

Recherche et dosage de sulfamides hypoglycémisants dans le plasma humain par CLHP-SM/SM à trappe d'ions : validation et application au dépistage des hypoglycémies factices

Identification and quantification of sulfonylureas in human plasma by LC-ESI-MS/MS : validation of the method and application to the diagnosis of factitious hypoglycemia

Guillaume HOIZEY^{(1,2)*}, Thierry TRENQUE⁽³⁾, Laurent BINET⁽¹⁾, Denis LAMIABLE^(1,2)

(1) Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Hôpital Maison-Blanche, CHU de Reims, France

(2) Fédération Médico-Judiciaire du CHU de Reims, France

(3) Centre Régional de Pharmacovigilance, CHU de Reims, France

*Auteur à qui adresser la correspondance : Guillaume HOIZEY, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie
CHU de Reims, 45, rue Cognacq-Jay F-51092 Reims cedex, France
Tél. : (33) 3 26 78 75 30 - Fax : (33) 3 26 78 84 56 - E-mail : ghoizey@chu-reims.fr

Ce travail a été présenté au XIII^{ème} congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, 8-10 juin 2005, Pau-France

(Reçu le 23 mai 2006 ; accepté après modifications le 17 juillet 2006)

RÉSUMÉ

Devant un tableau clinique d'hypoglycémie inexplicée, il est essentiel de rechercher la possibilité d'une intoxication par les sulfamides hypoglycémisants. A ce jour, le diagnostic définitif ne peut souvent se faire que par l'identification de ces molécules dans le sang. Nous proposons une méthode

SUMMARY

Identification of sulfonylureas in blood may be essential in the evaluation of hypoglycaemic crisis of unknown origin. The aim of the present study was to develop a highly selective liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (LC-ESI-MS/MS) method using an ion trap detec-

par CLHP-SM/SM à trappe d'ions permettant d'identifier et de quantifier 6 sulfamides hypoglycémiant (glibenclamide, glibornuride, glicazide, glimepiride, glipizide, carbutamide) dans le plasma humain. Après extraction en phase liquide de l'échantillon (500 µL) par l'éther en milieu acide, en utilisant le glisoxepide comme étalon interne, la séparation chromatographique s'effectue en 8 min, sur colonne Hypurity® (C18, 5µm, 150x2,1mm .i.d.) à l'aide du mélange acétonitrile/acide formique 0,1%, 50/50 v/v délivré en mode isocratique. La détection est assurée par un détecteur SM/SM à trappe d'ions en mode d'ionisation électrospray positif. L'identification de la ou des molécule(s) incriminée(s) est réalisée par comparaison des spectres obtenus en mode « scan complet SM/SM » avec les spectres de références enregistrés dans une bibliothèque spectrale réalisée au laboratoire. La détermination des concentrations plasmatiques est effectuée au moyen de gammes étalons préparées dans les mêmes conditions. La méthode a été validée pour des domaines de linéarité, variables selon la molécule ($r^2 > 0,99$). Le défaut de justesse et la fidélité déterminés pour chaque molécule et à différentes concentrations sont inférieurs à 15%, excepté aux limites de quantification de certains composés au niveau desquelles ces valeurs peuvent atteindre 18%. Les coefficients d'extraction obtenus dans le plasma sont compris entre 63% et 87%, sauf pour le carbutamide (< 45%). L'effet de suppression d'ions ne survient pas aux temps de rétention des composés d'intérêt. Cette méthode, rapide et spécifique, est bien adaptée à l'identification et la quantification dans le plasma de sulfamides hypoglycémiant, dans un contexte d'hypoglycémie « factices ».

MOTS-CLÉS

Sulfamides hypoglycémiant, CLHP-SM/SM à trappe d'ions, hypoglycémie « factice ».

Introduction

Les sulfamides représentent un large groupe de composés pharmacologiques utilisés pour différentes applications thérapeutiques. Certains d'entre eux, nommés sulfamides hypoglycémiant, sont employés depuis plus de 50 ans comme agents antidiabétiques, indiqués notamment dans la prise en charge du diabète sucré non insulino-dépendant (de type 2). Le mésusage de ces molécules peut conduire à une hypoglycémie parfois sévère, dont l'origine peut être, dans certaines situations, liée à une prise clandestine et volontaire de ces substances. Le clinicien se trouve alors face à un patient souffrant d'hypoglycémies récidivantes inexplicables pouvant mimer un hyperinsulinisme endogène. Ce phénomène, souvent qualifié d'hypoglycémie « factice », est décrit comme étant une des manifestations du syndrome de « Münchhausen » (1). Dans ce contexte, il est essentiel de pouvoir distinguer une hypoglycémie faisant suite à l'absorption volontaire (ou involontaire en cas d'administration par un tiers) de ces agents hypoglycémiant, avec d'autres étiologies, tel que la

