

Article court

Élargissement de la fenêtre de détection du zolpidem par la recherche de ses métabolites urinaires dans le cadre de la soumission chimique

Expansion of the detection window of zolpidem by testing its metabolites in urine. Application to drug facilitated crimes

Camille Richeval^{1*}, Aline Rifflet¹, Luc Humbert¹, Michel Imbenotte², Raymond Houssin³, Michel Lhermitte¹

¹ Laboratoire de Toxicologie et Génopathies, Centre de Biologie Pathologie Pierre Marie Degand, CHRU, 59037 Lille Cedex, France

² Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, BP 83, 59006 Lille Cedex, France

³ Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, EA 2692, BP 83, 59006 Lille Cedex, France

Résumé – Objectif : Dans le cadre de la soumission chimique, une méthode UPLC-MS/MS a été développée pour détecter le zolpidem et ses métabolites dans les urines. **Méthodes :** Pour déterminer les fenêtres de détection du zolpidem et de ses métabolites dans les urines, un volontaire a pris un comprimé de 10 mg. Les urines ont ensuite été collectées 30 min et 1 h après l'administration puis toutes les 12 h pendant 144 h. Après extraction sur cartouches Oasis[®] MCX (SPE), les urines ont été analysées sur une colonne ACQUITY UPLCTM BEH C18, 1,7 µm (2,1 × 100 mm) avec un gradient d'acide formique 0,1 % et d'acétonitrile, la détection a été effectuée au moyen d'un spectromètre de masse en tandem en utilisant deux transitions par composé. **Résultats :** Le zolpidem est détecté pendant 60 h, avec un pic après 12 h. Le métabolite I (acide 4-[(3-diméthylcarboylméthyl-6-méthyl)-imidazo-[1,2a]pyridine-2-yl]-benzoïque) est détecté jusqu'au dernier temps de la cinétique, tandis que le métabolite II (acide 3-diméthylcarbamoyleméthyl-2-(4-méthylphényl)-imidazo-[1,2a]-pyridine-6-carboxylique) est détecté jusque 84 h après l'administration. **Conclusion :** Ainsi, dans le cas de soumission chimique impliquant le zolpidem, dans les urines le métabolite I apparaît être le meilleur marqueur pour caractériser une exposition.

Mots clés : Zolpidem, urine, soumission chimique, UPLC-MS/MS

Abstract – Objectif : An UPLC-MS/MS method was developed to detect zolpidem and its metabolites in urine in case of drug facilitated crimes. **Methods :** To establish the windows of detection zolpidem and its metabolites in urine, a volunteer received a 10 mg dose. Urine specimens were collected 30 min and 1 h after administration then each 12 h for 144 h. After extraction on cartridge Oasis[®] MCX (SPE), the extracts were injected into an ACQUITY UPLCTM BEH C18, 1,7 µm (2,1 × 100 mm) column using a gradient formic acid 0.1% and acetonitrile. Detection was achieved by tandem mass spectrometry operating in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Two transitions were monitored for each compound. **Results :** Zolpidem was detected until 60 h with peak concentration after 12 h. Metabolite I (4-[(3-dimethylcarboylmethyl-6-methyl)-imidazo-[1,2a]pyridin-2-yl]-benzoic acid) was detected until 144 h, whereas metabolite II (3-dimethylcarbamoylemethyl-2-(4-methylphenyl) imidazo-[1,2a]-pyridine-6-carboxylic acid) was detected until 84 h after administration. **Conclusion :** Therefore, in case of drug facilitated crimes involving zolpidem, the metabolite I appears as the best marker to document an exposition.

Key words: Zolpidem, urine, drug facilitated crime, UPLC-MS/MS

Reçu le 5 mai 2008, accepté après modifications le 30 juin 2008

Publication en ligne le 31 janvier 2009

* Correspondance : Camille Richeval, Tél. 03 20 44 49 62, Fax 03 20 44 47 29, camille.richeval@caramail.com

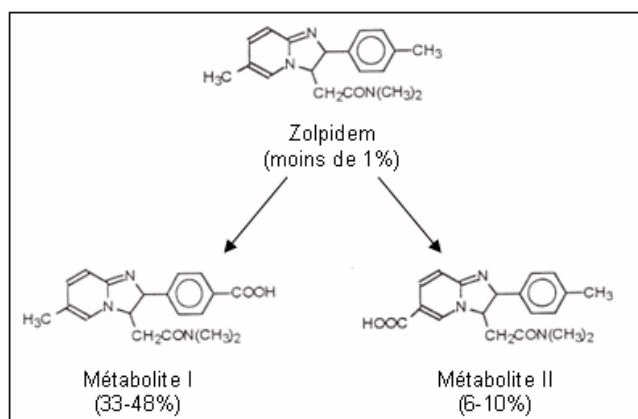


Fig. 1. Élimination urinaire du zolpidem et de ses métabolites.

