

La Liquide Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS/MS), un outil idéal pour l'accompagnement au développement économique

**Présenté par : Dr. CHANE MING Jimmy
Dr. CESARI Maya
Mr. MERIAU Christian**

**Plateforme de l'unité analytique
G.I.P. CYROI**

25 Juin 2009

Plan de la présentation

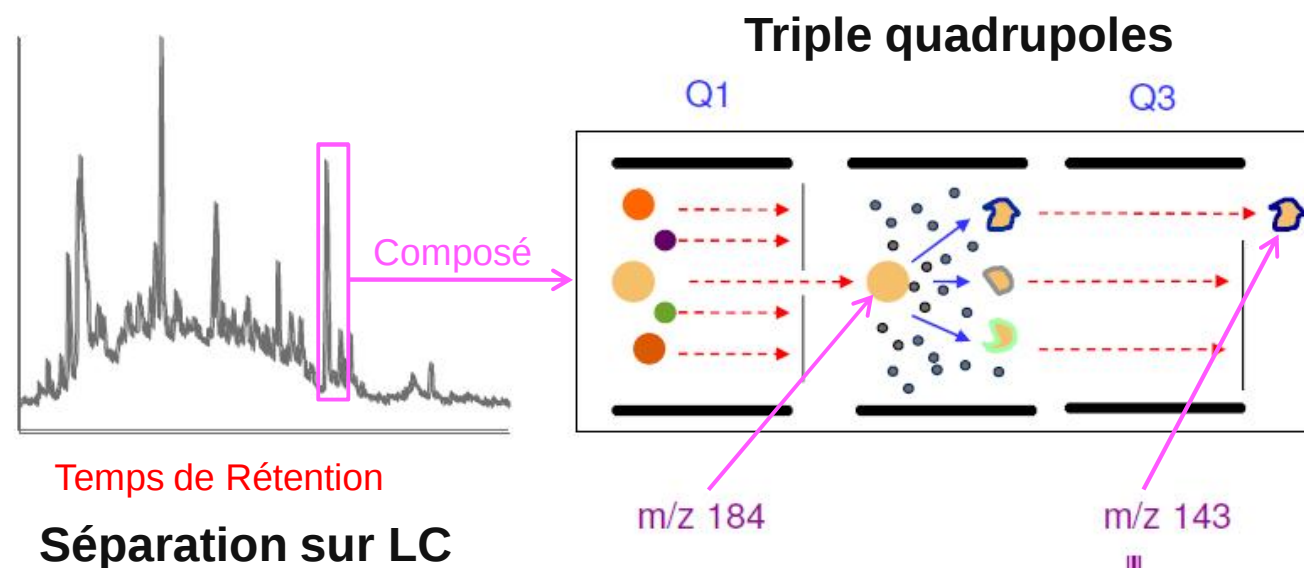
- Introduction à la LC-MS/MS
- Présentation de la AB 3200 Qtrap
- Avantages d'utilisation de la LC-MS/MS
- Applications de la LC-MS/MS dans le secteur de l'Agroalimentaire, de la Nutrition et de la Santé
- Conclusions

Introduction à la LC-MS/MS

- Qu'est ce que la LC-MS/MS?
 - a. **LC** : Liquide Chromatographie, une technique de séparation de molécules au travers d'un support solide par un fluide liquide appelé, phase mobile
 - b. **MS/MS** : Spectromètre de Masse à triple quadupoles en tandem, un instrument produisant des ions et pouvant les séparer dans une phase gazeuse selon le rapport de la masse sur la charge (m/e)



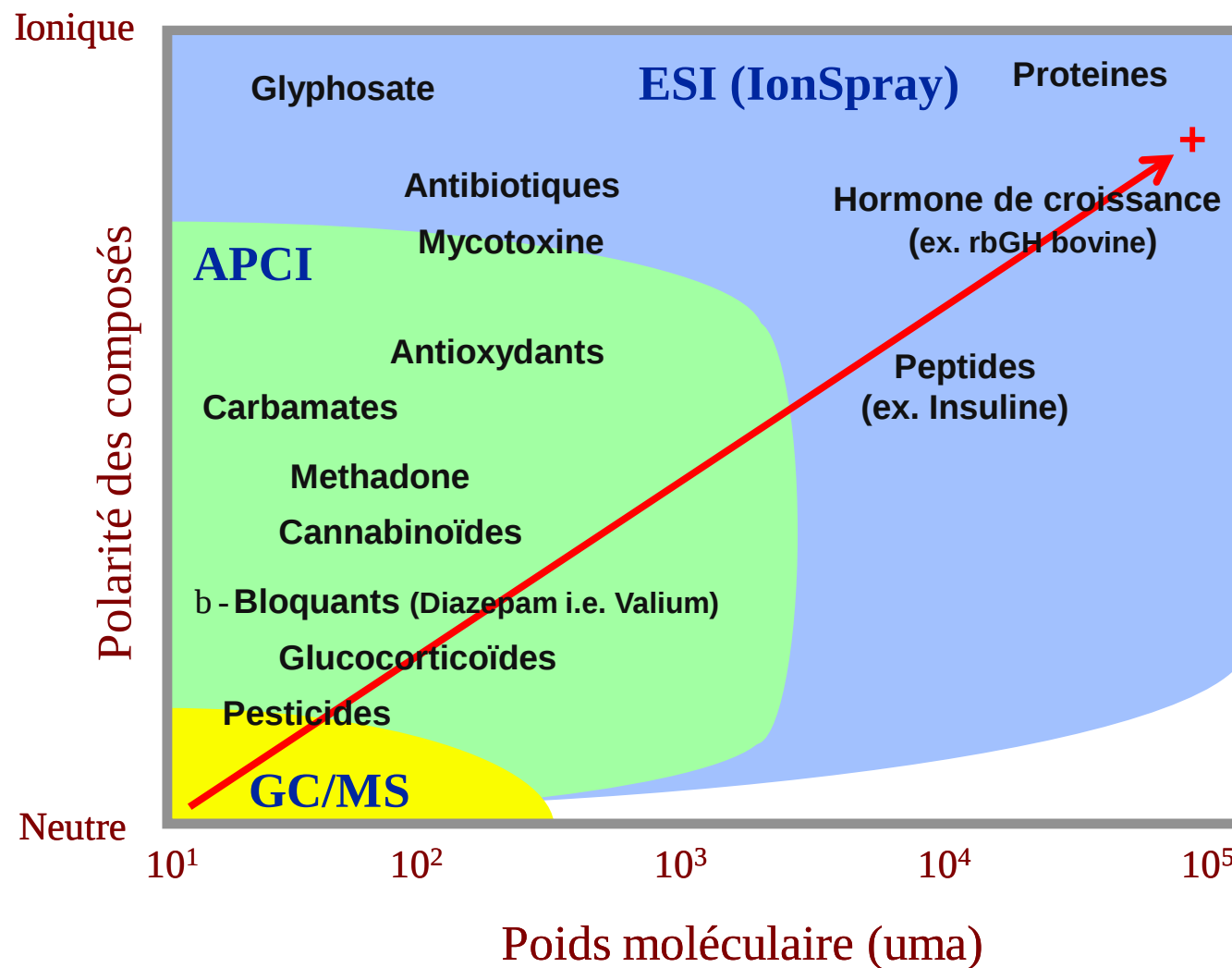
Schéma du fonctionnement de la LC-MS/MS



Le signal (184/143 amu) est proportionnel seulement à la concentration du composé

