

Développement de méthodes rapides pour l'analyse des cyanotoxines

Équipe de recherche

SAUVÉ, Sébastien, Université de Montréal
Prévost, Michèle, École Polytechnique

Partenaires

Beck, Jonathan, Thermo Scientific
Deblois, Christian, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs
Gagnon, Christian, Environnement Canada
Picard, Pierre, Phytronix Technologies Inc

Étudiants

Lemoine, Pascal, maîtrise, Université de Montréal
Macleod, Sherri, postdoctorat, Université de Montréal
Roy-Lachapelle, Audrey, maîtrise, Université de Montréal
Viglino, Liza, postdoctorat, Université de Montréal

Objectifs

Nos objectifs visaient deux aspects analytiques principaux : le premier était d'accélérer et d'améliorer la méthode traditionnelle d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette approche est basée sur trois stratégies; i) automatiser l'extraction sur phase solide (SPE) qui est normalement faite manuellement et qui est longue et requiert beaucoup de ressources humaines, ii) faire l'analyse en mode de chromatographie à haute pression, ce qui devrait accélérer le processus et réduire le temps de chromatographie par un facteur de 3 environ, iii) intégrer un maximum de cyanotoxines dans une seule analyse pour augmenter le nombre de toxines qui pourraient ainsi être intégrées aux programmes de surveillance et autres projets de recherche sur les cyanotoxines.

Le deuxième objectif était plus ambitieux et dans ce cas on tente de faire l'analyse des cyanotoxines en utilisant un mode d'ionisation novateur qui n'utilise pas la chromatographie liquide. Cette approche est basée sur l'utilisation de la désorption thermique induite par diode laser (LDTD) avec ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) couplée ici aussi à la spectrométrie de masse en tandem (LDTD-APCI-MS/MS). L'avantage d'une telle méthode est qu'elle permettrait de faire l'analyse en 10-15 sec, une amélioration phénoménale par rapport aux 15 minutes de la méthode usuelle en LC-MS/MS.

Un troisième objectif a été mis de côté, on visait la culture de souches de cyanobactéries pour produire nos propres standards de cyanotoxines, mais étant donné les ressources restreintes et que plusieurs standards sont redevenus disponibles commercialement, cet objectif n'était plus prioritaire.

Méthodologie et résultats

Projet en SPE-LC-MS/MS (responsables Liza Viglino→Sherri Macleod→Khadija Aboulfadl)

Objectif : mise au point d'une méthode analytique par préconcentration automatisée couplée à la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem (on-line SPE-LC-MS/MS) pour détecter et quantifier certaines cyanotoxines.

Toxines ciblées :

Deux molécules polaires: l'anatoxine-a et la cylindrospermopsine

Huit molécules semi et non polaires : la nodularine, et certaines toxines de la famille des microcystines (MC-RR, MC-LR, dm-MC, MC-YR, MC-LW, MC-LY, MC-LF).

Méthode expérimentale :

Notre premier objectif a été de reproduire sans trop de problèmes la méthode usuelle de LC-MS/MS en combinant les informations de nos partenaires (détails techniques fournis par Christian Deblois au CEAEQ et par Michael Quilliam au CNRC-Halifax).

Combiner la préconcentration et l'analyse des cyanotoxines polaires et non-polaires dans la même séquence chromatographique représente un grand défi analytique. L'automatisation de la préconcentration s'effectue grâce à un système de permutation de colonnes chromatographiques qui permet de faire les manipulations de la préconcentration par le système de chromatographie couplé au spectromètre de masse. Ce système de permutation est déjà utilisé avec succès dans le laboratoire pour la détection de composés organiques, notamment pour la détection de traces de médicaments dans les eaux usées et dans l'eau potable.

Deux systèmes de colonne on-line (cartouche et colonne de séparation) ont été testés et comparés afin de choisir la méthode la plus sensible pour toutes les molécules ciblées. Le premier système consistait à utiliser une colonne de charge et une colonne analytique C18 (HypersylGold, Thermo) et le deuxième système était constitué d'une colonne de charge polymérique (Strata-X, Phenomenex) et d'une colonne analytique C12 (RP-Fusion, Phenomenex).

Pour ce faire, différents paramètres ont été mesurés pour les deux systèmes de colonnes soient les courbes de calibration (0-2000 ng/L), les limites de détection, les effets de matrice et les recouvrements incluant la précision et la répétabilité. Tous ces tests ont été effectués dans un premier temps dans une matrice d'eau potable. D'après ces paramètres, le premier système (soit C18) a montré de meilleurs résultats essentiellement pour la famille des microcystines tandis que pour les molécules plus polaires, les deux systèmes démontrent des performances similaires. Pour les microcystines, le système basé sur les colonnes C18 permet d'atteindre de meilleures limites de détection, meilleures linéarités pour la courbe de calibration et une meilleure répétabilité, c'est pourquoi ce système a donc été choisi pour la suite du développement. Cette méthode de détection multi-toxines a été validée dans l'eau potable ainsi que dans des bouillons de cultures de cyanobactéries.