1 Introduction

La soumission chimique peut être définie comme l'administration à l'insu ou à l'incitation à la consommation d'une ou plusieurs substances par un individu dans le but d'altérer sa vigilance et de le rendre vulnérable afin de l'abuser. Après l'éthanol, le cannabis, les benzodiazépines et hypnotiques sont fréquemment rencontrés dans les cas de soumission chimique [1, 2].

Le zolpidem est un hypnotique de structure chimique non-benzodiazépinique indiqué dans le traitement à court terme de l'insomnie, commercialisé en France sous le nom de Stilnox[®]. Comme les benzodiazépines, le zolpidem est un agoniste non sélectif des récepteurs GABA de sous type oméga 1 et 2. L'action sédatrice des benzodiazépines est liée aux récepteurs oméga 1, tandis que le sous type oméga 2 est responsable des effets sur la mémoire [3].

Le zolpidem a déjà été impliqué dans plusieurs cas de soumission chimique [4-6]. Comme beaucoup de produits utilisés par les agresseurs, le zolpidem est rapidement actif, en effet son pic plasmatique est atteint environ une heure après une prise de 10 mg. Mais surtout il a une demi-vie courte, de 2 à 3 heures [7, 8].

Le zolpidem est métabolisé par oxydation et hydroxylation en métabolites inactifs, appelés métabolite I et II. (métabolite I : acide 4-[(3-diméthylcarbamoylméthyl-6-méthyl)imidazo-[1,2a]-pyridine-2-yl]-benzoïque), métabolite II : acide 3-diméthylcarbamoylméthyl-2-(4-méthylphényl)imidazo-[1,2a]-pyridine-6-carboxylique) selon le schéma de la figure 1. Il est éliminé sous forme de métabolites : 29 à 42 % de la dose dans les fèces et 48 à 67 % dans les urines et sous forme inchangée pour moins de 1 % [9].

Plusieurs études avaient permis d'évaluer les fenêtres de détection du zolpidem dans les urines : 36 h après détection par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) et 36-96 h après détection par LC-MS/MS [4, 10]. Or lors de soumission chimique, les victimes ne peuvent se manifester que plusieurs heures, voire plusieurs jours après les faits, c'est pourquoi il était intéressant de tenter d'élargir les fenêtres de détection, notamment en suivant l'élimination des métabolites urinaires de cette substance.

Pour établir les fenêtres de détection du zolpidem et de ses métabolites dans les urines, les métabolites I et II ont été synthétisés [11], puis une méthode d'extraction en phase solide (SPE) et de détection par UPLC-MS/MS a été développée.

2 Matériels et méthodes

2.1 Échantillons

Après consentement éclairé, un volontaire sain (femme, 51 ans, 62 kg) a ingéré une dose de zolpidem (un comprimé de 10 mg). Ses urines sont collectées dans des flacons en plastique après 30 min puis 1 h, et toutes les 12 h pendant 144 h après l'ingestion. Les échantillons ont été congelés à -20 °C.

Le blanc urine est obtenu par le volontaire avant l'ingestion du comprimé de zolpidem.

2.2 Matériels et réactifs

L'acétonitrile de qualité HPLC et le méthyl tert-butyl éther (MTBE) proviennent de Carlo Erba Réactifs (France). Le méthanol (Chromanorm HPLC grade) est acheté auprès de VWR (France). L'acide formique 98-100 % et l'acide orthophosphorique 85 % (Reagent Grade, ACS, ISO) sont achetés auprès de Scharlau (Espagne), et l'ammoniaque 25 % auprès de Merck (Allemagne). Le zolpidem est fourni par Sanofi-Aventis (France). Les cartouches Oasis[®] MCX 1cc 30 mg sont achetées auprès de Waters (USA).

