

V. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC/MS-MS)

La chromatographie liquide en haute performance (HPLC) est largement utilisée dans le domaine de la chimie analytique. Le couplage à la spectrométrie de masse en tandem est un puissant outil pour détecter, identifier et quantifier spécifiquement des molécules de façon très précise.

Les couplages de la LC avec des systèmes à triple quadripôles, dits « en tandem » (LC-MS/MS) représentent aujourd'hui les plus fortes ventes dans l'industrie pharmaceutique (en particulier pour les études de toxicocinétique et de pharmacocinétique), ainsi probablement que dans les laboratoires de toxicologie médicale ou de suivi thérapeutique pharmacologique.



Figure 12 : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (AB SCIEX 5500 QTRAP)

1. La chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide en haute performance permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification, sa grande précision permet la recherche de traces.

Au niveau chromatographique, Le temps de rétention d'analyte varie selon l'interaction entre la phase stationnaire, les molécules étant analysées et le ou les solvants utilisés. À mesure que l'échantillon passe à travers la colonne, il interagit entre les deux phases à des vitesses différentes, principalement à cause des polarités différentes des analytes. Un analyte sera plus ou moins retenu sur la colonne selon que son affinité avec celle-ci est grande ou petite. Un composé apolaire sera par exemple, plus retenu, sur une colonne apolaire qu'un composé

polaire. Et sur une colonne apolaire, un solvant apolaire au un pouvoir éluatif plus grand qu'un solvant polaire. (22)



Figure 13 : Appareil de la Chromatographie Liquide à Haute Performance

◆ **Les composants de la HPLC :**

- **La phase mobile ou éluant** : un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.
- **La phase stationnaire** : un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.
- **Réservoir de la phase mobile** : Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon
- **Pompe** : Elle délivre en continu la phase mobile sous pression avec un débit constant et stable
- **Injecteur** : Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ L...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.
- **Vanne à boucle d'échantillonnage** : Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe, la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique.

◆ **Fonctionnement de l'appareil**

- La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.
- Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

- En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

2. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires, d'analyser qualitativement et quantitativement une vaste gamme de composés biologiques et chimiques. Son principe est le suivant : un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par différents procédés (bombardement électronique, ionisation chimique...). Parmi les ions obtenus, l'ion moléculaire permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir rupture des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Les ions formés sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont le lecteur permet l'identifier de la structure moléculaire. (24)



Figure 14 : La spectrométrie de masse en tandem AB SCIEX 5500 QTRAP

Principe générale :

A la sortie de la colonne chromatographique, le composé en solution est introduit par un capillaire dans la source d'ionisation : ESI ou l'électrospray. C'est l'interface dans laquelle les molécules sont ionisées.

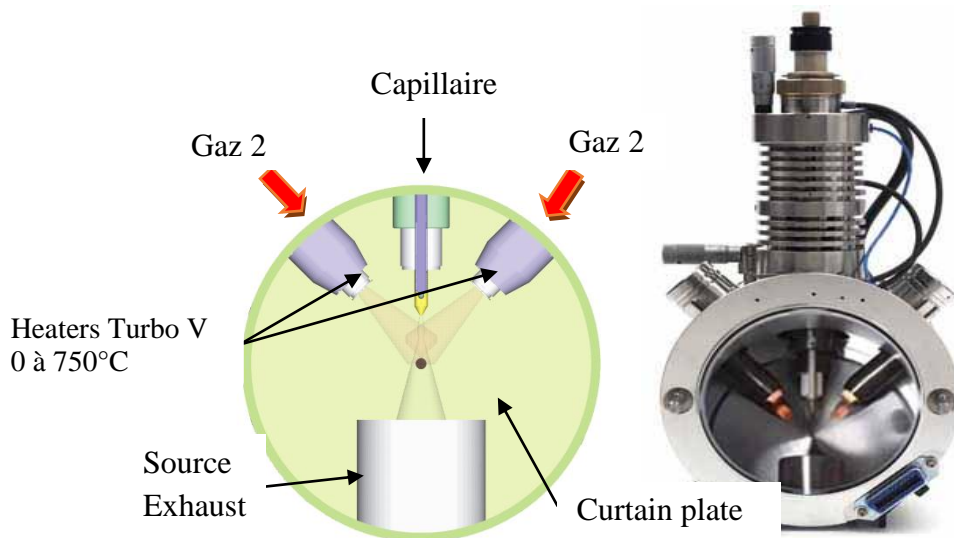


Figure 15: Source d'ionisation (25)