Transition en MRM (184/143 uma)
Résultat chromatographique

Les domaines analytiques de la LC-MS/MS



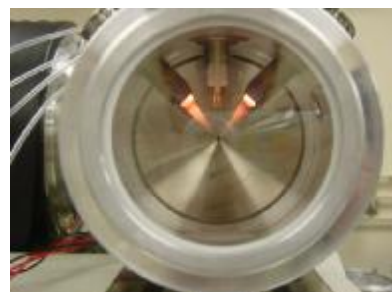
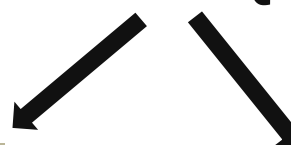
Présentation de l'AB 3200 QTrap

Spécialement adaptée à l'étude qualitative et quantitative des molécules comprises entre **50 à 1700 uma**

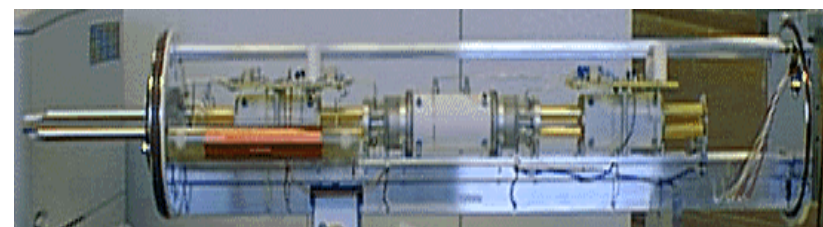


Permet de réaliser des analyses à haute résolution et avec une très grande sensibilité (**de l'ordre du partie-par-billion, ppb**)

AB 3200 Qtrap



Turbo "V" source
(ionisation en APCI ou ESI)



Triples quadrupoles sur rail

Les avantages d'utilisation de l'AB 3200 QTrap

- Couvre une grande partie des composés organiques (ex. Les antioxydants, les antibiotiques, les mycotoxines, les stéroïdes, les pesticides, les résidus de médicaments vétérinaires, les peptides, etc...)
- Raccourcit le temps d'analyse ("**gain de temps**") et simplifie la préparation de l'échantillon ("**gain d'argent**")
- Améliore la résolution (moins d'interférents) tout en gardant une très grande sensibilité analytique (interprétation plus rapide)
- Collecte des données riches d'informations (ex. empreintes spectrales spécifiques aux molécules)



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

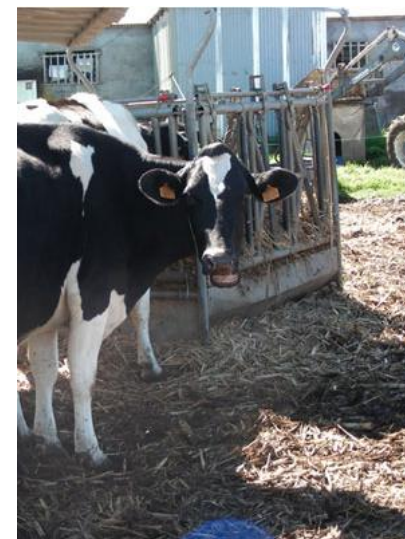
- Surveillance des contaminants émergents dans les denrées alimentaires tels que les résidus de médicaments vétérinaires
- Type de médicaments vétérinaires:
 - q Antibiotiques
 - q Hormones et promoteurs de croissance
 - q Antiparasitaires
 - q Tranquillisants
 - q Divers



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

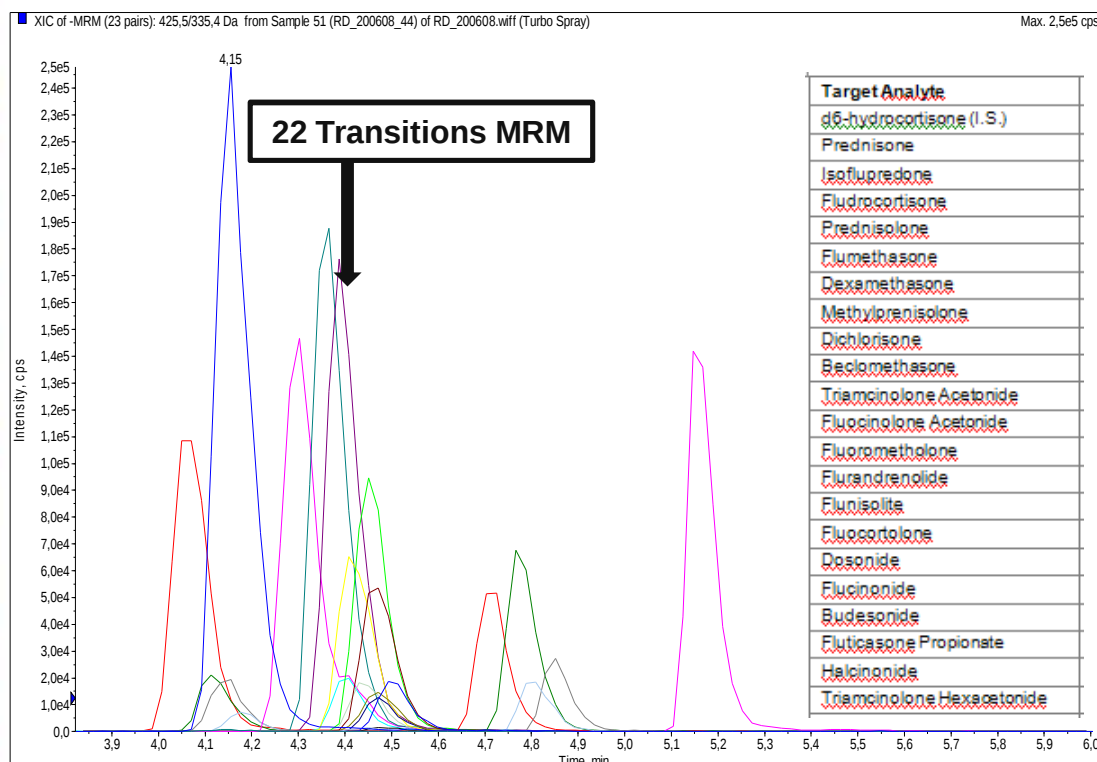
- Les promoteurs de croissance : Label garantissant un usage très restreint des médicaments vétérinaires en production animale

