

Place du screening toxicologique par chromatographie liquid haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) dans le diagnostic des intoxications médicamenteuses

[Role of toxicological screening by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) in diagnosis of drug intoxication]

S. Elmrabeh¹, M. Ibriz¹, F. Zalagh², M. Bentafrit², B. Birich², M. Khaya², M. Idrissi², N. Badrane², A. Soulaymani¹,
and R. Soulaymani Bencheikh²⁻³

¹Laboratoire de Génétique et Biométrie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kenitra, Maroc

²Centre Antipoison et de pharmacovigilance du Maroc, Rabat, Maroc

³Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Maroc

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The study's objective was to assess the role of toxicological screening by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) in diagnosis of drug intoxication to compare those results with results obtained by immunoassay and colorimetric tests.

This prospective study was carried out over a period of one year (2012) at the Laboratory of Moroccan Poison Control and Pharmacovigilance Center. Toxicological screening was performed by using HPLC-DAD, immunoassay and colorimetric tests using plasma and urine of 107 patients. The plasma sample was submitted to a liquid-liquid extraction. The residue was subjected to HPLC-DAD using prazepam as the internal standard. The separation was carried out on an ODS-Hypersil column with phosphate buffer /acetonitrile as the mobile phase. The screening immunoassay and colorimetric tests have been applied to urine samples.

The most common drugs present were benzodiazepines (39, 44%) and antidepressants (23, 94%). The results showed a good agreement (67.29 %) between the results of screening by HPLC-DAD and results obtained by immunoassay and colorimetric tests. The discordance was occurred in 32.71%.

In our study, the causes of discordance were technical limits. It was the absence of the molecule suspected at the spectral library or the similarity of the UV-spectra. In other cases the toxicokinetic of the suspected substance influence the results; the compound is metabolized or even eliminated or the identified drug is administered to the patient as symptomatic treatment.

Data analysis shows that toxicological screening by HPLC -DAD allows the identification of unrecognized drugs by immunoassay and colorimetric tests. This method can simultaneously identify several molecules belonging to different classes of drugs.

KEYWORDS: Screening, HPLC-DAD, Intoxication, Drugs, Colorimetric, Immunoassay.

RESUME: L'objectif de cette étude était d'évaluer la place du screening toxicologique de médicaments par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD) dans le diagnostic des intoxications médicamenteuses et de comparer les résultats obtenus par rapport aux résultats des méthodes colorimétriques et immunologiques.

Il s'agit d'une étude prospective, basée sur l'analyse de 107 prélèvements sanguins et urinaires reçus au laboratoire du Centre anti poison et de pharmacovigilance du Maroc pendant une période de 12 mois. Pour le screening par HPLC-DAD, les

plasmas ont subi une extraction liquide-liquide (prazépam comme standard interne). La séparation s'est effectuée sur colonne HYPERSIL ODS à l'aide d'un gradient acétonitrile/tampon phosphate. Les urines des malades ont été analysées par des méthodes colorimétriques et immunologiques. Les médicaments recherchés étaient des benzodiazépines (39, 44%) suivis des antidépresseurs (23,94%). Il y'avait une bonne concordance (67,29 %) entre les résultats du screening par HPLC/DAD et ceux obtenus par les méthodes colorimétriques et immunologiques et une discordance dans 32,71% des cas.

Les causes de discordance étaient d'une part des causes techniques, absence de la molécule suspectée au niveau de la spectrothèque soit la ressemblance des spectres UV pour les molécules pharmaco-chimiquement proches). D'autre part, la toxicocinétique de la substance incriminée peut influencer le résultat, la molécule mère est déjà métabolisée voire éliminée. Dans d'autres cas le médicament identifié est administré au patient comme traitement.

Le screening toxicologique par HPLC-DAD permet l'identification des médicaments non reconnus par les tests colorimétriques et immunologiques. Il permet également l'identification simultanée de plusieurs molécules appartenant à des classes médicamenteuses différentes.

MOTS-CLEFS: Screening, HPLC-DAD, Intoxication, Médicament, Colorimétrie, immunologique.

1 INTRODUCTION

La prise en charge d'une intoxication est essentiellement symptomatique et repose avant tout sur l'approche clinique, regroupant l'anamnèse, l'examen clinique complet, l'électrocardiogramme et les bilans biologiques [1]. L'analyse toxicologique est un complément dans cette prise en charge. Celle-ci permet d'identifier et/ou de doser la substance toxique consommée afin de confirmer ou de réfuter l'hypothèse d'intoxication, d'évaluer sa gravité et de surveiller le traitement [2], [3], [4], [5].

