



HAL
open science

Développement de nouvelles méthodes séparatives compatibles avec une détection par spectrométrie de masse et par électrochimie pour l'analyse des traces de catécholamines et molécules apparentées

Raluca-Ioana Chirita

► **To cite this version:**

Raluca-Ioana Chirita. Développement de nouvelles méthodes séparatives compatibles avec une détection par spectrométrie de masse et par électrochimie pour l'analyse des traces de catécholamines et molécules apparentées. Autre. Université d'Orléans, 2009. Français. NNT: . tel-00489172

HAL Id: tel-00489172

<https://theses.hal.science/tel-00489172>

Submitted on 4 Jun 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

THÈSE présentée par :

Raluca - Ioana CHIRITA

soutenance prévue le : **27 novembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

**Développement de nouvelles méthodes séparatives
compatibles avec une détection par spectrométrie de
masse et par électrochimie pour l'analyse des traces de
catécholamines et molécules apparentées**

THÈSE dirigée par :

Claire ELFAKIR

Professeur – Université d'Orléans

Adriana FINARU

Professeur – Université de Bacau

RAPPORTEURS :

Pierre CHAMINADE

Professeur – Université de Paris Sud XI

Constantin LUCA

Professeur – Université Politehnica Bucuresti

JURY :

Claire ELFAKIR

Professeur – Université d'Orléans

Adriana FINARU

Professeur – Université de Bacau

Pierre CHAMINADE

Professeur – Université de Paris Sud XI

Constantin LUCA

Professeur – Université Politehnica Bucuresti

Agnès DELMAS

Directrice de recherche au CBM CNRS Orléans

Lucian GAVRILA

Professeur – Université de Bacau

*A mes parents,
A Catalin,*

*La curiosité mène à tout : parfois à écouter aux portes,
parfois à découvrir l'Amérique.*

José Maria Eça de Queiros

Remerciements

Tout d'abord je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Gérard Guillaumet et à Madame la Professeur Adriana Finaru, les initiateurs des collaborations entre l'Université d'Orléans et l'Université de Bacau, sans leurs efforts cette thèse en cotutelle n'aurait pas pu exister.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) dans le laboratoire des sciences analytiques dirigé par Monsieur le Professeur Michel Lafosse que je remercie particulièrement pour la confiance qu'il a témoigné à mon regard. Je souhaite associer à ces remerciements, Monsieur le Professeur Olivier Martin, directeur de l'ICOA pour son accueil au sein de l'institut.

J'adresse également ma profonde gratitude à Madame la Professeur Claire Elfakir pour m'avoir suivie au cours de ces années d'étude comme directrice de thèse, pour sa disponibilité, sa patience et ses conseils avisés et pour son soutien quotidien.

Je remercie Madame la Professeur Adriana Finaru à qui je suis particulièrement reconnaissante de m'avoir communiqué sa passion pour la recherche et pour sa confiance, pour ses permanents encouragements et pour ses précieux conseils.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Pierre Chaminade, directeur du Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie Paris Sud (Université Paris-Sud XI) et Monsieur le Professeur Constantin Luca de l'Université Politehnica Bucarest qui ont aimablement accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs. De même, je remercie Madame Agnès Delmas, directrice de recherche au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) du CNRS d'Orléans et Monsieur le Professeur Lucian Gavrilă, Secrétaire Scientifique de l'Université de Bacau, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Patrick Chaimbault, actuellement Professeur à l'Université de Metz, pour ses précieux conseils et pour m'avoir appris les

« secrets » de la spectrométrie de masse. Pour ses coups de main précieux dans les moments de panique : « Au secours le Sciex ne marche pas !!!! ».

Je remercie également Mademoiselle Caroline West, Maître de conférence à L'Université d'Orléans, pour son aide au niveau des traitements statistiques de mes résultats, ainsi que pour ces encouragements.

J'associe à ces remerciements, les autres enseignants chercheurs du laboratoire : les Professeurs Philippe Morin et Benoît Maunit et les Maîtres de conférences Raphael Delépée, Emilie Destandau, Eric Lesellier et Reine Nehme pour leurs conseils et leurs soutiens.

Mes remerciements les plus vifs sont pour mes collègues analystes (actuels ou anciens) et pour la plupart des très chers amis (que j'espère garder pour la vie) : Marie, Bérengère, Romain, Boutayna, Laetitia, Fanny, Karim, Saida, Alix, Sandrine, Florian, Claire, Thomas, Adrien, Nathalie, Jean Marie..... vous m'avez été ma famille d'accueil durant ces quatre dernières années. L'amitié que vous m'avez témoignée et votre bon humour ont été des vrais réconforts dans les moments les plus difficiles. J'ai appris plein de choses avec vous de la grammaire et la géographie française à la chimie analytique en passant par l'histoire et les problèmes d'environnement.

Je tiens aussi à remercier mes amis roumains : Anca, Oana (PO), Edy, Cristina, Oana, Cristina, Ani, Lili qui m'ont soutenu et encouragé de loin ou de près.

Merci maman et merci papa, merci du fond du cœur pour votre amour et votre soutien, sans vos efforts et vos sacrifices je ne serai jamais arrivée loin. Mon grand frère, tu a toujours été mon exemple, c'est grâce à toi que je suis là aujourd'hui. Un grand merci à ma petite nièce, Diana, pour avoir accepté cette tata qui n'était pas là pour les premières années de sa vie.

Catalin, mon amour, merci pour ta patience, ton soutien, tes mots d'encouragement et ta confiance. Ton amour m'a donné la force de surpasser toutes les difficultés pour atteindre le but. Nous voilà enfin ensemble pour le reste de nos vies.

SOMMAIRE

<i>Liste des abréviations</i>	15
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES METHODES D'ANALYSE DES NEUROTRANSMETTEURS	23
I. Système nerveux – terminologie et définitions	23
I.1. Le système nerveux	23
I.2. Le neurone	23
I.3. La neurotransmission	25
I.4. Les neurotransmetteurs	25
I.5. Les neuromédiateurs	26
II. Catécholamines et indolamines	27
II.1. L'adrénaline (ou épinephrine)	28
II.2. La noradrénaline (ou norépinephrine)	29
II.3. La dopamine	30
II.4. La sérotonine	31
II.5. Métabolisme des catécholamines et indolamines	32
II.5.1. Voie de synthèse des catécholamines	32
II.5.2. Métabolisme des catécholamines	33
II.5.3. Voie de synthèse de la sérotonine	34
II.5.4. Le métabolisme de la sérotonine.....	35
II.5.5. Concentrations physiologiques des catécholamines et indolamines	35
III. Maladies associées à des déséquilibres de concentration des catécholamines et indolamines	37
III.1. La maladie d'Alzheimer (AD)	37
III.2. La maladie de Parkinson	38
III.3. La schizophrénie	38
III.4. La dépression	38
III.5. Le syndrome carcinoïde	39
III.6. Les phéochromocytomes	39
IV. Etat de l'art sur l'analyse des catécholamines et indolamines	39
IV.1. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	40
IV.2. Analyse par Chromatographie en Phase Liquide (CPL)	41
IV.2.1. Modes de détection utilisés pour les catécholamines en CPL	42
IV.2.1.1. La détection spectrophotométrique.....	42
IV.2.1.2. La détection spectrofluorimétrique	43
IV.2.1.3. La détection électrochimique.....	45
IV.2.1.4. La détection par spectrométrie de masse	46
IV.2.1.5. Bilan des modes de détection des catécholamines en CPL.....	53
IV.2.2. Analyse par chromatographie liquide à polarité de phases inversée	54

IV.2.3. Analyse par chromatographie liquide d'appariement d'ions	58
IV.2.4. Analyse par chromatographie d'échange d'ions (IEC).....	63
IV.3. Analyse par électrophorèse capillaire (EC).....	65
V. Conclusions et perspectives	70
Références bibliographiques	72
CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT DE METHODES DE SEPARATION POUR LES CATECHOLAMINES EN PHASE INVERSE ET APPARIEMENT D'IONS.....	79
I. Introduction	79
II. Choix des conditions de pH pour l'analyse des catécholamines.....	81
III. Analyse par chromatographie liquide à polarité de phases inverse (RPLC).....	84
III.1. Analyse sur silice greffée C18.....	84
III.1.1. Choix du pourcentage et de la nature du modificateur organique	84
III.1.2. Influence du pH de la phase mobile sur la rétention.....	85
III.1.3. Influence de la concentration en sels dans la phase mobile sur la rétention des analytes.....	86
III.1.4. Bilan des conditions d'analyse sur C18.....	87
III.2. Analyse sur support de carbone graphite poreux (PGC)	87
III.2.1. Analyse en mode isocratique.....	88
III.2.2. Choix du modificateur organique	89
III.2.3. Analyse en mode gradient	90
III.2.4. Bilan des conditions d'analyse sur PGC.....	91
III.3. Analyse sur colonnes perfluorées	91
III.3.1. Influence de la nature et du pourcentage du modificateur organique	93
III.3.2. Influence de la concentration et de la nature du sel	94
III.3.3. Influence de la température	97
III.3.4. Bilan des séparations sur colonne perfluorée.....	98
III.4. Analyse sur colonne mixte mode (Stability IP).....	99
III.4.1. Influence de la nature et pourcentage du modificateur organique	99
III.4.2. Influence de la concentration et de la nature du sel	102
III.4.3. Optimisation du gradient d'élution	103
III.4.4. Bilan sur les séparations en mode mixte.....	105
III.5. Conclusions sur les séparations en mode phase inverse.....	105
IV. Séparation des catécholamines par chromatographie liquide d'appariement d'ions .. 106	
IV.1. Appariement d'ions sur colonnes conventionnelles (3 à 5 µm).....	107
IV.1.1. Analyse en appariement d'ions sur support C18	107
IV.1.1.1. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique	107
IV.1.1.2. Choix de l'agent d'appariement d'ions.....	109
IV.1.1.3. Bilan sur l'appariement d'ions sur C18	113
IV.1.2. Analyse en appariement d'ions sur PGC	114
IV.1.2.1. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile ..	114
IV.1.2.2. Choix de l'agent d'appariement d'ions.....	116
IV.1.2.3. Mise au point du gradient d'élution	118
IV.1.2.4. Bilan sur l'appariement d'ions sur PGC	119
IV.1.3. C18 vs PGC pour l'appariement d'ions.....	120
IV.2. L'appariement d'ions sur colonnes à résolution rapide (fast chromatography)	121
IV.2.1. Analyses sur colonnes monolithiques.....	122
IV.2.1.1. Généralités sur colonnes monolithiques	122
IV.2.1.2. Séparation en appariement d'ions sur colonne monolithique	124
IV.2.1.3. Bilan sur la séparation en appariement d'ions sur colonne monolithique.....	127
IV.2.2. Analyse sur les colonnes « fused core »	127
IV.2.2.1. Généralités sur les colonnes « fused core »	127

IV.2.2.2. Analyse en appariement d'ions sur colonne « fused core »	129
IV.2.2.3. Bilan sur l'analyse en appariement d'ions sur colonne « fused core »	131
IV.2.3. Monolithe vs « fused core »	131
V. Conclusions.....	132
Références bibliographiques.....	134
CHAPITRE III. ANALYSE DE NEUROTRANSMETTEURS PAR CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHILES (HILIC).....	139
I. Introduction	139
II. Etat de l'art sur la Chromatographie d'Interactions Hydrophiles (HILIC).....	140
II.1. Mécanisme principal de rétention en mode HILIC	141
II.2. Mécanismes secondaires de rétention en mode HILIC	142
II.3. Paramètres influant sur la séparation en mode HILIC.....	145
II.3.1. Choix de la phase stationnaire	145
II.3.2. Nature et pourcentage des solvants dans la phase mobile.....	148
II.3.3. Nature et concentration des sels dans la phase mobile.....	149
II.3.4. pH de la phase mobile.....	151
II.3.5. Température	152
II.3.5. Importance du solvant d'injection.....	153
II.4. Résumé des deux références se rapportant à l'analyse des catécholamines en mode HILIC.....	154
II.5. Conclusions.....	155
III. Approche détaillée pour la sélection des systèmes HILIC – Application à la séparation des catécholamines.....	156
III.1. Comparaison des performances de phases stationnaires HILIC.....	156
III.2. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique.....	165
III.3. Influence de la nature et de la concentration en sel	167
III.4. Influence du pH	169
III.5. Influence de la température.....	171
III.6. Systèmes retenus en vue d'un couplage aux détecteurs SM et électrochimique.....	173
III.7. Traitement des résultats par l'analyse en composantes principales (ACP).....	175
III.7.1. Généralités sur les ACP	175
III.7.2. Interprétation des ACP à l'analyse des catécholamines sur les 12 colonnes HILIC.....	176
III.7.3. Procédure proposée pour l'optimisation d'une séparation en mode HILIC.....	186
IV. Application du modèle proposé à l'optimisation de la séparation d'une autre famille de composés très polaires.....	187
IV.1. Performances comparées de différents supports polaires en vue de l'analyse d'herbicides organophosphorés par chromatographie d'interactions hydrophiles.....	188
IV.1.1. Introduction	188
IV.1.2. Partie expérimentale	191
IV.1.3. Résultats et discussion.....	192
IV.1.3.1. Influence du pourcentage et de la nature du modificateur organique	195
IV.1.3.2. Influence de la nature et de la concentration du sel	197
IV.1.3.3. Influence du pH de la phase mobile sur la rétention.....	199
IV.1.3.4. Influence de la température	200
IV.1.4. Conclusions	201
V. Conclusions.....	201

Références bibliographiques..... 203

CHAPITRE IV. ANALYSE DES CATECHOLAMINES PAR COUPLAGE CPL-SM/SM
..... *Erreur ! Signet non défini.*

I. Introduction *Erreur ! Signet non défini.*

II. Etude des paramètres de production et de transmission des ions *Erreur ! Signet non défini.*

II.1. Etude des spectres de masse et de la fragmentation *Erreur ! Signet non défini.*

II.2. Optimisation des paramètres de la source et de la cellule de collision *Erreur ! Signet non défini.*

II.2.1. Spectromètre de masse Sciex API 300..... **Erreur ! Signet non défini.**

II.2.2. Spectromètre de masse Sciex API 3000..... **Erreur ! Signet non défini.**

II.2.3. Spectromètre de masse Micromass Quatro Ultima **Erreur ! Signet non défini.**

II.2.4. Choix des transitions suivies..... **Erreur ! Signet non défini.**

II.2.5. Bilan sur l'optimisation des paramètres en SM **Erreur ! Signet non défini.**

III. Couplage des systèmes en appariement d'ions à la spectrométrie de masse..... *Erreur ! Signet non défini.*

III.1. Evaluation des limites de détection (LOD) des différents systèmes en appariement d'ions couplés à la spectrométrie de masse *Erreur ! Signet non défini.*

III.2. Analyse qualitative de l'extrait de cerveau en couplage appariement d'ions-SM/SM
..... *Erreur ! Signet non défini.*

III.3. Evaluation des LODs dans l'extrait de cerveau..... *Erreur ! Signet non défini.*

III.3. Analyse quantitative de catécholamines dans l'extrait de cerveau par couplage chromatographie d'appariement d'ions-SM/SM *Erreur ! Signet non défini.*

III.3.1. Méthode de l'étalonnage externe **Erreur ! Signet non défini.**

III.3.2. Méthode des ajouts dosés **Erreur ! Signet non défini.**

III.4. Bilan de l'analyse de catecholamines en chromatographie d'appariement d'ions en couplage avec la spectrométrie de masse *Erreur ! Signet non défini.*

IV. Couplage des systèmes en mode HILIC avec la SM..... *Erreur ! Signet non défini.*

IV.1. Influence de la composition de la phase mobile HILIC sur l'ionisation des solutés *Erreur ! Signet non défini.*

IV.1.1. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique **Erreur ! Signet non défini.**

IV.1.2. Influence de la nature et de la concentration en sel **Erreur ! Signet non défini.**

IV.1.3. Influence du pH **Erreur ! Signet non défini.**

IV.1.4. Analyse des données par ACP..... **Erreur ! Signet non défini.**

IV.1.5. Conclusions **Erreur ! Signet non défini.**

IV.2. Evaluation des LODs des systèmes HILIC..... *Erreur ! Signet non défini.*

IV.2.1. LODs dans la phase mobile **Erreur ! Signet non défini.**

IV.2.2. LODs dans la matrice **Erreur ! Signet non défini.**

IV.3. Dosage des catécholamines par couplage HILIC-SM/SM *Erreur ! Signet non défini.*

IV.3.1. Analyse d'un extrait de cerveau **Erreur ! Signet non défini.**

IV.3.2. Méthode de l'étalonnage externe..... **Erreur ! Signet non défini.**

IV.3.3. Méthode des ajouts dosés **Erreur ! Signet non défini.**

IV.4. Bilan de l'analyse de catecholamines en mode HILIC en couplage avec la spectrométrie de masse *Erreur ! Signet non défini.*

V. Comparaison des systèmes en appariements d'ions et en mode HILIC *Erreur ! Signet non défini.*

VI. Conclusions *Erreur ! Signet non défini.*

<i>Références bibliographiques</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
CHAPITRE V. OPTIMISATION D'UNE METHODE D'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE) POUR LES CATECHOLAMINES	255
I. Introduction	255
II. Etat de l'art sur l'extraction sur phase solide des catécholamines	256
II.1. Principe de l'extraction sur phase solide	256
II.2. SPE des catécholamines	258
III. Optimisation d'une méthode SPE pour le mélange de 12 catécholamines sélectionné	266
III.1. Cartouche de type hydrophile/lipophile (Oasis HLB)	266
III.1.1. Protocole type phase inverse	266
III.1.2. Protocole type appariement d'ions	268
III.1.3. Bilan sur les méthodes d'extraction sur support de type hydrophile/lipophile	269
III.2. Cartouche de type échangeur de cations	269
III.2.1. Echangeurs forts de cations	269
III.2.1.1. Cartouche Oasis MCX	269
III.2.1.2. Cartouche Bond Elut Plexa PCX	275
III.2.2. Echangeurs faibles des cations	275
III.2.3. Cartouche mode mixte échangeur d'anions et de cations (Bond Elut AccuCAT).....	276
III.2.4. Bilan sur l'extraction sur support échangeur d'ions	278
III.3. Cartouche de type C18	278
III.4. Cartouche de type PGC	279
III.4.1. Optimisation d'un protocole SPE en appariement d'ions	279
III.4.2. Bilan sur l'extraction sur PGC	283
IV. Application des 2 protocoles SPE optimisés à l'analyse d'un échantillon biologique (extrait de cerveau de mouton)	284
IV.1. SPE de l'extrait du cerveau du mouton sur support Oasis HLB	284
IV.2. SPE d'un extrait de cerveau de mouton sur support PGC	286
IV.3. SPE d'un extrait de cerveau de mouton sur les deux supports Oasis HLB et PGC	289
V. Conclusions	290
<i>Références bibliographiques</i>	291
CONCLUSIONS GENERALES	295
ANNEXES	301

Liste des abréviations

3-MT	3-methoxytyramine
5HIAA	Acide 5-hydroxyindole acétique
A	Adrénaline
ACN	Acétronitrile
ACP	Analyse en composante principale
AD	Alzheimer disease = maladie d'Alzheimer
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric pressure chemical ionisation)
API	Ionisation à pression atmosphérique (Atmospheric pressure ionisation)
APPI	Photoionisation à pression atmosphérique (Atmospheric pressure photo ionisation)
Asp	Acide aspartique
°C	Degré Celsius
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPL	Chromatographie en Phase Liquide
CV	Coefficient de variation
DA	Dopamine
DEDL	Détecteur évaporatif à la diffusion de la lumière
DHBA	Dihydroxybenzylamine
DOPA	Dihydroxyphenylalanine
DOPAC	Acide dihydroxyphenyl acétique
DPBA	Acide diphényl bromique
EC	Electrophorèse Capillaire
Eth	Ethephon
ESI	Electrospray ou « Ionspray »
EtOH	Ethanol
FIA	Flow Injection Analysis
GABA	Acide γ amino butyrique
GLUF	Glufosinate d'ammonium
GLU	Acide glutamique
GLYPH	Glyphosate
HFBA	Acide heptafluorobutyrique
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Chromatographie liquide hautes performances (High Performance Liquid Chromatography)
HVA	Acide Homovanillique
IP-LC	Chromatographie d'appariement d'ions

IS	Etalon interne
LIF	Fluorescence induite par laser (Laser Induced Fluorescence)
LOD	Limite de détection (Limit of Detection)
LOQ	Limite de quantification (Limit of Quantification)
MeOH	Méthanol
min	minutes
mM	millimolaire
MN	Métaépinephrine
NA	Noradrénaline
NFPA	Acide nonafluoropentanoïque
nm	Nanomètre
NMN	Normétaépinephrine
NPC	Chromatographie en phase normale (Normal phase liquide chromatography)
PDFOA	Acide pentadecafluorooctanoïque
PGC	Carbone graphite poreux (Porous Graphitic Carbon)
Phe	Phénylalanine
RPLC	Chromatographie à polarité de phases inversée (Reversed Phase Liquide Chromatography)
r² ou R²	Coefficient de détermination
S	Sérotonine
SDS	Dodecyl sodium sulfate
SM	Spectrométrie de masse
SM/SM	Spectrométrie de masse tandem
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SPE	Extraction sur phase solide (Solid phase extraction)
TDFHA	Acide tridecafluoroheptanoïque
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
t_R	Temps de rétention
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UV	Ultra-violet
VMA	Acide vanilmandélique

Introduction generale

INTRODUCTION GENERALE

Depuis très longtemps les humains s'intéressent au plus complexe des organes du corps humain, le cerveau. Le centre de contrôle de toutes les activités conscientes et inconscientes, n'a pas encore dévoilé tous ses secrets. Il gère chaque seconde des millions d'informations venues de chaque partie du corps et renvoie autant de réponses à travers les réseaux neuronaux. Les catécholamines et les indolamines font partie de la famille des neurotransmetteurs et jouent des rôles importants dans la transmission de l'information dans le cerveau. Des déséquilibres dans leurs concentrations peuvent provoquer de graves maladies neurodégénératives, telles les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer, ou mêmes des maladies d'ordre psychiatrique, telles la dépression, la schizophrénie ou les troubles anxieux. Dans ce contexte des méthodes d'analyse très précises et sensibles sont nécessaires afin de détecter des faibles différences de concentration de ces composés dans les différents tissus et fluides biologiques.

L'objectif de notre travail a été de développer en vue de l'identification et le dosage des catécholamines (noradrénaline, adrénaline et dopamine), indolamine (sérotonine), leurs précurseurs (tyrosine, tryptophane et dihydroxyphényl alanine) et leurs métabolites (acide dihydroxyphényl acétique, acide homovanillique, acide 5-hydroxyindole acétique et 3-méthoxytyramine) dans un extrait de cerveau, de nouvelles méthodes séparatives par chromatographie en phase liquide (CPL) compatibles avec une double détection par spectrométrie de masse et par électrochimie. Dans ce but, il a fallu prendre en compte les contraintes imposées par chacun de ces détecteurs et essayer de trouver le compromis pour atteindre notre objectif. Nous avons ainsi identifié d'une part des contraintes liées à l'exigence de volatilité de la phase mobile et de volume minimal de modificateur organique dans celle-ci, pour avoir un spray stable en spectrométrie de masse (minimum de 10% de solvant organique) et d'autre part la nécessité d'une séparation totale des composés pour la détection électrochimique «non spécifique». Une divergence entre ces deux types de détecteurs apparaît au sujet de la concentration de sel nécessaire pour l'obtention de la sensibilité maximale. Si en électrochimie une meilleure sensibilité est obtenue avec des phases très riches en sel, en revanche en spectrométrie de masse une phase mobile peu chargée en sel est préférable pour éviter la contamination de l'appareillage et la perte de sensibilité. Nous avons donc opté en priorité pour l'utilisation d'une quantité modérée de sels dans les phases mobiles pour obtenir la meilleure sensibilité en spectrométrie de masse. Pour améliorer le seuil de détection en

électrochimie il suffira alors d'introduire un liquide additionnel post-colonne pour augmenter la quantité de sel avant la détection.

Le premier chapitre bibliographique de ce mémoire présente l'importance des catécholamines dans l'organisme à travers leurs rôles dans la neurotransmission et leurs implications dans différentes maladies. Les différentes méthodes d'analyse actuelles pour cette famille de composés et plus particulièrement celles qui utilisent la chromatographie en phase liquide sont également résumées.

Dans le deuxième chapitre sont présentés les résultats obtenus au cours de la mise au point de méthodes de séparation en chromatographie phase inverse (RPLC) et en appariement d'ions dans le but d'obtenir de nouvelles méthodes compatibles avec une détection par spectrométrie de masse. Nous montrons que l'utilisation des acides perfluorés comme agents d'appariement d'ions volatils et des supports de type monolithe greffé C18 nous permettent de réaliser la séparation de nos analytes.

La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) est considérée comme une alternative prometteuse à la RPLC pour la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau. Depuis ces cinq dernières années, de nombreuses colonnes compatibles avec le mode HILIC ont été développées et sont maintenant commercialisées avec un nombre important d'applications publiées. Malgré l'intérêt suscité par cette technique, les mécanismes de rétention des composés ne sont pas encore totalement élucidés. C'est pourquoi le troisième chapitre de ce manuscrit sera dédié à la mise au point des séparations en mode HILIC pour nos composés et à la comparaison et la classification des différentes phases stationnaires disponibles afin de mieux appréhender les mécanismes de rétention.

Dans le quatrième chapitre sont présentés les résultats obtenus en couplage CPL-SM des systèmes les plus performants mis au point dans les chapitres II et III. Les limites de détection obtenues pour les deux systèmes chromatographiques complémentaires ont été comparés afin d'évaluer les avantages et inconvénients de chacun des systèmes vis à vis de l'analyse des catécholamines. Une étape de purification et de pré-concentration de l'échantillon s'est avérée nécessaire pour améliorer les limites de détection lors de l'analyse d'échantillons naturels. Les performances de différentes cartouches d'extraction sur phase solide (SPE) ont ainsi été évaluées et l'optimisation des méthodes SPE fait l'objet du cinquième chapitre de ce mémoire.

Enfin nous allons présenter des conclusions sur l'intégralité de ce travail et les perspectives sur sa continuité.

Chapitre I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR
LES METHODES D'ANALYSE DES
NEUROTRANSMETTEURS

CHAPITRE I.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES METHODES D'ANALYSE DES NEUROTRANSMETTEURS

I. Système nerveux – terminologie et définitions

I.1. Le système nerveux

Le système nerveux peut être divisé en deux grandes parties: le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux central (SNC). Le SNP est composé de tous les nerfs rachidiens et crâniens, qui sont présents dans toutes les parties du corps, transmettant les messages du SNC. Le SNC est composé du cerveau (l'encéphale), protégé par le crâne, et de la moelle spinale (ou épinière), protégée par la colonne vertébrale.

Le cerveau est composé de deux hémisphères (gauche et droit), du cervelet et du tronc cérébral. Chaque hémisphère est divisé en lobes et constitué du cortex cérébral de coloration grisâtre, connu aussi sous le nom de matière grise. Le cortex est formé des corps cellulaires de neurones et de cellules gliales, et recouvre la matière blanche qui est composée d'axones et des cellules de la glie.

I.2. Le neurone

L'unité fonctionnelle de base du système nerveux est la cellule nerveuse ou le neurone. Ce sont des cellules hautement spécialisées pour transmettre les informations aux autres cellules nerveuses, aux muscles ou aux organes. Le cerveau contient entre 1 million et 100 millions de neurones, en fonction de l'espèce. En nombre encore plus grand dans le cerveau sont les cellules de la névroglie ou les cellules gliales. Elles ne participent pas directement au traitement de l'information, mais sont très importantes pour l'exécution normale des fonctions nerveuses.

