

Analyse par RMN ^1H de liquides biologiques dans deux cas d'intoxication par le mécoprop et le 2,4-D

^1H NMR analysis of biological samples in two cases of poisoning with mecoprop and 2,4-D

Bernard CARTIGNY⁽¹⁾, Michel IMBENOTTE⁽²⁾, Nathalie AZAROUAL⁽³⁾,
Daniel MATHIEU⁽⁴⁾, Gaston VERMEERSCH⁽³⁾, Michel LHERMITTE^{(1,2)*}

(1) Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, CHRU - 59045 LILLE Cedex

(2) Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, BP 83 - 59006 LILLE Cedex

(3) Laboratoire de Physique, UPRESA CNRS 8009, Laboratoire d'Application RMN de l'Université de Lille 2,
BP 83 - 59006 LILLE Cedex

(4) Service d'Urgences Respiratoires et de Réanimation Médicale, Hôpital Calmette, CHRU - 59045 LILLE Cedex

* Auteur à qui adresser la correspondance : Pr Michel LHERMITTE, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, 59045 LILLE Cedex - FRANCE - Tél : 33 (0)3 20 44 49 63 - E-mail mlhermitte@chru.lille.fr

(Reçu le 4 juillet 2003 ; accepté le 16 septembre 2003)

RÉSUMÉ

Deux cas d'intoxication volontaire par un herbicide sont rapportés chez deux hommes de 51 et 52 ans. L'analyse par spectroscopie RMN- ^1H du désherbant a permis de montrer qu'il contenait essentiellement deux herbicides chlorophénoxylés : l'acide 2-(2-méthyl 4-chloro) phénoxy-propionique, aussi appelé mécoprop ou MCPP, et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou 2,4-D, et de préciser leurs proportions respectives. Les signes cliniques présentés correspondent à ceux décrits dans la littérature, en particulier l'insuffisance rénale fonctionnelle, l'acidose métabolique et la rhabdomyolyse. L'analyse d'échantillons d'urine, de sérum et de liquide de lavage gastrique par spectroscopie RMN- ^1H a permis de retrouver le mécoprop dans les échantillons biologiques ainsi que la diméthylamine présente dans la formulation concernée. Le mécoprop a pu être dosé, par intégration relative de pics caractéristiques, à 7,2 et 2,3 mmol/L dans le premier recueil d'urine obtenu respectivement pour chaque patient. Une augmentation forte de la créatine a aussi été trouvée à 15,5 et 10,2 mmol/L respectivement, ce qui est en relation avec la rhabdomyolyse présente dans les deux cas. L'analyse de ces deux nouveaux cas élargit le champ d'application de la RMN dans le diagnostic des intoxications aiguës.

MOTS-CLÉS

Mécoprop, 2,4-D, herbicides chlorophénoxylés, urine, RMN ^1H .

SUMMARY

Two cases of self poisoning with an herbicide are reported for two men, age 51 and 52 years old. The analysis of the product by ^1H -NMR spectroscopy revealed that it essentially contained two chlorophenoxy herbicides : the 2-(2-methyl 4-chloro) phenoxypropionic acid (mecoprop, MCPP) and the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ; it also specified their respective proportions. The clinical findings as presented fit those described in the literature, especially renal dysfunction, metabolic acidosis and rhabdomyolysis. The analysis of urine, serum and gastric washings using ^1H -NMR confirmed the presence of mecoprop in these biological samples as well as dimethylamine in the ingested product. Mecoprop was quantitated by relative integration of its characteristic peaks, which revealed a concentration of respectively 7.2 and 2.3 mmol/L in the first urine of each patient. An important increase of creatine excretion, 15.5 and 10.2 mmol/L, was also found in the same biological samples and was probably connected to the rhabdomyolysis present in both cases. These two new cases of acute poisoning illustrate the applicability of ^1H -NMR spectroscopy chlorophenoxy herbicides.

KEY-WORDS

Mecoprop, 2,4-D, phenoxy herbicides, urine, ^1H NMR.

Introduction

Les herbicides chlorophénoxylés regroupent quelques composés ayant un noyau phénol substitué par un à trois atomes de chlore, et dont la fonction phénol est liée à un acide, acétique, propionique ou butyrique. Ils sont commercialisés sous forme de sels avec la diméthylamine ou la diéthanolamine, ou sous forme d'ester isooctylique. Selon l'efficacité recherchée, ils sont souvent associés entre eux et parfois à d'autres types d'herbicides (chlorpyrifos, dicamba, ioxynil). L'un des plus courants est l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou 2,4-D (CAS : 94-75-7). Le 2,4-D est fréquemment associé au mécoprop ou acide 2-(2-méthyl 4-chloro) phénoxypropionique, encore appelé MCPP (CAS : 7085-19-0).

