicaments. Ce paramètre, correctement interprété, constitue un outil indispensable à l'adaptation la plus optimale de la thérapie [1].

Sur l'ensemble des médicaments présents dans la pharmacopée, seulement une petite quarantaine font aujourd'hui l'objet d'un suivi thérapeutique pharmacologique régulier :

- les **antiépileptiques** (acide valproïque, phénytoïne, carbamazépine, phénobarbital, lamotrigine, topiramate, vigabatrine...).

Ces médicaments qui sont utilisés pour éviter la survenue des crises convulsives chez le malade épileptique présentent parfois une toxicité importante difficile à déceler cliniquement, ce qui explique que, depuis plusieurs années, on réalise le suivi thérapeutique pharmacologique des antiépileptiques ;

- les **antibiotiques** (amikacine, gentamicine, vancomycine, teicoplanine,...).

Le suivi thérapeutique pharmacologique des antibiotiques a longtemps été limité aux aminoglycosides et aux glycopeptides dont la néphrotoxicité est redoutée ;

- les **antirétroviraux** (saquinavir, ritonavir, didanosine, lamivudine, ...).

Le suivi thérapeutique pharmacologique fait partie des moyens dont on dispose pour rendre le plus optimal possible le traitement d'une pathologie restant encore aujourd'hui incurable ;

- les **antifongiques** (amphotéricine B, itraconazole, voriconazole, posaconazole,...).  
Même si l'index thérapeutique de ces médicaments est relativement large, leur suivi thérapeutique pharmacologique est intéressant puisqu'il permet de réduire le développement de résistances et aussi de diminuer le coût et la durée des traitements ;
- les **immunosuppresseurs** (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus, évérolimus, acide mycophénolique, ...) ;
- les **médicaments du système cardiovasculaire** (digoxine, amiodarone, disopyramide, propafénone, flécaïnide,...) ;
- les **psychotropes** (amitriptyline, imipramine, clomipramine, désipramine, clozapine, lithium, midazolam,...) ;
- d'autres médicaments comme la **théophylline**, le **méthotrexate**, le **5-fluorouracil**.

Ainsi, selon les cas, le suivi thérapeutique pharmacologique a pour objectif de :

1. permettre une adaptation posologique adéquate conduisant à une efficacité pharmacologique optimale

Dans ce groupe, on trouve les médicaments pour lesquels il existe une importante variation interindividuelle de la biodisponibilité, qui peut être responsable dans certains cas d'une inefficacité thérapeutique. Les interactions médicamenteuses, dont les plus significatives affectent souvent le métabolisme, peuvent en effet entraîner des variations importantes de la concentration des médicaments dans le sang et au niveau de leur cible cellulaire, et en conséquence, conduire à une efficacité pharmacologique variable, parfois insuffisante. Le suivi thérapeutique pharmacologique est un outil indispensable pour objectiver ces variations et corriger éventuellement la posologie afin d'atteindre un effet pharmacologique optimal ;

2. prévenir les manifestations indésirables apparaissant au cours de certains traitements

A l'origine, début des années septante, le suivi thérapeutique pharmacologique avait pour principale raison la prévention de la toxicité des médicaments, parmi lesquels on trouvait les aminosides, les glycopeptides, mais également la digoxine. Cet objectif du suivi thérapeutique pharmacologique reste une priorité et le nombre de médicaments dont on contrôle la pharmacocinétique pour en prévenir la toxicité est de plus en plus vaste ;



### 3. permettre une réduction du coût des traitements

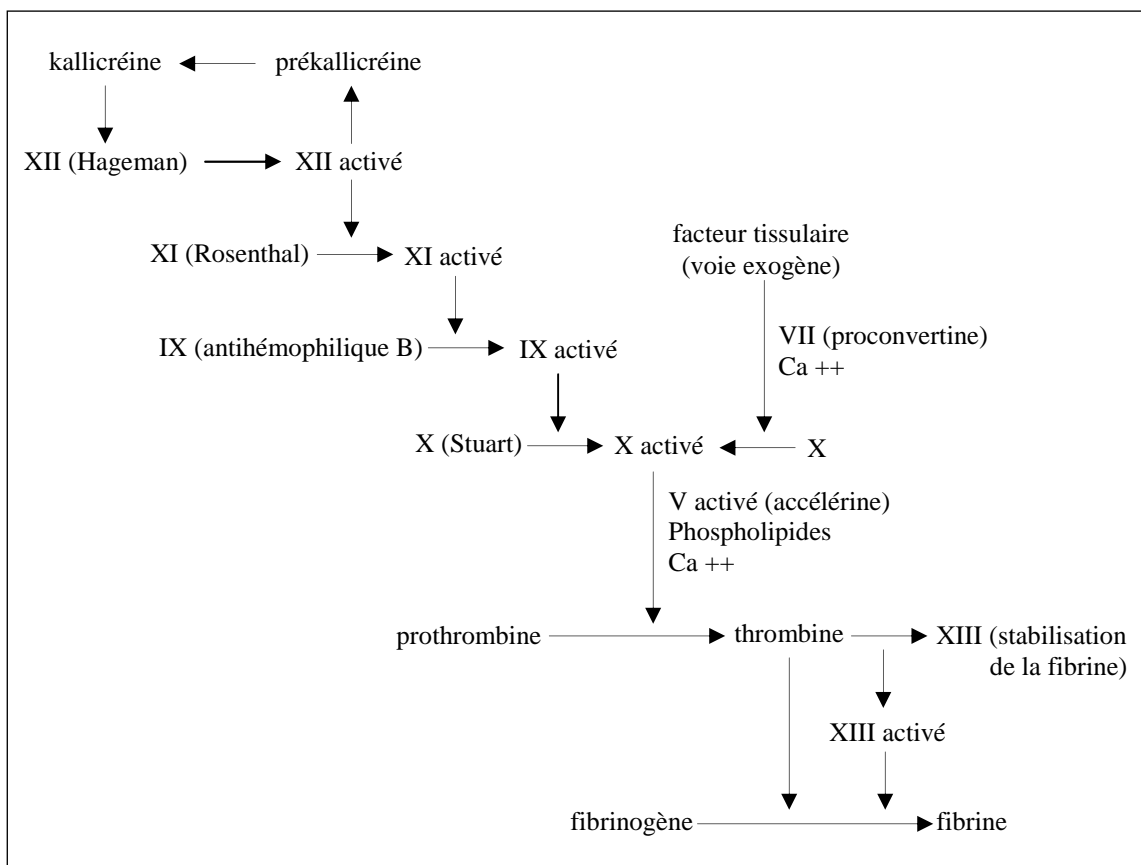
Les soins de santé sont de plus en plus coûteux, mais le budget qui leur est consacré n'est pas extensible indéfiniment. Depuis de nombreuses années, les restrictions budgétaires se multiplient. Il est dès lors tout à fait légitime que toute initiative permettant de réduire les dépenses soit bien reçue et notamment le suivi thérapeutique pharmacologique.

Dans la mesure où le nombre de médicaments bénéficiant d'un suivi thérapeutique pharmacologique régulier était relativement restreint, on peut facilement comprendre l'intérêt d'en étendre la pratique à des classes pharmacologiques jusque là rarement concernées. On peut citer les **antivitamines K**, la **méthadone**, le **bupropion**, le **GHB**, les **sulfamidés hypoglycémifiants** et les  **$\beta$ -lactamines**, pour lesquels le suivi thérapeutique pharmacologique permettra selon les cas d'atteindre une efficacité pharmacologique optimale, de prévenir les manifestations indésirables ou de réduire le coût du traitement.

## I.2. Le suivi thérapeutique pharmacologique dont l'objectif est d'atteindre une efficacité pharmacologique optimale

### I.2.1. Les antivitamines K

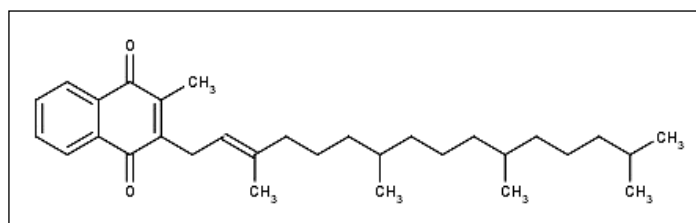
La vitamine K, sous forme réduite, agit comme cofacteur nécessaire à la carboxylation post-transcriptionnelle de résidus glutamates de certaines protéines, parmi lesquelles on retrouve les facteurs de coagulation II, VII, IX et X (glycoprotéines possédant un résidu d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique). Au cours de cette carboxylation, la vitamine K est oxydée. Elle sera à nouveau réduite au moyen de deux enzymes, l'époxyde réductase et la NADPH-quinone réductase, pour pouvoir à nouveau intervenir dans le processus de carboxylation [2]. La vitamine K joue donc un rôle prépondérant dans le processus de coagulation (*Figure 1*).



*Figure 1 : Description du mécanisme de la coagulation*

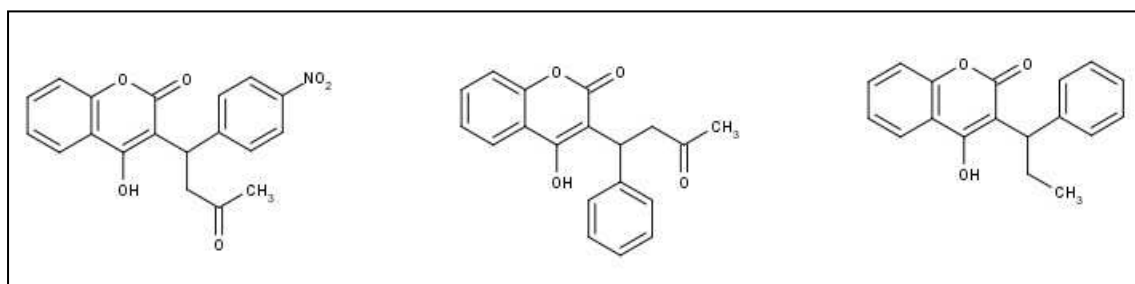
La vitamine K existe sous deux formes naturelles : la vitamine K1 (phytonadione), qui se retrouve dans l'alimentation (feuilles de légumes, huiles végétales et foie), et la vitamine K2

(ménaquinone), qui est synthétisée par la flore intestinale (**Figure 2**) [3]. Une alimentation variée permet d'éviter les carences. Toutefois des déficits peuvent apparaître en cas de malabsorption intestinale ou au cours de traitements antibactériens de longue durée. Les nouveaux-nés, spécialement les prématurés, constituent également une population à risque de déficit en vitamine K en raison de la faible concentration de cette vitamine dans le lait maternel. Les principales indications thérapeutiques de la vitamine K (Konakion®) concernent la prévention et le traitement des carences, spécialement chez les nouveaux-nés, ainsi que la prise en charge du traitement des surdosages ou des intoxications aux antivitamines K [4; 5].



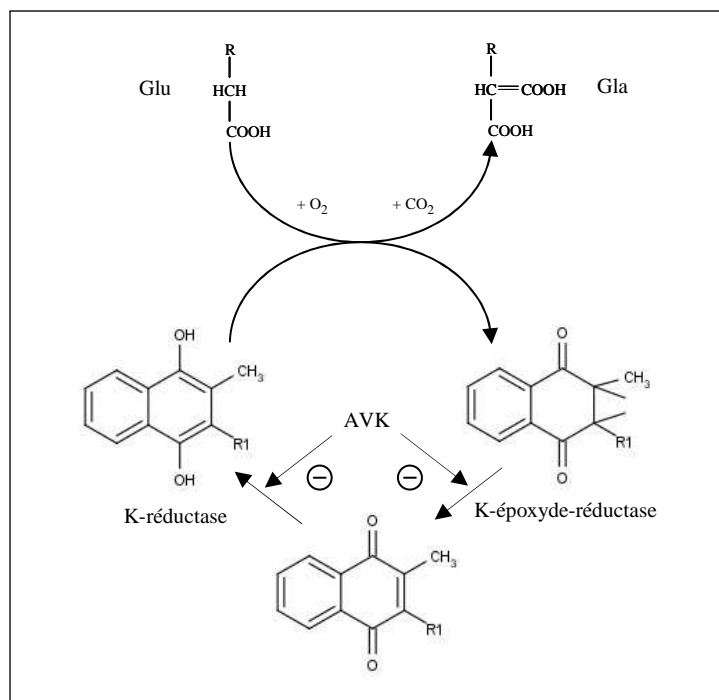
*Figure 2 : Structure chimique de la vitamine K1*

La découverte fortuite des antivitamines K remonte aux années 1920 où on observa la mort d'un grand nombre de bovins par hémorragies cataclysmiques après avoir absorbé de la luzerne contaminée par des moisissures contenant de grandes quantités de substances à activité antivitamine K [6]. Ces produits à activité antivitamine K, d'abord utilisés comme raticides, ont été proposés dans les années 1950 comme agents antithrombotiques, spécialement dans la prophylaxie primaire et secondaire des maladies emboliques, la prévention des accidents vasculaires cérébraux et les récurrences d'infarctus myocardique [7; 8]. Dans le groupe des dérivés de l'hydroxycoumarine, la warfarine est la plus utilisée aux Etats-Unis et Outre-Manche, alors que l'acénocoumarol et la phenprocoumone sont plus souvent prescrits en Europe (**Figure 3**).



*Figure 3 : Structures chimiques de l'acénocoumarol, de la warfarine et de la phenprocoumone*

L'activité pharmacologique de ces produits résulte d'une inhibition de synthèse des facteurs de coagulation vitamine K dépendants (**Figure 4**). En effet, seuls les facteurs de coagulation préalablement  $\gamma$ -carboxylés par l'intermédiaire de la vitamine K, peuvent, en présence d'ions calcium, subir un changement de leur conformation responsable de l'activation du facteur et de son activité biologique. Ces anticoagulants oraux inhibent l'époxyde réductase et la NADPH-quinone réductase, entraînant une déplétion de la forme réduite de la vitamine K, secondairement une diminution de la  $\gamma$ -carboxylation et un blocage indirect de la fonction des facteurs de coagulation [2]. Ainsi, ces anticoagulants oraux n'inhibent pas directement les facteurs de coagulation mais conduisent à la disparition des facteurs  $\gamma$ -carboxylés, ce qui explique le délai de deux à cinq jours nécessaire pour voir apparaître l'effet antithrombotique. Parmi les facteurs de coagulation, la prothrombine présente la plus longue demi-vie plasmatique, de l'ordre de 60 heures, ce qui explique la nécessité de faire coïncider au moins pendant cinq jours le traitement héparinique, directement antithrombotique, et le traitement par anticoagulant oral. La nature et la quantité des différentes coumarines n'influencent que très peu ce temps de latence, mais bien la durée et l'importance de l'action anticoagulante. La réversibilité de l'effet anticoagulant dépend du temps de demi-vie d'élimination des produits et de la rapidité avec laquelle de nouveaux facteurs vitamine K dépendants sont synthétisés *de novo*. Les antivitamines K exercent également un léger effet pro-coagulant, en inhibant la synthèse, vitamine K dépendante également, des facteurs de la contre régulation, à savoir les protéines C et S [9].



**Figure 4 : Mécanisme d'action des médicaments à activité antivitamine K**

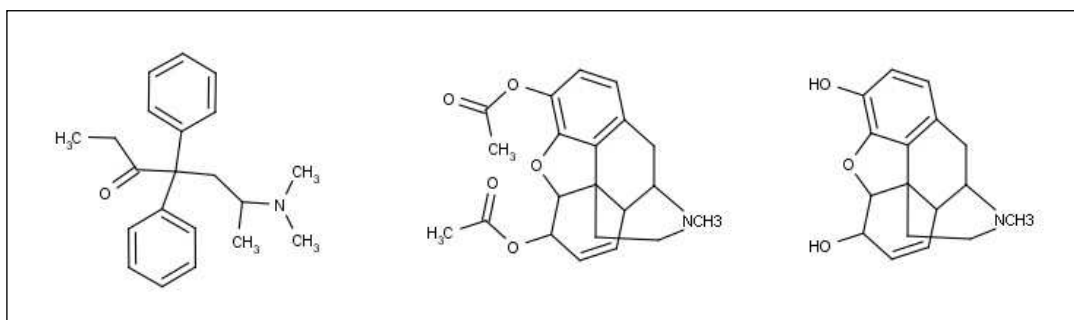
La manipulation de la warfarine, de l'acénocoumarol et de la phenprocoumone, médicaments à faible index thérapeutique, reste très délicate avec le risque de voir apparaître de graves hémorragies pouvant être mortelles. Ces trois médicaments sont caractérisés par une bonne biodisponibilité orale. Leur fort degré de liaison aux protéines plasmatiques (97 à 99 %) et leur métabolisme hépatique intensif par le cytochrome P450 2C9 justifient un important risque d'interactions médicamenteuses, notamment avec les fibrates, les sulfonylurées, la cimétidine, le phénobarbital, la carbamazépine, l'amiodarone. Le statut génétique, modulant l'expression du cytochrome P450 2C9, peut également être un facteur d'influence [10].

Le suivi thérapeutique pharmacologique des antivitamines K est apprécié par la mesure de l'INR ou International Normalized Ratio. Ce paramètre calcule le rapport des temps de prothrombine du patient traité et d'un sujet témoin, normalisé au moyen d'un indice permettant de limiter les variations liées à l'activité des réactifs employés. Le risque d'hémorragie augmente de manière significative lorsque l'INR est supérieur à 3 [11].

## **I.2.2. La méthadone**

La méthadone, opioïde dérivé d'une structure diphénylpropylamine, est un agoniste puissant des récepteurs  $\mu$  [12]. Ces récepteurs aux opiacés, largement distribués dans le système nerveux central, modulent principalement l'action nociceptive, mais également l'humeur, les réponses au stress et le centre respiratoire bulbaire. Les effets pharmacologiques de la méthadone reproduisent partiellement ceux des encéphalines et des  $\beta$  endorphines, opioïdes peptidiques endogènes jouant le rôle d'antidouleurs naturels et de neurotransmetteurs du bien-être [13].

La méthadone fait partie de l'arsenal thérapeutique depuis le milieu des années quarante. Synthétisée à partir de la péthidine dans un laboratoire allemand en 1938 dans le but de remplacer la morphine, elle fut employée pour la première fois durant la seconde guerre mondiale comme analgésique [14]. Dès 1965, elle fut également reconnue efficace dans le traitement des dépendances à l'héroïne. Depuis lors, les deux principales indications de sa prescription restent inchangées, faisant de la méthadone un analgésique puissant utilisé pour le traitement des douleurs chroniques, mais également un agent mondialement utilisé dans la prise en charge des addictions aux opiacés (*Figure 5*) [15].



*Figure 5 : Structure chimique de la méthadone, de l'héroïne et de la morphine*

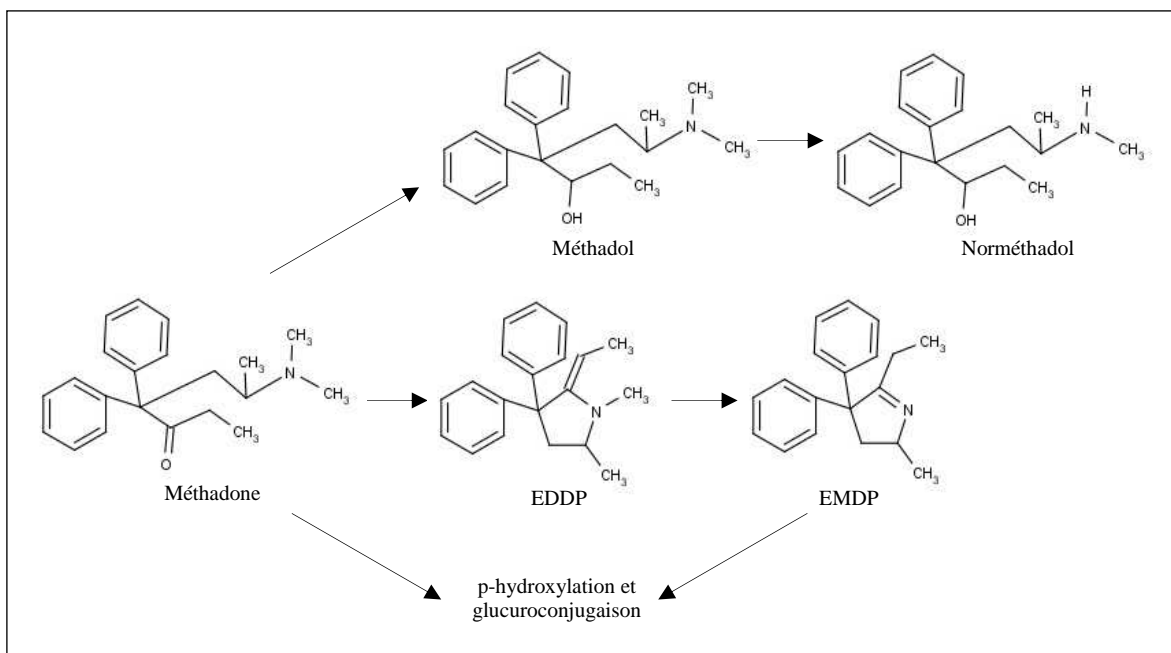
En effet, les multiples problèmes générés par la consommation accrue d'héroïne aux Etats-Unis début des années soixante sont à l'origine de l'utilisation de la méthadone comme thérapie substitutive. Cette indication pour la méthadone est attribuée aux travaux de deux chercheurs américains, Dole et Nyswander [16; 17]. Ceux-ci furent les premiers à considérer l'héroïnomanie comme une pathologie responsable d'une déficience métabolique permanente du système nerveux central. Ce déséquilibre neurologique explique la nécessité d'une administration régulière d'opiacés pour contrebalancer les effets rapides du manque d'héroïne, caractérisé principalement par des crises de douleurs associées à un malaise physique, des sueurs profuses, de l'insomnie, de l'agitation et des angoisses. L'hypothèse retenue par Dole et son collaborateur consistait à administrer aux patients héroïnomanes de la méthadone, soit un opiacé à longue durée d'action, pour retarder l'apparition des symptômes liés au manque. Leurs travaux démontrèrent que la méthadone retardait l'apparition de ces symptômes d'au moins 24 heures, permettant une thérapie d'une seule prise par jour. La méthadone présentait de plus l'avantage de bloquer les effets euphoriques liés à la prise d'héroïne, décourageant l'usage et le désir de consommation du produit illicite [18; 19]. Plus de quarante-cinq ans après cette découverte, la méthadone occupe toujours la première place des thérapies de substitution aux opiacés [20].

Cette thérapie substitutive permet également de diminuer de manière significative le risque de décès dans la population héroïnomane, et dans certains cas, de réinsérer socialement le sujet consommateur.

Malheureusement, le traitement présente l'inconvénient majeur d'induire chez l'individu une autre dépendance, cette fois à la méthadone elle-même. Très souvent, le traitement substitutif doit ainsi être poursuivi pendant plusieurs années, parfois même durant toute la vie, au risque de voir le sujet anciennement héroïnomane retomber dans l'usage de drogues illicites [21]. Le sevrage définitif à la méthadone est donc rarement rencontré et n'est certainement plus

l'objectif premier du traitement substitutif. Le but de la substitution peut dans certains cas se résumer à écarter autant que possible le toxicomane des drogues dures, dans d'autres, seulement à limiter sa consommation d'héroïne. L'échec du traitement substitutif, avec consommation d'héroïne, peut cependant également être causé par des doses insuffisantes de méthadone, ne permettant pas de contrôler suffisamment les symptômes liés au sevrage. Les doses préconisées pour l'initiation au traitement à la méthadone sont de 20 à 30 mg les premiers jours, lentement augmentées jusqu'à des posologies de 80, 100, voire 120 mg par jour en prise orale, sous forme de gélules ou de sirop [22]. Ces doses, pourtant généralement jugées satisfaisantes pour contrôler les symptômes dus au manque, ne tiennent malheureusement pas compte des caractéristiques pharmacocinétiques particulières et changeantes de la méthadone. L'objectif thérapeutique devrait plutôt être exprimé en termes de concentration plasmatique : la saturation des récepteurs est acquise pour une méthadonémie de l'ordre de 400 ng/mL [23].

La méthadone est caractérisée par une biodisponibilité orale proche de 80%, un degré de liaison aux protéines plasmatiques, majoritairement à l' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide, de l'ordre de 86% et un large volume de distribution, variant de 1,7 à 9,2 L/kg selon les sujets [24]. La méthadone est principalement métabolisée par N-déméthylation pour donner une structure cyclique, le 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP), à son tour N-déméthylé pour produire le 2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EMDP), métabolite cependant largement minoritaire [25]. Le méthadol, autre métabolite également très minoritaire, est formé par réduction de la méthadone (*Figure 6*). Ces trois métabolites ne présentent pas d'activité pharmacologique [25]. La principale enzyme impliquée dans cette N-déméthylation est le cytochrome P450 3A4, et dans une moindre mesure les cytochromes 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 et 2D6. La méthadone présente une élimination variable et biphasique, avec une phase d'élimination  $\alpha$  de l'ordre de 8 à 12 heures et une phase d'élimination  $\beta$  de 30 à 60 heures. Le produit et les métabolites se retrouvent majoritairement dans les fèces et dans une moindre mesure, dans les urines.



*Figure 6 : Métabolisme de la méthadone*

Bien que des interactions soient possibles au niveau des différents processus pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisation et élimination), la métabolisation, et plus particulièrement l'implication du cytochrome P450 3A4, sont responsables de la majorité des variations interindividuelles observées avec la méthadone [26]. Il a en effet été démontré que l'activité de ce cytochrome peut varier selon les individus d'un facteur 1 à 30 dans le foie et d'un facteur 1 à 11 dans les intestins [24]. De plus, le CYP450 3A4 peut être induit, mais également inhibé, de manière très significative par de nombreux médicaments [23]. Parmi les inducteurs, on peut noter les traitements antiviraux très fréquemment prescrits dans cette population à risque et qui peuvent alors expliquer l'inefficacité des traitements substitutifs en cas de métabolisme excessif, même si la compliance des patients est excellente. Par contre, les agents inhibiteurs, tels que le fluconazole, l'itraconazole, la clarithromycine, ou encore le vérapamil, peuvent à l'inverse être tenus responsables d'augmentations significatives des taux de méthadone, majorant le risque de survenue d'une dépression respiratoire [24- 27].

Plusieurs auteurs ont proposé le suivi thérapeutique pharmacologique de la méthadone dans le cas où les symptômes du manque ne sont pas contrôlés malgré l'apparente compliance au traitement du patient. Un suivi thérapeutique régulier, en tout cas dans les premiers mois du traitement substitutif, pourrait sans nul doute améliorer l'efficacité de la prise en charge des héroïnomanes.

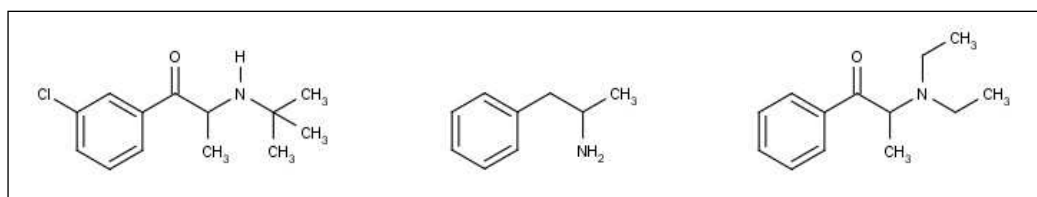


### **I.3. Le suivi thérapeutique pharmacologique dont l'objectif est d'éviter la toxicité des traitements**

#### **I.3.1. Le bupropion**

Le bupropion est une aminocétone actuellement utilisée comme antidépresseur et produit de substitution de la dépendance tabagique. Ce médicament fut approuvé pour la première fois en 1985 par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de la dépression [28]. Cependant, en raison du nombre important de convulsions, observées principalement chez des sujets présentant des antécédents de traumatismes crâniens ou des foyers épileptiques, le bupropion fut retiré de la Pharmacopée Internationale un an plus tard. Des études complémentaires montrèrent cependant qu'à posologie réduite, le risque convulsif était similaire à celui des autres antidépresseurs [28; 29]. Le produit fut alors réintroduit aux Etats-Unis en 1989 avec une attention particulière pour les sujets souffrant de troubles alimentaires et d'épilepsies. En 1997, la FDA autorisa le bupropion pour le traitement de la dépendance au tabac [29]. Et ce n'est qu'en 2007, que le produit fut de nouveau prescrit en Europe sous le nom de Wellbutrin<sup>®</sup> comme agent antidépresseur.

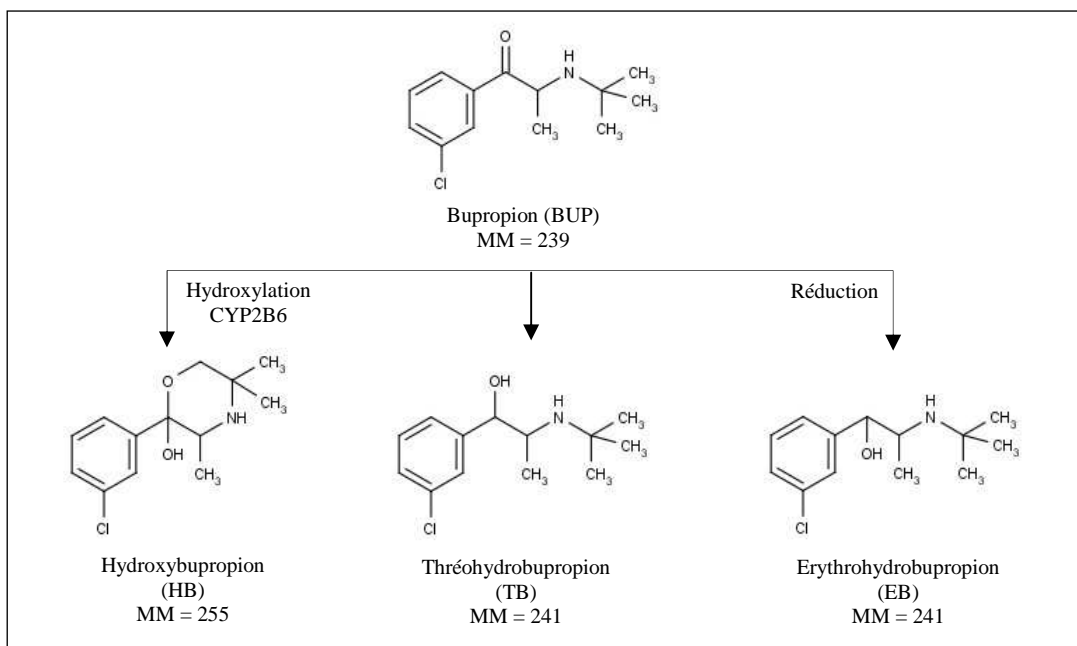
Le bupropion se caractérise par une structure monocyclique, très différente de celle des autres agents antidépresseurs, majoritairement tricycliques et tétracycliques. Sa structure chimique présente néanmoins beaucoup de similitudes avec celles de l'amphétamine et du diéthylpropion, tous deux connus pour leurs propriétés anorexigènes (**Figure 7**). Ses effets thérapeutiques sont comparables à ceux des antidépresseurs classiques. Le bupropion agit par inhibition de la recapture dopaminergique et noradrénergique. Par ailleurs, dans le sevrage tabagique, le bupropion n'est pas un véritable agent de substitution de la nicotine. Il augmente la quantité de dopamine dans les noyaux accumbens, pour lutter contre l'effondrement qui succède à quelques heures d'abstinence tabagique [30; 31].



*Figure 7 : Structure chimique du bupropion, de l'amphétamine et du diéthylpropion*

Les posologies de bupropion, prescrit comme agent antidépresseur ou support au sevrage tabagique, sont de l'ordre de 300 mg par jour, sous forme de comprimés de 75 ou 100 mg, ou sous forme de comprimés à libération prolongée dosés à 300 mg. Ces posologies conduisent à des concentrations thérapeutiques de bupropion comprises entre 25 et 100 µg/L [32].

Le bupropion subit un métabolisme hépatique extrêmement important. Trois métabolites pharmacologiquement actifs sont formés : l'hydroxybupropion (HB), via une t-butylhydroxylation avec formation d'un anneau morphinol, et deux isomères, le thréohydrobupropion (TB) et l'érythrohydrobupropion (EB), via des réductions du groupe carbonyle (**Figure 8**) [33]. Les modèles animaux suggèrent que l'activité de l'hydroxybupropion et des deux isomères représente respectivement 50% et 20% de celle du bupropion [34]. Les demi-vies d'élimination de ces composés sont relativement différentes : 8 heures pour le bupropion (retrouvé en très faible quantité (0,5%) sous forme inchangée dans les urines) et de 19 à 35 heures pour les métabolites [34; 35].



**Figure 8** : Métabolisme du bupropion

Après quelques années d'emploi du bupropion comme antidépresseur ou comme aide thérapeutique au sevrage tabagique, plusieurs publications font état d'intoxications sévères associant de la tachycardie sinusale, de l'hypertension, de l'agitation, des hallucinations, des myoclonies, des convulsions, ces effets étant d'autant plus marqués avec les formes à libération prolongée [36; 37]. Le suivi thérapeutique pharmacologique du bupropion a ainsi

pour objectif majeur de vérifier les concentrations plasmatiques du médicament afin d'éviter la toxicité.

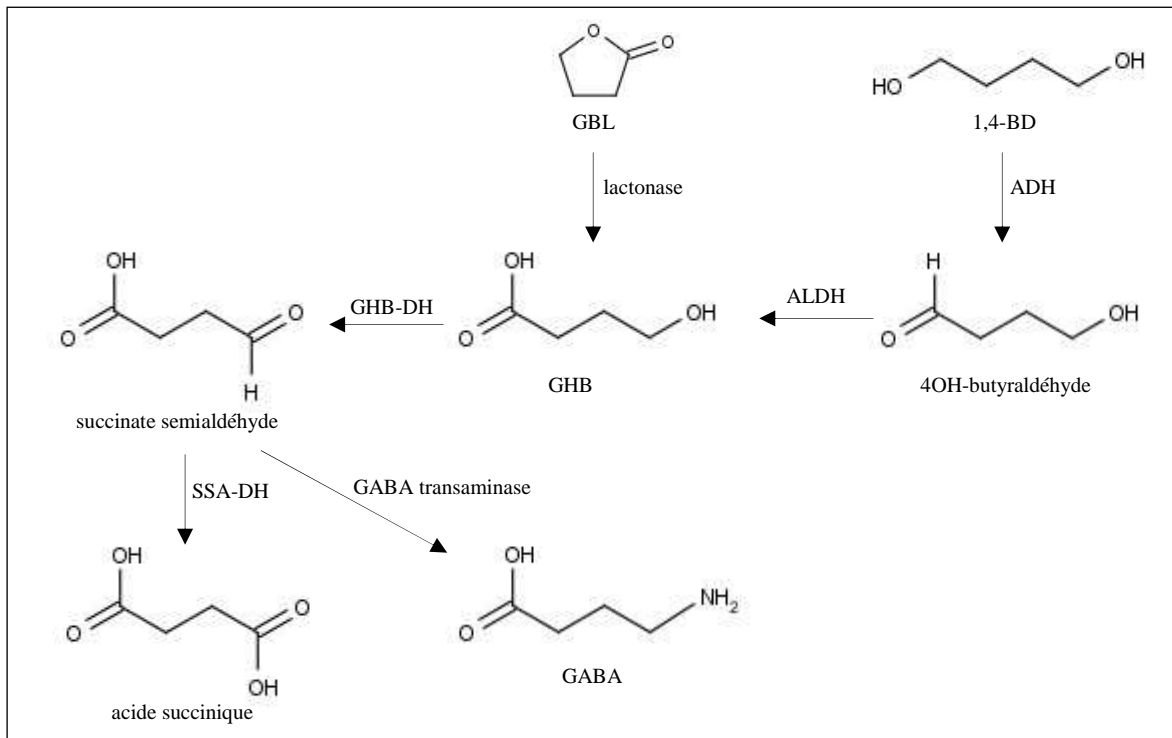
### **I.3.2. Le GHB**

Le GHB (**acide 4-hydroxybutanoïque**), molécule à courte chaîne d'acide gras, est un précurseur du principal neurotransmetteur inhibiteur, le GABA, présent de manière naturelle dans le cerveau des mammifères. Il agit comme agoniste partiel au niveau du récepteur GABA<sub>B</sub> et se lie avec une forte affinité à son récepteur spécifique couplé aux protéines G présent en forte concentration dans l'hippocampe, le septum et le cortex [38]. Sa consommation entraîne de plus une importante libération de dopamine au niveau central.

Le GHB (Ecstasy liquide, Liquid X, Liquid E, Georgia Home Boy, Gamma-oh, Easy lady) fut isolé en 1874 et synthétisé pour la première fois en 1961 par Laborit [39]. Début des années soixante, il fut utilisé comme agent anesthésiant et comme adjuvant dans le traitement des dépendances aux opiacés et à l'alcool. Dès 1980, le produit fut cependant de plus en plus utilisé par voie détournée comme agent dopant, principalement par les culturistes, de par ses effets de relargage de l'hormone de croissance, et par la suite, dans les dancings pour ses propriétés euphorisantes [40-41]. Au début des années nonante, des faits divers impliquant le GHB dans des cas de soumission chimique ont commencé à faire la une des médias. C'est en raison de ces abus que le sel de l'acide 4 hydroxybutanoïque fut soumis à la législation sur les stupéfiants en France à partir du 5 mai 1999 et contrôlé dans la plupart des pays européens dès mars 2001, date à laquelle les Nations-Unies placèrent le GHB sous contrôle [42; 43]. En 2002, les autorités sanitaires françaises ne lui accordaient plus que trois indications thérapeutiques, à savoir adjuvant anesthésique en chirurgie et obstétrique, agent sédatif en neurotraumatologie et traitement de la catalepsie [44]. Différentes spécialités pharmaceutiques à base de GHB sont actuellement commercialisées (Xyrem<sup>®</sup>, Alcover<sup>®</sup>, Gamma-OH<sup>®</sup>).

Le GHB présente une bonne biodisponibilité par voie orale. Les concentrations maximales dans le sang, de l'ordre de 125 mg/L pour une dose de 60 mg/kg, sont généralement atteintes 20 minutes après l'ingestion [45]. Le produit est presque entièrement métabolisé par la GHB déshydrogénase (GHB-DH) en succinate semialdéhyde, à son tour métabolisée par la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSA-DH) en acide succinique, transformé via le cycle de Krebs en dioxyde de carbone et en eau (*Figure 9*) [44]. Le GHB ne possède ainsi

aucun métabolite d'oxydation spécifique. Suite à une probable limitation de la dégradation enzymatique, le temps de demi-vie plasmatique du produit est dose dépendante. Par voie intraveineuse, il est de 40 minutes pour des doses de 60 mg/kg, et par voie orale de 20 à 25 minutes pour des doses de 12,5 à 50 mg/kg [46]. C'est cette élimination rapide sous forme de gaz carbonique et d'eau qui explique sa faible toxicité et sa courte durée d'action.



*Figure 9 : Métabolisme du GHB*

Malgré une variabilité intra et interindividuelle significative et un faible index thérapeutique, les effets du GHB semblent être dose dépendants : des quantités de 10 mg/kg engendrent une augmentation de la confiance en soi, de l'euphorie, de la relaxation, un effet anxiolytique et parfois de l'amnésie, des doses de 20 à 30 mg/kg induisent un état léthargique et le sommeil, alors que des doses supérieures à 50 mg/kg produisent de véritables anesthésies [47]. La posologie usuelle en anesthésiologie varie d'ailleurs de 60 mg/kg chez l'adulte à 100 mg/kg chez l'enfant. A ces doses, le GHB induit hypnose et hypotonie, mais n'a pas d'effet analgésique ou myorelaxant [46].

Suite aux modifications législatives relatives à la possession et au commerce de GHB, l'usage détourné de deux précurseurs du GHB, à savoir la gamma-butyrolactone (GBL) et le 1,4 butanediol (1,4BD), a fortement augmenté [48]. La GBL peut être retrouvée dans des produits commercialisés tels que vernis à ongles, pesticides, produits nettoyants, et toute une série de

solvants industriels, alors que le 1,4 BD est utilisé comme produit de synthèse dans la confection de résines, de polyuréthanes et de GBL. En suivant quelques instructions, la GBL peut être aisément transformée en GHB par réaction chimique, et est vendue de la sorte comme précurseur « légalement autorisé » du GHB.

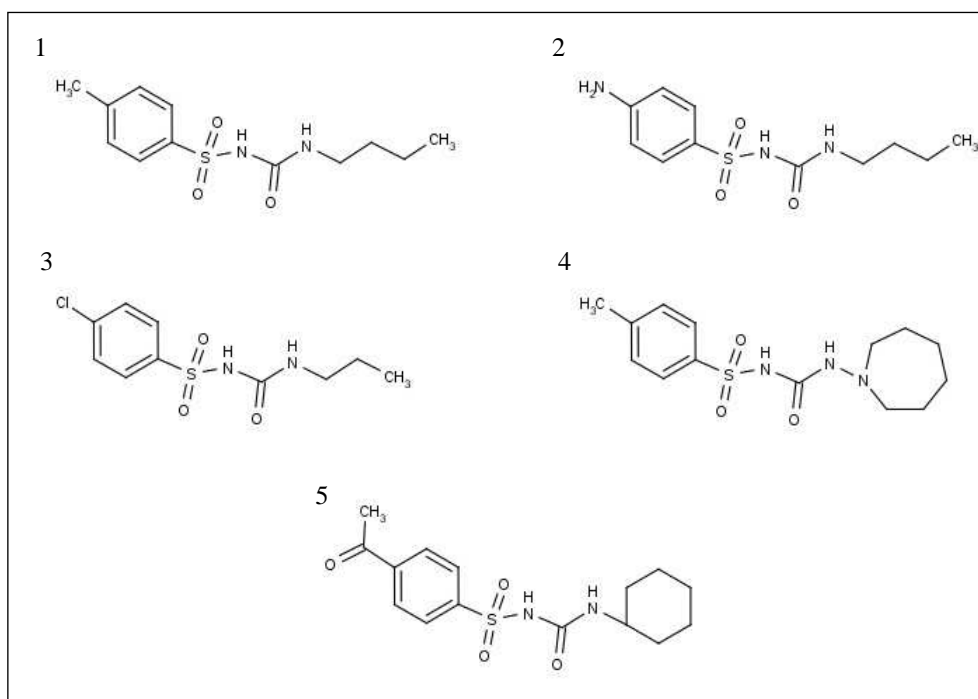
Après ingestion, la GBL et le 1,4 BD se comportent comme de véritables prodrogues et sont métabolisés en GHB par différents mécanismes [49-51] : la GBL en une étape sous l'influence d'une lactonase sérique, le 1,4 BD en deux étapes grâce à une alcool déshydrogénase d'une part, qui le convertit d'abord en gamma-hydroxybutyraldéhyde, et ensuite grâce à une aldéhyde déshydrogénase, pour l'obtention du GHB (*Figure 9*). Comme le GHB, ces deux substances sont des drogues d'abus, mais leurs effets sont quelques peu différents. Leur administration entraîne des concentrations plus importantes de GHB en un laps de temps plus court qu'en cas d'absorption directe de GHB. Plusieurs recherches effectuées chez l'animal confirment que la prise de GBL conduit à des concentrations maximales de GHB plus élevées, un effet plus rapide et de plus longue durée, par comparaison avec une prise équimolaire de GHB [52]. Ce constat peut également expliquer la toxicité plus importante des overdoses à la GBL. Quant au 1,4 BD, sa consommation avec de l'alcool peut entraîner une inhibition de son métabolisme et ainsi induire une toxicité retardée. Ces substances ne sont cependant pas considérées comme des produits narcotiques stupéfiants.

En Toxicologie judiciaire, la recherche de GHB dans les prélèvements biologiques a pour but d'établir la réalité d'une soumission chimique. Cependant, la demi-vie brève du produit complique la tâche de l'expert et même en cas de prise d'une dose élevée de GHB (60 mg/kg per os), la soumission chimique ne peut être établie au-delà de 5 heures dans le sang et de 10 heures dans les urines [53]. La confirmation de la consommation peut cependant se faire à distance des faits par l'analyse des cheveux [54].

En Toxicologie clinique, bien que la toxicité du GHB soit faible, des décès ont été rapportés après usage du produit, avec ou sans co-médication [55]. Le mécanisme prépondérant expliquant le décès est la dépression respiratoire induite par inhibition du système nerveux central [55; 56]. Il apparaît donc utile de disposer au laboratoire d'une technique analytique adaptée à la fois au dosage du GHB dans le sang lors de son utilisation en clinique et à sa recherche et sa quantification dans des prélèvements récoltés dans des affaires de Toxicologie judiciaire.

### I.3.3. Les sulfamidés hypoglycémiants

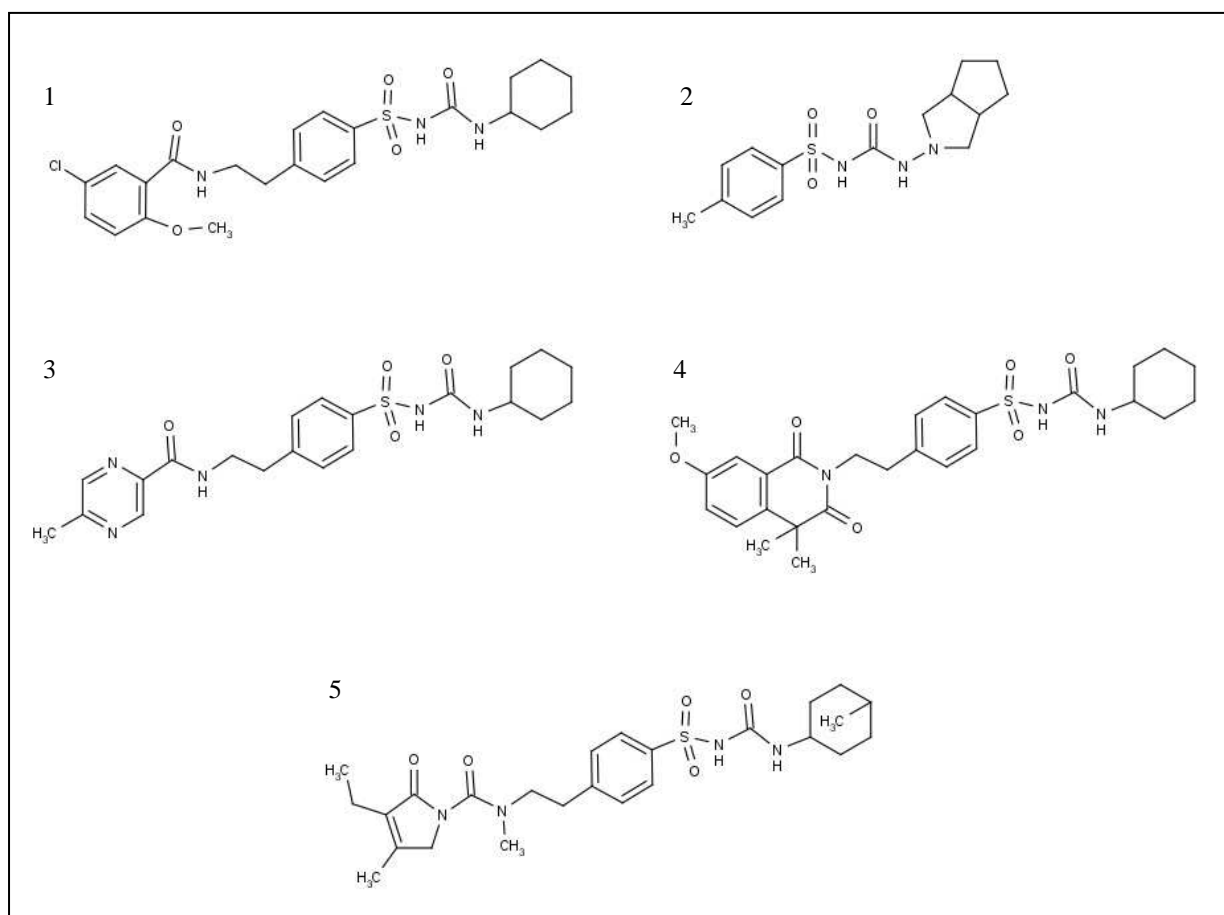
La mise en évidence de l'effet hypoglycémiant des sulfamidés remonte à plusieurs décennies (1942), lorsque plusieurs accidents hypoglycémiques sévères furent observés après administration d'un sulfamidé à propriété antibactérienne chez des patients atteints de fièvre typhoïde [57]. Les travaux d'Auguste Loubatières confirmèrent dans les années qui suivirent que certains sulfamidés présentaient en effet un tropisme particulier pour les cellules insulinosécrétrices des îlots de Langerhans, entraînant une libération accrue d'insuline endogène [58]. Malgré cette découverte très prometteuse, il fallut attendre 1956 pour voir la commercialisation de la première sulfonylurée, à savoir le tolbutamide, comme agent antidiabétique [59]. Ce nouveau médicament constituait à l'époque la seule alternative aux injections d'insuline pour les patients diabétiques non insulino-dépendants. Depuis lors, et ce malgré la commercialisation de nombreux autres hypoglycémiant, les sulfonylurées occupent toujours une place de choix dans la prise en charge des traitements du diabète de type 2 [60]. Les molécules dites de première génération regroupaient, outre le tolbutamide, le carbutamide, le chlorpropamide, le tolazamide et l'acétohexamide. Ces produits étaient tous des arylsulfonylurées substituées à la fois sur le benzène et sur l'urée (**Figure 10**).