Les fonctions des neurones sont de recevoir et d'intégrer les informations entrantes venant des récepteurs sensitifs ou d'autres neurones et de transmettre ces informations à d'autres neurones ou organes effecteurs. Chaque neurone est une entité distincte, avec une membrane cellulaire qui marque ses limites. Les informations sont transmises entre les neurones au niveau des régions spécialisées appelées synapses où les membranes des cellules adjacentes sont en étroite relation.

Il existe une grande diversité de forme et de taille de neurones dans les différentes parties du système nerveux, mais ils partagent tous certaines caractéristiques communes [1].

Un neurone est constitué par le corps cellulaire (soma), un axone et des dendrites. Le corps cellulaire contient le nucleus et le cytoplasme. L'axone (qui conduit l'influx nerveux) part du corps cellulaire et la plupart du temps se ramifie en plusieurs branches avant de finir par des terminaisons nerveuses. Les dendrites partent aussi du corps cellulaire et elles reçoivent des messages d'autres neurones. Les synapses sont les points à travers lesquels les neurones communiquent (Figure I.1). Les dendrites et le corps cellulaire sont en lien avec d'autres neurones par l'intermédiaire des synapses [2].

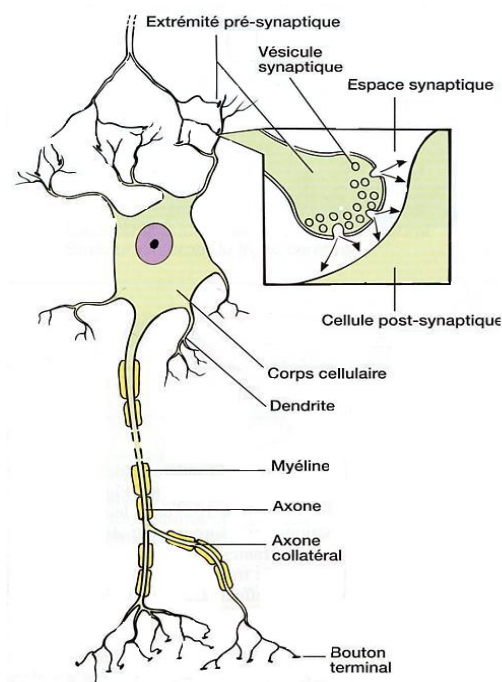


Figure I.1. Représentation schématique de la structure fondamentale du neurone et de la synapse [1]

Le système nerveux autonome ou système nerveux viscéral est la partie du système nerveux responsable des fonctions automatiques telles que la digestion ou la sudation. Ses constituants sont présents aussi bien dans le SNC que dans le SNP. Ils se divisent en deux parties distinctes sur le plan anatomique et fonctionnel: le système sympathique et le système parasympathique, ayant généralement des effets antagonistes sur les structures qu'ils innervent. Le système autonome innerve les muscles lisses, le muscle cardiaque et les glandes sécrétoires. Il intervient pour une part importante dans les mécanismes homéostatiques qui contrôlent le milieu intérieur.

I.3. La neurotransmission

La transmission d'informations d'un neurone, dit présynaptique, à un autre, dit postsynaptique, est assurée par des substances chimiques appelées neurotransmetteurs. Dans le système nerveux, il y a un système de transmission double: électrique et chimique. Il faut mentionner le fait que la transmission électrique fait appel aux ions chimiques [3].

Les informations à l'intérieur des neurones sont codées par des variations d'énergie électrique. Au repos, un neurone a un potentiel électrique transmembranaire d'environ 70 millivolts, l'intérieur étant négatif par rapport à l'extérieur. Lors de l'excitation d'un neurone au-dessus d'un certain seuil il se produit une brève inversion de son potentiel de membrane (potentiel d'action). Le potentiel d'action se propage le long de l'axone et envahit les terminaisons nerveuses. L'invasion des terminaisons nerveuses par le potentiel d'action entraîne la libération de neurotransmetteurs [1].

Les neurotransmetteurs sont stockés dans les vésicules des extrémités nerveuses, et ils sont libérés dans la synapse où ils diffusent jusqu'aux récepteurs des cellules effectrices auxquelles ils se lient. Les cellules cibles ouvrent ou ferment divers canaux ioniques, ce qui permet de propager plus loin l'information. Ce signal peut être excitateur par dépolarisation ou inhibiteur par hyperpolarisation [3].

I.4. Les neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont les messagers chimiques les plus courants du système nerveux et permettent le passage de l'influx nerveux entre deux neurones. Pour pouvoir être considérée comme neurotransmetteur, la substance neuroactive doit remplir les critères suivants:

- elle doit être d'origine neuronale et doit s'accumuler dans les terminaisons présynaptiques, d'où elle est libérée lors de la dépolarisation;
- lorsqu'elle est libérée, elle doit induire des effets postsynaptiques sur les cellules cibles;
- elle doit être inactivée métaboliquement ou elle doit disparaître de la fente synaptique par un mécanisme de ré-assimilation;
- Son application expérimentale sur du tissu nerveux doit produire des effets comparables à ceux induits par sa production naturelle.

En fonction de leur nature chimique, les neurotransmetteurs peuvent être divisés en deux grandes classes: les amines biogéniques et les acides aminés (Figure I.2) [4].

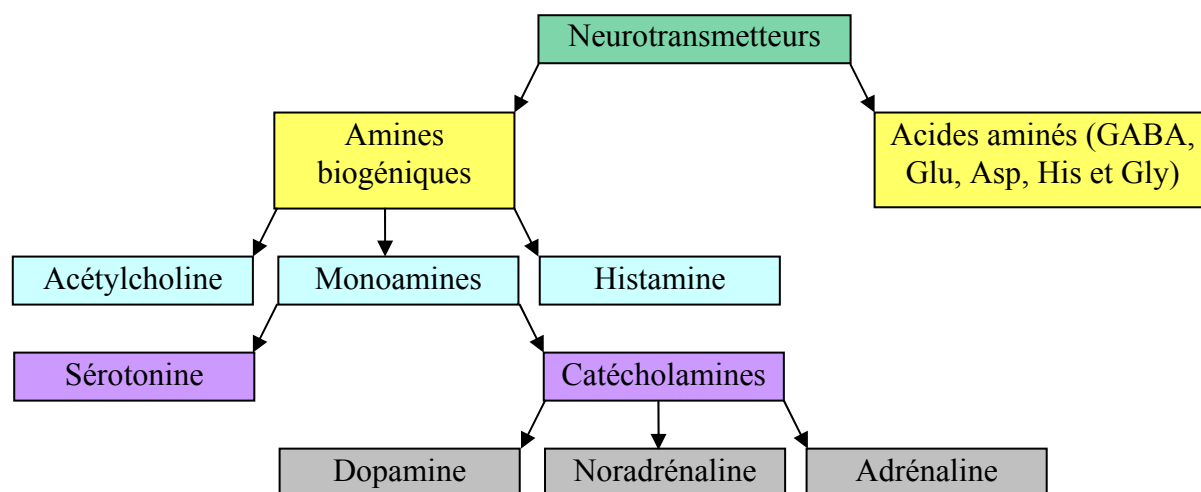


Figure I.2. Classification des neurotransmetteurs en fonction de leur structure chimique [4]

I.5. Les neuromédiateurs

Par rapport aux neurotransmetteurs, les neuromédiateurs peuvent être divisés en plusieurs sous-classes, parmi lesquelles la plus importante est celle des neuropeptides. D'autres neuromédiateurs sont représentés par certaines substances gazeuses (NO_2 et CO) actives du point de vue neurobiologique et certains composés dérivés du métabolisme des acides gras tels l'acide arachidonique et les éicosanoïdes.

Les neuropeptides sont synthétisés par les neurones et ils sont libérés, comme neurotransmetteurs, par les terminaisons présynaptiques. Comme ils ne réunissent pas tous les critères précédemment énoncés, ils ne font pas partie des neurotransmetteurs. Les neuropeptides sont fréquemment appelés « neurotransmetteurs présumés » (par exemple les endorphines) [4].

Les neuropeptides n'influencent pas seulement les neurones, mais aussi les tissus non-neuronaux. De plus, il semble que les neuropeptides fassent la liaison entre les activités du cerveau et d'autres fonctions du corps, tel l'axe neuro-immune. En conséquence les neuropeptides sont impliqués dans divers processus physiologiques comme le développement, la croissance, l'homéostasie du corps, le comportement ou les réponses immunitaires.

De la même manière que les neurotransmetteurs et les neuromédiateurs, les dérivés neuroactifs des acides gras peuvent se lier aux membranes des récepteurs, ayant comme résultat la transduction du signal en aval. Des gaz tels les monoxydes de carbone ou l'oxyde nitrique peuvent agir également comme des messagers chimiques. [4]

II. Catécholamines et indolamines

Les catécholamines (la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline) (Annexe1) sont des neurotransmetteurs de la famille des monoamines qui sont tous synthétisés à partir du même acide aminé (la tyrosine) et de ce fait, ont une structure similaire constituée d'un noyau aromatique avec deux groupements hydroxyle (le noyau catéchol) et une éthylamine comme chaîne latérale (Figure I.3) [3,4].

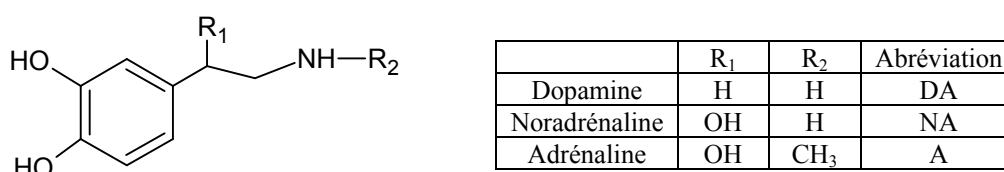


Figure I.3. Structure générale des catécholamines

Elles sont importantes pour le pronostic, le diagnostic et la thérapie de maladies cardiovasculaires et en leur qualité de neurotransmetteurs, elles sont des molécules cibles pour l'étude de la neurotransmission.

La sérotonine (S) fait partie de la famille des neurotransmetteurs de type indolique. Elle est synthétisée à partir du tryptophane (Trp). S est le neurotransmetteur pour lequel il existe le plus grand nombre de récepteurs.

Les catécholamines et les indolamines, ainsi que leurs métabolites, sont des molécules polaires, non-volatiles. Ce sont des substances très sensibles à la lumière, à l'oxygène, à la température et au pH. C'est pourquoi elles doivent être conservées en milieu acide (pH inférieur à 3), à l'abri de la lumière et à basse température.

K. Miki et A. Sudo [5] ont réalisé une étude montrant l'effet du pH, du temps de stockage et de la température sur la stabilité des catécholamines (DA, A et NA) dans les urines. Ils ont pu constater qu'à pH inférieur ou égal à 7, les urines conservées à moins de 4°C

ne perdent pas de quantités significatives de catécholamines au moins pendant les 7 premiers jours, tandis qu'à pH 10, elles se dégradent rapidement même conservées à -20°C. Cette étude met en évidence l'importance de la température sur la conservation des catécholamines. Les échantillons d'urine doivent être rapidement congelés à -80°C, en vue d'une conservation sur le long terme.

Dans l'annexe 1 sont présentées les structures chimiques de tous les analytes qui ont fait l'objet de notre étude.

II.1. L'adrénaline (ou épinephrine)

En 1921, Loewi découvre une substance qu'il appelle « accelerace », et qui sera identifiée comme étant l'adrénaline (A) en 1936. L'adrénaline a un rôle de premier plan dans le système nerveux dit sympathique (système nerveux ayant une action essentiellement excitatrice). Dans le système nerveux périphérique (neurones post-ganglionnaires sympathiques), elle est moins répandue que la noradrénaline. Dans le système nerveux central (SNC) elle est présente dans certains neurones de l'hypothalamus et du bulbe rachidien (Figure I.4) [6].

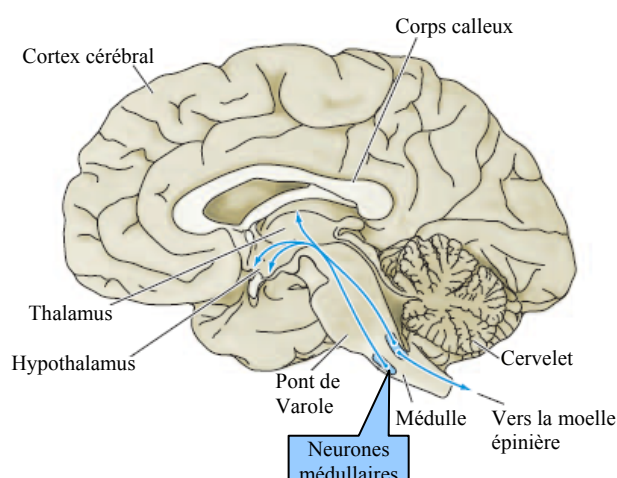


Figure I.4. Distribution des neurones contenant de l'adrénaline (flèches bleues) [7]

L'adrénaline est aussi une hormone sécrétée par les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale. Cette hormone a une action sympathomimétique (mimant le système sympathique) et est sécrétée en réponse à un état de stress ou en vue d'une activité physique. Elle entraîne une accélération du rythme cardiaque, de la pression artérielle, dilate les bronches et les pupilles et élève la concentration du glucose sanguin. Elle est l'hormone sécrétée en cas de peur ou d'anxiété [6].

Umegaki *et al* [8] a montré que dans le cas de femmes atteintes de démence de type Alzheimer, le taux d'adrénaline dans le plasma est significativement moins élevé que pour les sujets sains. La quantité moyenne de A dans le sang est de l'ordre de 50 à 750 pmol.L⁻¹ soit 10 – 130 ng.mL⁻¹.

II.2. La noradrénaline (ou norépinephrine)

Comme la noradrénaline (NA) est le précurseur direct de l'adrénaline, elle a longtemps été considérée seulement comme un intermédiaire dans la synthèse de l'adrénaline. C'est en 1940 qu'on découvre que la NA joue un rôle significatif comme neurotransmetteur *per se*.

NA est un transmetteur majeur du SNC, elle est principalement présente dans les neurones du locus coeruleus et subcoeruleus (Figure I.5) [4].

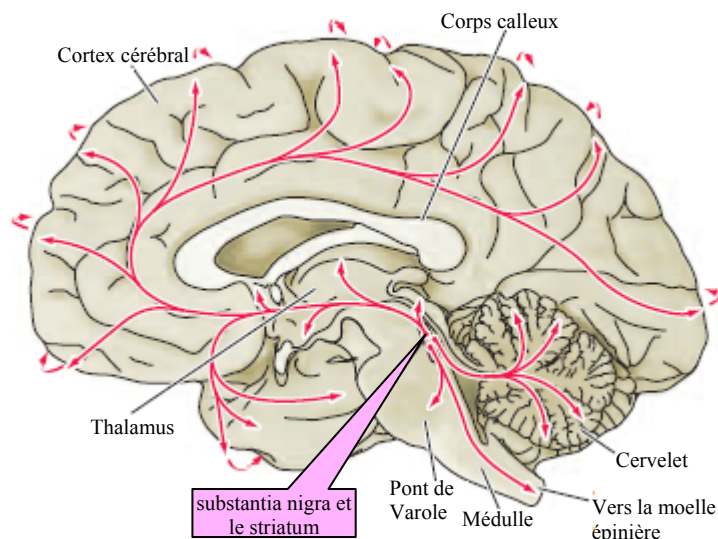


Figure I.5. Distribution des neurones contenant de la noradrénaline (flèches rouges) [7]

D'une part, la libération de la NA a des effets inhibiteurs et détermine une décroissance dans l'activité spontanée des neurones et d'autre part, la NA semble augmenter la réponse neuronale aux stimuli visuels, auditifs et nociceptifs (stimuli produisant la douleur).

Dans la maladie de Parkinson, des pertes importantes de neurones dans le locus coeruleus ont été observées. Même si l'implication du système dopaminergique joue un rôle

dominant dans cette maladie, les déficits noradrénergiques semblent spécialement responsables des déficits de la fonction cognitive.

Pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (AD), une perte de neurones noradrénergiques du locus cœruleus a été constatée, cette perte n'a pas été constatée dans d'autres types de démence. Des liens forts entre la sévérité de l'AD et la perte des neurones noradrénergiques sont mis en évidence.

La NA semble impliquée aussi dans la schizophrénie [9], la dépression, l'épilepsie, les troubles anxieux et les troubles de stress post-traumatique [4].

La concentration dans le sang de la NA est de l'ordre de 5 ng.mL^{-1} et son élimination urinaire est normalement inférieure à $100 \text{ } \mu\text{g}$ par 24 h.

II.3. La dopamine

La dopamine (DA) a été synthétisée pour la première fois en 1910. Arvid Carlsson a reçu en 2000 le prix Nobel de physiologie ou médecine pour avoir démontré que DA n'est pas seulement précurseur de NA et A mais également un neurotransmetteur. DA intervient dans les circuits neuronaux de l'appétence et du plaisir et donc dans leurs dérèglements (comportements d'addiction et dépendance aux drogues). Les neurones dopaminergiques sont principalement localisés dans la substantia nigra et le striatum (Figure I.6) [4].

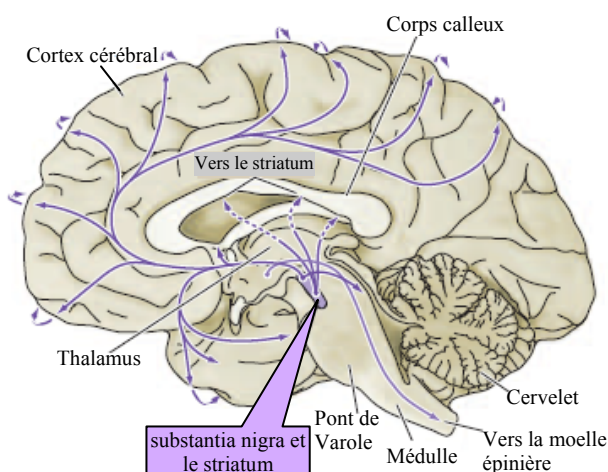


Figure I.6. Distribution des neurones contenant de la dopamine (flèches violettes) [7]

La distribution des divers systèmes dopaminergiques indique que la DA influence un grand nombre de fonctions du cerveau. Par exemple elle est impliquée dans la régulation de la tension artérielle, la cognition, l'apprentissage et les comportements liés à la peur [4].

Les dysfonctionnements dans la transmission dopaminergique sont impliqués dans une multitude de maladies de nature neurologique et psychiatrique. Certains dysfonctionnements entraînent une augmentation de production de DA. L'hyperactivité des transmissions de DA augmente la concentration de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique. Cet excès est associé à des troubles décrits dans la schizophrénie et l'anorexie mentale (hallucinations, délire, agitation) [4,10]. A l'inverse, le déficit de DA est associé principalement aux dysfonctionnements moteurs et à des problèmes de comportement liés à la motivation et aux déséquilibres émotionnels [2]. Ce déficit est impliqué aussi dans les maladies neurodégénératives de type maladie de Parkinson, d'Alzheimer et de Huntington [11-13].

II.4. La sérotonine

La sérotonine (S) (5-hydroxy-tryptamine) découverte en 1947 est un vasoconstricteur puissant et stimulant la contraction des muscles lisses. Dans les années 50, il est devenu évident que la S et la diéthylamine de l'acide D-lysergique (LSD), une des drogues hallucinogènes les plus puissantes, présentaient des similitudes au niveau de leur structure chimique (Figure I.7), mais il a fallu encore dix ans avant l'identification de la S comme neurotransmetteur [4,14].

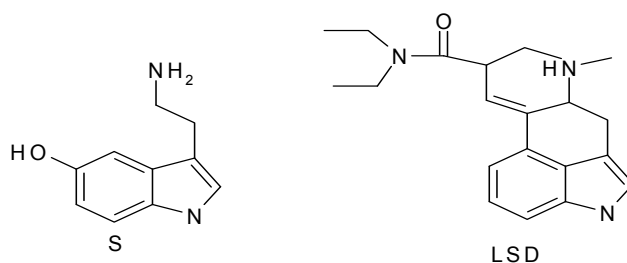


Figure I.7. Structures de la sérotonine et du LSD

Les neurones sérotoninergiques sont principalement localisés dans les noyaux du raphé (Figure I.8). Les noyaux du raphé sont un ensemble de structures sous-corticales du cerveau, présentes au niveau du bulbe rachidien, du pont et du mésencéphale [4].

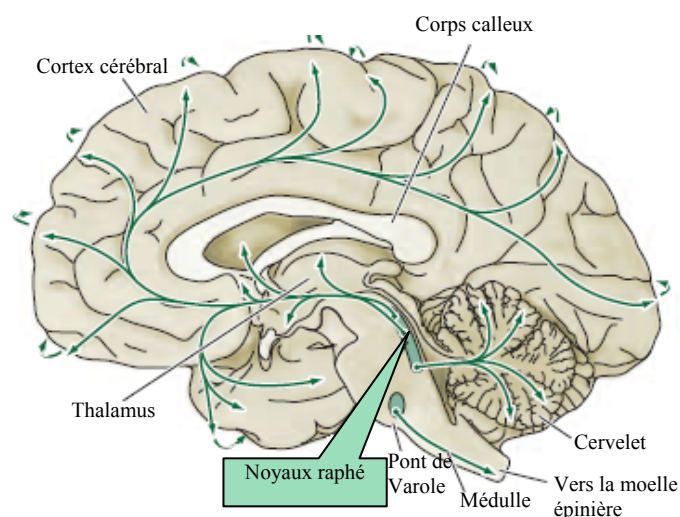


Figure I.8. Distribution des neurones contenant de la sérotonine (flèches vertes) [7]

La sérotonine est impliquée dans une variété de processus physiologiques, tels que la contraction des muscles lisses, la régulation de la pression sanguine, et dans la transmission de l'influx nerveux dans le SNC et le PNC. Elle influence des processus liés à la mémoire et à l'apprentissage, aux comportements sexuels et nutritionnels [4,14].

L'implication de la sérotonine dans différentes maladies, telles que la dépression, la schizophrénie, l'épilepsie, l'anorexie nerveuse, la démence ou le syndrome carcinoïde a été établie [15-17]. Par exemple pour les malades d'AD, la densité des récepteurs sérotoninergiques (5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}) dans le cortex diminue. De façon similaire, la maladie de Huntington est associée à une réduction significative des récepteurs 5-HT_{1D} dans la substantia nigra [4,14].

Le taux de S dans le sang est normalement de 0,10 à 0,30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

II.5. Métabolisme des catécholamines et indolamines

II.5.1. Voie de synthèse des catécholamines

La tyrosine (Tyr) est le précurseur direct des catécholamines et la tyrosine hydroxylase est l'enzyme limitante de leur voie de biosynthèse. La tyrosine hydroxylase agit comme une oxydoréductase avec un cofacteur, la tétrahydroptérine, pour transformer la L-Tyr en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA). En suite la L-DOPA est convertie en dopamine par l'intermédiaire de la DOPA décarboxylase. La dopamine β -hydroxylase catalyse la conversion de DA en noradrénaline. La production de l'adrénaline est catalysée par la

phényléthanolamine N-méthyletransférase. La conversion de la Tyr en A est donc réalisée en quatre étapes:

- hydroxylation du cycle;
- décarboxylation ;
- hydroxylation de la chaîne latérale;
- N-méthylation.

Cette voie de biosynthèse est représentée dans la figure I.9 [18].

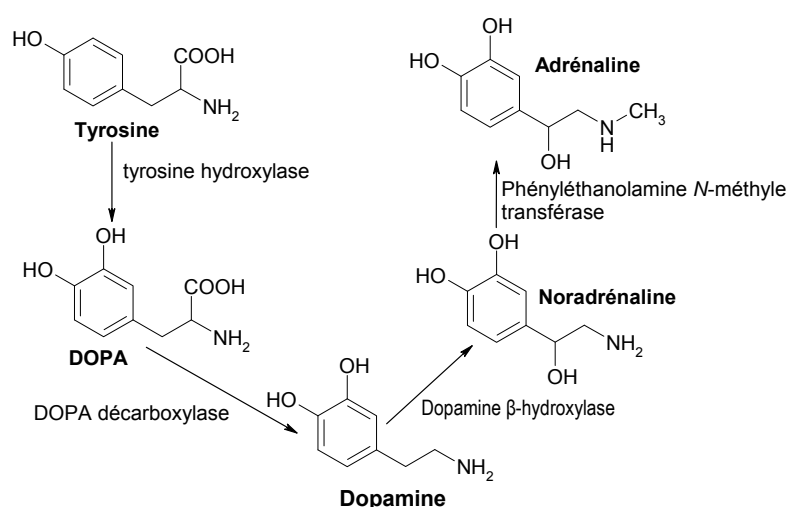


Figure I.9. Biosynthèse des catécholamines

II.5.2. Métabolisme des catécholamines

Les catécholamines sont rapidement inactivées par recapture neuronale et extraneuronale ou par métabolisation par les enzymes catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et monoamine oxydase (MAO) pour former des métabolites inactifs O-méthyle et désaminés (figure I.10). Leurs effets physiologiques sont donc fugaces.

La COMT catalyse l'addition d'un groupement méthyle en position 3 du noyau aromatique. Selon le substrat, cette réaction produit de l'acide homovanillique (HVA), de la normétanéphrine (NMN) ou de la métanéphrine (MN).

La MAO est une oxydoréductase qui désamine les monoamines. Les inhibiteurs de la MAO ont été utilisés dans le traitement de l'hypertension et de la dépression, mais des interactions avec des aliments ou d'autres médicaments limitent leur utilisation.

Les métanéphrines sont des dérivés méthoxylés de l'A et de la NA, de même l'acide vanillyl-mandélique (VMA) est le produit O-méthyle de ces deux catécholamines. Plus de

95% des patients atteints de phéochromocytomes présentent une concentration élevée de métanéphrines ou du VMA dans l'urine. C'est pourquoi on utilise ces tests dans le diagnostic de la maladie [18].

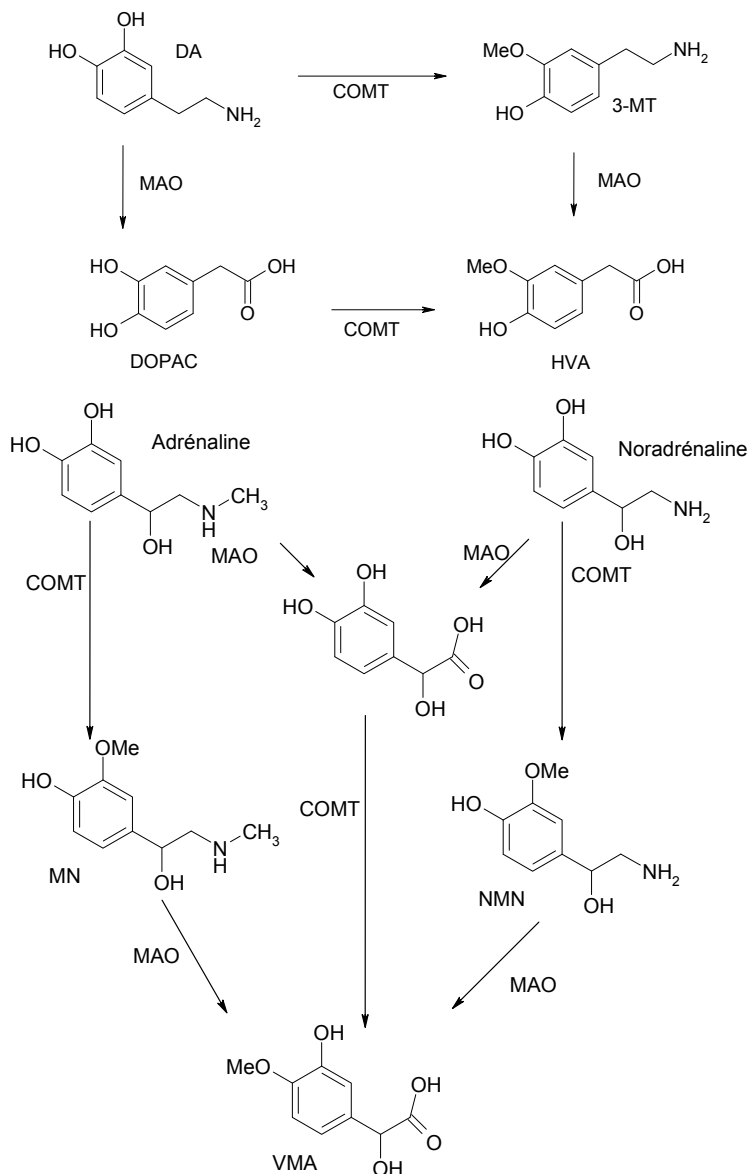


Figure I.10. Métabolisme des catécholamines par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) et monoamine oxydase (MAO)

II.5.3. Voie de synthèse de la sérotonine

Les neurones sont la seule source de sérotonine dans le SNC. Le précurseur de la S est le tryptophane (Trp) et la disponibilité de cet acide aminé essentiel représente un facteur limitant pour la synthèse de la S. La Trp hydroxylase catalyse le passage de Trp en 5 hydroxy-

tryptophane, qui à son tour est transformé en sérotonine sous l'action de la L-aminoacide décarboxylase (figure I.11).