Les intoxications aiguës, intentionnelles ou accidentelles, par les herbicides chlorophénoxylés sont relativement courantes puisque 66 cas ont été décrits dans la littérature entre 1962 et 2000 (1), parmi lesquels 22 eurent une issue fatale. Dans ces intoxications, le 2,4-D est très souvent en cause, parfois seul, mais quelques cas concernent des intoxications associant le 2,4-D et le mécoprop (2, 3, 4). Les doses ingérées varient généralement de quelques grammes à plus de 100 g d'herbicides chlorophénoxylés totaux. Seul un auteur rapporte une ingestion massive de 1200 mg/kg de 2,4-D (5), alors que les doses mortelles sont estimées chez l'homme entre 80 et 714 mg/kg. Les délais entre ingestion et prise en charge varient de 30 minutes à 10 heures. Les signes les plus courants de l'ingestion d'herbicides chlorophénoxylés ne sont pas spécifiques et associent vomissements, diarrhées, crampes et faiblesse musculaire, douleurs abdominales et brûlures de la bouche. On retrouve dans de nombreux cas des signes de confusion mentale, avec parfois perte de conscience et coma ; les cas les plus graves aboutissent au décès. La symptomatologie varie bien sûr avec les doses ingérées, mais est difficilement imputable à un composé particulier à cause des nombreuses associations existant dans les différentes formulations. Les concentrations sanguines d'herbicides chlorophénoxylés rapportées varient de 0,25 à 10 mmol/L ; elles sont liées à la dose ingérée et au délai entre l'ingestion et la prise de sang. Les traitements mis en place dans ces cas d'intoxication aiguë font souvent appel à l'hémodialyse et à la diurèse alcaline pour augmenter l'élimination de ces toxiques acides.

Quelques cas de toxicité en milieu professionnel, dans les industries chimiques et de formulation de ces produits et chez les agriculteurs ont été décrits (1). L'absorption des matières actives s'effectue soit par contact cutané, soit par inhalation ; mais même parmi

les cas les plus exposés, aucun décès n'a jamais été constaté. Les méthodes généralement utilisées pour quantifier les herbicides chlorophénoxylés dans les liquides biologiques sont des méthodes de chromatographie liquide haute performance (CLHP) et de chromatographie en phase gazeuse (CPG). En 1999, Beeson et coll. (6) proposent une méthode de dosage de différentes classes d'herbicides par CLHP associée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP-MS-MS), après extraction organique. Une revue récente (7) expose l'ensemble des méthodes existantes pour le dosage d'un grand nombre de pesticides. Ces méthodes sont souvent appliquées aux dérivés chlorophénoxylés spécifiques de l'intoxication décrite, les composés les plus souvent retrouvés étant le 2,4-D, l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T), le mécoprop, l'acide 2-(2,4-dichloro) phénoxypropionique (dichlorprop), l'acide 2-méthyl 4-chloro phénoxyacétique (MCPA). Pour le 2,4-D, des méthodes d'immunoenzymologie dans le cadre du suivi de 45 employés à des postes de production et de formulation (8) et des méthodes de radioimmunologie pour le suivi de 22 applicateurs (9) ont aussi été décrites. La spectroscopie RMN ayant déjà été appliquée à d'autres types de xénobiotiques (10), l'objectif de ce travail est donc de vérifier l'applicabilité de la RMN ¹H à la détection et la quantification du mécoprop et du 2,4-D dans les cas d'intoxication aiguë.

Matériel et méthodes

Cas cliniques

Patient 1.

Un homme de 51 ans suivait un traitement par lithium pour psychose maniaco-dépressive. Après un arrêt de 9 mois, il est retrouvé inconscient à son domicile au côté d'emballages vides de Xanax® (alprazolam) et d'un flacon de désherbant S.E.M. Le patient est en coma stade II (score de Glasgow à 6) avec des vomissements très abondants. A l'examen, il présente une hypotonie, une hyporéflexie, un myosis serré et des mouvements myocloniques. On retrouve un important encombrement bronchique bilatéral, une fréquence cardiaque de 100/min. Sur place, sont effectuées une ventilation contrôlée et une rééquilibration hydro-électrolytique. A l'admission à l'hôpital, son état reste inchangé. Les examens montrent une insuffisance rénale fonctionnelle, une hyperthermie (38,7° C) et une expectoration purulente avec hyperleucocytose.

L'électrocardiogramme et la radiographie de thorax sont normaux. Le traitement a consisté en la poursuite de la ventilation et de la rééquilibration hydro-électrolytique. Par ailleurs, un lavage gastrique est réalisé,

suivi de l'administration de 50 g de charbon actif per os. L'inhalation de vomissements déclenche une bronchite traitée par antibiothérapie. Le patient, qui n'a plus de manifestation neurologique persistante, retrouve un état de conscience normal à la 18^{ème} heure. La ventilation assistée est arrêtée et le patient est extubé au bout de deux jours. Il sort au 3^{ème} jour, transféré en Service de Psychiatrie.

Patient 2.

Un homme de 52 ans, traité pour syndrome dépressif par des benzodiazépines et des antidépresseurs, est retrouvé inconscient à son domicile avec, à ses côtés, un flacon vide de désherbant S.E.M.. A l'arrivée du SMUR, le patient est en coma stade II (score de Glasgow à 3). Il présente une hypotonie avec hyporéflexie ostéotendineuse et des myoclonies prédominant au niveau abdominal. La fréquence cardiaque est à 110/min. Le patient est intubé et mis sous ventilation contrôlée. A l'admission à l'hôpital, l'état clinique est identique. Les examens biologiques montrent une acidose métabolique, une hyperlactatémie et hyperkaliémie, une insuffisance rénale fonctionnelle, une cytolyse hépatique modérée et une hyperleucocytose. La radiographie du thorax révèle une condensation pulmonaire basale gauche liée à l'inhalation de vomissements. L'électrocardiogramme montre des perturbations en rapport avec l'hyperkaliémie. Le traitement a consisté en la poursuite de la ventilation assistée, une rééquilibration hydro-électrolytique et un lavage gastrique suivi de l'administration de charbon activé et une alcalinisation. L'évolution est marquée par un retour à une conscience normale en 24 heures et une normalisation de la fonction rénale. Sur le plan musculaire, une rhabdomyolyse apparaît, avec impotence motrice et élévation des CK qui culminent au 3^{ème} jour et se normalisent ensuite. La cytolyse hépatique augmente les trois premiers jours et se normalise ensuite. On note par ailleurs une pancréatite et l'apparition d'un méléna au sixième jour en rapport avec des lésions d'œsophagite et de gastrite diffuse. L'ensemble de ces anomalies est en faveur d'une lésion caustique. L'évolution est favorable et les contrôles radiographique et endoscopique à deux mois sont normaux.

