

# Critères d'indentification des xénobiotiques en fonction du mode de détection

Journée scientifique SFTA  
Criblage toxicologique

Vendredi 22 janvier 2016, Ecole du Val de Grâce -PARIS

[L. HUMBERT](#), [J.F WIART](#), [C. RICHEVAL](#), [M. PHANITHAVONG](#), [J.M. GAULIER](#), [D. ALLORGE](#)

Laboratoire de Toxicologie, Centre de Biologie et Pathologie - CHRU de Lille

# Considérations générales



Caractériser la présence (ou certifier l'absence) d'un ou plusieurs xénobiotiques dans une matrice biologique.



Très grande variété des substances à rechercher

**Caractéristiques & concentrations très différentes**

# Considérations générales

Identification se basera sur la comparaison de paramètres acquis à des référentiels

- temps de rétention
- spectre de masse
- spectre UV
- ...

**Identification devra(it) être objective : ne pas (trop?) dépendre du jugement de l'opérateur.**



# Considérations générales

Evaluation des performances basée sur :

- la sensibilité
- la sélectivité
- la qualité de l'identification.

Le contexte : RCM, SOUCHI, confirmation d'un dépistage (AVP) ...



**Notion de seuil**

# Stratégie analytique

Le criblage peut être séparée en deux étapes

Etape de criblage : analyses visant à détecter le plus grand nombre de composés d'intérêt ou de familles de composés.

Automates multiparamétriques : les tests immunologiques

Recherche d'une classe de substances (benzodiazépines ...)

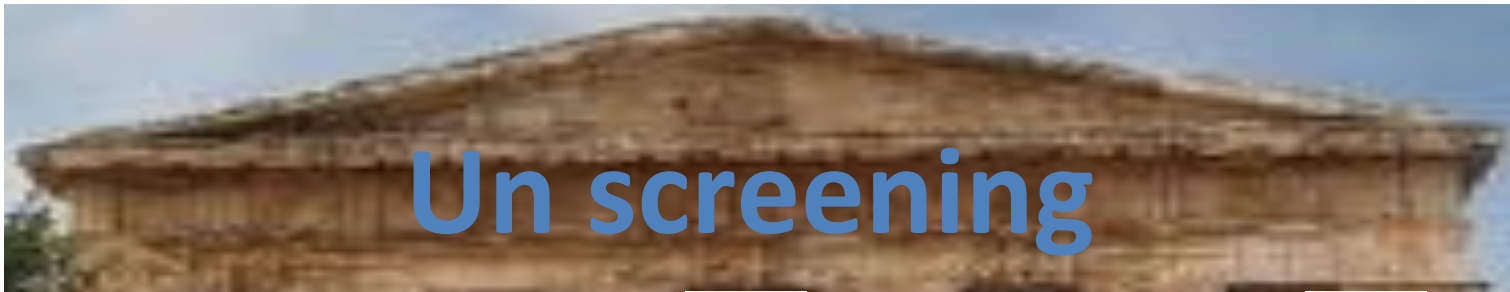
Dosage d'un composé (paracétamol .... )

Etape d'identification : identifier avec la plus grande certitude possible (les substances détectées auparavant) et aussi d'en rechercher de façon beaucoup plus large.

Méthodes séparatives:

- la chromatographie (gazeuse & liquide)

- la détection (DAD, spectrométrie de masse)



# Un screening



**Préparation de l'échantillon**

**Technologie**

**Logiciel**

## La préparation d'échantillon : 1er niveau de sélectivité

Molécules  
Acides

Molécules  
Basiques

Molécules  
Polaires

Molécules  
Apolaires

Rendement d'extraction : 100% !!!  
Elimination totale des endogènes !!!

