

Introduction : Progress of LC-MS and LC-MS/MS in analytical toxicology

Introduction : l'avenir de la LC-MS et de la LC-MS/MS en toxicologie analytique

Hans H. MAURER

Department of Experimental and Clinical Toxicology,
Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology
University of Saarland - D-66421 Homburg (Saar), Germany

Tel. : +49 6841 1626050 - Fax : +49 6841 162 6051 - E-mail : hans.maurer@uniklinikum-saarland.de

Since the 1970s, different LC-MS interface types such as moving belt, direct liquid introduction, continuous-flow or frit-terminated fast atom bombardment, particle beam, and thermospray have been developed for removing the mobile phase and for ionization of the analytes. However, none of these interfaces has proven to be suitable for routine analysis. Only the development of electrospray ionization (ESI) and atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) brought the breakthrough. In 2002, the Nobel Prize in Chemistry was presented to John B. Fenn and Koichi Tanaka for their development of electrospray ionization as a soft ionization method for mass spectrometric analyses of biological macromolecules.

Since about 10 years, rather robust apparatus are available and an increasing number of analytical toxicologists have developed LC-MS and LC-MS/MS procedures for screening, identification and/or quantification of drugs, poisons and/or their metabolites in all kind of biosamples (1-5). A synopsis of the activities of SFTA members in this field was presented at their Scientific Meeting on LC-MS held in Paris in December 2004. The proceedings in this issue demonstrate their high performance.

On this occasion, Marc Deveaux, the editor of the *Annales de Toxicologie Analytique*, asked me to criti-

Depuis les années 70, les différents types d'interface de LC-MS tels que la ceinture mobile, l'introduction liquide directe (infusion), le bombardement rapide d'atome à débit continu ou frit-terminated, le faisceau de particules et le thermospray ont été développés pour enlever la phase mobile et pour ioniser les analytes. Cependant, aucune de ces interfaces ne s'est avérée appropriée à l'analyse de routine. Seuls les développements de l'ionisation par electrospray (ESI) et de l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ont permis la percée, et en 2002, le prix Nobel de chimie a été attribué à John B. Fenn et Koichi Tanaka pour leur développement de l'ionisation par electrospray comme méthode douce d'ionisation pour l'analyse des macromolécules biologiques par spectrométrie de masse.

Depuis environ 10 ans, des appareils assez robustes sont disponibles et un nombre croissant de toxicologues analystes ont développé des procédures de LC-MS et de LC-MS/MS pour le dépistage, l'identification et/ou la quantification des drogues, des poisons et/ou de leurs métabolites dans les différents liquides biologiques (1-5). Une synthèse des activités des membres de la Société Française de Toxicologie Analytique dans ce domaine a été présentée à la Journée Scientifique «LC-MS et LC-MS/MS en toxicologie analytique» à Paris le 10 décembre 2004. Les articles de ce numéro démontrent leur haut niveau.

À cette occasion, Marc Deveaux, rédacteur en chef des

cally comment the progresses and the pros and cons of LC-MS and LC-MS/MS and finally to assess their position today and in future in the arsenal of analytical techniques in forensic and clinical toxicology. As always, new technologies encourage active colleagues to adopt them into their routine work. Most people tried to develop procedures for analytes which they could already analyze with good success with established methods like GC-MS (e.g. common drugs of abuse in urine or blood) (1-5). In such cases, it is often difficult to assess the actual benefit of the LC-MS procedures after accounting for disadvantages such as ion suppression, the high costs for the apparatus, for method development and validation, etc. Fortunately, some colleagues focused and are focusing their work on analytes which are not at all or difficult to analyze by established techniques such as quaternary muscle relaxants, glycosides, amanitins, antidiabetics, low-dosed opioids, benzodiazepines, neuroleptics, beta-blockers, risperidone, buprenorphine, or LSD (3, 6-15). However, when establishing LC-MS procedures in routine work, several limitations must be kept in mind, as stated by most experts in this field (3-5, 16-19). The spectral information of electrospray ionization (ESI) and/or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) spectra is limited compared with electron ionization mass spectra. Collision-induced dissociation (CID), which leads to structure related fragments, can be achieved by raising the orifice or fragmentor voltage, but the fragmentation patterns can vary considerably between different apparatus (18-21). Another important problem when using ESI is the possible reduction of the ionization of an analyte by co-eluting compounds, the so-called ion suppression effect (22-27), because in these cases, a relevant toxicant might be overlooked (10) resulting, in the worst case, in the patient's death. Therefore, all pros and cons have to be considered before establishing new methods in daily laboratory routine.