*Figure 10 : Structures chimiques des sulfamidés de 1<sup>ère</sup> génération*

*(1. Tolbutamide – 2. Carbutamide – 3. Chlorpropamide – 4. Tolazamide – 5 Acétohexamide)*

Le premier sulfamidé hypoglycémiant de deuxième génération, à savoir le glibenclamide, fut commercialisé dix ans plus tard [61]. Sa formule chimique était également une arylsulfonylurée, porteuse cependant de structure aliphatique et de cycles hydrophobes à ses deux extrémités (**Figure 11**). Ces quelques modifications apportées à la structure des sulfamidés jusqu'alors commercialisés, entraînaient d'importants changements pharmacologiques, faisant du glibenclamide un hypoglycémiant extrêmement puissant, puisque actif à des posologies 100 fois plus faibles que les produits précédemment cités [59; 60]. D'autres sulfamidés de deuxième génération allaient alors rapidement envahir le marché mondial, parmi lesquels on peut citer le gliclazide, le glipizide et la gliquidone, et supplanter les molécules de première génération [59]. Le glimépiridine, dernier sulfamidé hypoglycémiant à avoir été commercialisé, est parfois considéré comme le premier agent de troisième génération [62].



**Figure 11** : Structures chimiques des sulfamidés de 2<sup>ème</sup> génération

(1. Glibenclamide – 2. Gliclazide – 3. Glipizide – 4. Gliquidone – 5. Glimépiride)

L'indication principale de la prescription des sulfonylurées reste avant tout le diabète de type 2, après échec des premières mesures thérapeutiques, à savoir les règles hygiéno-diététiques et la prise de biguanides [60]. Elles sont rarement utilisées en monothérapie, mais plutôt en association avec d'autres antidiabétiques oraux, selon l'évolution et la sévérité de la maladie diabétique. L'association avec de l'insuline est également envisagée lorsqu'une insulinosécrétion résiduelle significative persiste, susceptible d'être stimulée par l'action du sulfamidé. L'explication du mécanisme d'action des sulfonylurées comprend une fermeture des canaux potassiques ATP-sensibles, provoquant une dépolarisation de la membrane des cellules  $\beta$  qui se traduit par une activation des canaux calciques voltage dépendants. L'exocytose des granules d'insuline survient alors suite aux modifications des concentrations calciques intracytoplasmiques engendrées [63].

Ces sulfonylurées présentent toutes une excellente résorption par voie orale, sont pour la plupart fortement métabolisées par le foie avec formation de métabolites actifs, et éliminées par voie rénale en proportions variables. Elles présentent de plus la particularité d'être fortement liées aux protéines plasmatiques, pouvant ainsi être responsables d'interactions non désirées lors d'associations médicamenteuses (anticoagulants coumariniques, fibrates, ...) [64]. Un temps de demi-vie important couplé à une relative longue durée d'action de ces médicaments peut être bénéfique pour réguler la glycémie et favoriser la compliance des patients, mais est également susceptible de majorer et de prolonger une hypoglycémie en cas de surdosage. Cette hypoglycémie est d'ailleurs le principal frein à l'augmentation des posologies dans le cas où les objectifs thérapeutiques ne sont pas atteints [65; 66].

Le suivi thérapeutique pharmacologique des sulfonylurées a une place très limitée dans la prise en charge des traitements hypoglycémisants. En effet, l'efficacité des thérapies antidiabétiques est évaluée par la mesure de l'hémoglobine glyquée, paramètre biologique reflétant la glycémie moyenne au cours des 60 derniers jours [67]. Sa valeur chez le sujet non diabétique se situe entre 4 et 6 % de l'hémoglobine totale, et des taux inférieurs à 7% (voire 6,5%) constituent un objectif thérapeutique à atteindre pour le sujet diabétique non insulino-dépendant [67; 68]. Cependant, comme c'est le cas pour tout traitement chronique susceptible d'être suivi par le patient de manière inappropriée, la recherche des sulfonylurées dans le sang peut être un moyen adéquat de vérifier la compliance du sujet au traitement lorsque ce dernier est jugé mal équilibré. La détermination exacte de la concentration du sulfamidé dans le sang peut également s'avérer une démarche intéressante pour évaluer l'influence d'une insuffisance hépatique ou rénale en cas de survenue d'épisodes d'hypoglycémies à répétition.

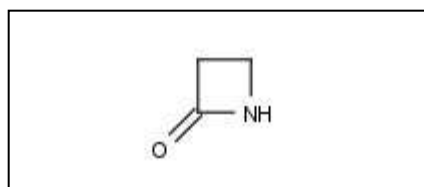


Cependant, la principale raison motivant une recherche ou un dosage sanguin de sulfonylurées est l'exploration d'une hypoglycémie d'origine indéterminée [69]. Ces molécules peuvent en effet être la cause d'hypoglycémies sévères, pouvant se prolonger durant plusieurs jours. Contrairement aux hypoglycémies générées par l'injection d'insuline, la prise de sulfonylurées engendre une élévation des taux d'insuline couplée à une augmentation équimolaire des taux de C-peptide [70]. Un taux élevé de C peptide lors d'un épisode d'hypoglycémie permet en effet d'exclure une prise d'insuline exogène et est le témoin d'une sécrétion non contrôlée d'insuline endogène. Cette situation se rencontre également dans le décours d'une pathologie endocrine relativement rare, l'insulinome [71; 72]. Cette pathologie se traduit par une tumeur  $\beta$ -langerhansienne, habituellement bénigne, générant une sécrétion d'insuline ectopique et non contrôlée, en totale indépendance avec la glycémie du sujet [73].

#### **I.4. Le suivi thérapeutique pharmacologique dont l'objectif est de réduire les coûts des traitements**

##### **Les $\beta$ -lactamines**

La découverte de la pénicilline en 1928 par Alexandre Fleming compte parmi les progrès thérapeutiques majeurs du vingtième siècle [74]. Les infections bactériennes sont en effet extrêmement courantes et sont à l'origine d'une mortalité et d'une morbidité très significatives. Après la découverte de cette molécule, beaucoup d'autres agents (céphalosporines, tétracyclines, aminoglycosides) sont apparus sur le marché. Quatre-vingts années plus tard, les  $\beta$ -lactamines comptent toujours parmi les antibiotiques les plus fréquemment utilisés (*Figure 12*).



*Figure 12 : Structure chimique du noyau  $\beta$ -lactame*

Le suivi thérapeutique pharmacologique des antibiotiques a longtemps eu pour seul objectif la réduction de la toxicité iatrogène de quelques molécules, dont les plus connues font partie de la famille des aminoglycosides et des glycopeptides. Cette approche avait le mérite en effet de réduire de manière très significative la néphrotoxicité et l'ototoxicité de ces agents, sans se soucier cependant de l'efficacité et des coûts des thérapies entreprises [75; 76]. Après une quarantaine d'années de succès thérapeutiques faciles, l'émergence de souches bactériennes de plus en plus résistantes (Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus, Pneumocoques Pénicilline Résistants, ...), combinée à des échecs thérapeutiques difficilement prévisibles, a poussé les infectiologues à prendre conscience des risques d'une antibiothérapie mal adaptée. De plus, l'application de thérapies de plus en plus agressives en médecine ambulatoire, tels que les traitements administrés aux patients cancéreux ou transplantés, ainsi que la survenue de pathologies réduisant les défenses immunitaires comme par exemple le SIDA, ont de surcroît encore compliqué le traitement des infections sévères rencontrées chez de tels patients dans la mesure où leurs propres défenses étaient déjà fortement réduites. Un dernier fait marquant la complexité de la lutte contre les infections sévères est l'étroitesse de l'arsenal

thérapeutique antibactérien disponible, majoré par une pause très marquée dans l'innovation pharmaceutique dans ce secteur, où la découverte de nouvelles molécules présentant un mécanisme d'action original fait cruellement défaut. Toutes ces raisons ont nécessité l'instauration d'une rationalisation des modèles de prescription des antibiotiques dans le but d'améliorer les taux de guérison et de réduire le coût des traitements, tout en conservant l'efficacité de l'arsenal thérapeutique [77]. Les stratégies appliquées pour l'optimisation de l'antibiothérapie consistent à prendre en compte les caractéristiques du malade (état physiopathologique, statut immunitaire, évolution clinique, ...), des bactéries (nature et sensibilité des germes, localisation anatomique, ...) et des antibiotiques administrés (mécanismes de l'activité antimicrobienne, efficacité, contre indications, ...) [78-80]. Les modèles d'administration, en s'adaptant aux modes d'action des médicaments, sont également des facteurs supplémentaires pris en compte dans l'optimisation des traitements [81; 82]. Ainsi, l'administration de doses journalières uniques d'antibiotiques à bactéricidie concentration dépendante (ex : aminosides), de même que l'administration par perfusion continue d'antibiotiques à bactéricidie temps dépendante (ex : les  $\beta$ -lactamines) constituent une approche de plus en plus utilisée. L'optimisation des schémas posologiques à partir des paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques a d'ailleurs dans un premier temps été validée sur des modèles animaux, puis sur l'Homme, et a montré qu'une réduction significative des coûts de traitement pouvait être dégagée [83].

Un suivi thérapeutique pharmacologique isolé de tout contexte clinique ou bactériologique est désormais unanimement considéré comme très peu informatif voire inefficace. L'optimisation anti-infectieuse exige en effet plus que la simple détermination d'un intervalle de concentrations considérées comme efficaces. Cependant, en y intégrant toutes les données précitées, le suivi thérapeutique pharmacologique des antibiotiques a désormais toute sa place dans la prise en charge des infections sévères, et ce pour l'ensemble des antibiotiques, qu'ils soient connus comme médicaments à index thérapeutique étroit ou large. La complexité des relations doses – concentrations – effets cliniques, intégrant les profils pharmacocinétiques et l'activité bactériologique, explique en effet que le suivi thérapeutique pharmacologique peut s'appliquer pour une grande majorité des agents antibiotiques. Il permet, au moyen de quelques prises de sang, de décrire des modèles pharmacocinétiques prédictifs à appliquer pour optimiser l'antibiothérapie, permettant de limiter au maximum les quantités d'antibiotiques à utiliser, et ce, de manière adaptée à chaque patient. Cette démarche permet de plus de garantir un meilleur rapport bénéfice / risque, en limitant l'administration

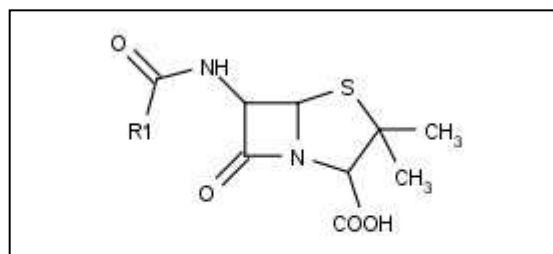
de thérapies inappropriées et non réfléchies, et en sélectionnant le plus rapidement possible un traitement adapté au patient, limitant d'autant plus les dépenses thérapeutiques [77].

Les  $\beta$ -lactamines occupent une place importante dans la prise en charge des infections sévères. Ce sont des antibiotiques temps dépendants, ce qui implique que leur activité est directement corrélée avec le temps durant lequel leur concentration plasmatique reste supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) des germes responsables de l'infection [84; 85]. Plusieurs études, réalisées aussi bien chez l'animal que chez l'Homme, ont mis en évidence une efficacité thérapeutique optimale lorsque la concentration plasmatique à l'équilibre atteint 4 à 5 fois la CMI [86-88]. Etant donné que de telles concentrations ne peuvent être atteintes que par le biais de perfusions continues, ce mode d'administration s'est généralisé pour les patients sévèrement infectés.

On distingue quatre sous-classes de  $\beta$ -lactamines: les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames.

### 1. Les pénicillines

Elles sont constituées d'un noyau  $\beta$ -lactame accolé à un noyau soufré thiazolidine à cinq sommets (**Figure 13**) [89-91].



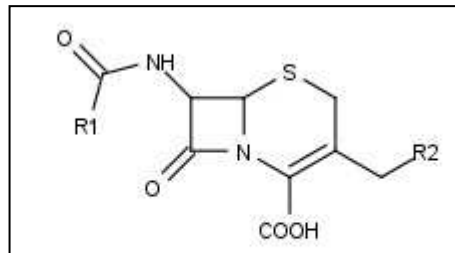
*Figure 13 : Structure chimique des pénicillines*

Il en existe quatre catégories :

- les pénicillines standards : la pénicilline V et la pénicilline G ;
- les antistaphylococciques (spectre étroit mais résistance aux pénicillinases) : oxacilline, cloxacilline et flucloxacilline ;
- les aminopénicillines : l'ampicilline et l'amoxicilline ;
- les antipseudomonas : on en distingue deux sous-groupes, les carboxypénicillines, à savoir la témocilline et la ticarcilline, et les uréidopénicillines, dont la principale est la pipéracilline.

## 2. Les céphalosporines

Leur structure chimique est constituée par un noyau  $\beta$ -lactame accolé à un noyau dihydrothiazine soufré à six sommets (**Figure 14**) [89; 90; 92].



*Figure 14 : Structure chimique des céphalosporines*

Presque toutes résistantes aux  $\beta$ -lactamases, on les classe généralement en quatre générations selon leur spectre d'activité vis-à-vis des germes aérobies à Gram négatifs. Le spectre s'élargit lorsque l'on passe de la première à la quatrième génération, contrairement à l'activité antistaphylococcique, qui, elle, décroît.

- *Céphalosporines de première génération* : céfadroxil, céfalexine, céfatrizine, céfazoline et céfafradine.

Les céphalosporines de première génération sont actives contre les streptocoques, les staphylocoques et la plupart des *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*. Elles sont efficaces dans les infections de la peau et des tissus mous et employées à titre prophylactique pour les suites d'interventions chirurgicales.

- *Céphalosporines de deuxième génération* : céfacor, céfamandole, céfuroxime.

Elles sont couramment employées dans le traitement empirique des infections extrahospitalières de l'arbre respiratoire et toute une variété d'infections pédiatriques, à l'exception de la méningite, en raison de leur très faible passage dans le liquide céphalorachidien.

- *Céphalosporines de troisième génération* : céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone.

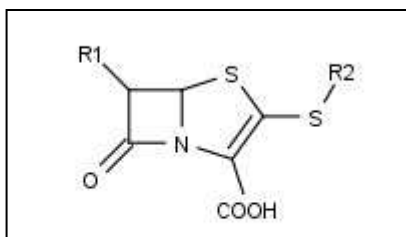
Une importante propriété de ces antibiotiques est qu'ils atteignent dans le LCR des concentrations bactéricides contre les entérobactéries et les trois principaux agents méningés, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* et *H. influenzae*. Ils sont utiles, souvent en bithérapie associés à des aminosides, contre les infections nosocomiales graves, telles que la pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*.

- *Céphalosporines de quatrième génération* : céfépime.

Ce seul représentant de la dernière génération présente une meilleure résistance aux différentes  $\beta$ -lactamases que l'ensemble des céphalosporines de troisième génération.

### 3. Les carbapénèmes

Ils comprennent un noyau  $\beta$ -lactame fusionné avec un noyau pénème à cinq sommets (**Figure 15**) [89; 90; 93].

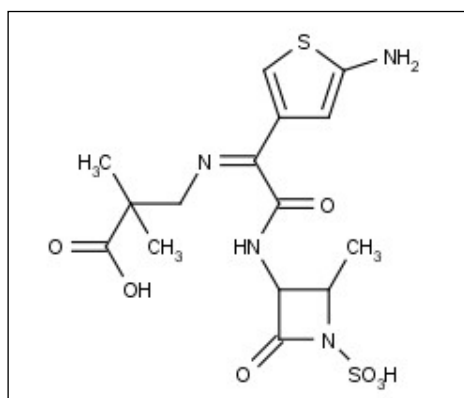


*Figure 15* : Structure chimique des carbapénèmes

Les deux principaux représentants de la classe sont l'imipénème et le méropénème. Ils sont tous les deux particulièrement indiqués pour traiter des infections résistantes aux autres antibiotiques. Leur très large spectre d'activité permet de les employer dans le traitement des infections polymicrobiennes, en remplacement de l'administration de deux ou plusieurs antibiotiques.

### 4. Les monobactames

Leur seul représentant est l'aztréonam. Il comprend un seul noyau  $\beta$ -lactame auquel est attaché un radical sulfoné (**Figure 16**) [89 ;90 ; 94].



*Figure 16* : Structure chimique de l'aztréonam

Ce produit est de moins en moins utilisé, notamment parce que malgré son activité intéressante sur les bacilles à Gram négatif, il n'exerce aucune activité sur les bactéries à Gram positif.

## **II. BUT DU TRAVAIL**



L'objectif principal de ce travail est de démontrer l'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique appliqué à quelques médicaments ou classes pharmaceutiques habituellement non contrôlés.

Le suivi thérapeutique pharmacologique repose sur la mesure de la concentration sanguine d'un médicament administré à un patient dans le but d'adapter individuellement la posologie. Les deux principales justifications habituellement retenues pour le suivi thérapeutique pharmacologique sont d'une part la diminution du taux d'échecs thérapeutiques, liés à une mauvaise observance ou à l'emploi d'une posologie insuffisante, et d'autre part la réduction de la fréquence des manifestations indésirables et/ou toxiques des médicaments, plutôt associés à une posologie excessive. La liste des médicaments faisant en pratique l'objet de cette démarche est cependant restreinte à une quarantaine de substances, en raison principalement des différents critères qui justifient l'obtention d'une intervention des soins de santé, à savoir :

- l'existence d'une corrélation entre la concentration plasmatique et les effets pharmacodynamiques ;
- une zone thérapeutique étroite ;
- une variabilité pharmacocinétique interindividuelle importante ;
- l'absence d'autres marqueurs permettant d'évaluer l'effet thérapeutique.

Le but de ce travail est de convaincre les Cliniciens des avantages d'un élargissement de cette liste conventionnelle à d'autres molécules, en leur présentant une multitude d'autres indications pour le suivi thérapeutique pharmacologique, comme la réduction du coût des thérapies antibactériennes par  $\beta$ -lactamines, l'aide au diagnostic d'une résistance ou d'une hypersensibilité aux anticoagulants oraux, l'évaluation des thérapies substitutives par la méthadone, la vérification de la compliance au traitement par sulfonyles, ou encore la réduction de la toxicité des traitements à base de bupropion et de GHB. Pour répondre à cet objectif, il était nécessaire de développer et de valider plusieurs techniques qui sont en parfaite adéquation avec les besoins du suivi thérapeutique pharmacologique.

## **III. MATERIEL ET METHODES**

**III.1. Les antivitamines K**

**III.2. La méthadone**

**III.3. Le bupropion**

**III.4. Le GHB**

**III.5. Les sulfamidés hypoglycémiants**

**III.6. Les  $\beta$ -lactamines**

Le suivi thérapeutique pharmacologique ne peut se concevoir que si l'on utilise des techniques analytiques fiables, vérifiées au moyen de dossiers de validation. Ces conditions sont en effet indispensables pour assurer l'exactitude et la précision des résultats et permettre ensuite une interprétation biomédicale.

Les techniques analytiques utilisées dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique appartiennent à deux groupes bien distincts, d'une part les **méthodes immunologiques** et d'autre part les **méthodes chromatographiques** :

- **les techniques immunologiques** qui datent des années 70, ont largement contribué, en raison de leur simplicité d'utilisation, à l'essor du contrôle thérapeutique, qui était alors réalisé essentiellement dans le but de réduire la toxicité de quelques médicaments (digoxine, amikacine,...). Depuis lors, développées et commercialisées par de nombreuses firmes, elles proposent aujourd'hui des procédés automatisés rapides et simples à mettre en œuvre pour le dosage de médicaments d'utilisation délicate.

Pourtant de nombreuses réserves pour l'utilisation de ces méthodes sont à formuler :

- le principal inconvénient est leur manque de spécificité, qui résulte de l'existence de réactions croisées, dont l'importance quantitative est variable selon la nature monoclonale ou polyclonale des anticorps utilisés. L'exemple du dosage de la ciclosporine, où les réactions croisées peuvent, selon les réactifs utilisés, augmenter de 10 à 400% les concentrations apparentes de la substance mère, illustre parfaitement ce problème ;
- de plus, l'utilisation de ces méthodes pour l'analyse de nouvelles molécules est tributaire du développement par les industriels d'anticorps adaptés à ces nouveaux médicaments ;
- enfin, le coût des réactifs rend la réalisation de chaque test très onéreux (surtout lorsque le nombre de tests à effectuer chaque jour est faible).

Pour toutes ces raisons, l'utilisation des techniques immunologiques dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique reste limitée à un petit nombre de médicaments ;

- **les techniques chromatographiques**, plus spécifiques que les techniques immunologiques, permettent en outre le dosage simultané de différentes molécules appartenant à une même classe pharmacologique. Elles sont capables de différencier la substance parent de ses métabolites.

Ces avantages incontestables ne peuvent faire oublier certains inconvénients comme la notion du temps de réalisation de l'analyse (mise au point et validation), la complexité

des systèmes chromatographiques nécessitant un personnel qualifié et enfin les coûts importants liés à l'acquisition et à l'entretien des équipements.

Dans le cadre de ce travail, orienté vers le suivi thérapeutique pharmacologique de médicaments rarement dosés, le recours aux techniques chromatographiques s'imposait. C'est ainsi que nous avons mis au point différentes méthodes d'analyses :

- 3 techniques en chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD), applicables aux antivitamines K, à la méthadone et aux  $\beta$ -lactamines ;
- 2 techniques en chromatographie liquide ultra performante couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC/MS-MS), adaptées aux dosages du bupropion et des sulfamidés hypoglycémifiants ;
- 2 techniques en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse, utilisées pour l'analyse du GHB et de la méthadone.

Pour ces différentes méthodes, les étapes préparatoires ont été l'extraction en phase liquide – EPL (antivitamines K, méthadone, GHB, sulfamidés) ou l'extraction en phase solide – EPS (bupropion,  $\beta$ -lactamines).

### **III.1. Les antivitamines K**

La méthode analytique développée permet le dosage de trois antivitamines K, l'acénocoumarol, la phenprocoumone et la warfarine. Elle comprend une extraction en phase liquide suivie d'une analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes.

#### **Extraction en phase liquide**

L'extraction est réalisée sur 1 mL de sang, auquel sont ajoutés 100  $\mu$ L d'une solution à 10  $\mu$ g/mL de prazépam (SI), 1 mL d'une solution 0.2 M d'acide chlorhydrique et 8 mL d'une solution d'extraction. Cette dernière est composée d'un mélange en proportion équivalente d'acétate d'éthyle et d'éther diéthylique. Après agitation et centrifugation, la phase organique est évaporée sous azote à une température de 30°C. Le résidu obtenu est alors reconstitué par 100  $\mu$ L d'une solution de tampon phosphate pH 3.8 et d'acétonitrile (95-5 ; v/v). Quarante microlitres de cette solution sont utilisés pour l'analyse chromatographique.

### **Chromatographie par HPLC-DAD**

Le système chromatographique consiste en un module de séparation Alliance 2695 de Waters, équipé d'une pompe quaternaire basse pression, d'une ligne de dégazage et d'un échantillonneur thermostatisé à 4°C, connecté à un détecteur à barrette de diodes 2996 de la même firme. La séparation chromatographique est réalisée au moyen d'une colonne analytique C8 Symmetry<sup>®</sup> (250 mm x 4.6 mm i.d. – Waters), équipée d'une pré-colonne (20 mm x 4.6 mm i.d. – Waters). La phase mobile consiste en un mélange d'acétonitrile (A) et de tampon phosphate pH 3.8 (B). Elle est délivrée au débit de 1 mL/minute en mode non isocratique selon le gradient suivant : T<sub>0-1</sub> : 13% A ; T<sub>1-9</sub> : 13-35% A ; T<sub>9-28</sub> : 35-80% A ; T<sub>28-30</sub> : 80-13% A ; T<sub>30-35</sub> : 13% A. Le détecteur balaye le spectre UV de 200 à 400 nm.

## **III.2. La méthadone**

La méthadone a été analysée par deux techniques analytiques différentes, d'une part la chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrettes de diodes (HPLC-DAD) et d'autre part la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

### **III.2.1. Analyse de la méthadone et de son principal métabolite, l'EDDP, par HPLC-DAD**

#### **Extraction en phase liquide**

L'extraction est réalisée sur 1 mL de plasma, auquel sont ajoutés 100 µL d'une solution à 10 µg/mL de prazépam (SI), 1 mL d'une solution 1 M de bicarbonate à pH 8.5 et 5 mL d'une solution d'extraction constituée d'un mélange de différents solvants [éther diéthylique (50%) – dichlorométhane (25%) – hexane (15%) – alcool n-amylique (10%)]. Après agitation et centrifugation, la phase organique est évaporée sous azote à une température de 30°C. Le résidu obtenu est alors reconstitué par 70 µL d'une solution de tampon phosphate pH 3.8 et d'acétonitrile (95-5 ; v/v). Quarante microlitres de cette solution sont utilisés pour l'analyse chromatographique.

#### **Chromatographie par HPLC-DAD**

Le système chromatographique est en tout point identique à celui décrit pour le dosage des antivitamines K (Alliance 2695 connecté à un détecteur à barrette de diodes 2996 – Waters).

### **III.2.2. Analyse de la méthadone et de son principal métabolite, l'EDDP, par GC-MS**

#### **Extraction en phase liquide**

Un millilitre de plasma est soumis à deux extractions successives en phase liquide après ajout de 10 µL d'une solution de standard interne (codéine-d<sub>3</sub>, morphine-d<sub>3</sub>, 6-acétylmorphine-d<sub>3</sub>, EDDP d<sub>3</sub>). La première extraction est réalisée par un mélange chloroforme (50%) – isopropanol (25%) – n-heptane (25%) en présence de tampon dihydrogénophosphate de potassium à pH 3.8. Après agitation et centrifugation, la phase organique est extraite par une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M. La phase aqueuse acidifiée subit alors une seconde extraction par du chloroforme après neutralisation avec de l'hydroxyde de sodium en présence de tampon dihydrogénophosphate de potassium à pH 8.4. La phase organique est récupérée et évaporée. L'extrait sec subit enfin une dérivation par un mélange de 10 µL de BSTFA/TMCS (99-1 ; v/v) et de 30 µL d'acétate d'éthyle. Trois microlitres de la solution obtenue sont injectés dans le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse.

#### **Chromatographie par GC-MS**

Le système chromatographique comprend un chromatographe gazeux Trace 2000<sup>®</sup> (Interscience<sup>®</sup>) combiné à un spectromètre de masse DSQ<sup>®</sup> (Interscience). La colonne chromatographique utilisée est de type HP-5MS (Agilent Technologies<sup>®</sup>). Trois microlitres de la solution d'extraction sont injectés en tête de colonne en mode sans division. La phase mobile, constituée d'hélium N60, est délivrée à un débit constant de 1.2 mL/minute. L'analyse se réalise selon un gradient de température, réalisé en partant d'une température initiale de 50°C maintenue pendant 2 minutes, suivie d'une augmentation de température de 15°C/minute jusque 295°C, puis une stabilisation de la température durant 5 minutes. La ligne de transfert est constamment maintenue à 300°C. Le mode de fonctionnement du spectromètre de masse est le « Single Ion Monitoring– SIM » et les ions étudiés sont les suivants : 72 – 223 – 294 pour la méthadone, 374 – 347 – 237 pour la codéine d<sub>3</sub>, qui sert de standard interne à la méthadone, 276 – 277 – 262 pour l'EDDP et 279 – 280 – 265 pour l'EDDP d<sub>3</sub>. La technique chromatographique permet de plus le dosage simultané de nombreux autres opiacés, parmi lesquels la 6 monoacétylmorphine et la morphine, les deux principaux métabolites de l'héroïne.

### **III.3. Le bupropion**

La méthode développée permet le dosage du bupropion (BUP) et de ses trois principaux métabolites : l'hydroxybupropion (HB), le thréohydrobupropion (TB) et l'érythrohydrobupropion (EB). La technique comprend une extraction en phase solide suivie d'une analyse en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC/MS-MS).

#### **Extraction en phase solide**

L'analyse est réalisée sur 100  $\mu$ L de sang auxquels sont ajoutés 50  $\mu$ L d'une solution à 1 mg/L de BUPd<sub>9</sub> et de HBd<sub>6</sub> (standards internes). La précipitation des protéines est provoquée par ajout de 500  $\mu$ L d'une solution constituée d'un mélange de méthanol (30%) et de solution aqueuse saturée en sulfate de zinc (70%). Après agitation et centrifugation, le surnageant est dilué au moyen de 2 mL d'eau désionisée. La solution ainsi obtenue est chargée sur colonne Oasis<sup>®</sup> HLB (Waters) préalablement conditionnée par passage de méthanol et d'eau désionisée. Le lavage est réalisé par passages successifs d'eau désionisée (3 x 1 mL), suivi d'un mélange d'eau désionisée contenant 10% de méthanol (3 x 1 mL). Après 15 minutes de séchage, l'élution se fait par ajout d'un mélange de dichlorométhane (75%) et d'isopropanol (25%) (3 x 1 mL). Après évaporation sous azote à 30°C, le résidu obtenu est reconstitué dans 100  $\mu$ L d'une solution de tampon formate d'ammonium (2mM – pH 4) et d'acétonitrile (90-10 ; v/v). Dix microlitres de cette solution sont injectés dans le système UPLC/ESI-MS-MS.

#### **Chromatographie par UPLC-MS-MS**

Le système chromatographique consiste en un module de séparation Acquity UPLC couplé à un spectromètre de masse Quattro Premier<sup>®</sup> – Waters. La phase mobile est constituée d'un mélange de deux solutions, à savoir du formate d'ammonium (2mM – pH 4) – solution A, et de l'acétonitrile – solution B. Elle est délivrée à un débit de 400  $\mu$ L par minute selon le gradient suivant : T<sub>0</sub> : 95% A ; T<sub>3,5</sub> : 70% A ; T<sub>4,2</sub> : 68,5% A ; T<sub>4,7</sub> : 5% A ; T<sub>4,8</sub> : 95% A ; T<sub>5,7</sub> : 95% A. La séparation chromatographique est réalisée au moyen d'une colonne analytique Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH Phenyl (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7  $\mu$ m – Waters). La source électrospray d'ionisation fonctionne en mode positif. Le mode d'acquisition des données est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Les valeurs des différentes transitions sont les suivantes :

Analytes	MRM 1 (Quantification)	MRM2 (Qualification)
BUP	240.0 > <u>184.0</u>	240.0 > 166.0
BUPd <sub>9</sub>	249.2 > 185.0	-
HB	256.1 > <u>238.1</u>	256.1 > 167.1
HBd <sub>6</sub>	262.2 > <u>244.2</u>	-
TB	244.1 > <u>170.0</u>	244.1 > 188.0
EB	244.1 > <u>170.0</u>	244.1 > 188.0

Nous avons pu comparer les performances de la technique ainsi développée à celles d'une méthode HPLC/MS-MS utilisée au Laboratoire de Toxicologie du CHU Dupuytren à Limoges. Les principales différences se résument par une meilleure sélectivité avec une séparation totale des énantiomères EB et TB et une réduction significative du temps d'analyse (5.7 minutes vs 12.0 minutes)

### **III.4. Le GHB**

La technique de dosage du GHB a été développée pour divers milieux biologiques, le sang complet, l'urine et le contenu gastrique. La méthode comprend une extraction en phase liquide suivie d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

#### **Extraction en phase liquide**

A 20 µL de sang complet, d'urine ou de contenu gastrique, sont ajoutés 10 µL d'une solution de GHBd<sub>6</sub> titrée à 40 mg/L, 40 µL de méthanol, 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N et 4 mL d'acétate d'éthyle. Après agitation et centrifugation, la phase organique est récupérée et évaporée. L'extrait subit alors une dérivation par 30 µL de BSTFA/TMCS (99-1 ; v/v) durant 30 minutes à 70°C. Un microlitre de la solution obtenue est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse.

#### **Chromatographie par GC-MS**

Le système chromatographique est identique à celui précédemment décrit pour l'analyse de la méthadone (chromatographe gazeux Trace 2000<sup>®</sup> combiné à un spectromètre de masse DSQ<sup>®</sup> – Interscience<sup>®</sup>). La colonne chromatographique utilisée est de type VF-5MS (Varian<sup>®</sup>). La



phase mobile, constituée d'hélium N60, est délivrée à un débit constant de 1.8 mL/minute. L'analyse se réalise selon un gradient de température, à savoir une température initiale de 60°C, maintenue 2 minutes, suivie d'une augmentation de température de 10°C/minute jusque 150°C, puis d'une augmentation de 30°C/minute jusque 300°C, température maintenue durant 5 minutes. Le mode de fonctionnement du spectromètre de masse est le « Single Ion Monitoring » et les ions étudiés sont les suivants :  $233 - 204 - 117$  pour le GHB et 239 pour le GHBd<sub>6</sub>, son standard interne.

### **III.5. Les sulfamidés hypoglycémiantes**

La technique d'analyse développée au laboratoire permet le dosage d'un grand nombre de sulfamidés hypoglycémiantes, les cinq médicaments commercialisés en Belgique (glibenclamide, gliclazide, glipizide, gliquidone et glimépiride), auxquels s'ajoutent d'autres sulfonyles disponibles sur le marché international (carbutamide, chlorpropamide, tolbutamide, tolazamide, glibornuride, acétohexamide). A ces molécules insulinosécrétagogues, s'ajoute le répaglinide, seul représentant de la classe des glinides, dont le mécanisme d'action sur la sécrétion d'insuline est tout à fait comparable à celui des sulfonyles.

La technique présentée est basée sur une extraction en phase liquide suivie d'une analyse en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC/MS-MS).

#### **Extraction en phase liquide**

L'extraction est réalisée sur 500 µL de plasma, auxquels sont ajoutés 25 µL d'une solution à 10 µg/mL de glipizide d<sub>11</sub> et de glyburide d<sub>11</sub> (SI), 250 µL d'une solution 0.2 N d'acide chlorhydrique et 5 mL d'éther diéthylique. Après agitation et centrifugation, la phase organique est évaporée sous azote à une température de 40°C. L'extrait sec est repris par 200 µL d'un mélange d'acide formique 0.1 N et d'acétonitrile (90-10 ; v/v). Dix microlitres de cette solution sont utilisés pour l'analyse chromatographique.

#### **Chromatographie par UPLC-MS-MS**

Le système chromatographique est celui précédemment présenté pour le dosage du bupropion (module Acquity UPLC couplé à un spectromètre de masse Quattro Premier<sup>®</sup> de Waters). La

phase mobile est constituée d'un mélange de deux solutions, à savoir un mélange d'acide formique 0.1% - solution A - et d'acétonitrile - solution B -. Elle est délivrée à un débit de 300 µL par minute selon le gradient suivant : T<sub>0</sub> : 90% A ; T<sub>3,5</sub> : 50% A ; T<sub>8</sub> : 20% A ; T<sub>8,2</sub> : 90% A ; T<sub>9,2</sub> : 90% A. La séparation chromatographique est réalisée au moyen d'une colonne analytique Acquity UPLC<sup>®</sup> C18 (150 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm – Waters). La source électrospray d'ionisation fonctionne en mode positif. Le mode d'acquisition des données est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Les valeurs des différentes transitions sont les suivantes :

<b>Analytes</b>	<b>MRM 1 (Quantification)</b>	<b>MRM2 (Qualification)</b>
glibenclamide	494.0 > <u>369.0</u>	494.0 > 304.1
gliclazide	324.1 > <u>127.0</u>	324.1 > 110.0
glipizide	446.0 > <u>321.2</u>	446.0 > 347.1
gliquidone	528.2 > <u>403.0</u>	528.2 > 386.0
glimépiride	491.2 > <u>352.2</u>	-
glibornuride	367.2 > <u>170.0</u>	367.2 > 152.0
carbutamide	272.1 > <u>155.9</u>	272.1 > 74.0
chlorpropamide	277.0 > <u>174.9</u>	277.0 > 192.0
tolbutamide	271.1 > <u>172.0</u>	271.1 > 74.0
tolazamide	312.1 > <u>115.0</u>	312.1 > 91.0
acétohexamide	325.1 > <u>243.1</u>	325.1 > 119.0
Répaglinide	453.2 > <u>162.0</u>	453.2 > 162.0
glipizide d <sub>11</sub>	457.2 > <u>321.2</u>	457.2 > 347.1
glyburide d <sub>11</sub>	505.2 > <u>369.1</u>	-

### **III.6. Les β-lactamines**

La technique développée permet le dosage simultané de cinq β-lactamines, trois céphalosporines (céfépime, ceftazidime, céfuroxime), un carbapénème (méro pénème) et une pénicilline (pipé racilline). Elle comprend une extraction en phase solide suivie d'une analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes.

### **Extraction en phase solide (EPS)**

L'échantillon, correspondant à 500 µL de plasma auxquels sont ajoutés 50 µL de solution de standard interne (céforanide à 125 µg/mL), est extrait sur colonne C18ec préalablement reconstituée par passage de méthanol et de tampon phosphate pH 7.4. Le lavage est réalisé par passages successifs de ce même tampon (4 x 300 µL), suivi d'un mélange de ce tampon avec 5% de méthanol (2 x 300 µL). L'élution des antibiotiques se fait par ajout de méthanol (3 x 500 µL). Après évaporation sous azote à 30°C de la solution d'élution, le résidu obtenu est reconstitué dans 100 µL d'une solution de tampon phosphate et d'acétonitrile (95-5 ; v/v). Quarante microlitres de cette solution sont utilisés pour l'analyse chromatographique.

### **Chromatographie par HPLC-DAD**

Le système chromatographique est celui préalablement décrit pour le dosage des antivitamines K et de la méthadone (Alliance 2695 connecté à un détecteur à barrette de diodes 2996 – Waters), avec quelques modifications : la phase mobile consiste en un mélange d'acétonitrile (A) et de tampon phosphate pH 7.4 (B), délivrée à un débit de 1 mL/minute en mode non isocratique selon le gradient suivant (T<sub>0-5</sub> : 5% A ; T<sub>5-20</sub> : 5-50% A ; T<sub>20-21</sub> : 50% A ; T<sub>21-26</sub> : 50-5% A ; T<sub>26-31</sub> : 5% A). La technique chromatographique permet le dosage simultané des cinq antibiotiques en 35 minutes, avec détection par balayage du spectre UV de 200 à 400 nm.

## **IV. RESULTATS**

**IV.1. Les antivitamines K**

**IV.2. La méthadone**

**IV.3. Le bupropion**

**IV.4. Le GHB**

**IV.5. Les sulfamidés hypoglycémiants**

**IV.6. Les  $\beta$ -lactamines**

## **IV.1. Les antivitamines K**

Trois médicaments à activité antivitamine K sont actuellement commercialisés en Belgique : l'acénocoumarol (Sintrom<sup>®</sup>), la phenprocoumone (Marcoumar<sup>®</sup>) et la warfarine (Marevan<sup>®</sup>). Ces drogues à faible index thérapeutique sont connues pour entraîner des hémorragies sévères en cas de prescription inadaptée. Pour cette raison, les traitements antivitamines K sont régulièrement contrôlés au moyen d'un index biologique, l'INR (Rapport Normalisé International), qui détermine le temps de prothrombine. Il permet ainsi d'évaluer l'efficacité de la thérapeutique par une mesure directe du pouvoir pharmacologique anticoagulant.

Un autre type de contrôle peut être le suivi thérapeutique pharmacologique, moins classique mais tout aussi valable pour évaluer l'efficacité des traitements coumariniques. Le dosage de ces médicaments est aussi la seule façon de mettre en évidence une intoxication mortelle au moyen de prélèvements médico-légaux, où dans ce cas il est impossible de mettre en parallèle l'INR (prélèvement biologique indispensable) et l'hémorragie.

La méthode présentée permet une recherche et un dosage dans les échantillons sanguins des trois dérivés coumariniques simultanément. La validation de la technique analytique mise au point a été réalisée selon le concept de l'erreur totale comme critère de décision. Au moyen du programme Enoval de la Société Arlenda, les paramètres de validation (modèle de régression, justesse, fidélité, profil d'exactitude, limite de quantification, incertitude de mesure) ont été calculés et répondent parfaitement aux critères retenus (limites acceptables fixées à 20 %). En ce qui concerne la quantification, la méthode analytique s'est révélée linéaire de 40 à 500 µg/L (intervalle thérapeutique de 30 à 100 µg/L) pour l'acénocoumarol et de 400 à 5000 µg/L (intervalle thérapeutique de 1000 à 3000 µg/L) pour la phenprocoumone et la warfarine. Bien que ce ne soit pas l'habitude, on pourrait en théorie, grâce à la sensibilité de la méthode décrite, faire du contrôle thérapeutique en utilisant le dosage des trois médicaments antivitamines K étudiés. A fortiori, la méthode présentée pour le dosage simultané des trois antivitamines K commercialisés en Belgique peut être utilisée et est adaptée à la mise en évidence d'intoxications par ces dérivés coumariniques.

Les détails analytiques de la méthode ont été publiés dans la *publication* qui suit.

### **Publication 1**

Fatal intoxications by acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin : Method validation in blood using the total error approach, Raphaël Denooz, Zoénabo Douamba, Corinne Charlier, *Journal of Chromatography B*, **2009**; 877: 2344-2348.



## Fatal intoxications by acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin: Method validation in blood using the total error approach<sup>☆</sup>

Raphaël Denooz\*, Zoénabo Douamba, Corinne Charlier

Laboratoire de Toxicologie Clinique, Médico-Légale, Environnementale et en Entreprise, Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman B 35, B 4000 Liège, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 July 2008

Accepted 25 November 2008

Available online 11 December 2008

#### Keywords:

Anticoagulant drugs

HPLC

Total error

### ABSTRACT

A simple high-performance liquid chromatography (HPLC) method with ultraviolet (UV) detection has been developed and validated for simultaneous identification and quantification of three antivitamin K drugs (acenocoumarol, warfarin and phenprocoumon) in whole blood. The aim of this development was to propose an analytical technique adapted to the situations of forensic toxicology, i.e. intoxication with massive anticoagulant doses, when the usual coagulation tests could not be used. The blood sample, after spiked with prazepam as an internal standard (IS), was submitted to a liquid–liquid extraction (LLE) prior to HPLC analysis. A chromatographic separation was achieved on a C8 Symmetry column with a mobile phase consisting of an acetonitrile and phosphate buffer (pH 3.8) mixture in a gradient mode. Detection was carried out at a wavelength between 200 and 400 nm. This method has been validated with the concept of total error as decision criterion. Trueness ranged from 99.1% to 105.0% and precision was good with RSD between 1.3% and 6.7%. Consequently, this rapid and simple chromatographic technique is well adapted to focus intoxications with most important coumarinic drugs available on pharmaceutical market and is now routinely used in our laboratory for forensic “general unknown” screening.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The coumarinic anticoagulants have been used for more than 50 years like antithrombotic drugs, and specially in the primary and secondary prophylaxis of thromboembolic disease. These drugs are very effective and very much used. The response to these drugs is based on an inhibition of the synthesis of vitamin K-dependent coagulation factors [1]. The great individual variability in response to coumarin anticoagulant is caused by many different factors, including the rate of absorption and metabolic transformation, diet, genetically determined resistance to the drugs and also drugs concentration in blood at steady state [1,2]. Consequently, administration of these products has to be made with respect of a narrow therapeutic index, is delicate and needs regular medical control to avoid risks of haemorrhage [1,2]. Indeed, the therapeutic overdose can be at the origin of particularly serious hemorrhagic accidents, causing death in case of late medical intervention [3].

In the group of 4-OH coumarins, the most frequently used anticoagulant is warfarin in the USA and the U.K., whereas acenocoumarol and phenprocoumon are the first-choice elsewhere. These products have nearly 100% oral bioavailability and a high degree of protein binding, approximately 99%. They are metabolized by hepatic cytochrom P-450 isoenzymes with production of inactive hydroxylated metabolites [1,4–5].

Coumarins inhibit hepatic synthesis of the vitamin K-dependent coagulation factors II, VII, IX and X as well as of the anticoagulant protein C and S. They inhibit the vitamin K epoxide reductase, preventing vitamin K from being reduced to its active form, cofactor in the synthesis of these clotting factors. The optimal therapeutic effect is observed only after 3–5 days of treatment, time necessary for the consumption of synthesized factors. The nature and the amount of antivitamin K introduced do not influence this latency time, but well the duration and the importance of the delayed anticoagulant action. The reversibility of the anticoagulant effect depends on the half-life of elimination of coumarins and on the speed of renewal of the coagulation factors [1,4–5].

Therapeutic monitoring of the effect of these drugs is usually done by measuring a coagulation parameter, the international normalized ratio (INR). The risk of haemorrhage increases significantly and linearly as soon as the parameter is higher than 3 [6]. However, several situations can impose direct identification and quantification of the anticoagulant agent, particularly in forensic cases [7]. Deaths can indeed be caused by excessive doses of antivitamin K, after volunteer consumption or not. The determination of the

<sup>☆</sup> This paper is part of a special issue entitled “Method Validation, Comparison and Transfer”, guest edited by Serge Rudaz and Philippe Hubert.

\* Corresponding author at: Laboratoire de Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman B 35, B 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 366 88 16; fax: +32 4 366 88 89.

E-mail address: [Raphael.denooz@chu.ulg.ac.be](mailto:Raphael.denooz@chu.ulg.ac.be) (R. Denooz).

INR in a postmortem blood is not possible, and then only specific identification of anticoagulant drugs can confirm intoxication. All concentrations higher than the therapeutic index can be considered as potentially toxic, which was corresponding to 100 µg/L for acenocoumarol, 3600 µg/L for phenprocoumon and 3000 µg/L for warfarin [8].

The aim of this study was to develop a sensitive and specific method for the simultaneous determination of acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin in postmortem blood by HPLC DAD. The method developed has been validated with the Enoval® program [9–11]. The limits of quantification were 40 µg/L for acenocoumarol and 400 µg/L for phenprocoumon and warfarin. Regression analysis of the calibration revealed good correlation ( $R^2 > 0.995$ ) for all compounds. Accuracies were satisfactory, with CVs < 20%. The uncertainty of measurement was calculated by means of the concept of the total error.

