

Document technique de l'AMA – TD2015IDCR

Document n°:	TD2015IDCR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

CRITÈRES MINIMUM APPLICABLES À LA CONFIRMATION PAR CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE L'IDENTITÉ DES ANALYTES À DES FINS DE CONTRÔLE DU DOPAGE.

L'aptitude d'une méthode à identifier un analyte dépend de toute la procédure : préparation de l'*échantillon*, séparation chromatographique, analyse de masse et évaluation des données. La documentation décrivant la méthode devrait inclure toutes les parties de la méthode. Les caractéristiques d'analyse appropriées doivent être documentées pour l'ensemble de la méthode d'identification et devraient démontrer qu'elles présentent une adéquation à l'usage prévu suffisante par le biais de la validation appropriée de la méthode.

Dans leurs protocoles d'analyse, les laboratoires doivent suivre les critères d'identification décrits dans le présent Document technique, notamment pour la différenciation entre les isomères de la même substance (si cela est nécessaire pour identifier sans équivoque une *substance interdite*).

1.0 Critères chromatographiques

- Le temps de rétention (TR) du pic chromatographique de l'analyte dans l'*échantillon* ne doit pas différer (ΔTR) de plus d'un (1) pour cent (%) ou $\pm 0,1$ minutes (le plus grand des deux¹ doit être considéré, mais sans dépasser la largeur complète à mi-hauteur, FWHM) de celui du même analyte dans un *échantillon* dopé, un *échantillon* de la collection de référence ou un matériel de référence analysé dans la même séquence d'analyse.
- À titre alternatif, le laboratoire peut choisir d'utiliser comme critère d'acceptation le temps de rétention relatif (TRR), où le TR du pic d'intérêt est mesuré par rapport à un composé de référence chromatographique (CRC).
 - Si le CRC n'est pas l'analyte marqué avec un isotope stable, le TRR de l'analyte dans l'*échantillon* ne doit pas différer de plus de $\pm 1\%$ de celui du même analyte dans un *échantillon* dopé, un *échantillon* de la collection de référence ou un matériel de référence analysé dans la même séquence d'analyse.
 - Si le CRC est l'analyte marqué avec un isotope stable, le TRR de l'analyte dans l'*échantillon* ne doit pas différer de plus de $\pm 0,5\%$ de celui du même analyte dans un *échantillon* dopé, un *échantillon* de la

¹ En considérant « le plus grand des deux », la différence de TR (ΔTR) peut être plus grande qu'en réalité pour des pics chromatographiques étroits (par ex. par UHPLC avec une FWHM de 1s). Puisque toute ΔTR supérieure à la FWHM est généralement considérée comme n'étant pas une bonne corrélation avec le TR, une ΔTR maximale est fixée à la FWHM du pic de référence dans l'*échantillon* dopé, l'*échantillon* de la collection de référence ou le matériel de référence.

Document technique de l'AMA – TD2015IDCR

Document n°:	TD2015IDCR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

collection de référence ou un matériel de référence analysé dans la même séquence d'analyse.

2.0 Critères d'identification par spectrométrie de masse

Les stratégies usuellement employées pour identifier les analytes à l'aide de techniques basées sur la spectrométrie de masse (SM) sont souvent qualifiées d'approches descendante (« top-down ») et ascendante (« bottom-up »).

- L'approche descendante (« top-down ») implique l'analyse par SM de l'analyte intact par la génération d'ions spécifiques à la substance.
- L'approche ascendante (« bottom-up ») implique la mesure des fragments de l'analyte produits de manière enzymatique ou chimique et l'identification de ces fragments.

Bien que ces termes aient été particulièrement utilisés pour l'analyse de grandes molécules (par ex. des protéines), les deux approches sont valables et applicables à l'identification par SM de tout analyte dès lors que l'information obtenue respecte les critères définis dans le présent Document technique.

