

Article original

Intérêt d'un logiciel de déconvolution (AMDIS) et d'une détection SIM/SCAN pour le screening toxicologique par CPG-SM

Improvement of toxicologic GC-MS screening using a deconvolution software (AMDIS) and SIM/SCAN mode

Nathalie Allibe-Signorini^{1*}, Séverine Berard¹, Françoise Vincent², Germain Bessard², Luc Barret¹, Hélène Eysseric^{1,2}

¹ Laboratoire de Médecine Légale, UFR de Médecine, Université Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France

² UF de Pharmacologie-Toxicologie, DBPC, CHU de Grenoble, 38000 Grenoble, France

Résumé – Objectif : Cette étude propose une optimisation du screening toxicologique classique en chromatographie gazeuse couplée à une détection en spectrométrie de masse (CPG-SM), en utilisant un logiciel de déconvolution : Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) et une détection simultanée en mode SIM et en mode SCAN. **Méthodes :** Les analyses sont effectuées avec un appareil CPG-SM Agilent équipé d'un passeur d'échantillons liquides et associé aux logiciels Retention Time Locking Software (RTL) et AMDIS. Deux bibliothèques commerciales (PMW et NIST) sont utilisées ainsi qu'une bibliothèque propre au laboratoire. Un plasma A surchargé avec 16 molécules et un autre plasma B surchargé avec de la buprénorphine et son métabolite la norbuprénorphine ont été utilisés pour tester respectivement le logiciel AMDIS et la sensibilité de la détection SIM/SCAN. **Résultats :** Parmi les 16 molécules du plasma A, 11 ont été mises en évidence par la déconvolution tandis que seulement 5 ont été identifiées par une recherche en librairie classique. Cinq composés n'ont pas été repérés pour des problèmes chromatographiques ou de sensibilité en mode SCAN. La buprénorphine et son métabolite n'ont été mis en évidence que grâce au mode SIM/SCAN. **Conclusion :** La déconvolution permet de détecter des molécules même lorsqu'aucun pic n'est repéré sur le chromatogramme, ceci se vérifie au quotidien sur des cas réels. Le mode SIM/SCAN permet de diminuer le nombre d'injections, tout en conservant la même sensibilité.

Mots clés : Déconvolution, CPG-SM, screening toxicologique

Abstract – Introduction: This study aimed to improve our gas chromatography/mass spectrometry screening method by using a deconvolution software (AMDIS) and a SIM/SCAN mode of detection. **Methods:** Gas chromatography-mass spectrometry analyses were carried out on an Agilent Technologies equipment. Data acquisition and analysis were performed using different softwares: Retention Time Locking, AMDIS and MSD Chemstation, as well as 2 commercial libraries and an in-house library. Two plasmas were prepared: 16 drugs of interest were added to the plasma A so as to test AMDIS, whereas plasma B was prepared by adding buprenorphine and norbuprenorphine to a final concentration of 1 µg/L to control the sensitivity of the SIM/SCAN method. **Results:** The analyse of plasma A shows that 11 drugs were detected by using AMDIS whereas only 5 were identified with the commercial libraries. This GC-MS method does not allow the identification 5 drugs among these 16 tested drugs. It can be noticed that buprenorphine and norbuprenorphine can be detected only by using SIM/SCAN acquisition mode. **Conclusion:** This deconvolution software allows to distinguish the spectrum of the compound from the background noise and the co-elutants. Furthermore, with the SIM/SCAN acquisition mode, the number of injections was able to be decreased.

Key words: Deconvolution, GC-MS, toxicologic screening

Reçu le 23 juin 2008, accepté après modifications le 10 septembre 2008

Publication en ligne le 31 janvier 2009

* Correspondance : Nathalie Allibe-Signorini, Tél. (33)4 76 63 71 07, Fax (33)4 76 63 74 23, nathalie.signorini@ujf-grenoble.fr

1 Introduction

Le screening toxicologique, constitue la première étape d'une analyse dans un laboratoire de toxicologie, que ce soit dans le cadre de la toxicologie médico-légale (recherche des causes de la mort, conduite automobile sous l'emprise de substances psychoactives, identification de produits de saisie) ou de la toxicologie hospitalière (diagnostic de coma, recherche de conduite toxicophile). La mise en évidence ou au contraire l'exclusion de xénobiotiques (stupéfiants, médicaments ou produits toxiques) est l'étape indispensable de recherche et d'identification avant celle de confirmation et de dosage.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (CPG-SM) et la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (CLHP/BD) sont les deux principales techniques utilisées couramment pour le screening. En CPG-SM, le screening a très largement été développé par Maurer qui non seulement propose des applications à différentes classes de molécules dans des matrices variées [1–5], mais réalise également des comparaisons avec les autres techniques de screening existantes [6–8].