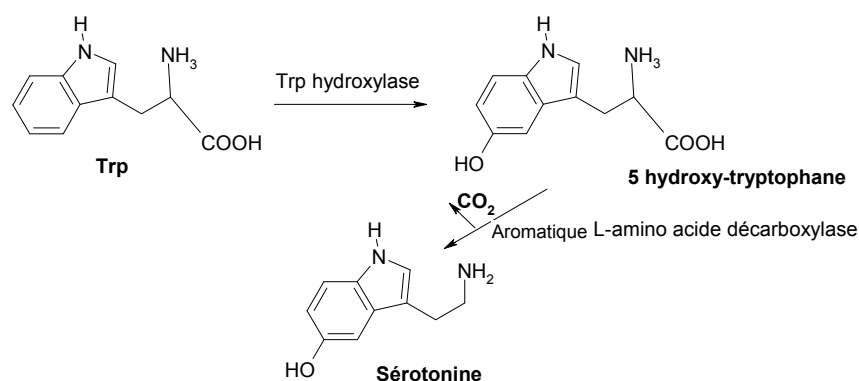


Figure I.11. Biosynthèse de la sérotonine

II.5.4. Le métabolisme de la sérotonine

L'inactivation de la sérotonine est réalisée par voie enzymatique sous l'action consécutive de deux enzymes: la monoamino oxydase (MAO) et l'aldéhyde déshydrogénase (figure I.12). Le métabolite résultant, l'acide 5 hydroxyindolique (5HIAA) est éliminé par voie urinaire.

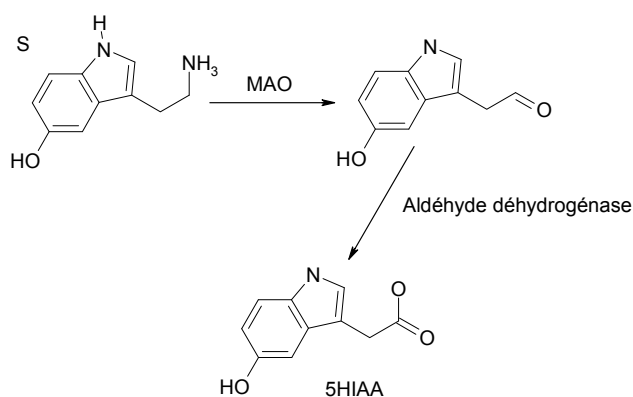


Figure I.12. Métabolisme de la sérotonine

II.5.5. Concentrations physiologiques des catécholamines et indolamines

Dans les organismes vivants les processus d'anabolisme (synthèse) et de catabolisme (dégradation) se passent de manière continue. Nous avons pu voir dans les paragraphes précédents que les catécholamines et les indolamines sont rapidement transformées sous l'action de différentes enzymes (principalement la MAO et la COMT). En conséquence, les

fluides biologiques se présentent comme des mélanges complexes contenant entre autre des catécholamines, indolamines et aussi leurs précurseurs et métabolites.

Les concentrations d'un analyte peuvent être très différentes selon l'échantillon biologique. Par exemple la NA atteint dans les urines des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng.mL^{-1} tandis que sa concentration dans le plasma est inférieure à 1 ng.mL^{-1} (Tableau I.1).

Tableau I.1. Concentration des catécholamines, indolamines, précurseurs et métabolites dans les urines, le plasma (humain ou animal) et le cerveau (animal)

Composé	Concentration dans :		
	Urine (ng.mL^{-1})	Cerveau ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Plasma (ng.mL^{-1})
Tyr	27100 [19]	$\sim 10^{\bullet}$ [20]	~ 11000 [21]
DOPA	-	$\sim 1,25^{\bullet\bullet}$ [22]	$\sim 1,3$ [21]
A	0,3 – 30 [23-26] 12,6* [27]	-	0,02 – 0,6 [28,29] 0,69** [30] 0,32*** [30]
NA	6 – 100 [23-26] 77** [31] 10,1* [27]	$\sim 1,5^{\bullet}$ [20] $\sim 0,1^{\bullet\bullet}$ [32] $\sim 0,3^{\bullet\bullet}$ [22]	0,07 - 0,94 [28,29] 0,73** [30] 0,38*** [30]
DA	20 – 250 [19,24-26] 34* [27]	$\sim 1,5^{\bullet}$ [20] $\sim 0,5^{\bullet\bullet}$ [32] $\sim 4^{\bullet\bullet}$ [22] 4,6 $^{\diamond}$ [33]	0,03 – 0,5 [28,29] 0,48** [30] 0,27*** [30]
MN	5 – 45 [24] 15,9* [27]	-	0,01 – 0,06 [34]
NMN	2 – 25 [24] 20,8* [27]	-	0,04 – 0,2 [34]
3-MT	-	-	<0,03 [34]
DHPG	-	-	0,8 – 1 [29]
MHPG	-	-	3,6 - 5,6 [28,29,35]
DOPAC	315 – 1500 [26]	$\sim 1,5^{\bullet\bullet}$ [22]	0,9 - 2,8 [29,35] 1,4** [30] 3,9*** [30]
HVA	1500 – 5000 [26]	-	6,7 – 10,5 [29,35]
VMA	-	-	4 – 15 [29]
Trp	21600 [19]	-	(8 – 14) $\times 10^3$ [36]
S	12 – 230 [19,26]	0,45 $^{\bullet\bullet}$ [22] 5,3 $^{\diamond}$ [33]	-
5HIAA	300 – 6500 [26]	$\sim 0,5^{\bullet\bullet}$ [22]	-

* urine de porc

\bullet cerveau de porc – quantité exprimée pour la *substantia nigra*

** cerveau/ urine/ plasma de rat

$\bullet\bullet$ cerveau de rat – quantité exprimée pour le *Striatum*

*** plasma de lapin

$^{\diamond}$ cortex préfrontal des primates

Dans le tableau I.1, nous avons réuni des données de la littérature sur la concentration des différentes catécholamines, indolamines et de leurs précurseurs et métabolites dans les urines et le plasma humain et animal, ainsi que dans le cerveau animal. Le plus couramment les dosages sont réalisés dans les urines car l'échantillonnage est plus facile, les volumes disponibles plus importants que pour les autres fluides biologiques et les teneurs en catécholamines plus élevées.

Comme on peut le voir dans le tableau I.1 les concentrations des catécholamines dans le cerveau sont très faibles et pour la plupart inférieures à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, ce qui nécessite de disposer de méthodes très sensibles pour leur dosage.

III. Maladies associées à des déséquilibres de concentration des catécholamines et indolamines

Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe précédent, les catécholamines et les indolamines sont impliquées dans une multitude de processus dans l'organisme et un déséquilibre de leurs concentrations peut entraîner des maladies très différentes, telles que des tumeurs (neuroblastoma et pheochromocytoma), des maladies neurodégénératives (les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou de Huntington) ou des maladies d'ordre psychiatrique (dépression, schizophrénie, troubles anxieux, etc). Pour certaines maladies, comme la pheochromocytoma, l'analyse des catécholamines est déjà utilisée pour le diagnostic [18,37]. Pour d'autres, la recherche est encore en cours, des liens entre les concentrations des catécholamines et la maladie ont été établis [8] mais pas encore validés.

III.1. La maladie d'Alzheimer (AD)

Dans le cas de l'AD il n'y a pas qu'une seule famille de neurotransmetteurs qui est affectée. Les neurones produisant de l'acétylcholine, du glutamate, du GABA, des neuropeptides aussi bien que ceux noradrénergiques ou sérotoninergiques sont altérés. Si on considère que le diagnostic de l'AD ne peut actuellement être confirmé qu'après la mort du patient (par autopsie) on peut dire que la recherche des marqueurs de cette maladie reste tout à fait d'actualité.

III.2. La maladie de Parkinson

Dans les troubles d'origine parkinsonienne, les zones du cerveau atteintes sont les groupes de cellules situées au milieu ou sur la base du cerveau antérieur: les noyaux gris centraux. Les connexions de ces noyaux sont étendues et complexes et font partie de nombreux circuits mettant en jeu différents niveaux du cerveau. L'activité neuronale à l'intérieur de ces circuits fait intervenir la dopamine, un neurotransmetteur dont l'épuisement progressif est à l'origine de la maladie, désorganisant d'abord et finissant par bloquer les transmissions au sein de leurs voies. Les déficits en neurotransmetteurs ne sont pas limités à celui de la dopamine. De nombreux neurones à noradrénaline sont altérés, ainsi que certains systèmes sérotoninergiques. Il existe actuellement un certain nombre de traitements médicaux qui peuvent aider les patients à retrouver l'équilibre biochimique du système et restaurent une fonction motrice normale [38]. Les médicaments administrés sont à base de L-DOPA, qui est convertie en dopamine dans le cerveau. De nos jours, d'autres substances ont été associées à la L-DOPA, par exemple la carbidopa qui réduit le métabolisme de DOPA avant son arrivée dans le cerveau et ainsi permet à des teneurs plus importantes de DOPA d'atteindre le cerveau tout en réduisant les effets secondaires [2].

III.3. La schizophrénie

Des autopsies ont permis de montrer que dans la schizophrénie chronique, de nombreux récepteurs de la dopamine étaient augmentés dans certains noyaux gris centraux. Donc on peut dire qu'une hyperactivité du système dopaminergique entraîne des effets comportementaux proches de ceux de la schizophrénie. Bien que l'hypothèse dopamine demande encore à être étayée, ce neurotransmetteur est le candidat le plus logique pour jouer un rôle majeur dans cette maladie. Deux molécules augmentent la libération de dopamine dans le cerveau, l'amphétamine et le lévodopa (L-DOPA) [38-40].

III.4. La dépression

Les premiers traitements médicamenteux de la dépression sont apparus à la fin des années 50. La plupart des antidépresseurs affectent la noradrénaline ou la sérotonine dans le cerveau et corrigent les signaux anormaux qui contrôlent l'humeur, les pensées et autres sensations.

III.5. Le syndrome carcinoïde

Dans le cas du syndrome carcinoïde, l'organisme transforme 50% du tryptophane alimentaire en sérotonine, au lieu de seulement 1% dans les organismes sains [41].

III.6. Les phéochromocytomes

Les phéochromocytomes sont des tumeurs des cellules chromaffines de la médullo-surrénale, qui produisent, stockent et métabolisent des catécholamines. Parmi les symptômes de cette maladie, on note des maux de tête, des palpitations, de la fatigue, de la fièvre, de l'hypertension et de l'hyperglycémie, mais le symptôme principal reste l'excès de catécholamines [42]. Les tests biochimiques pour les phéochromocytomes incluent les mesures des catécholamines et métanéphrines (produits de dégradation méthoxylées des catécholamines) urinaires [43].

IV. Etat de l'art sur l'analyse des catécholamines et indolamines

Nous avons montré dans les paragraphes précédents le rôle important que les catécholamines et indolamines jouent dans l'organisme. Dans ce contexte, on peut comprendre l'intérêt majeur des analystes envers ces molécules. Le besoin de méthodes sensibles et précises en vue de leur application dans le domaine des analyses biomédicales représente toujours un challenge d'actualité.

De nos jours, le perfectionnement continu des modes de détection, et en particulier le développement de la spectrométrie de masse ont fait beaucoup avancer la recherche au niveau de la bioanalyse.

Dans les paragraphes suivants nous allons faire un bref résumé des méthodes d'analyse présentes dans la littérature. Nous allons nous intéresser particulièrement aux méthodes d'analyse qui n'impliquent pas une dérivation. En effet la dérivation d'une molécule en vue de son analyse présente de nombreux désavantages, parmi lesquels :

- l'augmentation du temps d'analyse (par ajout d'étapes supplémentaires) ;
- l'augmentation de la complexité du milieu car les rendements des réactions ne sont pas toujours de 100% et l'agent de dérivation est souvent introduit en excès.

IV.1. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La CPG, chromatographie en phase gazeuse, est un mode d'analyse adapté pour les composés volatils. Les catécholamines n'étant pas des substances volatiles (leurs points de fusion varient entre 130°C pour le DOPAC et plus de 300°C pour la Tyr), une dérivation sera donc nécessaire pour rendre ces molécules volatiles avant leur analyse en CPG.

Pour l'analyse des catécholamines dérivées en CPG, le détecteur le plus couramment utilisé est la spectrométrie de masse. L'impact électronique [44] et l'ionisation chimique [45] sont couramment utilisés comme modes d'ionisation. Le mode d'acquisition des signaux détectés le plus utilisé est le mode SIM (Selected Ion Monitoring) [44,46], les limites de détection dans ces conditions sont de l'ordre du pg.mL^{-1} [47].

Les composés les plus utilisés pour la dérivation des catécholamines, en vue de leur analyse par CPG sont: l'anhydride heptafluorobutyrique [48], l'aldéhyde pentafluoropropionique [49], le chlorure de pentafluorobenzoyl [44], le trifluoroacétyl [50], le chloroformate de méthyle ou d'éthyle [51], le *tert*-butyldiméthylechlorosilane (TBDMS) [52], l'*O-tert*-butyldiméthylsilyl-*N*-formate [53], le *N*-méthyle-*N*-triméthylsilyl trifluoroacetamide [44,54-58], le *N*-trifluoroacetyl-*N*-triméthylsilyl [59] ou le *N,O*-dipentafluoropropionyl [60].

Les réactions de dérivation sont la plupart du temps réalisées en milieu anhydre, dans des solvants organiques tels que l'acétonitrile ou le trifluoroéthanol [47] avec la pyridine comme catalyseur pour certaines réactions [44]. Elles peuvent être lentes et durer plusieurs heures. Par exemple la conversion en dérivés triméthylsilylés prend 3 heures à 60°C [47].

La CPG-MS est encore utilisée dans les analyses des catécholamines en routine, pour le diagnostic de la pheochromocytoma [61], grâce au coût relativement réduit du matériel et à la simplicité de la technique, mais le besoin de dérivation pour cette technique reste un désavantage majeur [47].

IV.2. Analyse par Chromatographie en Phase Liquide (CPL)

A la fin des années 80, la chromatographie liquide (CPL) est devenue un outil puissant et indispensable en biochimie. Les méthodes chromatographiques sont utilisées pour la purification, la séparation et l'analyse quantitative des composés chimiques.

Le besoin en analyse rapide a conduit à l'apparition de nouveaux supports de type monolithe, qui grâce à leur structure macroporeuse permettent de travailler à de hauts débits tout en gardant des pressions dans des limites acceptables pour les systèmes classiques de CPL. En parallèle des travaux ont été menés sur la fabrication de supports de silice de très faible granulométrie (diamètre de particules, 1,7 μm) et des pompes capables de travailler à de très hautes pressions (UPLC – Ultra High Pressure Liquid Chromatography).

Dans l'optique de l'analyse de petits volumes d'échantillon et d'une consommation minimale de solvant (miniaturisation des systèmes), des pompes capables de délivrer des volumes de solvants de l'ordre du μL ou nL par minute et des colonnes de très faibles diamètres internes (inférieurs à 1 mm) ont été également mises au point cette dernière décennie. On parle dans ces conditions de la micro ou nanoLC.

Pour couvrir un nombre important d'applications, plusieurs modes d'interactions HPLC ont été développés en fonction des caractéristiques des molécules à analyser. Par exemple: la chromatographie à polarité de phases inversée (RPLC) est destinée à la séparation des molécules apolaires, tandis que les ions et les molécules ionisables sont séparés par chromatographie d'échange d'ions (IC) ou d'appariement d'ions. La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) est plus adaptée aux molécules hautement polaires et solubles dans l'eau.

Pour choisir le mode chromatographique le mieux adapté à une séparation donnée on se base en premier lieu sur les caractéristiques des analytes : la masse molaire, la polarité et le caractère ionique [62]. Pour l'analyse des catécholamines, molécules de faible masse molaire, très polaires et très solubles dans l'eau, principalement trois approches chromatographiques sont été envisagées jusqu'à présent: la chromatographie à polarité de phases inversée, la chromatographie d'appariement d'ions et la chromatographie d'échange d'ions. Ces trois types de chromatographie seront développés plus loin en s'appuyant sur des exemples pris dans la littérature.

IV.2.1. Modes de détection utilisés pour les catécholamines en CPL

Pour pouvoir analyser les solutés avant tout il faut pouvoir les détecter en sortie de colonne chromatographique. Par rapport à la CPG, la CPL offre l'avantage d'un plus grand choix possible de modes de détection. Le choix du mode de détection est basé principalement sur les propriétés caractéristiques des catécholamines. Par exemple, la présence d'un noyau aromatique (groupement chromophore) justifie l'utilisation d'une détection par UV.

Les techniques les plus utilisées en matière de détection des catécholamines sont la détection UV, la détection par fluorescence, la détection électrochimique et la spectrométrie de masse. Parmi ces détecteurs, deux semblent mieux adaptés grâce à leurs sensibilité et spécificité, à l'analyse de traces: le détecteur électrochimique et la spectrométrie de masse.

IV.2.1.1. La détection spectrophotométrique

La spectrophotométrie UV-Visible (UV-Vis) permet la détection des molécules qui absorbent dans le domaine de l'UV ou du visible. L'absorbance (A) d'une solution est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log \left[\frac{I_0}{I} \right] = \epsilon l C \quad (\text{I.1})$$

Avec: I_0 = intensité de la lumière monochromatique incidente envoyée sur l'échantillon

I = intensité de la lumière transmise

ϵ = coefficient d'absorptivité molaire du soluté (dépend de la longueur d'onde)

l = longueur du trajet optique

C = concentration de l'espèce détectée

La longueur d'onde du détecteur doit être sélectionnée en fonction du chromophore de la molécule à détecter. La plupart des solvants utilisés en CPL absorbent eux aussi aux faibles longueurs d'onde, entre 170 et 230 nm (voir Annexe 2). Afin de limiter les interférences et la faible sensibilité liée à l'absorbance de la phase mobile, il est préférable de choisir pour détecter les solutés, une longueur d'onde supérieure à 230 nm. Comme on peut le voir sur le spectre d'absorption de la dopamine présenté dans la figure I.13, les catécholamines ont un maximum d'absorption inférieur à 220 nm et un maximum spécifique autour de 280 nm.

C'est cette dernière longueur d'onde (λ) qui sera utilisée pour leur détection en UV, même si la valeur du coefficient d'absorbance est nettement inférieure à 280 nm qu'à 220 nm.

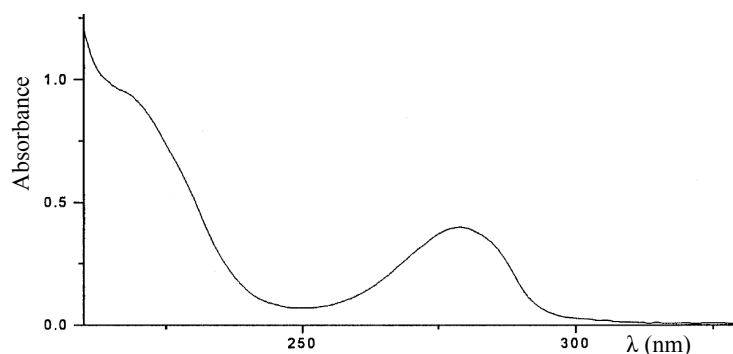


Figure I.13. Spectre d'absorption UV de la dopamine [63]

Même si la détection UV des catécholamines n'est pas très sensible (LOD de l'ordre du $\mu\text{g.mL}^{-1}$), c'est le mode de détection le plus répandu en routine car l'appareillage est simple et peu coûteux [64-66].

IV.2.1.2. La détection spectrofluorimétrique

La fluorescence est la propriété d'une molécule, d'un atome, ou d'un ensemble d'atomes d'émettre un photon suite à l'absorption d'un autre photon. Le principe de la fluorescence est décrit par le diagramme de Jablonski (figure IV.14):

- La molécule fluorescente (ou fluorochrome) absorbe des photons dans l'UV et passe de l'état fondamental (S_0) à l'état singulet excité (S_n).
- L'énergie absorbée (S_n) peut être dissipée sous forme de chaleur ou par des conversions internes. Le fluorochrome perd en énergie interne et passe du niveau S_n à un état singulet excité de niveau plus faible (S_1).
- La fluorescence est le retour de la molécule de l'état excité à son état fondamental (S_0), phénomène qui a lieu avec la réémission d'un photon de plus faible énergie [67].

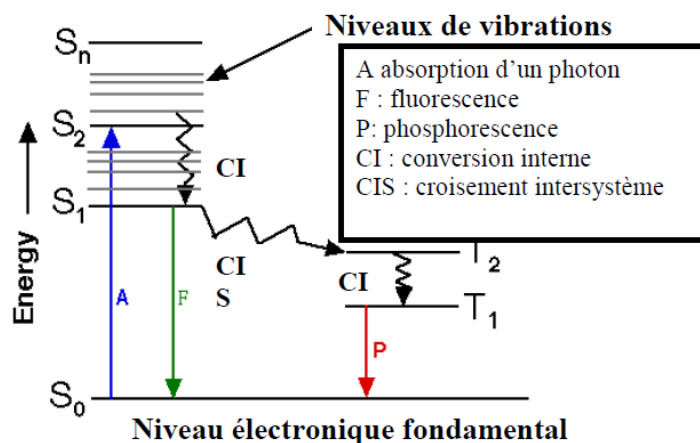
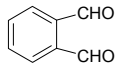
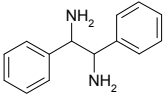


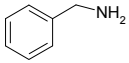
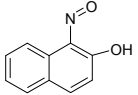
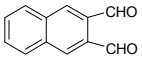
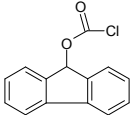
Figure I.14. Diagramme de Jablonski [67]

Toutes les molécules ne fluorescent pas naturellement, c'est le cas des catécholamines. Pour ces molécules une étape de dérivation est nécessaire pour les transformer en des composés fluorescents et donc «visibles» pour le détecteur. La réaction de dérivation peut être réalisée avant ou après la séparation chromatographique des catécholamines, on parle respectivement de dérivation pré-colonne [22] ou post-colonne [19]. La dérivation pré-colonne implique la modification définitive de la structure de la molécule avant son analyse, elle peut donc diminuer la polarité des molécules et faciliter leur séparation dans un système chromatographique de type phase inverse.

Les principaux agents de dérivation utilisés sont présentés dans le tableau I.2. Les longueurs d'ondes pour l'excitation et l'émission dépendent de l'agent de dérivation utilisé.

Tableau I.2. Agents de dérivation utilisés en HPLC-fluorimétrie

Composés analysés	Echantillon	Agent de dérivation	Type de dérivation	$\lambda_{\text{excitation}}$ $\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	Réf biblio
Trp, DOPA, DA, NA, NMN, Tyr, S	Urine	 <i>o</i> -Phtalaldehyde (OPA)	Post colonne	280 445	[19]
NA, A, NMN, DA, S, HVA, DOPAC, MN, 5HIAA	Urine	 meso-1,2-diphényléthylenediamine (DPE)	Post colonne	350 480	[26]

Composés analysés	Echantillon	Agent de dérivation	Type de dérivation	$\lambda_{\text{excitation}}$ $\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	Réf biblio
NA	Cerveau	 benzylamine	Pré-colonne	345 480	[68]
NA, DA, S, DOPAC, DOPA, 5HIAA	Cerveau	benzylamine et DPE	Pré-colonne	345 480	[22]
NA, A, DA, DOPA, DOPAC	Urine	Terbium-EDTA	Post colonne	300 545	[69]
5HIAA	Urine	 1 nitroso-2 naphthol	Post colonne	285 320	[70,71]
NA, DA	Cerveau	 naphthalène- 2,3- dicarboxaldehyde (NDA)	Pré- colonne	442 480	[72]
NA, DA, A, MN, NMN, DHBA	Urine	 Chlorure de fluorényl 9- methylchloroformiate (FMOC-Cl)	Pré- colonne	263 313	[73]

Ce mode de détection est nettement plus sensible que l'UV mais son principal désavantage pour l'analyse des catécholamines provient de la nécessité d'une dérivation.

IV.2.1.3. La détection électrochimique

La détection électrochimique met à profit les propriétés oxydoréductrices des analytes. Les catéchols, les phénols et les amines aromatiques sont des composés qui s'oxydent facilement [62]. La réaction d'oxydation possible pour les catécholamines est la suivante:

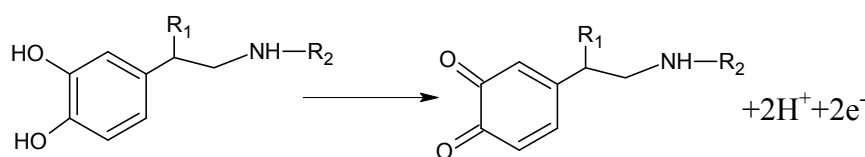


Figure I.15. Réaction d'oxydation des catécholamines

Le détecteur électrochimique est constitué d'une cellule de détection où ont lieu les réactions électrochimiques et comporte 3 électrodes: une électrode de travail, une électrode de référence et une contre électrode (ou électrode auxiliaire). La réaction d'oxydation ou de réduction a lieu à l'électrode de travail. L'électrode de référence est une électrode argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) avec un potentiel fixe. L'électrode auxiliaire est constituée d'une plaque de platine incorporée dans le corps de la cellule, elle assure le retour du courant généré par la réaction électrochimique [74,75]. Pour l'analyse des catécholamines l'électrode de travail est en carbone vitreux et le potentiel appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est compris entre 550 et 800 mV [35,76].

Pour être compatibles avec le détecteur électrochimique, les phases mobiles de la chromatographie doivent être conductrices. Elles sont constituées en général, de tampons aqueux avec de fortes concentrations de sel de l'ordre de 0,01 à 0,1 mol.L⁻¹.

Par rapport aux deux modes de détection présentés précédemment, le détecteur électrochimique a l'avantage d'être spécifique (seules répondent les espèces oxydables au potentiel de travail choisi) et très sensible. Des LODs très faibles de l'ordre du µg.L⁻¹ [28,35,77,78], voire du ng.L⁻¹ [29,76] sont obtenues. La détection électrochimique représente le mode de détection de choix pour l'analyse de traces des catécholamines [28,77-79]

IV.2.1.4. La détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse spectrale capable de fournir la masse moléculaire et des renseignements structuraux sur les molécules. C'est un mode de détection spécifique et sensible, ce qui explique pourquoi c'est devenu un des modes de détection les plus populaires pour la chromatographie surtout dans le domaine des bioanalyses.

