

Université de Montréal

**Analyse quantitative des cyanotoxines d'eau douce par
LDTD-APCI-MS/MS**

par

Pascal Lemoine

Département de Chimie

Faculté des Arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en Chimie

avril, 2010

© Pascal Lemoine, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Analyse quantitative des cyanotoxines d'eau douce par LDTD-APCI-MS/MS

présenté par :
Pascal Lemoine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marius D'Amboise, président-rapporteur
Dr. Sébastien Sauvé, directeur de recherche
Dr. Michèle Prévost, codirectrice de recherche
Dr. Pierre Chaurand, membre du jury

Remerciements

Je remercie les professeurs Sébastien Sauvé et Michèle Prévost pour l'opportunité de réaliser une maîtrise au sein de leur équipe, en plus de m'avoir accompagné au long du captivant parcours associé à l'obtention d'un diplôme d'études graduées. Merci aussi aux collègues du laboratoire pour la franche camaraderie, le soutien technique et scientifique : Liza Viglino, Pedro Segura, Paul Fayad, Koffi Badjagbo, Khadija Aboulfadl et Sherri Lynn MacLeod. Un autre merci aux techniciennes du CREDEAU de la Polytechnique : Jacinthe Mailly et Julie Philibert pour leur précieuse collaboration.

Bien sûr, je remercie ma conjointe, ma famille et ma belle-famille pour leur intérêt réel envers mes activités, pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette période de ma vie. Et plus particulièrement, je remercie, dans un ordre chronologique, les personnes suivantes qui ont influencé mon cheminement scolaire depuis la reprise de mes études en 1999 : ma mère, pour son amour inconditionnel; moi, pour m'être bott  l'... afin d'faire c'qui faut pour arriver où j'suis; le professeur Yves Robitaille et la technicienne de laboratoire Hélène Thibeault du Centre de Formation Professionnelle de Sorel-Tracy pour leur enthousiasme à répondre à chacune de mes questions; le professeur Roger Ayoub du cégep de Sorel-Tracy pour sa passion, même en dernière année de carrière; les professeurs Benoit Daoust, Gervais Bérubé, Pierre Tancrede et le technicien de laboratoire Jocelyn Bouchard de l'Université du Québec   Trois-Rivières pour leur excellent enseignement et leur grande disponibilité; Vincent Lemoine qui a fait germer l'idée d'entreprendre une maîtrise lors d'un moment d'errance et André Lajeunesse qui m'a fortement conseillé de ne pas abandonner la maîtrise alors que les démarches étaient déjà effectuées en ce sens.

Et pourquoi ne pas remercier? (dans aucun ordre précis) : Jean-Philippe Levesque, Jonathan Lacombe, Ariane et Christian Valois, David Nolet, Louis-Charles Rainville, Miguel Pomerleau, Alexandre Bonnier, Chantal Lachance, Kimberley Kelemen, Gym Clerc Lentsolo Yalli, Ian Gilbert, Éric Parenteau, David Lampron et Maxime Grenier.

Résumé

Avec la hausse mondiale de la fréquence des floraisons de cyanobactéries (CB), dont certaines produisent des cyanotoxines (CT), le développement d'une méthode de détection/quantification rapide d'un maximum de CT s'impose. Cette méthode permettrait de faire un suivi quotidien de la toxicité de plans d'eau contaminés par des CB et ainsi d'émettre rapidement des avis d'alerte appropriés afin de protéger la santé publique.

Une nouvelle technologie utilisant la désorption thermique induite par diode laser (LDTD) couplée à l'ionisation chimique sous pression atmosphérique (APCI) et reliée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a déjà fait ses preuves avec des temps d'analyse de l'ordre de quelques secondes. Les analytes sont désorbés par la LDTD, ionisés en phase gazeuse par APCI et détectés par la MS/MS. Il n'y a donc pas de séparation chromatographique, et la préparation de l'échantillon avant l'analyse est minimale selon la complexité de la matrice contenant les analytes.

Parmi les quatre CT testées (microcystine-LR, cylindrospermopsine, saxitoxine et anatoxine-a (ANA-a)), seule l'ANA-a a généré une désorption significative nécessaire au développement d'une méthode analytique avec l'interface LDTD-APCI. La forte polarité ou le poids moléculaire élevé des autres CT empêche probablement leur désorption.

L'optimisation des paramètres instrumentaux, tout en tenant compte de l'interférence isobarique de l'acide aminé phénylalanine (PHE) lors de la détection de l'ANA-a par MS/MS, a généré une limite de détection d'ANA-a de l'ordre de 1 µg/L. Celle-ci a été évaluée à partir d'une matrice apparentée à une matrice réelle, démontrant qu'il serait possible d'utiliser la LDTD pour effectuer le suivi de l'ANA-a dans les eaux naturelles selon les normes environnementales applicables (1 à 12 µg/L). Il a été possible d'éviter l'interférence isobarique de la PHE en raison de sa très faible désorption avec l'interface LDTD-APCI. En effet, il a été démontré qu'une concentration aussi élevée que 500 µg/L de PHE ne causait aucune interférence sur le signal de l'ANA-a.

Mots-clés : LDTD, APCI, MS/MS, anatoxine-a, phénylalanine, cyanotoxine, microcystine, saxitoxine, cylindrospermopsine, cyanobactérie.

Abstract

Within the context of the worldwide increasing frequency of cyanobacterial (CB) blooms, some containing cyanotoxins (CT), the development of a detection/quantification method for the fast analysis a maximum of CT is necessary. This method would allow daily tracking of the toxicity of CB-contaminated water such that, as warranted, appropriate measures can be taken quickly to protect public health.

A new technology using laser diode thermal desorption (LDTD) coupled to atmospheric pressure chemical ionization (APCI)-tandem mass spectrometry (MS/MS) has shown great potential to reduce analysis time to seconds. Analytes are desorbed by the LDTD, ionized in gas-phase by APCI and detected by MS/MS. Therefore, there is no chromatographic separation and sample treatment prior to analysis is minimal, depending on the complexity of the sample matrix.

Among the four CT tested (microcystin-LR, cylindrospermopsin, saxitoxin and anatoxin-a (ANA-a)), only ANA-a exhibited sufficient desorption which is necessary to develop an analytical method with the LDTD-APCI interface. The strong polarity or high molecular weight of the other CT probably inhibited their efficient desorption.

Optimization of instrumental parameters, while accounting for the isobaric interference caused by the acid amino phenylalanine (PHE) in the detection of ANA-a by MS/MS, generated a detection limit of the order of 1 $\mu\text{g/L}$ ANA-a. This value was obtained in a simulated natural matrix, demonstrating that it would be possible to use LDTD to monitor ANA-a in natural waters within the range of current applicable environmental guidelines (1 to 12 ($\mu\text{g/L}$)). Because PHE desorption is limited with the LDTD-APCI interface, this method avoids its interference on ANA-a analysis, even at PHE concentrations as high as 500 $\mu\text{g/L}$.

Keywords: LDTD, APCI, MS/MS, anatoxin-a, phenylalanine, cyanotoxin, microcystin, saxitoxin, cylindrospermopsin, cyanobacteria.

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	iv
Abstract	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xii
Chapitre 1. Introduction	1
1.1. Mise en contexte	1
1.2. Caractéristiques générales des cyanobactéries	2
1.3. Conditions de floraison	3
1.4. Stratégies de survie	4
1.5. Production de cyanotoxines	5
1.6. Cyanotoxines : propriétés physico-chimiques, toxicité et normes	6
1.6.1. Peptides cycliques (Microcystines)	6
1.6.2. Alcaloïdes	7
1.6.2.1. Anatoxine-a et ses dérivés	7
1.6.2.2. Saxitoxine et ses dérivés	9
1.6.2.3. Cyndrospermopsine et ses dérivés	10
1.6.2.4. Autres cyanotoxines	10
1.6.3. Toxicité : mécanismes d'action, LD ₅₀ et normes	11
1.6.3.1. Microcystines	11
1.6.3.2. Anatoxine-a et ses dérivés	12
1.6.3.3. Saxitoxine et ses dérivés	12
1.6.3.4. Cyndrospermopsine et ses dérivés	13
1.6.3.5. LD ₅₀ et normes	13
1.7. Analyse quantitative des cyanotoxines	15
1.7.1. Préparation des échantillons	15
1.7.2. Méthodes d'analyse des cyanotoxines	16
1.7.2.1. Méthodes immuno-biochimiques	16

1.7.2.2. Méthodes physico-chimiques.....	17
1.7.3. Avantages et inconvénients des méthodes d'analyse.....	20
1.8. Contexte et objectifs du projet de recherche.....	22
Chapitre 2. Partie Expérimentale.....	24
2.1. Principes de fonctionnement de la LDTD-APCI.....	24
2.1.1. LDTD.....	24
2.1.2. APCI.....	27
2.2. Matériels et méthodes.....	29
2.2.1. Composés chimiques, réactifs, solvants.....	29
2.2.2. Préparation des solutions et analyse par LDTD-APCI-MS/MS.....	29
Chapitre 3. Résultats et Discussion : Saxitoxine, cylindrospermopsine et microcystine-LR.....	31
3.1. Analyse de la saxitoxine par LDTD-ACPI-MS/MS.....	31
3.2. Analyse de la cylindrospermopsine par LDTD-APCI-MS/MS.....	33
3.3. Analyse de la microcystine-LR par LDTD-APCI-MS/MS.....	35
3.4. Perspectives futures.....	37
Chapitre 4. Analyse ultra-rapide de l'anatoxine-a par LDTD-APCI-MS/MS : Développement, validation de la méthode et résolution de la phénylalanine.....	40
Abstract.....	41
Introduction.....	41
Materials and Methods.....	44
Chemical and Reagents.....	44
Stock solution and bloom matrix preparation.....	44
Analysis with LDTD-ACPI-MS/MS.....	44
Method validation.....	46
Evaluation of PHE interference on ANA-a analysis by LDTD-APCI-MS/MS.....	47
Results and Discussion.....	47
LDTD-APCI-MS/MS parameter optimization for ANA-a analysis.....	47
Removal of PHE interference.....	52
Method validation.....	56
Conclusion.....	58

Acknowledgement.....	59
Supplemental information.....	59
Explanation of the 500 $\mu\text{g/L}$ PHE concentration associated with a dense cyanobacteria bloom.	61
Chapitre 5. Conclusion.....	67
Bibliographie.....	69

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Variations structurelles de l'anatoxine-a et de ses dérivés	8
Tableau 1-2. Variations structurelles de la cylindrospermopsine et de ses dérivés	10
Tableau 1-3. Toxicité des cyanotoxines retrouvées en eau douce	13
Tableau 1-4. Concentration maximale tolérable des cyanotoxines dans l'eau potable	14
Tableau 2-1. Mécanismes APCI (+/-)	28
Tableau 2-2. Paramètres LDTD-APCI-MS/MS et valeurs m/z attendues	30
Tableau 2-3. Patrons laser utilisés pour désorber la saxitoxine, cylindrospermopsine et microcystine-LR.....	30
Tableau 3-1. Valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI et autres méthodes pour la saxitoxine	31
Tableau 3-2. Valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI et autre méthode pour la cylindrospermopsine	34
Tableau 3-3. Valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI et autres méthodes pour la microcystine-LR.....	36
Tableau 4-1. Optimal Selected Reaction Monitoring (SRM) parameters for the analysis of ANA-a, CLO and PHE with MS/MS.....	46
Tableau 4-2. Comparisons of method validation parameters for external and internal calibration curves of ANA-a, with or without CLO (10 µg/L).	57
Tableau 4-3. Accuracy and precision for external and internal calibration curves of ANA-a, with and without CLO (10 µg/L, n=5).	57
Tableau 4-4. Evaluation of CLO (10 µg/L) as an IS. (n = 8, SRM m/z 406.1 → 101.1 (CLO) and 166.1 → 149.1(ANA-a)).	66

Liste des figures

Figure 1-1. Structure générale des microcystines	6
Figure 1-2. Structure générale de l'anatoxine-a et de ses dérivés.....	8
Figure 1-3. Structure générale de la saxitoxine et de ses dérivés.....	9
Figure 1-4. Structure générale de la cylindrospermopsine et de ses dérivés	10
Figure 1-5. Préparation de l'échantillon avant l'analyse.....	16
Figure 1-6. Acquisition SRM par MS/MS	20
Figure 1-7. Comparaison de la performance des méthodes d'analyse.....	21
Figure 2-1. Schéma du fonctionnement de l'interface LDTD	25
Figure 2-2. Diagramme théorique d'Arrhenius (Vaporisation vs Fragmentation)	26
Figure 3-1. Spectre saxitoxine, ionisation (+) (mode d'acquisition balayage complet, valeurs m/z 30 – 380, puissance laser 60 %).	31
Figure 3-2. (a) Spectre cylindrospermopsine, ionisation (+). (b) Spectre cylindrospermopsine, ionisation (-). (Mode d'acquisition balayage complet, valeurs m/z 30 – 450, 60 % de puissance laser).	33
Figure 3-3. (a) Spectre microcystine-LR ionisation (+). (b) Spectre microcystine-LR ionisation (-) (Mode d'acquisition balayage complet, valeurs m/z 100 – 1000, puissance laser 60 %).	35
Figure 4-1. ANa-a and PHE structures and corresponding molecular weights (M.W.).	42
Figure 4-2. (a) Ana-a desorption peak. (b) Ana-a full scan spectrum (m/z 30 – 300). (c) Ana-a full scan product ion spectrum (m/z 30 – 180) acquired with 18 V collision energy. All three analyses (a-c) were carried out at 35 % laser power.	48
Figure 4-3. Average peak area of 500 $\mu\text{g/L}$ ANA-a and 500 $\mu\text{g/L}$ PHE. (n = 3 for each laser power (%) used, SIM m/z 166.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.	49
Figure 4-4. (a) Effects on ANA-a signal intensity of changing the carrier gas flow rate (1 to 6 L/min) with fixed discharge current values (1 to 6 μA). (b) Effects on ANA-a signal intensity of changing the discharge current value (1 to 6 μA) with fixed carrier gas	

flow rates (1 to 6 L/min). (For each setting: n = 3, 20% laser power, SRM m/z 166.1 → 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.	51
Figure 4-5. (a) PHE full scan spectrum (m/z 30 – 180) (20% laser power). (b) PHE full scan product ion spectrum (m/z 30 – 180) acquired with a 60% laser power and 10 V collision energy.	54
Figure 4-6. Comparison of average peak area given by ANA-a SRM transitions for the following solutions: blank, PHE (500 $\mu\text{g/L}$), ANA-a (25 $\mu\text{g/L}$) and a mix of PHE (500 $\mu\text{g/L}$) + ANA-a (25 $\mu\text{g/L}$). (n = 5, 20% laser power, using parameters optimized for ANA-a analysis). Vertical error bars represent standard deviations from the mean. ..	55
Figure 4-7. Variability of the corona discharge current (μA) at constant corona discharge voltage (V).	59
Figure 4-8. Effect of solvent pH on ANA-a analysis by LDTD-APCI-MS/MS. (n = 3, laser power 20%, SRM m/z 166.1 → 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.	60
Figure 4-9. Degradation assessment of ANA-a under experimental conditions. (pH 11.5, n = 3, laser power 20%, SRM m/z 166.1 → 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.	60
Figure 4-10. Effect on ANA-a signal intensity/variability of analyte deposition solvent. (n = 8, SRM m/z 166.1 → 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.	61
Figure 4-11. Desorption profile of bloom matrix blank and Ana-a 1 $\mu\text{g/L}$ in bloom matrix for SRM m/z 166.1 → 131.1 (a,b) and SRM m/z 166.1 → 149.1 (c,d)	63
Figure 4-12. Matrix effect assessment for an external calibration with optimal conditions for Ana-a analysis (SRM m/z 166.1 → 149.1, n = 3, pH 11.5, 50 % MeOH with laser power at 20 %). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.	64
Figure 4-13. Atrazine, caffeine, 17 α -ethinylestradiol and CLO structures and corresponding M.W.	65

Liste des sigles et abréviations

$(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$	Clusters d'eau
% RSD	Relative standard deviation / écart type relatif
AA	Acide aminé, acides aminés
Adda	Acide (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-dièneoïque
(6Z)Adda	Stéréo-isomère d'Adda
ANA-a	Anatoxine-a
AP	Affinité Protonique
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization / Ionisation chimique sous pression atmosphérique
Arb	Unités arbitraires
BTEX	Benzène, toluène, ethylbenzène, xylène
CB	Cyanobactérie, cyanobactéries
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
CLO	Clomiphène / Clomiphene
CT	Cyanotoxine, cyanotoxines
CYN	Cylindrospermopsine
dd-H ₂ O	Eau déminéralisée/distillée
Dha7	Déhydroalanine
e ⁻	Électron, électrons
E _a	Énergie d'activation
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
ESI	Electrospray / Nébulisation électrostatique
fwhm	Full width at half maximum
GC	Gas chromatography / Chromatographie en phase gazeuse
GTX	Gonyautoxine
HPLC	High performance liquid chromatography / Chromatographie liquide à haute performance
IS	Étalon interne / internal standard
L	Leucine
LC	Liquid chromatography / Chromatographie liquide

LD ₅₀	Dose létale tuant 50% d'une population
LDTD	Laser diode thermal desorption / Désorption thermique induite par diode laser
Log <i>k</i> _{ow}	Logarithme de la constante de partage octanol-eau
m/z	Masse sur charge / mass-to-charge
MC	Microcystine, microcystines
MC-LR	Microcystine-Leucine/Arginine
MDL	Method detection limit / Limite de détection de la méthode
MLQ	Method limit of quantification / Limite de quantification de la méthode
MS	Mass spectrometry / Spectrométrie de masse
MS/MS	Tandem mass spectrometry / Spectrométrie de masse en tandem
M.M.	Masse molaire / Molecular weight
n	Nombre de réplicats
OMS	Organisation mondiale de la santé
PHE	Phénylalanine / Phenylalanine
PST	Paralytic Shellfish Toxins
q	Chambre de collision
QC	Spiked bloom matrix sample of ANA-a
QIT	Quadrupole ion-trap
QqQ	Triple quadripôles
QqTOF	Hybrid quadrupole time-of-flight
R	Arginine
SIM	Selected ion monitoring / Balayage d'ions sélectionnés
SPE	Solid phase extraction / Extraction sur phase solide
SRM	Selected Reaction Monitoring / Balayage d'ions fragments sélectionnés
STX	Saxitoxine
TP	Thermospray / Nébulisation thermique
Y	Tyrosine

Chapitre 1. Introduction

1.1. Mise en contexte

Il est maintenant reconnu que la composition de l'atmosphère actuelle résulte principalement de la présence de microorganismes nommés cyanobactéries (CB) ou plus communément : algues bleu-vert. Depuis plus de 2 milliards d'années que ces pionniers photosynthétiques s'adaptent efficacement aux différentes conditions environnementales, colonisant ainsi la planète entière.¹ De nombreux contacts néfastes survenus entre ces microorganismes et l'être humain sont répertoriés depuis près de 60 ans.²⁻³ Cependant, l'alarme n'a été véritablement sonnée qu'à la suite d'un incident survenu au Brésil en 1996. L'enquête de ce cas, suivant le décès d'une cinquantaine de patients préalablement dialysés avec de l'eau contaminée par des cyanotoxines (CT), a permis de mettre en lumière le pouvoir létal des CT sur l'humain.⁴

Les travaux caractérisant la première CT d'eau douce datent du milieu des années 60⁵, mais c'est seulement suite à l'événement déclencheur du Brésil que des chercheurs du monde entier se sont mobilisés afin d'enquêter sur les conditions de prolifération des CB en eau douce et sur les CT produites. Malgré les progrès réalisés, l'évaluation de la quantité potentielle de CT contaminant un plan d'eau ne se résume pas qu'à identifier le genre, l'espèce et la lignée de CB. En effet, les CT produites en eau douce sont formées de quatre familles distinctes de composés chimiques dont la production n'est pas la propriété exclusive d'une seule espèce de CB. De plus, à l'intérieur d'une espèce considérée toxique, seules les lignées de CB possédant le bagage génétique approprié produiront des CT.^{1,6} Finalement, nous sommes encore à évaluer les conditions environnementales, ainsi que l'explication écologique, favorisant sans équivoque la prolifération des CB et la production de CT.⁷⁻⁸ C'est pourquoi la détection et la quantification des CT sont de première importance dans l'évaluation de la toxicité des plans d'eau douce, et que le développement de méthodes analytiques à cette fin occupe les chercheurs de toutes les parties du globe depuis maintenant plus de 20 ans.

1.2. Caractéristiques générales des cyanobactéries

Les CB sont des microorganismes procaryotes, c'est-à-dire sans organelles ni noyau délimitant le matériel génétique, possédant une paroi cellulaire rigide apparentée à celle des bactéries de type Gram-négative. Elles utilisent la photosynthèse comme processus de formation d'énergie métabolique à l'aide du pigment photosynthétique chlorophylle *a* (chl *a*), et de pigments photosynthétiques intrinsèques aux CB, soit la phycocyanine ou la phycoérythrine. Chacun de ces pigments donnent une coloration aux algues : bleu-vert dans le cas de la phycocyanine et rougeâtre dans le cas de la phycoérythrine.^{6,9} Ceci explique le nom « cyanobactérie » donné à ces microorganismes retrouvés en eau douce par l'association du préfixe cyan, qui désigne la coloration bleu-vert générée par le processus de la photosynthèse, et du mot bactérie. Ce terme témoigne aussi des particularités des CB qui joignent certaines propriétés des bactéries à celles des végétaux.

Plus de 150 genres de CB sont répertoriés et répartis en plus de 2000 espèces. Parmi celles-ci, seulement une quarantaine sont reconnues comme toxique.¹⁰ Elles ont colonisé les cours d'eau douce et marine, de façon planctonique et benthique, ainsi que les sols. Leur exceptionnelle capacité d'adaptation leur a permis de survivre et de croître dans des sources d'eau thermale, acide ou à forte concentration saline, ainsi que sur les sols nus ou rocaillieux, les déserts et même dans les neiges et glaces des deux pôles.¹

Les CB se multiplient de façon asexuée, soit par fission binaire ou multiple, soit par production de spores. Elles prolifèrent comme entité unicellulaire où chaque cellule est compétitive par rapport aux autres, ou comme entité multicellulaire nommée trichome et présentant une structure filamenteuse formée par adhésion directe entre les parois des cellules individuelles. Les cellules constituant le trichome agissent en symbiose par échange de nutriments ou de molécules régulatrices du métabolisme. Les CB unicellulaires engendrent aussi des agrégats dont la cohésion est assurée par une sécrétion produite lors de la phase de croissance de la colonie.¹¹

Comme l'habitat de prédilection des CB sont les cours d'eau douce en surface et que ces derniers sont d'importantes sources d'eau potable où les nappes phréatiques font défaut¹, cet ouvrage ne traitera que des CB se trouvant dans de tels cours d'eau.

1.3. Conditions de floraison

La période de prolifération des CB, souvent caractérisée par la présence d'un tapis vert-bleuâtre et visqueux à la surface d'un plan d'eau, se nomme floraison.¹² Il est à noter que ce type de floraison n'est pas le seul indicateur de la présence de CB comme il sera démontré à la section 1.4. La floraison survient lorsque certaines conditions environnementales situées dans une zone optimale sont réunies : température, quantité de nutriments, intensité lumineuse et débit du cours d'eau.^{1,6}

De façon générale, la température de croissance est de 20 – 25 °C, jusqu'à un maximum de 35 °C, quoique pour certaines espèces la prolifération peut se produire à 10 °C.¹² L'azote et plus particulièrement le phosphore demeurent les nutriments les plus importants car ils sont considérés comme des facteurs limitant dans les cours d'eau.¹³ Étant un organisme photosynthétique, l'intensité lumineuse et la durée d'illumination sont primordiales, d'où le fait que les CB ne colonisent pas les nappes phréatiques. Un dernier facteur physique dont l'importance ne peut être négligée provient du débit du cours d'eau qui doit être faible, voire stagnant. Ceci permet l'accès au nutriment grâce à un brassage modéré ou quasi inexistant du milieu, mais aussi la stratification des eaux. Cette stratification crée des conditions variables de température et de luminosité, en fonction de la profondeur, que les différentes espèces utilisent à leurs avantages.¹⁴

Lorsque ces conditions sont réunies au Québec et dans l'hémisphère Nord, en général on retrouve des épisodes de floraison débutant au mois de juin et se poursuivant jusqu'à la fin du mois de septembre.¹² Ces épisodes se produisent naturellement, mais la fréquence et l'intensité de ces événements ont amplifié en raison de la contribution anthropomorphe au phénomène d'eutrophisation. Cette eutrophisation survient lorsque la charge en nutriments (azote et phosphore) est supérieure aux conditions normales, favorisant la croissance du phytoplancton en général, incluant les CB. Cette biomasse anormalement élevée induit indirectement une réduction de la concentration d'oxygène dissous dans le plan d'eau, suite à la consommation d'oxygène par les microorganismes qui se nourrissent des CB mortes, et cette condition d'anoxie détruit la vie aquatique. De plus, le manque d'oxygène provoque le relargage des substances liées aux sédiments, dont le phosphore, accélérant le processus d'eutrophisation.¹³

La contribution de l'homme à ce phénomène n'est plus mise en doute et les rejets riches en azote et phosphore, provenant du milieu agricole par suite du ruissellement et du milieu urbain par déversement direct dans les étendues d'eau, sont les éléments clés à réduire. De plus, si on adhère aux théories clamant que les activités humaines accélèrent le réchauffement climatique, il est plausible de penser que les longues périodes de chaleur qui en résultent allongent la durée des conditions optimales favorisant la croissance des CB.¹⁵⁻¹⁶

1.4. Stratégies de survie

Les épisodes de floraison sont normalement caractérisés par la prédominance d'une ou de quelques espèces de CB, qui se sont avérées les mieux adaptées aux conditions environnementales au détriment du reste de la communauté phytoplanctonique.¹⁰ Pour être en mesure de proliférer et de s'accaparer du milieu, les CB utilisent plusieurs stratégies de survie dont voici les principales.

