

Mise en place de l'analyse par LC/ MSMS des Métanéphrines

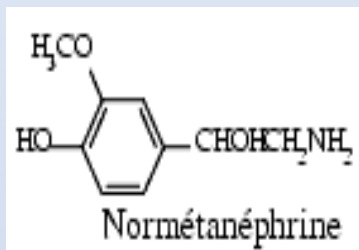
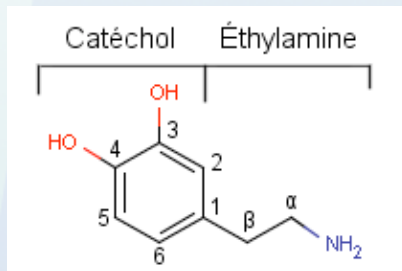
C. Le Goff
CHIMIE MÉDICALE
CHU de Liège
Belgique

- **Un biologiste: connaissance théorique datant des études de pharmacie**
 - **Un ingénieur industriel: connaissance théorique datant des études d'ingénieur MAIS maîtrise de l'HPLC**
 - **Un technicien de laboratoire: connaissance en GCMS et en HPLC**
- pas de connaissances de la pratique en LC-MS/MS**

TQ 5500

- Logiciel
- Support scientifique
- Service après-vente
- Sensibilité
- Spécificité

- Phéochromocytome et neuroblastome
- Les cathécholamines



Métanéphrines

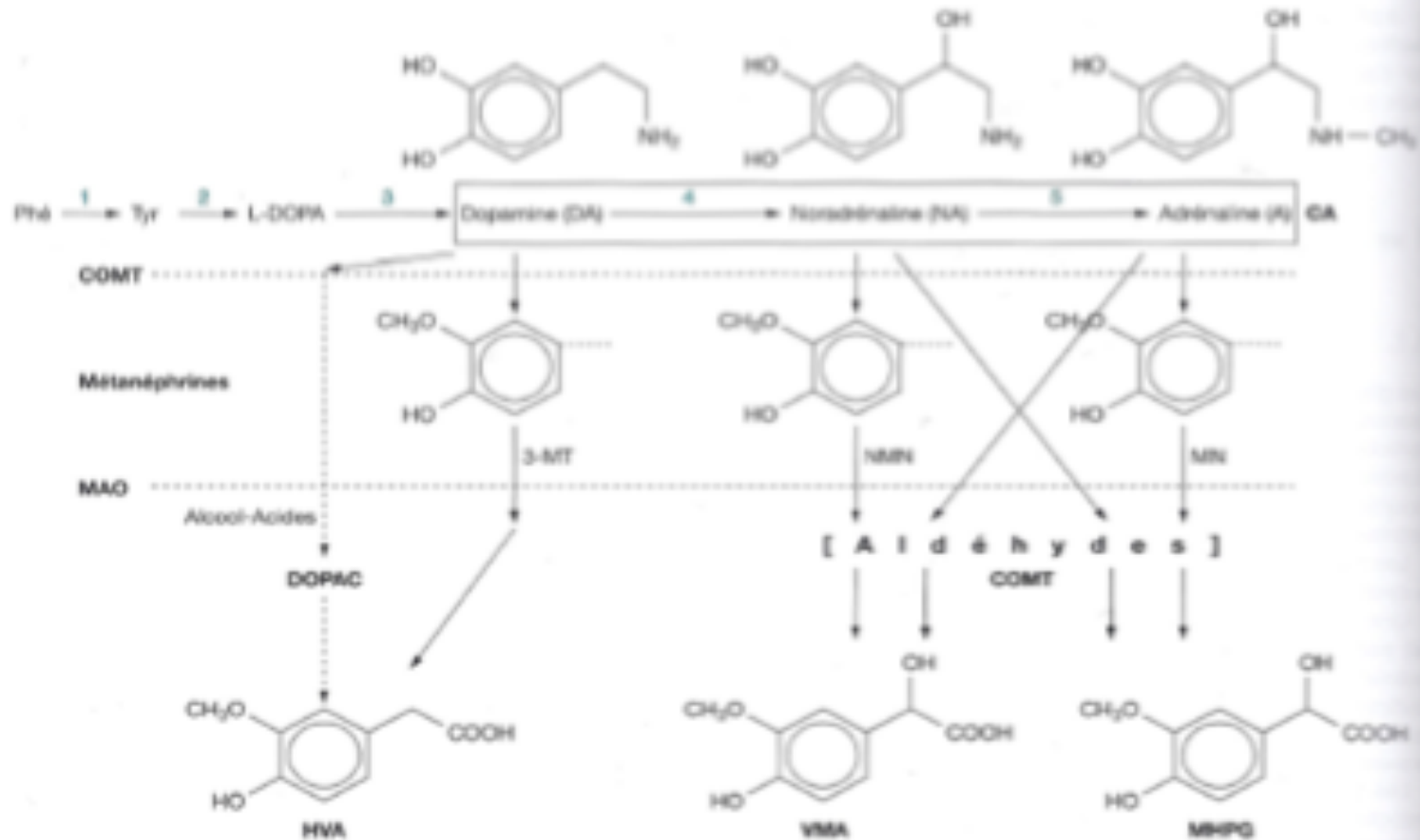


Figure 1 ■ Métabolisme des catécholamines.

(1) : Phénylalanine Hydroxylase, (2) : Tyrosine Hydroxylase, (3) : DOPA décarboxylase, (4) : Dopamine β-Hydroxylase, (5) : Phényléthanolamine-N-méthyltransférase.