This chromatographic technique allows the simultaneous research of oral anticoagulant drugs in forensic cases.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and chemicals

Acenocoumarol (ACN) was kindly provided by Novartis Pharma (Vilvoorde, Belgium). Phenprocoumon (PPC) was generously supplied by Roche (Bruxelles, Belgium), Warfarin (WF) by Therabel Pharma (Bruxelles, Belgium) and Prazepam (PZ) obtained by Certa (Bruxelles, Belgium). These products were obtained as certified reference compounds. Acetonitrile, methanol (MeOH), ethyl acetate and diethyl ether were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands), hydrogen chloride and sodium dihydrogenophosphate from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were at least of analytical grade. HPLC-grade water was produced by a laboratory MilliQ system (Millipore, Bruxelles, Bel-

gium). Pooled blank blood was purchased from the blood bank of the Hospital.

### 2.2. Chromatographic system

The development and validation work was carried out on a chromatographic system consisting of a Waters Alliance 2695 Separation Module, equipped with a quaternary, low-pressure mixing pump, a degassing line and a thermostated autosampler, connected with a Waters 2996 photodiode array detector (Zellik, Belgium). The Empower® software (Waters) was used to pilot the HPLC instrument and to process the data (area integration, calculation and plotting of chromatograms). Baselines were visually inspected and were manually adjusted when necessary.

HPLC separation was performed at 25 °C using a Symmetry® C8 analytical column (250 mm × 4.6 mm i.d.) packed with 5 µm diameter particles (Waters), equipped with a guard column (20 mm × 4.6 mm) containing identical packing material. The autosampler was programmed with an injection volume of 40 µL, a carousel temperature of 4 °C and a run time of 35 min.

The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and a phosphate buffer (B). It was delivered at 1 mL/min, with the following step-wise gradient elution program: 0–1.0 min, 13% A; 1.0–9.0 min, 13–35% A; 9.0–28.0 min, 35–80% A; 28.0–30.0 min, decrease from 80 to 13% A; 30.0–35.0 min, column equilibration with 13% A. The UV-vis spectra were obtained in the range 200–400 nm.

### 2.3. Solutions preparation

Phosphate buffer solution was prepared by dissolving 12 g of sodium dihydrogenophosphate solution in two liters of ultrapure water. The pH was then adjusted to 3.8 with phosphoric acid. All

**Table 1**  
Method validation.

	ACN		PPC	WF
Response function	Linear reg.		Linear reg.	Linear reg.
Trueness				
40 µg/mL	1.96 <sup>a</sup>	400 µg/mL	1.13 <sup>a</sup>	-0.33 <sup>a</sup>
60 µg/mL	-0.87 <sup>a</sup>	600 µg/mL	-0.21 <sup>a</sup>	-0.61 <sup>a</sup>
100 µg/mL	5.04 <sup>a</sup>	1000 µg/mL	0.298 <sup>a</sup>	1.76 <sup>a</sup>
250 µg/mL	4.83 <sup>a</sup>	2500 µg/mL	1.39 <sup>a</sup>	0.91 <sup>a</sup>
500 µg/mL	0.50 <sup>a</sup>	5000 µg/mL	3.08 <sup>a</sup>	4.77 <sup>a</sup>
Precision (repeatability/intermediate precision)				
40 µg/mL	4.94/5.80 <sup>b</sup>	400 µg/mL	3.54/3.57 <sup>b</sup>	5.04/6.72 <sup>b</sup>
60 µg/mL	2.73/4.60 <sup>b</sup>	600 µg/mL	3.20/3.20 <sup>b</sup>	2.46/4.86 <sup>b</sup>
100 µg/mL	2.29/3.52 <sup>b</sup>	1000 µg/mL	3.15/3.15 <sup>b</sup>	2.30/2.85 <sup>b</sup>
250 µg/mL	1.31/3.54 <sup>b</sup>	2500 µg/mL	1.70/2.53 <sup>b</sup>	3.28/3.28 <sup>b</sup>
500 µg/mL	3.40/5.34 <sup>b</sup>	5000 µg/mL	3.58/5.56 <sup>b</sup>	3.19/3.83 <sup>b</sup>
Accuracy (β-expectation tolerance)				
40 µg/mL	[-10.30; 14.22] <sup>c</sup>	400 µg/mL	[-5.94; 8.19] <sup>c</sup>	[-15.51; 14.84] <sup>c</sup>
60 µg/mL	[-12.52; 10.79] <sup>c</sup>	600 µg/mL	[-6.51; 6.09] <sup>c</sup>	[-13.79; 12.57] <sup>c</sup>
100 µg/mL	[-3.52; 13.59] <sup>c</sup>	1000 µg/mL	[-5.91; 6.50] <sup>c</sup>	[-4.46; 7.96] <sup>c</sup>
250 µg/mL	[-5.69; 15.35] <sup>c</sup>	2500 µg/mL	[-4.67; 7.44] <sup>c</sup>	[-5.56; 7.38] <sup>c</sup>
500 µg/mL	[-12.63; 13.64] <sup>c</sup>	5000 µg/mL	[-10.51; 16.67] <sup>c</sup>	[-3.42; 12.95] <sup>c</sup>
Linearity				
Range (µg/mL)	[40, 500]	Range (µg/mL)	[400, 5000]	[452, 5000]
Slope	1.007	Slope	1.033	1.051
Intercept	2.684	Intercept	-24.32	-41.25
R <sup>2</sup>	0.9953	R <sup>2</sup>	0.9959	0.9974
LLOQ (µg/mL)	40	LLOQ (µg/mL)	400	400

<sup>a</sup> Relative bias (%).

<sup>b</sup> (R.S.D. %).

<sup>c</sup> Limits (%).



prepared solutions were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  HV filter (Milipore) prior to use.

ACN, PPC, WF and PZ powders were separately dissolved in methanol to obtain stock solutions at 2 g/L. Then the solutions were mixed and appropriately diluted in methanol to obtain two pools of working solutions: the first solution at 250 mg/L for PPC and WF and 25 mg/L for ACN, and the second at 25 mg/L for PPC and WF and 2.5 mg/L for ACN, whereas the I.S., Prazepam, was diluted in methanol at 10 mg/L. These standard solutions were stored at +4 °C.

Blood calibration standards at 25, 50, 100, 200, 400 and 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ACN, and at 250, 500, 1000, 2000, 4000 and 8000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for PPC and WF were prepared by adding appropriate volumes of the respective stock solutions to blank blood. Blood validation standards were prepared at 40, 60, 100, 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ACN, and at 400, 600, 1000, 2500 and 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for PPC and WF.

#### 2.4. Sample preparation

To 1 mL of whole blood were added 100  $\mu\text{L}$  of a 10 mg/L IS solution, 1 mL of 0.2 M HCl solution and 8 mL of the extraction solvent, diethyl ether and ethyl acetate (50/50, v/v), in a 10-mL borosilicate tube. The tubes were shaken for 15 min then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The organic phase was transferred into a 10-mL borosilicate tube and evaporated to dryness at 30 °C under a gentle stream of nitrogen. Dry extracts were re-dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of a mixture of phosphate buffer–acetonitrile (95:5, v/v). The samples were transferred into vials, and 40  $\mu\text{L}$  were injected into the LC–DAD.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Method validation

A statistical approach based on the total error measurements, including both bias (trueness) and standard deviation (precision), was applied to validate the method. The tolerance interval used is called the “ $\beta$ -expectation tolerance interval”, defined as an interval in which it is expected that at least a define proportion ( $\beta$ ) will lay inside. It can be used as a predictive tool which can guarantee that at least a proportion  $\beta$  (e.g. 0.95 or 95%) of future results will be included in the set acceptance limits. With such a validation strategy, the developed method has been accepted by the laboratory for forensic identification of coumarin overdoses.

The method has been validated with the Enoval program (Arlenda, Liège, Belgium). In order to validate the method, calibration curves were tested in duplicate, one set at the beginning and the second at the end of the HPLC run, on three separate occasions. Calibration curves were obtained by plotting ratios of analyte peak area divided by internal standard peak area versus the analyte concentrations in spiked samples. Validation standards were analyzed in triplicates at five concentration levels (at 40, 60, 100, 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ACN, and at 400, 600, 1000, 2500 and 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for PPC and WF), on three different days too.

The concept of total error calculated with the Enoval program has been used to evaluate the validation parameters (regression model, trueness, precision, accuracy profile, LLOQ, etc.). The acceptance limits were fixed at  $\pm 20\%$ , which is acceptable for forensic cases definitively.

#### 3.2. Response function

Since it was acceptable, the simple linear regression was selected for validation, with consideration of the easibility. The concentration of the unknown sample was then calculated using a simple linear regression analysis model.

#### 3.3. Trueness

Trueness gives information on systematic error. It refers to the closeness of agreement between the exact concentration in certified material and the obtained mean of results. The trueness was expressed in terms of relative bias (%) for each concentration level of the five validation standards for ACN, PPC and WF (Table 1). Trueness was acceptable for the three analyzed anticoagulants, since the bias did not exceed the value of  $\pm 15\%$ .

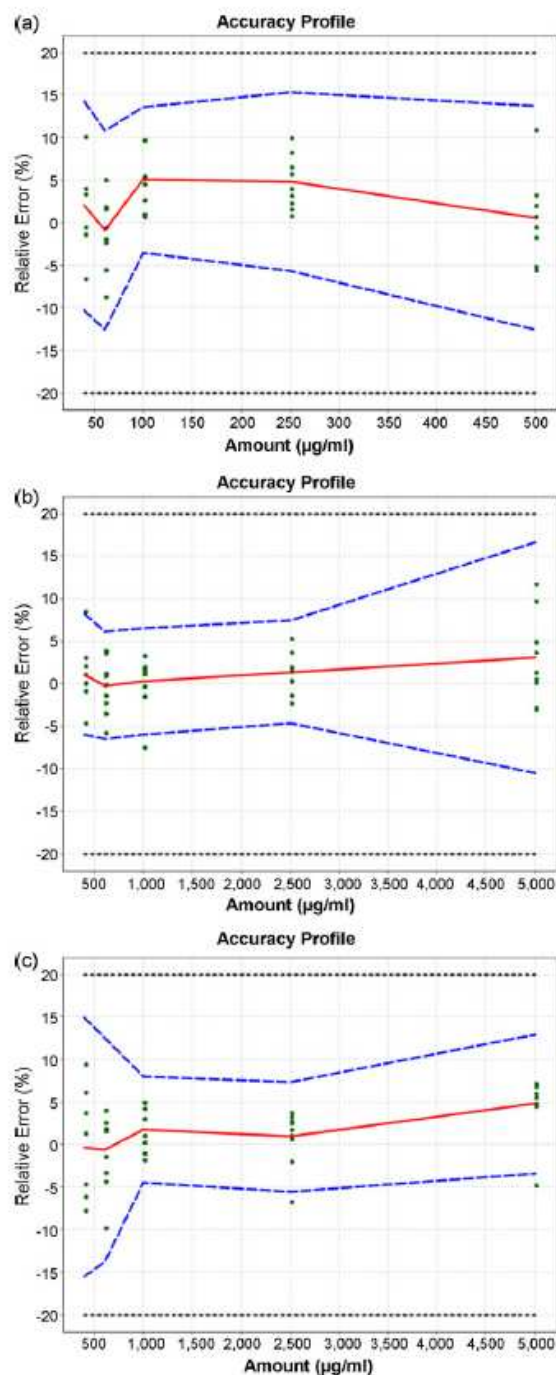


Fig. 1. Accuracy profiles for ACN (a), PPC (b) and WF (c) using a linear regression model. Relative bias (---), acceptance limits (....),  $\beta$ -expectation tolerance limits (---), relative back-calculated concentrations (·).

QC samples have been prepared by spiking whole blood samples.

### 3.4. Precision

Precision gives information about random errors and was evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision. The precision of the developed method, expressed in terms of relative standard deviation (R.S.D.) values, was determined for the different antivitamin K. The R.S.D. values were relatively low, about

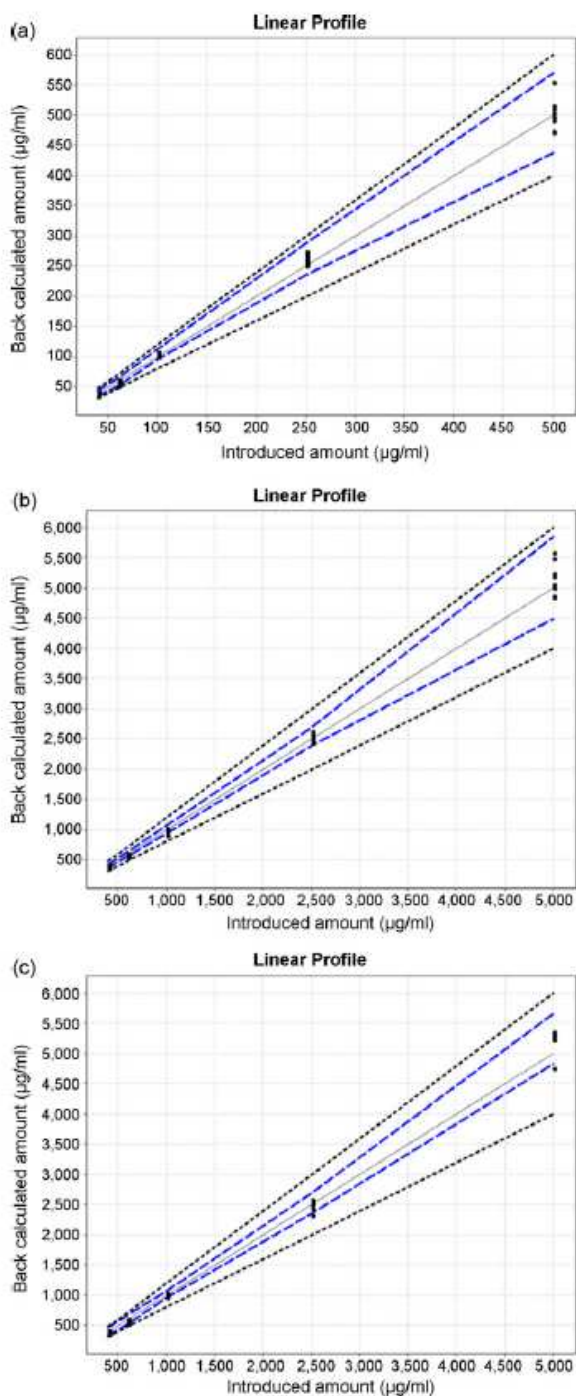


Fig. 2. Linearity profiles for ACN (a), PPC (b) and WF (c).

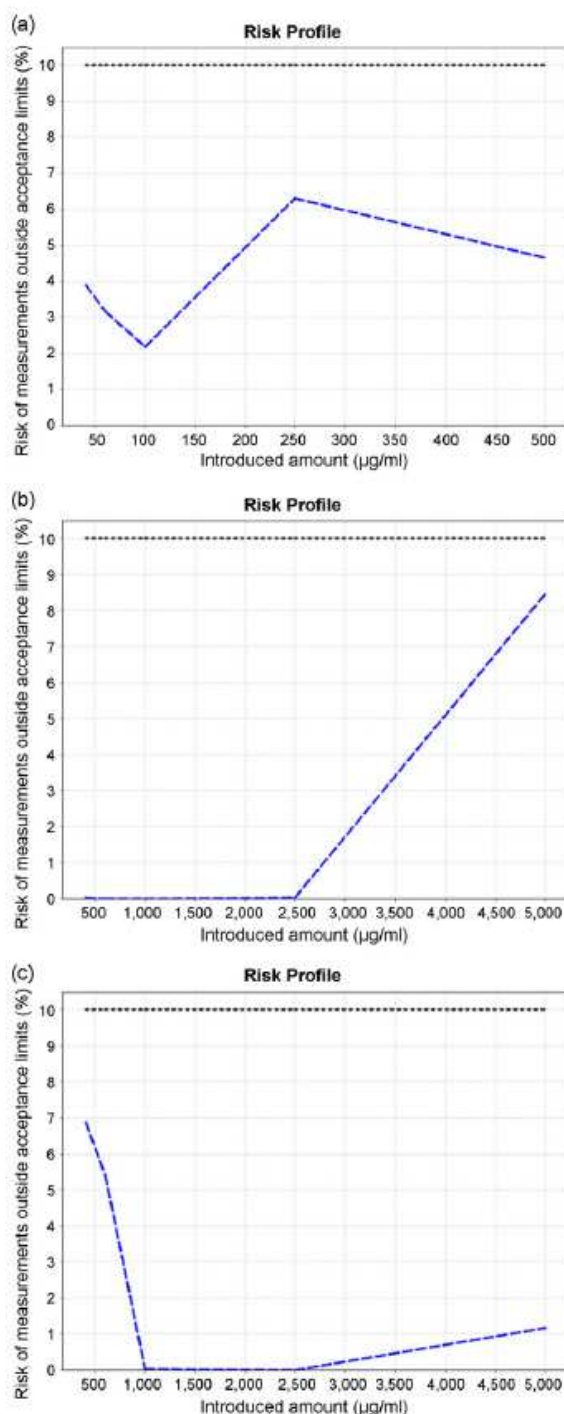


Fig. 3. Risk profiles for ACN (a), PPC (b) and WF (c) obtained by concentration level. The maximum tolerated risk is set at 10 %.

5.8%, 5.6% and 6.7%, respectively for ACN, PPC and WF. These results illustrate the good precision of the developed method.

### 3.5. Accuracy and LLOQ

The accuracy profiles for each drug are based on the total error of the measurements, i.e. systematic and random errors. Accuracy refers to the closeness of agreement between the test result and the accepted reference value, called the conventionally true value

**Table 2**  
Estimates of the measurement uncertainties related to acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin.

Analyte	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Uncertainty of the bias ( $\mu\text{g/L}$ )	Uncertainty ( $\mu\text{g/L}$ )	Expanded uncertainty ( $\mu\text{g/L}$ )	Relative expanded uncertainty (%)
Acenocoumarol	40	0,96	2,51	5,02	12,55
	60	1,39	3,09	6,18	10,30
	100	1,72	3,92	7,83	7,83
	250	4,87	10,10	20,20	8,08
	500	13,18	29,79	59,58	11,92
Phenprocoumon	400	4,86	15,10	30,19	7,55
	600	6,40	20,23	40,46	6,74
	1000	10,50	33,20	66,40	6,64
	2500	30,54	70,27	140,5	5,62
	5000	136,6	309,7	619,5	12,39
Warfarin	400	12,25	29,53	59,05	14,76
	600	15,34	32,96	65,92	10,99
	1000	12,36	31,04	62,09	6,21
	2500	27,37	86,55	173,1	6,92
	5000	80,84	207,7	415,4	8,31

too. Acceptance limits were settled at 20% for each concentration level. The method can be considered as accurate for each concentration included in the tested range. Limit of quantification has been determined at 40  $\mu\text{g/L}$  for ACN, at 400  $\mu\text{g/L}$  for PPC and for WF (Fig. 1).

### 3.6. Linearity

The linearity of an analytical method is the ability within a definite range to obtain results directly proportional to the concentration (quantity) of the analyte in the sample. For the different anticoagulants, the model of regression selected was the linear regression model. Indeed, as presented in Table 1, these models can be considered as linear with slope values obtained for the different anticoagulants always between 0.85 and 1.15, the optimal range [12,13]. The linearity of the model of regression selected was also demonstrated using the absolute  $\beta$ -expectation tolerance limits, with acceptance limit at 20% expressed in the concentration units. The method was considered as valid within the range for which the dashed curves are within the dotted acceptance limits (Fig. 2).

### 3.7. Risk assessment

By using the  $\beta$ -expectation tolerance intervals obtained with the previously selected regression models, risk of having future measurement falling outside the specified acceptance limits was assessed. The maximum risk tolerated was set at 10%. Fig. 3 shows the risk profiles for each studied anticoagulants. In all cases the risk did not exceed 10%.

### 3.8. Uncertainty assessment

Uncertainty of measurements has been evaluated by the same validation study. In fact, as long as the experimental design used for the validation is representative of the sources of variability that will be encountered during routine analysis, this uncertainty estimate is relevant for the results obtained in the laboratory having validated the analytical procedure. As shown in Table 2, the relative expanded uncertainty of each anticoagulant irrespective of the concentration levels did not exceed 20%.

## 4. Conclusions

The validation method developed for the identification and quantification of acenocoumarol, warfarin and phenprocoumon with the concept of total error for decision criterion gave us complete satisfaction. Indeed, the aim of this development was to propose an analytical technique adapted to the situations of forensic toxicology, i.e. intoxication with massive anticoagulant doses. Analysis of these three anticoagulant drugs have been made in one simple injection with a satisfactory analytical quality since the calculated total error does not exceed 20%. Analytical method is linear from 40 to 500  $\mu\text{g/L}$  for ACN, and from 400 to 5000  $\mu\text{g/L}$  for PPC and WF. These blood concentrations include toxic level for ACN (100  $\mu\text{g/L}$ ). For PPC and WF intoxications, blood samples need to be diluted in order to be quantified.

The uncertainty study revealed a maximum 20% of error, which is very satisfying for forensic cases. Consequently, simultaneous research, and, if necessary, quantification, of coumarinic drugs available on pharmaceutical market can be performed easily by forensic toxicological laboratories.

## References

- [1] M. Ufer, Clin. Pharmacokinet. 44 (2005) 1227.
- [2] J.M. Cesar, A. Garcia-Avello, J.L. Navarro, M.V. Herraez, Blood Coagul. Fibrin. 15 (2004) 673.
- [3] J. Cruickshank, M. Ragg, D. Edey, Emerg. Med. Australas. 13 (2001) 91.
- [4] R.B. Saraeva, I.D. Paskaleva, E. Doncheva, C.B. Eap, V.S. Ganey, J. Clin. Pharm. Ther. 32 (2007) 641.
- [5] F.J. Penning-van Beest, J. Koerselman, R.M. Herings, J. Thromb. Haemost. 6 (2008) 284.
- [6] J.H. van Geest-Daalderop, B.A. Hutten, N.C. Pequeriaux, H.J. De Vries-Goldschmeding, E. Rakers, M. Levi, Thromb. Haemost. 98 (2007) 747.
- [7] T. Hohler, J. Becker, K.H. Meyer zum Buschenfelde, C. Rittner, Int. J. Legal Med. 108 (1996) 268.
- [8] M. Schulz, A. Schmoltdt, Pharmazie 12 (1997) 895.
- [9] Arlenda Home Page, <https://www.arlenda.com>, e.noval Version V2.0c PROD, March 2008.
- [10] P. Hubert, E. Rozet, B. Boulanger, W. Dewé, M. Laurentie, N. Dubois, C. Charlier, M. Feinberg, Acta Clin. Belg. 61 (2006) 54.
- [11] FDA Home Page, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>, June 2008.
- [12] P. Hubert, et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 579.
- [13] P. Hubert, et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 760.

## IV.2. La méthadone

La méthadone est un médicament dont la fréquence de prescription est importante comme traitement de substitution à l'héroïne. Elle est également utilisée de façon illicite comme drogue de rue.

Ses propriétés pharmacologiques sont très intéressantes, mais sa toxicité est tout aussi remarquable et redoutable. Les manifestations indésirables qu'elle engendre peuvent apparaître pour des concentrations plasmatiques très variables et parfois relativement faibles, notamment dans l'intervalle thérapeutique (150 à 400 µg/L). On peut dire qu'il existe un large chevauchement entre les concentrations plasmatiques thérapeutiques de méthadone et celles associées à des signes de toxicité. Depuis longtemps, la technique chromatographique développée au laboratoire a été mise à la disposition des Cliniciens, psychiatres surtout, qui vérifient ainsi la compliance de leurs patients et contrôlent la réponse biologique aux doses administrées. La détermination exacte de la posologie à administrer à chaque patient, adaptée sur base des résultats analytiques obtenus, est capitale pour assurer le succès thérapeutique et éviter toute intoxication.

Sur base de cas médico-légaux traités au sein du Service de Toxicologie clinique entre octobre 2002 et avril 2005, on a pu constater la gravité de la toxicité potentielle d'une administration de méthadone. Pendant cette période de 30 mois, 23 décès liés à la méthadone ont été répertoriés :

- 11 sujets présentaient des taux plasmatiques de méthadone supérieurs à l'intervalle thérapeutique supérieur (400 µg/L),
- 10 sujets révélaient des taux plasmatiques compris dans l'intervalle thérapeutique,
- 2 sujets manifestaient un taux plasmatique inférieur à la valeur thérapeutique basse.

Evidemment, dans le sang de ces 23 patients décédés, d'autres médicaments ont été retrouvés : des benzodiazépines (18 fois), des stupéfiants (15 fois), de l'alcool (2 fois).

La nature et la fréquence des xénobiotiques associés à la méthadone se trouvent à la figure 1 de la *publication* ci-après.

La même analyse, réalisée sur les dossiers médicaux légaux réceptionnés au laboratoire entre mai 2005 et avril 2010, confirme la forte toxicité de la méthadone puisqu'elle est directement impliquée dans 75 décès durant cette période.

## **Publication 2**

Revue des cas d'intoxication mortelle à la méthadone : observations recensées au CHU de Liège, Raphaël Denooz, Corinne Charlier, Acta Clinica Belgica, **2006**; 61 suppl. 1: 32-36.

## REVUE DES CAS D'INTOXICATION MORTELLE A LA METHADONE: OBSERVATIONS RECENSEES AU CHU DE LIEGE

R. Denooz, C. Charlier

Key words : Méthadone, Intoxications mortelles, Drogues, Toxicologie Médico-légale

### ABSTRACT

All methadone-associated deaths from October 2002 to April 2005 are analysed. A regular increase in these fatal intoxications has been recorded, in Belgium as in other countries, due, in particular, to an intensified prescription of this product, of which illicit use as street dope becomes problematic.

Over the 30 months period covered by the study, 26 deaths related to methadone were listed, of which 3 occurred in accidental circumstances. In the other 23 cases, methadone can be found, yet always associated with psychotropic substances, mainly benzodiazepines (18 cases), narcotics (15 cases) and finally alcohol (5 cases).

Based upon the nature of the products combined with methadone, records have been divided in two groups:

- in the first group (17 observations), xenobiotics at (infra)therapeutic levels are detected.
- in the other group (6 observations), xenobiotics at high and toxic levels are detected.

Blood methadone concentrations are not so different between the 2 groups of individuals since the median values and the extreme values are worth respectively 308, and 110-11300 µg/L, for the first group and 776 and 93-2080 µg/L for the second group. There is thus an important overlap between the therapeutic blood methadone concentrations (150-400 µg/L) and blood concentrations observed in fatalities. Thus, it is necessary that all information and post-mortem results must be examined in a critical way to identify and justify cause of the death.

### INTRODUCTION

La méthadone a été d'abord utilisée pendant la seconde guerre mondiale pour ses propriétés analgésiques. Ce n'est qu'au début des années 60 qu'elle fut préconisée aux Etats-Unis dans les traitements de substitution à l'héroïne. Ses remarquables propriétés pharmacologiques s'expliquent par sa forte affinité pour les récepteurs cellulaires aux opiacés et par sa longue durée d'action, permettant d'envisager une thérapie substitutive comprenant une seule prise du produit par jour. Son utilisation s'est aujourd'hui répandue dans le monde entier parce qu'elle permet de réduire efficacement la consommation de drogues illicites administrées par injection, ainsi que la transmission de maladies virales (HIV, hépatites B et C) liée à la contami-

Laboratoire de Toxicologie Clinique et Médico-légale,  
CHU-B35,  
B4000 Liège, Belgique

Address for correspondence :  
R. Denooz  
Résident spécialiste  
Laboratoire de Toxicologie clinique et Toxicologie Médico-légale  
Tour 2, 5ème étage  
CHU Sart Tilman B-35  
B 4000 Liège  
Belgique  
Tel.: + 32 4 366 88 16  
Fax: + 32 4 366 88 85  
E-mail: raphael.denooz@chu.ulg.ac.be

nation de seringues employées par les toxicomanes. Les patients sous traitement de substitution peuvent aussi espérer une amélioration de leurs aptitudes socioprofessionnelles. Il est évident que le fléau engendré par la consommation de drogues «dures» est et reste un sujet de préoccupation majeure en matière de Santé Publique.

Les intéressantes propriétés pharmacologiques de la méthadone ne peuvent cependant faire oublier sa forte toxicité, objectivée par un nombre important de décès qui lui sont imputables. Des cas d'intoxications mortelles à la méthadone ont été observés depuis de nombreuses années dans tous les pays où le produit est autorisé. Il n'y a évidemment et malheureusement pas de doute qu'un nombre important d'héroïnomanes, utilisant le traitement de substitution à la méthadone, continuent à consommer, de manière intermittente au moins, de l'héroïne. Ce fait est particulièrement vrai dans les premiers mois du sevrage, exposant alors le sujet à un risque accru d'overdose. Il est ainsi inévitable qu'un produit actif dans le traitement d'addiction, aussi importante que l'héroïnomanie, soit impliqué dans des intoxications mortelles, qu'elles soient accidentelles ou volontaires, ce qui est confirmé par la présence relativement fréquente de méthadone dans les prélèvements post-mortem (1-6).

De nombreux décès mettant en cause la méthadone ont été constatés chez des sujets toxicomanes non inscrits dans des programmes de sevrage. Les victimes peuvent aussi être des proches de patients sous traitement substitutif, parfois après une seule exposition à ce médicament, ou tout aussi fréquemment des enfants, après absorption de sirop ou de gélules de méthadone laissés par inattention et par négligence à leur portée. Parfois, les parents peuvent également administrer «leur» méthadone à leurs enfants dans le but de les calmer (!).

Pour réduire ce risque important, les autorités sanitaires ont légiféré pour rendre la délivrance de la méthadone strictement sous contrôle, obligeant le toxicomane à un suivi régulier auprès de professionnels de la Santé (médecins, pharmaciens, psychologues, assistants sociaux,...), et quand cela s'avère possible, à une consommation du produit directement à la pharmacie. Malgré cela, la méthadone est rapidement devenue une drogue de rue, aussi facilement accessible que les drogues illicites.

Notre expérience limitée dans le domaine de la toxicologie médico-légale, basée sur seulement trois années d'expertise, nous permet toutefois de confirmer le nombre élevé de décès où la méthadone est impliquée.

## MATERIEL ET MÉTHODES

Sur une période de deux ans et demi (octobre 2002 - avril 2005), on a étudié tous les dossiers médico-légaux où la méthadone a été identifiée dans des prélèvements provenant d'individus décédés. Les examens toxicologiques ont toujours été réalisés sur du sang, préférentiellement périphérique (fémoral), et parfois sur des urines si cela s'avérait possible. Les analyses de prélèvements d'organes n'ont pu être effectuées de manière systématique, puisque la décision d'autopsies était laissée à l'appréciation du médecin légiste.

Le screening toxicologique s'appuie sur des techniques immunologiques et chromatographiques :

- dans les urines, les stupéfiants (cannabinoides, opiacés, cocaïne et amphétamines), les benzodiazépines et les antidépresseurs tricycliques ont été mis en évidence par méthode immunochimique (Axsym® - Abbott). Le résultat, positif ou négatif, a été systématiquement confirmé par une chromatographie appropriée ;
- dans le sang
  - . l'éthanol et les solvants ont été évalués au moyen d'un chromatographe gazeux équipé d'un injecteur à espace de tête et d'un détecteur à ionisation de flamme (HS-GC-FID),
  - . les stupéfiants ont été dosés par une méthode chromatographique reliée à un spectromètre de masse (GC-MS),
  - . les médicaments, psychotropes et autres, ont été appréciés, après extraction à pH acide et à pH basique, par chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrettes de diodes (HPLC-DAD) et par GC-MS ;
- dans l'urine et dans le sang, la méthadone a été recherchée après extraction liquide-liquide en milieu basique, par HPLC-DAD. En cas de résultat positif, le dosage de la méthadone a été confirmé par GC-MS.

## RÉSULTATS

Les résultats présentés reposent sur l'examen de 26 dossiers parmi lesquels 3 concernaient des cas de mort survenue au cours d'accidents (deux incendies et un accident de travail). Pour les 23 dossiers restants, la méthadone est impliquée dans le décès, toujours associée à des xénobiotiques (alcool, stupéfiants, psychotropes : benzodiazépines, antidépresseurs, neuroleptiques, barbituriques, etc.)

Les différentes observations ont été réparties en 2 groupes. Dans le premier groupe, on trouve 17



individus pour lesquels la méthadone était présente dans le sang, en association avec des xénobiotiques à concentration thérapeutique, voire infra-thérapeutique (tableau 1). Dans l'autre groupe, constitué de 6 sujets, la méthadone était également présente dans le sang, accompagnée par des xénobiotiques à concentration toxique (tableau 2).

## DISCUSSION

Les méthadonémies observées dans les 23 dossiers médico-légaux étudiés sont très variables. En tenant compte des taux sériques thérapeutiques communément admis (entre 150 et 400 µg/L), on peut envisager de classer les sujets de notre étude en 3 catégories :

**Tableau 1 - Résultats obtenus dans le groupe de sujets présentant une méthadonémie positive associée à des xénobiotiques en concentration (infra)thérapeutique.**

Dossier	Méthadonémie (µg/L)	Psychotropes	Xénobiotiques associés	
			Stupéfiants	Alcool (g/L)
1	110	Lorazépam	MDMA, MDA	-
2	163	Alprazolam, Bromazépam, Clonazépam, Nordiazépam	THC-COOH	-
3	173	Flurazépam	-	-
4	174	Tétrazépam, Trazadone, Prothipendil	-	0,20
5	178	-	THC, THC-COOH	-
6	198	Bromazépam	THC, Benzoylécgonine	-
7	250	Diazépam, Mélicitrène	Benzoylécgonine	-
8	255	-	THC, THC-COOH	-
9	308	Lorazépam, Citalopram, Paroxétine, Tramadol	Cocaïne, Benzoylécgonine	-
10	310	Diazépam, Nordiazépam	MDMA	0,38
11	369	Alprazolam	THC-COOH	-
12	454	-	-	-
13	463	Diazépam, Nordiazépam, Citalopram	THC-COOH	-
14	542	Diazépam, Nordiazépam, Oxazépam	Benzoylécgonine	-
15	1272	Sertraline	-	-
16	1380	-	THC, THC-COOH	-
17	11300	Lormétazépam	-	-

**Tableau 2 - Résultats obtenus dans le groupe de sujets présentant une méthadonémie positive associée à des xénobiotiques en concentration supra-thérapeutique (toxique).**

Dossier	Méthadonémie (µg/L)	Psychotropes (µg/L)	Xénobiotiques associés	
			Stupéfiants (µg/L)	Alcool (g/L)
18	93	Diazépam (507) Nordiazépam (847) Prothipendil (632)	-	2,72
19	704	Alprazolam (30) Clonazépam (15) Sertaline (888)	THC (2.0) THC-COOH (10.5)	1,31
20	726	Bromazépam (871)	-	-
21	827	Bromazépam (2865) Diazépam (28) Nordiazépam (246)	-	0,23
22	936	Clotiazépam (645) Clonazépam (35) Pirpampérone (1918)	THC-COOH (4.2)	-
23	2080	Bromazépam (1239) Mirtazapine (196) Codéine (65)	Benzoylécgonine (1083)	-

- ceux dont le taux sérique est supra-thérapeutique (>400 µg/L), au nombre de 11,
- ceux dont le taux sérique est thérapeutique, au nombre de 10,
- ceux dont le taux sérique est infra-thérapeutique (<150 µg/L), au nombre de 2.

Certes, on peut s'étonner de relever des cas de décès où la méthadone a été retrouvée dans le sang à de faibles concentrations (6 cas inférieurs à 200 µg/L), en l'absence de taux élevés d'autres xénobiotiques. Mais des concentrations basses en méthadone peuvent être toxiques si elles concernent des individus, non héroïnomanes, qui absorbent de la méthadone pour la première fois.

Les méthadonémies (valeurs médianes et valeurs extrêmes) retrouvées dans notre étude sont équivalentes à celles décrites dans la littérature (tableau 3), à l'exception d'un résultat particulièrement élevé à 11300 µg/l (6-9). En excluant cette dernière valeur, le résultat le plus élevé est de 2080 µg/l.

Les valeurs médianes des méthadonémies sont de 308 µg/l (méthadone et xénobiotiques à concentration thérapeutique ou infra-thérapeutique) et de 776 µg/l (méthadone et xénobiotiques à concentration toxique).

Si la méthadonémie est plus élevée quand les xénobiotiques associés sont présents en concentration toxique, les valeurs extrêmes de méthadonémie sont assez semblables, puisqu'en faisant abstraction de la concentration sérique exceptionnelle à 11300 µg/l, elles sont comprises entre 110 à 1380 µg/l dans le premier groupe et entre 93 et 2080 µg/l dans le second groupe.

En ce qui concerne la nature des xénobiotiques associés, on peut remarquer que la méthadone n'a jamais été retrouvée seule mais toujours accompagnée par d'autres médicaments (figure 1). Ces résultats mettent en évidence une polyconsommation importante avec un rôle vraisemblablement très significatif des psychotropes (19 cas) et des stupéfiants (15 cas). La présence de

Tableau 3 - Valeurs médianes et valeurs extrêmes de méthadonémies publiées dans la littérature comparées à celles observées dans notre étude.

	Cas étudiés (n)	Valeurs Médianes (µg/L)	Valeurs Minimales et Maximales (µg/L)
Sheffield	16	294	49 - 2440
Palm Beach	75	441	50 - 1903
Jefferson	30	599	-
		(Moyenne)	
Liège	23	369	93 - 11300
		(Moyenne)	

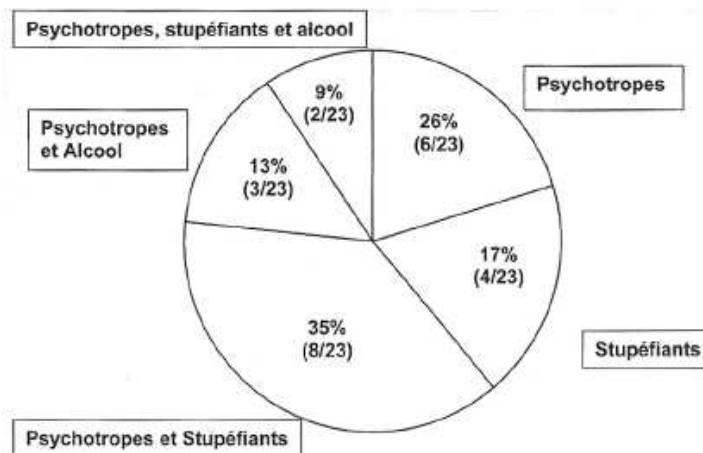


Figure 1 : Nature et fréquence des xénobiotiques associés à la méthadone

benzodiazépines (18 cas), parfois associées à l'alcool (5 cas), accentue très certainement la dépression respiratoire induite par la méthadone.

Dans ces conditions, la responsabilité de la méthadone dans les décès repris dans notre étude est difficile à évaluer. Certains taux sanguins étaient compris dans l'intervalle thérapeutique préconisé pour des sujets tolérants. La quantité de méthadone capable d'entraîner la mort est en tout cas très variable, selon qu'elle est utilisée chez des sujets tolérants ou non, et a fortiori chez des enfants.

### ABSTRACT

Tous les dossiers, enregistrés entre octobre 2002 et avril 2005, concernant les décès impliquant la méthadone, ont été analysés. On constate une augmentation régulière de ces intoxications mortelles, en Belgique comme dans d'autres pays, en raison notamment d'une prescription intensifiée du produit dont l'usage illicite comme drogue de rue devient problématique.

Sur la période de 30 mois concernée par l'étude, 26 décès liés à la méthadone ont été recensés, dont 3 sont survenus dans des circonstances accidentelles. Dans les 23 autres cas, la méthadone est présente mais toujours associée à des psychotropes, principalement les benzodiazépines (18 cas), les stupéfiants (15 cas) et enfin, l'alcool (5 cas).

En se basant sur la nature des produits associés à la méthadone, on a constitué 2 groupes de sujets :

- dans le premier groupe (17 observations), on note la présence de xénobiotiques à des taux (infra)thérapeutiques ;
- dans le second groupe (6 observations), les xénobiotiques sont présents à des taux élevés et toxiques.

Les méthadonémies ne sont pas très différentes dans les 2 groupes d'individus puisque les valeurs médianes et les valeurs extrêmes sont respectivement de 308 et de 110-11300 µg/L pour le premier groupe et de 776 et de 93-2080 µg/L pour le second groupe. Il existe donc un chevauchement important entre les concentrations sanguines thérapeutiques de méthadone (150 – 400 µg/L) et les concentrations sanguines observées dans les cas mortels. Aussi, faut-il insister sur le fait que toutes les informations et résultats post-mortem doivent être examinés de façon critique pour identifier et justifier la cause du décès.

### REFERENCES

1. Heinemann A, Iwersen-Bergmann S, Stein S, Schmoldt A, Püschel K. Methadone-related fatalities in Hamburg 1990-1999: implications for quality standards in maintenance treatment? *Forensic Sci Int.* 2000; 113: 449-55.
2. Gagajewski A, Apple FS. Methadone-related deaths in Hennepin County, Minnesota: 1992-2002. *J Forensic Sci.* 2003; 48: 668-71.
3. Karch SB, Stephens BG. Toxicology and pathology of deaths related to methadone: retrospective review. *West J Med.* 2000; 172: 11-4.
4. Grab H, Behnsen S, Kimont H G, Staak M, Häferstein H. Methadone and its role in drug-related fatalities in Cologne 1989-2000. *Forensic Sci Int.* 2003; 132: 195-200.
5. Musshoff F, Lachenmeier DW, Madea B. Methadone substitution: medicolegal problems in Germany. *Forensic Sci Int.* 2003; 133: 118-24.
6. Wolff K. Characterization of Methadone Overdose: Clinical Considerations and the Scientific Evidence. *Ther Drug Monit.* 2002; 24: 457-70.
7. Milroy C M, Forrest A R W. Methadone deaths: a toxicological analysis. *J Clin Pathol.* 2000; 53: 277-81.
8. Wolf BC, Lavezzi WA, Sullivan LM, Flannagan LM. Methadone-related deaths in Palm Beach County. *J Forensic Sci.* 2004; 49: 375-8.
9. Mikolaenko I, Robinson C A, Davis C G. A review of Methadone Deaths in Jefferson County, Alabama. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23: 299-304.

### **IV.3. Le bupropion**

De structure chimique comparable à celle de l'amphétamine, le bupropion peut provoquer des manifestations indésirables associant troubles cardiaques (tachycardie, hypertension, arythmies) et convulsions. Plusieurs cas de décès liés à une prise excessive de cette drogue sont rapportés dans la littérature. Un cas mortel d'overdose au bupropion a été étudié dans notre laboratoire et a fait l'objet de publications annexées. La sévérité de cette toxicité a logiquement conduit au retrait du médicament assez rapidement après sa première commercialisation. Par la suite, le bupropion a été réintroduit dans l'arsenal thérapeutique avec comme indication pharmacologique le traitement de la dépendance au tabac (Zyban® - 1997) et la dépression (Wellbutrin® - 2007).

La technique analytique que nous avons développée permet le dosage dans le sang du bupropion et de ses 3 principaux métabolites - l'hydroxybupropion, le thréohydrobupropion et l'érythrohydrobupropion -. La détection des différentes molécules a été réalisée au moyen d'un module de séparation Acquity UPLC couplé à un spectromètre de masse Quattro Premier selon le mode d'acquisition MRM. La validation de la méthode a été effectuée selon le concept de l'erreur totale avec le logiciel Enoval®. La linéarité est acquise pour des valeurs de 5 à 1000 ng/mL pour le bupropion et de 10 à 2000 ng/mL pour les 3 métabolites. Les profils d'exactitude (80-120%), la précision (<15%) et les limites de détection, fixées à 1 ng/mL pour le bupropion et à 2 ng/mL pour les métabolites, ont également été évalués et répondent à tous les critères de validation. Cette technique de grande sensibilité et de haute spécificité (voir *publication 3*) est parfaitement adaptée au suivi thérapeutique pharmacologique du bupropion, puisque les concentrations thérapeutiques sont de 25 à 100 ng/mL pour le bupropion (linéaire de 5 à 1000 ng/mL).

Ce sujet avait également au préalable fait l'objet d'un article (voir *publication 4*) présentant le cas d'une intoxication mortelle au bupropion dans un cadre médico-légal.

### **Publication 3**

Ultra-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Bupropion and its Main Metabolites in Human Whole Blood, Raphaël Denooz, Magali Mercerolle, Gérard Lachâtre, Corinne Charlier, *Journal of Analytical Toxicology*, **2010**; 34, *in press*.

# Ultra-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Bupropion and its Main Metabolites in Human Whole Blood

Raphael Denooz<sup>1,\*</sup>, Magali Mercerolle<sup>2</sup>, Gérard Lachâtre<sup>2</sup>, and Corrine Charlier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service de Toxicologie Clinique, Médicolégale, Environnementale et en Entreprise, Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, ULg, Centre Hospitalier Universitaire Sart Tilman B35, Liege, Belgium and <sup>2</sup>Service de Pharmacologie et Toxicologie—Centre Régional de Pharmacovigilance, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges, France

## Abstract

A selective and sensitive ultra-performance liquid chromatography (UPLC)–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (MS) method for simultaneous determination of bupropion and its main metabolites, hydroxybupropion, erythrohydrobupropion, and threo hydrobupropion, in human whole blood is presented. The sample preparation consists of cleanup protein precipitation with methanol combined with a solid-phase extraction on Oasis HLB cartridges. Analytes were separated on a Waters Acquity UPLC® BEH phenyl column using a binary mobile phase consisting of ammonium formate buffer (2 mM, pH 4) and acetonitrile. Detection was performed on a Waters Acquity UPLC system coupled to a Quattro Premier triple-quadrupole MS in positive ion selected reaction monitoring. Internal standards were bupropion-*d*<sub>9</sub> and hydroxybupropion-*d*<sub>6</sub>. Linearity was from 5 to 1000 ng/mL for bupropion and from 10 to 2000 ng/mL for metabolites. Accuracy profiles (80–120%), precision (< 15%), and limits of detection (1 ng/mL for bupropion and 2 ng/mL for metabolites) were also evaluated and responded to all criteria of validation. The aim of this study was to compare this presented method with a previously described method developed on a classic liquid chromatography–tandem MS system.

## Introduction

Bupropion (BUP) is an aminoketone widely used as antidepressant and non-nicotine pharmacotherapy for smoking cessation (1). It was reported to weakly inhibit dopamine and norepinephrine reuptake (2). It has also been studied as anorexigenic drug and to correct bipolar and attention-deficit hyperactivity disorders (3).

BUP is extensively metabolized in the body with less than 0.5% of product recovered intact in urine. Three pharmacologically active metabolites are formed: hydroxybupropion (HB), via *t*-butylhydroxylation and subsequent formation of

the morphinol ring, and the isomers threo hydrobupropion (TB) and erythrohydrobupropion (EB), via reduction of the carbonyl group (4). Figure 1 represents chemical structures of BUP, HB, EB, and TB. Animal models have suggested that the activity of HB and both TB and EB isomers represent 50% and 20% of the BUP activity, respectively (5). The elimination half-lives for these compounds are quite different: 8 h for BUP and 19–35 h for HB, TB, and EB (6).

As HB is almost exclusively generated by CYP2B6 (7–9), BUP has been used for many years as phenotypic marker to explore interindividual variability in the expression of this cytochrome. Several different analytical techniques have been developed to determine BUP in blood, including chiral or achiral methods, gas and liquid chromatography (LC), and UV or mass spectrometric (MS) detection (4,5,10,11). The most impressive techniques associated chiral chromatography with MS, generating good separations of the different isomers and high sensitivity and selectivity (5).