Une caractéristique importante et exclusive aux CB est la capacité de fixer l'azote atmosphérique, c'est-à-dire de le convertir en ammoniac. Cette faculté est primordiale pour l'établissement d'une colonie dans un environnement pauvre en azote inorganique. Cependant, pour effectuer cette conversion, les CB multicellulaires doivent se modifier en cellule de type hétérocyste contenant un centre de transformation de l'azote atmosphérique. Il est à noter que cette fonction n'est pas spécifique aux hétérocystes et que d'autres espèces de CB fixent l'azote atmosphérique.^{11,17}

Comme autre mécanisme procurant un avantage marqué, on note l'aptitude des CB à se positionner à une profondeur précise dans une colonne d'eau stratifiée ou non (flottabilité). Celles qui démontrent cette capacité le font par l'entremise de vésicules gazeuses et de réserves de sucres agissant comme ballast. Ce positionnement leur permet non seulement d'accéder aux nutriments, mais aussi d'obtenir l'intensité lumineuse optimale pour proliférer.¹ Jumelée à ce mécanisme, on note l'utilisation de différentes longueurs d'ondes par les pigments photosynthétiques phycocyanine et phycoérythrine, comparativement à celles utilisées par la chl *a* contenue chez les autres phytoplanctons.¹⁰

Lorsque les conditions environnementales sont totalement défavorables à la croissance des CB, comme l'arrivée de l'hiver dans l'hémisphère Nord par exemple, certaines CB multicellulaires se différencient en akinètes. Les cellules du type akinète possèdent une paroi cellulaire très rigide et des réserves énergétiques permettant au microorganisme de survivre et de recommencer à croître lorsque les conditions redeviennent propices.^{6,17} Il résulte de l'ensemble de ces stratégies que les CB et les épisodes de floraison ne sont pas nécessairement visibles à la surface d'un plan d'eau, ce qui est particulièrement le cas des espèces benthiques.

1.5. Production de cyanotoxines

Comme mentionné à la section 1.1, les CT sont produites par plus d'une quarantaine d'espèces de CB, dont les souches spécifiques à chaque espèce doivent posséder le matériel génétique nécessaire pour les synthétiser. De plus, les quatre familles de CT retrouvées en eau douce, soit les microcystines (MC), la saxitoxine (STX) et ses dérivés, l'anatoxine-a (ANA-a) et ses dérivés ainsi que la cylindrospermopsine (CYN) et ses dérivés, ne sont pas l'exclusivité d'une seule espèce, et une même espèce peut produire plus d'un type de CT.

Encore aujourd'hui on se questionne à savoir si les CT sont des métabolites primaires, dont l'expression est constitutive, ou bien des métabolites secondaires produits suite à une réponse face à un stimulus environnemental.⁶ À priori, la deuxième hypothèse était la plus plausible car la quantité de CT produite par une lignée donnée semblait directement reliée aux conditions environnementales favorables à sa croissance. Dans le même ordre d'idées, on croyait, par le biais des MC, à des effets allélopathiques entre les CB et le restant du phytoplancton : (i) diminution de la prédation des zooplanctons sur les CB de souches toxiques, (ii) inhibition de la croissance de certaines espèces d'algues et (iii) symbiose avec d'autres microorganismes favorisant l'implantation des CB dans le milieu.^{1,7-8}

Pour soutenir l'hypothèse que les CT sont des métabolites primaires, on a corrélé la quantité de CT produites à la phase de croissance exponentielle de la population de CB. Dans la majorité des cas, le contenu en CT lors de la phase de croissance de la population est à 80 – 90 % intracellulaire, et aucun système de transport des CT n'a été identifié. Cette

constatation rend incertaine l'hypothèse que la cause des effets allélopathiques observés soit due à la présence des CT dans le milieu. Cependant, aucun rôle métabolique, en tant que métabolites primaires, n'a été répertorié jusqu'à maintenant.^{1,6-8}

1.6. Cyanotoxines : propriétés physico-chimiques, toxicité et normes

La distinction effectuée dans les sections précédentes, en quatre familles de CT en fonction de la structure chimique propre à chaque type, n'est pas une classification reconnue. On les distingue plutôt selon une structure chimique plus générale, soit les peptides cycliques et les alcaloïdes, ou bien selon leurs effets toxiques, en hépatotoxines, neurotoxines et cytotoxines.¹

1.6.1. Peptides cycliques (Microcystines)

La CT la plus étudiée à ce jour, et présentant plus de 70 dérivés, est la MC. Cette molécule est constituée de 7 acides aminés (AA) se rejoignant aux extrémités pour former une structure cyclique.¹⁸ La Figure 1-1 présente la structure générale des MC :

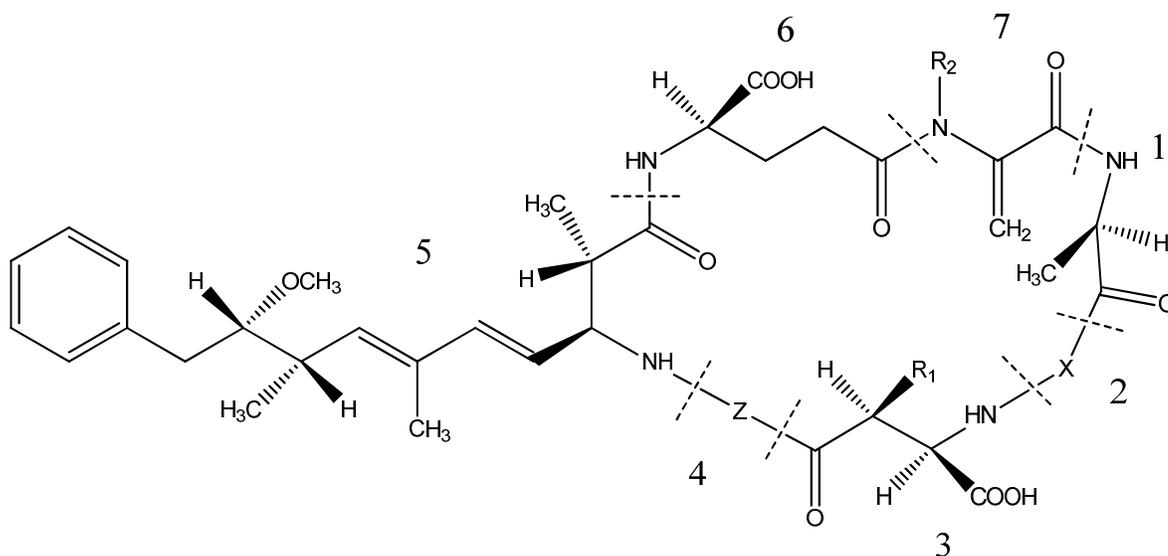


Figure 1-1. Structure générale des microcystines

1 = D-Alanine ; **2** = L-X (variable) ; **3** = D-érythro-β-méthyl-D-acide aspartique ; **4** = L-Z (variable) ; **5** = Adda (acide (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque) ; **6** = D-glutamate ; **7** = N-méthyl-déhydroalanine. **R₁** et **R₂** = H ou CH₃.

Les dérivés proviennent principalement de la substitution d'AA en position **2** et **4** ou du retrait/ajout d'un CH₃ sur les fonctionnalités **3** et **7**. La MC la plus répandue est la MC-LR où en position **2** se situe l'AA leucine (L) et en position **4** l'AA arginine (R). Il est à noter que des isomères géométriques des MC sont possibles. En effet, le groupement Adda possède des atomes de C asymétriques, et il a été démontré que la toxicité variait selon l'isomère impliqué (voir sections 1.6.3.1 et Tableau 1.3).¹⁹

Selon leur composition, les MC présentent une gamme de masses molaires (M.M.) située entre 900 – 1100 g/mol. La structure générale possède deux fonctions carboxyliques (position **3** et **6**, pK_a ≈ 3.4), et selon la présence d'une ou deux R (position **2** et **4**, pK_a ≈ 12.5), les MC adoptent la forme anionique ou neutre en milieu aqueux naturel. Dans ces mêmes conditions, la solubilité de la MC-LR > 1 g/L mais, de façon inattendue, elle démontre un caractère hydrophobe élevé (log *k_{ow}* ≈ 4). On explique ce phénomène par l'effet simultané du groupement Adda hydrophobe et des fonctions polaires carboxyliques, amines et amides.²⁰ Les MC possèdent une grande stabilité chimique, probablement à cause de leur structure cyclique. Conséquemment, elles résistent à l'oxydation et à l'hydrolyse chimique à pH neutre, elles conservent leur toxicité après ébullition et elles ne sont photosensibles qu'en présence de pigments photosynthétiques.¹ Leur M.M. élevée et leur caractère polaire font en sorte qu'elles ne sont que très peu ou pas volatiles.¹⁰

1.6.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés produits principalement par les plantes et réputés pour être actifs biologiquement. Leurs propriétés proviennent de la présence d'un ou plusieurs hétérocycle(s) azoté(s) à l'intérieur de leur structure chimique.¹

1.6.2.1. Anatoxine-a et ses dérivés

L'ANA-a et ses dérivés sont des amines secondaires bi-cycliques possédant un groupement cétone. Les différents dérivés se distinguent principalement par la présence d'une double liaison sur le cycle et d'une substitution au niveau du groupement cétone. L'ANA-a, aussi nommée plus systématiquement 2-acétyl-9-azabicyclo(4,2,1)non-2-ène, a été la première CT caractérisée.²¹ La Figure 1-2 présente sa structure générale protonée

ainsi que celles des produits résultant de sa dégradation, la dihydroanatoxine-a et l'époxyanatoxine-a²² :

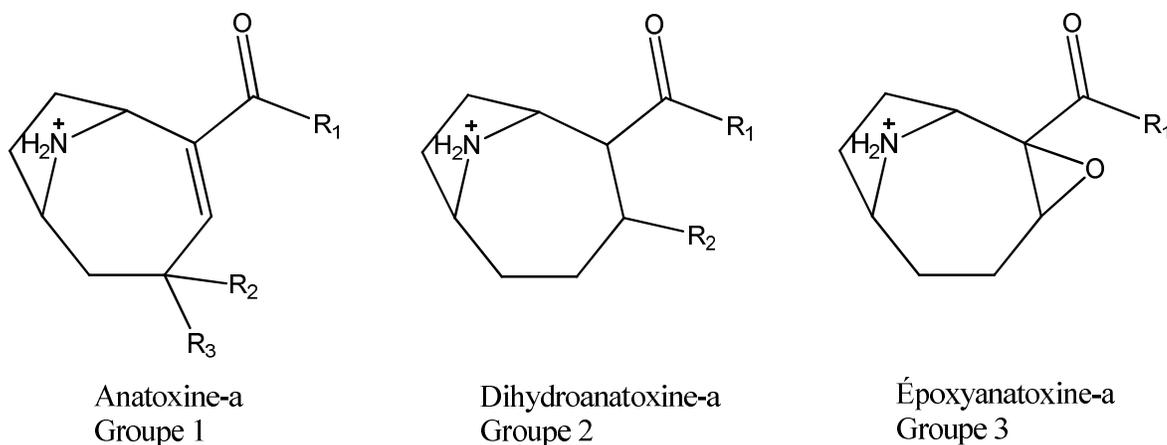


Figure 1-2. Structure générale de l'anatoxine-a et de ses dérivés

Le Tableau 1-1 présente les différents dérivés avec les différences structurales qui les caractérisent.¹⁸

Tableau 1-1. Variations structurales de l'anatoxine-a et de ses dérivés

Groupe	R ₁	R ₂	R ₃	Dérivé
1	CH ₃	H	H	Anatoxine-a
	C ₂ H ₅	H	H	Homoanatoxine-a
	C ₂ H ₅	OH	H	4S-hydroxyhomoanatoxine-a
	C ₂ H ₅	H	OH	4R-hydroxyhomoanatoxine-a
	C ₂ H ₅	C=O		Cétohomoanatoxine-a
2	CH ₃	H	---	Dihydroanatoxine-a
	C ₂ H ₅	H	---	Dihydrohomoanatoxine-a
	C ₂ H ₅	OCH ₃	---	Hydrométhoxyhomoanatoxine-a
3	CH ₃	---	---	Époxyanatoxine-a
	C ₂ H ₅	---	---	Époxyhomoanatoxine-a

L'ANA-a et l'homoanatoxine-a sont de petites molécules ayant respectivement une M.M. de 165 et 179 g/mol. Ces molécules sont très solubles dans les eaux naturelles car elles y existent sous la forme cationique en raison de la protonation de la fonction amine ($pK_a \approx 9.6$).²³ Ces composés sont stables en milieu acide ($pH \leq 3$), alors qu'ils se dégradent en conditions alcalines en plus d'être photosensibles. L'ANA-a et l'homoanatoxine-a sont

volatiles car elles peuvent être analysées par chromatographie en phase gazeuse sans dérivation.^{22,24}

1.6.2.2. Saxitoxine et ses dérivés

La STX possède un noyau tétrahydropurique sur lequel surviennent plusieurs substitutions. Les dérivés proviennent principalement de la présence de groupement(s) sulfate(s) (SO_4^-) en position R_2 , R_3 et R_4 : tels les STX sans SO_4^- , les gonyautoxines (GTX) avec un SO_4^- et les C-toxines avec deux SO_4^- . La présence de OH en position R_1 et R_4 , et d'un groupement carbamate en position R_4 , génère d'autres dérivés. L'ensemble de ces CT est aussi nommé PST (Paralytic Shellfish Toxins).⁶ La Figure 1-3 montre la structure générale protonée de la STX et de ses dérivés¹⁸ :

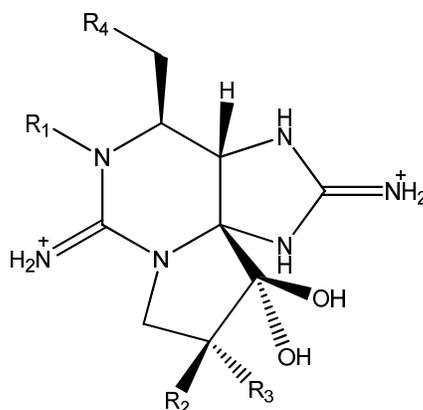


Figure 1-3. Structure générale de la saxitoxine et de ses dérivés

Les M.M. des PST varient entre 241 – 491 g/mol.⁶ Les pK_a des deux fonctions guanidines, selon les dérivés considérés, sont $\approx 8 - 9$ pour la fonction pyrimidine et $\approx 10.5 - 11.5$ pour la fonction imidazole.²⁵ La présence ou l'absence de SO_4^- sur ces molécules génère trois états de charges possibles dans les eaux naturelles : + 2 pour les non-sulfatés, +1 pour les mono-sulfatés et neutre pour les doublement sulfatés. Il en résulte que les PST sont très solubles en milieu aqueux.²⁶ Leur stabilité dépend des dérivés considérés ainsi que des conditions du milieu. Il en sera question brièvement dans la section 1.6.3.

1.6.2.3. Cyindrospermopsine et ses dérivés

La CYN est la plus récente famille de CT d'eau douce identifiée, et sa structure a été caractérisée en 1992.²⁷ Elle possède une unité guanidine tricyclique sulfatée conjuguée à une unité hydroxyméthyluracile. Jusqu'à maintenant deux dérivés ont été répertoriés.²⁸ La Figure 1-4 présente la structure générale ionisée de ce groupe de CT et au Tableau 1-2 apparaissent les dérivés¹⁸ :

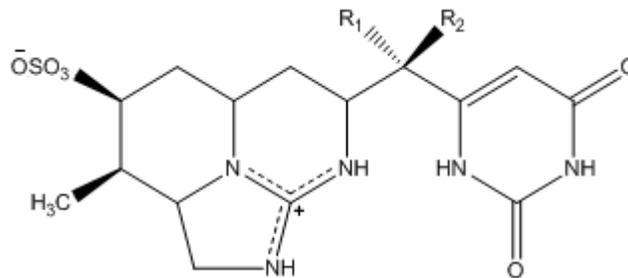


Figure 1-4. Structure générale de la cyindrospermopsine et de ses dérivés

Tableau 1-2. Variations structurales de la cyindrospermopsine et de ses dérivés

R₁	R₂	Dérivé
H	OH	Cyindrospermopsine
H	H	7-déoxycyindrospermopsine
OH	H	7-épicyindrospermopsine

La M.M. de la CYN est de 415 g/mol et elle est soluble dans les eaux naturelles. Elle y adopte la forme d'un zwitterion par le gain et la perte d'un proton provenant respectivement des groupements guanidines ($pK_a \approx 9.45$) et SO_4^- .²⁹ Ces composés sont stables lorsque seuls en solution, mais sont photosensibles en présence d'une concentration élevée d'extrait d'algues où les pigments photosynthétiques ont été libérés. La variation du pH et la hausse de la température n'accélèrent pas la dégradation de la CYN, même qu'après quinze min d'ébullition la toxicité de ce composé reste identique.³⁰

1.6.2.4. Autres cyanotoxines

D'autres CT sont produites par les CB. Cependant, à cause de leur apparition sporadique ou d'une provenance marine, elles ne seront pas traitées dans cet ouvrage. Sans faire la liste exhaustive de ces autres CT, mentionnons l'existence de divers alcaloïdes

comme la neurotoxine anatoxine-a(S) dont la structure chimique est composée d'une N-hydroxyguanine cyclique liée à un ester phosphate. On retrouve aussi des CT ayant un effet irritant tel la lyngbyatoxine-a, l'aplysiatoxine et la débromoaplysiatoxine. De plus, on soupçonne un pouvoir irritant, voire allergène, à une composante constitutive de l'ensemble des CB, soit les lipopolysaccharides contenus dans leur paroi cellulaire. Finalement, mentionnons les nodularines et ses dérivés, d'autres peptides cycliques semblables aux MC à l'exception qu'elles sont constituées de 5 AA qui génèrent des effets hépatotoxiques.^{1,31}

1.6.3. Toxicité : mécanismes d'action, LD₅₀ et normes

Les structures chimiques des différentes CT leur confèrent un potentiel de toxicité aiguë ainsi qu'un mécanisme d'action propre à chacune d'elles. Les MC démontrent un pouvoir hépatotoxique, alors que l'ANA-a et la STX, ainsi que leurs dérivés, génèrent des effets neurotoxiques. La CYN provoque des effets cytotoxiques dans plusieurs organes cibles.¹⁰ Plusieurs voies d'exposition aux CT sont possibles : (i) l'ingestion d'eau contaminée, (ii) l'ingestion d'organismes où la bioaccumulation des CT a eu lieu et (iii) l'inhalation sous forme d'aérosol.¹² Les sous-sections suivantes présentent le mécanisme d'action des différentes CT ainsi que les valeurs de la dose létale tuant 50% d'une population de souris (LD₅₀).

1.6.3.1. Microcystines

Chez les mammifères, l'organe cible des MC est le foie. Lorsque ces composés sont ingérés et libérés dans le sang, après avoir traversé l'estomac et l'iléon, ils s'accumulent dans les hépatocytes par l'entremise du système de transport des acides biliaires. À l'intérieur des cellules du foie, les MC inhibent les protéines du type phosphatase (PP1 et PP2A) qui exécute la déphosphorylation de phosphoprotéines intracellulaires. Cette inhibition entraîne un dérèglement de la structure de la cellule, résultant en la mort de celle-ci. Une nécrose massive des hépatocytes provoque une hémorragie interne et s'ensuit le décès de l'individu empoisonné. Il a été établi que l'inhibition est due aux AA 5 et 6, correspondant à l'Adda et l'acide glutamique (Figure 1-1). Il en découle que les dérivés présentant des modifications structurelles dans cette région auront une toxicité moindre que la MC-LR, qui est la plus toxique.^{1,8}

1.6.3.2. Anatoxine-a et ses dérivés

L'ANA-a est un agoniste qui mime l'effet de l'acétylcholine, un neurotransmetteur stimulant un organe cible, en se liant de façon irréversible aux récepteurs-acétylcholines nicotiniques situés aux jonctions neuromusculaires. Cette liaison provoque une stimulation musculaire constante se traduisant par la paralysie des muscles respiratoires et menant à l'asphyxie des mammifères contaminés. Ce phénomène survient car l'ANA-a possède une affinité supérieure à celle de l'acétylcholine envers les récepteurs, en raison de la non-méthylation de l'atome d'azote de l'ANA-a, et que cette CT n'est pas dégradée par l'acétylcholinestérase.³² Le dérivé homoanatoxine-a est légèrement moins toxique que l'ANA-a, mais il engendre les mêmes conséquences selon un mécanisme d'action différent qui n'est pas totalement élucidé.⁵ Les dérivés du groupe 2 et 3 (Figure 1-2 et Tableau 1-1) sont non-toxiques vu l'absence d'une liaison double à l'intérieur du cycle. Ceci amène une perte de planéité de la chaîne carbonylée qui semble nécessaire lors de l'interaction avec les récepteurs-acétylcholine.³³

1.6.3.3. Saxitoxine et ses dérivés

À l'instar de l'ANA-a, les PST provoquent la paralysie des muscles respiratoires, car elles interfèrent avec l'activité des canaux sodium (Na^+) qui génèrent le potentiel électrique de la membrane cellulaire. Cette activité est essentielle à la transmission de l'influx nerveux et à la contraction musculaire. Les PST se lient sur un site d'une protéine transmembranaire (portion extérieure à la cellule) et empêchent le passage des Na^+ à l'intérieur de la cellule.³⁴ La néo-STX et la STX sont les plus puissantes des PST alors que les PST doublement sulfatés (C-Toxines) sont les moins toxiques. L'affinité pour le site de liaison dépend principalement d'interactions électrostatiques : les groupements SO_4^- diminuent la force de l'interaction³⁵, alors qu'un groupement OH en position R_1 augmente la force de l'association.³⁶

Les PST se dégradent lentement par hydrolyse en milieu naturel (pH neutre et 25 °C). Dans ces conditions, les C-toxines perdent leur fonction carbamate sulfatée et les dérivés générés sont plus toxiques. On soupçonne aussi la conversion des GTX en néo-STX et en STX. Un pH acide ralentit ces conversions, alors qu'une hausse de la température

accélère la dégradation en entités plus toxiques. Cependant, une température supérieure à 100 °C combinée à un temps de chauffage adéquat amène une perte complète de toxicité. Globalement, la toxicité des épisodes de floraison contenant les PST augmente en fonction du temps pour atteindre un plateau et diminuer par la suite.³⁷⁻³⁹

1.6.3.4. *Cylindrospermopsine et ses dérivés*

La CYN était récemment considérée comme une hépatotoxine, vu les dommages au foie qu'elle causait, mais elle est maintenant classée comme une cytotoxine car elle génère les mêmes effets sur d'autres organes. Le mode d'action n'est pas totalement élucidé et il semble y avoir deux voies indépendantes. La voie rapide s'effectue par l'entremise de métabolites produits par l'interaction entre la CYN et le cytochrome P450. La voie lente résulte de l'inhibition de la synthèse protéique par la liaison de la CYN sur une composante de la machinerie associée à la fabrication des protéines, autres que les ribosomes. La portion uracile intacte est responsable de la toxicité, car les composés où cette partie uracile était chlorée ou manquante étaient cinquante fois moins toxiques.⁴⁰⁻⁴²

1.6.3.5. LD₅₀ et normes

L'évaluation de la LD₅₀ est un bon indicateur de la toxicité aiguë d'un composé. Ces doses ont été évaluées sur des souris par injection intra-péritonéale, c'est-à-dire au travers de la peau qui recouvre l'abdomen. Le Tableau 1-3 démontre les résultats obtenus^{6,10} :

Tableau 1-3. Toxicité des cyanotoxines retrouvées en eau douce

Cyanotoxine	LD ₅₀ (µg/kg)
MC-LR	50
MC-YR	70
MC-RR	600
[Dha7]MC-LR	250
[(6Z)-Adda]MC-LR	1200
ANA-a	200
Homoanatoxine-a	250
STX	10
CYN	2000* (200)**

* Après 24 heures (mode d'action : cytochrome P450)

** Entre 5 et 7 jours (mode d'action : inhibition synthèse protéique)

Les normes et lignes directrices qui découlent de ces études toxicologiques sont appliquées à l'eau potable. Elles ciblent une concentration seuil, par type de CT, au-delà de laquelle on doit prendre des précautions et/ou des actions pour remédier à la situation. Les valeurs appliquées aux CT prennent en compte les CT totales, c'est-à-dire celles qui sont sous la forme libre (dissoutes dans l'eau) et celles qui sont situées à l'intérieur des cellules. Le Tableau 1-4 présente les normes actuellement en vigueur et celles qui sont proposées dans divers pays⁶ :

Tableau 1-4. Concentration maximale tolérable des cyanotoxines dans l'eau potable

Cyanotoxine	Pays/Organisme	Concentration µg/L
MC-LR	OMS, France, Afrique du Sud	1.0
MC-LR	Canada	1.5
MC	Australie	1.3 (équivalent MC-LR)
MC	Brésil, Portugal, Angleterre, Espagne	1.0 (équivalent MC-LR)
MC	Nouvelle-Zélande	1.0 et 0.1 (équivalent MC-LR)
ANA-a	Québec	3.7
ANA -a	Nouvelle-Zélande	6.0
Homoanatoxine-a	Nouvelle-Zélande	2.0
CYN	Nouvelle-Zélande	1.0
CYN	Brésil	15.0
PST	Nouvelle-Zélande, Brésil	3.0

L'OMS n'a établi qu'une seule norme pour les CT d'eau douce, soit pour la MC-LR qui est la CT la plus fréquente et la plus répandue, avec une valeur de 1.0 µg/L. La différence avec la ligne directrice du Canada est attribuable aux paramètres utilisés pour calculer la concentration maximale ne présentant aucun effet nocif, notamment le poids moyen adulte et la quantité d'eau ingérée quotidiennement. Comme les MC présentent plus de 70 dérivés, et que la MC-LR est la plus toxique à ce jour, plusieurs pays proposent et adoptent une norme qui convertit la concentration des dérivés en équivalent de la toxicité de la MC-LR. La Nouvelle-Zélande prévoit une norme de 0.1 équivalent MC-LR vu le potentiel carcinogène des MC; ces composés pouvant initier à long terme la formation de tumeurs chez les souris.⁶

1.7. Analyse quantitative des cyanotoxines

Cette section expose les principales méthodes d'analyse des CT, mais ne se veut pas une revue exhaustive ni une explication approfondie de leur principe de fonctionnement. Une comparaison des performances analytiques au niveau de la sensibilité et de la sélectivité est aussi effectuée.

