

Article original / Original article

Intoxication non létale par la Méthoxétamine : confirmation analytique à l'aide d'un système d'extraction en ligne Turboflow[®] couplé à de la LC/MS/MS

A non fatal intoxication with Methoxetamine: analytical confirmation with a Turboflow[®] on-line extraction coupled with LC/MS/MS

Emuri Abe¹, Florian Ricard¹, Philippe Charlier², Geoffroy de la Grandmaison², Jean-Claude Alvarez^{1,*}

¹ Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, AP-HP, Hôpital Raymond Poincaré, 104 boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

² Département de Médecine Légale et d'Anatomo-Pathologie, AP-HP, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, UFR Médecine PIFO, 104 boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

Résumé – Objectif : Entièrement automatisable et couplé à la spectrométrie de masse, l'extraction en ligne est un outil alliant rapidité et sensibilité. Le but de cette étude a été de développer une méthode de dosage dans le plasma d'un analogue structural de la kétamine, la méthoxétamine (MXE), par LC/MS/MS précédée d'une extraction en ligne utilisant le système Turboflow[®]. **Méthodes :** 100 µL de plasma sont ajoutés au même volume d'une solution de travail de kétamine-d4 dans l'acétonitrile utilisé comme étalon interne (EI). Après centrifugation, 20 µL du surnageant sont injectés sur une colonne d'extraction C18 XL (50 × 0,5-mm). Les analytes retenus sont transférés de la colonne d'extraction vers une colonne analytique Hypersil GOLD (50 × 3-mm ; diamètre des particules : 3 µm) puis élués grâce à un gradient de phase mobile tampon formiate/acétonitrile. La MXE et l'EI sont ionisés grâce à une source électrospray en mode positif. Les ions parents [M + H]⁺ sont *m/z* 248,1 pour la MXE et *m/z* 242,1 pour l'EI. L'ion fils le plus abondant après fragmentation est utilisé pour la quantification, soit *m/z* 203,1 pour la MXE et 224,1 pour l'EI. **Résultats :** La justesse est comprise entre 96,8 % et 108,8 % et les CV intra- et inter-jour <8,8 % sur l'ensemble de la gamme de calibration de 2,0 ng/mL (LOQ) jusqu'à 1000,0 ng/mL. Aucun effet matrice n'a été observé. **Conclusion :** Le système Turboflow[®] couplé à la LC/MS/MS permet une quantification rapide de composés comme la MXE dans le plasma sans extraction préalable et sans effet matrice. Cette méthode a permis avec succès la confirmation analytique d'une intoxication aiguë à la MXE, montrant chez le patient une concentration plasmatique de 136,0 ng/mL.

Mots clés : Extraction en ligne, CL-SM/SM, méthoxétamine, drogues de synthèse

Abstract – Introduction: Fully automated, and coupled with a mass spectrometric detection, on-line extraction is a very powerful and less time consuming tool than the classical extraction techniques. The objective of this study was to develop an on-line automated sample preparation using a Turboflow[®] device coupled to a LC/MS/MS for measurement of methoxetamine (MXE) in human plasma. **Methods:** Samples (100 µL) were vortex mixed with internal standard solution (ketamine-d4 in acetonitrile). After centrifugation, 20 µL of the supernatant were injected onto a 50 × 0.5-mm C18XL column. The retained analytes were then back-flushed onto a 50 × 3-mm (3 µm) Hypersil GOLD analytical column, then eluted with formate buffer/acetonitrile gradient. MXE and IS were ionized by electrospray in positive mode. Parent [M + H]⁺ ions were *m/z* 248.1 for MXE and *m/z* 242.1 for IS. The most intense product ion of MXE (*m/z* 203.1) and IS (*m/z* 224.1) were used for quantification. **Results:** The assay was accurate ([96.8% – 108.8%] range) and precise (intra- and inter-day coefficient of variation <8.8%) over the range of 2.0 (LOQ) to 1000.0 ng/mL (upper limit of quantification). No matrix effect was observed. **Conclusion:** Turboflow[®] device coupled with LC/MS/MS allows rapid determination of compounds like MXE in plasma without extraction and without matrix effect. This method has been successfully applied to one case report after acute intoxication, showing a plasma concentration of 136 ng/mL.

Key words: On-line extraction, LC-MS/MS, methoxetamine, designer drugs

Reçu le 27 octobre 2012, accepté après modifications le 5 février 2013

Publication en ligne le 3 mai 2013

* Correspondance :

Jean-Claude Alvarez, jean-claude.alvarez@rpc.aphp.fr

1 Introduction

L'émergence de nouvelles drogues de synthèse, mieux connues sous leurs appellations anglo-saxonnes *designer drugs*, *research chemicals* ou encore *legal highs* impose au toxicologue analyste un nouveau défi. En même temps que l'apparition très rapide de ces nouvelles drogues de synthèse, le toxicologue doit, en parallèle, faire évoluer ses techniques de dépistage et de reconnaissance de ces nouveaux composés afin d'être toujours performant dans leur identification. Les techniques offertes aux toxicologues analystes ne cessent d'évoluer en terme de sensibilité et de spécificité grâce à la spectrométrie de masse. Mais outre la phase de détection, la phase de préparation de l'échantillon a également évolué ces dernières années par le développement de systèmes d'extraction dit « en ligne ».

L'extraction en ligne de type Turboflow[®] repose sur un système simple et entièrement automatisable où une faible quantité de prise d'essai – suivant ou non une préparation d'échantillon, souvent une précipitation – est directement injectée dans une colonne dite « d'extraction » soumise à un flux turbulent généré par un débit élevé de phase mobile de l'ordre du mL/min [1]. En aval de la colonne d'extraction est positionnée une colonne dite « d'élution » où les molécules d'intérêt sont séparées puis détectées comme lors d'une chromatographie classique. Avec un système de détection tel que la spectrométrie de masse en tandem en sortie de colonne, le système dans son ensemble conjugue la rapidité de l'extraction en ligne et la sensibilité de détection offerte par la spectrométrie de masse, ce qui en fait un outil très précieux. Cet outil s'adapte particulièrement bien dans un laboratoire de toxicologie hospitalière car il permet une réponse très rapide dans le temps et assure un diagnostic biologique fiable et rapide.

