

Développement de méthodes rapides pour l'analyse des cyanotoxines

**Sébastien Sauvé, Michèle
Prévost, Pascal Lemoine, Liza
Viglino, Audrey Roy-Lachapelle,
Arash Zamyadi et Sherri
Macleod**

Département de chimie

sebastien.sauve@umontreal.ca

Collaborateurs

Michèle Prévost, École Polytechnique

Christian Gagnon, Environnement Canada

Jonathan Beck , ThermoFisher

Christian Deblois, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs

Pierre Picard, Phytronix Technologies Inc

Objectifs

- Accès aux standards
- Méthode SPE-LC-MS/MS multi-toxines
- Méthode(s) LD TD-APCI-MS/MS
 - Anatoxine
 - Microcystines

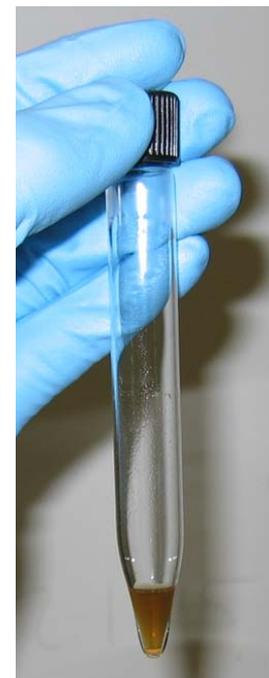
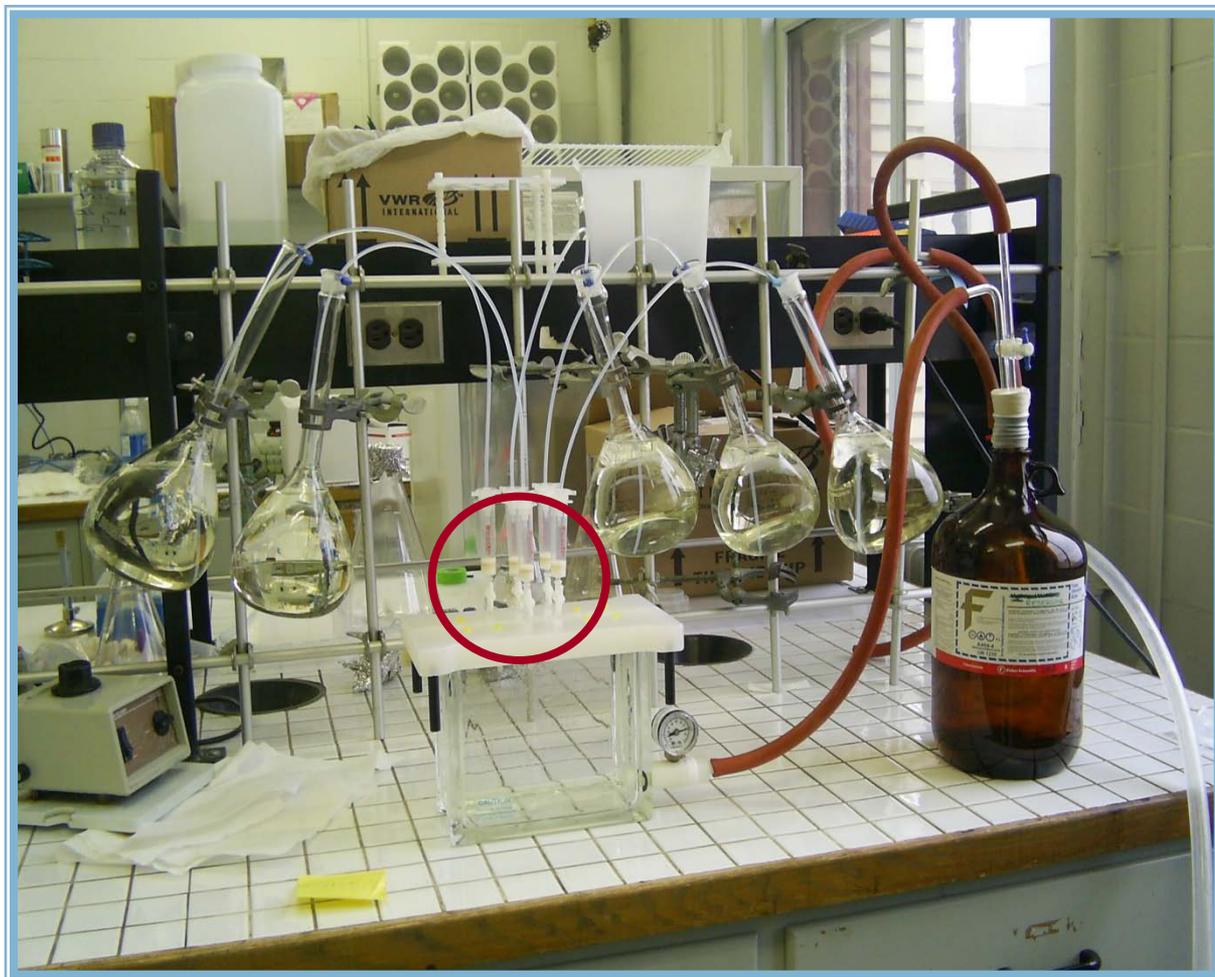
Accès aux standards

- Difficultés pour l'obtention de standards
- Évalué la possibilité de produire nous-même certaines toxines
- Réussi à acquérir les standards qu'on ciblait
- On a donc focalisé nos efforts et ressources vers les autres objectifs
- Ce serait possible de cibler certaines toxines encore manquantes mais ça représente des efforts significatifs
- Certains travaux avec Poly comme « source »

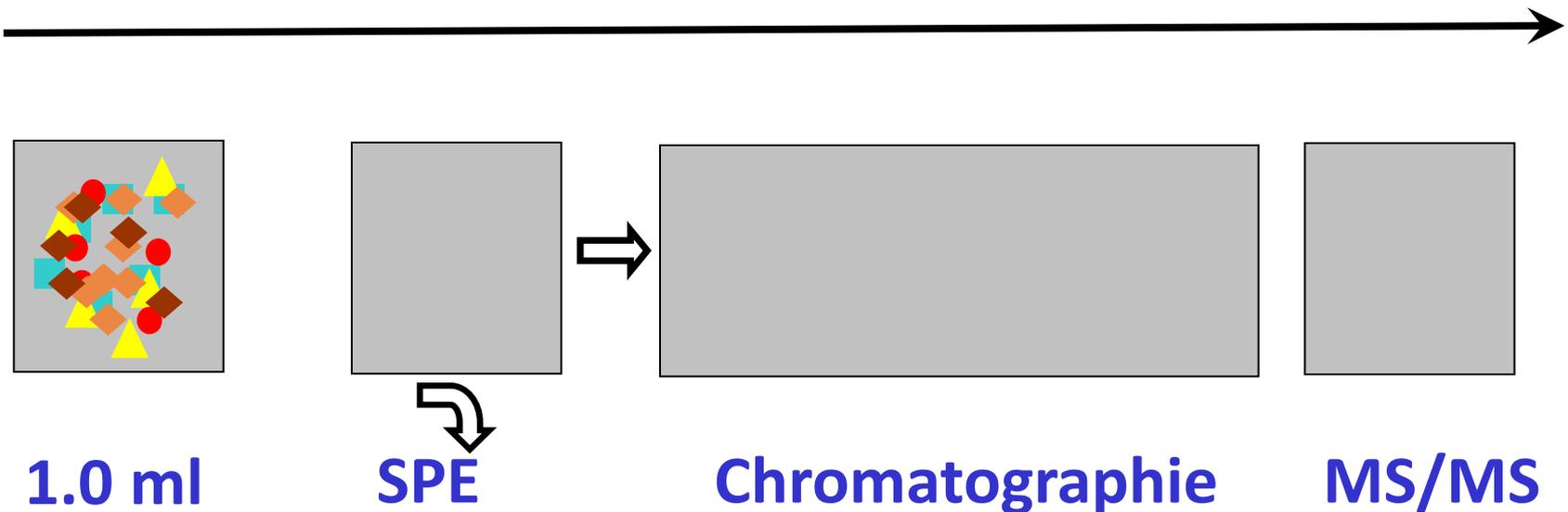


Méthode SPE-LC- MS/MS Multi-toxines en haute pression

SPE: Enrichissement (solid phase extraction)



Extraction SPE automatique (Online SPE)