Quelle que soit la technique chromatographique de screening utilisée, l'identification d'un composé dépend toujours de deux paramètres essentiels : son spectre (de masse ou UV) et son temps de rétention. Dans le cadre du screening par CPG-SM, les maintenances de routine (colonne coupée, installation d'une colonne neuve), entraînent un décalage des temps de rétention plus ou moins important. Pour pallier ce problème, Blumberg et Klee ont développé le concept de *retention time locking* (RTL) [9]. Il permet de rétablir les temps de rétention d'origine, décalés suite à une maintenance, par ajustement de la pression. Le système RTL permet une quasi parfaite reproductibilité des temps de rétention avec un coefficient de variation inférieur à 0,1 % par simple blocage du temps de rétention d'un seul analyte, désigné comme le composé de référence de la méthode utilisée [10]. Ainsi, ce système apporte une fiabilité supplémentaire à l'identification des molécules lorsque l'on souhaite créer des bibliothèques couplant le spectre de masse d'un composé à son temps de rétention. Des essais inter-instruments sont également réalisables, à condition d'avoir le même composé de référence (obtention des mêmes temps de rétention sur deux instruments différents). Jusqu'à présent, le système RTL a été appliqué avec succès dans le domaine de l'agroalimentaire [11, 12] et dans celui de la toxicologie [10]. En effet, Rasanen et coll. [10] ont réalisé une étude évaluant l'impact du système RTL sur la précision à long terme du temps de rétention de 124 médicaments couramment rencontrés en toxicologie à des concentrations thérapeutiques et toxiques dans des sangs collectés lors d'autopsie. Ce travail a montré que l'utilisation du système RTL augmente la précision du temps de rétention rendant ainsi le dépistage de ces 124 molécules plus fiable.

Parallèlement à la variation du temps de rétention, et toujours dans le cadre du screening, il persiste un obstacle à l'exploitation la plus complète possible d'un chromatogramme : comment détecter/repérer et identifier des composés coélus ou noyés dans le bruit de fond ? En effet, un spectre issu

directement du chromatogramme s'avère souvent être un assemblage de différents spectres (matrice, interférents, analytes). Pour s'affranchir de telles interférences et améliorer la sensibilité, une solution peut être de réaliser l'analyse en mode SIM (*select ion monitoring*) plutôt qu'en mode SCAN. Cependant, en mode SIM le composé ne peut être détecté que par quelques ions, et cela suppose que les composés recherchés soient connus puisque ce mode de détection correspond à une détection d'ions choisis par l'utilisateur, on parle alors de screening ciblé ou *multi target screening* (MTS). Ce système de détection n'est donc pas adapté à un screening destiné à identifier des composés inconnus de l'analyste (*general unknown screening* ou GUS).

Pour résoudre le problème des composés coélus ou noyés dans le bruit de fond, le National Institute of Standards and Technology (NIST) a développé un nouveau logiciel nommé AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System). Ce logiciel permet, par un procédé mathématique, d'extraire un signal d'une matrice complexe afin d'obtenir des spectres de masse épurés. De plus, ce système permet une identification spectrale couplée au temps de rétention, et confirme le résultat par une recherche sur la bibliothèque NIST 05 [13]. En effet, dans un premier temps, le logiciel compare le spectre de masse et identifie le composé par rapport aux spectres de masse et aux temps de rétention des composés présents dans la bibliothèque créée au laboratoire, puis ce résultat est confirmé par rapport aux spectres de masse des bibliothèques commerciales : NIST et PMW (Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites) [13, 14].

D'autres logiciels permettant une analyse automatisée des chromatogrammes obtenus en CPG-SM ont été développés pour dépister des composés inconnus à partir de prélèvements biologiques [15–17]. Par exemple, la macro-commande Caribou a été développée par Cohen et coll. afin d'identifier et d'estimer de manière semi-quantitative les molécules présentes dans des prélèvements de sérum ou d'urine [16, 17]. En 1999, AMDIS a été testé pour la détection automatique d'acides organiques dans l'urine par Halket et coll. [18]. Härtig a récemment utilisé la combinaison spectres de masse et temps de rétention bloqués grâce au système RTL afin d'identifier rapidement des dérivés d'acides gras [19]. Cependant ce type de recherche automatisée basée sur 2 critères (spectre de masse et temps de rétention) a plutôt été utilisé pour l'analyse des pesticides [20–24]. Le logiciel AMDIS a également été appliqué avec succès au domaine de la toxicologie. Rasanen et coll. ont identifié automatiquement plusieurs médicaments à partir de sangs collectés lors d'autopsie même lorsqu'aucun pic n'était visible sur le chromatogramme [25].

L'objectif de ce travail a été de développer une méthode de screening en CPG-SM en exploitant d'une part les concepts de temps de rétention bloqués et de déconvolution proposés par les logiciels de traitement associés à l'appareillage, et d'autre part en créant une bibliothèque de référence, propre au laboratoire couplant les spectres de masse et les temps de rétention. Ce type de bibliothèque est nécessaire au fonctionnement du logiciel AMDIS et permet une identification des composés plus fiable.

Tableau I. Liste des molécules utilisées pour surcharger le plasma A.

Produits	Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Produits	Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Produits	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
Pentobarbital	10 000	Loxapine	100	Oxazépam	100
Phénobarbital	10 000	Bromazépam	100	Cétirizine	100
Méprobamate	10 000	Hydroxyzine	100	Bisoprolol	100
Quinine	10 000	Tropatépine	100	Betaxolol	100
Halopéridol	100	Paroxétine	100	Risperidone	100
Buprénorphine	25				

Nous avons également testé l'intérêt du mode SIM/SCAN en termes de sensibilité sur des molécules choisies pour leur faible niveau de concentration, la buprénorphine et la norbuprénorphine.