- Fluorimétrie(EDA): manque de spécificité et de sensibilité
- Radio-enzymologie: spécificité et sensibilité satisfaisante ms durée +++ (+radioéléments)
- HPLC: rapide!!!???, sensible et spécifique

Préparation des échantillons

- Hydrolyse
- Extraction sur colonne échangeuse de cations
- Extraction liquide-liquide

Séparation chromatographique

- 70 min/ patient sur l'HPLC
- Détecteur électrochimique

Matériel

- Colonne LiChroCART C18
- Solvants (Acétate de sodium, acide citrique, EDTA et acide sulfonique)

iMethod™ test kit

- method documentation
- MS and LC method files
- processing method files and report templates
- sample preparation
- instrument parameters (to accelerate the adoption of this method for routine testing)

Nouvelle méthode (iMethod™- METHANEPHRINE)

LC

- System controller CBM-20A
- 2 Isocratic pumps LC-20AD (with semi-micro 50 µL mixer)
- Autosampler SIL-20AC
- Column oven CTO-20AC

Colonne:

- **Colonne C18 pour molécules apolaires:** Phenomenex Analytical Column, 2.6 µm, Kinetex HILIC Column, 50 x 2.1 mm

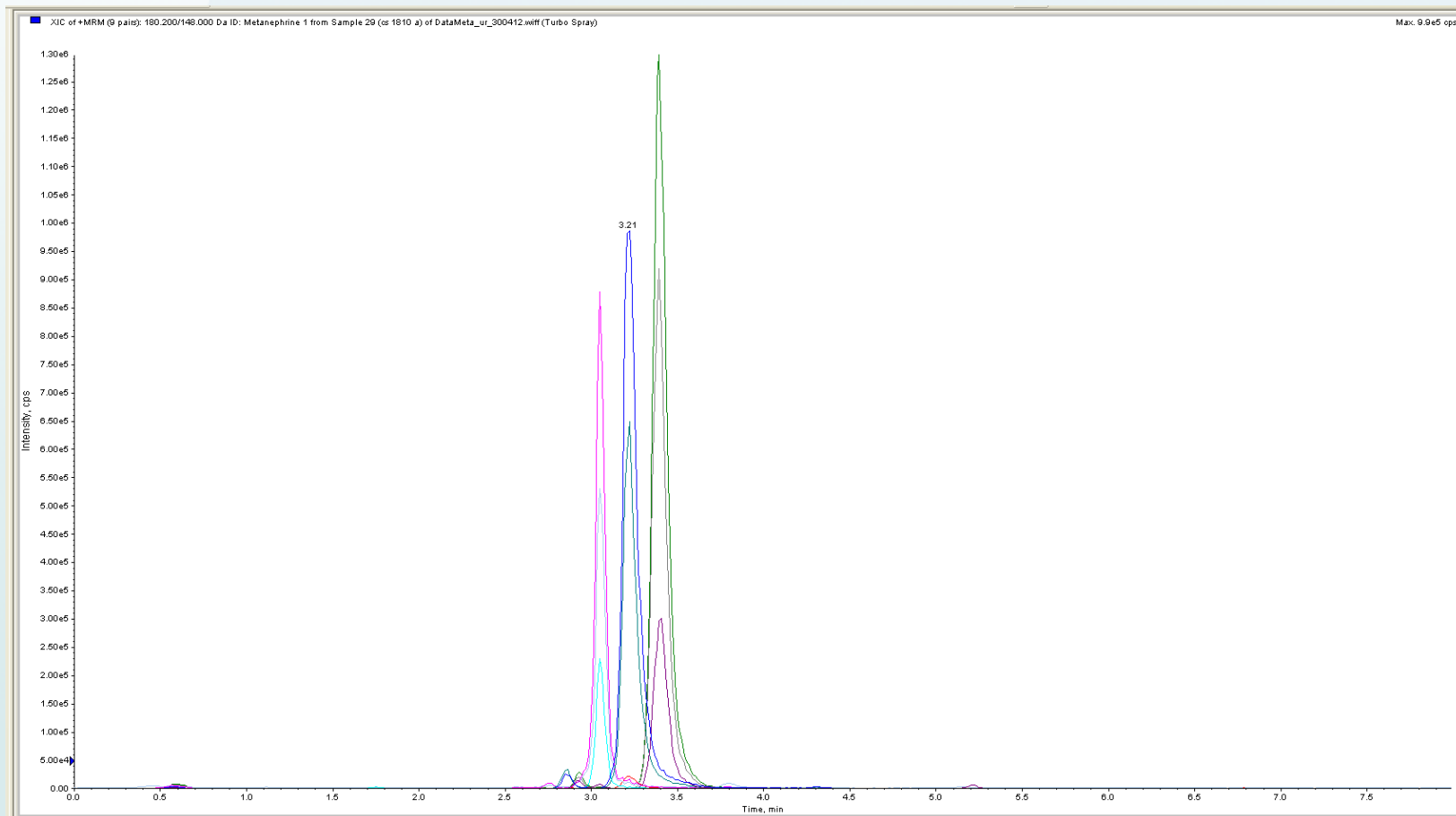
Solvants:

- Mobile Phase A (Ammonium Formate)
- Mobile Phase B (Acetonitrile)
- Needle Rinse (95:5 (v:v) Acetonitrile: Water)

