

Revue générale

Intoxication fatale par le carbofurane et le métaldéhyde : analyse par spectroscopie RMN ¹H et par CLHP-SM

Carbofuran and metaldehyde fatal poisoning: ¹H NMR spectroscopy and HPLC-MS analysis

Bernard Cartigny^{1*}, Jean François Wiart², Camille Richeval², Nathalie Azaroual³, Michel Imbenotte¹, Luc Humbert², Gaston Vermeersch³, Michel Lhermitte^{1,2}

¹ Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, BP 83, 59006 Lille Cedex, France

² Laboratoire de Toxicologie et Génopathies, Centre de Biologie Pathologique, CHRU de Lille, 59037 Lille Cedex, France

³ Laboratoire de Physique, UMR CNRS 8009, Laboratoire d'Application RMN de l'Université de Lille 2, BP 83, 59006 Lille Cedex, France

Résumé – Objectifs : Suite à un acte suicidaire, une femme de 54 ans est retrouvée morte à son domicile. Dans un premier temps, seul un échantillon de sang a été prélevé et envoyé au laboratoire. En fait, à proximité du corps avaient été retrouvés une bouteille d'alcool et deux types de granulés, les uns de couleur verte et les autres de couleur bleue. Ces granulés parvinrent ultérieurement au laboratoire afin de déterminer l'origine de l'intoxication. **Méthodes :** L'échantillon de sang et les deux types de granulés ont été analysés par spectroscopie RMN ¹H à 500 MHz. Une recherche d'alcoolémie par CPG – espace de tête – DIF et un screening dans le cadre d'un protocole médico-légal ont été effectués. Pour les analyses en CLHP-SM, l'échantillon de sang a été extrait en milieu basique avec du méthylclonazépam comme standard interne et un suivi des ions spécifiques de chaque composé est effectué. Les granulés verts et bleus sont mis en solution aqueuse avant analyse. **Résultats :** L'analyse du sang de cadavre par spectroscopie RMN ¹H a révélé des composés endogènes : lactate, alanine, acétate, succinate ainsi que de l'éthanol, quantifié à 1,87 g/L alors que la CPG-HS-FID le mesurait à 2,15 g/L. L'étude ultérieure des granulés a révélé les pics caractéristiques du carbofurane dans ceux de couleur verte, ainsi que confirmé par CLHP-SM. Le métaldéhyde, matière active des granulés bleus, a été caractérisé par ses paramètres RMN¹H. Seule l'analyse CLHP-SM du sang a permis la quantification du carbofurane à 1,4 mg/L. Par contre, l'analyse RMN ¹H de ce même échantillon sanguin a révélé un doublet à 2,24 ppm et un quadruplet à 9,67 ppm. Ces signaux ont été attribués à l'acétaldéhyde, quantifié à 5,7 mg/L. **Conclusions :** Ce travail illustre bien la complémentarité entre la spectroscopie RMN ¹H et la CLHP-SM pour l'analyse de produits supposés ingérés et d'un échantillon de sang afin d'y détecter le carbofurane et des composés aldéhydiques. En effet, l'acétaldéhyde mis en évidence par la première technique, peut résulter de l'hydrolyse du métaldéhyde à pH acide. La concentration mesurée va dans le sens d'une ingestion de granulés bleus par la défunte.

Mots clés : Carbofurane, métaldéhyde, acétaldéhyde, intoxication, RMN ¹H, CLHP-SM

Abstract – Aims: A 54 years old woman committed suicide at home. At first, a blood cadaveric sample was drawn and sent to the laboratory. In fact, a bottle of alcohol and two types of granules, green and blue, have been found near her body. Later, granules were sent to the laboratory in order to clarify the origin of poisoning. **Methods:** The blood sample, green and blue granules were analyzed by ¹H NMR spectroscopy at 500 MHz. Blood alcohol was determined using GC-HS-FID and usual screening was performed within forensic limits. For HPLC-MS analyses, the blood sample was extracted in basic buffer with methylclonazepam as internal standard and specific ions were followed to detect each compound. Green and blue granules were dissolved into deuterated water before analysis. **Results:** In the ¹H NMR spectra of cadaveric blood, characteristic resonances were assigned to endogenous compounds, such as lactate, alanine, acetate and succinate. Ethanol was also detected and quantitated at 1.87 g/L, whereas GC-HS-FID gave 2.15 g/L. ¹H NMR analysis of the two types of granules was then performed and carbofuran was detected in the green ones, as confirmed by HPLC-MS results. Metaldehyde, the active ingredient of the blue granules, was characterized by its NMR parameters. Carbofuran was quantitated in the blood sample only by HPLC-MS at 1.4 mg/L. On the other hand, using ¹H NMR spectroscopic analysis of this blood sample, a doublet at 2.24 ppm and a quadruplet at 9.67 ppm were assigned