Les consommateurs de produits psychoactifs à travers l'Europe et particulièrement en Grande Bretagne [2–5] semblent manifester un intérêt croissant pour la méthoxétamine (MXE) qui est apparue pour la première fois en 2010 [6]. Le plus souvent, les voies d'administration utilisées sont la voie orale ou la voie nasale par insufflation [7] mais d'autres voies d'administration telles que les voies intramusculaire, intraveineuse ou encore rectale ont été décrites [8]. La structure chimique de la MXE, de type arylcyclohexylamine, est très proche de la kétamine dans la mesure où seulement 2 groupements chimiques diffèrent entre les molécules : le groupement 2-chloro de la kétamine a été remplacé par un groupement 3-méthoxy sur le cycle phényle et le groupement N-méthyle par un groupement N-éthyle sur l'amine (figure 1). Analogue de la kétamine, la MXE agirait comme cette dernière, en conjuguant un effet antagoniste des récepteurs NMDA et un effet inhibiteur de la recapture de la dopamine [6, 7]. Plus lipophile que la kétamine, la MXE semble avoir un délai d'action et une demi-vie plus longue par rapport à son analogue structural. La kétamine et ses analogues tels que la MXE sont utilisés comme drogues récréatives pour leurs effets dissociatifs et hallucinogènes [8].

Les signes cliniques d'une intoxication par la MXE sont peu connus et la plupart des études se contentent de décrire les symptômes ressentis par les usagers qui décrivent leurs expériences sur les forums de discussions ou les sites dédiés comme le site Erowid [7]. Parmi ces symptômes, une confusion, une

analgésie, des signes d'anxiété et des effets en rapport avec l'activation du système nerveux sympathique [9] tels qu'une hypertension, une tachycardie ou encore une mydriase sont les plus décrits. En fait, ces symptômes sont largement compatibles avec ceux observés lors d'une intoxication à la kétamine [7, 10]. Au vu de l'absence d'étude pharmacologique, certains auteurs se sont proposés de collecter des données à travers plusieurs sources et notamment auprès des acquéreurs de ces substances sur Internet afin de mieux appréhender leur toxicité aiguë [11]. En 2012, la MXE a fait partie d'une étude présentant un aperçu sur la chimie des *legal highs* destinée au toxicologue [12]. Les études les plus récentes présentent le plus souvent une description clinique des cas d'intoxications à la MXE [9, 10, 13]. À travers ces études, la MXE a été identifiée – mais non quantifiée – dans des échantillons de sérum grâce à une technique de criblage toxicologique [10] par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) ou par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) après avoir acheté la drogue sur Internet [8]. Des concentrations sériques de MXE ont été récemment décrites dans le même laboratoire par CG-SM [9, 13]. Néanmoins, aucune de ces études ne concerne la description et la validation d'une méthode efficace permettant l'identification et la quantification de la drogue dans un échantillon biologique. Suite à un cas d'intoxication suspectée par la MXE, nous avons développé puis validé une méthode automatisée utilisant le principe de l'extraction en ligne couplée à de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse en tandem permettant la détection et la quantification rapide de la MXE dans le plasma.

2 Matériels et méthodes

2.1 Substances et réactifs

Le chlorhydrate de MXE, poudre blanche et soluble dans le méthanol [2-(3-méthoxyphényl)-2-(éthylamino)cyclohexanone] (figure 1, C₁₅H₂₁NO₂, masse monoisotopique : 247,3 g/mol) et l'étalon interne (EI), le chlorhydrate de kétamine-d₄ (figure 2, C₁₃H₁₃Cl₂D₄NO, masse monoisotopique : 278,2 g/mol) ont été fournis auprès de LCG Standards (Molsheim, France). L'acétonitrile (de qualité HPLC), le formiate d'ammonium et l'acide formique ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Paris, France). Le méthanol (de qualité HPLC) a été obtenu auprès de Prolabo (Paris, France). L'eau ultra-pure employée a été obtenue après ultrafiltration par un appareil Direct-Q UV3 (Millipore Corp., Molsheim, France). Tous les autres réactifs étaient de qualité analytique.

2.2 Solutions de travail, standards de calibration et contrôles de qualité

Les solutions mères de MXE (1,0 g/L) et d'étalon interne (100,0 mg/L) ont été préparées par dilution dans le méthanol. Les solutions de travail de MXE pour les standards de calibration (CS) ont été préparées à trois différentes concentrations (1,0 – 0,1 et 0,01 mg/L) par dilution de la solution mère dans le méthanol. Les trois mêmes niveaux de concentrations de

