Zeitschrift: Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles
Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles
Band: 73 (1976-1977)
Heft: 349

Artikel: La spectrométrie de masse en biologie et médecine
Autor: Rivier, Laurent / Baumann, Pierre
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-277041

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 14.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Bulletin de la Société vaudoise des Sciences naturelles

N° 349 1976 Vol. 73, Fasc. 1

La spectrométrie de masse en biologie et médecine

PAR

LAURENT RIVIER [1] et PIERRE BAUMANN [2]

1. INTRODUCTION

Les analyses par spectrométrie de masse ont débuté vers 1950 essentiellement pour les déterminations quantitatives des produits pétroliers. La première connexion d'un chromatographe en phase gazeuse avec un spectromètre de masse date de 1957, et depuis, des progrès considérables ont été accomplis, en particulier dans le domaine des sciences biologiques. Le but de cet article est de présenter l'état actuel des possibilités qu'offre cette combinaison dans le cadre de la biologie et de la médecine.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique extrêmement efficace lors de l'analyse qualitative et quantitative de mélanges complexes de substances, à condition qu'ils soient volatilisables. D'une part, la colonne du chromatographe permet la séparation des composés à analyser; d'autre part, le spectromètre de masse fournit des informations non équivoques sur la structure moléculaire et la quantité de chaque substance, au fur et à mesure qu'elles sortent du chromatographe. Une très grande quantité d'informations est facilement obtenue à chaque injection. Si, en plus, un ordinateur fait partie du système, le spectre obtenu est enregistré et comparé automatiquement à des spectres connus, préalablement mémorisés: l'identification est alors facilitée. De plus, en établissant une courbe étalon, l'ordinateur calcule également les quantités de substances recherchées.

Dans la première partie de cet article, la description schématique du fonctionnement d'un appareil de GC-MS moderne sera donnée. Puis,

[1] Institut de biologie et physiologie végétales, Université de Lausanne, place de la Riponne, 1005 Lausanne.

[2] Laboratoire de biochimie, Centre de recherches psychopathologiques, Clinique psychiatrique universitaire de Lausanne, 1008 Prilly.

pour illustrer les capacités remarquables de cette technique, quelques exemples d'applications seront présentés, choisis dans divers domaines de la recherche biologique ou médicale. Enfin, les avantages et inconvénients de l'utilisation de cet appareillage seront résumés pour s'arrêter à une bibliographie élargie. Elle tiendra moins compte des travaux originaux effectués dans ce domaine, que de revues d'applications pouvant permettre à chacun d'approfondir rapidement le sujet qui l'intéresse, en rapport avec la technique concernée.

2. Principes du fonctionnement du GC-MS (fig. 1)

En GC-MS, le gaz vecteur généralement utilisé est l'hélium. Sa pression dans la colonne du chromatographe en phase gazeuse est de l'ordre de 1 atm. Le spectromètre de masse fonctionne sous un vide de 10^{-7} Torr environ. C'est pourquoi il est nécessaire d'éliminer semi-quantativement le gaz vecteur entre les deux appareils par un séparateur (1). Il existe plusieurs types de séparateurs et leur principe de fonctionnement est pratiquement semblable: il consiste à soumettre l'éluat du chromato-

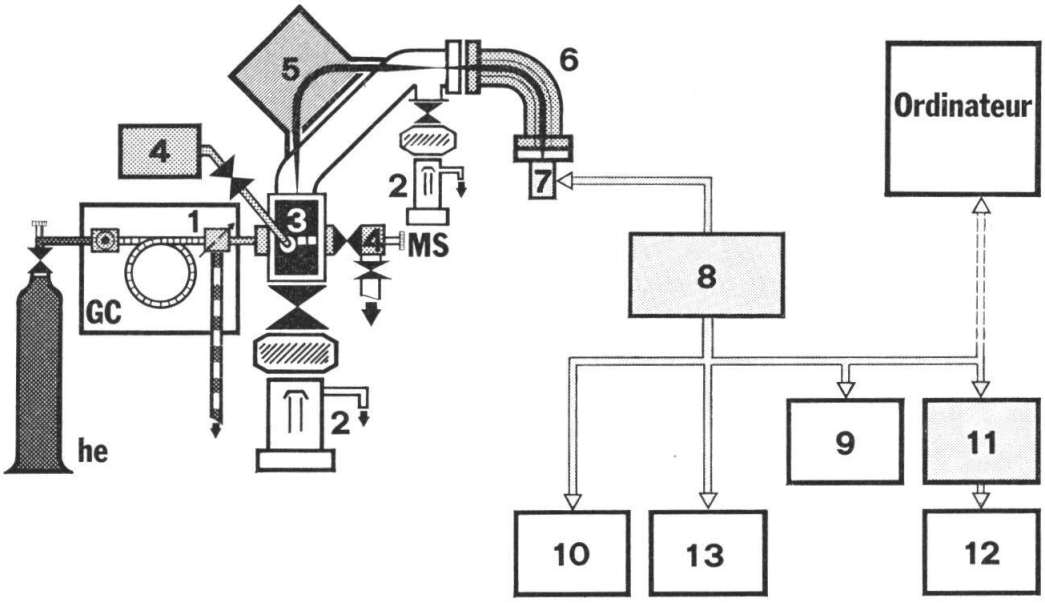


Fig. 1. — Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS-COM) (d'après Varian MAT 112).

1. Séparateur
2. Pompes à diffusion
3. Source ionique
4. Systèmes d'introduction directe de l'échantillon de référence
5. Champ magnétique
6. Champ électrostatique
7. Multiplicateur d'électrons secondaires
8. Amplificateur à courant continu
9. Oscilloscope
10. Enregistreur à plume
11. Système à détection d'ions multiples
12. Enregistreur pour système à détection d'ions multiples
13. Enregistreur photosensible galvanométrique.

graphe à un vide obtenu par une pompe à diffusion très efficace (2). Le gaz vecteur — ayant un poids moléculaire plus petit que la substance à analyser — est aspiré plus rapidement par la pompe et l'échantillon enrichi, continuant sur sa trajectoire, passe dans la chambre de la source ionique (3). D'un filament chauffé émanent des électrons qui bombardent les molécules provenant du séparateur avec une énergie convenablement choisie. Celle-ci est généralement réglable entre 5 et 100 eV. Les molécules de l'échantillon passent alors à un état énergétique instable, puis se fragmentent pour retrouver un état stable, donnant principalement des ions positifs. Pour une valeur donnée de l'énergie d'ionisation (généralement 70 eV), le nombre de fragments et leurs abondances relatives sont caractéristiques de la substance à analyser, fournissant ainsi « l'empreinte digitale de la molécule ». Cela permet de l'identifier de manière non équivoque. Cette propriété unique de spécificité montre tout l'intérêt que peut avoir cette technique lors des analyses de mélanges complexes.