Le principe de l'électrospray peut être décrit en trois étapes qui sont : la production de gouttelettes hautement chargées (**Mode Positif M+H / Mode négatif: M-H**) contenant des molécules de solvant et d'analyte, la réduction du diamètre de ces gouttelettes, et enfin le passage des ions de la solution vers la phase gazeuse. (24)

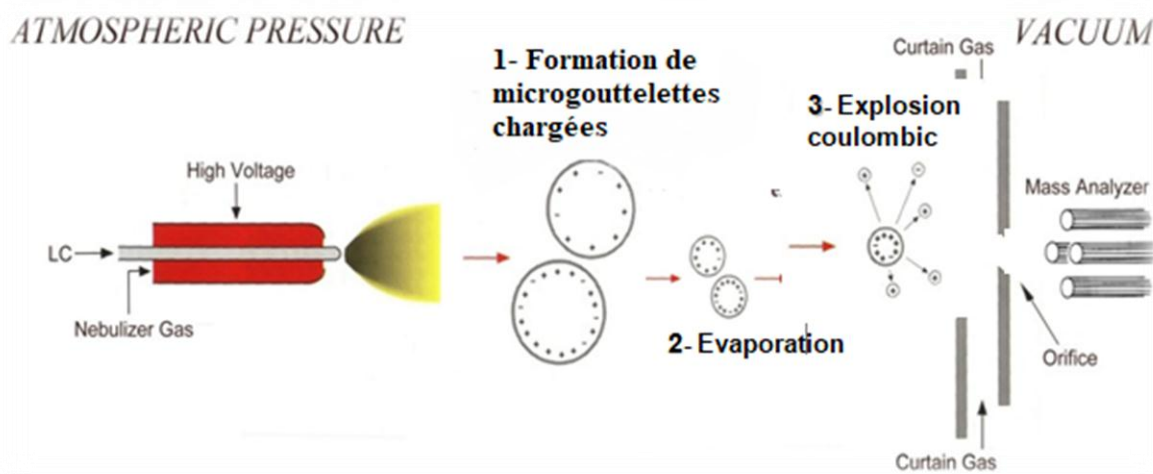


Figure 16: Schéma d'une ionisation par Electrospray (26)

Les ions sont ensuite dirigés dans la direction du premier quadripôle (le quadripôle de transfert ou Q_0) qui a pour rôle la focalisation du faisceau d'ions avant l'entrée dans l'analyseur.

L'analyseur se comporte ici de trois quadripôles : le premier (Q_1) va permettre de sélectionner un ion précurseur (ion parent), L'ion précurseur est amené à la chambre de collision (Q_2) qui est le quadripôle responsable de la fragmentation des ions par une énergie de collision définie préalablement et sous l'effet d'un bombardement par des atomes d'azote.

Les fragments sont sélectionnés encore une fois selon leur rapport m/z dans un deuxième analyseur (Q_3), seuls les ions prédéfinis sont triés, ce sont les ions fils ou les ions produits. Chaque molécule se trouve ainsi identifiée par deux couples (ou plus) ions précurseur/ ion produit, les deux couples présentent deux transitions, la première transition produite est utilisée pour la quantification et sert également à identifier la molécule, la deuxième est complémentaire pour la confirmation de l'identité de la molécule (24, 25).

C'est ce qu'on appelle le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). C'est un mode qui correspond à une détection sélective de transitions. On sélectionne un ion précurseur qu'on casse dans la chambre de collision, puis parmi tous les ions produits, un ion est conservé. C'est le mode principalement utilisé pour la quantification de molécules connues.

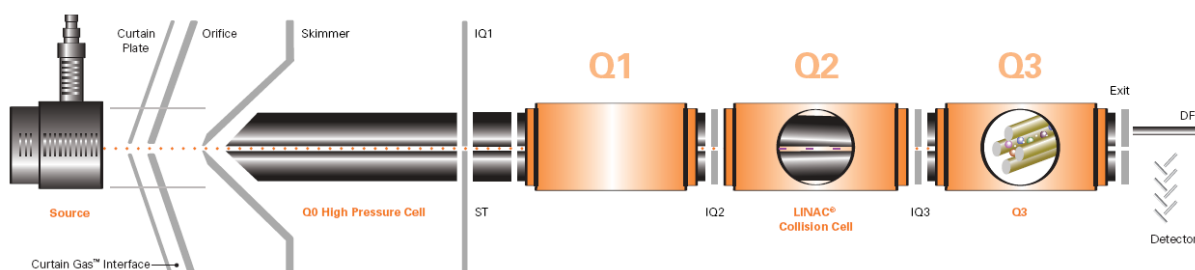


Figure 17: Schéma résumant les trois quadripôles (27)

Le faisceau d'ion, ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe plusieurs types de détecteur capable de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Les détecteurs multiplicateurs d'ions sont les plus utilisés en spectrométrie de masse.

