

Développement, validation et mise en application d'une méthode de criblage toxicologique dédié aux nouveaux produits de synthèse (NPS).

Auteurs : J.Bourgain, B.Gillardin, S.Boiné, L.Imbert, J.Wils, F.Lamoureux

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Service de Pharmacologie, CHU de Rouen – Rouen (France)

CHU
ROUEN NORMANDIE

Introduction

Les nouveaux produits de synthèse (NPS) sont définis, par l'Office des Nations unies contre les drogues et le crime (UNODC), comme de nouveaux stupéfiants, sous forme pure ou préparée, qui ne sont pas contrôlés et qui peuvent présenter une menace pour la santé publique (1). Fin 2021, l'EMCDDA a recensé environ 880 NPS, dont 52 nouvellement signalés en 2021, issues de diverses familles de stupéfiants tels que les cannabinoïdes, les cathinones, les opioïdes, les benzodiazépines, etc... Néanmoins, en 2020, 65% des matières

saisies étaient représentés par quelques substances : N-ethylhexedrone, 3-MMC et 3-CMC (2). La consommation de ces stupéfiants a augmentée, particulièrement démocratisée via internet et les réseaux sociaux (3). De nouvelles substances arrivent sur le marché de manière régulière, entraînant un retard, à la fois de la législation, des données clinico-biologiques disponibles et des méthodes analytiques. De manière pragmatique, le dépistage peut se concentrer sur les stupéfiants les plus fréquemment impliqués dans les cas

d'intoxication et de mésusage. La Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) propose des recommandations sur la liste minimale des NPS les plus courants à dépister (4). L'objectif est de développer un criblage toxicologique qualitatif dédié aux NPS sur matrice urinaire. La méthode de validation est détaillée par la suite, conformément aux recommandations de la norme ISO 15189 et des sociétés savantes, ainsi qu'une mise en application concrète sur des échantillons.

Matériels et méthodes

Réactifs :

Les contrôles externes de qualité (EEQ) sont fournis par la SFTA. Les lots de 2021 et 2022 sont sous la forme de 4 flacons comprenant chacun 5 NPS différents, sous forme de poudres solubilisées dans du méthanol et conservées à -80°C entre les tests. Les concentrations théoriques de chaque molécule sont de 500 ou 1000 µg/mL, l'échantillon 2022-B n'est pas quantifié.

La solution étalon est un mélange de 80% de méthanol et de 20% de sulfate de zinc, 3 étalons internes deutérés sont ajoutés, le Δ-9-tétrahydrocannabinol-d3, diazepam-d5, morphine-d3 à une concentration de 50 ng/mL.

La phase mobile utilisée en chromatographie est composée d'un mélange A, de méthanol et d'acide formique (0,2%), et d'un mélange B de formate d'ammonium à 2 nmol/L et d'acide formique (0,2%).

Préparation échantillons :

- Prélèvement 100 µL de l'échantillon
- Ajout 200 µL solution étalon
- Vortex et centrifugation 5 minutes à 16000g
- Prélèvement surnageant, placé dans un vial

Instrumentation : HPLC-MS²

Le système HPLC utilisé, Shimadzu®, Kyoto, Japon, est en phase inversée avec une colonne Nucléodur Sphinx RP 3µm, Macherey-Nagel®. Le gradient d'éluion entre les solutions A et B est détaillé sur la figure.

La détection est assurée par un spectromètre de masse en tandem avec électrobulbation (ESI-MS²), 4500 QTRAP, Sciex®, Darmstadt, Allemagne.

Interprétation :

Via le logiciel Analyst®, revue de l'ensemble des NPS comparativement à un matrice vierge. Deux transitions positives sont nécessaires pour la détection d'un NPS. Les isomères tels que la 2-FA et la 4-FA sont regroupés en X-FA.