Dans le compartiment de la source ionique se trouvent également divers systèmes d'introduction directs des échantillons (4). Ils permettent d'étalonner l'appareil par exemple.

Il existe plusieurs manières de séparer les fragments chargés, mais il ne sera fait état ici que du type le plus courant, où un champ magnétique est utilisé. Grâce à des électrodes convenablement chargées, les fragments de la molécule sont projetés dans une direction bien définie; ils passent ensuite dans un champ magnétique (5) où ils sont déviés en fonction de leur masse m et de leur charge e. La formule suivante s'applique à ce système:

$$m/e = H^2 \cdot r^2/2V$$

Dans les appareils à déflection magnétique, le potentiel d'accélération V est maintenu constant, tandis que le champ magnétique H varie. Le rayon r de la trajectoire des ions est fixé par la géométrie de l'appareil, si bien que, en modifiant le champ magnétique de sa valeur minimale à celle maximale, le rapport m/e passera de la valeur 1 à 1000 ou plus, permettant d'enregistrer un spectre de masse complet. Le balayage d'un tel intervalle de masses nécessite seulement une dizaine de secondes avec les appareils récents. Il est également possible de maintenir le champ constant et de faire varier le potentiel V cette fois. C'est ce qui est utilisé en fragmentographie de masse, en particulier (cf. § 3). Dans l'instrument présenté à la fig. 1, les fragments passent encore par un champ électrostatique. Cette double focalisation est destinée à améliorer le pouvoir de séparation de l'appareil, ce qui est nécessaire pour des applications bien précises. Par exemple, on utilisera un spectromètre de masse de ce type, c'est-à-dire à haute résolution, pour différencier les fragments CO^+ (m/e = 27,9949) du $CH_2 = CH_2^+$ (m/e = 28, 0313). Mais dans la grande

majorité des cas, un appareil à focalisation simple est suffisant, comme les applications présentées plus loin le montreront.

Au niveau de la détection des fragments, un multiplicateur d'électrons secondaires (7) et un amplificateur à courant continu (8) augmentent le signal produit par les ions. Le spectre peut être visualisé sur un oscilloscope (9) et sur un enregistreur galvanométrique à papier photosensible (13). De plus, il est souvent utile de mesurer au cours du temps l'évolution du flux total des ions pendant la chromatographie (10). Finalement, un ordinateur peut compléter avantageusement le système pour enregistrer, présenter, trier et comparer les données obtenues par le GC-MS.

3. Quelques techniques particulières

3.1. *Fragmentographie de masse*

En utilisant le spectromètre de masse comme détecteur spécifique de certains ions de fragmentation bien choisis et en nombre limité, la sensibilité du système est considérablement augmentée. Cette technique est particulièrement utile lorsque la quantité de substance à analyser est extrêmement petite. Elle est appelée également *« détection spécifique de ions multiples »*. Elle se prête spécialement bien pour des mesures quantitatives. L'utilisation de ce procédé implique la connaissance préalable du spectre de masse de la ou des substances à analyser. On n'enregistrera alors que les ions les plus importants et caractéristiques des composés (11 et 12 de la fig. 1). Certains appareils permettent d'enregistrer simultanément jusqu'à 8 ions; avec un ordinateur, il est possible d'augmenter ce chiffre à 18.

3.2. *Ionisation chimique*

Un spectre de masse est souvent très complexe et ne permet pas toujours de déterminer le poids moléculaire de la substance recherchée. Afin de pallier ces désavantages, la technique de l'ionisation chimique est complémentaire à l'ionisation électronique utilisée dans la spectrométrie de masse classique. Le méthane ou le butane — parfois l'ammoniac — sont utilisés comme gaz vecteurs pour la partie de chromatographie. Comme ces gaz ne sont pas totalement éliminés par le séparateur, une quantité importante de ceux-ci arrive jusqu'à la source ionique, où ils sont ionisés. Ces fragments se recombinent alors avec les molécules de l'échantillon. Ces recombinaisons sont instables et forment le plus souvent des ions MH^+ (la molécule à analyser non fragmentée et combinée à un proton provenant du gaz vecteur = *« ion quasi-moléculaire »*) en grande quantité. D'autres fragments apparaissent aussi, mais leur

nombre est restreint. Il s'agit d'une méthode complémentaire à la spectrométrie de masse usuelle, dont la sensibilité serait augmentée. Elle serait utile essentiellement lors du dosage de substances situées dans un mélange complexe peu purifié.

3.3. *Ionisation par désorption de champ*

Un des obstacles majeurs de la GC-MS est l'obligation de travailler avec des substances volatilisables. En fait, un échantillon possédant une pression partielle de vapeur de 10^{-13} Torr peut être détecté et identifié. C'est un cas extrême, et généralement, on cherche à améliorer la volatilité des substances par la formation de dérivés divers (estérification, acylation, etc.). Pourtant cela n'est pas toujours possible et l'échantillon peu volatil doit être introduit directement dans la chambre d'ionisation. Lors de la désorption de champ, la substance est soumise à un champ électromagnétique très fort qui va l'ioniser. Un tel champ est normalement produit en appliquant un haut potentiel (approximativement 10 kV) à un filament ou à une lame de rasoir. Cette méthode, appelée ionisation par désorption de champ, produit principalement des ions moléculaires. Elle trouve application lors de l'analyse de molécules de poids supérieur à 600 environ et lors de l'analyse d'extraits biologiques peu purifiés.

3.4. *Chromatographie liquide — spectrométrie de masse*

Avec quelques années de retard sur la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide à haute pression a pris un essor considérable depuis l'introduction de supports capables de supporter 200 atm. D'emblée, on a essayé de coupler un chromatographe à un spectromètre de masse (ARPINO et coll., 1974; HORNING et coll., 1974; MC LAFFERTY et coll., 1975). Mais l'élimination du solvant après la chromatographie n'a pas été réalisée de manière satisfaisante. Pour l'instant donc, cette technique ne peut pas rivaliser avec la GC-MS, mais il est certain que la perspective de pouvoir analyser comme en GC-MS des substances polaires, sans les transformer, et des composés de haut poids moléculaire, tels que les peptides, est extrêmement séduisante en biologie.

4. QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATIONS DE LA GC-MS EN BIOLOGIE ET MÉDECINE

Les trois exemples qui suivent ont été choisis dans le but d'illustrer d'une manière significative les techniques présentées plus haut dans des domaines biologiques et médicaux.