2.3 Extraction

Un millilitre d'urine en présence de 25 µL de méthyl clonazépam (EI) est acidifié avec 20 µL d'acide orthophosphorique 85 %. Puis le mélange est déposé sur une cartouche Oasis[®] MCX (*Mixed mode Cation eXchange*). Initialement conditionnée par 1 mL de méthanol et 1 mL d'eau distillée, le mélange est déposé sur la colonne. La colonne est ensuite lavée par 1 mL d'eau acidifiée à 2 % d'acide formique puis par 1 mL de méthanol. Elle est ensuite séchée pendant 1 min. L'échantillon est élué par 1 mL d'un mélange MTBE/méthanol/ammoniaque (75/25/5). L'éluat est évaporé à sec sous azote à 50 °C. Le résidu est reconstitué dans 100 µL de phase mobile (acide formique 0,1 % / acétonitrile (90/10)).

2.4 Conditions chromatographiques

La séparation chromatographique est effectuée sur un système ACQUITY UPLC[™] (Waters) munie d'une colonne ACQUITY UPLC[™] BEH C18, 1,7 µm (2,1 × 100 mm). 20 µL d'échantillon sont injectés sur la colonne qui est éluée par un gradient acide formique 0,1 % / acétonitrile avec un débit de 0,7 mL/min, le temps d'analyse est de 4,5 min (tableau I).

La détection est réalisée par un Micromass Quattro Premier XE (Waters), spectromètre de masse en tandem équipé d'une interface electrospray de type Z-spray. L'ionisation est réalisée en mode electrospray positif (ES+). Les conditions

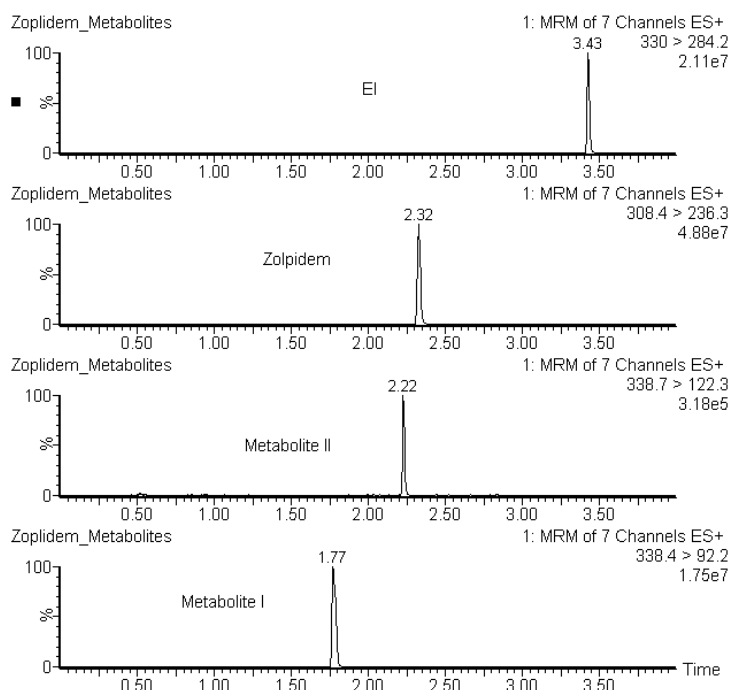


Fig. 2. Profil chromatographique d'un extrait d'urine surchargée en zolpidem et ses métabolites I et II avec des concentrations de 50, 1000 et 500 ng/mL respectivement.

Tableau I. Gradient UPLC pour l'analyse du zolpidem et de ses métabolites.

Temps (min)	Eau %	Acétonitrile %
0	90	10
1	90	10
3	50	50
3,4	50	50
3,5	90	10
4,5	90	10

optimales déterminées pour l'analyse du zolpidem et de ses métabolites sont les suivantes : tension du capillaire : 3,5 V, température de la source : 140 °C, débit de cône gaz : 20 L/h, température et débit de gaz de désolvatation : 420 °C, 1000 L/h.

Après optimisation des ions parents, des ions fils, des tensions de cône et des énergies de collision, l'acquisition se fait en mode MRM (*multiple reaction monitoring*) suivant les transitions présentées dans le tableau II.