1.0 ml

SPE

Chromatographie

MS/MS

Déchets

La totalité des analytes
dans le 1.0 ml sera injectée
dans le détecteur MS

LC-MS/MS



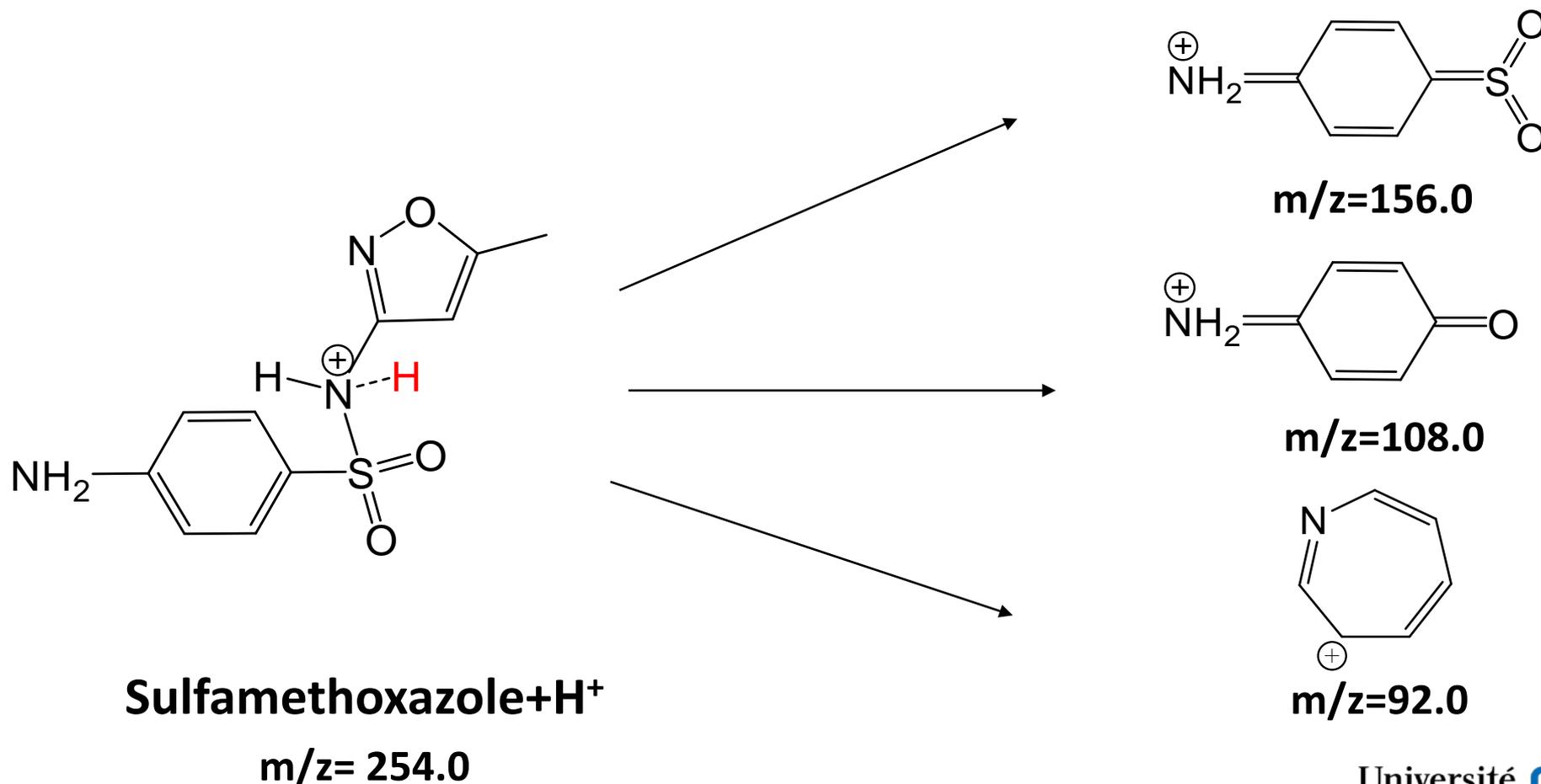
Détection:
**Spectrométrie de
masse en tandem**

(mode de suivi
ciblé - *selected
reaction monitoring
SRM*)

ThermoElectron TSQ Quantum EQuan
MAX System

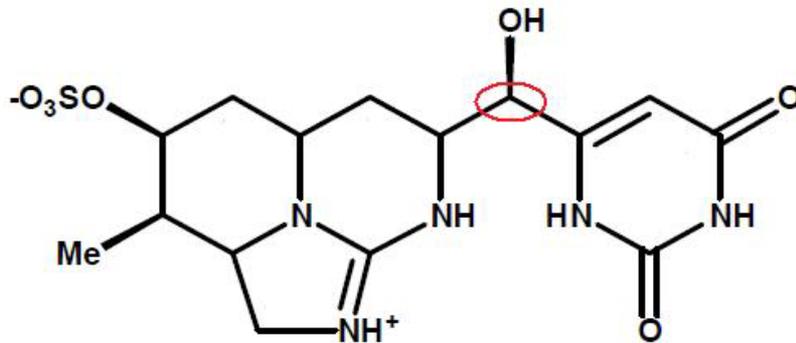
Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

Argon-induced Fragmentation

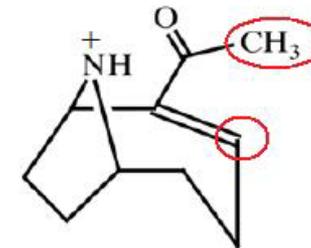


Cyanotoxines par LC-MS/MS

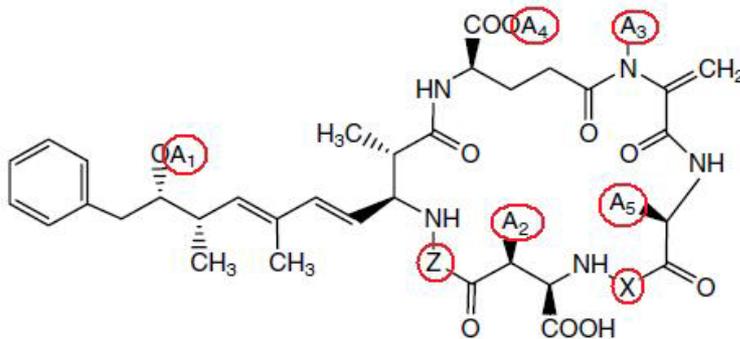
Défi analytique à relever: développer une méthode d'analyse simultanée de différentes classes de cyanotoxines.



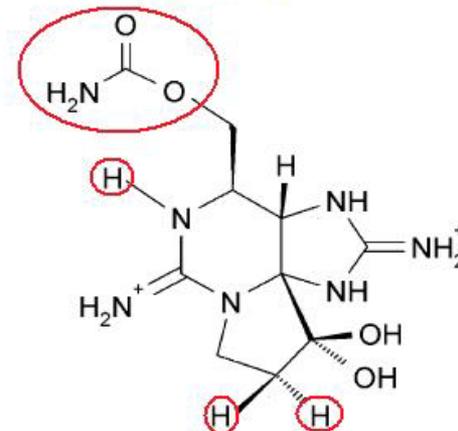
Cylindrospermopsine



Anatoxine-a



Squelette de microcystine



Saxitoxine

Composés ciblés

	Compound	pKa	Molecular Weight (g mol⁻¹)
	Cylindrospermopsin	8.8	415
	Anatoxin-a	9.4	165
	Phenylalanine (interferent)	1.83 9.13	165
	Nodularin		825
Seven microcystin	M-RR	3.5	1038
	M-YR	3.5	1045
	M-LR	3.5	995
	Dm-LR		981
	M-LY		1002
	M-LW		1025
	M-LF		986

Défis analytiques

Analyser plus rapidement!

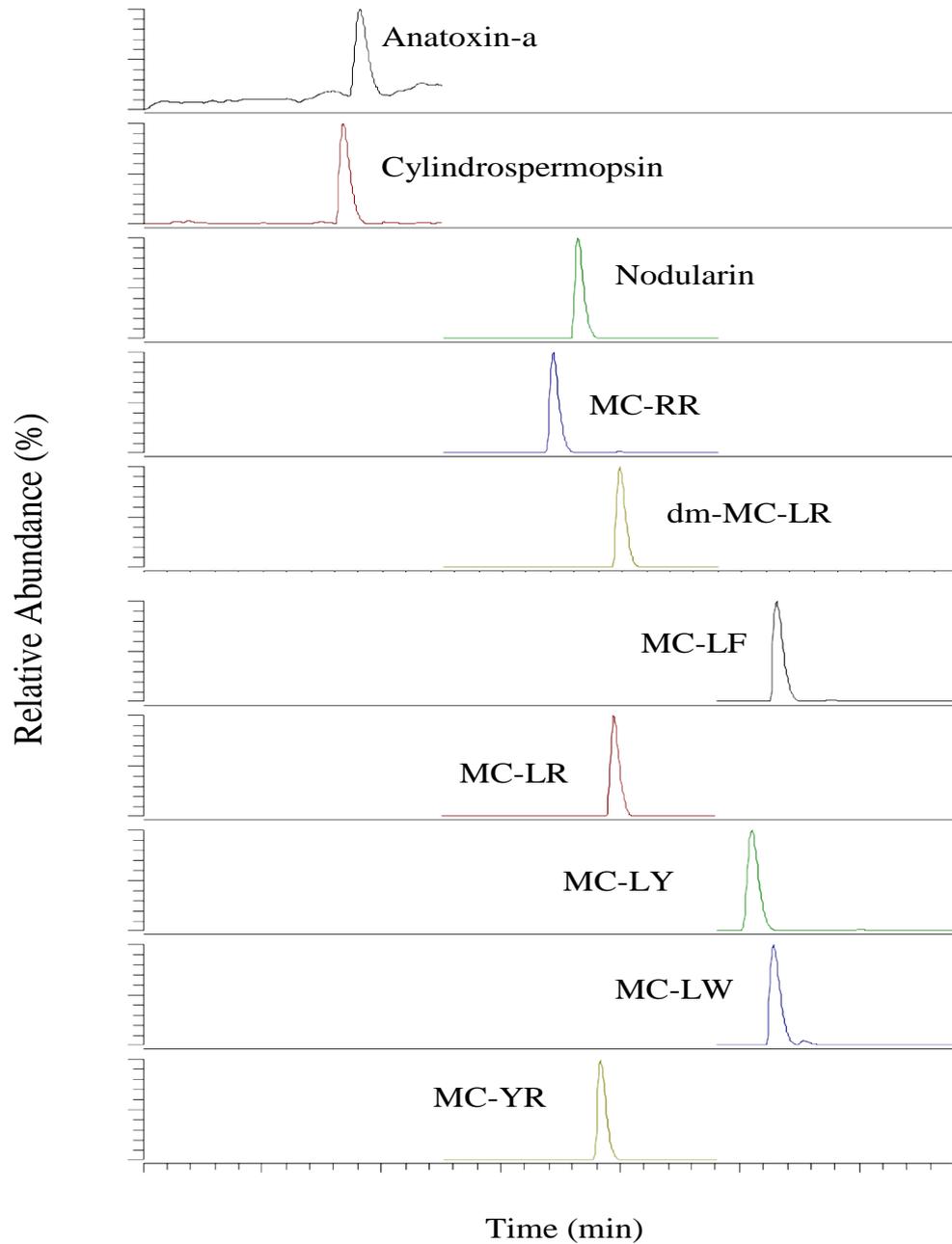
- éliminer l'extraction sur phase solide (SPE) et utiliser la SPE automatisée
- utiliser un système de colonnes, pompes et valves procurant une analyse rapide, malgré la haute pression (> 600 bar)

