

**Journée Thématique MS**

**Biologie clinique et Diagnostic**

13 octobre 2015 - Paris

**Waters**

THE SCIENCE OF WHAT'S  
POSSIBLE™

# Intérêts et Applications du Screening en HR-MS en Toxicologie médico-légale

**Dr Elodie SAUSSEREAU**

Laboratoire de Toxicologie

Groupe Hospitalier du Havre

Expert près la Cour d'Appel de Rouen

[www.labo-expertox.ch-havre.fr](http://www.labo-expertox.ch-havre.fr)



# Screening toxicologique

- **Screening ciblé** : recherche de composés spécifiques (présence : oui ou non)
- **Screening non-ciblé** : recherche de tous composés inconnus sans aucune information au préalable sur les analytes potentiellement présents dans la matrice

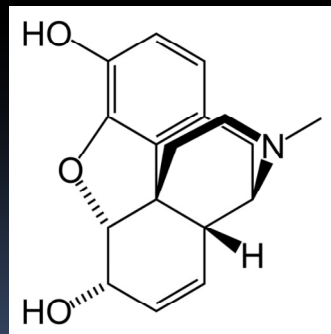
# Haute Résolution - Masse Exacte

- **Masse nominale** : nombre entier de l'isotope le plus abondant de chaque élément
- **Masse exacte** : masse exacte de l'isotope le plus abondant de chaque élément

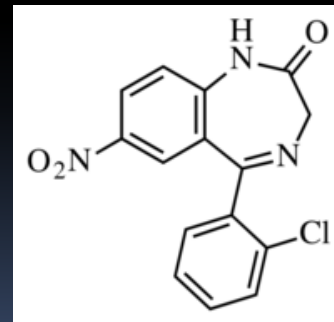
Elément	Nucléide	Masse nominale	Masse exacte	Abondance isotopique
Hydrogène	H	1	1,0078	100 %
Carbone	C <sup>12</sup>	12	12,0000	100 %
	C <sup>13</sup>	13	13,0034	1,10 %
Azote	N <sup>14</sup>	14	14,0031	100 %
	N <sup>15</sup>	15	15,0001	0,37 %
Oxygène	O <sup>16</sup>	16	15,9949	100 %
	O <sup>17</sup>	17	16,9991	0,04 %
	O <sup>18</sup>	18	17,9992	0,20 %

# Haute Résolution - Masse Exacte

- Mesure de la masse exacte à 4-5 décimales  
(masse monoisotopique)
- Identification de nouveaux composés  
(formule brute)
- Distinction de composés avec même masse nominale mais différente masse exacte

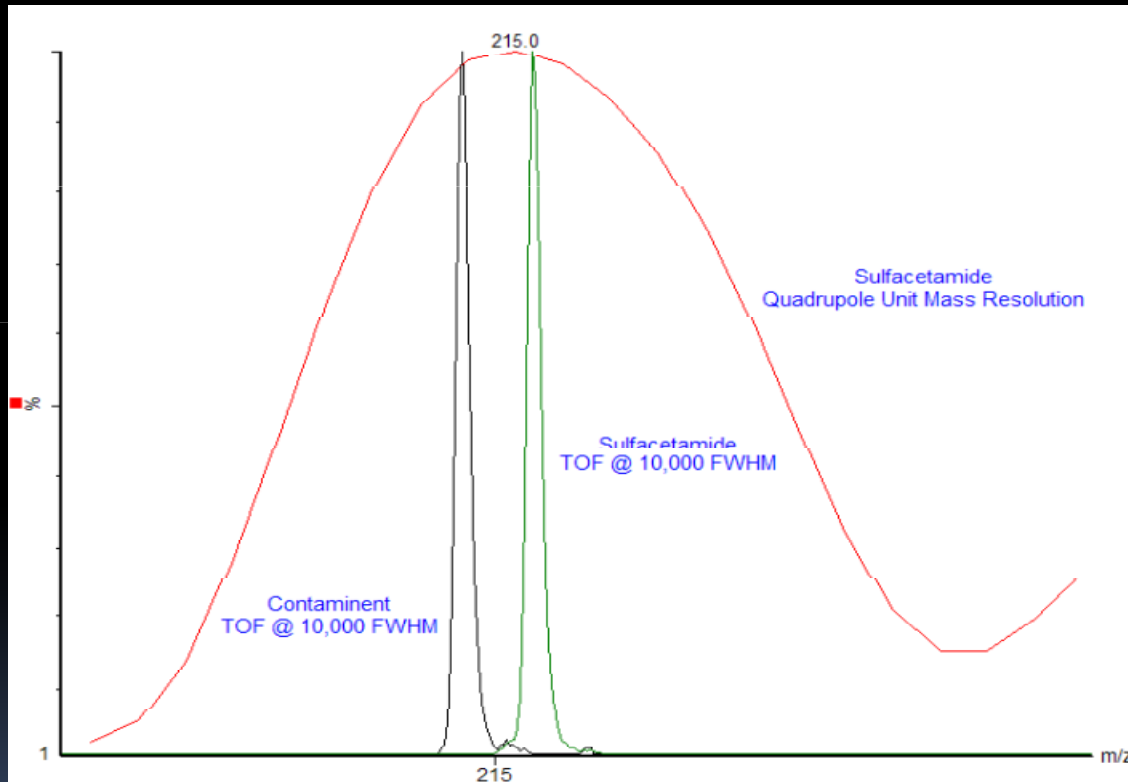


morphine  
 $C_{17}H_{19}NO_3$   
MM=285,3377



7-amino-clonazepam  
 $C_{15}H_{12}ClNO_3$   
MM=285,7283

# Haute Résolution - Masse Exacte



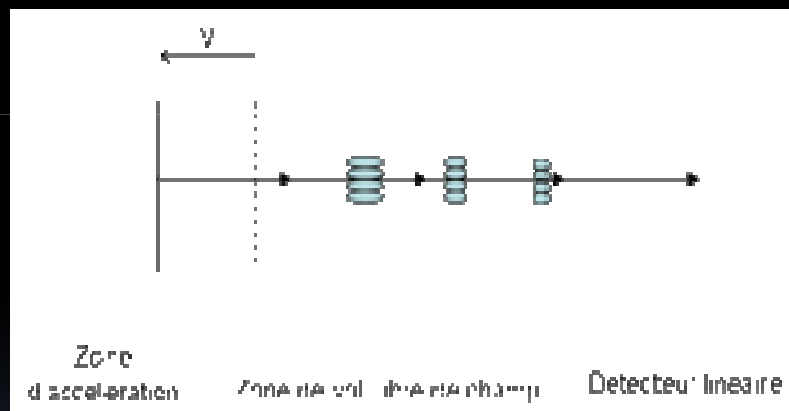
- **Quadripôle** : résolution insuffisante pour différencier les 2 molécules
- **HR** : haute résolution réduit interférences entre molécules de masse « similaires » (sélectivité ++)  
→ distinction de 2 pics

# Spectrométrie de Masse Haute Résolution

## Analyseurs

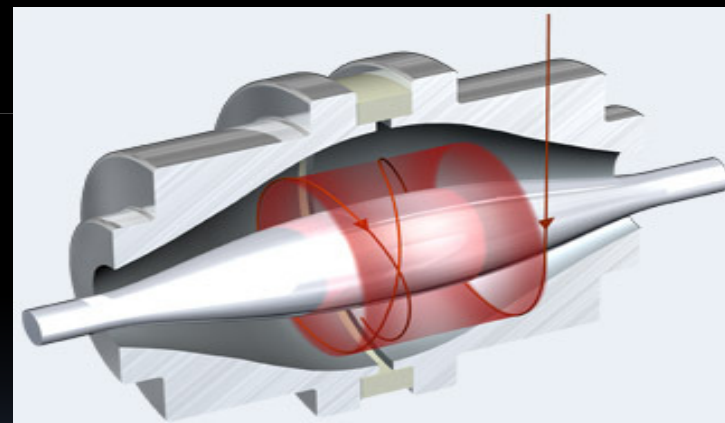
### Temps de vol

Mesure le temps que met un ion  $m/z$ , accéléré par une tension, à parcourir une distance ( $10^{-5}$ sec)



### Orbitrap

Mesure la fréquence d'oscillation d'un ion  $m/z$  autour de l'électrode centrale

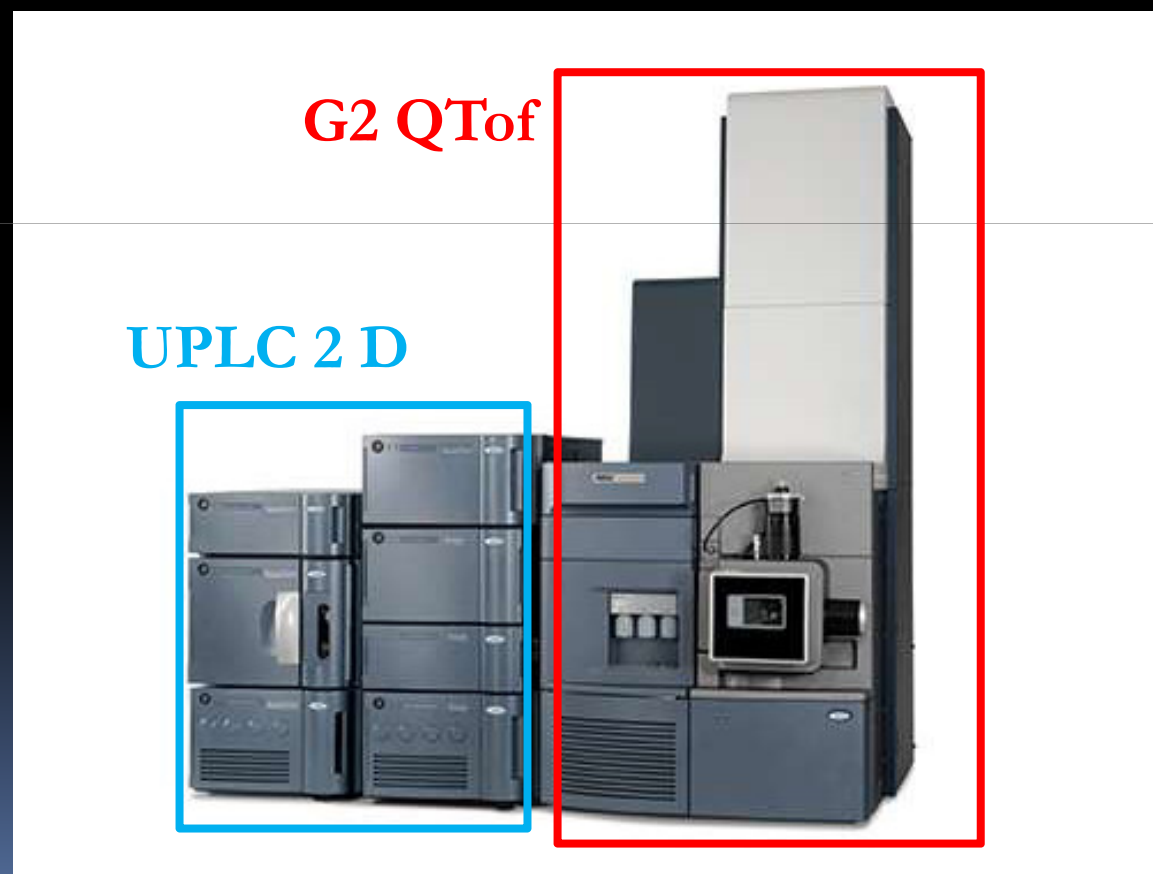


## Mesure de la masse exacte

- ✓ 5 décimales après la virgule
- ✓ améliore la confiance
- ✓ diminue faux positifs