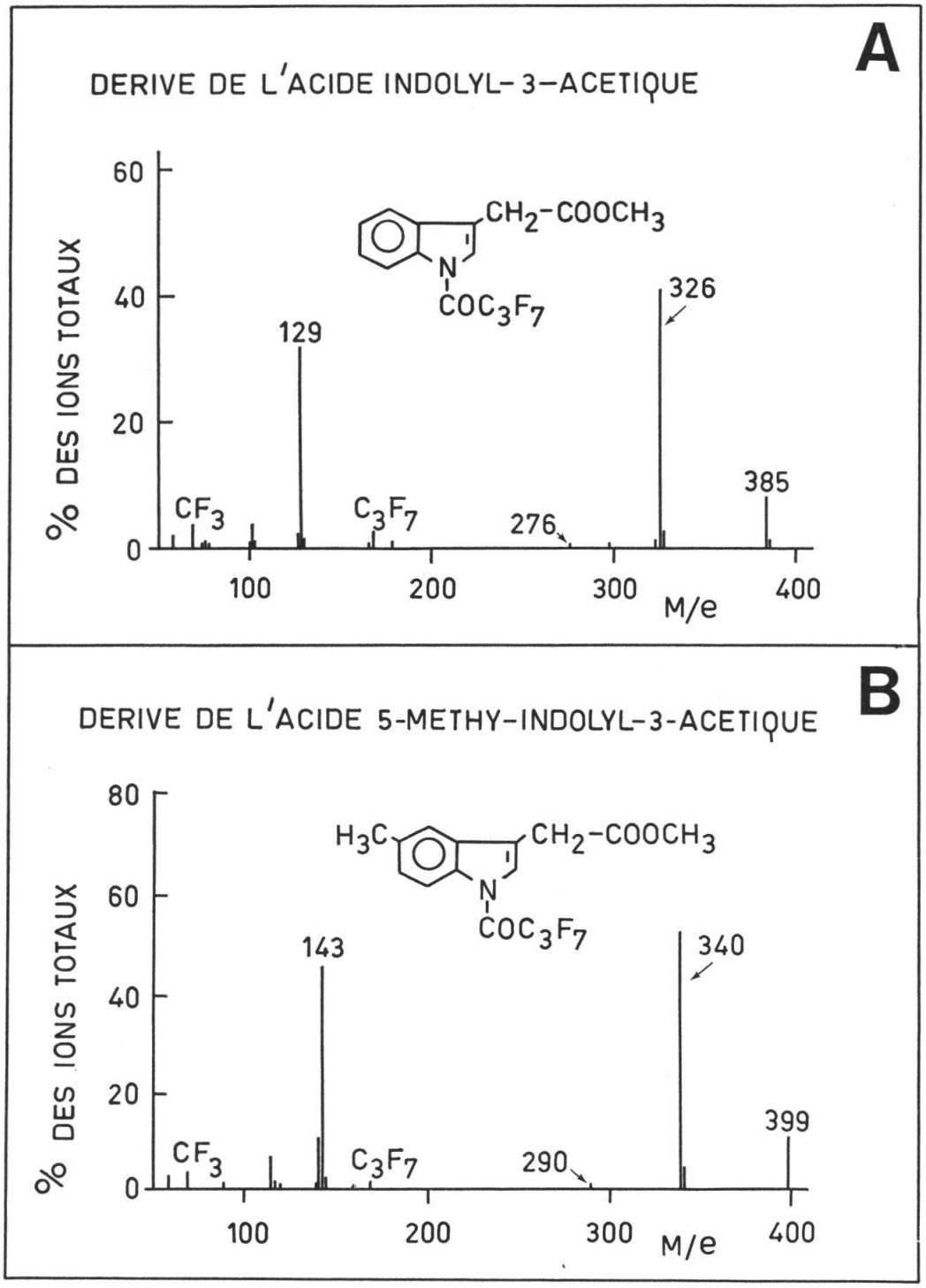


Fig. 2. — Spectre de masse des dérivés heptafluorobutyl, ester de méthyl de l'acide indolyl-3-acétique (A) et de l'acide 5-méthyl-indolyl-3-acétique (B). D'après RIVIER et PILET (1974).

4.1. *Quantification d'une hormone de croissance végétale par fragmentographie de masse*

Dans le cadre des analyses des phytohormones de croissance, il n'est plus possible d'utiliser actuellement des méthodes d'analyses traditionnelles, tels les tests biologiques. En effet, ils se sont révélés peu spécifiques, bien que relativement très sensibles, même si on procède à une séparation chromatographique préliminaire. Il était alors nécessaire de développer une nouvelle méthode de dosage aussi sensible que les tests biologiques, mais qui soit plus spécifique.

L'acide indolyl-3-acétique est très répandu dans le règne végétal (PILET, 1961). Cette hormone de croissance joue en particulier un rôle dans le contrôle de l'élongation des racines, et semble être liée à la réaction géotropique de ces dernières (PILET, 1972). Afin de préciser le taux de cette hormone le long de l'axe de la racine, une méthode de fragmentographie de masse a été développée (RIVIER et PILET, 1974). Elle a permis d'identifier de manière non équivoque et de doser l'acide indolyl-3-acétique, en particulier dans la coiffe de la racine. Cette assise cellulaire terminale de la racine, longue de 0,5 mm, pèse 0,2 mg environ. Il n'est pratiquement possible de rassembler qu'un nombre limité de coiffes. Dans ce cas la méthode choisie (la fragmentographie de masse) s'est avérée environ 1000 fois plus sensible que la chromatographie en phase

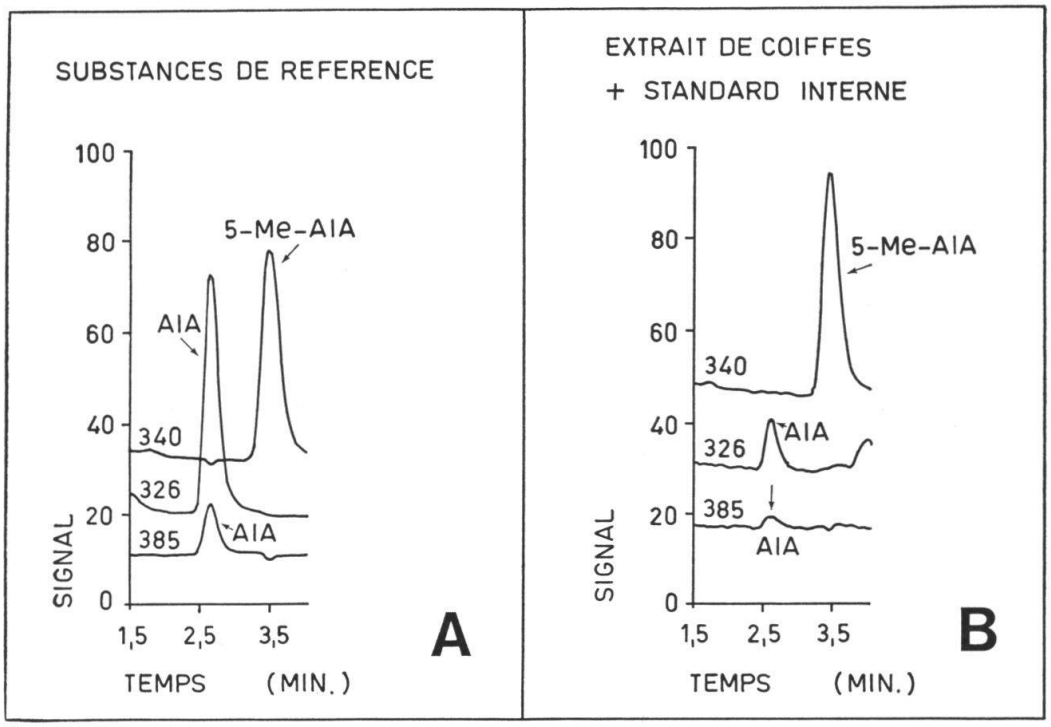


Fig. 3. — Fragmentogrammes de masse des dérivés d'extraits des substances de référence (A) et de coiffes de racines de *Zea mays* (B). D'après RIVIER et PILET (1974).