Un système d'exploitation et de traitement de données (ordinateur muni d'un logiciel approprié), permet l'enregistrement des mesures, de contrôler l'instrument et d'interpréter les résultats illustrés sous forme d'un chromatogramme représentant le signal par rapport au temps de rétention de chaque molécule.

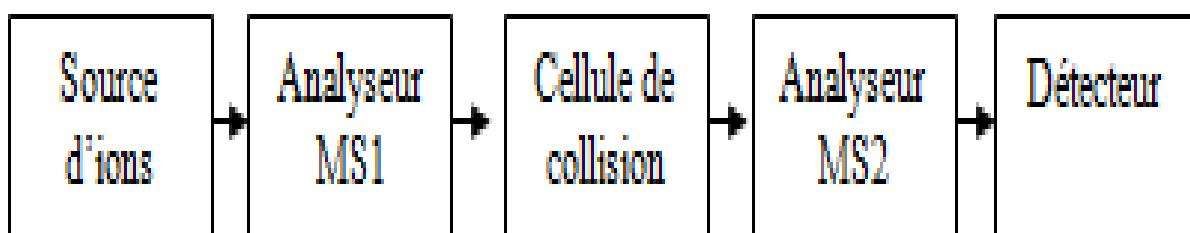


Figure 18: Schéma résumant le principe de la spectrométrie de masse en tandem

VI. Mise au point et validation de la méthode de confirmation

La mise au point d'une méthode consiste à préparer tout d'abord les solutions standards de chaque molécule et leurs standards internes.

Ensuite, chaque solution standard est injectée dans la LC-MS/MS afin d'optimiser les paramètres de détections (Temps de rétention, température du four, la phase mobile, la colonne, température de source, les paramètres d'ionisation...), ainsi que les transitions correspondantes à la molécule (ion précurseur/ion produit).

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondent au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce détecter et contrôler les sources d'erreurs possible liées à la méthode étudiée : définition générale est proposée par FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance ». (28)

Autrement dit, la validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par les laboratoires. (29)

1. Les grandeurs mesurées

Les grandeurs mesurées pour un analyte lors d'une mesure par couplage chromatographie - spectrométrie de masse en tandem, sont :

- le temps de rétention relatif,
- l'intensité relative des signaux ioniques des molécules cibles (hauteur ou surface du signal) rapporté au signal de l'étalon interne,
- l'intensité relative entre signaux ioniques caractéristiques de l'analyte (rapports d'ion ou de transition).

Les signaux considérés seront intégrés dans une fenêtre de temps de rétention donnée autour du temps de rétention attendu pour les analytes cibles.

2. Critères de la validation

Les critères et exigences de validation selon la décision 2002/657/EC de la Communauté Européenne⁽³⁰⁾, qui détaille les techniques et la méthodologie à suivre pour le contrôle des médicaments vétérinaires, ainsi le laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA)⁽³¹⁾.

2.1. Spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés,...).

Observation des chromatogrammes d'ions d'un nombre conséquent d'échantillons blancs différents et vérification de l'absence de coélutions pouvant perturber l'interprétation.