# Spectrométrie de Masse Haute Résolution « Temps de Vol - TOF »

**UPLC Acquity 2D - XEVO G2 Qtof**  
Waters®



# Screening TOF

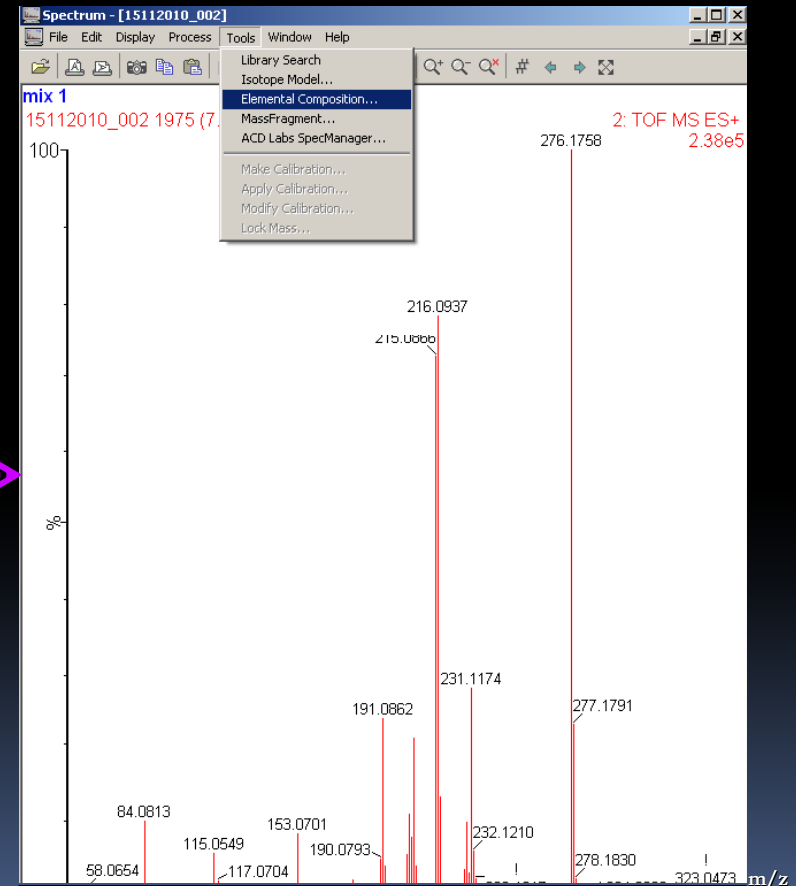
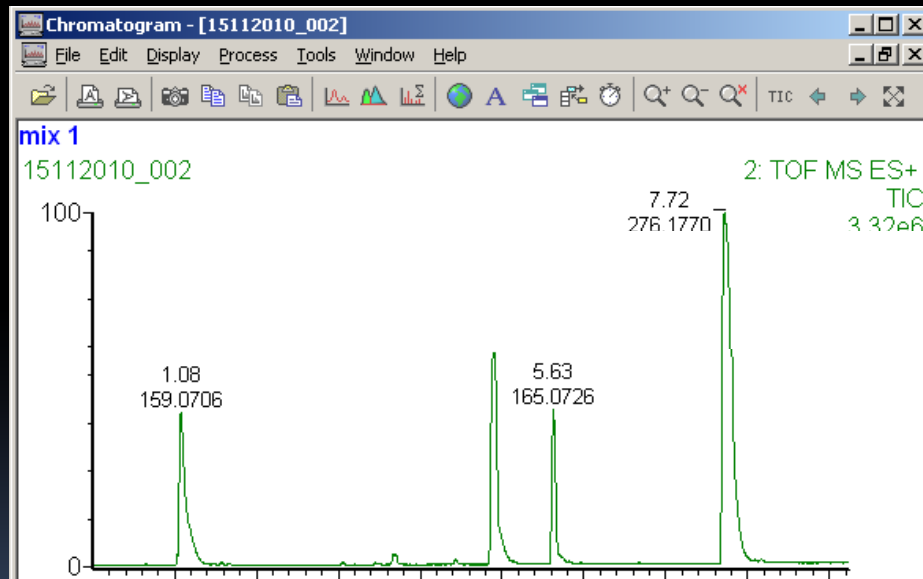
## Objectifs

- ❖ Screening non ciblé et identification de nouveaux composés (formule brute) et élucidation structurale (formule brute – schéma de fragmentation)
- ❖ Augmenter le nombre de composés analysés (avec ou sans standards)
- ❖ Informations sur les métabolites
- ❖ Screening hautement spécifique ( $MS^E$ )
- ❖ « *Reprocess* » des données (pas de ré-analyse)

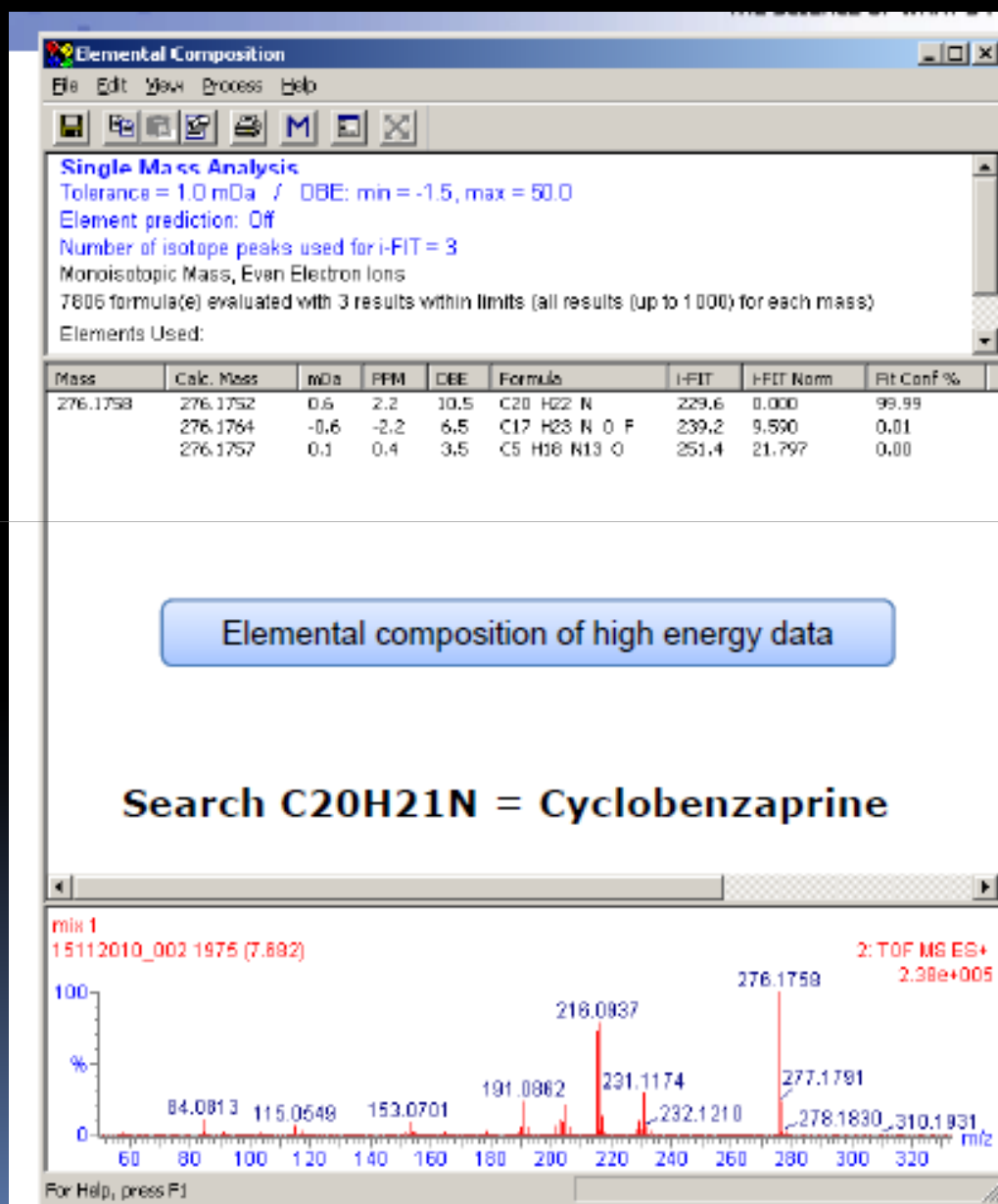


# TOF - « Temps de vol »

- Screening non ciblé : analyse élémentaire

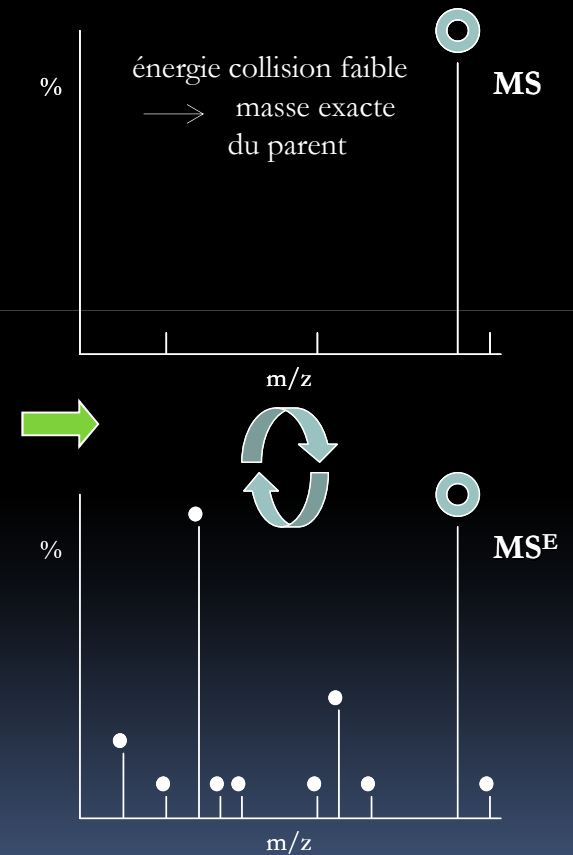
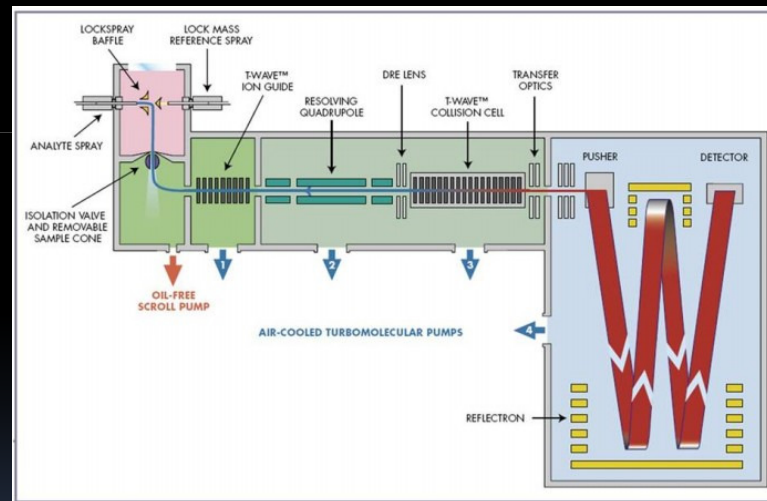
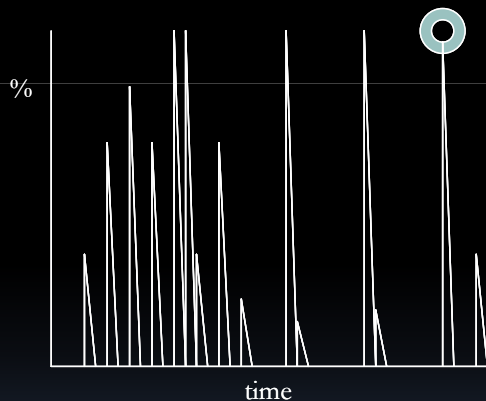


# TOF - « Temps de vol »



# MS-TOF

## ➤ Mode d'acquisition MS<sup>E</sup> - Technologie T-Wave



Alternance continue d'une fonction « faible énergie » avec une fonction « haute énergie »

énergie collision élevée  
→ masse exacte de tous les ions fragments

# MS-TOF

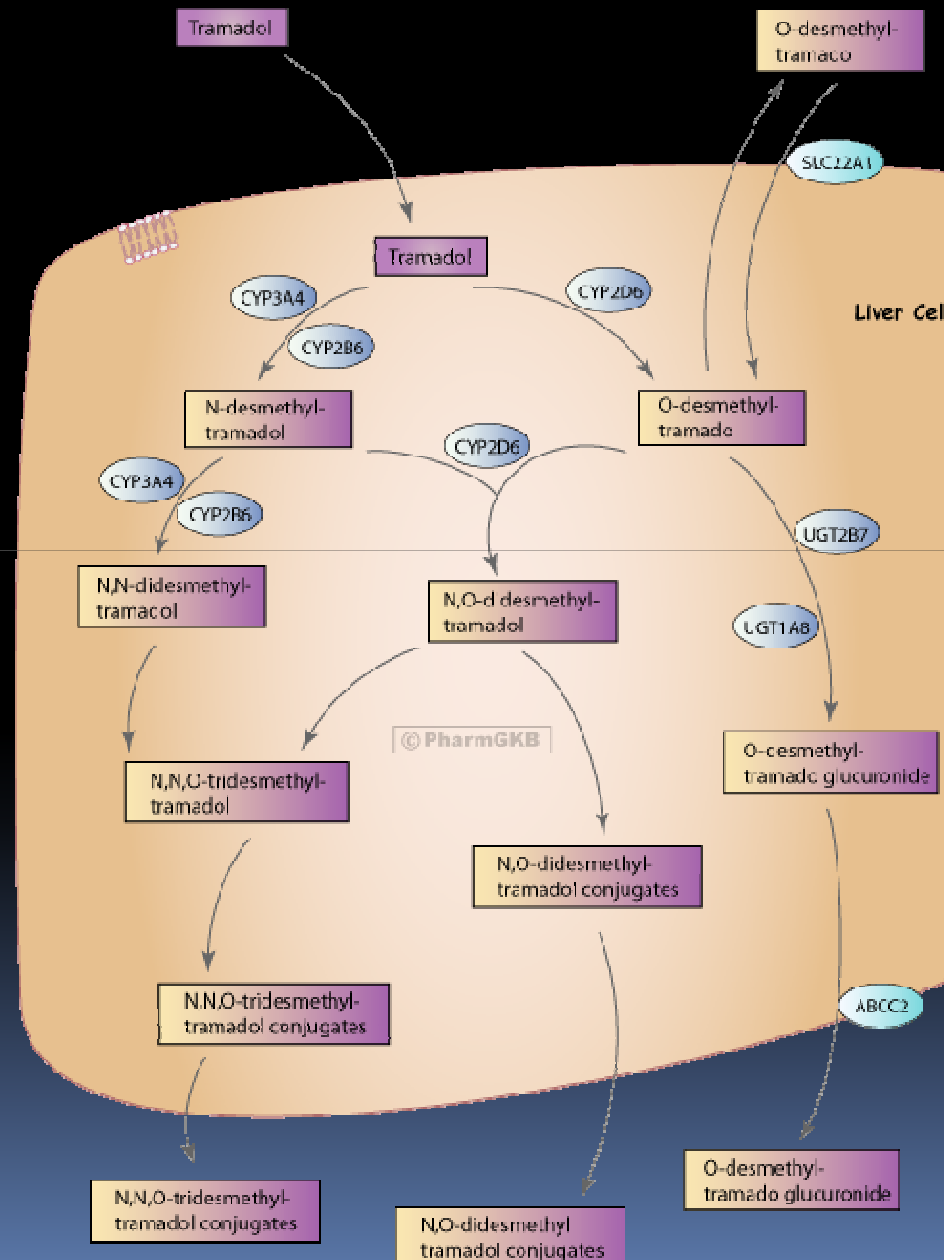
## Recherche de métabolites [METABOLYNX®]

- ❖ Xénobiotiques de même masse monoisotopique
- ❖ Polymorphisme des enzymes du métabolisme (CYP 450)
- ❖ Médecine légale

- Soumission chimique : glucuronides (urines)
- Putréfaction
  - dégradation des molécules peu stables : ex. benzodiazépines
  - analyses des viscères (foie, rein, ...)