- q Les promoteurs de croissance : glucocorticoïdes et bêta-agonistes
- q Substances utilisées pour accroître la masse musculaire et pour stimuler la lactation
- q Usage Interdit en France et en Europe, mais autorisés dans certains pays



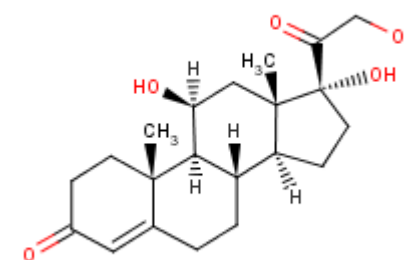
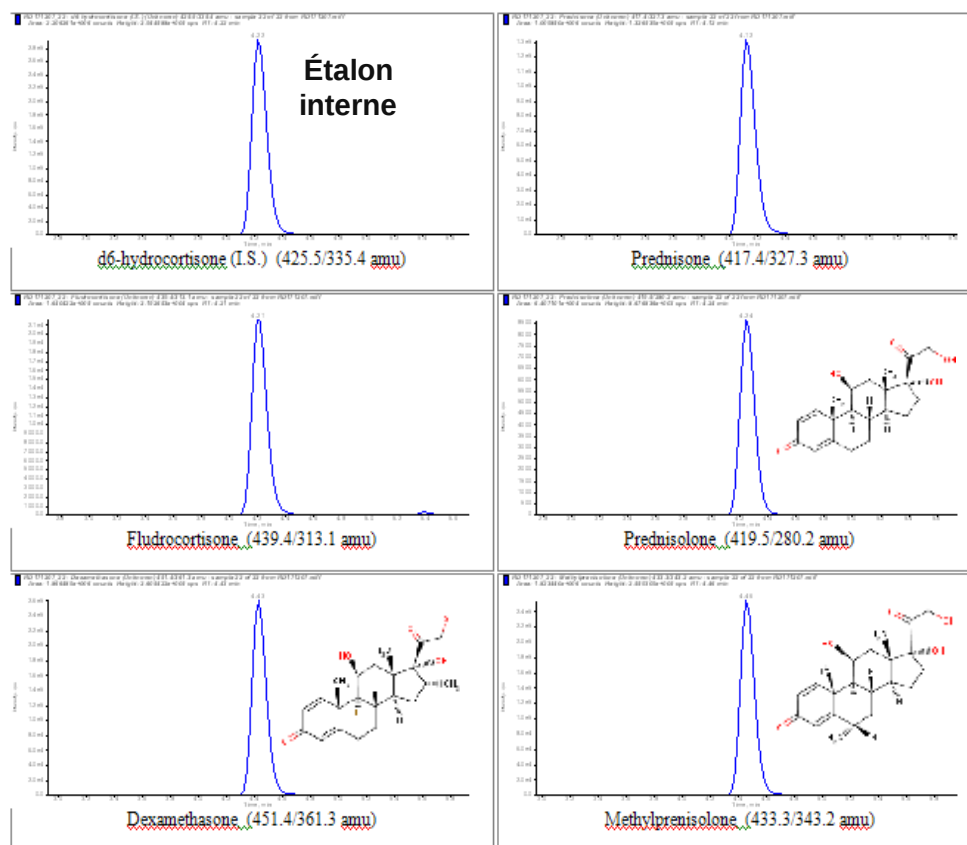
Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

- Les promoteurs de croissance : Label garantissant un usage très restreint des médicaments vétérinaires en production animale



22 glucocorticoïdes dopés à 0.5 ng/ml (ppb) dans le plasma animal et détecté en mode MRM en 6 min.

Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire



Hydrocortisone (endogène)

Règlement (CEE) 2377/90 fixe la Limite Maximale de Résidus (LMR) égale à 0.75 ug/Kg (ppb) pour les glucocorticoïdes dans le lait et la viande bovine.

Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

- Les hormones recombinantes (GH) : Méthode directe de contrôle des hormones de croissance en production animale

q Les hormones de croissance animale recombinante : rbGH (Posilac), reGH (EquiGen-5), rpGH (Reporcine)

q Substances utilisées pour accroître la masse musculaire ou la production laitière (risque d'infection des mamelles par le staphylocoque)

q Usage strictement interdit en France et en Europe, mais autorisés aux Etats-Unis et plus d'une trentaine de pays dans le monde



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

Got rbST in your milk?

Dairy co-op bows to pressure to stop use of hormone

George Raine, Chronicle Staff Writer
Sunday, March 25, 2007

In January, California Dairies' board voted to ask its members not to inject synthetic bovine growth hormone into their cows. If they do, their milk will have to be segregated and they'll pay a surcharge.

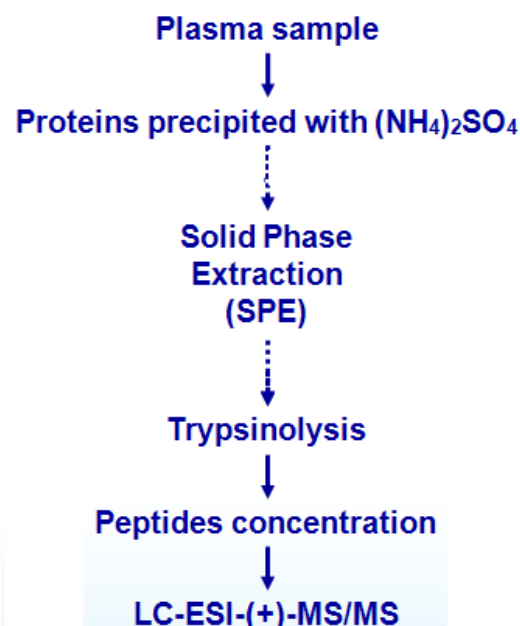
Consumer demand is obvious," Cotta said.

Starbucks spokeswoman Sanja Gould in Seattle said the company is already rbST-free in stores in Northern California, New England, New Mexico, Montana, Oregon, Washington, Idaho and Alaska. That represents 37 percent of its dairy volume. The company will be free of bovine growth hormone in other markets as supply becomes available, Gould said.

Recombinant bovine somatotropin, or rbST, was approved by the Food and Drug Administration 14 years ago. Injected every two weeks into cows, it sustains lactation by stimulating cows' appetites so they eat more and produce more milk, perhaps an extra 5 quarts per day.



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'agroalimentaire

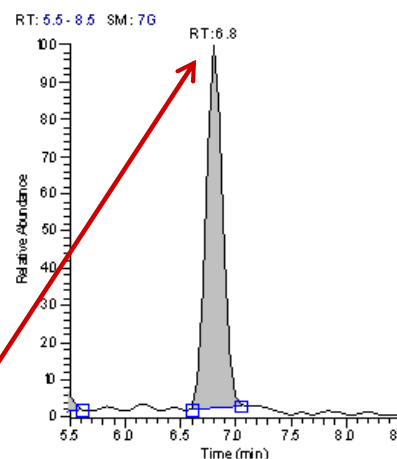


Posilac (Mosanto Inc.)