gazeuse (détecteur à ionisation de flamme) ou que la GC-MS classique. Avant l'injection dans le GC-MS, la molécule d'acide indolyl-3-acétique a subi plusieurs modifications afin d'obtenir une volatilité et une fragmentation favorables (fig. 2A). Le choix d'un standard interne convenable permet de limiter les erreurs inhérentes aux manipulations de l'analyse. Idéalement, ce standard pourrait être la molécule deutérée elle-même, mais son emploi est restreint par la difficulté de se procurer ou de synthétiser ce dérivé. Ici, c'est l'acide 5-méthyl-indolyl-3-acétique qui a été utilisé (fig. 2B). Son comportement au cours de l'extraction et de la purification des extraits est semblable à celui de l'hormone, mais, dans les conditions chromatographiques utilisées, son temps de rétention est plus grand (fig. 3A). En choisissant les ions les plus abondants dans les spectres de masse des deux composés, et en enregistrant au cours du temps leur intensité, on obtient un chromatogramme caractéristique pour les substances de référence (fig. 3A) et pour l'extrait de coiffes (fig. 3B).

Le rapport des surfaces ou des hauteurs des pics de l'ion correspondant à l'acide indolyl-3-acétique d'une part, et celles des pics correspondant au standard interne, d'autre part, permet de déterminer le taux en hormone de chaque extrait, grâce à une courbe étalon.

Les preuves de l'identité du pic sont données par les trois éléments suivants:

1. Le temps de rétention du pic correspond à celui de la substance de référence;
2. Le pic est obtenu sur certaines valeurs de m/e qui correspondent spécifiquement à la substance à analyser, et
3. Le rapport entre les hauteurs des deux pics correspondant à la substance est semblable à celui des mêmes ions dans le spectre de masse.

Par cette méthode, deux lots de mille coiffes ont été préparés et la teneur en acide indolyl-3-acétique a pu être déterminée de manière non équivoque. Une coiffe contient 93,6 picogrammes de cette hormone.

Des essais récents ont montré que cette technique ne se limitait pas au dosage de cette hormone uniquement, mais qu'elle pouvait également s'appliquer à d'autres composés endogènes, pour autant que l'on soit en possession de la substance de référence. Par exemple, on sait qu'une hormone de régulation de croissance différente de l'AIA est liée également au géotropisme de la racine (PILET, 1975). Cet inhibiteur, l'acide abscissique, a pu être dosé récemment dans ce même matériel végétal (RIVIER et coll., en préparation).

4.2. *Analyse d'un médicament thymoleptique dans l'urine par ionisation chimique*

Dans les cas d'intoxication volontaire et accidentelle, il peut être vital d'analyser les métabolites d'un médicament dans l'urine si celui-ci est dégradé très rapidement par l'organisme. FOLTZ et ses collaborateurs (1974) ont développé une méthode de GC-MS par ionisation chimique afin de déterminer les métabolites d'un médicament antidépressif, l'amitriptyline.

Après extraction de l'urine, ils soumettent le résidu à la GC-MS en utilisant le méthane comme gaz vecteur. Avec l'enregistrement du flux ionique total, le médicament et ses métabolites apparaissent en fonction de leur temps de rétention respectif (fig. 4). Cette mesure ne permet pas