Instrumentation et réactifs

Les analyses RMN ¹H ont été réalisées sur un spectromètre Brüker DPX 300 MHz. Les composés standards sont de marque Riedel-de Haën, de qualité Pestanal et proviennent de chez Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'eau deutérée (D₂O) et l'acide 3-triméthylsilyl 2,2,3,3-tétradeutéropropionique (TSP-d₄) sont fournis par Eurisotop (St Aubin, France).

Spectroscopie RMN ¹H

Dans un tube RMN de 5 mm de diamètre, on introduit 500 µL d'échantillon (urine, sérum, liquide de lavage gastrique ou solution de standards) et un tube porte-capillaire contenant une solution de TSP-d₄ dosée à 2,1 mmol proton/L. Cette solution sert de référence pour les déplacements chimiques (δ ¹H = 0,00 ppm) et permet la quantification des composés par intégration de leurs pics relativement au TSP-d₄. Une séquence de présaturation est appliquée pour atténuer le signal de l'eau. Selon la concentration des échantillons, 128 à 512 accumulations ont été réalisées sur une largeur spectrale de 3200 Hz. Avant transformation de Fourier, une fonction exponentielle correspondant à un élargissement de 0,3 Hz est appliquée. L'utilisation du logiciel 1D WIN NMR de Brüker a servi au traitement des données.

Prélèvements biologiques

Pour le premier patient, deux échantillons d'urine, deux de sérum et un de liquide de lavage gastrique ont été obtenus. Les premiers prélèvements ainsi que le liquide de lavage gastrique correspondent au jour d'admission. Les prélèvements suivants ont été effectués le lendemain. Le produit supposé ingéré a aussi pu être analysé. Pour le deuxième patient, un échantillon d'urine et un de sérum ont été collectés à l'admission, le jour de l'intoxication. L'ensemble des prélèvements a été congelé à - 20° C jusqu'à l'analyse.

Résultats et discussion

Analyse du désherbant

Dans un premier temps, le désherbant suspecté d'avoir été ingéré a été analysé. Le spectre RMN ¹H correspondant à une dilution dans l'eau est présenté Figure 1. Celui-ci révèle la présence de deux matières actives. L'acide 2-(4-chloro 2-méthylphénoxy) propionique ou mécoprop et l'acide 2,4-dichlorophénoxy acétique ou 2,4-D ont tout d'abord été caractérisés à partir de standards commerciaux. Les caractéristiques spectrales de ces deux composés, avec attribution des signaux sont bien retrouvées (Figure 1) et sont rassemblées dans le Tableau I. On peut remarquer que les deux groupes méthyle du mécoprop donnent des résonances bien caractéristiques en début de spectre. Dans la partie aromatique du spectre, les deux composés donnent des résonances indicatives de noyaux phényle substitués en positions 1, 2 et 4. On observe en effet deux doublets et un doublet dédoublé avec des constantes correspondant à des couplages ortho et méta. En plus des deux composés herbicides, on peut observer un singulet intense à 2,63 ppm sur le spectre du désherbant ; il s'agit de la

diméthylamine, identifiée par son déplacement chimique δ et qui fournit la base dans cette formulation S.E.M. L'intégration des signaux, en tenant compte de la dilution, montre que le dés herbant contient en moyenne 570 mmol/L de mécoprop et 86 mmol/L de 2,4-D, ce dernier représentant donc environ 1/7^{ème} de la quantité de mécoprop. La quantification du mécoprop portant sur le groupe méthyle du groupement propionique, la limite de détection (LOD) a pu être estimée à 0,05 mmol/L et la limite de quantification (LOQ) à 0,2 mmol/L. Pour le 2,4-D, ces limites sont légèrement plus élevées (respectivement 0,15 et 0,60 mmol/L) car

seuls les signaux aromatiques et le méthylène en α du groupe carboxylique sont disponibles pour la détection et la quantification.

La validation de la méthode pour l'analyse des échantillons d'urine a ensuite été effectuée selon le protocole décrit précédemment par Cartigny et coll. (11). Pour le mécoprop, la méthode est linéaire entre 0,2 et 20 mmol/L, alors que pour le 2,4-D, la zone de linéarité se situe entre 0,5 et 5 mmol/L. Les LOD et LOQ sont respectivement de 0,05 et 0,2 mmol/L pour le mécoprop, et de 0,2 et 0,6 mmol/L pour le 2,4-D.

