

Document technique de l'AMA – TD2003IDCR

Document n° :	TD2003IDCR-FR	Version n° :	1.2
Rédaction :	Équipe de projet de l'AMA	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2003	Date d'entrée en vigueur :	01 janvier 2004

CRITERES D'IDENTIFICATION DANS LES ANALYSES QUALITATIVES FAISANT APPEL A LA CHROMATOGRAPHIE ET A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Toute analyse doit donner lieu à l'enregistrement de données analytiques appropriées. Le Laboratoire doit établir des critères d'identification pour chaque substance analysée. Des exemples de critères acceptables sont donnés ci-après.

Séparation chromatographique

En chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, le temps de rétention (TR) de l'analyte ne doit pas différer de plus de un (1) pour cent ou de $\pm 0,2$ min (au plus petit des deux), de celui de la même substance dans un échantillon de référence d'urine dopée, ou provenant d'une Collection de Référence ou de Matériel de Référence analysé au même moment. Si des dérives du temps de rétention sont observées mais peuvent être expliquées (par exemple par une surcharge de la colonne), les critères de temps de rétention peuvent être assouplis. En chromatographie liquide haute performance, le temps de rétention de l'analyte ne doit pas différer de plus de deux (2) pour cent ou de $\pm 0,4$ min (au plus petit des deux), de celui de la même substance dans un échantillon de référence d'urine dopée, ou échantillon provenant d'une Collection de Référence ou Matériel de Référence faisant partie du même lot d'analyse.

Détection par spectrométrie de masse

Mode balayage complet. Le **balayage** de tout ou partie de la gamme de masse constitue l'approche privilégiée pour l'identification. Un **balayage** partiel peut commencer à une valeur m/z supérieure à celle de tout ion abondant dû à l'agent de dérivatisation ou au réactif d'ionisation chimique.

Lorsque l'acquisition est effectuée par **balayage** total ou partiel, tous les **ions diagnostiques** présentant une **abondance relative** supérieure à 10 % dans le spectre de référence obtenu à partir d'une urine témoin positive, d'un échantillon provenant d'une Collection de Référence ou d'un Matériel de Référence doivent être présents dans le spectre du composé inconnu. De plus, l'abondance relative de trois des **ions diagnostiques** ne doit pas présenter, par rapport à celle des mêmes ions dans un échantillon de référence uriné dopée, ou provenant d'une Collection de Référence, ou de Matériel de Référence, une différence supérieure à la valeur indiquée dans le Tableau 1. L'**abondance relative** des **ions diagnostiques** peut être établie à partir de spectres simples ou moyens ou par intégration des pics chromatographiques correspondant aux ions extraits.

Si l'on procède à une soustraction de bruit de fond, il convient de l'appliquer uniformément à tous les *Echantillons* analysés au même moment, et de l'utiliser pour toute prise de décision relative à la présence d'une *Substance Interdite*, l'usage d'une *Méthode Interdite* ou la présence d'un *Métabolite* ou *Marqueur* associé.

Le recours à des bases de données spectrales (spectrothèques) pour la recherche ou la comparaison de spectres est autorisé. Le Laboratoire doit établir des critères d'acceptation pour l'identification des composés sur la base du degré de similitude spectrale. L'indice de similitude d'une recherche inversée n'étant pas suffisant pour

Document technique de l'AMA – TD2003IDCR

Document n° :	TD2003IDCR-FR	Version n° :	1.2
Rédaction :	Équipe de projet de l'AMA	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2003	Date d'entrée en vigueur :	01 janvier 2004

garantir l'identification, tout résultat de similitude spectrale avec une référence de spectrothèque doit être confirmé par un scientifique qualifié.

Si l'on ne dispose pas de trois **ions diagnostiques** présentant une **abondance relative** supérieure à 5 %, il faut procéder à une seconde dérivatisation ou appliquer une seconde technique d'ionisation ou de fragmentation. La seconde dérivatisation doit produire des **ions diagnostiques** différents. La seconde technique d'ionisation doit reposer sur un principe physique différent (ionisation chimique par opposition à électronique) et devrait elle aussi produire des **ions diagnostiques** différents. Il n'est pas acceptable d'utiliser une technique qui modifie simplement l'**abondance relative** des ions de même masse. Dans tous les cas, le recours à deux **ions diagnostiques** au minimum est obligatoire pour chaque spectre de masse.