# Exemple du tramadol et de la venlafaxine

TRAMADOL



# Tramadol

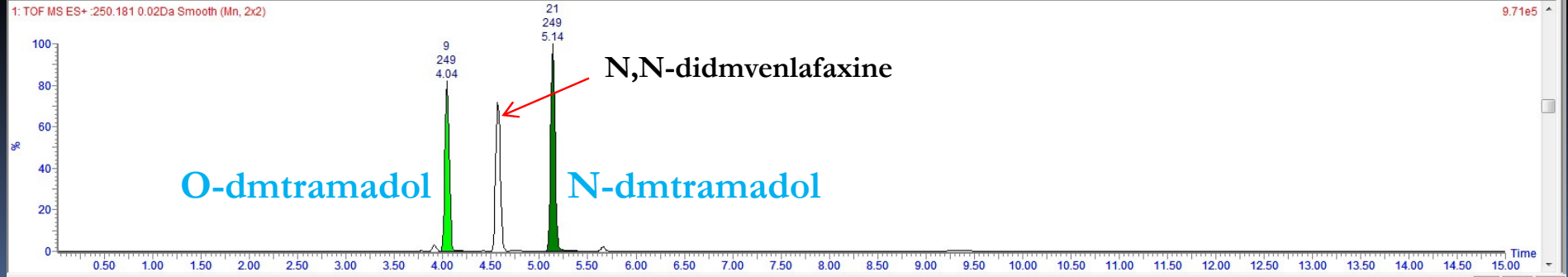
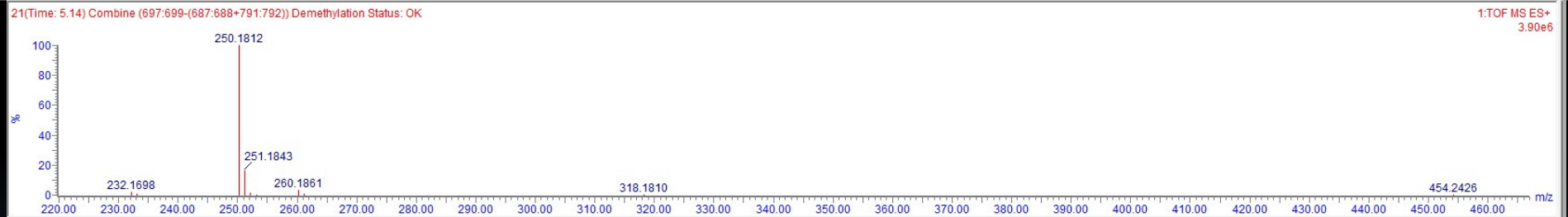
MetaboLynx XS Browser - [tramadol310815]

Plate: 1    Vial: 5

Expected Metabolites: parent C16H25NO2 (7/61 entries)

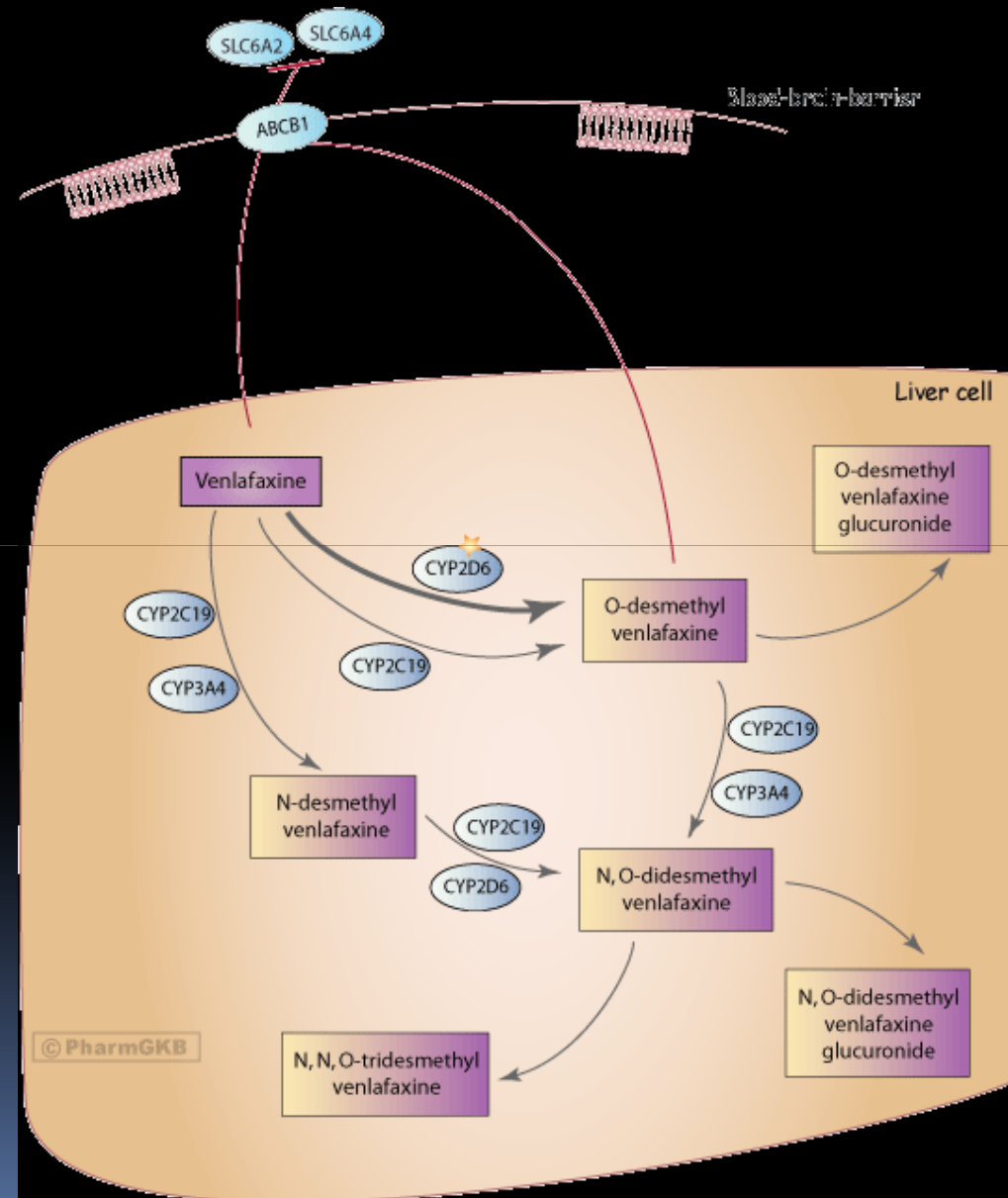
Status	MS...	Mass	Metabolite Name	Formula	Mass Difference	m/z Found	mDa	PPM	Label	Peak ID	Time	Trace	Area Abs	Area %	PDA Peak Are
✓	YES	249.1729	Demethylation	C15H23NO2	-14.0146	250.1817	1.0	4.1		9	4.04	1: TOF MS ES+ :250.1...	42496.60	13.69	...
✓	YES	249.1729	Demethylation	C15H23NO2	-14.0152	250.1812	0.5	2.1		21	5.14	1: TOF MS ES+ :250.1...	51480.20	16.59	...
✓	YES	235.1572	Didesmethyl	C14H21NO2	-28.0301	236.1662	1.2	5.0		10	4.12	1: TOF MS ES+ :236.1...	26709.60	8.61	...
✓	YES	235.1572	Didesmethyl	C14H21NO2	-28.0317	236.1646	-0.4	-1.8		19	5.02	1: TOF MS ES+ :236.1...	374.80	0.12	...
✓	YES	411.1893	Didesmethyl + Glucuronide conjugation	C20H29NO8	148.0002	412.1965	-0.6	-1.5		3	3.41	1: TOF MS ES+ :412.1...	10538.50	3.40	...
✓	YES	425.2050	Glucuronide conjugation + Demethylation	C21H31NO8	162.0181	426.2145	1.7	4.1		2	3.30	1: TOF MS ES+ :426.2...	25079.80	8.08	...
✓	YES	263.1885	Parent	C16H25NO2	0.0006	264.1970	0.7	2.5		20	5.07	1: TOF MS ES+ :264.1...	153692.91	49.52	...

Métabolite desméthyl m/z = 249.1729



# Exemple du tramadol et de la venlafaxine

VENLAFAXINE



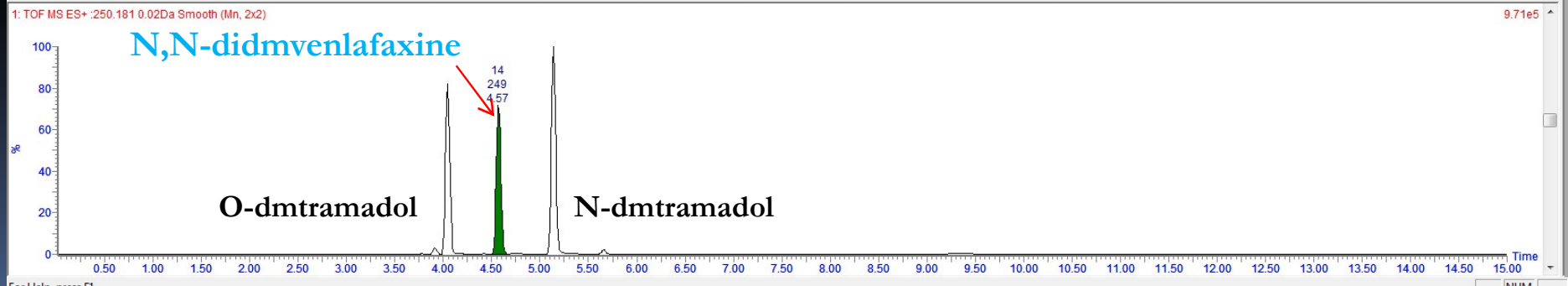
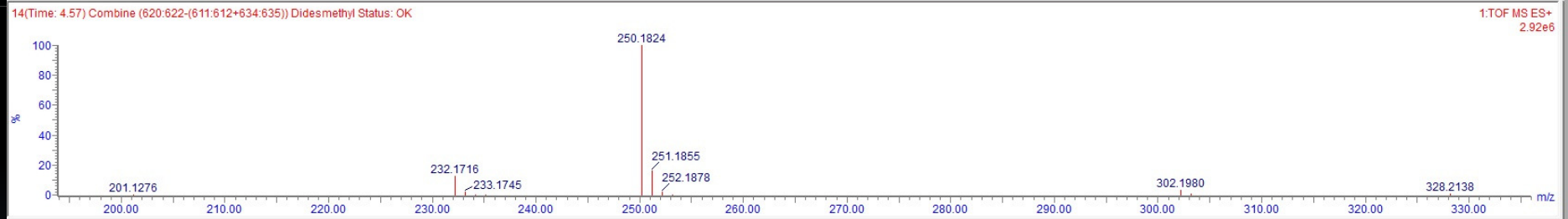
# Venlafaxine

MetaboLynx XS Browser - [venlaf]

Expected Metabolites - parent C17H27NO2 (5/50 entries)

Status	MS...	Mass	Metabolite Name	Formula	Mass Difference	m/z Found	mDa	PPM	Label	Peak ID	Time	Trace	Area Abs	Area %	PDA Peak Area
✓	YES	263.1885	Demethylation	C16H25NO2	-14.0140	264.1980	1.7	6.3		17	4.67	1: TOF MS ES+ :264.1...	156009.59	29.91 ...	
✓	YES	263.1885	Demethylation	C16H25NO2	-14.0147	264.1972	0.9	3.3		29	5.81	1: TOF MS ES+ :264.1...	53874.60	10.33 ...	
✓	YES	249.1729	Didesmethyl	C15H23NO2	-28.0295	250.1824	1.7	6.9		14	4.57	1: TOF MS ES+ :250.1...	38737.90	7.43 ...	
✓	YES	439.2206	Glucuronide conjugation-CH2 (R,0:-CH2)	C22H33NO8	162.0169	440.2289	0.5	1.1		4	3.59	1: TOF MS ES+ :440.2...	52411.90	10.05 ...	
✓	YES	277.2042	Parent	C17H27NO2	0.0008	278.2128	0.8	3.0		30	5.96	1: TOF MS ES+ :278.2...	220538.50	42.28 ...	