1.7.1. Préparation des échantillons

Une étape importante, préalable à la quantification des analytes, est la préparation des échantillons. Les CT étant dissoutes dans la matrice environnementale et à l'intérieur des cellules, la lyse cellulaire doit être effectuée afin d'évaluer la toxicité totale d'un échantillon. Selon le contexte de l'analyse, la fraction dissoute peut être séparée de la fraction cellulaire par filtration ou ultracentrifugation. Après l'éclatement des cellules, les composés qui nous intéressent sont extraits de la phase aqueuse avec un solvant approprié. La nouvelle matrice obtenue est souvent riche en substances causant des interférences lors de l'analyse, et la concentration en analytes peut y être inférieure à la gamme linéaire dynamique de la méthode de quantification. Pour remédier à cette situation, une extraction sur phase solide (SPE), où les analytes ont une plus grande affinité pour la phase solide comparativement à la phase liquide, peut être effectuée. Idéalement, la quantité d'interférents adsorbés est minimale, et la récupération des CT se fait par élution avec un solvant approprié. Ce solvant est ensuite évaporé à sec afin de concentrer dans un volume adéquat les analytes. Si la SPE n'est pas nécessaire, alors on se débarrasse des débris cellulaires avant de faire l'évaporation et la reconstitution. La Figure 1-5 (adapté de Pérez et al.)⁴³ schématise ces étapes :

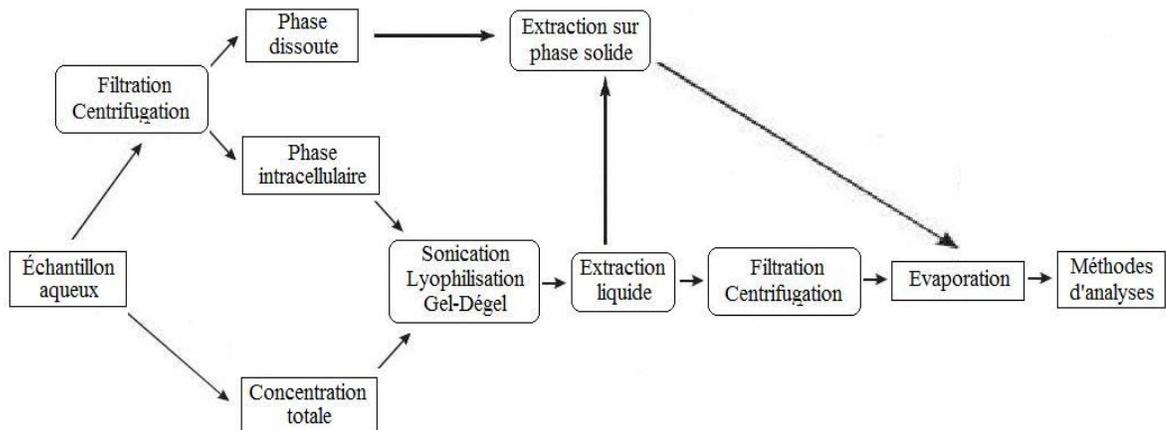


Figure 1-5. Préparation de l'échantillon avant l'analyse

1.7.2. Méthodes d'analyse des cyanotoxines

Les techniques d'analyse peuvent être des méthodes immuno-biochimiques ou des méthodes physico-chimiques. Ces dernières sont constituées des techniques chromatographiques couplées principalement à deux types de détecteur : ceux qui détectent une radiation ou la spectrométrie de masse (MS).¹

1.7.2.1. Méthodes immuno-biochimiques

Les méthodes ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays) utilisent la reconnaissance de motifs structuraux spécifiques à certaines CT par des anticorps poly ou monoclonaux. La détection requiert la formation d'un complexe entre une CT liée à l'anticorps et une enzyme. Un substrat est ensuite ajouté. Le produit réactionnel généré, suite à l'action de la CT conjuguée, est analysé par spectrophotométrie.³¹ La détection peut aussi s'effectuer suite à la compétition pour le site actif de l'anticorps entre une CT préalablement conjuguée et une CT présente dans l'échantillon. Dans ce cas, la quantité de CT est inversement proportionnelle à l'intensité de la coloration.⁴⁴ Jusqu'à maintenant, seuls des kits ELISA d'analyse des MC et de la STX ont été commercialisés.⁴⁵

La détection des MC peut s'effectuer par l'entremise de leur activité biochimique (section 1.6.3.1). Il s'agit de mesurer l'activité d'une quantité définie de PP1 ou PP2A, en présence de différentes concentrations de MC et d'une quantité fixe d'un substrat ciblé par l'enzyme. Initialement, un substrat contenant un radio-isotope du ³²phosphore était utilisé,

mais celui-ci a été remplacé par un substrat détectable par spectrophotométrie pour pallier aux problèmes reliés à l'utilisation de matériel radioactif.¹

L'activité biologique de la STX (section 1.6.3.3) est aussi utilisée pour détecter sa présence. Pour ce faire, des cellules cancéreuses, de type neuroblastes et démontrant l'expression des canaux Na^+ , sont incubées avec un agent favorisant l'ouverture des canaux Na^+ et un agent qui entrave la sortie des Na^+ de la cellule. La présence de la STX bloque les canaux Na^+ et assure la survie de la cellule alors que l'absence de la STX provoque une entrée excessive de Na^+ dans la cellule qui lui est fatale. Le taux de survie des cellules dans ces conditions, et en fonction de la concentration de STX, est évalué par colorimétrie.³¹

1.7.2.2. Méthodes physico-chimiques

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange utilisant la différence d'affinité que démontrent les analytes à l'égard d'une phase mobile et d'une phase stationnaire, en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Les composés entraînés par la phase mobile dans le montage chromatographique sont élués à des vitesses différentes, en fonction du temps passé dans la phase mobile versus le temps adsorbé sur la phase stationnaire. On distingue principalement deux types de chromatographie, soit en phase liquide (LC) ou en phase gazeuse (GC).

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) utilise une phase mobile liquide et une phase stationnaire généralement liquide ou pseudo-liquide greffé sur un support solide. Elle permet de séparer efficacement des composés dont la polarité et la taille sont similaires car elle utilise une phase stationnaire de très fine granulométrie (ordre du μm). Afin d'obtenir un débit de solvant acceptable, un système de pompes est nécessaire pour pousser la phase mobile au travers de la phase stationnaire. Le type de HPLC le plus utilisé est celui nommé phase inversée, caractérisée par une phase stationnaire moins polaire que la phase mobile (généralement un alcane à dix-huit carbones (C_{18})). L'éluion débute avec une phase mobile composée d'un solvant aqueux contenant une faible teneur en solvant organique. Les molécules très polaires éluent en premier vu leur faible affinité pour la phase stationnaire. L'augmentation graduelle de la teneur en solvant organique de la

phase mobile provoque l'élution des composés ayant un caractère hydrophobe croissant, et qui étaient adsorbés sur la phase stationnaire. Notons que ce type de chromatographie n'est pas performant avec les PST très polaires, et qu'une séparation chromatographique à phase normale (principe contraire à la chromatographie à phase inversée) a été développée pour séparer ces composés.²⁶

La GC présente des différences importantes face à la HPLC : (i) les analytes sont élués en phase gazeuse, (ii) la phase mobile est constituée d'un gaz relativement inerte, et (iii) l'élution s'effectue principalement en fonction de la température de la colonne chromatographique. Par exemple, la séparation de composés de polarités similaires, mais ayant des pressions de vapeur différentes, s'effectue par un choix adéquat de la température afin de vaporiser un composé au détriment d'un autre. Les composés ayant une polarité différente, mais une pression de vapeur semblable, seront séparés par la force des interactions propre à chaque composé avec la phase stationnaire. Seule l'ANA-a et ses dérivés, ainsi que les MC, sont analysés par GC. Les MC doivent être modifiées chimiquement afin d'augmenter leur volatilité, alors que ce n'est pas nécessaire dans le cas de l'ANA-a.^{24,46-47} Pour de plus amples renseignements concernant la HPLC et la GC, le manuel de Kirkland et Snyder⁴⁸ et le manuel de Littlewood⁴⁹ peuvent être consultés.

La HPLC peut être couplée à divers type de détecteur du rayonnement : UV, émission de fluorescence ou enregistrement du spectre d'absorption par des barrettes de diode. Ces méthodes de détection sont basées sur la présence de chromophores sur les analytes, un groupement qui permet l'absorption de photons d'une énergie donnée et générant un patron spécifique d'absorption et d'émission de longueur d'onde. Dans le cas de l'ANA-a et des PST, une dérivation pré ou post-colonne chromatographique est nécessaire afin d'ajouter un chromophore sur l'analyte.⁵⁰⁻⁵¹

La HPLC et la GC peuvent être couplées à la MS qui distingue les composés ionisés selon la valeur égale à leur masse divisée par leur nombre de charge (m/z).⁵² La pression à l'intérieur de ce type d'analyseur s'approche du vide complet afin de ne pas entraver le parcours des ions et ainsi risquer une perte de signal. Lorsque la MS est jumelée à la HPLC, l'ionisation des CT s'effectue par nébulisation électrostatique (ESI) sous

pression atmosphérique, et le simple (Q) ou le triple quadripôles (QqQ) est utilisé comme analyseur.⁵³ L'ESI nécessite que les analytes contenus dans le solvant chromatographique le soient sous forme d'ions. Suivant l'application d'un voltage (+/-) de l'ordre du kV sur l'extrémité du capillaire contenant le solvant, il se forme un nuage de gouttelettes chargées par répulsion électrostatique. Ces gouttelettes sont vaporisées à haute température, éjectant les ions sous forme gazeuse. Ceux-ci sont ensuite attirés dans le MS par l'effet d'entraînement du vacuum.

Lorsque la MS est jumelée à la GC, l'ionisation des analytes est effectuée par impact électronique à une pression très basse, et le simple quadripôle est utilisé comme analyseur. L'impact électronique nécessite que les molécules soient préalablement en phase gazeuse. Suivant la collision entre des e^- possédant une forte énergie cinétique et les analytes, il se produit un transfert d'énergie qui éjecte un e^- du composé et forme un radical cation. Les ions sont ensuite attirés dans le MS par l'application d'une différence de potentiel. Cette technique est compatible avec la GC qui achemine directement les analytes en phase gazeuse dans la chambre d'ionisation.

Le faisceau ionique, généré par les deux techniques d'ionisation, pénètre dans le simple quadripôle constitué de tiges métalliques pairées, agissant comme électrodes, et sur lesquelles est appliqué un voltage (+/-). En fonction de ces voltages, les ions possédant une valeur m/z adéquate oscilleront de façon stable à l'intérieur du champ quadripolaire et seront transmis sans déviation à la composante suivante du MS. Les ions dont la valeur m/z ne permet pas d'oscillations stabilisées à l'intérieur du champ quadripolaire percuteront les électrodes et ne seront pas détectés. Le simple quadripôle permet d'effectuer un balayage d'ions sélectionnés (SIM), en fixant des potentiels de façon à ne filtrer qu'une seule valeur m/z .

Le QqQ (faisant partie des techniques de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)) est composé de trois quadripôles permettant différents type d'acquisition des ions, dont le balayage d'ions fragments sélectionnés (SRM). Tout comme le simple quadripôle, les ions sont filtrés par un premier quadripôle (Q_1), selon les voltages appliqués, et entrent dans une chambre de collision (q) contenant un gaz inerte à une pression définie.

L'application d'une différence de potentiel accélère les ions à l'intérieur de q , générant des collisions entre les analytes et le gaz. L'énergie interne des composés augmente et, lorsque cette énergie est supérieure à l'énergie de dissociation propre à chaque analyte, ces composés se fragmentent. Les ions fragments générés sont reproductibles mais dépendent de l'énergie d'accélération appliquée. Finalement, les ions fragments sont filtrés par le dernier quadripôle (Q_3) et détectés par un photomultiplicateur d' e^- . Celui-ci produit une cascade d' e^- pour chaque ion frappant le détecteur et le courant résultant est convertit en signal d'intensité variable. Le mode d'acquisition SRM fixe des valeurs de voltages pour Q_1 et Q_3 permettant respectivement de sélectionner l'analyte qui nous intéresse et un fragment spécifique à celui-ci généré préalablement dans q . La Figure 1-6 montre une acquisition SRM par MS/MS :

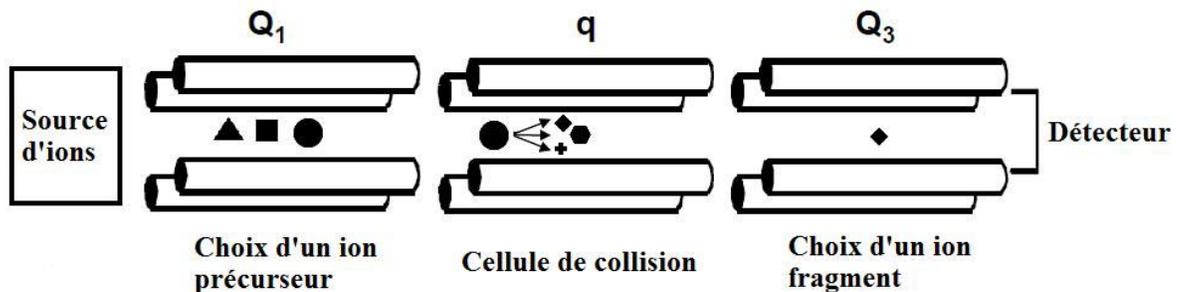


Figure 1-6. Acquisition SRM par MS/MS

Pour de plus amples renseignements concernant la MS, le manuel de Gross⁵² peut être consulté.

1.7.3. Avantages et inconvénients des méthodes d'analyse

Les méthodes analytiques présentées à la section précédente doivent être assez sensibles pour détecter/quantifier les CT selon les normes et lignes directrices en vigueur, mais aussi sélectives afin d'identifier sans équivoque les CT et de distinguer les dérivés les uns des autres. La Figure 1-7 (adapté de Levi et al.)⁶ résume les performances analytiques selon la technique utilisée :

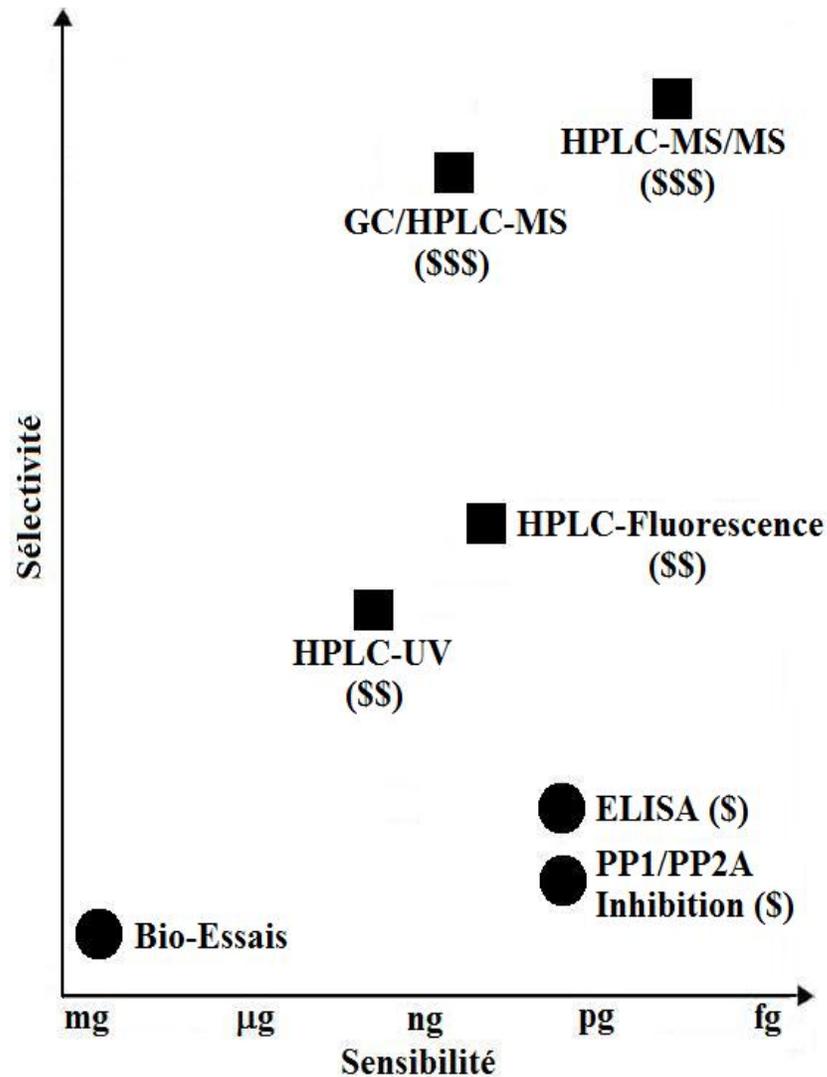


Figure 1-7. Comparaison de la performance des méthodes d'analyse

Les techniques immuno-biochimiques sont très sensibles, mais peu sélectives comparativement aux méthodes physico-chimiques. Le test ELISA souffre de la réactivité croisée des dérivés de MC envers les anticorps, empêchant de les distinguer. Le test d'inhibition de PP1/PP2A ne peut différencier les dérivés de MC car la portion moléculaire entravant l'activité enzymatique est commune à la majorité de ces dérivés.⁵⁴

La sélectivité des techniques chromatographiques dépend du détecteur utilisé. La faible sélectivité du détecteur UV provient du chevauchement des patrons d'absorption des dérivés et des interférents, coéluant avec l'analyte qui nous intéresse.⁵⁵ L'émission de fluorescence présente des effets de matrice plus faible que la détection UV car l'abondance

de molécules fluorescentes est moindre que celles absorbant le rayonnement UV.⁵⁶ La MS présente une meilleure sélectivité, permettant de différencier les dérivés, en ciblant directement la valeur m/z d'un analyte par l'utilisation du mode d'acquisition SIM.⁵⁴ La détection des fragments d'un composé générés selon l'énergie de collision appliquée, par l'utilisation du mode d'acquisition SRM avec la MS/MS, augmente la sélectivité car deux valeurs m/z sont successivement ciblées. Cette sélectivité diminue le bruit de fond et procure une sensibilité égale aux techniques immuno-biochimiques.⁵² La Figure 1-7 montre, à titre comparatif, les faibles performances des bio-essais sur différents organismes vu leur incapacité de différencier les dérivés et la nécessité d'une quantité importante de CT pour être efficaces. Ces tests ne servent plus à détecter/quantifier les CT, mais seulement à effectuer des études toxicologiques.¹

D'autres critères permettent d'évaluer la convenance d'une méthode analytique selon les objectifs à atteindre : facilité d'exécution/opération, préparation des échantillons et coûts liés à l'achat/utilisation/maintien des appareils.¹⁰ En ce sens, les kits ELISA sont idéaux pour effectuer rapidement la surveillance des MC et de la STX car la préparation des échantillons est minimale.⁵⁵ Cependant, un seul type de CT est ciblé et les dérivés ne sont pas différenciés. La HPLC-MS est la technique la plus performante pour identifier/quantifier les CT, mais elle est très onéreuse, possède un faible débit d'échantillons et doit être exécutée par du personnel hautement qualifié.

1.8. Contexte et objectifs du projet de recherche

Le faible débit d'échantillons analysés par HPLC-MS résulte des longues étapes de préparations des échantillons (comme la SPE) et de la séparation chromatographique. Cependant, une récente interface compatible avec la MS, nommée LDTD (Laser Diode Thermal Desorption) et jumelée à la technique d'ionisation APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), a démontré une réduction drastique du temps d'analyse à quelques secondes, par l'élimination de l'étape chromatographique. De plus, les échantillons analysés avec la LDTD-APCI ne nécessitent aucune préparation laborieuse, même en présence d'une matrice complexe, sauf lorsque la préconcentration était indispensable afin d'atteindre la limite de détection/quantification de la méthode (MDL et MQL).⁵⁷⁻⁵⁹

Dans l'optique d'utiliser les performances analytiques de la MS/MS comme méthode de suivi rapide, sensible et sélective des CT dans une matrice environnementale, le présent projet de recherche propose d'évaluer la possibilité de coupler la LDTD-APCI à la MS/MS à cette fin. Les étapes suivantes permettront d'étudier la faisabilité de ce couplage et de développer la méthode d'analyse le cas échéant :

- À partir de paramètres instrumentaux LDTD-APCI prédéfinis, une étude préliminaire visant à évaluer la sensibilité d'un représentant de chacune des quatre familles de CT (MC-LR, STX, ANA-a et CYN) sera réalisé.
- Pour chaque CT ayant démontré un signal suffisant, nécessaire au développement d'une méthode analytique, l'optimisation des paramètres instrumentaux sera effectuée afin d'obtenir la sensibilité maximale.
- Le développement et la validation de la méthode analytique se feront par l'évaluation des paramètres suivants : MDL et MQL dans une matrice naturelle ou synthétique, gamme linéaire dynamique, exactitude et précision (% RSD).
 - La nécessité d'utiliser un étalon interne (IS) sera aussi évaluée selon le % RSD de la méthode.

Chapitre 2. Partie Expérimentale

2.1. Principes de fonctionnement de la LDTD-APCI

L'interface LDTD-APCI couple la désorption thermique induite par une diode laser à l'ionisation chimique sous pression atmosphérique pour introduire directement les analytes ionisés dans le MS. La désorption d'un échantillon, préalablement séché sur une mince surface métallique, s'effectue par un transfert d'énergie entre la surface de déposition et les analytes, suite à l'élévation rapide de la température du métal produite par la diode laser. Suivant la désorption, un gaz vecteur entraîne les molécules neutres sous phase vapeur dans la région de l'aiguille Corona pour y être ionisées. Les ions générés sont ensuite aspirés dans le MS sous l'effet du vide. Les sous-sections suivantes expliquent le déroulement d'une analyse par LDTD-APCI, ainsi que les principes sous-jacents au fonctionnement de chaque composante. Les travaux de Wu et al.⁵⁷, Fayad et al.⁵⁸ et de Segura et al.⁵⁹ ont servi à décrire l'ensemble des notions qui suivent.

2.1.1. LDTD

Un faible volume (2 – 10 μL) de solvant contenant les analytes solubilisés est déposé dans un puits inséré dans une plaque analytique de 96 puits. Les puits sont constitués d'une mince couche d'acier inoxydable qui absorbe efficacement la chaleur. La géométrie de ces puits (Figure 2-1) concentre les analytes qui cristallisent lors du séchage du solvant, dans la zone optimale de chauffage, soit au centre du puits. Après l'évaporation du solvant, la plaque analytique est déposée dans l'enceinte de la LDTD où une cage, mobile sur les axes X – Y, prend la plaque et positionne l'arrière de celle-ci face au laser. La diode laser infrarouge (980 nm, 20 W) est mise en marche et contrôlée selon les paramètres suivants : rampe d'élévation de la puissance du laser, temps de maintien de la puissance du laser et rampe de diminution de la puissance du laser. Le laser focalisé vient frapper l'arrière du puits qui emmagasine la chaleur et peut ainsi transférer de l'énergie aux molécules cristallisées. La Figure 2-1 (adapté de Picard et al.)⁶⁰ présente un schéma du fonctionnement de la LDTD :

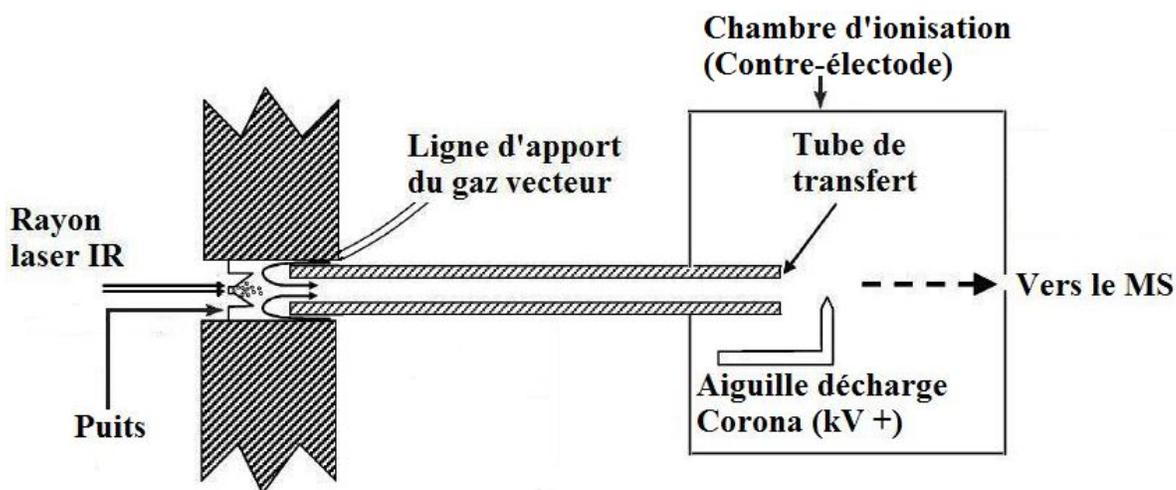


Figure 2-1. Schéma du fonctionnement de l'interface LDTD

La désorption se produit lorsque la force des interactions intermoléculaires entre les analytes ainsi que la force des interactions entre la surface métallique et les analytes sont rompues. Les conditions opératoires ont démontré que les composés désorbent sous l'effet d'une température inférieure à la température de vaporisation répertoriée, créant ainsi la possibilité d'analyser par LDTD-APCI des composés qui sont normalement thermosensibles.⁶⁰ Ce phénomène est expliqué par : (i) les différences de propriétés de phase que présente la matière à l'échelle nanométrique comparativement à l'échelle de la matière visible (« bulk »)⁶¹, et (ii) la composition de la surface sur laquelle repose la matière, qui influence les propriétés de phase.⁶²⁻⁶³ On estime que la contribution essentielle à l'enthalpie de fusion d'un solide provient des vibrations internes des molécules qui le composent. Par conséquent, les vibrations des molécules se trouvant à la surface d'un cristal seront plus importantes, suite à une hausse de la température, comparativement aux vibrations d'une même molécule située à l'intérieur de ce cristal. Il devient évident qu'un cristal organique de très petites dimensions nécessitera moins d'énergie pour fondre en comparaison d'un même cristal de grandes dimensions. Ainsi, le faible volume de déposition procure une masse d'analytes qui, après cristallisation, présentera des propriétés semblables à celles démontrées à l'échelle nanométrique.