Résoudre l'interférence de la phénylalanine sur l'anatoxine-a

- la même masse et fragments
- besoin d'éliminer les faux positifs



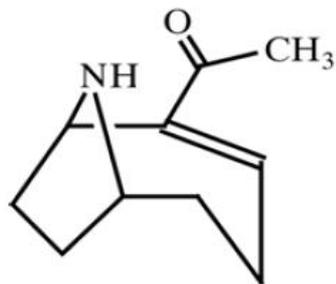
<http://fav.me/dsk92w>



SPE-UPLC/MSMS,
standards @ 1 $\mu\text{g l}^{-1}$

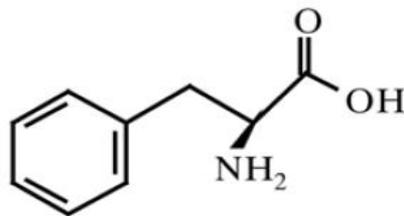
Anatoxine-a et phénylalanine

- Séparation des isobars par chromatographie
- Quantification avec le fragment spécifique de l'anatoxine-a (166.10 > 43.3)



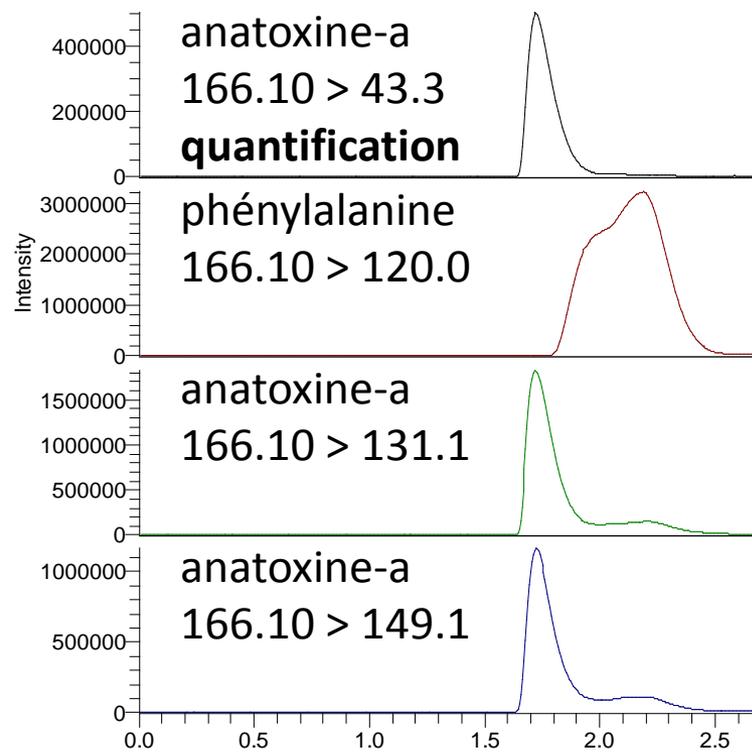
ANA-a

M.W. = 165.24 g/mol



PHE

M.W. = 165.19 g/mol



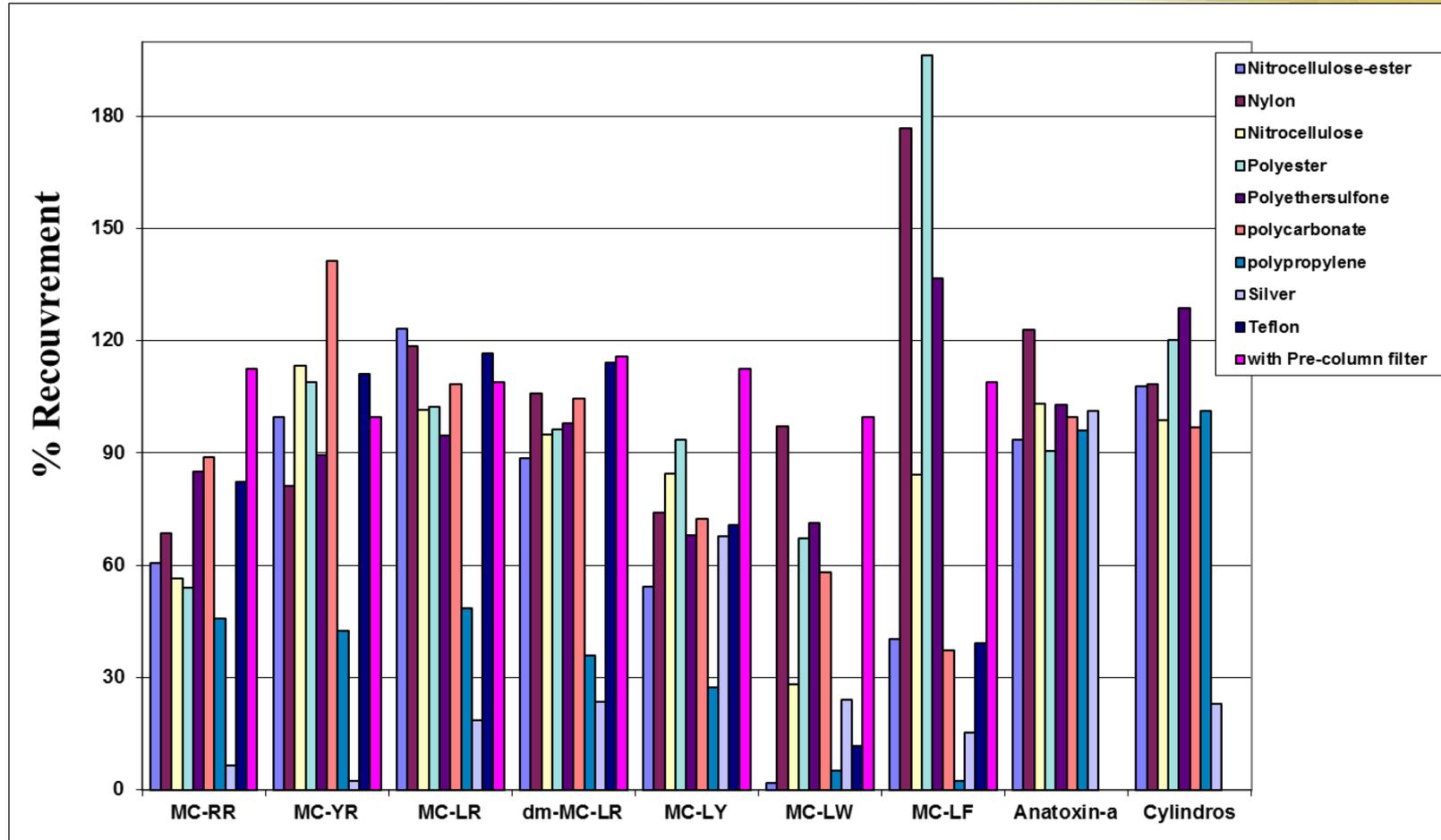
Performances

Toxin	Parent	Fragment	Recovery	R ²	Slope (x10 ⁻⁴)	MDL (ng/L)
cylindrospermopsin	416.10	194.10	98	0.9913	5.5	0.2
anatoxin-a	166.10	149.10	10	0.9949	8.6	10
MC-RR	519.76	135.00	56	0.9989	104.4	.01
MC-YR	1045.60	135.20	96	0.9997	2.5	17
nodularin	825.39	135.20	n/a			-
MC-LR	995.65	134.80	109	0.9936	5.7	1
dm-MC-LR	981.60	135.00	106	0.9933	8.8	3
MC-LY	1002.65	135.15	138	0.9984	2.0	-
MC-LW	1025.67	891.40	140	0.9982	3.1	9
MC-LF	986.63	213.11	138	0.9911	2.6	1