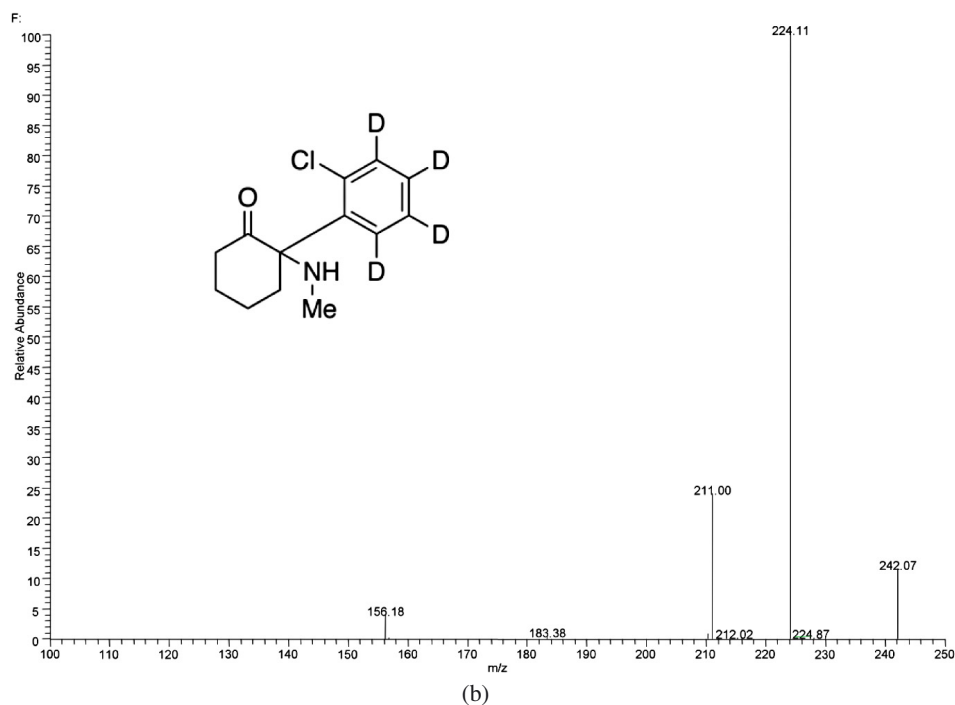
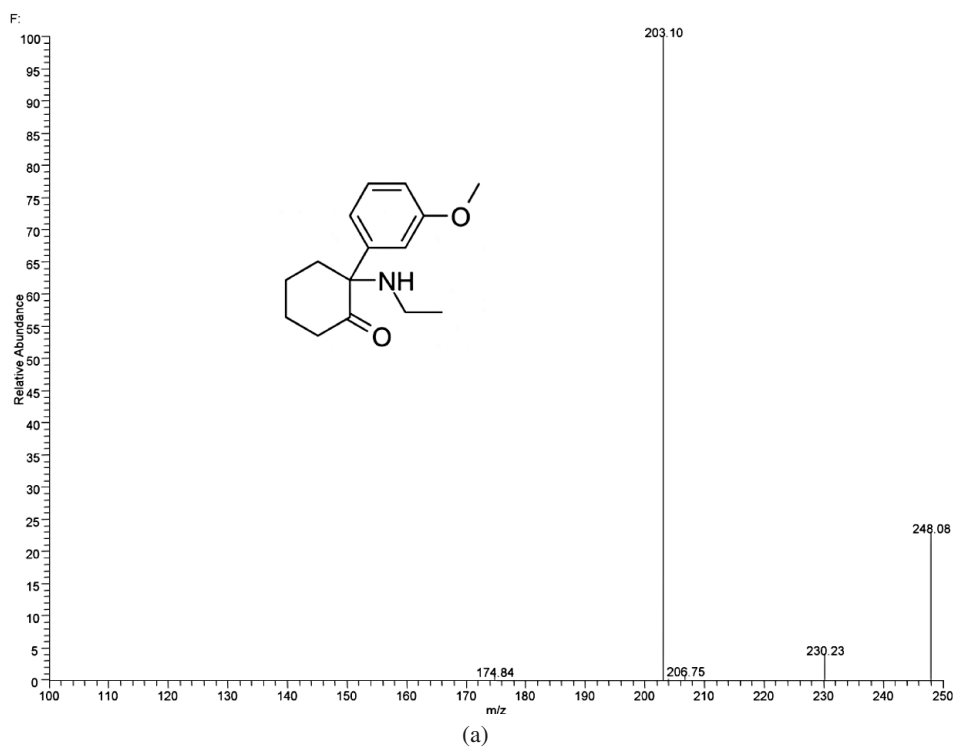


Fig. 1. Structures chimiques et spectres de masse obtenus pour (a) la méthoxétamine et (b) la kétamine-d4.

solutions de travail de MXE ont également été préparés pour les contrôles de qualités internes (CQ). La solution de travail d'étalon interne (0,5 mg/L) a été préparée par dilution de la solution mère dans l'acétonitrile.

Les courbes de calibration ont été obtenues par ajout de volumes appropriés des solutions de travail mentionnées précédemment soit à du plasma vierge de substance afin d'obtenir

les points de calibration correspondant aux concentrations de 2,0 – 5,0 – 10,0 – 20,0 – 50,0 – 100,0 – 200,0 – 500,0 et 1000,0 ng/mL. Les échantillons destinés aux contrôles de qualité ont également été préparés dans les mêmes matrices vierges aux concentrations de 3,0 – 30,0 – 300,0 et 750,0 ng/mL. Les échantillons de plasma humains collectés sur anticoagulant Acid Citric Dextrose (ACD) utilisés pour

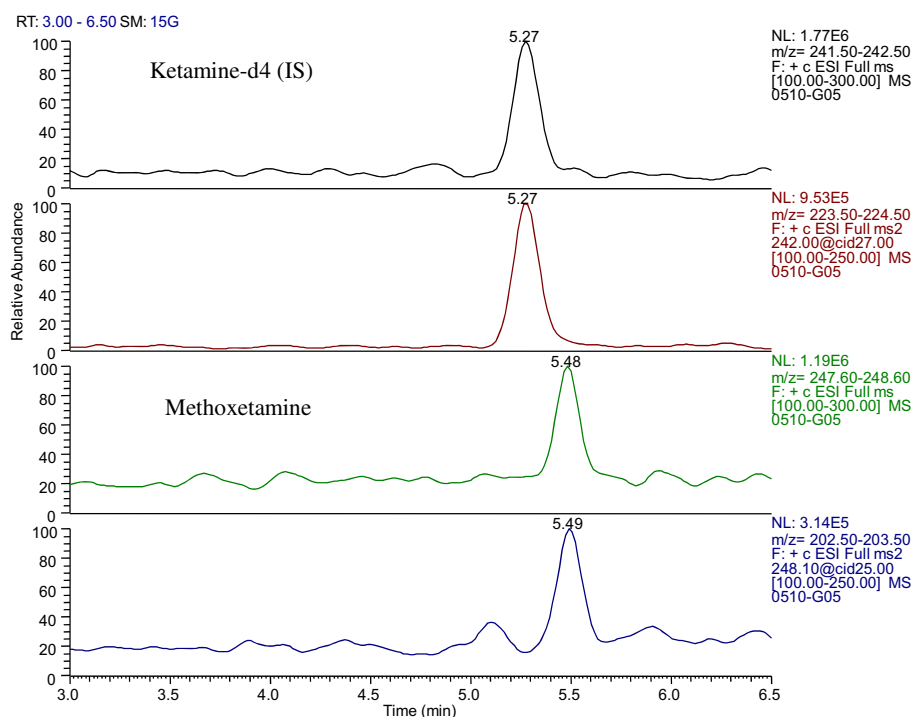


Fig. 2. Chromatogrammes d'un plasma vierge surchargé avec 5,0 ng/mL de méthoxétamine. De haut en bas : les chromatogrammes de l'ion parent $m/z = 242,1$ et son ion fils $m/z = 224,1$ de la kétamine-d4, l'ion parent $m/z = 248,1$ et son ion fils $m/z = 203,1$ de la méthoxétamine.

le développement, la validation et la préparation des gammes d'étalonnage ont été fournis par l'Établissement Français du Sang (EFS, Versailles, France). Les solutions de calibration et les aliquotes de contrôles de qualité ont été conservés à -20°C .