Les interactions entre la surface de déposition et les analytes ne peuvent être négligées, comme l'ont démontré la hausse de la température de fusion de monocouches

d'alcanes adsorbés sur une surface d'Au et la baisse de la température de fusion de films de polyéthylène selon la surface de déposition utilisée. Cependant, le fabricant des plaques analytiques ne fournit pas d'informations permettant d'évaluer l'impact de la surface métallique sur le phénomène de désorption; est-ce que la surface est inerte ou passivée pour limiter les interactions? Néanmoins, l'adsorption des composés sur la surface est nécessaire afin d'éviter les pertes, car avec la géométrie des appareils MS utilisés, la plaque analytique est insérée à la verticale dans l'enceinte de la LDTD.

Un autre phénomène régissant la désorption de molécules thermosensibles avec la LDTD-APCI s'explique par la compétition cinétique entre le processus de vaporisation et le celui de fragmentation.⁶⁴ L'énergie d'activation (E_a) requise pour vaporiser ces molécules est plus élevée que l' E_a qui produit la fragmentation, ce qui avantage cette dernière lors d'une élévation faible-moyenne de la température. Cependant, la diode laser a la capacité de chauffer rapidement la surface métallique, jusqu'à un taux de 3000 °C/s, permettant un transfert d'énergie qui surpasse largement l' E_a du processus de fragmentation (bien que la désorption actuelle se fasse plutôt entre 100 et 150 °C). Lorsque l'énergie fournie dépasse l' E_a reliée à la vaporisation, la désorption des analytes est le processus le plus important. La Figure 2-2 présente un exemple de diagramme d'Arrhenius qui schématise ce concept :

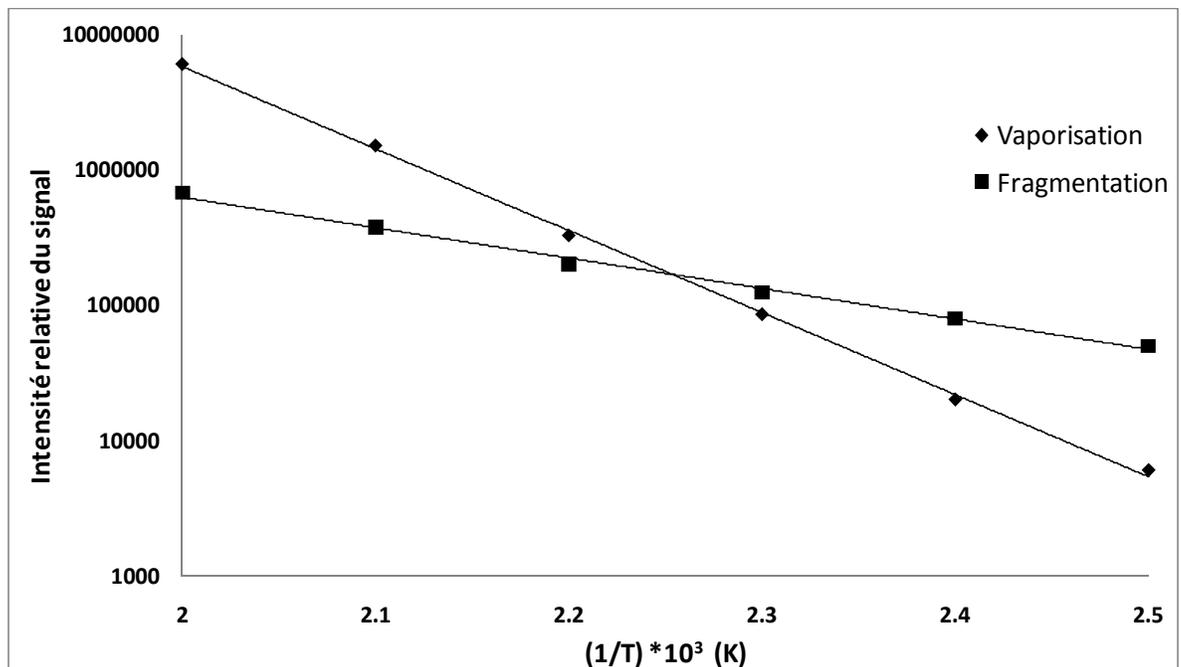


Figure 2-2. Diagramme théorique d'Arrhenius (Vaporisation vs Fragmentation)

2.1.2. APCI

Précédant la mise en marche de la diode laser, un cylindre en verre est positionné au-dessus du puits pour : (i) concentrer les vapeurs d'analytes et éviter les pertes, et (ii) servir de canal de transfert des analytes suite à l'écoulement d'un gaz vecteur allant du puits vers le module APCI. Le gaz permet aussi d'effectuer la thermalisation des molécules métastables par transfert d'énergie avec les molécules constituant le gaz vecteur.⁶⁰ Ceci stabilise les analytes et réduit la fragmentation avant l'ionisation.

La technique APCI conventionnelle est normalement couplée à la HPLC et elle est appropriée pour ioniser les analytes volatils, neutres ou peu polaires. Le module APCI est constitué d'un vaporisateur, servant à évaporer le solvant chromatographique et les analytes, et d'une fine aiguille sur laquelle est appliqué un voltage (+/-) de l'ordre du kV. La différence de potentiel générée entre l'aiguille et une contre électrode crée une décharge Corona au bout de l'aiguille et produit un courant de l'ordre du μA .⁶⁵ Les e^- libres contenus dans le plasma frapperont éventuellement les espèces majoritaires N_2 et O_2 de l'air ambiant, créant principalement des radicaux $\text{N}_2^{+\bullet}$ et O_2^{\bullet} (ions réactifs primaires).⁶⁶⁻⁶⁷ Ceux-ci réagiront avec l'humidité de l'air et/ou les molécules du solvant, générant ainsi des ions réactifs (+/-). La chaîne réactionnelle de la page 28 expose les réactions formant les ions réactifs primaires et les ions réactifs.

Le principal mécanisme de formation d'analytes chargés positivement est par transfert d'un proton entre un ion réactif protoné et l'analyte. Cette réaction est régie par l'affinité protonique (AP) respective des composés et elle survient lorsque l'AP des analytes > à l'AP des ions réactifs. Comme cette réaction est exothermique, l'augmentation de l'énergie interne est distribuée parmi les degrés de liberté (rotations/vibrations) des analytes ionisés, justifiant le choix judicieux des ions réactifs afin d'éviter la fragmentation en raison d'une différence AP trop élevée. L'ionisation (+) peut se produire via des mécanismes autres que le transfert d'un proton tels l'addition d'un électrophile sur l'analyte, ce qui forme un adduit et complique l'interprétation des résultats, ou bien par un échange de charge déterminé par l'énergie d'ionisation et de recombinaison de l'analyte et de l'ion réactif.⁵²

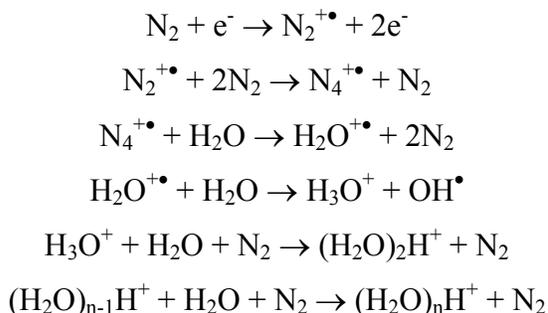
La formation d'analytes chargés négativement peut aussi se produire par le transfert d'un proton, entre l'analyte et un anion, lorsque le caractère acide en phase gazeuse de l'analyte est supérieur à celui de l'ion réactif. Cependant, la capture électronique, dissociative ou non, est le principal mécanisme en APCI (-) où l'analyte incorpore un e^- libre dans une de ses orbitales. L'affinité électronique gère ce phénomène et celle-ci provient de la présence d'atomes électronégatifs (halogènes) ou de groupements électro-attracteurs sur le composé, par exemple un groupement carbonyle conjugué ou un groupement nitro.⁶⁷ Le Tableau 2-1 résume les différentes réactions se produisant entre les ions réactifs et les analytes, lors du processus APCI (+/-) :

Tableau 2-1. Mécanismes APCI (+/-)

Polarité	Réaction	Mécanisme
APCI (+)	$M + [R + H]^+ \rightarrow [M + H]^+ + R$	Transfert d'un proton
	$M + X^+ \rightarrow [M + X]^+$	Addition électrophile
	$M + R^{\bullet+} \rightarrow M^{\bullet+} + R$	Échange de charge
APCI (-)	$M + R^- \rightarrow [M - H]^- + RH$	Transfert d'un proton
	$M + e^- \rightarrow M^{\bullet-}$	Capture électronique
	$MA + e^- \rightarrow M^{\bullet-} + A^-$	Capture électronique dissociative

M = Analyte; R = ions réactifs; X = composé électrophile; A = Halogène

L'interface LDTD-APCI ne nécessite pas de vaporisateur car le solvant est séché avant d'effectuer la désorption. Il en résulte que : (i) le gaz (N_2) utilisé pour assister le vaporisateur dans la désolvatation des analytes en APCI conventionnelle n'est plus nécessaire, et (ii) dans le mode d'ionisation (+) les ions réactifs se forment par réaction des radicaux avec l'humidité de l'air, générant des clusters d'eau ($(H_2O)_nH^+$) selon la chaîne réactionnelle suivante⁶⁶ :



L'AP des $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ augmente en fonction du nombre croissant de molécules d'eau.⁶⁸ Par conséquent, lorsque $n = 1$ ou 2 , l'AP est la plus faible (691 et 820 kJ/mol respectivement), rendant ces $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ très réactifs comparativement aux $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ où $n > 3$ (AP > 835 kJ/mol). La proportion des $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$, où $n = 1$ ou 2 , augmente lorsque la teneur en eau de l'air ambiant est très faible, soit ≤ 3 ppm.⁶⁹ À l'inverse, à partir d'air ayant une humidité relative de 21 % (6600 ppm), les $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ formés contiennent majoritairement entre 5 et 8 molécules d'eau. Si l'AP des analytes est connue, il est donc possible de « contrôler » l'exothermicité de la réaction en fonction de la teneur en eau de l'air afin de réduire la fragmentation.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Composés chimiques, réactifs, solvants

La MC-LR (10.0 mg/L, MeOH), la STX (24.2 mg/L, eau acidifiée 3 mM HCl) et la CYN (12.4 mg/L, eau déminéralisée) proviennent de l'Institut des Biosciences Marines du Conseil National de Recherches du Canada (Halifax, N-É, Canada). L'air comprimé (qualité Ultra-Zéro certifié, ≤ 2 ppm H_2O) a été acheté chez MEGS Specialty Gases and Equipment, Inc. (Ville St-Laurent, QC, Canada). Le MeOH de qualité HPLC a été acquis de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

2.2.2. Préparation des solutions et analyse par LDTD-APCI-MS/MS

Pour chacune des CT, une solution de concentration égale à 2 mg/L fût préparée par dilution des étalons commerciaux, avec du MeOH pour la MC-LR, et de l'eau déionisée pour la STX et la CYN. La désorption/ionisation des analytes a été effectuée avec le modèle T-960 LDTD-ACPI, et celui-ci a été contrôlé par le logiciel LazSoft 4.0 (Phytronix Technologies, Québec, QC, Canada). Les analytes furent détectés à l'aide d'un MS de type triple quadripôles Quantum Ultra AM, et ce dernier a été dirigé par le logiciel Excalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'analyse des données a été réalisée avec la fonction Qual Browser du logiciel Excalibur 2.0.

L'évaluation de la faisabilité de l'analyse pour les différentes CT avec l'interface LDTD-APCI, couplée à la MS/MS, a été exécutée à partir de paramètres instrumentaux

prédéterminés et de la valeur m/z attendue pour chacune des CT présentés au Tableau 2-2. L'acquisition du signal a été effectuée avec le mode « balayage complet », sur une plage de valeurs m/z contenant celui de l'analyte.

Tableau 2-2. Paramètres LDTD-APCI-MS/MS et valeurs m/z attendues

Paramètres LDTD-APCI-MS/MS		Cyanotoxine	Valeurs m/z attendues
Débit gaz vecteur	3 L/min	MC-LR	995 (+) ⁷⁰
Voltage décharge Corona	5000 V		993 (-) ⁷¹
Gaz Rideau	0 Arb	STX	300 ²⁶
« Ion sweep gas »	0.3 Arb		
Gaz auxiliaire	0 Arb	CYN	416 (+) ⁷²
Température capillaire	350 °C		414 (-) ⁷³
Lentille électro-transfert	80 V		

Le débit du gaz vecteur permet d'ajuster la vitesse à laquelle les analytes entrent dans la région de la décharge Corona et le voltage appliqué conditionne l'intensité de celle-ci. Le capillaire est situé à l'entrée du MS et amène les ions vers un système de lentilles et de quadripôles (Q_0 et Q_{00}) qui convergent le faisceau ionique avant l'analyse des ions par Q_1 . Ce capillaire est chauffé à haute température afin de garder les analytes sous forme gazeuse. La lentille d'électro-transfert, située immédiatement après le capillaire, génère un voltage d'accélération qui favorise la transmission d'une plage de valeurs m/z qui varie selon le voltage appliqué.

Les deux patrons laser utilisés pour tenter de désorber les CT sont présentés au Tableau 2-3.

Tableau 2-3. Patrons laser utilisés pour désorber la saxitoxine, cylindrospermopsine et microcystine-LR

	Rampe d'élévation puissance du laser	Temps de maintien puissance du laser	Rampe de diminution puissance du laser
Patron laser 1	0 – 20 % / 1 s	3 s	20 – 0 % / 0.01 s
Patron laser 2	0 – 60 % / 1 s	3 s	60 – 0 % / 0.01 s

Chapitre 3. Résultats et Discussion : Saxitoxine, cylindrospermopsine et microcystine-LR

3.1. Analyse de la saxitoxine par LDTD-ACPI-MS/MS

Les résultats d'analyse de la STX, obtenus à partir des paramètres des Tableaux 2-2 et 2-3, sont présentés à la Figure 3-1.

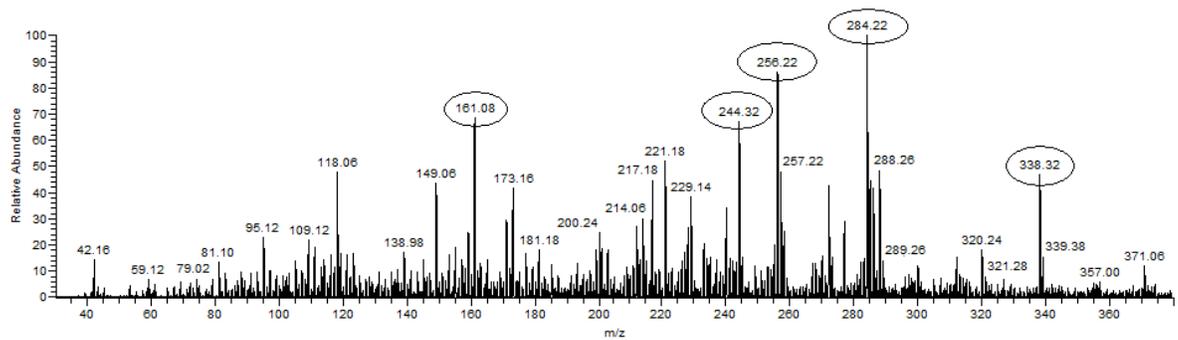


Figure 3-1. Spectre saxitoxine, ionisation (+) (mode d'acquisition balayage complet, valeurs m/z 30 – 380, puissance laser 60 %).

Les valeurs m/z encerclées identifient les ions générés lors du processus de désorption alors que les autres signaux sont présents avant, pendant et après la désorption. La Figure 3-1 ne démontre pas la valeur attendue à 300 m/z produite par la STX intacte protonée en ionisation (+). Cependant, quatre valeurs m/z inférieures sont observées, suggérant la fragmentation de la STX lors de la désorption. Ces fragments hypothétiques furent comparés (Tableau 3-1) à ceux répertoriés dans la littérature et obtenus par HPLC-nébulisation thermique(TP)-MS⁷⁴, HPLC-APCI-MS⁷⁵ et HPLC-ESI-MS/MS²⁶.

Tableau 3-1. Valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI et autres méthodes pour la saxitoxine

Méthode	LDTD-APCI	HPLC-TP-MS	HPLC-APCI-MS	HPLC-ESI-MS/MS
Valeur (m/z)	284	<u>282</u>	<u>282</u>	<u>282</u>
	256	<u>239</u>	<u>239</u>	221
	244	<u>162</u>	<u>74</u>	204
	161	<u>150</u>		186
				179
			138	

La comparaison des valeurs m/z générées par LDTD-APCI, avec les fragments produits par les autres techniques (identifiés par soulignement), ne montre aucune concordance. Pourtant, ces techniques fragmentent la STX par l'effet direct ou indirect d'une température élevée (150 – 325 °C), comme le fragment de valeur m/z 282 résultant de la perte d'une molécule d'eau. Conséquemment, il était plausible de penser que les valeurs m/z générées par LDTD-APCI auraient été les mêmes. En effet, l'apport de chaleur lors du processus de désorption par l'interface LDTD-APCI devrait fragmenter similairement la STX, même si le mécanisme d'introduction de l'échantillon dans la chambre d'ionisation, ainsi que le processus d'ionisation lui-même, soit différent des autres techniques. Notons que les techniques de comparaison démontraient la présence de la valeur m/z 300, leur permettant de corréler les fragments observés à la STX, ce qui n'est pas notre cas.

Parmi les valeurs m/z obtenues par notre technique, aucun des fragments reproductibles de la STX, générés dans une cellule de collision en MS/MS (identifiés en italique dans le Tableau 3-1), n'a été observé. Par conséquent, nos résultats d'analyse nous font croire que la STX ne désorbe pas, selon nos conditions instrumentales, et c'est probablement en raison du caractère ionique de ce composé qui le rend non-volatil. De plus, il s'est avéré que les valeurs m/z encerclées à la Figure 3-1 ont été aussi observées lors de la désorption de la CYN et de la MC-LR (Figures 3-2a et 3-3a), suggérant des interférences provenant du gaz vecteur, de la plaque analytique ou de l'air ambiant du laboratoire. La valeur à 338 m/z a été identifiée comme étant l'érucamide, un additif ajouté au polyéthylène dont les plaques analytiques sont constituées.⁷⁶

Le mode d'ionisation (-) n'a pas été investigué car au meilleur de nos connaissances la STX n'y produit pas de signal, probablement attribuable à l'absence d'un groupement sulfate acide comme en possèdent certains de ses dérivés.⁷⁷ Toutefois, comme nos résultats en mode d'ionisation (+) démontrent que la STX ne désorbe pas avec l'interface LDTD-APCI, alors peu importe le mode d'ionisation employé, aucun signal ne sera généré. Il est à noter que le spectre balayage complet à 20 % de puissance laser n'est pas présenté, car les

valeurs m/z générées sont les mêmes qu'à 60 % de puissance laser, mais avec une intensité globale de signal plus faible.

3.2. Analyse de la cylindrospermopsine par LDTD-APCI-MS/MS

Les résultats d'analyse de la CYN, obtenus à partir des paramètres des Tableaux 2-2 et 2-3, sont présentés à la Figure 3-2.

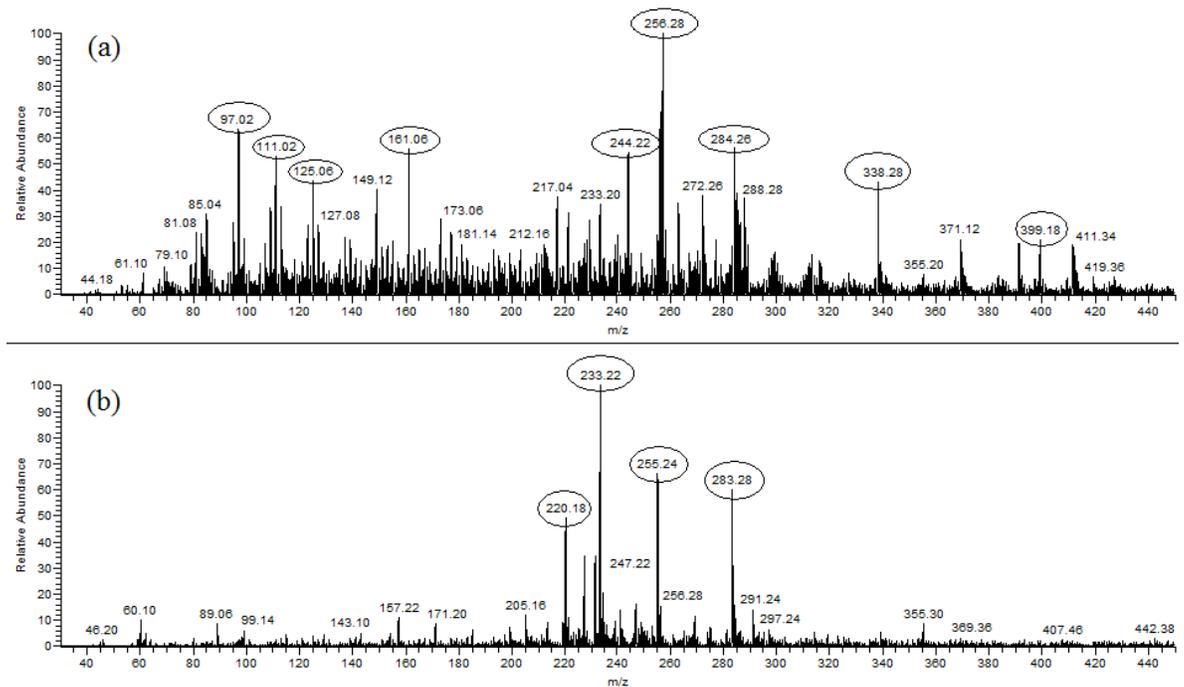


Figure 3-2. (a) Spectre cylindrospermopsine, ionisation (+). (b) Spectre cylindrospermopsine, ionisation (-). (Mode d'acquisition balayage complet, valeurs m/z 30 – 450, 60 % de puissance laser).

Les valeurs m/z encerclées identifient les ions générés lors du processus de désorption, alors que les autres signaux sont présents avant, pendant et après la désorption. Les Figures 3-2a et 3-2b ne montrent pas les valeurs attendues de 416 et 414 m/z , produites respectivement par la CYN intacte protonée en ionisation (+) et par la CYN intacte déprotonée en ionisation (-). Cependant, les deux modes d'ionisation présentent plusieurs valeurs m/z inférieures, suggérant la fragmentation de la CYN lors de la désorption. Ces hypothétiques fragments furent comparés (Tableau 3-2) à ceux répertoriés dans la littérature et obtenus par HPLC-ESI-MS/MS⁷².

Tableau 3-2. Valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI et autre méthode pour la cylindrospermopsine

Méthode	LDTD-APCI (+)	HPLC-ESI-MS/MS (+)	LDTD-APCI (-)
Valeur (m/z)	399	<i>336</i>	283
	<u>338</u>	<i>318</i>	255
	<u>284</u>	<i>274</i>	233
	<u>256</u>	<i>194</i>	220
	<u>244</u>	<i>176</i>	
	<u>161</u>		
	125		
	111		
	97		

Les valeurs m/z soulignées font partie du spectre de désorption de la STX et de la MC-LR (Figures 3-1 et 3-3a), nous permettant d'affirmer qu'ils ne proviennent pas de la CYN. En effet, comme ces valeurs m/z apparaissent sur le spectre de chaque CT, elles doivent être générées par des interférences communes à chaque processus de désorption tel : le gaz vecteur, la plaque analytique ou l'air ambiant du laboratoire.

