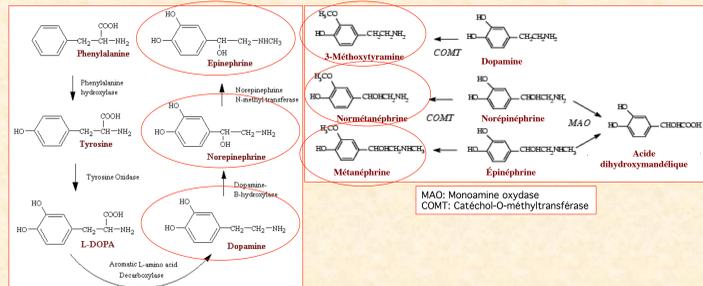


Résumé

Les catécholamines sont des hormones produites par la zone médullaire des glandes surrénales. Le dosage des concentrations urinaires des catécholamines et de leurs métabolites est utilisé pour le diagnostic clinique des tumeurs neurochromaffines sécrétant des catécholamines (phéochromocytomes, paragangliomes et neuroblastomes). **Objectif.** L'objectif était de développer et de valider une méthode HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem afin de doser simultanément les catécholamines urinaires (épinéphrine, norépinéphrine et dopamine), ainsi que leurs métabolites libres (métanéphrine, normétanéphrine et 3-méthoxytyramine). **Méthode.** La préparation des échantillons a été réalisée au moyen d'une extraction en phase solide (SPE) sur plaques OASIS WCX (Waters). La séparation chromatographique des analytes a été effectuée avec une colonne ACQUITY UPLC HSS T3, et les analytes ont été analysés sur une plateforme UPLC ACQUITY couplée à un spectromètre de masse triple quadripolaire (TQD) de Waters. **Résultats.** Nous avons observé que l'imprécision intra- et inter-essais pour les 6 composés étaient au plus de 5,6% et 11,6% respectivement, et que la rémanence était non significative. Cette méthode a démontré une excellente linéarité au-delà de la gamme de concentrations des courbes de calibration. Le pH initial des urines affecte le recouvrement des analytes après l'extraction de la colonne SPE. Cependant, après correction avec les standards internes, le pourcentage de récupération pour chacun des analytes après l'extraction de la colonne SPE était en moyenne de 98% ± 10,7 %. Les résultats de 98 patients mesurés par LC-MS/MS ont été corrélés avec la méthode HPLC avec détection coulométrique (ECD) du CHUM. Nous avons observé que la méthode par LC-MS/MS corrèle avec la méthode HPLC-ECD pour tous les analytes ($r = 0,7179-0,9908$; $p \leq 0,0001$). **Discussion et Conclusions.** La mesure des catécholamines et de leurs métabolites libres urinaires par notre méthode LC-MS/MS possède des avantages potentiels par rapport à la méthode par HPLC-ECD. Entre autres, la nouvelle procédure d'extraction est beaucoup plus rapide et nous permet d'extraire plus d'échantillons à la fois. Ayant la possibilité d'être automatisée, cette méthode permet un très haut débit d'analyses et de gagner du temps technique. De plus, nous sommes maintenant en mesure de quantifier le 3-méthoxytyramine non quantifié précédemment. Le dosage simultané des catécholamines et de leurs métabolites par LC-MS/MS semble une méthode avantageuse pour le diagnostic clinique des tumeurs neurochromaffines sécrétant des catécholamines.

Introduction

1. Biosynthèse et catabolisme des catécholamines.



3. Utilités cliniques:

- Pour aider à diagnostiquer ou éliminer un phéochromocytome, un paragangliome ou un neuroblastome:
- En présence de la triade classique (maux de tête, transpiration et tachycardie) et autres symptômes de l'hypertension
- Incidentalome surrénalien
- Surveillance des syndromes héréditaires, tels que MEN 2 et von Hippel-Lindau
- Diagnostic différentiel de l'hypertension essentielle

Objectifs

- Développer et valider une méthode HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem afin de doser simultanément les catécholamines urinaires (épinéphrine, norépinéphrine et dopamine), ainsi que leurs métabolites libres (métanéphrine, normétanéphrine et 3-méthoxytyramine).