2.5 Validation de méthode

Les droites de calibration sont obtenues en préparant des standards contenant 0,1 ; 1 ; 10 ; 50 et 100 ng/mL de zolpidem, 1 ; 5 ; 10 ; 100 et 1500 ng/mL de métabolite I et 50 ; 100 ; 250 ; 500 et 1000 ng/mL de métabolite II. Elles correspondent à une régression linéaire entre la surface de chaque composé sur l'étalon interne et la concentration du zolpidem et de ses métabolites ajoutés dans le blanc urine.

La répétabilité et l'exactitude sont déterminées en utilisant le blanc urine surchargé en zolpidem à 1 et 50 ng/mL, en métabolite I à 100 et 1 000 ng/mL et en métabolite II à 100 et 500 ng/mL.

Tableau II. Transitions MRM pour le zolpidem et ses métabolites.

Composés	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de cône (V)	Énergie de collision (eV)
Zolpidem	308,4	264,2	40	26
		236,3	40	26
Métabolite I	338,4	92,2	45	48
		65,2	45	48
Métabolite II	338,7	122,3	40	55
		78,2	40	55
Methyl-clonazepam	330,0	284,2	45	26

Les rendements d'extraction sont établis aux mêmes concentrations que les deux paramètres de validation précédents, en comparant la surface du pic de chaque composé dans le blanc urine surchargé avec la surface du pic des standards ajoutés après extraction aux mêmes concentrations.

Le rapport signal sur bruit de fond (*S/N*) est calculé pour chaque composé sur le point le plus bas de la gamme. Les limites de détection sont ainsi déterminées en calculant les concentrations pour un rapport *S/N* équivalent à 3.

3 Résultats

3.1 Validation de méthode

Dans les conditions chromatographiques décrites, il n'a pas été observé d'interférence entre le zolpidem, ses métabolites, l'étalon interne et une quelconque substance endogène présente dans l'urine.

Les temps de rétention du métabolite I, métabolite II, zolpidem et de l'étalon interne sont respectivement 1,77 ; 2,22 ; 2,32 et 3,43 min (figure 2).

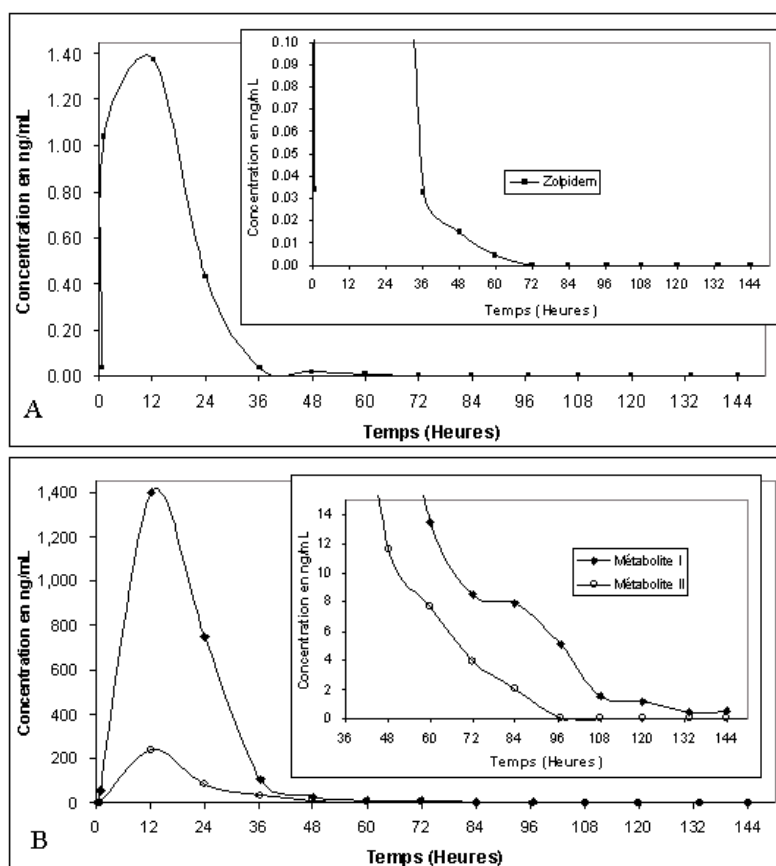


Fig. 3. Cinétiques d'élimination dans les urines du zolpidem (A) et des ses métabolites (B) après administration orale de 10 mg de zolpidem.