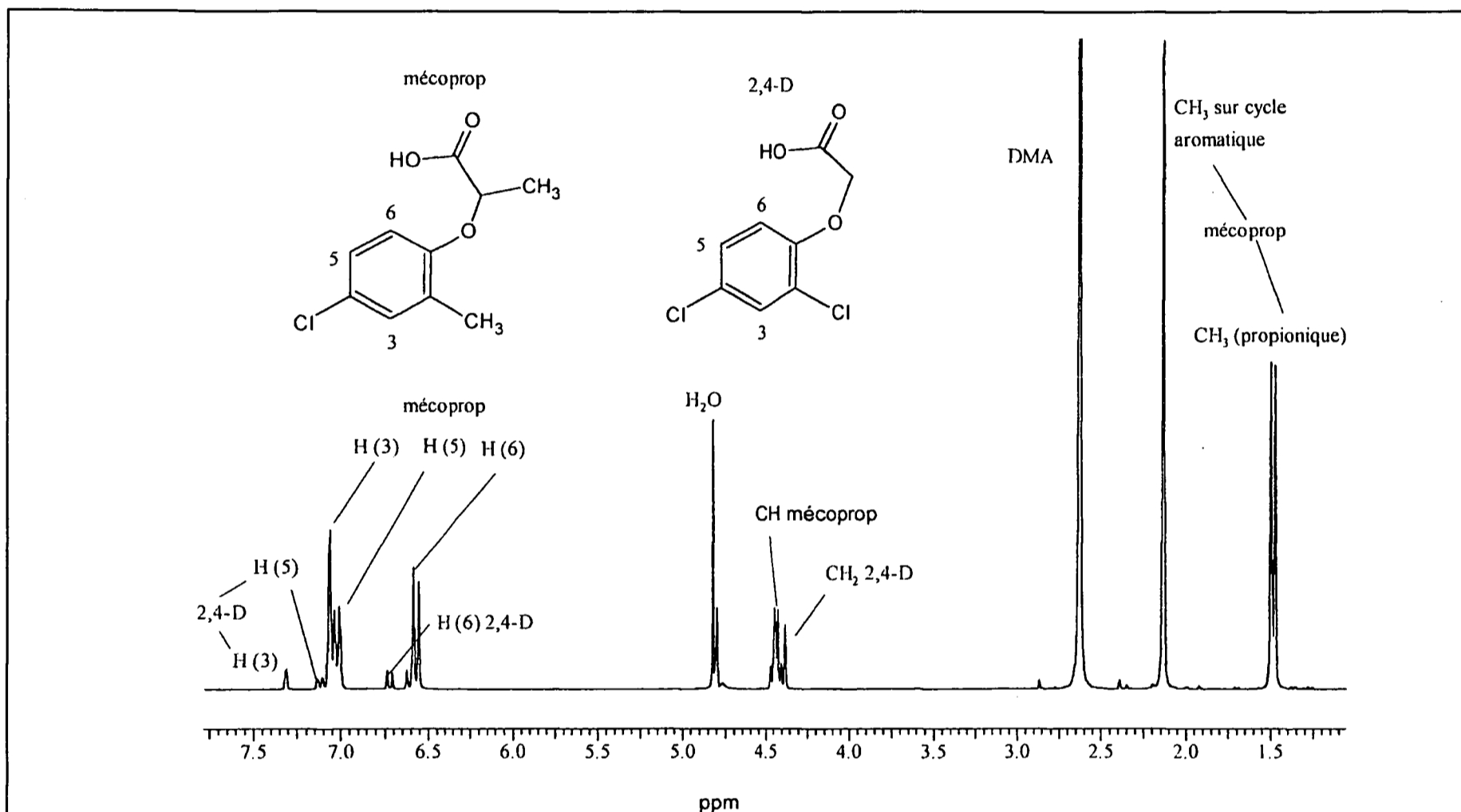


Figure 1 : Spectre RMN ¹H du dés herbant supposé ingéré, dilué dans l'eau. (DMA = diméthylamine).

Tableau I : Caractéristiques spectrales en RMN ¹H du mécoprop et du 2,4 -D dans le dés herbant dilué dans l'eau. (δ = déplacement chimique ; J = constante de couplage).

composé	δ (ppm)	signal	J (Hz)	attribution
mécoprop	1,49	doublet	6,8	CH ₃ propionique
	2,14	singulet	-	CH ₃ sur cycle aromatique
	4,44	quadruplet	6,8	CH
	6,57	doublet	8,6	H (6)
	7,02	doublet de doublet	8,6 et 2,6	H (5)
	7,06	doublet	2,6	H (3)
2,4-D	4,38	singulet	-	CH ₂
	6,72	doublet	8,8	H (6)
	7,12	doublet de doublet	8,8 et 2,4	H (5)
	7,31	doublet	2,4	H (3)