NPS	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	TR (min)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
2-FDCK (5)	222,1	109,1 / 163,1	2,8	60	10	35	15
2C-B (6)	260,0	228,1 / 243,0	3,5	60	10	35	15
2C-B-fly (7)	285	188 / 173	3,6	60	10	35	15
3-HO-PCP (8)	260,2	86,1 / 107,0	3,5	60	10	35	15
3-MeO-PCE (9)	234,2	121,0 / 189,1	3,9	60	10	35	15
4F-MDMB-BINACA (10)	364,2	219,1 / 145,0	5,6	60	10	35	15
4F-MPH (11)	252,0	83,9 / 56,0	3,4	60	10	20	15
5-MeO-DMT (12)	219,1	58,0 / 130,1	2,4	60	10	35	15
5F-MDMB-PICA (13)	377,0	232,0 / 144,0	5,6	60	10	35	15
AB-PINACA (14)	331,2	215,1 / 286,1	5,4	15	10	35	15
Etizolam (15)	343,1	314,1 / 289,1	5,0	60	10	38	15
JWH-210 (16)	370,2	183,1 / 214,2	Non connu	80	10	35	15
MDPHP (17)	290,2	135,0 / 219,1	3,8	60	10	35	15
Methoxetamine (18)	248,2	203,1 / 175,0	3,4	40	10	25	20
N-ethylhexedrone (19)	220,2	58,0 / 146,1	2,6	60	10	15	15
X-CMC (20)	198,5	58,1 / 75	Non connu	60	10	15	15
X-FA (17)	154,1	109,0 / 137,0	2,5	40	10	25	20
X-FA (17)	182,0	109,0 / 72,1	2,9	60	10	35	15
X-MEC (21)	192,1	145,0 / 119,1	3,0	50	10	27	20
X-MMC (22)	178,1	144,8 / 160,0	2,8	50	10	20	18

Tableau – Paramètres du spectromètre de masse pour les NPS testés

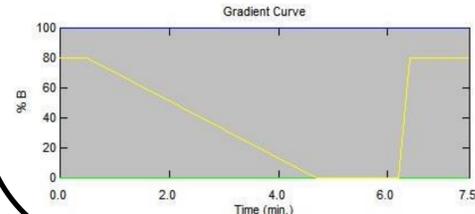
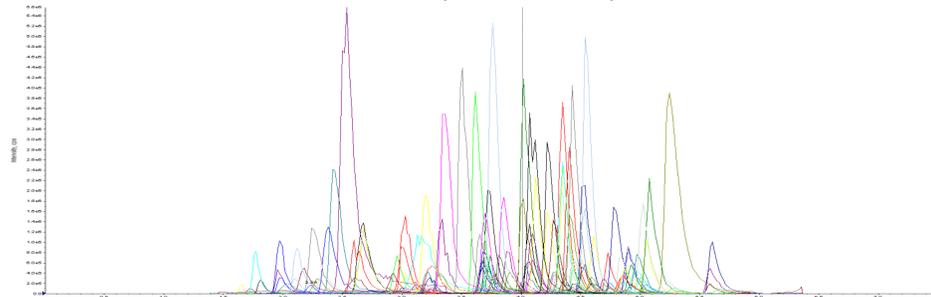


Figure – Gradient d'éluion de la phase mobile

Résultats

Répétabilité

Principe :

- 6 dosages successifs
- 4 niveaux de concentrations retenus : à 0 / 10 / 50 / 100 ng/mL
- Mesure de l'aire sous la courbe (AUC) et calcul d'un coefficient de variation (CV)

A noter : EEQ 2022-B non quantifié, le rapport de dilution reste identique.

Objectifs : CV ≤ 30%

Résultats :

- Ensemble des CV < 30% et matrice vierge : Conforme
- JWH-210 ininterprétable et X-CMC non détecté

Reproductibilité

Principe :

- 6 dosages successifs répétés sur 3 jours distincts
- 4 niveaux de concentrations retenus : à 0 / 10 / 50 / 100 ng/mL
- Mesure de l'AUC et calcul CV

A noter : EEQ 2022-B non quantifié, le rapport de dilution reste identique.

Objectifs : Détection qualitative du signal

Résultats :

- Matrice chargée positive et matrice vierge négative : Conforme
- JWH-210 ininterprétable et X-CMC non détecté

Limite de détection

Principe :

- Gamme de dilution : 0,5 ng/mL à 100 ng/mL
- Tests répétés sur 3 jours distincts
- Valeur la plus élevée retenue comme limite de détection (LD)

A noter : EEQ 2022-B non quantifié, la LD ne peut être déterminée pour le 2C-B fly, X-CMC, 3-MeO-PCE, 5F-MDMB-PICA, MDPHP.