2 Matériel et méthode

2.1 Réactifs et produits de référence

L'acétate d'éthyle (AE) et le méthanol sont fournis par SDS (Peypin, France), le Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide avec 1 % de triméthylchlorosilane (BSTFA 1 %TMCS) par Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA). Les Toxitubes[®] A et B (extraction liquide-liquide) sont fournis par Varian (Lake Forest, USA). Le SKF-525A (SKF ou N,N-diéthylaminoéthyl 2,2-diphénylvalérate), fourni par Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA) est utilisé comme étalon interne. Les produits de référence utilisés pour la création de la bibliothèque et pour la surcharge des plasmas sont fournis par les différents laboratoires pharmaceutiques qui les commercialisent. Le plasma témoin est fourni par l'Établissement Français du Sang. Des analyses en CLHP/BD et en CPG-SM ont permis de vérifier que ce plasma ne contenait aucun toxique. Les solutions de produits de référence et SKF sont à 100 mg/L dans le méthanol et conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Cas réels

16 échantillons de sang total post-mortem provenant d'autopsies ont été utilisés pour réaliser nos tests sur des cas réels de médecine légale.

2.3 Préparation d'échantillons

– Solutions pures (solutions à 100 mg/L dans du méthanol) :

À 10 μL de solution pure est ajouté 0,1 μg de SKF. Le tout est évaporé sous un flux d'azote. Le résidu sec est repris par 60 μL d'acétate. Ensuite la moitié de cette solution est prélevée et évaporée sous un flux d'azote. Le résidu sec est alors repris par 30 μL de BSTFA 1 %TMCS (agent silylant). Cette solution est laissée 1 heure à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans une étuve. Les deux

solutions obtenues, l'une dans l'acétate d'éthyle et l'autre dans le BSTFA 1 %TMCS sont injectées en CPG-SM.

– Échantillons biologiques (plasmas surchargés ou sang de cas réels).

Les extractions sont réalisées en Toxitube[®] A selon le mode opératoire suivant : 1 mL d'échantillon biologique est introduit dans le Toxitube[®], 5 μL d'une solution de SKF à 100 mg/L sont ajoutés et le volume est complété à 5 mL avec de l'eau distillée. Le Toxitube[®] est ensuite placé sous agitation douce pendant 10 minutes puis centrifugé pendant 10 minutes à 1300 g. Le surnageant est récupéré dans un tube en verre borosilicaté et évaporé sous azote. Le résidu sec est repris par deux fois 100 μL d'un mélange eau/acétonitrile (50/50, v/v) et transféré dans un tube Eppendorf. La solution est vortexée puis centrifugée 5 minutes à 14 000 g. Le surnageant est transféré dans un réactifial et évaporé sous azote. Le résidu sec est repris par 60 μL d'acétate d'éthyle. La moitié de cette solution est conservée à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tandis que les 30 μL restants sont évaporés sous azote puis repris par 30 μL de BSTFA 1 %TMCS et placés 1 heure à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les extraits sont ensuite injectés en CPG-SM.

Les tests en screening ont été réalisés sur un plasma témoin surchargé contenant les 16 molécules présentées dans le tableau I (plasma surchargé A).

Les tests en SIM/SCAN ont été réalisés sur un plasma témoin contenant buprénorphine et norbuprénorphine à 1 $\mu\text{g/L}$ (plasma surchargé B).

2.4 Système CPG-SM

Les analyses sont effectuées avec un chromatographe 6890N Network GC System (Agilent Technologies) couplé à un spectromètre de masse 5975 inert XL Mass Selective Detector, équipé d'un passeur d'échantillons liquides 7683 Series Autosampler. Les injections automatiques (1 μL) sont réalisées en mode splitless pulsé, à une température de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, sur une colonne capillaire de silice fondue : DB-5ms (30 m \times 0,25 mm d.i. ; 0,25 μm d'épaisseur de film). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit constant de 1 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 min, puis une programmation à $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ jusqu'à $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ et un plateau de 11 min à $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. La détection est réalisée en impact électronique à 70 eV, en mode SCAN avec un balayage des masses de 40 à 600 uma. Les températures de l'interface, de la source et du quadripôle sont respectivement de 315, 230 et $150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Déconvolution (11/16)

Phénobarbital		Non détectés : Bisoprolol, Cétirizine, Paroxétine, Buprénorphine et Rispéridone
Bétaxolol	Halopéridol	
Oxazépam	Tropatépine	
Hydroxyzine		
<i>Méprobamate</i>	<i>Pentobarbital</i>	Recherche en librairie classique (5/16)
<i>Bromazépam</i>	<i>Quinine</i>	
<i>Loxapine</i>		

Fig. 1. Comparaison d’une recherche en bibliothèque avec AMDIS (en gras) et d’une recherche classique en librairie (en italique) après injection du plasma A.

2.5 Logiciels

Les différents logiciels utilisés sont les suivants : MSD ChemStation (Rev. D.02.00.275), Retention Time Locking Software (Rev. B.01.01), qui permet de travailler en temps de rétention bloqués, et MSD Productivity Chemstation Deconvolution Reporting Software (déc. 2005 – Rev.A.02.01).

Deux bibliothèques commerciales sont utilisées : NIST 05 Spectral library (Rev. D.05.00) et PMW (Rev.D.04.00).

2.6 Création de la bibliothèque

Une fois la méthode chromatographique fixée en temps de rétention grâce au système RTL, 1 µL de chaque solution de produit pur a été injecté afin d’obtenir les spectres d’ions et les temps de rétention des différentes molécules. Notre propre bibliothèque couplant spectre de masse et temps de rétention, a alors pu être créée avec le SKF en produit de référence pour les temps de rétention.