In a previous paper (12), we described a sensitive and reproducible method for the identification and the quantitative determination of BUP and its main metabolites in a case of fatal BUP overdose. The presented method was performed with a high-performance liquid chromatography (HPLC) system consisting of a series 200LC microflow rate (PerkinElmer, Wellesley, MA) coupled with an API 2000 LC–MS–MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The chromatographic conditions included a Symmetry Shield RP<sub>18</sub> column used with a gradient of ammonium formate buffer and acetonitrile mixture.

The aim of our present study is to compare the performance of this previously described method with the results obtained using an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system. We have tested an Acquity UPLC coupled with a Quattro Premier MS (Waters, Milford, MA). We can conclude a better selectivity of the system because EB and TB can be separated with linearity from 10 to 2000 ng/mL.

\* Author to whom correspondence should be addressed.

## Experimental

### Chemicals and reagents

BUP, bupropion- $d_9$  (BUP- $d_9$ ), HB, and hydroxybupropion- $d_6$  (HB- $d_6$ ), each at 1 mg/mL, were purchased from LGC Standards (Molsheim, France). EB and TB powders were kindly provided by GlaxoSmithKline (Stevenage, U.K.) as hydrochloride salts. Methanol, acetonitrile, and water (all of LC-MS quality) were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Formic acid and ammonium formate were from Sigma (Bornem, Belgium). Methylene chloride, propan-2-ol, and zinc sulfate were from VWR (Leuven, Belgium). All reagents were at least analytical grade. Pooled blank blood was purchased from the blood bank of the hospital. Oasis<sup>®</sup> HLB extraction cartridges (sorbent 60 mg; 3 mL) were from Waters.

### Stock solutions

The stock standard solutions of EB and TB were prepared in methanol at 1 mg/mL. Then, solutions of EB, TB, BUP, and HB were mixed and appropriately diluted in methanol to obtain three pools of working solutions at 1, 0.1, and 0.01 mg/L for BUP and at 2, 0.2, and 0.02 mg/L for HB, EB, and TB. BUP- $d_9$ , used as internal standard for BUP, and HB- $d_6$ , used as internal standard for HB, EB, and TB, were prepared in methanol at 1 mg/L. These working solutions were stored at 4°C.

### Sample preparation

Calibration standards were prepared by adding standard spiking solutions to 100  $\mu$ L of drug-free human whole blood with 50  $\mu$ L of internal standard solution. The first step of sample preparation consisted of adding to the blood 0.5 mL of a mixture of zinc sulfate saturated aqueous solution and methanol (70:30, v/v). Spiked blood samples were vortex mixed for 10 s and centrifuged at 3000 rpm for 5 min in order to eliminate blood proteins. Supernatants were transferred to 10-mL glass tubes, completed by 2 mL of deionized water, and vortex mixed for 10 s. The cleanup procedure of the biological samples was performed by SPE using the 24 tubes vacuum manifold Macherey-Nagel (Düren, Germany). The Oasis HLB cartridges were conditioned

with 2 mL of methanol followed by 2 mL of deionized water. Supernatants were loaded on the cartridges and completely drawn through under light vacuum (typically 5 mm Hg). The cartridges were washed with 3 mL of deionized water and with 3 mL of a mixture of deionized water and methanol (90:10, v/v). Cartridges were dried for 15 min to eliminate washing solutions. BUP and metabolites were then desorbed with 3 mL of a methylene chloride and propan-2-ol mixture (75:25, v/v) and collected in 10-mL glass tubes. The eluted solutions were evaporated under a nitrogen stream at 30°C, and the residue was reconstituted with 100  $\mu$ L of a mixture of acetonitrile and formate buffer (2 mM, pH 4.0, 10:90, v/v). Samples were introduced in 200- $\mu$ L HPLC microvials, and 10  $\mu$ L was injected into the LC-electrospray ionization (ESI)-MS-MS system.

### Chromatographic system

LC-ESI-MS-MS measurements were carried out with a Waters Acquity UPLC system (Zellick, Belgium) coupled to a Quattro Premier triple quadrupole mass spectrometer from Micromass (Waters) using an ESI source. Instrument control and data processing were carried out by means of Masslynx 4.1 software.

LC separation was performed at 40°C using a Waters Acquity UPLC BEH phenyl column (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7- $\mu$ m particle size). A binary mobile phase, previously degassed by nitrogen, with a gradient elution was used. Mobile phase A was ammonium formate buffer (2 mM, pH 4.0); mobile phase B was acetonitrile. The mobile phase flow rate was 0.4 mL/min with the following gradient program (time, % mobile phase A): 0 min, 95%A; 3.5 min, 70%A; 4.2 min, 68.5%A; 4.7 min, 5%A; 4.8 min, 95%A; and 5.7 min, 95%A. Samples were kept in the autosampler at 10°C.

The ESI source was operated in the positive mode at the following working conditions: capillary voltage of +2.55 kV; source block and desolvation temperature of 120 and 350°C, respectively; and N<sub>2</sub> desolvation and nebulizer gas at flow rates of 800 and 50 L/h, respectively.

Data acquisition for quantification and confirmation was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Two transitions were followed for the identification, and only one used for quantification. Two transitions, retention time, cone voltage, dwell time, and collision energy optimized for each compound are given in Table I. Finally, the data acquisition was performed under time-segmented conditions based on the chromatographic separation of the target compounds to maximize the sensitivity of detection.

### Validation

The method has been validated following the general guidelines for validation of analytical methods with the Enval program (13).

*Response function.* Calibration curves consisted of six standard concentrations

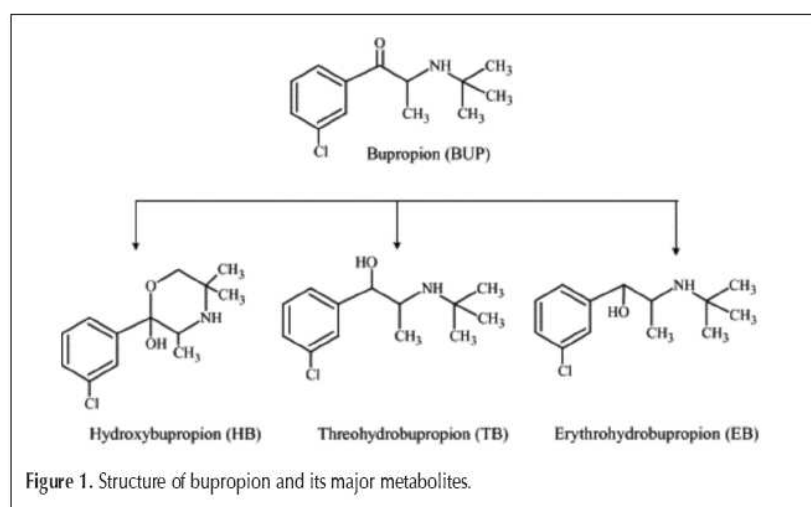


Figure 1. Structure of bupropion and its major metabolites.

of the four analytes in whole blood: 10, 25, 50, 200, 500, and 1000 ng/mL for BUP and 20, 50, 100, 400, 1000, and 2000 ng/mL for HB, EB, and TB. Duplicate calibration curves were analyzed daily for three days. The curves were obtained by plotting ratios of analyte peak area divided by internal standard peak area versus the analyte concentrations in spiked samples. The concentration of the unknown sample was calculated using weighted linear regression analysis.

*Trueness, precision, lower limit of quantitation, linearity, and accuracy.* A statistical approach based on the total error measurement, including both bias and standard deviation, was applied to validate the method. Validation samples were analyzed in triplicates at seven concentration levels: 1, 5, 10, 50, 200, 500, and 1000 ng/mL for BUP and 2, 10, 20, 100, 400,

1000, and 2000 ng/mL for HB, EB, and TB on three different days.

*Recovery.* The recovery was determined by comparison of peak areas from blank human whole blood fortified prior to the extraction procedure (loading on cartridges) and fortified after the extraction procedure, which represents 100% recovery. With this procedure, we could quantitatively evaluate the percentage of analytes extracted from blood matrix. Recovery was determined from blood spiked with four different concentrations (10, 50, 200, and 500 ng/mL for BUP and 20, 100, 400, and 1000 ng/mL for metabolites).

*Ion suppression—matrix effect.* One of the best tools for observing matrix effects is the post-column infusion technique. Analytes of interest were infused post-column via a T-shaped con-

Table I. Retention Times and Tandem Mass Spectrometry Parameters For All Analytes and Internal Standards

Analyte		Retention Time (min)	Cone Voltage (V)	Dwell Time (ms)	Quantification Transition (Collision Energy) (CE, eV)	Confirmation Transition (Collision Energy) (CE, eV)
Bupropion	BUP	3.76	20	40	240.0 > 184.0 (13)	240.0 > 166.0 (16)
Bupropion-d <sub>9</sub>	BUP-d <sub>9</sub>	3.75	20	40	249.2 > 185.0 (13)	
Hydroxybupropion	HB	3.25	14	40	256.1 > 238.1 (13)	256.1 > 167.1 (24)
Hydroxybupropion-d <sub>6</sub>	HB-d <sub>6</sub>	3.23	14	40	262.2 > 244.2 (13)	
Erythrohydrobupropion	EB	3.79	20	50	244.1 > 170.0 (20)	244.1 > 188.0 (13)
Threohydrobupropion	TB	3.88	20	50	244.1 > 170.0 (20)	244.1 > 188.0 (13)

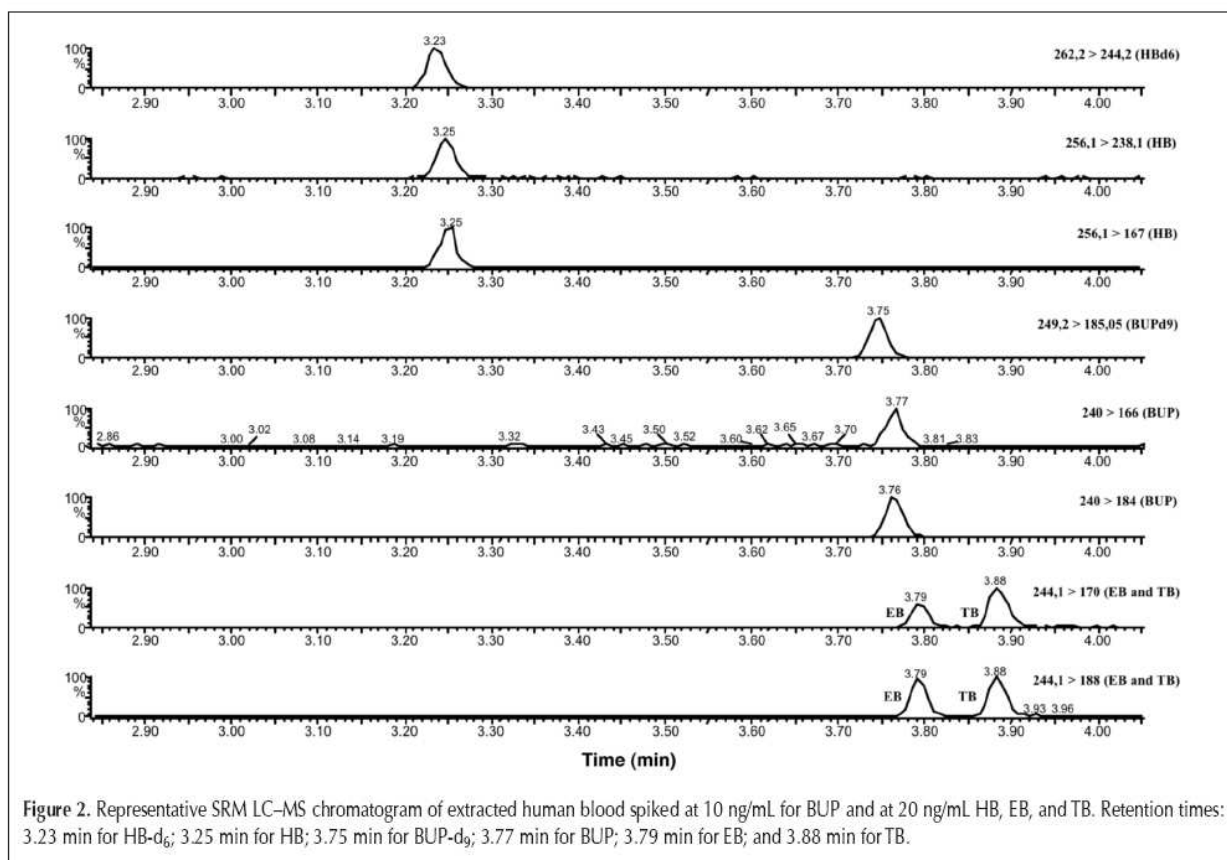


Figure 2. Representative SRM LC-MS chromatogram of extracted human blood spiked at 10 ng/mL for BUP and at 20 ng/mL HB, EB, and TB. Retention times: 3.23 min for HB-d<sub>6</sub>; 3.25 min for HB; 3.75 min for BUP-d<sub>9</sub>; 3.77 min for BUP; 3.79 min for EB; and 3.88 min for TB.



nector at a steady rate of 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  into the LC eluant stream. At the same time, 10  $\mu\text{L}$  of blank whole blood extracts (matrix) was injected, and the LC–MS assay was conducted while the standard mixture was infused.

## Results

### Chromatograms

The proposed method enables the simultaneous quantification of BUP and its main metabolites in human whole blood. Separation was carried out on a reversed-phase column using acetonitrile/ammonium formate buffer mobile phases. In order to shorten the analysis time as much as possible, UPLC technique was performed using a 100-mm  $\times$  2.1-mm column with a 1.7- $\mu\text{m}$  particle diameter. A gradient program from 95% of buffer phase to 95% of acetonitrile was performed in order to elute all analytes in a reasonably short time (5.7 min). Although addition of salts to the mobile phase is not recom-

mended in LC–MS, low concentrations of ammonium formate (2 mM) clearly improved sensitivity and peak shape without causing clogging problems. The chromatograms of LC–MS–MS analysis of the samples blood spiked at 10 ng/mL with BUP and at 20 ng/mL with metabolites are shown in Figure 2. With the sample processing and chromatographic conditions described, all peaks are symmetric.

### MS

MS parameters were suitably optimized so as to achieve the maximum abundance of product ions of BUP and metabolites. BUP is a low molecular weight compound containing a secondary amine in its structure. Because of the presence of basic nitrogen in the molecule, BUP exhibited favorable sensitivity in positive ion mode detection. In this study, ESI was selected as the ionization source. The parameters of the ionization efficiency were optimized by evaluating the sensitivity using flow injection analysis with the mobile phase at 0.4 mL/min. The protonated molecular ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  was selected as the precursor ion, and the cone voltage was adjusted to its maximum signal at the first quadrupole of the MS. Then the product ion spectra were recorded at different values of collision energy to find the two most intense transitions for each analyte.

### Response function

Six calibration standards (10–1000 ng/mL for BUP and 20–2000 ng/mL for metabolites) were analyzed in duplicate on three different days. The standard curves were satisfactorily described by weighted linear regression analysis. The calibration parameters were stable with regression coefficients  $> 0.99$ .

### Trueness, precision, lower limit of quantitation, linearity, and accuracy

These validation parameters have been evaluated at seven different concentrations for each compound (1, 5, 10, 50, 200, 500, and 1000 ng/mL for BUP and 2, 10, 20, 100, 400, 1000, and 2000 ng/mL for HB, EB, and TB). Trueness and precision give information on systematic and random errors, respectively. Trueness, expressed in terms of relative bias (%), refers to the closeness of agreement between the exact concentration in certified material (or spiked material) and the obtained main results. The precision of the

Table II. Method Validation

BUP Concentration	BUP	HB/EB/TB Concentration	HB	EB	TB
Trueness*					
(1 ng/mL) <sup>†</sup>	-17.3	(2 ng/mL) <sup>†</sup>	3.4	24.2	-9.4
5 ng/mL	3.4	10 ng/mL	3.9	7.8	0.4
10 ng/mL	-1.3	20 ng/mL	0.7	6.6	1.4
50 ng/mL	5.8	100 ng/mL	3.6	7.8	5.5
200 ng/mL	0.9	400 ng/mL	-2.8	3.7	0.6
500 ng/mL	2.1	1000 ng/mL	-1.5	6.8	4.6
1000 ng/mL	4.3	2000 ng/mL	-0.4	3.7	0.9
Precision (repeatability / intermediate precision) <sup>‡</sup>					
(1 ng/mL) <sup>†</sup>	15.2 / 17.1	(2 ng/mL) <sup>†</sup>	10.1 / 17.8	12.4 / 15.6	17.8 / 29.8
5 ng/mL	6.6 / 8.9	10 ng/mL	8.6 / 8.6	7.7 / 7.7	10.6 / 10.6
10 ng/mL	7.0 / 7.0	20 ng/mL	4.7 / 7.5	5.2 / 5.2	7.2 / 7.9
50 ng/mL	3.3 / 3.4	100 ng/mL	4.5 / 4.5	5.4 / 5.9	6.5 / 6.5
200 ng/mL	5.9 / 5.9	400 ng/mL	4.9 / 4.9	5.1 / 5.7	5.4 / 5.4
500 ng/mL	2.9 / 2.9	1000 ng/mL	3.2 / 3.2	2.5 / 2.5	1.5 / 2.9
1000 ng/mL	4.2 / 4.7	2000 ng/mL	2.3 / 2.3	3.8 / 3.8	2.7 / 2.7
Uncertainty of measurements <sup>§</sup>					
(1 ng/mL) <sup>†</sup>	37.0	(2 ng/mL) <sup>†</sup>	40.0	34.0	66.7
5 ng/mL	19.6	10 ng/mL	18.2	16.2	22.4
10 ng/mL	14.7	20 ng/mL	16.6	11.0	17.0
50 ng/mL	7.1	100 ng/mL	9.6	12.6	13.6
200 ng/mL	12.5	400 ng/mL	10.3	12.4	11.4
500 ng/mL	6.1	1000 ng/mL	6.7	5.4	6.7
1000 ng/mL	10.2	2000 ng/mL	4.9	8.0	5.8
Linearity					
Range (ng/mL)	5–1000		10–2000	10–2000	10–2000
LOD (ng/mL)	1		2	2	2
LLOQ (ng/mL)	5		10	10	10
* Relative bias (%).					
<sup>†</sup> Level not included in the stated linearity.					
<sup>‡</sup> RSD %.					
<sup>§</sup> Expressed as a percentage.					

developed method, expressed in terms of relative standard deviation (RSD) values, was evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision. Results showed that both trueness and precision are acceptable for BUP from the 5 ng/mL level and for metabolites from the 10 ng/mL level because the bias and the RSD values did not exceed 15% (Table II). As shown in the table, the relative uncertainty measurement of each compound did not exceed 20% for concentration levels from 5 ng/mL for BUP and from 10 ng/mL for metabolites (except for TB, which presents a 22.4% relative uncertainty measurement for the concentration level at 10 ng/mL). Consequently, the lower limits of quantitation (LLOQ) were fixed at 5 ng/mL for BUP and 10 ng/mL for metabolites. Therefore, the developed method was linear over 5–1000 ng/mL for BUP and 10–2000 ng/mL for metabolites. As in all spiked samples, each compound was easily detected, and the LODs were at least 1 ng/mL for BUP and 2 ng/mL for metabolites.

The accuracy profile is based on the total error of the measurements (i.e., systematic and random errors). It refers to the closeness of agreement between the test result and the acceptance reference value. The accepted limits tolerated in

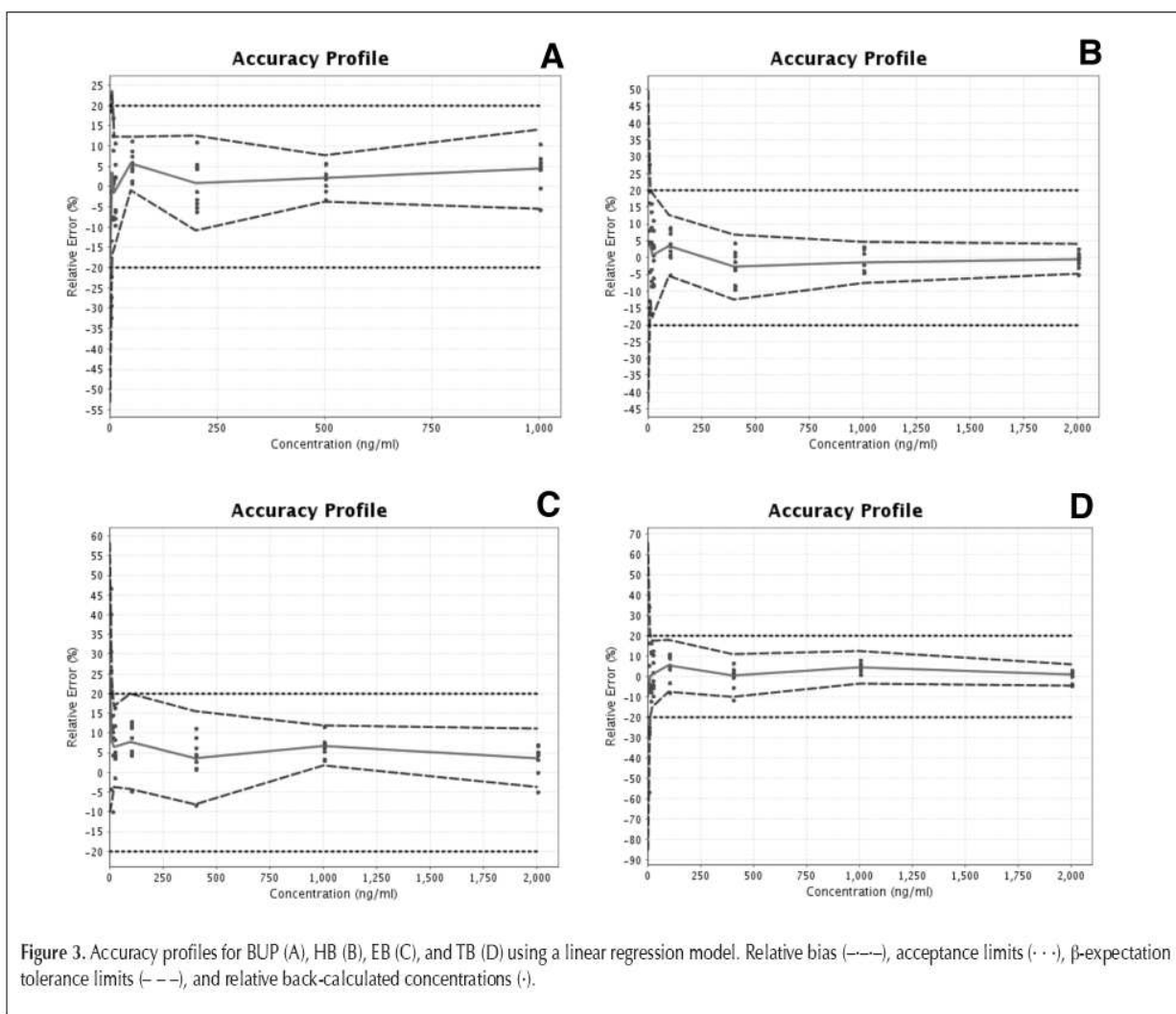
this study are fixed at 20%. The method can be considered as accurate for BUP at 5 ng/mL and for metabolites at 10 ng/mL (Figure 3).

### Recovery

Extraction recovery of the analytes from human whole blood was determined at four different concentrations by comparing analyte responses of pre-extraction spiked samples to those of post-extraction spiked samples. Recoveries were examined in triplicate at four concentration levels. The extraction recoveries were higher than 62% for BUP, 63% for HB, 61% for EB, and more than 58% for TB.

### Ion suppression

Matrix effect was examined by the simultaneous post-column infusion of BUP, metabolites, and internal standard via a T-shaped connector into the MS–MS detector during the chromatographic analysis of four different batches of blank whole blood extracts. No significant ion suppression effect was observed.



### Sample analysis

Several blood samples obtained from patients suspected of abusing bupropion have been analyzed by both methodologies. Results presented in Table III show no significant difference, except the interesting separation of the two hydrobupropion enantiomers with the UPLC method. Chromatograms obtained from analysis of blood patient 2

proved the good selectivity of the method with EB and TB perfectly separated (Figure 4).

### Discussion and Conclusions

The aim of this study was to compare a UPLC–MS method for bupropion analysis with an HPLC–MS method described in a previous paper (12). To facilitate the comparison, extraction procedure and chromatographic conditions have been reproduced with few changes. The only modification brought to the extraction procedure was a change of internal standards: BUP and HB deuterated standards have been preferred to lidocaine-d<sub>10</sub> in order to attenuate ion suppression effects. On the other hand, important modifications were carried out on the LC system. We used an Acquity UPLC BEH phenyl column in place of a Symmetry Shield RP<sub>18</sub> column with a modified elution

	BUP (ng/mL)		HB (ng/mL)		EB + TB (ng/mL)		EB* (ng/mL)	TB* (ng/mL)
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC		
Patient 1	238	235	1090	1084	1890	1906	249	1658
Difference <sup>†</sup>		-1.4%		-0.5%		+0.9%		
Patient 2	45	47	1330	1398	2280	2065	326	1739
Difference		+4.9%		+5.1%		-9.4%		
Patient 3	51	52	879	887	1260	1257	165	1092
Difference		+2.6%		+0.9%		-0.2%		
Patient 4	1110	1048	1170	1108	2530	2803	330	2473
Difference		-5.5%		-5.3%		+10.8%		

\* Results obtained with the UPLC system.  
<sup>†</sup> Difference = (Result UPLC – Result HPLC) × 100/Result HPLC.

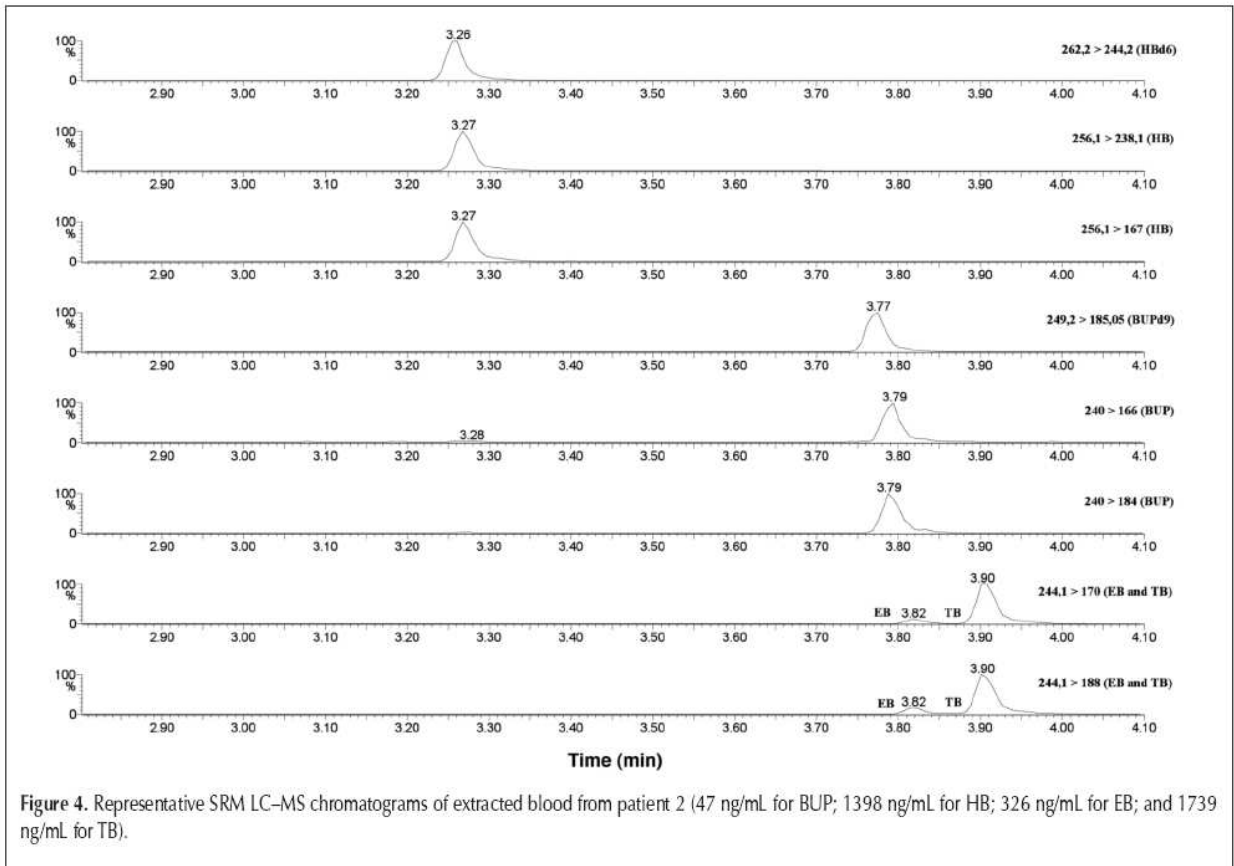


Figure 4. Representative SRM LC–MS chromatograms of extracted blood from patient 2 (47 ng/mL for BUP; 1398 ng/mL for HB; 326 ng/mL for EB; and 1739 ng/mL for TB).

gradient, which permitted the separation of EB and TB and a significant reduction of analysis run time from 12.0 min to 5.7 min. Despite a shorter chromatographic run time, the UPLC system showed better selectivity properties with a good separation of enantiomers.

All parameters tested for the method validation had completely satisfied to international criteria (14). No significant difference was observed in term of trueness, precision, accuracy, or extraction recovery between both methods.

In conclusion, determination of bupropion and its main metabolites in blood by UPLC–MS–MS showed a better selectivity with a perfect separation of EB and TB enantiomers and a significant reduction of analysis run time (5.7 min vs. 12.0 min).

## References

1. J.J. Steward, H.J. Berkel, R.C. Parish, M.R. Simar, A. Syed, J.A. Bocchini, J.T. Wilson, and J.E. Manno. Single-dose pharmacokinetics of bupropion in adolescents: effects of smoking status and gender. *J. Clin. Pharmacol.* **41**: 770–778 (2001).
2. B.R. Cooper, C.M. Wang, R.F. Cox, R. Norton, V. Shea, and R.M. Ferris. Evidence that the acute behavioural and electrophysiological effects of bupropion (Wellbutrin®) are mediated by a noradrenergic mechanism. *Neuropsychopharmacol.* **11**: 133–141 (1994).
3. H.G. Kinnell. Bupropion for smokers: drug is almost identical in structure to diethylpropion, a controlled drug. *Br. Med. J.* **322**: 431–432 (2001).
4. K.K. Loboz, A.S. Gross, J. Ray, and A.J. McLachlan. HPLC assay for bupropion and its major metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B* **823**: 115–121 (2005).
5. R. Coles and E.D. Kharasch. Stereoselective analysis of bupropion and hydroxybupropion in human plasma and urine by LC/MS/MS. *J. Chromatogr. B* **857**: 67–75 (2007).
6. J. Posner, A. Bye, K. Dean, A.W. Peck, and P.D. Whiteman. The disposition of bupropion and its metabolites in healthy male volunteers after single and multiple doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **29**: 97–103 (1985).
7. S.R. Faucette, R.L. Hawke, E.L. Lecluyse, S.S. Shord, B. Yan, R.M. Laethem, and C.M. Lindley. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab. Dispos.* **28**: 1222–1230 (2000).
8. N.N. Bumpus, U.M. Kent, and P.F. Hollenberg. Metabolism of efavirenz and 8-hydroxyefavirenz by P450 2B6 leads to inactivation by two distinct mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**: 345–351 (2006).
9. S. Palovaara, O. Pelkonen, J. Uusitalo, S. Lundgren, and K. Laine. Inhibition of cytochrome P450 2B6 activity by hormone replacement therapy and oral contraceptive as measured by bupropion hydroxylation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **74**: 326–333 (2003).
10. T.P. Rohrig and N.G. Ray. Tissue distribution of bupropion in a fatal overdose. *J. Anal. Toxicol.* **16**: 343–345 (1992).
11. V. Ramcharitar, B.S. Levine, B.A. Goldberger, and Y.H. Caplan. Bupropion and alcohol fatal intoxication: case report. *Forensic Sci. Int.* **56**: 151–156 (1992).
12. M. Merceroles, R. Denooz, G. Lachatre, and C. Charlier. A fatal case of bupropion (Zyban) overdose. *J. Anal. Toxicol.* **32**: 192–196 (2008).
13. Arlenda Home Page. *E.noval Version V2.0e Prod* <http://www.arlenda.com> (September 2009).
14. FDA Home Page. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov> (accessed December 2009).

Manuscript received October 29, 2009;  
revision received December 28, 2009.

#### **Publication 4**

A Fatal Case of Bupropion (Zyban<sup>®</sup>) Overdose, Magali Mercerolle, Raphaël Denooz, Gérard Lachâtre, Corinne Charlier, *Journal of Analytical Toxicology*, **2008**; 32: 192-196.

## Case Report

# A Fatal Case of Bupropion (Zyban®) Overdose

Magali Mercerolle<sup>1</sup>, Raphaël Denooz<sup>2</sup>, Gérard Lachâtre<sup>1</sup>, and Corinne Charlier<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Service de Pharmacologie et Toxicologie—Centre Régional de Pharmacovigilance, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, 2 avenue Martin-Luther King, 87042 Limoges, France and <sup>2</sup>Laboratoire de Toxicologie Clinique et de Toxicologie Médico-Légale, Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman B 35, B 4000 Liège, Belgium

### Abstract

A sensitive and reproducible method for the identification and the quantitative determination of bupropion (BUP) and its major metabolites, hydroxybupropion (OH-BUP) and threohydrobupropion (T-BUP), was developed in blood and urine. The three compounds were extracted with a solid-phase extraction procedure followed by LC-ESI-MS-MS separation and quantification using decadeuterated lidocaine as internal standard. BUP and its metabolites were satisfactorily identified by multiple reactions monitoring detection. The limits of detection and quantification were determined at 5 and 10 µg/L, respectively, for each analyte. The intraday and interday coefficients of variability were lower than 11.9% for BUP and its metabolites. This method was applied to the forensic case of a 35-year-old male who died after a suspected ingestion of 30 slow-release tablets of Zyban. As samplings were performed at least 72 h after the drug intake, BUP had disappeared from blood, but OH-BUP and T-BUP were present at the concentrations of 5.8 and 30.4 mg/L, respectively. In urine, concentrations ranged from 42.9 mg/L for BUP to 617 mg/L for T-BUP. These results agree with the hypothesis of a successful suicide attempt.

### Introduction

Tobacco use remains one of the major causes of death in the world. For many years, several European countries have launched active campaigns against tobacco use. Several nicotine substitution products have been proposed to smokers in order to help them to stop. In 1997, the Food and Drug Administration (FDA) approved the use of an antidepressant drug, bupropion (BUP), to help adult smokers to stop tobacco use (1).

Originally approved for the treatment of depression in 1985, BUP was removed from International Pharmacopeia one year later because of the important risk of seizures, mainly identified in sub-populations with epilepsy or a history of head trauma (2). Complementary studies showed that, at a lower dose range, the incidence of seizures was similar to that of other antidepressant

drugs. The product was reintroduced in 1989 with special attention paid to side effects in patients with known epilepsy or suffering from eating disorders (1,2). The daily oral dose, used for depression as well as smoking cessation, is about 300 mg, administered in normal release tablets of 75 or 100 mg (depression) or in sustained release tablets of 150 mg (smoking cessation). Therapeutic concentrations of BUP in blood when these doses are used range between 25 and 100 µg/L (3).

BUP is a monocyclic antidepressant, chemically unrelated to tricyclic, tetracyclic, or other known antidepressant agents. This drug is structurally similar to amphetamine and diethylpropion, an anorexigenic drug. Its therapeutic efficacy is, however, comparable to that of classical antidepressants. In fact, bupropion is a dual dopaminergic and noradrenergic reuptake inhibitor, presenting weak but relatively selective inhibition characteristics of dopamine reuptake (4).

In smoking cessation, BUP does not replace nicotine, but it is believed to act by increasing dopamine levels in the *nucleus accumbens* because dopamine level can be decreased during cigarette abstinence (5).

After two or three years of prescription for tobacco-use cessation, several articles concerning bupropion toxicity appeared in the literature (6–8). The clinical toxicity of BUP overdose included sinusoidal tachycardia, hypertension, hallucinations, agitation, seizures and tremors, and sometimes drowsiness. These side effects might be prolonged with the sustained-release forms of bupropion (Zyban, Wellbutrin SR®) (9).

Cardiac manifestations are uncommon (except for tachycardia); nevertheless, overdose with more than 1.5 g has been associated with disturbance of intraventricular conduction and prolongation of the QT interval. With massive overdose (10 g or more), cardiac failure and death can occur in absence of fast treatment. The rates of 0.01 and 0.11 deaths per 1000 prescriptions, respectively, were reported in Canada and the United Kingdom. Almost all deaths were related to intentional BUP overdoses (10).

Very few postmortem toxicological data including BUP have been published (11–13). The interpretation of blood concentrations is complicated by the fact that BUP is unstable in blood and is extensively metabolized by multiple pathways into two major and one minor active metabolites, hydroxybupropion (OH-BUP) and the amino-alcohol isomers, threohy-

\* Author to whom correspondence should be addressed: Pr. Corinne Charlier, Laboratoire de Toxicologie Clinique et de Toxicologie Médico-Légale, Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman B 35, B 4000 Liège, Belgique. E-mail: c.charlier@chu.ulg.ac.be.

drobupropion (T-BUP) and erythrohydrobupropion (E-BUP). The identification and quantification of these metabolites are essential to reveal intoxications by BUP (14,15). Figure 1 presents chemical structures of BUP, OH-BUP, T-BUP, and E-BUP.

The present article describes a liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS–MS) method for the rapid and sensitive identification and quantification of BUP and its metabolites in blood and urine and its application to a fatal case of Zyban overdose.

## Case History

A 35-year-old male was found lying in his bed about 72 h after he died. An empty box of Zyban (30 slow-release tablets of 150 mg of BUP) was near the body. The young man had been following a six-month treatment to stop tobacco use. No other known medication was involved. No goodbye letter was found in the room, but he had become increasingly depressed according to his family. The incident occurred during a very hot period in the summer, which led to the partial decomposition of the body. No autopsy was imposed by legal authorities, so only femoral whole blood and urine samples were collected for analysis during the external examination.

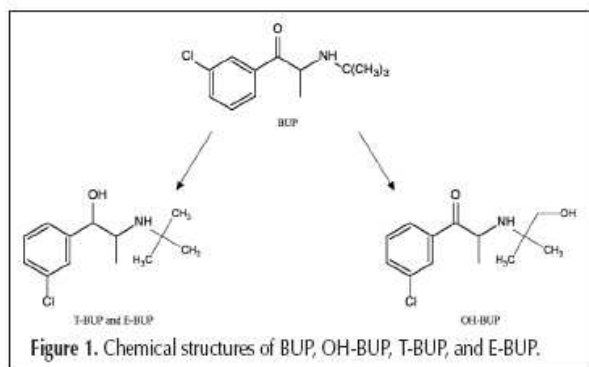
## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

BUP, OH-BUP, and T-BUP were kindly provided by GlaxoSmithKline (Stevenage, U.K.) as hydrochloride salts. The internal standard (I.S.), decadeuterated lidocaine, was obtained from C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Methanol and acetonitrile were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France); formic acid (99% min) and ammonium formate were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France); and methylene chloride, propan-2-ol, and zinc sulfate were from VWR (Strasbourg, France).

### Preparation of standard solutions

BUP, OH-BUP, T-BUP, and I.S. powders were separately dissolved in methanol to obtain stock solutions at 1 g/L. Then the solutions were mixed and appropriately diluted in deionized water to obtain four pools of working solutions of BUP, OH-BUP,



and T-BUP at 5, 1, 0.5, and 0.1 mg/L, and the I.S. was diluted in deionized water at 5 mg/L. These standard solutions were stored at +4°C.

### Instrumentation

The chromatographic system consisted of a series 200LC micro-flow rate, high-pressure gradient pumping system (Perkin-Elmer Instruments, Les Ulis, France) including a Rheodyne model 7725 injection valve equipped with a 20- $\mu$ L internal loop. Two mobile phases previously degassed by nitrogen were employed. Mobile phase A was ammonium formate buffer (2mM, pH 4.0). Mobile phase B was a 90:10 (v/v) mixture of acetonitrile and ammonium formate buffer (2mM, pH 4.0). The flow rate was 50  $\mu$ L/min. A SymmetryShield RP 18 column (150  $\times$  1.0-mm i.d., 3.5  $\mu$ m, Waters, Milford, MA) was used for compound separation with a gradient of mobile phases A and B programmed as following: 0–1.0 min, 5% B; 1.0–1.5 min, 5 to 35% B; 5.0–5.5 min, 35 to 40% B; 5.5–7.5 min, 40 to 95% B; 7.5–8.5 min, decrease from 95 to 5% B; and 8.5–12 min, column equilibration with 5% B.

Detection was carried out with an API 2000 LC–MS–MS System (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a TurboIonSpray ionization source and controlled by Analyst<sup>®</sup> software. The TurboIonSpray settings were optimized by infusing, at 5  $\mu$ L/min, a 1 mg/L solution of the four compounds (BUP, OH-BUP, T-BUP, and I.S.) prepared in a 30:70 (v/v) mixture of acetonitrile and formate buffer (2mM, pH 4.0). In the positive mode, the optimal settings of the ionization in the source were ion spray voltage at 5000V and curtain gas and ion source gas 1 at 40 and 20 units, respectively. The declustering potential (DP) was optimized for each compound as shown in Table I.

### Sample preparation

Calibration standards at 0, 10, 25, 50, 100, 200, and 500  $\mu$ g/L were prepared by spiking 100  $\mu$ L of drug-free human whole blood and urine with 10  $\mu$ L of the I.S. solution prepared at 5 mg/L and the appropriate volumes of the different working solutions.

**Table I.** Optimized Mass Spectrometric Parameters

Analytes	Q1	Q3	DP	FP	EP	CEP	CE	CXP
	Mass* (amu)	Mass (amu)						
I.S.	246.0	96.2	41.0	360.0	-10.0	12.0	27.0	0.0
OH-BUP	255.9	238.0	11.0	360.0	-6.0	14.0	15.0	4.0
	255.9	167.1	16.0	350.0	-6.5	20.0	33.0	0.0
BUP	239.9	166.0	16.0	370.0	-6.5	14.0	25.0	2.0
	239.9	184.0	16.0	370.0	-6.0	12.0	17.0	2.0
T-BUP	242.3	168.2	16.0	360.0	-9.5	14.0	23.0	0.0
	242.3	186.0	16.0	360.0	-10.5	14.0	15.0	2.0

\* Q1 mass, parent ion mass-to-charge ratio; Q2 mass, daughter ion mass-to-charge ratio; DP, declustering potential (orifice plate); FP, focusing potential (focusing ring); EP, entrance potential (Q0 lens); CEP, cell entrance potential; CE, collision cell potential; and CXP, cell exit potential.

Then 0.5 mL of a 70:30 (v/v) mixture of zinc sulfate saturated aqueous solution and methanol was added to blood (not to urine) in order to precipitate blood proteins. Spiked blood and urine samples were vortex mixed for 10 s and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Supernatants were transferred to 15-mL glass tubes, added to 2 mL of deionized water, and vortex mixed for 10 s. Oasis<sup>®</sup> HLB extraction cartridges were conditioned by 2 mL of methanol and equilibrated by 2 mL of deionized water. Then supernatants were loaded, and cartridges were successively washed by 3 mL of deionized water and 3 mL of a 90:10 (v/v) mixture of deionized water and methanol. Cartridges were dried for 15 min, and washing solutions were eliminated. Solutes were eluted by 3 mL of a methylene chloride and propan-2-ol (75:25, v/v) mixture and collected in 10-mL glass tubes. Eluates were evaporated under nitrogen flux at room temperature and reconstituted with 50  $\mu$ L of a 10:90 (v/v) mixture of acetonitrile and formate buffer (2mM, pH 4.0). These extracts were introduced in 200- $\mu$ L vials for injection, and 10  $\mu$ L was injected into our LC-ESI-MS-MS system (16).

## Results and Discussion

BUP and its main metabolites were identified by multiple

Analytes	Mass Transition 1 ( $m/z > m/z$ )	Mass Transition 2 ( $m/z > m/z$ )	Retention Time (min)	Relative Retention Time
I.S.	246.0 > 96.2	–	6.76	–
OH-BUP	255.9 > 238.0	255.9 > 167.1	6.94	1.03
BUP	239.9 > 166.0	239.9 > 184.0	7.14	1.06
T-BUP	242.3 > 168.2	242.3 > 186.0	7.14	1.06

reactions monitoring (MRM) detection. Table II shows the mass transitions of each analyte and their retention times. The “mass transition 1” corresponds to the mass transition used for the quantification; the “mass transition 2” confirms the first one.

The particular case of the amino-alcohol isomers, T-BUP and E-BUP, was studied. Indeed, T-BUP and E-BUP co-elute (relative retention time: 1.06) and show the same MRM transitions with equivalent abundances under our LC-ESI-MS-MS conditions. Moreover, previous pharmacokinetics studies have shown that E-BUP concentrations in human plasma are very low and only contribute to a small portion of the overall combination peak (17–22). As a consequence, we decided to analyze and quantify the main analyte, T-BUP.

### Method validation

Calibration curves obtained between 10 and 500  $\mu$ g/L for BUP and its two main metabolites, using linear regression without weighting, gave excellent correlation coefficients ( $r > 0.993$ ). For all analytes, the limits of detection and quantitation were 5 and 10  $\mu$ g/L, respectively.

Extraction recovery was determined by comparing the representative peak areas of extracted drug-free blood (or urine) spiked before extraction, with the peak area of drug-free blood (or urine) fortified before injection, at the same concentration. The extraction recoveries were higher than 54.3%, 63.4%, and 60.5%, respectively, for BUP, OH-BUP, and T-BUP. Coefficient of variability (C.V.) values were determined at 10, 50, 200, and 500  $\mu$ g/L by replicate analyses ( $n = 5$ ) of human whole blood and urine aliquots, either on the same run (intraday) or on separate days (interday) and proved that the method is precise (intraday and interday C.V. were lower than 11.9% for BUP, OH-BUP, and T-BUP). Method validation data have been detailed in Table III.

### Matrix ion suppression

Matrix ion suppression effects on the MRM LC-MS-MS sen-

Products	Spiked Concentrations ( $\mu$ g/L)	$n^*$	Within-Day		Between-Day		Measurement Uncertainty (%)	Extraction Recovery (%)	Extraction Recovery CV (%)
			CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)			
BUP	10	5	3.8	4.1	9.8	2.9	23.0	79.3	16.7
	50	5	11.0	-7.2	7.6	-2.3	17.2	64.6	11.0
	200	5	7.6	1.0	4.0	-8.6	16.0	54.3	7.7
	500	5	11.9	16.3	8.5	-9.3	24.8	70.4	11.9
T-BUP	10	5	4.0	1.0	3.7	6.8	14.7	61.2	17.4
	50	5	3.2	9.2	5.5	1.5	12.7	70.1	3.1
	200	5	3.3	0.7	5.6	2.4	13.8	60.5	3.5
	500	5	4.7	3.4	3.3	2.1	8.8	64.5	4.6
OH-BUP	10	5	3.1	-1.1	1.5	3.0	6.2	63.4	6.4
	50	5	2.0	-4.0	4.3	4.6	13.6	90.0	1.8
	200	5	2.2	-5.1	4.5	1.7	10.9	73.0	2.2
	500	5	2.2	-1.2	3.7	5.8	13.6	75.9	2.3

\*  $n$ , number of determinations and CV%, coefficient of variation.



sitivity were evaluated by the experiment of the post-column analyte infusion described by Antignac et al. (23). A standard solution containing BUP, OH-BUP, and T-BUP at 100 µg/L and I.S. at 500 µg/L in mobile phase was infused post-column via a T-shaped connector, at 50 µL/min, using an infusion pump. Ten different blank (no spiked) whole blood and urine samples were extracted. Ten microliters of extracted bloods and urines was then injected onto an HPLC column at a 50 µL/min mobile phase flow by a Perkin Elmer autosampler, and MRM LC-MS-MS chromatograms were acquired for each analyte. No significant ion suppression effect was observed because of matrix components present in reconstituted extracts.