2.3 Préparation des échantillons

Cent μL de la solution de travail d'EI dans l'acétonitrile (0,5 mg/L) sont ajoutés à chaque tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 100 μL de plasma. Après mélange au vortex et centrifugation (14,000 g, 10 min), 50 μL du surnageant sont transférés dans des vials placés dans le passeur d'échantillons automatique.

2.4 Instrumentation et conditions d'analyse

Le système Turboflow[®] est un système Cohesive Aria TLX-1 (version 1.1.1 ThermoFisher Scientific) équipé d'un module à 12 colonnes, 6 colonnes d'extraction et 6 colonnes analytiques, une pompe quaternaire pour les colonnes d'extraction, une pompe binaire pour les colonnes analytiques et d'un passeur d'échantillons automatique CTC PAL 2.2.0. La pompe quaternaire permet de délivrer une phase mobile constituée d'un mélange d'une solution de formiate d'ammonium 5 mM (B) et d'acétonitrile (C). La pompe binaire permet quant à elle de délivrer une phase mobile constituée d'un mélange de tampon formiate d'ammonium/acide formique 2 mM à pH = 3,8 (A) et d'acétonitrile (C). L'ensemble du système est contrôlé par le logiciel Aria operating (v1.1.1).

Au cours de la première étape, 20 μL du surnageant obtenu après préparation de l'échantillon sont injectés sur une colonne Turboflow[®] C18XL soumise à un flux turbulent (100 % B, 2,0 mL/min, 30 s). Lors de la deuxième étape, l'analyte retenu est décroché de la colonne Turboflow[®] grâce à un solvant d'élution (A/C, v/v : 90/10) conservé dans une boucle et focalisé grâce au té (position ouverte) sur la colonne analytique C18 Hypersil GOLD (50 \times 0,5 mm (diamètre interne), diamètre des particules = 3 μm ; ThermoFisher Scientific). À la troisième étape, pendant le gradient de phase mobile sur la colonne analytique (A/C, v/v : 90/10 à 60/40), la colonne Turboflow[®] est lavée par le solvant C (100 %) afin d'éviter toute contamination lors de l'injection suivante. La boucle est remplie à nouveau à la quatrième étape par le mélange constituant le solvant d'élution (A/C, v/v : 30/70) tandis que la séparation chromatographique se poursuit sur la colonne analytique. À la cinquième étape, la colonne d'extraction est rééquilibrée par 100 % de la solution B. Avant la rééquilibration de la colonne analytique (étape 7), la composition de la phase mobile est inversée (étape 6) de manière à éliminer les interférences avant la prochaine injection. La durée totale de l'analyse est ainsi inférieure à 10 minutes, incluant la rééquilibration de la colonne. Les éluants sont dirigés vers la poubelle (té fermé) les deux premières minutes suivant chaque injection sur la colonne Turboflow[®] et l'acquisition des données chromatographiques SM/SM est réalisée de la deuxième minute jusqu'à 6,5 min. Les gradients d'élution et les positions des valves sont résumés dans le tableau I.

Les composés sont détectés par spectrométrie de masse grâce à un détecteur ThermoFisher Scientific LCQ Deca XP Plus de type trappe d'ions, équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). L'azote (N_2) (N2MID350, générateur

Tableau I. Méthode TurboFlow CL-SM/SM de la méthoxétamine en 7 étapes.

Étape	Pompe du système TurboFlow							Pompe du système analytique				
	Début (min:s)	Temps (s)	Débit (mL/min)	Gradient	%C	%C	Té	Boucle	Débit (mL/min)	Gradient	%A	%B
1	00:00	30	2,00	Step	100,0		Out	Out	0,75	Step	90,0	10,0
2	00:50	90	0,30	Step	100,0		In	In	0,55	Step	90,0	10,0
3	02:00	90	0,50	Step		100,0	Out	In	0,25	Ramp	60,0	40,0
4	03:50	90	2,00	Step	30,0	70,0	Out	In	0,25	Step	60,0	40,0
5	05:00	90	0,50	Step	100,0		Out	Out	0,25	Step	60,0	40,0
6	06:50	60	0,50	Step	100,0		Out	Out	0,25	Ramp	10,0	90,0
7	7:50	120	0,50	Step	100,0		Out	Out	0,25	Step	90,0	10,0

d'azote, Parker Hannifin France SAS, Contamine-sur-Avre, France) est employé comme gaz de nébulisation ainsi que comme gaz auxiliaire à une pression de 30 et 5 unités arbitraires, respectivement. La source ESI est configurée en mode d'ionisation positive, et un potentiel d'ionisation de +4,0 kV a été appliqué. Le scan time est de 0,03 ms⁻¹. La température du capillaire est fixée à 250 °C avec un voltage de +15,0 V. Les réglages du système sont optimisés par infusion continue d'une solution de MXE à 1 mg/L dans le tampon NH₄COOH pH 3,8/acétonitrile (20 :80, v/v) au débit de 3 µL/min. L'acquisition des données a été réalisée en mode « full-scan MS/MS ». Les formes protonnées [M + H]⁺ des ions moléculaires de la MXE (*m/z* = 248,1) et de l'étalon interne (*m/z* = 242,1) sont retenues dans la trappe avec une résolution de masse de 1,0 unité de masse atomique (amu) puis fragmentées avec un temps d'activation de 30 ms et une énergie de collision de 25 % et 27 %, respectivement. L'ion fils le plus abondant après fragmentation est utilisé pour la quantification soit *m/z* 203,1 pour la MXE et 224,1 pour l'EI (figure 1).

L'acquisition des données chromatographiques est réalisée à l'aide du logiciel Xcalibur (v 2.0.7, ThermoFisher Scientific). Pour la quantification de la MXE, le logiciel LCQuan (v 2.5.6, ThermoFisher Scientific) est utilisé.

2.5 Procédure de validation de la méthode

La méthode a été validée pour la sélectivité, la linéarité, la sensibilité, la justesse et la précision, l'effet matrice et le rendement d'extraction selon les recommandations de la *US Food and Drug Administration*.