* Correspondance : Bernard Cartigny, Tél. : 33 3 20 96 49 17, bernard.cartigny@univ-lille2.fr

to acetaldehyde, which could be quantitated to 5.7 mg/L. **Conclusions:** The present work illustrates the complementarity between ^1H NMR spectroscopy and HPLC-MS for the analysis of both suspected solid forms and blood sample, in order to detect carbofuran and aldehydic compounds. Indeed, acetaldehyde, only detected by ^1H NMR analysis of the blood sample, could be formed by hydrolysis of metaldehyde at acidic pH. Discussion about its concentration is in agreement with the supposed ingestion of blue granules.

Key words: Carbofuran, metaldehyde, acetaldehyde, poisoning, ^1H NMR, HPLC-MS

Reçu le 16 octobre 2008, accepté après modifications le 1er juillet 2009

Publication en ligne le 14 août 2009

1 Introduction

Les intoxications par anti-nuisibles et pesticides sont fréquentes et la diversité des matières actives et de leurs concentrations conduit à des effets néfastes allant de quelques signes mineurs à des issues fatales [1]. Le problème d'identification et de quantification des composés chimiques incriminés se complique lorsque la personne intoxiquée a eu la possibilité d'ingérer plusieurs sortes de produits.

Parmi ces produits, le métaldéhyde qui est un polymère cyclique d'acétaldéhyde, est généralement employé comme molluscicide. Il est commercialisé sous forme de granulés qui ne peuvent en contenir au maximum que 6 % et sous des appellations diverses (Métarex[®], Hélimax[®], Limoxyl[®]...). Sous cette forme, le métaldéhyde est souvent la cause d'ingestions accidentelles chez les enfants, mais il peut aussi être utilisé lors de tentatives d'autolyse chez les adultes [2, 3]. Il y a peu de travaux sur la détermination du métaldéhyde [4, 5] et l'un des buts de ce travail est de montrer l'apport de la spectroscopie RMN ^1H pour sa caractérisation. En effet, cette technique a déjà montré son applicabilité et sa complémentarité aux techniques conventionnelles pour différents types de xénobiotiques [6].

Les carbamates peuvent aussi entraîner des intoxications graves et parmi cette famille, le carbofurane est utilisé en agriculture pour lutter contre les nématodes et une grande variété d'insectes défoliateurs et fousseurs qui s'attaquent aux cultures de fruits et de légumes. Il est commercialisé sous de nombreuses appellations (Furadan[®], Crisfuran[®], Curaterr[®], Yaltox[®]...) et sa dangerosité est liée à ses propriétés d'inhibition des cholinestérases. Quelques techniques analytiques sont décrites dans la littérature [7]. La plupart des intoxications publiées sont professionnelles. Cependant, Ameno et coll. rapportent plusieurs cas mortels après ingestion volontaire de carbofurane [8].

L'objectif de ce travail est de montrer l'apport de la spectroscopie RMN ^1H à la mise en évidence de composés chimiques dans des formes solides supposées ingérées par le défunt et d'établir des corrélations avec les xénobiotiques détectés dans un échantillon biologique recueilli lors d'un cas mortel d'intoxication où le métaldéhyde et le carbofurane peuvent être considérés.

2 Matériel et méthodes

2.1 Cas clinique et prélèvements

Suite à un acte suicidaire étayé par une lettre manuscrite laissée sur place, une femme âgée de 54 ans est retrouvée

morte chez elle. Aucune autopsie n'est pratiquée et, dans le cadre de la levée de corps, seul un échantillon de sang est prélevé et envoyé au laboratoire. Il a été congelé à -20°C jusqu'à analyse.

Aucune notion de temps écoulé entre l'ingestion, le décès et le prélèvement n'a pu être obtenue.

À proximité du corps, on avait retrouvé une bouteille d'alcool ainsi que deux types de granulés, verts et bleus. Ces granulés ont été envoyés ultérieurement au laboratoire pour analyse. Ceux de couleur bleue étaient dans leur boîte d'origine correspondant d'après l'étiquette à un produit anti-limaces. Les granulés verts étaient dans un flacon sans étiquette. Les deux types de granulés ont été conservés à température ambiante jusqu'à analyse.