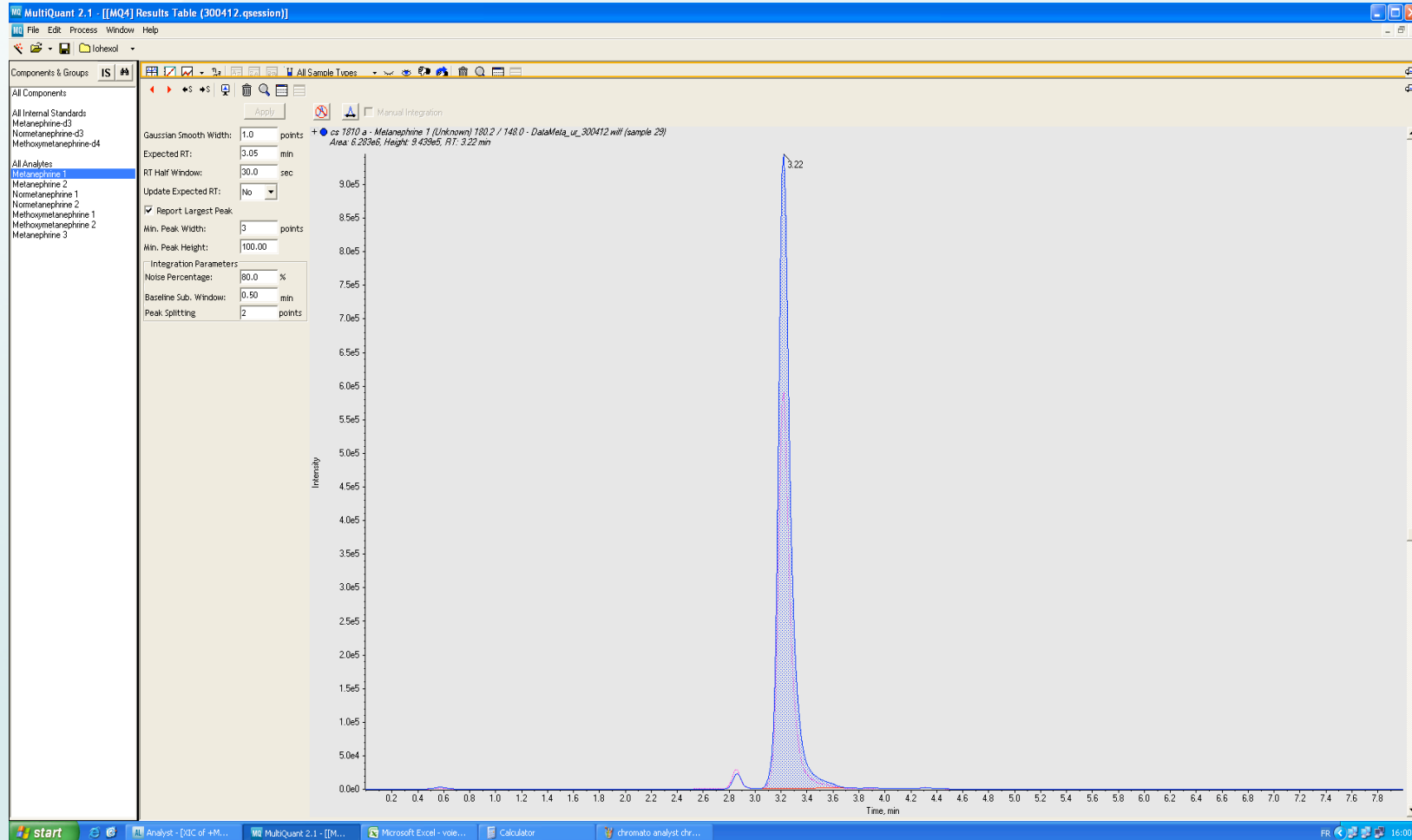
Nouvelle méthode (iMethod™- METHANEPHRINE)

- 1. Measure a volume of urine sample into a microcentrifuge tube.
- 2. Add x μ L of combined internal standard spiking solution to each tube and mix using a vortex mixer for approximately 5 to 10 seconds.
- 3. Add x μ L of methanol to each double blank tube and mix using a vortex mixer for approximately 5 to 10 seconds.
- 4. Add x μ L of water to each tube and mix using a vortex mixer for approximately 5 to 10 seconds.
- 5. Condition the SPE phase (cartridge or 96 well plate) with x mL of SPE Wash solution.
- 6. Apply vacuum or positive pressure.
- 7. Condition the SPE phase (cartridge or 96 well plate) with x mL of water.
- 8. Apply vacuum or positive pressure.
- 9. Add sample and apply vacuum or positive pressure.
- 10. Wash the SPE phase (cartridge or 96 well plate) with x mL of water.
- 11. Add sample and apply vacuum or positive pressure.
- 12. Wash the SPE phase (cartridge or 96 well plate) with 2 x 1 mL of SPE Wash solution.
- 13. Apply vacuum or positive pressure for each 1 mL addition.
- 14. Replace tubes or 96 well plate in preparation for elution.
- 15. Elute from the SPE phase (cartridge or 96 well plate) with 3 x 0.35 mL of SPE Elution