Objectifs : LD ≤ 1 ng/mL

Résultats :

- 7 NPS avec une LD ≤ 1 ng/mL
- 7 NPS avec une LD entre 5 et 50 ng/mL
- JWH-210 ininterprétable

Contamination inter-échantillon

Principe :

- Dosages successifs de 3 échantillons à concentration élevée (100 ng/mL) et 3 à concentration faible (10 ng/mL), le tout répété 3 fois.
- Tests répétés sur 3 jours distincts
- Mesure de l'AUC et calcul CV

Objectifs : CV ≤ 15% pour les échantillons à 10 ng/mL

Résultats :

- CV > 15% pour 13 NPS
- Nécessité d'un rinçage de la colonne entre dosages successifs

Effet matrice

Principe :

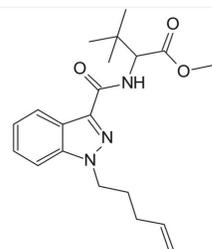
- Dosages de différents lots de matrices urinaires chargés en NPS et vierges.
- Mesure de l'AUC et comparaison par rapport au signal de la LD

Objectifs :

- Absence d'interférences
- Ou interférence ≤ 20% du signal de la LD

Résultats :

- Absence d'interférence matricielle significative
- Exception pour le JWH-210



MDMB-4en-PINACA

Application en biologie médicale

Clinique : Homme de 44 ans avec antécédent de schizophrénie. Une décompensation de psychose a nécessité une prise en charge aux urgences. Sa famille a retrouvé une substance suspecte, issue de Chine, visible sur l'illustration.

Méthode : Extraction de la substance dans du méthanol, 9,88 mg dans 10 mL de méthanol. Dilution progressive jusqu'à une concentration théorique de 100 et 1000 ng/mL. La suite du protocole est identique à celle d'une matrice urinaire décrite dans la partie matériels et méthodes.

Résultats : Détection d'un cannabinoïde de synthèse (MDMB-4en-PINACA), résultat confirmé par une analyse externalisée au CHU de Lille.



Illustration – Photographie d'un échantillon d'herbe provenant de Chine

Discussion et conclusion

Le développement et l'utilisation de criblage à la recherche de NPS sont un défi analytique en toxicologie médicale. Devant l'accès facilité aux NPS par internet, les laboratoires de biologie médicale doivent être capables de détecter ces substances. La méthode décrite dans ce travail, permet la recherche qualitative de 97 NPS dans un échantillon urinaire en moins de 10 minutes. L'utilisation des EEQ de la SFTA est une solution avantageuse à moindre coût permettant de tester une famille de NPS diversifiés. Néanmoins, ces échantillons étant un mélange de 5 NPS, on ne peut jamais exclure un risque d'interférence.

Le X-CMC n'a été détecté dans aucun test, et le JWH-210 présente une interférence matricielle rendant sa détection compliquée. Des tests complémentaires sur des substances pures permettraient de rechercher la cause du problème. La validation d'un échantillon de 18 NPS sur les 20 testés prouve la robustesse de la méthode développée ici. L'apparition et l'évolution des consommations et des recommandations sur le sujet demanderont une évolution et une flexibilité de la méthode analytique, les données recueillies ici servant de socle. Une extension de recherche sur des matrices complémentaires tels que, par exemple, le sang ou les cheveux, est envisageable.