Parmi les valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI (+), aucun des fragments de la CYN, générés dans une cellule de collision en MS/MS (+) (identifiés en italiques dans le Tableau 3-2), n'a été observé. Notons que la méthode de comparaison démontrait la présence de la valeur m/z 416 en mode d'ionisation (+), permettant de corréler les fragments observés à la CYN. La valeur m/z 399 s'est révélée faire parti du spectre de désorption de la MC-LR (Figure 3-3a), et n'est donc pas un fragment de la CYN pour les mêmes raisons citées plus haut. Les valeurs m/z 125, 111 et 97 possèdent une différence de ± 14 m/z, qui est caractéristique de la perte de groupement CH_2 chez les molécules possédant de longues chaînes alkyles.⁵² L'érucamide possède une telle chaîne, comme le montre son patron de fragmentation MS/MS⁷⁸, justifiant la présence occasionnelle de ces fragments lors de la désorption.

La littérature ne fournit aucune information à propos de la fragmentation de la CYN en mode d'ionisation (-). Cependant, les valeurs m/z obtenues (Figure 3-2b) se sont avérées faire parti du spectre de désorption de la MC-LR (Figure 3-3b), les excluant comme fragments de la CYN. Les résultats obtenus dans les deux modes d'ionisation nous portent

à croire que la CYN ne désorbe pas sous les conditions instrumentales utilisées, possiblement en raison du caractère zwitterionique de la molécule qui la rend non-volatile. Il est à noter que les spectres balayage complet à 20 % de puissance laser, dans les deux modes d'ionisation, ne sont pas présentés, car les valeurs m/z sont les mêmes que celles générées à 60 % de puissance laser, mais avec une intensité globale du signal plus faible.

3.3. Analyse de la microcystine-LR par LDTD-APCI-MS/MS

Les résultats d'analyse de la MC-LR, obtenus à partir des paramètres des Tableaux 2-2 et 2-3, sont présentés à la Figure 3-3.

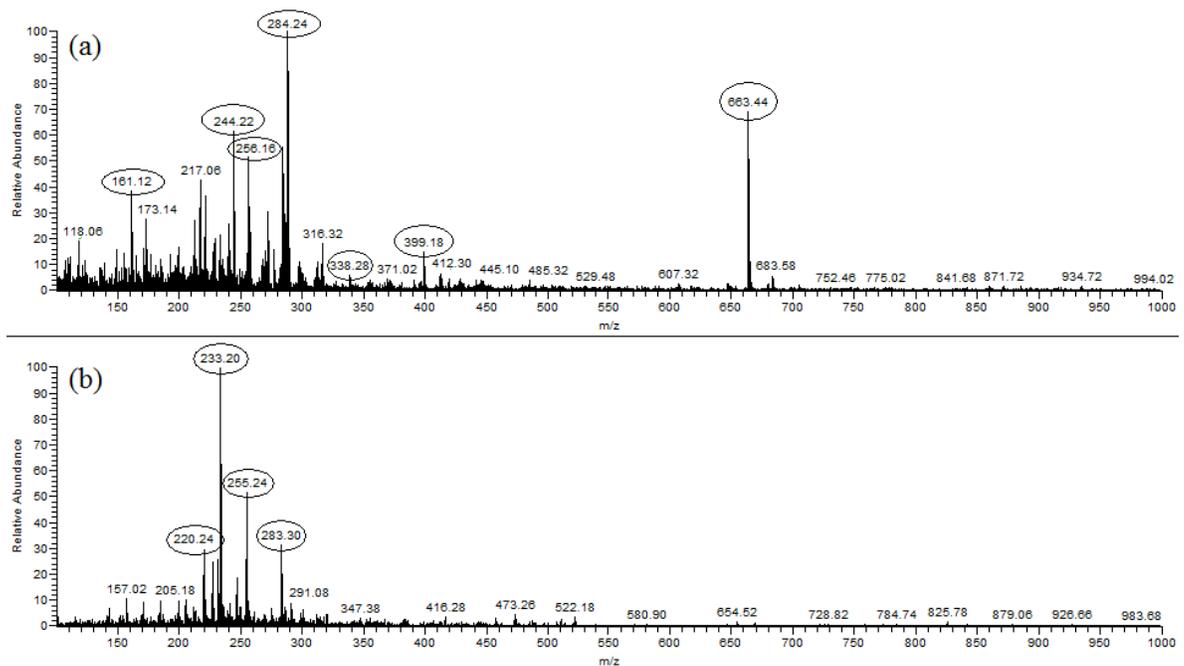


Figure 3-3. (a) Spectre microcystine-LR ionisation (+). (b) Spectre microcystine-LR ionisation (-) (Mode d'acquisition balayage complet, valeurs m/z 100 – 1000, puissance laser 60 %).

Les valeurs m/z encerclées identifient les ions générés lors du processus de désorption, alors que les autres signaux sont présents avant, pendant et après la désorption. Les Figure 3-3a et 3-3b ne montrent pas les valeurs attendues de 995 et 993 m/z , produites respectivement par la MC-LR intacte protonée en ionisation (+) et par la MC-LR intacte déprotonée en ionisation (-). Cependant, les deux modes d'ionisation présentent plusieurs valeurs m/z inférieures, suggérant la fragmentation de la MC-LR lors de la désorption. Ces

hypothétiques fragments furent comparés (Tableau 3-3) à ceux répertoriés dans la littérature et obtenus par HPLC-ESI-MS/MS.⁷⁰⁻⁷¹

Tableau 3-3. Valeurs m/z obtenues par LDTD-APCI et autres méthodes pour la microcystine-LR

Méthode	LDTD	HPLC	HPLC	HPLC	LDTD	HPLC
	APCI	ESI-MS	ESI-MS/MS	ESI-MS/MS*	APCI	ESI-MS
	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Valeur (m/z)	663	861	967	882	<u>283</u>	496**
	<u>399</u>	498*	866	861	<u>255</u>	487**
	<u>338</u>	482*	728	779	<u>233</u>	
	<u>284</u>	135	682	594	<u>220</u>	
	<u>256</u>		599	498		
	<u>244</u>		553	482		
	<u>161</u>		397	468		
			375	431		
			268	135		
			213			
			135			

*MC-LR ou fragments possédant deux charges positives.

**MC-LR ou fragments possédant deux charges négatives.

Les valeurs m/z soulignées (Tableau 3-3) font partie du spectre de désorption de la STX et/ou de la CYN (Figures 3-1, 3-2a et 3-2b), les excluant comme fragments de la MC-LR. La comparaison des valeurs m/z générées par LDTD-APCI (+/-), avec les fragments produits par HPLC-ESI-MS (+/-), ne montre aucune concordance. Notons que les techniques de comparaison démontraient la présence des valeurs 995 et 498 m/z en mode d'ionisation (+), et les valeurs 993 et 496 m/z en mode d'ionisation (-), permettant de corréliser les fragments observés à la MC-LR.

Les peptides analysés par MS/MS génèrent des patrons de fragmentation permettant d'élucider leur composition en AA, ainsi que la séquence de ceux-ci à l'intérieur du peptide. Selon l'endroit où le bris du lien peptidique survient, les fragments possèdent un nombre déterminé d'AA et une valeur m/z définie. Le Tableau 3-3 présente les fragments produits par les différentes séquences d'AA de la MC-LR (identifiés en italique dans le Tableau 3-3), pouvant servir à identifier le signal à 663 m/z (Figure 3-2a). Toutefois, aucun fragment de la MC-LR ne correspond à ce signal. Cependant, conjointement au processus

de fragmentation, il peut survenir une perte de petites molécules, tels l'ammoniaque et l'eau, sur les ions fragments.⁷⁹ Ainsi, le retrait d'une molécule d'eau (-18 m/z) aux séquences d'AA de la MC-LR générant une valeur m/z de 682, soit les AA 6+7+1+2+3+4+H et 4+5+6+7+H (Figure 1-1), résulte à une valeur m/z de 664. Malgré cela, on ne peut affirmer que la présence du signal à 663 m/z provient de la MC-LR, surtout que le signal de la molécule intacte n'apparaît pas dans le spectre de désorption.

Nos résultats d'analyse nous font croire que la MC-LR ne désorbe pas, selon nos conditions instrumentales, et c'est probablement à cause de la polarité de ce composé, ainsi qu'à sa M.M. élevée, qui le rend non-volatil. Il est à noter que les spectres à 20 % de puissance laser, dans les deux modes d'ionisation, ne sont pas présentés, car les valeurs m/z sont les mêmes que celles générées à 60 % de puissance laser, mais avec une intensité globale du signal plus faible.

3.4. Perspectives futures

L'interface LDTD-APCI s'inscrit parmi les techniques émergentes effectuant la désorption d'analytes préalablement déposés sur une surface, sous pression atmosphérique.⁸⁰ L'ionisation subséquente des composés permet la détection rapide de ceux-ci par la MS. Quoique ces techniques simplifient et accélèrent l'analyse par le retrait de l'étape chromatographique, la littérature scientifique, elle, n'abonde pas sur le sujet. L'approfondissement des connaissances, principalement au niveau des variables influençant la désorption des composés, améliorera les performances de ces méthodes ainsi que l'étendue des composés se prêtant à ce type d'analyse.

Par exemple, il a été démontré que l'intensité du signal de certains analytes (hormones stéroïdiennes) variait selon le solvant utilisé pour la déposition dans les puits des plaques analytiques.⁵⁸ L'explication se situerait au niveau de la tension de surface du solvant qui influencerait la cristallisation par une dispersion adéquate des analytes sur la surface du puits, et ultimement, les interactions analyte-analyte, analyte-matrice et analyte-surface. Dans le même ordre d'idées, il sera démontré au Chapitre 4 qu'un composé

possédant une fonction ionisable occasionne une variation du signal en fonction du pH du solvant de déposition.

Par ailleurs, la modification des interactions analyte-analyte et analyte-surface est aussi possible par l'entremise d'une forte concentration d'acide stéarique ajoutée au solvant de déposition. L'acide stéarique est constitué d'une chaîne C₁₈, qui, lorsque mis en excès par rapport aux analytes, enchevêtre et trappe ceux-ci lors de la cristallisation. Lors de la désorption de la matrice d'acide stéarique de la surface du puits analytique, il survient un effet d'entraînement des analytes qui passent ainsi en phase vapeur. Ceci a été démontré dans le cas du chloramphénicol (antibiotique), résultant en une augmentation du signal d'un facteur 5 à 10.⁸¹

La dérivation chimique des analytes serait une avenue à envisager afin de changer les propriétés physico-chimiques de ceux-ci et ainsi favoriser leur désorption lors du transfert de chaleur. Comme mentionné à la section 1.7.2.2, les MC peuvent être modifiées chimiquement pour augmenter leur volatilité à l'aide d'une oxydation chimique au permanganate de potassium. Le réactif clive les MC au niveau de l'AA Adda (Figure 1-1) et génère un fragment analysé par GC, présupposant un caractère volatil à ce nouvel analyte.⁴⁶ Nous envisagions d'effectuer la procédure d'oxydation des MC, suivi de l'analyse du fragment par LDTD-APCI-MS/MS, mais le projet a avorté suite à la discontinuité commerciale de l'étalon servant au développement de la méthode. Il est à noter que deux limitations sont associées à cette procédure : (i) la non-sélectivité de la méthode d'oxydation, vu la présence de l'AA Adda à l'intérieur de la structure chimique d'une grande majorité des MC, rendant du même coup impossible la différenciation des dérivés qui possèdent une toxicité variable, et (ii) l'effort nécessaire pour effectuer la procédure complète de dérivation qui vient compromettre l'avantage que procure le temps d'analyse rapide de la LDTD-APCI.

Il a été question à la section 3.1 de la présence de l'érucamide dans les spectres d'essais de désorption de la STX, CYN et la MC-LR. Ces molécules, incluant les impuretés contenues dans le gaz vecteur et l'air ambiant du laboratoire, peuvent causer une suppression du signal en diminuant l'efficacité d'ionisation des analytes d'intérêt. Ce

phénomène survient lorsque l'AP des impuretés est supérieure à l'AP des analytes. Par conséquent, il serait avantageux de retirer l'érucamide des composantes entrant dans la fabrication des plaques analytique, ce qui permettrait probablement d'augmenter le signal des analytes désorbés, et du même coup de diminuer les limites de détection instrumentales.

Les possibilités présentées dans cette section n'ont pas été investiguées dans le présent projet car, outre les résultats présentés dans ce chapitre, la totalité des travaux a consisté à développer une méthode d'analyse de l'ANA-a. Celle-ci a démontré le potentiel d'être facilement désorbée et ionisée avec la LD TD-APCI, quoiqu'une embûche de taille devait être surmontée, soit l'interférence isobarique de l'AA phénylalanine (PHE) lors de l'analyse de l'ANA-a par MS/MS. Le prochain chapitre résume le développement de la méthode d'analyse ainsi que les stratégies utilisées pour enrayer cette interférence. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis au journal scientifique *Analytical Chemistry*.

Chapitre 4. Analyse ultra-rapide de l'anatoxine-a par LDTD-APCI-MS/MS : Développement, validation de la méthode et résolution de la phénylalanine

Avant-propos : La presque totalité des travaux associés à l'article qui suit, incluant la recherche de la littérature pertinente, les manipulations en laboratoire, l'analyse des résultats et la rédaction complète de l'article, a été effectuée par l'auteur de ce mémoire. Les coauteurs ont agi à titre de conseillers technique et scientifique lors de la première soumission de l'article. Pour la soumission subséquente, les coauteurs ont agi comme correcteurs et manipulateurs en laboratoire afin de satisfaire les exigences des réviseurs choisis par l'éditeur. Par conséquent, le mémoire contient la version améliorée de l'article suite aux commentaires des réviseurs.

Les lecteurs sont avisés que certains propos présentés dans les chapitres précédents concernant l'ANA-a et la LDTD-APCI, tout comme les abréviations utilisées, sont répétés afin de reproduire intégralement l'article scientifique et de conserver la cohésion et la compréhension de celui-ci. Les références relatives à cet article ont été intégrées aux références du reste de l'ouvrage.

Ultra-Fast Analysis of Anatoxin-A Using Laser Diode Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Validation and Resolution from Phenylalanine

Pascal Lemoine[†], Patrice Tremblay[‡], Michèle Prévost[§], Morgan Sollicec[†] and Sébastien Sauvé[†]

[†]Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

[‡]Phytronix Technologies, Québec, QC, Canada

[§]NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Department of Civil, Geological and Mining Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montreal, QC, Canada

Reproduced with permission from Analytical Chemistry journal, submitted for publication. Unpublished work copyright 2010 American Chemical Society. Manuscript ID ac-2010-01090z.R1

Abstract

A novel approach for the analysis of the cyanobacterial toxin, anatoxin-a (ANA-a), in an environmentally relevant matrix, using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (LDTD-APCI-MS/MS) is presented. The ultra-fast analysis time (15 s/sample) provided by the LDTD-APCI interface is strengthened by its ability to remove interference from phenylalanine (PHE), an isobaric interference in ANA-a analysis by MS/MS. Thus the LDTD-APCI interface avoids the time consuming steps of derivatization, chromatographic separation or solid-phase extraction prior analysis. Method development and instrumental parameter optimizations were focused toward signal enhancement of ANA-a, and signal removal of a PHE interference as high as 500 $\mu\text{g/L}$. External calibration in a complex matrix gave detection and quantification limit values of 1 and 3 $\mu\text{g/L}$ respectively, as well as good linearity ($R^2 > 0.999$) over nearly two orders of magnitude. Internal calibration with clomiphene (CLO) is possible and method performance was similar to that obtained by external calibration. This work demonstrated the utility of the LDTD-APCI source for ultra-fast detection and quantification of ANA-a in environmental aqueous matrices, and confirmed its ability to suppress the interference of PHE without sample preparation or chromatographic separation.

Introduction

Anatoxin-a (ANA-a) is a neurotoxic alkaloid compound produced by many freshwater cyanobacteria genera, namely *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Oscillatoria* and *Planktothrix* among others.⁵ This neurotoxin was the first cyanotoxin structurally characterized and was found to be a low molecular weight (M.W. = 165.12 g/mol) bi-cyclic secondary amino molecule, which is also named more systematically: 2-acetyl-9-azabicyclo(4,2,1)non-2-ene (Figure 4-1).²¹ It is readily soluble in

natural waters by protonation of the amino function (pK_a 9.4), generating the cationic species.⁸² ANA-a is stable in acidic media ($pH \leq 3$), but degrades rather rapidly in alkaline conditions and is light sensitive.⁸³

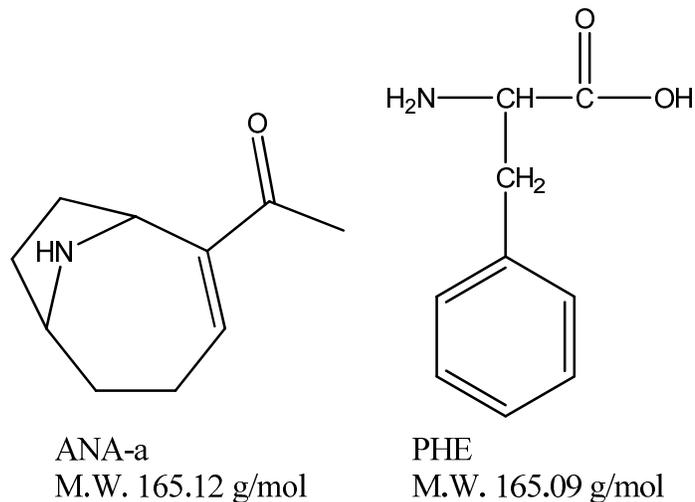


Figure 4-1. ANa-a and PHE structures and corresponding molecular weights (M.W.).

This potent toxin mimics the effect of the neurotransmitter acetylcholine by competition for binding to acetylcholine-receptors. ANA-a has a greater affinity for nicotinic acetylcholine-receptors than acetylcholine, and is not hydrolyzed by acetylcholinesterase, resulting in overstimulation of respiratory muscles and suffocation of exposed individuals.³² An LD_{50} value of 200 – 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was determined by intraperitoneal injection on mice and as of now, suggested guideline values addressing tolerable ANA-a concentration in drinking and recreational water range from 1 to 12 $\mu\text{g}/\text{L}$.^{10,84-85}

Techniques for analyzing ANA-a have been reviewed by Osswald et al.⁵, ranging from biological methods to chromatographic methods, both in gas and liquid phase, using electron capture, UV, fluorescence or mass spectrometry (MS) for analyte detection. Bioassays using different test organisms are no longer in use for the analysis of ANA-a since they lack specificity, require a large amount of standard material to be effective and are prone to ethical criticisms. The chromatographic methods coupled with spectroscopic detection are not sensitive enough, and necessitate derivatization to improve their detection

limits. The coupling with MS allows for better sensitivity and specificity; however the essential amino acid phenylalanine (PHE) (Figure 4-1) is an isobaric interference in MS detection of ANA-a, using single or triple quadrupole(s) instruments.⁸⁶ Furey et al.⁸⁷ depicted multiple options to remove this interference: (i) derivatization of ANA-a and PHE with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole to alter significantly the compounds' chromatographic behavior, (ii) selective methylation of PHE with diazomethane prior to LC-MS analysis (iii) use of other MS techniques such as hybrid quadrupole time-of-flight (QqTOF) or quadrupole ion-trap (QIT) providing respectively higher mass resolution or intrinsic mass fragmentation pathway. Otherwise, sufficient chromatographic resolution of PHE from ANA-a, without derivatization, was achieved with high performance LC⁸⁸ and ultra-performance LC⁸⁹ with retention times around 8 and 3 min respectively. Despite these performances achieved by chromatography, costly solvent and columns are necessary and the analysis time is counted in minutes.

An MS interface called LDTD (Laser Diode Thermal Desorption), which is combined with atmospheric pressure chemical ionization (APCI), has shown great potential to reduce analysis time to seconds by removing the chromatographic step and introducing charged analytes directly into the mass spectrometer.⁵⁷⁻⁵⁹ Fayad et al.⁵⁸ have described in detail the working fundamental principles of LDTD-APCI, as well as optimization of instrumental parameters for the analysis of feminizing hormones.

Herein we report the first application of the LDTD-APCI source, coupled to MS/MS, for the detection and quantification of cyanotoxin ANA-a in a complex matrix, eliminating the PHE interference without any laborious and time-consuming sample preparation. Optimization of instrumental parameters for simultaneous detection of ANA-a and removal of PHE interference, are demonstrated. Method validation, including evaluation of detection and quantification limits, linear dynamic range, accuracy and precision are reported. We also explore the suitability of clomiphene (CLO) as an internal standard (IS) for internal calibration. This new method generates high-throughput results (roughly an order of magnitude faster than LC alternative) and could be adapted and applied for environmental and food safety screening purposes.

Materials and Methods

Chemical and Reagents

ANA-a/fumarate salt was obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). L-PHE, 99% and CLO/citrate salt were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Oakville, ON, Canada). Sodium hydroxide (certified A.C.S.) and glacial acetic acid (HPLC) were purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Compressed air (Ultra Zero Certified grade; ≤ 2 ppm water), used as carrier gas, was obtained from MEGS Specialty Gases, Inc. (St-Laurent, QC, Canada). Methanol (MeOH) of HPLC grade was acquired from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Stock solution and bloom matrix preparation

1 mg ANA-a/fumarate salt was dissolved in 10 mL demineralized/distilled water (dd-H₂O), containing 0.05 M glacial acetic acid, (pH ~ 3), and was stored at -20 °C. Earlier studies showed that ANA-a is stable for 3 – 4 months under these conditions.^{24,90} All working solutions and dilutions of ANA-a were prepared daily with the final pH adjusted to 11.5 with NaOH (5 mM). Diluted solutions of ANA-a were prepared in dd-H₂O and MeOH (50:50, v/v). The artificial bloom matrix was made by mixing, in equal proportion, a pure culture media (ASM-1)⁹¹, containing a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa*, and river water. Before mixing, freeze-thawing of the culture media was repeated three times to lyophilize cells, followed by filtration using 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Working solutions of ANA-a in bloom matrix were also prepared daily (pH 11.5) with the filtrate. Diluted solutions of ANA-a were prepared in bloom matrix and MeOH (50:50, v/v). For internal calibration, CLO in bloom matrix and MeOH (50:50, v/v), was added to solutions at 10 μ g/L.

Analysis with LDTD-ACPI-MS/MS

Compounds desorption and ionization were performed with the T-960 LDTD-APCI interface model, controlled by LazSoft 4.0 software (Phytronix Technologies, Québec, QC, Canada). Analytes were detected using a Quantum Ultra AM triple quadrupole mass

spectrometer, controlled by Xcalibur 2.0 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Samples containing dissolved analytes were spotted (2 μL) in wells, made of a thin stainless steel alloy embedded in a 96 sample-plate, and heated at 30 °C until dryness. Each well has a hexagonal shape engineered to concentrate the crystallizing analytes in the heating zone while solvent evaporates. The loaded plate is inserted inside the LDTD housing unit, where an X – Y moveable stage aligns the back of the wells in front of an infra-red laser diode (980 nm, 20 W, continuous). Desorption occurs when the focalized laser hits the back of a well, vaporizing the analytes through indirect heat transfer between the bottom of the well and the crystallized analytes. A glass transfer-tube ensures that no loss of analytes occurs while they are transported by the carrier gas to the Corona needle region. Another important role of the carrier gas is to prevent internal fragmentation of the desorbed compounds, by thermalization. Furthermore, the temperature of the carrier gas is set to 50 °C to avoid any temperature variation. Since there is no solvent, uncharged molecules arriving in the corona region go through the APCI process via water molecules present in the carrier gas (and thus generate a distinct and cleaner signal than APCI combined with LC).⁶⁸

Optimization of LDTD-APCI instrumental parameters was done in positive ionization mode with the following settings: sheath gas 0, ion sweep gas 0.3, auxiliary gas 0 (all arbitrary values) and capillary temperature 350 °C. Diluted solutions of ANA-a (500 $\mu\text{g/L}$) in dd-H₂O (pH ~ 3) were used to optimize the laser power, while 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a was used to optimize the other parameters. The resulting LDTD-APCI instrumental parameters were: carrier gas flow rate 2 L/min, corona discharge current 3 μA and laser power 20%. The laser power pattern was the following: 3 s at 0%, 1 s ramp from 0 to 20%, 3 s hold at 20%, 0.01 s from 20 to 0% and 8 s at 0%. CLO was analyzed with the same LDTD-APCI parameters.

Selected reaction monitoring (SRM) mode was used for the detection and quantification of ANA-a, and optimization of MS/MS parameters was carried out with the following conditions: collision gas (Ar) pressure 1.5 mTorr and resolution for Q1/Q3 was set to 0.7 u fwhm (full width at half maximum). The SRM transitions used for ANA-a

quantification and confirmation appear in Table 4-1. For internal calibration, the instrument response was determined as the ratio of the analyte area to that of the IS (SRM transition m/z 406.1 \rightarrow 101.1).

Tableau 4-1. Optimal Selected Reaction Monitoring (SRM) parameters for the analysis of ANA-a, CLO and PHE with MS/MS.