2.2 Instrumentation et réactifs

Les standards de métaldéhyde et de carbofurane sont communs pour la CLHP-SM et la spectrométrie RMN ^1H . Le premier provient de chez Fluka et le second de chez Riedel de Haën.

Les analyses RMN ^1H ont été réalisées sur un spectromètre Bruker AVANCE 500 MHz à température ambiante; l'utilisation du logiciel WINNMR de Bruker a servi au traitement des données. L'eau deutérée (D_2O) et l'acide 3-triméthylsilyl 2,2,3,3-tétradeutéropropionique (TSP- d_4) sont fournis par Eurisotop (St Aubin, France).

Les analyses par CLHP-SM ont été réalisées sur un chromatographe liquide ultra performance UPLC-TQDTM de chez Waters. La colonne utilisée est une Acquity HSS C_{18} 1,8 μm ($2,1 \times 150$ mm). Le méthylclonazépam provient de chez Roche (Bâle, Suisse). Le standard 3-hydroxycarbofurane n'est pas disponible commercialement et a été identifié en CLHP-SM par sa fragmentation caractéristique.

2.3 Spectroscopie RMN ^1H

Les spectres des composés standard ont été obtenus par dissolution du composé correspondant dans D_2O . Un mL de sang de cadavre a été préalablement déprotéiné par de l'acide sulfosalicylique directement introduit dans le tube de sang. Après agitation et centrifugation, l'analyse RMN est directement effectuée sur le surnageant. On introduit 500 μL d'échantillon (solutions de standards et sang déprotéiné) dans un tube RMN de 5 mm de diamètre. Puis un tube capillaire contenant une solution de TSP- d_4 dosée à 2,24 mmol proton/L est introduit dans le tube RMN. La solution de TSP- d_4 est une référence pour les déplacements chimiques ($\delta^1\text{H} = 0,00$ ppm) et

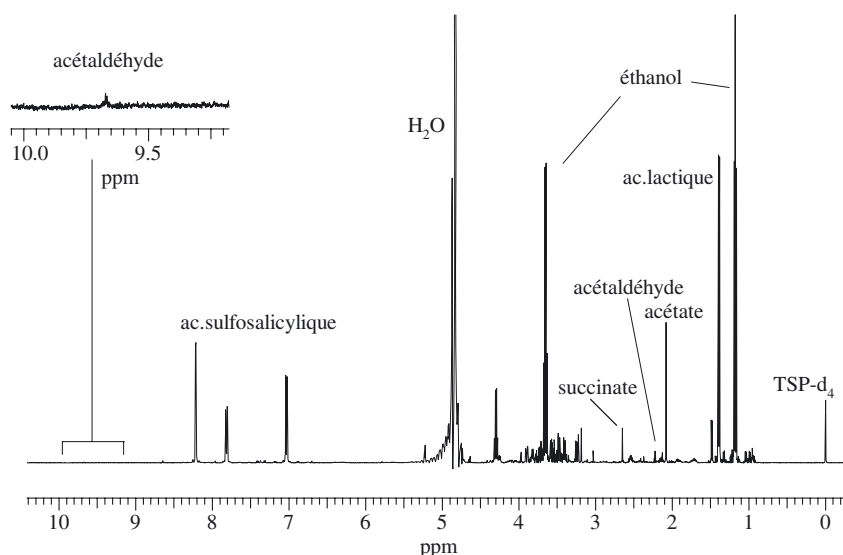


Fig. 1. Spectre RMN ¹H 500 MHz du sang déprotéinisé : en plus de composants endogènes, l'acétaldéhyde est identifié par ses deux signaux : un doublet à 2,24 et un quadruplet à 9,67 ppm par rapport à la référence TSP-d₄.

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 8000 Hz. Avant transformation de Fourier, une fonction exponentielle correspondant à un élargissement de 0,3 Hz est appliquée.

2.4 Chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse

Après ajout de méthyl clonazépam, 200 µL d'échantillon sont extraits en tampon borate saturé pH 9,0 par 5 mL d'un mélange dichlorométhane/éther/hexane/alcool isoamylique (30/50/20/0,5). Après agitation et centrifugation, la phase organique récupérée est séchée. La séparation chromatographique est réalisée par un gradient de tampon formate d'ammonium pH 3-acétonitrile. L'ionisation est réalisée en mode électrospray positif et négatif. Les conditions optimales déterminées pour l'analyse des molécules sont : tension du capillaire : 3 kV, température de la source : 150 °C, débit de cône gaz : 50 L/h, température et débit de gaz de désolvatation : 350 °C, 650 L/h. Le balayage se fait de 80 à 650 *m/z* avec un suivi des ions spécifiques de chaque composé : *m/z* 222 pour le carbofurane et *m/z* 238 pour son métabolite hydroxylé. Une gamme d'étalonnage en carbofurane a été réalisée jusque 400 ng/mL avec une limite de détection à 10 ng/mL.