Bibliographie

1. Panchuelo G, Gallegos A, Evans-Brown M, Christie R, Jorge R, Morales JD, et al. EU Early Warning System on NPS – 25 years. *Report européen sur les drogues. Tendances et évolutions.* 2022.
2. Miliano C, Margiani G, Rattore L, De Luca M. Sales and Advertising Channels of New Psychoactive Substances (NPS): Internet, Social Networks, and Smartphone Apps. *Brain Sciences.* 29 juin 2018;8(7):123.
3. Klotz P. Recommendations de la SFTA pour la réalisation des analyses toxicologiques impliquant des NPS – version 2021. *Toxicologie Analytique et Clinique.* mars 2022;34(1):1-3.
4. Meštrić S, Odojčić S, Biosa G, Valentinović V, Di Masi G, Chtadni F, et al. Method development for the identification of methoxetamine, 3-fluoro-deschloroketamine and deschloroketamine and their main metabolites in blood and hair and forensic application. *Forensic Science International.* juin 2021;323:110877.
5. Rocchi R, Simeoni MC, Montecassio C, Vannutelli G, Carini R, Segni M, et al. Analysis of new psychoactive substances in oral fluids by means of microextraction by packed sorbent followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* mai 2018;10(5):865-73.
6. Adamowicz P, Malczyk A. Stability of synthetic cathinones in blood and urine. *Forensic Science International.* fév 2019;295:36-45.
7. Davidson AB, Mandal M, Johansen SS, Dalgaard PW, Linnet K. In vitro and in vivo metabolism and detection of 3-HO-PCP, a synthetic phenethylamine, in human samples and pooled human hepatocytes using high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal.* juill 2020;12(7):987-93.
8. Gicquel T, Richeval C, Mesi V, Goh A, Hakim F, Pelletier R, et al. Fatal intoxication related to two new arylcyclohexylamine derivatives (2F-DCK and 3-MeO-PCE). *Forensic Science International.* juill 2021;326:110852.
9. Haschimi B, Mogler L, Haller S, Giorgini A, Schwarze B, Westphal F, et al. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 4F-MDMB-BINACA in "legal high" products and human urine specimens. *Drug Test Anal.* sept 2019;11(9):1377-86.
10. Papa P, Valli A, Di Tuccio M, Frison G, Zanarano F, Buscaglia E, et al. Analytically Confirmed Intoxication by 4-Fluoromethylphenidate, an Analog of Methylphenidate. *Journal of Analytical Toxicology.* 1 juin 2019;43(5):e1-7.
11. Ambach L, Hernandez-Rendon A, König S, Westmann W. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots: Screening of novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Test Anal.* avr 2014;6(4):367-75.
12. Mogler L, Franz F, Rentsch D, Angerer V, Weinfurter G, Longworth M, et al. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid SF-MDMB-PICA in "legal high" products and human urine samples: Detection of SF-MDMB-PICA in herbal blends and human urine. *Drug Test Analysis.* janv 2018;10(1):196-205.
13. Takayama T, Suzuki M, Todoroki K, Inoue K, Min JJ, Kikura-Hanajiri R, et al. UPLC/ESI-MS/MS-based determination of metabolism of several new illicit drugs: 4F-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, SF-QUPIC and alpha-PVT, by human liver microsomes: Metabolism of illicit drugs by LC/MS/MS. *Bioméd Chromatogr.* juin 2014;28(6):831-8.
14. Bai B, Chao S, Chao S, Picard N, Delage M, Mathieu O, et al. Characterization and identification of eight designer benzodiazepine metabolites by incubation with human liver microsomes and analysis by a triple quadrupole mass spectrometer. *Int J Legal Med.* juill 2017;131(4):979-88.
15. Cho B, Cho HS, Kim J, Sim J, Seol I, Baek SK, et al. Simultaneous determination of synthetic cannabinoids and their metabolites in human hair using LC-MS/MS and application to human hair. *Forensic Science International.* janv 2016;266:1100S.
16. Fan SY, Zang CZ, Shen PH, Ko YC, Hsu YH, Lin MC, et al. A LC-MS/MS method for determination of 73 synthetic cathinones and related metabolites in urine. *Forensic Science International.* oct 2020;335:110429.
17. Bade R, Abdelaziz A, Nguyen L, Pandopoulos AJ, White JM, Gerber C. Determination of 21 synthetic cathinones, phenethylamines, amphetamines and opioids in influent wastewater using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* fév 2020;208:120479.
18. Bade R, Eggleston G, Shimko KM, Mueller J. Quantification of new psychoactive substances in Australian wastewater utilizing direct injection liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* janv 2023;253:133787.
19. Nowak K, Szpot P, Zawadzki M. Unstable of 4-CMC in human serum specimen. *Forensic Toxicol.* janv 2019;37(1):261-4.
20. Fan SY, Zang CZ, Shen PH, Ko YC, Hsu YH, Lin MC, et al. Simultaneous LC-MS/MS screening for multiple phenethylamine-type conventional drugs and new psychoactive substances in urine. *Forensic Science International.* août 2021;325:110884.
21. Bade R, Abdelaziz A, Nguyen L, Pandopoulos AJ, White JM, Gerber C. Determination of 21 synthetic cathinones, phenethylamines, amphetamines and opioids in influent wastewater using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* fév 2020;208:120479.