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision Energy (V)	Tube Lens (V)
ANA-a	166.1	149.1 ^a	15	53
	166.1	131.1 ^b	20	53
CLO	406.1	101.1	23	83
PHE	166.1	120.1	17	53
	166.1	149.1	10	53
	166.1	131.1	15	53

^aTransition m/z 166.1 \rightarrow 149.1 (quantification)

^bTransition m/z 166.1 \rightarrow 131.1 (confirmation)

When needed, SYSTAT 11 software (Chicago, IL, USA) for Windows was used for statistical comparison. Tests performed include t-test for two groups, and ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Method validation

Data analysis was performed with LCQuan 2.5 software by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Method validation was done with a seven-point external and internal calibration curve on bloom matrix spiked with ANA-a. Each concentration, ranging from 3 to 250 $\mu\text{g/L}$, was analyzed in triplicate. Method detection limit (MDL) and method limit of quantification (MLQ) were respectively established as 3 and 10 times the result of adding the standard deviation to the mean value of 10 blank matrix replicates, and dividing by the slope of the calibration curve (external or internal). Accuracy (%), expressed as the % relative error (RE), and precision, expressed as the % relative standard deviation (RSD), were evaluated using spiked bloom matrix samples of ANA-a at 5, 20 and 200 $\mu\text{g/L}$ (QC), analyzed five times with IS. The suitability of CLO as an IS was evaluated with a 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a concentration, mixed with three different CLO concentrations (10,

25, 50 $\mu\text{g/L}$), in the dd- H_2O (pH 11.5) and MeOH (50:50, v/v) solvent. All solutions were analyzed 8 times with the optimized LDTD parameters for ANA-a detection and the % RSD obtained were compared to establish the optimal CLO concentration. Repeatability was evaluated by analyzing triplicates of the same standard (30 $\mu\text{g/L}$) over ten different days.

Evaluation of PHE interference on ANA-a analysis by LDTD-APCI-MS/MS

A 100 mg/L solution of L-PHE was prepared daily by dissolving 50 mg of L-PHE in 500 mL dd- H_2O . All working solutions and dilutions of PHE (5 mg/L and 500 $\mu\text{g/L}$ respectively) were prepared daily in dd- H_2O with the final pH adjusted to 11.5 with NaOH (5 mM). Two other solutions containing i) 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a and ii) 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a and 500 $\mu\text{g/L}$ PHE were similarly prepared. Interference evaluation was executed by comparison of the peak area given by ANA-a SRM transitions for the following solutions: blank, 500 $\mu\text{g/L}$ PHE, 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a and 500 $\mu\text{g/L}$ PHE + 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a. Data were acquired using LDTD-APCI and MS/MS parameters as optimized for ANA-a detection. The SRM transition parameters for PHE analysis by MS/MS are presented in Table 4-1 and were used to confirm the presence of PHE.

Results and Discussion

LDTD-APCI-MS/MS parameter optimization for ANA-a analysis

Our first step was to ensure that ANA-a vaporized and formed the protonated molecule $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 166.1, as well as the expected fragments at m/z 149.1 and 131.1, in positive ionization mode.⁹² We used a default laser power value of 35%, combined with the laser pattern described earlier. Default carrier gas flow rate and corona discharge current values were set respectively at 3 L/min and 4 μA . For this initial experiment the solvent used for sample deposition was acidified dd- H_2O (acetic acid 0.05 M, pH \sim 3). Figure 4-2a shows that ANA-a desorbs readily as evidenced by the extracted full scan spectrum (Figure 4-2b). The expected fragments were also observed as shown in Figure 4-2c, demonstrating that ANA-a is a suitable compound to be analyzed by LDTD-APCI-MS/MS. Optimal

collision energies, generating the highest signal intensity for each fragment chosen, are presented in Table 4-1.

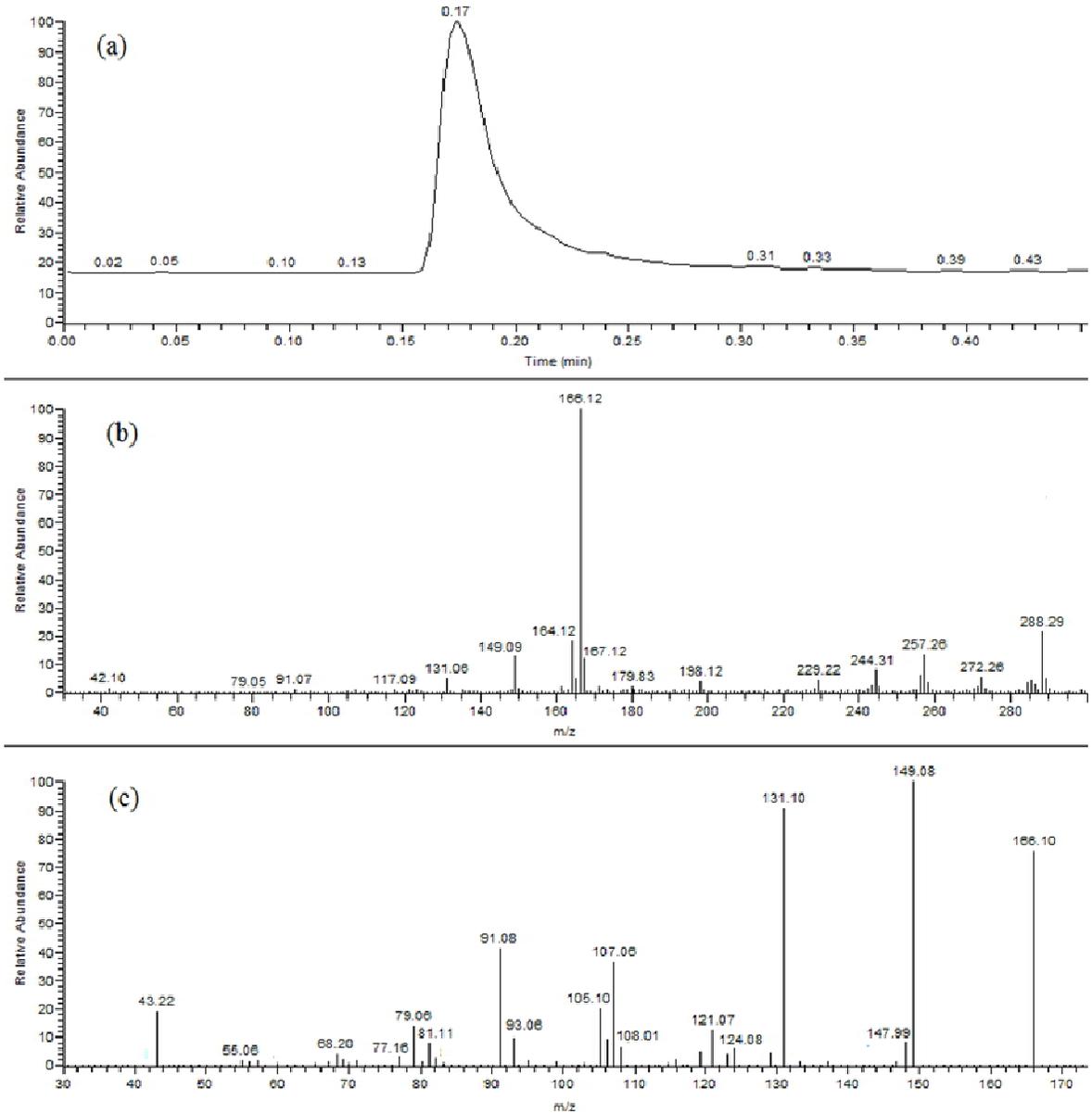


Figure 4-2. (a) Ana-a desorption peak. (b) Ana-a full scan spectrum (m/z 30 – 300). (c) Ana-a full scan product ion spectrum (m/z 30 – 180) acquired with 18 V collision energy. All three analyses (a-c) were carried out at 35 % laser power.

Laser power is a crucial parameter which must be optimized to favor total desorption of the crystallized compound while minimizing fragmentation/decomposition due to an accumulation of excessive internal energy.⁶⁴ Moreover, a proper adjustment of the laser power may prevent vaporization of matrix compounds, thus reducing the background noise. We used selected ion monitoring (SIM) mode to compare the peak area given by different laser power (%), with incremental values of 5% to a maximum of 55%. Analyses were done in triplicate and the results presented in Figure 4-3 show that with a laser power $\geq 20\%$, the ANA-a signal does not significantly improve ($P > 0.05$) even though an upward trend was observed with greater laser power (%). Variability was acceptable for all laser power tested, with % RSD values ranging from 4 – 15%. We selected 20% laser power to overcome the interference of PHE, as will be discussed later.

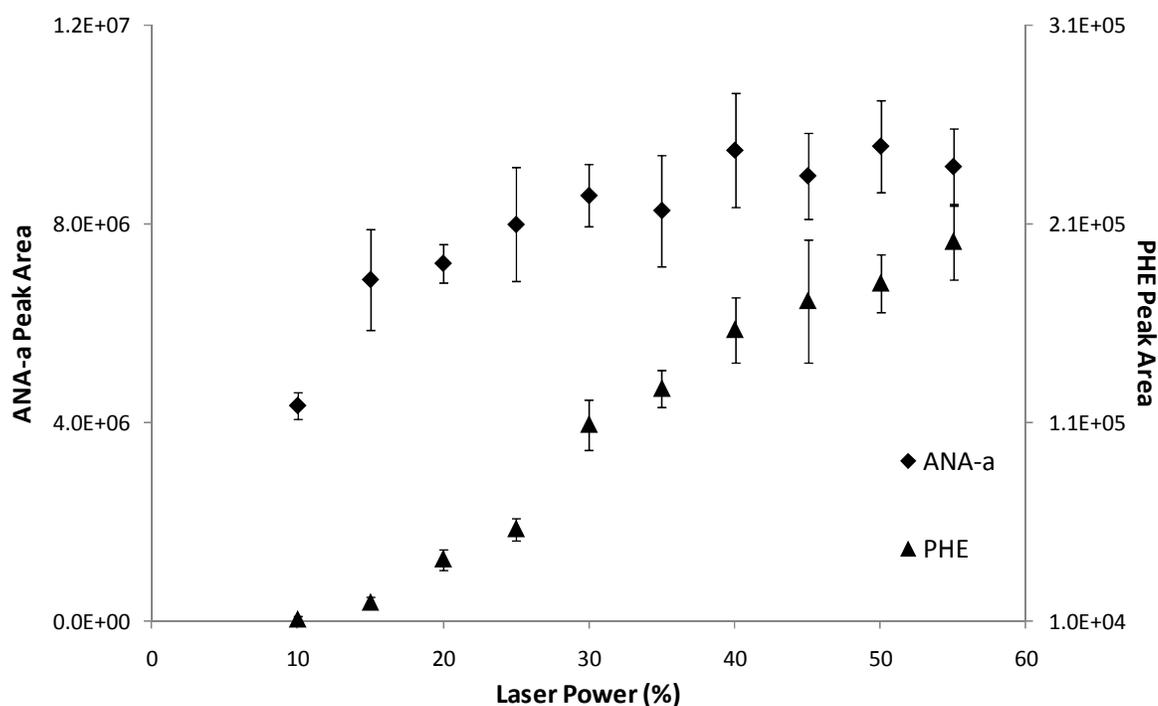


Figure 4-3. Average peak area of 500 $\mu\text{g/L}$ ANA-a and 500 $\mu\text{g/L}$ PHE. ($n = 3$ for each laser power (%) used, SIM m/z 166.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

The carrier gas flow rate must be adjusted to obtain maximal sensitivity, but until this point in our experiment, the carrier gas flow rate optimization was done with a fixed

corona discharge voltage⁵⁷⁻⁵⁸ or with a fixed corona discharge current.⁵⁹ A fixed corona discharge voltage can bring instability in the resulting corona discharge current, as was demonstrated by our first experiments (Supplemental Information Figure 4-7), and a single arbitrary corona discharge current value for optimizing the carrier gas flow could affect sensitivity. To investigate the effect of those variables on signal intensity, we analyzed (n = 3) ANA-a with the optimal laser parameters while changing carrier gas flow rate values (1 to 6 L/min) with fixed discharge current values, ranging from 1 to 6 μA (Figure 4-4).

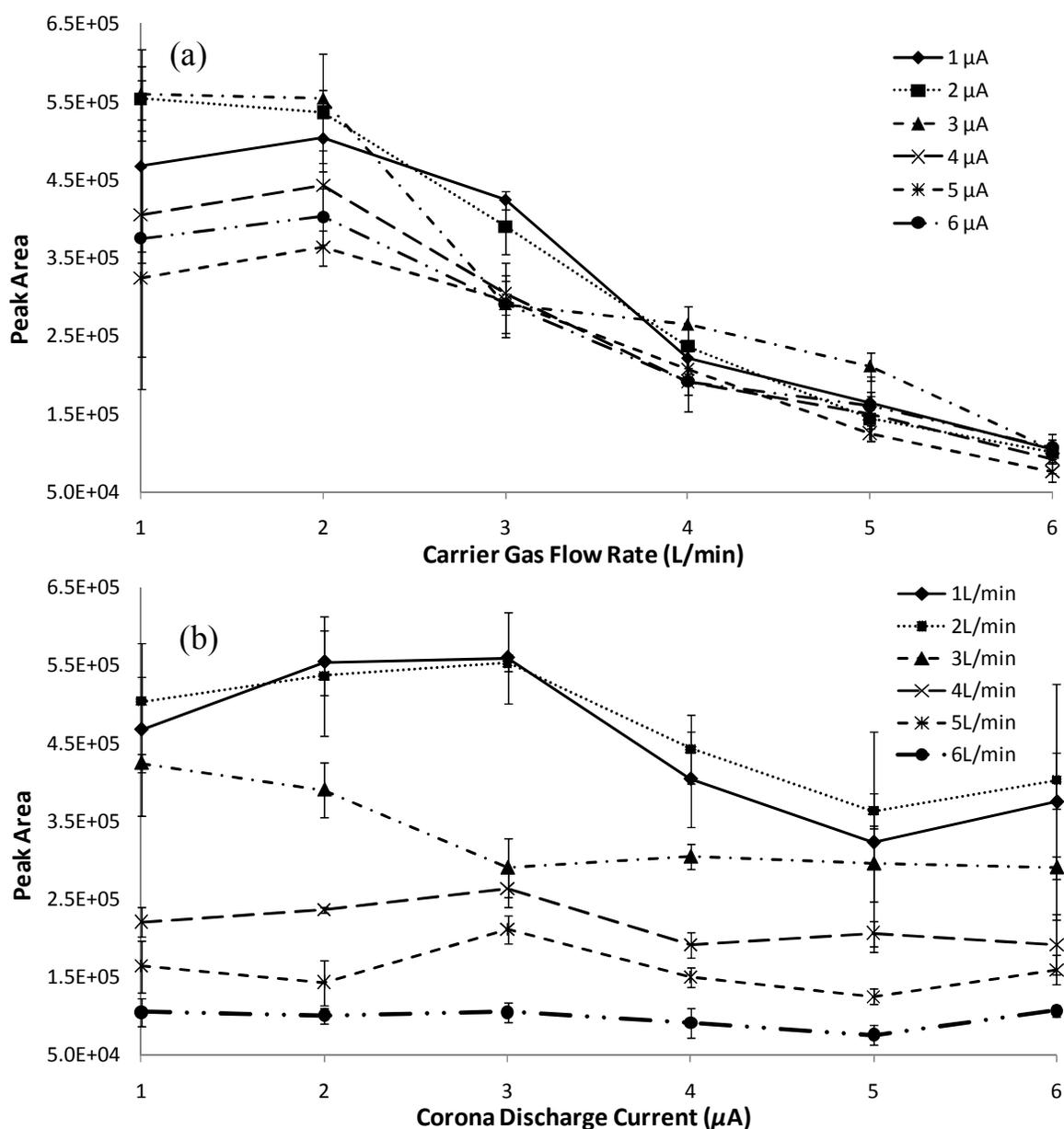


Figure 4-4. (a) Effects on ANA-a signal intensity of changing the carrier gas flow rate (1 to 6 L/min) with fixed discharge current values (1 to 6 μ A). (b) Effects on ANA-a signal intensity of changing the discharge current value (1 to 6 μ A) with fixed carrier gas flow rates (1 to 6 L/min). (For each setting: $n = 3$, 20% laser power, SRM m/z 166.1 \rightarrow 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

With a carrier gas flow rate superior to 2 L/min, signal intensity was compromised, independently of the corona discharge current value used (Figure 4-4a). These results were also observed for BTEX analysis in air by Badjagbo et al.⁹³ who demonstrated how carrier gas velocity influences analyte ionization efficiency. They found that signal intensity was related to analyte residence time in the corona discharge region. It is interesting to note that our optimal carrier gas flow rate value is in the same range (2 – 3 L/min) as the studies mentioned, suggesting that this parameter is not compound-dependent but rather a physical constraint to obtain efficient ionization. High corona discharge currents decrease sensitivity for low carrier gas flow rate values, while changing corona discharge current had no effect for high carrier gas flow rates (Figure 4-4b). This may be explained by the work done by Eiceman et al.⁹⁴ who demonstrated that the abundance of less reactive water clusters $H_3O^+(H_2O)_n$ ($n = 3 - 9$) increases with higher corona discharge current values. Therefore, for low carrier gas flow rates, high corona discharge currents cause a slight drop in signal intensity due to the increasing presence of these less reactive species, which diminish ionization efficiency. For higher carrier gas flow rate values, this influence is negligible since ionization efficiency is most strongly influenced (reduced) by low time residence in the corona discharge region. In our case, the effect of water clusters $n = 3 - 9$ on ionization seems lessened because their abundance is a function of the initial amount of water contained in the air used as the reagent gas.⁶⁸⁻⁶⁹ It was demonstrated that air containing 21 % relative humidity produced mainly water clusters $n = 5 - 8$, with only a small portion of highly reactive water clusters $n = 1 - 2$, while with air containing 3 ppm of water the proportion of water clusters $n = 1 - 2$ increased significantly. Nonetheless, in light of our results, we selected a 2 L/min carrier gas flow rate and a 3 μ A corona discharge current to provide optimal sensitivity and signal stability.

Initially, acidified aqueous matrices were used for analyte deposition in wells, since ANA-a is stable in acidic media. We then evaluated the signal response under basic

conditions for which ANA-a would be a neutral compound (pK_a 9.4) and should vaporize with more ease.⁹⁵ Diluted ANA-a solutions were prepared with three different aqueous solvents (pH 3.0, 8.0 and 11.5). The results of triplicate analysis are presented in Figure 4-8 (Supplemental Information), where a threefold signal enhancement at a pH value of 11.5 was observed. With ANA-a being light sensitive and decomposing under basic conditions, we evaluated the extent of degradation for an ANA-a solution (pH 11.5) analyzed immediately after its preparation, and analyzed four hours later (240 min) while standing at room temperature and exposed to light. Results presented in Figure 4-9 (Supplemental Information) showed that after four hours a 50% degradation occurred under those conditions, which is consistent with the half-life (270 min) that Stevens et al.⁸³ obtained with similar conditions. Thus, analyses should be carried out rapidly after the solutions are prepared to prevent analyte degradation. Occasionally, with water (2 μ L) used as the deposition solvent, the well surface was not fully covered due to the high surface tension of the solvent. To ensure better solvent dispersion and more reproducible crystallization of the analytes on the well surface as the solvent evaporates, we mixed our aqueous matrix with an equal proportion of MeOH. Since the solvent used for analyte deposition may have an effect on signal intensity⁵⁸, we compared the peak area of ANA-a ($n = 8$) in water and in the mixed solvent (Figure 4-10, Supplemental Information). A slight signal augmentation ($P < 0.05$) was observed with the binary solvent mixture, and though the % RSD values were 4% for H₂O and MeOH (50:50, v/v) and 9% for H₂O, the compared precisions were not statistically different ($P > 0.05$). We selected the binary solvent mixture since we visually observed that it fully covered the wells for each sample deposition.

We evaluated the variability by analyzing a given 30 ppb standard over ten different days, % difference was lower than 3% on five days out of ten and reached a maximum of 8% on two occasions due to a high outlier values for one of the triplicate on those two days (data not shown).

Removal of PHE interference

Evaluation of PHE interference was done with a 500 μ g/L concentration, chosen to mimic a natural and dense blue-green algae bloom (See Supplemental Information for

details on concentration estimation). Our first assessment of the possible influence of PHE on ANA-a analysis by LDTD-APCI-MS/MS began by examining PHE vaporization in SIM mode for m/z 166.1, analogous to what we had done with ANA-a. Initial results were promising (Figure 4-3) indicating that an equal concentration of PHE generated a signal approximately two orders of magnitude lower than ANA-a. A full scan spectrum (m/z 30 – 180) of 5 mg/L PHE, acquired with a 20% laser power, reveals a base peak at m/z 120.1 resulting from the loss of formic acid⁸⁷, indicating that in-source fragmentation occurs (Figure 4-5a) and explaining the signal disparity observed between ANA-a and PHE in Figure 4-3. Given the low signal of PHE when acquired with a 20 % laser power, we analyzed it (5 mg/L) with a 60% laser power to generate a better signal and roughly estimate the relative importance of the signals generated by PHE for the SRM transitions chosen for analysis of ANA-a (Table 4-1). The full scan product ion spectrum obtained with a 10 V collision energy confirms the potential of false positive results by the presence (relative intensities compared to m/z 120.1 < 10%) of product ions at m/z 149.1 and 131.1 (Figure 4-5b).

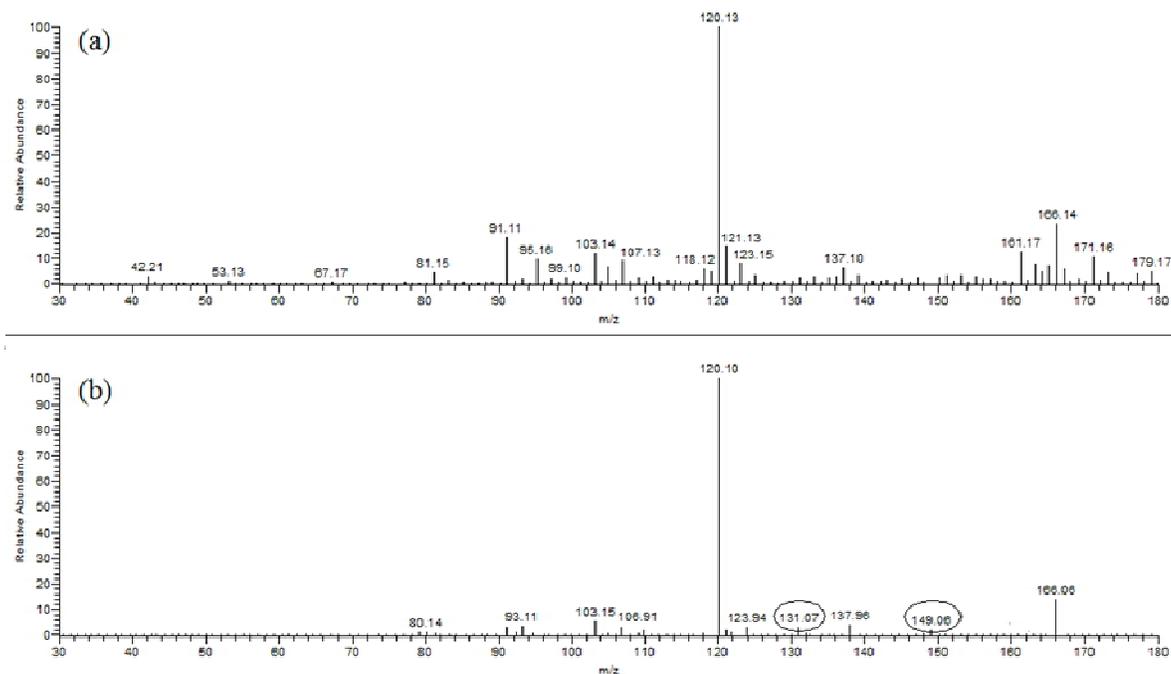


Figure 4-5. (a) PHE full scan spectrum (m/z 30 – 180) (20% laser power). (b) PHE full scan product ion spectrum (m/z 30 – 180) acquired with a 60% laser power and 10 V collision energy.

Our next step was to eliminate this interference by combining the feeble production of PHE ion at 20% laser power with collision energies that favor production of fragment ions of ANA-a over those of PHE. As can be seen in Table 4-1, ANA-a is more difficult to dissociate, expressed by the higher collision energies required to maximize production of the product ions. As ANA-a SRM intensities increase with higher collision energy, until reaching optimal values of 15 and 20 V, PHE signal intensities decrease after exceeding optimal collision energies of 10 and 15 V (m/z 166.1 \rightarrow 149.1 and 131.1 respectively). We compared the peak areas given by the following solutions: blank, 500 $\mu\text{g/L}$ PHE, 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a and 500 $\mu\text{g/L}$ PHE + 25 $\mu\text{g/L}$ ANA-a. Five replicates of each solution were analyzed using the optimized conditions previously detailed, including the 20% laser power to favor ANA-a, and diminish PHE vaporization. Results presented in Figure 4-6 show that a 500 $\mu\text{g/L}$ concentration of PHE does not generate a signal that is significantly different ($P = 0.37$) from the blank signal. Consequently, the peak areas for ANA-a, with or without 500 $\mu\text{g/L}$ PHE, are not statistically significantly different ($P = 0.18$) from one another.