Métabolite didesméthyl  $m/z = 249.1729$



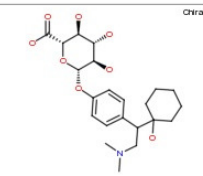


# Venlafaxine

Report - Windows Internet Explorer  
http://localhost:8100/cgi-bin/report.cgi

## Report

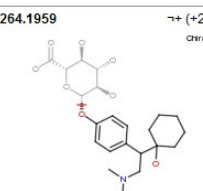
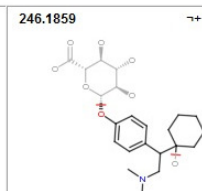
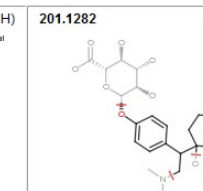
Input

	ID (job)	88
	Mass (Da)	439.2206
	Formula	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>8</sub>
	DBE	7

Experiment

Product ion(s) (Da)	107.0505 133.0664 159.0813 201.1282 246.1859 264.1959 276.1807 328.2129 422.2173 440.2282 +/- 0.001 in positive mode, structure filter off
DBE	-10 to 50
Electron count	both
Maximum H deficit	6
Fragment number of bonds	4
Scoring	aromatic: 6, multiple: 4, ring: 2, phenyl: 8, other: 1 H-deficit: 0, hetero modifier: 0.5, max score: 16
Order:	mass
Plot:	show <input checked="" type="radio"/> hide <input type="radio"/>
Files:	<a href="#">CSV</a>

Results:

 264.1959 $\rightarrow$ (+2H) Oxtrial	 246.1859 $\rightarrow$ (+1H) Oxtrial	 201.1282 $\rightarrow$ (+0H) Oxtrial
264.1964 (-0.5 mDa) (S:0.5, B:1) C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>2</sub> (-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	246.1858 (+0.1 mDa) (S:1.0, B:2) C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> NO (-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> )	201.1279 (+0.3 mDa) (S:1.5, B:3) C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> O (-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>7</sub> )

Done

Local intranet | Protected Mode: Off

7:17 PM  
8/31/2015

O-dmvenlafaxine glucuronide

m/z = 439.2206

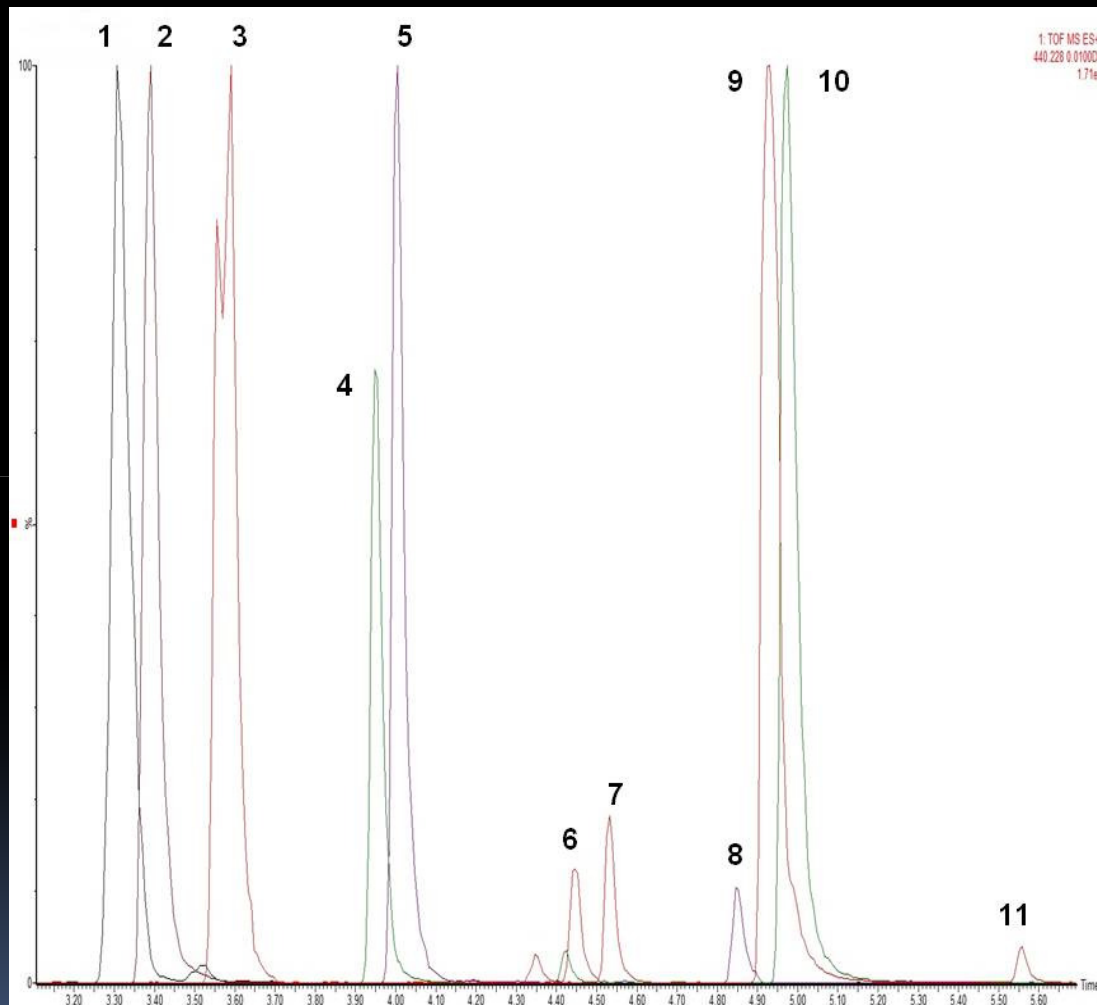
## Fragments

m/z = 264.1964 (parent)

m/z = 246.1858

m/z = 201.1279

# Exemple du tramadol et de la venlafaxine



1	O-dm-tramadol-glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>1</sub> O <sub>8</sub>
2	O,N-didm-tramadol-glucuronide	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>1</sub> O <sub>8</sub>
3	O-dm-venlafaxine-glucuronide	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>1</sub> O <sub>8</sub>
4	O-dm-tramadol	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
5	O,N-didm-tramadol	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
6	N-didm-venlafaxine	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
7	O-dm-venlafaxine	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
8	N,N-didm-tramadol	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
9	tramadol	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
10	N-dm-tramadol	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>
11	N-dm-venlafaxine	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>

(dm = desméthyl)

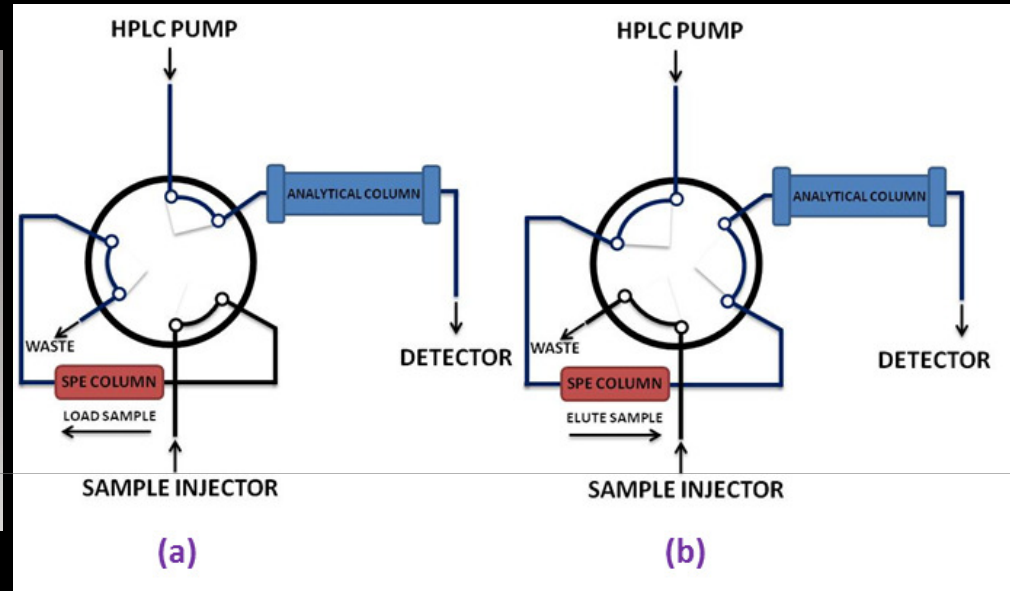
# Couplage UPLC-TOF avec SPE *online*

## UPLC Acquity 2D - XEVO G2 Qtof

Waters®



# UPLC 2D - QToF



**UPLC** : temps d'acquisition réduit = robustesse du criblage toxicologique

**UPLC 2D-Qtof** : analyse spécifique-sensible-robuste de matrices de matrices biologiques ou non +/- complexes

# Matrices biologiques complexes

## Viscères

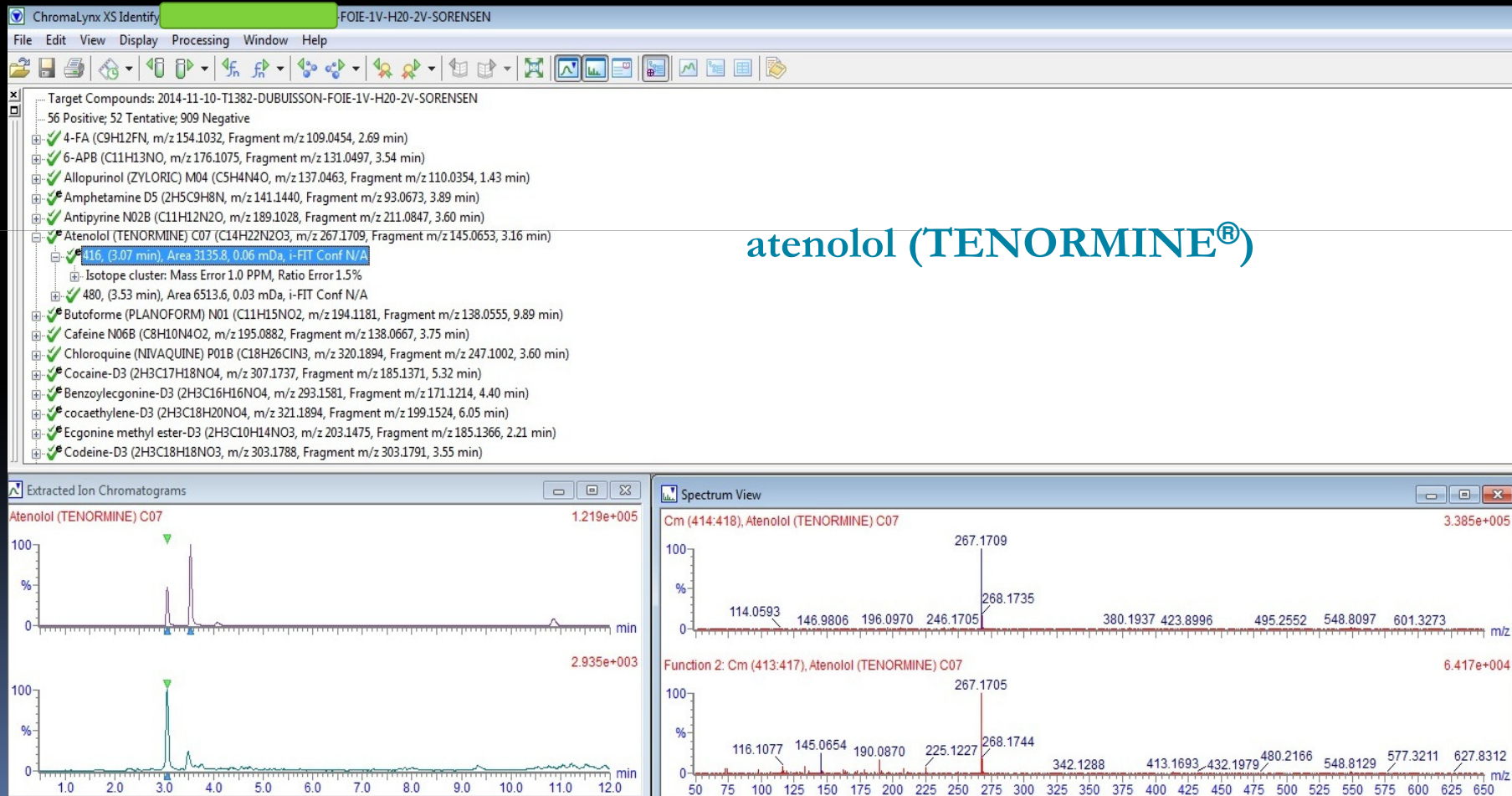
- Corps putréfié - carbonisé, exhumation ...
- Exemple : ♀ carbonisée : sang-foie déshydratés  
sang = 80 % eau ; foie = 65 % eau
- Broyage après réhydratation  
(eau ou Sørensen pH 6,8)