La spécificité de l'information obtenue pour identifier l'analyte sans équivoque doit être établie dans le cadre du processus de validation de la méthode (par ex. à l'aide de l'outil BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, pour l'analyse d'une séquence d'acide aminé donnée en liaison avec une base de données appropriée, telle que, par exemple, UniProtKB) et ne fait pas partie du présent document.

Les critères d'identification par SM soit par scan (par ex. scan complet (« full scan »), scan d'ions produits (« product ion scan »)) soit sans scan (par ex. fragmentométrie, mesure par suivi de réactions sélectionnées) reposent sur la présence et l'abondance relative d'un certain nombre d'ions diagnostiques qui sont définis par le laboratoire comme caractéristiques de l'analyte. Tout traitement de données (par ex. intégration, soustraction, calcul de moyenne, etc.) doit être effectué uniformément sur l'ensemble de la séquence d'analyse.

La concentration d'une *substance interdite* ou de ses *métabolites* ou *marqueurs* devrait pouvoir être comparable (c'est à dire que le signal de l'analyte devrait être du même ordre de grandeur) dans l'*échantillon* et l'urine dopée, l'*échantillon* de collection de référence ou le matériel de référence pour assurer l'identification de l'analyte cible.

Les critères d'identification suivants doivent être appliqués :

- Chaque masse mesurée utilisée pour l'identification ne doit pas dépasser $\pm 0,5$ Da de la masse correspondante du même ion acquis à partir d'un *échantillon* dopé, d'un *échantillon* de la collection de référence ou d'un matériel de référence analysé dans la même séquence d'analyse.

Document technique de l'AMA – TD2015IDCR

Document n°:	TD2015IDCR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

- Lorsque l'on utilise la SM à étape unique (« single-stage »), au moins trois (3) ions diagnostiques doivent être acquis.

Lorsque l'on utilise la SM en tandem (par ex. MS/MS), au moins deux (2) transitions d'ions parents-fils (à savoir deux transitions SRM) doivent être étudiées. La fenêtre d'acquisition de l'ion parent ne doit pas être supérieure à un m/z de 1,3, sauf si cela est requis par sa masse moléculaire et par son état de charge.

- L'abondance des ions diagnostiques doit être déterminée à partir de l'aire ou de la hauteur de pic des chromatogrammes intégrés de l'ion sélectionné. Cette règle est également applicable quand seul le mode scan est utilisé pour l'identification.
- Le rapport signal-bruit (S/B) de tous les ions diagnostiques doit être supérieur à trois sur un (3:1).
- Les abondances relatives doivent être calculées en divisant l'aire ou la hauteur de la trace d'ion de chaque ion diagnostique par l'aire ou la hauteur obtenue à partir de la trace d'ion de l'ion diagnostique le plus abondant considérée comme le pic de base².
- Les abondances relatives d'un ion diagnostique quelconque ne doivent pas différer des valeurs spécifiées au tableau 1 pour les abondances relatives correspondantes des mêmes ions acquis à partir d'une urine de contrôle positive dopée, d'un *échantillon* de la collection de référence ou d'un matériel de référence.
- Si trois (3) ions diagnostiques ou deux (2) transitions ne sont pas disponibles, un second dérivé doit être préparé, ou une deuxième technique d'ionisation ou de dissociation³ doit être utilisée. La deuxième technique d'ionisation doit reposer sur un principe physique différent, à savoir l'ionisation chimique plutôt que l'ionisation électronique et là encore, devrait fournir des ions diagnostiques différents. Il n'est pas acceptable d'utiliser une technique qui ne change que l'abondance relative des mêmes ions.
- Il n'est pas admissible, sans explication valable⁴, d'extraire plus que le nombre minimum requis d'ions ou de transitions dans le SRM ou le SIM et de

² L'ion correspondant au pic de base doit être l'ion diagnostique le plus abondant acquis à partir d'une urine de contrôle positive dopée, d'un *échantillon* de la collection de référence ou du matériel de référence. Le pic de base de cet ion référence doit également être utilisé pour le calcul des abondances relatives dans le chromatogramme de l'*échantillon*, même s'il ne constitue pas le pic de base de l'ion dans l'*échantillon*.