Tableau III. Paramètres de validation dans l'urine.

Composés	Linéarité <i>n</i> = 3	Limite de détection	Répétabilité CV %, <i>n</i> = 6	Exactitude % <i>n</i> = 6	Rendement d'extraction <i>n</i> = 6
Zolpidem	0,1–100 ng/mL <i>r</i> ² = 0,998	3 pg/mL	14 % (1 ng/mL) 23 % (50 ng/mL)	4 % (1 ng/mL) 6 % (50 ng/mL)	84 % (1 ng/mL) 96 % (50 ng/mL)
Métabolite I	1–1500 ng/mL <i>r</i> ² = 0,990	0,2 ng/mL	12 % (100 ng/mL) 16 % (1000 ng/mL)	16 % (100 ng/mL) 5 % (1000 ng/mL)	88 % (100 ng/mL) 97 % (1000 ng/mL)
Métabolite II	50–1000 ng/mL <i>r</i> ² = 0,999	10 ng/mL	13 % (100 ng/mL) 21 % (500 ng/mL)	5 % (100 ng/mL) 10 % (500 ng/mL)	90 % (100 ng/mL) 103 % (500 ng/mL)

Les linéarités, les limites de détection et les rendements d'extraction pour chacun des composés sont présentés dans le tableau III. La différence de 2 Log 10 entre la limite de détection du zolpidem et celles de ses métabolites peut s'expliquer par le rendement d'ionisation des molécules. En effet dans les conditions du spectromètre de masse en ESI+ définies pour cette méthode, les métabolites du zolpidem sont des composés acides qui s'ionisent moins facilement que le zolpidem.

3.2 Application

Les cinétiques d'élimination du zolpidem et des métabolites sont données dans les figures 3A et B.

Le zolpidem est détecté 30 min après l'ingestion jusque 60 h, avec une concentration maximale à 1,37 ng/mL obtenue à 12 h. En ce qui concerne les métabolites I et II, la concen-

tration maximale est obtenue après 12 h avec 1400 ng/mL et 240 ng/mL respectivement. Le métabolite I est présent dès 30 min jusqu'au moins 144 h après l'ingestion (figure 4). Par contre le métabolite II n'est détecté qu'à partir de 12 h jusqu'à 84 h.

4 Discussion et conclusion

L'analyse des différents temps de la cinétique, après extraction SPE, a permis de détecter le zolpidem jusque 60 h ce qui est comparable aux résultats de précédentes études, qui avec des couplages tels que LC-MS et LC-MS/MS, avaient détecté le zolpidem jusque 36 à 60 h voire 96 h [4, 10]. Les métabolites acides du zolpidem avaient été mis en évidence jusque 60 h par LC-MS, soit plus longtemps que le zolpidem [10].