# Choix technologique

Doit

*Détecter le plus grand nombre de xénobiotiques*

Doit être

*Sensible*

*Spécifique*

Utilisant

*GC/MS(MS)*

*LC/MS(MS)*

Sans

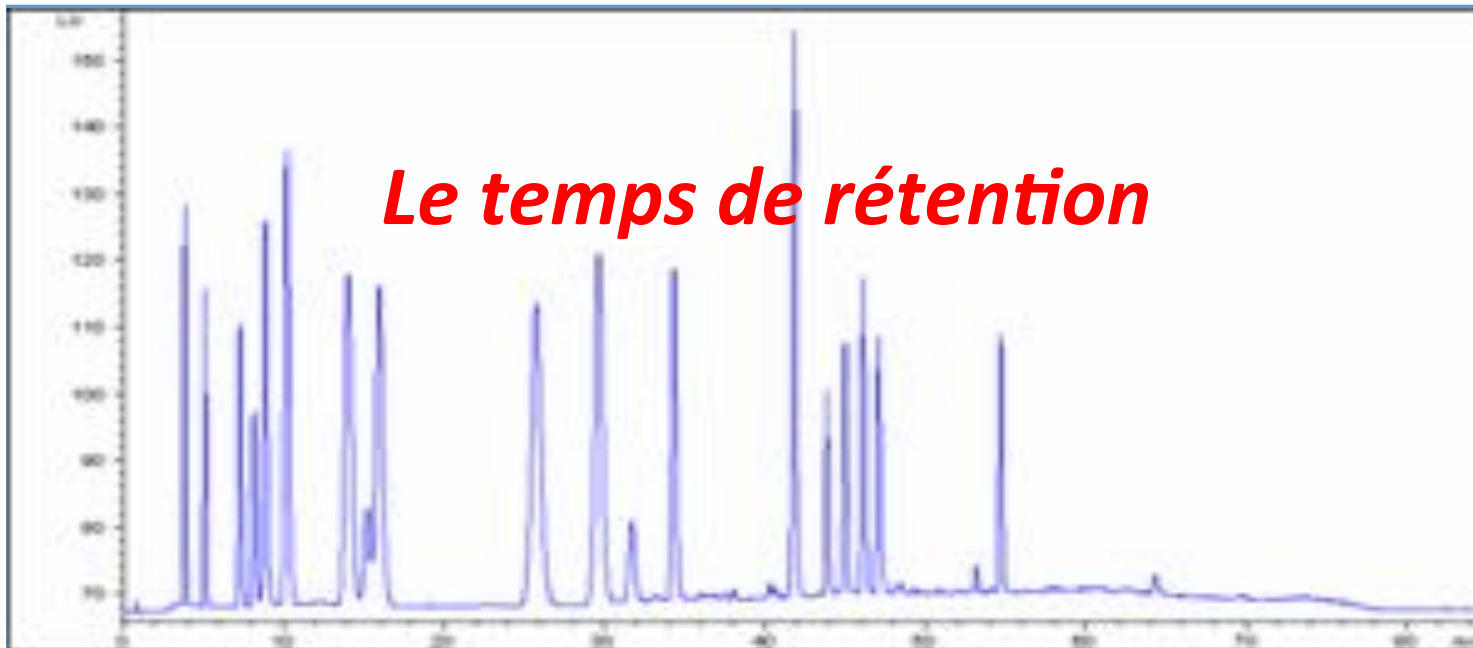
*Consommé trop de temps*

*Consommé trop d'échantillon*





## La séparation chromatographique : 2<sup>ème</sup> niveau de sélectivité

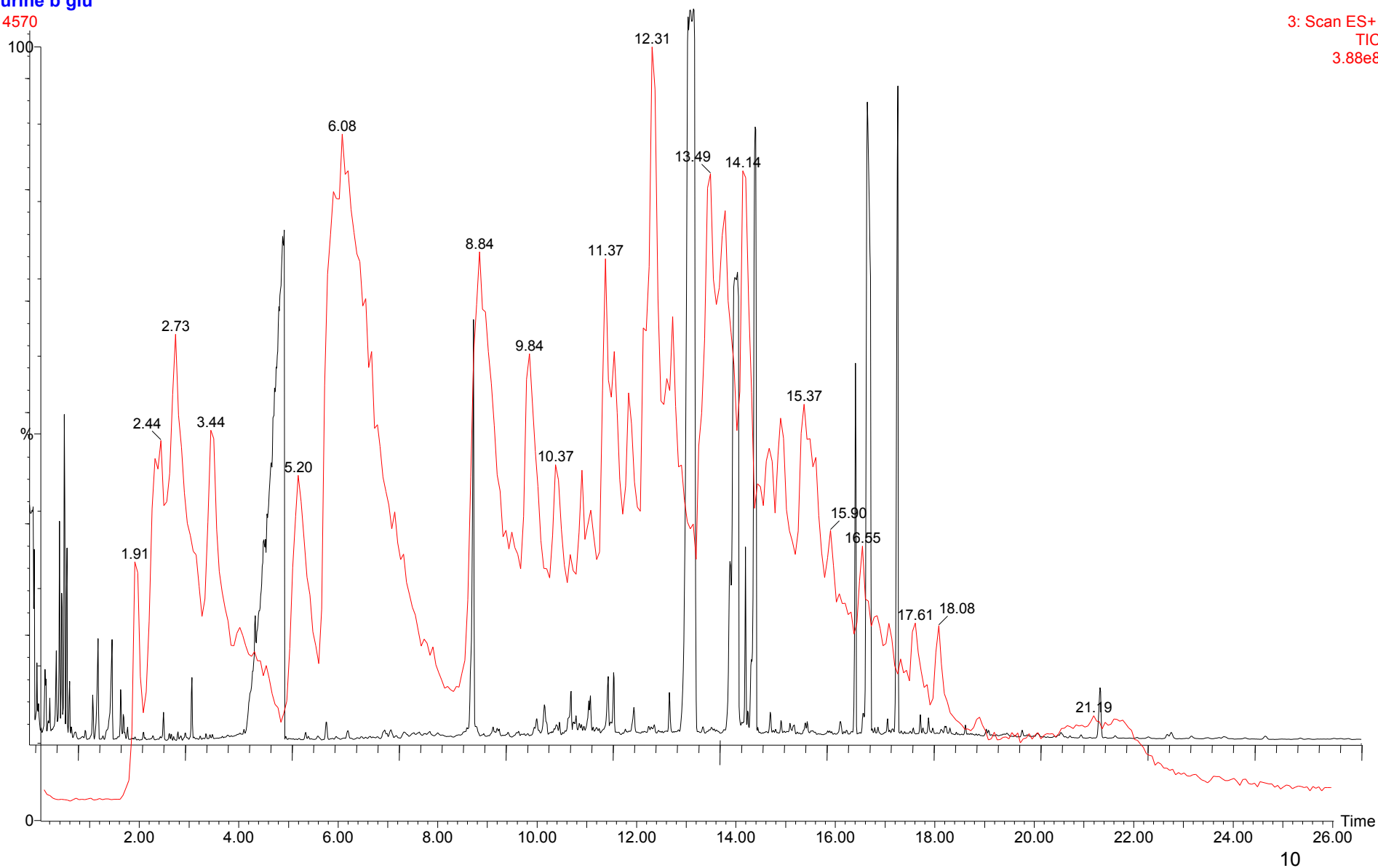


# La séparation chromatographique : 2ème niveau de sélectivité

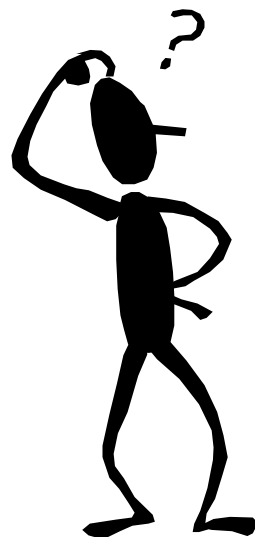
urine b glu

4570

3: Scan ES+  
TIC  
3.88e8



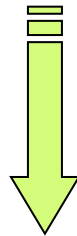
# Stratégie analytique : la détection



# La détection : mode d'acquisition

## *Screening non ciblé*

Acquisition Full scan

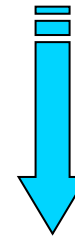


**Librarie de  
Spectres**



## *Screening ciblé*

Programmation de l'acquisition



**Liste de moléc.  
cibles**



## Identification : approche théorique

| Technique              | MLL   |
|------------------------|-------|
| GC                     | 1.25  |
| HPLC                   | 0.80  |
| MS                     | 1.40  |
| GC/MS                  | 10.12 |
| GC/MS/MS               | 1.19  |
| HPLC/MS/MS             | 3.82  |
| GC/MS/MS or HPLC/MS/MS | 1.00  |

Longueur moyenne de liste, ou *Mean List Length (MLL)*,

Plus approchant de 1 : moins la mesure est ambiguë.

Possibilité d'ajouter des procédures analytiques.

De Zeeuw, R. Drug screening in biological fluids - The need for a systematic approach. *Journal of Chromatography B* **689**, 71–79 (1997)

# Identification : approche pratique

## Utilisation des points d'identifications (IP)

| Techniques                  | Nombre d'IP                   | P |
|-----------------------------|-------------------------------|---|
| MS/MS (EI ou CI)            | 1                             | 1 |
| MS/MS (EI ou CI)            | 2 (EI) + 2 (CI)               | 4 |
| LC-MS                       | 1                             | 1 |
| MS/MS (EI ou CI) + LC-MS/MS | 1 (première) + 2 (après fil)  | 4 |
| MS/MS (EI ou CI) + LC-MS/MS | 2 (premières) + 1 (après fil) | 4 |
| MS/MS                       | 1                             | 2 |
| MS/MS + LC-MS               | 2 + 2                         | 4 |
| MS/MS + MS/MS               | 1 + 1                         | 4 |

IP > 3 requis pour une identification considérée comme fiable.