Pertes par filtration

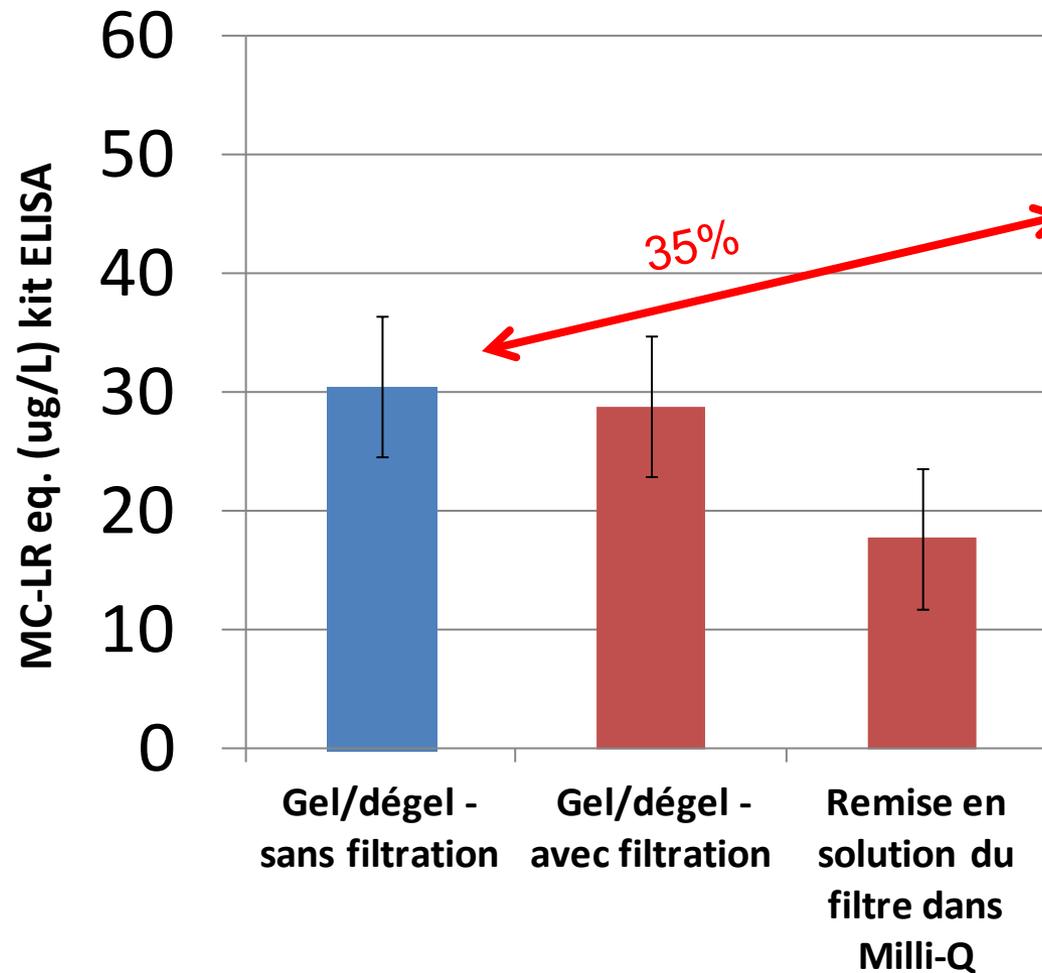
Filter	Source
Nylon	Chromspec
Polyester (PETE)	
Nitrocellulose	
Nitrocellulose-ester (MCE)	
Polyethersulfone (PES)	Sterlitech
Polycarbonate (PCTE)	
Polypropylen (PP)	
Teflon (PTFE)	
Silver metal membrane	
Pre-column filter	Thermo-Fisher

Recouvrement après filtration



Impact du prétraitement des échantillons sur l'analyse des toxines

Adsorption des toxines libérées par gel dégel



Conclusion SPE-Online

- Validation en comparant avec le CEAEQ
- Identifié un problème de sorption des cyanotoxines sur les membranes filtres
- Doit compléter et répéter certaines analyses de sorption sur les membranes filtres

Analyse de cyanotoxines par LDTD-APCI-MS/MS

→ **15 sec/échantillon** au lieu de 15-20 min LC-MSMS

■ Principes de fonctionnement de la LD'TD:

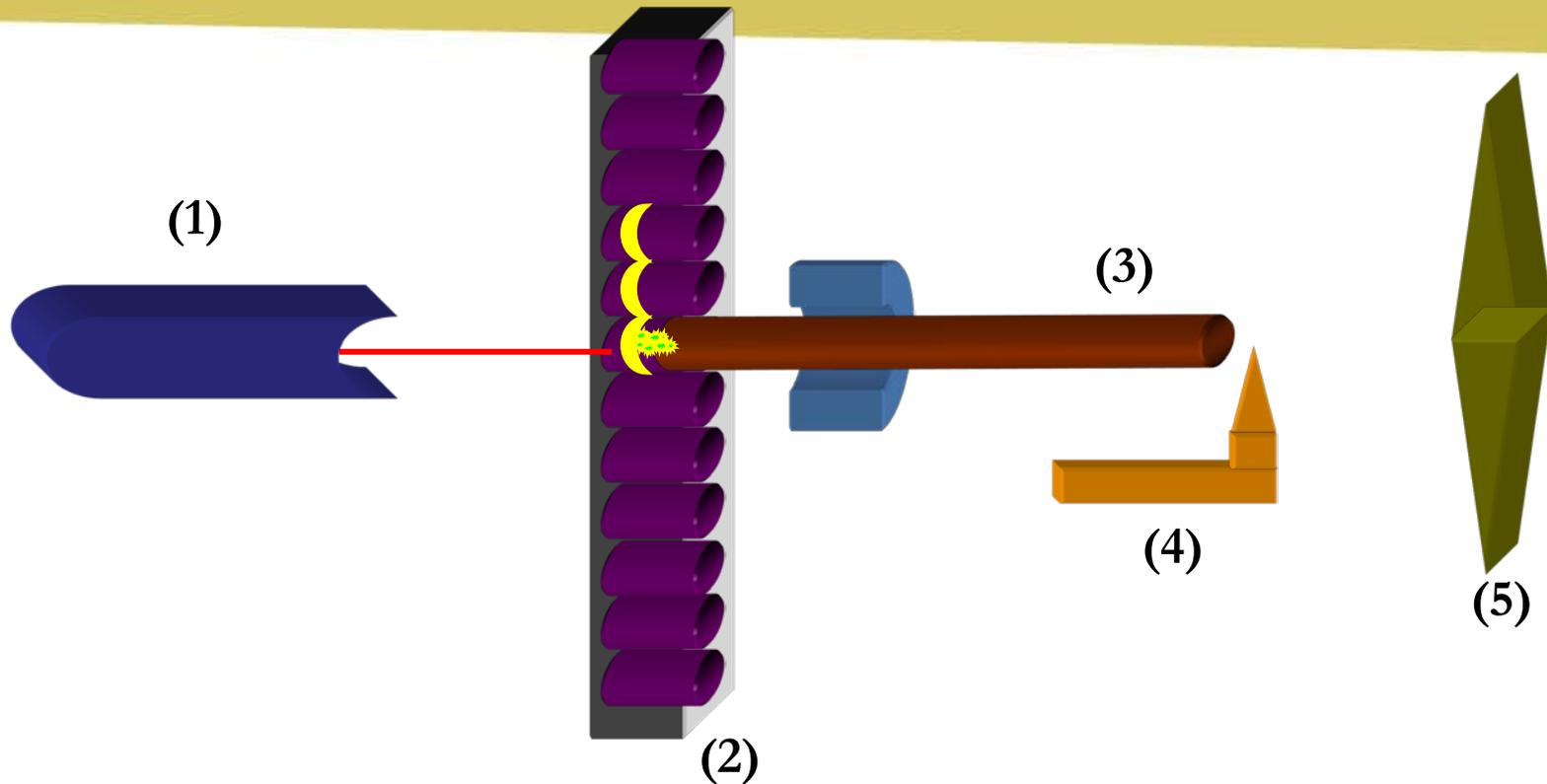
- ✓ technique qui combine la désorption thermique (laser) + APCI
- ✓ déposition (petit volume 1-5 μ l) sur une plaque (96 puits); séchage 2 min
- ✓ analytes neutres désorbent sous l'effet de chaleur générée par le laser
- ✓ aiguille à décharge corona va ioniser les analytes (mode + ou -)
- ✓ gaz (air) assure le transfert des analytes des puits vers le MS



Échantillonneur
→
960 échantillons



LDTD-APCI-MS/MS



- (1) Laser infrarouge (980 nm, 20W) : ajustement de la puissance voulue*
- (2) Plaque LazWell 96 positions: désorption des analytes (volume 1 – 10 μ L)*
- (3) Tube de transfert des analytes neutres désorbés*
- (4) Aiguille pour l'ionisation des composés (en mode + ou -)*
- (5) Entrez vers le MS des analytes chargés*

Résultats / défi

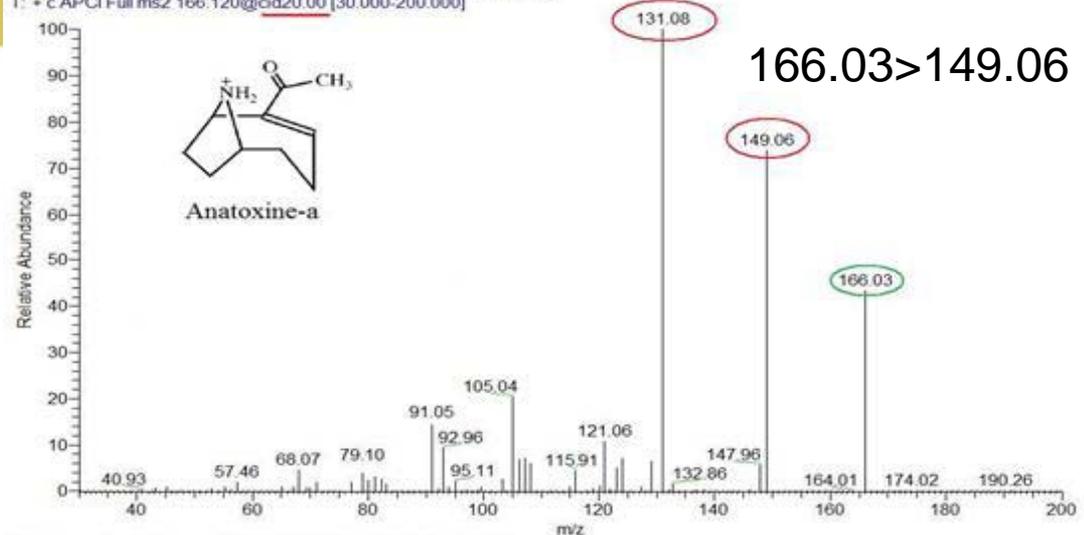
Seule l'anatoxine-a est vaporisable et ionisable par LDTD-APCI.

Interférence de la Phénylalanine et pistes possibles:

Patron de désorption (intensité du signal vs puissance laser utilisée).