2.5.1 Spécificité, contamination

Dans le but d'étudier si les constituants endogènes de la matrice provoquaient des interférences avec la technique de dosage, des échantillons vierges ne contenant ni MXE ni étalon interne (blanc), des échantillons contenant uniquement l'étalon interne (zéro), et des échantillons correspondant à la limite inférieure de quantification (LLOQ) ont été analysés selon la procédure décrite précédemment. La spécificité du dosage a été définie comme l'absence dans les échantillons vierges d'interférence aux temps de rétention et sur les canaux ioniques correspondant à la MXE et à l'étalon interne. Dans chaque série d'analyse, un échantillon vierge a aussi été injecté

dans le système chromatographique immédiatement après le passage d'un échantillon correspondant au standard de calibration le plus élevé pour évaluer la contamination potentielle entre deux injections consécutives. D'autre part, les concentrations plasmatiques et sériques après surcharge par MXE ont été déterminées chez quinze patients choisis au hasard pour évaluer l'influence du type de recueil des prélèvements. Le sérum a été obtenu par prélèvement sur tube sec et les plasmas ont été obtenus après prélèvements sur trois anticoagulants : héparinate de lithium, ethyle diamine tetra acetic acid (EDTA) et fluorure de sodium.

2.5.2 Linéarité

Un échantillon vierge ou blanc, un point zéro et neuf standards de calibration dans l'intervalle de concentration suivant : 2,0 ng/mL (limite de quantification inférieure (LLOQ)) à 1000,0 ng/mL (limite de quantification supérieure (ULOQ)) ont été traités pour l'obtention de chaque courbe de calibration. Dix courbes de calibration obtenues sur une période de vingt et un jours ont été analysées pour la détermination du modèle mathématique de régression le plus approprié. Le meilleur modèle entre les régressions linéaires et quadratiques a été défini en utilisant divers facteurs de pondération (ex. : $1/x$ et $1/x^2$). L'équation aboutissant au plus faible et plus reproductible pourcentage de biais total par rapport aux valeurs théoriques des standards de calibration a été retenue. La méthode de l'étalon interne a été utilisée pour la quantification des concentrations de MXE : les ratios [MXE]/[étalon interne] ont été rapportés à la concentration théorique. Pour la validation du modèle, les concentrations recalculées des standards de calibration devaient être comprises entre 85 % et 115 % de la concentration théorique correspondante.

2.5.3 Limite de quantification inférieure

La LLOQ a été définie comme la concentration la plus faible pour laquelle une justesse comprise entre 80 % et 120 % et une précision avec un coefficient de variation de ±20 % pouvaient être obtenues sur dix mesures.

2.5.4 Limite de détection

La limite de détection (LOD) a été définie comme la concentration la plus faible pour laquelle le spectre MS/MS

de la MXE a pu être identifié avec un rapport signal sur bruit supérieur à 3.

2.5.5 Justesse et précision

La justesse (valeur mesurée/valeur théorique $\times 100\%$) et la précision (coefficient de variation = écart type des valeurs mesurées/valeur théorique $\times 100\%$) ont été déterminées pour les quatre niveaux de contrôles de qualité. Pour l'étude de la variabilité intra-jour, dix échantillons de chaque niveau de contrôle de qualité ont été analysés le même jour. Pour l'étude de la variabilité inter-jour, chaque niveau de contrôle de qualité a été analysé dix fois, trois jours différents, sur une période de deux semaines. Une justesse comprise entre 85 % et 115 % des valeurs théoriques avec un coefficient de variation de $\pm 15\%$ devaient être obtenus, excepté pour la LLOQ pour laquelle un intervalle de 80 % à 120 % et un coefficient de variation de $\pm 20\%$ pouvaient être acceptés pour la justesse et la précision, respectivement.

2.5.6 Rendement d'extraction et effet matrice

Dans le but d'évaluer le rendement d'extraction, des solutions aqueuses de MXE (5,0 – 50,0 et 500,0 ng/mL) ont été préparées avec l'étalon interne. Après l'étape de précipitation, les solutions préparées ont été (1) soumises à la méthode Turboflow[®] en intégralité et (2) analysées en court-circuitant le système Turboflow[®] (c'est-à-dire en injectant directement dans la colonne analytique). La moyenne des aires des pics chromatographiques obtenus après la procédure Turboflow[®] complète a été comparée à celle observée après injection directe dans la colonne analytique, cette dernière représentant théoriquement un rendement de 100 %. Pour être satisfaisantes, les valeurs obtenues pour l'étalon interne ne devaient pas excéder $\pm 15\%$ de variation par rapport à celles de la MXE.

Trois autres solutions aux mêmes concentrations ont été préparées dans le plasma vierge. Pour évaluer l'effet matrice, après l'étape de précipitation, les solutions plasmatiques et aqueuses ont été soumises à la procédure Turboflow[®] complète. La moyenne des aires des pics chromatographiques observée avec les solutions plasmatiques a été comparée avec celle observée avec les solutions aqueuses.

2.6 Application à un cas clinique

Cette méthode analytique a été développée à l'occasion d'une demande d'un hôpital extérieur où une intoxication par la MXE a été suspectée. À notre connaissance, ce cas représente le premier décrit dans notre pays. Le sujet est un jeune étudiant de 24 ans avec des antécédents de dépression et de consommation de substances illégales telles que la kétamine, la cocaïne ou encore le cannabis. Il a été retrouvé sur une place publique par les pompiers au milieu de la nuit. Hospitalisé, il a été rapidement orienté vers un service de réanimation médicale. L'examen clinique a révélé une désorientation spatio-temporelle avec amnésie, nystagmus et mydriase bilatérale. Un accident vasculaire cérébral a été suspecté mais aucune anomalie n'a été retrouvée au scanner cérébral. Le personnel soignant ayant retrouvé un petit étui en plastique contenant une

fine poudre blanche accompagnée d'une paille, une intoxication a rapidement été suspectée. Des échantillons d'urine et de sang ont alors été collectés à l'admission correspondant à quelques heures après l'absorption afin de pratiquer des examens toxicologiques.

3 Résultats

3.1 Analyse par Turboflow[®] et LC-MS/MS

Après optimisation des conditions chromatographiques et spectrométriques, la MXE et l'EI ont été élués avec des temps de rétention respectifs de 5,2 et 5,5 min. La figure 2 représente le chromatogramme obtenu après extraction d'un standard de calibration à 5,0 ng/mL.