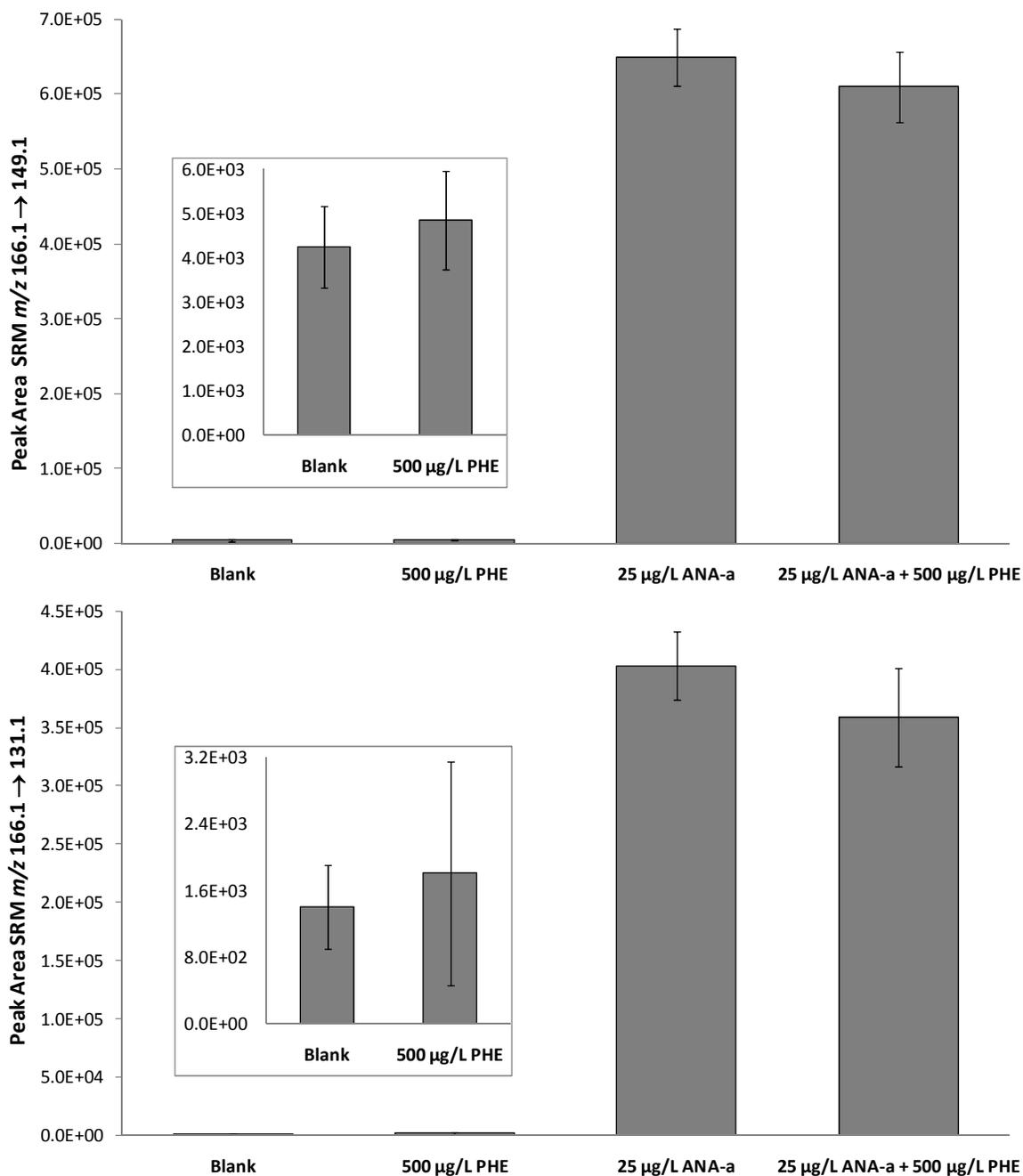


Figure 4-6. Comparison of average peak area given by ANA-a SRM transitions for the following solutions: blank, PHE (500 µg/L), ANA-a (25 µg/L) and a mix of PHE (500 µg/L) + ANA-a (25 µg/L). (n = 5, 20% laser power, using parameters optimized for ANA-a analysis). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

To further assess potential matrix effects, we compared the signals generated by a blank in the solvent matrix only to that generated with the presence of a bloom matrix (with cellular debris and other ions). Fig 4-11 (Supplemental information) shows that there is a clear difference between the signal following the desorption of the bloom matrix blank and 1 ppb Ana-a standard in the bloom matrix (peak areas of 2300 vs 35 000 units for SRM m/z 131.1 and 11 000 vs 72 000 for SRM m/z 149.1).

An external calibration for the Ana-a standards in pure solution vs a real algal bloom matrix is also presented in Figure 4-12 (Supplemental information), the ratio of the signal in the bloom vs. that of pure standards varied from 0.62 to 0.52. We attribute this difference either to sorption of Ana-a to cellular components from the bloom matrix or to ionization/MS matrix effects.

Method validation

An ideal IS will behave as the compound of interest under experimental conditions, and with the ever expanding range of commercial isotopically-labeled compounds this is becoming a feasible option for many contaminants. Unfortunately, isotopically-labeled ANA-a is not commercially available, thus we explored alternative compounds to act as IS. Preliminary results with atrazine, caffeine, 17 α -ethinylestradiol⁵⁸ and CLO (Figure 4-13, Supplemental Information) demonstrated that they all vaporize readily using the LDTD-APCI interface (unpublished results). Further investigation demonstrated that only CLO (10 μ g/L) gave reproducible ANA-a signal corrections (n = 8, RSD ~ 5%) using the optimized parameters for ANA-a analysis (Table S-1).

Results for method qualification, from external and internal calibration in a bloom-like matrix, are presented in Table 4-2 and 4-3.

Tableau 4-2. Comparisons of method validation parameters for external and internal calibration curves of ANA-a, with or without CLO (10 $\mu\text{g/L}$).

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

Tableau 4-3. Accuracy and precision for external and internal calibration curves of ANA-a, with and without CLO (10 $\mu\text{g/L}$, n=5).

Calibration type	QC (5 $\mu\text{g/L}$)		QC (20 $\mu\text{g/L}$)		QC (200 $\mu\text{g/L}$)	
	Accuracy (RE %)	RSD (%)	Accuracy (RE %)	RSD (%)	Accuracy (RE %)	RSD (%)
External	14	7	8	13	4	8
Internal	33	8	5	8	20	8

The external calibration curve gave a linear dynamic range between 3 – 250 $\mu\text{g/L}$, with a correlation coefficient (R^2) > 0.999. The experimentally-determined concentration of the QC demonstrated the accuracy (RE 4 – 33%) and precision (RSD 7 – 13%) of our method. Though the MDL and MLQ were respectively of 1 and 3 $\mu\text{g/L}$, higher than other methods reported, our method overcomes important drawbacks such as use of derivatization procedures and pre-concentration steps to achieve lower MDL (3 – 10 ng/L)^{51,96}, or a run time of 3 and 8 min per sample, to obtain sufficient chromatographic resolution of ANA-a from PHE with MDL of 130 ng/L and 8 ng/L respectively.⁸⁸⁻⁸⁹ For environmental screening purposes, LDTD-APCI is robust to ionic suppression and alternative methods cannot provide the simplicity and high-throughput of LDTD-APCI (15 s/sample). This is roughly an order of magnitude faster than an equivalent UPLC method, while the cost of the LDTD interface and required LDTD consumables are only somewhat lower than that of UPLC, the savings in terms of instrument time is tremendous, thus allowing a much larger number of samples to be analyzed weekly on a rather expensive

triple-quadrupole instrument, and a reduced number of MS instruments to maintain in large throughput laboratories.

Our method could be further validated for broader applications but it is certainly applicable for rapid initial decision making during bloom events suspected to involve ANA-a. Furthermore, we proved that under conditions hypothetically generated by a dense blue-green algae bloom, even a 500 $\mu\text{g/L}$ PHE concentration will not cause any interference on ANA-a analysis by LDTD-APCI-MS/MS. A recent publication⁹⁷ reported that ANA-a maximum concentrations found in fresh waters were ranging between 0.01 to 1.7 mg/L, and since current guideline values addressing tolerable ANA-a concentration in drinking and recreational water range from 1 to 12 $\mu\text{g/L}$ ^{10,84-85}, the MLQ of our method is adequate. Finally, the internal calibration gave similar performance to the external calibration, with the exception that the average % RSD value for standards and QC of 8% for external calibration was lowered to 5% with the internal calibration, an insignificant difference ($P = 0.24$).

Conclusion

We developed and validated an original high-throughput method for the analysis of ANA-a in a complex matrix with the LDTD-APCI source coupled to MS/MS, while accounting for PHE interference. Instrumental parameters were optimized to give the maximal signal for ANA-a while reducing as much as possible the signal of PHE. Laser power was combined with appropriate SRM conditions, to totally remove interference of PHE up to a concentration of 500 $\mu\text{g/L}$. External and internal calibration curves in a real bloom-like matrix, the latter with CLO acting as IS, gave linear dynamic ranges over nearly two orders of magnitude, with excellent correlation coefficients (R^2) > 0.998. The MDL and MLQ were found to be around 1 and 3 $\mu\text{g/L}$ respectively, which is higher than other published methods but still acceptable given possible regulatory limits. The ultra-fast analysis time of 15 s/sample, combined with the resolution of PHE from ANA-a without sample pre-treatment, makes this method a suitable alternative for rapid environmental screening of ANA-a in water bodies.

Acknowledgement

The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is acknowledged for financial support. We thank Paul Fayad, Dr. Pedro A. Segura, Dr. Liza Viglino, Dr. Sherri Lynn MacLeod and Dr. David Bird for their technical and scientific support.

Supplemental information

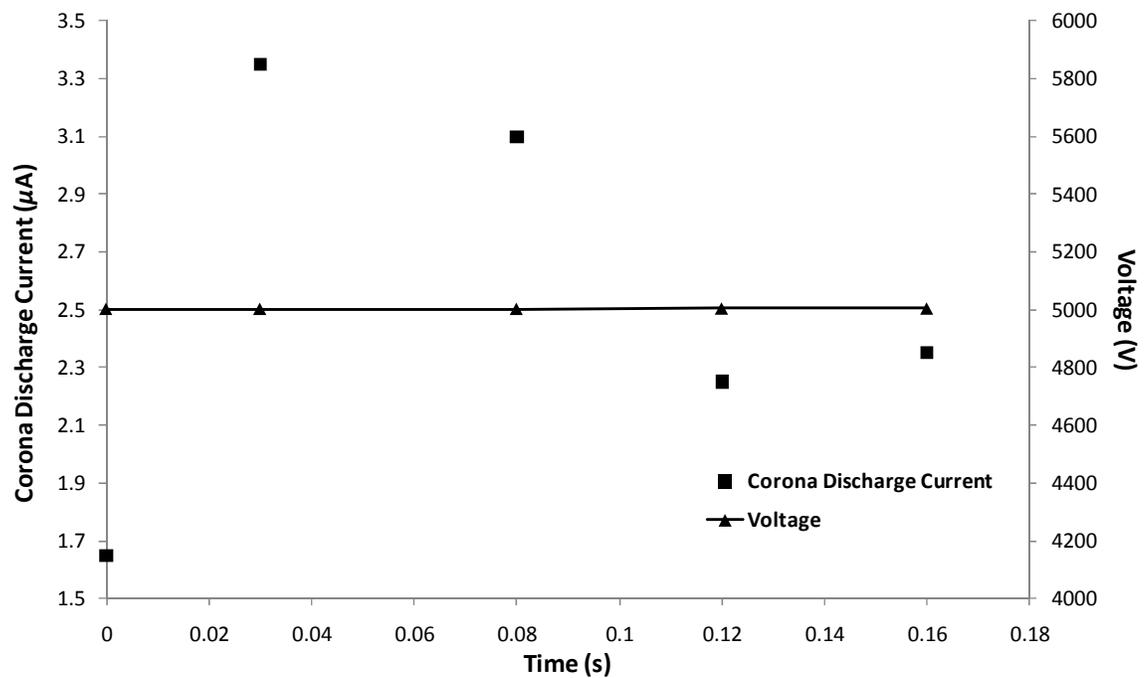


Figure 4-7. Variability of the corona discharge current (μA) at constant corona discharge voltage (V).

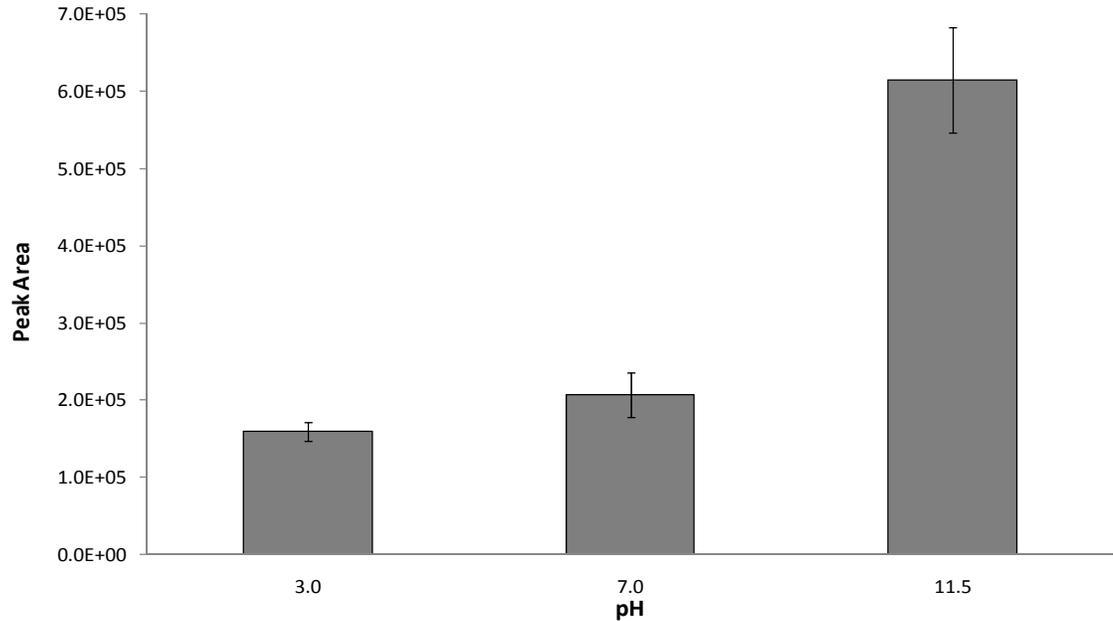


Figure 4-8. Effect of solvent pH on ANA-a analysis by LDTD-APCI-MS/MS. (n = 3, laser power 20%, SRM m/z 166.1 \rightarrow 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

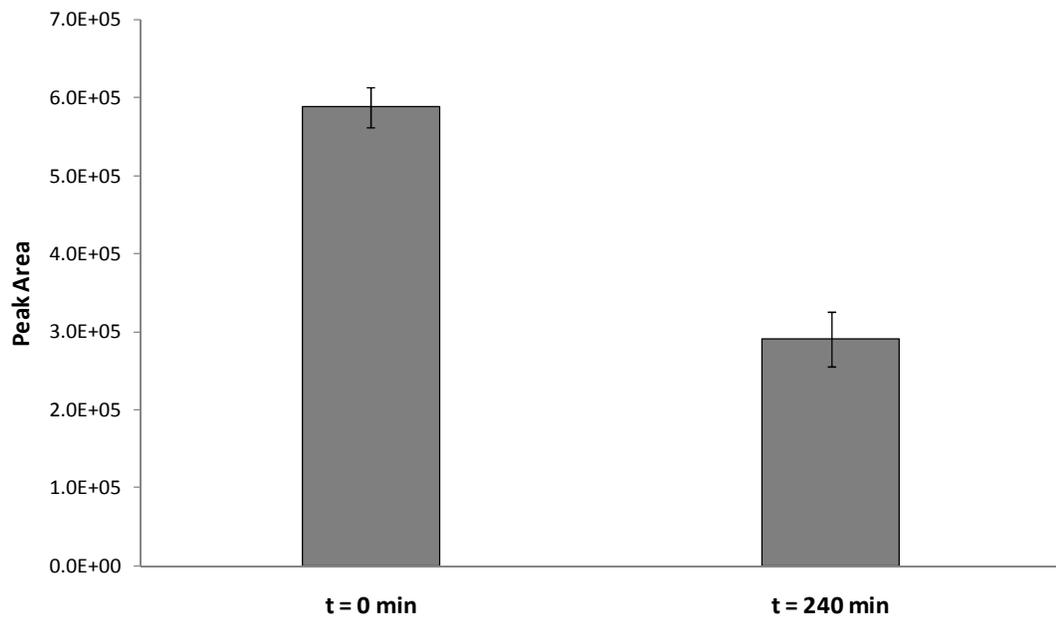


Figure 4-9. Degradation assessment of ANA-a under experimental conditions. (pH 11.5, n = 3, laser power 20%, SRM m/z 166.1 \rightarrow 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

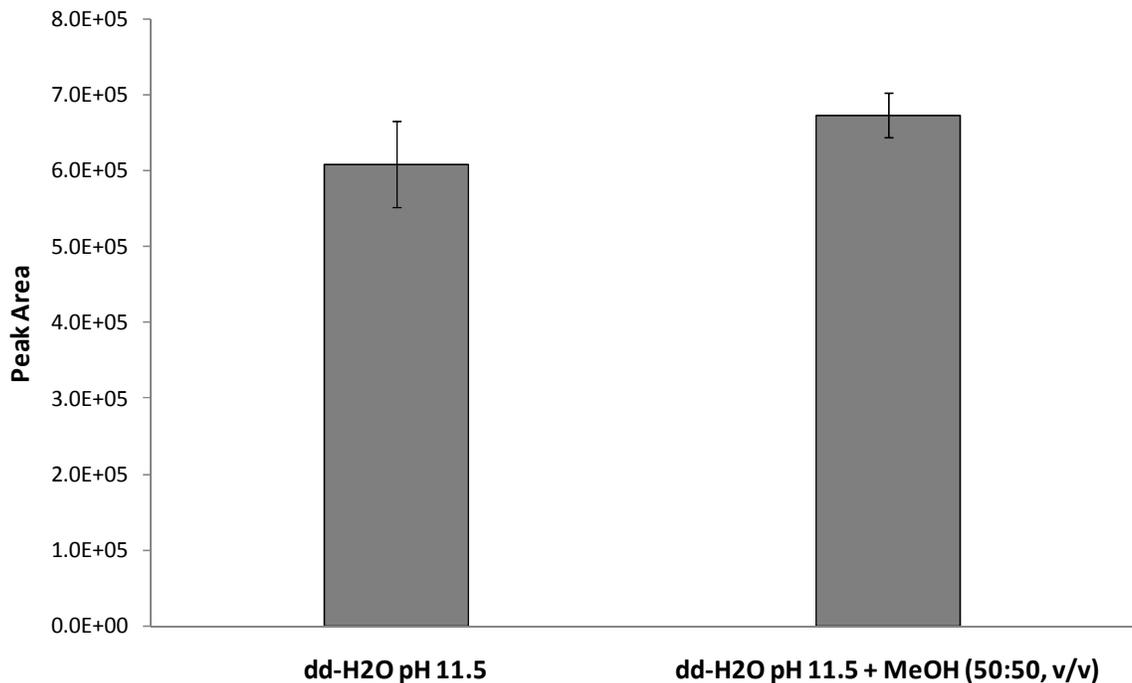


Figure 4-10. Effect on ANA-a signal intensity/variability of analyte deposition solvent. (n = 8, SRM m/z 166.1 → 149.1). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

Explanation of the 500 $\mu\text{g/L}$ PHE concentration associated with a dense cyanobacteria bloom.

A qualitative measurement of phytoplankton abundance in a water body can be achieved by the Total Carbon : Chlorophyll *a* ratio, (C (g/L) : chl *a* (g/L)). This ratio evolves with changing conditions like sunlight, temperature and nutrient content.⁹⁸ A ratio value of 30 is associated with eutrophic conditions, commonly associated with cyanobacterial blooms.⁹⁹ The Total Carbon, and the protein content, are estimated to be about 50 % of the total phytoplankton biomass.¹⁰⁰ This protein mass can be converted into a total amino acids concentration, with an average amino acid molar mass (135 g/mol). Generally, the PHE content in proteins (%) is around 3.5%.¹⁰¹⁻¹⁰³

The World Health Organization set a chl *a* concentration > 50 $\mu\text{g/L}$, related to a toxic biomass of cyanobacteria in drinking water, as a very high risk level causing adverse health effects¹, and noted that an average concentration of 300 $\mu\text{g/L}$ chl *a* is representative

of cyanobacterial blooms in eutrophic conditions. With a starting value of 400 $\mu\text{g/L}$ chl *a*, we can approximate a high PHE concentration generated in a bloom:

$$\text{Eq.1} \quad \frac{C(\mu\text{g/L})}{\text{chl } a (\mu\text{g/L})} = 30 = \frac{C(\mu\text{g/L})}{400 \mu\text{g/L}} \quad C (\mu\text{g/L}) = 12\,000 \mu\text{g/L}$$

$$\text{Eq.2} \quad C (\mu\text{g/L}) = \text{proteins content} (\mu\text{g/L}) = 12\,000 \mu\text{g/L}$$

$$\text{Eq.3} \quad \frac{\text{proteins content}(\mu\text{g/L})}{\text{average amino acid molar mass (g/mol)}} = \text{total amino acids (AA) concentration} (\mu\text{M})$$

$$\frac{12\,000 \mu\text{g/L}}{135 \text{ g/mol}} = 88.9 \mu\text{M}$$

$$\text{Eq.4} \quad \text{total AA concentration} (\mu\text{M}) * \text{PHE relative abundance} = \text{PHE concentration} (\mu\text{M})$$

$$88.9 \mu\text{M} * 0.035 \text{ PHE} = 3.1 \mu\text{M}$$

$$\text{Eq.5} \quad \text{PHE concentration} (\mu\text{mol/L}) * \text{PHE molar mass (g/mol)} = \text{PHE concentration} (\mu\text{g/L})$$

$$3.1 \mu\text{mol/L} * 165 \text{ g/mol} = 513 \mu\text{g/L}$$

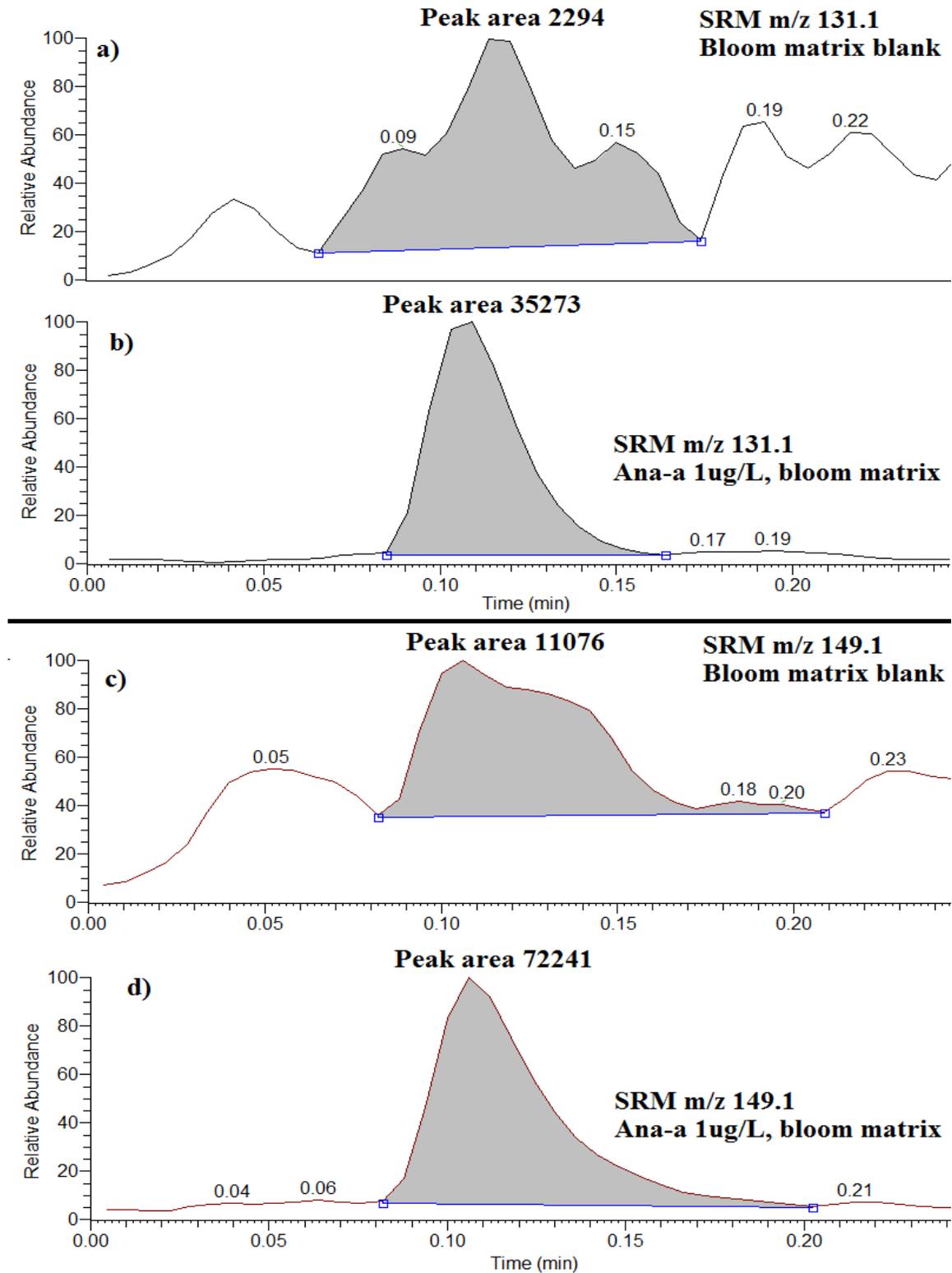
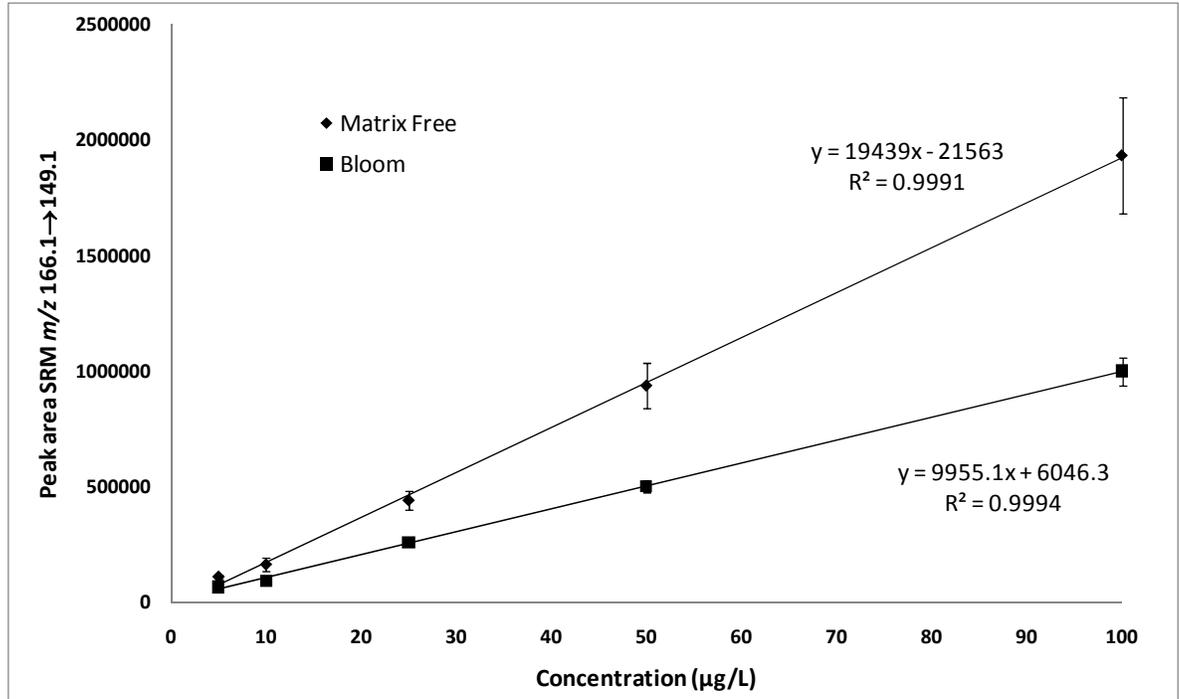


Figure 4-111. Desorption profile of bloom matrix blank and Ana-a 1 µg/L in bloom matrix for SRM m/z 166.1 \rightarrow 131.1 (a,b) and SRM m/z 166.1 \rightarrow 149.1 (c,d)



Comparison of the ratio of bloom:solvent signal

5 ppb	10 ppb	25 ppb	50 ppb	100 ppb
0.600	0.616	0.614	0.537	0.518

Figure 4-122. Matrix effect assessment for an external calibration with optimal conditions for Ana-a analysis (SRM m/z 166.1 \rightarrow 149.1, $n = 3$, pH 11.5, 50 % MeOH with laser power at 20 %). Vertical error bars represent standard deviations from the mean.