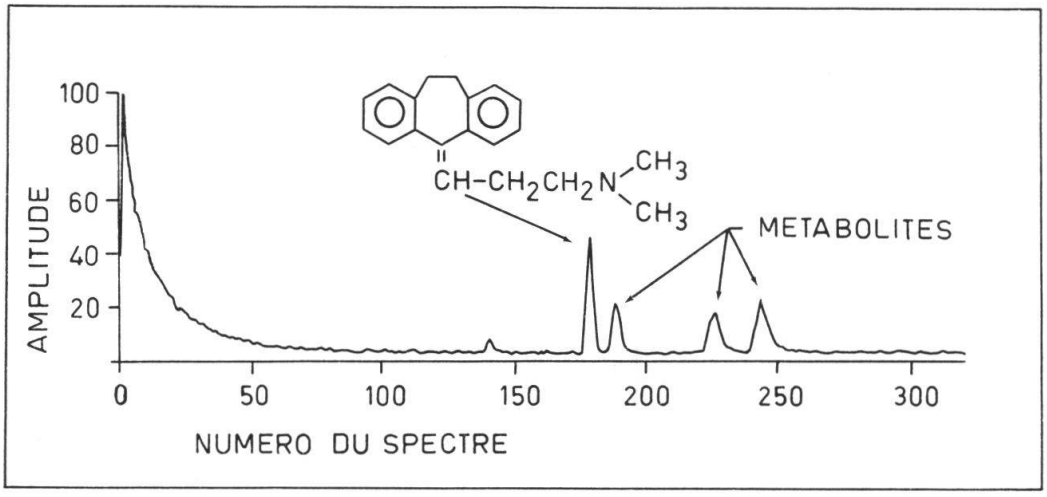
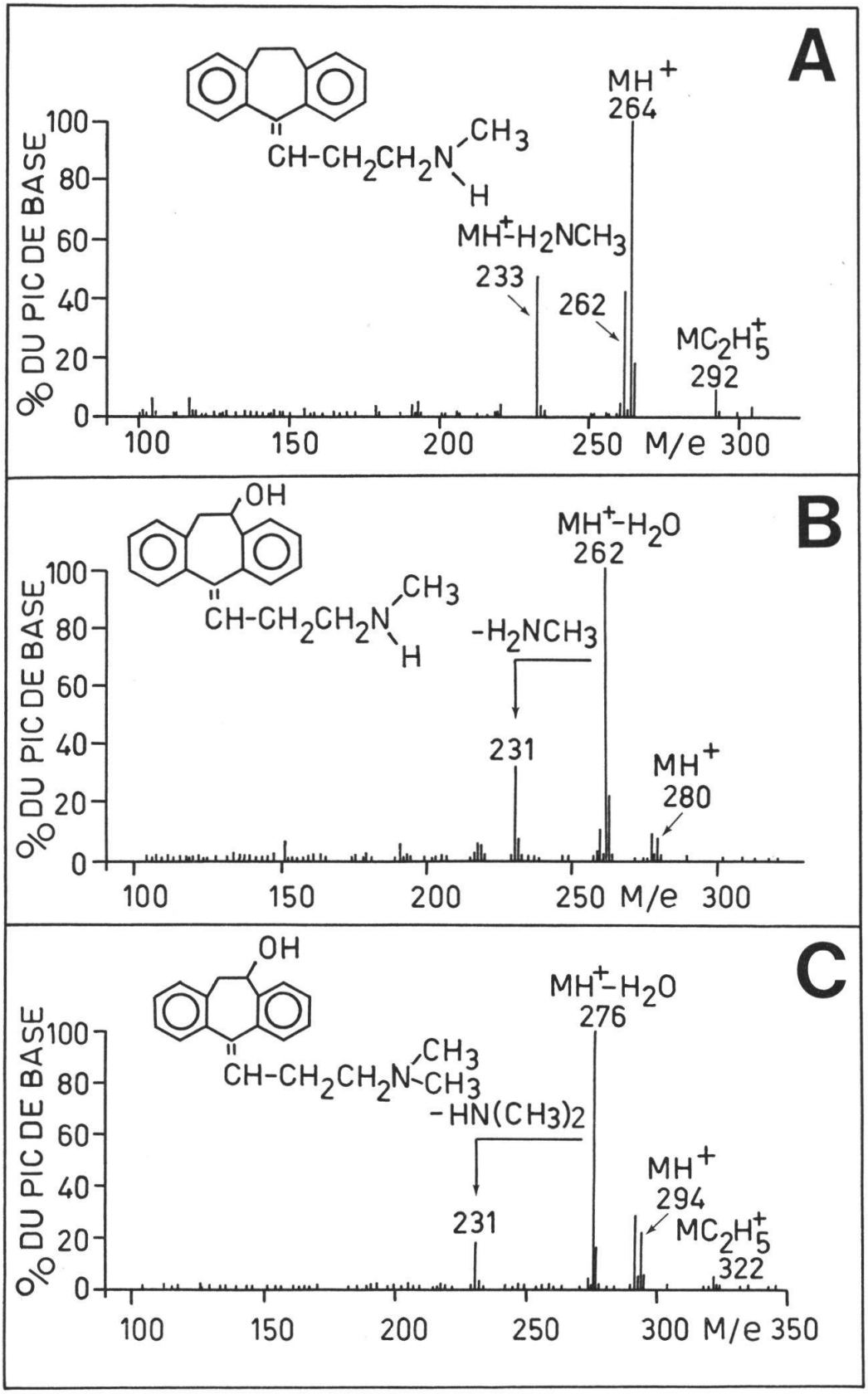


Fig. 4. — Chromatogramme reconstitué par ordinateur du flux total ionique provenant de l'injection d'un extrait d'urine d'un patient qui a reçu une dose d'amitriptyline. D'après FOLTZ et coll. (1974).

l'identification de la structure des métabolites, mais détermine le temps de rétention de chacun d'eux. A cette fin, une nouvelle injection est effectuée afin d'enregistrer un spectre de masse complet au moment où la substance intéressante émerge du chromatographe. L'élucidation de la structure de chaque métabolite est alors possible et la figure 5 donne le spectre de masse par ionisation chimique de chacun des composés. Bien que très simple, chaque spectre est caractéristique d'une substance et, malgré la grande similitude de structure des molécules, la distinction des spectres est aisée. De cette manière, et en une seule injection, il a été possible de déterminer les trois métabolites de l'amitriptyline: la nortriptyline (fig. 5A), l'hydroxynortriptyline (fig. 5B) et l'hydroxyamitriptyline (fig. 5C).


A
MH+
264
CH-CH2CH2N
CH3
H
MH+-H2NCH3
233
262
MC2H5+
292
% DU PIC DE BASE
100
80
60
40
20
0
100
150
200
250
M/e
300
B
OH
MH+-H2O
262
CH-CH2CH2N
CH3
H
-H2NCH3
231
MH+
280
% DU PIC DE BASE
100
80
60
40
20
0
100
150
200
250
M/e
300
C
OH
MH+-H2O
276
CH-CH2CH2N
CH3
CH3
-HN(CH3)2
231
MH+
294
MC2H5+
322
% DU PIC DE BASE
100
80
60
40
20
0
100
150
200
250
300
M/e
350

Du point de vue méthodologique, il apparaît donc que:

1. L'élucidation de la structure de chaque métabolite a été facilitée par un nombre relativement restreint de pics dans les spectres de masse.
2. Le pic MH^+, ou pic pseudo-moléculaire, n'est pas le plus abondant dans tous les cas, comme il serait souhaitable théoriquement. En effet, comme les métabolites hydroxylés sont facilement déshydratés dans la source elle-même, ce sont les pics $MH^+—H_2O$ qui sont les plus abondants, dans le spectre de ces substances.
3. Dans certains cas, des recombinaisons plus nombreuses peuvent avoir lieu, compliquant ainsi la lecture du spectre de masse. Dans le cas de la nortriptyline, l'ion $MC_2H_5^+$ provient de la condensation de deux molécules de gaz vecteur, le méthane, avec une molécule du métabolite.

Par cet exemple, on se rend compte que l'élucidation de structure de molécule inconnue n'est pas simple, mais que l'utilisation de la GC-MS, et particulièrement la technique de l'ionisation chimique facilitent le problème.

4.3. *Utilisation d'isotopes stables pour la détermination d'une voie métabolique*

L'emploi d'isotopes radioactifs en biologie humaine a toujours été problématique pour des raisons éthiques évidentes. Par contre, l'administration de composés marqués par des isotopes stables est possible, à condition de pouvoir disposer de méthodes judicieuses pour les détecter et les doser. La spectrométrie de masse est la méthode qui fournit le plus de renseignements sur les molécules marquées, puisque, par son spectre de masse, elle rend possible la détermination de la position de chaque atome substitué. Par ailleurs, les isotopes stables ont l'avantage de ne pas modifier de manière significative le comportement biologique de la substance (PENG et coll. 1972). Par leur caractère quasi-inoffensif pour l'organisme, ces molécules particulières sont un outil idéal pour suivre le métabolisme *in vivo* de substances exogènes. Leur utilisation permet également de connaître le métabolisme de substances endogènes. Dans ce cas, il faut compter sur la présence naturelle de l'isotope stable choisi dans l'organisme même. Pour l'azote par exemple, ainsi que pour l'oxygène et le deutérium, la proportion d'isotope stable naturel est négligeable par rapport à celle de la substance synthétisée. Par contre, si on choisit le C^{13}, il faudra tenir compte de son abondance naturelle, puisqu'elle excède 1 %.

