

Véronique Viette¹, Marc Fathi²

Place du couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse en toxicologie clinique

La toxicologie clinique recherche des médicaments, des substances d'abus et des composés toxiques dans des échantillons de sang et d'urine en règle générale. Les méthodes doivent être sélectives, précises, sensibles, faciles à utiliser et si possible automatisées [1,2].

Grâce à sa sélectivité et sa sensibilité pour une vaste gamme de composés, la technologie LC-MS(/MS) est très attrayante pour l'identification de composés inconnus dans du matériel biologique.

Les méthodes LC-MS(/MS)

Les méthodes LC-MS(/MS) se composent de quatre étapes:

1. préparation échantillon,
2. séparation chromatographique,
3. détection MS puis traitement,
4. et analyse des données.

Chaque phase peut être plus ou moins automatisée.

Préparation échantillon

Un traitement adéquat de l'échantillon pour minimiser les effets matrices [2] est important.

L'approche «dilute and shoot» [3,4] est bien adaptée à l'urine. Alors que la précipitation des protéines (PP) [5], l'extraction liquide-liquide (LLE) [4-7] ou l'extraction sur phase solide (SPE) [7-9] s'appliquent à différentes matrices (sang, urine ou contenu gastrique). L'association PP et SPE est la plus souvent choisie pour traiter les échantillons sanguins [10,11].

L'automatisation de la SPE facilite l'utilisation de la LC-MS(/MS) dans les laboratoires cliniques [10]. L'approche en ligne est une alternative faisant appel à la technique de commutation de colonnes [12] qui a l'avantage d'éliminer les étapes d'évaporation/reconstitution requis pour la SPE hors ligne.

Le prélèvement sanguin sur papier buvard simplifie et réduit la préparation échantillon [13,14].

Séparation chromatographique

Pour obtenir une bonne performance chromatographique dans un temps minimum, différentes stratégies peuvent être utilisées en combinant débit, lon-

gueur de colonne, résolution et contrepression. Une stratégie très prometteuse est l'utilisation de la chromatographie liquide à ultra haute pression (UHPLC) [3,5,7,8].

Détection par spectrométrie de masse

Le type d'applications couvertes par la LC-MS/MS est lié à la source d'ionisation utilisée alors que la sélectivité est en relation avec le type d'instrument. La toxicologie utilise souvent l'ionisation électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Les sources APCI et ESI s'utilisent sur le même instrument et les sources les plus récentes permettent d'alterner entre les deux modes d'ionisation. Actuellement, le rapport bénéfices/désavantages de ces sources ne favorise pas leur utilisation. Il en est de même pour l'alternance entre ionisation mode positif et négatif. Etant donné que nonante pourcent des composés d'intérêt en toxicologie sont ionisés en mode positif, l'alternance de polarité est rarement employée.

Les instruments

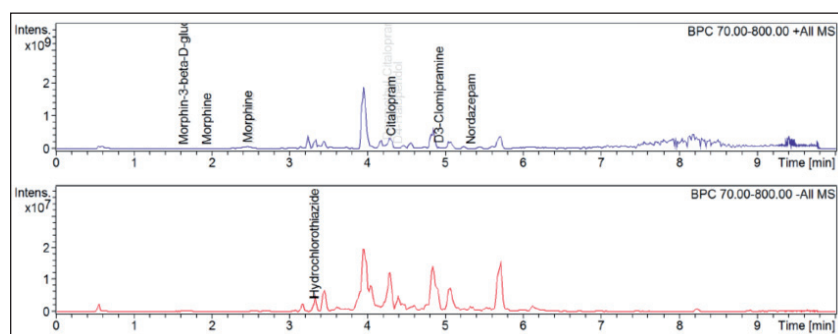
Trois types principaux d'instruments

sont utilisés, séparément ou en combinaison, en laboratoires cliniques: le quadropole (Q), la trappe d'ions (IT) et l'instrument temps-de-vol (TOF).