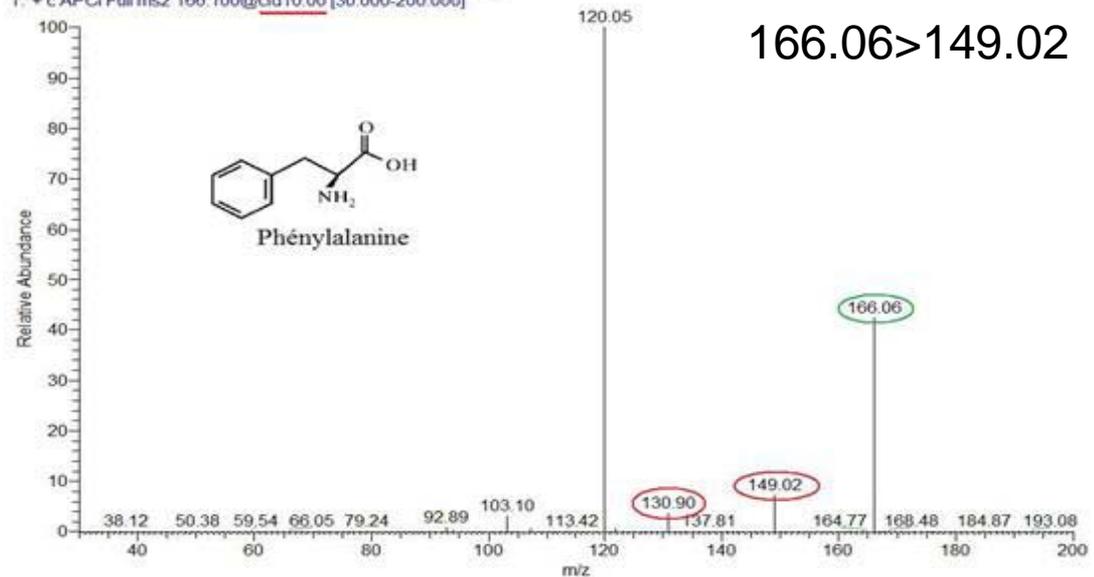
Optimisation des SRMs (fragments communs).

ANA 2 ppm full scan product Ce 20 #46 RT: 0.23 AV: 1 NL: 6.95E5
T: + c APCI Full ms2 166.120@cid20.00 [30.000-200.000]



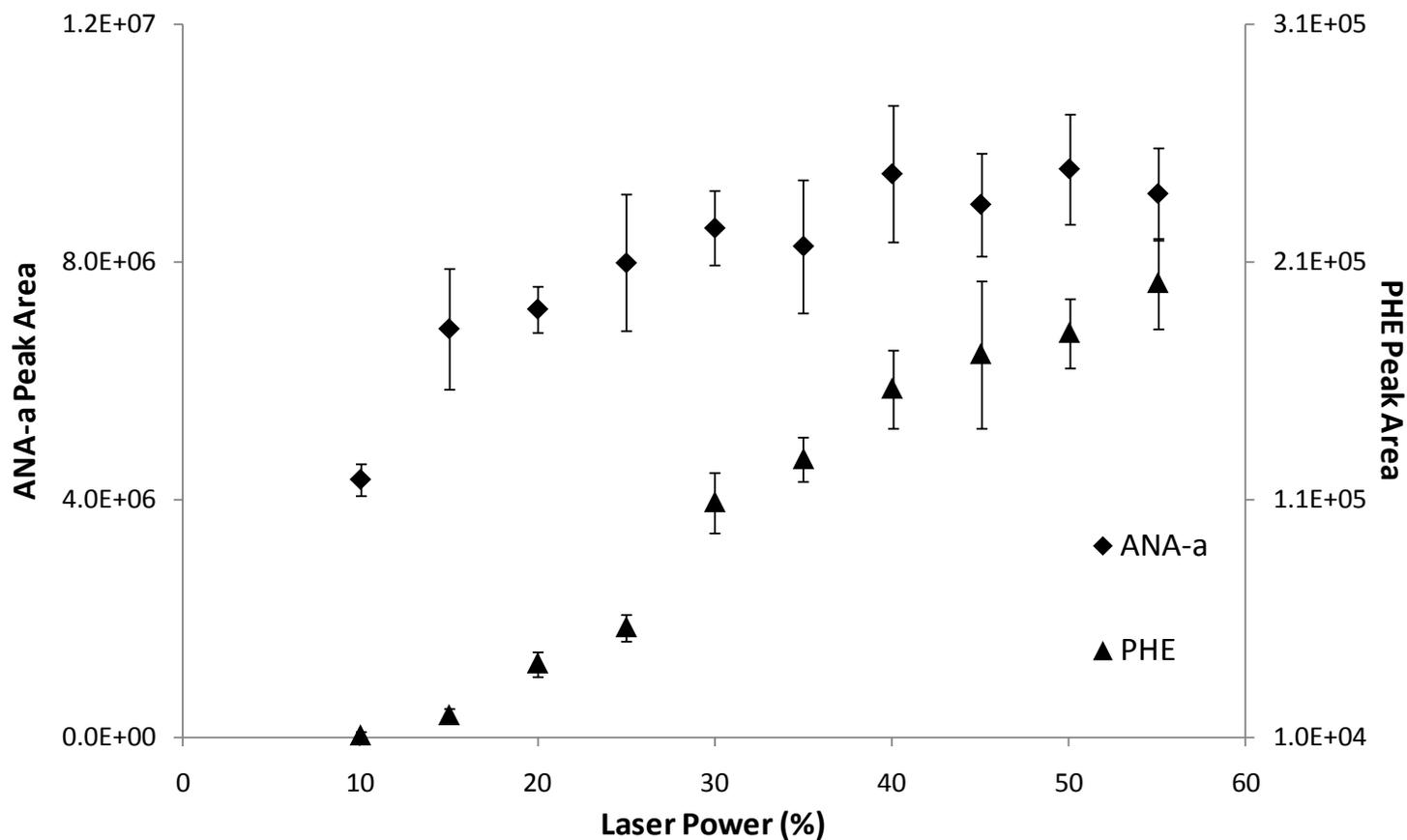
166.03 > 149.06

full scan product 2 ppm ce 10 #47 RT: 0.25 AV: 1 NL: 1.67E6
T: + c APCI Full ms2 166.100@cid10.00 [30.000-200.000]



166.06 > 149.02

Séparation par gradient de puissance laser de la LDTD



Performances (anatoxine-a)

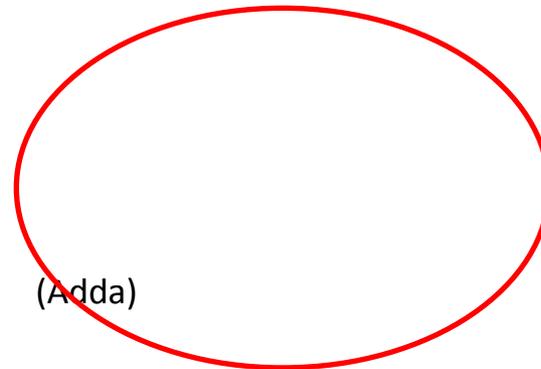
Calibration type	R^2	Linearity range ($\mu\text{g/L}$)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MLQ ($\mu\text{g/L}$)	Standards Avg. RSD (%)
External	0.999	3 – 250	1	3	8
Internal	0.998	5 – 250	1	4	5

Dernier Défi – microcystines par LDTD-APCI-MS/MS

- Plus ambitieux, mais comme on a réussi pour l'anatoxine – on va essayer
- Microcystines ne se volatilisent pas par LDTD
- Cheminement plus complexe

Approche de la détection des microcystines

- Oxydation de la toxine pour former le fragment volatile cible MMPB
- Détection par LDTD-APCI-MS/MS



(Adda)

Squelette de la Microcystine

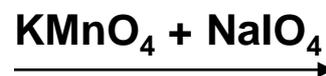
X et Z : Variable

Mdha : N-méthyl-déhydroalanine

Masp : D-érythro-b-méthyl-D-acide aspartique

Adda : acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-méthoxy-2-6-8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque

Oxydation de la microcystine



Microcystine

MMPB

- Oxydation en solution alcaline (pH = 9) pendant 3h à température ambiante.
- Extraction liquide avec acétate d'éthyle

Détection du MMPB

Quantification du MMPB par étalonnage interne, avec l'acide 4-phénylbutirique par LDTD-APCI-MS/MS

MMPB

Acide 4-phénylbutirique

Données préliminaires de performance:

R^2 : 0,995

Linearity range: 1 – 500 $\mu\text{g/L}$

LOD: 1 $\mu\text{g/L}$

LOQ: 3 $\mu\text{g/L}$

Standards Avg. RSD: 9%

Remerciements

Partenaires et organismes subventionnaires:

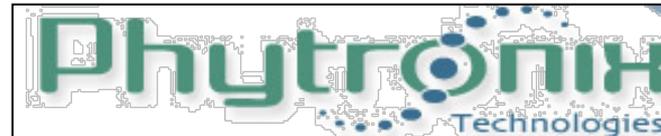
*Fonds de recherche
sur la nature
et les technologies*

Québec 



**CHAIRE
INDUSTRIELLE CRSNG
EN EAU POTABLE**

Thermo
SCIENTIFIC



**CRSNG
NSERC**

Les gens. La découverte. L'innovation.