Lors de nos tests de validation, nous avons aussi remarqué que les cyanotoxines pouvaient être retenues par certains types de filtres. Donc on a porté une attention particulière aux méthodes de traitement d'échantillons pour s'assurer qu'une filtration inopportune ne viendrait pas diminuer ou éliminer des cyanotoxines (si on filtre un échantillon avec une membrane d'un matériau qui absorbe les cyanotoxines juste avant l'analyse, les résultats de l'analyse seront faussés indiquant une concentration plus basse que la réalité). Dans ce cas, certains types de filtre fonctionnaient mieux que d'autres mais l'idéal pour notre système (SPE-LC-MS/MS) était de ne pas filtrer au préalable l'échantillon et d'utiliser un préfiltre installé à même le système chromatographique.

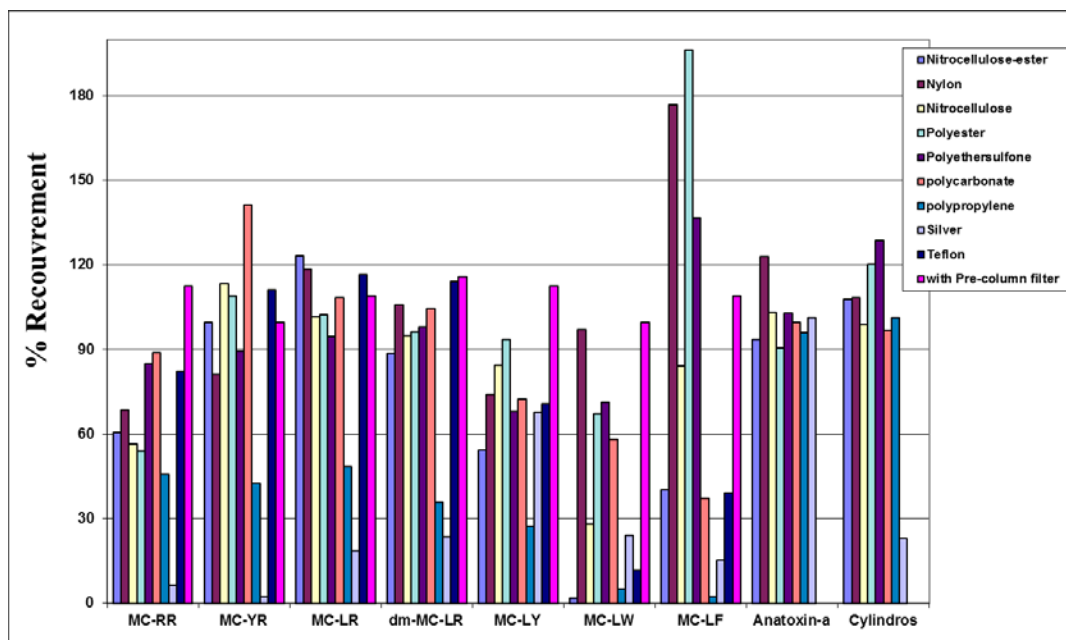


Figure 1 - Rétention des cyanotoxines par les membranes de filtration (% recouvrement).

Une problématique supplémentaire s'impose concernant l'anatoxine. Un acide aminé, la phénylalanine, peut représenter une interférence pour la détection de l'anatoxine en raison de leur masse similaire. Il a été possible de contourner cette problématique grâce à la chromatographie liquide qui permet une séparation suffisante des deux composés.

Nous avons obtenu une pompe de chromatographie haute pression qui nous a permis de transférer la méthode SPE-LC-MS/MS en mode haute pression.

On voulait comparer certaines analyses en simultanées entre la méthode analytique utilisée à l'Université de Montréal et celle en place au CEAEQ, à Québec. Des travaux de cette nature ont été effectués indirectement pour comparer les analyses dans l'eau d'une station d'eau potable fortement contaminée. La méthode utilisée et certains résultats d'analyse sont présentés dans un papier récemment publié dans Water Research (Zamyadi et al., 2012). Par contre, les délais excessifs d'entreposage entre les deux séries d'analyses suggèrent qu'une dégradation a eu lieu entre les deux analyses (les données du CEAEQ sont plus basses et mesurées plus tard).