Le principe d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par SM nécessite la formation d'ions (à l'état gazeux) à partir de l'échantillon. Bien que les techniques mises en œuvre en

spectrométrie de masse soient nombreuses, le principe de l'appareillage reste globalement le même. Un spectromètre de masse est composé de trois parties principales:

- la source d'ions a le rôle de produire des ions à l'état gazeux, soit par l'ionisation directe de l'échantillon, soit par la nébulisation et la désolvatation des ions formés. Il existe plusieurs techniques d'ionisation : la thermo-ionisation (l'impact électronique et l'ionisation chimique), la désorption (ex : le MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, le FAB = Fast Atom Bombardement) et la nébulisation à pression atmosphérique (ESI = Electrospray Ionisation, APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APPI = Atmospheric Pressure Photo- Ionisation) ;
- l'analyseur réalise le tri des ions en fonction de leurs rapports masse/charge (m/z). Selon leur principe de fonctionnement, les analyseurs peuvent être divisés en plusieurs catégories: les analyseurs à déflexion magnétique, les analyseurs à résonance cyclotronique ionique, les filtres quadripolaires, les pièges à ions et les analyseurs à temps de vol.
- le détecteur recueille tous les ions séparés par l'analyseur et produit un courant électrique proportionnel au nombre d'ions. Il est constitué d'un collecteur et d'un ensemble électronique d'amplification et de mesure du signal [80].

L'analyse des catécholamines en couplage CPL-SM implique donc toujours la nécessité d'avoir des phases mobiles volatiles. Ce type de couplage ne sera donc pas compatible avec l'emploi d'agents d'appariement d'ions de type octylsulfonate et des sels non-volatils tels les tampons phosphates ou encore l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA).

Le couplage CPL-SM permet l'identification des composés grâce à deux types d'informations: le temps de rétention (t_R) offert par la chromatographie et les informations structurales offertes par la SM. La complémentarité de ces deux techniques rend possible l'analyse des catécholamines dans différentes matrices telles que les urines [81], le liquide céphalorachidien (CSF) et le liquide amniotique [82], le plasma [83], des cultures cellulaires [84] ou le cerveau [20].

Le développement de cette technique couplée (CPL-SM) a progressé rapidement ces dernières années grâce aux avancées techniques au niveau de la SM, ce qui permet maintenant d'atteindre des limites de détection comparables à celles offertes par la détection électrochimique. La SM offre en plus des informations structurales qui facilitent

l'identification précise des analytes. Des LOD de 0,5 à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sont maintenant obtenues couramment pour les différentes catécholamines en SM [24,32]. Des limites 100 fois plus faibles ont même été rapportées récemment par de Jong *et al* [34] (par ajout d'une étape de pré-concentration sur cartouche) et par Zhang *et al* [33] (par le passage à la nanoLC).

La source d'ionisation utilisée pour l'analyse des catécholamines en couplage CPL-SM, est la plupart du temps, l'électrospray (ESI) [85-87], mais l'utilisation de l'APCI [24,88] et de l'APPI [32,89] a aussi été rapportée, c'est pourquoi nous allons détailler par la suite leur principe de fonctionnement.

Source d'ionisation de type ESI

Le mode d'ionisation par électrospray (ESI) est devenu une des techniques d'ionisation les plus importantes pour le couplage des méthodes séparatives liquides avec la spectrométrie de masse. C'est un mode d'ionisation qui peut être utilisé pour des petites molécules polaires comme pour les plus grandes. On travaille à pression atmosphérique et à une température modérée, et c'est probablement la technique d'ionisation la plus douce [90].

L'ionisation par électrospray est produite par l'application d'un fort champ électrique, à pression atmosphérique, sur un liquide qui passe à travers un capillaire à faible débit (1-10 $\mu\text{L.min}^{-1}$). Le champ électrique est le résultat de l'application d'une différence de potentiel de 3-6 kV entre le capillaire et une contre-électrode située à une distance de 0,3 - 2 cm. Ce champ cause une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie de capillaire (le cône de Taylor) et induit la formation de petites gouttelettes chargées (figure I.16.). Les gouttelettes traversent ensuite un rideau de gaz chauffé ou un capillaire chauffé, dans le but d'éliminer les dernières traces de solvant [91].

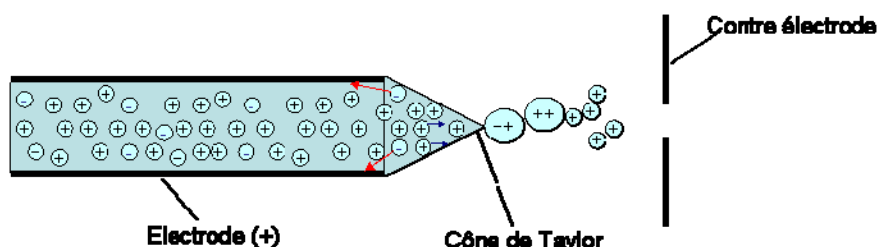


Figure I.16. Formation des gouttelettes chargées en electropray

L'évaporation du solvant des microgouttelettes a comme conséquence le rapprochement des charges de même signe. Pour minimiser les forces de répulsion de type électrostatique, les charges ont tendance à remonter à la surface des gouttelettes. Quand ces forces électrostatiques deviennent supérieures à la tension de surface de la gouttelette, celle-ci explose (explosion coulombienne) en gouttelettes plus petites. Ce processus se répète un grand nombre de fois jusqu'à la désolvatation complète des ions [91].

La production des gouttelettes et des ions en phase gazeuse ne pose pas de problèmes tant que le débit de liquide, la concentration en électrolyte et la tension de surface ne sont pas trop élevés. En revanche, une augmentation de la valeur d'un ou plusieurs de ces paramètres peut défavoriser la production de l'aérosol. En CPL, même en divisant le flux de la phase mobile, celui-ci reste parfois trop important pour une performance optimale de l'électrospray. Pour y remédier, une assistance pneumatique sous forme d'air comprimé a été ajoutée dans le cas de l'IonSpray. Pour exalter l'évaporation du liquide durant l'étape d'ionisation, certaines sources ESI sont également équipées d'un gaz auxiliaire chauffant, le gaz de désolvatation (figure I.17). C'est le cas de la source TurboIon Spray (PE-Sciex API 300) ou de la source Zspray (Micromass Quattro Ultima). Cela permet de travailler avec des solutions totalement aqueuses et avec des teneurs en sels plus importantes.

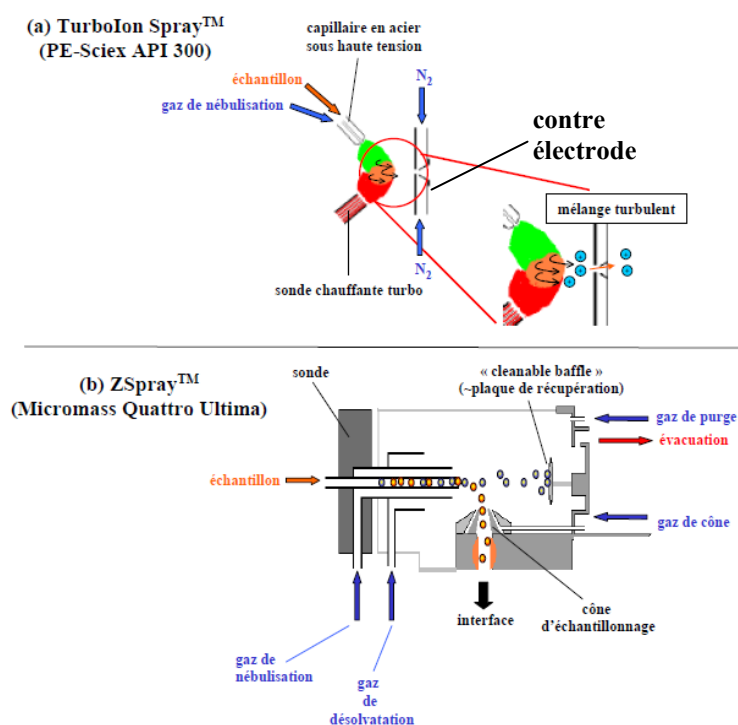


Figure I.17. Représentation schématique des sources de type ESI
(a) source TurboIon Spray™ (API 300 - Sciex)
(b) source Zspray™ (Quattro Ultima - Micromass)

Source d'ionisation de type APCI

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique d'ionisation analogue à l'ionisation chimique sous vide (utilisée principalement en CPG). Des ions du solvant sont formés par des décharges couronne sur le spray, l'ionisation des analytes est réalisée par le transfert d'un proton du solvant ionisé. Cette technique est adaptée pour l'ionisation des molécules polaires et peu polaires de masse moléculaire inférieure à 1500 Da et on obtient principalement des ions monochargés [91]. Les ions formés sont transférés dans l'analyseur à travers des interfaces sous vide identiques à celles utilisées en ESI, ce qui fait que ces types de source sont facilement interchangeables [92].

La source APCI, représentée sur la figure I.18, utilise un nébuleur pneumatique à azote pour former un aérosol à l'intérieur d'une chambre (le vaporisateur) chauffée à des températures élevées (entre 350 C et 500 C). Dans le vaporisateur, l'effluent de la colonne de chromatographie est évaporé et il est mélangé avec le gaz nébuleur pour amener les analytes vers l'électrode à décharge couronne constituée d'une aiguille et d'une chambre de nébulisation qui sert de contre-électrode. Une différence de potentiel élevée ($\pm 2 - 3$ kV) est appliquée sur cette électrode, provoquant une décharge couronne (décharge électrique lumineuse) de $\sim 2-3$ μ A. Cette décharge est une source constante d'électrons pour le processus d'ionisation en APCI : elle ionise l'air ambiant et crée un plasma, i.e. un gaz ionisé, autour de la pointe de l'aiguille. Les ions radicalaires du plasma participent ensuite à des réactions chimiques qui donnent lieu à l'ionisation des analytes [93].

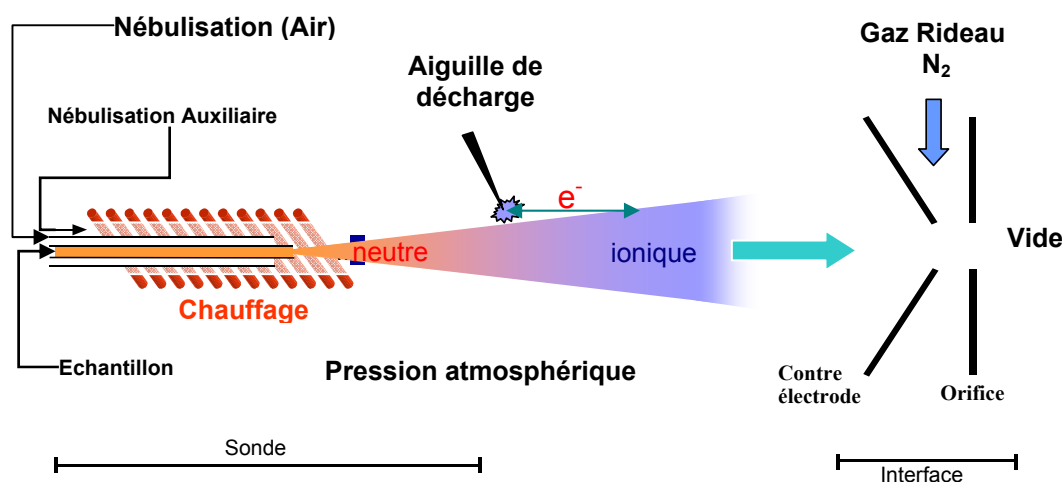


Figure I.18. Représentation schématique d'une source de type APCI

Source d'ionisation de type APPI

Introduite récemment la photo ionisation à pression atmosphérique (APPI) représente une alternative à l'APCI. La construction de la source est très semblable à celle de l'APCI (figure I.19), la différence vient du fait que l'aiguille de décharge couronne est remplacée par une lampe UV [92]. L'ionisation est initiée par un faisceau de photons émis par la lampe UV. L'ionisation en APPI peut être réalisée selon deux modes:

- l'APPI directe: l'analyte (M) absorbe directement un photon et éjecte un électron (e^-) pour former un radical cation (équation I.2). En présence de solvants protiques (eau ou méthanol), l'ion observé est MH^+ , il se forme par la soustraction d'un atome d'hydrogène au solvant (S) par $M^{+\bullet}$ (équation I.3)



- l'APPI à l'aide d'un dopant (Dopant assisted APPI – DA-APPI) : un volume important de dopant (D) (anisole, toluène, acétone, THF) est introduit dans la zone d'ionisation. On forme d'abord les radicaux cations du dopant par l'absorption des photons (équation I.4). Les analytes sont ensuite ionisés en une ou deux étapes. Pour les molécules apolaires l'ionisation est réalisée par l'échange de charge directe avec le dopant (équation I.5). Le deuxième mécanisme d'ionisation implique la participation du solvant, c'est ce dernier qui va être ionisé par le dopant par le transfert d'un proton (équation I.6) et ensuite il va céder ce proton en faveur des analytes (équation I.7). Ce mécanisme est possible seulement si l'affinité protonique du solvant est plus importante que celle du dopant, mais plus faible que celle de l'analyte [93].



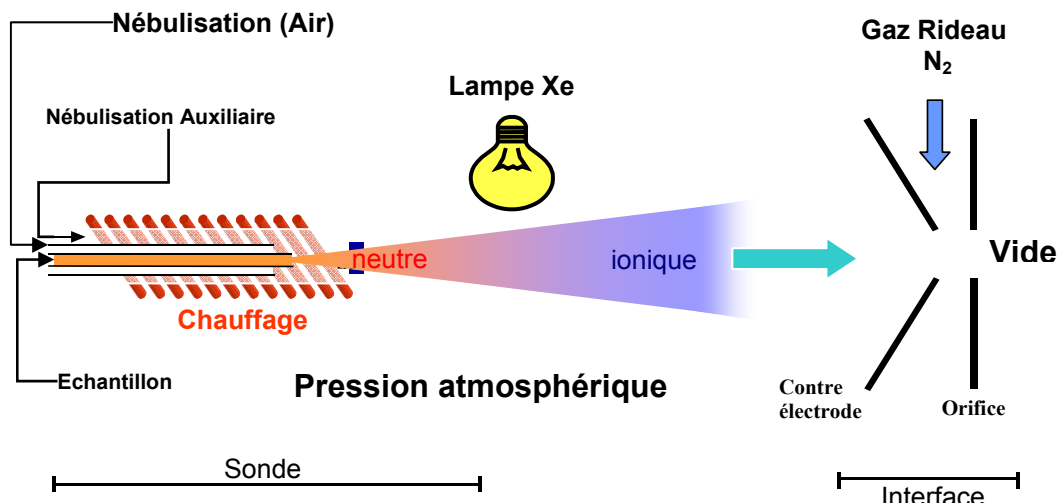


Figure I.19. Représentation schématique d'une source de type APPI

Les sources de type ESI (TurboIon Spray et ZSpray) peuvent être directement couplées avec des colonnes qui travaillent avec des débits inférieurs à $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, en revanche, les sources APCI et APPI sont plus adaptées au couplage avec des colonnes qui travaillent avec des débits de phase mobile plus importants ($0,8 - 2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) sans nécessiter de diviseur de flux.

L'analyseur quadripolaire

En ce qui concerne les analyseurs, pour les catécholamines, les plus couramment utilisés sont les analyseurs de type triple quadripôle [82,84,89,94]. Un quadripôle est constitué de quatre barres métalliques identiques et parallèles disposées sous forme de carré (figure I.20). Idéalement, ces barres sont hyperboliques, mais pour la commodité, des barres parfaitement rondes sont acceptables.

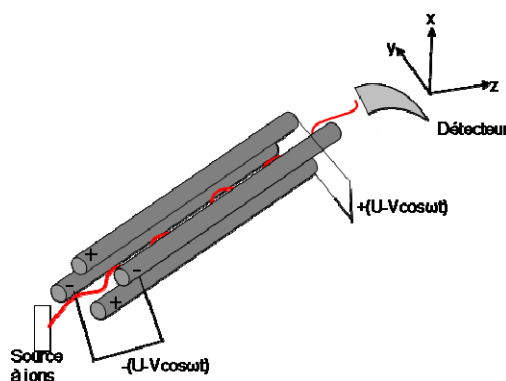


Figure I.20. Schéma d'un analyseur quadripolaire

Les deux groupes de barres ont des polarités opposées et sont soumis à une tension ayant une composante continue (U) et une composante alternative ($V\cos\omega t$). Quand le quadripôle ne fonctionne qu'en radiofréquence, c'est-à-dire que la composante continue est nulle ($U=0$), tous les ions sont transmis sans discrimination. Tout le long de leur parcours dans le quadripôle, les ions sont attirés par l'électrode de signe opposé mais sont repoussés avant qu'ils ne l'aient atteinte à cause de son changement de signe. Les ions rentrent en résonance avec la radiofréquence appliquée et sont transmis par le quadripôle. Quand on applique une composante continue (U) non nulle, les ions sont filtrés selon leur rapport m/z .

Parmi les avantages du quadripôle, on compte : une construction simple, pas trop onéreuse, une bonne transmission des ions (très important pour les analyses quantitatives), une grande vitesse de balayage (compatible avec la CPL) et la possibilité de travailler en mode masse tandem si trois quadripôles sont mis en série [93].

IV.2.1.5. Bilan des modes de détection des catécholamines en CPL

Facile à mettre en œuvre grâce à la présence des groupements chromophores dans la structure des catécholamines, la détection UV ne présente pas la sensibilité et la spécificité suffisantes pour être utilisée lors de l'analyse de traces. Nettement plus sensible que l'UV, la fluorimétrie présente cependant un désavantage majeur qui est la nécessité d'une étape de dérivation.

Parmi les modes de détection présentés, la détection électrochimique et la SM sont les plus intéressantes. Les meilleures LODs sont obtenues à l'heure actuelle avec l'électrochimie, c'est pourquoi c'est le mode de détection de choix pour l'analyse des catécholamines.

La spectrométrie de masse offre, en plus de LODs faibles (proches de celles obtenues par électrochimie), des informations structurales qui facilitent l'identification des composés et leur quantification. Ce mode de détection spécifique devient de plus en plus utilisé pour l'analyse des catécholamines. Ce sont ces 2 types de détecteurs que nous avons retenus pour la suite de notre étude.

Les exigences de l'analyse des catécholamines avec une double détection par spectrométrie de masse et par électrochimie sont celles d'une séparation totale de tous les composés pour le détecteur électrochimique et d'une phase mobile volatile pour la détection en SM. Dans la suite de ce chapitre nous avons cherché à répertorier les différentes méthodes

chromatographiques publiées jusqu'à présent dans la littérature et qui pourraient satisfaire ces exigences particulières.

La majorité des composés d'intérêt pharmaceutique, biochimique, biologique et biomédical sont ionisables. Il y a deux approches principales pour la séparation des ions sur support apolaire de type phase inverse :

- le recul d'ionisation qui implique l'ajustement du pH de la phase mobile de sorte à ce que les composés soient sous leur forme neutre,
- l'appariement d'ions [62].

IV.2.2. Analyse par chromatographie liquide à polarité de phases inversée

Pour la séparation des catécholamines non dérivées en phase inverse on peut observer deux grandes tendances dans la littérature. D'une part, les séparations sur colonne C18 avec des phases mobiles, pour la plupart, très riches en eau [95] et d'autre part, les séparations sur colonne carbone graphite poreux (PGC) avec des phases mobiles plus riches en modificateur organique [64].

a) L'approche C18

Les systèmes chromatographiques sur colonne C18 associés à la détection électrochimique utilisent des phases mobiles avec des quantités importantes de sels. Les phases mobiles sont composées la plupart du temps d'au moins 95% de solution aqueuse de citrate de sodium et/ou d'acide citrique, et au plus de 5% de MeOH ou ACN. Kumarathan et Vincent [95] ont utilisé un tel système pour la séparation de : NA, A, DA, DOPA et des isomères de la Tyr, mais la faible rétention de la NA rend quasiment impossible son identification dans un échantillon de plasma.

Des meilleurs résultats en terme de séparation sont obtenus par Machida *et al* [76] en utilisant une phase mobile semblable et une colonne C30 (plus apolaire que la C18) (**Figure I.21**). Dans ces conditions, une importante rétention est observée pour la NA, ce qui permet son dosage dans le plasma avec des courbes d'étalonnage dans des gammes de concentrations comprises entre 40 et 5000 pg.mL⁻¹ ($r^2 > 0,996$).

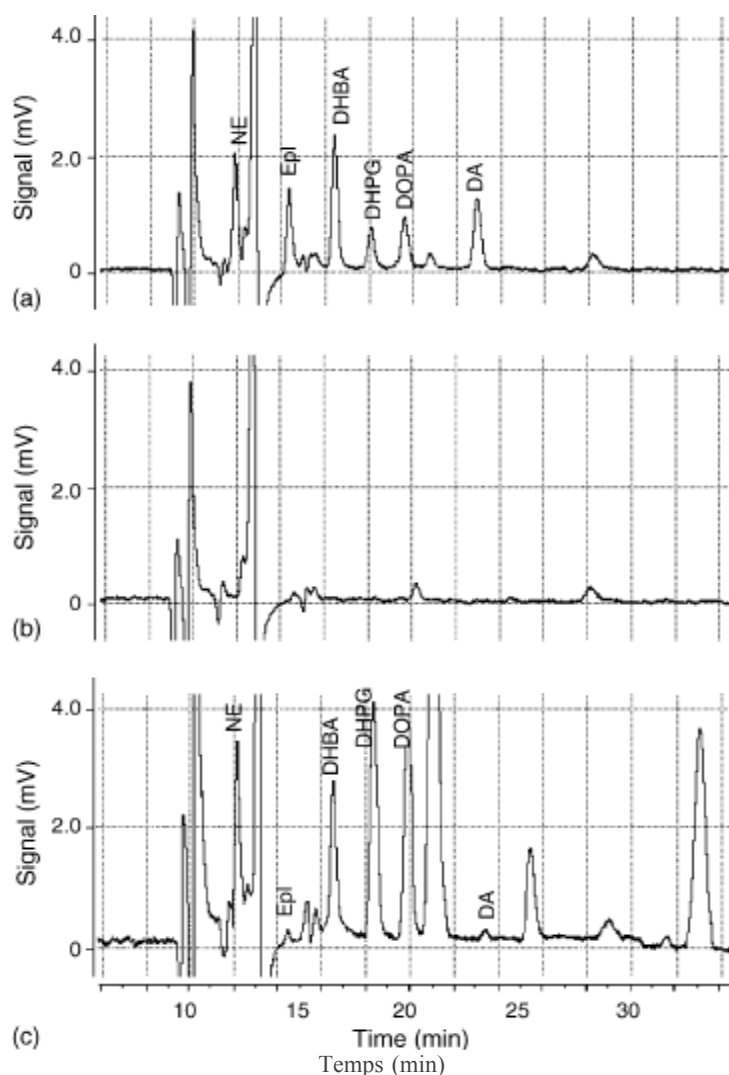


Figure I.21. Chromatogrammes: (a) plasma artificiel dopé avec $0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ de chaque analyte; (b) blanc de plasma artificiel (c) échantillon de plasma d'un patient
 Pour (a) et (c) DHBA (standard interne) ajouté en concentration de 1 ng.mL^{-1} [76]
 Colonne : Deverosil RP Aqueous-AR-5 (L x Ø 250 x 4,6 mm) Phase mobile : acide citrique 1,05% + EDTA 2Na 0,02% ajusté à pH 2,8 avec NaOH/ ACN (98/2 v/v). Détection électrochimique.

Ce système présenté par Machida *et al* impliquant l'utilisation de composés non volatils dans les phases mobiles n'est pas compatible avec un couplage LC – SM. D'autres séparations ont été réalisées à l'aide de phases mobiles composées de MeOH ou ACN et de différents acides volatils: acide acétique [84], acide formique [97] ou acide trifluoroacétique TFA [96] compatibles avec la SM.

Li *et al.* [83] ont présenté une étude de l'influence de la nature de l'acide dans la phase mobile sur l'intensité du signal en SM pour DOPA et DA. Les meilleurs résultats sont obtenus en présence d'acide formique et d'acide acétique, tandis que la présence de TFA diminue la réponse (figure I.22). La suppression du signal en présence de TFA peut être causée par la

formation d'une paire d'ions entre les analytes protonés et l'anion carboxylé, mais aussi par la volatilité plus faible et la conductivité plus importante de la phase mobile.

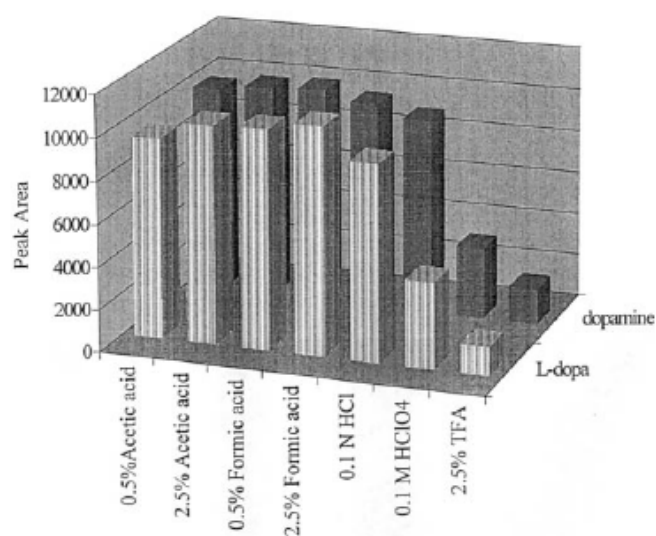


Figure I.22. Influence de la nature de l'acide dans la phase mobile sur le signal en SM [83]

T. Hasegawa *et al.* [98] proposent pour la séparation d'un mélange de 6 catécholamines et métabolites (NA, A, MN, NMN, DA et DOPA) dans le plasma, un système composé d'une colonne C18 et d'une phase mobile constituée d'une solution aqueuse à 1% d'acide formique et de MeOH contenant aussi 1% d'acide formique en mode gradient d'éluion. Même si la présence de l'acide dans la phase mobile est favorable à l'ionisation des composés lors de leur analyse en SM comme l'ont constatés Li *et al.* [83], les LODs rapportées par T. Hasegawa sont plutôt élevées, de l'ordre de 1 mg.L^{-1} , donc inacceptables dans le cas d'analyse de traces (les concentrations dans le cerveau, d'après la littérature, sont 1000 fois plus faibles [22,32]).

G. B. Martin *et al* ont publié en 2007 [99] une méthode pour la séparation en 8 minutes de la NA, l'A, la DA, la DOPA, la 5-S-cysteinyl-dopa et la α -methyldopa sur une colonne C18 avec une phase mobile similaire à celle de Hasegawa, composée de MeOH/H₂O et 0,1% d'acide formique en gradient. Grâce à la pré-concentration de l'échantillon sur des cartouches d'extraction sur phase solide (SPE) ils arrivent à obtenir des LODs plus faibles de l'ordre de 0,2 à $1,5 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Un des avantages de la SM est lié au fait qu'il n'y a plus d'exigence de séparation totale de tous les composés. Seuls les composés ayant la même masse molaire doivent être séparés. Pour les composés de masse molaire différente, une quantification reste possible

même s'ils sont coélus, cela permet de réduire les temps d'analyse. Bourcier *et al.* [82] ont ainsi réalisé la détection de 23 neurotransmetteurs et métabolites en moins de 15 minutes, sur une colonne C18 avec une phase mobile ACN/acide formique 0,1% en gradient d'élution.

En ce qui concerne notre problématique, ces conditions ne sont pas suffisantes car le manque de sélectivité du détecteur électrochimique impose le besoin d'une séparation de tous les composés.

b) L'approche PGC

Le PGC est un des supports les plus hydrophobes disponibles en chromatographie, il est exclusivement composé de feuillets plans d'atomes de carbone hybridés sp^2 disposés selon un motif hexagonal. La valence de ces atomes étant complètement satisfaite, la surface du PGC ne dispose pas de groupements fonctionnels et est comparable à une grande molécule polycyclique aromatique.

La rétention sur PGC est la combinaison de plusieurs mécanismes et ferait intervenir différents types d'interaction:

- Des interactions dispersives (forces de London) entre le PGC et l'analyte d'une part et la phase mobile d'autre part ;
- Des interactions hydrophobes (entre la surface du PGC et les noyaux aromatiques des catécholamines);
- Des interactions de charge induite entre un analyte polaire et la surface polarisable du graphite [100].

Pour la rétention des anions, le PGC fait intervenir en plus des interactions électroniques (transfert de charge donneur-accepteur) entre les doublets d'électrons non liants des anions et les zones appauvries en électrons π du PGC.