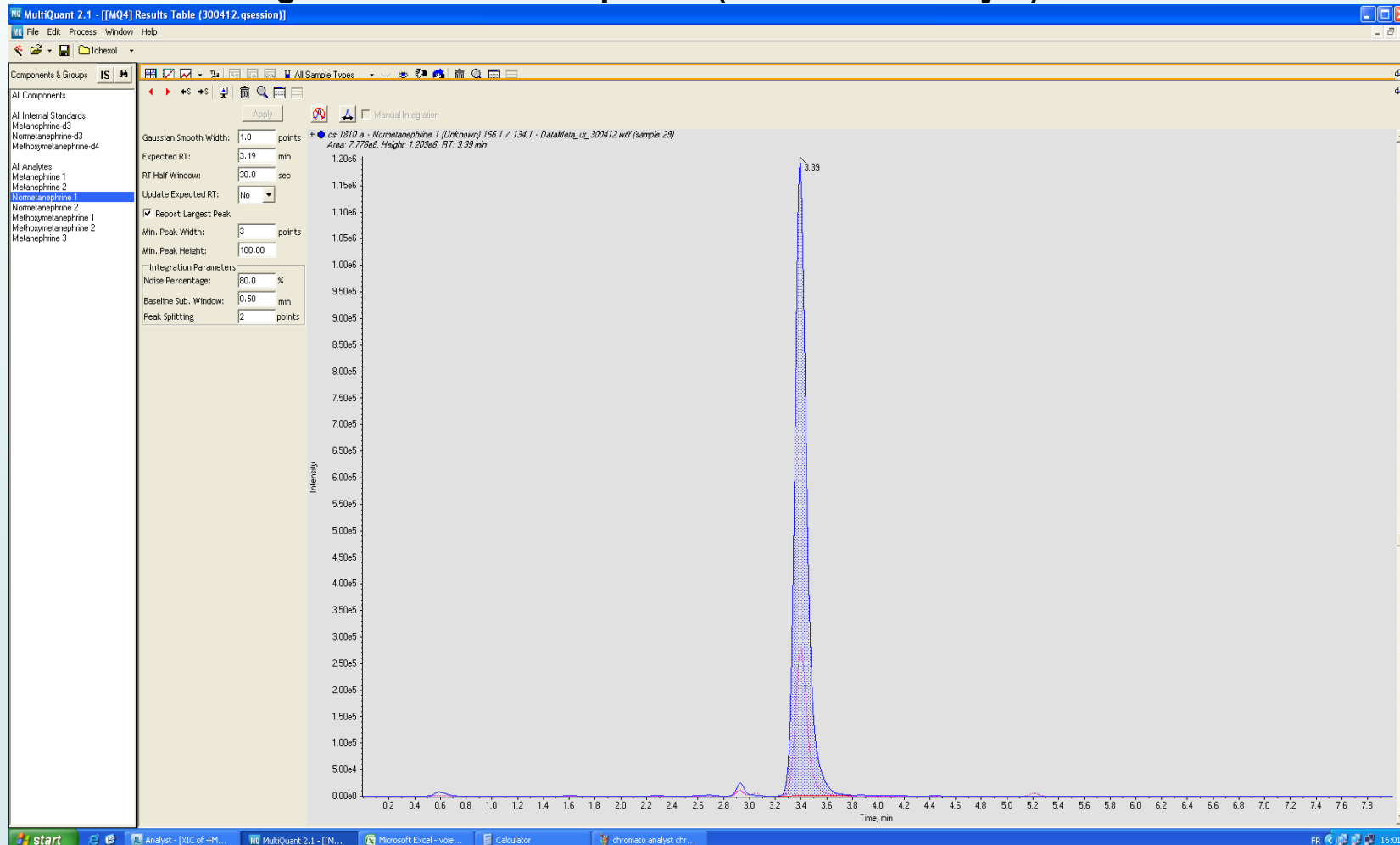
- 1 chromatogramme LC-MS/MS



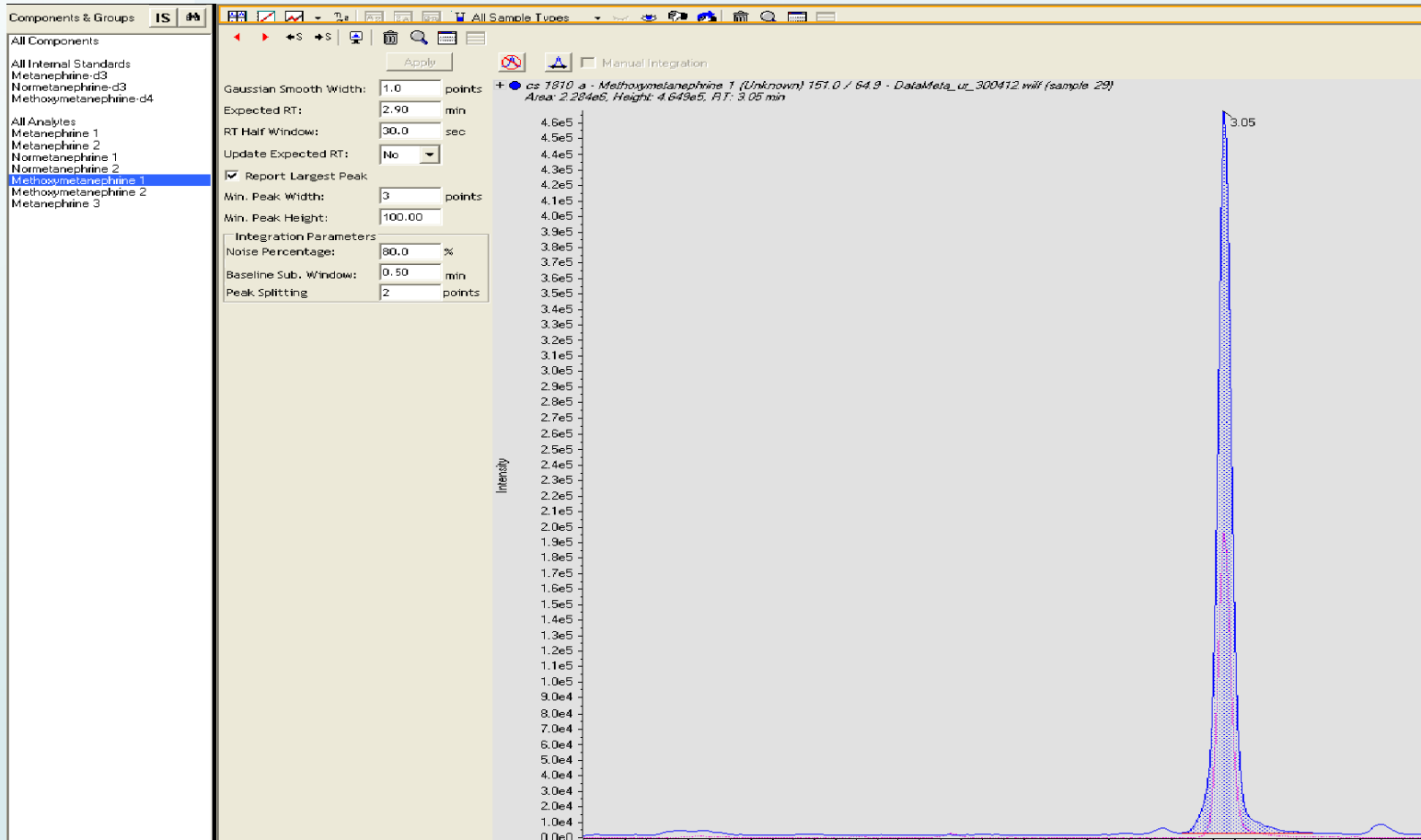
- 1 chromatogramme Métanéphrine (LCMS/MS-Analyst)