Les analyses toxicologiques utilisent principalement deux grands groupes de méthodes différentes qui sont les méthodes colorimétriques, photométriques, enzymatiques et immunologiques d'une part et les méthodes séparatives d'autre part. Le premier groupe permet de donner une orientation rapide sur l'origine de l'intoxication, il est simple et ne nécessite pas de traitement pré-analytique, mais ce groupe a une sensibilité variable, il est moins spécifique et peut donner lieu à des interférences où à des réactions croisées. Afin de confirmer les résultats des échantillons obtenus par ces méthodes, on a recours à des méthodes plus sophistiquées et précises telles que la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD). Ces méthodes permettent d'identifier et/ou de doser après extraction appropriée de nombreuses xénobiotiques avec une grande sensibilité et spécificité et avec un coût d'investissement considérablement réduit [1], [5], [6].

Selon les données épidémiologiques du Centre Anti-Poisons du Maroc (CAPM), le médicament reste le toxique le plus incriminé dans les intoxications [7]. Pour répondre aux demandes toxicologiques des patients, le laboratoire du CAPM a développé une technique de screening médicamenteux par HPLC-DAD. L'objectif de cette étude était d'évaluer la place du screening toxicologique de médicaments par HPLC-DAD dans le diagnostic des intoxications médicamenteuses et de comparer les résultats obtenus par rapport aux résultats des méthodes colorimétriques et immunologiques.

2 MATERIELS ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective étalée sur une année (01 Janvier 2012 à 31 Décembre 2012). L'étude a été menée au laboratoire de toxicologie et de pharmacologie du CAPM. Le laboratoire couvre les examens de toxicologie médicale ainsi que les dosages des médicaments pour le suivi thérapeutique des patients.

Les patients inclus étaient des patients hospitalisés ou consultant en ambulatoire pour une suspicion d'intoxication médicamenteuse aigue et chez qui au même temps des prélèvements sanguins et urinaires ont été réalisés. Tous les prélèvements non-conformes (Echantillons de sang coagulé, Echantillons sans identité, identité illisible ou incomplète) ont été exclus. Un tableau clinique a été fourni pour chaque patient renfermant toutes les informations utiles.

Le sang est prélevé dans des tubes contenant des anticoagulants (EDTA ou héparine) puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 minutes et enfin conservé à 4°C. La réalisation de l'extraction nécessite l'utilisation de 1 ml de plasma. Les urines sont conservées à + 4°C. Les plasmas sanguins sont utilisés pour le screening toxicologique par HPLC-DAD et les urines ont servi pour les analyses colorimétriques et immunologiques.

L'analyse du screening toxicologique médicamenteux a été effectuée sur une chaîne HPLC (Type Agilent série 1100) équipée d'un détecteur à barrette de diodes et d'une colonne HYPERSIL ODS 100×2,1 mm, 5 µm précédée d'une précolonne 20 x 2 mm, pilotée par le logiciel HP Chemstation for LC, version B02 possédant la bibliothèque Toxicol. La température de l'enceinte thermostatée est de 40° C. La phase mobile est un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate 20 mM dont les proportions varient selon un gradient (tableau 1). Les longueurs d'onde d'acquisition utilisées sont 210, 230, 254 nm.

Après extraction liquide-liquide utilisant le prazépam comme standard interne, 10 µl d'échantillon sont injectés dans la colonne et l'analyse chromatographique dure 20 minutes.

L'interprétation des résultats est effectuée par le logiciel « Chemstation » qui permet la détermination de la concordance du spectre élué à son homologue en bibliothèque qui est évalué par le match factor et la concordance entre les molécules est acceptée à une valeur supérieure ou égale à 990/1000.

Tableau 1. Condition chromatographiques du screening par HPLC/DAD

Temps (min)	Débit (ml/min)	% Tampon	% Acétonitrile
6,50	0,4	55	45
13,00	0,4	25	75
15,00	0,4	20	80
19,00	0,4	85	15

Les méthodes effectuées au niveau des urines comprenaient la recherche des salicylés par la réaction de Trinder, des phénothiazines par la réaction de Forrest, des imipramines par la réaction au nitrite de sodium et du paracétamol par la réaction à l'O-crésol [8]. Les benzodiazépines, opiacées, morphiniques, cocaïniques et cannabinoïdes sont recherchées par les tests d'immuno-chromatographie (cassettes fournis par RAPID DRUG SCREEN –Individual TM).