La rétention est aussi déterminée par la surface de contact entre l'analyte et le graphite ainsi que par la nature et l'orientation des groupements fonctionnels du soluté par rapport à la surface du PGC. La rétention est donc augmentée pour les molécules planes et diminuée pour les molécules très structurées et rigides qui ne peuvent entrer en contact avec le graphite qu'avec une petite partie de leur surface moléculaire.

Grâce à ses propriétés rétentives, le PGC facilite le couplage LC-SM car il permet d'utiliser des phases mobiles avec une plus forte teneur en modificateur organique qu'avec un support de type C18.

Tornkvist *et al.* [20] ont mis au point une méthode CPL-SM/SM avec ionisation positive et négative dans une seule analyse. La séparation du mélange standard de 9 catécholamines (DA, NA, A, Tyr, VMA, HVA, DOPA, DOPAC et ortho methyl DOPA) est obtenue sur une colonne capillaire de PGC (LxØ= 15cm x 200 µm). L'élution est réalisée à l'aide d'une phase mobile composée de 60% de MeOH et 40% de tampon formiate d'ammonium 50 mM, à pH 2,9.. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la présence de NA, DA et Tyr dans un extrait de substantia nigra (figure I.23). On remarque cependant une importante dérive de la ligne de base entre 10 et 15 minutes (figure I.23), qui pourrait masquer des composés tels que VMA, DOPAC et DOPA ayant des rétentions dans cet intervalle de temps.

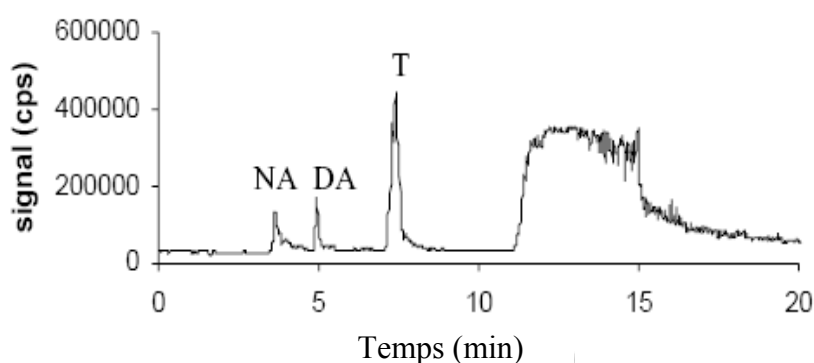


Figure I.23. Analyse d'un échantillon de substantia nigra sur une colonne capillaire en PGC en couplage avec la SM [20]

Colonne capillaire PGC (L x Ø= 15cm x 200 µm). Phase mobile : MeOH / tampon formiate d'ammonium pH 2.9, 0,05 M, (60/40 v/v). Débit : 3 µl/min. Détection : SM/SM (ESI positive)

En plus du fait que A et NA ne peuvent pas être séparés dans ces conditions, un autre point faible de la méthode a été mis en évidence par Rinne *et al.* [101] qui ont observé la dégradation par oxydation des catécholamines sur le support PGC.

IV.2.3. Analyse par chromatographie liquide d'appariement d'ions

Une alternative pour la séparation des ions peu retenus en chromatographie de phases inversée est la chromatographie d'appariement d'ions (IP-RPLC). Les phases stationnaires utilisées pour ce type de chromatographie sont les mêmes que celles utilisées en phase inverse et sont principalement représentées par les silices greffées C18. En général, les phases mobiles sont constituées d'un mélange de modificateur organique et d'une solution aqueuse

contenant un agent d'appariement d'ions [74]. Les agents d'appariement d'ions sont des composés qui ont un groupement ionique (une tête polaire), de charge opposée à celle des composés à séparer, attaché à une chaîne carbonée hydrophobe grâce à laquelle ils interagissent avec les colonnes apolaires.

Il existe plusieurs théories pour expliquer le mécanisme de rétention en chromatographie de paire d'ions, dont les principales sont les suivantes:

- 1^{er} modèle: le partage: la paire d'ions entre l'analyte chargé et l'agent d'appariement d'ions de charge opposée se forme d'abord dans la phase mobile puis est adsorbée sur la phase stationnaire;
- 2^{ème} modèle: l'échange d'ions: dans un premiers temps il y a adsorption de l'agent d'appariement d'ions sur la phase stationnaire, qui se comporte par la suite comme un échangeur d'ions;
- 3^{ème} modèle: l'interaction d'ions avec formation d'une double couche électrique à l'interface solide/liquide: l'agent d'appariement d'ions s'adsorbe sur la phase stationnaire et entraîne l'apparition d'une différence de potentiel entre la surface du solide et la solution. Les solutés ionisés se concentrent dans la couche liquide au voisinage de la surface et forme la «couche diffuse», les ions de même signe que l'agent d'appariement d'ions sont repoussés de la couche diffuse, alors que les ions de signe contraire y sont attirés [102].

Pour l'analyse des catécholamines, la chromatographie d'appariement d'ions représente le mode le plus utilisé [26,35,65,86,103]. Dans les conditions de pH acide correspondant à leur domaine de stabilité, les catécholamines sont sous forme chargée positivement (voir les pka des composés dans l'Annexe 1). Les agents de paire d'ions utilisés sont alors des acides forts qui forment la paire d'ions avec le groupement amine positivement chargé au pH de la phase mobile (généralement pH inférieur à 3).

Les anions de type alkylsulfate et alkylsulfonate sont les plus utilisés pour l'analyse des catécholamines. Avec une longueur de chaîne alkyle qui varie entre 6 et 12 atomes de carbone, ils sont rajoutés dans la phase mobile sous forme d'acide [103] ou de sel de sodium [104]. Les agents de paire d'ions les plus utilisés dans cette famille sont les composés avec 8 carbones: l'acide octylsulfonique (OSA) [79,103,105,106], l'octylsulfonate de sodium (OSS) [97,107] et l'octylsulfate de sodium (SOS) [108]. L'utilisation d'agents de paire d'ions à

chaîne plus courte (6 [65] ou 7 [109] atomes de carbone), et plus longues (10 [110] ou 12 [111] atomes de carbone), a aussi été rapportée. Les phases mobiles typiques sont composées de tampons phosphates, avec des pH voisins de 3, en présence d'EDTA et d'un faible pourcentage de modificateur organique (inférieur à 10%). Les séparations sont réalisées sur des colonnes de type C18 associées principalement à une détection électrochimique. Le rôle de l'EDTA est de complexer les impuretés afin d'obtenir une meilleure ligne de base avec la détection électrochimique.

Sur ce principe, Qu *et al.* [106] ont réalisé dans un extrait de cerveau de poulet, le dosage de : NA, A, DA, DOPA, S, 5HIAA, HVA, DOPAC, DOE (deoxyépinephrine) en présence d'isoprenaline comme standard interne. Le système chromatographique est constitué d'une colonne BAS Phase II ODS (LxØ 100x3,2 mm) et d'une phase mobile composée d'un mélange d'ACN et d'une solution aqueuse d'acide monochloracétique 0,1 mol.L⁻¹, de SOS 0,65 mmol.L⁻¹ et d'EDTA 0,5 mmol.L⁻¹ (pH ajusté à 3,05 avec NaOH) (2,9/97,1 v/v). Dans ces conditions une séparation des 10 analytes est réalisée en moins de 25 minutes (Figure I.24). Pour cette séparation, deux types de mécanisme sont mis en jeu pour la rétention des analytes. D'une part, un mécanisme de type appariement d'ions pour les composés aminés protonés et d'autre part, un mécanisme classique de type phase inverse pour les composés qui n'ont pas de fonction amine (HVA, DOPAC) et ne sont pas chargés positivement.

Une faible rétention de DOPA, NA et DOPAC est observée, avec coélution en début de chromatogramme avec des composés endogènes provenant de la matrice (pics signalés par les flèches rouges), ce qui rend impossible la quantification précise de ces trois composés.

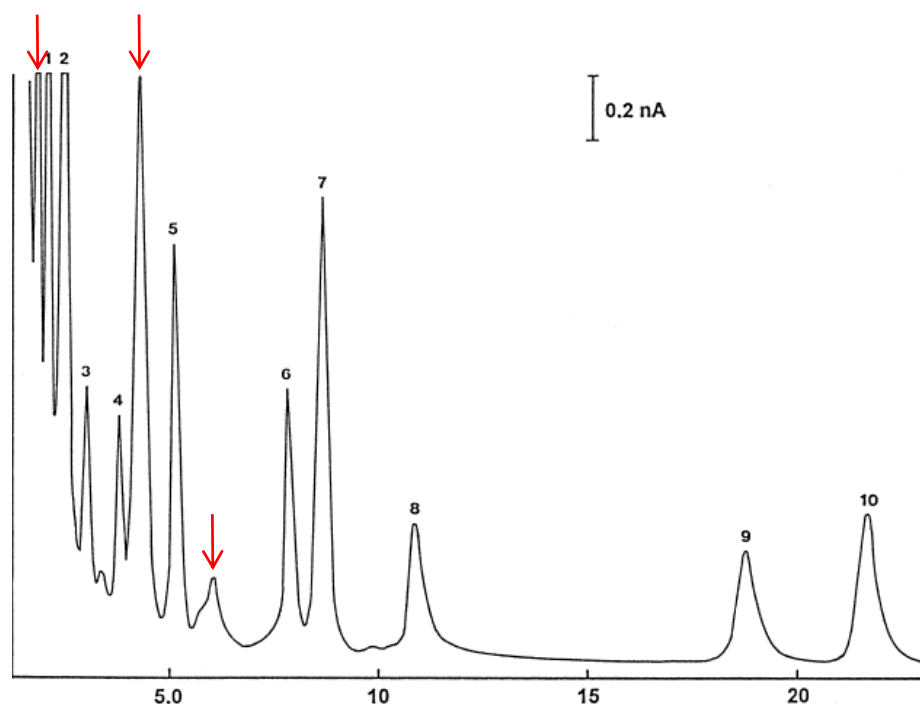


Figure I. 24. Chromatogramme d'un homogénat de cerveau (*area ventralis*)

Colonne et precolonne: Bas Phase II ODS L x Ø 100 x 3,2 mm et respectivement L x Ø 15 x 3,2 mm. Phase mobile: 0,1 mol.L⁻¹ d'acide monochloroacétique, 0,65 mmol.L⁻¹ SOS et 0,5 mmol.L⁻¹ EDTA, (pH ajusté à 3,05 avec NaOH 6 mol.L⁻¹) 97,1% et 2,9% ACN. Détection électrochimique.

(1) L-DOPA; (2) NA; (3) DOPAC;(4) A; (5) HVA; (6) DA; (7) 5-HIAA; (8) DOE; (9) IS; (10) 5-HT [106]

L'utilisation d'un agent de paire d'ions de chaîne carbonée plus longue peut augmenter la rétention pour ces trois composés et les dégager du volume mort, comme le montre Talwar *et al* [111] qui ont utilisé le dodecylsulphate de sodium (DSS) (figure I.25):

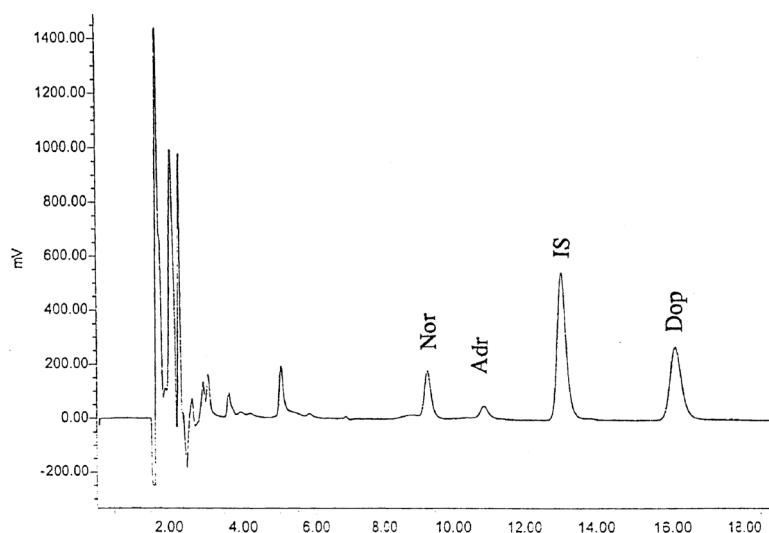


Figure I. 25. Profil chromatographique d'un extrait d'urine

Colonne : Luna C18 (L x Ø = 250 x 4,6 mm); Phase mobile : tampon dihydrogenophosphate de sodium 50 mmol.L⁻¹, 250 mg.L⁻¹ EDTA, 500 mg.L⁻¹ DSS, 200 ml.L⁻¹ ACN et 100 ml.L⁻¹ MeOH. pH ajusté à 2,9 avec H₃PO₄ 6 mol.L⁻¹ ; Détection électrochimique [111]

La séparation proposée peut être satisfaisante mais l'utilisation des alkylsulfonates non volatils rend incompatible la transposition directe au couplage avec la SM. Pour contourner cet inconvénient, Neubecker *et al* [31] ont utilisé avec succès l'acide heptafluorobutyrique (HFBA), acide perfluoré volatil, comme agent d'appariement d'ions pour l'analyse de la NA dans les urines du rat avec une détection par SM.

De leur côté, A. T. Wood *et al.* [96] ont réussi à séparer en moins de 20 minutes un mélange de 11 composés (NA, A, DA, DOPA, Tyr, Trp, 5 OH Trp, S, octopamine, tyramine, N-acétylsérotinine) sur une colonne C18 (Altech) avec une phase mobile composée d'eau et de méthanol contenant 0,05% de TFA, en mode gradient d'élution (**Figure I.26**).

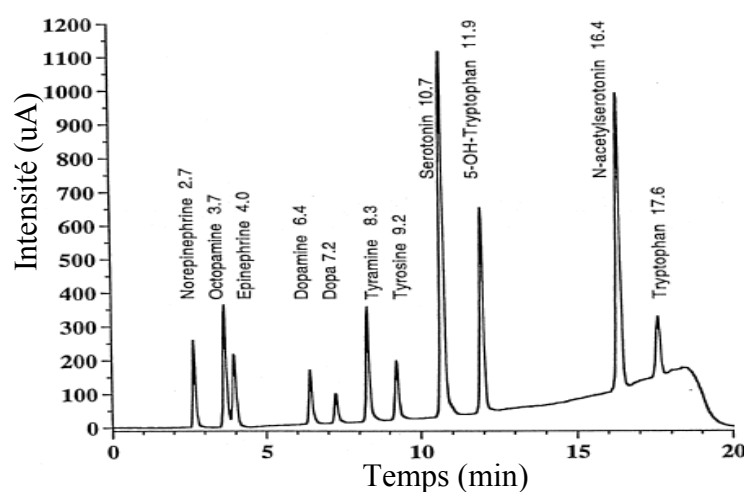


Figure I.26. Profil de la séparation d'un mélange standard des 11 composés. Colonne: Alltima C18 (L x Ø =150 x 4,6 mm.). de 2,5% à 60% MeOH en 15 minutes. Détection : fluorimétrique.

D. Thiebaut *et al* [86] ont présenté une étude comparative sur les capacités rétentes de différentes colonnes C18 et la colonne PGC vis-à-vis d'un mélange de neurotransmetteurs (parmi lesquels: NA, DA, A, DOPA, Tyr et S) en appariement d'ions avec détection par SM. Ils ont mis en évidence le fait qu'à concentration égale de TFA dans la phase mobile (26,5 mol.L⁻¹), si pour les colonnes C18, le pourcentage de modificateur organique ne doit pas dépasser 5% pour éviter d'éluer la NA dans le volume mort, sur le support PGC un minimum de 10% de solvant organique dans la phase mobile est nécessaire pour l'élution des composés. Ils montrent aussi que le passage de TFA à HFBA sur PGC a comme effet l'augmentation de la rétention de tous les composés et de ce fait une amélioration de la résolution entre les couples A/ NA et DOPA/ S peut être observée (figure I. 27).

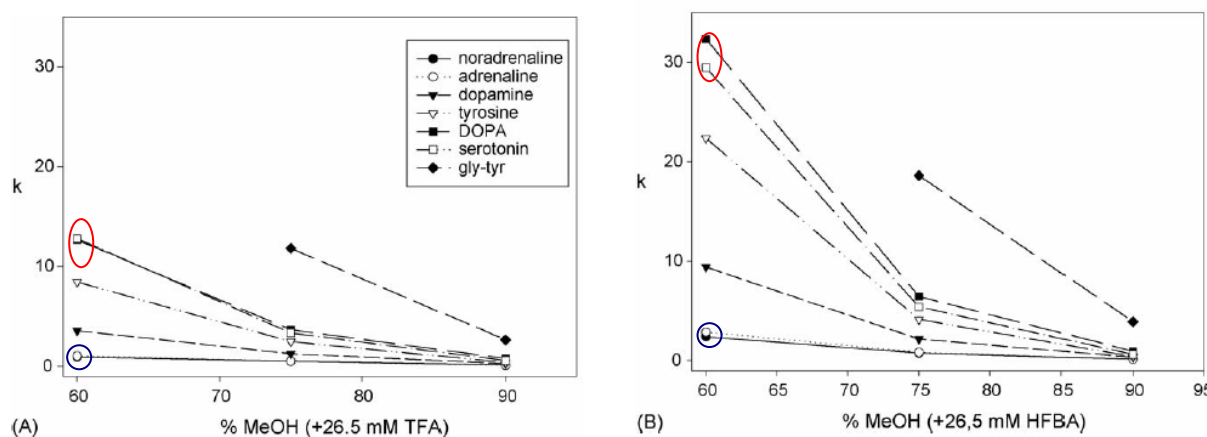


Figure I.27. Variations des facteurs de rétention sur la colonne PGC en fonction du pourcentage de MeOH avec (A) TFA et (B) HFBA comme agent d'appariement d'ions [86]

IV.2.4. Analyse par chromatographie d'échange d'ions (IEC)

La chromatographie d'échange d'ions (IEC) est basée sur un processus d'échange d'ions entre la phase mobile et des groupements fonctionnels ionisés greffés sur le support solide. Les anions sont séparés sur des phases greffées de type ammonium quaternaire et les cations sur des phases contenant des groupements sulfonate, carboxyle ou phosphate [74].

Les catécholamines sont des composés facilement ionisables et donc la chromatographie d'échange d'ions semble parfaitement adaptée pour leur séparation.

Il existe quelques exemples de séparation de catécholamines par échange de cations [66,112,113]. de Borba et Rohrer [112] ont utilisé une colonne Ion Pac C18 (Dionex) et une phase mobile en gradient de concentration d'acide méthylsulfonique de 3 mmol.L^{-1} à 45 mmol.L^{-1} , pour la détermination des amines biologiques dans des boissons alcoolisées.

De bons résultats ont été obtenus par Heidbreder *et al.* [113] pour le dosage de NA, DA et S dans des microdialysats de cerveau de rat, par une méthode qui utilise un échangeur fort de cations (Capcell Paj SCX UG80 – Phenomenex). Les courbes d'étalonnage, tracées entre 1 et 50 ng.mL^{-1} , ont de très bons coefficients de corrélation (supérieurs à 0,998). Les LODs établies sont comprises entre 50 et 100 pg.mL^{-1} . Le mélange de catécholamines analysé reste simple, il implique seulement des composés ayant un groupement amine primaire protoné, qui interagit facilement avec la phase stationnaire.

Récemment Luo *et al.* [66] ont présenté la séparation d'un mélange de catécholamines et métabolites sur une colonne phase inverse modifiée par l'addition d'un groupement sulfonate ($\text{SO}_3\text{-HC-C}_8\text{-L}$), pour faire de l'échange de cations. Ils comparent les performances

séparatives de cette nouvelle colonne avec deux colonnes commerciales: une colonne C18 (Zorbax SB) avec l'utilisation d'hexanesulfonate comme agent d'appariement d'ions en phase mobile et une colonne de type mixte mode: phase inverse et échange de cations (Primsep 200) (Figure I.28). Même en présence d'agent d'appariement d'ions de faibles rétentions et une séparation insuffisante sont observées sur le support C18. Des meilleurs résultats sont obtenus sur la colonne Primsep grâce au mécanisme d'échange d'ions, mais la rétention reste encore faible puisque 8 des 9 composés étudiés sont élués dans les 4 premières minutes avec la coélution de HVA et DOPA. L'amélioration de la séparation n'est pas envisageable car le pourcentage d'ACN et la concentration de TFA sont déjà faibles et ne peuvent donc pas être beaucoup plus réduits.

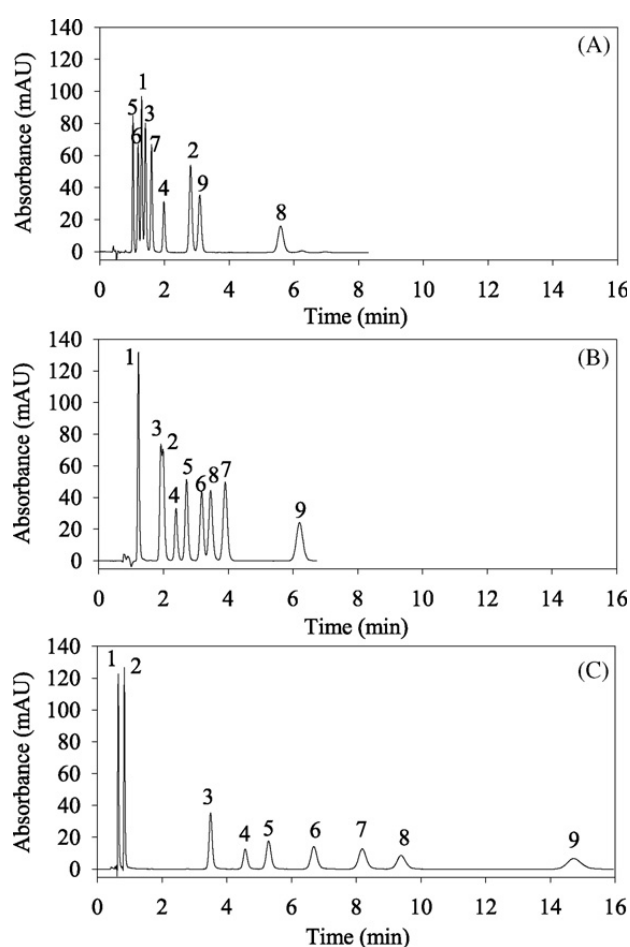


Figure I.28. Séparation des catécholamines sur différentes phases.

(A) Zorbax SB C18. Conditions chromatographiques : 10/90 ACN/H₂O contenant 0,1% (v/v) TFA, 0,2 mmol.L⁻¹ EDTA et 10 mmol.L⁻¹ hexanesulfonate de sodium, T=40°C

(B) Primsep 200. Conditions chromatographiques : 10/90 ACN/H₂O contenant 0,02% (v/v) TFA, T=40°C

(C) ⁻SO₃-HC-C8-L. Conditions chromatographiques : 24/76 ACN/H₂O contenant 0,02% (v/v) TFA and 0,2 mmol.L⁻¹ EDTA, T=65°C

Autres conditions chromatographiques : colonnes 5,0 × 0,46 cm, débit = 1,0 mL/min, détection : UV barrette des diodes. 1. DOPAC, 2. HVA, 3. DOPA, 4. Tyr, 5. NA, 6. A, 7. DA, 8. Phe, 9. 3-MT [66]

Les meilleurs résultats en terme de rétention et de séparation sont enregistrés sur la colonne modifiée $\text{SO}_3\text{-HC-C}_8\text{-L}$. Cependant, l'augmentation de rétention entraîne un élargissement des pics des composés aminés les plus retenus. Une augmentation de la température de la colonne (passage de 40°C sur les autres supports à 65°C), n'a pas pu améliorer l'efficacité des pics. Les composés acides, DOPAC et HVA, négativement chargés et ne possédant pas de groupement aminé, sont faiblement retenus et élués en premier du fait qu'ils subissent une répulsion électrostatique avec les groupements SO_3^- du support. Les deux composés qui sont élués après sont deux acides aminés DOPA et Tyr. La rétention plus importante de la phénylalanine (Phe) par rapport aux autres acides aminés s'explique par sa polarité plus faible (absence de groupement hydroxyle sur le noyau aromatique).

Les exemples d'analyse de catécholamines en échange d'ions ne sont pas très abondants dans la littérature. En effet, en échange d'ions, on ne peut séparer que les solutés de même signe et de charge opposée à celle du support séparatif. Les solutés de même signe que le support sont repoussés et sortent très proches du volume mort. La plupart du temps, nous avons besoin d'analyser les catécholamines en même temps que leurs métabolites or ces composés dans les mêmes conditions de pH, n'ont pas le même état de charge et ne peuvent donc pas être séparés sur un même échangeur d'ions.

IV.3. Analyse par électrophorèse capillaire (EC)

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative puissante adaptée spécialement à l'analyse des ions ou des molécules ionisables. Les avantages de cette technique sont les hautes efficacités et résolutions des séparations, la rapidité de l'analyse et le faible volume d'échantillon nécessaire pour l'analyse [114].

L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) et l'électrophorèse capillaire micellaire (MEKC) sont les deux modes les plus répandus de l'EC. Le principe de la CZE est basé sur la différence de mobilité électrophorétique des analytes et elle est principalement utilisée pour la séparation des ions. Le principe de la MECK est basé sur la différence de partage des analytes entre une phase micellaire et une phase aqueuse, cette technique est utilisée la plupart du temps pour l'analyse des composés non-ioniques.

Pour la séparation des catécholamines, la CEZ peut s'appliquer grâce au fait que ces composés sont chargés dans une gamme importante de pH (voir le pKa dans l'ANNEXE 1)

[115]. La MEKC est aussi utilisée et les micelles sont formées la plupart du temps à l'aide du dodecylsulfate de sodium (SDS) [114,116].

Au début, le seul mode de détection disponible en électrophorèse capillaire était l'UV. Les avancées technologiques permettent maintenant l'utilisation en EC, du fluorimètre, du conductimètre et de la SM. La figure I.29 présente la représentation schématique d'un appareil d'électrophorèse capillaire avec détection UV.

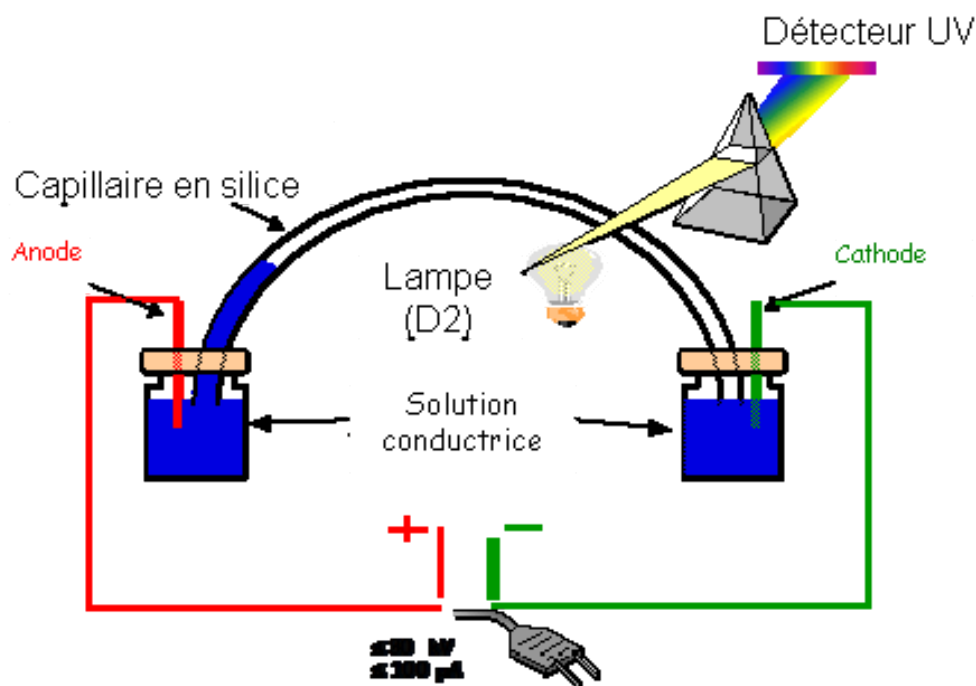


Figure I.29. Représentation schématique d'un appareil d'électrophorèse capillaire avec détection UV

Pour l'analyse des catécholamines en EC, différents modes de détection ont été utilisés: l'UV [115], l'électrochimie (ED) [117,118], la chimiluminescence [119,120], la fluorescence y compris la fluorescence induite par laser (LIF) [121], la conductimétrie (CD) [122] et la SM [123].