La configuration QqQ_{LT} est un hybride de Q et IT [15,16]. Cette configuration a été adoptée avec succès pour des dépistages toxicologiques (GUS) et en mode dépistage multi-ciblé (MTS) [4,6,8].

La capacité des systèmes TOF à déterminer avec grande précision le rapport m/z d'un composé permet l'attribution d'une formule chimique unique basée sur les constituants atomiques. Ainsi des bibliothèques spectrales peuvent être élaborées à partir de formules chimiques en l'absence de matériel de référence [17]. La combinaison UHPLC-TOF raccourcit les temps d'analyse tout en maintenant une résolution élevée [3].

Les méthodes ciblées suivent des réactions multiples (MRM): ions précurseurs → ions produits. Ceci permet une sélectivité élevée avec une haute sensibilité. De manière similaire avec les instruments IT, des étapes séquentielles sont répétées «n» fois en piégeant différents ions produits à chaque cycle. MSⁿ cycles peuvent être réa-



Exemple de chromatogrammes de base obtenus en mode ionisation positif et négatif. Vous trouverez des illustrations complémentaires en ligne à l'adresse suivante: www.sulm.ch/d/pipette/pipette-archiv → Nr. 3/2015.

1 Dr Véronique Viette, Directrice Laboratoires ADMED, La Chaux-de-Fonds

2 Dr Marc Fathi, faculté des Sciences, Université de Genève

lisés, en général «n» n'excède pas 2 [7,9,10] ou 3 [5] du fait d'une perte de signal. Dans chacune de ces méthodes, la détection est restreinte à une liste de composés définis dans la recherche initiale. Pour les applications GUS, chaque signal supérieur à un seuil prédéfini est pris en compte pour les étapes ultérieures. La capacité d'identification est alors limitée par le contenu de la librairie utilisée.

Le système Orbitrap permet une détermination de masse très précise. Il offre une très haute résolution [18], son emploi en particulier en toxicologie forensique semble promis à un bel avenir [17].

Utilisation en laboratoire clinique

L'utilisation de la LC-MS(/MS) est en augmentation en complément aux techniques GC-MS et LC-UV pour les méthodes de dépistage d'inconnus. L'identification par MS/MS semble plus sûre que la simple MS ou la LC-UV comme suggéré par K. Lynch [9,19].

Un problème majeur est le manque de librairies universelles en LC-MS(/MS) car elles sont dépendantes des instruments et donc très restrictives en comparaison des librairies GC-MS [20].

Des recommandations pour les analyses qualitatives toxicologiques ont été publiées sur la base d'investigations séquentielles (du dépistage à la confirmation). Chaque fois qu'un test immunologique est utilisé pour le dépistage d'inconnus, un test de confirmation ou d'identification sera nécessaire du fait de la spécificité limitée des immunodosages. La MS permet la détection et l'identification de composés avec une sélectivité et une sensibilité élevées pour une large gamme de composés.

Interprétation des résultats analytiques

L'interprétation des résultats d'analyses toxicologiques est complexe. Elle doit tenir compte à la fois des méthodes et de leurs limites, et de multiples paramètres souvent associés chez un même patient. Ces éléments sont liés à l'intoxication elle-même et au patient, ils doivent être intégrés dans le contexte du diagnostic. Il s'agit d'une approche multidisciplinaire.

Conclusion et perspectives

Le dépistage d'une grande variété de composés dans des matrices diverses est une tâche complexe mais, la LC-MS peut répondre à de tels défis. La LC-MS et la GC-MS sont capables de caractériser de nombreux composés inconnus, l'association de ces méthodes semble la meilleure approche pour le dépistage d'inconnus [20].

Probablement que la MS haute résolution couplée à des spectres MS-MS sera de plus en plus utilisée pour les méthodes de dépistage de manière à améliorer l'exactitude des identifications. De plus, les performances des instruments MS vont évoluer dans le sens d'une augmentation de la sensibilité, de la sélectivité, de la vitesse de scannage et d'exactitude de masse. Ceci va favoriser la diffusion des instruments MS dans les laboratoires de toxicologie clinique.