Accumulation d'IP par application de plusieurs techniques analytiques

# Identification : approche pratique

Table 1

Maximum tolerance windows for relative ion intensities to ensure appropriate uncertainty in identification (adapted from [28])<sup>a</sup>

| Relative abundance<br>(% of base peak) | GC-EI-MS        | GC-CI-MS, GC-MS <sup>a</sup> ,<br>LC-MS, LC-MS <sup>a</sup> |
|----------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------|
| ≥ 50                                   | ±10% (absolute) | ±15% (absolute)                                             |
| <50 and ≥25                            | ±20% (relative) | ±25% (relative)                                             |
| <25                                    | ± 5% (absolute) | ±10% (absolute)                                             |

<sup>a</sup> For example, absolute difference means 45–55% for a 50% ± (5% absolute) abundance. Relative difference means 40–60% for a 50% ± (20% relative) abundance.



# Recommendations



EUROPEAN COMMISSION  
DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY

Safety of the Food Chain  
Pesticides and biocides

SANTE/11945/2015

30 November -1 December 2015 rev. 0

## Requirements for chromatography

D2 The minimum acceptable retention time for the analyte[s] under examination should be at least twice the retention time corresponding to the void volume of the column. The retention time of the analyte in the extract should correspond to that of the calibration standard (may need to be matrix-matched) with a tolerance of  $\pm 0.1$  min, for both gas chromatography and liquid chromatography. Larger retention time deviations are acceptable where both retention time and peak shape of the analyte match with those of a suitable IL-IS, or evidence from validation studies is available. IL-IS can be particularly useful where the chromatographic procedure exhibits matrix induced retention time shifts or peak shape distortions. Overspiking with the analyte suspected to be present in the sample will also help to increase confidence in the identification.

SANTE/11945/2015

Supersedes

SANCO/12571/2013

Implemented by 01/01/2016



# Recommendations

**Table 4.** Identification requirements for different MS techniques<sup>2</sup>

| MS detector / characteristics | Typical systems (examples)                                   | Acquisition                                                                                                                                   | Requirements for identification                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                               |                                                              |                                                                                                                                               | minimum number of ions                                                                                                                                                                             | other                                                                                                                                                                                                                        |
| Unit mass resolution          | quadrupole, ion trap, TOF                                    | full scan, limited m/z range, SIM                                                                                                             | 3 ions                                                                                                                                                                                             | <p><math>S/N \geq 3^*</math></p> <p>Analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap.</p> <p>Ion ratio within <math>\pm 30\%</math> (relative) of average of calibration standards from same sequence</p> |
| MS/MS                         | triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap       | selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution | 2 product ions                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                              |
| Accurate mass measurement     | High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS sector MS | full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof                             | 2 ions with mass accuracy $\leq 5 \text{ ppm}^{**\dagger\dagger}$                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                              |
|                               |                                                              | combined single stage MS and MS/MS with mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution              | <p>2 ions:</p> <p>1 molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion with mass acc. <math>\leq 5 \text{ ppm}^{**\dagger\dagger}</math></p> <p>plus</p> <p>1 MS/MS product ion<sup>§§</sup></p> |                                                                                                                                                                                                                              |

\* preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion

\*\* including at least one fragment ion

††  $< 1 \text{ mDa}$  for  $m/z < 200$

§ no specific requirement for mass accuracy

§§ in case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

# Recommendations

## Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence

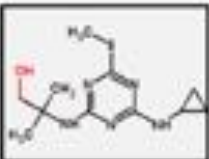
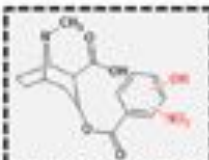
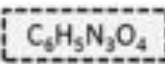
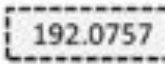
| Example                                                                             | Identification confidence                                                                       | Minimum data requirements                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
|    | <b>Level 1: Confirmed structure</b><br>by reference standard                                    | MS, MS <sup>2</sup> , RT, Reference Std.                                         |
|                                                                                     | <b>Level 2: Probable structure</b><br>a) by library spectrum match<br>b) by diagnostic evidence | MS, MS <sup>2</sup> , Library MS <sup>2</sup><br>MS, MS <sup>2</sup> , Exp. data |
|   | <b>Level 3: Tentative candidate(s)</b><br>structure, substituent, class                         | MS, MS <sup>2</sup> , Exp. data                                                  |
|  | <b>Level 4: Unequivocal molecular formula</b>                                                   | MS isotope/adduct                                                                |
|  | <b>Level 5: Exact mass of interest</b>                                                          | MS                                                                               |

Figure 1. Proposed identification confidence levels in high resolution mass spectrometric analysis. Note: MS<sup>2</sup> is intended to also represent any form of MS fragmentation (e.g., MS<sup>+</sup>, MS<sup>+</sup>).

# Criblage par HPLC/DAD

**Chaque constructeur a sa solution « clé en main »**

colonne : Symmetry C8 250 x 4,6 mm

phase mobile :

- solvant A : acétonitrile

- solvant B : tampon phosphate 0,05 mM pH 3,8

| temps<br>(min) | débit<br>(ml) | % A  | % B  |
|----------------|---------------|------|------|
| 0.00           | 1.00          | 13.0 | 87.0 |
| 9.00           | 1.00          | 35.0 | 65.0 |
| 28.00          | 1.50          | 80.0 | 20.0 |
| 30.00          | 1.50          | 80.0 | 20.0 |
| 31.00          | 1.50          | 13.0 | 87.0 |

température : 30°C

détection : entre 190 et 350 nm

durée de chromatographie : 37 min



# Criblage par HPLC/DAD

Identification d'un pic :

- analogie du temps de rétention
- comparaison des spectres :
  - \* reconnaissance de la molécule
  - \* pic de pureté

Rapport de pureté et d'identification

Librairie Toxicol : 1075 molécules

*Présence d'une substance ayant les caractéristiques spectrales et chromatographiques de : ...*

# Criblage par HPLC/DAD

Sensibilité modeste

Certaines molécules n'absorbent pas en UV

Acide valproïque

Méprobamate

Baclofène ...

Certains composés possèdent même spectre UV et TR : venlafaxine et bisoprolol

*Manque de spécificité, spectres pouvant être proches (BZD) ou peu informatifs (phénobarbital)*

# Le criblage par GCMS

1<sup>er</sup> couplage ayant une véritablement efficace pour détecter et identifier fiablement.

Standardisation des sources : création de bibliothèques

➤ **EI permet d'acquérir un nombre important d'IP**

Etape préalable : dérivation (dérivés silylés, d'anhydrides d'acide, ou des agents alkylants).