Analyse des échantillons biologiques

Premier patient : Les deux échantillons d'urine ont donné un spectre pratiquement identique d'un point de vue qualitatif et celui du premier échantillon est reproduit Figures 2 et 3. Dans la partie aromatique du spectre (Figure 2), en dehors des composés endogènes normaux (urée et acide hippurique), on note la présence des signaux correspondant aux trois protons aromatiques du mécoprop. Par contre, les signaux aromatiques du 2,4-D, en quantité bien moindre dans le désherbant, ne sont pratiquement pas détectables. Dans la partie aliphatique du spectre (Figure 3), on constate la présence de signaux habituels de l'urine : la créatinine (singulets à 3,02 et 4,05 ppm dûs respectivement au CH₃ et au CH₂), ainsi que la créatine (singulets à 3,01 et 3,91 ppm). On détecte aussi dans ce prélèvement la présence d'éthanol (triplet à 1,16 ppm dû au CH₃). Dans le 2^{ème} prélèvement urinaire (spectre non présenté), un fort signal est attribué à l'acide lactique (doublet à 1,31 ppm). En plus de ces composés, on note Figure 3 les signaux caractéristiques de composants du désherbant. On observe un doublet à 1,53 ppm (dû au méthyle du groupement propionique), un singulet à 2,23 ppm (méthyle en 2 du cycle aromatique) et un singulet à 2,70 ppm (pic de diméthylamine). Les déplacements chimiques de ces signaux sont proches de ceux établis Tableau I à partir de la formulation commerciale. Ils varient en fonction de la force ionique et du pH et diffèrent donc dans les milieux biologiques de ceux trouvés dans le désherbant. Afin de s'assurer qu'il

s'agit bien des composés attendus, il a été procédé à des ajouts de standards.

Le deuxième échantillon d'urine présente un spectre similaire, mais avec des concentrations moindres en xénobiotiques. Les quantifications ont donc pu être réalisées pour le mécoprop sur le signal du doublet du méthyle. Les concentrations ainsi déterminées sont présentées Tableau II, dans lequel on peut remarquer que la cinétique d'élimination de la diméthylamine apparaît différente de celle des deux matières actives. Par ailleurs, les premières urines des deux patients révèlent une très forte concentration en créatine, bien supérieure aux valeurs normales ($N=0,19 \pm 0,03$ mmol/L d'après Yasuda et coll. (12)) et à la créatinine. On peut rapprocher ce fait de la rhabdomyolyse présente dans les deux cas cliniques ; pour le premier patient, la créatine est retrouvée avec des valeurs normales dans la seconde urine. Dans les deux sérums, la présence du doublet à 1,53 ppm indique que le mécoprop est détectable ; de même, la diméthylamine est observée par son singulet à 2,70 ppm, mais ces signaux sont trop faibles pour être quantifiables. Aucun signal aromatique n'est par ailleurs détecté dans les échantillons de sérum. La concentration en lactate s'élevait à 5,6 et 2,9 mmol/L dans chacun des deux sérums. Le liquide gastrique a aussi été analysé et le spectre RMN ¹H est présenté figure 4. Le mécoprop est nettement visible (1,43 mmol/L quantifié sur le doublet du méthyle du groupement propionique) et la diméthylamine a pu être quantifiée à 4,03 mmol/L ; par contre, dans ce milieu, les signaux aromatiques sont aussi difficilement détectables.