3 Résultats et discussion

3.1 Analyse du sang

L'analyse par spectroscopie RMN ¹H du sang de cadavre déprotéinisé révèle la présence de composés endogènes (figure 1) caractérisés par leur déplacement chimique et une

constante de couplage : le lactate ($\delta = 1,30$ ppm, constante de couplage $J = 7,1$ Hz), l'alanine ($\delta = 1,48$ ppm, $J = 7,3$ Hz), le succinate ($\delta = 2,65$ ppm). La spécificité d'attribution des signaux RMN est en effet assurée par la cohérence des valeurs spectrales fournies par les déplacements chimiques caractéristiques, les constantes de couplage et les valeurs relatives d'intégration des signaux. En effet, ces différents signaux observés correspondent aux différents éléments structuraux caractéristiques de chaque composé chimique.

D'un point de vue quantitatif, l'intégration des signaux de composants endogènes relativement à la référence TSP-d₄ de concentration connue a permis d'établir les valeurs de concentrations suivantes : lactate 2,1 g/L, alanine 297 mg/L, succinate 111 mg/L.

En plus des signaux attribuables aux composants endogènes, apparaissent un triplet à 1,18 ppm ($J = 7,1$ Hz) et un quadruplet à 3,65 ppm ($J = 7,1$ Hz) tous deux caractéristiques respectivement des groupements méthyle et méthylène de l'éthanol. L'intégration de ces signaux relativement au TSP-d₄ a permis la quantification à 1,87 g éthanol/L. Cette valeur est relativement voisine de celle déterminée dans le cadre d'un protocole médico-légal par CPG-HS-FID, soit 2,15 g/L.

L'acétate est également détecté dans le spectre par le singulet à 2,08 ppm dû au groupement méthyle. Il est quantifié à 4,46 mmol/L soit 268 mg/L.

Le spectre présenté figure 1 comporte aussi les trois signaux attribuables à l'acide sulfosalicylique, réactif de déprotéinisation, à 7,03–7,8 et 8,2 ppm correspondant aux protons aromatiques de ce réactif.

D'autres signaux sont mis en évidence : un doublet à 2,24 ppm et un quadruplet à 9,67 ppm et de même constante de couplage 2,1 Hz. Ce sont les résonances proportionnelles et respectives du groupement méthyle et du proton aldéhydique de l'acétaldéhyde. La spectroscopie RMN permet en effet de proposer directement à partir d'un spectre des structures chimiques basées sur les groupements fonctionnels observés, la confirmation pouvant être apportée par l'étude de