Suppression des liaisons hydrogènes

- Augmente la volatilité
- Réduit la thermolabilité
- Améliore les performances chromatographiques
- Spectres souvent plus riches

# GCMS : l'identification

**Les spectres de masse acquis très rarement purs.**

**Comment soustraire le bruit de fond d'un spectre ?**

**La déconvolution : reconstruction de spectres de masse « purs » à partir du comportement des ions mesurés pris individuellement.**

- permet d'extraire efficacement des composés du bruit de fond**
- minimise le problème des composés co-élus.**

# GCMS : l'identification

## Algorithmes de comparaison

Utilisation de logiciels : comparaison rapide du spectre acquis avec les librairies.

➤ *Score, ou match factor, généralement normalisé*

correspondance :

-entre spectre acquis et spectre de référence      **Forward Fit**

-entre spectre de référence et spectre acquis      **Reverse Fit**

Calcul basé sur la présence des ions ET sur leurs intensités relatives

➤ **Seuil d'indice de pureté fixé > x? %**

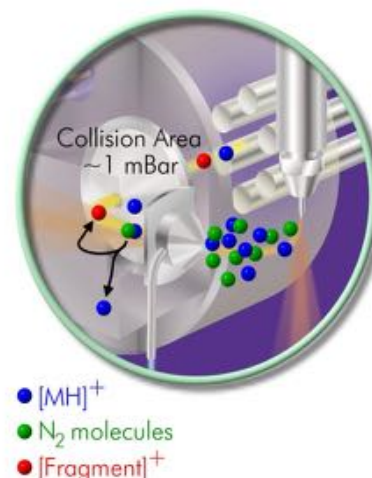


# Le criblage par LCMS

Applicable à une beaucoup plus large gamme de substances

ESI ionisation douce (pas/peu de fragmentation des analytes)

Dissociation par collision induite (CID)

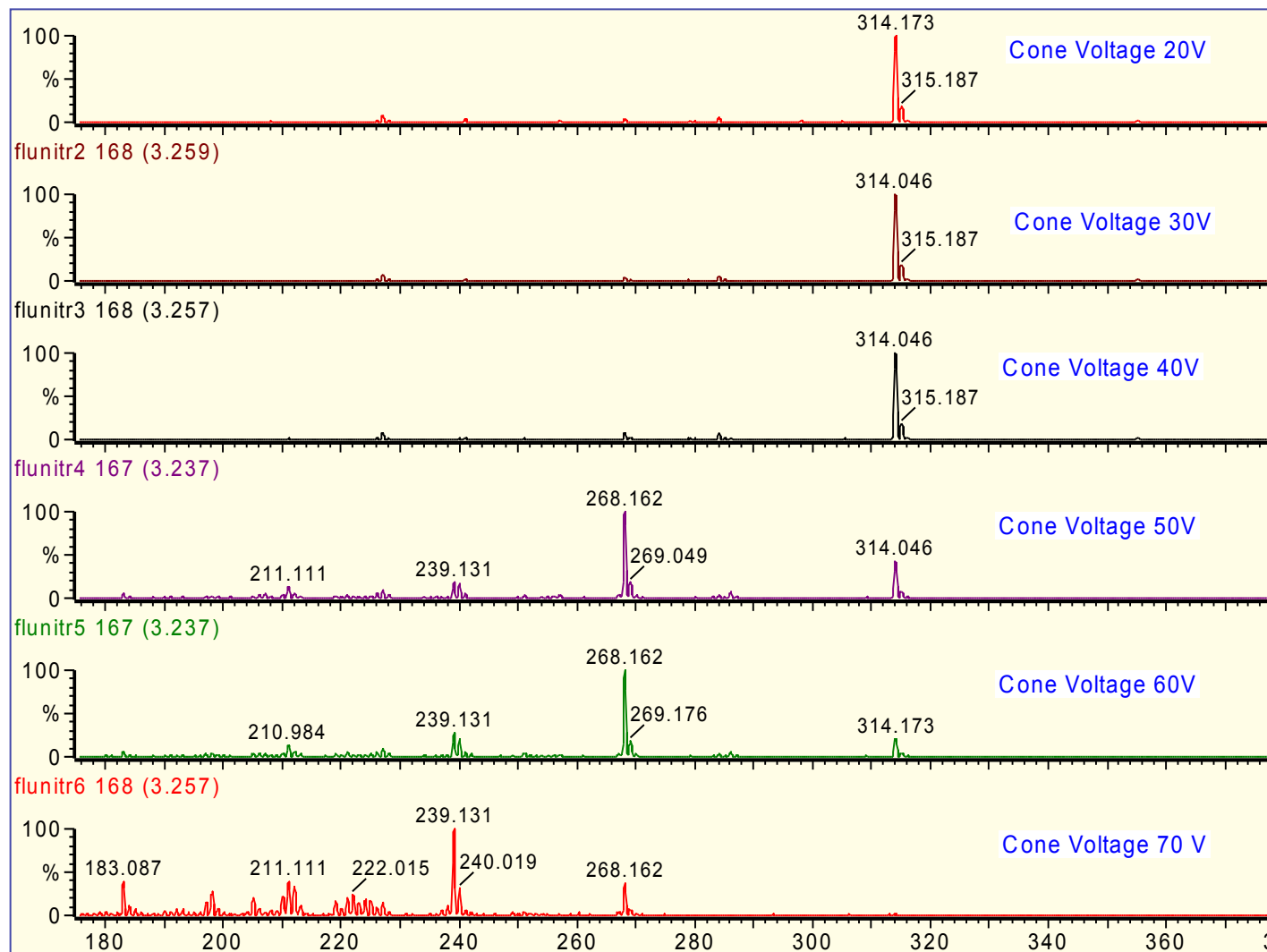


Différences significatives entre instruments (**intensités relatives des différents fragments**)