3 Résultats

Le plasma A surchargé avec 16 molécules (tableau I) a été utilisé pour tester le logiciel de déconvolution. Les résultats obtenus pour le screening de ce plasma sont présentés dans la figure 1. Deux types de recherche en bibliothèque ont été réalisés : d’une part une recherche avec AMDIS effectuée automatiquement sur tout le chromatogramme et corrélant spectre de masse et temps de rétention, d’autre part une recherche en librairie classique qui est une technique manuelle au cours de laquelle l’analyste lance une recherche en bibliothèque, ne tenant compte que du spectre de masse, pour chaque pic du chromatogramme. Contrairement à la recherche avec AMDIS,

cette recherche classique ne tient pas compte du temps de rétention des produits et elle est réalisée avec le spectre d’ions total c’est-à-dire non épuré.

Parmi les 16 molécules du plasma A, 11 sont identifiées lors de la recherche avec AMDIS, tandis que seulement 5 sont reconnues par la recherche en librairie classique. On note également que 5 composés ne sont pas retrouvés : bisoprolol, cétirizine, paroxétine, buprénorphine et rispéridone.

Nous avons également comparé la recherche avec AMDIS et la recherche en librairie classique pour 10 échantillons de sang post-mortem de médecine légale, les résultats sont présentés dans la figure 2. Pour ces 10 cas réels, la recherche avec AMDIS a permis de détecter 33 molécules parmi 35, tandis que la recherche en librairie classique a mis en évidence seulement 16 molécules sur 35.

Les résultats concernant les tests du mode de détection SIM/SCAN sont présentés à la figure 3. La buprénorphine-1TMS est identifiée en mode SIM, tandis qu’aucun pic n’est visible sur le chromatogramme correspondant au mode SCAN. De la même manière la norbuprénorphine-2TMS ne peut pas être identifiée en mode SCAN puisque 2 ions sur les 3 ions de qualification de cette molécule ne sont pas présents dans l’acquisition en SCAN (*m/z* : 500 et 524) (figure 4). Ce type de détection a été vérifiée sur 6 cas médico-légaux présentant de la buprénorphine dont un avec de la norbuprénorphine à 1,2 µg/L (tableau II).

4 Discussion

Le screening toxicologique s’appuie essentiellement sur des méthodes d’analyses immunochimiques ou chromatographiques. Parmi ces méthodes chromatographiques, CLHP/BD et CPG-SM sont les deux principales techniques utilisées couramment, elles sont complémentaires car l’une permet souvent de mettre en évidence ce que l’autre ne détecte pas.

Déconvolution (33/35)

Témazépam (1)	Diazépam (2)	
Laudanosine (1)	Cyamémazine (1)	
Hydroxyzine (2)	Citalopram (1)	
Tramadol-N-desméthyl (1)	Norcitalopram (1)	
Tramadol-O-desméthyl (1)	Zolpidem (1)	
Bromazépam (2)	Lidocaïne (1)	
<u>Sertraline (107 µg/L (1))</u>	Acéprométazine (1)	
Venlafaxine (1)	Néfopam (1)	<i>Recherche en librairie classique (16/35)</i>
<i>Caféine (3)</i>	<i>Mirtazapine (1)</i>	
<i>Paracétamol (4)</i>	<i>Méprobamate (1)</i>	<i>Desmethylclomipramine (1)</i>
<i>Norcyamémazine (1)</i>	<i>Sertraline (206 µg/L (1))</i>	
<i>Nordiazépam (1)</i>	<i>Tramadol (1)</i>	<i>Noralimémazine (1)</i>
<i>Clomipramine (1)</i>		

Fig. 2. Comparaison de la recherche AMDIS (en gras) et de la recherche en librairie classique (en italique) pour 10 cas réels de médecine légale. Les chiffres indiqués entre parenthèse correspondent au nombre de fois où le composé a été détecté.

Tableau II. Comparaison des résultats de dosage et d’une détection SIM/SCAN pour la buprénorphine et la norbuprénorphine pour 6 cas réels de médecine légale.

	Buprénorphine		Norbuprénorphine	
	Dosage (µg/L)	SIM/SCAN	Dosage (µg/L)	SIM/SCAN
Cas n°1	35,5	+	33,7	+
Cas n°2	9,9	+	13,2	+
Cas n°3	7,2	+	1,2	+
Cas n°4	6,5	+	2,2	+
Cas n°5	3,4	+	3,4	+
Cas n°6	4,9	+	5	+

La CPG-SM, principalement avec un mode d’ionisation par impact électronique (IE) et une analyse en balayage total des masses (ou mode SCAN), est la méthode de référence pour le screening. Elle associe un bon pouvoir de séparation à une détection spécifique et universelle. Elle fournit des spectres de masse riches en informations, très reproductibles, permettant ainsi l’utilisation de différentes bibliothèques de référence totalisant plus de 500 000 spectres (PMW

et NIST) [13, 14]. Cette technique présente néanmoins deux inconvénients : d’une part, les composés thermosensibles ne sont pas analysables car ils se dégradent dans l’injecteur dont la température est élevée, d’autre part elle nécessite d’avoir des molécules volatiles. Cependant, une dérivation des molécules peut permettre de pallier ce dernier inconvénient. Par exemple, la méthylation, la silylation ou l’acylation de certaines molécules peut être réalisée afin d’abaisser leur point d’ébullition et d’augmenter leur volatilité [26].