◀ Fig. 5. — Spectres de masse par ionisation chimique (Méthane) des trois métabolites de l'amitriptyline: la nortriptyline (A), l'hydroxynortriptyline (B) et l'hydroxyamitriptyline (C). D'après FOLTZ et coll. (1974).

L'exemple qui suit a été réalisé par CURTIUS en pédiatrie (CURTIUS et coll., 1972 a et b): Si on administre à un enfant sain de la phénylalanine deutérée, on trouve dans l'urine les métabolites marqués tels la tyrosine et l'acide p-hydroxyphényl-lactique par exemple (fig. 6). Si l'expérience est répétée avec un sujet atteint de phényl-cétonurie,

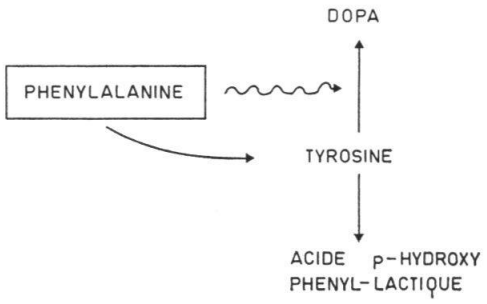


Fig. 6. — Métabolisme de la phénylalanine chez un enfant sain. D'après CURTIUS et coll. (1972b).

on n'observera aucune excrétion d'acide p-hydroxy-phényl-lactique marqué, mais paradoxalement une production plus forte de ce métabolite non marqué. Or, chez ce malade, la phénylalanine ne peut pas être métabolisée en tyrosine. Comment expliquer alors ce phénomène? C'est justement par l'utilisation judicieuse d'isotopes stables que CURTIUS a démontré finalement que la phénylalanine inhibe la formation de DOPA à partir de la tyrosine, cette dernière provenant de la nutrition. Comme cette voie métabolique est bloquée, une autre voie devient prépondérante et la tyrosine est alors dégradée en acide p-hydroxy-phényl-lactique.

5. QUELQUES PRINCIPES DE MÉTHODOLOGIE

Lors d'analyses par GC-MS, il est essentiel de procéder à un certain nombre de contrôles, afin de s'assurer que la mesure effectuée corresponde effectivement à ce qui doit être analysé. Il est bien connu que les extraits biologiques (sang, plasma, extraits végétaux,...) renferment une quantité très grande de substances les plus diverses. Si elles ont un temps de rétention identique, elles sont capables d'interférer parfois avec le composé que l'on désire analyser. Dans ce cas, il est certain que les mesures ne correspondent pas à la réalité *in vivo*.

Dans cette optique, il n'est pas rare que l'enregistrement de spectres de masse au moment de l'émergence d'un pic de chromatographie apparemment pur (c'est-à-dire, de forme gaussienne), ne laisse apparaître, après dépouillement, qu'un mélange de substances. Il est alors impossible de déterminer les structures des composés en présence.

Lorsqu'un dosage est envisagé, il est absolument nécessaire de tester minutieusement les méthodes d'extraction et de purification utilisées. Premièrement, les valeurs m/e (paramètres choisis pour la fragmentographie de masse), doivent correspondre, dans le spectre de référence, à une intensité relative suffisante. De cette manière une détection précise et sensible du composé recherché est réalisable. Deuxièmement, la valeur m/e doit, en règle générale, être la plus grande possible. Cela permet d'éviter également le risque d'interférence avec d'autres substances. En effet, les fragments de rapport m/e élevé ne seront pas contaminés par ceux qui proviennent d'impuretés de poids moléculaire inférieur. Il est aussi important de contrôler si les ions produits par les substances appartenant à la colonne du chromatographe et aux impuretés des solvants d'extraction et de dérivatisation, n'interfèrent pas sur les canaux choisis.

C'est ainsi seulement qu'un dosage spécifique et sensible pourra s'effectuer dans de bonnes conditions par fragmentographie de masse. De plus, des fragmentogrammes « propres » permettent d'utiliser une température de chromatographie plus élevée, puisque aucune substance étrangère, ni même le solvant, ne vient perturber la ligne de base. Il en résulte un gain de temps appréciable. Ainsi donc, si toutes les exigences particulières à cette méthode sont respectées, les techniques de GC-MS, et particulièrement la fragmentographie de masse, atteignent une très haute capacité d'analyse.

6. Comparaison avec d'autres méthodes

Dans le *tableau*, la sensibilité de diverses méthodes utilisées couramment en biologie et en médecine est reportée. Quelques remarques s'imposent à son propos.

Il est certain que, lorsqu'ils existent, les procédés utilisant une réaction immunologique sont rapides, sensibles et simples à exécuter. De cette manière, même à des sensibilités proches de la limite, ces tests donnant un résultat négatif, permettent d'exclure la présence de la substance recherchée dans le spécimen. Pourtant, ce sont certaines particularités structurales de la molécule à analyser qui déterminent la spécificité de la méthode. Or ces caractéristiques peuvent être communes à plusieurs métabolites de cette molécule, ainsi qu'à d'autres composés. La spécificité de cette méthode est donc variable, et une réaction immunologique positive devra être confirmée par d'autres tests non sérologiques.

Les méthodes spectrophotométriques (absorption et fluorescence) n'offrent sensibilité et spécificité que dans des cas bien limités. Ce n'est qu'après un contrôle minutieux que ces techniques pourront être utilisées en routine.

La chromatographie en phase gazeuse est plus sensible que la chromatographie sur couche mince ou sur papier d'un facteur 10 environ.

TABLEAU: Sensibilité approximative de quelques systèmes analytiques utilisés en biologie et médecine (déterminations quantitatives)

Méthode	Concentration minimale (mole/litre)	Quantité minimale (mole)	Volume minimal (microlitre)
Tests immunologiques	10^{-7} – 10^{-8}	10^{-11} –10^{-12}	10 – 100
Spectrophotométrie	10^{-6}	10^{-10}	100
Fluorimétrie	10^{-9}	10^{-13}	100
Chromatographie en phase gazeuse			
Détecteur à ionisation de flamme	10^{-4}	10^{-10}	1
Détecteur au phosphore	10^{-9}	10^{-15}	1
Détecteur à capture d'électrons	10^{-7}	10^{-13}	1
GC-MS	10^{-5}	10^{-10}	10
Fragmentographie de masse	10^{-9}	10^{-14}	10

Son application est limitée aux composés volatilisables. Des détecteurs spécifiques peuvent augmenter la sensibilité de cette technique jusqu'à 1000 fois (détecteur à capture d'électrons ou détecteur au phosphore).