# Matrices biologiques complexes

## Viscères

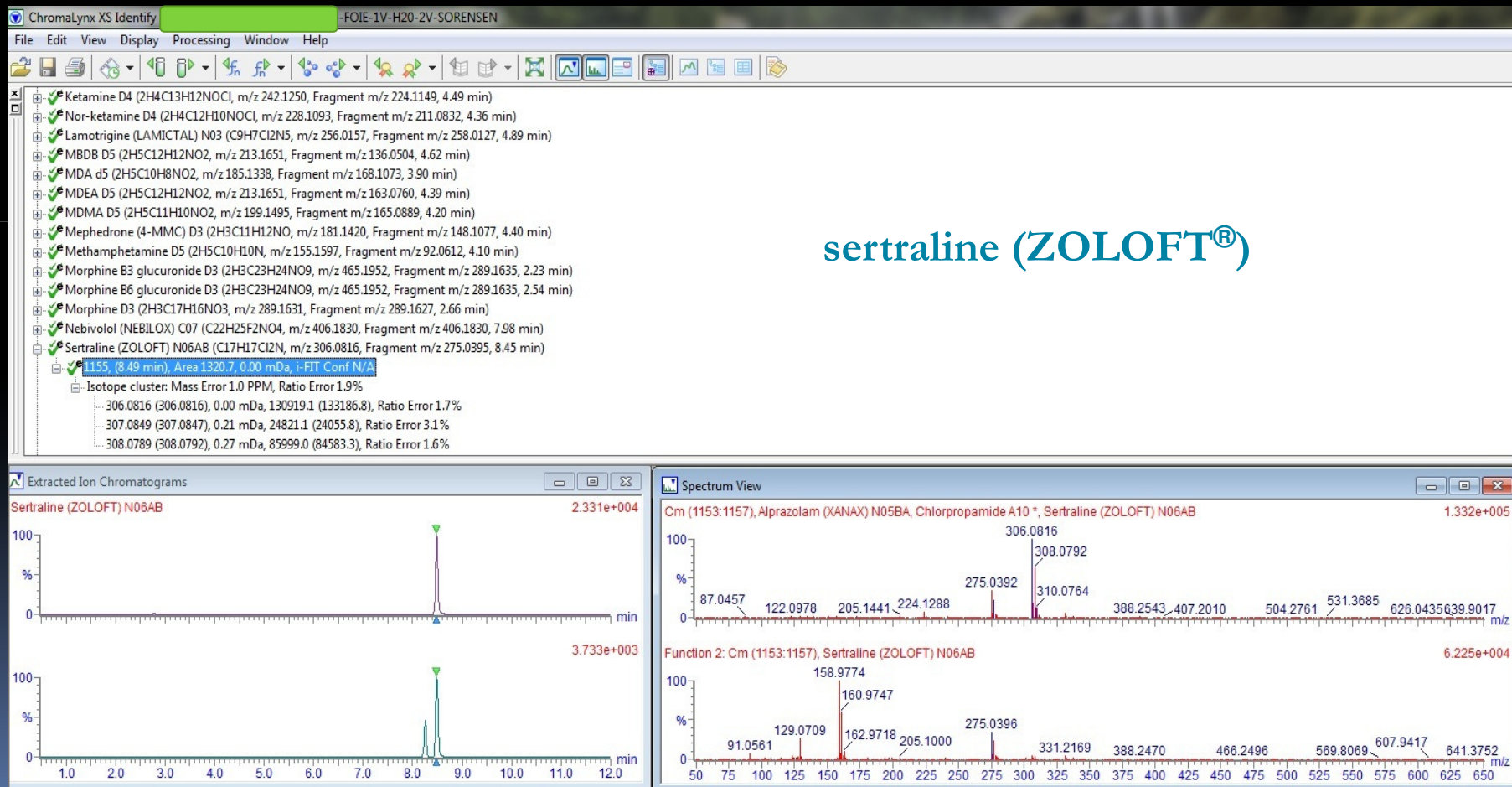
### ➤ Screening UPLC-Qtof avec PEL du foie



# Matrices biologiques complexes

## Viscères

➤ Screening UPLC-Qtof avec PEL du foie



# Matrices biologiques complexes

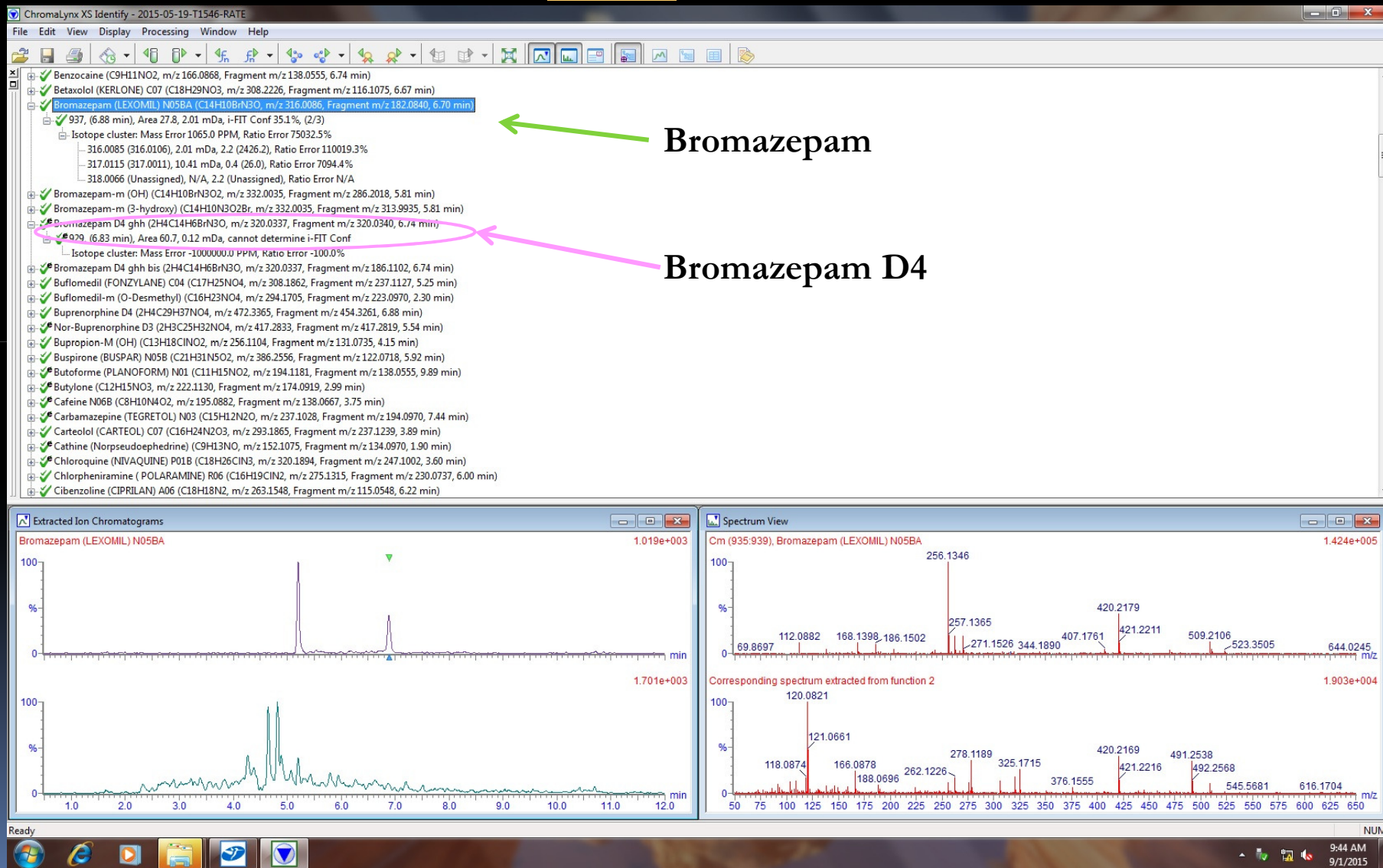
## Viscères

- Analyse simultanée qualitative et quantitative avec EI deutérés
- Broyage des viscères dans tampon Sörensen avec EI deutérés ( $\approx$  40 molécules médoc et stup)
- Ex. ♀ exhumation après 1 mois sous terre dans une bâche – putréfaction +++ : Foie, Rein, Rate



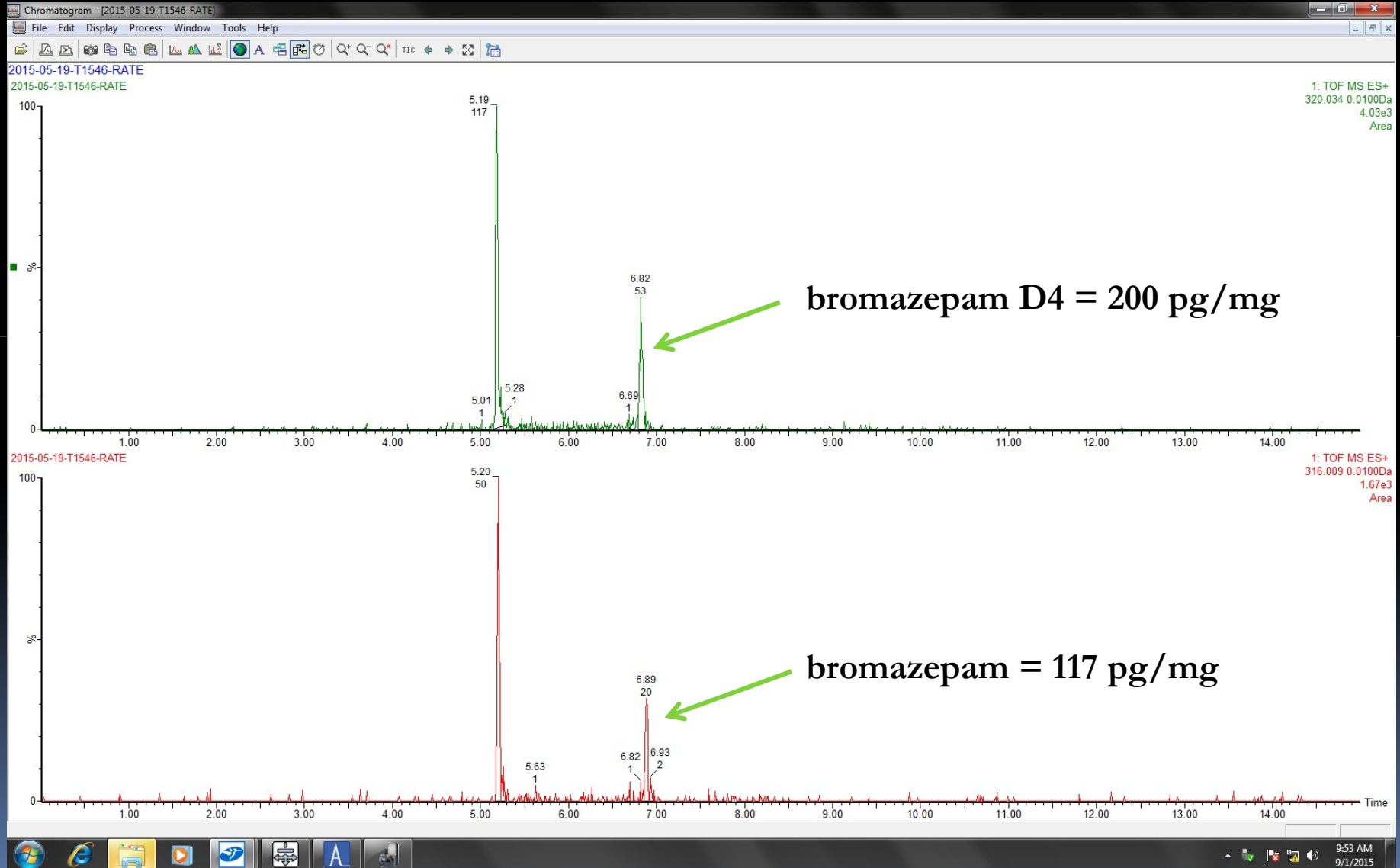
# Matrices biologiques complexes

## Rate



# Matrices biologiques complexes

## Rate

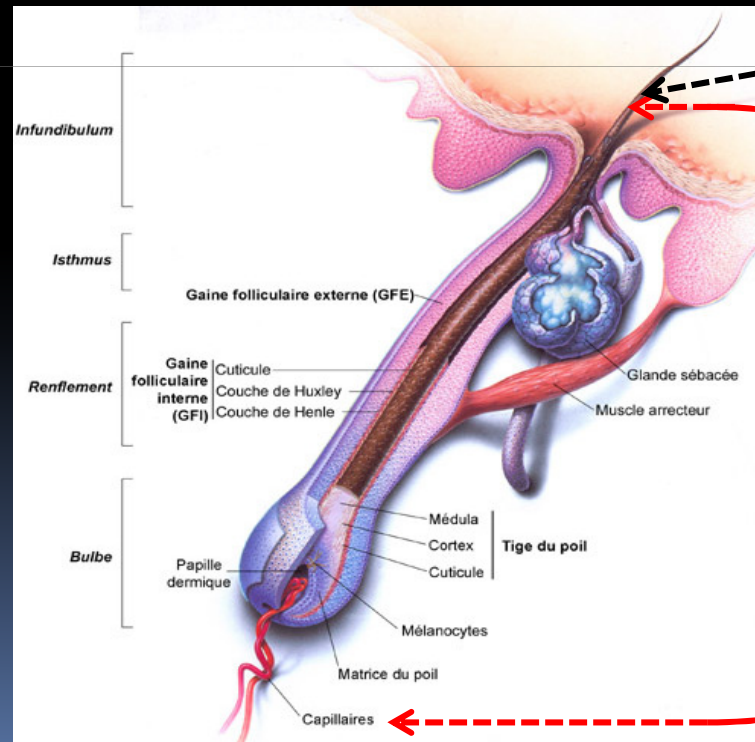


# Matrices biologiques complexes

## Cheveux

- Marqueur expositions répétées/chroniques
- Fenêtre de détection : plusieurs semaines  
→ profil de consommation à long terme