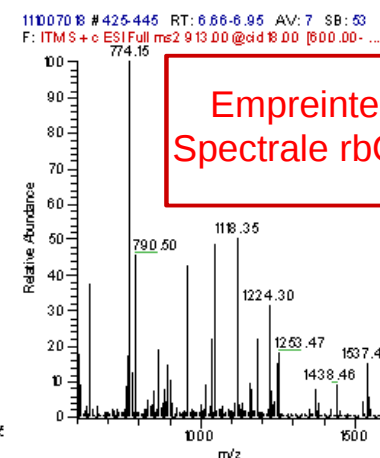
➤ rbGH : MFPAM-SLSG-LFANAVLR : 17 AA [M+2H]²⁺ (m/z 913,0)



ionisation	Ionisation	ESI +
	Capillary T°	270 °C
Mass analyser : linear ion trap	Sheath gas flow	45 au
	Aux. gas flow	10 au
	Peptides	rbGH
	m/z	913,0
	CID	18 %



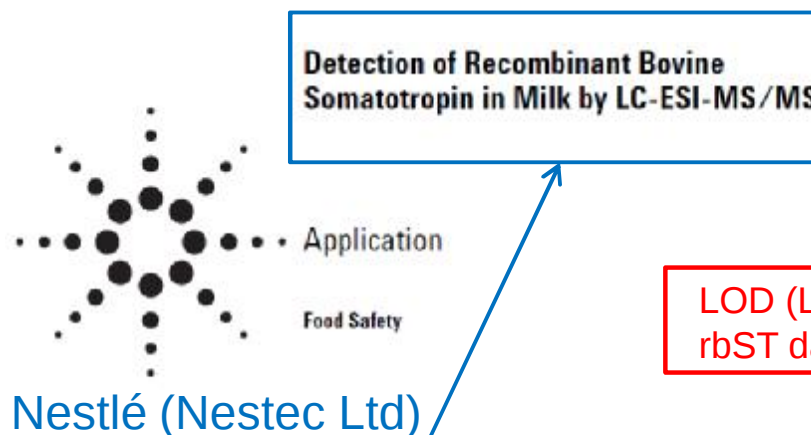
rbGH dopé à 10ng/ml dans le plasma bovin



Empreinte Spectrale rbGH

Source : Dr. L. Bailly-Chouriberry
(Thèse de Doctorat 2007)

Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'agroalimentaire



Authors

Marie-Hélène Le Breton, Sandrine Rochereau-Roulot, Gaud Pinol, Fabrice Monteau, and Bruno Le Bizec
Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA)
Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN)
BP 50707, 44307, Nantes
France

Marie-Hélène Le Breton
2 Nestlé Research Center
Nestlé Ltd., P.O. Box 44
CH-1000 Lausanne 26
Switzerland

exist regarding its use, but the lack of confirmatory methods [1] for its detection makes it difficult to apply these regulations. It turns out to be an international issue in terms of animal doping and in food safety as well. Indeed, residues of rbST can be present in the milk of dairy animals treated with this hormone.

In order to detect residues of rbST in milk, the choice has been made to focus the analysis on the tryptic N-terminal peptide of the protein, specifically the difference between the endogenous and recombinant forms. The N-terminal amino acid alanine that is present in the endogenous form is replaced by a methionine in the recombinant one [2].

Abstract

Recombinant bovine somatotropin (rbST), also called growth hormone, is a protein hormone used in dairy farming to enhance milk production. A method has been developed for the detection of rbST in milk by ESI(+)-LC-MS/MS. This method allowed a detection limit of 20 pg of tryptic N-terminal peptide rbST in standard solution injected on-column and was successfully applied to extracts obtained from milk samples spiked with 50 ng/mL (2.3 pmol/mL) rbST.

This application describes a method for the detection of rbST by ESI(+)-LC-MS/MS. The method was successfully applied to extracts from milk samples spiked with rbST.

Experimental

Standards of Proteins and Peptides

Protein standards of rbST and recombinant equine somatotropin, reST (EquiGen-5), were obtained

LOD (Limite de détection) de rbST dans le lait = 50ng/ml

Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

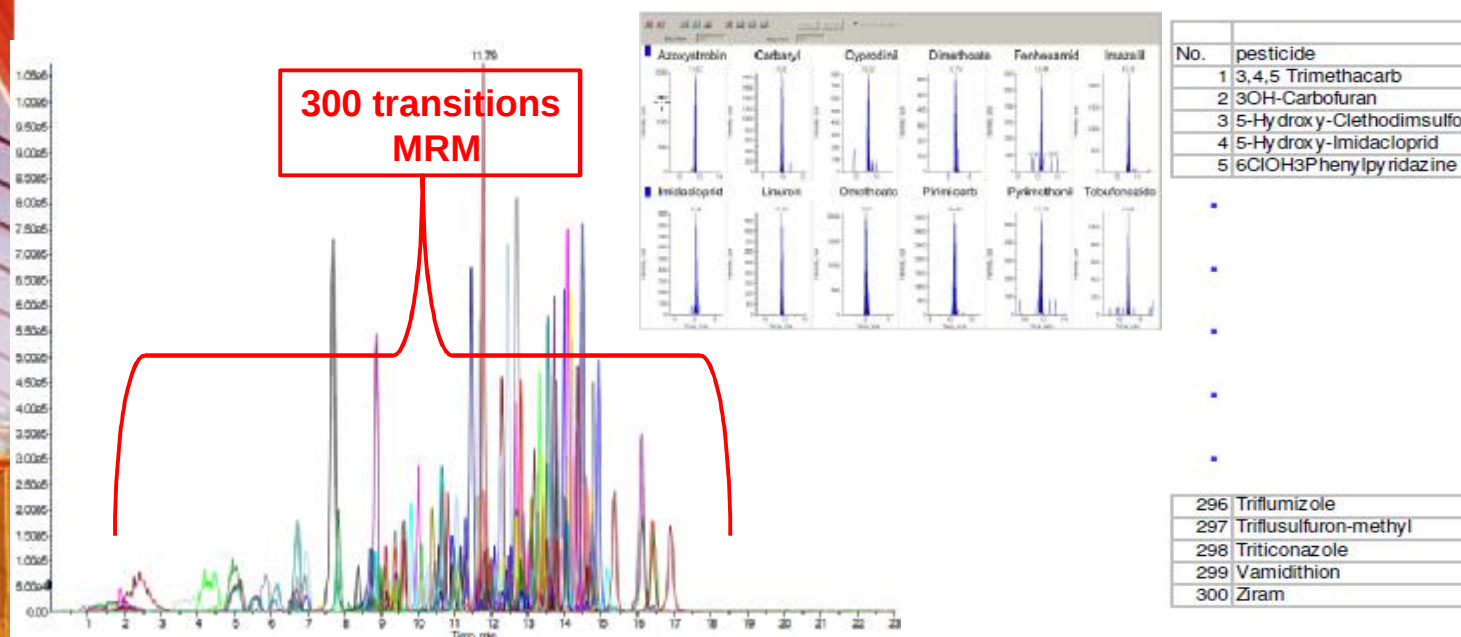
- Agriculture raisonnée ou bio : Dépistage de résidus pour la valorisation de produits naturels garantis sans pesticides