D'autre part, la haute sensibilité de la MS-MS déclenche un intérêt croissant pour des préparations échantillons alternatives telles que les prélèvements sanguins sur papier buvard [13].

Correspondance:
Veronique.Viette@ne.ch

Platz der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung in der klinischen Toxikologie

In der klinischen Toxikologie betreffen systematische Nachweisuntersuchungen sowohl die Analyse einer äusserst grossen Zahl chemischer Substanzen als auch die Wirksamkeit der therapeutischen Betreuung des von der Intoxikation Betroffenen.

Da die zu untersuchenden Verbindungen im Allgemeinen nicht bekannt sind, ist der erste Schritt eines toxikologischen Screenings die eindeutige Feststellung und Identifizierung der vorliegenden Schadstoffe.

Zur Bewältigung dieser Aufgabe sind die Techniken der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung und besonders die LC-MS/MS in den heutigen Toxikologie-Laboratorien unumgängliche Analysewerkzeuge.

Références

- 1 M. Vogeser, C. Seger, Clin.Biochem. 2008, 41,649.
- 2 P.J. Taylor, Ther Drug Monit. 2005,27,689.
- 3 F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, L. Avois, M. Saugy, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Chromatogr. A 2009,1216,4423.
- 4 S. Dresen, N. Ferreirós, H. Gnann, R. Zimmermann, W. Weinmann, Anal. Bioanal. Chem. 2010,396,2425.
- 5 D.K. Wissenbach, M.R. Meyer, D. Remane, A.A. Weber, H.H. Maurer, Anal.Bioanal.Chem. 2011,400,79.
- 6 M. Gergov, P. Nokua, E. Vuori, I. Ojanperä, Forensic Sci.Int. 2009,186,36.
- 7 H.C. Liu, R.H. Liu, D.-L. Lin, H.-O. Ho, Rapid Commun.Mass Spectrom. 2010,24,75.
- 8 V. Viette, D. Guillarme, R. Mylonas, Y. Mauron, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, J.L. Veuthey, Clin. Biochem. 2011,44,45.
- 9 R.D. Johnson, S.R. Botch, J. Anal.Toxicol. 2011,35,65.
- 10 S. Sturm, F. Hammann, J. Drewe, H.H. Maurer, A. Scholer, J. Chromatogr.B 2010,878,2726.
- 11 I. Marchi, S. Rudaz, Selman, J.L. Veuthey, J. Chromatogr.B 2007,845,244.
- 12 Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, A.I.Gusev, J. Chromatogr.A 2005,1080,99.
- 13 C. Hirtz, S. Lehmann, Ann. Biol. Clin. 2015,73,25.
- 14 L. Ambach, A. Hernández Redondo, S. König, W.Weinmann, Drug Test Anal. 2014,6(4),367.
- 15 G. Hopfgartner, E. Varesio, V. Tschappat, C. Grivet, E. Bourgogne, L.A. Leuthold, J. Mass Spectrom. 2004,72,3653.
- 16 S. Smith, C. Giesker, R. Reimschuessel, C.S. Decker, M.C. Carson, J. Chromatogr. A 2009,1216,8224.
- 17 A.H. Wu, R. Gerona, P. Armenian, D. French, M. Petrie, K.L. Lynch, Clin. Toxicol. (Phila) 2012,50(8),733.
- 18 J.L. Habib Jiwan, P. Wallemacq, M.F. Hérent, Clin.Biochem. 2011,44,136.
- 19 K.L. Lynch, A.R. Breaud, H. Vandenberghe, A.H.B. Wu, W. Clark, Clin.Chim.Acta 2010,411,1474.
- 20 H.H.Maurer, Ther Drug Monit. 2012, 34, 561.