Mode fragmentométrique (Selected Ion Monitoring ou SIM). Dans certains cas, il peut être nécessaire de restreindre l'acquisition à certains ions sélectionnés pour pouvoir détecter la substance à la Limite Minimale de Performance Requise. L'acquisition doit alors porter sur trois **ions diagnostiques** au minimum. L'**abondance relative** d'un **ion diagnostique** doit de préférence être déterminée à partir de l'aire ou de la hauteur des pics chromatographiques correspondant aux ions sélectionnés. Le **rapport signal/bruit** doit être supérieur à trois sur un (3:1) pour l'**ion diagnostique** le moins intense. L'intensité relative d'aucun des ions ne doit présenter, par rapport à celle du même ion dans un échantillon de référence d'urine dopée, ou provenant d'une Collection de Référence, ou de Matériel de Référence, une différence supérieure à la valeur indiquée dans le Tableau 1. Si un **ion diagnostique** présente une **abondance relative** inférieure à 5 % dans l'échantillon de référence, il doit être présent dans l'échantillon à analyser. La concentration de la *Substance Interdite* ou de son *Métabolite* ou *Marqueur* devrait être comparable dans l'*Echantillon* et dans l'échantillon de référence d'urine dopée, ou provenant d'une Collection de Référence, ou de Matériel de Référence.

Tableau 1

Plages maximales de tolérance pour les intensités relatives permettant d'établir l'identité avec une incertitude appropriée

Abondance relative (% du pic de base)	IE-CPG/SM	IC-CPG/SM ; CPG/SMⁿ ; CL/SM ; CL/SMⁿ
> 50 %	± 10 % (différence absolue)	± 15 % (différence absolue)
25 % à 50 %	± 20 % (différence relative)	± 25 % (différence relative)
< 25 %	± 5 % (différence absolue)	± 10 % (différence absolue)

Si le protocole du Laboratoire exige que trois des ions soient compris dans la plage de tolérance pour identifier une substance, il n'est pas admissible sans explication valable de collecter des ions supplémentaires pour ensuite sélectionner les rapports ioniques compris dans les tolérances en ignorant les autres, qui ne permettraient pas de satisfaire aux critères d'identification.

Si l'on ne dispose pas de trois **ions diagnostiques**, il faut procéder à une seconde dérivatisation ou appliquer une seconde technique d'ionisation ou de fragmentation. La seconde dérivatisation devrait produire des **ions diagnostiques** différents. La

Document technique de l'AMA – TD2003IDCR

Document n° :	TD2003IDCR-FR	Version n° :	1.2
Rédaction :	Équipe de projet de l'AMA	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2003	Date d'entrée en vigueur :	01 janvier 2004

seconde technique d'ionisation doit reposer sur un principe physique différent (ionisation chimique par opposition à électronique) et doit elle aussi produire des **ions diagnostiques** différents. Il n'est pas acceptable d'utiliser une technique qui modifie simplement l'**abondance relative** des ions de même masse. Dans tous les cas, le recours à deux **ions diagnostiques** au minimum est obligatoire pour chaque spectre de masse.

Détection par spectrométrie de masse en tandem (SMⁿ)

En **spectrométrie de masse en tandem**, l'acquisition des données peut être réalisée soit en mode **balayage** complet (full scan) soit en mode fragmentométrique avec suivi d'une réaction sélectionnée (selected reaction monitoring ou SRM). La combinaison de plusieurs processus successifs (sélection de l'ion parent en fonction de sa masse, puis dissociation potentiellement univoque par collision et enfin sélection selon leur masse ou **balayage** des ions fils produits) confère à la **spectrométrie de masse en tandem** une spécificité accrue. Il convient de choisir les conditions de collision de façon à assurer la présence de l'ion parent dans l'acquisition SM/SM réalisée par **balayage SM/SM** ou SRM. Dans certains cas, un couple parent-fils unique peut être suffisamment spécifique pour donner un résultat univoque. Lorsqu'il s'agit de suivre la réaction générant un seul ion fils à partir d'un seul ion parent, la résolution en masse du premier analyseur doit être réglée sur 1. Lorsqu'il s'agit de suivre plusieurs ions fils, l'intensité relative d'aucun des ions ne doit présenter, par rapport à celle du même ion dans un échantillon de référence d'urine dopée, ou provenant d'une Collection de Référence, ou de Matériel de Référence analysé au même moment, une différence supérieure à la valeur indiquée dans le Tableau 1. Le **rapport signal/bruit** doit être supérieur à trois sur un (3:1) pour l'**ion diagnostique** le moins intense. L'**abondance relative** d'un **ion diagnostique** doit de préférence être déterminée à partir de l'aire ou de la hauteur des pics chromatographiques correspondant aux ions sélectionnés. Si un **ion diagnostique** présente une **abondance relative** inférieure à 5 % dans l'échantillon de référence, il doit être présent dans l'échantillon à analyser.

En l'absence d'**ion(s) fils diagnostique(s)** univoque(s), il faut procéder à une seconde dérivatisation ou appliquer une seconde technique d'ionisation ou de fragmentation. La seconde dérivatisation devrait produire des ions parents et/ou fils différents. La seconde technique d'ionisation peut faire appel à un autre réactif d'ionisation chimique, mais devrait générer des ions parents ou fils différents. Il n'est pas acceptable d'utiliser une technique qui modifie simplement l'abondance relative des ions de même masse.