- 1 chromatogramme Normétanéphrine (LCMS/MS- Analyst)



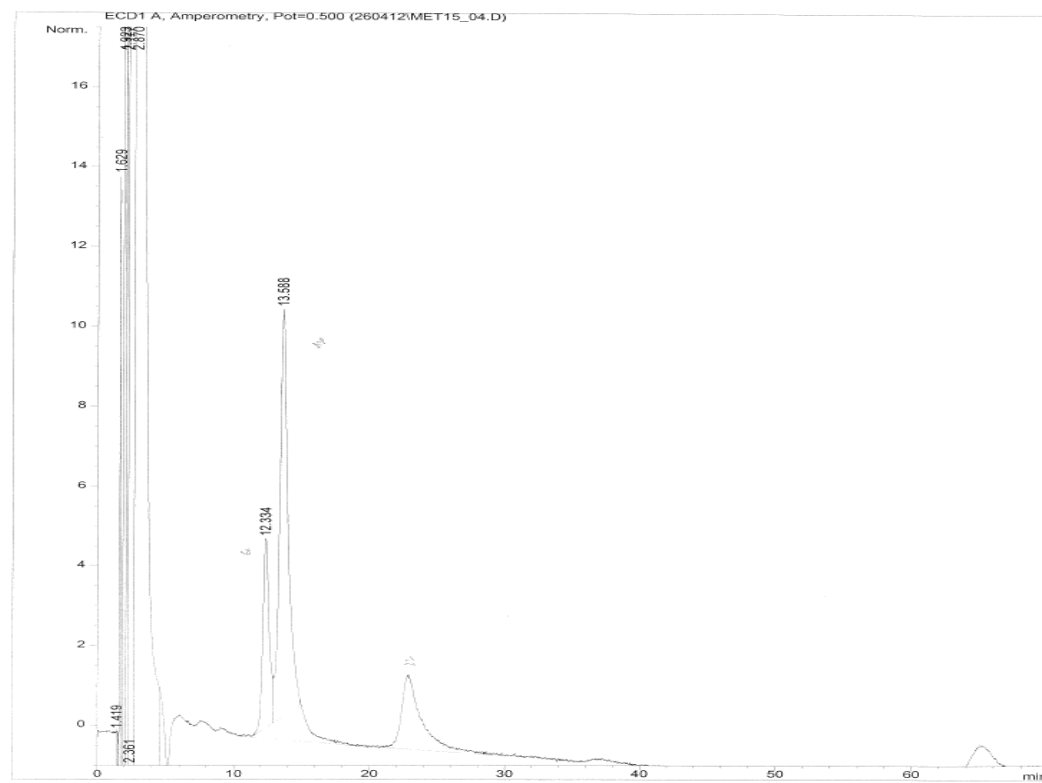
- 1 chromatogramme méthoxymétanéphrine (LCMS/MS-Analyst)