3 RESULTATS

Pendant la période d'étude on a reçu, des échantillons sanguins et urinaires de 107 patients. L'âge moyen est de 18,43± 1,9 ans. Le sexe ration est de 1,16 en faveur des individus de sexe féminin. Pour tous les cas analysés par HPLC-DAD, la répartition des intoxications médicamenteuses selon les classes pharmaceutiques des médicaments a montré que les benzodiazépines viennent au premier rang avec 39,44% du total, suivis par les antidépresseurs 23,94%, les antiépileptiques 12,68%, les neuroleptiques 11,27%, les antalgiques non opiacés 7,04% et 5,63 pour les autres classes de médicaments (figure 1).

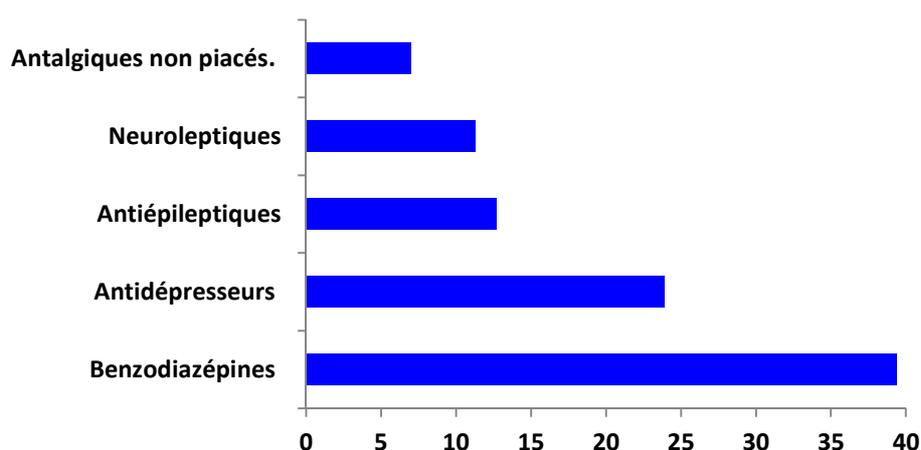


Fig. 1. Répartition des médicaments détectés par HPLC-DAD selon la classe thérapeutique de médicament.

Les résultats obtenus par les méthodes colorimétriques et immunologiques ont montré que les benzodiazépines (60,38%) occupent la première place suivies par les antidépresseurs tricycliques (13,21%), les neuroleptiques (7,55%), et un pourcentage de 9,43% pour les antiépileptiques et les antalgiques non opiacés.

La comparaison des résultats obtenus a montré une bonne concordance (67,29 %) entre les résultats du screening par HPLC-DAD et ceux obtenus par les méthodes colorimétriques et immunologiques (Tableau 2) et une discordance dans 35 cas soit 32,71% (Tableau 3). Cette discordance était en rapport avec des résultats négatifs par HPLC-DAD et positifs par les méthodes colorimétriques et immunologique et vis versa, ou la détermination de deux médicaments différents par chaque méthode.

Tableau 2. Comparaison des résultats du screening pour les intoxications médicamenteuses par HPLC-DAD, méthodes colorimétriques et immunologiques : cas des concordances.