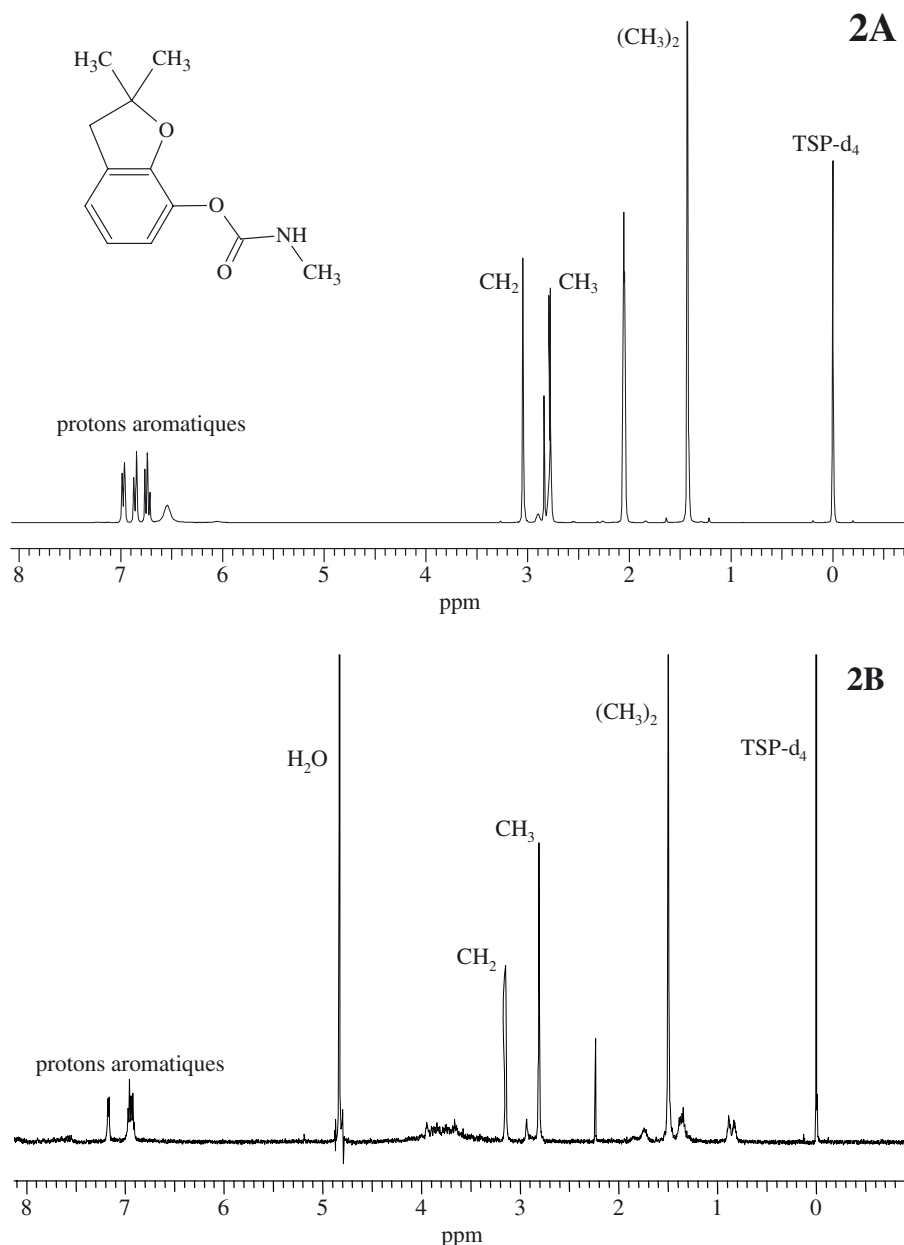


Fig. 2. Spectre RMN ¹H 500 MHz A : d'un standard de carbofurane. B : des granulés verts dissous dans D₂O.

standards. Dans un but de quantification, l'analyse de solutions aqueuses titrées en acétaldéhyde entre 0,05 et 15 mmol/L (2,2 à 660 mg/L) a conduit à une réponse linéaire ($r^2 = 0,998$) pour le signal du groupement méthyle. Dans l'échantillon de sang, la concentration en acétaldéhyde a été mesurée à 0,130 mmol/L (5,7 mg/L). Cette valeur est très élevée puisque chez le sujet normal, elle est inférieure à 1 μ mol/L sang et même inférieure à 50 μ mol/L chez des sujets n'oxydant pas l'acétaldéhyde [9]. Remarquons que la valeur déterminée dans le cas étudié n'atteint pas celle publiée par Heath et coll. en 1992 [10] soit 0,931 mmol/L, mais chez une personne ayant ingéré du disulfiram, inhibiteur de l'oxydation de l'acétaldéhyde.

La question se posait donc d'une origine de l'acétaldéhyde en plus du métabolisme de l'éthanol. Afin d'apporter des élé-

ments de réponse, et la recherche classique par screening dans le cadre d'un protocole médico-légal ayant été négative à part l'éthanol, les granulés trouvés à proximité du cadavre ont été analysés.

3.2 Analyse des granulés

Les deux types de granulés ont été dissous dans D₂O pour l'analyse RMN ¹H. Le spectre de la solution obtenue à partir des granulés verts (figure 2B) révèle la présence de signaux majoritaires : trois singulets résonnant à 1,50, 2,81 et 3,15 ppm, et d'autres signaux entre 6,90 et 7,20 ppm, ces derniers indiquant une structure aromatique. La comparaison au