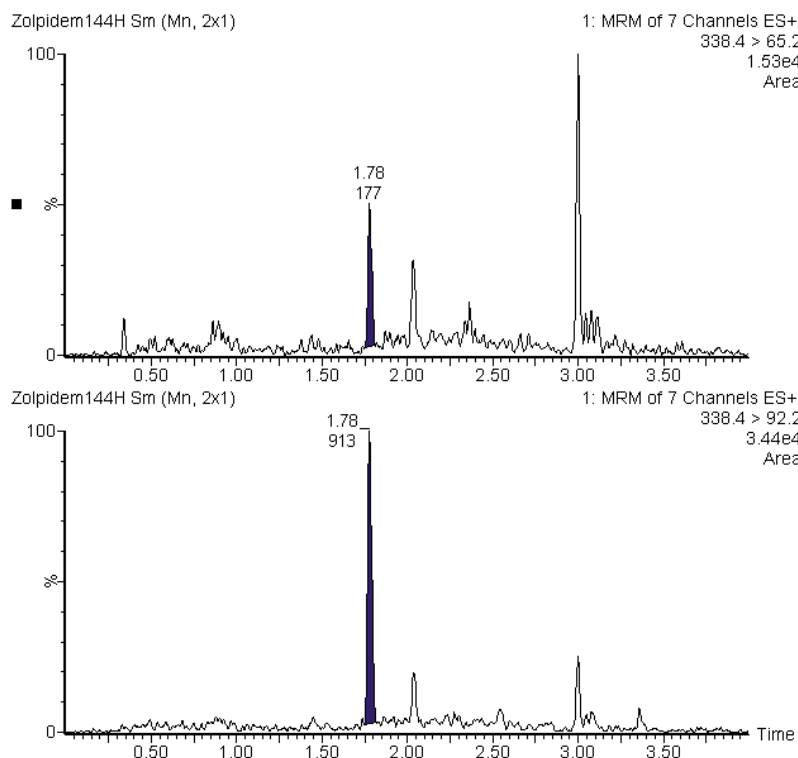


Fig. 4. Chromatogramme des deux transitions du métabolite I après extraction de l'urine à T 144 h.

En effet, la recherche des métabolites s'avère intéressante pour justifier une prise de zolpidem plusieurs heures après l'ingestion puisque les métabolites sont encore détectés alors que le principe actif ne l'est plus. Le métabolite I a été détecté au moins 144 h après l'ingestion d'un comprimé et le métabolite II, 72 h, permettant ainsi d'élargir considérablement la fenêtre de détection du zolpidem.

Les concentrations urinaires maximales obtenues pour le métabolite I, II et le zolpidem sont de 1400 ng/mL, 240 ng/mL et 1,37 ng/mL respectivement. Ces résultats justifient bien que les métabolites sont les produits majeurs d'élimination du zolpidem dans les urines.

Grâce à la synthèse des métabolites acides du zolpidem, une méthode d'analyse sensible et rapide a été développée par UPLC-MS/MS. Cette étude sur l'élimination urinaire du zolpidem et ses métabolites montre qu'il est possible de documenter une prise de 10 mg de zolpidem au moins 144 h après l'ingestion grâce à la présence de son métabolite majeur dans les urines.

Références

- Hindmarch I, ElSohly M, Gambles J, Salamone S. Forensic urinalysis of drug in cases of alleged sexual assault. *J Clin Forensic Med.* 2001; 8: 197-205.
- Questel F, Lagier G, FoDjezra D, Dally S, Elkaharrat D, Diamant-Berger O. Usage criminel de produits psychoactifs analyse d'une série parisienne. *Ann Toxicol Anal.* 2002; 13: 371-380.
- Terzano MG, Rossi M, Palomba V, Smerieri A, Parrino L. New drugs for insomnia: comparative tolerability of zopiclone, zolpidem and zaleplon. *Drug Saf.* 2003; 26: 261-282.
- Villain M, Chèze M, Tracqui A, Ludes B, Kintz P. Windows of detection of zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults. *Forensic Sci Int.* 2004; 143: 157-161.
- Kintz P, Villain M, Dumestre-Toulet V, Ludes B. Drug-facilitated sexual assault and analytical toxicology : the role of LC-MS/MS A case involving zolpidem. *J Clin Forensic Med.* 2005; 12: 36-41.
- Chèze M, Duffort G, Deveaux M, Pépin G. Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: Report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris. *Forensic Sci Int.* 2005; 153: 3-10.
- Greenblatt DJ. Pharmacokinetic determinants of hypnotic drug action: The art and science of controlling release. *Sleep Med.* 2006; Suppl 1: S10-S14.
- Greenblatt DJ, Harmatz JS, von Moltke LL, Ehrenberg BL, Harrel L, Corbett K, Counihan M, Graf JA, Darwish M, Mertzanis P, Martin PT, Cevallos WH, Shader RI. Comparative kinetics and dynamics of zaleplon, zolpidem, and placebo. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64(5): 553-561.
- Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Foster City: Biomedical Publications Foster City Californie 2002: 1115-1117.
- Société Française de Toxicologie Analytique, Consensus. Soumission chimique : prise en charge toxicologique. *Ann Toxicol Anal.* 2003; 15: 239-242.
- Klupsch F, Houssin R, Humbert L, Imbenotte M, Henichart JP, Lhermitte M. Major metabolites of zolpidem : expeditious synthesis and mass spectra. *Chem Pharm Bull. (Tokyo)* 2006; 54(9): 1318-1321.