Méthode immunologiques et colorimétriques	Screening par HPLC-DAD	Effectifs	Pourcentage
Négatif	Négatif	37	51,39
Benzodiazépines= P SPI=N	Bromazépam	5	6,94
Benzodiazépines= P SPI=N	Midazolam	4	5,55
Benzodiazépines= P SPI=N	Diazépam	3	4,17
Benzodiazépines= P SPI=N	Témazépam	2	2,78
Benzodiazépines= P SPI=N, Coc=N, Morph=N, THC=N	Diazépam Bromazépam	1	1,39
Benzodiazépines= P SPI=N, Coc=N, Morph=N, THC=N	Témazépam Diazépam	1	1,39
Benzodiazépines= P SPI=N, Coc=N, Morph=N, OP=N	Témazépam Carbamazépine	1	1,39
Benzodiazépines= P SPI=N, Coc=N, Amph=N, Morph=N THC=N, OP=N	Oméprazole Alprazolam Zolpidem	1	1,39
Benzodiazépines= P SPI=N, Coc=N, Amph=N, THC=N	Lévomépromazine, Zolpidem, Alprazolam	1	1,39
Imipraminiques= P SP=N, BDZ=N	Amitriptyline	4	5,55
Imipraminiques= P SP=N, BDZ=N, Coc=N, Morph=N, OP=N	Nortriptyline	1	1,39
Paracétamol= P SPI=N, BDZ=N	Paracétamol	2	2,78
Phénothiazines=P SI=N, BDZ=N	Chloropromazine	2	2,78
Phénobarbital=P SPI=N, BDZ=N	Phénobarbital	4	5,55
Salicylés=P PI=N, BDZ=N, Amph=N, Morph=N	acide acétylsalicylique	1	1,39
Phénothiazines=P, Benzodiazépines=P SI=N, Coc=N, Morph=N, Amph=N	Périciazine, Diazépam	1	1,39
Phénothiazines=P SI=N, BDZ=N, Morph=N, THC=N, OP=N	Lévomépromazine	1	1,39
Total		72	100

N= négatif, P= positif S = salicylés, P= phénothiazines, I= imipramines, BZD= benzodiazépines, OP= opiacées, Morp= Morphiniques, Amph= amphétamines, Coc= cocaïnes, THC= cannabinoïdes.

L'analyse chromatographique par HPLC-DAD nous a permis de confirmer le résultat négatif obtenu par les méthodes colorimétrique et immunologiques pour la recherche de salicylés, phénothiazines, imipramines, benzodiazépines, Amphétamines, opiacées, cocaïniques et cannabinoïdes.

Tableau 3. Comparaison des résultats du screening pour les intoxications médicamenteuses par HPLC-DAD, méthodes colorimétriques et immunologiques : cas des discordances.

Nombre de cas ayant le même résultat	Méthodes colorimétriques et immunologiques	Molécules identifiées par HPLC-DAD
7	Benzodiazépines	Négatif
2	Salicylés	Négatif
1	Morphiniques	Négatif
1	Négatif	Amitriptyline
1	Négatif	Thiopental
1	Négatif	Métabolite d'amisulpride, chlorpromazine
1	Négatif	Carbamazépine
2	Négatif	Phénobarbital
1	Négatif	Miansérine
1	Négatif	Levomopromazine
1	Négatif	Bromazépam, Amitriptyline
3	Négatif	Bromazépam
1	Négatif	Tianéptine
1	Négatif	Miansérine
1	Négatif	Désipramine
2	Négatif	Diazépam
1	Négatif	Midazolam
1	Négatif	Dibenzépine
1	Négatif	Estazolam, Acide valproïque
1	Benzodiazépines	Miansérine
1	Benzodiazépines	Lévomépromazine, Tianéptine
1	Benzodiazépines	Paracétamol, Hydroxyzine
1	Benzodiazépines	Noramidopyrine, Lévomépromazine
1	Benzodiazépines	Tianéptine

La confrontation des médicaments suspectés cliniquement avec les résultats de l'HPLC-DAD a montré une parfaite concordance (74,42%). La discordance a été notée pour 11 cas soit 25,58% (Tableau 4).

Tableau 4. Cas de discordances entre les analyses par HPLC-DAD et les tableaux cliniques

Tableaux cliniques	Analyses par HPLC-DAD
Niaprazine	Négatif
Hydroxyzine	Négatif
Maprotiline	Négatif
Paracétamol	Négatif
Bromazépam, Alprazolam	Négatif
Lévodopa	Négatif
Trihexyphenidyle Chlorhydrate	Négatif
Prazépam	Diazépam
Amitriptyline	Imipramine
Valproate de sodium	Carbamazépine
- Clomipramine	Thiopental

4 DISCUSSION

Sur les 107 analyses effectuées par HPLC-DAD, la répartition des intoxications médicamenteuses selon les classes pharmaceutiques des médicaments a montré que les familles médicamenteuses les plus incriminées, sont les psychotropes ce qui concorde avec les résultats de l'étude réalisé par le CAPM. Le bromazépam étant le principe actif le plus rencontré, l'abondance de cette molécule peut être expliquée par sa vente illégale dans le marché parallèle au Maroc. [8]

Dans notre études, pour tous les cas où on a noté une parfaite concordance entre les résultats des méthodes colorimétriques, immunologiques et les résultats du screening par HPLC-DAD, il s'avère que les dépistages colorimétriques et immunologiques permettent uniquement le diagnostic de certains médicaments ou certaines classes de médicaments (paracétamol, benzodiazépines, barbituriques, salicylés, antidépresseurs tricycliques) ou de stupéfiants (amphétamines, dérivés opiacés) sans préciser la nature exacte du produit en cause de l'intoxication, de plus la liste des molécules développées pour ces tests est limitée et de nombreuses classes médicamenteuses sont ignorées [3, 9].