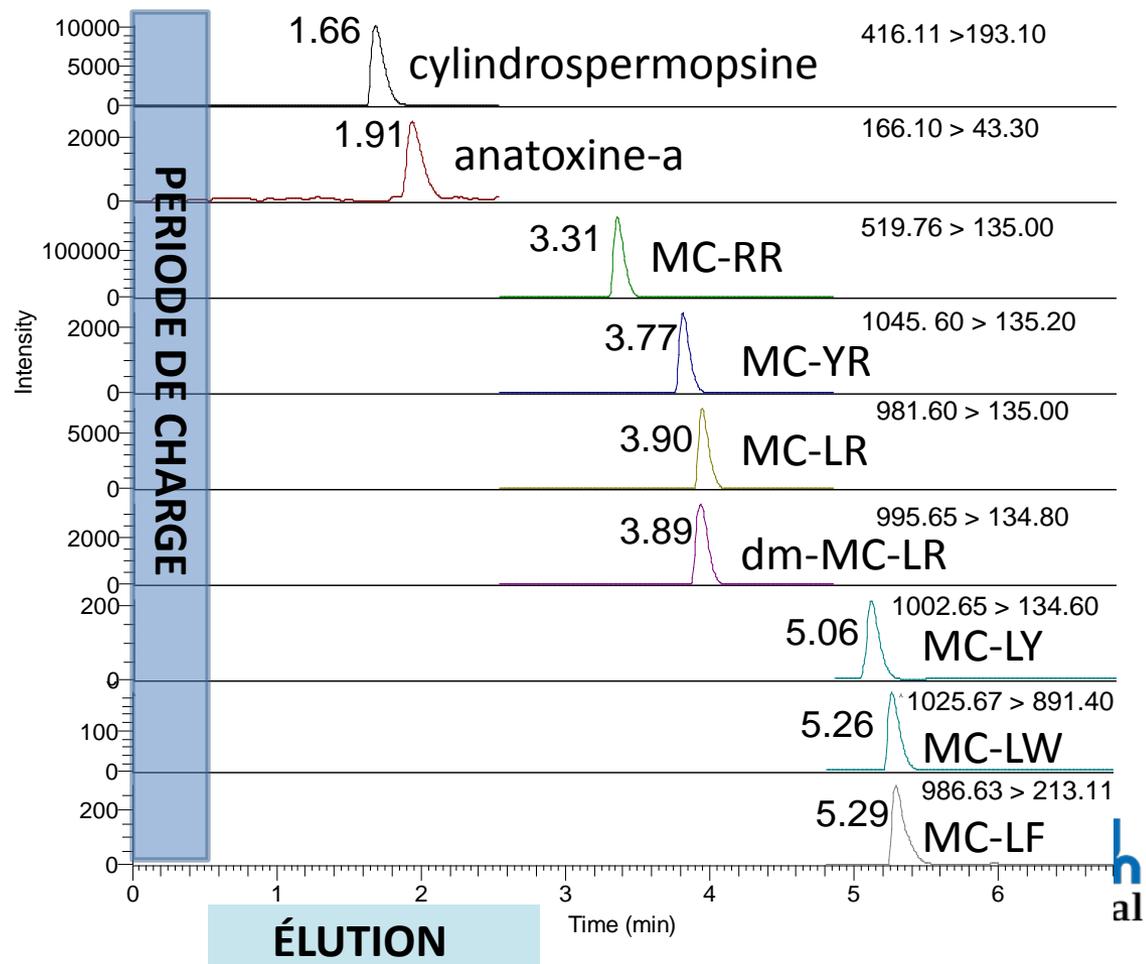


Questions?

sebastien.sauve@umontreal.ca

Exemple de chromatogramme

- limites de détection
 - 10-300 ng/L
- co-élutions:
 - MC-LR & dm-LR
 - MC-LW & LF
- 100mm colonne
 - 2x longueur: > temps, > pression
 - > débit = > pression



Specific SRM conditions for determination of cyanotoxines

Toxin	T_R	Ionisation	Parent ion	MS/MS transition	CE (eV)	Tube lens (V)
Cylindrospermopsin	1.67	ESI ⁺	[M + H] ⁺	416.1 > 194.1 ^a	37	151
				416.1 > 176.1	31	151
Anatoxin-a	1.81	ESI ⁺	[M + H] ⁺	166.1 > 149.1 ^a	11	86
				166.1 > 131.1	10	86
				166.1 > 43.3	22	86
Phenylalanine (interferent)	2.22	ESI ⁺	[M + H] ⁺	166.1 > 120 ^a	13	125
MC-RR	3.42	ESI ⁺	[M + 2H] ²⁺	519.8 > 135 ^a	31	138
				519.8 > 102.9	70	138
				519.8 > 105.1	47	138
MC-YR	3.83	ESI ⁺	[M + H] ⁺	1045.6 > 135.2	58	183
				1045.6 > 213.1 ^a	58	183
Nodularin	3.63	ESI ⁺	[M + H] ⁺	825.4 > 135.2 ^a	50	148
MC-LR	3.95	ESI ⁺	[M + H] ⁺	995.7 > 134.8 ^a	57	198
				995.7 > 213	39	198
dm-MC-LR	3.98	ESI ⁺	[M + H] ⁺	981.6 > 135 ^a	65	206
				981.6 > 361.25	46	206
				981.6 > 163.11	68	206
MC-LY	5.10	ESI ⁺	[M + H] ⁺	1002.7 > 135.15	37	118
				1002.7 > 213.11	63	118
				1002.7 > 265.1 ^a	50	125
				1002.7 > 375.12	27	118
MC-LW	5.29	ESI ⁺	[M + H] ⁺	1025.7 > 891.4 ^a	24	164
				1025.7 > 583.18	29	164
				1025.7 > 213	43	164
MC-LF	5.31	ESI ⁺	[M + H] ⁺	986.6 > 213.11 ^a	34	150
				986.6 > 375.21	22	150

^aThe first transition listed for each component was the transition used for quantitation while the following are for confirmation of the compound.

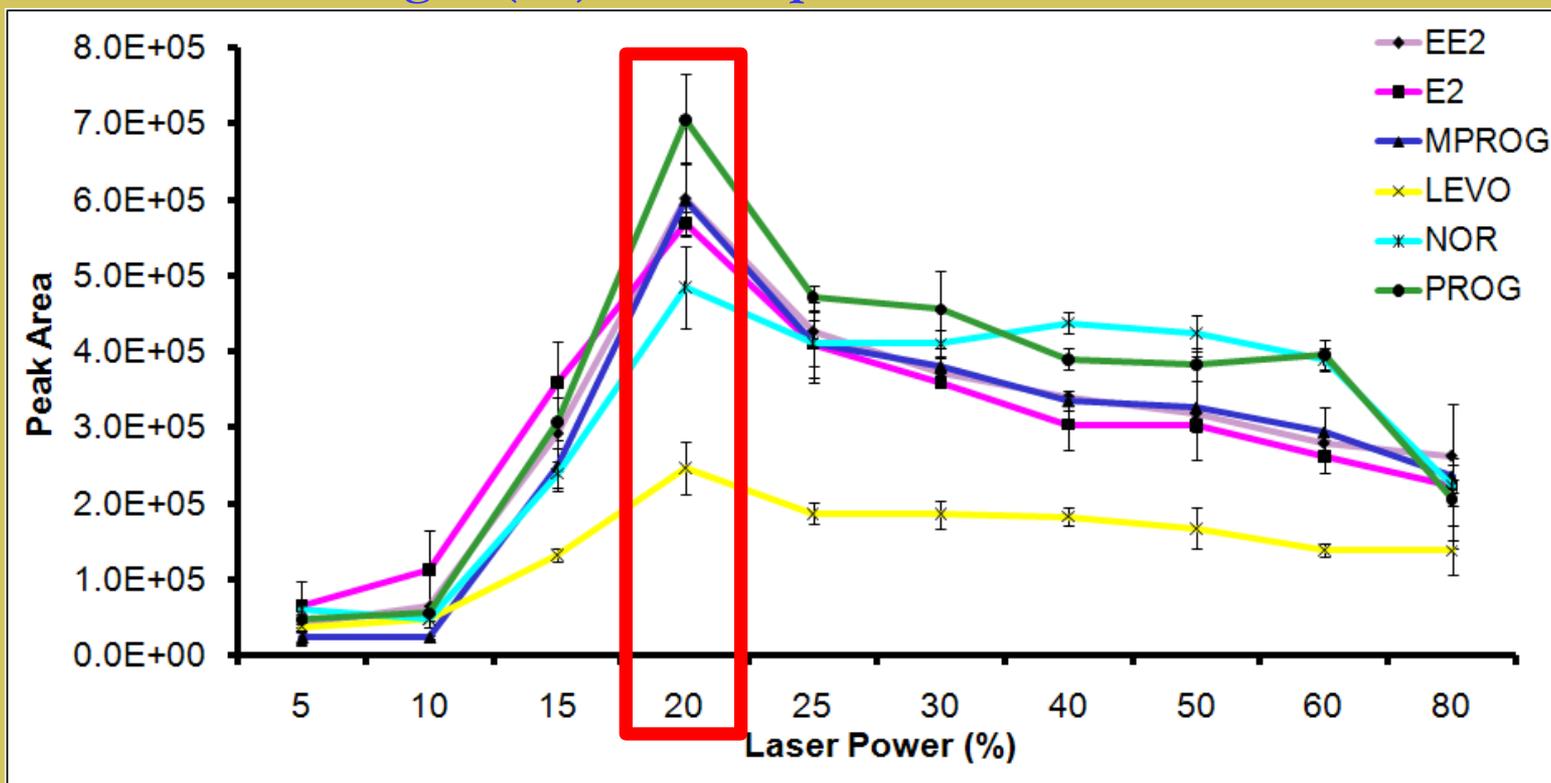


LDTD: Optimisation



■ Paramètres influençant l'ionisation et la désorption thermique des analytes par LDTD-MSMS:

- ✓ puissance (%) et patron du laser
- ✓ solvant de déposition dans lequel se trouve l'analyte
- ✓ la masse de déposition (volume de déposition)
- ✓ le débit du gaz (air) de transport