EC-UV

Si en chromatographie liquide la longueur d'onde utilisée pour la détection UV des catécholamines est généralement 280 nm, en EC l'absence de solvants organiques dans le tampon électrophorétique permet la détection à 220 nm, zone d'absorption maximale pour les

catécholamines comme on peut le voir sur le spectre UV de DA (figure I.13, paragraphe IV.2.1.1).

La détection UV présente l'avantage de ne pas nécessiter de réactions de dérivation, mais le désavantage d'être peu sensible par rapport au LIF, ED, CD ou SM.

Des limites de détection de l'ordre du $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les catécholamines et leurs métabolites sont rapportées dans la majorité des publications en EC-UV [116,124,125]. Par exemple Sirén et al. [124] ont obtenu des LODs comprises entre 0,6 et 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Une amélioration des LODs a été obtenue par Tseng *et al.* [126] par modification de charge de la surface du capillaire en utilisant de fortes concentrations de chlorure de poly(diallyldiméthylammonium) (PDDAC), ce qui entraîne une inversion du flux électroosmotique (EOF). Cela a comme effet un affinement des pics (Figure I.30) et donc une amélioration du rapporte signal/bruit. Dans ces conditions les LOD varient entre 3 ng.mL^{-1} pour le 5HIAA et 20 ng.mL^{-1} pour VMA.

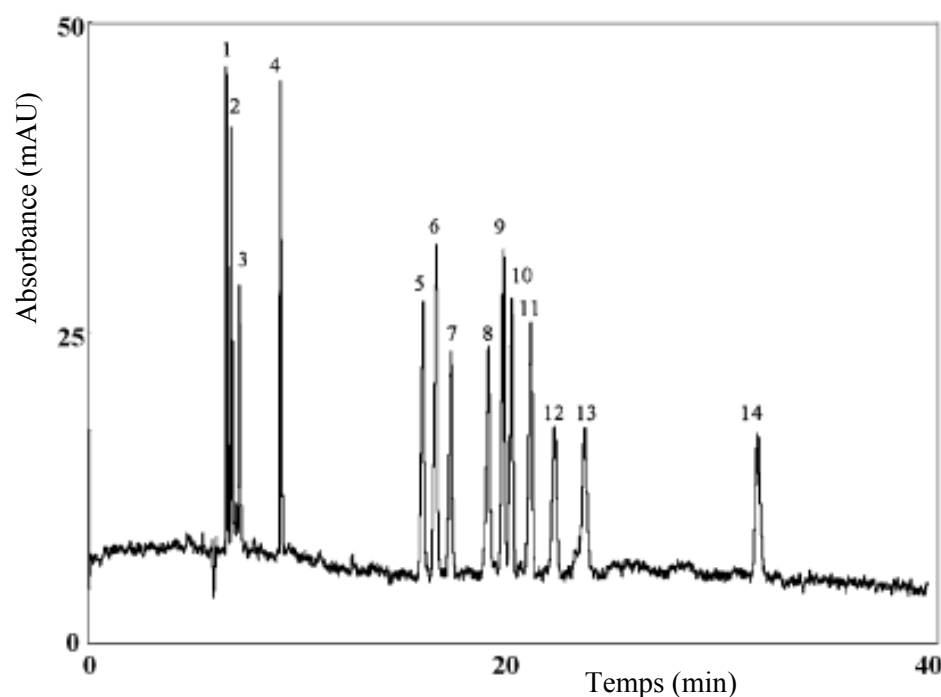


Figure I.30. Séparation simultanée des catécholamines, indolamines et metanéphrines avec une solution 1,2% PDDAC et inversion d'EOF

Conditions électrophorétiques : longueur totale du capillaire 60 cm (longueur effective 50 cm); tampon : 1.2% PDDAC et 5mM acide formique à pH 4.0; voltage : 15kV; injection hydrodynamique à 20 cm d'hauteur pendant 10 s ; détection UV à 220 nm. (1) VMA; (2) HVA; (3) Trp; (4) 5-HIAA; (5) MN; (6) E ; (7) NMN; (8) 3-MT; (9) 5-HT; (10) DA; (11) HMBA; (12) DHBA; (13) TA; (14) 3-IXS [126].

EC-LIF

Grâce à une sensibilité plus importante que celle de l'UV et un montage plus simple que celui nécessaire pour une détection électrochimique, le LIF est très utilisé pour les catécholamines [72,121,127-129]. Les LODs obtenues avec le LIF sont de quelques ng.mL⁻¹. Par exemple, Zhou *et al.* [121] ont obtenu respectivement 4,3 ng.mL⁻¹, 8,1 ng.mL⁻¹ et 12,4 ng.mL⁻¹ pour A, DA et NA.

Les limitations de la détection LIF viennent du fait que pour les catécholamines, une réaction de dérivation avec un agent fluorophore s'impose. Les deux inconvénients majeurs de ce fait sont liés d'une part à la quantité minimale de substrat nécessaire pour la réaction de dérivation (les quantités de catécholamines présentes dans les échantillons sont très faibles) et d'autre part, à la présence de produits secondaires de la réaction («pollution» de l'échantillon). Les solutions envisageables sont une pré-concentration de l'échantillon avant la dérivation et une étape de purification après la dérivation [130].

Les agents de dérivation les plus utilisés sont : le 4 chloro-7 nitro 2,1,3 benzoxadiazole (NBD-Cl) [121,128], le naphthalène-2,3-dicarboxyaldehyde (NDA) [72] et la fluorescein-5-isothiocyanate (FTIC) [129].

Pour s'affranchir de l'étape de dérivation Hsieh *et al.* [131] ont utilisé un détecteur à fluorescence native induite par le laser (LINF) pour l'analyse d'un mélange standard de DA, A, S, HVA, VMA, TA (tryptamine), Trp et 5HIAA. Les LODs obtenues pour ces analytes varient beaucoup en fonction de la structure de la molécule et vont de 0,06 ng.mL⁻¹ pour Trp à 120 ng.mL⁻¹ pour HVA, mais restent comparables à celles obtenues avec le LIF.

EC-SM

Pour l'EC comme pour la CPL, la SM est un mode de détection sensible et spécifique. La possibilité d'identifier les composés même en présence d'une matrice complexe représente l'avantage majeur que la SM offre par rapport à tous les autres détecteurs disponibles à l'heure actuelle. La figure I.31 représente la comparaison entre un électrophérogramme EC-UV et un EC-SM d'une même urine [132]. On peut voir ainsi la supériorité de la SM qui permet l'identification des composés et rend possible la quantification même en présence d'une matrice complexe.

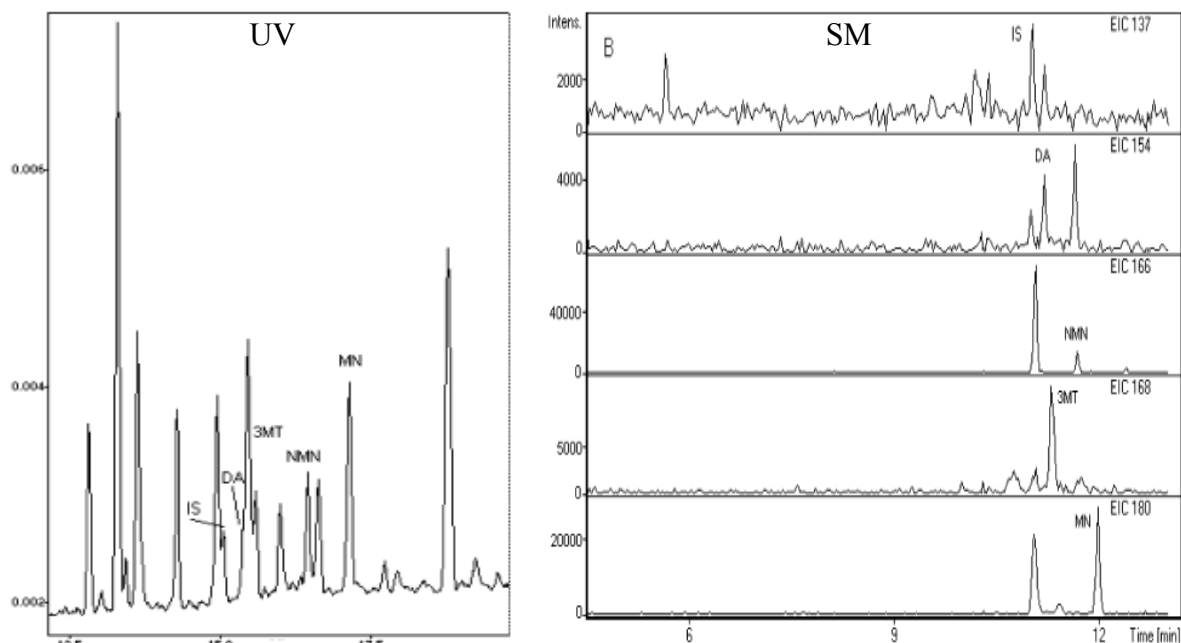


Figure I.31. Comparaison d'une analyse EC-UV (A) et EC-MS (B) d'un échantillon d'urine

Conditions électrophorétiques : **UV**: longueur totale du capillaire 77 cm (longueur effective 70 cm); tampon: 50mmol.L⁻¹ acétate d'ammonium – 40 mmol.L⁻¹ diisopropylamine à pH 4.0; voltage : 20 kV; injection hydrodynamique 30 s; détection UV à 200 nm

SM: longueur totale du capillaire 80 cm; tampon: acétate d'ammonium 50mmol.L⁻¹ à pH 4.0; voltage : 20 kV; injection hydrodynamique 30 s; [132]

Même si les LODs restent légèrement supérieures à celles obtenues avec le LIF, l'absence d'étape de dérivation et la spécificité de l'analyse sont à l'avantage de la détection SM. Les LODs typiques pour la SM vont de 50 à 250 ng.mL⁻¹ [14,123,132-134].

En EC-ESI-SM, à cause des faibles débits de l'électrolyte à l'entrée de la masse un liquide additionnel doit être ajouté pour augmenter le débit. Le plus couramment, c'est un alcool (méthanol, éthanol ou propanol) [133] qui est utilisé. Une alternative plus intéressante est représentée par la miniaturisation de la source (source de type nanospray) compatible avec de faible débit d'effluent, qui évite la dilution de l'échantillon par l'élimination du liquide additionnel [123].

Le désavantage majeur de l'EC-SM par rapport à la CPL-SM vient du fait que les LODs sont plus élevées du fait des petits volumes injectés en EC.

V. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre nous avons pu voir l'importance que les catécholamines, les indolamines et leurs métabolites présentent pour la transmission des informations à l'intérieur du cerveau et du cerveau vers les organes effecteurs. Nous avons aussi présenté les voies de synthèse et le métabolisme des catécholamines afin de comprendre comment ces composés interagissent dans l'organisme.

Nous avons montré que les déséquilibres de concentration des catécholamines dans l'organisme sont liés à plusieurs maladies et que le dosage des catécholamines peut servir pour le diagnostic de certaines d'entre elles.

Nous avons passé en revue les méthodes d'analyse qui ont été employées pour la détermination des catécholamines. Nous avons pu voir que la chromatographie liquide présente de nombreux avantages par rapport à la chromatographie gazeuse ou l'électrophorèse capillaire. Ces avantages sont principalement liés à la durée des analyses, leur précision et leur sensibilité (grâce aux détecteurs plus performants).

En chromatographie liquide les méthodes décrites dans la littérature ne sont pas toutes adaptées à nos besoins d'analyser simultanément un mélange de catécholamines, indolamines et de leurs précurseurs et métabolites dans un extrait du cerveau ou dans des milieux de culture de neurones. Par exemple la chromatographie d'échange d'ions n'est pas adaptée à l'analyse de mélanges complexes contenant à la fois des composés acides et des composés aminés car ils ne peuvent pas être retenus par les mêmes supports.

La majorité des méthodes proposées en phase inverse et en appariement d'ions sont couplées à la détection électrochimique et de ce fait utilisent des phases mobiles avec des concentrations très importantes en sels, parfois non volatils, qui ne permettent pas une compatibilité directe avec une détection par spectrométrie de masse.

Parmi les méthodes présentées, nous avons pu voir que la tendance actuelle va vers le couplage CPL-SM. Grâce aux informations structurales offertes par cette technique, les identifications et les dosages des catécholamines sont réalisés de manière plus facile et plus exacte. Pour l'instant, les méthodes publiées n'offrent ni la sélectivité ni la sensibilité suffisante pour une application directe à notre mélange d'analytes, c'est pourquoi les travaux de cette thèse vont se focaliser sur le développement de nouvelles méthodes d'analyse de

catécholamines de charges différentes compatibles avec une détection par spectrométrie de masse.

Dans le deuxième chapitre de ce mémoire, nous allons présenter les méthodes que nous avons mises au point en chromatographie phase inverse et chromatographie d'appariement d'ions et les avantages des phases stationnaires de nouvelle génération (les supports monolithes et les supports à noyau dur ou « fused core »).

Le troisième chapitre est dédié au développement des analyses en chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) et à une meilleure compréhension des mécanismes de rétention dans ce mode chromatographique en plein essor.

Les meilleurs systèmes optimisés ont été ensuite couplés à la spectrométrie de masse puis appliqués à la détermination des limites de détection et au dosage des catécholamines dans un extrait de cerveau. Les résultats obtenus sont présentés dans le quatrième chapitre.

Le dernier chapitre de ce mémoire est dédié à l'optimisation des méthodes de purification et préconcentration des échantillons par extraction sur phase solide.

Références bibliographiques

- [1] A.R. Crossman, D. Neary, Neuroanatomie, Elsevier, 2004.
- [2] J. Carey, Brain Facts, 2008.
- [3] F. Horn, G. Lindenmeier, C. Grillhosl, I. Moc, S. Berghold, N. Schneider, B. Munster, Biochimie humaine, Flammarion, 2005.
- [4] O. von Bohlen und Halbach, R. Dermietzel, Neurotransmitters and Neuromodulators, Wiley-VCH, 2006.
- [5] K. Miki, A. Sudo, Clin. Chem. 44 (1998) 1759.
- [6] N. Aime-Genty, Le cerveau - Dictionnaire encyclopédique Librerie Vuibert, 1997.
- [7] D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, W.C. Hall, A.-S. Lamantia, J.O. McNamara, S.M. Williams, Neuroscience, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA 01375 U.S.A., 2004.
- [8] H. Umegaki, H. Ikari, H. Nakahata, J. Yoshimura, H. Endo, T. Yamamoto, A. Iguchi, Brain Research 858 (2000) 67.
- [9] K. Yamamoto, O. Hornykiewicz, Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 28 (2004) 913.
- [10] I. Perez-Neri, J. Ramirez-Bermudez, S. Montes, C. Rios, Neurochem Res 31 (2006) 1279.
- [11] V.L. Cropley, M. Fujita, R.B. Innis, P.J. Nathan, Biol. Psychiatry 59 (2006) 898.
- [12] M.R. Lemke, G. Fuchs, I. Gemende, B. Herting, C. Oehlwein, H. Reichmann, J. Rieke, J. Volkmann, J. Neurol. 251 (2004) VI/24.
- [13] G.A. Fuchs, I. Gemende, B. Herting, M.R. Lemke, C. Oehlwein, H. Reichmann, J. Rieke, D. Emmans, J. Volkmann, J. Neurol. 251 (2004) VI/28.
- [14] Z.D. Peterson, M.L. Lee, S.W. Graves, J. Chromatogr. B 810 (2004) 101.
- [15] B.J. Jones, T.P. Blackburn, Pharmacology Biochemistry and Behavior 71 (2002) 555.
- [16] G. Bagdy, V. Kecskemeti, P. Riba, R. Jakus, J. Neurochem. 100 (2007) 857.
- [17] C.A. Jones, A.C. McCreary, J. Neuropharm. 55 (2008) 1056.
- [18] D.K. Garnner, P.A. Mayers, R.K. Murray, V.W. Rodwell, Biochimie de HARPER, de boeck.
- [19] M. Yoshitake, H. Nohta, S. Ogata, K. Todoroki, H. Yoshida, T. Yoshitake, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. B 858 (2007) 307.
- [20] A. Törnkvist, P.J.R. Sjöberg, K.E. Markides, J. Bergquist, J. Chromatogr. B 801 (2004) 323.
- [21] S. Letellier, J.P. Garnier, J. Spy, B. Bousquet, J. Chromatogr. B 696 (1997) 9.
- [22] T. Yoshitake, J. Kehr, S. Yoshitake, K. Fujino, H. Nohta, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. B 807 (2004) 177.
- [23] A. Thomas, H. Geyer, H.J. Mester, W. Schonzer, E. Zimmermann, M. Thevis, Chromatographia 64 (2006) 587.
- [24] E.C.Y. Chan, P.C. Ho, Rapid Commun. Mass Spectrom. 14 (2000) 1959.
- [25] E. Nalewajko, A. Wiszowata, A. Kojlo, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 1673.
- [26] T.J. Panholzer, J. Beyer, K. Lichtwald, Clin. Chem. 45 (1999) 262–268.
- [27] M. Hay, P. Mormède, J. Chromatogr. B 703 (1997) 15.
- [28] C. Sabbioni, M.A. Saracino, R. Mandrioli, S. Pinzauti, S. Furlanetto, G. Gerra, M.A. Raggi, J. Chromatogr. A 1032 (2004) 65.
- [29] N. Unceta, E. Rodriguez, Z.G. de Balugera, C. Sampedro, M.A. Goicolea, S. Barrondo, J. Sallés, R.J. Barrio, Anal. Chim. Acta 444 (2001) 211.
- [30] Y. Wang, D.S. Fice, P.K.F. Yeung, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 519.
- [31] T.A. Neubecker, M.A. Coombs, M. Quijano, T.P. O'Neill, C.A. Cruze, R.L.M. Dobson, J. Chromatogr. B 718 (1998) 225–233.

- [32] J.A. Starkey, Y. Mechref, J. Muzikar, W.J. McBride, M.V. Novotny, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3342.
- [33] X. Zhang, A. Rauch, H. Lee, H. Xiao, G. Rainer, N.K. Logothetis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3621.
- [34] W.H.A. de Jong, K.S. Graham, J.C. van der Molen, T.P. Links, M.P. Morris, H.A. Ross, E.G.E. de Vries, I.P. Kema, *Clin. Chem.* 53 (2007) 1684.
- [35] M.A. Raggi, V. Pucci, C. Sabbioni, S. Furlanetto, G. Gerra, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 275.
- [36] I.P. Kema, W.G. Meijer, G. Meirborg, B. Ooms, P.H.B. Willemse, E.G.E. de Vries, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1811.
- [37] J.P. Desager, *European Chromatography and Analysis* August/September (1991) 9.
- [38] R.L. Gregory, *Le cerveau un inconnue - dictionnaire encyclopédique* Robert Laffont, Paris, 2000.
- [39] G.E. Duncan, B.B. Sheitman, J.A. Lieberman, *Brain Research Reviews* 29 (1999) 250.
- [40] D.A. Lewis, M. Akil, *Journal of Psychiatric Research* 31 (1997) 175.
- [41] W.J. Marschall, S.K. Bangert, *Biochimie médicale - Physiopathologie et diagnostique*, Elsevier, 2005.
- [42] Karel Pacak, Karen T. Adams, G. Eisenhofer, *ADRENAL PHYSIOLOGY AND DISEASES*, Capter 34. Pheochromocytoma 2006.
- [43] R.L. Taylor, R.J. Singh, *Clin. Chem.* 48 (2002) 533.
- [44] U.E.G. Bock, P.G. Waser, *J. Chromatogr. A* 213 (1981) 413.
- [45] D.J. Edwards, M. Rizk, D.G. Spiker, *Biochemical Medicine* 25 (1981) 135.
- [46] G.K.E. Scriba, R.T. Borchardt, J.A. Zirrolli, P.V. Fennessey, *J. Chromatogr. B* 433 (1988) 31.
- [47] J. Bergquist, A. Sciubisz, A. Kaczor, J. Silberring, *J. Neurosci. Methods* 113 (2002) 1.
- [48] M.G. Bigdeli, M.A. Collins, *Biochemical Medicine* 12 (1975) 55.
- [49] C.R. Freed, R.J. Weinkam, K.L. Melmon, N. Castagnoli, *Anal. Biochem.* 78 (1977) 319.
- [50] E.K. Gordon, J. Oliver, K. Black, I.J. Kopin, *Biochemical Medicine* 11 (1974) 32.
- [51] P. Husek, Z.-H. Huang, C.C. Sweeley, *Anal. Chim. Acta* 259 (1992) 185.
- [52] S. Xie, R.F. Suckow, T.B. Cooper, *J. Chromatogr. B* 677 (1996) 37.
- [53] A.P.J.M. De Jong, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. B* 276 (1983) 267.
- [54] J. Szopa, G. Wilczynski, O. Fiehn, A. Wenczel, L. Willmitzer, *Phytochemistry* 58 (2001) 315.
- [55] A. Swiedrych, K. Lorenc-Kukula, A. Skiryecz, J. Szopa, *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (2004) 593.
- [56] P.S. Doshi, D.J. Edwards, *J. Chromatogr. A* 210 (1981) 505.
- [57] A. Swiedrych, J. Stachowiak, J. Szopa, *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (2004) 103.
- [58] Susan E. Hattox, R.C. Murphy, *Biological Mass Spectrometry* 5 (1978) 338.
- [59] K. Jacob, W. Vogt, M. Knedel, G. Schwertfeger, *J. Chromatogr. B* 146 (1978) 221.
- [60] L.M. Nelson, F.A. Bubb, P.M. Lax, M.W. Weg, M. Sandler, *Clin. Chim. Acta* 92 (1979) 235.
- [61] G.A. Smythe, G. Edwards, P. Graham, L. Lazarus, *Clin. Chem.* 38 (1992) 486.
- [62] W.J. Lough, I.W. Wainer, *High Performance Liquide Chromatography - Fundamental principles and practice*, Blackie Academic & Professional, 1996.
- [63] J. Liu, Q. Li, Y. Yu, X. Fang, *Analytical Sciences* 19 (2003) 1099.
- [64] P. Koivisto, A. Tornkvist, E. Heldin, K.E. Markides, *Chromatographia* 55 (2002) 39.
- [65] P. Pagel, J. Blome, H.U. Wolf, *J. Chromatogr. B* 746 (2000) 297.
- [66] H. Luo, L. Ma, C. Paek, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 8.
- [67] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 2006.

- [68] M. Yamaguchi, T. Yoshitake, K. Fujino, K. Kawano, J. Kehr, J. Ishida, *Anal. Biochem.* 270 (1999) 296.
- [69] M.A. Fotopoulou, P.C. Ioannou, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 179.
- [70] J.M. Zuetenhorst, C.M. Korse, J.M.G. Bonfrer, E. Peter, C.B.H.W. Lamers, B.G. Taal, *Clin. Chem.* 50 (2004) 1634.
- [71] A.E.M. Stroomer, H. Overmars, N.G.G.M. Abellng, v.G.A. H., *Clin. Chem.* 36 (1990).
- [72] N. Siri, M. Lacroix, J.-C. Garrigues, V. Poinot, F. Couderc, *Electrophoresis* 27 (2006) 4446.
- [73] E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.Y. Ho, P.C. Ho, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 179.
- [74] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [75] V.R. Mayer, *Practical High Performance Liquide Chromatography*, Wiley, 2004.
- [76] M. Machida, A. Sakaguchi, S. Kamada, T. Fujimoto, S. Takechi, S. Kakinoki, A. Nomura, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 249.
- [77] M. Dehnhard, *Gen. Comp. Endocrinol.* 151 (2007) 274.
- [78] M.A. Saracino, R. Mandrioli, L. Mercolini, A. Ferranti, A. Zaimovic, C. Leonardi, M.A. Raggi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 107.
- [79] M.A. Raggi, C. Sabbioni, G. Casamenti, G. Gerra, N. Calonghi, L. Masotti, *J. Chromatogr. B* 730 (1999) 2001.
- [80] G. Bouchoux, M. Sablier, *Technique de l'ingenieur P-2645 1*.
- [81] M.M. Kushnir, F.M. Urry, E.L. Frank, W.L. Roberts, B. Shushan, *Clin. Chem.* 48 (2002) 323.
- [82] S. Bourcier, J.F. Benoist, F. Clerc, O. Rigal, M. Taghi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1405.
- [83] W. Li, D.T. Rossi, S.T. Fountain, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 325.
- [84] V. Carrera, E. Sabater, E. Vilanova, M.A. Sogorb, *J. Chromatogr. B* 847 (2007) 88.
- [85] M.E.P. Hows, L. Lacroix, C. Heidbreder, A.J. Organ, A.J. Shah, *J. Neurosci. Methods* 138 (2004) 123.
- [86] D. Thiébaud, J. Vial, M. Michel, M.-C. Hennion, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 97.
- [87] W.H.A. de Jong, K.S. Graham, E.G.E. de Vries, I.P. Kema, *J. Chromatogr. B* 868 (2008) 28.
- [88] S. Chen, Q.i. Li, C.P. M., K. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1869.
- [89] T.J. Kauppila, T. Nikkola, R.A. Ketola, R. Kostianen, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 781.
- [90] A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345.
- [91] E. de Hoffmann, V. Stoorbant, *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, Wiley, Chichester, 2007.
- [92] J.H. Gross, *Mass Spectrometry. A text book*, Springer, Heidelberg, 2005.
- [93] C. Dass, *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, Wiley, Hoboken, 2007.
- [94] S.A. Lagerstedt, D.J. O'Kane, R.J. Singh, *Clin. Chem.* 50 (2004) 603.
- [95] P. Kumarathanan, R. Vincent, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 349.
- [96] A.T. Wood, M.R. Hall, *J. Chromatogr. B* 744 (2000) 221.
- [97] P. Manini, R. Andreolia, S. Cavazzinia, E. Bergamaschia, A. Mutti, W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. B* 744 (2000) 423.
- [98] T. Hasegawa, K. Wada, E. Hiyama, T. Masujima, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 814.
- [99] G.B. Martin, P. Chiap, P. Paquet, G. Pierard, P. de Tullio, Y. Martin, E. Rozet, P. Hubert, J. Crommen, M. Fillet, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 141.
- [100] E. Forgács, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 229.