Si un spectromètre de masse est utilisé comme détecteur spécifique (fragmentographie de masse), alors la sensibilité du système est comparable à celle du détecteur à capture d'électrons. De plus, et contrairement à cette dernière, toutes les classes de composés chimiques peuvent être analysées par fragmentographie de masse. L'utilisation d'un standard interne idéal est alors possible.

Le coût relativement élevé de l'investissement de départ ainsi que celui de l'utilisation d'un GC-MS semblent représenter un sérieux handicap. Il est pourtant amplement compensé par la rapidité avec laquelle des résultats de qualité sont obtenus. Une cinquantaine d'échantillons peuvent être analysés en une journée de 8 heures.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Comme il a été montré tout au long de cet article, la capacité d'effectuer des mesures qualitatives et quantitatives par GC-MS est applicable à un éventail très large de composés. La qualité des résultats obtenus démontre la validité de ces techniques dans les domaines de la biologie et de la médecine. Il est pourtant nécessaire que l'utilisation et le maintien de cet appareillage soient simplifiés à l'avenir. A cette condition, ces techniques seront utilisables hors du domaine exclusif de la recherche. D'ailleurs il est significatif que la tendance du marché actuel va vers la simplification et le contrôle par mini-ordinateur des différents organes du spectromètre de masse. Il est alors possible d'imaginer que prochainement la GC-MS pourra être utilisée en routine, dans les hôpitaux par exemple.

Remerciements. — Nous adressons nos remerciements au Professeur P.-E. Pilet, directeur de l'Institut de Biologie et Physiologie végétales de l'Université de Lausanne, pour les précieux conseils et les fructueux échanges qu'il nous a prodigués tout au long de la rédaction de cet article.

BIBLIOGRAPHIE

1. Travaux cités dans le texte

ARPINO, P. J., DAWKINS, B. G. et MCLAFFERTY, F. W. 1974. — A liquid chromatography/mass spectrometry system providing continuous monitoring with nanogram sensitivity. *J. Chromatogr. Sci.*, *12*, 574-578.

CURTIUS, H.-Ch., BAERLOCHER, K. et VÖLLMIN, J. A. 1972 a. — Pathogenesis of phenylketonuria: Inhibition of dopa and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta*, *42*, 235-239.

—, VÖLLMIN, J. A., et BAERLOCHER, K. 1972 b. — The use of deuterated phenylalanine for the elucidations of the phenylalanine-tyrosine metabolism. *Clin. Chim. Acta*, *37*, 277-285.

FOLTZ, R. L., CLARKS, P. A., KNOWLTON, D. A. et HOYLAND, J. R. 1974. — The rapid identification of drugs from mass spectra. Battelle, Columbus Lab., Columbus, Ohio/USA.

HORNING, E. C., CARROLL, D. I. DZIDIC, I., HAEGELE, K. D., HORNING, M. G. et STILLWELL, R. N. 1974. — Liquid chromatograph — mass spectrometer-computer analytical systems. A continuous-flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, *99*, 13-21.

MCLAFFERTY, F.W., KNUTTI, R., VENKATARAGHAVAN, R., ARPINO, P. J. et DAWKINS, B. G. 1975. — Continuous mass spectrometric monitoring of a liquid chromatograph with subnanogram sensitivity using an on-line computer. *Anal. Chem.*, *47*, 1503-1505.

PENG, S.-K., HO, K.-J. et TAYLOR, C. B. 1972. — Biologic effects of prolonged exposure to deuterium oxide. A behavioral, metabolic and morphologic study. *Arch. Path.*, *94*, 81-89.

PILET, P. E., 1961. — Les phytohormones de croissance. Masson, Paris.

— 1972. — Géoperception et géoréaction racinaire. *Physiol. vég.*, *10*, 347-367.

— 1975. — Abscisic acid as a root inhibitor: physiological analyses. *Planta* (Berl.), *122*, 299-302.

RIVIER, L. et PILET, P. E., 1974. — Indolyl-3-acetic acid in cap and apex of maize root: Identification and quantification by mass fragmentography. *Planta* (Berl.), *120*, 107-112.

—, MILON, H. et PILET, P. E. — en préparation.

2. Quelques ouvrages résumant les différentes techniques

ANBAR, M. et ABERTH, W.H., 1974. — Field ionization mass spectrometry: a new tool for the analytical chemist. *Anal. Chem. 46*, 59A.

ARPINO, P., 1975. — Un couplage difficile entre chromatographie liquide et spectrométrie de masse. *La Recherche*, *6*, 769-772.

BERTILSSON, L. et SJOQVIST, F., 1973. — Mass fragmentography in clinical psychopharmacology. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, *7*, 147-159.

BORGÅ, O., PALMER, L., SJOQVIST, F. et HOLMSTEDT, B., 1973. — Mass fragmentography used in quantitative analysis of drugs and endogenous compounds in biological fluids. In « Pharmacology and the future of man ». *Proc. 5th. int. congr. pharmacol., San Francisco, 3*, 56-68. Karger, Bâle.

BRANDENBERGER, H., 1970. — Gas chromatography in toxicological analysis. Improvement of selectivity and sensitivity by inserting multiple detectors. *Pharm. Acta Helv., 45*, 394.

BROOKS, C. J. W., 1971. — Gas chromatography — mass spectrometry. In « Mass spectrometry, a specialist periodical report, 1.» The Chemical Society, Londres, 288-307.

— et MIDDLEDITCH, B. S., 1973. — Gas chromatography — mass spectrometry. In « Mass spectrometry, a specialist periodical report, 2.» The Chemical Society, Londres, 302-335.

BURLINGAME, A. D., COX, R. E., DERRICK, P. J., 1974. — Mass spectrometry. *Anal. Chem. 46* (5), 248R-287R.

CAPRIOLI, R. M., FIES, W.F. et STORY, M. S., 1974. — Direct analysis of stable isotopes with a quadruple mass spectrometer. *Anal. Chem. 46*, 453A.

CIBA SYMPOSIUM, 1974. — The poisoned patient: the role of the laboratory. Elsevier, New York.

COSTA, E. et HOLMSTEDT, B., 1973. — Gas chromatography — mass spectrometry in neurobiology. *Adv. Biochem. Psychopharmacol. 7*, 1-168.

COSTELLO. C. E., HERTZ, H. S., SAKAI, T. et BIEMANN, K., 1974. — Routine use of a flexible gas chromatography — mass spectrometer — computer system to identify drugs and their metabolites in body fluids of overdose victims. *Clin. Chem. 20*, 255.

DREYER, W. J., KUPPERMANN, A., BOETTGER, H. G. et coll., 1974. — Automatic mass-spectrometric analysis: preliminary report of a novel mass-spectrometric system for biomedical applications. *Clin. Chem., 20*, 998.