3.2 Validation de la méthode

3.2.1 Spécificité et contamination

Aucune interférence endogène de sérum vierge et de plasma de patients hospitalisés n'a été observée aux temps de rétention et aux spectres de la MXE et de l'EI. Quand un échantillon blanc a été analysé directement après le plus haut point de gamme, la contamination moyenne était inférieure à la limite de détection pour la MXE et inférieure à 0,2 % de l'EI (données non exposées). Aucune interférence n'a été mise en évidence pour le sérum, les différents anticoagulants testés ni sur les échantillons hémolysés.

3.2.2 Linéarité et limite de quantification

Le meilleur modèle mathématique déterminé pour l'interprétation des courbes de calibration est une équation de type linéaire pondérée par l'inverse de la concentration ($1/x$). La gamme de calibration à neuf points montre une bonne linéarité entre 2,0 et 1000,0 ng/mL avec un coefficient de corrélation s'étendant de 0,9970 à 0,9998. Le coefficient de variation inter-jour s'est étendu de 1,4 à 15,5 % et le biais de 0,1 à 8,9 % pour les concentrations calculées des neuf points de gamme. La LLOQ a été établie à 2,0 ng/mL avec un coefficient de variation de 15,5 %, une justesse de 100,9 % et un rapport signal sur bruit (S/B) supérieur à 10. La ULOQ a été déterminée à 1000,0 ng/mL. Des dilutions au demi et au dixième des CQ ont été testées et les concentrations calculées des CQ dilués n'ont pas montré d'écart de justesse par rapport aux concentrations théoriques.

3.2.3 Limite de détection

La limite de détection a été établie à 1,0 ng/mL avec un S/B supérieur à 3.

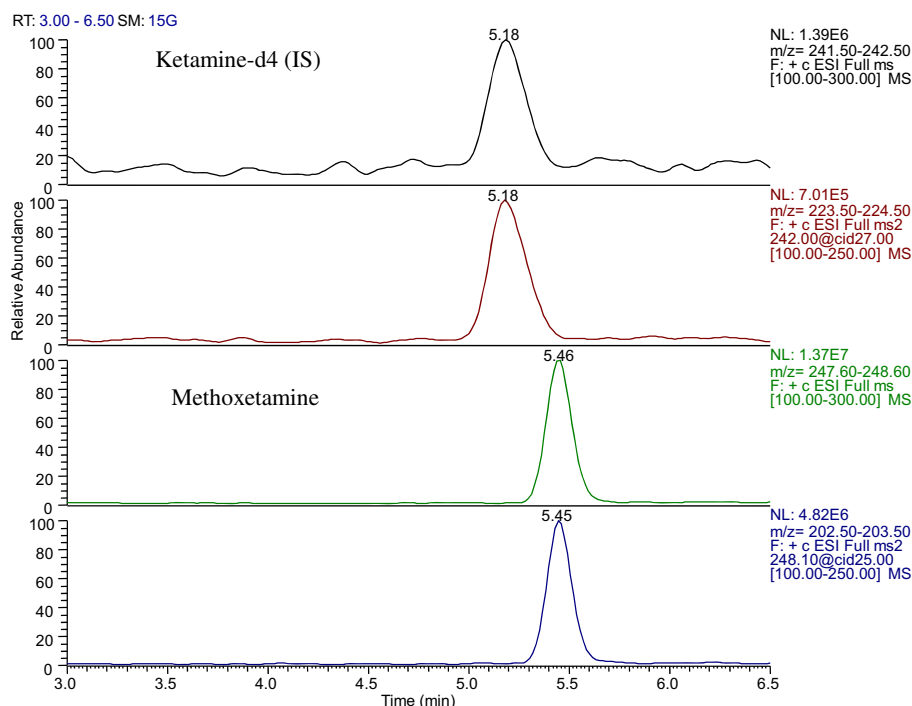


Fig. 3. Chromatogrammes obtenus après extraction du plasma de notre patient. La concentration en méthoxétamine est de 136,0 ng/mL. De haut en bas : les chromatogrammes de l'ion parent $m/z = 242,1$ et son ion fils $m/z = 224,1$ de la kétamine-d4, l'ion parent $m/z = 248,1$ et son ion fils $m/z = 203,1$ de la méthoxétamine.

Tableau II. Précision et justesse obtenus avec les échantillons de CQ de la méthoxétamine.

	Concentrations des CQ (ng/mL)			
	3	30	300	750
Précision intra-jour %	7,5	4,4	6,5	4,0
Justesse intra-jour %	102,7	106,1	104,8	98,9
Précision inter-jour %	8,8	8,7	3,2	7,1
Justesse inter-jour %	103,5	106,7	104,8	98,4

3.2.4 Précision et justesse

Les valeurs de la précision et de la justesse intra-jour et inter-jour pour les contrôles de qualité sont résumées dans le tableau II. La précision intra-jour a été comprise entre 4,0 et 7,5 % avec une justesse comprise entre 96,8 et 108,8 % ; la précision inter-jour s'est étendue de 3,2 à 8,8 % avec une justesse comprise entre 98,4 et 106,7 %.

3.2.5 Effet matrice et rendement d'extraction

Dans le plasma, l'effet matrice et le rendement d'extraction ont été indépendants de la concentration de MXE (tableau III). L'effet matrice s'est étendu de 3,0 à 10,0 % et le rendement d'extraction par la colonne Turboflow® de la MXE a été compris entre 86,0 et 91,0 %. L'effet matrice de l'EI a été inférieur à 4 % et le rendement d'extraction de l'étalon interne a été compris entre 89,0 et 92,0 %.

Tableau III. Effet matrice et rendement d'extraction de la méthoxétamine et de l'étalon interne.

	Effet matrice (%)	Rendement d'extraction (%)
Méthoxétamine		
5 ng/mL	-3	91
50 ng/mL	+10	86
500 ng/mL	-10	88
Kétamine-d4 (EI)		
5 ng/mL	+4	92
50 ng/mL	-4	89
500 ng/mL	-5	89

3.3 Application au cas clinique

Cette méthode validée a été appliquée avec succès sur l'échantillon de plasma de notre patient et a permis la quantification de la MXE à une concentration de 136,0 ng/mL. Une concentration en paracétamol à 1 µg/mL a également été retrouvée. La figure 3 montre le chromatogramme obtenu après extraction de 100 µL d'échantillon plasmatique. La pureté de la MXE dans la poudre a été de 35 %, associée à 20 % de paracétamol. Aucun autre pic n'a été observé.