Estimation de la concentration

Quelle que soit la méthode utilisée, on peut estimer la concentration en calculant le rapport de la hauteur (aire) respective du pic obtenu au temps de rétention de l'analyte considéré et du pic d'un étalon interne. L'emploi d'un étalon interne convenablement deutérié est recommandé, mais non exigé. Le rapport des hauteurs (aires) peut alors être comparé à celui d'un étalon ou d'une urine témoin positive. Il suffit, pour estimer la concentration, d'utiliser un ion unique présentant un rapport masse/charge approprié (par exemple $m/z = 405$ pour le dérivé di-TMS de la 19-norandrostérone), obtenu à partir d'un chromatogramme d'extraction

Document technique de l'AMA – TD2003IDCR

Document n° :	TD2003IDCR-FR	Version n° :	1.2
Rédaction :	Équipe de projet de l'AMA	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2003	Date d'entrée en vigueur :	01 janvier 2004

ionique ou d'un chromatogramme **SIM**. Des ions complémentaires doivent être utilisés pour vérifier la conformité aux critères d'identification.

Définitions

Abondance relative (spectrométrie de masse) : rapport, exprimé en pourcentage, de l'abondance d'un ion particulier à l'abondance du plus abondant des ions analysés.

Différence maximale d'abondance relative : différence maximale admise entre l'abondance relative respectivement obtenue, pour un ion particulier, dans l'*Echantillon* et dans l'urine témoin positive ; cette différence peut être exprimée en termes ABSOLUS ou RELATIFS.

Différence absolue : différence calculée en soustrayant le pourcentage fixé de l'abondance relative obtenue pour l'ion étudié dans l'urine témoin positive ou le Matériel de Référence. Par exemple, si la mesure de l'abondance relative d'un ion dans le pic chromatographique considéré a donné pour l'urine témoin positive ou le Matériel de Référence une valeur de 20 %, l'abondance relative observée pour le même ion dans l'échantillon d'urine à analyser devra se situer dans l'intervalle 15-25 % ($20 \% \pm 5 \%$) pour que cet ion puisse contribuer à une identification acceptable.

Différence relative : différence calculée en multipliant par le pourcentage fixé l'abondance relative obtenue pour l'ion étudié dans l'urine témoin positive ou le Matériel de Référence. Par exemple, si la mesure de l'abondance relative d'un ion dans le pic chromatographique considéré a donné pour l'urine témoin positive ou le Matériel de Référence une valeur de 30 % et que la différence maximale admise (en termes relatifs) est de 20 %, l'abondance relative observée pour le même ion dans l'échantillon d'urine à analyser devra se situer dans l'intervalle 24-36 % ($30 \% \pm (30 \times 20 \%)$) pour que cet ion puisse contribuer à une identification acceptable.

Balayage : acquisition d'ions dans une gamme continue de valeurs m/z.

Fragmentométrie, Selected Ion Monitoring (SIM) : acquisition d'ions à une ou plusieurs valeurs m/z discrètes, prédéterminées, pendant des temps spécifiés de résidence.

Ion(s) diagnostique(s) : ion moléculaire ou fragments ioniques dont la présence et l'abondance sont caractéristiques de la substance considérée, et peuvent donc contribuer à son identification. Un second ion appartenant au même cortège isotopique peut également être utilisé comme ion diagnostique à condition que la spécificité de la composition atomique du fragment le justifie (par exemple présence de Cl, Br ou autres éléments caractérisés par l'abondance des ions isotopiques).

Rapport signal/bruit : rapport entre l'amplitude de la réponse de l'instrument à l'analyte (signal) et l'amplitude du fond (bruit).

Spectrométrie de masse faible résolution (SMFR) : la SMFR est définie comme une technique de spectrométrie de masse possédant un pouvoir de résolution (à 10 % de la vallée) inférieur à 3 000.

Document technique de l'AMA – TD2003IDCR

Document n° :	TD2003IDCR-FR	Version n° :	1.2
Rédaction :	Équipe de projet de l'AMA	Approuvé par :	Comité Exécutif de l'AMA
Date :	11 mai 2003	Date d'entrée en vigueur :	01 janvier 2004

Spectrométrie de masse en tandem (SM/SM ou SMⁿ) : technique consistant à isoler un ion parent (ou précurseur) dans un analyseur de masse, puis à le fragmenter par collision avec un gaz, et à collecter les ions fils dans un second analyseur de masse. Ce processus peut être appliqué de multiples fois, ce qu'exprime l'exposant "n". La technique peut être mise en œuvre dans l'espace (par ex. SM à triple quadrupôle) ou dans le temps (par ex. SM à piège ionique).

Spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) : aux fins du *Standard International* pour les Laboratoires, la SMHR est définie comme une technique de spectrométrie de masse possédant un pouvoir de résolution (à 10 % de la vallée) supérieur à 3 000.

01 sept, 2010
EXPIRÉ