présence d'un insulinome. Le dépistage de la prise non contrôlée de sulfamides hypoglycémiant est donc nécessaire, et doit évidemment être envisagé avant toute chirurgie exploratrice voire de pancréatectomie totale ou partielle, comme cela a déjà été décrit (2, 3). Plusieurs méthodes ont été proposées pour la recherche et la quantification des sulfamides hypoglycémiant dans les liquides biologiques. La plupart d'entre-elles fait appel à la chromatographie liquide haute performance (CLHP) associée à un détecteur UV (4), à un détecteur à barrette de diodes (5), ou de fluorescence après dérivation de l'extrait plasmatique (6). Une méthode fondée sur l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à la détection UV a également été proposée pour une recherche dans les urines (7). Ces méthodes souffrent de certaines limites liées principalement au manque de spécificité, particulièrement lorsqu'une seule longueur d'onde dans l'UV est utilisée pour la détection. Paroni et coll. (8) ont publié une méthode en EC, mais indiquent clairement que cette technique ne peut, du fait d'un manque de spécificité, être envisagée seule pour le diagnostic formel de la prise volontaire de

KEY-WORD

Sulfonylureas, LC-MS/MS ion-trap, factitious hypoglycemia.

sulfamides hypoglycémiant. Plus récemment, des méthodes basées sur la CLHP couplée à la spectrométrie de masse (SM) utilisant un simple quadripôle ont été rapportées (9, 10). Ces techniques pourraient manquer de spécificité puisque l'identification des molécules d'intérêt n'est fondée que sur la détection d'un seul fragment de masse. *A contrario*, Maurer et coll. (11) ont développé et validé une procédure CLHP-SM simple quadripôle utilisée en mode d'ions sélectionnés (SIM), pour le dépistage (« screening »), l'identification *via* une librairie spectrale, et la quantification de sulfamides hypoglycémiant dans le plasma humain. Dans cette méthode, une plus grande spécificité était obtenue par l'utilisation de spectres de masse enregistrés à deux voltages de fragmenteur. A notre connaissance, aucune méthode faisant appel à la spectrométrie de masse en tandem n'a été décrite à ce jour dans cette application.

Une des particularités du détecteur de masse à trappe ionique est de pouvoir mesurer la totalité des ions « piégés » dans la trappe, et autorise, par voie de conséquence, l'acquisition de spectres SM/SM complets, sans perte de sensibilité (12). Nous décrivons une méthode de « screening » ciblé, permettant l'identification et la quantification des 6 sulfamides hypoglycémiant présents sur le marché Français (glibenclamide, glibornuride, glicazide, glimepiride, glipizide, carbutamide). Cette technique, entièrement validée dans le plasma humain, fait appel au couplage par CLHP-SM/SM à trappe d'ions utilisé en mode SM/SM complet.

Matériel et Méthodes

Réactifs

Les différents sulfamides hypoglycémiant ont été gracieusement fournis par les laboratoires pharmaceutiques suivants : glibenclamide et glimepiride par Aventis (Paris, France) ; glipizide par Pfizer (Paris, France) ; gliclazide et carbutamide par Servier (Neuilly-sur-Seine) ; glibornuride par CSP (Couron, France) ; et glisoxepide (étalon interne) par Bayer (Puteaux, France). L'ensemble des solvants organiques et réactifs utilisés sont de qualité analytique. L'acétonitrile et le diéthyl éther proviennent de la société SDS (Peypin, France) ; le méthanol, l'acide formique et l'acide chlorhydrique ont été obtenus chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'eau purifiée est produite par un système Waters-MilliQ® purification system (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France).

Echantillons biologiques

Les échantillons de plasma humain utilisés pour le

développement, la validation et la préparation des gammes d'étalonnage ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang (site de Reims). Les échantillons plasmatiques provenant d'authentiques cas de suspicions d'hypoglycémies « factices » ont été adressés au laboratoire pour investigation toxicologique.

Gammes d'étalonnage

Les solutions mères à 1g/L de chaque composé et de l'étalon interne sont préparées dans du méthanol et conservées à 4°C. Les solutions de travail sont préparées extemporanément par dilution successive des solutions mères dans le méthanol. Les gammes d'étalonnage (7 points) sont préparées par ajout de 10 µL de la solution de travail appropriée à 500 µL de plasma. Les concentrations plasmatiques finales s'étendent de 3,91 à 250 µg/L pour le glibenclamide ; de 7,81 à 500 µg/L pour le glipizide, gliclazide et le glibornuride ; de 15,6 à 1000 µg/L pour le glimepiride ; et de 31,25 à 2000 µg/L pour le carbutamide.