Pour la sous-section du projet ciblant l'extraction des toxines dans la chair de poisson, le CEAEQ nous a indiqué avoir effectué l'ensemble des études requises et cet aspect ne semblait plus utile pour leurs besoins.

Projet en LDTD-APCI-MS/MS (responsables Pascal Lemoine et Audrey Roy-Lachapelle)

Nous avons analysé un représentant de chaque classe de cyanotoxines avec la source LDTD-APCI-MS/MS, de façon à évaluer la stabilité du composé et son potentiel de vaporisation (la désorption thermique nécessite une molécule volatile et suffisamment thermostable pour garder son intégrité sous l'influence de la chaleur). Parmi les cinq classes de cyanotoxines testées avec la source LDTD-MS/MS, seule l'anatoxine-a se vaporise intacte sous l'effet de la chaleur (et s'ionise, tel que confirmé par infusion directe avec APCI-MS/MS).

Nous avons ensuite effectué l'optimisation des paramètres instrumentaux LDTD-MS/MS pour maximiser le signal obtenu de l'anatoxine-a. La puissance laser et les fragments produits par la spectrométrie de masse en tandem génère un signal intense avec une variabilité inférieure à 15 %. À partir de ces paramètres, nous avons bâti une courbe d'étalonnage du signal de l'anatoxine-a, en fonction de sa concentration, dans une matrice pure. Les premières courbes d'étalonnage dans une matrice pure montre une proportionnalité du signal > 0.99 , entre $2.5 - 100 \mu\text{g l}^{-1}$. La limite de détection instrumentale étant de $1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Dans ce cas, il y a aussi une interférence isobarique de l'acide aminé phénylalanine (165.09 g/mol) sur l'anatoxine-a (165.13 g/mol) lors de la détection par spectrométrie de masse. De plus, les fragments de l'anatoxine-a choisis pour effectuer la détection/quantification ainsi que la confirmation du composé ($166.1 \rightarrow 149.1$ et $166.1 \rightarrow 131.1$) peuvent être produits par la phénylalanine. Pour enrayer cette interférence, l'optimisation du patron de puissance laser, jumelée à l'optimisation de l'énergie de collision d'obtention des fragments, génère des conditions qui favorisent l'analyse de l'anatoxine-a au détriment de la phénylalanine. En effet, avec la puissance laser modérée utilisée, la phénylalanine se volatilise très peu et combinée à cela, le choix des énergies de collision produit des fragments chez la phénylalanine dont l'intensité des courbes d'étalonnage avec de l'eau de culture de cyanobactéries selon la méthode déterminée (calibration par ajouts dosés) et nous avons ainsi évalué les limites de détection/quantification, les effets de matrice et les limites de détection/quantification.

Un des réviseurs pour la soumission initiale du papier illustrant cette méthode demandait d'effectuer la validation de la méthode avec des échantillons de blooms d'algues réels pour confirmer l'efficacité pour la détection de l'anatoxine-a. On espérait obtenir de tels échantillons durant l'été 2011 pour pouvoir finaliser ce papier mais on n'a pas réussi à acquérir un échantillon naturel d'eau positif en anatoxine-a (la validation actuellement présentée dans le papier utilise des blooms d'algues dopés). Ce papier a été resoumis à Toxicon, un autre journal dédié aux toxines. Puisque la méthode est bonne et validée, on ne peut simplement pas répondre à cette demande précédente du réviseur (qui n'est pas déraisonnable mais ce n'est pas parce qu'on ne voulait pas!) mais le papier devrait pouvoir être tout de même publié.

Il est très prometteur que l'approche par LDTD-APCI-MS/MS puisse fonctionner pour l'analyse de la somme des microcystines par l'intermédiaire de l'analyse du fragment MMPB. Cette méthode permettrait donc une analyse commune à la somme des microcystines et pas une analyse individuelle des différentes variantes, de telles données seraient néanmoins très utiles pour le suivi environnemental. La poursuite de ces travaux est présentement financée par la subvention de fonctionnement de recherche du CSRNG du Pr. Sauvé.

Les travaux pour cette approche ultrarapide ont commencé au cours de l'été 2010. Les travaux de doctorat d'Audrey Roy-Lachapelle visent principalement l'analyse ultrarapide de la famille des microcystines par LDTD. Nous avons r uss  à obtenir un standard de MMPB (erythro-2-méthyl-3-méthoxy-4-ph nylbutyric), le sous-produit provenant des microcystines et qui pourrait être généré par dérivatisation ou oxydation control e.