- Structure kératinisée
- 3 phases :
  - anagène (4-8 ans)
  - catagène (2 sem)
  - télogène (3 mois)
- Vertex : 0,34 mm/j  
soit 1 cm/mois  
(0,7 – 1,3 cm/mois)



Localisation du  
prélèvement de cheveux  
= **vertex**

Temps de migration  
d'une molécule dans le  
follicule pilo-sébacé (des  
capillaires sanguins  
jusqu'au vertex  $\approx$  1,2-1,5  
cm) = **3-4 jours**

# Matrices biologiques complexes

## Cheveux

- 10 mg cheveux (poils pubiens)
- 200 µl de tampon (Sorënsen pH 6,86) + EI deutérés
- ultra-sons 2 h
- UPLC-Qtof avec PEL : injection 100 µl
- Résultats très satisfaisants (CQE) avec prise d'essai réduite à 5 mg



Si suspicion contamination externe : lavage eau, MeOH, dichlorométhane

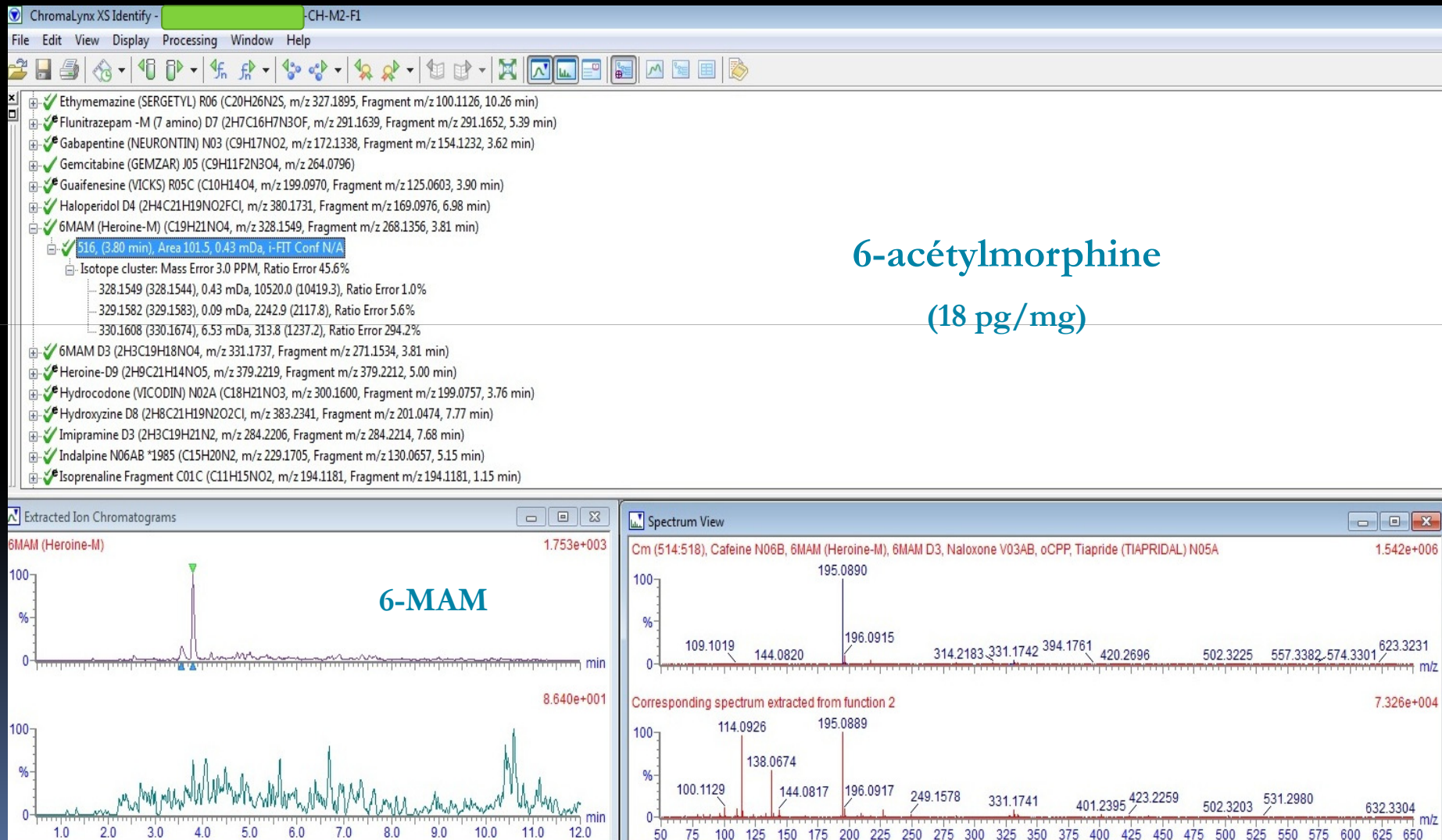
# Matrices biologiques complexes

## Cheveux

- ✓ ♂ alcoolique (sous traitement), dcd à domicile
- ✓ Examen de corps : syndrome asphyxique ++
- ✓ Analyse toxicologique sang et urines :
  - alcoolémie = 1,36 g/l ; alcoolurie = 2 g/l
  - présence 6-MAM, morphine, alcaloïdes de l'opium (codéine, noscapine, papavérine) et paracétamol  
consommation d'héroïne (toxicomanie non connue)
  - morphine = 56 ng/ml ; M3G = 100 ng/ml ; M6G = 16 ng/ml
  - décès imputable à l'héroïne ?

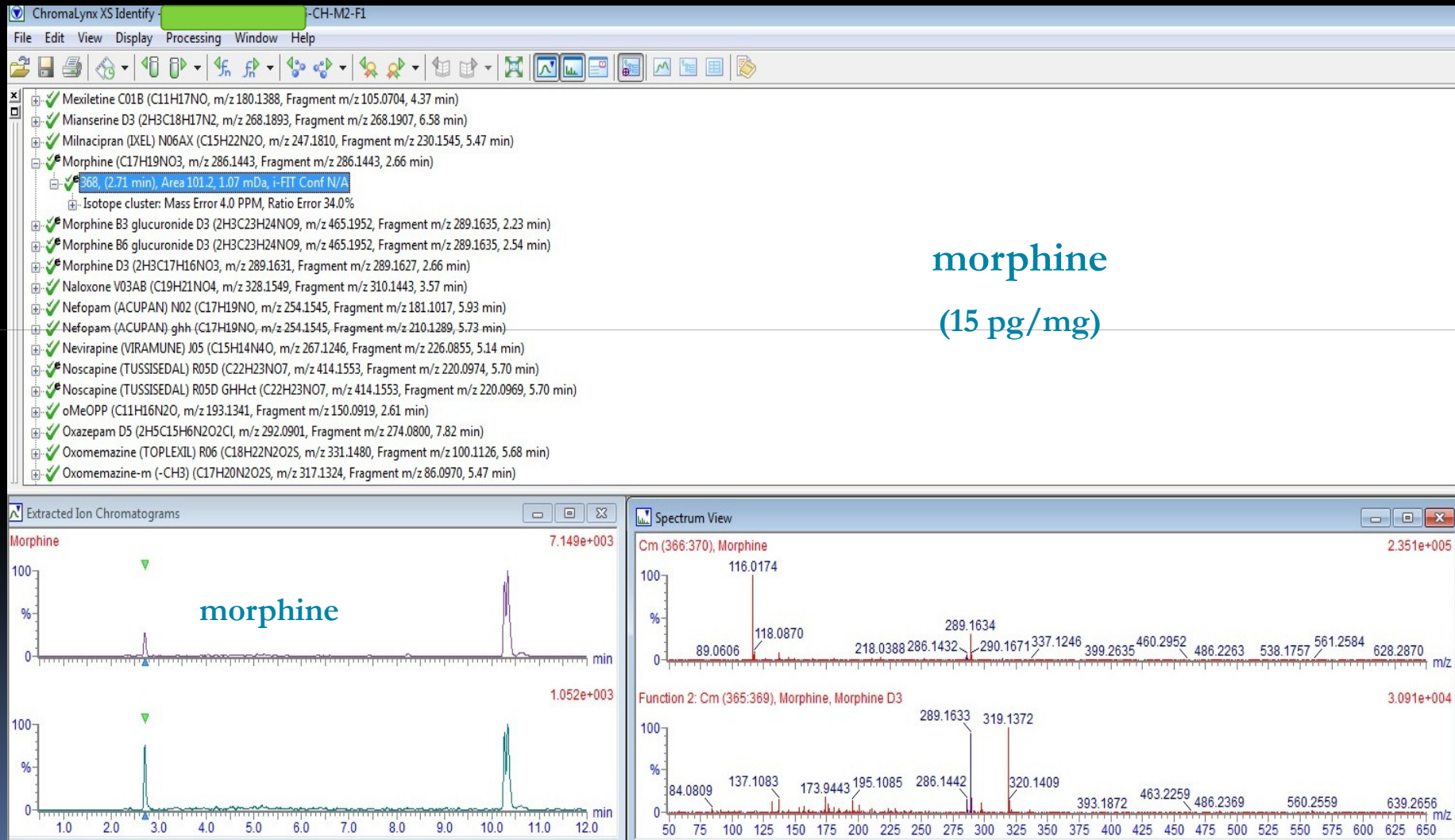
# Matrices biologiques complexes

## Cheveux



# Matrices biologiques complexes

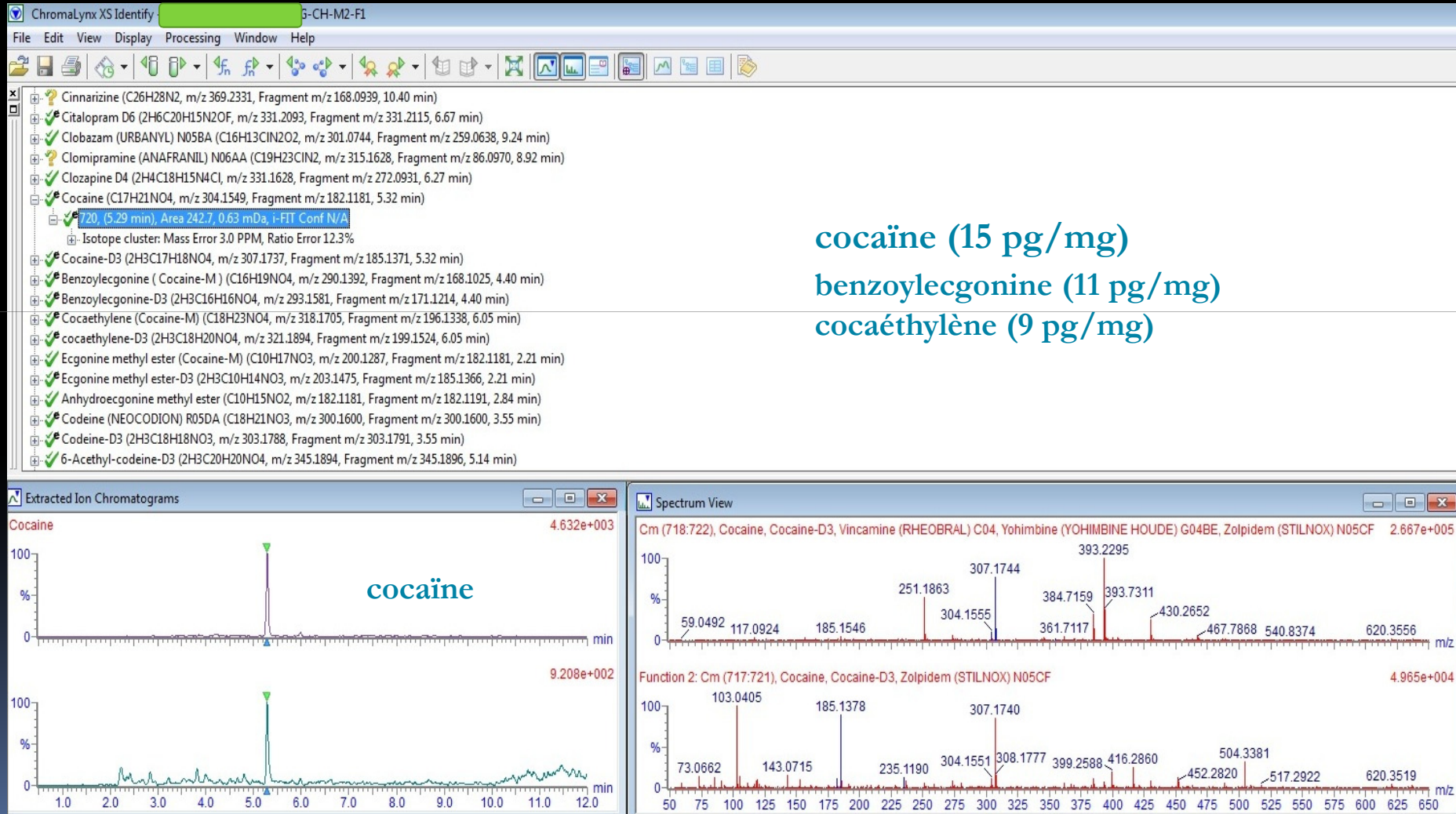
## Cheveux



morphine  
(15 pg/mg)