Procédure d'extraction

Les échantillons plasmatiques (500 µL) sont extraits par 5 mL de diéthyl éther après ajout de 25µL d'une solution de glisoxepide [10 mg/L dans le méthanol], utilisé comme étalon interne, et 100 µL d'acide chlorhydrique 1N. Après agitation au vortex durant 1 min et centrifugation à 3000 g pendant 5 min, la phase organique est transférée dans un tube conique puis évaporée à sec sous un courant d'azote à 40°C. L'extrait sec est repris par 200 µL du mélange acide formique 0,1% / acétonitrile (50/50 v/v), et 5 µL d'échantillon sont injectés dans le système chromatographique.

CLHP-SM/SM

Instrumentation et conditions chromatographiques

Le système utilisé est constitué d'un chromatographe en phase liquide Surveyor® LC system couplé à un détecteur de masse à trappe d'ions LCQ Advantage® (ThermoElectron, Les Ulis, France). L'ensemble est piloté par le logiciel dédié Xcalibur®. La séparation chromatographique des analytes est effectuée au moyen d'une colonne Hypurity® C18 (150 x 2,1 mm d.i. ; 5-µm ; ThermoHypersil-Keystone, Les Ulis, France) maintenue à une température de 30°C. La phase mobile, constituée du mélange acide formique 0,1% / acétonitrile (50/50 v/v), est délivrée à un débit de 0,3 mL/min en mode isocratique, sans division en sortie de colonne.

Conditions SM/SM, identification et quantification

L'interface d'ionisation est de type électrospray (ESI) utilisée en mode positif. Les principaux paramètres du détecteur sont, après optimisation pour l'ensemble des molécules : tension entre l'aiguille de nébulisation et le corps de la source : 4 kV ; température de source et de désolvatation de l'azote : respectivement 200°C et 300°C ; tension de l'électromultiplicateur : 400 V. L'hélium ultrapure (99,995%) est introduit dans la trappe en tant que gaz de collision (pression : 5.10^{-3} Torr).

Les données sont enregistrées en mode SM/SM et acquisition de spectres complets (Mode « Full scan MS/MS ») avec un balayage de m/z 120 à m/z 600. Pour chacun des sulfamides, les spectres SM/SM complets sont obtenus après collision de l'ion parent (ion pseudomoléculaire protoné $[M+H]^+$) par l'hélium [énergie de collision : 50% (unité arbitraire)]. Les ions parents et fils (correspondant au spectre complet SM/SM) sont présentés dans le Tableau I.

L'identification des composés est obtenue par comparaison des spectres SM/SM des pics observés sur le tracé chromatographique, avec les spectres SM/SM de références, stockés dans une bibliothèque créée au laboratoire et contenant, à ce jour, près de 1000 molécules.

La quantification des substances identifiées est également réalisée en mode « scan complet » après un simple retraitement automatisé de l'acquisition. L'ion fils présentant la plus grande intensité est sélectionné pour la quantification (Tableau I). Les courbes d'étalonnages sont calculées par régression linéaire pondérée ($1/\text{concentration}$) à partir de la mesure du rapport des aires de pics de chacun des sulfamides d'intérêt et de l'étalon interne *versus* la concentration du composé. La concentration du(es) sulfamide(s) identifié(s) dans un plasma authentique est déterminée au moyen de la courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions. Si dans un échantillon, la concentration devait excéder la limite supérieure de la gamme étalon, l'échantillon est à nouveau analysé après une étape de dilution appropriée.

Paramètres de validation

Contrôles de qualité

Des contrôles de qualités internes (CQI) ont été préparés à partir de plasma humain témoin à 3 concentrations différentes (bas de gamme, milieu de gamme et haut de gamme) pour chacune des 6 molécules étudiées (Tableau II). Des aliquotes de ces échantillons étaient conservés à -20°C jusqu'à analyse et renouvelés tous les 3 mois.

Tableau I : Ions parents et fils des 6 sulfamides recherchés et du glisoxepide utilisé comme étalon interne. L'ion fils souligné est employé pour la quantification.

Molécule	Ion parent (m/z)	Ions fils (m/z)* - Spectre complet SM/SM
Glibenclamide	494 (M+H) ⁺	<u>369</u> (100), 395(5)
Glipizide	446 (M+H) ⁺	<u>321</u> (100), 347(24), 286(3), 304(2)
Gliclazide	324 (M+H) ⁺	<u>127</u> (100), 110(43), 168(31), 153(18), 151 (8), 128 (7)
Glibornuride	367 (M+H) ⁺	<u>349</u> (100), 170(58), 196(40), 152(31)
Glimépiride	491 (M+H) ⁺	<u>352</u> (100)
Carbutamide	272 (M+H) ⁺	<u>156</u> (100), 173(34), 229(14), 155(3)
Glisoxepide	450 (M+H) ⁺	<u>310</u> (100), 141(99), 311(14), 350(8)

*Les valeurs entre parenthèses correspondent aux intensités relatives.