Les microcystines totales sont donc déterminées à l'aide de leur fragment MMPB par LDTD-APCI-MSMS. L'ion sélectionné, en mode négatif, est de m/z 207 et les deux fragments utilisés pour la quantification sont de m/z 131 et m/z 175. La littérature mentionne qu'il est nécessaire de d rivatiser le MMPB pour obtenir un composé estérifié plus volatil qui peut ensuite être analysé par un système de chromatographie gazeuse (Kaya and Sano, 1999). Dans le cas présent, aucune dérivatisation du MMPB n'est nécessaire pour le système de LDTD-APCI-MS/MS. Pour le moment, une limite de détection de 1 µg/L est obtenue avec le MMPB en solvant pur, dans ce cas-ci, de l'acétate d'éthyle.

Pour obtenir le fragment MMPB à partir des microcystines, une oxydation est nécessaire. L'approche étudiée jusqu'à maintenant est l'utilisation du permanganate de potassium comme agent oxydant. Plusieurs approches alternatives seront aussi évaluées pour effectuer l'oxydation afin d'obtenir une bonne réponse du MMPB en LDTD-APCI-MSMS.

Tout d'abord, une oxydation en ajoutant directement du KMNO₄ aux microcystines dans les puits d'analyse des plaques LDTD a été faite. Ensuite, une oxydation des microcystines avec le KMNO₄ seul à temps réactionnels différents a été faite. Une oxydation à l'aide du couple KMNO₄ et périodate de sodium à divers temps réactionnels a été testé ainsi que l'extraction du MMPB en milieu réactionnel avec divers solvants (méthanol, hexane, acétate d'éthyle).  ventuellement, d'autres oxydants, tels : le chlore, le dioxyde de chlore et l'ozone, seront étudiés afin de voir si la performance de l'oxydation des microcystines peut être améliorée. Nos résultats préliminaires démontrent une linéarité variant de 10 à 500 µg MMPB /L et une limite de détection autour de 1 µg MMPB /L.

Retombées escomptées

Les principales retombées escomptées sont une facilitation et une accélération de l'analyse d'une série de cyanotoxines par SPE-LC-MS/MS, telle que démontrées dans un papier récent (Zamyadi et al., 2012).

Publications dans des journaux scientifiques

Lemoine P, Tremblay P, Prévost M, Sollic M, Sauvé S. "Ultra-Fast Analysis of Anatoxin-A Using Laser Diode Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Validation and Resolution from Phenylalanine." Soumis à *Toxicon* (Janvier 2012)

Un autre papier illustre la méthode analytique développée par le Dr. Macleod (post-doc) et appliquée à l'analyse des cyanotoxines présentes dans une usine d'eau potable au Québec :

Zamyadi A, Macleod SL, Fan Y, McQuaid N, Dorner D, Sauvé S, Prévost M. "Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: a monitoring and treatment challenge" *Water Research*

Un papier est en rédaction pour décrire en détails la méthode SPE-LC-MS/MS pour l'analyse de multiples cyanotoxines.

Communications orales

Roy-Lachapelle, A, Sauvé S. Analysis of total microcystin using Laser Diode Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry (LDTD-APCI-MS/MS). Soumis pour une affiche: 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, May 20th-24th 2012, Vancouver, BC, Canada.

Sauvé S. "Laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization: a novel sample introduction method capable of analyte differentiation without the use of traditional chromatographic separation" 7th Annual LC/MS/MS workshop on Environmental Applications and Food Safety. 13-14 juin 2011, Buffalo, NY.

Viglino L, Lemoine P, Prévost M, Sauvé S. 2009. Fully Automated Quantification of Different Classes of Cyanobacterial Toxins by Online SPE-LC-ESI-MS/MS. 57th ASMS Conference, May 31st-June 4th 2009, Philadelphia, PA (affiche).

Sauvé S. 2011. Analyses ultrarapides de contaminants émergents dans l'environnement. Séminaire présenté à l'université de Bordeaux le 7 décembre 2011

Sauvé S. Environmental Monitoring of Pharmaceuticals. 12 Juillet 2011. Université de Florence, Florence Italie.

Sauvé S. "Laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization: a novel sample introduction method capable of analyte differentiation without the use of traditional chromatographic separation" 7th Annual LC/MS/MS workshop on Environmental Applications and Food Safety. 13-14 juin 2011, Buffalo, NY.

Sauvé S. Environmental Monitoring of Pharmaceuticals. 23 Mars 2011. Florida International University, Miami, FL.

References

- Kaya, K., Sano, T., 1999. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Anal. Chim. Acta* 386, 107-112.
- Zamyadi, A., Macleod, S., Fan, Y., Natasha McQuaid, N., Dorner, S., Sauvé, S., Prévost, M., 2012. Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: a monitoring and treatment challenge. *Wat. Res.* in press.