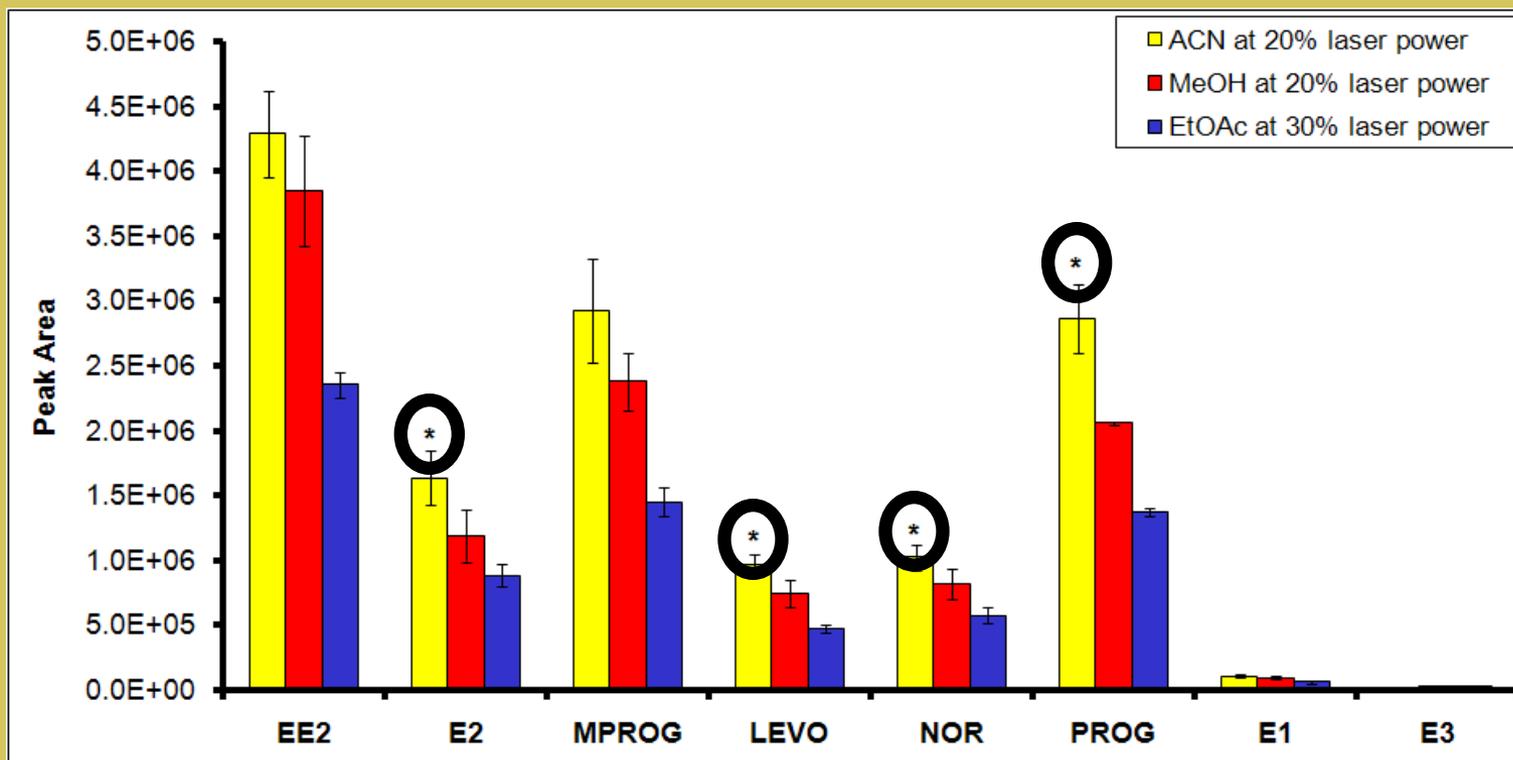


LDTD: Optimisation



■ Paramètres influençant l'ionisation et la désorption thermique des analytes par LDTD-MSMS:

- ✓ puissance et patron du laser
- ✓ solvant de dépôt dans lequel se trouve l'analyte
- ✓ la masse de dépôt (volume de dépôt)
- ✓ le débit du gaz (air) de transport



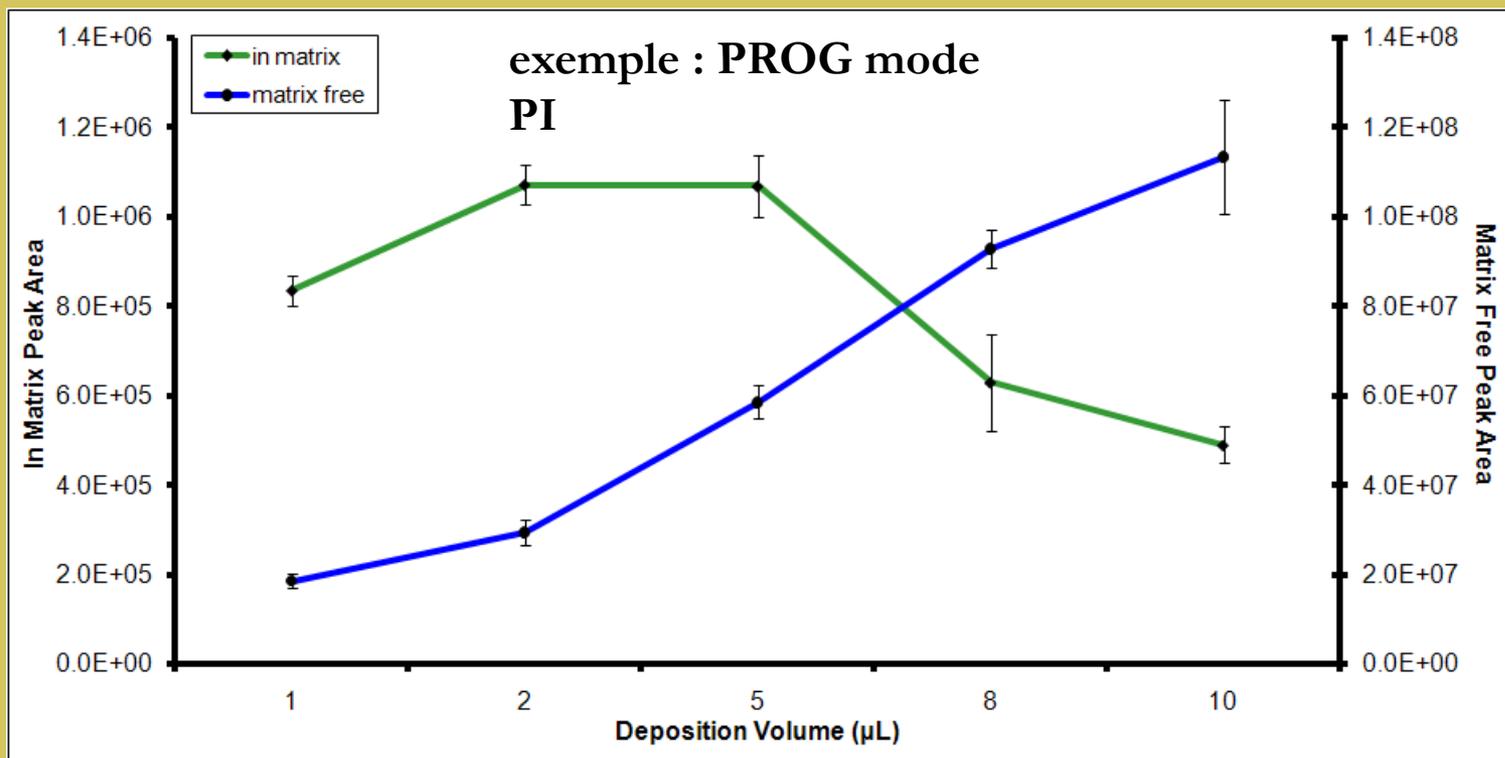


LDTD: Optimisation



■ Paramètres influençant l'ionisation et la désorption thermique des analytes par LDTD-MSMS:

- ✓ puissance et patron du laser
- ✓ solvant de déposition dans lequel se trouve l'analyte
- ✓ la masse de déposition (volume de déposition)
- ✓ le débit du gaz (air) de transport