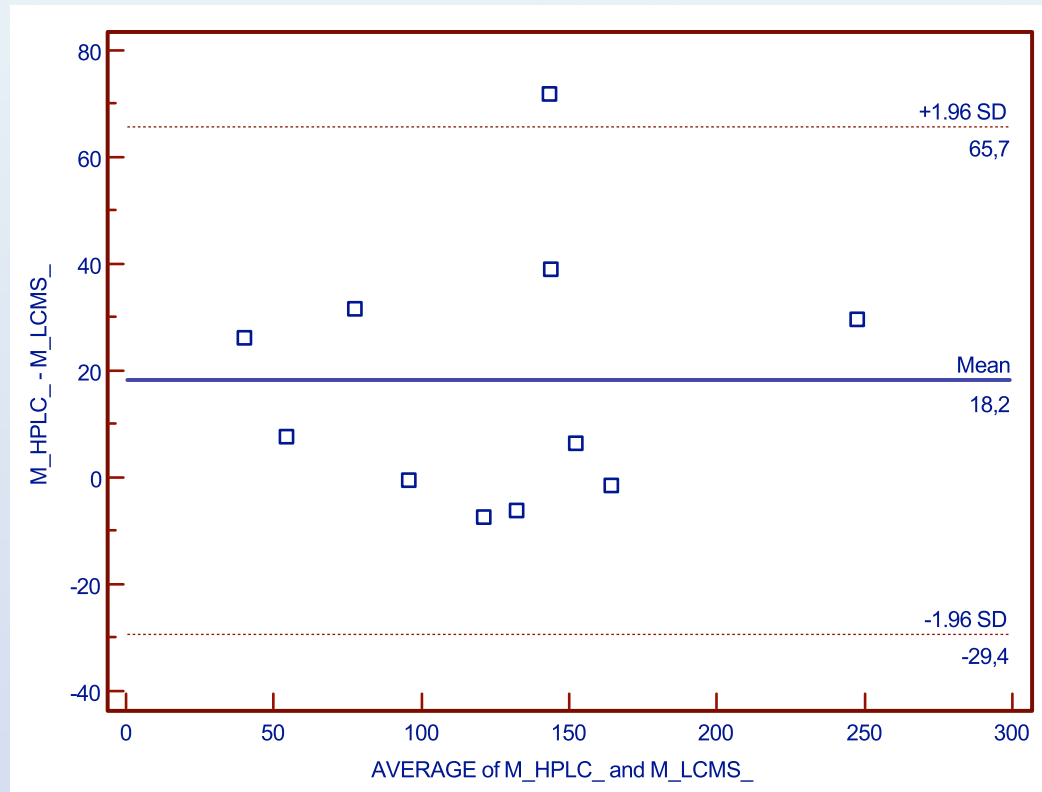
- 1 chromatogramme méthanéphrine et norméthanéphrine en HPLC

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\260412\MET15_04.D Sample Name: CS 1810

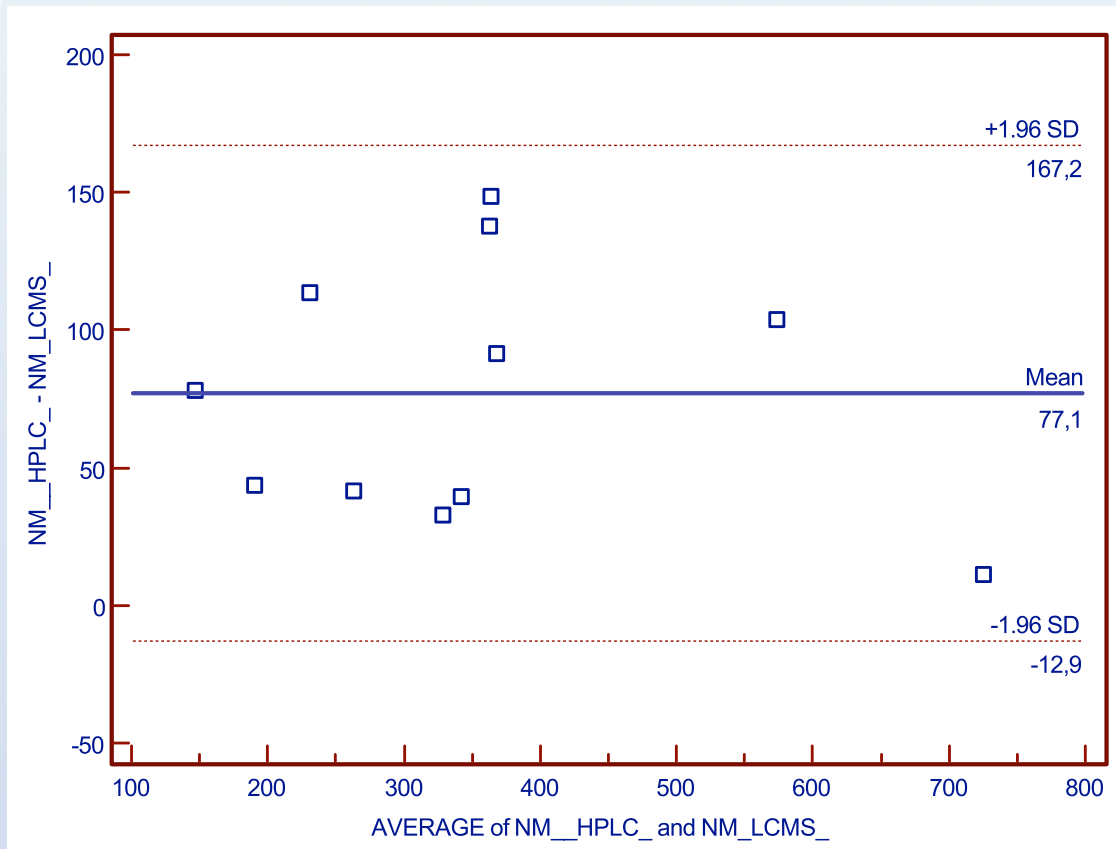
Injection Date : 4/26/2012 6:20:20 PM Seq. Line : 3
Sample Name : CS 1810 Vial : 41
Acq. Operator : yc Inj : 1
Inj Volume : 40 µl
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\META15YC.S
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\META.M
Last changed : 10/14/2011 1:54:58 PM by Yc