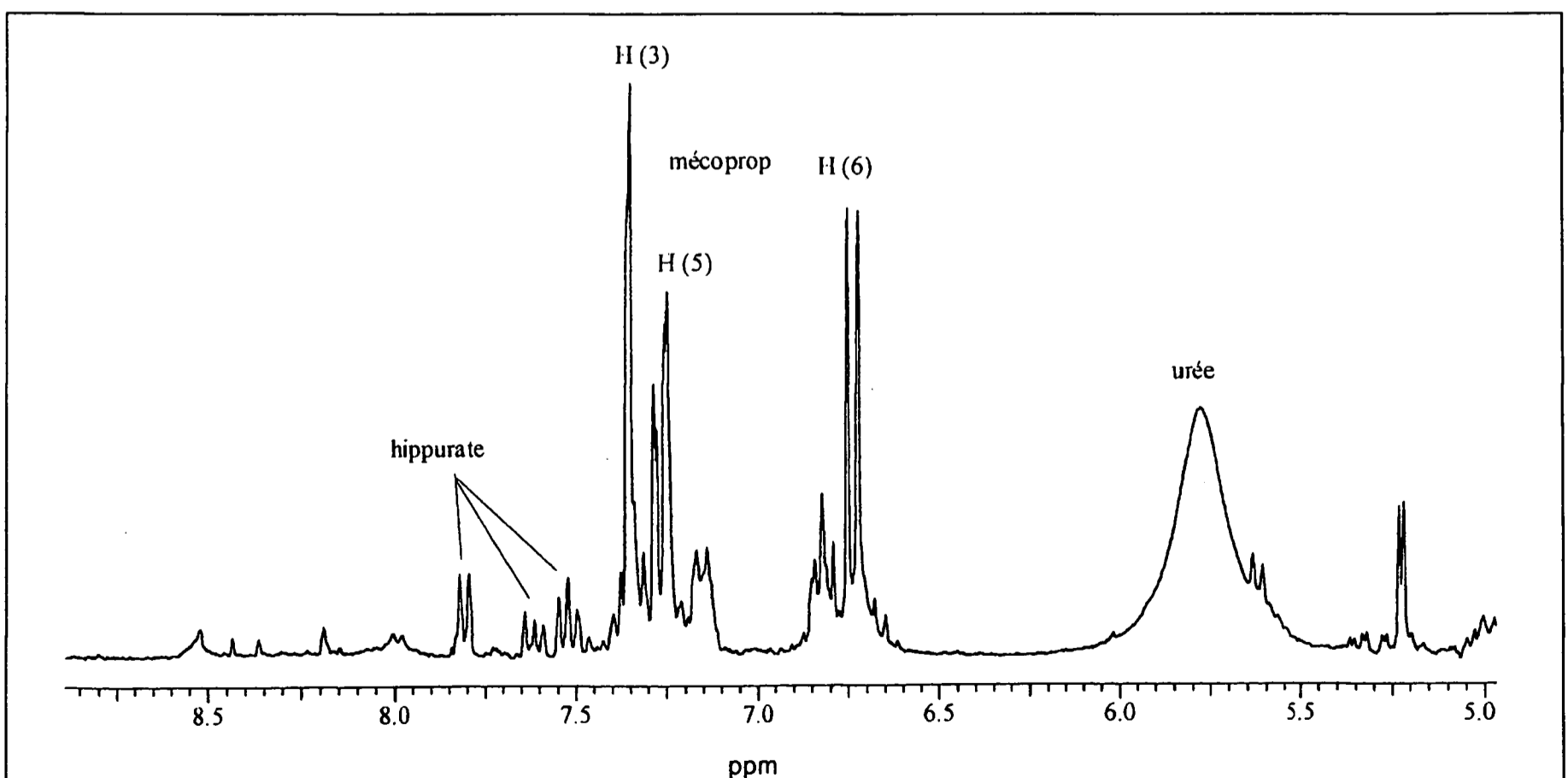


Figure 2 : Spectre RMN ¹H (partie aromatique) de l'urine n° 1 du premier patient.

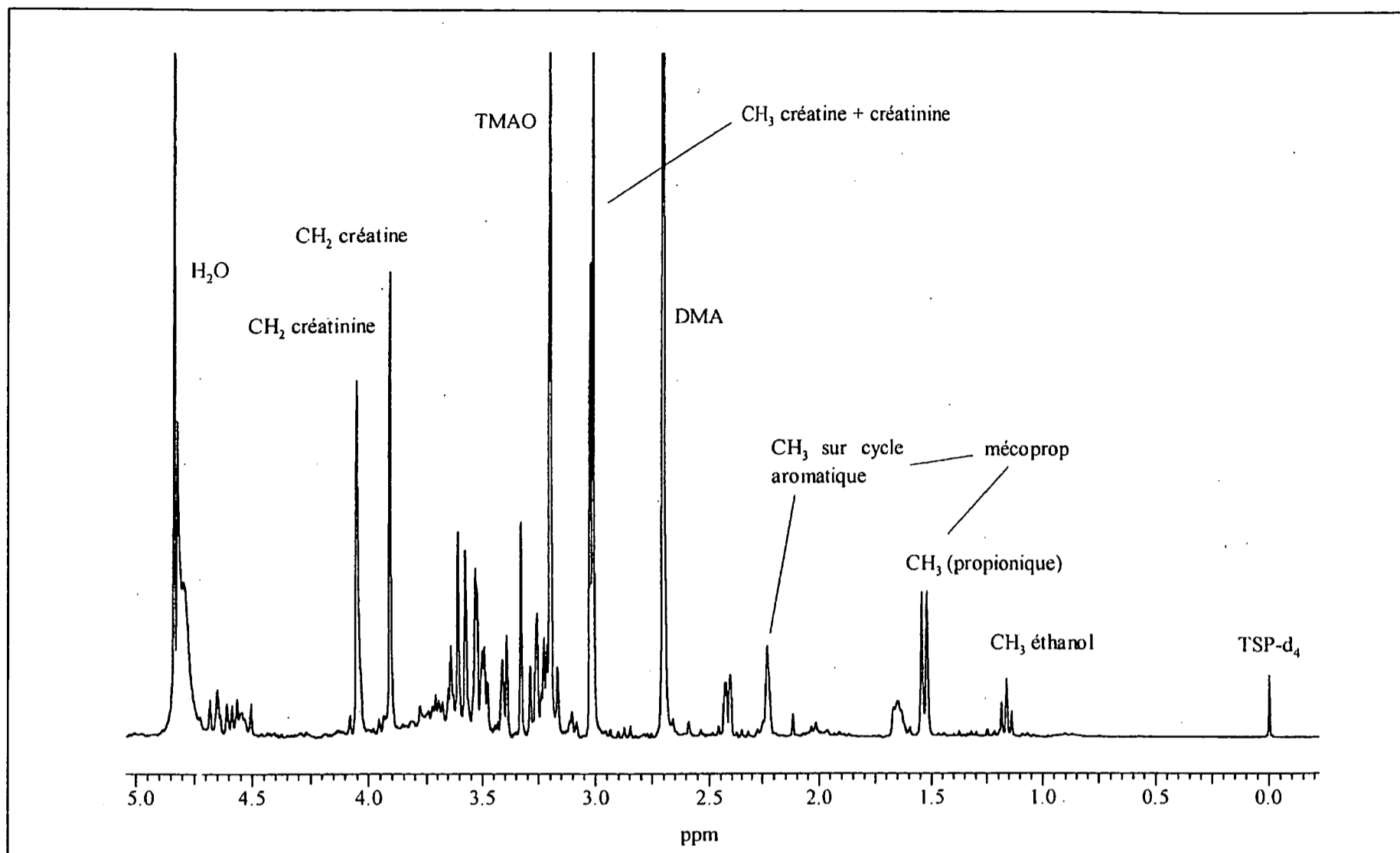


Figure 3 : Spectre RMN ¹H (partie aliphatique) de l'urine n° 1 du premier patient. (TSP-d₄ = acide 3-triméthylsilyl 2,2,3,3-tétra-deutéropropionique).