Fidélité et justesse (biais)

La précision et la justesse ont été déterminés à partir de 10 (répétabilité) et 20 (fidélité intermédiaire) CQI pour les 3 concentrations de chacun des composés d'intérêt. La fidélité, objectivée par le coefficient de variation (CV %), est considérée comme acceptable si sa valeur est retrouvée inférieure à 15%, excepté à la limite de quantification où un CV de 20% est admis (12). La justesse intra et inter-série, définie ici par le biais, est évaluée selon la formule suivante :

$$\text{Biais} = \left[\frac{\text{moyenne des concentrations mesurées}}{\text{concentration attendue}} \times 100 \right] - 100$$

La méthode est considérée comme juste pour un biais compris entre -15 et +15%, sauf pour la concentration au seuil de quantification pour laquelle une valeur de biais de +/- 20% est tolérée.

Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est définie pour chaque composé par la plus petite concentration, obtenue après dilutions successives de CQI, permettant d'atteindre un rapport signal/bruit supérieur à 3. La limite de quantification (LQ) a été fixée comme correspondant au premier point de la gamme d'étalonnage.

Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été établi à partir de CQI correspondant aux points bas et hauts des gammes étalons (n=5). Les échantillons plasmatiques sont extraits dans les conditions décrites ci-dessus, sans ajout de l'étalon interne. Ce dernier n'est ajouté dans la phase organique qu'après l'étape d'extraction. L'ensemble est évaporé à sec, et le résidu, repris par la phase mobile, est injecté dans le système chromatographique. Les échan-

Tableau II : Fidélité et justesse (biais).

Composé	CQI Bas Moyen haut [µg/L]	Fidélité		Justesse	
		Répétabilité (CV%, n=10)	Fidélité intermédiaire (CV%, n=20)	Intra-série (Biais % n=10)	Inter-série (Biais % n=20)
Carbutamide	31,2	15,9	9,6	-18,5	-12,6
	250	5,6	6,1	-6,8	-6,1
	1000	7,0	8,6	-1,6	7,2
Glibenclamide	3,91	17,8	9,8	18,2	16,6
	31,25	7,2	7,6	-3	12,6
	125	4,7	4,8	5,1	5,5
Glibornuride	7,81	12,0	9,4	-4,9	-3,5
	62,5	4,4	8,3	-1,6	1,9
	250	6,6	5,9	1,8	1,9
Gliclazide	7,81	7,4	6,9	-17	-8,2
	62,5	5,5	6,9	-4,1	-7,3
	250	6,2	5,5	-3,2	-1,6
Glimépiride	15,6	12,3	9,8	4,3	2,2
	125	8,6	9,2	3,6	10,9
	500	10,1	6,4	9,5	6,5
Glipizide	7,81	7,4	9,9	-1,8	9,9
	62,5	2,3	6,9	-5,4	-7,1
	250	5,4	7,2	-3,2	-6,3

tillons contrôles (n=5) sont préparés par l'ajout de l'étalon interne dans une solution pure (phase mobile) contenant les 6 sulfamides hypoglycémiantes à des concentrations basses et hautes. Le mélange est évaporé à sec, puis repris par la phase mobile, et analysé. Le rendement d'extraction est déterminé par la comparaison des aires des pics des échantillons contrôles avec les aires des pics obtenus après extraction des échantillons plasmatiques, auxquels l'étalon interne a été ajouté au moment de l'évaporation de la phase organique. Une procédure identique a été appliquée pour la détermination du rendement d'extraction du glisoxyde à la concentration de 500 µg/L, en utilisant le glimépiride en tant qu'étalon interne.

Contamination

La présence de contamination inter-échantillons a été évaluée par l'analyse alternée d'échantillons plasmatiques témoins (n=3), et d'échantillons plasmatiques contenant une concentration élevée (points hauts des gammes d'étalonnage) de chaque analyte. La concentration résiduelle, retrouvée dans le premier échantillon témoin suivant immédiatement un échantillon à concentration élevée, permet la détermination du taux de contamination. Un taux inférieur à 0,5% de la LQ est considéré comme négligeable.

Spécificité et étude de la suppression d'ionisation

La spécificité de cette méthode a été évaluée par l'analyse de 10 échantillons plasmatiques provenant de 10 volontaires sains n'ayant reçu aucun traitement médicamenteux.