La CLHP/BD est souvent utilisée pour le screening ; en effet, elle permet la détection d’un très grand nombre de molécules car beaucoup absorbent dans l’UV. Cependant, son pouvoir de séparation et sa spécificité sont inférieurs à ceux de la CPG-SM en mode IE-SCAN. Contrairement aux spectres de masse (IE), les spectres UV peuvent être influencés par différents paramètres tels que la phase mobile, le pH, la température. Ce manque de spécificité du spectre UV implique de prendre en compte également le paramètre temps de rétention et donc des conditions chromatographiques fixées. Il est, par conséquent, nécessaire d’appliquer la méthode du constructeur dans les moindres détails pour pouvoir utiliser la bibliothèque

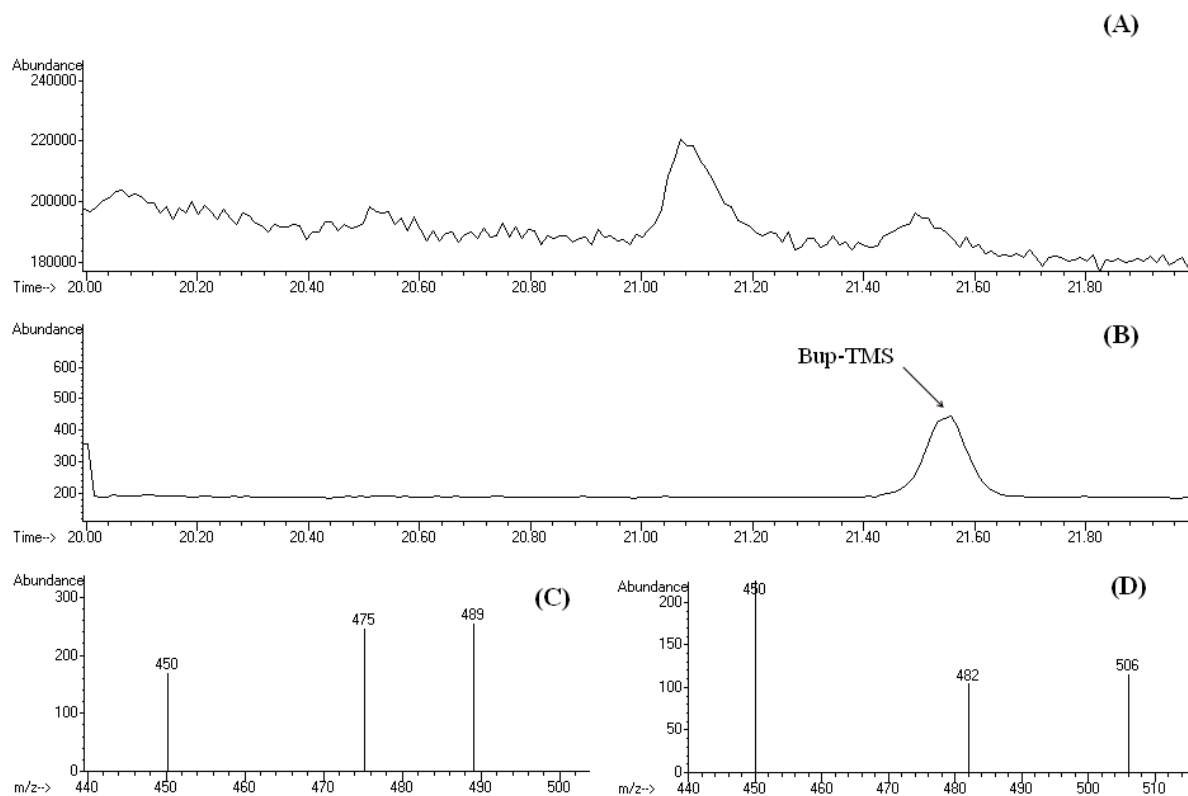


Fig. 3. Détection SIM/SCAN de la buprénorphine-1TMS. (A) Chromatogramme de l'acquisition en mode SCAN (40 à 600 u/a). (B) Chromatogramme de l'acquisition en mode SIM. (C) Spectre de masse correspondant au mode SCAN. (D) Spectre de masse correspondant au mode SIM.