**Nécessite plusieurs spectres acquis à différentes énergies de collision**

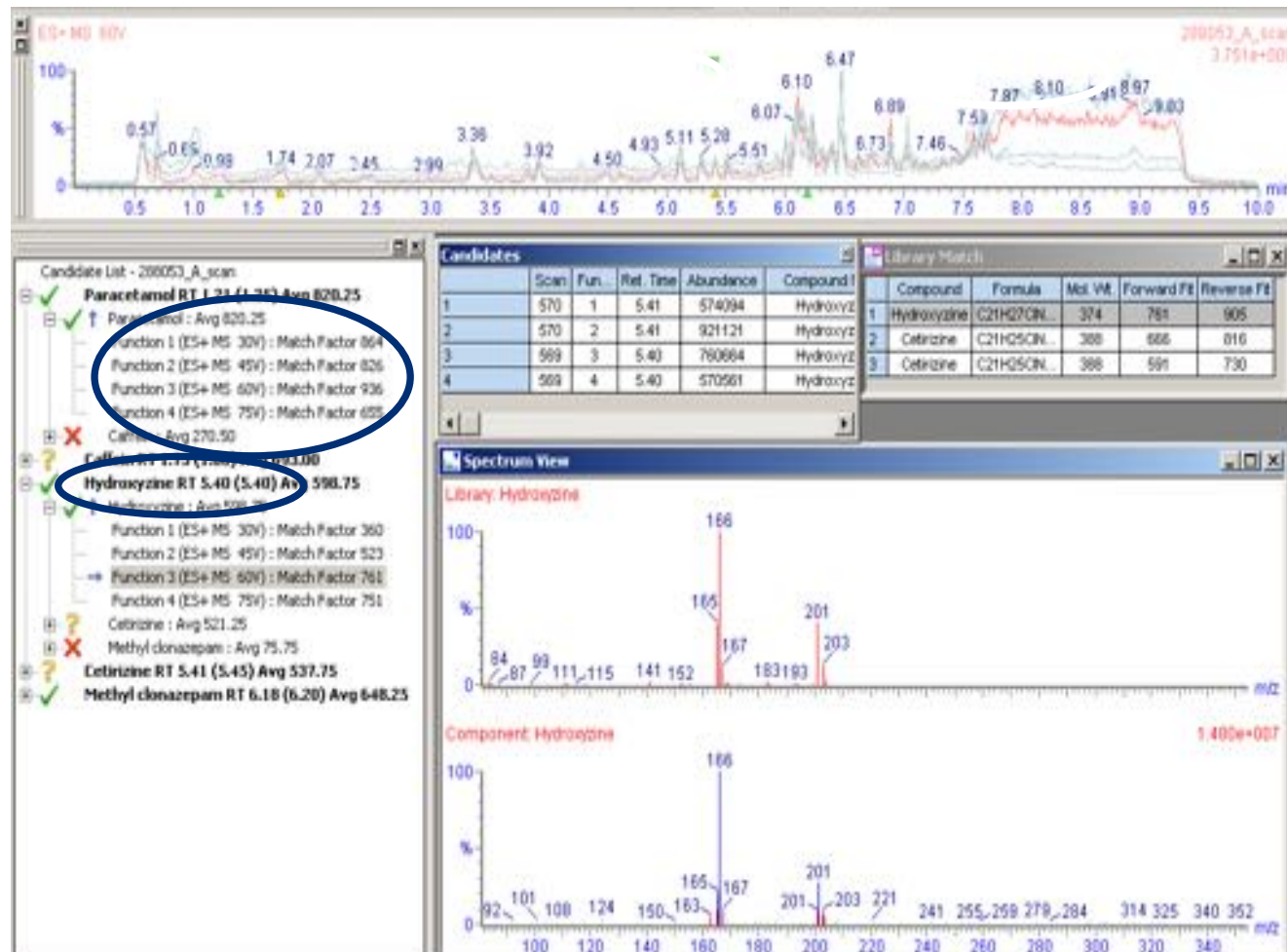
# LCMS

## Acquisition simultanées à différentes énergies de collision

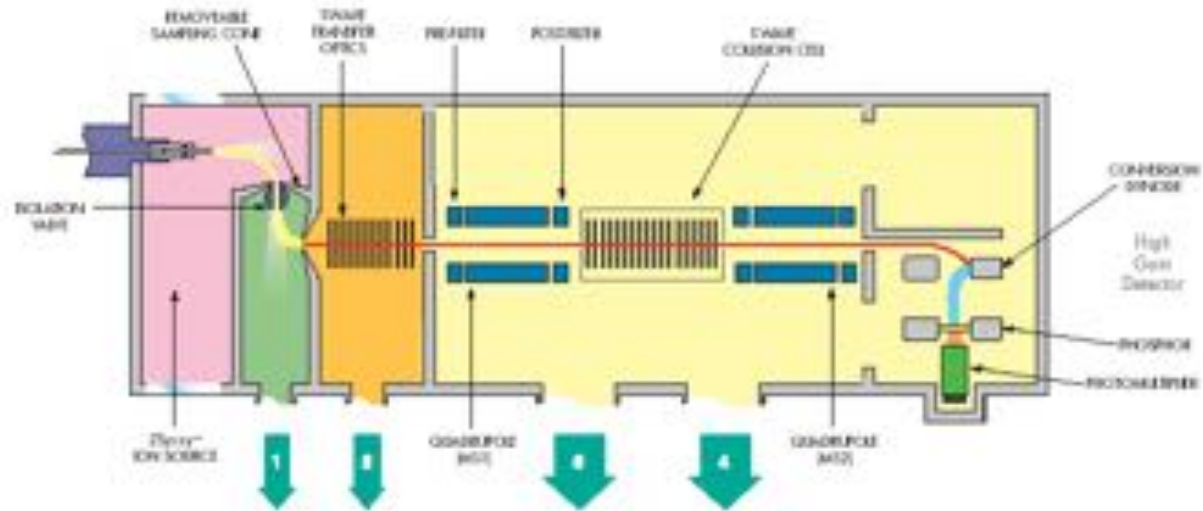


**Paramétrage variable selon les fournisseurs**

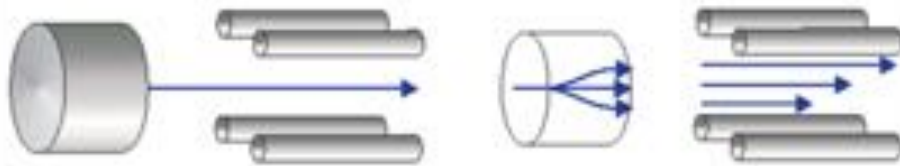
# LCMS : l'identification



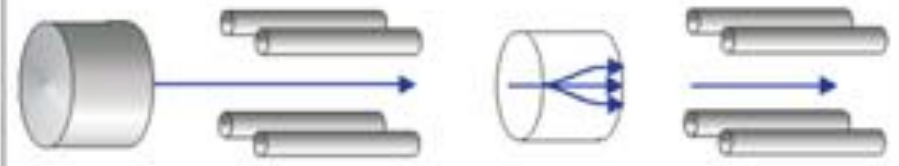
# MSMS : acquisition en mode MRM



Product Ion Scan



MRM: Multiple Reaction Monitoring



**Acquisition en mode ciblée**

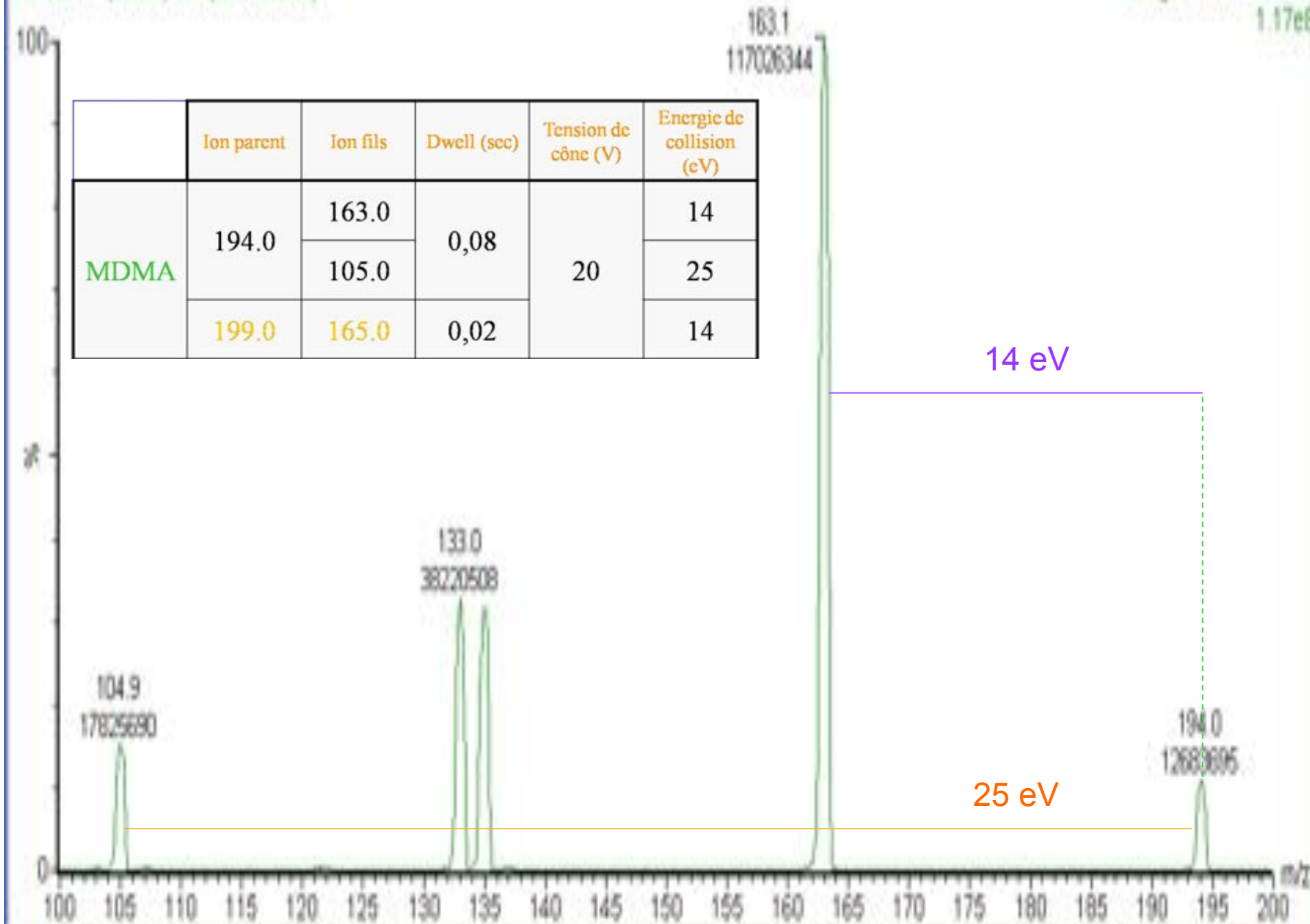
MDMA3 1 (0.500) Sm (SG, 2x0.60)

Daughters of 194ES+  
1.17e8

|      | Ion parent | Ion fils | Dwell (sec) | Tension de cône (V) | Energie de collision (eV) |
|------|------------|----------|-------------|---------------------|---------------------------|
| MDMA | 194.0      | 163.0    | 0,08        | 20                  | 14                        |
|      |            | 105.0    |             |                     | 25                        |