L'HPLC-DAD permet l'identification de plusieurs molécules appartenant à des classes médicamenteuses très variées (bromazépam, phénobarbital, lévomépromazine, dibenzépine...).

Pour les cas de non concordance entre les deux méthodes dans cette étude. Les analyses toxicologiques par HPLC-DAD se sont révélées négatifs pour 10 cas alors que les méthodes colorimétriques et immunologiques ont identifié pour ces même cas 7 benzodiazépines, 2 salicylés et un morphinique. Ce résultat peut être expliqué d'une part par le temps post intoxication qui pourrait être suffisant pour l'élimination du médicament par l'organisme d'autre part la toxicocinétique de la molécule incriminé peut influencer le résultat, la molécule mère peut être déjà métabolisé voir éliminée.

Cependant, pour 5 autres cas, identifiés comme benzodiazépines positifs par les méthodes colorimétriques et immunologiques, l'HPLC-DAD, quant à elle, a identifié trois antidépresseurs, deux antalgiques non opiacés, deux neuroleptiques et un anxiolytique.

Cette dernière discordance peut être expliquée par les interférences connues pour les méthodes colorimétriques et les réactions croisées des méthodes immunologiques qui peuvent conduire à des faux 'positifs' [1, 10].

Par ailleurs, 20 cas ont été déclarés négatifs par les méthodes colorimétriques et immunologiques alors que l'HPLC-DAD a permis d'identifier le midazolam, l'amitriptyline, l'amisulpride, la chlorpromazine, la lévomepromazine, le bromazépam, la désipramine, le diazépam, la dibenzépine, l'estazolam, la tianéptine et le phénobarbital. Le résultat positif de recherche de ces molécules par HPLC-DAD confirme la grande sensibilité et la grande spécificité de la méthode vis-à-vis de ces molécules.

Les résultats négatifs par les méthodes immunologiques pourraient être expliqués par la différence d'affinité des molécules d'une même classe vis-à-vis d'un même anticorps ce qui peut donner lieu à des faux négatifs [6].

La concentration de la molécule incriminée dans l'intoxication (La concentration circulante est inférieure au taux de positivité du test) peut donner des faux négatifs par les méthodes immunologiques [6].

Pour l'acide valproïque, la miansérine, le thiopental et la carbamazépine, ce résultat pourrait être expliqué pour la miansérine par le fait que les antidépresseurs tétracycliques ne sont pas détectables par les trousses immunologiques utilisées pour le dépistage des antidépresseurs imipraminiques tricycliques [10].

Pour les autres molécules (l'acide valproïque, le thiopental, la pholcodine), on ne dispose pas à l'échelle de notre laboratoire de méthodes spécifiques pour la détection de ces molécules.

Concernant les patients ayant suivis un traitement médical avant l'analyse, la confrontation des résultats obtenus par HPLC-DAD en relation avec les médicaments suspectés par le clinicien a montré une concordance dans 32 cas et une discordance dans 11 cas.

Parmi les 11 cas de discordance, 7 analyses par HPLC-DAD se sont révélés négatives malgré la prise préalable par les patients de certains médicaments. Les médicaments utilisés diffèrent selon les cas et concernent les produits suivants : niaprazine, hydroxyzine, maprotiline, alprazolam, bromazépam, paracétamol, lévodopa et trihexyphenidyle chlorhydrate.

Ce résultat négatif obtenu pourrait être expliqué, en partie, par le délai relativement important entre la prise du médicament et le moment de la réalisation de l'analyse toxicologique. Cette donnée ne peut pas être confirmée puisque on ne dispose pas dans les informations fournis au laboratoire du délai d'intoxication constituant une limite de notre étude.

Le résultat pour 2 cas (lévodopa et trihexyphenidyle chlorhydrate) était négatif en raison d'absence dans notre spectrothèque Toxicol des spectres homologues pour ces deux médicaments.