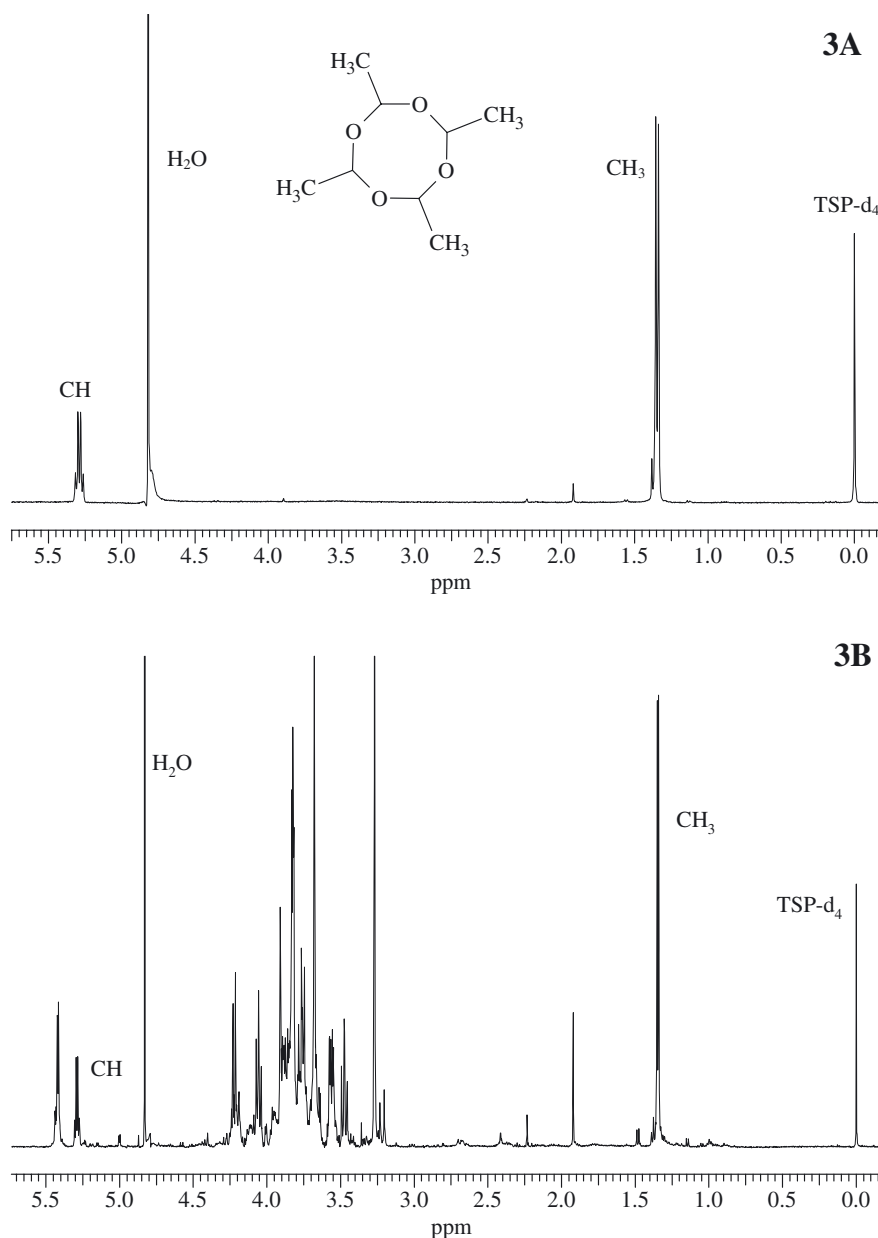


Fig. 3. Spectre RMN ¹H 500 MHz A : d'un standard de métaldéhyde. B : des granulés bleus dissous dans D₂O.

niveau de l'ensemble des résonances a pu être établie avec un standard de carbofurane (figure 2A). Les singulets à 1,50, 2,81 et 3,15 ppm correspondent en effet, respectivement aux groupements diméthyle, méthyle et méthylène de ce composé, les autres signaux étant dûs aux trois protons du cycle aromatique.

Afin de conforter ce résultat, une analyse par CLHP-SM a été menée sur ces mêmes granulés verts mis en solution. La présence de carbofurane, élué à 7,8 min et caractérisé par l'ion pseudomoléculaire *m/z* 222 a été confirmée.

Pour les granulés bleus mis en solution dans D₂O, le spectre RMN ¹H révèle, parmi de nombreuses résonances, la présence de deux signaux (figure 3B) : un doublet résonnant à 1,35 ppm (*J* = 5,3 Hz) et un quadruplet à 5,29 ppm (*J* = 5,3 Hz). Il s'agit de groupements fonctionnels couplés et

en proportions d'intensités respectives 3/1. Ces deux signaux sont identiques à ceux obtenus avec un standard de métaldéhyde en solution dans D₂O (figure 3A) : le doublet correspond au groupement méthyle et le quadruplet est attribuable au groupement méthyne.