Nevertheless, LC-MS has shown to be an ideal supplement to the current gold standard GC-MS, especially for detection of more polar, unstable or low-dosed drugs, especially in blood plasma. It may become a gold standard in clinical and forensic toxicology and doping control if some days the current disadvantages like irreproducibility of fragmentation, reduction of ionization by matrix etc. will be overcome, if one of the increasing number of quite different techniques will become the apparatus standard, and finally, if the costs of the apparatus will markedly be reduced.

Annales de Toxicologie Analytique, m'a demandé de commenter de façon critique les progrès et le pour et le contre de la LC-MS et de la LC-MS/MS, d'évaluer leur position aujourd'hui et d'envisager leur avenir dans l'arsenal des techniques analytiques en toxicologie médico-légale et clinique. Comme toujours, les nouvelles technologies incitent les collègues les plus actifs à les adopter pour leur travail de routine. La plupart des toxicologues ont essayé de développer des procédures pour les analytes qu'ils pouvaient déjà analyser avec succès par des méthodes établies comme la GC-MS (par exemple les drogues d'abus dans les urines ou dans le sang) (1-5). Dans ces cas, il est souvent difficile d'évaluer l'avantage réel des procédures de LC-MS après avoir tenu compte des inconvénients tels que la suppression d'ions, les coûts élevés de l'appareil, du développement et de la validation de la méthode, etc. Heureusement, quelques collègues ont focalisé (et focalisent !) leur travail sur les analytes qui ne sont pas analysables ou qui sont difficilement analysables par des techniques déjà établies, tels que les paralysants neuromusculaires, les glycosides, les amanitines, les antidiabétiques, les opioïdes utilisés à petite dose, les benzodiazépines, les neuroleptiques, les bêta-bloquants, la rispéridone, la buprénorphine, ou le LSD (3, 6-15).

Cependant, quand on établit des procédures de LC-MS pour le travail de routine, plusieurs limitations doivent être gardées à l'esprit : la plupart des experts dans ce domaine sont d'accords sur ces points (3-5, 16-19). L'information spectrale obtenue par ESI et/ou par APCI est relativement limitée comparé aux spectres de masse obtenus par ionisation électronique. La dissociation induite par collision (CID), qui mène à des fragments liés à la structure, peut être réalisée en élevant la tension de l'orifice ou du fragmenteur, mais les modèles de fragmentation peuvent varier considérablement entre les différents appareils (18-21). Un autre problème important en utilisant l'ESI est la réduction possible de l'ionisation d'un analyte par des composés co-élués, appelé la suppression d'ions (22-27). Dans ce cas, un toxique important pourrait ne pas être détecté (10), ayant pour conséquence, dans le pire des cas, le décès du patient. Par conséquent, tous les avantages et les inconvénients doivent être considérés avant d'établir de nouvelles méthodes de LC-MS ou de LC-MS/MS dans la routine quotidienne du laboratoire.

Néanmoins, la LC-MS est devenu un complément idéal à la méthode de référence actuelle, la GC-MS, particulièrement pour la détection des substances plus polaires, instables ou faiblement dosées, particulièrement dans le plasma. Elle pourrait devenir une méthode de référence en toxicologie clinique et médico-légale et dans le contrôle antidopage si les désavantages actuels comme la fragmentation peu reproductible, la suppression d'ions et l'effet de matrice sont surmontés. D'autre part, il faudrait qu'une des nombreuses techniques proposées devienne la norme et enfin que le coût des appareils soit nettement diminué.