Méthodes

Collecte d'urine 24 hrs

- Arrêt de la médication (si possible)
- Agent de conservation: 25 mL acide acétique 50%
- Conserver à 4 °C durant la collecte
- Réception: ajustement du pH entre 2-4



Extraction en phase solide

- Plaque Waters 96-puits OASIS WCX 2 mg résine, 30 µm
- Volume d'échantillon: 100 µL
- Conditionnement: 100 mM acétate d'ammonium pH 6,5
- Lavage: H₂O et méthanol
- Elution: 98% phase A + 2% phase B

Séparation chromatographique

- Plateforme Waters UPLC ACQUITY TQD
- Colonne : ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 µm (2,1 x 150 mm)
- Température de la colonnes: 30 °C
- Température des échantillons: 7 °C
- Volume d'injection: 20 µL
- Elution par gradient: 0,2% acide formique + 0,2% acide formique/acétonitrile
- Durée du chromatogramme: 8 minutes



Analyse en spectroscopie de masse en tandem

- Plateforme Waters UPLC ACQUITY TQD
- Conditions spectroscopiques:

	Trace MS	Cone (V)	Coll (eV)	STDi
Norépinéphrine	152>107	38	18	NE-D6
Épinéphrine	184>166	22	12	EP-D6
Normétanéphrine	166>133,9	28	20	EP-D6
Dopamine	137>91	42	20	Dopa-D4
Métanéphrine	180>165,1	34	17	MN-D3
3-Méthoxytyramine	151>91	35	19	MTY-D4
NE-D6	158>113	38	18	---
EP-D6	190>172	22	12	---
Dopa-D4	141>95	42	20	---
MN-D3	183>168,1	34	17	---
MTY-D4	155>95	35	19	---

Résultats

Figure 1. Séparation chromatographique des catécholamines urinaires et de ses métabolites libres.

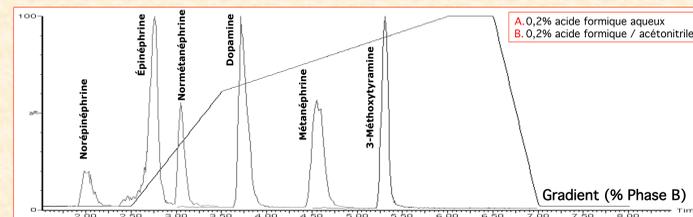


Tableau 1. Imprécision intra- et inter-essais.

N = 10	Valeurs cibles (nmol/L)		%CV intra-essai		%CV inter-essai	
	CQ1	CQ2	CQ1	CQ2	CQ1	CQ2
Norépinéphrine	195-361	1022-1531	4,3	3,6	6,4	7,4
Épinéphrine	54,1-99,9	388-584	5,6	4,6	11,6	7,3
Normétanéphrine	1491-2233	5973-8954	1,8	3,6	3,7	8,0
Dopamine	424-790	2925-4388	3,6	4,2	6,1	5,1
Métanéphrine	340-634	1957-2941	4,5	4,3	6,3	6,2
3-Méthoxytyramine	323-478	2434-3654	2,8	2,7	4,9	4,4

Tableau 2. Rémanence, linéarité et LoQ.

N = 5	Rémanence (%)	Linéarité (nmol/L)	LoQ (nmol/L)
Norépinéphrine	0,01	0 - 2200	8,5
Épinéphrine	0,02	0 - 1000	2,0
Normétanéphrine	ND	0 - 9000	1,7
Dopamine	0,02	0 - 5000	6,8
Métanéphrine	0,03	0 - 3300	1,6
3-Méthoxytyramine	0,01	0 - 4750	1,5

Rémanence: Dosage successif d'échantillons élevés suivi d'échantillons bas
 Rémanence = (B1-B3)/(H3-B3)*100
 LoQ: limite de quantification ([Analyte] où le ratio Signal/Bruit ≥ 10)

Tableau 3. Pourcentage de récupération des analytes purs après l'extraction en phase solide.

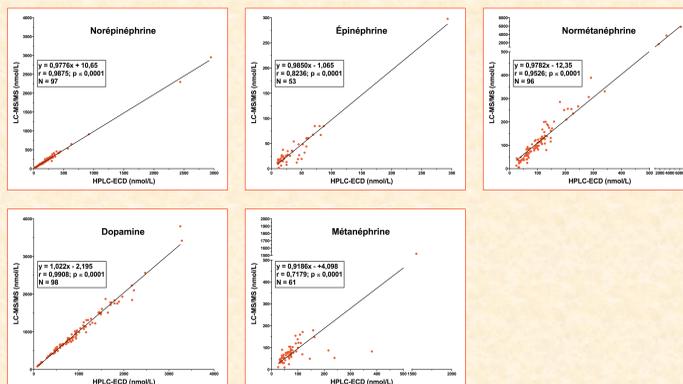
N = 5	NIVEAU BAS (Cat 7)		NIVEAU MOYEN (Cat 4)		NIVEAU HAUT (Cat 1)	
	Récupération (%)	Écart-type (%)	Récupération (%)	Écart-type (%)	Récupération (%)	Écart-type (%)
Norépinéphrine	98,0	17,7	98,0	10,4	97,9	3,8
Épinéphrine	97,9	16,1	97,8	11,9	97,7	5,3
Normétanéphrine	97,9	11,4	98,4	9,2	98,2	6,3
Dopamine	97,9	12,4	97,9	8,6	98,0	4,3
Métanéphrine	97,9	15,0	98,0	4,7	97,9	10,0
3-Méthoxytyramine	98,0	4,9	98,0	3,9	98,0	1,3

Le pourcentage de récupération des analytes après l'extraction en phase solide a été évalué par comparaison de la concentration des analytes purs obtenus avant et après l'extraction en phase solide, et corrigée avec leurs STDi respectifs.