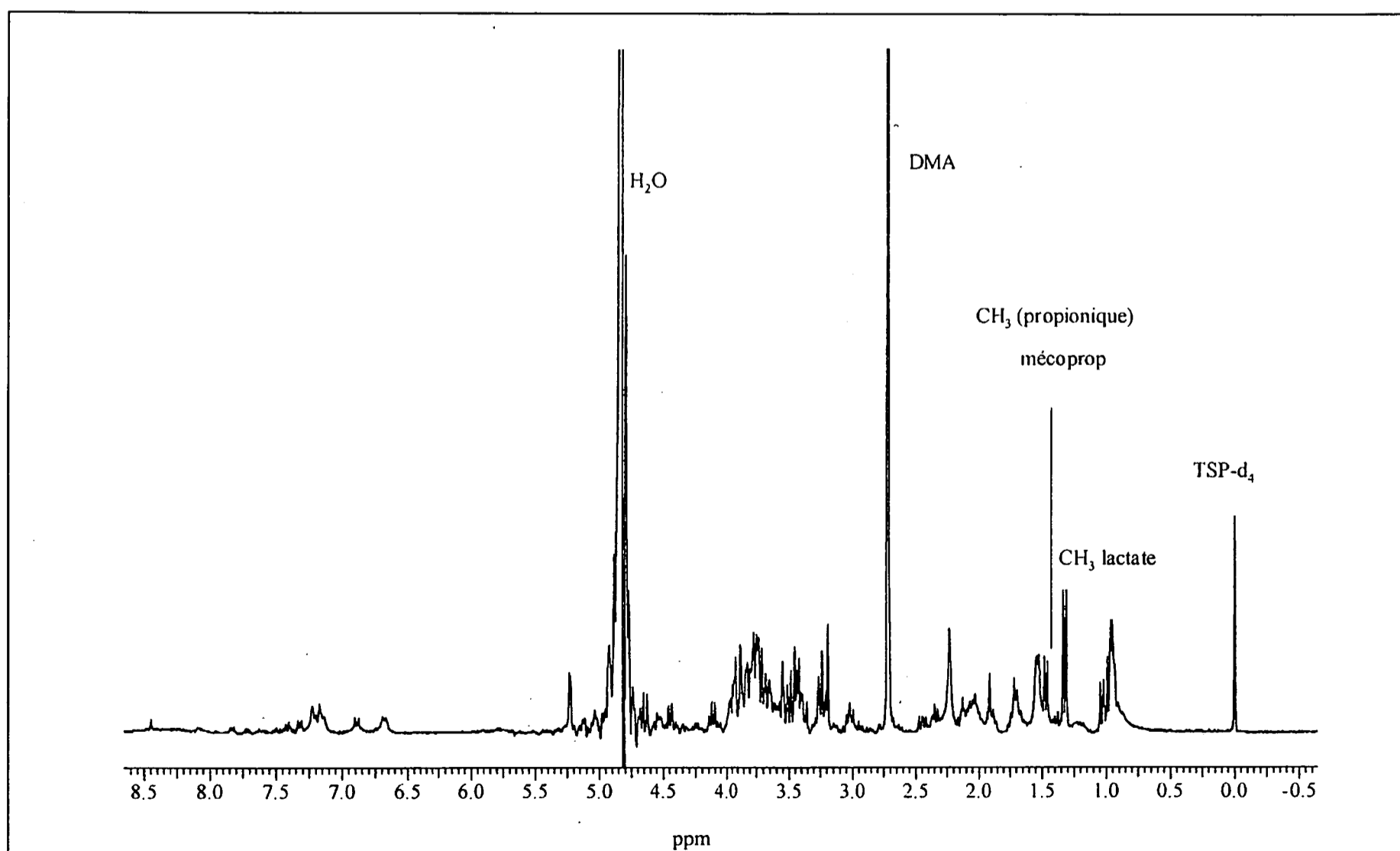


Figure 4 : Spectre RMN ¹H du liquide gastrique du premier patient.

Deuxième patient : Les spectres de l'urine et du sérum révèlent les mêmes anomalies que celles détectées pour le premier patient, en particulier les signaux correspondant aux groupements méthyle du mécoprop et de la diméthylamine sont bien retrouvés. Les signaux aromatiques du mécoprop sont plus faibles. Comme dans le premier cas, la créatine urinaire est fortement augmentée, ainsi que les acides lactique et acétique. Les concentrations des toxiques dans les urines des deux patients sont rassemblées dans le tableau II. Dans l'échantillon de sérum, le mécoprop est bien détecté, mais les signaux caractéristiques sont trop faibles pour être quantifiés. La diméthylamine sérique est quantifiée à 0,73 mmol/L.