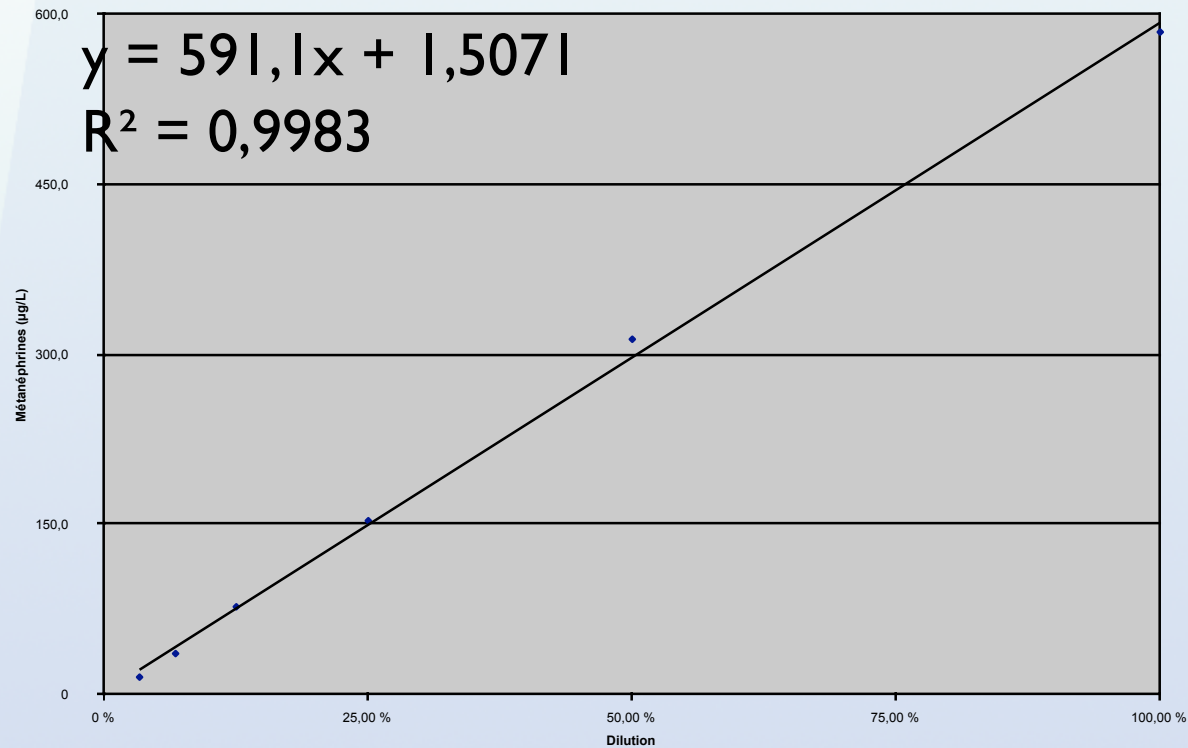
- **Corrélation HPLC avec la LCMS/MS (Métanéphrines) → Bland-Altman
N=11**