- q Pesticides et leurs résidus sont pour la plupart des composés polaires, peu volatils et thermolabiles
- q Avantage de la LC-MS/MS, un pré-traitement de l'échantillon plus rapide et moins coûteux
- q Tandem MS/MS améliore les performances analytiques en sensibilité et en sélectivité



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

Simultaneous Quantitative Screening and Qualitative Confirmation of 300 Pesticides Using the New 3200 Q TRAP® LC/MS/MS System



300 pesticides et résidus analysés dans les fruits et les légumes en une seule injection et avec une durée d'analyse de 18 min.

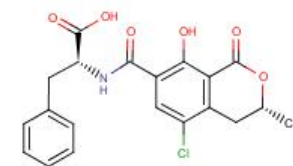
Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

- Risque alimentaire : recherche de Mycotoxines

Automated On-line Solid-Phase Extraction–Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine and Beer

ALESSANDRO BACALONI, CHIARA CAVALIERE, ANGELO FABERI, ELISABETTA PASTORINI, ROBERTO SAMPERI, AND ALDO LAGARÀ*

Department of Chemistry, "La Sapienza" University, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy



Ochratoxine A
(PM = 403)

Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk
Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources

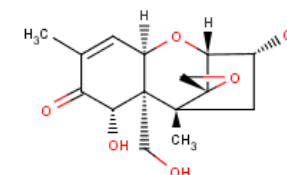
Chiara Cavaliere, Patrizia Foglia, Elisabetta Pastorini, Roberto Samperi, Aldo Lagarà*

Department of Chemistry, "La Sapienza" University, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy
Received 13 July 2005; received in revised form 11 September 2005; accepted 25 September 2005

Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

FRANZ BERTHILLER,¹ CHIARA DALL'ASTA,¹ RAINER SCHUEHMACHER,^{2*} MARC LEMMENS,² GERHARD ADAM,² AND RUDOLF KRSKA¹

Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Research and Institute for Plant Production Biotechnology, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Konrad Lorenz Strasse 20, A-3430 Tulln, Austria, and Institute of Applied Genetics and Cell Biology, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria



Deoxynivalenol ou Vomitoxine
(PM = 296)

Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

- Identification des toxines marines : Les ciguatoxines

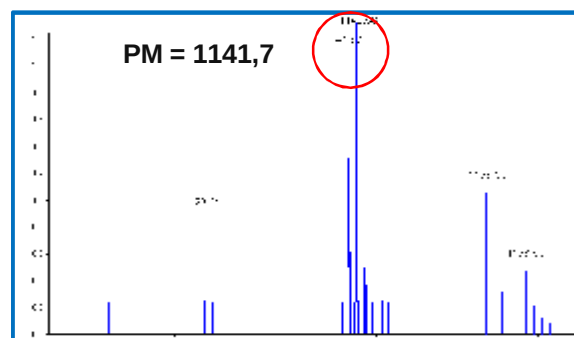


Gambierdiscus
(micro-algues)

contamination



Ciguatoxine
isolée de
poissons



Empreinte spectrale de la ciguatoxine
par LC-ESI-MS/MS (Lenoir, 2006)

Source : Dr. J. TURQUET
(Travaux en cours)

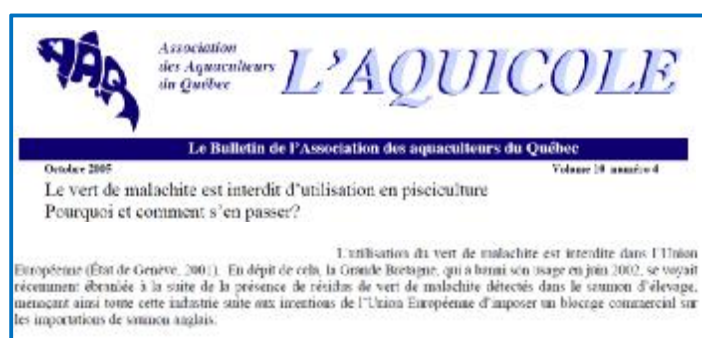
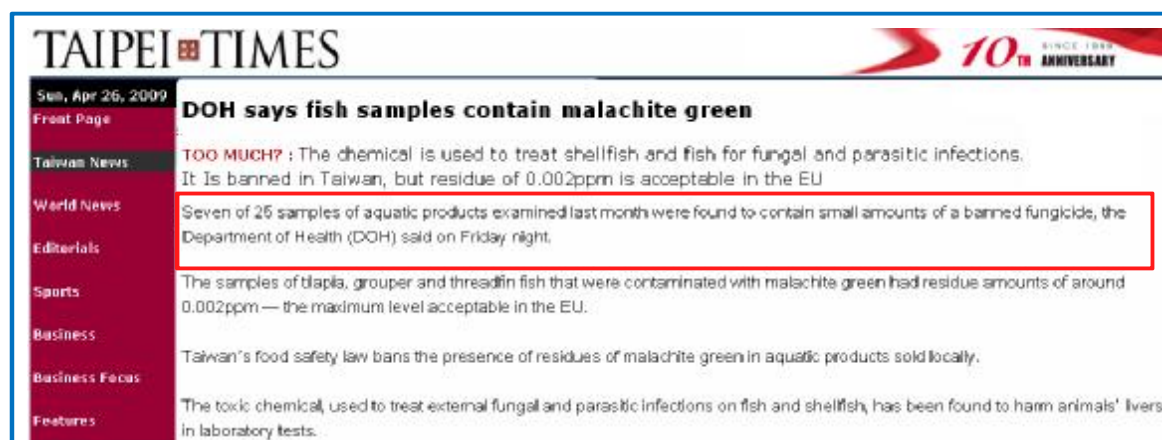


Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire

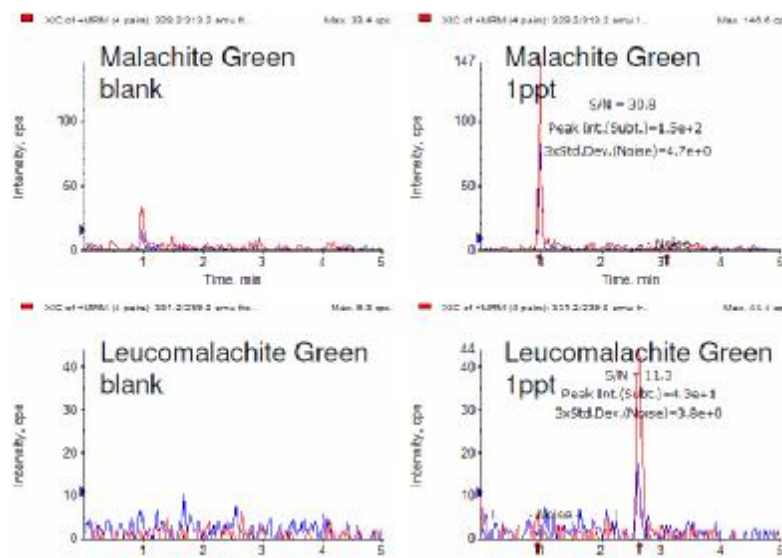
- Valorisation des produits locaux provenant de l'Aquicole : Cas du Vert Malachite
 - q Le vert de malachite utilisé de façon étendue comme biocide (efficace contre les protozoaires) dans l'industrie aquacole à travers le monde depuis 1936
 - q Aujourd'hui, c'est une substance très controversée sur le plan international ; elle présente des propriétés tératogènes et carcinogènes.
 - q Usage strictement interdit en France et en Europe (Décision 2002/657/CE), mais toujours utilisé dans certains pays



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire



Les applications de la LC-MS/MS pour une démarche Qualité dans le secteur de l'Agroalimentaire



5ppt (pg/mL) on API 3200™ LC/MS/MS system

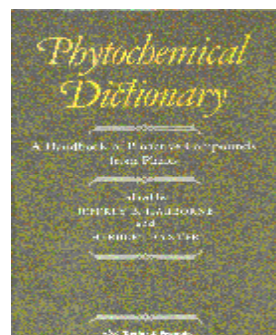
Malachite Green Testing Summary

- Detection of Malachite green and Leucomalachite green by LC/MS/MS in less than 10min
- API 3200™ LC/MS/MS system's data
 - LOD Malachite green (quantifier MRM) < 5ppt
 - Linear range Malachite green (both MRMs): 5-10000ppt
 - LOD Leucomalachite green (quantifier MRM) < 5ppt
 - Linear range Leucomalachite green (both MRMs): 50-100000ppt



Les applications de la LC-MS/MS dans le secteur de la Agronutrition

- Evaluation du potentiel bioactif des fruits tropicaux



20000 molécules bioactives
(Alcaloïdes, polyphénols,
terpènes, etc...)



Caractérisation des composants bioactifs (ex. propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires) des fruits tropicaux par analyse LC-MS/MS

Source : Dr. Marie-Paul GONTHIER
(Travaux en cours)



L B G M
Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire
Faculté des Sciences et des Technologies
Université de la Réunion

Contact : gonthier@univ-reunion.fr

Les applications de la LC-MS/MS dans le secteur de la Agronutrition

- Découverte des bienfaits des aliments: Détermination des acides gras polyinsaturés, les Oméga-3



Développement d'une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse des acides gras polyinsaturés de type oméga-3 à l'aide de la théorie des plans d'expérience

Caroline Douny*, Guy Maghuin-Rogister et Marie-Louise Scippo

Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires, CART (Centre d'Analyse des Résidus en Traces), Département des sciences des denrées alimentaires, (Bât B43b), Faculté de médecine Vétérinaire, Université de Liège, 20, Blvd de Colonster, 4000 Liège

Conclusions

En conclusion, l'utilisation de la théorie des plans d'expériences a permis d'optimiser de manière rationnelle les paramètres liés à la séparation par HPLC de l'acide α -linoléique sous sa forme méthyl ester. Une fois cette démarche réalisée, il a été aisé d'ajouter 13 autres acides gras des familles oméga-3 et -6 à la technique d'analyse. Cette technique sera utilisée pour étudier la stabilité des acides gras et l'apparition de produits de dégradation précoces dans des denrées alimentaires riches en acides gras de type oméga-3.

Les applications de la LC-MS/MS dans le secteur de l'Agronutrition

- Valorisation des plantes aromatiques et médicinales : Caractérisation et Quantification des composés actifs

Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry

Irene Parejo *et al.*

Departament de Productes Naturals, Universitat de Barcelona, Spain

Quantitative determination of Astragaloside IV, a natural product with cardioprotective activity, in plasma, urine and other biological samples by HPLC coupled with tandem mass spectrometry

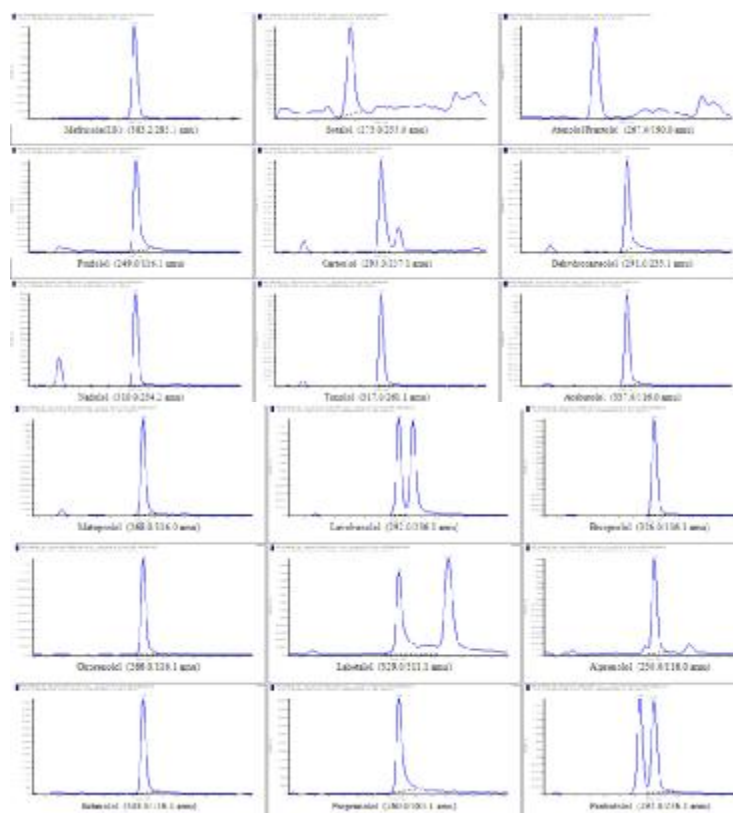
Weidong Zhang^{a,b,*}, Chuan Zhang^a, Runhui Liu^a, Huiliang Li^a,
Jintao Zhang^c, Chen Mao^c, Chunlin Chen^c

Simultaneous determination of four active alkaloids from a traditional chinese medicine *Corydalis saxicola* Bunting. (Yanhuanglian) in plasma and urine samples by LC-MS-MS