Références

- Maurer H. H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to Clinical and Forensic Toxicology [review]. *Clin. Biochem.* 2005 ; 38 : 310-8.
- Maurer H. H. Advances in analytical toxicology : Current role of liquid chromatography-mass spectrometry for drug quantification in blood and oral fluid [review]. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005 ; 378 : in press.
- Maurer H. H. Screening par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). *Ann. Toxicol. Anal.* 2005 ; 17 : 13-20.
- Maurer H. H. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control [review]. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004 ; 42 : 1310-24.
- Marquet P. Progress of LC-MS in clinical and forensic toxicology [review]. *Ther. Drug Monit.* 2002 ; 24 : 255-76.
- Hoja H., Marquet P., Verneuil B., Lotfi H., Dupuy J.-L., Lachatre G. Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol* 1997 ; 21 : 160-5.
- Canezin J., Cailleux A., Turcant A., Le Bouil A., Harry P., Allain P. Determination of LSD and its metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001 ; 765 : 15-27.
- Cirimele V., Villain M., Pépin G., Ludes B., Kintz P. Screening procedure for eight quaternary nitrogen muscle relaxants in blood by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 2003 ; 789 : 107-13.
- Gaillard Y., Blaise P., Darre A., Barbier T., Pépin G. An unusual case of death : suffocation caused by leaves of common ivy (*Hedera helix*). Detection of hederacoside C, alpha-hederin, and hederagenin by LC-ESI/MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2003 ; 27 : 257-62.
- Maurer H. H., Schmitt C. J., Weber A. A., Kraemer T. Validated electrospray LC-MS assay for determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000 ; 748 : 125-35.
- Kratzsch C., Tenberken O., Peters F. T., Weber A. A., Kraemer T., Maurer H. H. Screening, library-assisted identification and validated quantification of twentythree benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 2004 ; 39 : 856-72.
- Maurer H. H., Tenberken O., Kratzsch C., Weber A. A., Peters F. T. Screening for, library-assisted identification and fully validated quantification of twenty-two beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. A* 2004 ; 1058 : 169-81.
- Kratzsch C., Weber A. A., Peters F. T., Kraemer T., Maurer H. H. Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 2003 ; 38 : 283-95.
- Maurer H. H., Kratzsch C., Kraemer T., Peters F. T., Weber A. A. Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry (APCI-LC-MS). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002 ; 773 : 63-73.
- Maurer H. H., Kratzsch C., Weber A. A., Peters F. T., Kraemer T. Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydro metabolite 10-hydroxy carbamazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2002 ; 37 : 687-92.
- Maurer H. H., Kraemer T., Kratzsch C., Peters F. T., Weber A. A. Negative ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry (NICI-GC-MS) and atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry (APCI-LC-MS) of low-dosed and/or polar drugs in plasma. *Ther. Drug Monit.* 2002 ; 24 : 117-24.
- Saint-Marcoux F., Lachatre G., Marquet P. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography-diode array detection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003 ; 14 : 14-22.
- Weinmann W., Stoertzel M., Vogt S., Wendt J. Tune compounds for electrospray ionisation/in-source collision-induced dissociation with mass spectral library searching. *J. Chromatogr. A* 2001 ; 926 : 199-209.
- Rivier L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Anal. Chim. Acta* 2003 ; 492 : 69-82.
- Lips A.G.A.M., Lameijer W., Fokkens R. H., Nibbering N.M.M. Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001 ; 759 : 191-207.
- Hough J. M., Haney C. A., Voyksner R. D., Bereman R. D. Evaluation of electrospray transport CID for the generation of searchable libraries. *Anal. Chem.* 2000 ; 72 : 2265-70.
- Souverain S., Rudaz S., Veuthey J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J. Chromatogr. A* 2004 ; 1058 : 61-6.
- Mallet C. R., Lu Z., Mazzeo J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004 ; 18 : 49-58.
- Annesley T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2003 ; 49 : 1041-44.
- Liang H. R., Foltz R. L., Meng M., Bennett P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003 ; 17 : 2815-21.
- Dams R., Huestis M. A., Lambert W. E., Murphy C. M. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003 ; 14 : 1290-4.
- Muller C., Schafer P., Stortzel M., Vogt S., Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002 ; 773 : 47-52.