### Case report

Comprehensive toxicology testing was performed. The qualitative drug screen, a combination of fluorescence polarization immunoassay and gas and liquid chromatography of the blood and urine, showed the presence of bupropion and its metabolites. No other drugs or ethyl alcohol were found. The results of the toxicological analysis of our reported fatal case are pre-

sented in Table IV. No BUP was found in the femoral blood, and OH-BUP and T-BUP were detected and respectively quantified at 5.8 and 30.4 mg/L after suitable dilutions were made. Figure 2 shows chromatograms of the peripheral blood of our reported fatal case. In urine, BUP and its active metabolites were detected at very high concentrations: BUP at 42.9 mg/L, OH-BUP at 100 mg/L, and T-BUP at 617.0 mg/L.

In this case study, bupropion could be responsible for death, even though there was no BUP in the blood at the time of the analysis. The femoral blood concentration levels of OH-BUP and T-BUP, 5.8 and 30.4 mg/L, respectively, seem to be within the range of lethal concentrations in postmortem blood. Friel et al. (13) studied three fatal overdoses involving BUP and presented peripheral blood levels as high as 4.0, 3.4, and 11.5 mg/L, respectively, for BUP, OH-BUP, and T-BUP.

To date, if the symptomatology of intoxication by BUP is well documented, there are few references to blood concentrations of BUP and its metabolites in cases of lethal intoxication by this drug (11,13,15).

In this fatal case, the femoral blood sample was taken about 72 h after the death and refrigerated 4 days before the testing was done. The analysis did not reveal the presence of BUP. This result was not surprising insofar as Laizure and DeVane (14) demonstrated that about 50% of the active compound BUP was damaged in plasmatic samples stocked at 22°C and the totality at 37°C, for more than 48 h. Moreover, the authors also explain that BUP does not degrade into any of the three metabolites, OH-BUP, E-BUP, and T-BUP. As a consequence BUP was probably damaged by the hydrolysis of the carbon-nitrogen bond of the amino group. The studies of Laizure and DeVane (14) demonstrated on the other hand the very good stability of these three metabolites. Therefore, we can suppose that the blood concentrations of OH-BUP (5.8 mg/L) and T-BUP (30.4 mg/L) determined with samples taken three days after the death are in accordance with antemortem concentrations, without taking redistribution postmortem into account. On this assumption, these concentrations are quite comparable with a lethal overdose observed by other authors: from 1.7 to 5.0 mg/L for OH-BUP and from 4.6 to 17.8 mg/L for T-BUP (11,13,15).

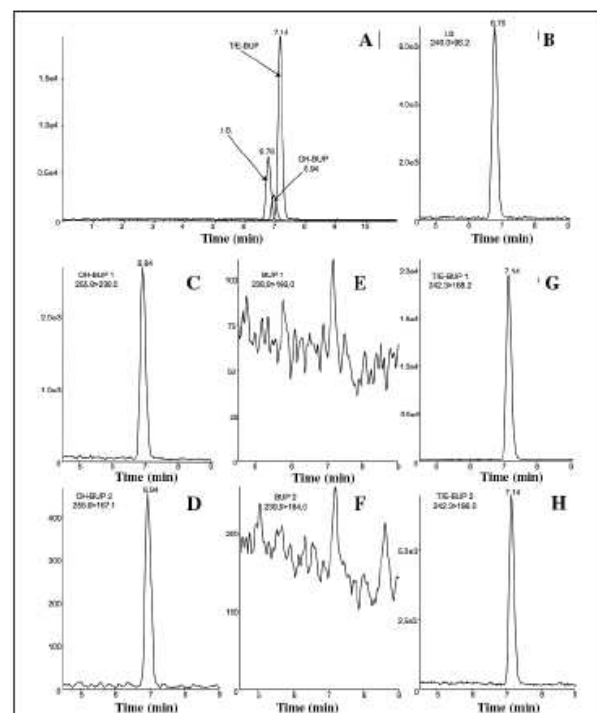
In blood, lethal concentrations are much higher than therapeutic concentrations (therapeutic concentrations of BUP in blood ranged between 25 and 100 µg/L) (3). Considering toxicological findings (lethal blood concentrations of metabolites) and the features of BUP toxicity symptoms in case of overdose described by Jepsen et al. (9) (cardiovascular with prolonged QRS and QT, and neurological with seizure and coma), the death could be the result of BUP toxic effects, although the death circumstances were unknown.

### Conclusions

We developed a specific and sensitive LC-ESI-MS-MS method for the identification and the quantification of BUP and its main metabolites in blood and urine. This method was validated from 10 to 500 µg/L for each analyte. Applied to a forensic case of a suicide with BUP, the method revealed lethal

**Table IV. Concentrations of BUP and its Metabolites Obtained after Suitable Dilution of the Postmortem Samples of the Reported Fatal Case**

Sample	BUP (mg/L)	OH-BUP (mg/L)	T-BUP (mg/L)
Femoral blood	Not detected	5.8	30.4
Urine	42.9	100	617



**Figure 2.** Chromatograms of the peripheral blood (dilution: 1:100) of our reported fatal case spiked with I.S.: full chromatogram (A); I.S. mass transition (B); OH-BUP mass transitions 1 and 2 (C, D); BUP mass transitions 1 and 2 (E, F); and T/E-BUP mass transitions 1 and 2 (G, H).

concentrations in blood (only metabolites were found because BUP is unstable) and urine. This sensitive method seems to be able to monitor bupropion in tobacco substitution, as well as to reveal intoxications by bupropion in forensic cases when Zyban is implicated (plasmatic therapeutic concentrations of BUP, OH-BUP, and T-BUP range between 20 and 100 µg/L, 94 and 486 µg/L, and 27 and 213 µg/L, respectively) (3,24). In this forensic case, BUP had disappeared from blood but was identified in urine at very high concentration, and OH-BUP and T-BUP were detected and quantified in blood and urine at lethal or at least very high concentrations. BUP seemed to be responsible of death because no other drug neither drug of abuse was revealed by general blood and urine screening.

## References

1. M.G. Belson and T.R. Kelley. Bupropion exposures: clinical manifestations and medical outcome. *J. Emerg. Med.* **23**: 223–230 (2002).
2. G. Shepherd, L.I. Velez, and D.C. Keyes. Intentional bupropion overdoses. *J. Emerg. Med.* **27**: 147–151 (2004).
3. C.L. Winek, W.W. Wahba, C.L. Winek, Jr., and T.W. Balzer. Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Sci. Int.* **122**: 107–123 (2001).
4. H. Hasegawa, R. Meeusen, S. Sarre, M. Diltoer, M.F. Piacentini, and Y. Michotte. Acute dopamine/norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. *J. Appl. Physiol.* **99**: 1397–1401 (2005).
5. K.L. Summers and E. Giacobini. Effects of local and repeated systemic administration of (–)nicotine on extracellular levels of acetylcholine, norepinephrine, dopamine, and serotonin in rat cortex. *Neurochem. Res.* **20**: 753–759 (1995).
6. G. Shepherd. Adverse effects associated with extra doses of bupropion. *Pharmacotherapy* **25**: 1378–1382 (2005).
7. H.A. Spiller, E.A. Ramoska, E.P. Krenzelok, S.R. Sheen, D.J. Borys, D. Villalobos, S. Muir, and L. Jones-Easom. Bupropion overdose: a 3-year multi-center retrospective analysis. *Am. J. Emerg. Med.* **12**: 43–45 (1994).
8. J.A. Tracey, N. Cassidy, P.B. Casey, and I. Ali. Bupropion (Zyban) toxicity. *Ir. Med. J.* **95**: 23–24 (2002).
9. F. Jepsen, J. Matthews, and F.J. Andrews. Sustained release bupropion overdose: an important cause of prolonged symptoms after an overdose. *Emerg. Med. J.* **20**: 560–561 (2003).
10. B. Mintzes, K. Bassett, and J.M. Wright. Drug safety without borders: concerns about bupropion. *Can. Med. Assoc. J.* **167**: 447 (2002).
11. V. Ramcharitar, B.S. Levine, B.A. Goldberger, and Y.H. Caplan. Bupropion and alcohol fatal intoxication: case report. *Forensic Sci. Int.* **56**: 151–156 (1992).
12. A.B. Storrow. Bupropion overdose and seizure. *Am. J. Emerg. Med.* **12**: 183–184 (1994).
13. P.N. Friel, B.K. Logan, and C.L. Fligner. Three fatal drug overdoses involving bupropion. *J. Anal. Toxicol.* **17**: 436–438 (1993).
14. S.C. Laizure and C.L. DeVane. Stability of bupropion and its major metabolites in human plasma. *Ther. Drug Monit.* **7**: 447–450 (1985).
15. T.P. Rohrig and N.G. Ray. Tissue distribution of bupropion in a fatal overdose. *J. Anal. Toxicol.* **16**: 343–345 (1992).
16. C. Arellano, C. Philibert, C. Vachoux, J. Woodley, and G. Houin. Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry method to assess the metabolism of bupropion in rat everted gut sacs. *J. Chromatogr. B* **829**: 50–55 (2005).
17. J.J. Stewart, H.J. Berkel, R.C. Parish, M.R. Simar, A. Syed, J.A. Bocchini, Jr., J.T. Wilson, and J.E. Manno. Single-dose pharmacokinetics of bupropion in adolescents: effects of smoking status and gender. *J. Clin. Pharmacol.* **41**: 770–778 (2001).
18. S.C. Laizure, C.L. DeVane, J.T. Stewart, C.S. Dommissie, and A.A. Lai. Pharmacokinetics of bupropion and its major metabolites in normal subjects after a single dose. *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**: 586–589 (1985).
19. L.M. Hesse, K. Venkatakrishnan, M.H. Court, L.L. von Moltke, S.X. Duan, R.I. Shader, and D.J. Greenblatt. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion potential drugs interaction with other antidepressants. *Drug Metab. Dispos.* **28**: 1176–1183 (2000).
20. S.R. Faucette, R.L. Hawke, E.L. Lecluyse, S.S. Shord, B. Yan, R.M. Laethem, and C.M. Lindley. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab. Dispos.* **28**: 1222–1230 (2000).
21. R.F. Suckow, M.F. Zhang, and T.B. Cooper. Enantiomeric determination of the phenylmorpholinol metabolite of bupropion in human plasma using coupled achiral-chiral liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **11**: 174–179 (1997).
22. V. Borges, E. Yang, J. Dunn, and J. Henion. High-throughput liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of bupropion and its metabolites in human, mouse and rat plasma using a monolithic column. *J. Chromatogr. B* **804**: 277–287 (2004).
23. J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, and B. Le Bizec. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal. Chim. Acta* **529**: 129–136 (2005).
24. R.C. Baselt. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 7th ed. Biomedical Publications, Foster City, CA, 2004, pp 138–140.

Manuscript received May 31, 2007;  
revision received August 21, 2007.

#### **IV.4. Le gamma-hydroxybutyrate (GHB)**

Le gamma-hydroxybutyrate (GHB), précurseur de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), est un agent inhibiteur du système nerveux central. Anesthésique à double action, d'abord euphorisant, puis sédatif et amnésiant, il peut en outre servir d'adjuvant aux dépendances aux opiacés et à l'alcool, ou encore être utilisé dans le traitement de la narcolepsie associée à de la cataplexie. Aujourd'hui, le GHB est souvent associé à la consommation de drogues illicites et une véritable toxicomanie s'est développée un peu partout dans le monde en raison des propriétés euphorisantes et amnésiantes de ce produit. Le GHB est parfois utilisé à l'insu des personnes qui en deviennent les victimes (vols, extorsions de signatures, viols, ...).

Au vu des différentes utilisations potentielles du GHB, licites ou illicites, une technique de dosage dans les liquides biologiques s'impose. Basée sur une extraction en milieu liquide suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, la technique développée et présentée en annexe permet le dosage du GHB dans le sang, l'urine et le contenu gastrique. Quel que soit le milieu biologique, la linéarité de la méthode est acquise entre 2.5 et 80 mg/L, les coefficients de variation sont toujours inférieurs à 9% et l'exactitude comprise entre 90.1% et 104.2%. La limite de détection est calculée à 1 mg/L, ce qui rend la méthode suffisamment sensible pour mettre en évidence une exposition au produit puisque les taux physiologiques de GHB sont de 1.5 mg/L. Mais en raison de la demi-vie biologique très courte du GHB, une consommation ne peut être confirmée que si l'échantillon biologique est prélevé rapidement après la consommation, dans les 4 à 6 heures (pour le sang) ou 8 à 12 heures (pour les urines).

Dans l'observation reprise dans la *publication* qui suit, on a pu démontrer l'intoxication au GHB d'un homme de 28 ans qui présentait 6 heures après l'admission à l'hôpital un taux sanguin de 43 mg/L et une concentration urinaire de 2324 mg/L.

### **Publication 5**

Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) measurement by GC-MS in blood, urine and gastric contents, following an acute intoxication in Belgium, Quentin Bodson, Raphaël Denooz, Philippe Serpe, Corinne Charlier, *Acta Clinica Belgica*, **2008**; 63: 200-208.

## Case Reports

## GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID (GHB) MEASUREMENT BY GC-MS IN BLOOD, URINE AND GASTRIC CONTENTS, FOLLOWING AN ACUTE INTOXICATION IN BELGIUM

Q. Bodson, R. Denooz, P. Serpe, C. Charlier

**Key words :** GHB, gamma-hydroxybutyrate, intoxication, GC-MS, gas chromatography-mass, spectrometry

### ABSTRACT

Gamma-hydroxybutyrate (GHB, sodium oxybate) is a compound related to neuromodulator gamma-aminobutyric acid (GABA), emerging as a recreational drug of abuse and as a rape drug. GHB-related emergencies have dramatically increased in the 1990s, but a decrease is observed since 2000. We describe the case of an acute GHB intoxication in a 28-year-old male who fell unconscious after ingestion of a mouthful of an unknown beverage, and required medical support for 2 days. A cocaine abuse was also detected by preliminary toxicological screening, but the clinical presentation was not typical of cocaine intoxication.

A simple liquid-liquid extraction was used for quantitation of GHB, followed by disilyl-derivatiza-

tion and analysis in selective ion monitoring (SIM) mode by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using GHB-d6 as internal standard.

High concentrations of GHB were detected in urine (3020 mg/L) and gastric contents (71487 mg/L) at admission. After a 6-hours delay, GHB was still present in urine at 2324 mg/L and in blood at 43 mg/L.

The clinical symptoms of cocaine intoxication were diminished by GHB consumption, and the cerebral scan was modified. Attention must thus be paid to acute intoxications with surprising clinical symptoms, and GHB has probably to be added to the preliminary toxicological screening.

Data available regarding GHB are briefly reviewed, and our results are compared with previously published reports of non-fatal GHB intoxication.

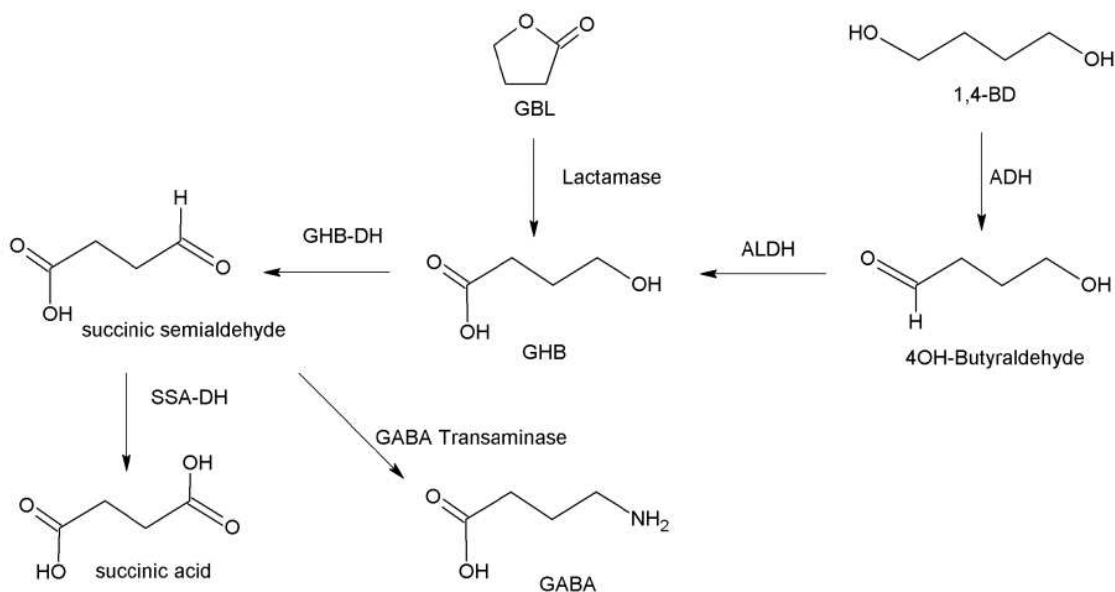
Laboratoire de Toxicologie,  
Université de Liège,  
CHU Sart-Tilman, Belgium

**Address for Correspondence:**  
Phn. Quentin Bodson,  
Laboratoire de Toxicologie Clinique  
Tour II, +5  
CHU Sart-Tilman  
4000 Liège  
Belgium.  
Tel: +32 (0)4 366 76 79  
Fax: +32 (0)4 366 88 89  
E-mail: Q.Bodson@ulg.ac.be

### INTRODUCTION

Gamma-hydroxybutyrate (GHB, sodium oxybate), a compound structurally related to the human depressant neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) (Figure 1), is naturally present at nanomolar concentrations in the mammalian brain (1). It has been shown to act on specific receptors, called GHB receptors (2), and also on GABA-B receptors (3;4).

At low doses (about 10 mg/kg), it induces anxiolysis, somnolence, amnesia, hypotonia; whereas it is hypnotic with powerful sedative properties at higher doses (30 to 60 mg/kg) (5;6). GHB might lead to euphoria, dependence, and shows an unfortunate effectiveness



**Figure 1.** Metabolic pathway of GHB and related substances.

GHB is almost completely metabolized by GHB dehydrogenase (GHB-DH) into succinic semialdehyde, which is then converted by succinic semialdehyde dehydrogenase (SSA-DH) into succinic acid that enters Krebs cycle and leads to the production of CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O. GHB has thus no specifically identifiable oxidation products.

Conversion of GHB into neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) is ensured by GHB-DH and GABA transaminase.

Gamma-butyrolactone (GBL) is converted *in vivo* into GHB by lactamase, which simply breaks open the lactonic ring. 1,4-butanediol (1,4-BD) is oxidized in 4-OH-butaldehyde by ADH (alcohol dehydrogenase), and then converted into GHB by aldehyde dehydrogenase (ALDH).

as a "drug-facilitated sexual assault" agent ("rape drug") (7;8).

GHB, isolated in 1874 (9), was first synthesized by Laborit in the early 1960s (10). GHB was then used for years in Europe and the United States as an anaesthetic agent, as an hypnotic (11) and in the treatment of alcohol withdrawal (12). It was originally considered as a food supplement, sold in health food stores as a sleep aid, as a weight loss drug and as muscle enhancer. GHB was alleged to increase production of growth hormone (13;14), which led to its abuse by bodybuilders as a steroid alternative when steroid use became illegal in the late 1980s (15).

In the 1990s, GHB spread from the sports world over to the club world (16;17). Due to its stimulant, anxiolytic and euphoric effects at low doses, GHB became a popular drug of abuse in clubs, where it is often called "liquid ecstasy", "liquid X", "G", "Grievous Bodily Harm", "liquid E", "Georgia Home Boy", "gamma-oh", "easy lay", etc. Consequently, GHB-related emergencies in the US increased dramatically from 56 cases in 1994 to about

5000 in 2000 (18), but a decrease was observed when GHB was scheduled in 2000 (19-21).

Since the United Nation's decision to put GHB under control in March 2001, GHB has been a controlled substance in most European Union member states. The European Medicines Agency (EMA) has designated it as an "Orphan Medicinal Product" in February 2003, and delivered a marketing authorisation, valid throughout the EU, in October 2005 (22), for the treatment of cataplexy in adult patients with narcolepsy (23;24). GHB is now legally available for this indication, under controlled conditions, in most of the EU member states as in the US (Xyrem®) (22). There are important differences in GHB seizures in Europe, but the global trend seems to be stabilization or decrease in GHB abuse since 2002-2003 (25-27). In Belgium, the trend in GHB use in regard of total drug abuse in recreational settings varied between 1% to 2% from 2002 to 2005 (28).

Gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD), converted *in vivo* to GHB (Figure 1), are not controlled substances (e.g. industrial solvents) (29).

Easily available on the Internet, they are often used for GHB preparation or as GHB substitute (30;31), with an increasing risk of adverse effects due to increased bio-availability (32-34).

Difficulties to find one's personal dose range (an extra 10% can lead from euphoria to vomiting) (35), concentrations variability of available powders and solutions, confusion between GHB, 1,4-BD and GBL, and frequent dilution with alcohol are associated with an elevated occurrence of adverse effects, although it has been shown that there are minimal pharmacokinetic interactions between GHB and ethanol (36).

The half-life of GHB is approximately 30 min and GHB can be totally excreted from the body within 10-12 h. GHB is often undetectable in plasma after 6-8 h, in living patients (37;38).

Moreover, GHB is an endogenous compound and post-mortem production might be significant and become a severe artefact, particularly in blood (39-41). Urine, easily available and less susceptible to post-mortem modification, is the recommended sample (41;42).

In forensic cases (i.e. overdose, death, driving under the influence (DUI), sexual assault), case history, delay of analysis, post-mortem interval (39;43), storage (42;44), clinical presentation (levels of sedation or coma, agitation, combativeness, self-injurious behaviours, etc.) have to be considered for an accurate interpretation of the toxicological findings (45).

## CASE HISTORY

A 28-year-old white male was found in comatose on the public way, in the lateral recovery position, on a Saturday night. He was transported to an emergency department. Friends reported that he had vigilance disorders 10 minutes after ingestion of a mouthful of an unknown beverage. Clinical presentation did not agree with morphinic or cocaine intoxication. The patient was in an ethylic state. The subject's eyes were bloodshot, with a strong bilateral miosis and fixed pupils. He was haemodynamically stable with a pulse of 66 bpm and a blood pressure of 120/80 mm Hg. His respiratory rate was of 19 breaths per minute.

Propofol and remifentanyl were administered upon arrival at the emergency department to allow patient's intubation, and to calm him down. Urine, blood and gastric aspiration were collected for toxicology. Gastric

lavage and activated charcoal administration were performed. A cerebral CT scan showed a cerebral oedema and a suspicion of meningeal haemorrhage. The patient did not show any trace of cutaneous or intravenous injection. Electrocardiogram and cardio-pulmonary examination were normal. Blood tests showed a slight elevation of white blood cell count ( $15440/\text{mm}^3$ ) with normal leukocyte differential. Electrolyte profile was normal. A mild respiratory acidosis (pH 7.29) was present, and lactic acid was elevated (26.4 mg/dL). Renal, liver and pancreatic function tests were normal.

Toxicology screening on Abbott AxSYM® and Roche Cobas Integra 400®, based on "Fluorescence Polarization Immunoassay" (FPIA), were performed on urine, blood and gastric aspiration.

Cocaine metabolite was found highly positive in urine, above the limit of linearity (LOL: 5.0 mg/L). Presence of cocaine in urine (benzoylecgonine > 1.2 mg/L) and blood (benzoylecgonine: 142 µg/L) was confirmed by GC-MS. Benzoylecgonine was detected positive in gastric aspiration by HPLC-DAD, but not quantified. Ethanol was found positive at 1.60 g/L on Abbott AxSYM®, based on "Radiative Energy Attenuation" (REA) technology.

Urine<sup>1</sup> and serum<sup>2</sup> "FPIA"-screening were negative for salicylates, acetaminophen, barbiturates, benzodiazepines, tricyclic antidepressants, cannabinoids, opiates and amphetamines. GC-MS and HPLC-DAD techniques confirmed these findings. Gastric aspiration screening was also negative, after treatment with Subtilisin A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

The patient was transferred to the Intensive Care Unit, where he was extubated rapidly. At day +1, the patient was still complaining about persistence of moderate pulsatile holocranial cephalgias. He also reported a total amnesia of the past events. Electroencephalogram was normal. The patient was discharged 2 days after arrival.

<sup>1</sup> Limits Of Quantitation (LOQ) for urine (in our lab).

Cocaine metabolites : 0.10 mg/L; barbiturates : 0.12 mg/L; benzodiazepines : 0.20 mg/L; tricyclic antidepressants : 40.0 µg/L; salicylates : 5.0 mg/L; cannabinoids : 13.0 µg/L; opiates : 0.06 mg/L; amphetamines : 0.50 mg/L

<sup>2</sup> Limits Of Quantitation (LOQ) for serum (in our lab).

Tricyclic antidepressants : 75.0 µg/L; salicylates : 5.0 mg/L; acetaminophen : 1.0 mg/L; barbiturates : 0.03 mg/L; benzodiazepines : 0.003 mg/L.

Due to intoxication history and clinical evolution (46;47), a specific determination of GHB was performed afterwards on the available samples, i.e. urine obtained at admission and 6 hours after admission, serum obtained 6 hours after admission (blood sample at admission was insufficient), and gastric contents obtained at admission.

To measure GHB in our patient's samples, a conventional technique was used: liquid-liquid extraction followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), with direct derivatization of GHB (48-50).

## MATERIAL (APPARATUS)

### Chemical and reagents

GHB sodium and GHB-d6 sodium were purchased from Cerilliant (Texas, USA) as 1.0 mg/ml solutions in methanol (as salt). Methanol and acetonitrile were analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) grade (both purchased from Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland). Ethyl acetate was Normapur analytical reagents from BDH-Prolabo-VWR. The derivatization reagent was a BSTFA/TMCS mix (99:1, V/V). BSTFA was N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide for gas chromatography from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). TMCS was trimethylchlorosilane for synthesis from Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Germany). 0.1N sulphuric acid solution used for extraction was prepared by dilution of sulphuric acid min 95%, purchased from VEL (Leuven, Belgium).

### Instrumentation

The automated injector was a Combi/Liquid PAL System Autosampler from CTC Analytics – Interscience. The GC model was an Interscience Thermo Electron Corporation Trace GC Ultra Gas Chromatograph with a split/splitless injector. The carrier gas was He (purity grade N60, 99.9999%) and the column used was a VF-5 MS capillary column ((5%-Phenyl)-dimethylpolysiloxane, 30m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) (Factor Four Capillary Column from Varian, The Netherlands). A Thermo Electron Corporation DSQ Mass Selective Detector was coupled to the GC for quantitative analysis.

## Methods

### Extraction

The extraction procedure was the same for urine, serum and gastric aspiration. Gastric contents were centrifuged. All samples were stored at -18°C (44). Each assay included a blank and an in-house quality control of 30 mg/L. To be in the linearity range of the GC, the patient's samples were appropriately diluted with bi-distilled water.

A 6-points calibration curve was built for urine, serum and gastric liquid, respectively. Twenty µl of blank matrix (fresh urine, fresh serum or fresh gastric liquid) were spiked with appropriate volume of GHB working solutions in methanol to obtain concentrations of 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 and 80.0 mg/L. In order to take into consideration the "matrix effect" in the extraction procedure, pure methanol was added to the mix to systematically reach the volume of 40 µl of methanol in every sample.

Similarly, 20 µl of the samples were vortex mixed with 40 µl of methanol. 10 µl of GHB-d6 methanolic solution (40 mg/L) were added as internal standard, followed by 200 µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N and vortex mixed. Ethyl acetate (4 ml) was added, and the compounds were extracted for 10 minutes on a rotating mixer, followed by a centrifugation at 2500 rpm for 5 minutes. The supernatant organic layer was transferred to a clean extraction tube and evaporated to dryness under N<sub>2</sub> gentle flow at 30 °C. The extracts were derivatized with 30 µl of a BSTFA/TMCS mix (99:1, V/V) for 30 min at 70°C. After cooling, the samples were transferred in GC vials.

### Analytical conditions

A 1 µl aliquot of the sample was automatically injected into the column, through which was applied a constant flow of 1.8 mL/min of carrier gas. Splitless mode was used for injection (Splitless time 1 min), and split vent remained opened all analysis long. The injector temperature was 230°C, and the oven temperature was initially set at 60°C, hold for 2 min, increase to 150°C at 10°C/min, then increase to 300°C at 30°C/min, and hold at 300°C for 5 min. The GC-MS transfer line temperature was set at 300 °C and the ion source at 250 °C. The classical electron impact mode at 70 eV was used for the ionization of the compounds. The electron multiplier was operated at 1370V and the

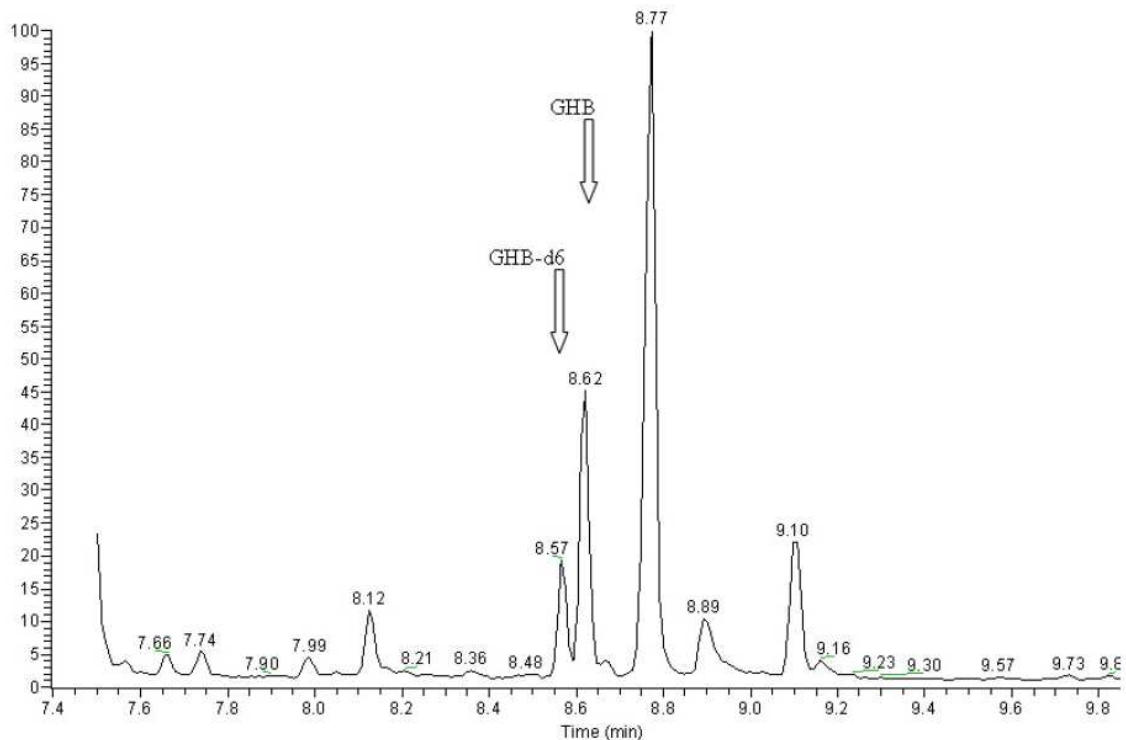


detector gain set at  $1.10^5$ . Dwell times were set at 50 ms for each ion and the total scan time was of 0.27 sec. Prior to all analyses the MS was tuned with the automated DSQ Tune programme.

Pure derivatized GHB and GHB-d6 were injected to define analytical conditions. Data were recorded in full scan mode, for the identification of GHB and GHB-d6 specific ions and to identify appropriate retention time (Figure 2). Retention times were established at 8.57 min for derivatized GHB-d6 and 8.62 for derivatized GHB. Ions selected for Single Ion Monitoring (SIM) of GHB were  $m/z$  233, 204 and 117, and GHB-d6 specific ion was  $m/z$  239 (Figure 3), as previously described (48;51) (underlined ions were used for quantitation).

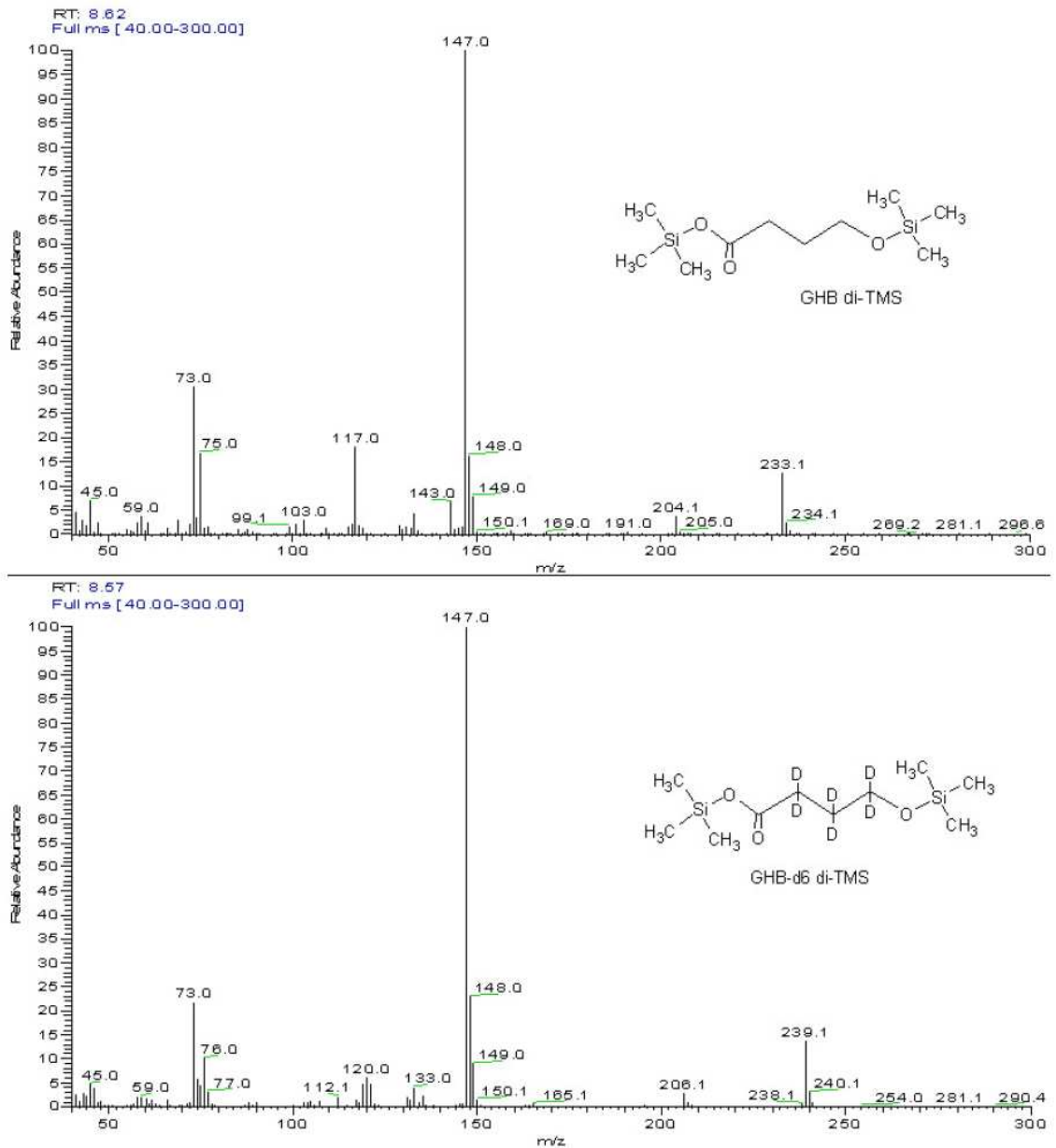
## RESULTS

For all samples, a weighted ( $1/x^2$ ) linear regression analysis of the ratio "GHB peak area to internal standard (GHB-d6) peak area" was performed. The 6-points calibration curves were linear over the concentration range assayed (2.5 to 80 mg/L), and regression fits ( $R^2$ ) were excellent ( $R^2=0.9975$  for urine,  $R^2=0.9971$  for serum and  $R^2=0.9982$  for gastric contents). Independently of the matrix, coefficients of variation were of less than 9% and accuracy ranged between 90.1% and 104.2%. Limit of detection (LOD) was determined as 1 mg/L, and limit of quantitation (LOQ) was defined as the lowest calibrator point, i.e. 2.5 mg/L.



**Figure 2:** GC-MS profile of a derivatized GHB-spiked urine.

Retention times were established at 8.57 min for derivatized GHB-d6 (internal standard) and 8.62 for derivatized GHB. (RT 8.77 = urea; RT 9.10 = phosphate).



**Figure 3:** Mass spectra of the trimethylsilyl derivative of GHB (GHB-di-TMS) and deuterated-GHB (GHB-d6-di-TMS as internal standard). Ions selected for Single Ion Monitoring (SIM) of GHB di-TMS are m/z 233, 204 and 117, and GHB-d6-di-TMS specific ion is m/z 239.



What is quite interesting is that the clinical presentation was not typical of cocaine intoxication, even if cocaine and benzoylecgonine have been ingested.

The clinical symptoms of cocaine intoxication were diminished by GHB consumption, and the cerebral scan was modified. Attention must thus be paid to acute intoxications with surprising clinical symptoms, and GHB has probably to be added to the preliminary toxicological screening.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof. Dr. Alain Verstraete, Laboratory of Clinical Biology and Toxicology, Ghent University Hospital, Belgium, for his kind advice and support. We also thank Dr. Elizabeth H. Crane of the Drug Abuse Warning Network for her collaboration in order to collect statistical data.

## REFERENCES

- Roth RH, Giarmann NJ. Natural occurrence of gamma-hydroxybutyrate in mammalian brain. *Biochem Pharmacol* 1970; 19: 1087-93.
- Snead OC. Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor. *J Neurochem* 2000; 75(5): 1986-96.
- Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, et al. Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* 1999; 38(11): 1667-73.
- Carai MAM, Colombo G, Brunetti G, et al. Role of GABA(B) receptors in the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *Eur J Pharmacol* 2001; 428(3): 315-21.
- Hornfeldt CS, Lothridge K, Upshaw Downs JC. Forensic science update: gamma-hydroxybutyrate (GHB). *Forensic Sci Commun* 2002; 4(1): 1-10.
- Drasbek KR, Christensen J, Jensen K. Gamma-hydroxybutyrate - a drug of abuse. *Acta Neurol Scand* 2006; 114(3): 145-56.
- Schwartz RH, Milteer R, LeBeau MA. Drug-facilitated sexual assault ("date rape"). *South Med J* 2000; 93(6): 558-61.
- Elian AA. A novel method for GHB detection in urine and its application in drug-facilitated sexual assaults. *Forensic Sci Int* 2000; 109(3): 183-7.
- Saytzeff A. Naturally occurring metabolite of GABA thought to function as a neurotransmitter or neuromodulator. The highest conc in humans is found in fetal cerebellum and adult hypothalamus. *Ann* 1874; 171: 258.
- Laborit H, Jouany JM, Gerard J, Fabiani F. Summary of an experimental and clinical study on a metabolic substrate with inhibitory central action: sodium 4-hydroxybutyrate. *Presse Med* 1960; 68: 1867-9.
- Hoes MJ, Vree TB, Guelen PJ. Gamma-hydroxybutyric acid as hypnotic. Clinical and pharmacokinetic evaluation of gamma-hydroxybutyric acid as hypnotic in man. *Encephale* 1980; 6(1): 93-9.
- Addolorato G, Caputo F, Capristo E, Stefanini GF, Gasbarrini G. Gamma-hydroxybutyric acid - Efficacy, potential abuse, and dependence in the treatment of alcohol addiction. *Alcohol* 2000; 20(3): 217-22.
- Takahara J, Yunoki S, Yakushiji W, Yamauchi J, Yamane Y. Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactin release in humans. *J Clin Endocrinol. Metab* 1977; 44(5): 1014-7.
- Rigamonti AE, Muller EE. Gamma-hydroxybutyric acid and growth hormone secretion studies in rats and dogs. *Alcohol* 2000; 20(3): 293-304.
- Krawczeniuk A. The occurrence of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in a steroid seizure. *Microgram* 1993; 26(7): 160-6.
- Rodgers J, Ashton CH, Gilvarry E, Young AH. Liquid ecstasy: a new kid on the dance floor. *Br J Psychiatry* 2004; 184: 104-6.
- Van Sassenbroeck DK, Calle PA, Rousseau FM, et al. Medical problems related to recreational drug use at nocturnal dance parties. *Eur J Emerg Med* 2003; 10(4): 302-8.
- Drug Abuse Warning Network. Trends in Drug-Related Emergency Department Visits, 1994-2002 At a Glance. <https://dawninfo.samhsa.gov>, 2003. Last accessed 10-3-2007.
- Anderson IB, Kim SY, Dyer JE, et al. Trends in gamma-hydroxybutyrate (GHB) and related drug intoxication: 1999 to 2003. *Ann Emerg Med* 2006; 47(2): 177-83.
- Drug Abuse Warning Network. Drug Abuse Warning Network, 2004: National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. <https://dawninfo.samhsa.gov>, 2004. Last accessed 10-3-2007.
- Food and Drug Administration. FDA warns about products containing gamma-butyrolactone or GBL and asks companies to issue a recall. FDA Talk Paper. <http://www.fda.gov/bbs/topics/answers/ans00937.html>, 1999. Last accessed 15-2-2007.
- European Medicines Agency (EMA). Xyrem European Public Assessment Report. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/xyrem/xyrem.htm>, 2007. Last accessed 8-6-2007.
- Mamelak M, Scharf MB, Woods M. Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings. *Sleep* 1986; 9: 285-9.
- Scharf MB, Lai AA, Branigan B, Stover R, Berkowitz DB. Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in narcoleptic patients. *Sleep* 1998; 21(5): 507-14.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). **Annual report 2004: the state of the drugs problem in Europe**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2004: 1-113.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). **Annual report 2005: the state of the drugs problem in Europe**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2005: 1-87.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). **Annual report 2006: the state of the drugs problem in Europe**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2006: 1-96.
- Epidemiology Unit - Scientific Institute of Public Health. Belgian National Report on Drugs 2006. Sleiman S, Roelands M, (eds). Brussels: Scientific Institute of Public Health. 2006: 1-151.
- Andersen MB, Netterstrom B. Unconsciousness after ingestion of nail varnish. *Ugeskr Laeg* 1992; 154(44): 3064.
- Dyer JE. Gamma-Hydroxybutyrate (GHB). In: Olson KR, ed. *Poisoning & Drug Overdose*. New-York, NY: McGraw-Hill/Apleton & Lange. 2004: 210-3.

31. Thai D, Dyer JE, Jacob P, Haller CA. Clinical pharmacology of 1,4-butanediol and gamma-hydroxybutyrate after oral 1,4-butanediol administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81(2): 178-84.
32. Lettieri J, Fung HL. Improved pharmacological activity via pro-drug modification: comparative pharmacokinetics of sodium gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1978; 22(1): 107-18.
33. Dupont P, Thornton J. Near-fatal gamma-butyrolactone intoxication - first report in the UK. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20(1): 19-22.
34. Becker J. A case of gamma-butyrolactone overdose. *Clin Toxicol* 2000; 38(2): 227.
35. The Vaults of Erowid. GHB. <http://www.erowid.org/chemicals/ghb/>, 2007. Last accessed 15-3-2007.
36. Thai D, Dyer JE, Benowitz NL, Haller CA. Gamma-hydroxybutyrate and ethanol effects and interactions in humans. *J Clin Psychopharmacol* 2006; 26(5): 524-9.
37. Brenneisen R, Elshohly MA, Murphy TP, et al. Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J Anal Toxicol* 2004; 28(8): 625-30.
38. Abanades S, Farre M, Segura M, et al. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1074: 559-76.
39. Moriya F, Hashimoto Y. Endogenous gamma-hydroxybutyric acid levels in postmortem blood. *Leg Med (Tokyo)* 2004; 6(1): 47-51.
40. Elliott SP, Lowe P, Symonds A. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. *Forensic Sci Int* 2004; 139(2-3): 183-90.
41. Moriya F, Hashimoto Y. Site-dependent production of gamma-hydroxybutyric acid in the early postmortem period. *Forensic Sci Int* 2005; 148(2-3): 139-42.
42. Kerrigan S. In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples. *J Anal Toxicol* 2002; 26(8): 571-4.
43. Elliott SP. Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid: implications for the interpretation of findings. *J Anal Toxicol* 2004; 28(1): 20-6.
44. LeBeau MA, Miller ML, Levine B. Effect of storage temperature on endogenous GHB levels in urine. *Forensic Sci Int* 2001; 119(2): 161-7.
45. Balikova M. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) misuse or abuse and interpretation of toxicological findings. *Soud Lek* 2005; 50(1): 7-9.
46. Chin RL, Sporer KA, Cullison B, Dyer JE, Wu TD. Clinical course of gamma-hydroxybutyrate overdose. *Ann Emerg Med* 1998; 31(6): 716-22.
47. Dyer JE, Roth B, Hyma BA. Gamma-hydroxybutyrate withdrawal syndrome. *Ann Emerg Med* 2001; 37(2): 147-53.
48. Couper FJ, Logan BK. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000; 24(1): 1-7.
49. Elian AA. GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. *Forensic Sci Int*. 2001; 122(1): 43-7.
50. Villain M, Cirimele V, Ludes B, Kintz P. Ultra-rapid procedure to test for gamma-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003; 792(1): 83-7.
51. Duer WC, Byers KL, Martin JV. Application of a convenient extraction procedure to analyze gamma-hydroxybutyric acid in fatalities involving gamma-hydroxybutyric acid, gamma-butyrolactone, and 1,4-butanediol. *J Anal Toxicol* 2001; 25(7): 576-82.
52. Shima N, Miki A, Kamata T, Katagi M, Tsuchihashi H. Urinary endogenous concentrations of GHB and its isomers in healthy humans and diabetics. *Forensic Sci Int* 2005; 149(2-3): 171-9.
53. Abanades S, Farre M, Segura M, et al. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1074: 559-76.
54. Kintz P, Villain M, Pelissier AL, Cirimele V, Leonetti G. Unusually high concentrations in a fatal GHB case. *J Anal Toxicol* 2005; 29(6): 582-5.
55. Louagie HK, Verstraete AG, De Soete CJ, Baetens DG, Calle PA. A sudden awakening from a near coma after combined intake of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and ethanol. *J Toxicol Clin Toxicol* 1997; 35(6): 591-4.
56. Segers S, Van Sassenbroeck DK, Verstraete AG, Martens P. Gamma-hydroxybutyrate (GHB): van een anesthesieproduct naar illegale drug. *Tijdschr Geneesk* 2002; 58(1): 49-54.
57. Mazarr-Proo S, Kerrigan S. Distribution of GHB in tissues and fluids following a fatal overdose. *J Anal Toxicol* 2005; 29(5): 398-400.
58. Stephens BG, Baselt RC. Driving under the influence of GHB? *J Anal Toxicol* 1994; 18(6): 357-8.
59. Caldicott DG, Chow FY, Burns BJ, Felgate PD, Byard RW. Fatalities associated with the use of gamma-hydroxybutyrate and its analogues in Australasia. *Med J Aust*. 2004; 181(6): 310-3.
60. Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Rossi A. Fatality due to gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and heroin intoxication. *J Forensic Sci* 1995; 40(3): 501-4.
61. Dyer JE, Isaacs SM, Keller KH. Gamma-hydroxybutyrate (GHB)-induced coma with serum and urine drugs levels. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36: 339.
62. Sporer KA, Chin RL, Dyer JE, Lamb R. Gamma-hydroxybutyrate serum levels and clinical syndrome after severe overdose. *Ann Emerg Med* 2003; 42(1): 3-8.
63. Elliott SP. Nonfatal instances of intoxication with gamma-hydroxybutyrate in the United Kingdom. *Ther Drug Monit* 2004; 26(4): 432-40.
64. Couper FJ, Thatcher JE, Logan BK. Suspected GHB overdoses in the emergency department. *J Anal Toxicol* 2004; 28(6): 481-4.
65. Deveaux M, Renet S, Renet V, et al. Use of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) at rave parties and in date rape in France: myth of reality? *Acta Clin Belg Suppl* 2002; 1(1): 37-40.
66. WHO's Expert Committee on Drug Dependence (ECDD). Pre-review of gamma-hydroxybutyric acid (GHB). 2006/WHO ECDD 34th Meeting: 1-31.
67. McCusker RR, Paget-Wilkes H, Chronister CW, Goldberger BA. Analysis of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1999; 23(5): 301-5.