L'analyse de ces granulés bleus en CLHP-SM n'a conduit à aucun signal caractéristique du métaldéhyde.

3.3 Comparaison des résultats relatifs au sang et aux granulés

En complément des résultats précédemment établis sur l'échantillon de sang par spectroscopie RMN ¹H, la

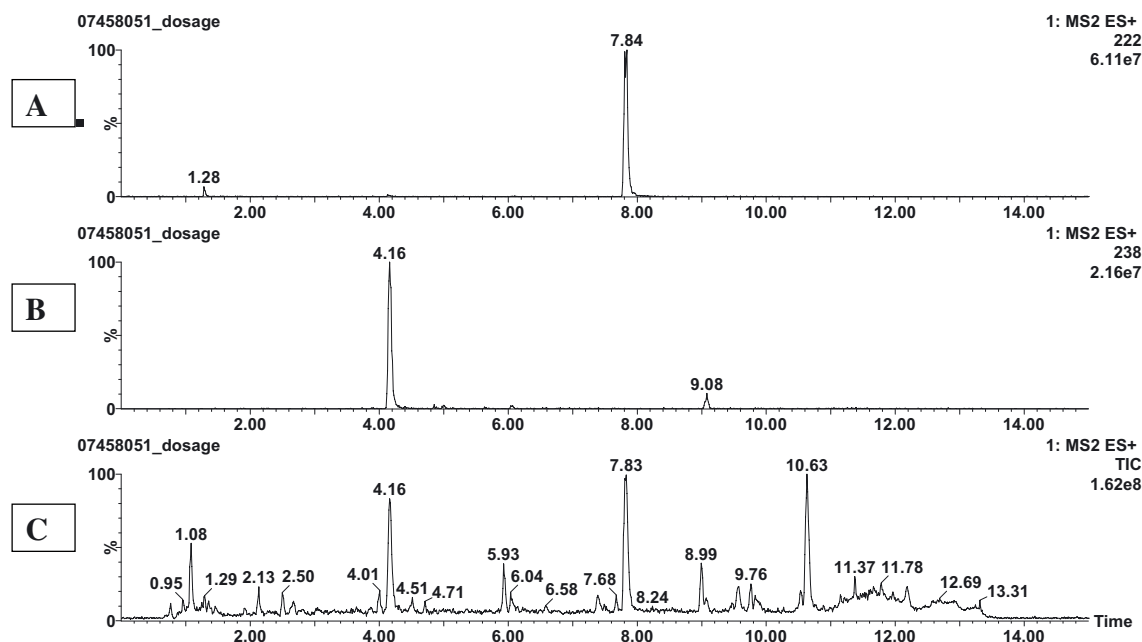


Fig. 4. Analyse du sang déprotéinisé par CLHP-SM. A : monitoring sur l'ion 222 correspondant au carbofurane. B : monitoring sur l'ion 238 attribué au métabolite hydroxylé. C : courant ionique total détecté.

comparaison a d'abord porté sur la matière active des granulés verts : le carbofurane.

Pour la quantification de ce composé par RMN ¹H, une gamme d'étalonnage a été réalisée dans l'eau. La linéarité de réponse basée sur le signal à 1,50 ppm a été observée jusque 0,43 mmol/L (95 mg/L), valeur correspondant au maximum de solubilité déterminé en milieu aqueux à température ambiante. La limite de quantification a été déterminée à 90 µmol/L (20 mg/L) et la limite de détection à 25 µmol/L (6 mg/L).

Dans le spectre RMN ¹H (figure 1), aucun signal correspondant au carbofurane n'a pu être détecté. Par contre, l'analyse de l'échantillon de sang par CLHP-SM (figure 4) a révélé qu'il contenait du carbofurane à une concentration de 1,4 mg/L, ainsi que des traces de son métabolite principal, le 3-hydroxycarbofurane. Ce dernier, élué à 4,2 min et caractérisé par l'ion *m/z* 238, n'a pu être quantifié. La concentration sanguine en carbofurane ainsi déterminée est comparable à celle des cas mortels rapportés par Ameno et coll. [8] et variant de 0,32 à 11,6 mg/L. Une valeur bien supérieure avait été trouvée à 29,3 mg/L suite à l'ingestion de 155 g de matière active [11].