ELDJARN, L., JELLUM, E. et STOKKE, O., 1974. — Application of gas chromatography — mass spectrometry in routine and research in clinical chemistry. *J. Chromatogr., 91*, 353-366.

FALKNER, F. C., SWEETMAN, B. J., et WATSON, J. T. — Biomedical application of selective ion monitoring. *Appl. Spectrosc. Rev.* (sous presse).

FINKLE, B. S. et TAYLOR, D. M., 1972. — A GC/MS reference data system for the identification of drugs of abuse. *J. Chromatogr. Sci. 10*, 312-333.

—, FOLTZ, R. L. et TAYLOR, D. M., 1974. — A comprehensive GC-MS reference data system for toxicology and biomedical purposes. *J. Chromatogr. Sci., 12*, 304-328.

FOLTZ, R. L., 1974. — Biomedical applications of chemical ionisation mass spectrometry. *Adv. in mass spectrom. 6*, 227-232.

FOWLER, K. T. et HIGH-JONES, P., 1957. — Mass spectrometry applied to clinical practice and research. *Br. Med. J. i*, 1205.

FRIGERIO, A., 1975. — Advances in mass spectrometry in biochemistry and medicine. Vol. 2. Spectrum publications, Holliswood, N.Y.

— et CASTAGNOLI, N., 1974. — Mass spectrometry in biochemistry and medicine. Raven Press, New York.

—, —, 1974. — Advances in mass spectrometry in biochemistry and medicine. Vol. 1. Spectrum publications, Holliswood, N.Y.

GORDON, A. E. et FRIGERIO, A., 1972. — Mass fragmentography as an application of gas-liquid chromatography — mass spectrometry in biological research. *J. Chromatogr., 73*, 401-417.

GROSTIC, M. F. et RINEHART, K. L., 1971. — Mass-spectral studies employing stable isotopes in chemistry and biochemistry. In « Mass spectrometry, techniques and applications ». Edit. Milne, G.W.A., Wiley-Interscience, New York, 217-286.

HAMMAR, C.-G., HOLMSTEDT, B., LINDGREN, J.-E., THAM, R., 1969. — The combination of gas chromatography and mass spectrometry in the identification of drugs and metabolites. *Adv. Pharmacol. Chemother. 7*, 53-89.

HOLMSTEDT, B. et PALMER, L., 1973. — Mass fragmentography: principles, advantages and future possibilities. *Adv. Biochem. Psychopharmacol. 7*, 1-14.

HORNING, H. C., HORNING, M. G., CARROLL, D. I., DZIDIC, I. et STILLWELL, R. N., 1973. — Chemical ionization mass spectrometry. *Adv. Biochem. Psychopharmacol., 7*, 15-31.

JENDEN, D. J. et CHO, A. K., 1973. — Applications of integrated gas chromatography mass spectrometry in pharmacology and toxicology. *Ann. Rev. Pharmacol., 13*, 371-390.

KLEIN, P. D. et PETERSON, S. V., 1973. — Instrumentation for stable isotopes, 255-274. — Drug quantitation by mass fragmentography, 291-359. in « Proc. First Inter. Conf. on stable isotopes in chemistry, biology and medicine ». US Atomic Energy Commission.

LAWSON, A. M., 1975. — The scope of mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin. chem., 21*, 803-824.

— et DRAFFAN, G. H., 1975. — Gas liquid chromatography — mass spectrometry in biochemistry, pharmacology and toxicology. *Progr. Med. Chem., 12.*

MAC FADDEN, W. H., 1967. — Mass-spectrometry analysis of gaschromatographic eluents. In « Advances in chromatography » Giddings J. C. et Keller R. A. éditeurs, Vol. 4, 265-332.

— 1973. — Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry: applications in organic analysis. Wiley-Interscience, New York, N.Y.

MATWIYOFF, N. A. et OTT, D. G., 1973. — Stable isotopes tracers in the life sciences and medicine. *Science, 181*, 1125-1133.

MAMER, O. A., MITCHELL, W. J. et SCRIVER, C. R., Editeurs, 1974. — Applications of gas chromatography — mass spectrometry to the investigation of human disease. McGill Université Montreal Childrens Hospital Research Institute, Montreal, Canada.

MILLARD, B. J., 1971. — Mass spectrometry in drug research. *Adv. Drug Res. 6*, 157.

MILLER, F. A., HEMINGWAY, A., NIER, A. O. et coll., 1950. — The development of, and certain clinical applications for, a portable mass spectrometer. *J. Thorac. Surg., 20*, 714.

PALMER, L. et HOLMSTEDT, B., 1975. — Mass fragmentography. The use of the mass spectrometer as a selective and sensitive detector in gas chomatography. *LKB Science Tools, 22*, 25-32.

PROX, A., 1973. — Some applications of mass spectrometry in drug metabolism studies. *Xenobiotica, 3*, 473.

Proceedings of the First international conference on stable isotopes in chemistry, biology and medicine. 9-11.5.1973, Argonne, Ill./USA. United States Atomic Energy Commission.

ROBOZ, J., 1975. — Mass spectrometry in clinical chemistry. In « Advances in clinical chemistry ». Bodanski O. et Latner A. L. éditeurs, Vol. 17, 109-191.

SIMPSON, C. F. et GOUGH, T. A., 1972. — Gas chromatography — mass spectroscopy interfacial systems. *CRC Critical Reviews in Anal. Chem., 3*, 1-40.

SPITELLER, G. et REMBERG, G., 1974. — Arzneimittelstoffwechseluntersuchungen mit der Massenspectrometrie. *Naturwissenschaften, 61*, 491-499.

STROLIN-BENEDETTI, M. et STROLIN, P., 1974. — The use of stable isotopes in metabolic studies. *Pharmacol. Clin., 1*, 15-23.

SWEELEY, C. C., YOUNG, N. D., HOLLAND, J. F. et GATTES, S. C., 1974. — Rapid computerized identification of compounds in complex biological mixtures by gas chromatography — mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, *99*, 507-517.

WALLER, G. R., 1972. — Biochemical applications of mass spectrometry. Ed. Wiley — Interscience, New York, N.Y.

WATSON, J. T., 1976 — An introduction to mass spectrometry for biomedical, environmental, and forensic applications. Raven Press, New York. N.Y.

—, PELSTER, D. R., SWEETMAN, B. J. et coll., 1973. — Display oriented data system for multiple ion detection with gas chromatography — mass spectrometry in quantifying biomedically important compounds. *Anal. Chem.*, *45*, 2071-2078.

WILLIAMS, D. H. et FLEMING, I., 1966. — Spectroscopic methods in organic chemistry. McGraw-Hill Publishing Company Limited, London.

WOLDRING, S., 1970. — Biomedical application of mass spectrometry for monitoring partial pressures. A technical review. *J. Assoc. Adv. Med. Instrum.* *4*, 43.

Manuscrit reçu le 29 mars 1976.