# Matrices biologiques complexes

## Cheveux



cocaine (15 pg/mg)

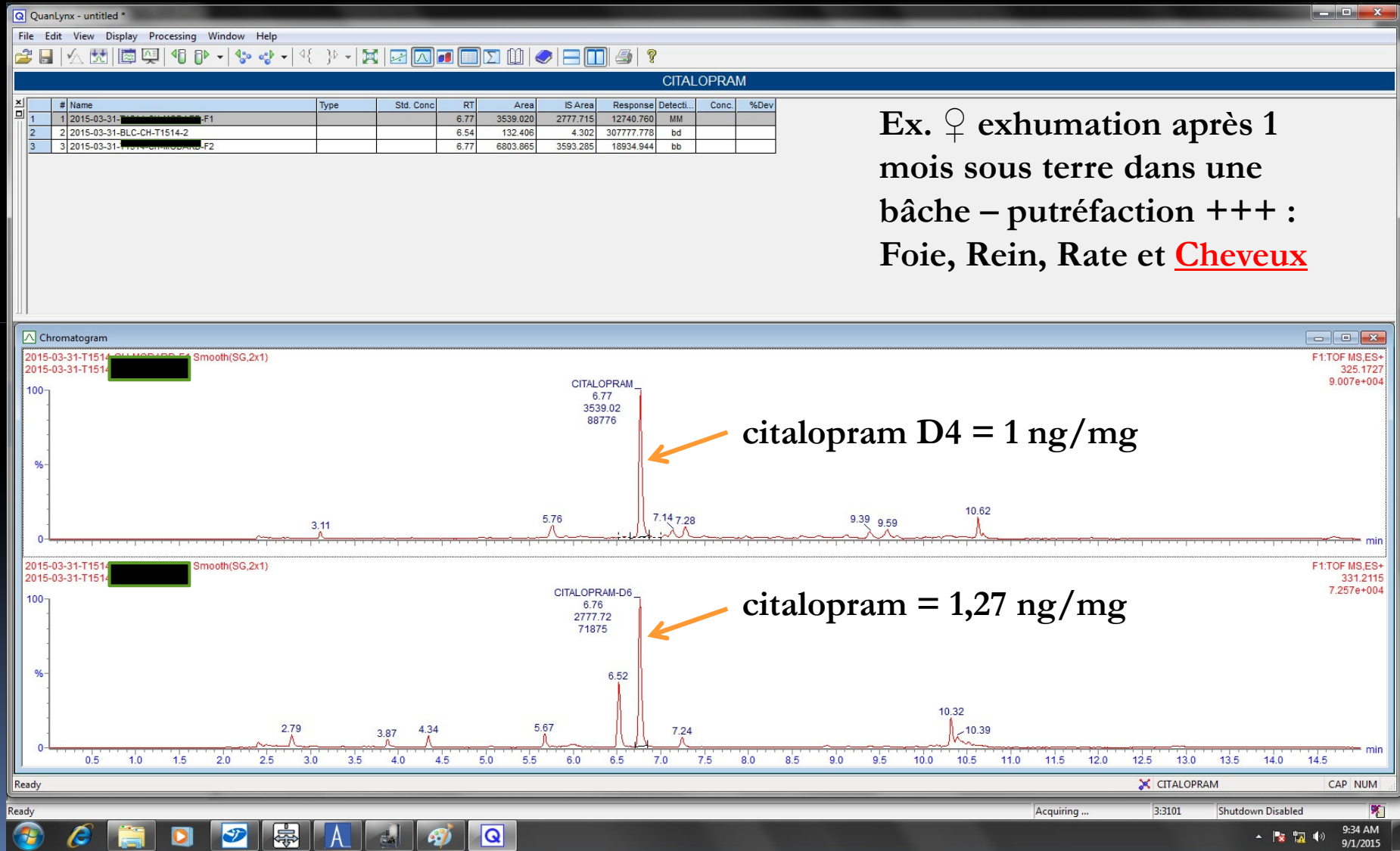
benzoylcegonine (11 pg/mg)

cocaéthylène (9 pg/mg)