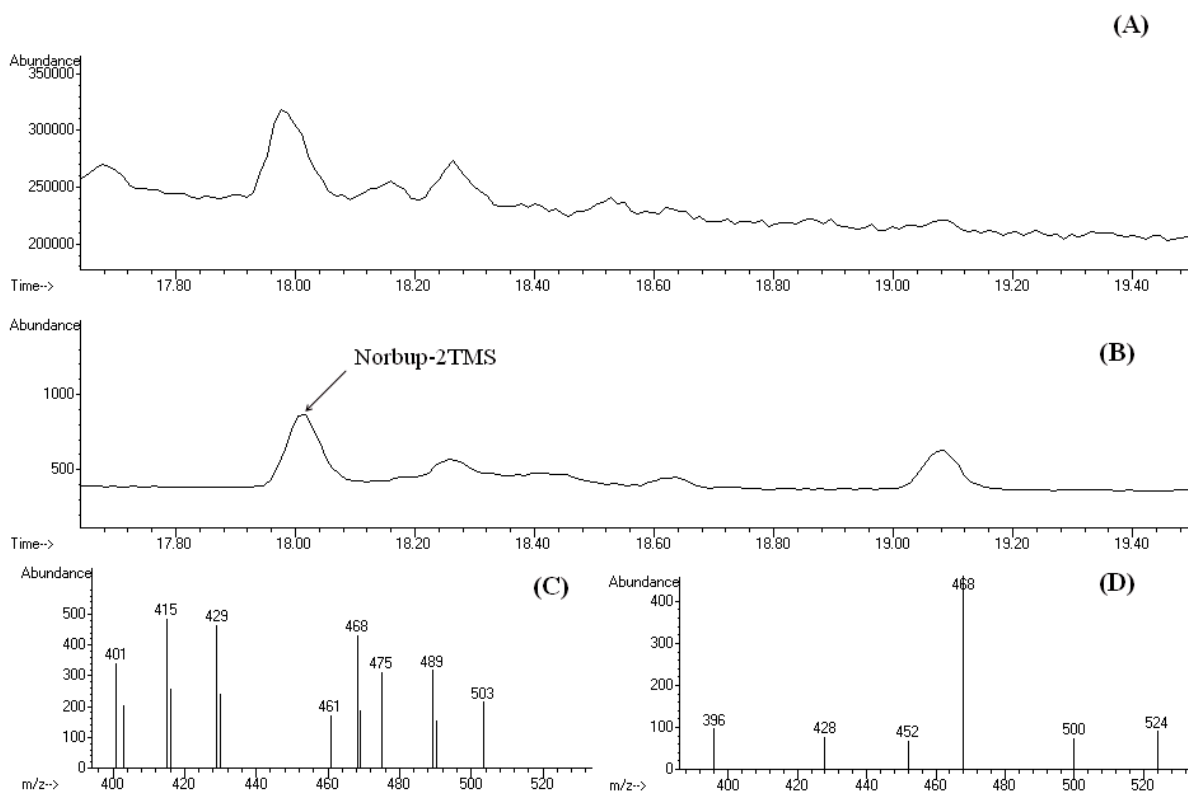


Fig. 4. Détection SIM/SCAN de la norbuprénorphine-2TMS. (A) Chromatogramme de l'acquisition en mode SCAN (40 à 600 u/a). (B) Chromatogramme de l'acquisition en mode SIM. (C) Spectre de masse correspondant au mode SCAN. (D) Spectre de masse correspondant au mode SIM.

fournie avec l'appareil. Si ce n'est pas le cas, le laboratoire doit élaborer sa propre bibliothèque [6].

La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse simple quadripôle ou en tandem (CLHP-SM, CLHP-SM/SM) s'impose peu à peu comme une technique de screening complémentaire aux deux autres [27, 28]. Elle permet la détection de substances moins volatiles, plus polaires, instables ou faiblement concentrées, particulièrement dans le plasma. Malheureusement, de nombreux inconvénients subsistent : appareillage coûteux, pouvoir de séparation assez limité, manque de reproductibilité de la fragmentation, risque important de suppression d'ions par les composés coélués. De plus, il faudrait que l'un des nombreux protocoles proposés devienne la méthode de référence (choix de la source d'ionisation par exemple). Ceci permettrait la création de bibliothèques comportant des spectres de masse « universels », utilisables par tout possesseur d'une CLHP/SM [7, 8, 27, 28].

Afin d'optimiser le screening en CPG-SM nous avons utilisé un logiciel de déconvolution (AMDIS) ainsi qu'une détection en mode SIM/SCAN.

Pour obtenir une meilleure fiabilité de l'identification, il est important de coupler spectre de masse et temps de rétention du composé. De plus, le temps de rétention est un paramètre de reconnaissance indispensable pour le logiciel AMDIS. Nous avons donc créé notre propre bibliothèque (GRENOBLE) qui nous permet ainsi de coupler ces deux paramètres. Un autre intérêt de créer notre propre bibliothèque est de pallier certains inconvénients dus aux bibliothèques commerciales. La NIST et la PMW sont utilisées quotidiennement au laboratoire. Cependant, ces deux bases de données spectrales présentent plusieurs inconvénients. Elles ne sont pas exhaustives et ne contiennent pas certains métabolites et dérivés silylés, ainsi que quelques médicaments et stupéfiants. La cétirizine, par exemple, est absente de la NIST comme de la PMW. De plus, dans la PMW, l'enregistrement de la plupart des spectres de masse ne débute qu'à 50 uma. Or, les produits tels que les métabolites des antidépresseurs sont caractérisés par des spectres de masse ayant l'ion 44 majoritaire, ce qui conduit parfois à une faible reconnaissance du spectre inconnu enregistré dans nos conditions expérimentales lorsqu'il est comparé à la bibliothèque commerciale.

Par ailleurs, pour pallier les variations des temps de rétention, qui peuvent perturber l'interprétation, deux solutions sont possibles : soit de travailler en temps de rétention relatifs, soit de réajuster après chaque maintenance les temps de rétention, ce que nous permet de réaliser automatiquement le logiciel RTL. En effet, l'appareil ajuste automatiquement la pression du gaz vecteur dans la colonne pour que le temps de rétention du composé de référence (SKF) soit toujours identique. Après une maintenance (colonne coupée, changée), il suffit d'indiquer le temps de rétention d'origine de notre composé de référence. Le logiciel calcule alors automatiquement la pression nécessaire pour rétablir le temps de rétention et l'applique. Les paramètres chromatographiques étant ainsi réajustés puis bloqués, la reproductibilité des temps de rétention des différentes molécules est optimisée.