4 Discussion

Nous rapportons ici une méthode de dosage validée de la MXE en utilisant de la LC/MS/MS précédée par une extraction en ligne utilisant le système Turboflow®. Concernant l'analyse

chromatographique en elle-même, l'utilisation d'une trappe à ions pour la détection en spectrométrie de masse est apparue intéressante lorsqu'il faut rechercher des nouveaux composés tels que les nouvelles drogues de synthèse étant donné que leur formule chimique est parfois inconnue et que cette technologie permet l'obtention d'un spectre complet de fragmentation avec une bonne sensibilité. Le choix d'un étalon interne adapté est indispensable lors d'une mise au point d'une technique de CL-SM/SM. Les étalons internes les plus appropriés sont des isotopes de l'analyte étudié, souvent des isotopes deutérés, qui en règle générale ont le même comportement que l'analyte en ce qui concerne le rendement d'extraction, la chromatographie et l'effet matrice. Dans notre cas, aucun isotope de la MXE n'étant commercialisé, la kétamine-d4 a été choisie comme étalon interne en raison de sa grande analogie structurale avec la MXE. Le résultat des rendements d'extraction très proches, avec une différence inférieure à 5 %, démontre une analogie entre le comportement de la kétamine-d4 et celui de la MXE. Dans les deux études relatant d'intoxications à la MXE avec confirmation analytique [9, 13], la pyribenzamine avait été choisie comme étalon interne, présentant une structure moins similaire à la MXE que la kétamine.

Un certain nombre d'applications utilisant le système Turboflow[®] ont été décrites depuis le début des années 1990 et peuvent être appliquées en routine dans un laboratoire de toxicologie [1]. L'utilisation de l'extraction en ligne comme méthode de préparation d'échantillons dans le cadre de dosage de petites molécules est croissante, car relativement simple à utiliser, entièrement automatisable et permettant un gain de temps conséquent par rapport aux techniques d'extraction manuelles classiques, important notamment dans un contexte d'urgences hospitalières. Récemment, deux méthodes utilisant l'extraction en ligne grâce au système Turboflow[®] ont été décrites pour le suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de tyrosine kinase [14] mais également des antifongiques azolés [15].

Deux types d'applications peuvent être rencontrés lors de la mise au point d'une méthode utilisant le système Turboflow[®]. La première application, la plus ancienne, utilise le système en *Quick Elute Mode*, c'est-à-dire que le système de détection se trouve généralement directement en sortie de la colonne d'extraction. La deuxième, utilisée dans notre application et appelée *Focus Mode*, est plus appropriée pour les échantillons complexes comme les échantillons biologiques car ce mode utilise une étape dite « d'élution » après la phase d'extraction et permet ainsi une meilleure résolution entre les composés recherchés.

Il existe une grande variété de colonnes d'extraction disponibles pour le système d'extraction en ligne mais toutes reposent sur le même principe d'exclusion stérique. En imposant à la colonne d'extraction un fort débit de phase mobile (*turbulent flow*, 2,0 mL/min dans notre méthode), les petites molécules d'intérêt comme la MXE ont le temps de diffuser au sein des pores des particules de la colonne d'extraction en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire, tandis que les macromolécules comme les protéines sont directement exclues car celles-ci n'ont pas le temps de diffuser au sein des pores et donc d'interagir avec la phase stationnaire. Plusieurs colonnes Turboflow[®] sont ainsi disponibles et doivent être rigou-

reusement sélectionnées en fonction de la structure chimique du composé à extraire. Ainsi, le choix de la colonne d'extraction sera conditionné par la polarité de la molécule à extraire de la même manière que l'on choisirait le solvant qui entraînerait un rendement d'extraction optimal. Pour la MXE, molécule lipophile ($\log P = 1,92$), la colonne ainsi retenue offrant le meilleur rendement d'extraction a été une colonne Turboflow[®] C18XL (50 × 0,5 mm (diamètre interne)). Les colonnes d'extraction actuelles présentent des diamètres bien inférieurs aux colonnes initialement développées, ce qui permet ainsi de réduire la consommation de solvant utilisé pour générer le flux turbulent [1].

Dans les méthodes en LC/MS/MS, la phase d'extraction est parfois remplacée par une simple précipitation. Dans ce cas, un effet matrice est alors souvent observé notamment dans les matrices biologiques « chargées » type sang total, plasma ou sérum. L'importance du rôle des phospholipides endogènes n'est plus à démontrer dans leur participation à l'effet matrice. Certains auteurs ont démontré une diminution réellement significative du taux de phospholipides dans des échantillons plasmatiques après extraction en ligne utilisant un système Turboflow[®] en comparaison avec une simple précipitation [16, 17]. Les résultats de notre validation de méthode montrent l'absence d'effet matrice significatif, confirmant l'efficacité du système Turboflow[®] dans ce domaine.

Si certaines matrices telles que les échantillons urinaires, plasmatiques et sériques sont de bonnes candidates à l'extraction en ligne car qualifiés de matrices « simples », il est plus difficile d'envisager l'extraction en ligne d'autres matrices plus complexes comme on peut retrouver en toxicologie médico-légale telles que les viscères ou les prélèvements capillaires, ce qui représente probablement l'une des limites du système. L'autre limite se situe également au niveau de la durée de vie des colonnes d'extraction, mais celles-ci peuvent être préservées par une simple précipitation de l'échantillon biologique en amont de l'extraction en ligne, ce que nous réalisons systématiquement dans notre laboratoire. Cette précipitation préalable semble ainsi être le meilleur moyen pour allonger la durée de vie des colonnes d'extraction ainsi que le risque d'obstruction [1, 18]. Enfin, l'acquisition d'un tel appareillage doit être rigoureusement étudié car relativement coûteux à l'achat et en consommables et son investissement mérite d'être étudié sur le long terme en fonction des demandes adressées au laboratoire.