Tableau 4. Exactitude.

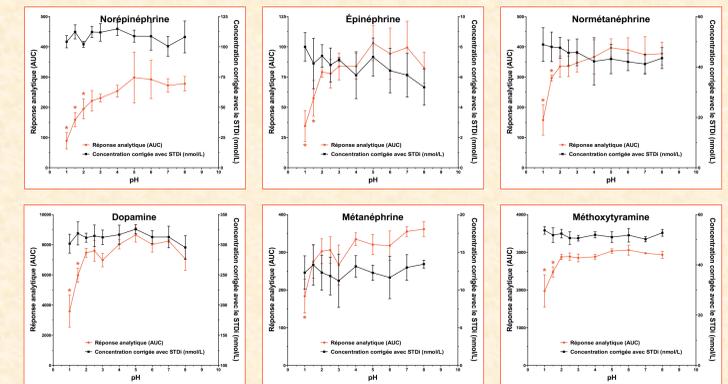
	Contrôle externe du RCPAQAP [®] -Biogenic Amines (nmol/L)					
	61-09		61-10		46-5	
	LC-MS/MS	Pairs	LC-MS/MS	Pairs	LC-MS/MS	Pairs
Norépinéphrine	746	556-752	434	375-525	388	331-481
Épinéphrine	287	236-438	227	173-301	618	557-1035
Normétanéphrine	13941	13700-20500	10107	9400-14200	ND	ND
Dopamine	4193	4010-4890	3193	2910-3550	2514	2130-2610
Métanéphrine	4030	3000-4600	2797	2200-3400	ND	ND
3-Méthoxytyramine	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Figure 2. Corrélation de la méthode LC-MS/MS avec la méthode HPLC-ECD.



Les catécholamines urinaires et leurs métabolites libres ont été mesurés avec la méthode HPLC-ECD (actuellement au CHUM) et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec notre nouvelle méthode LC-MS/MS. Suite à une analyse de corrélation Passing-Bablok, nous avons observé une corrélation linéaire entre les concentrations de tous les analytes mesurés avec la méthode LC-MS/MS et la méthode HPLC-ECD ($r = 0,7179-0,9908$, $p < 0,001$).

Figure 3. Recouvrement de chacun des analytes après l'extraction en phase solide selon le pH pré-extraction.



Le pH d'une collecte d'urine 24 heures a été réajusté avant l'extraction entre pH 1 et pH 8, et les catécholamines urinaires ont été analysés par LC-MS/MS. Les résultats représentent la moyenne ± ET (N = 4) de la réponse analytique (AUC) obtenue sans correction avec les STDi (●) ou de la concentration (nmol/L) obtenue après correction avec les STDi (●). Des différences statistiquement significatives sont indiquées comme suit: * $p < 0,05$ (ANOVA).

Conclusions

- La méthode par LC-MS/MS corrèle très bien avec celle par HPLC-ECD pour tous les analytes ($r = 0,7179-0,9908$; $p \leq 0,0001$)
- La méthode est précise et exacte
- La mesure des catécholamines et de leurs métabolites libres urinaires par notre méthode LC-MS/MS possède des avantages par rapport à la méthode par HPLC-ECD du CHUM:
 - Plus rapide (gain 4 heures de temps technique)
 - Permet d'extraire plus d'échantillons à la fois (80 au lieu de 50 patients)
 - Nous pouvons maintenant rapporter une valeur de 3-méthoxytyramine pour l'urine

Perspectives

- Automatisation de la procédure d'extraction en phase solide, pouvant permettre un très haut débit d'analyses et de gagner du temps technique

Remerciements

- Société Québécoise de Biologie Clinique (Bourse du Fonds de formation)
- Collègues résidents et biochimistes cliniques
- Waters Corporation pour le prêt de matériel lors de l'évaluation de la méthode

Références

1. Peitzsch. *et al* (2013) Clinica Chimica Acta. 418:50-58
2. UPTODATE. Clinical presentation and diagnosis of pheochromocytoma (May 12, 2014)