Ces échantillons ont également permis de réaliser les investigations relatives au phénomène de suppression d'ions. Après extraction, les échantillons plasmatiques sont injectés dans le système CLHP-SM/SM, parallèlement à l'injection en continue directement dans la source ESI (injection post-colonne) des 6 sulfamides et de leur étalon interne (d'après 14).

Résultats et discussion

Analyse SM/SM, « screening » et quantification

Le mode d'ionisation retenu pour cette analyse est l'ESI et non l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Des essais préliminaires ont montré, qu'avec notre appareillage, l'ionisation des composés au moyen d'une source APCI produisait, contrairement à Maurer et coll. (11), un signal moins intense (environ d'un facteur 2) que celui obtenu en mode ESI.

L'utilisation d'une trappe ionique permet, grâce à l'accu-

mulation d'ions dans la trappe, l'acquisition de spectres SM/SM dit « complet », conférant ainsi à cette technique, une certaine spécificité, sans sacrifice de la sensibilité. La production de plusieurs ions fils pour la plupart des molécules (Tableau I), permet d'assurer une identification sans ambiguïté du ou des composé(s) incriminé(s). Le choix d'une énergie de collision identique pour l'ensemble des molécules analysées était dicté par le fait que notre bibliothèque spectrale a été initialement réalisée dans ces conditions. Avec cette énergie de collision (50% unité arbitraire), aucun des spectres SM/SM ne révèle la présence d'ions parents (Tableau I). Il est à noter qu'en cas de doute ou de spectre SM/SM moins informatif, un tel détecteur permet la réalisation d'une analyse de type SM/SM/SM grâce à une nouvelle fragmentation de l'ions fils majoritaire. Cette démarche pourrait être utile, par exemple, pour l'identification formelle du glimépiride dont le spectre « complet » ne produit, dans nos conditions expérimentales, qu'un seul ion fils. Dans cet exemple, les ions obtenus en SM/SM/SM à partir de la fragmentation de m/z 352 (spectre SM/SM) sont les suivants : m/z 126 (100%) et m/z 335 (21%).

Le glisoxepide a été choisi comme étalon interne car ce sulfamide hypoglycémiant n'a jamais été commercialisé en France. Lorsqu'un ou plusieurs composés a(ont) été identifié(s), la procédure de quantification quasi-simultanée est alors engagée. Un simple re-traitement de l'information spectrale obtenue en mode « full scan SM/SM » permet d'« extraire » l'ion fils majoritaire (Tableau I) utilisé comme ion pour la quantification. Il s'agit d'une approche sensiblement différente de celles

utilisées en CLHP-SM (simple quadipôle) ou CLHP-SM/SM (quadripôles en tandem) pour lesquels les méthodes quantitatives utilisent, le plus souvent, les modes d'ions sélectionnés (SIM pour la CLHP-SM) ou de transitions sélectionnées (SRM pour la CLHP-SM/SM). Du fait de ses particularités technologiques, le détecteur à trappe d'ions autorise l'analyse quantitative en mode « full scan SM/SM », sans perte de signal.

Chromatographie

La Figure 1 représente un chromatogramme « reconstruit » à partir de l'ion fils majoritaire de chacun des sulfamides étudiés, ajoutés à des concentrations thérapeutiques et extraits d'un échantillon plasmatique (500 µL). La séparation des molécules est presque complète, et la durée de l'acquisition est inférieure à 8 min.

Validation

Les principaux paramètres relatifs à la validation de cette méthode sont colligés dans les Tableau II et III. La fidélité et la justesse apparaissent comme satisfaisantes, et sont conformes aux recommandations récemment publiées par Nicolas O. et coll. (13). La répétabilité n'exède pas 15% sauf pour les CQI bas, correspondant aux LQ du carbutamide et du glibenclamide, en restant toutefois inférieure à 20%. La fidélité intermédiaire est toujours inférieure à 10%. La justesse est comprise entre -15 et +15%, exceptée aux LQ de ces mêmes composés, avec des valeurs de biais comprises entre -20 et +20%.

Tableau III : LD, LQ, concentrations thérapeutiques, linéarité et rendement d'extraction.