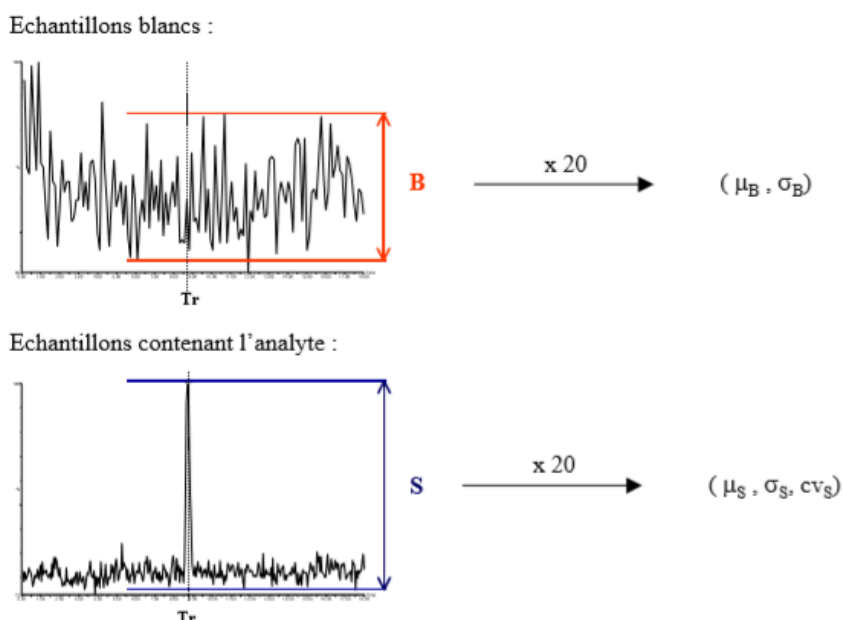


Figure 19: Chromatogrammes de 20 échantillons blancs et de 20 analytes seuls

2.2. Linéarité

Capacité de la méthode à fournir une réponse proportionnelle ($y=ax+b$) à la concentration en analyte sur un domaine de concentration donné.

Méthode d'estimation : calcul du coefficient de détermination R^2 de la droite de régression (intensité rapportée à l'étalon interne en fonction de la concentration), réalisée à partir d'un mélange d'échantillons blancs différents ($n=20$), supplémenté à au moins six niveaux de concentration.

Objectif (fixé en interne) : $R^2 > 0,97$

2.3. Justesse

Différence entre la concentration estimée en analyte dans un échantillon analysé avec la méthode considérée et la concentration réelle en analyte dans cet échantillon (supplémenté).

Méthode d'estimation: Calcul de la différence entre la concentration moyenne obtenue pour une série d'analyse ($n=20$) sur un même échantillon (C_{moy}) et la concentration réelle de cet échantillon ($C_{\text{théo}}$), exprimée en pourcentage par rapport à cette concentration réelle (Figure 18).

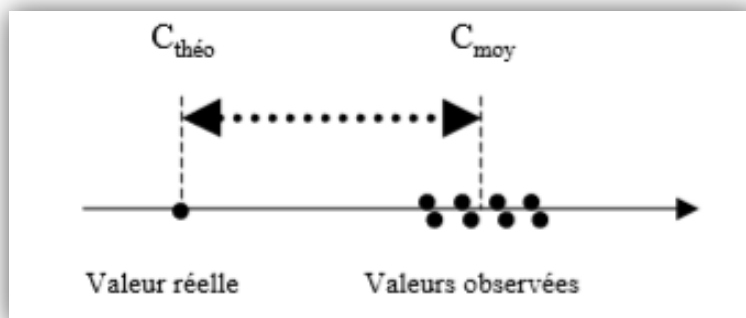


Figure 20: Représentation de la justesse

Objectif (fixé par la directive européenne 2002/657/CE) : justesse minimale d'une méthode quantitative :

Tableau 2 : valeurs de justesse à respecter selon la décision européenne 2002/657

Fraction de masse ($\mu\text{g/kg}$)	Justesse %
≤ 1	-50% à +20%
1 à 10	-30% à +10%
≥ 10	-20% à +10%

2.4. Fidélité

Variabilité de la grandeur mesurée pour des répétitions de la méthode dans des conditions identiques (répétabilité), avec modification d'au moins un paramètre (reproductibilité intra laboratoire) et au sein de différents laboratoires (reproductibilité inter-laboratoire).

Méthode d'estimation : Calcul du coefficient de variation (CV %) du paramètre considéré, sur une série d'analyse ($n=20$) d'un échantillon contenant l'analyte à une concentration C , proche (d'un facteur 0,5 ; 1 ; 1,5 ou 2) de la capacité de détection ou de la LMR (tableau 1).

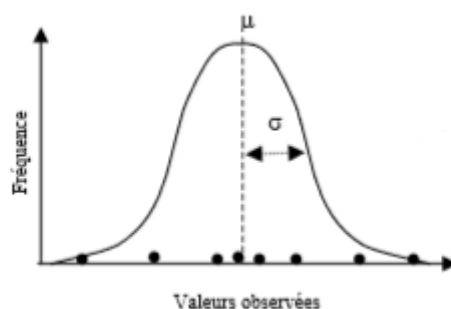


Figure 21 : Représentation de la fidélité

Objectif (fixé par la directive européenne 2002/657/CE) : La loi d'Horwitz est applicable aux concentrations supérieures à 100 ppb, elle l'est beaucoup moins pour des valeurs inférieures (le calcul donne des CV – donc des tolérances – très importants). En pratique les CV doivent être aussi petits que possibles.