## **IV.5. Les sulfamidés hypoglycémiantes**

La méthode analytique permettant le dosage des sulfonylurées dans les milieux biologiques s'appuie sur la chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC/MS-MS). Elle autorise la mise en évidence de 11 sulfamidés hypoglycémiantes et du répaglinide, seul représentant de la classe des glinides. Elle constitue un outil précieux pour les Cliniciens qui peuvent d'abord vérifier la compliance des patients recevant ces médicaments antidiabétiques, et qui sont ensuite à même d'établir un diagnostic différentiel en présence d'épisodes d'hypoglycémies associées à un hyperinsulinisme. Ces hypoglycémies se rencontrent dans deux pathologies extrêmement rares, d'une part l'hyperinsulinisme congénital, se traduisant par des épisodes d'hypoglycémies sévères survenant le plus souvent chez le nourrisson, et d'autre part l'insulinome, qui se présente sous la forme d'une tumeur bêta-langerhansienne, le plus souvent bénigne, entraînant la sécrétion d'insuline ectopique et non contrôlée, indépendante de la glycémie du sujet. L'insulinome est la principale cause d'hypoglycémie associée à un hyperinsulinisme endogène chez l'adulte non diabétique.

L'absorption de médicaments insulinosécrétagogues effectuée en dehors de toute pathologie fait partie des troubles psychiatriques caractérisés par la volonté du sujet de mimer une maladie, identifiée sous le nom de syndrome de Munchausen. L'hypoglycémie ainsi générée peut conduire à un faux diagnostic et entraîner des traitements médicaux ou chirurgicaux inutiles, comme la pancréatectomie partielle ou totale, thérapeutique de l'insulinome. Ces hypoglycémies sont qualifiées de factices. On comprend dans ces conditions que la recherche et le dosage de sulfamidés insulinosécrétagogues fassent partie de l'arsenal diagnostique nécessaire en cas de suspicion d'insulinome (voir *publication* qui suit). La méthode de dosage développée au laboratoire présente les critères de sensibilité et de spécificité suffisants pour rechercher et doser dans le sang 11 sulfamidés hypoglycémiantes et le répaglinide, avec une limite de quantification de 10 ng/mL pour chacun de ces médicaments.

### **Publication 6**

Intérêt du dosage des sulfamidés hypoglycémiants : de la vérification de la compliance au diagnostic différentiel des hyperinsulinismes, Raphaël Denooz, Corinne Charlier, Revue Médicale de Liège, **2010; 65**, *in press*.

# INTÉRÊT DU DOSAGE DES SULFAMIDÉS HYPOGLYCÉMIANTS :

## de la vérification de la compliance au diagnostic différentiel des hyperinsulinismes

R. DENOZ (1, 2), C. CHARLIER (1, 2)

**RÉSUMÉ :** Plus de cinquante ans après leur mise sur le marché, les sulfamidés hypoglycémiant font toujours partie du traitement de base du diabète non insulino-dépendant. A côté de leurs remarquables propriétés pharmacologiques, ces produits ont, à différentes reprises, été tenus responsables d'hypoglycémies sévères survenant de manière inexplicable chez des sujets non diabétiques. Ce type d'hypoglycémie, qualifiée de factice, est notamment fréquemment retrouvée dans le syndrome de Munchausen, trouble psychiatrique poussant le malade à mimer une pathologie. Cette hypoglycémie est associée à un hyperinsulinisme endogène simulant une pathologie endocrine très rare, l'insulinome. Nous souhaitons faire connaître aux Cliniciens l'intérêt de la recherche et du dosage sanguin des sulfamidés hypoglycémiant dans le cadre du diagnostic différentiel des hyperinsulinismes. La mise en évidence d'une hypoglycémie induite par ces médicaments constitue un élément intéressant pour orienter le diagnostic et éventuellement éviter une pancréatectomie en cas de forte suspicion d'insulinome. La méthode analytique développée au laboratoire s'appuie sur la chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse tandem (UPLC-MS-MS). Par cette technique, on peut mettre en évidence dans le sang une dizaine de sulfonylurées et le répaglinide. Elle constituera à l'avenir une méthode de choix face à toute suspicion de mésusage des sulfonylurées.

**MOTS-CLÉS :** Sulfamidés hypoglycémiant - LC-MS-MS - Insulinome - Syndrome de Munchausen

### LES SULFAMIDÉS HYPOGLYCÉMIANTS

C'est en 1942 que l'effet hypoglycémiant des sulfamidés a été reconnu de manière fortuite, lorsque plusieurs accidents hypoglycémiques sévères furent observés après administration d'un sulfamidé à propriété antibactérienne chez des patients atteints de fièvre typhoïde. Par la suite, A. Loubatières confirme le tropisme particulier de certains sulfamidés pour les cellules insulinosécrétrices des îlots de Langerhans, entraînant une libération accrue d'insuline endogène (1). Et c'est en 1956 que la commercialisation de la première sulfonylurée, le tolbutamide, comme agent antidiabétique, eut lieu. Ce médicament d'un type nouveau représentait la seule alternative aux injections d'insuline pour le traitement des patients diabétiques non insulino-dépendants. Aujourd'hui encore, malgré la commercialisa-

**INTEREST OF SULFONYLUREAS ASSAY: FROM THERAPEUTIC MONITORING TO DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF HYPERINSULINISM.**

**SUMMARY :** More than fifty years after their marketing, sulfonylureas remain one of the most prescribed drugs for the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. However, these products are sometimes responsible of unexplained and severe hypoglycaemias observed on patient without diabetic pathology. These typical hypoglycemias, qualified as factitious, are one of the clinical expressions of the Munchausen syndrome, a psychiatric disorder characterized by the need for the subject to simulate a pathology. The hypoglycemia is associated with an endogenous hyperinsulinism, also observed in a rare endocrine pathology, the insulinoma. This article aims to show the interest of the determination of sulfonylureas in blood for the differential diagnosis of endogenous hyperinsulinisms. The confirmation of a factitious hypoglycemia is capital to avoid a partial or subtotal pancreatectomy, surgical treatment when an insulinoma is suspected. Ultra liquid chromatography coupled with the mass spectrometry tandem (UPLC-MS-MS) technique had been used. The technique allowed the identification and quantification of the most used sulfonylureas and repaglinide in blood, and will be a method of choice to confirm a non-appropriate consumption of sulfonylureas.

**KEYWORDS :** Hypoglycemic sulfonylureas - LC-MS-MS - Insulinoma - Munchausen syndrome

tion d'autres médicaments hypoglycémiant, les sulfonylurées occupent toujours une place de choix dans la prise en charge des patients souffrant du diabète non insulino-dépendant.

Les sulfonylurées dites de première génération comprenaient, outre le tolbutamide, le carbutamide, le chlorpropamide, le tolazamide et l'acétohexamide. D'un point de vue chimique, ces médicaments hypoglycémiant étaient des arylsulfonylurées substituées sur le benzène et sur l'urée. Le premier sulfamidé hypoglycémiant de deuxième génération, à savoir le glibenclamide, fut commercialisé dix ans plus tard. Sa formule chimique est celle d'une arylsulfonylurée, porteuse de structures aliphatiques et de cycles hydrophobes à ses deux extrémités. De structure chimique ainsi modifiée, les sulfonylurées de deuxième génération possédaient une activité pharmacologique beaucoup plus puissante, puisque le glibenclamide est actif à des doses 100 fois plus faibles que les sulfonylurées de première génération. D'autres sulfamidés de deuxième génération allaient rapidement rejoindre l'arsenal thérapeutique disponible, parmi lesquels on peut citer le gli-clazide, le gli-

(1) Service de Toxicologie Clinique, Médicolégale, Environnementale et en Entreprise, CHU de Liège.

(2) Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, Département de Pharmacie, Université de Liège.



pizide et la gliquidone. Le glimépiridine, dernier sulfamidé hypoglycémiant mis sur le marché, est parfois considéré comme le premier hypoglycémiant de troisième génération.

A l'heure actuelle, cinq sulfamidés hypoglycémiants sont commercialisés en Belgique, le glibenclamide, le gliclazide, le glipizide, la gliquidone et le glimépiride.

#### INTÉRÊT DU DOSAGE DES SULFAMIDÉS HYPOGLYCÉMIANTS

Les dosages des sulfonyles dans les prélèvements sanguins ne font pas partie des analyses couramment réalisées dans les laboratoires de toxicologie clinique, alors qu'ils peuvent être utiles pour le suivi thérapeutique pharmacologique des patients diabétiques et pour la recherche des causes d'hypoglycémies inexpliquées.

- Le suivi thérapeutique pharmacologique de cette classe médicamenteuse est rarement utilisé. L'efficacité des traitements hypoglycémiants est en effet parfaitement évaluée par la mesure de la glycémie et mieux de l'hémoglobine glyquée, qui reflète la glycémie moyenne observée au cours des 6 dernières semaines. Chez le sujet non diabétique, le taux d'hémoglobine glyquée se situe entre 4 et 6 % de l'hémoglobine totale, un taux inférieur à 7% constitue l'objectif thérapeutique à atteindre chez le sujet diabétique (2). Outre l'intérêt du dosage sanguin des sulfonyles pour adapter la posologie du patient diabétique, l'évaluation du taux sanguin des sulfonyles est aussi un moyen indispensable pour vérifier la compliance du sujet au traitement lorsque certains doutes subsistent sur le respect du traitement.

- La recherche des sulfamidés dans le sang s'avère également utile pour identifier les causes d'une hypoglycémie inattendue. Elle peut être la conséquence d'une erreur d'administration du médicament. Elle peut aussi être due à une prise volontaire et abusive de médicament hypoglycémiant. Dans ce dernier cas, on observe une hypoglycémie générée volontairement, appelée factice, fréquemment observée dans le syndrome de Munchausen, pathologie psychiatrique caractérisée par le besoin de mimer une maladie (3, 4). Chez l'adulte, la symptomatologie et l'exploration du métabolisme glucidique sont dans ce cas fortement évocatrices d'une pathologie endocrine, l'insulinome (5). Ces patients seront régulièrement hospitalisés pour des symptômes qu'ils ont provoqués consciemment, à l'insu de leur entourage. Des cas d'hypoglycémies factices ont également été observés chez de jeunes enfants, mettant le plus souvent en cause leurs

proches. Ils portent alors le nom de syndrome de Munchausen par procuration (6).

Le dosage sanguin des sulfonyles présente donc plusieurs intérêts : vérifier la compliance du patient au traitement, diagnostiquer une intoxication fortuite, mettre en évidence un mésusage comme dans le syndrome de Munchausen pouvant conduire à un diagnostic erroné, permettre ou confirmer un diagnostic d'hyperinsulinisme.

#### L'HYPOGLYCÉMIE ASSOCIÉE À UN HYPERINSULINISME

L'hypoglycémie induite par un hyperinsulinisme résulte d'un déséquilibre entre le taux sanguin d'insuline et la glycémie. Dans les conditions physiologiques, le taux de glucose dans le sang joue un rôle central dans le contrôle de la sécrétion d'insuline (Fig. 1). La sécrétion de l'hormone se produit lorsque le glucose entre dans la cellule bêta-lingérianne via son récepteur spécifique. Le glucose est alors phosphorylé par une glucokinase, pour conduire in fine via le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire, à la synthèse de 38 molécules d'ATP par molécule de glucose. Lorsque la synthèse d'ATP dans la cellule est suffisamment importante, l'augmentation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture du canal potassique de la cellule pancréatique. La fermeture de ce canal entraîne une dépolarisation de la membrane cellulaire conduisant à l'ouverture du canal calcique, avec entrée de calcium dans la cellule et exocytose d'insuline. On comprend ainsi les liens étroits existant entre la glycémie et l'insuline. La prise de sulfonyles provoque de la même manière une libération d'insuline par blocage direct du canal potassique de la cellule pancréatique.

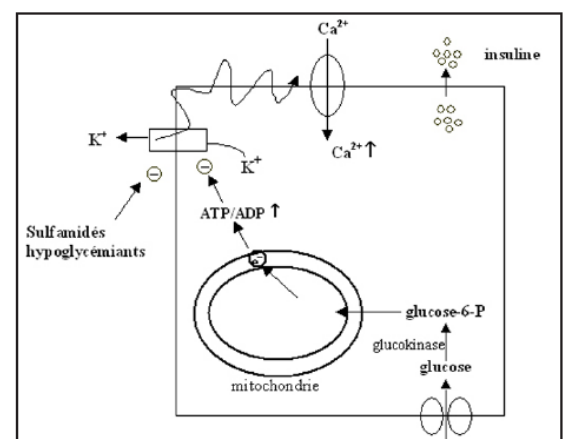


Figure 1. Effet insulinosécrétagogue des sulfamidés hypoglycémiants.

Les hypoglycémies associées à un hyperinsulinisme se rencontrent le plus souvent chez les sujets diabétiques, qu'ils reçoivent de l'insuline ou des sulfamidés hypoglycémiant. Elles s'expliquent par une prise trop importante de ces agents antidiabétiques compte tenu des taux sanguins de glucose. La fréquence des hypoglycémies est estimée, selon la «United Kingdom Prospective Diabetes Study» (UKPDS), à 11%, 17% et 37% pour les patients recevant respectivement chlorpropamide, glibenclamide et insuline (7). Si on ne considère que les épisodes d'hypoglycémies sévères, c'est à dire nécessitant une intervention d'un tiers, ces taux passent respectivement à 1,0%, 1,4% et 1,8%. Ainsi, au moins 1% des diabétiques sous sulfonurées développe chaque année une hypoglycémie sévère. Ce risque hypoglycémique constitue toujours aujourd'hui le principal obstacle à l'augmentation des doses de sulfamidés chez les patients dont le traitement est jugé insuffisant.

En l'absence de prise de médicaments hypoglycémiant, les deux principales causes responsables d'hypoglycémies avec hyperinsulinisme sont l'insulinome et l'hyperinsulinisme congénital (8-9). L'insulinome comprend la quasi totalité des hyperinsulinismes endogènes chez l'adulte et l'enfant de plus de 5 ans, alors que l'hyperinsulinisme congénital, caractérisé par une hyperplasie diffuse ou localisée des cellules de Langerhans, se révèle chez le nourrisson ou au cours de la petite enfance.

#### L'INSULINOME

Il s'agit d'une tumeur bêta-*langerhansienne*, habituellement bénigne, générant une sécrétion d'insuline ectopique et non contrôlée, totalement indépendant de la glycémie du sujet (10). L'insulinome est rarement dû (moins de 10% des cas) à une néoplasie maligne endocrinienne multiple de type 1 (NEM-1). L'apparition de cette pathologie est rare puisqu'elle ne touche que quatre personnes par million d'individus, avec une faible prédominance chez la femme (9). L'insulinome constitue la principale cause d'hypoglycémie associée à un hyperinsulinisme chez l'adulte non diabétique et peut survenir à tout âge, avec cependant une prédominance entre 40 et 70 ans. L'hypoglycémie apparaît le plus souvent en période de jeûne, plus de 6 heures après le dernier repas, ou à la suite d'un léger effort physique. Les symptômes cliniques qui sont peu spécifiques, associent troubles visuels, confusion et dysphorie, et sont incapables à eux seuls d'établir le diagnostic. En raison de la très faible fréquence de la pathologie dans la population générale et du manque de spécificité des signes

cliniques, le diagnostic de l'insulinome est parfois méconnu et peut demander plusieurs années avant d'être affirmé (11). En outre, lorsqu'ils sont présents, les signes neurologiques peuvent faire penser à des troubles psychiatriques, masquant encore plus la pathologie endocrine. L'insulinome, dont le traitement repose principalement sur l'ablation chirurgicale, peut être actuellement détectée et localisée localisé dans plus de 95% des cas par les techniques d'imagerie médicale (12).

#### L'HYPERINSULINISME CONGÉNITAL

L'hyperinsulinisme congénital apparaît le plus souvent dès les premiers jours de vie, parfois au cours des premières années de l'enfance. De fréquence estimée à 1 pour 30.000 à 1 pour 50.000, il est généralement responsable d'hypoglycémies sévères nécessitant une prise en charge rapide pour prévenir le risque de séquelles neurologiques (13). Il existe plusieurs types d'hyperinsulinisme congénital différenciés sur base du moment d'apparition des symptômes, période néonatale ou pendant les premières années de la vie, du type anatomopathologique de la lésion, focale ou diffuse, et du mode de transmission génétique, sporadique, autosomique récessif ou dominant (8). La principale cause d'hyperinsulinisme congénital est le dysfonctionnement du canal potassique pancréatique. Le traitement médical consiste à corriger l'hypoglycémie et à limiter les effets de l'insuline. La pancréatectomie partielle permet de guérir les formes focales, alors que les formes diffuses nécessitent une pancréatectomie subtotale avec un risque non négligeable de conduire à l'installation d'un diabète.

#### DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES HYPOGLYCÉMIES AVEC HYPERINSULINISME

Pour établir le diagnostic différentiel des hypoglycémies avec hyperinsulinisme, on s'appuie sur une anamnèse du patient, un examen clinique, des tests biologiques et l'imagerie médicale. Il est important de prendre en considération la possibilité d'une hypoglycémie factice accompagnant ce type de symptomatologie, que ce soit par injection d'insuline ou ingestion de médicaments insulinosécrétagogues.

L'injection d'insuline peut rapidement être confirmée au moyen de tests biologiques, représentés par un dosage sanguin d'insuline et de peptide C. Un taux effondré de ce dernier en présence d'un hyperinsulinisme est en effet très évocateur d'une prise d'insuline exogène. Par contre, un taux élevé de peptide C lors d'un

épisode d'hypoglycémie associée à un hyperinsulinisme est témoin d'une sécrétion endogène non contrôlée d'insuline. Cette situation se rencontre aussi bien dans des pathologies endocrines comme l'insulinome et l'hyperinsulinisme congénital qu'à la suite d'une ingestion de médicaments insulinosécrétagogues.

Des hypoglycémies factices sont susceptibles d'amener à un faux diagnostic d'insulinome en l'absence de recherche de consommation de médicaments (14). Une étude anglaise cite le chiffre de 37% d'hypoglycémies induites par une sulfonylurée dans une population de 93 patients préalablement suspectée d'être porteuse d'un insulinome (5). Dans deux autres études, 10 et 17% des hypoglycémies initialement inexplicables sont dues à la consommation d'une sulfonylurée (15).

Il est dès lors essentiel de rechercher la consommation de médicaments insulinosécrétagogues quand on veut établir le diagnostic des hypoglycémies induites par un hyperinsulinisme endogène.

#### DOSAGE DES SULFAMIDÉS HYPOGLYCÉMIANTS DÉVELOPPÉ AU CHU DE LIÈGE DANS LE CADRE DU DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES HYPOGLYCÉMIÉS SECONDAIRES À UN HYPERINSULINISME

Plusieurs techniques chromatographiques ont été décrites pour rechercher et doser les sulfamidés hypoglycémiant (16). La plupart de ces méthodes analytiques ont cependant été développées pour le dosage d'un seul agent hypoglycémiant, le plus souvent dans le cadre d'études pharmacocinétiques ou en rapport avec une intoxication. Ces techniques ne conviennent donc pas pour la mise en évidence d'hypoglycémies factices, où plusieurs médicaments peuvent être concernés. Dans ces cas où il est demandé d'exclure une hypoglycémie factice, on doit impérativement rechercher le plus grand nombre possible d'agents insulinosécrétagogues, afin d'éviter le risque d'un résultat faussement négatif. D'autant qu'en raison de l'existence d'un approvisionnement possible par internet de ces agents hypoglycémiant, l'étude ciblée de médicaments commercialisés dans notre pays est insuffisante. Pour ces différentes raisons, la technique d'analyse développée au laboratoire de Toxicologie clinique du CHU de Liège concerne un grand nombre de sulfamidés hypoglycémiant, les cinq médicaments commercialisés en Belgique (glibenclamide – Daonil<sup>®</sup>, Beroren<sup>®</sup>; gliclazide – Diamicon<sup>®</sup>; glipizide – Glibenèse<sup>®</sup>, Minidiab<sup>®</sup>; gliquidone – Glurenorm<sup>®</sup>, glimépi-

ride – Amarylle<sup>®</sup>), auxquels s'ajoutent d'autres sulfonylurées disponibles sur le marché international (carbutamide, chlorpropamide, tolbutamide, tolazamide, glibornuride, acétohexamide). On y adjoindra le répaglinide – Novonorm<sup>®</sup>, seul représentant de la classe des glinides, dont le mécanisme d'action sur la sécrétion d'insuline est tout à fait comparable à celui des sulfonylurées.

La recherche d'une consommation de sulfamidés hypoglycémiant doit se faire sur un échantillon sanguin prélevé le plus rapidement possible après l'épisode d'hypoglycémie. Le prélèvement sanguin avec lequel l'hyperinsulinisme a été mis en évidence constitue d'ailleurs l'échantillon idéal. En dehors de ces conditions, l'hypoglycémie factice ne pourra être exclue avec certitude. Les sulfamidés sont en effet pour la plupart rapidement éliminés du sang après une prise unique, avec des temps d'élimination variant de 12 à 24 heures selon les molécules. Le recours à des techniques analytiques très sensibles et très spécifiques est en l'occurrence indispensable pour ces recherches. La technique développée au laboratoire est une chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS-MS), technologie garantissant à l'heure actuelle la meilleure sensibilité et spécificité pour ces médicaments anti-diabétiques. L'urine, contenant principalement les métabolites de ces agents pharmacologiques, peut également être utilisée mais uniquement en complément des analyses sanguines.

Cette technique originale constitue dès à présent un outil précieux au service des Cliniciens et surtout des Diabétologues pour exclure une hypoglycémie factice induite par des médicaments insulinosécrétagogues et affirmer le diagnostic de l'hyperinsulinisme endogène avec hypoglycémie.

#### CONCLUSION

Les hypoglycémies répétitives et inexplicables survenant chez le sujet non diabétique, associées à un hyperinsulinisme endogène, évoquent la prise clandestine de médicaments insulinosécrétagogues. C'est pourquoi, la mise en évidence de ces médicaments dans le sang doit être systématiquement réalisée en cas de suspicion d'insulinome ou d'hyperinsulinisme congénital. La technique de recherche de ces agents pharmacologiques doit être très sensible, comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, et doit permettre d'identifier le plus grand nombre de sulfonylurées, auquel on ajoutera le répaglinide. Le prélèvement sanguin

doit être réalisé lors de l'épisode d'hypoglycémie, afin d'éviter tout résultat faussement négatif. La technique chromatographique développée au laboratoire de Toxicologie clinique du CHU de Liège permet de dépister les hypoglycémies factices, l'une des pathomimies les plus fréquentes du syndrome de Munchausen.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Scheen A. Les sulfamidés hypoglycémiant, 50 ans après Loubatières. *Rev. Med. Liege*, 1996, **51**, 90-93.
2. Rosenstock J.— Treatment strategies and new therapeutic advances for type 2 diabetes. *Diabetes Educ*, 2000, **26**, 14-18.
3. Charlton R, Smith G, Day A.— Munchausen's syndrome manifesting as factitious hypoglycemia. *Diabetologia*, 2001, **44**, 784-785
4. Bretz S.W., Richards J.R. Munchausen syndrome presenting acutely in the Emergency Department. *J. Emerg. Med.* 2000, **18**, 417-420.
5. Kwong P, Teale JD.— Screening for sulphonylureas in the investigation of hypoglycemia. *J R Soc Med*, 2002, **95**, 381-385.
6. Bougnères P.— Hypoglycémies "occultes", Munchausen par ou sans les parents. *Med Clin Pediatr*, 2002, **2**, 16-17.
7. Del Prato S, Pulizzi N.— The place of sulfonylureas in the therapy for type 2. *Metabolism*, 2006, **55**, S20-27.
8. Giurgea I, Ribeiro MJ, Boddart N.— Congenital Hyperinsulinism in Newborn and Infant. *Arch Pediatr*, 2005, **12**, 1628-1635
9. Service FJ, McMahon MM, O'Brien PC, et al.— Functioning insulinoma-incidence, recurrence, and long-term survival of patients : a 60-years study. *Mayo Clin Proc*, 1991, **66**, 711-719.
10. Nikfarjam M, Warshaw AL, Axelrod L, et al.— Improved Contemporary Surgical Management of Insulinomas: A 25-year Experience at the Massachusetts General Hospital *Ann Surg*, 2008, **247**, 165-172.
11. Palladino AA, Bennett MJ, Stanley CA.— Hyperinsulinism in Infancy and Childhood: When an Insulin Level is Not Always Enough. *Clin Chem*, 2008, **54**, 256-263.
12. Rostambeigi N, Thompson GB.— What should be done in an operating room when an insulinoma cannot be found ? *Clin Endocrinology*, 2009, **70**, 512-515.
13. Dekelbab BH, Sperling MA.— Recent advances in hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Acta Paediatrica*, 2006, **95**, 1157-1164.
14. Bardin C, Tafzi N.— Difficultés d'interprétation en toxicologie : identification plasmatique de sulfamidés hypoglycémiant et hypoglycémies inexplicées. *Rev Fr Lab*, 2008, **406**, 39-42.
15. Guillausseau PJ, Laloi-Michelin M, Delaval-Molko A.— Hypoglycémies factices de l'adulte. *Med Ther Endocrinol Repro*, 2002, **4**, 145-148.
16. Hozey G, Trenque T, Binet L.— Recherche et dosage de sulfamidés hypoglycémiant dans le plasma humain par CLHP-MS/MS à trappe d'ions : Validation et application au dépistage des hypoglycémies factices. *Ann Toxicol Anal*, 2006, **18**, 197-205.

Les demandes de tirés à part sont à adresser à Mr. R. Denooz, Service de Toxicologie clinique, Médico-légale, Environnementale et en Entreprise, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.  
Email : Raphael.Denooz@chu.ulg.ac.be

## IV.6. Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines appartiennent à un groupe d'antibiotiques très utilisés, particulièrement pour le traitement des infections sévères dans les unités de soins intensifs. Antibiotiques à bactéricidie temps dépendante, leur activité pharmacologique est proportionnelle à leur temps de contact avec les germes pathogènes. L'efficacité du traitement pour les  $\beta$ -lactamines est maximale lorsque leur concentration plasmatique à l'équilibre atteint 4 à 5 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) des germes responsables de l'infection. Pour atteindre de telles concentrations, leur mode d'administration est le plus souvent la perfusion continue. La connaissance des taux plasmatiques de ces antibiotiques est par conséquent indispensable pour évaluer valablement l'efficacité de la thérapie antimicrobienne.

Une méthode permettant le dosage des  $\beta$ -lactamines dans le plasma a été développée (*publication 7*). Elle est basée sur une extraction en phase solide suivie d'une analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes. Elle permet le dosage plasmatique simultané de 5  $\beta$ -lactamines, la céfépime, la ceftazidime, la céfuroxime, le méropénème et la pipéracilline. La validation analytique de cette méthode montre que :

- pour chaque antibiotique, la technique est linéaire de 2.5 à 60  $\mu\text{g/mL}$  ;
- pour les niveaux de concentration 5, 15, 30 et 50  $\mu\text{g/mL}$ , les biais calculés sont compris entre 93.2 et 107.1% et les coefficients de variation entre 0.9 et 12.2% ;
- la limite de quantification est de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  pour la ceftazidime, le méropénème et la pipéracilline et de 1  $\mu\text{g/mL}$  pour la céfépime et la céfuroxime.

La sensibilité de la méthode directe est dès lors suffisante pour proposer un suivi thérapeutique pharmaceutique des  $\beta$ -lactamines lorsque les CMI sont comprises entre 0.5 et 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Les patients admis dans les unités de soins intensifs, souvent dans un état grave, subissent régulièrement d'importantes modifications hémodynamiques (déficience organique, choc septique, épuration extracorporelle, administration d'importants volumes de solutés, etc...). Le profil pharmacocinétique des médicaments antimicrobiens utilisés fréquemment dans cette population fragilisée est un outil précieux pour ajuster valablement leur traitement antibactérien. Le dosage de la ceftazidime dans des échantillons plasmatiques provenant de 20

patients admis aux soins intensifs a démontré tout l'intérêt clinique de la méthode de dosage des  $\beta$ -lactamines que nous avons mise au point (*publication 8*).

Pour cette étude rétrospective, 10 malades présentant une fonction rénale normale (clairance à la créatinine supérieure à 60 mL/minute) et 10 autres patients présentant une insuffisance rénale plus ou moins sévère (clairance à la créatinine inférieure à 60 mL/minute) constituent la population étudiée. Dans chaque cas, la dose de charge est de 2 g de ceftazidime, suivie d'une perfusion continue de 2 à 8 g par 24 heures, et des prélèvements sanguins ont été réalisés plusieurs jours après l'instauration du traitement pour être ensuite soumis à l'analyse chromatographique.

Le suivi thérapeutique pharmacologique montre que la posologie standardisée de ceftazidime à 6 g par 24 heures, pour les patients à fonction rénale normale, est adéquate pour les germes dont la CMI est de 4  $\mu$ g/mL. A cette posologie, lorsque la fonction rénale est normale, le taux plasmatique moyen est de 34.2  $\mu$ g/mL (supérieur à 20  $\mu$ g/mL, 5 fois la CMI). La posologie de 6 g par 24 heures peut être réduite à 2 ou 3 g par jour pour traiter des infections à germes plus sensibles (CMI de 1 ou 2  $\mu$ g/mL). Pour les malades à fonction rénale réduite, le suivi thérapeutique pharmacologique met le plus souvent en évidence des posologies inadaptées, imposant le plus souvent d'importantes réductions posologiques.

Sur la base des données biologiques que nous avons rassemblées, il apparaît que le suivi thérapeutique pharmacologique des  $\beta$ -lactamines permettra d'améliorer l'efficacité de la thérapie antimicrobienne et conduira à la réduction significative des coûts.

### **Publication 7**

Simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Raphaël Denooz, Corinne Charlier, *Journal of Chromatography B*, **2008**; 864: 161-167.

Short communication

## Simultaneous determination of five $\beta$ -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection

Raphaël Denooz\*, Corinne Charlier

*Laboratoire de Toxicologie Clinique et de Toxicologie Médico-Légale, Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman B 35, B 4000 Liège, Belgium*

Received 30 October 2007; accepted 16 January 2008

Available online 2 February 2008

### Abstract

Monitoring of plasma antibiotic drugs is useful for better clinical management in infected patients, particularly in intensive care units. A simple and sensitive high-performance liquid chromatography (HPLC) method with ultraviolet (UV) detection has been developed and validated for simultaneous quantification of five  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma: cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin. The plasma sample, after spiked with ceftoranid as an internal standard (IS), was submitted to a solid-phase extraction (SPE) prior to HPLC analysis. A chromatographic separation was achieved on a C8 symmetry column with a mobile phase consisting of an acetonitrile and phosphate buffer (pH 7.4) mixture in a gradient mode. Detection was carried out at a wavelength between 200 and 400 nm. The method developed was linear over the concentration range of 2.5–60  $\mu\text{g/mL}$  for each antibiotic in the plasma samples. Accuracy ranged from 93.2 to 107.1% and precision was between 0.9 and 12.2%. The method has been applied to plasma samples obtained from patients treated with  $\beta$ -lactam antibiotics and is appropriated for easy determination of plasma concentrations for therapeutic monitoring applications.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:**  $\beta$ -Lactam antibiotics; Plasma; HPLC–UV

### 1. Introduction

The discovery of penicillin in the middle of the last century (1928) revolutionized the treatment of patients with infectious diseases. After the introduction of penicillin for clinical use, a large number of other antimicrobials were added to the antimicrobial arsenal: tetracyclines, cephalosporins, aminoglycosides. Eighty years later,  $\beta$ -lactam antibiotics are always one of the most frequently used antimicrobial agents, including penicillin derivatives, cephalosporins, monobactams, carbapenems and  $\beta$ -lactamase inhibitors [1].

$\beta$ -Lactams are time-dependent antibiotics, which implies that their activity is primarily related to the time during which their serum concentration remains above the minimal inhibition con-

centration (MIC) for the offending organism. This period above the MIC is the major parameter determining efficacy of  $\beta$ -lactam antibiotics. Many authors suggest that the time the concentration of the antibiotic remains above the MIC should be long, from 40 to 70% of the interval-time between doses [2]. Sometimes, a more long time, up to 100% of the dosing interval, may be needed in case of resistant organisms [3]. As announced in the scientific notices, the MIC for the described antibiotics are very different from one bacteria to another one, but are very often comprised between 0.5 and 4  $\mu\text{g/mL}$  for the most sensitive germs. Determination of the serum concentration of antimicrobials and comparison with the MIC of the micro-organism causing the infection is now an effective tool in individualising antimicrobial therapy. These evaluations led to the optimisation of the dosage regimens which allow to increase clinical efficacy and to reduce the selection of resistant mutants [4–6].

The purpose of this study was to develop a reproducible, reliable, rapid and selective method for the determination

\* Corresponding author. Tel.: +32 4 366 88 16; fax: +32 4 366 88 89.  
E-mail address: [Raphael.denooz@chu.ulg.ac.be](mailto:Raphael.denooz@chu.ulg.ac.be) (R. Denooz).



of five  $\beta$ -lactam antibiotics in plasma for therapeutic drug monitoring. Various methods have already been developed to analyse antibiotics in biological fluids using different sample preparation procedures: precipitation, liquid- or solid-phase extraction, generally followed by liquid chromatography coupled to UV detection [7–15].

We introduced a simple and rapid assay method for the simultaneous determination of piperacillin (penicillin derivate), cefuroxim (second generation cephalosporin), ceftazidim (third generation cephalosporin), cefepim (fourth generation cephalosporin) and meropenem (carbapenem) in plasma. Compared to other LC methods using UV detection that have been published for  $\beta$ -lactams in biological samples, our technique is able to measure simultaneously these five different compounds under the same extraction and chromatographic conditions.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and chemicals

Piperacillin was kindly provided by Wyeth Pharmaceuticals (Louvain-la-Neuve, Belgium). Ceftazidim and cefuroxim were generously supplied by GlaxoSmithKline (Erembodegem, Belgium), cefepim and ceforanid by Bristol-Myers (Braine-l'Alleud, Belgium) and meropenem by AstraZeneca (Destelbergen, Belgium). These products were obtained as certified reference compounds. Acetonitrile and methanol (MeOH) were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands), potassium dihydrogenophosphate and di-sodium hydrogenophosphate from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were at least of analytical grade. HPLC-grade water was produced by a laboratory MilliQ system (Millipore, Bruxelles, Belgium). Pooled blank plasma was purchased from the blood bank of the Hospital. End-capped C18 SPE cartridges (pore size: 60 Å; particle size: 45  $\mu$ m; specific surface: 500 m<sup>2</sup>/g; sorbent: 100 mg; volume: 1 mL; carbon content: 14%) were from Macherey-Nagel (Düren, Germany).

### 2.2. Chromatographic system

The development and validation work was carried out on a chromatographic system consisting of a Waters Alliance 2695 Separation Module, equipped with a quaternary, low-pressure mixing pump, a degassing line and a thermostated autosampler, connected with a Waters 2996 photodiode array detector (Zellik, Belgium). The Empower<sup>®</sup> software (Waters) was used to pilot the HPLC instrument and to process the data (area integration, calculation and plotting of chromatograms). Baselines were visually inspected and were manually adjusted when necessary.

HPLC separation was performed at 25 °C using a Symmetry<sup>®</sup> C8 analytical column (250 mm  $\times$  4.6 mm i.d.) packed with 5  $\mu$ m diameter particles (Waters), equipped with a guard column (20 mm  $\times$  4.6 mm) containing identical packing material. The autosampler was programmed with an injection volume of 40  $\mu$ L, a carousel temperature of 4 °C and a run time of 35 min.

The mobile phase consisted in acetonitrile (A) and a phosphate buffer (B). It was delivered at 1 mL/min, with the following

step-wise gradient elution program: 5% A at time 0, held for 5 min; then the proportion of A was linearly increased to 50% in 20 min, held 1 min and finally decreased to 5% in 5 min. The UV-vis spectra were obtained in the range 200–400 nm.

### 2.3. Solutions

Stock standard solutions were prepared by dissolving antibiotics (20 mg) in 10 mL of ultrapure water to get a 2.0 mg/mL concentration for each component. Plasma calibration standards at 2.5, 5, 10, 20, 40 and 60  $\mu$ g/mL concentration of each antibiotic, and plasma control samples at 15, 30 and 50  $\mu$ g/mL were prepared in batches of 10 mL by adding appropriate volumes of the respective stock solutions to blank plasma. Calibration standards and control samples were stored as 500  $\mu$ L aliquots in polypropylene Eppendorf tubes at  $-80$  °C until use and thawed the day of analysis. The compound ceforanide was used as the internal standard at the concentration of 125  $\mu$ g/mL in ultrapure water. This solution was stored at  $-80$  °C.

Phosphate buffer solution was prepared by mixing 197 mL of a 1/15 M potassium dihydrogenophosphate solution (9.07 g dissolved in 1000.0 mL of ultrapure water) and 803 mL of a 1/15 M di-sodium hydrogenophosphate solution (11.87 g dissolved in 1000.0 mL of ultrapure water). The pH was adjusted to 7.4. The buffer solution was filtered through a 0.45- $\mu$ m HV filter (Millipore) prior to use.

### 2.4. Sample preparation

Calibration curve standards, quality controls and patient samples were thawed and allowed to equilibrate at room temperature. The thawed samples were vortexed to ensure complete mixing of contents. The clean up procedure of the biological samples was performed by SPE using the 24 tubes vacuum manifold Macherey-Nagel (Düren, Germany). The C18 sep-pak cartridges (Waters) were conditioned with 3  $\times$  1 mL MeOH followed by 2  $\times$  1 mL phosphate buffer pH 7.4. Five hundred microliters of plasma was mixed in a polypropylene Eppendorf vial with 50  $\mu$ L of I.S. solution. Then, 500  $\mu$ L of the resulting solution were loaded on the cartridges and completely drawn through under light vacuum (typically 5 mm Hg). The cartridge was washed four times with 300  $\mu$ L of phosphate buffer pH 7.4 solution and twice with 300  $\mu$ L of 5% MeOH in phosphate buffer pH 7.4 solution. Antibiotics were desorbed three times with 500  $\mu$ L of MeOH. The eluted solutions were evaporated under a nitrogen stream at +30 °C and the residue was reconstituted in 100  $\mu$ L of phosphate buffer-acetonitrile (95:5, v/v). Samples were introduced into 200  $\mu$ L HPLC microvials and a volume of 30  $\mu$ L was used for HPLC analysis.

### 2.5. Validation of the method

The method has been validated following the general guidelines for validation of analytical methods with the Enoval program [16,17].

Calibration curves were obtained by plotting ratios of analyte peak area divided by internal standard peak area versus the

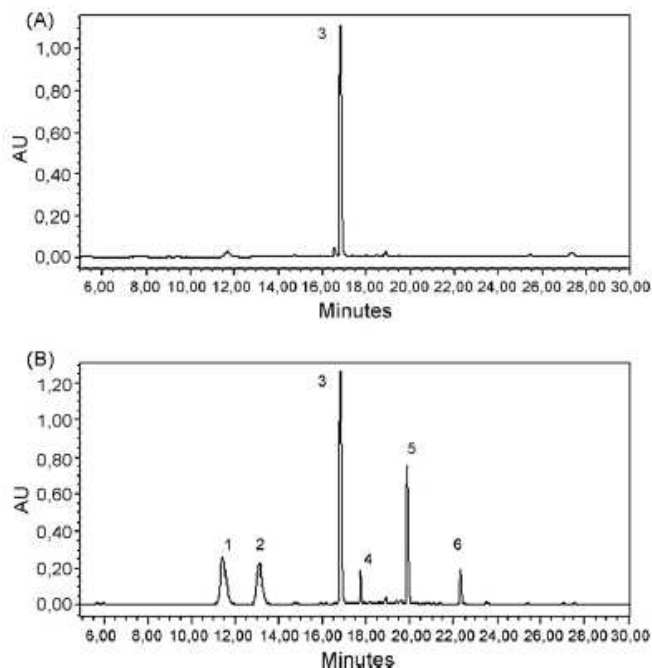


Fig. 1. HPLC chromatograms of (A) a blank patient plasma and (B) a plasma spiked with 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each antibiotic and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the internal standard (1, ceftazidim; 2, cefepim; 3, ceforanide; 4, meropenem; 5, cefuroxim; 6, piperacillin).

analyte concentrations in spiked samples. The concentration of the unknown sample was calculated using linear regression analysis. The linearity of the method was demonstrated over the concentration range of 2.5–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for each compound by assaying six calibration standards in duplicate, one set at

the beginning and the second at the end of the HPLC run, on three separate occasions. Control samples were analysed in triplicates at four concentration levels (5, 15, 30 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of each compound, on three different days too. The control samples were used for determination of precision and accuracy of the method, calculated with the established calibration curves, and, of course, in each run. The limits of quantification (LOQ) were experimentally determined by analysing plasma samples spiked with antibiotics at 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations. The lower LOQ was chosen as the concentration which provided measurements with a precision and accuracy within the recommended  $\pm 20\%$  from their nominal values, in accordance with the FDA guidelines [18].

Different solutions were prepared to evaluate the absolute recovery: spiked plasma (5, 15, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) subjected to SPE before being injected into the HPLC system and spiked aqueous solutions, not subjected to SPE, but injected directly into the system at equivalent concentrations of antibiotics. The absolute recovery (expressed in %) was evaluated as the ratio of the concentrations of antibiotics calculated for each solution.

The stability of antibiotics in plasma and in stock solutions was inspected during all the storage steps (i.e., at room temperature (22–25  $^{\circ}\text{C}$ ), at +4  $^{\circ}\text{C}$  and at –80  $^{\circ}\text{C}$ ). To determine the stability of  $\beta$ -lactams in the matrix, the plasma pool was spiked with the standard mixture to achieve a concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for each antimicrobial agent and then aliquoted in polypropylene Eppendorf tubes. Five aliquots from each storage condition were analysed at hour 0, 3, 6, 9, 12 and 24 for the room temperature stability study, at hour 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 for the test at +4  $^{\circ}\text{C}$ , and at week 1, 2, 4 and 8 for samples stored at –80  $^{\circ}\text{C}$ . After being placed at the appropriated temperature, samples were stored if necessary at –80  $^{\circ}\text{C}$  until the day of analysis.

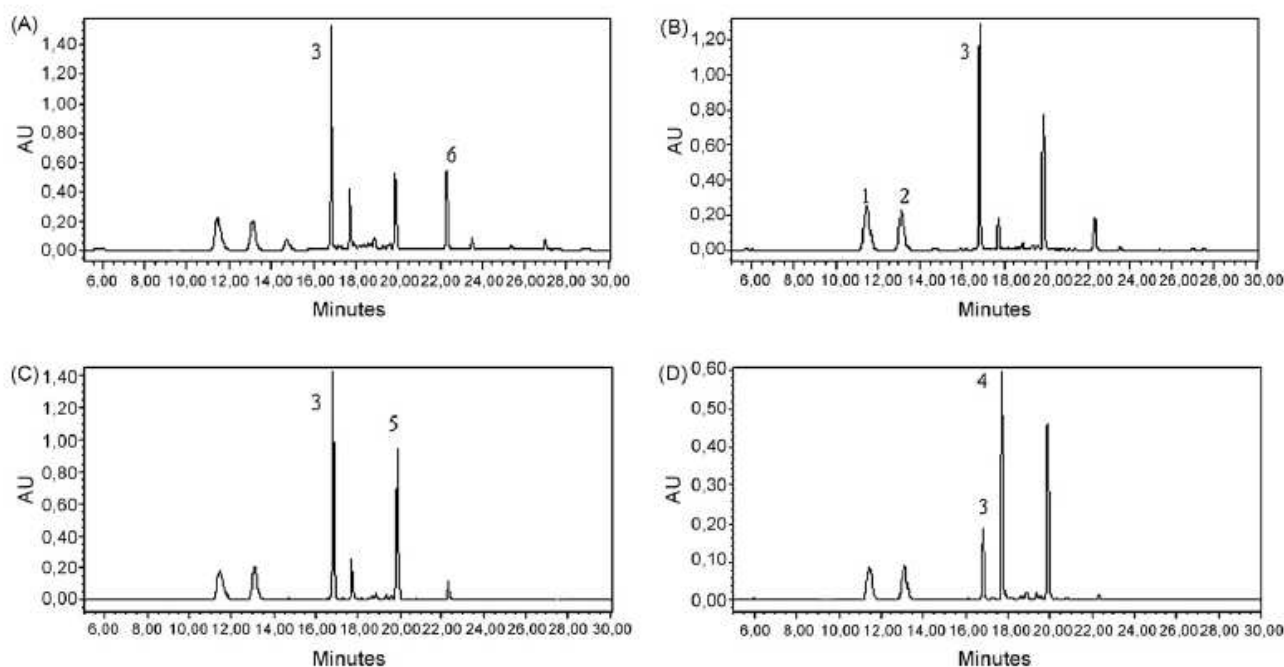


Fig. 2. The stacked chromatograms of a standard mixture of antibiotics at 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  at 220 nm (A), at 256 nm (B), at 270 nm (C) and at 300 nm (D) (1, ceftazidim; 2, cefepim; 3, ceforanide; 4, meropenem; 5, cefuroxim; 6, piperacillin).

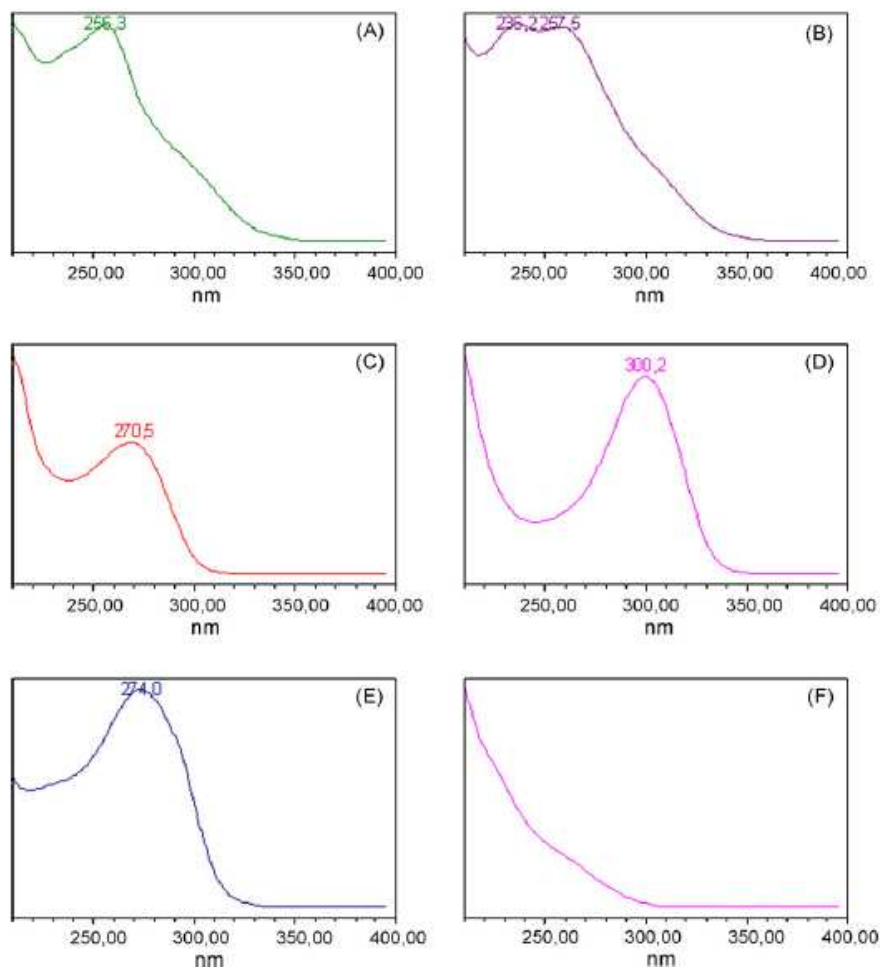


Fig. 3. The UV-vis spectra between 200 and 400 nm of each analyte (A, ceftazidim; B, cefepim; C, ceforanide; D, meropenem; E, cefuroxim; F, piperacillin).