|      | 199.0      | 165.0    | 0,02        |                     | 14                        |

14 eV

25 eV



# MSMS : acquisition en mode MRM

**Élimine tous les ions autres que ceux d'intérêts**

**Séparation chromatographique peut être moins « élaborée » (co-élution) si transitions MRM suffisamment sélectives**

**2 transitions MRM permettent normalement d'identifier un composé**

**Nombre de transitions MRM possible (variable suivant les fournisseurs)**

**Mode d'acquisition le plus sensible actuellement**

# MSMS : acquisition en mode MRM

Parfois difficile d'obtenir des transitions spécifiques

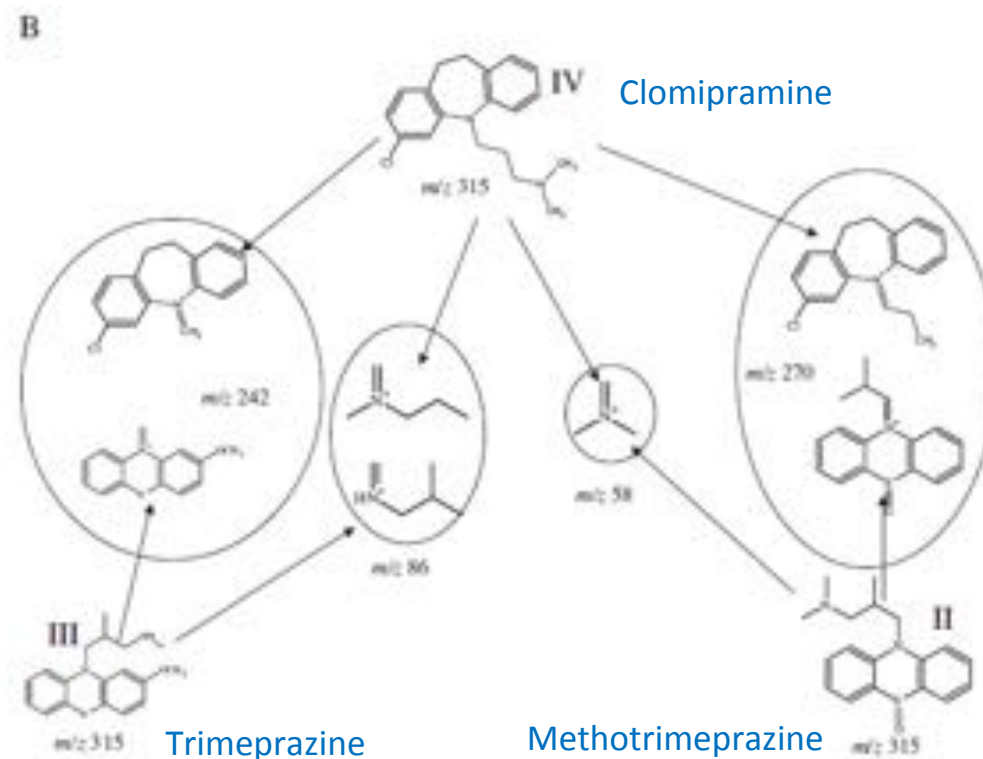
- Perte d'eau
- Un groupement méthyl

Clinical Chemistry 54:9  
1519-1527 (2008)

Drug Monitoring and Toxicology

Pitfalls and Prevention Strategies for  
Liquid Chromatography-Tandem Mass  
Spectrometry in the Selected Reaction-  
Monitoring Mode for Drug Analysis