La toxicité cérébelleuse réversible a été décrite comme un des symptômes qui doit alerter les cliniciens d'une éventuelle possibilité d'intoxication par la MXE [13]. L'examen clinique de notre patient n'a pas révélé d'ataxie cérébelleuse, mais certains symptômes tels que la confusion, la mydriase et le nystagmus sont cohérents avec une intoxication par un analogue de la kétamine tel que la MXE et la plupart des études rapportent ce type de symptomatologie dans leur cas cliniques [9, 10, 13]. Notre cas clinique présentait une concentration plasmatique de MXE de 136 ng/mL. Wood et coll. ont décrit trois cas supportés par une confirmation analytique avec des concentrations sériques s'étendant de 90,0 à 200,0 ng/mL [9]. Les concentrations sériques étaient situées entre 120,0 et 200,0 ng/mL après insufflation nasale de la drogue et à 90,0 ng/mL après ingestion d'environ 200 mg de

poudre dissous dans l'eau. De plus, Shields et coll. ont décrit des concentrations sériques de MXE chez trois patients s'échelonnant entre 160,0 et 240,0 ng/mL après insufflation nasale de la drogue [13]. La MXE a été quantifiée dans ces deux études par chromatographie gazeuse avec détection en mode *Selected Ion Monitoring* (SIM) en utilisant une gamme de calibration s'étendant de 5,0 à 1000,0 ng/mL [9, 13]. Peu de données sont disponibles concernant les concentrations sanguines de MXE car les différentes descriptions d'intoxication à la MXE ne sont que rarement supportées par une confirmation analytique. Néanmoins, notre résultat semble être concordant avec les résultats des deux études précédentes.

5 Conclusion

L'extraction en ligne de type flux turbulent est une technique intéressante dans le cadre de l'analyse de petites molécules comme les médicaments ou les stupéfiants dans les échantillons biologiques, particulièrement dans un cadre d'urgences hospitalières. Dans notre cas, elle a permis une détection et une quantification très rapide de la MXE dans le plasma humain et cette méthode, entièrement validée, peut désormais être appliquée chaque fois qu'une intoxication par la MXE est suspectée afin d'obtenir rapidement une confirmation analytique.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

- Couchman L. Turbulent flow chromatography in bioanalysis: a review. *Biomed Chromatogr.* 2012; 26(8): 892–905.
- Wood DM, Hunter L, Measham F, Dargan PI. Limited use of novel psychoactive substances in South London nightclubs. *QJM* 2012.
- Schmidt MM, Sharma A, Schifano F, Feinmann C. "Legal highs" on the net-evaluation of UK-based websites, products and product information. *Forensic Sci Int.* 2011; 206(1-3): 92–97.
- Westwell AD, Hutchings A, Caldicott DG. The identification and chemical characterization of a new arylcyclohexylamine, methoxetamine, using a novel Emergency Department toxicosurveillance tool. *Drug Test Anal.* 2012.
- Misselbrook GP, Hamilton EJ. Out with the old, in with the new? Case reports of the clinical features and acute management of two novel designer drugs. *Acute Med.* 2012; 11(3): 157–160.
- Rosenbaum CD, Carreiro SP, Babu KM. Here today, gone tomorrow... and back again? A review of herbal marijuana alternatives (K2, Spice), synthetic cathinones (bath salts), kratom, *Salvia divinorum*, methoxetamine, and piperazines. *J Med Toxicol.* 2012; 8(1): 15–32.
- Corazza O, Schifano F, Simonato P, Fergus S, Assi S, Stair J, Corkery J, Trincas G, Deluca P, Davey Z, Blaszkowski U, Demetrovics Z, Moskalewicz J, Enea A, di Melchiorre G, Mervo B, di Furia L, Farre M, Flesland L, Pasinetti M, Pezzolesi C, Pisarska A, Shapiro H, Siemann H, Skutle A, Sferrazza E, Torrens M, van der Kreeft P, Zummo D, Scherbaum N. Phenomenon of new drugs on the Internet: the case of ketamine derivative methoxetamine. *Hum Psychopharmacol.* 2012; 27(2): 145–149.
- Ward J, Rhyee S, Plansky J, Boyer E. Methoxetamine: a novel ketamine analog and growing health-care concern. *Clin Toxicol (Phila).* 2011; 49(9): 874–875.
- Wood DM, Davies S, Puchnarewicz M, Johnston A, Dargan PI. Acute toxicity associated with the recreational use of the ketamine derivative methoxetamine. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(5): 853–856.
- Hofer KE, Grager B, Muller DM, Rauber-Luthy C, Kupferschmidt H, Rentsch KM, Ceschi A. Ketamine-like effects after recreational use of methoxetamine. *Ann Emerg Med.* 2012; 60(1): 97–99.
- Wood DM, Dargan PI. Novel psychoactive substances: How to understand the acute toxicity associated with the use of these substances. *Ther Drug Monit.* 2012.
- Gibbons S. "Legal highs"—novel and emerging psychoactive drugs: a chemical overview for the toxicologist. *Clin Toxicol (Phila).* 2012; 50(1): 15–24.
- Shields JE, Dargan PI, Wood DM, Puchnarewicz M, Davies S, Waring WS. Methoxetamine associated reversible cerebellar toxicity: three cases with analytical confirmation. *Clin Toxicol (Phila).* 2012; 50(5): 438–440.
- Couchman L, Birch M, Ireland R, Corrigan A, Wickramasinghe S, Josephs D, Spicer J, Flanagan RJ. An automated method for the measurement of a range of tyrosine kinase inhibitors in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 403(6): 1685–1695.
- Couchman L, Buckner SL, Morgan PE, Ceesay MM, Pagliuca A, Flanagan RJ. An automated method for the simultaneous measurement ofazole antifungal drugs in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404(2): 513–523.
- Michopoulos F, Edge AM, Theodoridis G, Wilson ID. Application of turbulent flow chromatography to the metabolic analysis of human plasma: comparison with protein precipitation. *J Sep Sci.* 2010; 33(10): 1472–1479.
- Liesener A, Karst U. Turbulent flow chromatography for the reduction of matrix effects in electrospray ionization mass spectrometry-based enzyme assays. *J Sep Sci.* 2005; 28(14): 1658–1665.
- Wu ST, Xing J, Apedo A, Wang-Iverson DB, Olah TV, Tymiak AA, Zhao N. High-throughput chiral analysis of albuterol enantiomers in dog plasma using on-line sample extraction/polar organic mode chiral liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004; 18(21): 2531–2536.