La spectroscopie RMN ¹H a donc permis de caractériser les deux herbicides chlorophénoxylés et de les retrouver dans la préparation commerciale et l'urine. Comparativement aux méthodes décrites dans la littérature, les limites de détection déterminées pour le mécoprop et le 2,4-D sont moins bonnes puisque les LOD des méthodes chromatographiques CPG/SM et CLHP/BD regroupées dans l'article de Aprea et coll. (7) sont comprises entre 5 et 80 nmol/L urine. Cependant, la spécificité de notre méthode est assurée par les caractéristiques spectrales des deux composés et l'absence de protocole d'extraction, concourant à sa simplicité. La sélectivité était moins bonne pour le 2,4-D dont le signal attribuable au CH₂ en α du groupement carboxylique était très proche du signal de l'eau.

Conclusion

La RMN ¹H a déjà été utilisée avec succès dans le diagnostic de différents types d'intoxication aiguës (10). Dans ce travail, elle a permis de confirmer l'origine supposée des produits dans deux cas d'intoxication volontaire. Un des avantages de la spectroscopie RMN est qu'elle ne nécessite pas d'a priori sur la structure chimique des composés étudiés. Ainsi, elle a permis la détection simultanée du xénobiotique majeur ainsi que du cation associé dans la formulation (la diméthylamine) ; ceci a été montré aussi bien dans le produit suspecté que dans les liquides biologiques collectés.

L'éthanol a été retrouvé dans un des échantillons et la perturbation d'autres composés tels que les acides lactique et acétique a pu être établie. De la même façon, la rhabdomyolyse est un signe souvent rapporté dans ce type d'intoxication et une forte augmentation de la créatine a en effet pu être détectée et quantifiée sur les mêmes spectres RMN ¹H. En plus, la spectroscopie RMN ¹H du liquide gastrique a permis la confirmation de la nature des toxiques ingérés. D'autres herbicides chlorophénoxylés retrouvés dans les désherbants ont été analysés en RMN, en particulier le 2,4,5-T, le dichlorprop et le MCPA. Leurs signaux, caractéristiques et différents de ceux du 2,4-D et du mécoprop, laissent penser que la spectroscopie RMN ¹H permettrait aussi le diagnostic de ces intoxications et que cette technique n'est pas limitée aux deux herbicides étudiés.

Tableau II : Analyse quantitative dans les urines des deux patients.

	1 ^{er} patient		2 ^{ème} patient
	urine n°1 (mmol/L)	urine n°2 (mmol/L)	urine (mmol/L)
mécoprop	7,2	2,6	2,3
2,4-D	ND*	ND*	ND*
diméthylamine	16,0	35,5	3,2
créatine	15,5	0,1	10,2
créatinine	8,7	4,1	3,5
autres composés détectés	éthanol (2,6)	acide lactique (2,1)	acides acétique (0,7) et lactique (1,0)

*ND : non détecté

Références

1. Bradberry S.M., Watt B.E., Proudfoot A.T., Vale J.A. Mechanisms of toxicity. Clinical features and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning : a review. *Clin. Toxicol.* 2000 ; 38 : 111-22.
2. Wells W.D., Wright N., Yeoman W.B. Clinical features and management of poisoning with 2,4-D and mecoprop. *Clin. Toxicol.* 1981 ; 18 : 273-6.
3. Berthelot-Moritz F., Daudenthun I., Goullé J.P., Droy J.M., Bonmarchand G., Leroy J. Severe intoxication following ingestion of 2,4-D and MCPP. *Intensive Care Med.* 1997 ; 23 : 356-7.
4. Nisse P., Couplet-Coquelle V., Saulnier F., Mathieu-Nolf M. Ingestion volontaire de 2,4-D et MCPP : à propos d'un décès. *Ann. Toxicol. Anal.* 2000 ; 12 : 175-6.
5. Osterloh J., Lotti M., Pond S. Toxicologic studies in a fatal overdose of 2,4-D, MCPP, and chlorpyrifos. *J. Anal. Toxicol.* 1983 ; 7 : 125-9.
6. Beeson M.D., Driskell W.J., Barr D.B. Isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal. Chem.* 1999 ; 71 : 3526-30.
7. Aprea C., Colosio C., Mammone T., Minoia C., Maroni M. Biological monitoring of pesticide exposure : a review of analytical methods. *J. Chromatogr. B* 2002 ; 769 : 191-219.
8. Knopp D. Assessment of exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the chemical industry : results of a five year biological monitoring study. *Occup. Environ. Med.* 1994 ; 51 : 152-9.
9. Lyubimov A.V., Garry V.F., Carlson R.E., Barr D.B., Baker S.E. Simplified urinary immunoassay for 2,4-D : validation and exposure assessment. *J. Lab. Clin. Med.* 2000 ; 136 : 116-24.
10. Imbenotte M., Azaroual N., Cartigny B., Vermeersch G., Lhermitte M. Identification and quantitation of xenobiotics by ¹H NMR spectroscopy in poisoning cases. *Forensic Sci. Int.* 2003 ; 133 : 132-5.
11. Cartigny B., Azaroual N., Imbenotte M., Sadeg N., Testart F., Richecoeur J., Vermeersch G., Lhermitte M. ¹H NMR spectroscopic investigation of serum and urine in a case of acute tetrahydrofuran poisoning. *J. Anal. Toxicol.* 2001 ; 25 : 270-4.
12. Yasuda M., Sugahara K., Zhang J., Ageta T., Nakayama K., Shuin T., Kodama H. Simultaneous determination of creatinine, creatine and guanidinoacetic acid in human serum and urine using liquid chromatography-atmospher pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997 ; 253 : 231-5.