François-Ludovic Sauvage,<sup>1,3</sup> Jean-Michel Gaulier,<sup>1</sup> Gérard Lachâtre,<sup>1,2</sup> and Pierre Marquet<sup>1,3\*</sup>



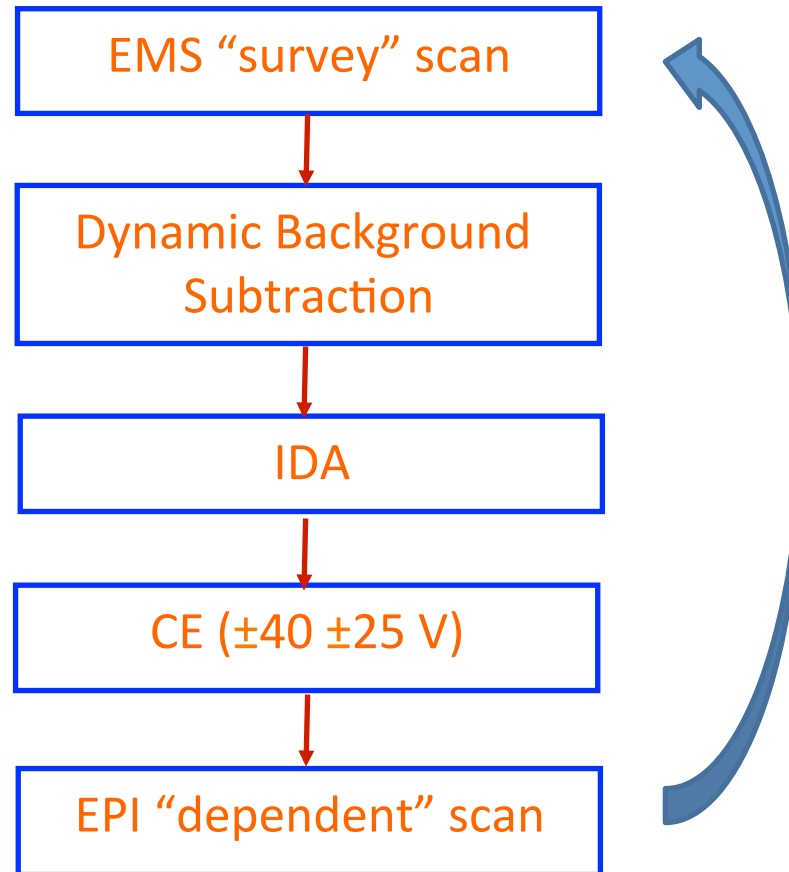
Parfois difficile d'obtenir une 2<sup>ème</sup> transition MRM suffisamment sensible  
(pholcodine, norfluox.)

Besoin d'employer une 3<sup>ème</sup> transition (Benzoylecgonine, cocaïne, méprobamate ...)

Nécessité d'employer une « non transition » (buprénorphine, norbupré)

# Autres modes acquisition

Appareils hybrides MS/MS-LIT(linear ion trap) : mode IDA





# Criblage en masse exacte



## Appareils de haute résolution

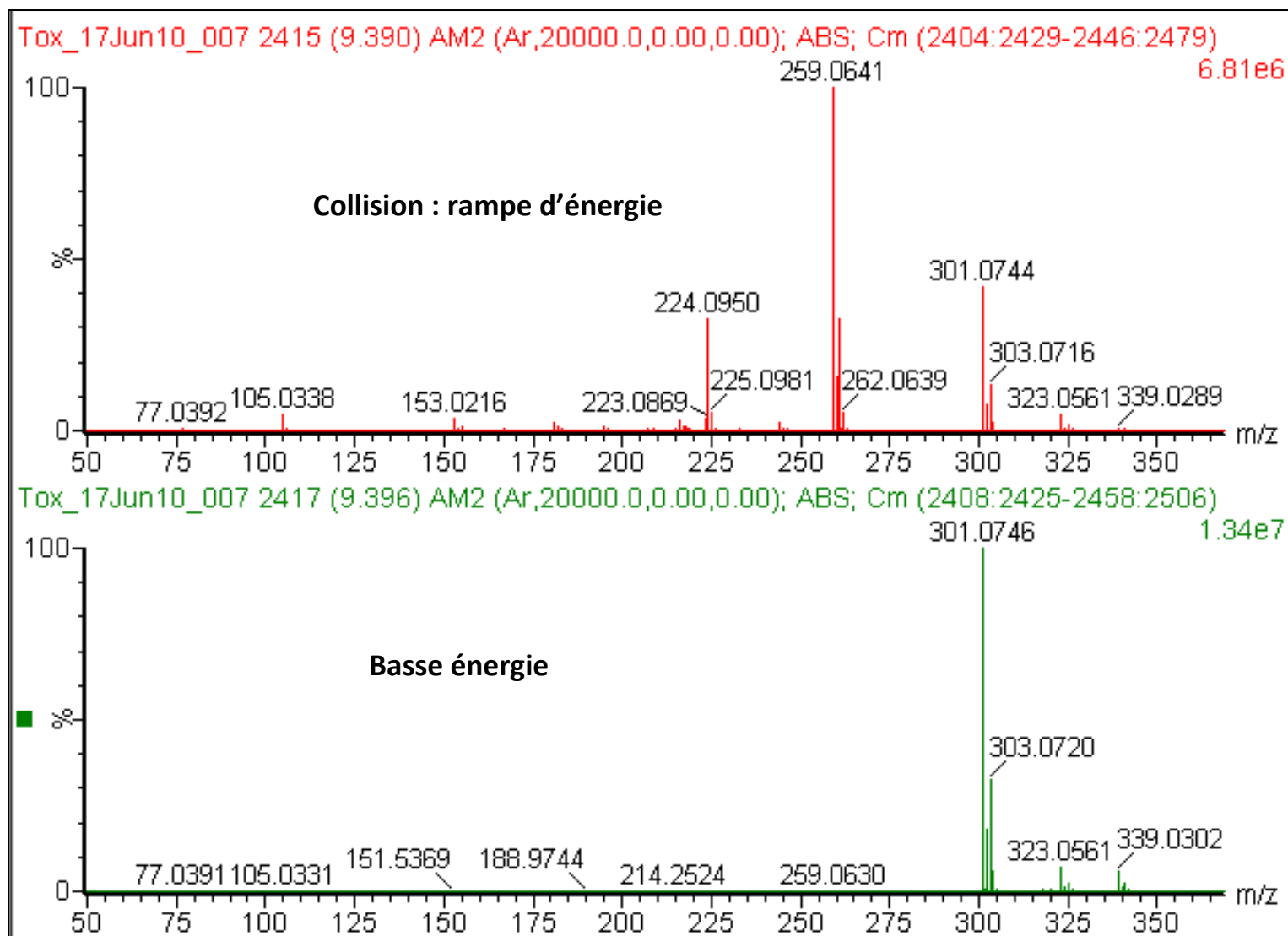
Détermination de la formule brute d'une substance