Hui-Liang Li^a, Wei-Dong Zhang^{a,b,*}, Run-Hui Liu^a, Chuan Zhang^a, Ting Han^d,
Xiang-Wei Wang^c, Xiao-Lin Wang^c, Jian-Bao Zhu^c, Chun-Lin Chen^c

Les applications de la LC-MS/MS dans le secteur de la Santé

- Les tranquillisants : Suivi de la pharmacocinétique des bêta-bloquants dans le plasma humain



Target Analyte
Mefruside(I.S.)
Sotalol
Atenolol/Practolol
Pindolol
Carteolol
Dehydrocarteolol
Nadolol
Timolol
Acebutolol
Metoprolol
Levobunolol
Bisoprolol
Oxprenolol
Labetalol
Alprenolol
Betaxolol
Propranolol
Penbutolol

Les β -bloquants sont utilisés pour réduire la fréquence cardiaque et diminuer la tension artérielle pour stabiliser l'hypertension

18 β -bloquants dopés à 20 ng/ml (ppb) dans le plasma humain et détectés en mode MRM en LC-MS/MS sur une injection de 5 min.

Les applications de la LC-MS/MS dans le secteur de la Santé

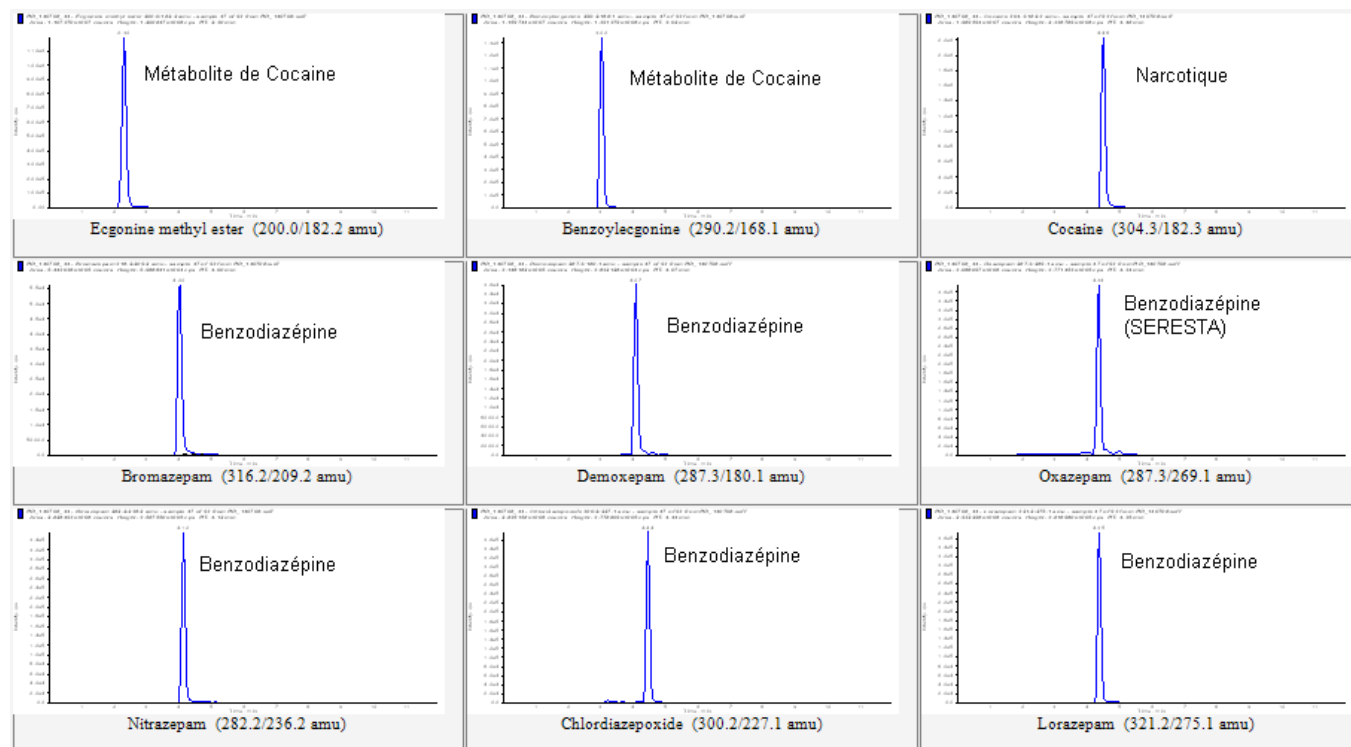
- Analyse en toxicologie : Dépistage des substances prohibées et thérapeutiques dans la salive

Target Analyte	RT (min)	Target Analyte	RT (min)
Mefruside (I.S.)	3.75	Nefopam	4.67
Phenylpropanolamine	2.50	Diazepam	4.59
Amphetamine	3.30	Prazepam	4.82
MDA	3.42	Medazepam	4.96
Methylamphetamine	3.67	EDDP	4.34
Phentermine	3.66	Methadone	4.80
MDMA	3.73	Propoxyphene	4.97
MDEA	3.82	Oxymorphone	3.46
MDPA	4.14	Morphine	3.66
Ecgonine methyl ester	2.30	Hydromorphone	3.76
Benzoyllecgonine	3.02	Dihydrocodeine	4.13
Cocaine	4.48	Pholcodine	4.21
Bromazepam	4.00	Codeine	4.09
Demoxepam	4.07	Levorphanol	4.35
Oxazepam	4.34	6-Monoacetylmorphine	4.03
Nitrazepam	4.12	Nalorphine	4.13
Chlordiazepoxide	4.44	Hydrocodone	4.15
Lorazepam	4.35	Naltrexone	4.24
Clonazepam	4.18	Nalbuphine	4.59
Temazepam	4.41	Diacetylmorphine	4.32
Nordiazepam	4.50	Butorphanol	4.53
Flunitrazepam	4.22	Dextromethorphan	4.86
Lormetazepam	4.46	Buprenorphine	5.24
Clobazam	4.29	Phencyclidine	4.62
Midazolam	4.65	LSD	4.30
		Methaqualone	4.25
		Ketamine	4.27
		Zopiclone	4.13
		Zolpidem	4.39
		Cannabinol	5.18
		Cannabidiol	5.08

55 substances prohibées et thérapeutiques dopées à 30ng/ml dans la salive et détectées en une injection de 6 min.