Pour 4 autres cas le clinicien avait suspecté la prise de certains médicaments (prazépam, amitriptyline, valproate de sodium, clomipramine) alors que l'HPLC-DAD en avait identifiée d'autres (diazépam, imipramine, carbamazépine, thiopental). Ce constat pourrait être expliqué soit par la ressemblance des spectres UV pour les molécules pharmacochimiquement proches soit que le médicament identifié est administré au patient comme traitement de base ou traitement symptomatique.

Les résultats de cette étude laissent entendre que l'HPLC-DAD est une méthode capable de détecter plusieurs molécules appartenant à des classes médicamenteuses très variées ainsi que leurs métabolites incluant même les intoxications polymédicamenteuses [9]. Cependant, cette technique nécessite un temps d'analyse et d'interprétation assez longs, un personnel qualifié en HPLC et la constitution d'une base très large de spectres de médicaments (spectrothèque).

5 CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude montrent que le screening toxicologique par HPLC-DAD pourrait constituer un outil de diagnostic efficace, car il permet l'identification de molécules appartenant à des classes médicamenteuses très variées ainsi que leurs métabolites; de plus ce type de screening permet de préciser la nature exacte de la molécule incriminée dans l'intoxication et de confirmer les tests colorimétriques et immunologiques qui ne permettent que l'identification de la classe médicamenteuse. Par ailleurs, l'HPLC-DAD permet l'identification formelle des composés non décelables par les tests colorimétriques et immunochimiques.

Le dialogue entre le clinicien et l'analyste est indispensable, cette collaboration clinico-biologique doit être instaurée afin d'éviter les pièges analytiques.

REFERENCES

- [1] B. Capolaghi, M. Moulisma, N. Houdret, F. J. Baud, "Stratégies Analytiques en Toxicologie D'urgence," *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XII, n° 4, 2000.
- [2] B. Mégarbane, L. Donettib, T. Blancc, G. Chéron, F. Jacobse, Groupe d'experts de la SRLF, "Intoxications Graves par Médicaments et Substances Illicites en Réanimation," *Réanimation* 15 332–342, 2006
- [3] P. Compagnona, V. Danelb, J.-P. Goullé, "Place des Analyses Toxicologiques," *Réanimation* 15 370–373, 2006
- [4] S. Ginolhac, M. Moulisma, G. Lardet, J.J. Valloisp, "Développement d'une Méthode de Dépistage Toxicologique Large dar HPLC/DAD : Comparaison de Trois Méthodes D'extraction du Sérum, Extraction Liquide-Liquide et Extractions Solide-Liquide (Bond Elut Certify® et OASIS® MCX)," *Toxicologie Analytique*, vol. XIII, n° 2, 2001.
- [5] P. Lheureux, K. Maes, R. Askenasi, "Du Bon Usage du Laboratoire de 1re Partie : Aspects techniques," *Réan. Urg.*, 5 (2), 87-95, 1996.
- [6] F. Vincent, V. Danel, "Quelle Collaboration Clinico-Biologique pour La Prise En Charge des Intoxications Aiguës ?," *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XII, n° 4, 2000.
- [7] H. Chaoui, N. Rhalem, R. Aghandous, I. Semlali, L. Ouammi, R. Soulaymani-Bencheikh, "Rapport des Cas D'intoxications Déclares Au Centre Anti Poison Du Maroc Au Cours De L'année 2012," *Toxicologie Maroc - N° 19 - 4ème trimestre 2013*.
- [8] N. Badrane, F. Abadi, L. Ouammi, R. Soulaymani-Bencheikh, "Intoxications Médicamenteuses au Maroc Données du Centre Anti Poison du Maroc (1980-2008)," *Toxicologie Maroc - N° 7 - 4ème trimestre 2010*.
- [9] C. Dehan, C. Ponchel, M. Oliver, S. Bohand, J.L. Moalic, M. Chevrier, J. P. Carpentier, A. M. Pauli, "Apport du screening toxicologique par CLHP/BD (1) Lors d'intoxications médicamenteuses," *Revue Française des Laboratoires*, N ° 336, octobre 2001.
- [10] B. Brunet, N. Venisse, Y. Papet, P. Mura, "Pertinence de l'immunochimie pour les services d'urgence hospitalière," *Ann Toxicol Anal.*; 21(1): 37-43, 2009.