Solutions of ceforanide at the concentration of 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in ultrapure water were tested too. Prior to their analysis, frozen samples were brought to room temperature and vortex-mixed well and concentrations were determined using calibration curves. The freezing-thawing stability of drugs at  $-80^\circ\text{C}$  was also confirmed. Samples were then analysed on a daily basis after repeated freezing-thawing cycles at  $-80^\circ\text{C}$  on three consecutive days. Drugs were considered stable in plasma if at least 90% of products were retained at the end of the study period and, stable if at least 95% were retained in the other solutions.

The influence of the matrix on the extraction by SPE was tested by varying the concentrations of proteins. Plasma, before spiked with antibiotics, was diluted with zero to ten volumes of physiological serum (NaCl 0.9%) to investigate the influence of proteins on the extraction procedure.

Each of the studied antibiotics were known to be unstable, and specially at room temperature. The ruggedness of the procedure was estimated by checking its susceptibility to minor changes such as the time for the post-extracting of the samples. In normal conditions, the total time of extraction procedure was between 1 and 1.5 h. Eluates obtained from spiked plasma and ready to be injected in the HPLC system were stored during 0, 1, 2, 3, 4 and

5 h at room temperature before injection. Stability of  $\beta$ -lactam have been evaluated too, by storing eluates in an autosampler programmed at  $4^\circ\text{C}$  during different periods of time (0, 6, 9, 12, 18, 24 h). Each determination was performed in triplicate.

Of course, control samples (15, 30 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) had been used in each run to validate the method.

## 2.6. Application

The method developed was used to investigate the plasma concentrations of  $\beta$ -lactam antibiotics in seriously infected patients. Blood samples were collected into heparinized test tubes and immediately centrifuged at  $900 \times g$  for 10 min. The plasma was immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  in microtubes until analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chromatograms

The proposed method enables the simultaneous quantification of five  $\beta$ -lactams antibiotics in plasma sample on the

Table 1  
Assessment of the accuracy, precision and recovery

Analyte	Nominal concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)	Precision		Recovery (%)
			Intra-assay (%)	Inter-assay (%)	
Cefepim	5	96.2	3.7	6.8	70.0
	15	95.5	3.0	4.4	71.7
	30	93.2	3.8	4.8	57.4
	50	94.2	4.2	4.2	nt
Ceftazidim	5	98.2	6.6	8.4	66.3
	15	98.8	5.4	5.8	75.7
	30	94.8	3.3	4.3	65.6
	50	96.8	2.5	2.5	nt
Cefuroxim	5	97.8	3.5	4.0	82.7
	15	101.9	1.9	4.3	84.8
	30	104.0	9.6	9.7	83.4
	50	107.1	6.0	12.2	nt
Meroopenem	5	100.3	0.9	5.9	74.3
	15	96.7	3.1	3.2	76.9
	30	94.3	2.0	3.5	79.7
	50	96.5	1.3	1.3	nt
Piperacillin	5	100.0	3.6	3.8	81.1
	15	99.1	2.2	3.3	78.7
	30	98.3	5.2	5.2	78.3
	50	98.4	4.0	5.6	nt

nt: Not tested.

same HPLC run. The retention times of ceftazidim, cefepim, ceforanide, meropenem, cefuroxim, and piperacillin were 11.50, 13.00, 16.80, 17.80, 19.95 and 22.36 min, respectively and the total run time of analysis was 30 min. As illustrated in Fig. 1, a blank patient sample and a plasma sample spiked with 15  $\mu\text{g/mL}$  of each antibiotic are of high chromatographic quality. For specific quantifications, the wavelength were set at 256 nm for cefepim and ceftazidim, 270 nm for cefuroxim and ceforanide, 300 nm for meropenem and 220 nm for piperacilline, as shown in the chromatograms presented in Fig. 2. The identification of antibiotics was based on the retention time and UV spectrum (Fig. 3). Peak purity of the analytes was corroborated by comparing the UV spectra of antibiotics peaks in plasma samples with the spectra of the drugs in the working solution standards. As shown in the chromatogram of the blank plasma (Fig. 1), no interfering peaks due to the matrix components were observed at the retention time of antibiotics.

### 3.2. Calibration curves and linearity

The standard curves were satisfactorily described by unweighted linear regression analysis. The calibration parameters were stable with regression coefficients always  $\geq 0.994$ . The curves were linear over the concentration range studied (2.5–60  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.3. Limit of quantification

The limit of quantification in plasma samples was experimentally determined to be 0.5  $\mu\text{g/mL}$  for ceftazidim, piperacillin and meropenem, and 1.0  $\mu\text{g/mL}$  for cefepim and cefuroxim.

The mean precision and accuracy for this limit value was found to be less than the maximum tolerable CV of 20% and within 80–120%. These limits are better or comparable to those reported previously in published HPLC methods and are sufficient to determine plasma concentrations of each of the five antibiotics in the clinical pharmacokinetic studies [7–15]. Insofar as in all the spiked samples, each antibiotic was easily detected, the limits of detection were at least at 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . These limits were sufficient to establish correlations between the plasma concentrations and the MICs, generally comprised between 0.5 and 4  $\mu\text{g/mL}$  for the most sensitive germs.

### 3.4. Precision, accuracy and recovery

The precision, the accuracy and the recovery of the HPLC developed method are given in Table 1. The accuracy and precisions were within the acceptable criteria: precision lower than 15% and mean accuracy within 85–115%. The intra-day and extra-day run precision were evaluated by replicating at three different moments the analyses of the plasma samples containing the antibiotics at four different concentrations. Recovery was determined at three different concentrations. Each value represents the mean of five measurements carried out.

### 3.5. Stability

Internal standard solutions, stock solutions and spiked plasmas did not reveal any appreciable degradation after 8 weeks of storage at  $-80^\circ\text{C}$ . At least three freeze-thaw cycles were able

Table 2

Result of analysis of several plasma samples obtained from patients undergoing chronic antibiotic treatments with continuous perfusion (A) or obtained from patients approximately 3 h after the end of a 30 min perfusion (B)

$\beta$ -Lactams	Doses (g/day)	Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )
(A)		
Meropenem	6	32.4
Meropenem	6	19.8
Meropenem	6	19.7
Piperacillin	20	86.0
Piperacillin	36	152.0
Piperacillin	24	59.3
Piperacillin	16	40.4
Cefepim	6	66.5
Ceftazidim	6	60.0
Ceftazidim	6	114.4
Ceftazidim	2	39.7
Ceftazidim	2	48.8
Ceftazidim	6	71.6
Ceftazidim	6	90.1
Ceftazidim	6	40.3
(B)		
Meropenem	4 $\times$ 0.5	3.5
Meropenem	4 $\times$ 1	48.0
Meropenem	3 $\times$ 2	3.1
Cefepim	1	22.8
Cefepim	2	17.5
Cefepim	2	10.8
Cefepim	2	16.1
Cefepim	6	22.2

to be executed without losses higher than 5% for solutions and than 10% for plasmas.

Stock solutions could be stored at 4 °C for 24 h with no evidence of decomposition (<5%) and up to 48 h for ceftazidim. At 20 °C, all antibiotic stock solutions could be conserved for at least 12 h, excepting for the cefuroxim, which presented a

degradation of 8% at this temperature. After 9 h, the stability remained acceptable (degradation <5%).

The antibiotics spiked in plasma presented more unstability. At room temperature, the degradation of cefuroxim was 11% after 9 h but less than 8% after 6 h. The other  $\beta$ -lactams presented acceptable stability after 9 h of storage at +20 °C. At 4 °C, all antibiotics were judged stable for at least 24 h, with degradation always lower than 10%.

Therefore, stock solutions and spiked plasmas could stay at least 2 months at  $-80$  °C, at least 24 h at 4 °C and no more than 6 h at +20 °C. Treatments at room temperature had to be as short as possible. Plasma after collection had to be transferred to laboratories at +4 °C as quickly as possible and had to be frozen at  $-80$  °C within the hour of reception.

### 3.6. Matrix effect

To evaluate the matrix effect, the concentration of protein was changed by dilution of samples with physiological serum. No significant differences were observed. The antibiotic peak areas remained almost constant with decreased concentration of proteins for the entire series of measurements.

### 3.7. Ruggedness

The stability of  $\beta$ -lactams after processing had been evaluated on the bench-top at room temperature and in the autosampler at 4 °C. There was no statistical difference (<10%) between the results for each group according to the tested parameter. The procedure exhibited suitable ruggedness for some variations of analysis delays. Consequently, vials ready to be injected could stay at least 5 h at room temperature and at least 24 h in an autosampler programmed at 4 °C before injection with no significant difference in concentration determination.

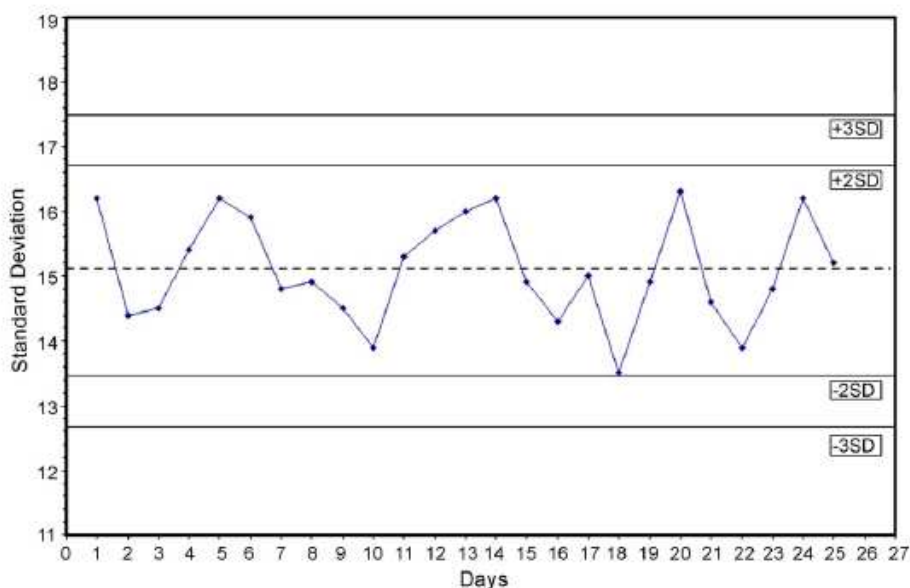


Fig. 4. Results of the quality controls obtained for ceftazidim (15  $\mu\text{g/mL}$ ) over a 6 months period (25 different runs).

### 3.8. Clinical application

The present method was successfully applied to perform the determination of concentrations of cefepim, ceftazidim, meropenem and piperacillin in several plasma samples obtained from patients undergoing chronic treatment, either as monotherapy or polytherapy with other antibiotic drugs. Results of some analysis are presented in Table 2. Plasma samples obtained from patients treated with continuous perfusions were systematically diluted with physiological serum (NaCl 0.9%) to be sure to obtain values included in the calibration curves. The results of the analyses of the ceftazidime control samples (spiked at 15 µg/mL) over a 6 months period are presented in Fig. 4.

### 4. Conclusion

Monitoring of the antibiotics concentration in plasma is an interesting tool in the treatment of patients seriously infected since the period during which the plasma concentration remains above the MIC is one of the most important parameters for the success of the treatment. The aim of this study was to develop a method for the determination of five β-lactam antibiotics in human plasma. The simultaneous determination of drugs is useful for routine application in the clinical laboratory. With this single sample preparation protocol, the analyst can monitor the most used antibiotic in intensive care units. This is the first report describing a simultaneous quantification of these β-lactam antibiotics. The method was simple, precise, accurate, selective and sufficiently sensitive. Analysis of plasma samples obtained from patients treated has shown the clinical suitability of the method for controlling the antimicrobial therapy of infected patients.

Further determinations will be done and comparison between the results of microbiological techniques and drug plasma monitoring will be performed to propose to the physicians a highly

performing approach of the antibiotherapy in intensive care units.

### References

- [1] A.W. Karchmer, in: G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Antimicrobial Therapy*, Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, USA, 2000, p. 274.
- [2] R. Dagan, E. Leibovitz, D. Greenberg, P. Yagupsky, D.M. Fliss, A. Leiberman, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17 (1998) 776.
- [3] I. Gustafsson, E. Lowdin, I. Odenholt, O. Cars, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 2436.
- [4] F. Scaglione, *Int. J. Antimicrob. Agents* 19 (2002) 349.
- [5] J.W. Mouton, D.J. Touzw, A.M. Horrevorts, A.A. Vinks, *Clin. Pharmacokinet.* 39 (2000) 185.
- [6] J.W. Mouton, N. Punt, *J. Antimicrob. Chemother.* 47 (2001) 500.
- [7] V.F. Samanidou, A.S. Ioannou, I.N. Papadoyannis, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 175.
- [8] M. Ehrlich, F.D. Daschner, K. Kümmerer, *J. Chromatogr. B* 751 (2001) 357.
- [9] J.J. Bafeltowska, E. Buszman, K. Mandat, J. Hawranek, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 249.
- [10] Y. Ozkan, I. Kucukguzel, S.A. Ozkan, H.Y. Aboul-Enein, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 263.
- [11] D.G. Musson, K.L. Birk, A.M. Cairns, A.K. Majumdar, J.D. Rogers, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 720 (1998) 99.
- [12] M.T. Rosseel, R. Peleman, H. Van Hoorebeke, R.A. Pauwels, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 689 (1997) 438.
- [13] S.D. Hanes, V.L. Herring, G.C. Wood, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 719 (1998) 245.
- [14] J. Guitton, A. Laffont, J. Bruzeau, L. Rochet-Mingret, M. Bonnefoy, J. Bureau, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* 719 (1998) 151.
- [15] C. Li, D. Xuan, M. Ye, C.H. Nightingale, D.P. Nicolau, *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 99.
- [16] Arlenda Home Page, e.noval Version V2.0c PROD, January 26, 2007, August 2007, <https://www.arlenda.com>.
- [17] P. Hubert, E. Rozet, B. Boulanger, W. Dewé, M. Laurentie, N. Dubois, C. Charlier, M. Feinberg, *Acta Clin. Belg.* 61 (2006) 54.
- [18] FDA Home page. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. August 2007, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>.

### **Publication 8**

Simultaneous quantification of five  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma by HPLC-DAD :  
Clinical application for ceftazidime treatment in intensive care units, Raphaël Denooz,  
Frédéric Frippiat, Corinne Charlier, Acta Clinica Belgica, **2010**; 65 - suppl. 1: 24-30.

## Clinical toxicology

## SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF FIVE $\beta$ -LACTAM ANTIBIOTICS IN HUMAN PLASMA BY HPLC-DAD: CLINICAL APPLICATION FOR CEFTAZIDIME TREATMENT IN INTENSIVE CARE UNITS

R. Denooz<sup>1,3</sup>, F. Fripiat<sup>2</sup>, C. Charlier<sup>1,3</sup>

**Key words:** Ceftazidime,  $\beta$ -lactam, antibiotic monitoring, continuous infusion

### ABSTRACT

A high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics (cefepime, ceftazidime, cefuroxime, meropenem and piperacilline) in human plasma using ultraviolet detection has been developed to control antimicrobial therapy in intensive care units. Ceftazidime is a time-dependent antibiotic, which presents an optimal efficiency directly correlated with the period during which their plasma concentrations remain above four to five times the minimal inhibition concentration

(MIC) of pathogens. Analysis of plasma samples obtained from twenty patients, with or without renal failure, and treated by ceftazidime continuous infusions, has shown the clinical suitability of the method. This retrospective study shown that standard dosages (6g/day ceftazidime continuous infusion) were not always adapted and could be reduced for treatment of patients infected by germs presenting MIC  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ . For patients with renal failure, ceftazidime plasmatic monitoring has performed more important dosage reductions. This retrospective study proved that antibiotic monitoring is an interesting tool to optimise treatment and to provide significant cost reductions.

- <sup>1</sup> Service de Toxicologie Clinique, Médiocolégale, Environnementale et en Entreprise, Centre Hospitalier Universitaire Sart Tilman B35, Liège, Belgique
- <sup>2</sup> Service des Maladies Infectieuses - Médecine Interne Générale, Centre Hospitalier Universitaire Sart Tilman B35, Liège, Belgique.
- <sup>3</sup> Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, Département de Pharmacie, ULg, Liège, Belgique.

### Address for Correspondence

Raphaël Denooz  
Service de toxicologie clinique,  
médiocolégale, environnementale et en entreprise  
Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman B35  
B 4000 Liège  
Belgique  
Tel: +32 4 366 76 83  
Fax: +32 4 366 88 89  
E-mail address: Raphael.Denooz@chu.ulg.ac.be

### INTRODUCTION

$\beta$ -lactams are now among the antibiotics most commonly used, especially in intensive care units for the treatment of severely infected patients. These antibiotics are time-dependent, which implies that their activity is directly correlated with the time during which their plasma concentration remains above the minimal inhibition concentration (MIC) for the micro-organism responsible for infection (1). To undergo bactericidal effect, animals models show that cephalosporin plasma concentrations have to remain above the MIC for at least 40% to 70% of the dosing interval, and sometimes up to 100 % of this interval in case of severe infections (2). But, although a time above the MIC superior at 50% of the dosing interval



may be sufficient in immunocompetent patients, concentration four to five times the MIC of the identified pathogen may be needed to obtain the maximal killing rate for immunocompromised patients (3). Higher concentrations seem not to significantly enhance the bactericidal activity (4). Administration of  $\beta$ -lactams by continuous infusion is thereby an useful approach to warrant a stable and efficient antibiotic blood concentration. Therefore, monitoring of plasma  $\beta$ -lactams, combined with determination of the MIC, could be an interesting tool in individualising antimicrobial therapy of severely infected patients.

Various HPLC methods have been published to achieve the analysis of cephalosporins in biological matrices, using several sample preparation procedures, different stationary and mobile phases and various detection modes (5-8). In a previous study, the authors had developed and validated a simple and rapid method for the simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics (cefepime, ceftazidime, cefuroxime, meropenem and piperacilline) in human plasma using ultraviolet detection (9). This method performed good separation, sensitivity and linearity over a wide concentration range.

Ceftazidime, due to its high degree potency and its very interesting tolerability profile, represents an antibiotic of choice for the treatment of bacterial infections in intensive care units (10). It is a third generation cephalosporin agent, with a broad spectrum of antimicrobial activity against gram-negative microorganisms including *Pseudomonas aeruginosa* (11). This  $\beta$ -lactam presents a half-life close to 1.5 hour and is not significantly metabolized. The antibiotic is excreted unchanged by glomerular filtration, with about 90% of the administered dose being eliminated in the urine within 24 h (12). Consequently, in patients with impaired renal function, the ceftazidime clearance becomes smaller and the half-life increases significantly in correlation with the severity of the renal failure (13). Moreover, as small molecular weight molecules with low protein binding (<20%), ceftazidime is susceptible to be eliminated by continuous hemodiafiltration.

Analysis of plasma samples obtained from twenty patients, with or without renal failure and treated with ceftazidime, has shown the clinical suitability of the method for controlling the adjustment of antimicrobial therapy. All patients received by continuous infusion different doses of ceftazidime calculated in function of weight, MIC and eventual renal failure. The aim of this study was to determine whether blood antibiotic concentrations were well adapted considering the MIC of the identified pathogens.

## MATERIAL AND METHOD

### Subjects

For this retrospective study, we have selected patients admitted to the medical or surgical intensive care units at the University Hospital of Liège and who have developed infections treated with ceftazidime. The antibiotic treatment, delivered by continuous intravenous infusion of ceftazidime, was evaluated in 10 patients with normal renal function (creatinine clearance: higher than 60 mL/min) and in 10 patients with renal failure (7 patients with creatinine clearance calculated by Cockcroft and Gault formula, between 30 and 59 mL/min and 3 patients with creatinine clearance calculated in the same way lower than 30 mL/min) (14). The patients received generally a standard intravenous loading dose of 2 g of ceftazidime over a 30 min period, followed via an automatic pump by a continuous infusion of 2 to 8 g of ceftazidime in 48 mL of serum saline administered over a period of 24 h. Blood samples (2 to 5 per patient) were collected from an in situ venous line in anticoagulant tubes after at least two consecutive doses of ceftazidime in order to ensure steady-states concentrations. Once collected, blood samples were immediately centrifuged, and the plasma was analyzed at the same day or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  if analysis was delayed.

*Pseudomonas* were considered susceptible to ceftazidime if MIC was  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ , and resistant if MIC was  $> 8 \mu\text{g/mL}$ , according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST (15).

### Method

Ceftazidime was determined by HPLC method with ultraviolet detection, routinely used for several years in our laboratory. The analytical method has been validated for simultaneous quantification of five  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma: piperacilline (penicillin derivate), cefuroxime (second generation cephalosporin), ceftazidime (third generation cephalosporin), cefepime (fourth generation cephalosporin) and meropenem (carbapenem). ceftazidime was generously supplied by GlaxoSmithKline (Erembodegem, Belgium). The plasma sample, after spiked with ceforanide as an internal standard (IS), was submitted to a solid-phase extraction (SPE) prior to HPLC analysis. Chromatographic system consisted of a Waters Alliance 2695 Separation Module, equipped with a quaternary, low-pressure mixing pump, a degassing line and a

thermostated autosampler, connected with a Waters 2996 photodiode array detector (Zellik, Belgium). The separation was achieved on a C8 Symmetry column with a mobile phase consisting of an acetonitrile and phosphate buffer mixture (pH 7.4) in a gradient mode.

The identification of antibiotics was based on the retention time and on the UV spectrum. The retention time of ceftazidime was 10,6 min. and the total run time of analysis was 30 min. As illustrated in Figure 1a, plasma sample spiked with 15 µg/mL of each antibiotic are of high chromatographic quality. For specific quantifications, the wavelength was set at 256 nm for ceftazidime, which correspond to the maximum absorbance wavelength for this β-lactam. Chromatogram of a plasma obtained from the patient 2-M (28,5µg/mL) who received 6g ceftazidime /day by continuous infusion is represented in Figure 1b. The developed technique was linear from 2,5 to 60 µg/mL, with a limit of quantification in plasma experimentally determined at 0,5 µg/mL. This concentration was sufficient to establish correlations between the plasma concentrations and the MICs, generally comprised between 0,5 and 4 µg/mL for the most sensitive germs. This method allowed simultaneous antibiotic quantifications and is not exclusively adapted for patients treated with continuous perfusions. Therefore, plasma samples obtained from patients treated with continuous perfusions were systematically diluted with physiological

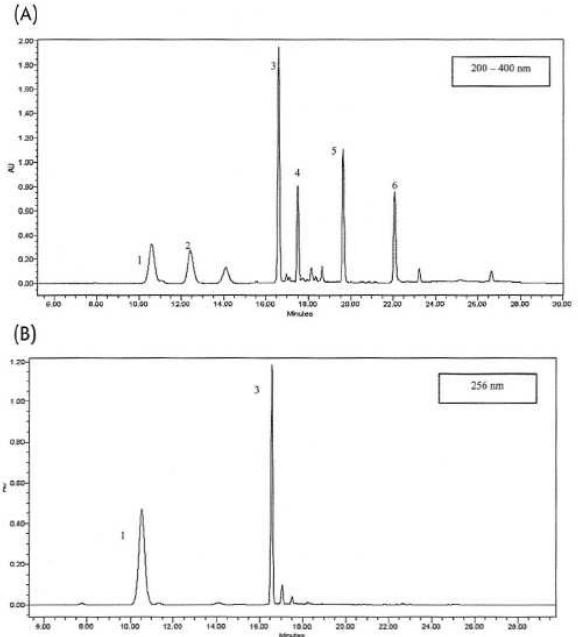


Figure 1: HPLC chromatograms of (A) a plasma spiked with 15 µg/mL of each antibiotic and 20 µg/mL of the internal standard. (1. ceftazidime; 2. cefepime; 3. ceftazidime (IS); 4. meropenem; 5. cefuroxime; 6. piperacilline.); (B) a plasma obtained from the patient 2-M (28,5µg/mL) who received 6g ceftazidime /day by continuous infusion. (1. ceftazidime ; 3. ceftazidime (IS)).

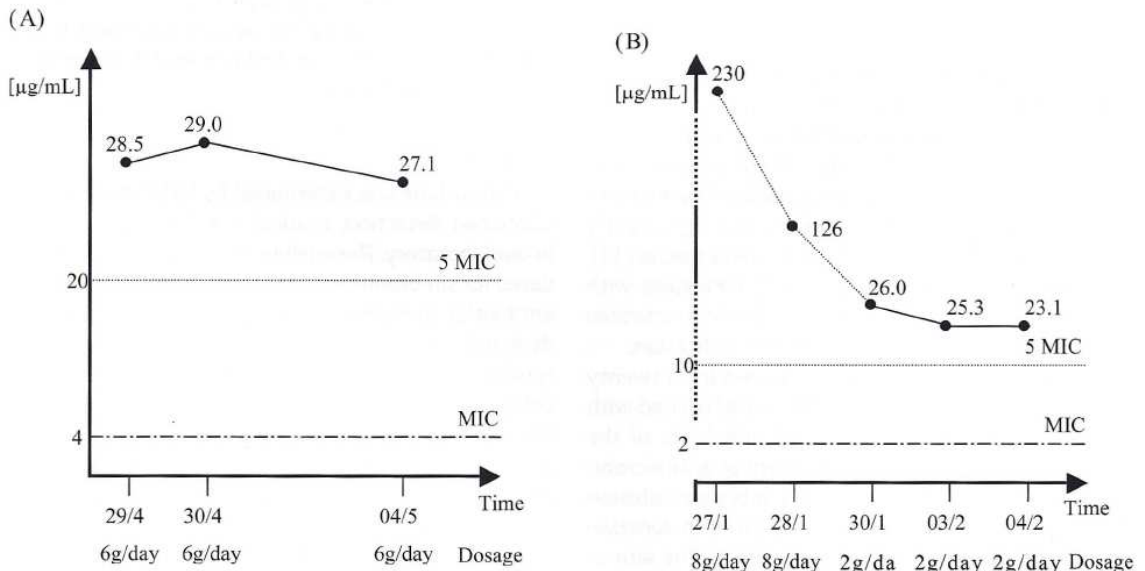


Figure 2: Concentration of ceftazidime in plasma for (A) patient 2-M and (B) patient 20-M. (A) Patient 2-M: initial loading dose of 2g, followed by a 6g/24h continuous infusion (B) Patient 20-M: initial loading dose of 2g, followed by a 8g/24h continuous infusion for 2 days before a 2g/24h dosage reduction

serum (NaCl 0.9%) to be sure to obtain values included in the calibration curve. This method is accurate and reproducible (coefficient of variation < 10%), allowing, after appropriate dilutions, quantification of plasma levels of ceftazidime from 0,5 to 240 µg/mL without interferences of the other common drugs.

**RESULTS**

Twenty patients more than 18 years old who had developed severe infections treated by continuous infusion of ceftazidime were retained for this retrospective study. The most common microorganism identified in biological samples (tracheal aspirations, blood, urine) was *Pseudomonas aeruginosa* (n = 18). None of these patients received ceftazidime before the MIC

was determined, contained between 1 and 16 µg/mL.

Data obtained for twenty patients have permitted to classify these subjects into three subgroups: first subgroup (called: *Well-adapted treatment*) was constituted of patients who received a well adapted ceftazidime dose as confirmed by therapeutic monitoring (plasmatic concentration = ±5 MIC). For the second subgroup (called: *Adjustment required*), an adjustment of ceftazidime dosage appeared necessary (plasmatic concentration largely >5 MIC). Finally, we have put together in the third subgroup (called: *Adjusted treatment*), the patients who received initially a too high ceftazidime dosage that was successfully adapted after therapeutic monitoring to achieve plasmatic level around 5 MIC. Results for patients with normal renal function and with renal failure are respectively indicated in Table 1 and Table 2. These tables contain in

**Table 1: Results obtained for patients with normal renal function.**

Gender	Age	Biological results				Antibiotherapy		
		Time	Urea g/L	Creatinine mg/L	CL CR. mL/Min.	MIC	Dose g/24h	Plasmatic Concentration µg/mL
<b>Well-adapted treatment</b>								
1-M	53	14/12	0,53	9,8	84	≤4	6	33,4
		20/12	0,54	4,3	>120	≤4	6	27,9
2-M	64	29/04	0,41	7,3	96	≤4	6	28,5
		30/04	0,32	7,3	97	≤4	6	29,0
		04/05	0,34	5,8	>120	≤4	6	27,1
<b>Adjustment required</b>								
3-F	63	30/10	0,33	4,2	>120	≤1	6	35,6
		31/10	0,25	3,9	>120	≤1	6	29,5
		02/11	0,20	3,8	>120	≤1	6	23,3
4-M	42	28/02	0,21	6,4	>120	≤4	8	35,1
		03/03	-	-	-	≤4	8	42,2
5-M	63	22/02	0,32	6,0	>120	≤2	6	27,3
		23/02	-	-	-	≤2	6	30,6
		25/02	0,20	4,5	>120	≤2	6	26,8
6-M	77	26/10	0,35	6,6	95	≤4	6	33,9
		29/10	0,32	6,0	105	≤4	6	39,9
		30/10	0,42	6,7	94	≤4	6	37,6
		31/10	0,48	5,4	117	≤4	6	35,1
		02/11	0,26	5,0	>120	≤4	6	36,8
7-F	46	13/07	≤0,05	4,3	>120	≤4	6	42,3
		23/07	≤0,05	3,4	>120	≤4	6	41,8
		03/08	0,11	5,4	>120	≤4	6	36,1
8-M	60	22/01	0,39	10,3	86	≤4	8	87,2
		23/01	0,19	5,4	>120	≤4	8	75,5
<b>Adjusted Treatment</b>								
9-F	77	04/07	0,34	6,2	84	≤4	8	63,6
		09/07	0,26	5,3	98	≤4	6	41,3
10-F	52	12/06	0,39	5,6	>120	≤4	8	27,4
		17/06	0,39	5,1	>120	≤4	10	42,4
		20/06	0,38	5,5	>120	≤4	10	44,0
		26/06	0,42	5,5	>120	≤4	10	48,4

**Table 2: Results obtained for patients with renal failure.**

Gender	Age	Biological results				Antibiotherapy		
		Time	Urea g/L	Creatinine mg/L	CL CR. mL/Min.	MIC	Dose g/24h	Plasmatic Concentration µg/mL
<b>Well-adapted Treatment</b>								
11-F	66	10/11	0,60	32,0	18	≤8	2	39,7
		13/11	0,40	28,5	20	≤8	2	48,8
12-M	78	19/09	0,70	15,2	41	≤16	6	71,7
		20/09	0,63	16,1	39	≤16	6	114,4
		21/09	0,65	17,5	36	≤16	6	100,8
		22/09	0,68	17,4	36	≤16	6	116,9
<b>Adjustment required</b>								
13-F	69	13/11	0,90	9,8	49	≤4	6	86,3
		14/11	1,02	11,5	38	≤4	6	118,8
14-M	75	31/10	0,97	22,2	35	≤1	2	69,3
		02/11	0,59	16,7	46	≤1	2	59,2
15-M	18	13/05	0,86	19,0	54	≤4	6	62,5
		14/05	0,97	19,4	53	≤4	6	60,9
		15/05	0,90	16,9	61	≤4	6	56,4
16-M	78	30/07	0,96	22,8	31	≤2	6	102,6
		03/08	1,49	32,9	22	≤2	6	88,5
		06/08	1,07	25,3	28	≤2	6	84,2
17-F	63	16/07	0,40	3,3	>120	≤2	3	27,0
		17/07	0,92	7,4	61	≤2	3	64,8
		18/07	1,46	10,8	42	≤2	3	158,7
18-F	58	03/08	0,53	9,9	105	≤4	6	116,5
		04/09	0,81	36,4	28	≤4	6	164,6
<b>Adjusted treatment</b>								
19-F	41	18/09	1,33	88,5	8	≤2	2	114,4
		20/09	0,98	78,0	10	≤2	1	46,1
20-M	53	27/01	1,60	30,3	35	≤2	8	230,2
		28/01	1,14	23,6	45	≤2	8	126,8
		30/01	0,50	12,4	85	≤2	2	26,0
		03/02	0,36	10,0	105	≤2	2	25,3
		04/02	0,50	11,3	93	≤2	2	23,1

addition to the plasmatic concentration of antibiotic, several informations: gender, age, dosage, sampling dates, biological results (urea, creatinine, creatinine clearance, MIC).

#### Subjects with normal renal function

We can observe that all patients with normal renal function received a standard dose of 6g/day ceftazidime by continuous infusion, excepted for the patients 4-M, 8-M, 9-F and 10-F, who received initially a 8g ceftazidime per day. For these dosages, the mean steady-state ceftazidime concentration was  $34,2 \pm 5,4 \mu\text{g/mL}$ . Those concentrations were always sufficient (maybe too high for the subjects 6-M and 7-F) to treat efficiently patients infected by germs presenting MIC  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$  (5 MIC =  $20 \mu\text{g/mL}$ ), but were certainly too low for MIC  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  (5 MIC =  $40 \mu\text{g/mL}$ ). On the other hand, 6g/day ceftazidime continuous infusions were not adapted to treat infections by germs with MIC lower than  $2 \mu\text{g/mL}$  (5 MIC =  $10 \mu\text{g/mL}$ ). Indeed, in this case, an important reduction of dosage could be proposed. The patient number 10-F represented an exception. This woman (height: 160 cm; weight: 128 kg) received a 8g/day ceftazidime continuous infusion to treat a diabetic foot infection, with *Pseudomonas aeruginosa* having a MIC of  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ . As plasmatic concentration was relatively low for this indication ( $27,4 \mu\text{g/mL}$ ), physician decided to raise dosage at 10 g/day to obtain at least  $40 \mu\text{g/mL}$  as minimal plasmatic concentration, considering possible underlying bone infection.

#### Subjects with impaired renal function

Our retrospective study showed that these patients could reach high plasmatic ceftazidime concentrations with low administered dosages. In these patients, higher plasmatic levels are reached and are thus suitable for treatment of infections caused by less sensitive pathogens (patient 12-M: MIC  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ , 6g/day continuous infusion, plasmatic concentrations above  $100 \mu\text{g/mL}$ ). On the other hand, this retrospective study demonstrated that, for patients with renal failure, the reduction of dosages had to be done according to the importance of the renal insufficiency, with the ceftazidime dose generally comprised between 1 and 3 g/day.

The evolution of plasma concentrations over time for patient 2-M, with normal renal function, and for patient 20-M, with acute renal failure, are shown in

Figure 2. For the first one, dosage adjustment was not required: ceftazidime plasma concentrations were higher than 5 MIC, without to be high enough to reduce dosage. In this case, therapeutic drug monitoring had shown that initial dosage was well adapted and required no modification. For the second patient, antibiotic plasma concentrations were very important, higher than  $100 \mu\text{g/mL}$  (MIC  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ), for a 8g/day continuous infusion of ceftazidime. Therefore, a reduction of the dosage, from 8g to 2g/day, was proposed, and has led to ceftazidime plasma concentrations higher than  $20 \mu\text{g/mL}$ , enough to reach antibiotic effectiveness.

For all patients presented in this retrospective study, ceftazidime plasma concentrations determined with the HPLC method were always above the target concentration, setting at 5 MIC. No exception was observed.

## DISCUSSION

Experimental studies had demonstrated that ceftazidime has a slow continuous kill characteristic, which was correlated with the time during which serum concentrations exceed the MIC. Indeed, absence of post-antibiotic effect observed with this  $\beta$ -lactam could facilitate the development of antibiotic resistance once antibiotic concentrations fall below this threshold (16). To avoid resistance development, some authors proposed to maintain antibiotic plasmatic concentrations above the MIC for 90 to 100% of the dosing interval. Other studies had demonstrated maximum killing of germs at four to five MIC, with no added effect at higher concentrations (17). Therefore, plasmatic concentrations maintained at 4 to 5 MIC during each dosing period could be retained as therapeutic goal, particularly in cases of severe infected patients (18-19). Thereby, ceftazidime plasmatic concentrations should be always higher than  $20 \mu\text{g/mL}$  to treat a patient infected with pathogens presenting a MIC  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ . As these concentration levels can't be reached with intermittent dosages, the application of continuous infusions is now generalized to ceftazidime treatments of severed infected patients.

Since the time during which the plasma concentration remains above the MIC is one of the most important parameters for the success of  $\beta$ -lactams, individual determinations of antibiotic concentrations are interesting applications in the treatment of each patient seriously infected. Indeed, these infected patients

may present important changes in haemodynamics and organ function, with modifications of half-lives, volumes of distribution or clearances (20). The knowledge of the pharmacokinetic profile of antimicrobial agents in this subpopulation is thus crucial to adjust correctly the dosage. The therapeutic failure may result from inadequate administered treatment, which can nevertheless be corrected with the therapeutic drug monitoring.

The aim of our retrospective study was to analyse in two groups, with or without renal failure, correlations between ceftazidime dosages and ceftazidime plasmatic concentrations, and determined if adjustment of dosage were required, considering MIC of microorganisms inducing infection. For all patients, ceftazidime plasma concentrations determined with the HPLC method were above 5 MIC. The therapeutic drug monitoring shown that dosages administered to patients in this retrospective study were often too high. For patients with normal renal function, this retrospective study shown that 6g/day ceftazidime continuous infusions were always sufficient to treat infections with germs presenting MIC  $\leq 4\mu\text{g/mL}$ , with a mean steady-state ceftazidime concentration at 34,2  $\mu\text{g/mL}$ . In effect, ceftazidime concentrations, determined by HPLC analysis, were always above the threshold limit set at 20  $\mu\text{g/mL}$  (MIC  $\leq 4\mu\text{g/mL}$ ). For a lot of these patients, reduction of dosages to 3 - 4g/day could certainly be proposed without lack of efficiency. For patients infected with very sensitive bugs (MIC  $\leq 1\mu\text{g/mL}$ ), lower dosages than 6g/day should always be considered, resulting in important reduction of antibiotic treatment cost. On the other hand, plasma concentrations observed after 6g/day ceftazidime continuous infusions are always too low for the treatment of normal renal patients infected with germs presenting MIC  $\geq 8\mu\text{g/mL}$ , which is in agreement with the sensitive breakpoints defined by the EUCAST (15). Previous studies with normal renal populations presented same observations (16). For renal insufficient patients, our retrospective study showed that it wasn't easy to predict plasmatic ceftazidime concentrations. The adjustment of the dosage, generally comprised between 1 to 3g/day, had to be done according to the determined plasmatic concentration and the importance of the renal insufficiency.

In this case also, we have obtained an important reduction of antibiotic treatment cost. Our study shown that too high ceftazidime dosages were always administered if we considered 5 MIC level as optimal efficiency plasmatic concentration. In almost all cases

reported, therapeutic drug monitoring proposed a dosage reduction, sometimes very significant.

Optimisation of treatment with plasmatic ceftazidime determination could reduce the antibiotherapy cost. Adjustment of ceftazidime infusion from 6 to 4 grams per day allows approximately an economy of 250 euros per week, which could represent an important amount on looking at the large prescription of ceftazidime in intensive care units. These observations have to be confirmed with a perspective study including the clinical efficacy of the antibiotic treatments.

## CONCLUSION

Analysis of plasma samples obtained from twenty patients treated by ceftazidime continuous infusion has shown the clinical suitability of the method for controlling the antimicrobial therapy. This application could propose to physicians a highly performing approach of the antibiotherapy in intensive care units. Our retrospective study proved that ceftazidime dosages were often too high, which caused important and useless expenses. Therefore, ceftazidime plasmatic monitoring is an interesting tool to optimise antibiotic treatment and to provide significant pharmacoeconomic advantages.

## REFERENCES

1. Gustafsson I, Lowdin E, Odenholt I, Cars O. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters for antimicrobial effects of cefotaxime and amoxicillin in an in vitro kinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2436-40.
2. Craig W A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters : rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1-10.
3. Mouton J W, Vinks A A. Is continuous infusion of beta-lactam antibiotics worthwhile? Efficacy and pharmacokinetic considerations. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 5-15.
4. Mouton J W, den Hollander J G. Killing of *Pseudomonas aeruginosa* during continuous and intermittent infusion of ceftazidime in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 931-36.
5. Samanidou V F, Ioannou A S, Papadoyannis I N. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction – a comparison with a conventional reversed phase silica based column. *J Chromatogr B* 2004; 809: 175-82.
6. Ehrlich M, Daschner F D, Kümmerer K. Rapid antibiotic drug monitoring: meropenem and ceftazidime determination in serum and bronchial secretions by high-performance liquid chromatography-integrated sample preparation. *J Chromatogr B* 2001; 751: 357-63.

7. Bafeltowska J J, Buszman E, Mandat K, Hawranek J. Determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2002; 976: 249-54.
8. Ozkan Y, Kucukguzel I, Ozkan SA, Aboul-Enein HY. A rapid, sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. *Biomed Chromatogr* 2001; 15: 263-6.
9. Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem, piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2008; 864: 161-67.
10. Sun H K, Kuti J L, Nicolau D P. Pharmacodynamics of antimicrobials for the empirical treatment of nosocomial pneumonia: a report from the OPTAMA Program. *Crit Care Med* 2005; 33: 2222-27.
11. Hughes W T, Armstrong D, Bodey G P et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 730-51.
12. Roberts J A, Webb A R, Lipman J. Cefepime versus ceftazidime: considerations for empirical use in critically ill patients. *Int J Antimicrob Ag* 2007; 29: 117-28.
13. Van Dalen R, Vree T B, Baars A M, Termond E. Dosage adjustment for ceftazidime in patients with impaired renal function. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 30: 597-605.
14. Levey A S, Bosch J P, Lewis J B et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine : a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-70.
15. (<http://www.eucast.org>); European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST; December 2009.
16. Mouton J W, Vinks A A, Punt N C. Pharmacokinetic – pharmacodynamic modelling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 733-38.
17. Angus B J, Smith M D, Suputtamongkol Y et al. Pharmacokinetic – pharmacodynamic evaluation of ceftazidime continuous infusion vs intermittent bolus injection in septicemic melioidosis. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50 : 184-91.
18. Hyatt J M, McKinnon P S, Zimmer G S, Schentag J J. The importance of pharmacokinetic-pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28: 143-60.
19. MacGowan A P, Bowker K E. Continuous infusion of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35: 391-402.
20. Gomez C M, Cordingly J J, Palazzo M G. Altered pharmacokinetics of ceftazidime in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1798-1802.

## **V. DISCUSSION ET CONCLUSION**

**V.1. Les antivitamines K**

**V.2. La méthadone**

**V.3. Le bupropion**

**V.4. Le GHB**

**V.5. Les sulfamidés hypoglycémiants**

**V.6. Les  $\beta$ -lactamines**

La pharmacovigilance se définit comme l'ensemble des procédures organisées de surveillance du risque d'apparition de manifestations indésirables provoquées par l'absorption des médicaments. Le système de pharmacovigilance comporte trois niveaux d'intervention. Le premier niveau est exercé par les professionnels de la Santé, le deuxième est sous la direction du Centre Belge de Pharmacovigilance (CBPH) et le troisième est pris en charge par EudraVigilance, qui constitue le réseau européen de pharmacovigilance. Le suivi thérapeutique pharmacologique, qui fait partie du premier niveau, représente une des approches les plus intéressantes susceptible de maîtriser le risque médicamenteux.

Des manifestations indésirables liées à la prise des médicaments évoqués dans notre travail ont été rapportées par différents centres de pharmacovigilance. Ainsi, une lettre de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) datée du 30 janvier 2007, prévenait les professionnels de la Santé du risque de survenue de torsades de pointes fatales et d'allongements de l'intervalle QT chez des patients recevant une forte dose de méthadone (supérieure à 120 mg/ jour) [95]. Une autre lettre faisant suite à une collecte de données par le centre de pharmacovigilance de Bourgogne témoignait du risque d'apparition de pathologies rhumatismales chez les malades traités par bupropion [96]. D'autres centres de pharmacovigilance ont informé les professionnels de la Santé des dangers liés à la consommation de GHB ou d'agents précurseurs [97], ou encore des conduites à tenir face à des contre-indications thérapeutiques, notamment des actes de chirurgie dentaire chez des sujets qui reçoivent des anticoagulants oraux [98].

Dans notre travail, nous avons choisi d'étudier des médicaments rarement soumis au suivi thérapeutique pharmacologique alors qu'ils possèdent une toxicité intrinsèque manifeste. La fréquence avec laquelle on retrouve ces molécules dans les cas d'intoxications mortelles témoigne en effet de leur dangerosité, particulièrement mise en évidence par les 98 cas de décès provoqués par la méthadone sur une période de 90 mois, ce qui justifie un suivi thérapeutique pharmacologique (méthadone, GHB, bupropion, antivitamines K).

### **V. 1. Les antivitamines K**

Le dosage plasmatique des antivitamines K peut constituer une alternative intéressante au contrôle de leur activité pharmacologique par l'établissement de l'INR, index biologique permettant de « sécuriser » les thérapies anticoagulantes. Dans un certain nombre de cas, l'INR peut être modifié par des interactions apparaissant entre les antivitamines K, des médicaments associés ainsi que certaines substances se trouvant dans notre alimentation.



Dans ce cas, le dosage plasmatique des antivitamines K peut constituer une option plus satisfaisante pour décider de l'attitude pharmacologique à adopter en cas d'hypersensibilité ou de résistance au traitement coumarinique.

La réponse aux antivitamines K est individuelle. De plus, elle varie au cours du traitement chez un même patient. Cette variabilité est liée à l'apport en vitamine K1 à partir des aliments et à la production de vitamine K2 synthétisée par la flore bactérienne intestinale, mais elle est également fonction de la pharmacocinétique des antivitamines K, dont les étapes successives sont influencées par de nombreux médicaments, et enfin elle est dépendante du métabolisme des facteurs de coagulation. Des cas de résistance transitoire aux antivitamines K ne sont pas exceptionnels. Ils sont le plus souvent dus à un apport excessif en vitamine K alimentaire ou à l'induction par certains médicaments d'enzymes hépatiques responsables de leur métabolisme.