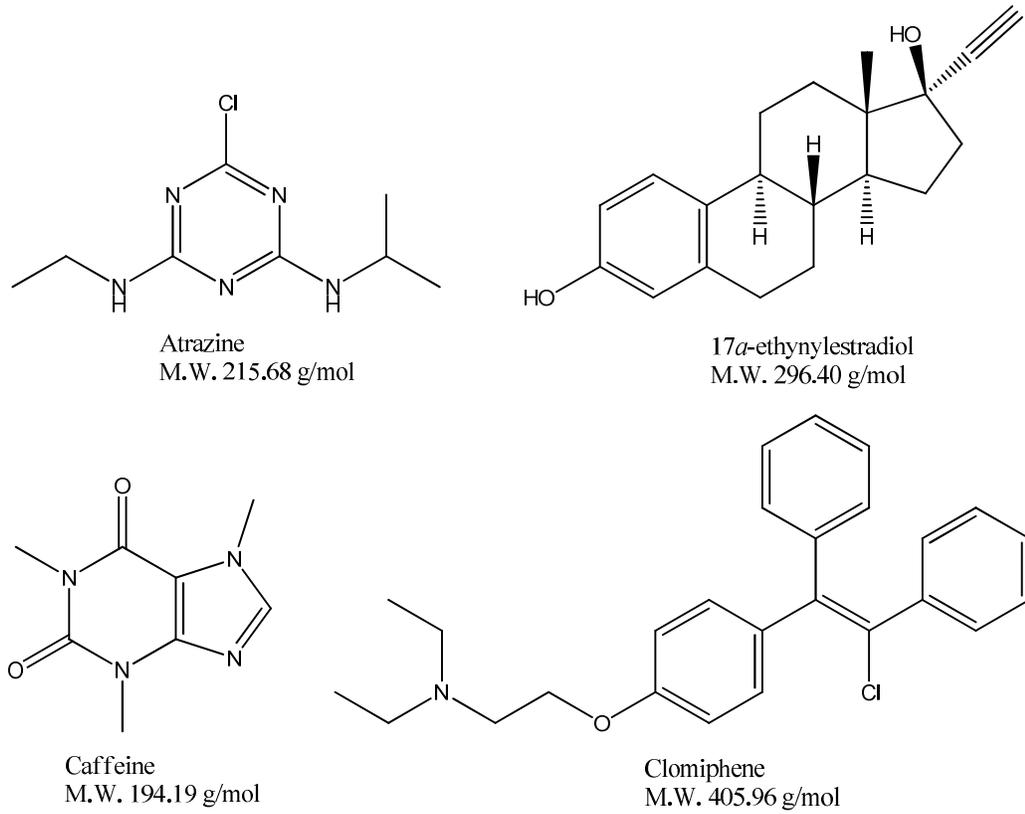


Figure 4-133. Atrazine, caffeine, 17 α -ethynylestradiol and CLO structures and corresponding M.W.

Tableau 4-4. Evaluation of CLO (10 µg/L) as an IS. (n = 8, SRM *m/z* 406.1 → 101.1 (CLO) and 166.1 → 149.1(ANA-a)).

Replicate	ANA-a 25 µg/L Peak Area	CLO 10 µg/L Peak Area	Ratio (ANA-a/CLO)
1	1008096	1091913	0.92
2	1222030	1232107	0.99
3	1174608	1166874	1.01
4	1256962	1265656	0.99
5	1121622	1166560	0.96
6	1078096	1131095	0.95
7	1299956	1219478	1.06
8	1074504	1025616	1.05
Average	1154484	1162412	0.99
Standard Deviation	100976	78808	0.048
% RSD	9	7	5

Chapitre 5. Conclusion

La chromatographie a longtemps été une étape essentielle afin de séparer un mélange de composés, préalablement à la détection de ceux-ci, en raison de la faible sélectivité des systèmes de détection des analytes. Cependant, avec la MS, et plus spécialement la MS/MS, cette séparation n'est plus essentielle ni nécessaire dans plusieurs cas. En effet, la détection des analytes effectuée avec le mode d'acquisition SRM permet de les différencier sans séparation chromatographique adéquate. À cet effet, la littérature scientifique contient plusieurs cas où des composés possédant des temps de rétention similaires, suite à la séparation par HPLC, sont tout de même différenciés, détectés et quantifiés grâce à la MS/MS.^{18,26,104-105}

Ceci explique l'avènement de techniques qui introduisent directement les analytes dans le MS, sans séparation chromatographique antérieure, et les principes de fonctionnement de l'interface LDTD-APCI permettent d'accomplir cette tâche. Le gain en temps qui en résulte (environ un ordre de grandeur) augmente considérablement le nombre d'échantillons analysés. Cependant, cette introduction directe des analytes dans le MS peut causer des problèmes comme le démontre bien le cas de l'interférence isobarique de la PHE lors de l'analyse de l'ANA-a par MS/MS (QqQ). Outre ce problème plutôt rare d'une interférence isobarique lors de l'analyse de molécules organiques par MS/MS, la principale limitation de la LDTD-APCI est attribuable aux composés possédant les propriétés physico-chimiques nécessaires au processus de désorption. En effet, les composés thermosensibles, polaires et ayant une M.M. élevée sont défavorables à ce processus, réduisant ainsi l'étendue des composés pouvant être analysés avec la LDTD-APCI.

Le présent projet consistait à évaluer le potentiel de désorption de quatre types de CT, avec la LDTD-APCI, afin de développer une méthode analytique permettant d'analyser simultanément un maximum de CT. Suite à l'ensemble des résultats obtenus, les performances globales de l'interface LDTD-APCI, en fonction de nos conditions analytiques, sont peu satisfaisantes. En effet, seule une CT (ANA-a) sur quatre (MC-LR, STX et CYN) a pu être désorbée significativement. Les pistes proposées à la section 3.4 pourraient probablement améliorer l'efficacité de cette technique afin d'effectuer rapidement l'analyse simultanée de plusieurs CT.

Malgré le faible potentiel de désorption de la MC-LR, la STX et la CYN, les performances analytiques de l'interface LDTD-APCI couplée à la MS/MS, ont été démontrées dans ce projet par le biais de l'analyse rapide de l'ANA-a contenue dans une matrice complexe (15 s/échantillon). La préparation minimale des échantillons permet de tirer avantage du temps d'analyse ultra-rapide de cette technique, mais encore plus notable est la suppression de l'interférence isobarique de la PHE lors de l'analyse de l'ANA-a par MS/MS (QqQ). L'originalité de la résolution de cette interférence est attribuable à la limitation majeure de la LDTD-APCI mentionnée plus haut où la désorption de certains types de composés, dont la PHE, est difficile voire nulle. Cependant, dans l'optique d'analyser simultanément l'ensemble des CT par LDTD-APCI, les stratégies mentionnées à la section 3.4 pourraient favoriser la désorption de la PHE et générer l'interférence isobarique, annulant ainsi le pouvoir discriminatoire de la technique.

Un objectif complémentaire à ce projet consistait à appliquer la méthode d'analyse de l'ANA-a qui a été développée, afin d'effectuer le suivi dans le temps de cette CT dans divers cours d'eau du Québec en période estivale et automnale. Cependant, la difficulté à se procurer les différents étalons et les efforts déployés pour supprimer l'interférence de la PHE n'ont pu permettre d'entreprendre cette partie du projet. Outre les résultats de concentration d'ANA-a que cette étude aurait générée, nous aurions mis à l'épreuve la robustesse de la méthode par l'analyse de différentes matrices environnementales. Par exemple, il aurait été possible d'évaluer s'il survient une variation non-négligeable de la MDL en fonction des matrices échantillonnées. Cette évaluation est importante car il est impératif pour toutes méthodes utilisées pour détecter l'ANA-a, de le faire selon les normes proposées (1 et 12 µg/L). Dans le cas contraire, une étape de préconcentration par SPE deviendrait nécessaire afin de détecter/quantifier l'ANA-a et disparaîtrait l'avantage d'utiliser l'interface LDTD-APCI plutôt que la HPLC.

Ce dernier point illustre une limitation liée à la détection/quantification rapide d'analytes au niveau de trace ($\leq \mu\text{g/L}$). Pour pallier à cette importante lacune, le domaine de la chimie analytique se doit d'améliorer la sensibilité des détecteurs présentement utilisés ou de créer des détecteurs plus sensibles; ce qui n'est pas une mince tâche...

Bibliographie

- (1) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I., Bartram, J., Eds.; E & FN Spon: London, 1999.
- (2) Stewart, I.; Webb, P. M.; Schluter, P. J.; Fleming, L. E.; Burns Jr., J. W.; Gantar, M.; Backer, L. C.; Shaw, G. R. *BMC Public Health* **2006**, *6*.
- (3) Carmichael, W. W. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2001**, *7*, 1393-1407.
- (4) Soares, R. M.; Yuan, M.; Servaites, J. C.; Delgado, A.; Magalhaes, V. F.; Hilborn, E. D.; Carmichael, W. W.; Azevedo, S. M. F. O. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 95-103.
- (5) Osswald, J.; Rellan, S.; Gago, A.; Vasconcelos, V. *Environ. Int.* **2007**, *33*, 1070-1089.
- (6) Levi, Y.; Harvey, M.; Cervantès, P. *Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et aux autres activités récréatives*; Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET): 2006.
- (7) Kaebernick, M.; Neilan, B. A. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *35*, 1-9.
- (8) Wiegand, C.; Pflugmacher, S. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2005**, *203*, 201-218.
- (9) Beutler, M.; Wiltshire, K. H.; Meyer, B.; Moldaenke, C.; Lüring, C.; Meyerhöfer, M.; Hansen, U.-P.; Dau, H. *Photosynth. Res.* **2002**, *72*, 39-53.
- (10) Svrcek, C.; Smith, D. W. *J. Environ. Eng. Sci.* **2004**, *3*, 155-184.
- (11) Flores, E.; Herrero, A.; Peter Wolk, C.; Maldener, I. *Trends in Microbiol.* **2006**, *14*, 439-443.
- (12) Chevalier, P.; Pilote, R.; Leclerc, J.-M. *Risque à la santé publique découlant de la présence de cyanobactéries et de microcystines dans trois bassins versants du Sud-ouest québécois tributaire du fleuve Saint-Laurent*; Ministère de la santé et des services sociaux et Santé Canada: 2001.
- (13) Correll, D. L. *J. Environ. Qual.* **1998**, *27*, 261-266.
- (14) Barbiero, R. P.; James, W. F.; Barko, J. W. *Freshwater Biol.* **1999**, *42*, 503-512.

- (15) Jöhnk, K. D.; Huisman, J.; Sharples, J.; Sommeijer, B.; Visser, P. M.; Strooms, J. M. *Glob. Change Biol.* **2008**, *14*, 495-512.
- (16) Wiedner, C.; Rücker, J.; Brüggemann, R.; Nixdorf, B. *Oecologia* **2007**, *152*, 473-484.
- (17) Adams, D. G.; Carr, N. G.; Wilcox, M. *Crit. Rev. Microbiol.* **1981**, *9*, 45-100.
- (18) Hiller, S.; Krock, B.; Cembella, A.; Luckas, B. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1238-1250.
- (19) Carmichael, W. W. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *72*, 445-459.
- (20) Rivasseau, C.; Martins, S.; Hennion, M.-C. *J. Chromatogr. A* **1998**, *799*, 155-169.
- (21) Devlin, J.; Edwards, O.; Gorham, P.; Hunter, N.; Pike, R.; Stavric, B. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 1367-1371.
- (22) Namikoshi, M.; Murakami, T.; Fujiwara, T.; Nagai, H.; Niki, T.; Harigaya, E.; Watanabe, M. F.; Oda, T.; Yamada, J.; Tsujimura, S. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1692-1696.
- (23) Vasas, G.; Gáspár, A.; Páger, C.; Surányi, G.; Máthé, C.; Hamvas, M. M.; Borbély, G. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 108-115.
- (24) Araoz, R.; Nghiê, H.-O.; Rippka, R.; Palibroda, N.; Tandeau de Marsac, N.; Herdman, M. *Microbiology+* **2005**, *151*, 1263-1273.
- (25) Sleno, L.; Volmer, D. A.; Kovacevic, B.; Maksic, Z. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 462-477.
- (26) Dell'Aversano, C.; Hess, P.; Quilliam, M. A. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1081*, 190-201.
- (27) Ohtani, I.; Moore, R. R.; Runnegar, M. T. C. *J. A. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7941-7942.
- (28) Seifert, M.; McGregor, G.; Eaglesham, G.; Wickramasinghe, W.; Shaw, G. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 73-80.
- (29) Kubo, T.; Sano, T.; Hoyosa, K.; Tanaka, N.; Kaya, K. *Toxicon* **2005**, *46*, 104-107.
- (30) Chiswell, R. K.; Shaw, G. R.; Eaglesham, G.; Smith, M. J.; Norris, R. L.; Seawright, A. A.; Moore, M. R. *Environ. Toxicol.* **1999**, *14*, 155-161.

- (31) Nicholson, B.; Papageorgiou, J.; Humpage, A.; Stenffensen, D.; Monis, P.; Linke, T.; Fanok, S.; Shaw, G.; Eaglesham, G.; Davis, B.; Wickramasinghe, W.; Stewart, I.; Carmichael, W.; Servaites, J. *Determination and significance of emerging algal toxins (cyanotoxins)*; AWWARF (American Water Works Association Research Foundation): 2007.
- (32) Swanson, K. L.; Allen, C. N.; Aronstam, R. S.; Rapoport, H.; Albuquerque, E. X. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 250-257.
- (33) Swanson, K. L.; Aronstam, R. S.; Wonnacott, S.; Rapoport, H.; Albuquerque, E. X. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 377-386.
- (34) Wang, D.-Z. *Mar. Drug* **2008**, *6*, 349-371.
- (35) Choudhary, G.; Shang, L.; Li, X.; Dudley Jr., S. C. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 912-919.
- (36) Penzotti, J. L.; Lipkind, G.; Fozzard, H. A.; Dudley Jr., S. C. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 698-706.
- (37) Indrasena, W. M.; Gill, T. A. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 49-57.
- (38) Indrasena, W. M.; Gill, T. A. *Food Chem.* **2000**, *71*, 71-77.
- (39) Indrasena, W. M.; Gill, T. A. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 948-953.
- (40) Falconer, I. R.; Humpage, A. R. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 299-304.
- (41) Froscio, S. M.; Humpage, A. R.; Wickramasinghe, W.; Shaw, G.; Falconer, I. R. *Toxicon* **2008**, *51*, 191-198.
- (42) Banker, R.; Carmeli, S.; Werman, M.; Telsch, B.; Porat, R.; Sukenik, A. *J. Toxicol. Env. Heal. A* **2001**, *62*, 281-288.
- (43) Pérez, S.; Aga, D. S. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*.
- (44) Carmichael, W. *Assessment of blue-green algal toxins in raw and finished drinking water*; American Water Works Association (AWWA): 2000.
- (45) Metcalf, J. S.; Codd, G. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 103-112.
- (46) Kaya, K.; Sano, T. *Anal. Chimi. Acta* **1999**, *386*, 107-112.
- (47) Rodriguez, V.; Yonamine, M.; Pinto, E. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2085-2090.

- (48) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J., *Introduction to modern liquid chromatography*. Wiley & Sons: New York, 1979.
- (49) Littlewood, A. B., *Gas chromatography: principles, techniques, and applications*. Academic press: New York, 1970.
- (50) Oshima, Y. *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 528-532.
- (51) James, K. J.; Furey, A.; Sherlock, I. R.; Stack, M. A.; Twohig, M.; Caudwell, F. B.; Skulberg, O. M. *J. Chromatogr. A* **1998**, *798*, 147-157.
- (52) Gross, J. H., *Mass spectrometry: a textbook*. Springer Verlag: Berlin, 2004.
- (53) Dahlmann, J.; Budakowski, W. R.; Luckas, B. *J. Chromatogr. A* **2003**, *994*, 45-57.
- (54) Sangolkar, L. N.; Maske, S. S.; Chakrabarti, T. *Wat. Res.* **2006**, *40*, 3485-3496.
- (55) McElhiney, J.; Lawton, L. A. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2005**, *203*, 219-230.
- (56) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Saunders College: Fort Worth, 1996.
- (57) Wu, J.; Hughes, C. S.; Picard, P.; Letarte, S.; Gaudreault, M.; Lévesque, J.-F.; Nicoll-Griffith, D. A.; Bateman, K. P. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4657-4665.
- (58) Fayad, P. B.; Prévost, M.; Sauvé, S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 639-645.
- (59) Segura, P. A.; Tremblay, P.; Picard, P.; Gagnon, C.; Sauvé, S. *J. Agr. Food Chem.* **2010**, DOI: 10.1021/jf903362v.
- (60) Picard, P.; Tremblay, P.; Paquin, E. R. Laser Diode Thermal Desorption source (LDTD): Fundamental Aspects. 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Denver, CO., 2008. Available at: <http://www.ldtd-ionsource.com/eng/ldtd/process.asp>
- (61) Jiang, Q.; Shi, H. X.; Zhao, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 2176.
- (62) Wang, Y.; Rafailovich, M.; Sokolov, J.; Gersappe, D.; Araki, T.; Zou, Y.; Kilcoyne, A. D. L.; Ade, H.; Marom, G.; Lustiger, A. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 28303.
- (63) Cousty, J.; Marchenko, A. *Surf. Sci.* **2002**, *520*, 128-136.
- (64) Beuhler, R. J.; Flanigan, E.; Greene, L. J.; Friedman, L. *J. A. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3990-3999.

- (65) Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N.; Haegele, K. D.; Horning, E. C. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 2369-2373.
- (66) Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 936-943.
- (67) Horning, E. C.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Lin, S. N.; Stillwell, R. N.; Thenot, J. P. *J. Chromatogr. A* **1977**, *142*, 481-495.
- (68) Sunner, J.; Nicol, G.; Kebarle, P. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1300-1307.
- (69) Picard, P.; Tremblay, P.; Paquin, E. R. Mechanisms Involved in Positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization of an LDTD Source. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Philadelphia, PA, 2009. Available at: <http://www.ldtd-ionsource.com/eng/ldtd/process.asp>
- (70) Yuan, M.; Namikoshi, M.; Otsuki, A.; Rinehart, K. L.; Sivonen, K.; Watanabe, M. F. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 33-43.
- (71) Yuan, M.; Namikoshi, M.; Otsuki, A.; Watanabe, M. F.; Rinehart, K. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 1138-1151.
- (72) Dörr, F. A.; Tomaz, J. C.; Lopes, N. P.; Pinto, E. *Rapid Commun. Mass Sp.* **2008**, *22*, 2015-2020.
- (73) Kikuchi, S.; Kubo, T.; Kaya, K. *Anal. Chimi. Acta* **2007**, *583*, 124-127.
- (74) Wils, E. R. J.; Hulst, A. G. *Rapid Commun. Mass Sp.* **1993**, *7*, 413-413.
- (75) Andrinolo, D.; Michea, L. F.; Lagos, N. *Toxicon* **1999**, *37*, 447-464.
- (76) Block, C.; Wynants, L.; Kelchtermans, M.; De Boer, R.; Compennolle, F. *Polym. Degrad. Stabil.* **2006**, *91*, 3163-3173.
- (77) Quilliam, M. A. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 527-548.
- (78) Nichols, K. K.; Ham, B. M.; Nichols, J. J.; Ziegler, C.; Green-Church, K. B. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 34.
- (79) Paizs, B.; Suhai, S. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 508-548.
- (80) Van Berkel, G. J.; Pasilis, S. P.; Ovchinnikova, O. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1161-1180.

- (81) Blachon, G.; Picard, P.; Paquin, E. R. Rapid Trace Determination of Chloramphenicol in Honey using Molecularly Imprinted Polymer followed by LDTD-APCI-MS/MS. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Philadelphia, PA, 2009. Available at: <http://www.ldtd-ionsource.com/eng/ldtd-applications/food.asp>
- (82) Wonnacott, S.; Gallagher, T. *Mar. Drug* **2006**, *4*, 228-254.
- (83) Stevens, D. K.; Krieger, R. I. *Toxicon* **1991**, *29*, 167-179.
- (84) Fawell, J. K.; Mitchell, R. E.; Hill, R. E.; Everett, D. J. *Hum. Exp. Toxicol.* **1999**, *18*, 168.
- (85) Codd, G. A.; Morrison, L. F.; Metcalf, J. S. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2005**, *203*, 264-272.
- (86) Gugger, M.; Lenoir, S.; Berger, C.; Ledreux, A.; Humbert, J.-C.; Guette, C.; Bernard, C. *Toxicon* **2005**, *45*, 919-928.
- (87) Furey, A.; Crowley, J.; Hamilton, B.; Lehane, M.; James, K. J. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1082*, 91-97.
- (88) Bogialli, S.; Bruno, M.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Laganà, A. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1122*, 180-185.
- (89) Oehrle, S. A.; Southwell, B.; Westrick, J. *Toxicon* **2009**, DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.10.001.
- (90) Ghassempour, A.; Najafi, N. M.; Mehdinia, A.; Davarani, S. S. H.; Fallahi, M.; Nakhshab, M. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1078*, 120-127.
- (91) Gorham, P. R.; McLachlan, J.; Hammer, U. T.; Kim, W. K. *Proc. Int. Assoc. Theor.* **1964**, *15*, 796-804.
- (92) Furey, A.; Crowley, J.; Lehane, M.; James, K. J. *Rapid Commun. Mass Sp.* **2003**, *17*, 583-588.
- (93) Badjagbo, K.; Furtos, A.; Alae, M.; Moore, S.; Sauvé, S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1711-1722.
- (94) Eiceman, G. A.; Kremer, J. H.; Snyder, A. P.; Tofferi, J. K. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1988**, *33*, 161-183.
- (95) McNair, H. M.; Miller, J. M., *Basic Gas Chromatography: Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, New York: 1997.

- (96) Bumke-Vogt, C.; Mailahn, W.; Chorus, I. *Environ. Toxicol.* **1999**, *14*, 117-125.
- (97) Hedman, C. J.; Krick, W. R.; Karner Perkins, D. A.; Harrahy, E. A.; Sonzogni, W. *C. J. Environ. Qual.* **2008**, *37*, 1817-1824.
- (98) Taylor, A. H.; Geider, R. J.; Gilbert, F. J. H. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **1997**, *152*, 51-66.
- (99) Geider, R. J. *New. Phytol.* **1987**, *106*, 1-34.
- (100) Simon, M.; Azam, F. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* **1989**, *51*, 201-213.
- (101) Williams, A. E.; Burris, R. H. *Am. J. Bot.* **1952**, *39*, 340-342.
- (102) Smith, D. G.; Young, E. G. *J. Biol. Chem.* **1955**, *217*, 845.
- (103) Garrett, R. H.; Grisham, C. M., *Biochemistry*. Saunders College: Fort Worth, 1999.
- (104) Wood, S. A.; Selwood, A. I.; Rueckert, A.; Holland, P. T.; Milne, J. R.; Smith, K. F.; Smits, B.; Watts, L. F.; Cary, C. S. *Toxicon* **2007**, *50*, 292-301.
- (105) Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Viglino, L.; Fürtös, A.; Gagnon, C.; Prévost, M.; Sauvé, S. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 8518-8527.