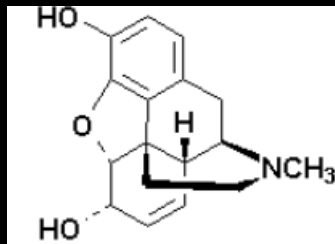
# Matrices biologiques complexes

## Cheveux



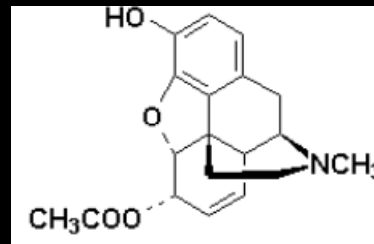
# Matières premières stupéfiantes

Pavot (capsules) → Opium → extraction / morphine



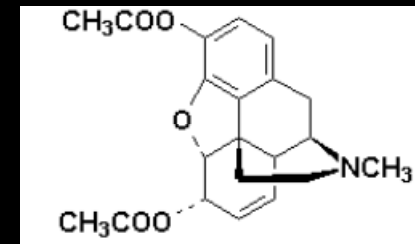
morphine

→  
réactif  
acétylation



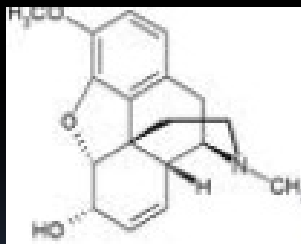
6-monoacétylmorphine

→  
réactif  
acétylation



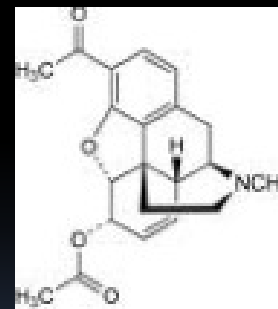
diacétylmorphine

= héroïne



codéine

→  
réactif  
acétylation



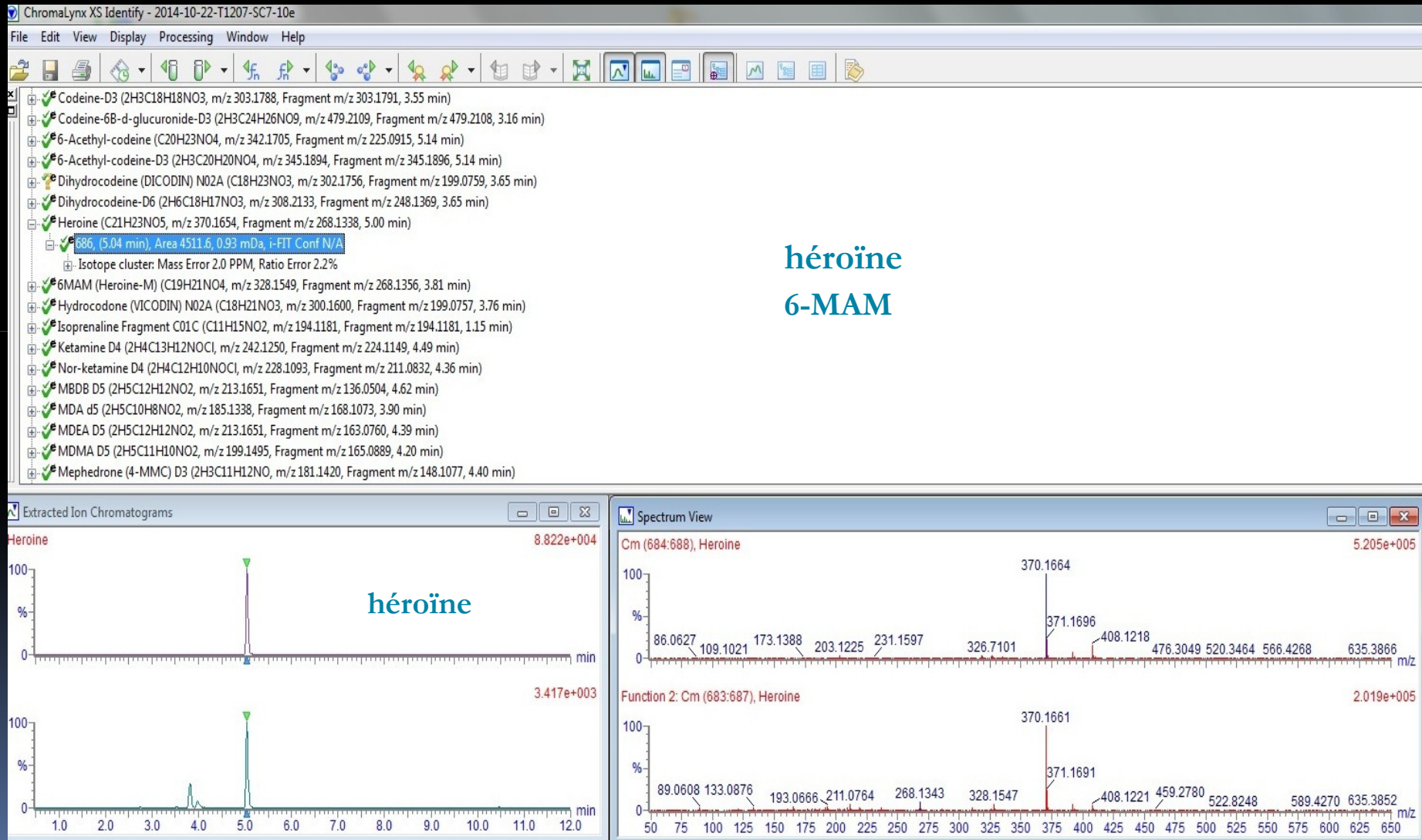
6-acétylcodéine



Autres alcaloïdes extraits : noscapine, papavérine

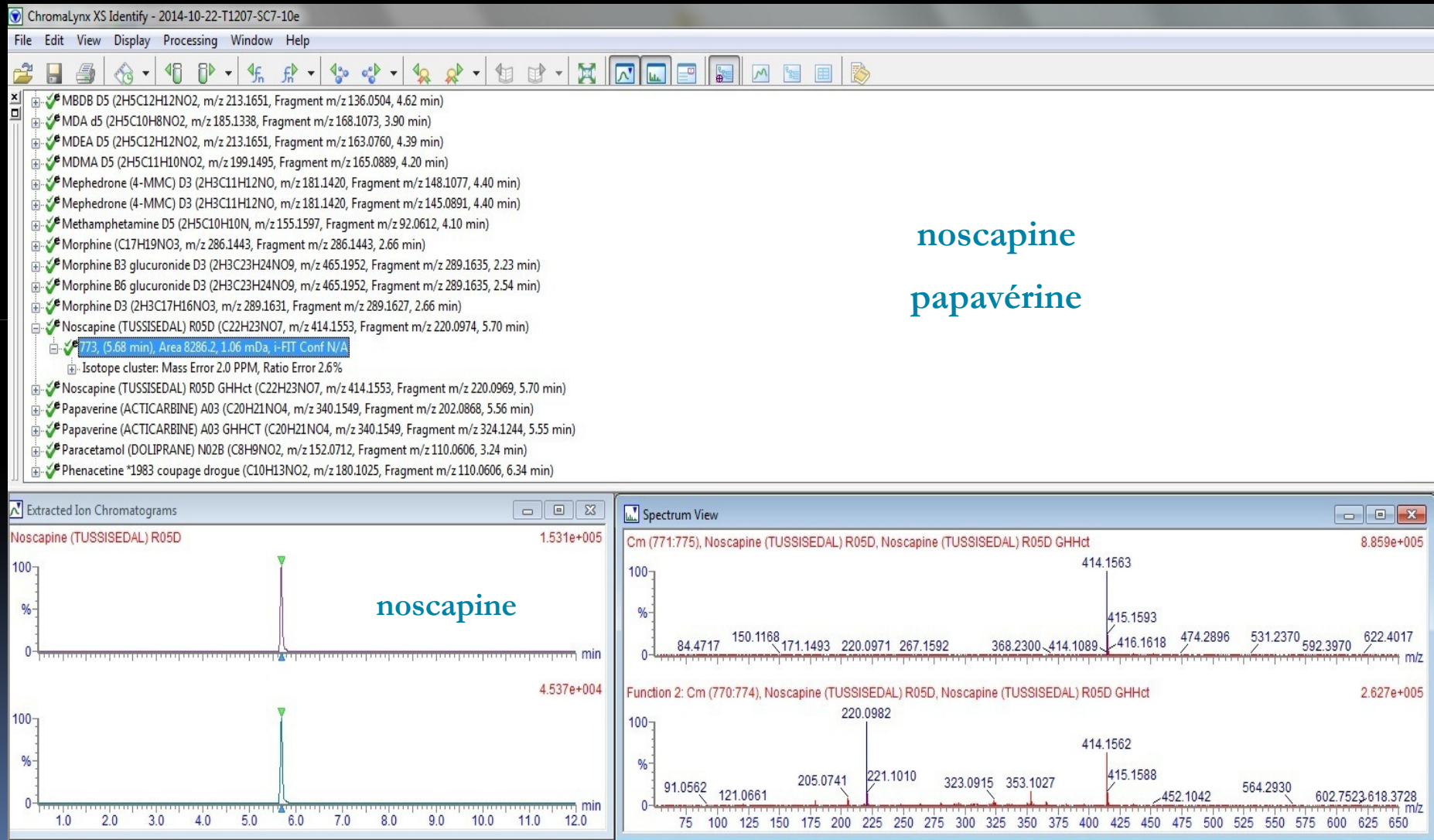
# Matières premières stupéfiantes

## héroïne



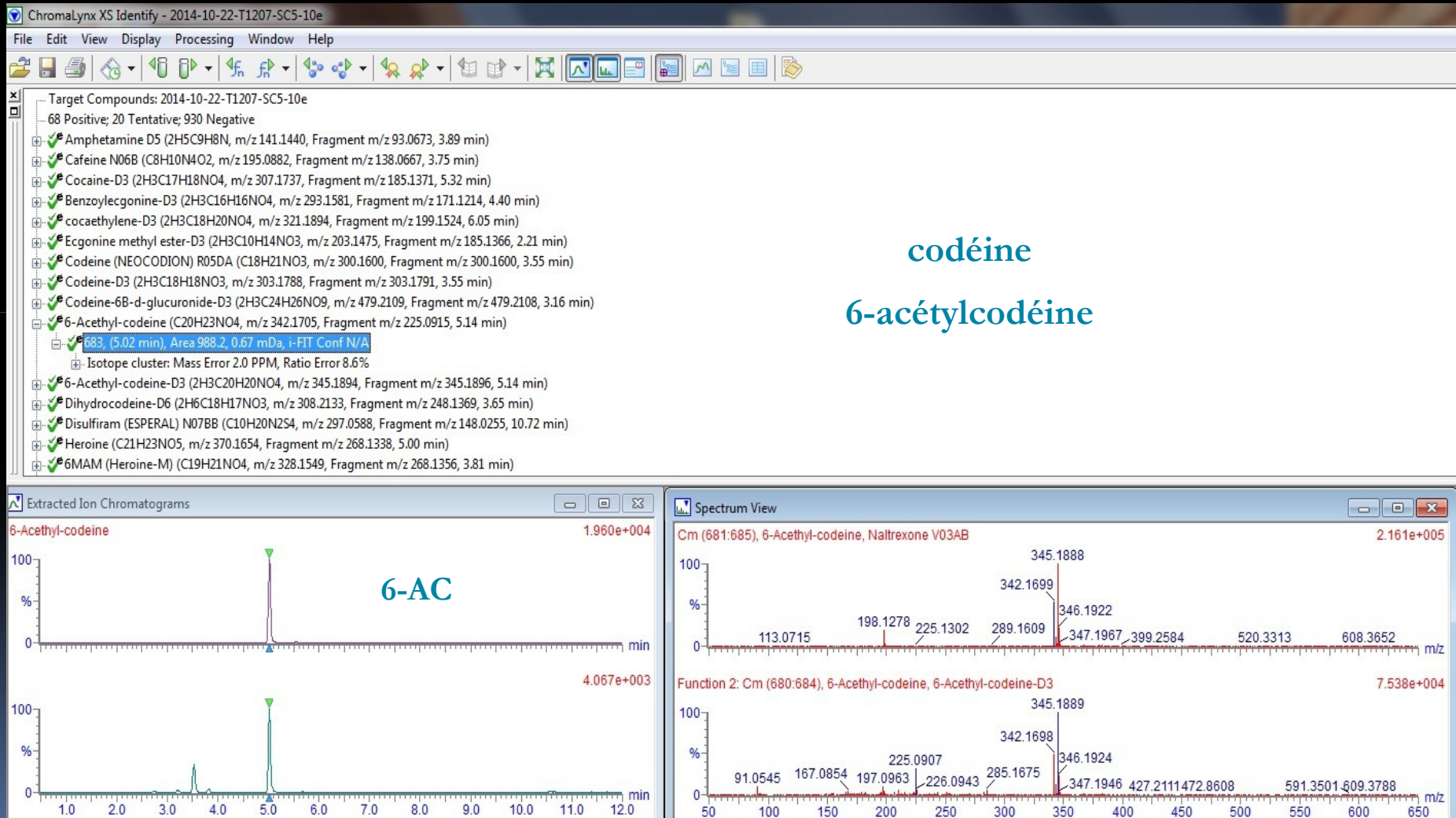
# Matières premières stupéfiantes

## héroïne



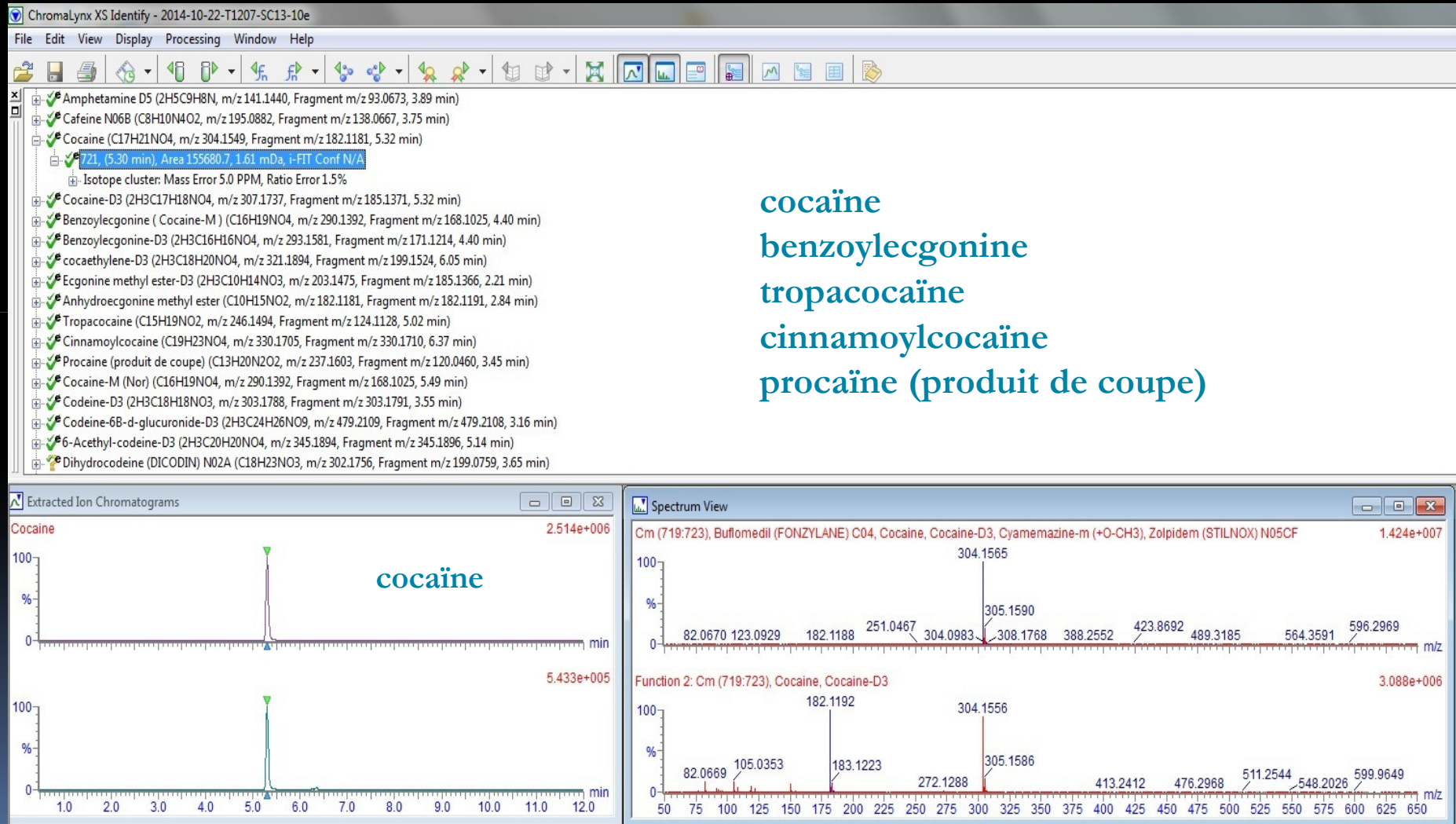
# Matières premières stupéfiantes

## héroïne



# Matières premières stupéfiantes

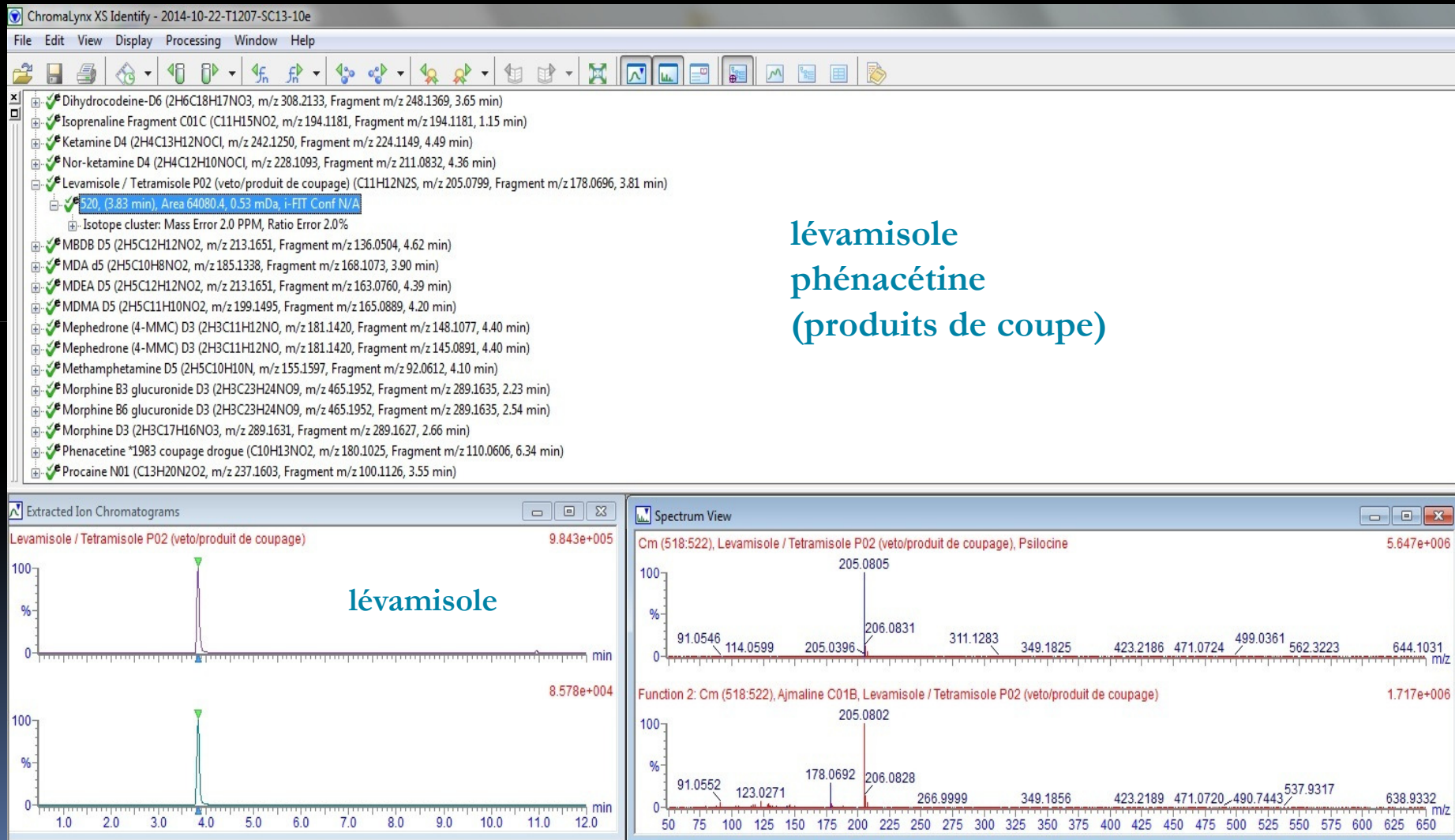
## cocaïne



cocaïne  
benzoylcegonine  
tropacocaine  
cinnamoylcocaïne  
procaine (produit de coupe)

# Matières premières stupéfiantes

## cocaïne



# Métabolites des produits de coupe