³ Une technique de dissociation différente pourrait, par exemple, consister à utiliser la SM³ au lieu de la SM² ou à utiliser la dissociation par capture d'électrons (ECD) ou la dissociation par transfert d'électrons (ETD) au lieu de la dissociation induite par collision (CID).

⁴ Une explication valable pourrait être, par exemple, une preuve manifeste que l'un des ions primaires établis subit une interférence de la part d'une substance qui co-élué partiellement.

Document technique de l'AMA – TD2015IDCR

Document n°:	TD2015IDCR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

sélectionner ceux ayant des abondances relatives à l'intérieur des fenêtres de tolérance, tout en ignorant les autres ions ou transitions qui ne répondraient pas aux critères d'identification.

Tableau 1. Fenêtres de tolérance maximales pour les abondances relatives afin de garantir la confiance appropriée dans l'identification

Abondance relative dans le spécimen de référence ⁵ (% du pic de base)	Fenêtres de tolérance maximales pour l'abondance relative dans l'échantillon	Exemples	
		Abondance relative (% du pic de base)	Fenêtre de tolérance (% du pic de base)
50 - 100	±10 (absolu)	60	50-70
		95	85-105
25 - 50	± 20% (relatif)	40	32-48
1 - 25	±5 (absolu) ⁶	10	5-15
		3	>0 ⁶ - 8

⁵ Échantillon dopé, échantillon de la collection de référence ou matériel de référence analysé dans la même séquence d'analyse.

⁶ Les ions diagnostiques doivent toujours être détectés dans l'échantillon (S/B > 3:1).

3.0 Définitions

Abondance relative : rapport entre l'abondance d'un ion particulier et celle du plus abondant des ions analysés.

Fenêtre de tolérance maximale des abondances relatives: différence maximale admise entre l'abondance relative d'un ion particulier obtenu à partir de l'échantillon et celle obtenue à partir du spécimen de référence. Elle peut être exprimée en termes ABSOLUS ou RELATIFS.

Absolue : calculée en ajoutant/soustrayant la valeur de tolérance fixée à/de l'abondance relative obtenue pour l'ion étudié dans le spécimen de référence.

Relative : calculée en prenant le pourcentage de tolérance fixé de l'abondance relative obtenu pour l'ion étudié dans le spécimen de référence, puis en ajoutant/soustrayant cette valeur à/de l'abondance relative.

Document technique de l'AMA – TD2015IDCR

Document n°:	TD2015IDCR	Version n°:	1.0
Rédaction:	Groupe d'experts des laboratoires de l'AMA	Approuvé par:	Comité exécutif de l'AMA
Date:	12 mai 2015	Date d'entrée en vigueur:	1 ^{er} septembre 2015

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

Ion diagnostique : ion moléculaire ou fragment d'ion dont la présence et l'abondance sont caractéristiques de l'analyte et peuvent donc aider 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 ex. présence de Cl, Br ou d'autres éléments ayant des ions isotopiques abondants).

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

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

Suivi d'une réaction sélectionnée (SRM) : données acquises à partir d'ions produits spécifiques correspondant aux m/z des ions précurseurs sélectionnés enregistrés par deux ou plusieurs modules du spectromètre de masse. La SRM peut être effectuée en tant que spectrométrie de masse tandem dans le temps ou que spectrométrie de masse tandem dans l'espace.

Remerciements

Le groupe d'experts des laboratoires de l'AMA tient à remercier les experts du Groupe de travail IDCR de l'AMA pour leurs contributions à la rédaction du présent Document technique: le Dr. José A. Pascual, le prof. Mario Thevis, le prof. Peter van Eenoo et le Dr. Terence Wan.