Une fois notre bibliothèque élaborée, nous avons réalisé des essais de traitement des résultats par le logiciel de déconvolution. Dans ce but, un plasma a été surchargé avec

16 molécules à concentration thérapeutique ou toxique rencontrées couramment en toxicologie pouvant présenter des problèmes d'analyse. En effet, certaines molécules, comme le méprobamate, ne sont détectées ni en immunochimie, ni en CLHP/BD ou certaines sont des molécules ne pouvant pas être identifiées de manière fiable en CLHP/BD, dans les conditions d'analyse du laboratoire, car parfois coéluées et présentant des spectres UV relativement proches : venlafaxine et bisoprolol, quinine et quinidine, amoxapine et loxapine. Enfin certaines de ces molécules posent des problèmes de détection en CPG-SM : paroxétine, risperidone ou des problèmes de détection à la fois en CPG-SM et en CLHP/BD comme la cétirizine.

L'analyse de ce plasma surchargé, nous a permis d'évaluer les performances du logiciel AMDIS ainsi que ses limites, en comparaison d'une recherche classique en bibliothèque. Ceci a permis de montrer que 11 molécules parmi les 16 sont identifiées par la recherche avec AMDIS, tandis que seulement 5 molécules parmi les 16 sont reconnues par la recherche classique en librairie (figure 1). On note également que 5 composés ne sont pas retrouvés quelque soit le type de recherche. Dans nos conditions d'analyse, la détection de quatre de ces molécules (bisoprolol, cétirizine, paroxétine et buprénorphine) est difficile aux concentrations utilisées dans cette étude. En ce qui concerne la risperidone, cette molécule n'est pas détectée dans nos conditions d'analyse de CPG-SM, même lorsqu'elle est injectée en direct sans extraction. Au laboratoire cette molécule est détectée et dosée par chromatographie liquide.

Les performances du logiciel AMDIS ont ensuite été testées sur 10 cas réels médico-légaux (figure 2). Ces 10 sangs collectés lors d'autopsie ont tout d'abord été analysés par les techniques utilisées habituellement au laboratoire : FPIA (Fluorescence Polarisation ImmunoAssay), CLHP/BD et CPG-SM. Plus de 90 % des produits ont été détectés par la recherche avec AMDIS, alors que moins de 50 % des molécules sont mises en évidence par la recherche en librairie classique. Seulement 2 produits n'ont pas été détectés par la recherche avec AMDIS, cependant ces deux molécules ne font pas partie de la bibliothèque GRENOBLE. Le logiciel AMDIS ne les connaissant pas, elles ne peuvent donc pas être identifiées. Ceci est le principal inconvénient de cette méthode, il est donc nécessaire de créer une bibliothèque la plus importante possible et surtout d'augmenter le nombre de produits la composant lorsque de nouvelles molécules apparaissent sur le marché. Après ajout de ces 2 molécules dans notre bibliothèque, elles ont été retrouvées par la recherche avec AMDIS.

En ce qui concerne la buprénorphine et son métabolite la norbuprénorphine, nous avons pu pallier le problème de sensibilité en utilisant une détection SIM/SCAN. Ce mode de détection permet d'atteindre une limite de détection suffisante pour le produit cherché, grâce au mode SIM, tout en disposant de la détection simultanée en mode SCAN pour le dépistage et l'identification d'autres produits inconnus.

Ainsi la détection en mode SIM/SCAN permet de mettre en évidence la buprénorphine-1TMS et la norbuprénorphine-2TMS présentes en faible concentration (1 µg/L). L'analyse de 6 cas médico-légaux dont les taux de buprénorphine et norbuprénorphine ont été préalablement dosés en CPG-SM, a permis de confirmer la détection de ces molécules même à de faibles concentrations (tableau II).

La détection SIM/SCAN permet une amélioration de la limite de détection, tout en conservant la possibilité de réaliser le dépistage de composés inconnus puisque le spectre de masse total est disponible. Une recherche en bibliothèque avec AMDIS peut donc être réalisée sur un chromatogramme acquis en SIM/SCAN. De plus, jusqu'ici l'échantillon silylé était injecté deux fois : une injection en mode SCAN pour le screening et une injection en mode SIM pour une recherche spécifique de la buprénorphine et de son métabolite. Ainsi, ce type de détection nous permet de diminuer le nombre d'injections.

5 Conclusion

Le logiciel de déconvolution (AMDIS) permet, par un procédé mathématique, d'extraire un signal d'une matrice complexe afin d'obtenir des spectres de masse épurés. Ainsi détecter automatiquement des molécules même lorsqu'aucun pic n'est repérable sur le chromatogramme devient possible. La limite de détection des composés ainsi que la fiabilité de l'identification ont été améliorées. Cependant la déconvolution n'est valable que pour les molécules appartenant à la bibliothèque propre au laboratoire puisque le temps de rétention est un des paramètres de reconnaissance. Il est donc important que le nombre de molécules présentes dans cette bibliothèque soit incrémenté régulièrement en fonction des nouvelles molécules et métabolites disponibles, pour améliorer la performance du screening.