Les applications de la LC-MS/MS dans le secteur de la Santé

- Analyse en toxicologie : Dépistage des substances prohibées et thérapeutiques dans la salive



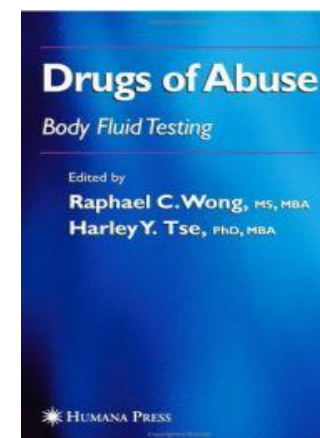
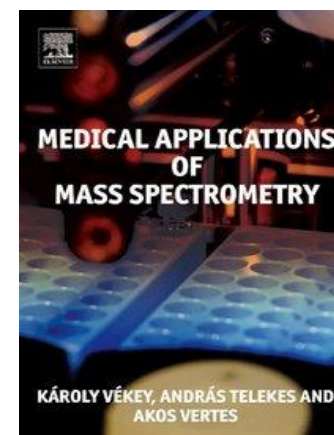
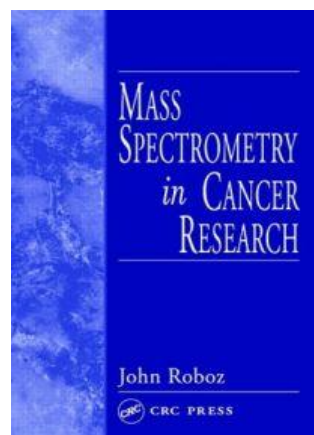
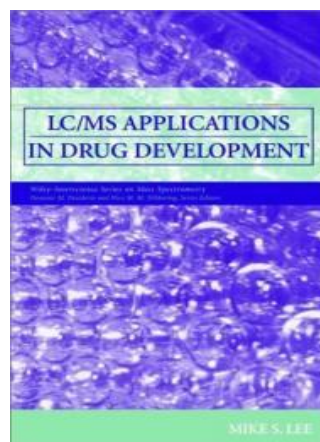
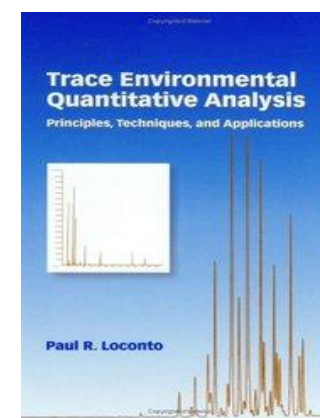
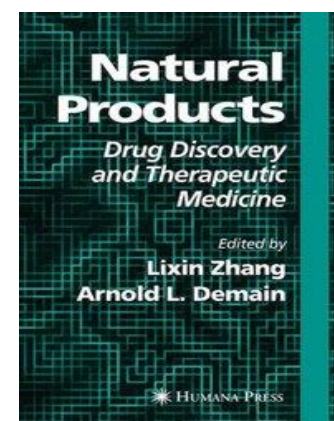
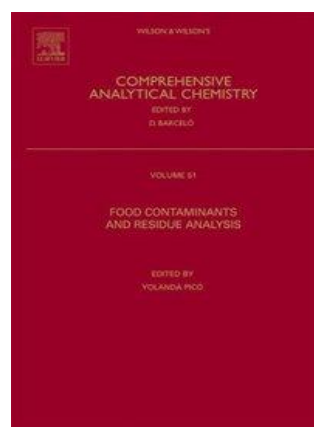
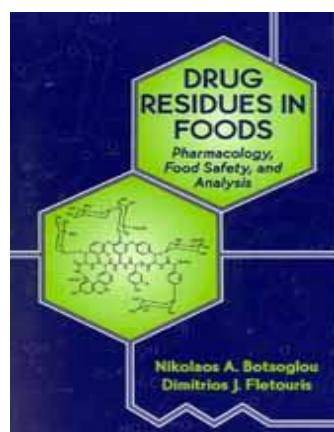
Référence: *Oral fluid testing proves comparative accuracy to urinalysis in detecting drug use*
G. Bennet , Elsevier Science, Dec. 2003.

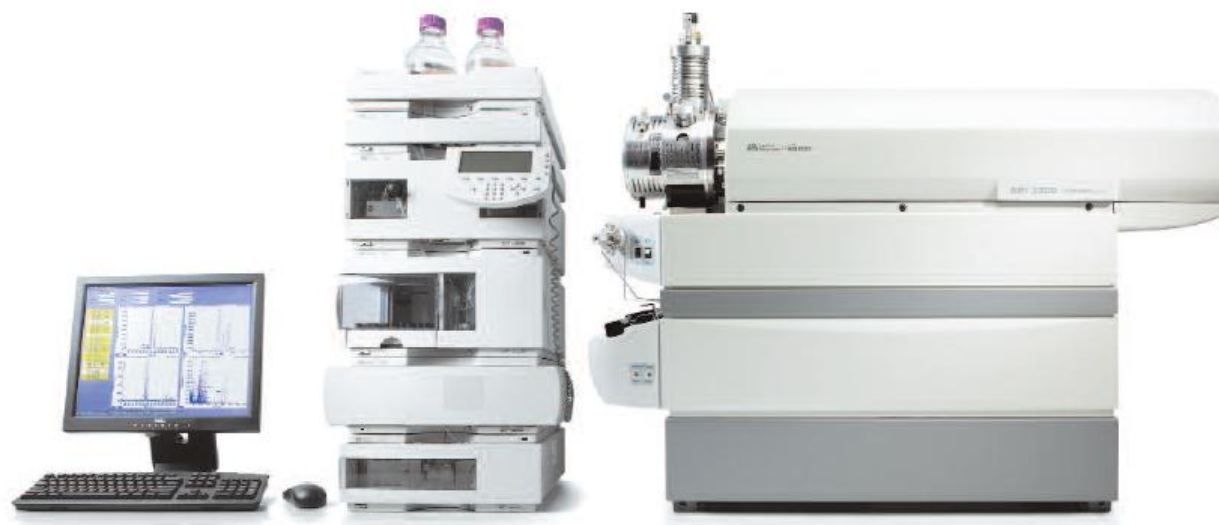
Conclusions

- q Le couplage LC-MS/MS en tandem est une méthode d'analyse de plus en plus utilisée pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants d'un mélange complexe (aliment, extrait végétal, eau, sang, salive, urine...)
- q Le Spectromètre de masse quadrapolaires tandem (MS/MS) permet les analyses qualitatives et quantitatives de composés présents à l'état de trace (exemple: sécurité alimentaire, surveillance environnementale, études toxicologiques...)
- q La technique LC-MS/MS s'adresse en particulier à des molécules polaires, peu volatiles et thermolabiles
- q L'utilisation de la LC-MS/MS permet de raccourcir le temps de l'analyse et simplifie la préparation de l'échantillon (pas de dérivation)



Références bibliographiques





Merçi de votre attention

La Liquide Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS/MS), un outil idéal pour l'accompagnement au développement économique

**Présenté par : Dr. CHANE MING Jimmy
Dr. CESARI Maya
Mr. MERIAU Christian**

**Plateforme de l'unité analytique
G.I.P. CYROI**

25 Juin 2009