- [101] S. Rinne, A. Holm, E. Lundanes, T. Greibrokk, J. Chromatogr. A 1119 (2006) 285.
- [102] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Chromatogr. B 717 (1998) 93.
- [103] M. Lee, S.Y. Oh, T.S. Pathak, I.R. Paeng, B.Y. Cho, K.J. Paeng, J. Chromatogr. A 1160 (2007) 340.
- [104] E. Rozet, R. Morello, F. Lecomte, G.B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K.S. Boos, P. Hubert, J. Chromatogr. B 844 (2006) 251.
- [105] J.D. Chi, J. Odontiatias, M. Franklin, J. Chromatogr. B 731 (1999) 361.
- [106] Y. Qu, L. Moons, F. Vandesaende, J. Chromatogr. B 704 (1997) 351.
- [107] E. Sastre, A. Nicolay, B. Bruguerolle, H. Portugal, J. Chromatogr. B 801 (2004) 205.
- [108] M.A. Vicente-Torres, P. Gil-Loyzaga, F. Carricondo, M.V. Bartolome, J. Neurosci. Methods 119 (2002) 31.
- [109] A. Ormazabal, A. Garcia-Cazorla, Y. Fernandez, E. Fernandez-Alvarez, J. Campistol, R. Artuch, J. Neurosci. Methods 142 (2005) 153.
- [110] B.A. Patel, M. Arundell, K.H. Parker, M.S. Yeoman, D. O'Hare, J. Chromatogr. B 818 (2005) 269.
- [111] D. Talwar, C. Williamson, A. McLaughlin, A. Gill, D.S.J. O'Reilly, J. Chromatogr. B 769 (2002) 341.
- [112] B.M. De Borba, J.S. Rohrer, J. Chromatogr. A 1155 (2007) 22.
- [113] C.A. Heidberder, L. Lacroix, A.R. Atkins, A.J. Organ, S. Murray, A. West, A.J. Shah, J. Neurosci. Methods 112 (2001) 135.
- [114] C.-E. Lin, I.J. Fang, Y. Deng, Jr., W.-S. Liao, H.-T. Cheng, W.-P. Huang, J. Chromatogr. A 1051 (2004) 85.
- [115] H. Sirén, U. Karjalainen, J. Chromatogr. A 853 (1999) 527.
- [116] G. Liu, J. Chen, Y. Ma, J. Chromatogr. B 805 (2004) 281.
- [117] O. Klett, I. Nischang, L. Nyholm, Electrophoresis 23 (2002) 3678.
- [118] Z. Liu, O. Niwa, R. Kurita, T. Horiuchi, Anal. Chem. 72 (2000) 1315.
- [119] C.Q. Wang, H. Wang, Y.M. Liu, Chinese Chemical Letters 18 (2007) 452.
- [120] R. Zhu, W.T. Kok, Anal. Chem. 69 (1997) 4010.
- [121] L. Zhou, W. Wang, S. Wang, Y. Hui, Z. Luo, Z. Hu, Anal. Chim. Acta 611 (2008) 212.
- [122] P.S. Vuorinen, M. Jussila, H. Sirén, S. Palonen, M.-L. Riekkola, J. Chromatogr. A 990 (2003) 45.
- [123] K. Vuorensola, H. Sirén, R. Kostianen, T. Kotiaho, J. Chromatogr. A 979 (2002) 179.
- [124] H. Sirén, M. Mielonen, M. Herlevi, J. Chromatogr. A 1032 (2004) 289.
- [125] K. Vuorensola, H. Sirén, J. Chromatogr. A 895 (2000) 317.
- [126] W.-L. Tseng, S.-M. Chen, C.-Y. Hsu, M.-M. Hsieh, Anal. Chim. Acta 613 (2008) 108.
- [127] S. Xiong, H. Han, R. Zhao, Y. Chen, G. Liu, Biomed. Chromatogr. 15 (2001) 83.
- [128] L. Zhou, S. Wang, K. Tian, Y. Dong, Z. Hu, J. Sep. Sci. 30 (2007) 110.
- [129] M. Du, V. Flanigan, Y. Ma, Electrophoresis 25 (2004) 1496.
- [130] P. Schmitt-Kopplin, Capillary Electrophoresis - Methods and Protocols, Totowa, 2008.
- [131] M.-M. Hsieh, H.-T. Chang, J. Chromatogr. A 1102 (2006) 302.
- [132] K. Vuorensola, H. Sirén, U. Karjalainen, J. Chromatogr. B 788 (2003) 277.
- [133] K. Vuorensola, J. Kokkonen, H. Siren, R.A. Ketola, Electrophoresis 22 (2001) 4347.
- [134] Z.D. Peterson, D.C. Collins, C.R. Bowerbank, M.L. Lee, S.W. Graves, J. Chromatogr. B 776 (2002) 221.

Chapitre II
DEVELOPPEMENT DE METHODES
DE SEPARATION POUR LES
CATECHOLAMINES EN PHASE
INVERSE ET APPARIEMENT D'IONS

CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT DE METHODES DE SEPARATION POUR LES CATECHOLAMINES EN PHASE INVERSE ET APPARIEMENT D'IONS

I. Introduction

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons présenté l'importance des catécholamines pour le bon fonctionnement de l'organisme ainsi que les méthodes que nous avons à notre disposition à ce jour pour leur analyse. Dans le contexte que nous nous sommes fixé :

- Analyse simultanée dans un échantillon biologique du panel des 11 composés suivants : les 3 catécholamines (NA, A et DA), une indolamine (S), les précurseurs (3 acides aminés : Tyr, DOPA et Trp), des métabolites acides (HVA, DOPAC et 5HIAA) et un métabolite aminé (3-MT),
- Détection par spectrométrie de masse (SM) et par électrochimie, aucune des méthodes proposées dans la littérature ne satisfaisant pleinement ces deux critères.

Le choix de ces deux modes de détection s'explique par leurs performances respectives. La spectrométrie de masse présente l'avantage d'offrir des informations structurales, facilitant ainsi l'identification des composés présents à l'état de traces dans les échantillons biologiques, mais reste une technique onéreuse. De son côté, l'électrochimie s'impose comme une technique de choix pour l'utilisation en routine grâce à sa grande sensibilité et à ses meilleures limites de détection. Le détecteur électrochimique implique des coûts moins élevés que la SM, une manipulation plus simple, mais reste moins spécifique que la SM (pas de discrimination possible entre les différentes molécules détectées dans des conditions de potentiel données).

Dans ce but, il faut prendre en compte les contraintes imposées par chacun de ces détecteurs et essayer de trouver le compromis qui nous permettra d'atteindre notre objectif. Nous avons donc :

- Pour la SM, l'exigence de volatilité de la phase mobile et d'un pourcentage de modificateur organique minimum pour augmenter le rendement d'ionisation des solutés.

Pour avoir un spray stable en spectrométrie de masse, nous nous sommes fixées une teneur minimale de 10% de modificateur organique dans l'éluant chromatographique.

- Pour la détection électrochimique, la nécessité d'une séparation totale des composés et l'utilisation d'une phase mobile très riche en sels pour augmenter sa conductivité.

Une incompatibilité apparaît entre ces deux détecteurs, liée à la concentration du sel nécessaire pour obtenir les meilleures conditions de sensibilité. Des phases mobiles très riches en sel permettent d'atteindre une meilleure sensibilité en électrochimie mais sont défavorables pour la SM.

Nous nous sommes fixées comme compromis l'utilisation d'une quantité modérée de sels dans les phases mobiles pour obtenir la meilleure sensibilité en masse, sachant que pour améliorer la sensibilité en électrochimie, il sera toujours possible d'introduire un liquide additionnel, après la séparation chromatographique et avant le détecteur, afin d'augmenter la concentration en sel.

Dans le premier chapitre, nous avons vu qu'en chromatographie liquide il y avait trois modes de séparation envisageables pour les catécholamines : l'échange d'ions, la phase inverse et l'appariement d'ions, mais que l'échange d'ions n'était pas adapté pour l'analyse de mélanges complexes contenant à la fois des composés anioniques et cationiques. Nous nous sommes donc intéressées à développer des séparations en modes phase inverse et appariement d'ions.

Après avoir montré que l'analyse en milieu basique n'était pas envisageable, nous allons présenter, dans la première partie de ce chapitre, les systèmes que nous avons mis au point en mode phase inverse en milieu acide. Nous avons mis au point des systèmes avec des phases mobiles composées d'un modificateur organique (MeOH ou ACN) et d'un tampon volatil, sur trois types différents de supports :

- les colonnes « classiques » de la phase inverse : C18 et PGC ;
- les colonnes perfluorées ;
- les colonnes de type mode mixte : phase inverse et échange de cations.

La deuxième partie du chapitre porte sur le développement de systèmes en appariement d'ions, avec des agents d'appariement d'ions volatils de la famille des acides

perfluorés. Les méthodes d'analyse ont d'abord été mises au point sur des colonnes remplies avec des particules poreuses classiques de phases types C18 et PGC (diamètre des particules 5 μm), puis transposées sur des colonnes dédiées à la « fast LC ». Nous avons utilisé dans ce but des phases C18 fabriquées selon deux techniques différentes :

- les colonnes monolith,
- les colonnes « fused core ».

Pour la totalité de ce travail de développement des systèmes chromatographiques nous avons :

- utilisé une détection UV à 280 nm (voir Chapitre I paragraphe IV.2.1.1) et en vue d'un dosage ultérieur,
- introduit dans le mélange standard des 11 solutés sélectionnés, la 3,4 dihydroxybenzylamine (DHBA). Ce composé a une structure très proche de celle des catécholamines, n'est pas synthétisé par l'organisme et, de ce fait, remplit les conditions exigées pour un étalon interne. Il apparaît par ailleurs dans la littérature comme le plus souvent utilisé [1-5].

Par souci de simplification, le terme générique catécholamines sera utilisé dans la suite de notre texte pour désigner tous les composés du mélange.

II. Choix des conditions de pH pour l'analyse des catécholamines

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les catécholamines avaient un état de charge variable en fonction des conditions de pH du milieu dans lequel elles se trouvent, or pour la séparation en mode phase inverse, l'idéal pour avoir de la rétention serait de faire du recul d'ionisation et ainsi d'avoir des composés non chargés. Vu la composition du mélange d'analytes que nous avons à séparer, qui contient des amines primaires et secondaires, des acides aminés et des acides, il ne sera pas possible de trouver des conditions de pH pour lesquelles tous les solutés seront neutres (Annexe 3). Deux stratégies ont alors été envisagées pour avoir une uniformisation des charges apparentes de ces molécules permettant de simplifier l'analyse en impliquant le même type d'interactions entre les composés et la phase stationnaire : une en milieu basique et une autre en milieu acide. C'est seulement dans les conditions de pH extrêmes que tous les composés ont une charge apparente identique :

- à $\text{pH} < 2$ tous les composés sont positivement chargés;

- à pH > 10,5 tous les composés sont négativement chargés (Annexe 3).

Nous avons également vu que les échantillons contenant des catécholamines doivent être conservés en milieu acide (pH < 3), à l'abri de la lumière et à basse température (-80°C), l'instabilité en pH supérieur à 7 ayant été mise en évidence par le travail de Miki et Sudo [6].

Nous avons voulu tester en premier lieu si la vitesse de dégradation des catécholamines n'empêcherait pas l'analyse dans des conditions de phases mobiles basiques, car le choix des colonnes commercialisées compatibles avec des milieux très acides est plus limité que celui des colonnes compatibles avec un milieu basique.

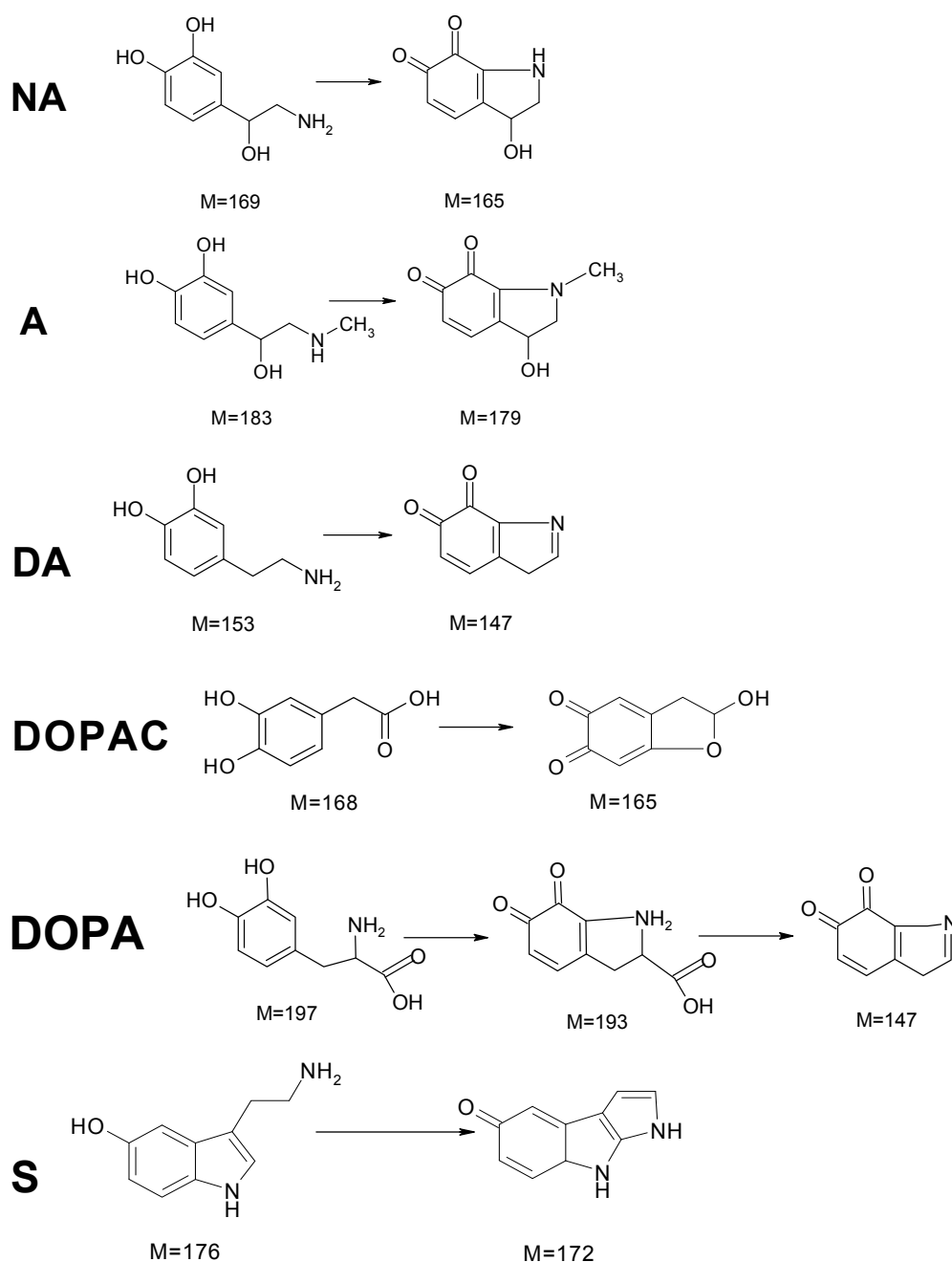


Figure II.1. Produits de dégradation de A, NA, DOPA, DA, DOPAC et S en milieu basique

Parmi les différents supports de silice greffée C18 résistants aux pH extrêmes, nous avons testé une colonne Nucleodur Gravity (125 x 2 mm, L x Ø), qui a un domaine de stabilité annoncé compris entre pH 1 et 11. Les phases mobiles utilisées sont constituées d'un mélange de MeOH et de solution aqueuse d'acétate d'ammonium 10 mM. Le pH de la phase aqueuse est ajusté à la valeur souhaitée (8 ou 10) à l'aide d'une solution d'ammoniaque 1N.

Les solutions de catécholamines injectées sont préparées extemporanément par dilution 1/20 dans la phase mobile à partir de solutions mères à 1000 µg.mL⁻¹ préparées en milieu acide. Pour certaines solutions, nous avons observé avant même l'injection un changement de couleur (passage de l'incolore au jaune). Nous avons vérifié l'hypothèse d'une dégradation immédiate due au milieu basique à l'aide de la spectrométrie de masse. Pour cela, l'analyse des solutions diluées de catécholamines a été réalisée par infusion directe dans la source électrospray du spectromètre API 300 SCIEX.

Les spectres de masse mettent en évidence des différences de 3 unités de masse par rapport à la masse attendue pour le DOPAC; de 4 unités de masse pour la S, l'A, la NA et la DOPA et de 6 unités de masse pour DA, ce qui confirme la dégradation des composés. Les produits de dégradation que nous avons pu identifier à partir des spectres de masse et de la littérature [7-9] sont répertoriés dans la figure II.1. Ils correspondent tous à l'oxydation des groupements phénol et à la cyclisation de la chaîne latérale du cycle benzénique pour former un hétérocycle à 5 atomes contenant un atome d'azote, pour : A, NA, DA, DOPA et S, ou un atome d'oxygène dans le cas du DOPAC.

En conclusion, l'analyse en milieu basique n'est pas envisageable pour les catécholamines, c'est la raison pour laquelle la suite de nos développements de méthodes a été faite avec des phases mobiles acides.

III. Analyse par chromatographie liquide à polarité de phases inverse (RPLC)

Par souci de stabilité des colonnes de silice greffée C18 et des composés, nous allons travailler à pH 3 mais une des difficultés pour l'analyse à ce pH vient du fait que les solutés n'auront pas tous la même charge, certains seront positifs (A, DA, NA, 3-MT, DHBA et S), d'autres neutres (Tyr, Trp et DOPA) ou encore négatifs (HVA, 5HIAA et DOPAC) [10].

Parmi les systèmes RPLC les plus simples, nous avons trouvé dans la littérature ceux pour lesquels sont utilisées une colonne octadecyl et une phase mobile composée d'un mélange d'un bon solvant (la plupart du temps l'ACN ou le MeOH) et d'un mauvais solvant qui peut être une solution aqueuse de sel ou d'acide, à condition qu'ils soient volatils [11,12]. Nos premiers essais ont été faits à partir de ces données.

III.1. Analyse sur silice greffée C18

Compte tenu de la composition de notre mélange, nous avons sélectionné pour notre étude une colonne Discovery HS C18 (Supelco), (150 x 2,1 mm L x Ø, diamètre des particules 3 µm, diamètre des pores 120 Å) réputée pouvant permettre une excellente symétrie de pic pour les composés acides et/ou basiques. La phase mobile utilisée est constituée d'un modificateur organique et de tampon formiate d'ammonium. Les solutions injectées sont toutes préparées dans la phase mobile.

III.1.1. Choix du pourcentage et de la nature du modificateur organique

Des essais avec une phase mobile composée d'un tampon HCOONH₄ 10 mM, pH 2,9 en mélange avec MeOH comme modificateur organique ont été réalisés. Un pourcentage inférieur à 10 % de MeOH est nécessaire pour obtenir de la rétention. La figure II.2. présente les meilleures conditions de séparation obtenues. Comme attendu en RPLC, l'ordre de rétention est principalement fonction de l'hydrophobie des molécules, la NA qui a la valeur de log P la plus petite sort en premier et l'HVA, qui a le log P le plus élevé est élué en dernier (Annexe 3). Malgré une grande différence entre les facteurs de rétention (k) de NA (k= 0,06) et de HVA (k= 11,5), Tyr, DA, DOPA, NA, A et DHBA sont coélusés en volume mort.

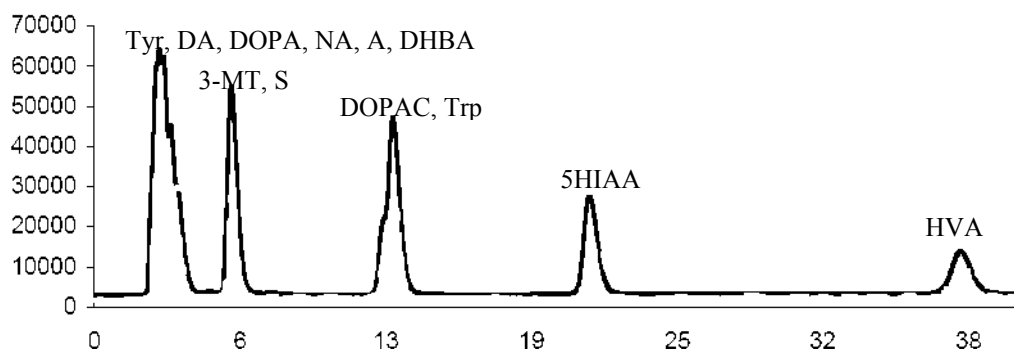


Figure II.2. Chromatogramme du mélange des catécholamines

Colonne : Discovery HS C18 (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 3 µm) ; Phase mobile : MeOH / HCOONH₄ 10 mM, pH 2,9 (90/10 v/v) ; Débit : 0,2 mL.min⁻¹ ; Détection UV.

Nous n'avons pas testé dans ces conditions l'ACN comme modificateur organique car il est connu qu'en RPLC c'est un solvant plus éluant que le MeOH et, par conséquent, il devrait être introduit en proportion inférieure à 10% ne respectant pas les exigences que nous nous sommes fixées pour le couplage à la SM.

III.1.2. Influence du pH de la phase mobile sur la rétention

En chromatographie de phase inverse, la rétention augmente avec l'hydrophobie du produit. Les composés ionisables sont donc plus retenus sous leur forme neutre que sous leur forme ionique. L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention des catécholamines. Pour cela nous avons utilisé une phase mobile composée de 10% MeOH et 90% de formiate d'ammonium 50 mM avec le pH ajusté avec de l'acide formique pour obtenir les valeurs suivantes de pH : 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 3,75 ; 4 et 5. Nous avons fixé 5 comme valeur maximale pour le pH pour la dégradation des produits. La figure II.3 présente les variations de rétention obtenues dans ce domaine de pH pour 6 produits représentatifs.

Pour les composés (NA, A, DHBA, DOPA, TYR, D, S, 3-MT) dont l'état de charge ne varie pas dans le domaine de pH étudié (2,5 - 5), nous n'avons pas observé de modification importante des facteurs de rétention. Par contre, dans ce domaine de pH, l'état de charge des composés acides (DOPAC, HVA et 5HIAA) et de l'acide aminé (Trp) varie beaucoup, ce qui explique la variation plus importante des facteurs de rétention.

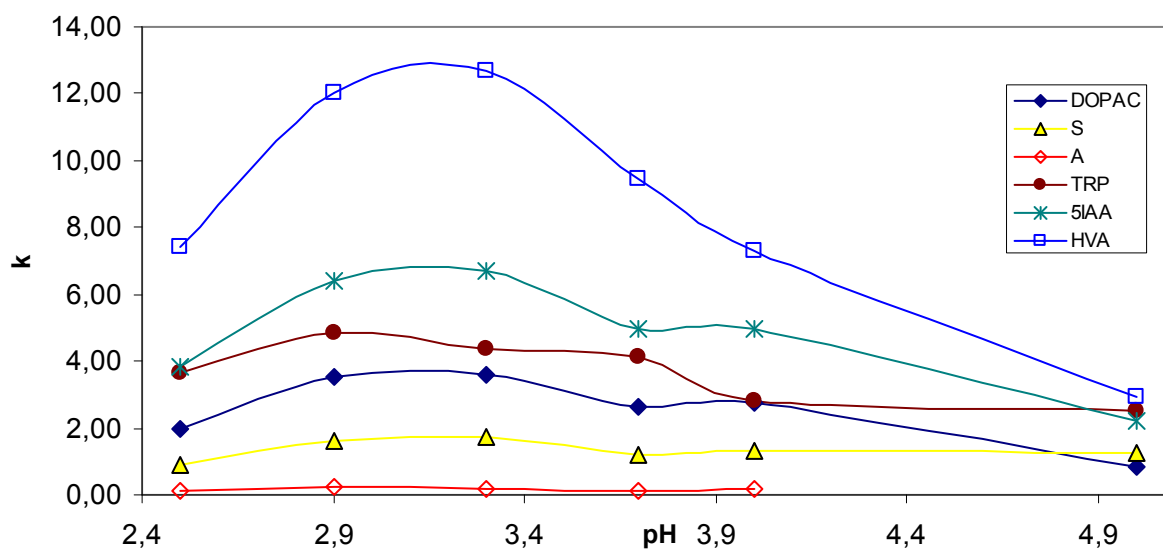


Figure II.3. Influence de la variation du pH sur le facteur de rétention

Colonne : Discovery HS C18 (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 3 µm) ; Phase mobile : MeOH / HCOONH₄ 50 mM (10/90 v/v).

III.1.3. Influence de la concentration en sels dans la phase mobile sur la rétention des analytes

Une quantité de sel trop importante dans la phase mobile peut avoir des effets négatifs sur l'abondance des ions formés en SM, mais une concentration trop faible n'est pas compatible avec la détection électrochimique. Pour trouver un compromis, nous avons étudié l'influence de la concentration en sels sur les facteurs de rétention.

Pour ces expériences, nous avons utilisé une phase mobile composée de MeOH et de formiate d'ammonium en proportion (10/90 v/v), en fixant le pH à 2,9 et en faisant varier la concentration en sel entre 10 et 100 mM. De nouveau, nous avons constaté (**figure II.4**) que pour NA, A, DHBA, DOPA, TYR, D, S, 3-MT, les facteurs de rétention restent constants quelque soit la concentration. Une diminution du facteur de rétention liée à l'augmentation de la concentration en sel est enregistrée pour les composés acides, elle est faible pour Trp, DOPAC et 5HIAA et plus importante pour HVA, cela étant dû à la diminution de la solubilité des composés avec l'augmentation de la concentration en sels dans la phase mobile.

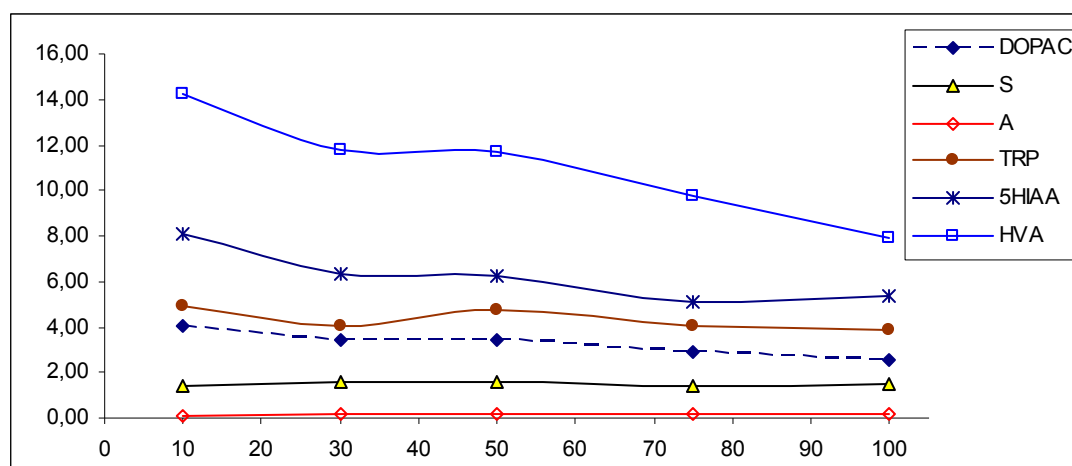


Figure II.4. Influence de la concentration en sels dans la phase mobile sur le facteur de rétention

Colonne : Discovery HS C18 (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 3 µm) ; Phase mobile : MeOH / HCOONH₄ (10, 30, 50, 75 et 100 mM) pH 2,9 (10/90 v/v).

III.1.4. Bilan des conditions d'analyse sur C18

Nous avons constaté que dans les conditions phase inverse, la rétention n'est possible que si le pourcentage de modificateur organique n'excède pas 10%. Dans ces conditions, même si plusieurs coélutions enregistrées ne posent pas de problème au niveau de la détection par spectrométrie de masse, puisque les composés coélus ont des masses molaires ou des transitions différentes, la séparation reste insuffisante pour une détection électrochimique. À la sélectivité insuffisante s'ajoute la rétention trop faible des solutés élués en premiers, qui risquent d'être masqués par des composés endogènes dans les matrices biologiques. Nous nous sommes en conséquence orientées vers un autre type de phase stationnaire.

III.2. Analyse sur support de carbone graphite poreux (PGC)

Nous avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit que le PGC est une alternative intéressante pour la séparation des catécholamines et plusieurs exemples de séparation de cette famille de molécules ont déjà été répertoriés [13-16]. Des mélanges plus ou moins complexes ont été analysés dans différentes matrices biologiques telles que le plasma [16] ou le cerveau [15]. Ce type de support qui a des propriétés rétentives si particulières a été utilisé avec différentes phases mobiles en association avec une détection UV [13,16] ou par spectrométrie de masse [15].

III.2.1. Analyse en mode isocratique

Pour nos premiers essais, nous avons repris les conditions de phase mobile (MeOH/HCOONH₄ 50 mM pH 2,9 (60/40 v/v)) décrites par Törnkvist *et al* [15], mais en divisant par 10 la concentration en sel (5 mM). Dans ces conditions, le mélange est mieux résolu que sur la colonne C18 mais il reste tout même la coélution de la paire NA/A (comme observée par Törnkvist) et de la paire DA/DHBA. Nous avons pu remarquer sur PGC des inversions d'ordre d'élution pour certains composés notamment pour les couples 3-MT, S et 5HIAA, HVA par rapport à la colonne C18.