Par ailleurs, l'utilisation du mode SIM/SCAN a permis d'augmenter la sensibilité de détection de la buprénorphine et de son métabolite. Ce mode pourra être appliqué à d'autres molécules difficiles à identifier, telles que la paroxétine, la cétirizine ou certains bêta-bloquants, pour lesquelles un manque de sensibilité est observé dans nos conditions d'analyse en CPG-SM. Un autre avantage du mode SIM/SCAN est de diminuer le nombre d'injections et ainsi de limiter l'encrassement de l'appareillage.

Références

- Maurer HH. Identification and differentiation of barbiturates, other sedative-hypnotics and their metabolites in urine integrated in a general screening procedure using computerized gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1990; 530(2): 307-326.
- Bickeboeller-Friedrich J, Maurer HH. Screening for detection of new antidepressants, neuroleptics, hypnotics, and their metabolites in urine by GC-MS developed using rat liver microsomes. *Ther Drug Monit.* 2001; 23(1): 61-70.
- Maurer HH, Tauvel FX, Kraemer T. Screening procedure for detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography-mass spectrometry after extractive methylation. *J Anal Toxicol.* 2001; 25: 237-244.
- Peters FT, Schaefer S, Staack RF, Kraemer T, Maurer HH. Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2003; 38(6): 659-676.
- Peters FT, Jung J, Kraemer T, Maurer HH. Fast, simple, and validated gas chromatographic-mass spectrometric assay for quantification of drugs relevant to diagnosis of brain death in human blood plasma samples. *Ther Drug Monit.* 2005; 27(3): 334-344.
- Maurer HH. Screening procedure for simultaneous detection of several drug classes used for high-throughput toxicological analyses and doping control. A review. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2000; 3: 467-480.
- Maurer HH. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(11): 1310-1324.
- Maurer HH, Peters FT. Toward high throughput drug screening using mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2005; 27(6): 686-688.
- Blumberg LM, Klee MS. Method translation and retention time locking in partition GC. *Anal Chem.* 1998; 70: 3828-3839.
- Rasanen I, Kontinen I, Nokua J, Ojanperä I, Vuori E. Precise gas chromatography with retention time locking in comprehensive toxicological screening for drugs in blood. *J Chromatogr B.* 2003; 788: 243-250.
- Cook J, Engel M, Wylie P, Quimby B. Multiresidue screening of pesticides in foods using retention time locking, GC-AED, database search, and GC-MS identification. *J AOAC Int.* 1999; 82(2): 313-326.
- Huang Z, Li Y, Chen B, Yao S. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2007; 853: 154-162.
- National Institute of Standards and Technology, NIST (Agilent Technologies; Rev.D.05.00).
- Pfleger K, Maurer HH, Weber A. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites (Agilent Technologies; Rev.D.04.00). Version 2002.
- Stimpfl Th, Demuth W, Varmuza K, Vycudilik W. Systematic toxicological analysis: computer-assisted identification of poisons in biological materials. *J Chromatogr B.* 2003; 789: 3-7.
- Bevalot F, Magne L, Gaillard Y, Le Meur C. Utilisation de macrocommandes pour l'optimisation de l'exploitation des chromatogrammes de dépistages systématiques obtenus en CPG-SM. *Ann Toxicol Anal.* 2003; 15(3): 169.
- Cohen S, Berny C, Bevalot F, Darnaud C, Manchon M, Guillaumont M, Guitton J. Screening toxicologique et estimation semi quantitative par GCMS. Réalisation 24h sur 24, dans un contexte hospitalier. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19(2): 195.
- Halket JM, Przyborowska A, Stein SE, Mallard WG, Down S, Chalmers RA. Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids – potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1999; 13: 279-284.
- Härtig C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using multidimensional gas chromatography-mass spectrometry database. *J Chromatogr A.* 2008; 1177: 159-169.
- Zhang W, Wu P, Li C. Study of automated mass spectral deconvolution and identification system (AMDIS) in pesticide residue analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20: 1563-1568.
- Mondello L, Salvatore A, Tranchida PQ, Cassili A, Dugo P, Dugo G. Reliable identification of pesticides using linear retention indices as an active tool in gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A.* 2008; 1186: 430-433.

22. Furtula V, Derksen G, Colodey A. Application of automated mass spectrometry deconvolution and identification software for pesticide analysis in surface waters. *J Environ Sci Health B*. 2006; 41: 1259-1271.
23. Krupcik J, Mydlova J, Spanik I, Tienpont B, Sandra P. Computerized separation of chromatographically unresolved peaks. *J Chromatogr A*. 2005; 1084: 80-89.
24. Dagan S. Comparison of gas chromatography-pulsed flame photometric detection-mass spectrometry, automated mass spectral deconvolution and identification system and gas chromatography-tandem mass spectrometry as tools for trace level detection and identification. *J Chromatogr A*. 2000; 868: 229-247.
25. Rasanen I, Vuori E, Ojanperä I. Quantitative screening for acidic and neutral drugs in whole blood by gas chromatography full scan mass spectrometry utilizing automated mass spectral deconvolution and identification system (AMDIS). Abstract book, TIAFT, Séoul, Corée. 29 août-2 sept. 2005: 130.
26. Humbert L, Lhermitte M. Molécules indétectables par chromatographie en phase gazeuse. *Ann Toxicol Anal*. 2005; 17(1): 57-63.
27. Maurer HH. Progress of LC-MS and LC-MS/MS in analytical toxicology. *Ann Toxicol Anal*. 2005; 17(1): 1-3.
28. Maurer HH. Screening by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Ann Toxicol Anal*. 2005; 17(1): 13-20.