Composé	LD [µg/L]	LQ [µg/L]	Concentration thérapeutiques [µg/L]	Linéarité [µg/L]	(r2) pondération (1/x)	Rendement d'extraction	
						Conc.[µg/L]	[%]
Carbutamide	1,98	31,25	>20000	31,25-2000	0,996	31,25 1000	37 44
Glibenclamide	0,24	3,91	30-350	3,91-250	0,995	3,91 125	87 76
Glibornuride	1,95	7,81	25-50	7,81-500	0,996	7,81 250	81 79
Gliclazide	0,49	7,81	250-4000	7,81-500	0,990	7,81 250	78 83
Glimépiride	0,98	15,6	>300	15,6-1000	0,990	15,6 500	86 70
Glipizide	1,95	7,81	100-1000	7,81-500	0,990	7,81 250	68 63
Glisoxepide (EI)						500	79

La méthode est linéaire pour chaque molécule avec des coefficients de détermination (r^2) systématiquement supérieurs à 0,99. Les LQ pour tous les composés d'intérêt sont nettement inférieures aux seuils bas des concentrations sanguines connues pour être thérapeutiques (Tableau III). Cela permet, dans un contexte de prise occulte de sulfamides hypoglycémiant, de rechercher ces molécules avec un certain délai par rapport à la prise (fonction de la demi-vie d'élimination).

La contamination inter-échantillon a été retrouvée inférieure à 0,3% de la LQ, et est donc considérée comme négligeable.

Les rendements d'extraction sont acceptables pour la plupart des composés, sauf pour le carbutamide dont

les rendements d'extraction (à 31,25 et 1000 $\mu\text{g/L}$) sont compris entre 35 et 45%. Toutefois, ces rendements demeurent répétables et la linéarité de la méthode pour ce composé est excellente. Au total, cette méthode est bien adaptée, de manière fiable et juste, à la détection et la quantification de ces sulfamides, pour des concentrations sub-thérapeutiques jusqu'à des concentrations toxiques (après dilution de l'échantillon si nécessaire).

L'analyse des 10 échantillons plasmatiques témoins n'a révélée aucune interférence chromatographique avec les composés d'intérêt. Le phénomène de suppression d'ions, plus connu avec l'utilisation d'une source d'ionisation ESI qu'APCI (15, 16), n'apparaît dans notre méthode que pour un temps de rétention inférieur à