1 Tr + un ion : insuffisant pour acquérir le nombre d'IP nécessaire

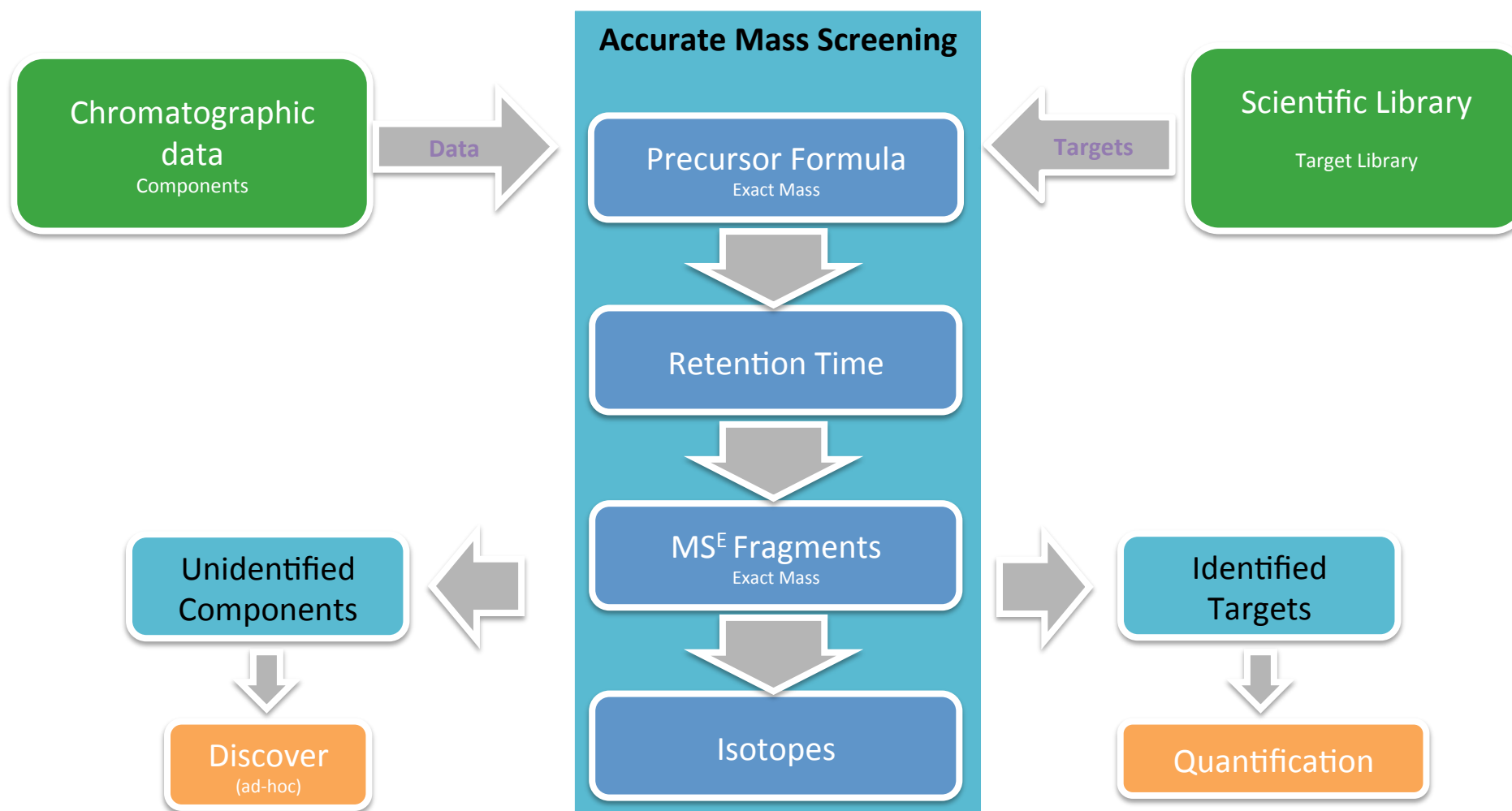
➤ Besoin de fragmentation : identification de l'isomère

Acquisition en mode balayage

# Criblage en masse exacte



# Screening Workflow



# Les librairies



Commerciale

Personnelle

Dernière  
mise à jour ?

Présence de  
métabolites?

Dernière mise  
à jour ?

Comment  
l'enrichir ?



***NIST* > 200 000**

**Maurer/Pfleger/Weber (MPW)**

**Rosner**

**SWGDRUG**

**On ne pourra identifier que des molécules référencées**

# Bonnes pratiques

Ajouter un ou plusieurs étalons internes

Posséder un/des CQI

Tenir à jour sa(es) librairie(s)

S'abonner à des EEQ



LISTE DES E.E.Q.

| Titre                                                | Année |
|------------------------------------------------------|-------|
| Ethylène glycol sérique (16-EG-Ser)                  | 2016  |
| SOUCHI sérum & urine (16-SOUCHI-N1)                  | 2016  |
| SOUCHI sérum & urine & cheveux (16-SOUCHI-N2)        | 2016  |
| Screening sérum & urine (16-Screen-ser)              | 2016  |
| Screening sang total & urine (16-Screen-ST)          | 2016  |
| bbloquants sériques (16-bbloq-ser)                   | 2016  |
| Antidépresseurs sériques (16-Antidep-ser)            | 2016  |
| Anxiolytiques sériques (16-Anxiol-ser)               | 2016  |
| Neuroleptiques sériques (16-Neuro-ser)               | 2016  |
| Psychotropes sériques (16-Psy-Ser)                   | 2016  |
| Psychotropes urinaires (16-Psy-Ur)                   | 2016  |
| Alcools sang total (16-Alcools-ST)                   | 2016  |
| Metformine sérique (16-Metf-Ser)                     | 2016  |
| Divers médicaments (16-Div-Ser)                      | 2016  |
| Stupéfiants sang total (16-Soups-ST) 4 flacons       | 2016  |
| Stupéfiants sang total (16-Soups-ST) 2 flacons       | 2016  |
| Stupéfiants sériques (16-Soups-Ser) 4 flacons        | 2016  |
| Stupéfiants sériques (16-Soups-Ser) 2 flacons        | 2016  |
| Buprénorphine & Méthadone sang total (16-Bup&Met-ST) | 2016  |
| Hallucinoènes urinaires (16-Hallu-ur)                | 2016  |

# Conclusion

Part importante de l'activité d'un laboratoire

Outils de plus en plus performants

Préférable d'associer plusieurs méthodes

Confirmer la présence d'un xénobiotique par la présence de ses métabolites

Vigilance sur le paramétrage d'acquisition & de déconvolution

- Rapport issu généralement d'une recherche automatique

Rester toujours vigilant dans l'interprétation des résultats