La comparaison a ensuite porté sur le composant actif des granulés bleus : le méaldéhyde. Une linéarité de réponse, basée sur le signal méthyl du méaldéhyde a été observée de 0,1 à 7,5 mmol/L. La limite de détection a été déterminée à 0,05 mmol/L (9 mg/L) et celle de quantification à 0,1 mmol/L (18 mg/L). Le spectre RMN ¹H du sang (figure 1) ne contient aucune des résonances attribuables à ce composé. Par contre, le méaldéhyde qui est un polymère cyclique d'acétaldéhyde peut s'hydrolyser en monomère. Comme les granulés bleus trouvés près du corps contenaient du méaldéhyde, la concentration sanguine relativement importante en monomère (5,7 mg/L) est un argument en faveur de l'ingestion de ce type de granulés.

Un argument supplémentaire provient du fait que l'échantillon de sang contenait aussi de l'acétate à 268 mg/L. Ceci indique que l'éthanol était bien transformé en acétate ; le métabolisme de l'éthanol apparaît ainsi avoir été fonctionnel. En revanche, l'analyse de l'échantillon de sang par CLHP-SM n'a pas permis de mettre en évidence de l'acétaldéhyde.

4 Conclusion

Ce cas d'intoxication fatale a permis de mettre en évidence dans le seul milieu biologique disponible et dans des formes supposées ingérées différents composés chimiques.

Pour la quantification du carbofurane dans le sang, la CLHP-SM est une méthode de choix et un outil efficace comparativement à la spectroscopie RMN ¹H qui ne peut détecter des concentrations inférieures à 6 mg/L. Par contre, cette dernière permet à partir du même spectre, par l'attribution des signaux caractéristiques de chaque groupement fonctionnel, l'identification non seulement de composants endogènes du milieu biologique considéré, mais également de xénobiotiques sans aucun *a priori* sur la nature chimique ou la famille de xénobiotiques présents. Dans l'intoxication présentée, ceci est possible même lorsque les groupements fonctionnels sont très différents, comme c'est le cas avec l'acétaldéhyde dont la mise en évidence n'a pas été possible par technique chromatographique et dont la présence était inattendue.

De plus, la spectroscopie RMN ¹H permet un accès direct, après validation de la linéarité de réponse, à la quantification. En particulier avec l'acétaldéhyde, elle a permis d'argumenter sur l'absorption d'un type de granulés. Plus généralement, en considérant les différences de capacité de détection, les données présentées illustrent bien la complémentarité des deux techniques face à ce type de problème en toxicologie médico-légale.

Références

1. Harry P. Pesticide poisoning. *Rev Prat.* 2000; 50: 372–376.
2. Bleakley C, Ferrie E, Collum N, Burke L. Self-poisoning with metaldehyde. *Emerg Med J.* 2008; 25: 381–382.
3. Shih CC, Chang SS, Chan YL, Chen JC, Chang MW, Tung MS, Deng JF, Yang CC. Acute metaldehyde poisoning in Taiwan. *Vet Hum Toxicol.* 2004; 46: 140–143.
4. Saito T, Morita S, Motoiyuku M, Akieda K, Otsuka H, Yamamoto I, Inokuchi S. Determination of metaldehyde in human serum by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 875: 573–576.
5. Jones A, Charlton A. Determination of metaldehyde in suspected cases of animal poisoning using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 4675–4677.
6. Imbenotte M, Azaroual N, Cartigny B, Vermeersch G, Lhermitte M. Detection and quantitation of xenobiotics in biological fluids by ^1H NMR spectroscopy. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2003; 41: 981–988.
7. Li H, Ricordel I, Tong L, Schopfer LM, Baud F, Mégarbane B, Maury E, Masson P, Lockridge O. Carbofuran poisoning detected by mass spectrometry of butyrylcholinesterase adduct in human serum. *J Appl Toxicol.* 2009; 29: 149–155.
8. Ameno K, Lee SK, In SW, Yang JY, Yoo YC, Ameno S, Kubota T, Kinoshita H, Ijiri I. Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases. *Forensic Sci Int.* 2001; 116: 59–61.
9. Lindros KO. Human blood acetaldehyde levels : with improved methods, a clearer picture emerges. *Alcohol Clin Exp Res.* 1983; 7: 70–75.
10. Heath MJ, Pachar JV, Perez Martinez AL, Toseland PA. An exceptional case of lethal disulfiram-alcohol reaction. *Forensic Sci Int.* 1992; 56: 45–50.
11. Ferslew KE, Hagardorn AN, McCormick WF. Poisoning from oral ingestion of carbofuran (Furadan 4F), a cholinesterase-inhibiting carbamate insecticide, and its effects on cholinesterase activity in various biological fluids. *J Forensic Sci.* 1992; 37: 337–344.