- **Corrélation HPLC avec la LCMS/MS (Normétanéphrines) → Bland-Altman
N=11**

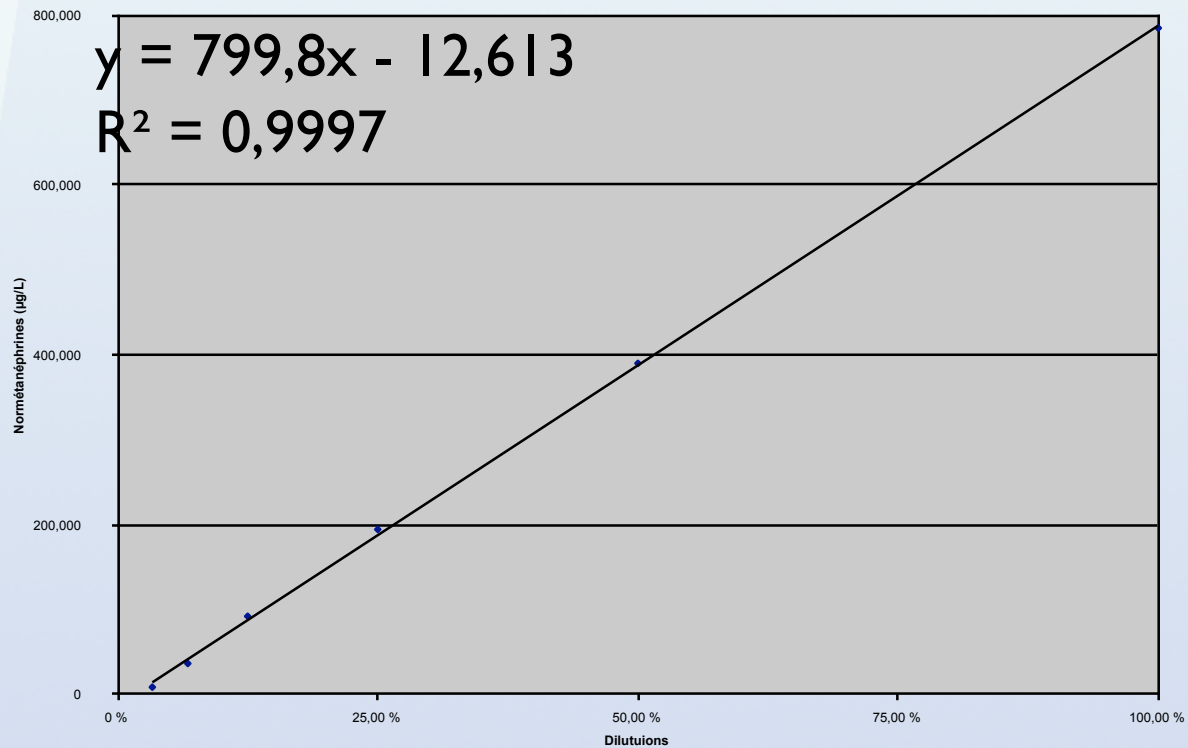


- Linéarité (méthanéphrines)



Recovery = 103.5% (SD=4.3%)
Dilution= max 8X

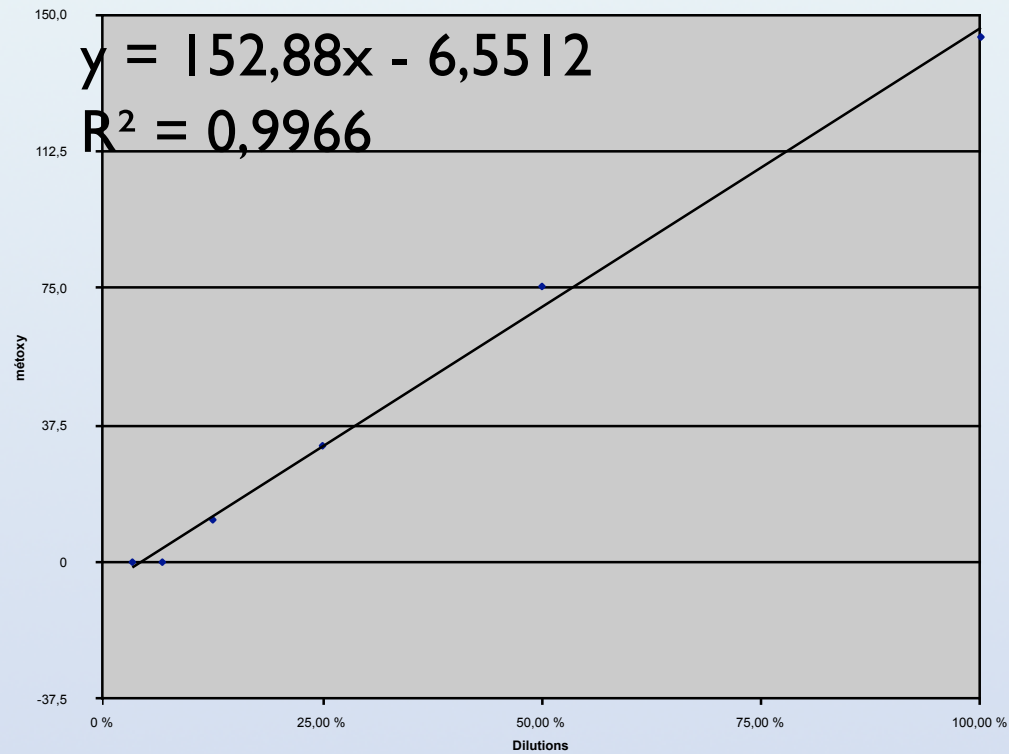
- **Linéarité (normétanéphrines)**



Recovery =97.4% (SD=3.1%)

Dilution= max 8 X

- Linéarité (métoxy)



Recovery = 103.5% (SD=4.3%)
Dilution= max 2X

Valeurs attendues des contrôles chromsystem en HPLC (Contrôle commercial)

- **Metanephrine: 346 (276-415) µg/L**
- **Normetanephrine: 986(789-1184) µg/L**
- **3-Methoxytyramine:330(248-413) µg/L**

Valeurs obtenues avec l'HPLC

- **Metanephrine: 371 (±18.47)µg/L**
- **Normetanephrine: 1117.76 (±58.85)µg/L**

Valeurs obtenues avec la LCMSMS

- **Metanephrine: 355 (±3.98) µg/L**

Valeurs attendues des contrôles Externes (Probioqual)

- Metanephrine: 114 µg/L
- Normetanephrine: 224 µg/L

Valeurs obtenues avec l'HPLC

- Metanephrine: 108 µg/L
- Normetanephrine: 228 µg/L

Valeurs obtenues avec la LCMSMS

- Metanephrine: 108 µg/L
- Normetanephrine: 198 µg/L

- **Gain de temps:**
 - **Préparation de l'échantillon**
 - 8 h → 4 h
 - **Analyse**
 - 70 min/échantillon → 8 min/échantillon
- ➔ **Temps dégagé pour d'autres développements**
- **Aide d'ABSCIEX pour la mise en route**

- **En 3 mois: totalement opérationnel et autonome**
- **Instrument robuste et très sensible**
- **Entretien très simple**
- **Service après-vente très satisfaisant (disponibilité++
+)**

















