On peut en fait expliquer la variabilité de la réponse pharmacologique aux antivitamines K de différentes façons :

- *par le polymorphisme génétique*

Le cytochrome P450 le plus impliqué dans le métabolisme des dérivés coumariniques est le cytochrome P450 2C9. Plusieurs variants alléliques de ce cytochrome ont été identifiés, dont le 2C9\*2 et le 2C9\*3, codant pour des enzymes à activité réduite justifiant chez les patients porteurs de ces variants génétiques d'une majoration de l'effet anticoagulant [10] ;

- *par des interactions médicamenteuses*

L'activité du cytochrome P450 2C9 est modifiée par des médicaments autres que les antivitamines K, notamment par des inducteurs tels que les barbituriques, la carbamazépine et la phénytoïne avec réduction de l'effet anticoagulant, par des inhibiteurs comme l'amiodarone, la cimétidine et les dérivés azolés avec augmentation de l'effet anticoagulant [99]. Le cytochrome P450 2C9 joue ainsi un rôle important dans la variabilité de la réponse au traitement coumarinique. Une exacerbation de l'activité anticoagulante peut également se manifester par une autre interaction médicamenteuse non métabolique qui est le déplacement des formes d'antivitamine K liées aux protéines plasmatiques vers des formes libres pharmacologiquement actives [64]. Les dérivés coumariniques, de la même façon que les sulfamidés hypoglycémifiants et certains fibrates, sont fortement liés à l'albumine plasmatique. Mais la répartition entre formes liées (non actives) et non liées (actives) ne peut être

objectivée par le suivi thérapeutique pharmacologique, qui mesure la totalité du médicament présent dans le sang, qu'il soit lié ou libre. Il faut juste se souvenir de cette éventualité lorsqu'on est en présence d'un effet exacerbé qui ne s'explique pas au vu de la posologie utilisée.

- *par manque de compliance de la part du patient*

Oublier de prendre son médicament ou au contraire oublier que l'on a pris son médicament et en reprendre une deuxième fois constituent une cause assez fréquente de variations de l'effet thérapeutique.

Par contre, les très rares cas de résistance constitutionnelle posent d'autres problèmes. La littérature fait état de patients résistants, sans aucune modification de l'INR, pour la warfarine (jusqu'à 45 mg/J), l'acénocoumarol (12 mg/J) ou encore la phenprocoumone (30 mg/J) [100]. Aujourd'hui, la génétique permet d'expliquer certains mécanismes de résistance aux AVK, notamment les mutations du gène VKORC1 [101]. Ce gène code pour le complexe enzymatique vitamine K époxyde réductase, cible des thérapies par antivitamines K. Bien qu'exceptionnelles, ces mutations sont responsables d'une inactivité parfois totale des traitements coumariniques.

On comprend, au vu de ces considérations, que les traitements à base d'anticoagulants oraux sont soumis à de très nombreuses variables, et que les résultats de l'INR sont parfois difficiles à interpréter. Le suivi thérapeutique pharmacologique des anticoagulants oraux devient ainsi un outil très intéressant pour les Cliniciens, complémentaire de l'INR, afin de leur permettre de détecter des résistances ou des hypersensibilités aux traitements antivitamines K, pour ensuite prendre les mesures pharmacothérapeutiques les plus adéquates.

La technique analytique que nous avons développée au moyen d'un chromatographe liquide à haute performance couplé à un détecteur à barrettes de diodes permet le dosage dans le sang des trois anticoagulants coumariniques commercialisés en Belgique, l'acénocoumarol, la phenprocoumone et la warfarine. La méthode s'est révélée linéaire de 40 à 500 ng/mL (intervalle thérapeutique de 30 à 100 ng/mL) pour l'acénocoumarol, et de 400 à 5000 ng/mL (intervalle thérapeutique de 1000 à 3000 ng/mL) pour la phenprocoumone et la warfarine. Cette méthode présente donc une sensibilité suffisante pour être utilisée dans le suivi thérapeutique pharmacologique des médicaments anticoagulants.

Par ailleurs, le dosage sanguin des antivitaminiques K constitue le seul moyen dont on dispose pour vérifier une intoxication massive et fatale, d'origine criminelle ou non, par ces

médicaments en l'absence de prélèvements ante mortem. En effet, la détermination de l'INR ne peut pas être réalisée sur des prélèvements post mortem.

## **V.2. La méthadone**

Les addictions sont nombreuses et variées. Elles entraînent de la dépendance, qui est parfois largement acceptée (caféine) et parfois fortement problématique, notamment quand elle est associée à une forte toxicité et à une morbidité importante (alcool et tabac). Quand la drogue induisant la dépendance est illégale, et liée à une pharmacocriminalité élevée, ou à un risque suicidaire important comme pour l'héroïne, la prise en charge de la dépendance est impérative.

La méthadone est un médicament très utilisé dans la thérapeutique de substitution à l'héroïne. Elle permet le sevrage des héroïnomanes, ou tout au moins, elle est susceptible d'éviter l'apparition d'un état de manque. Ses intéressantes propriétés pharmacocinétiques, associant bonne résorption par voie orale et longue demi-vie plasmatique (22 heures en moyenne), permettent une seule prise orale quotidienne, facilitant la compliance [23]. Le faible pic plasmatique apparaissant après la prise de méthadone et l'effet plateau de ses concentrations sanguines font que ce médicament opioïde n'induit pas les effets habituellement engendrés par l'héroïne, et notamment le flash. Sa forte activité agoniste au niveau des récepteurs  $\mu$  diminuerait ainsi l'appétence pour l'héroïne, en masquant les symptômes dus au manque. Les résultats thérapeutiques ne se situent cependant pas toujours au niveau des espérances et l'une des raisons de ces succès pourrait être l'absence fréquente de suivi thérapeutique pharmacologique [19].

La dose journalière initiale du traitement de substitution à la méthadone est habituellement comprise entre 20 et 30 mg. Cette posologie peut être augmentée à 60 mg par jour, voire 120 mg par jour (ou plus encore) en fonction des besoins du patient [22]. La tolérance au produit, mais surtout la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques de la méthadone, rendent en effet l'individualisation de la posologie indispensable. Ainsi, selon les patients pour une même dose administrée, on peut observer un surdosage ou au contraire un sous dosage. L'explication se situe essentiellement au niveau du métabolisme de la méthadone, pour laquelle on connaît des métaboliseurs ultra rapides (avec concentration plasmatique très faible pour des doses pharmacologiques habituelles) et des métaboliseurs lents (avec concentration plasmatique élevée pour de faibles doses administrées) [24; 102]. En plus du polymorphisme génétique des cytochromes P450 (et principalement le 3A4), qui

justifie des concentrations plasmatiques très variables pour une même dose administrée, le métabolisme de la méthadone est modifié par des interactions pharmacocinétiques. Les inducteurs enzymatiques classiques, comme les antiépileptiques (phénobarbital, carbamazépine), les antituberculeux (rifampicine) ou les thérapies antirétrovirales (efavirenz, névirapin), peuvent entraîner une inefficacité thérapeutique [24]. Les inhibiteurs enzymatiques tels que les antifongiques azolés (kétoconazole, itraconazole) ou les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (fluvoxamine, fluoxétine, paroxétine, sertraline) peuvent au contraire augmenter les taux plasmatiques de méthadone avec risque de dépression respiratoire. Le Clinicien informé des propriétés pharmacocinétiques de la méthadone et des interactions médicamenteuses possibles, se tournera logiquement vers le suivi pharmacothérapeutique de la méthadone afin de réussir l'approche thérapeutique substitutive. Une réponse insuffisante au traitement, posant la question de l'observance ou de l'existence possible d'interactions médicamenteuses, ou à l'inverse, une réponse excessive avec apparition de manifestations indésirables, correspondent à des situations qui nécessitent la réalisation de dosages sanguins de la méthadone.

Depuis de nombreuses années, le suivi thérapeutique pharmacologique des patients sous thérapie substitutive par méthadone est réalisé dans notre laboratoire. Aujourd'hui, 5 patients en moyenne sont suivis régulièrement au sein de notre Institution. La détermination des concentrations sanguines résiduelles de méthadone est réalisée au moyen d'un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse. La méthode développée permet, après une extraction en phase liquide et dérivatisation par un mélange de BSTFA-TMCS (99-1 ; v/v), la détection et la quantification de la méthadone et de l'EDDP, son principal métabolite, pharmacologiquement inactif. La sensibilité analytique a été fixée à 10 ng/mL pour les deux produits recherchés et la spécificité est garantie par l'usage de la spectrométrie de masse. L'intervalle de dosage s'étend de 10 à 800 ng/mL, englobant de la sorte les concentrations thérapeutiques généralement admises, comprises entre 150 et 400 ng/mL. Pour certains auteurs, la valeur cible serait de 400 ng/mL [23]. Des concentrations résiduelles de méthadone inférieures à 100 ng/mL sont considérées comme inefficaces, alors que les valeurs supérieures à 600 ng/mL (ou 800 ng/mL pour les plus tolérants) correspondent à un surdosage avec manifestations indésirables [103].

Actuellement, au vu des considérations évoquées et développées précédemment, les Cliniciens peuvent et devraient utiliser les concentrations plasmatiques de la méthadone comme indicateurs thérapeutiques en complément de l'examen clinique et de l'anamnèse.

Au total, la généralisation d'un suivi thérapeutique pharmacologique de la méthadone pourrait incontestablement améliorer le traitement des patients héroïnomanes en adaptant la posologie de manière la plus optimale (400 ng/mL est une concentration sérique rarement atteinte avec des doses de 60 à 80 mg généralement prescrites en milieu liégeois) et pourrait réduire de la même façon la toxicité de la méthadone, parfois importante car responsable d'issue fatale. En outre, avec le suivi thérapeutique, le Clinicien sera beaucoup aidé dans sa décision, confronté à une demande de modification de posologie (parfois irrationnelle). Il pourra ainsi expliquer des effets indésirables apparaissant, même à de faibles doses, et vérifier la compliance du patient au traitement.

### **V. 3. Le bupropion**

Le bupropion, dont la toxicité est importante, doit faire l'objet d'une attention particulière. Son utilisation est limitée au traitement de certaines formes de dépressions et au traitement du sevrage tabagique. Les recommandations internationales de la Food and Drug Administration, soutenues par les agences de pharmacovigilance, recommandent de n'utiliser le médicament qu'après exclusion de certaines pathologies telles convulsions, troubles bipolaires, sevrage alcoolique, anorexie, boulimie ou encore insuffisance hépatique sévère [104]. La crise convulsive généralisée, dont l'incidence est estimée à 0.1% pour des posologies journalières de 300 mg habituellement recommandées, constitue l'effet indésirable le plus grave et le plus redouté. La survenue de ces crises tonico-cloniques, dose dépendantes (l'incidence passe à 0.4% pour des doses quotidiennes de 450 mg), a conduit au retrait du médicament dans les années 80 [105]. Aujourd'hui, son usage thérapeutique doit logiquement être accompagné d'un suivi thérapeutique pharmacologique, ce qui est d'ailleurs conseillé par la « National Academy of Clinical Biochemistry » [1].

Le bupropion subit un métabolisme hépatique important avec formation de trois métabolites à activité pharmacologique : tout d'abord, l'hydroxybupropion (HB) formé par l'action du cytochrome P450 2B6, dont l'activité correspond à 50 % de celle du produit parent, et ensuite, deux diastérisomères, le thréohydrobupropion (TB) et l'érythrohydrobupropion (EB), de formation non élucidée et dont l'activité correspond à 20% de celle du bupropion. Les trois métabolites contribuent donc à l'activité pharmacologique du médicament, d'autant qu'ils présentent, à l'équilibre du traitement, des concentrations plasmatiques supérieures à celle du produit parent. Les concentrations mesurées après la prise d'un seul comprimé de bupropion

de 200 mg vont de 126 à 388 µg/L pour le bupropion, de 94 à 486 µg/L pour l'hydroxybupropion et de 27 à 213 µg/L pour le thréohydrobupropion [106].

Les effets du traitement sont dose dépendants. Cependant, la relation existant entre la quantité de bupropion administrée et ses concentrations plasmatiques est variable selon les patients. Elle dépend notamment du polymorphisme génétique du cytochrome P450 2B6, de la fonction rénale et surtout de la fonction hépatique expliquant l'apparition chez certains sujets de manifestations indésirables parmi lesquelles convulsions, tachycardie sinusale, hypertension, agitation et hallucinations. Le suivi thérapeutique pharmacologique du bupropion représente pour le Clinicien un outil précieux qui permet de prévenir ces manifestations indésirables.

La méthode analytique développée au moyen du module de séparation Acquity UPLC couplé à un spectromètre de masse Quattro Premier répond aux critères retenus pour le suivi thérapeutique pharmacologique. La sensibilité et la spécificité de la technique garantissent la validité des résultats obtenus pour le bupropion et ses trois métabolites. La gamme de linéarité recouvre largement les taux infrathérapeutiques, thérapeutiques, et suprathérapeutiques, puisqu'elle s'étend de 5 à 1000 ng/mL pour le bupropion et de 10 à 2000 ng/mL pour les métabolites. Les trop rares dosages réalisés au laboratoire ont permis aux Cliniciens prescripteurs d'évaluer la compliance de leurs patients au traitement, ou d'objectiver par la mise en évidence de concentrations suprathérapeutiques, des signes cliniques d'intoxication.

#### **V. 4. Le GHB**

Synthétisé et étudié par LABORIT dans les années 1960, il fut utilisé à cette époque comme agent anesthésiant. Aujourd'hui, le GHB est un produit dont l'utilisation thérapeutique est très limitée. En début d'année 2010, aucune spécialité pharmaceutique à base de GHB n'était commercialisée en Belgique. Dans le reste de l'Europe et aux Etats-unis, le GHB peut être utilisé dans le traitement de la narcolepsie associée à de la cataplexie et dans le sevrage des dépendances à l'alcool et aux opiacés. Le GHB est également employé comme agent anesthésiant, mais très rarement, principalement en neurotraumatologie et en obstétrique. En Belgique, il est prévu que le GHB fasse partie de l'arsenal thérapeutique la seconde moitié de l'année 2010, pour le traitement de la narcolepsie et de la cataplexie.

Les usages détournés du GHB l'ont fait connaître au grand public. Tout d'abord, au début des années 1980, il a largement circulé dans le milieu du bodybuilding où il était utilisé pour ses propriétés anabolisantes. Ensuite, début des années 1990, son utilisation a été plus fréquente

et notamment dans le but de nuire à autrui (vols, viols, extorsions de signatures). Il fut désigné sous le nom de « drogue du viol ». Ses propriétés de désinhibition et l'amnésie résultant de sa consommation expliquent la capacité de cette substance à soumettre chimiquement un individu. Dans un premier temps, le GHB provoque des états euphoriques proches de l'ivresse, et dans un second temps une forte sédation. De nos jours, dans les milieux festifs ou les « raves parties », il est consommé pour ses propriétés hallucinatoires et enivrantes. C'est pourquoi le GHB est depuis 2001 soumis à la législation sur les stupéfiants et dès lors son utilisation est évidemment spécialement règlementée.

Que ce soit pour un usage festif ou lors d'un traitement médicamenteux, la prise de GHB peut entraîner une certaine toxicité. Evidemment, les consommations illicites sont les plus dangereuses et entraînent régulièrement des comas, avec risque de dépression respiratoire et d'issues fatales [55]. Sa toxicité a contraint les comités d'experts à recommander la supervision des traitements de la narcolepsie par des médecins spécialistes des troubles du sommeil [107]. Les principales manifestations indésirables observées lors de ces thérapies se résument à des nausées, vertiges, maux de tête, pertes de mémoire, mais aussi bradycardie, hypotension, hypothermie et troubles respiratoires. Le risque de déficience respiratoire est à prendre en considération en cas d'apnée du sommeil ou de consommation d'autres agents déprimeurs du système nerveux central (benzodiazépines, barbituriques, et ...alcool !).

Le traitement chronique au GHB peut entraîner une pharmacodépendance et un syndrome de sevrage à l'arrêt du traitement, avec des symptômes comparables à ceux décrits lors d'un sevrage à l'alcool traduisant anxiété, insomnie, hallucination, convulsions et délires.

Que ce soit pour le traitement des dépendances à l'alcool ou de la narcolepsie, il est nécessaire d'utiliser de fortes doses de GHB sur une longue période de temps. Pour le sevrage alcoolique, des doses de 50 à 100 mg/kg de poids corporel, fractionnées en 3 à 6 prises au cours des 24 heures, sont utilisées [108]. Pour la narcolepsie, la dose quotidienne est comprise entre 4.5 et 9 g, fractionnée en 2 prises égales, la première au coucher, la deuxième deux heures et demie à quatre heures plus tard [107]. Une posologie de 9 g par nuit est considérée comme la plus efficace pour combattre la cataplexie. Malgré un profil de tolérance relativement bon, les doses thérapeutiques les plus élevées correspondent logiquement aux doses potentiellement toxiques. Des comas accompagnés de dépression respiratoire et convulsions, voire d'une issue fatale, ont été décrits à partir de doses supérieures à 50 mg/kg de poids corporel [109].

Puisque le GHB est actuellement peu utilisé en thérapeutique, le suivi thérapeutique pharmacologique est rare. Mais dans la mesure où le GHB fera prochainement son apparition

sur le marché belge et qu'il est beaucoup plus souvent l'objet d'une utilisation détournée, le développement d'une méthode de dosage s'imposait. Cette technique doit répondre aux caractéristiques habituelles des méthodes appliquées au suivi thérapeutique pharmacologique, et notamment elle doit présenter une grande sensibilité puisque le GHB se retrouve rapidement dans le sang à des concentrations relativement basses, en raison de sa demi-vie biologique très courte, de l'ordre de 27 minutes [110; 111].

La technique analytique développée et validée au laboratoire permettant le dosage du GHB s'appuie sur la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Elle permet la mise en évidence du GHB se trouvant dans le sang à de très faibles concentrations, puisque les limites de détection et de quantification du produit ont respectivement été fixées à 1 et 2.5 µg/mL. L'intervalle de linéarité du dosage, déterminé entre 2.5 et 80 µg/mL, répond parfaitement aux besoins du suivi thérapeutique pharmacologique. En effet, pour des doses de 50 mg/kg, les concentrations sanguines maximales mesurées étaient de 83.1 µg/mL. Mais six heures seulement après l'ingestion du médicament, les concentrations plasmatiques mesurées étaient inférieures au taux physiologique de 1.5 µg/mL [46; 112].

La méthode développée apporte aux Cliniciens le moyen d'évaluer les traitements à base de GHB. Aujourd'hui utilisée dans notre laboratoire pour la mise en évidence d'intoxications, volontaires ou non, cette technique est d'ores et déjà disponible pour la réalisation du suivi thérapeutique pharmacologique du GHB, lorsque ce dernier sera commercialisé dans notre pays.

## **V. 5. Les sulfamidés hypoglycémiantes**

La glycémie, et plus particulièrement l'hémoglobine glyquée, sont d'excellents indices biologiques pour contrôler l'efficacité du traitement par sulfamidés hypoglycémiantes. En cas de surdosage, conduisant à des concentrations supratherapeutiques de sulfamidés hypoglycémiantes, l'hypoglycémie sévère constitue la principale manifestation indésirable. On estime à 1 pour cent le nombre de patients diabétiques traités par sulfonurées qui présentent chaque année une hypoglycémie sévère, c'est-à-dire nécessitant l'intervention d'un tiers [60]. Les épisodes hypoglycémiques sont le plus souvent la conséquence d'une erreur de prise de médicament ou d'une inadéquation entre alimentation et importance de l'effort physique d'une part et d'autre part la quantité de médicament hypoglycémiant absorbée. L'interaction médicamenteuse, notamment si les sulfamidés hypoglycémiantes sont associés à des substances fortement liées aux protéines plasmatiques (anticoagulants oraux, fibrates, ...),



l'insuffisance rénale, et dans une moindre mesure l'insuffisance hépatique, sont des circonstances pouvant expliquer une augmentation de l'effet thérapeutique. Le suivi thérapeutique pharmacologique des sulfonyles peut apporter une réponse étiologique aux hypoglycémies apparaissant chez les sujets traités par ces médicaments, mais aussi, il peut permettre de vérifier la compliance du patient diabétique à son traitement. Enfin, le suivi thérapeutique pharmacologique peut s'avérer utile au diagnostic des hypoglycémies associées à un hyperinsulinisme endogène [113].

En dehors du traitement antidiabétique par sulfonyles, les deux principales causes d'hypoglycémies associées à un hyperinsulinisme endogène sont l'insulinome et l'hyperinsulinisme congénital. L'insulinome comprend la quasi totalité des hyperinsulinismes endogènes chez l'adulte et l'enfant de plus de cinq ans, alors que l'hyperinsulinisme congénital se révèle chez le nourrisson ou au cours de la petite enfance [73 ; 114]. Le traitement de ces pathologies extrêmement rares comprend le plus souvent une pancréatectomie, partielle en cas de formes focales, ou subtotale en cas de formes diffuses. Leur diagnostic s'appuie sur l'anamnèse du patient, l'examen clinique, l'imagerie médicale et les tests biologiques classiques, parmi lesquels il est indispensable d'ajouter la recherche de sulfamides hypoglycémisants. Plusieurs études font état en effet de consommation volontairement excessive de médicaments insulinosécrétagogues pour induire un faux diagnostic d'insulinome [113; 115].

La méthode analytique développée au laboratoire s'appuie sur la chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse tandem (UPLC/MS-MS). Elle autorise la recherche et le dosage simultanés de 11 sulfamides hypoglycémisants, parmi lesquels on retrouve les cinq molécules commercialisées en Belgique (glibenclamide, gliclazide, glipizide, gliquidone et glimépiride), ainsi que d'autres produits aisément disponibles sur le marché mondial (acétohexamide, carbutamide, chlorpropamide, glibornuride, tolazamide et tolbutamide). A ces médicaments, s'ajoute le répaglinide, seul représentant de la classe des glinides, dont le mécanisme d'action sur la sécrétion d'insuline est identique à celui des sulfonyles. La nécessité de disposer d'une technique analytique permettant la recherche du plus grand nombre possible d'agents responsables de sécrétion d'insuline est en effet indispensable pour exclure toute prise cachée et inavouée de ces médicaments. De plus, compte tenu de la rapidité avec laquelle certains de ces agents sont éliminés (12 à 24 heures), il est nécessaire de disposer d'une méthode présentant une bonne sensibilité. Le système UPLC/MS-MS répond parfaitement à ce critère puisque la validation de la méthode

développée annonce des limites de quantification de l'ordre de 10 ng/mL pour les différents agents pharmacologiques.

Cette technique analytique est parfaitement adaptée au suivi thérapeutique pharmacologique des traitements par sulfonyles ainsi qu'à la mise en évidence de prises clandestines de substances insulinosécrétagogues. Le suivi thérapeutique pharmacologique des sulfamidés hypoglycémisants permettra de protéger le patient de manifestations indésirables et de faire la distinction entre états d'hypoglycémie résultant d'un surdosage par sulfamidés hypoglycémisants et apparaissant en présence d'insulinome.

## **V. 6. Les $\beta$ -lactamines**

Les  $\beta$ -lactamines représentent une thérapeutique antimicrobienne dont le coût est relativement élevé, c'est pourquoi on lui confèrera une attention particulière. Dans nos pays industrialisés, le budget médicament a beaucoup augmenté au point de représenter aujourd'hui une fraction non négligeable du budget hospitalier. En 20 ans, le budget médicament est passé de 4% à 10% du budget hospitalier, notamment en raison de la mise à disposition quasiment permanente de nouvelles molécules toujours plus onéreuses. Les conséquences financières de certaines évolutions médicales deviennent difficilement maîtrisables et les budgets consacrés aux soins de santé sont très importants. Pour l'année 2006, l'Union Européenne des 25 a consacré aux soins de santé en moyenne 7.76% de son PIB, avec un taux moyen de 8.6% du PIB atteint pour l'Union des 15 [116].

L'approche pharmacoéconomique revêt dans ce contexte évolutif un intérêt tout particulier et l'utilisation des  $\beta$ -lactamines doit être soumise à une analyse objective permettant d'identifier la stratégie médicale possédant le meilleur rapport entre efficacité, tolérance et coût.

A ce stade, il n'est pas inutile de rappeler que la pharmacoéconomie permet l'allocation optimale des ressources de santé sans envisager de limiter les dépenses. Il convient en fait d'analyser les coûts en fonction des résultats positifs de la thérapeutique sur la Santé. L'analyse économique complète devra théoriquement prendre en compte 3 sortes de coûts. Tout d'abord, il faudra considérer des coûts directs, correspondant à la valeur de l'ensemble des ressources consommées liées à la prise en charge de la pathologie (médicaments, hospitalisation, examens de laboratoire et de radiologie, ...). Ensuite, on examinera les coûts indirects, recouvrant principalement les pertes de productivité du patient et aussi de son entourage. Enfin, on appréciera les coûts intangibles représentant la perte du bien-être du patient et de son entourage lié à la maladie, c'est-à-dire les coûts humains et psychologiques

de la maladie. Dans l'étude que nous avons réalisée auprès de patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs et sous thérapie par ceftazidime, on devra se limiter évidemment à juger les coûts directs du traitement par  $\beta$ -lactamines et tout spécialement à identifier l'économie possible par une adaptation pharmacologique optimale.

L'efficacité du traitement pour les  $\beta$ -lactamines est maximale lorsque leur concentration plasmatique à l'équilibre atteint 4 à 5 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) des germes responsables de l'infection [86-88]. En retenant cette théorie démontrée sur cultures de cellules *in vitro*, on admet que toute dose correspondant à des concentrations supérieures à 4 à 5 CMI est excessive et entraîne dès lors un coût inutile.

Sur base de l'analyse des résultats des  $\beta$ -lactamines obtenus chez 20 patients séjournant dans des unités de soins intensifs et présentant une insuffisance rénale dans la moitié des cas, on peut dire que :

- *pour les 10 patients à fonction rénale normale*, le suivi thérapeutique pharmacologique a montré que 2 patients seulement avaient un traitement bien adapté. Mais dans 7 cas, les doses de ceftazidime utilisées étaient trop importantes. Un seul patient recevait une dose insuffisante. Ainsi, sur base de cette étude rétrospective limitée (ce qui ne permet pas des conclusions statistiques, mais qui fournit une orientation), une adaptation posologique appuyée sur le suivi thérapeutique pharmacologique aurait permis une réduction globale des quantités de ceftazidime de 24.6 % ;
- *pour les 10 patients atteints d'insuffisance rénale*, les modifications à appliquer au traitement étaient encore plus significatives puisque le suivi thérapeutique pharmacologique démontrait la possibilité d'une réduction de 47.3% des quantités de ceftazidime utilisées.

Si on tient compte de la consommation globale de ceftazidime dans notre CHU (155 flacons de Glazidim<sup>®</sup> 1 g et 3266 flacons 2 g ont été consommés durant l'année 2009) et si on admet par extrapolation de nos résultats qu'on aurait pu réduire la consommation globale de ces médicaments de 24.6%, on comprend aisément qu'en appliquant le suivi thérapeutique pharmacologique, les économies financières peuvent être très significatives puisque le budget Glazidim<sup>®</sup> pour 2009 est évalué à 79076 euros.

**VI. REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] Marquet P.– Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments. Elsevier, Paris, **2004**; 20-31.
- [2] Hirsh J., Dalen J.E., Anderson D.R. et al.– Oral anticoagulants: Mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*, **2001**; 119: 8S- 21S.
- [3] Morishita T., Tamura N., Makino T. et al.– Production of Menaquinones by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, **1999**; 82: 1897-1903.
- [4] Lubetsky A., Yonath H., Olchovsky D. et al.– Comparison of oral vs intravenous phytonadione (vitamin K1) in patients with excessive anticoagulation. *Arch Intern Med*, **2003**; 163: 2469-2473.
- [5] Shoshkes M., Epplebaum A., Wilner M.– Oral phytonadione in neonatal hypoprothrombinemia. *J Pediatr*, **1959**; 55 (1): 80-84.
- [6] Wardrop D., Keeling D.– The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol*, **2008**; 141 (6): 757-763.
- [7] Pirmohamed M.– Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br J Haematol*, **2006**; 62 (5): 509-511.
- [8] Mueller R.L., Scheidt S.– History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation*, **1994**; 89: 432-449.
- [9] Samama M.M.– Hémorragies et thromboses, du diagnostic aux traitements. Deuxième édition. Masson, Issy Les Moulineaux, **2009**; 102.
- [10] Visser L.E., van Schaik R.H., van Vliet M. et al.– The risk of bleeding complications in patients with cytochrome P450 CYP2C9\*2 or CYP2C9\*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. *Thromb Haemost*, **2004**; 92(1): 61-66.

- [11] Cadiou G., Benhamou Y., Varin R. et al.– Facteurs de risque de surdosage en anti-vitamine K (AVK) Etude prospective cas témoins à partir d'un service d'accueil et des urgences (SAU). *Rev Med Interne*, **2006**; 27 suppl 3: S304.
- [12] Way W.L., Fields H.L., Leong Way E.– Analgésiques opioïdes et leurs antagonistes, in Katzung B.G. Ed., *Pharmacologie fondamentale et clinique*. 7<sup>ème</sup> Edition, Piccin, Stamford, **1998**; 513.
- [13] Hennen G.– *Endocrinologie*. De Boeck, Bruxelles, **2001**; 172-174.
- [14] Rosenzweig M.– Les drogues dans l'histoire – entre remède et poison – Archéologie d'un savoir oublié. De Boeck, Bruxelles, **1998**; 151-152.
- [15] Sweetman S.C.– *Martindale - The complete drug reference*. 36<sup>th</sup> Edition, Pharmaceutical Press, London, **2009**; 82.
- [16] Dole V., Nyswander M.– A medical treatment of diacetylmorphine (heroin) addiction. *JAMA*, **1965**; 193: 80-84.
- [17] Dole V., Nyswander M.– Heroin addiction: a metabolic disease. *Arch Intern Med*, **1967**; 120: 19-24.
- [18] Dole V., Robinson J., Orraca J. et al.– Methadone treatment of randomly selected criminal addicts. *New Engl J Med*, **1969**; 280: 1372-1375.
- [19] Mattick R.P., Breen C., Kimber J. et al.– Methadone maintenance therapy versus no opioid replacement therapy for opioid dependence. *Cochrane database Syst Rev*, **2003**; (2): CD002209.
- [20] Kuehn B.M.– Methadone treatment marks forty years. *JAMA*, **2005**; 294: 887-889.
- [21] Kleber H.D.– Methadone maintenance four decades later. Thousands of lives saved but still controversial. *JAMA*, **2008**; 300 (19): 2303-2305.

- [22] Kreek M.J., Vocci F.J.– History and current status of opioid maintenance treatments : blending conference session. *J Subst Abuse Treat*, **2002**; 23: 93-105.
- [23] Vazquez V., Gury C., Laqueille X.– Methadone : from pharmacokinetic profile to clinical pharmacology. *Encephale*, **2006**; 32: 478-486.
- [24] Weschules D.J., Bain K.T., Richeimer S.– Actual and potential drug interactions associated with methadone. *Pain Medicine*, **2007**; 9: 315-344.
- [25] Choo R.E., Jansson L.M., Scheidweiler K. et al.– A validated liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionisation-tandem mass spectrometric method for the quantification of methadone, EDDP and EMDP in human breast milk. *J Anal Toxicol*, **2007**; 31: 265-269.
- [26] Vieweg W., Carlyle Lipps W., Fernandez A.– Opioids and Methadone equivalents for clinicians. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, **2005**; 7: 86-88.
- [27] Gourevitch M.N., Friedland G.F.– Interactions between methadone and medications used to treat HIV infection: A review. *Mt Sinai J Med*, **2000**; 67: 429-436.
- [28] Belson M.G., Kelley T.R.– Bupropion exposures: clinical manifestations and medical outcome. *J Emerg Med*, **2002**; 23: 223–230.
- [29] Shepherd G., Velez L.I., Keyes D.C.– Intentional bupropion overdoses. *J Emerg Med*, **2004**; 27: 147–151.
- [30] Summers K.L., Giacobini E.– Effects of local and repeated systemic administration of nicotine on extracellular levels of acetylcholine, norepinephrine, dopamine, and serotonin in rat cortex. *Neurochem Res*, **1995**; 20: 753–759.
- [31] Hasegawa H., Meeusen R., Sarre S. et al.– Acute dopamine/norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. *J Appl Physiol*, **2005**; 99: 1397–1401.

- [32] Winek C.L., Wahba W.W., Winek C.L Jr. et al.– Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Sci Int*, **2001**; 122: 107–123.
- [33] Lobo K.K., Gross A.S., Ray J. et al.– HPLC assay for bupropion and its major metabolites in human plasma. *J Chromatogr B*, **2005**; 823: 115-121.
- [34] Coles R., Kharasch E.D.– Stereoselective analysis of bupropion and hydroxybupropion in human plasma and urine by LC/MS/MS. *J Chromatogr B*, **2007**; 857: 67-75.
- [35] Posner J., Bye A., Dean K. et al.– The disposition of bupropion and its metabolites in healthy male volunteers after single and multiple doses. *Eur J Clin Pharmacol*, **1985**; 29: 97-103.
- [36] Jepsen F, Matthews J., Andrews F.J.– Sustained release bupropion overdose: an important cause of prolonged symptoms after an overdose. *J Emerg Med*, **2003**; 20: 560–561.
- [37] Spiller H.A., Bottei E., Kalin L.– Fatal bupropion overdose with post mortem blood concentrations. *Forensic Sci Med Pathol*, **2008**; 4: 47-50.
- [38] van Nieuwenhuijzen P.S., McGregor I.S.– Sedative and hypothermic effects of GHB in rats alone and in combination with other drugs: Assessment using biotelemetry. *Drug Alcohol Depend*, **2009**; 103: 137-147.
- [39] Laborit H., Jouany J.M., Gerard J. et al.– Summary of an experimental and clinical study on a metabolic substrate with inhibitory central action : sodium 4-hydroxybutyrate. *Presse Med*, **1960**; 68: 1867-1869.
- [40] Mesmer M.Z., Satzger R.D.– Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by HPLC/UV-VIS spectrophotometry and HPLC/thermospray mass spectrometry. *J Forensic Sci*, **1998**; 43 (3): 489-492.
- [41] Rodgers J., Ashton C.H., Gilvarry E. et al.– Liquid ecstasy: a new kid on the dance floor. *Br J Psychiatry*, **2004**; 184: 104-106.



- [42] Villain M., Kintz P.– GHB : un contrôle (de qualité) de qualité. *Ann Toxicol Anal*, **2002**; 14: 3-9.
- [43] Communiqué de l'agence sur les drogues de l'UE à Lisbonne.– Le GHB et ses précurseurs – Nouvelle étude. 17 mars **2008**.
- [44] Deveaux M.– L'acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique (GHB): un vieux produit, de nouveaux problèmes. *Ann Toxicol Anal*, **2002**; 14: 417-423.
- [45] Kintz P., Goullé J.P., Cirimele V. et al.– Window of detection of gamma-hydroxybutyrate in blood and saliva. *Clin Chem*, **2001**; 47: 2033-2034.
- [46] Kintz P., Cirimele V., Jamey C. et al.– Soumission chimique par GHB : cheveux et GC/MS/MS. *Ann Toxicol Anal*, **2002**; 14: 129-131.
- [47] Rossi R., Lancia M., Gambelunghe C.– Identification of GHB and morphine in hair in a case of drug-facilitated sexual assault. *Forensic Sci Int*, **2009**; 186: e9-e11.
- [48] Palmer R.B.– Gamma-butyrolactone and 1,4 butanediol ; abused analogues of gamma-hydroxybutyrate. *Toxicol Rev*, **2004**; 23: 21-31.
- [49] Thai D., Dyer J.E., Jacob P. et al.– Clinical pharmacology of 1,4-butanediol and gamma-hydroxybutyrate after oral 1,4-butanediol administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, **2007**; 81: 178-184.
- [50] Lettieri J., Fung H.L.– Improved pharmacological activity via pro-drug modification : comparative pharmacokinetics of sodium gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **1978**; 22: 107-118.
- [51] Bodson Q., Denooz R., Serpe P. et al.– Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) measurement by GC-MS in blood, urine and gastric contents, following an acute intoxication in Belgium. *Acta Clin Belg*, **2008**; 63: 200-208.

- [52] Goodwin A.K., Brown P.R., Jansen E.E.W. et al.– Behavioral Effects and pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyrate (GHB) precursors, gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4 butanediol (1,4-BD) in baboons. *Psychopharmacology*, **2009**; 204: 465-476.
- [53] Goullé J.P., Bigo M., Lacroix C.– GHB sanguin et urinaire après épreuves de charge par voie orale et par voie intraveineuse. *J Med Leg Droit Med*, **2003**; 46: 101-108.
- [54] Kintz P., Cirimele V., Jamay C. et al.– Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. *J. Forensic Sci*, **2003**; 48: 1-6.
- [55] Zvosec D.L., Smith S.W., Hall B.J.– Three deaths associated with use of Xyrem<sup>®</sup>. *Sleep Med*, **2009**; 10: 490-493.
- [56] Wood D.M., Warren Gash C., Ashraf T. et al.– Medical and legal confusion surrounding gamma-hydroxybutyrate (GHB) and its precursors gamma-butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4BD). *Q J Med*, **2008**; 101: 23-29.
- [57] Levine R.– Sulfonylureas : background and development of the field. *Diabetes Care*, **1984**; 7 suppl 1: 3-7.
- [58] Loubatieres-Mariani M.M.– The discovery of hypoglycemic sulfonamides. *J Soc Biol*, **2007**; 201: 121-125.
- [59] Scheen A.– Les sulfamidés hypoglycémiants, 50 ans après Loubatières. *Rev Med Liege*, **1996**; 51: 90-93.
- [60] Del Prato S., Pulizzi N.– The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, **2006**; 55: S20-27.
- [61] Herrold J.N., Tzagournis M., Skillman T.G.– Acute and chronic studies using a new oral hypoglycaemic agent, glyburide. *Metabolism*, **1971**; 20: 414-421.
- [62] Hamaguchi T., Hirose T., Asakawa H. et al.– Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide. *Diabetes Res Clin Pract*, **2004**; 66S: S129-S132.

- [63] Palladino A.A., Bennett M.J., Stanley C.A.– Hyperinsulinism in Infancy and Childhood: When an Insulin Level is Not Always Enough. *Clin Chem*, **2008**; 54: 256-263.
- [64] Dorosz Ph.– Guide pratique des interactions médicamenteuses. 5<sup>ème</sup> Edidition, Maloine, Paris, **1995**; 13-15.
- [65] Amiel S.A., Dixon T., Mann R. et al.– Hypoglycaemia in type 2 diabetes. *Diabet Med*, **2008**; 25: 245-254.
- [66] Wright A.D., Cull C.A., MacLeod K.M. et al.– Hypoglycemia in type 2 diabetic patients randomised to and maintained on monotherapy with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin for 6 years from diagnosis: UKPDS73. *J Diabetes Complications*, **2006**; 20: 395-401.
- [67] Silink M., Mbanya J.C.– Global standardization of the HbA<sub>1c</sub> assay – The consensus committee recommendations. *Diabetes Voice*, **2007**; 52: 33-34.
- [68] Rosenstock J.– Treatment strategies and new therapeutic advances for type 2 diabetes. *Diabetes Educ*, **2000**; 26 suppl: 14-18.
- [69] Bardin C., Tafzi N.– Difficultés d'interprétation en toxicologie: Identification plasmatique de sulfamidés hypoglycémiants et hypoglycémies inexplicées. *Rev Fr Lab*, **2008**; 406: 39-42.
- [70] Guillausseau P.J., Laloi-Michelin M., Delaval-Molko A. et al.– Hypoglycémies factices de l'adulte. *Med Ther Endocrinol Repro*, **2002**; 4: 145-148.
- [71] Service F.J., McMahon M.M., O'Brien P.C. et al.– Functioning insulinoma-incidence, recurrence, and long-term survival of patients: a 60-years study. *Mayo Clin Proc*, **1991**; 66: 711-719.
- [72] Heurtier A., Grimaldi A.– Devant une hypoglycémie chez l'adulte non diabétique. *Méd Thérap*, **1997**; 3: 59-65.

- [73] Nikfarjam M., Warshaw A.L., Axelrod L. et al.– Improved Contemporary Surgical Management of Insulinomas: A 25-year Experience at the Massachusetts General Hospital. *Ann Surg*, **2008**; 247: 165-172.
- [74] Geddes A.– 80<sup>th</sup> Anniversary of the discovery of penicillin, an appreciation of Sir Alexander Fleming. *Int J Antimicrob Agents*, **2008**; 32: 373.
- [75] Prins J.M., Weverling G.J., De Blok K. et al.– Validation and nephrotoxicity of a simplified once-daily aminoglycoside dosing schedule and guidelines for monitoring therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**; 40: 2494-2499.
- [76] Chow A.W., Azar R.M.– Glycopeptides and nephrotoxicity. *Intensive Care Med*, **1994**; 20: S23-29.
- [77] Garraffo R.– Apport du suivi thérapeutique pharmacologique à l'optimisation d'une antibiothérapie in Marquet P. Ed., *Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments*. Elsevier, Paris, **2004** ; 33-38.
- [78] Roberts J.A., Webb S.A.R., Lipman J.– Cefepime versus ceftazidime: considerations for empirical use in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*, **2007**; 29: 117-128.
- [79] Ikawa K., Morikawa N., Hayato S. et al.– Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiling of cefepime in plasma and peritoneal fluid of abdominal surgery patients. *Int J Antimicrob Agents*, **2007**; 30: 270-273.
- [80] McKinnon P.S., Paladino J.A., Schentag J.J.– Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*, **2008**; 31: 345-351.
- [81] Mouton J.W., den Hollander J.G.– Killing of *Pseudomonas aeruginosa* during continuous and intermittent infusion of ceftazidime in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*, **1994**; 38 (5): 931-936.

- [82] Hanes S.D., Wood G.C., Herring V. et al.– Intermittent and continuous ceftazidime infusion for critically ill trauma patients. *Am J Surg*, **2000**; 179: 436-440.
- [83] McNabb J.J., Nightingale C.H., Quintiliani R.– Cost-effectiveness of ceftazidime by continuous infusion versus intermittent infusion for nosocomial pneumonia. *Pharmacotherapy*, **2001**; 21: 549-555.
- [84] Dalle J-H., Gnansounou M., Husson M-O. et al.– Continuous infusion of ceftazidime in the empiric treatment of febrile neutropenic children with cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*, **2002**; 24: 714-716.
- [85] Gustafson I., Lowdin E., Odenholt I. et al.– Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters for antimicrobial effects of cefotaxime and amoxicillin in an in vitro kinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45: 2436-2440.
- [86] Buijk S.L.C.E., Gyssens I.C., Mouton J.W. et al.– Pharmacokinetics of ceftazidime in serum and peritoneal exudate during continuous versus intermittent administration to patients with severe intra-abdominal infections. *J Antimicrob Chemother*, **2002**; 49: 121-128.
- [87] Mariat C., Venet C., Jehl F. et al.– Continuous infusion of ceftazidime in critically ill patients undergoing continuous venovenous haemodiafiltration : pharmacokinetic evaluation and dose recommendation. *Crit Care*, **2006**; 10: R26.
- [88] Cousson J., Floch T., Vernet-Garnier V. et al.– Intérêt pharmacodynamique de la perfusion continue vs l'administration intermittente de ceftazidime dans les pneumonies nosocomiales sévères. *Pathol Biol*, **2005**; 53: 546-550.
- [89] Shafran S.D.– Infections bactériennes in Page C. P. et coll. Ed., 1<sup>er</sup> édition française : *Pharmacologie intégrée*. De Boeck, Paris, **1999**; 419-444.
- [90] Ducharme M.P., Gimenez F., Decroix M.O.– Généralité sur les antibiotiques par voie systémique ; Classification, mécanisme d'action, spectre d'activité, prévention de l'iatropathologie in Gimenez F. et coll. Ed., 2<sup>ème</sup> édition: *Pharmacie clinique et thérapeutique*. Masson, Paris, **2002**; 847-857.

- [91] Bryskier A.– Pénicillines in Bryskier A. Ed., Antibiotiques agents, antibactériens et antifongiques. Ellipse, Paris, **1999**; 157.
- [92] Bryskier A., Aszodi J.– Céphèmes à usage parentéral in Bryskier A. Ed., Antibiotiques agents, antibactériens et antifongiques. Ellipse, Paris, **1999**; 225.
- [93] Bryskier A.– Carbapénèmes in Bryskier A. Ed., Antibiotiques agents, antibactériens et antifongiques. Ellipse, Paris, **1999**; 305.
- [94] Le Noc P.– Monolactames in Bryskier A. Ed., Antibiotiques agents, antibactériens et antifongiques. Ellipse, Paris, **1999**; 374-391.
- [95] Scart-Gres C.– Chlorhydrate de méthadone : information importante de pharmacovigilance. AFSSAPS – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, Lettre du 30 janvier **2007**.
- [96] Ornetti P., Disson-Dautriche A., Muller G. et al.– Manifestations rhumatologiques sous bupropion. Rev Rhum, **2004**; 71: 1198-1201.
- [97] Benadiba I.– Mise en garde sur la consommation de GBL (gamma-butyrolactone) – communiqué. Institut de Veille Sanitaire, 24 septembre **2009**.
- [98] Baldin B., Bonnet C., Chichmanian R.M. et al.– Bulletin niçois de Pharmacovigilance : Et si c'était le médicament ? Centre Régional de Pharmacovigilance et d'Information sur le Médicament, N°156; juillet – août **2008**.
- [99] Tableau des principales interactions – Répertoire commenté des Médicaments 2009 ; <http://www.cbip.be>, le 18/05/2010.
- [100] Samama M.M., Bodin L., Horellou M.H. et al.– Résistance aux antivitamines K (AVK): à propos d'un patient présentant une mutation du complexe enzymatique de la vitamine K époxyde réductase (VKORC1). J Mal Vasc, **2005**; 30 suppl 1: 30-31.

- [101] Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V. et al.– Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, **2004**; 427: 537-541.
- [102] Hobbins D.F.– Case report: Methadone maintenance dose of 1200 mg/day in an ultra-rapid metabolizer. *J Addict Nurs*, **2010**; 21: 22-36.
- [103] Boglione-Kerrien C., Furet Y., Bachelier J. et al.– Le dosage sanguin de la méthadone par technique FPIA: application au suivi des patients en traitement de substitution aux opiacés. *Ann Biol Clin*, **2007**; 65: 51-57.
- [104] Belson M.G., Kelley T.R.– Bupropion exposures: clinical manifestations and medical outcome. *J Emerg Med*, **2002**; 23: 223–230.
- [105] Shepherd G., Velez L.I., Keyes D.C.– Intentional bupropion overdoses. *J Emerg Med*, **2004**; 27: 147–151.
- [106] Baselt R.C.– Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 6<sup>th</sup> ed. Biomedical Publications, Foster City, CA, **2004**; 131-132.
- [107] Xyrem – EMA/100448/2010. Official website of European Medicines Agency: <http://www.ema.europa.eu>, le 18/05/2010.
- [108] Caputo F., Vignoli T., Francini S. et al.– GABAergic medications for treating alcohol dependence. *J Clin Psychopharmacol*, **2007**; 27: 539-540.
- [109] Benarroch E.E.–  $\gamma$ -Hydroxybutyric acid and its relevance in neurology. *Neurology*. **2009**; 72: 282-286.
- [110] Reeves J., Duda R.– GHB/GBL intoxication and withdrawal: a review and case presentation. *Addict Disord Their Treat*, **2003**; 2: 25-28.
- [111] Weir E.– Drug-facilitated date rape. *CMAJ*, **2001**; 165: 80.

[112] Abanades S., Farré M., Segura M. et al.– Disposition of gamma-hydroxybutyric acid in conventional and nonconventional biologic fluids after single drug administration: issues in methodology and drug monitoring. *Ther Drug Monit.* **2007**; 29: 64-70.

[113] Kwong P.Y.P., Teale J.D.– Screening for sulphonylureas in the investigation of hypoglycaemia. *J R Soc Med*, **2002**; 95: 381-385.

[114] Dekelbab B.H., Sperling M.A.– Recent advances in hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Acta Paediatr*, **2006**; 95: 1157-1164.

[115] Ramos E., Baron S., Sentanac S. et al.– Hypoglycémie liée à la prise volontaire de sulfamidés hypoglycémisants chez un enfant de 11 ans. *Arch Pédiatr.* **2005**; 12: 1109-1111.

[116] Dépense de Santé et Economie – Article 154452 du 19 avril **2006**.– Site EurActiv: <http://www.euractiv.com/fr/Sante>, le 18/05/2010.