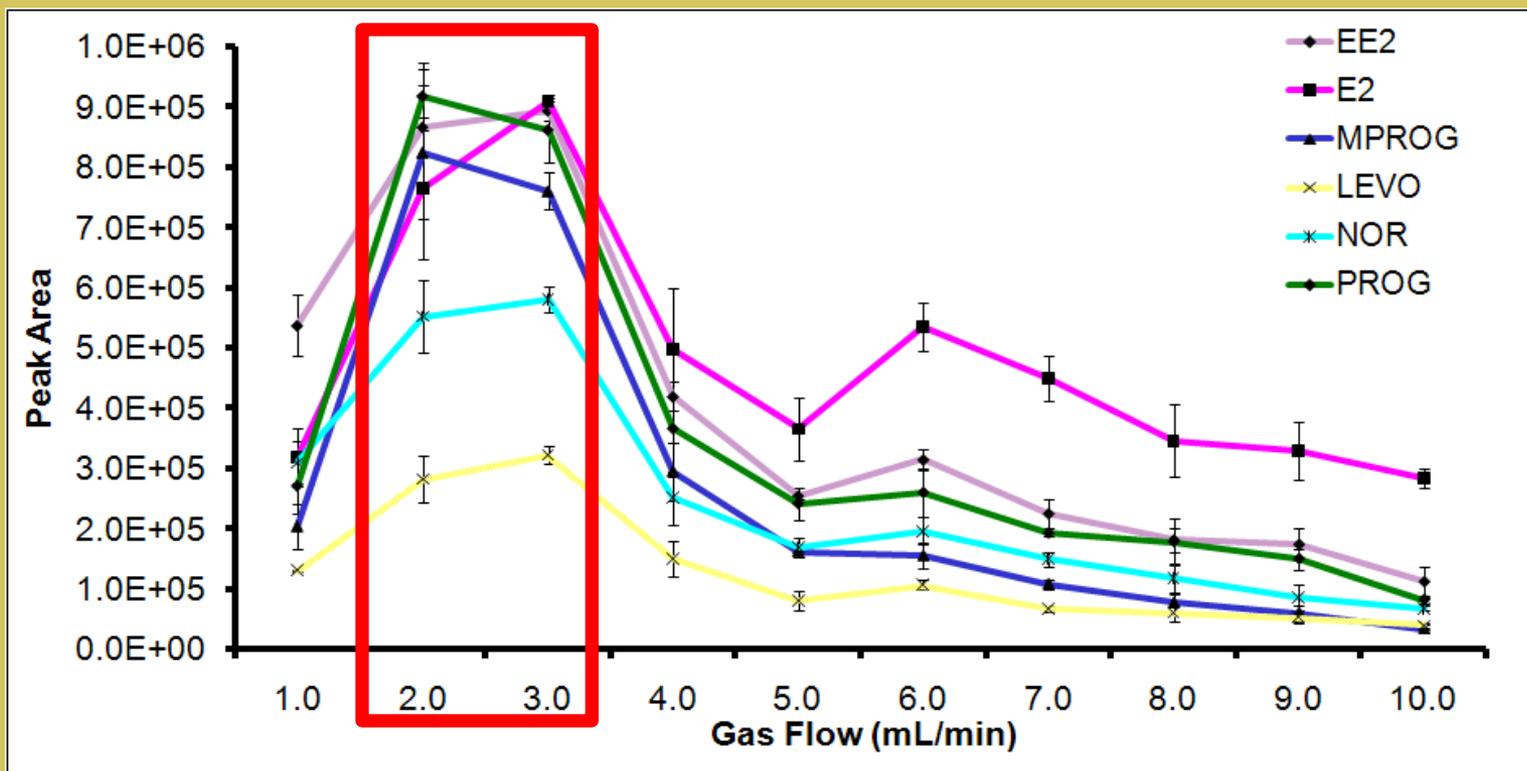


LDTD: Optimisation

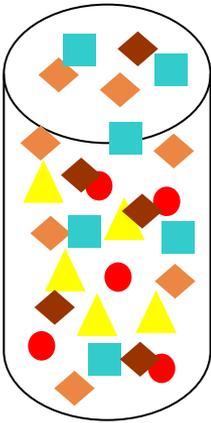


■ Paramètres influençant l'ionisation et la désorption thermique des analytes par LDTD-MSMS:

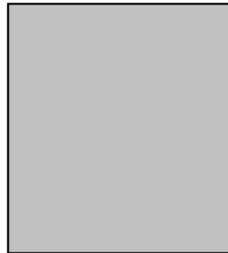
- ✓ puissance et patron du laser
- ✓ solvant de déposition dans lequel se trouve l'analyte
- ✓ la masse de déposition (volume de déposition)
- ✓ le débit (mL/min) du gaz (air) de transfert



Solid phase extraction

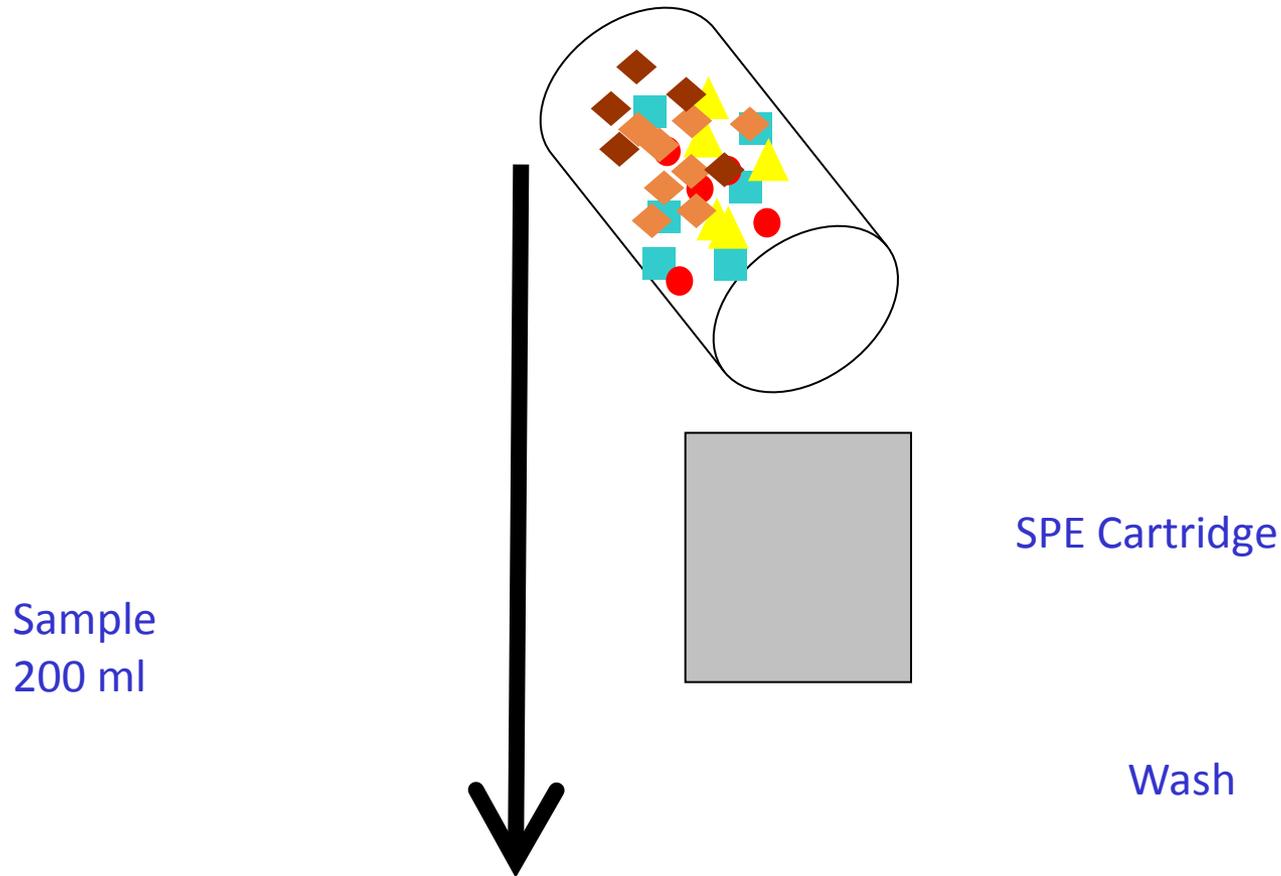


Sample
100-500 ml offline
1 ml online



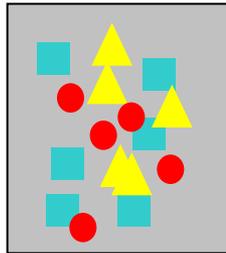
SPE cartridge

Solid phase extraction

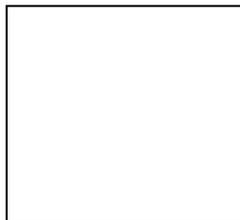


Solid phase extraction

Elution
offline

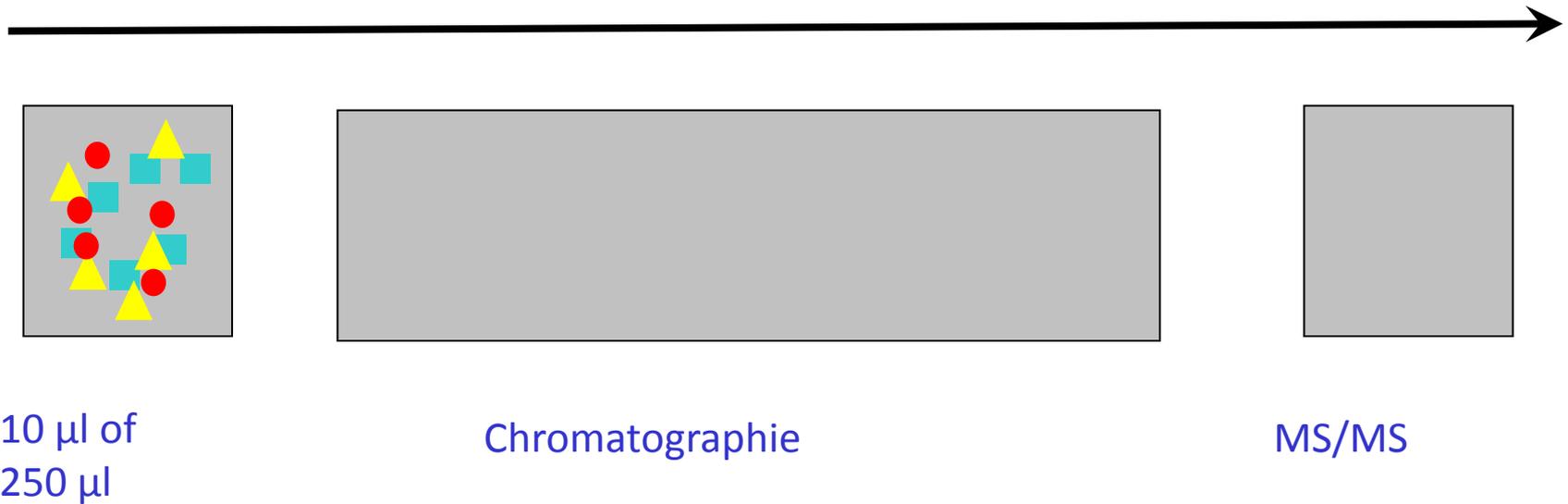


SPE Cartridge



Into ~250 μ l

Solid phase extraction offline



Seulement un aliquot de la SPE se rend au détecteur MS

Reconstitution



250 μL phase mobile
phase avec étalon interne

2 min bain ultrason

5 min centrifugation pour
bien dissoudre

Injection de 1-10 μl dans
le MS