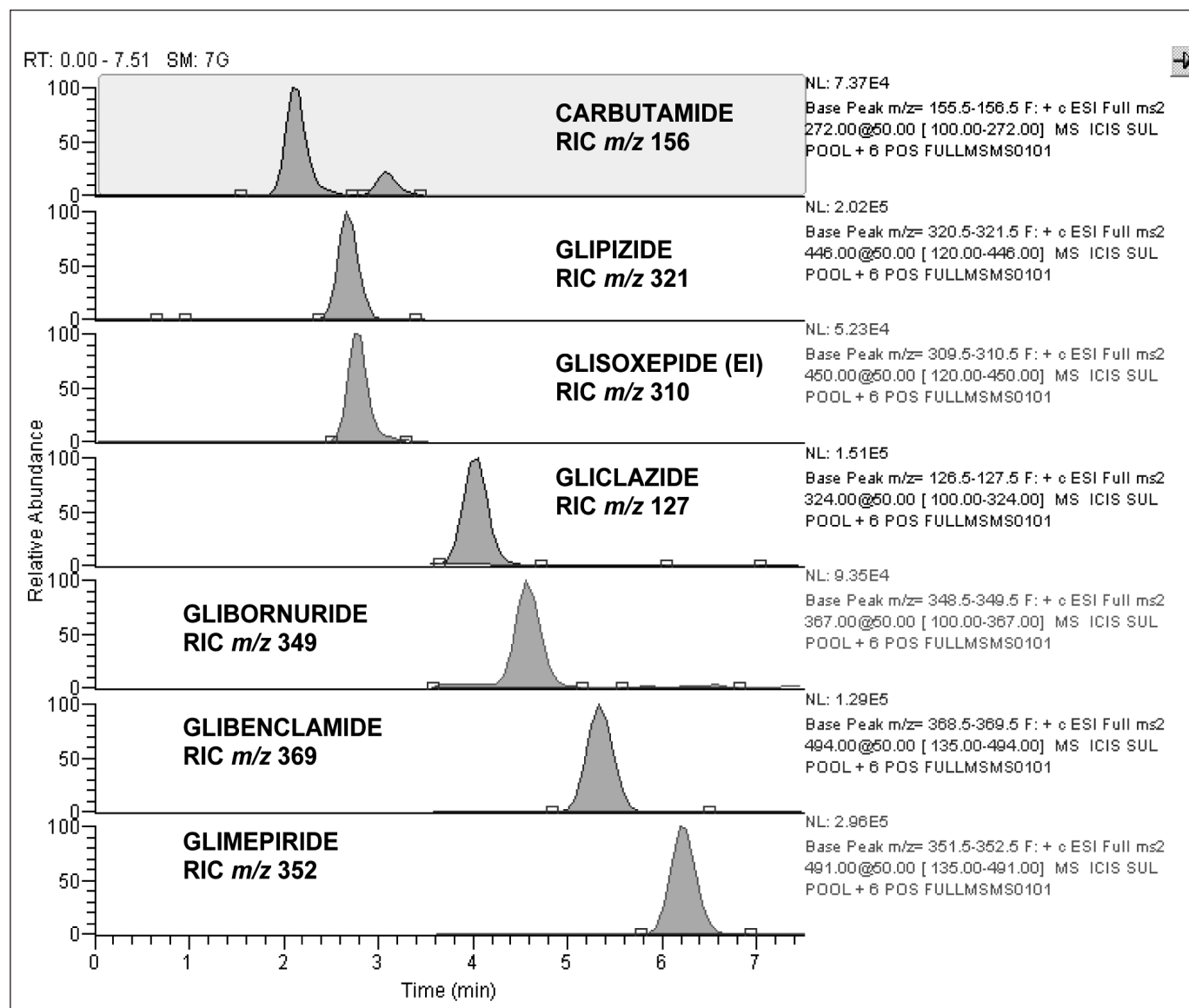


Figure 1 : Chromatogrammes « reconstruits » à partir des ions fils majoritaire (RIC) obtenus par l'analyse en CLHP-SM/SM « full-scan », d'un extrait plasmatique (500 μL) surchargé par 31,25 $\mu\text{g/L}$ de glibenclamide, 62,5 $\mu\text{g/L}$ de glibornuride, gliclazide et glipizide, 125 $\mu\text{g/L}$ de glimépiride, 250 $\mu\text{g/L}$ de carbutamide, et l'étalon interne, le glisoxepide. L'échantillon a été préparé et analysé dans les conditions décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

2 min et n'interfère pas avec l'ionisation des différents sulfamides. Il convient de noter, par ailleurs, que la séparation chromatographique presque totale permet probablement de limiter le risque de suppression d'ionisation pouvant survenir entre les molécules en cas de co-élution.

Application à d'authentiques cas cliniques

De janvier 2003 à avril 2006, 37 centres demandeurs (principalement des services cliniques d'endocrinologie de centres hospitaliers généraux ou universitaires) répartis sur l'ensemble du territoire français, nous ont adressé 266 échantillons sanguins pour recherches de sulfamides hypoglycémiantes chez des patients (74 hommes et 192 femmes) présentant des hypoglycémies sévères non expliquées. Grâce à cette méthode, 25 cas positifs [12 hommes (55 ± 25 ans) et 13 femmes (61 ± 20 ans)] ont pu être objectivés. Les résultats sont présentés dans le Tableau IV.

Les molécules identifiées étaient généralement absorbées isolément, excepté dans un cas où le gliclazide ($3657 \mu\text{g/L}$) a été retrouvé associé au glipizide ($1389 \mu\text{g/L}$). Le glibenclamide (13 cas), le glimépiride (3 cas) et le glipizide (1 cas) ont été mis en évidence dans le plasma à des concentrations thérapeutiques ou proches de la zone thérapeutique. Dans 2 cas, les concentrations plasmatiques de gliclazide étaient thérapeutiques alors que 3 patients présentaient des concentrations toxiques, 2 à 16 fois supérieures à la limite supérieure des concentrations thérapeutiques. Dans 3 autres cas, les concentrations de gliclazide ($2,3$ à $16 \mu\text{g/L}$) étaient nettement inférieures au seuil thérapeutique, suggérant que la prise de cette molécule pourrait remonter à plusieurs jours, en égard à sa longue demi-vie d'élimination (Tableau IV). Ceci souligne à nouveau tout l'intérêt, dans un tel contexte, de disposer d'une méthode analytique dont les LQ sont suffisamment basses pour détecter une absorption ancienne de ces sulfamides. Dans une approche permettant l'étude

des relations concentrations-effets, il aurait été intéressant de disposer pour ces patients, de la valeur de la glycémie. Malheureusement, cette information manque à notre étude, mais sera désormais systématiquement renseignée pour toute recherche de sulfamides hypoglycémiantes adressée à notre laboratoire.

En cas de prise plus ancienne ou pour démontrer une prise occulte répétée, une autre alternative serait bien évidemment de rechercher ces molécules dans les cheveux, comme cela a été récemment rapporté par Villain et coll. dans un cas d'intoxication criminelle par le glibenclamide (17). Des essais seront prochainement effectués dans cette optique. Nous pensons toutefois que le spectromètre de masse à trappe d'ions n'apportera pas, pour cette matrice, une sensibilité suffisante pour identifier et quantifier de très faibles concentrations de ces sulfamides. Le développement de cette technique sur un spectromètre de masse en tandem quadripolaire devra alors être envisagé.