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Tableau 3 : valeurs de reproductibilité du signal à respecter selon la décision 2002/657

Fraction de masse (µg / kg)	CV%
≥ 1 à 10	*
≥ 10 à 100	*
≥ 100 à 1000	23
≥ 1000	16

*Il n'y a pas de valeur limite de CV de reproductibilité pour les niveaux de concentration en analyte < 10 µg/kg. Les CV doivent donc être le plus faible possible.

- Pour les temps de rétention relatifs : CV < 2,5 % en LC
- Pour les rapports d'ion :

Tableau 4 : valeurs de reproductibilité du ratio du signal à respecter selon la décision 2002/657

Intensité relative (% du pic de base)	CV% (LC-MS/MS)
> 50%	±20%
> 20% à 50%	±20%
> 10% à 20%	±30%
≤ 10%	±50%

2.5.Limite de décision (CC α)

Une méthode analytique devra être caractérisée par une limite de décision (CC α) qui est la limite à partir de laquelle un échantillon peut être déclaré non conforme avec une certitude statistique de 1 – α . Dont l'erreur alpha (α) est la probabilité que l'échantillon testé soit conforme, même si une mesure non conforme a été obtenue («décision fondée sur un faux résultat non conforme»).Le CC α doit être en pratique utilisé en confirmation pour déclarer la non-conformité (si concentration supérieure au CC α) de l'échantillon.

Pour une méthode de confirmation, ce paramètre est calculé en considérant le signal le moins sensible (signal « critique » permettant de satisfaire tous les critères d'identification).

Méthode d'estimation:

✚ Dans le cas des substances soumises à LMR :

CC α est la concentration correspondant (au risque $\alpha = 5 \%$) à une réponse d'intensité $I_{CC\alpha}$, définie par la relation :

$$I_{CC\alpha} = \mu_{LMR} + 1,64 \cdot \sigma_{LMR}$$

Où μ_{LMR} et σ_{LMR} représentent respectivement la moyenne et l'écart type de l'amplitude du signal de l'analyte à la concentration égale à la LMR, calculés sur des échantillons supplémentés différents (n=20). La relation intensité/concentration est donnée par une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'un mélange d'échantillons blancs différents (n=20), supplémenté à au moins six niveaux de concentration incluant : 0 (n=5) ; x.MRL (n=5) ; 0,5 LMR (n=10) ; LMR (n=20) ; 1,5 LMR (n=10) et y.LMR (n=5) ou x et y sont fixés en fonction des besoins. Le signal moyen μ_B obtenu pour les échantillons blancs est utilisé comme origine forcée de la droite d'ajustement. D'après cette droite d'étalonnage, $I_{CC\alpha}$ peut s'écrire :

$$I_{CC\alpha} = \mu_B + a \cdot CC\alpha$$

On obtient donc finalement d'après ces deux relations :

$$CC\alpha = (\mu_{LMR} - \mu_B + 1,64 \cdot \sigma_{LMR}) / a$$

Objectif (fixé en interne) : Pour les méthodes spectrométriques, la valeur calculée pour CC α devra être confrontée a posteriori à un signal réellement observé pour une valeur de concentration la plus proche possible, afin de confirmer sa validité. En particulier, dans le cas des substances non soumises à LMR, le signal observé devrait être par définition mesurable dans 50% des cas avec un signal sur bruit d'environ 3 à 6.

2.6. Rendement d'extraction

Fraction de la quantité d'analyte contenu ou ajouté dans l'échantillon analysé qui est extraite et présente à la mesure finale.

Méthode d'estimation :

$$Rdt = 100 \times \frac{\left(\frac{\text{analyte}}{EE}\right)_{Ajout}}{\left(\frac{\text{analyte}}{EE}\right)_{Standard}}$$

- EE = étalon externe ;
- Ajout = échantillon supplémenté en analyte à la concentration C puis extrait ;
- Standard = échantillon témoin extrait et supplémenté en dernière étape par l'analyte cible à la concentration C.

Dans le cas d'une méthode n'incluant pas d'étalon externe, une estimation du rendement d'extraction basé sur les signaux bruts des analytes pourra alternativement être utilisée.

Objectif (fixé en interne) :

Le rendement d'extraction est estimé pour la connaissance des performances de la méthode, mais il n'est pas un critère d'acceptation de l'analyse ; en effet, nous considérons que la spécificité du signal (absence de composés interférents) pèse en général d'avantage sur le rapport signal sur bruit que le rendement d'extraction proprement dit.