Conclusion

Cette méthode par CLHP-SM/SM permet le dépistage et l'identification rapide dans le plasma humain de 6 sulfamides hypoglycémiantes présents sur le marché Français. La détection est assurée par un spectromètre de masse à trappe d'ions dont l'utilisation en mode SM/SM autorise l'acquisition de spectres « complets » suffisamment informatifs, conférant ainsi à cette technique une grande spécificité. La quantification est possible en simultanée dans le même mode, sans perte de signal. La validation montre que cette procédure est juste et fidèle, et que le phénomène de suppression d'ionisation n'interfère pas avec les molécules investiguées. Son application avec succès au sein de notre laboratoire, pour la recherche de sulfamides hypoglycémiantes chez des patients souffrant d'hypoglycémie inexplicée à répétition, démontre l'intérêt de cette technique pour confirmer ou infirmer le diagnostic de prise occulte de ces substances médicamenteuses.

Tableau IV : Sulfamides hypoglycémiantes identifiés chez 25 patients présentant une hypoglycémie factice. Etude réalisée de janvier 2003 à avril 2006.

Composé identifié	Nombre de cas	Concentrations plasmatiques extrêmes [$\mu\text{g/l}$]	Concentrations plasmatiques thérapeutiques [$\mu\text{g/l}$]	T1/2 élimination (h)
Glibenclamide	13	12-250	30-350	5-7
Gliclazide	8	2,3-65600	250-4000	20
Glimépiride	3	35-550	> 300	5-8
Glipizide	1	1389	100-1000	2,5-4

Références

1. Charlton R., Smith G., Day A. Munchausen's syndrome manifesting as factitious hypoglycemia. *Diabetologia* 1998 ; 44 : 784-5.
2. Trenque T., Hoizey G., Lamiable D. Serious hypoglycemia: Munchausen's syndrome. *Diabetes Care* 2001 ; 24 : 792-3.
3. Bougnères P. Hypoglycémies "occultes", Münchhausen par ou sans les parents. *Med. Clin. Pédiatr.* 2002 ; 2 : 16-7.
4. Shenflied G.M., Boutagy J.S., Webb C. A screening test for detecting sulfonylureas in plasma. *Ther. Drug Monit.* 1990 ; 12 : 393-397.
5. Drummer O.H., Kotsos A., McIntyre I. A class-independent drug screen in forensic toxicology using a photodiode array detector. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 225-9.
6. Adams W.J., Skinner G.S., Bombardt P.A., Courtney M., Bewer J.E. Determination of glyburide in human serum by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem.* 1982 ; 54 : 1287-91.
7. Nunez M., Ferguson J.E., Machacek D., Jacob G., Oda R.P., Lawson G.W., Landers J.P. Detection of Hypoglycemic drugs in human urine using micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.* 1995 ; 67 : 3668-75.
8. Paroni R., Comuzzi B., Arcelloni C., Brocco S., De Kreutzenberg S., Tiengo A., et al. Comparison of capillary electrophoresis with HPLC for diagnosis of factitious hypoglycemia. *Clin. Chem.* 2000 ; 46 : 1773-80.
9. Magni F., Marazzini L., Pereira S., Monti L., Kienle M.G. Identification of sulfonylureas in serum by electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2000 ; 282 : 136-41.
10. Susanto F., Reinauer H. Screening and simultaneous quantitative measurement of six sulfonylureas in serum by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization (APCI LC/MS). *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997 ; 357 : 1202-09.
11. Maurer H.H., Kratzsch C., Kremer T., Peters F.T., Weber A.A. Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylureas-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2002 ; 773 : 63-73.
12. Cole M.J., Janiszewski J.S., Fouda H.G. Electrospray mass spectrometry in contemporary drug metabolism and pharmacokinetics. In : *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Pramanik B.N., Ganguly A.K., and Gross M.L., eds. Marcel Dekker, New York, NY, 2002 ; 211-49.
13. Nicolas O., Farenc C., Bressolle F. Stratégie de validation de méthodes de dosage en bionalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. *Ann. Toxicol. Anal.* 2004 ; 16 : 118-27.
14. Müller C., Schäfer P., Strörtzel M., Vogt S., Weinmann W. Ion suppression effects in liquid-chromatography-electrospray ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with spectra libraries. *J. Chromatogr. B.* 2002 ; 773 : 47-52.
15. Souverain S., Rudaz S., Veuthey J.L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LP-ACPI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr. A* 2004 ; 1058 : 61-6.
16. Maurer H.H. Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). *Ann. Toxicol. Anal.* 2005 ; 17 : 13-8.
17. Villain M., Flesch F., Tournoud C., Cirimele V., Kintz P. Le glibenclamide utilisé comme arme chimique : cas rare d'une intoxication criminelle. *Ann. Toxicol. Anal.* 2005 ; 17 : 138.