Comme sur la colonne C18, ce sont les composés avec les log P les plus importants (HVA, DOPAC, 5HIAA) qui sont les plus retenus. Le PGC est un support plus rétentif que le C18, des augmentations importantes de rétention sont enregistrées sur PGC pour les composés acides (Tyr, DOPA, DOPAC) et pour les composés indoliques (S, Trp et 5HIAA). La rétention importante de ces composés peut s'expliquer par les particularités du PGC, qui est un support offrant des interactions fortes avec les composés anioniques et avec ceux ayant une structure plane [17,18]. Ces composés ne sont pas élués avec des phases mobiles contenant 10% de modificateur organique et même avec 60% de MeOH dans la phase mobile, les facteurs de rétention restent supérieurs à ceux observés sur C18 avec 10% de MeOH.

Pour l'élution de 5HIAA, nous avons rencontré des difficultés supplémentaires, liées au fait que ce composé possède une structure relativement plane (noyau indolique) et qu'il est sous sa forme anionique à pH 3. Des concentrations importantes en sel (100-150 mM) et un fort pourcentage de modificateur organique (plus de 60% d'ACN) dans la phase mobile sont nécessaires pour son élution (Figure II.5).

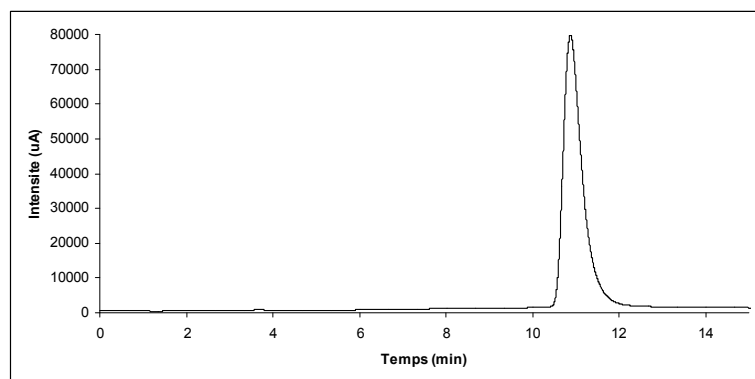


Figure II.5. Le 5HIAA à 100 µg.L⁻¹

Colonne : PGC (L x Ø = 100 x 4,6 mm, 5µm) ; Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 100 mM, pH 2,8, (70/30 v/v) ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : UV.

III.2.2. Choix du modificateur organique

En remplaçant les 60% de MeOH dans la phase mobile par 60% d'ACN, les temps de rétention (t_r) de tous les composés ont beaucoup diminué (figure II.6) ce qui entraîne la perte de séparation entre les 7 composés : A, NA, DHBA, DA, 3-MT, Tyr et DOPA, tous coélusés très proche du volume mort (figure II.7). Cette modification de phase mobile implique aussi des inversions d'ordre d'élution entre Trp et DOPAC d'une part et 3-MT et le couple Tyr, DOPA d'autre part.

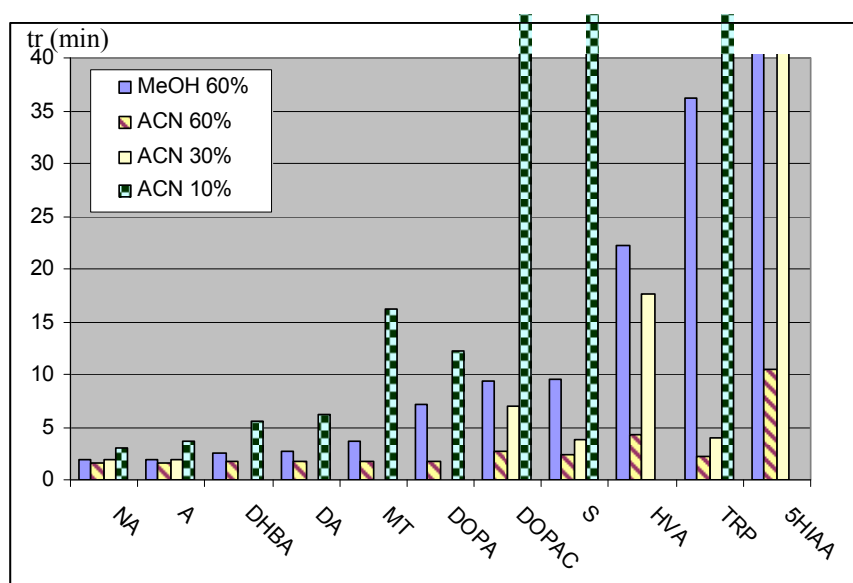


Figure II.6. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique sur la rétention des analytes

Colonne : PGC ($L \times \varnothing = 100 \times 4,6 \text{ mm}, 5\mu\text{m}$) ; Phase mobile : MeOH ou ACN et HCOONH_4 5 mM, pH 2,9 ; Débit : $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

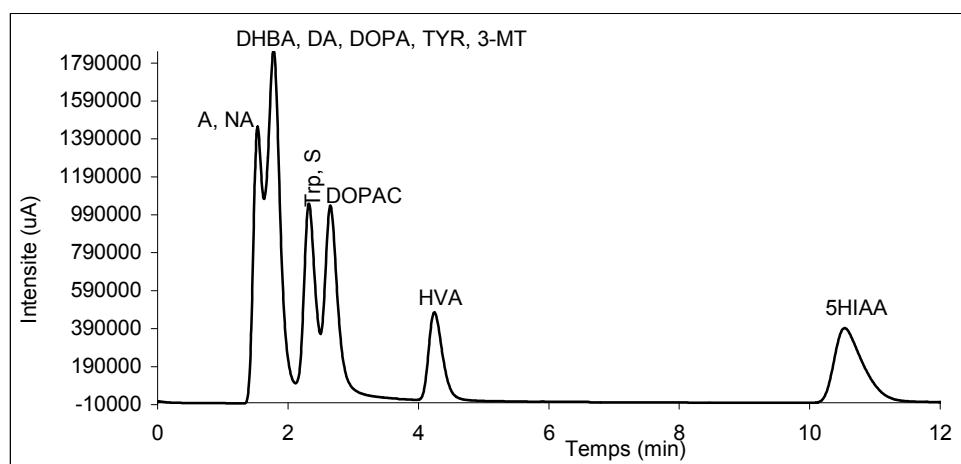


Figure II.7. Profil de séparation des catécholamines sur PGC

Colonne : PGC ($L \times \varnothing = 100 \times 4,6 \text{ mm}, 5\mu\text{m}$) ; Phase mobile : ACN/ HCOONH_4 5 mM, pH 2,8, (60/40 v/v) ; Débit : $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Détection : UV.

La figure II.6 met en évidence, qu'une diminution du pourcentage d'ACN dans la phase mobile se traduit, comme attendu, par une augmentation de t_R pour tous les analytes. Cet effet est d'autant plus important que le t_R du composé est élevé. Vu les différences très importantes entre les temps de rétention des premiers composés élués et ceux élués en dernier (les acides), un gradient d'ACN peut être envisagé pour séparer un maximum de composés tout en maintenant un temps d'analyse raisonnable.

III.2.3. Analyse en mode gradient

Pour faciliter la sortie des composés trop retenus (S, Trp, 5HIAA), nous avons augmenté la concentration en sel dans la phase mobile initiale ainsi que la teneur en ACN durant le gradient.

La figure II.8 présente la séparation optimale que l'on peut obtenir en gradient d'éluion sur PGC. Si une bonne séparation de NA, A, DA, DHBA, TYR, DOPA et 3-MT peut être réalisée en 12 min, la séparation entre S et Trp n'est pas totale (pas de retour à la ligne de base). De plus, dans ces conditions, le DOPAC donne un pic déformé, très large et confondu dans la dérive de la ligne de base. Quant au 5HIAA, il reste non-élué dans ces conditions.

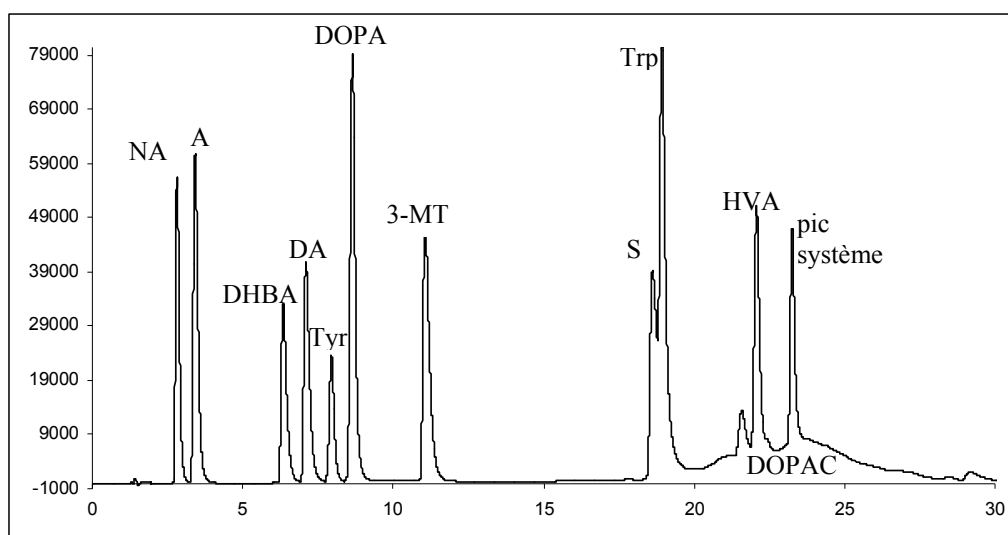


Figure II.8. Séparation des catécholamines sur PGC en gradient

Colonne : PGC (L x Ø = 100 x 4,6 mm, 5µm) ; Phase mobile : A : ACN/HCOONH₄ 50 mM pH 3 (10/90 v/v), B : ACN/HCOONH₄ 100 mM pH 3 (70/30 v/v) selon le gradient suivant : de 0 à 30% de B en 15 min, de 30 à 100% de B en 5 min et maintenue à 100% B pendant 5 min puis à 0% B pour le rééquilibrage ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : UV.

Le gradient d'élution, en plus de permettre la séparation des solutés les moins retenus, offre la possibilité de réduire les coélutions de ces solutés avec ceux indésirables présents dans la matrice en introduisant initialement un palier initial dont la composition serait inférieure à 10 %.

III.2.4. Bilan des conditions d'analyse sur PGC

Par rapport à la silice greffée C18, une plus forte rétention et une meilleure séparation des analytes sont obtenues sur PGC. Des phases mobiles plus riches en modificateur organique sont nécessaires pour l'élution des composés sur cette colonne ce qui présente un avantage pour la détection en SM (meilleure sensibilité).

Les différences importantes de rétention entre les premiers et les derniers analytes élués en mode isocratique nous ont obligés à mettre au point des gradients d'élution. En gradient ACN/HCOONH₄, nous avons obtenu pour la première fois une séparation entre la NA et l'A. Sept analytes (NA, A, DA, DHBA, TYR, DOPA et 3-MT) sur les 12 sont séparés en 12 min. En revanche, la séparation entre S et Trp ou l'élution de 5HIAA dans des délais acceptables (moins de 40 min) n'ont pas pu être obtenues par cette méthode. De plus, la déformation importante du pic chromatographique associé au DOPAC nous a conduit à l'abandon de cette méthode d'analyse. Le couplage de ce système à la SM ne sera pas envisagé.

III.3. Analyse sur colonnes perfluorées

Les colonnes pentafluoro phényle (PFP) sont réputées être des colonnes offrant des sélectivités complémentaires de celles des supports C18, C8 et phényle. Elles sont constituées d'un groupement pentafluoro phényle lié à la silice par une chaîne alkyle, le plus souvent propyle (Figure II.9). Elles offrent plusieurs types d'interaction pour la rétention des composés : reconnaissance stérique, interactions électrostatiques, liées aux doublets électroniques des atomes de fluor et interactions π - π , liées à la présence des noyaux aromatiques [19].

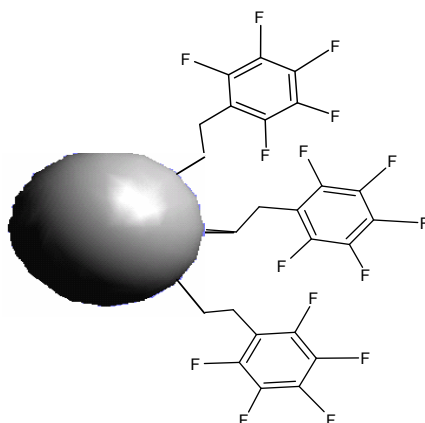


Figure II.9. Représentation schématique d'une phase stationnaire PFP

Les supports PFP sont recommandés pour la séparation des composés aromatiques, tels les hydroquinones et des composés aromatiques basiques d'intérêt pharmaceutique [20,21]. Des séparations de catécholamines sont présentées par différents fabricants des colonnes PFP [22,23]. Pour exemple, la Figure II.10 présente la séparation isocratique de 5 catécholamines : NA, DOPA, A, Tyr et DA sur la colonne Allure PFP Propyl avec une phase mobile constituée d'une solution aqueuse de phosphate d'ammonium 50 mM pH 3.

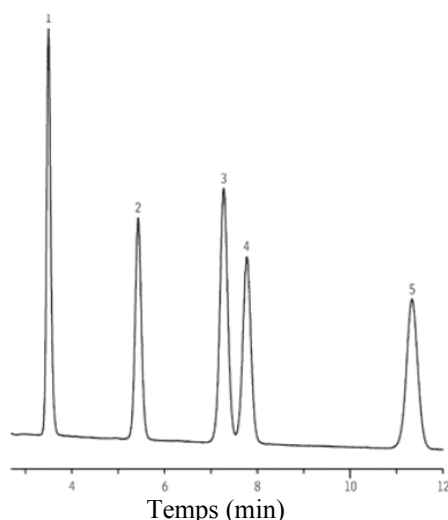


Figure II.10. Séparation de NA (1), DOPA (2), A (3), Tyr (4) et DA (5) sur une colonne PFP [22]

Colonne : Allure PFP Propyl (L x Ø= 150 x 4,6 mm, 5 µm) ; Phase mobile : Phosphate d'ammonium 50 mM, pH 3. Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : UV à 266 nm.

En partant de cet exemple, nous avons adapté la phase mobile pour avoir des conditions compatibles avec la SM, c'est à dire remplacement du phosphate d'ammonium par

l'acétate d'ammonium pour obtenir une phase mobile volatile et aussi ajout d'ACN ou de MeOH dans la phase mobile pour améliorer la stabilité du spray.

III.3.1. Influence de la nature et du pourcentage du modificateur organique

Bell et Jones [24,25] ont remarqué que pour l'analyse de composés basiques d'intérêt pharmaceutique, les colonnes de type PFP montrent de la rétention en présence aussi bien de faibles que de forts pourcentages de modificateur organique dans la phase mobile. Des mécanismes de type phase inverse et de type phase normale sont respectivement mis en œuvre selon la valeur (faible ou élevée) du pourcentage de solvant organique. La combinaison de ces deux mécanismes est à l'origine d'une relation en forme de « U » liant la rétention et le pourcentage de modificateur organique. Sur la colonne Pursuit PFP, que nous avons utilisée, nous n'avons pas pu mettre en évidence ce type de comportement vis-à-vis des catécholamines. On n'observe pas de rétention de ces solutés au fort pourcentage de modificateur organique (MeOH et ACN), seul un mécanisme de type phase inverse est constaté. Nous avons donc travaillé avec des phases mobiles riches en solutions aqueuses, caractéristiques des séparations de composés polaires en phase inverse.

La rétention reste faible quand l'ACN est utilisé comme modificateur organique dans la phase mobile, même à faible pourcentage (10%) (Figure II.11). La séparation des composés est insuffisante puisque la moitié des composés (NA, DOPA, A, DHBA, DA et Tyr) sont coélus au voisinage du volume mort. L'utilisation du MeOH à la place de l'ACN a pour effet une augmentation importante (2 à 5 fois) des facteurs de rétention de tous les composés et s'accompagne d'une amélioration de la sélectivité (Figure II.11). Le MeOH est donc le modificateur organique qui est le plus intéressant pour la suite de notre étude.

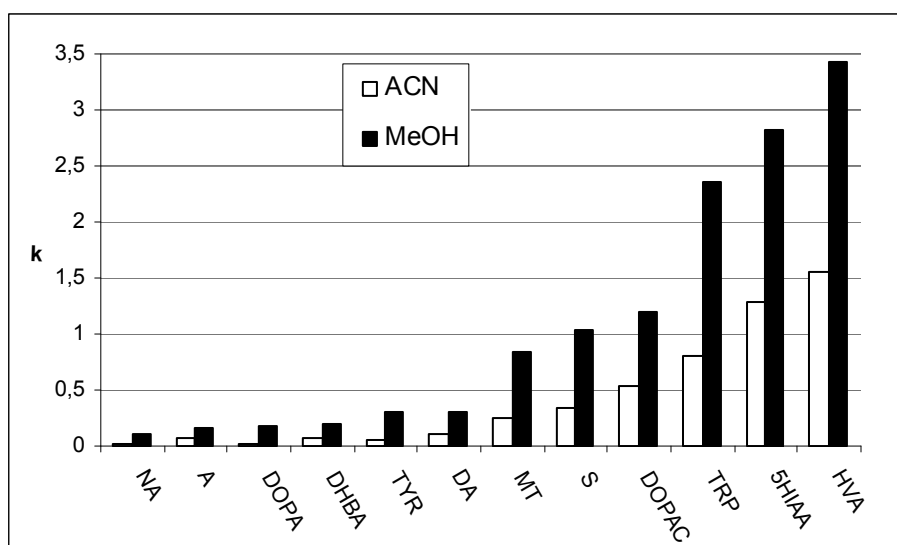


Figure II.11. Influence de la nature du modificateur organique sur les facteurs de rétention des catécholamines

Colonne : Pursuit PFP (L x Ø= 150 x 2,1 mm, 5 µm) ; Phase mobile : ACN ou MeOH et CH₃COONH₄ 20 mM, pH 2,9, (10/90 v/v).

Nous vérifions sur la figure II.11 que les catécholamines sont éluées selon un ordre croissant de log P, comme attendu en RPLC.

Sachant que nous nous sommes fixées un seuil minimum de 10% de solvant organique dans la phase mobile, il reste à étudier l'influence de la nature du sel et de sa concentration dans la phase mobile pour essayer d'améliorer nos séparations.

III.3.2. Influence de la concentration et de la nature du sel

Nous avons étudié l'influence sur la rétention de 4 sels différents : le citrate de sodium, le dihydrogénophosphate d'ammonium, le dihydrogénophosphate de sodium et l'acétate d'ammonium, afin de vérifier si des interactions électrostatiques intervenaient ou non dans le mécanisme de rétention des catécholamines sur le support PFP. Le choix de ces sels a été fait de sorte à modifier leur partie cationique (Na⁺ et NH₄⁺) et leur partie anionique (dihydrogène phosphate, citrate et acétate).

Comme nous pouvons l'observer sur la figure II.12, la nature du sel introduit à la concentration de 10 mM n'a pas d'influence sur l'ordre d'éluion mais modifie la rétention des catécholamines. Parmi les 4 sels étudiés, 3 ont des forces d'éluion comparables (citrate de sodium, dihydrogénophosphate d'ammonium et dihydrogénophosphate de sodium) et un se distingue (acétate d'ammonium) en étant nettement plus éluant pour tous les composés. Pour les trois composés acides (DOPAC, HVA et 5HIAA), la rétention la plus importante est

obtenue avec le dihydrogénophosphate d'ammonium et pour le reste des composés avec le citrate du sodium. Entre un sel d'ammonium et un sel de sodium (dihydrogénophosphate), les différences de rétention ne sont pas très significatives et ne permettent pas de quantifier l'importance de la part des interactions électrostatiques exercées par les fluors dans le mécanisme de rétention des catécholamines sur PFP.

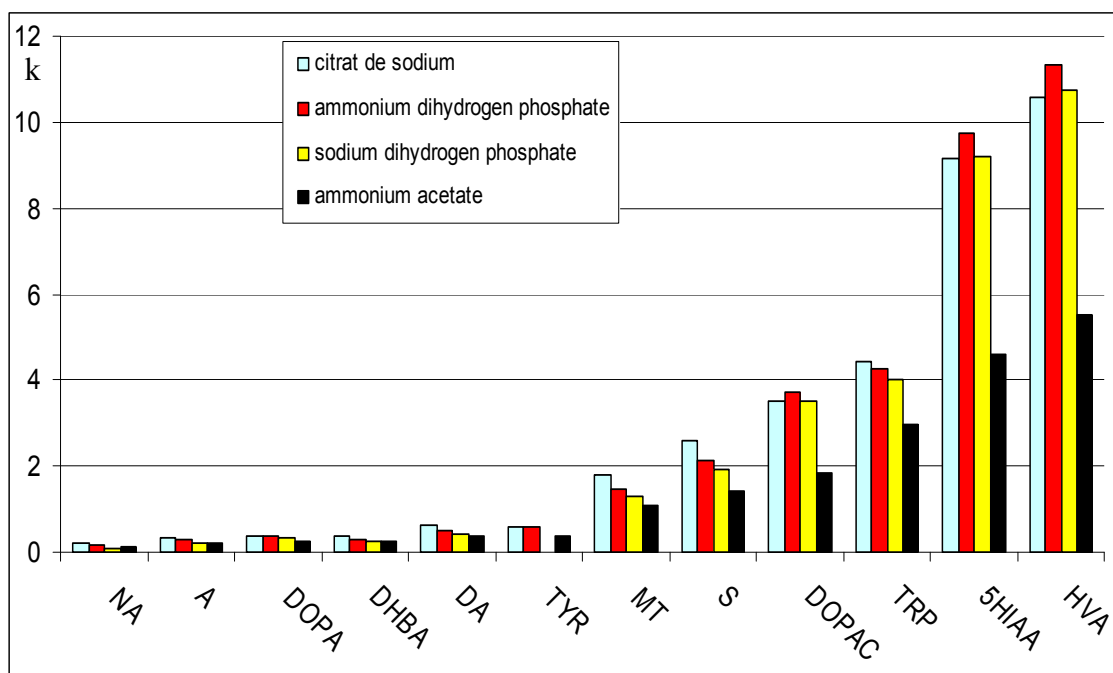


Figure II.12. Influence de la nature du sel sur la rétention des catécholamines

Colonne : Pursuit PFP (L x Ø= 150 x 2,1 mm, 5 µm) ; Phase mobile : MeOH/ tampon 10 mM, pH 3, (10/90 v/v).

L'influence de la concentration en sel dans la phase mobile a été étudiée pour deux sels : le dihydrogénophosphate de sodium et l'acétate d'ammonium. Si, pour le dihydrogénophosphate de sodium, il n'y a pas de différences significatives entre les facteurs de rétention des composés aux différentes concentrations étudiées (5, 10, 20 et 50 mM) (Figure II.13 a.), pour l'acétate d'ammonium, on observe une augmentation de la rétention avec la diminution de la concentration en sel dans la phase mobile (Figure II.13 b.). Le même phénomène a été rapporté par Bell *et al* [25] dans le cas de l'analyse de composés de la famille de l'éphédrine et en présence d'acétate d'ammonium dans la phase mobile.

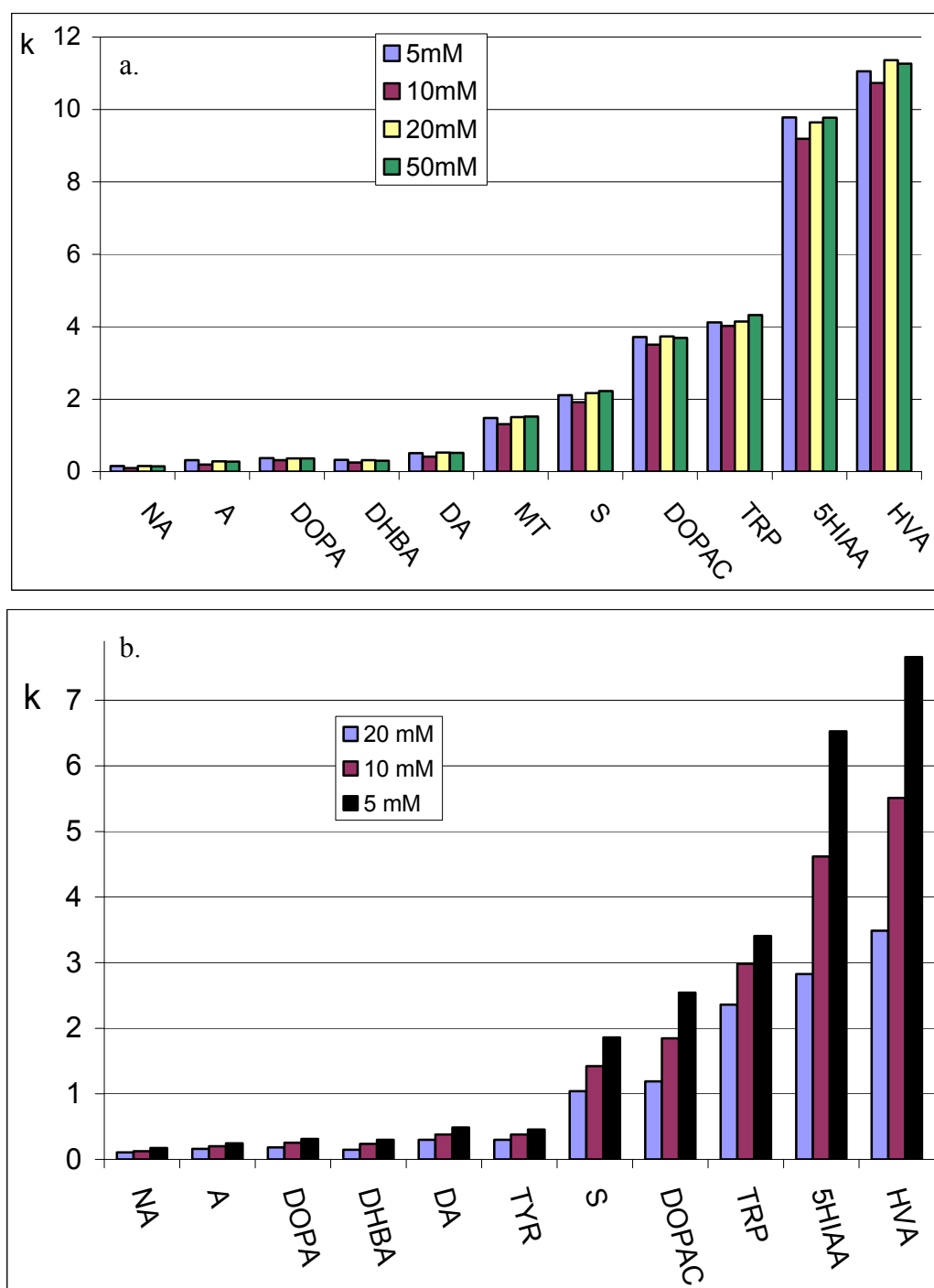


Figure II.13. Influence de la concentration en sel sur la rétention des catécholamines
 Colonne : Pursuit PFP (L x Ø= 150 x 2,1 mm, 5 µm) ;
 Phase mobile : a. MeOH/ NaH₂PO₄ pH 3, (10/90 v/v).
 b. MeOH/ CH₃COONH₄ pH 3, (10/90 v/v).

La meilleure séparation obtenue sur le support PFP correspond à l'utilisation en isocratique d'une phase mobile MeOH/CH₃COONH₄ 10 mM, pH 2,9 (10/90 v/v) (Figure II.14). On peut constater sur la figure que les pics chromatographiques pour tous les composés ne sont pas symétriques avec une trainée plus ou moins importante selon la rétention. Aucune

amélioration de la symétrie des pics n'est observée en changeant la nature du sel ou sa concentration.

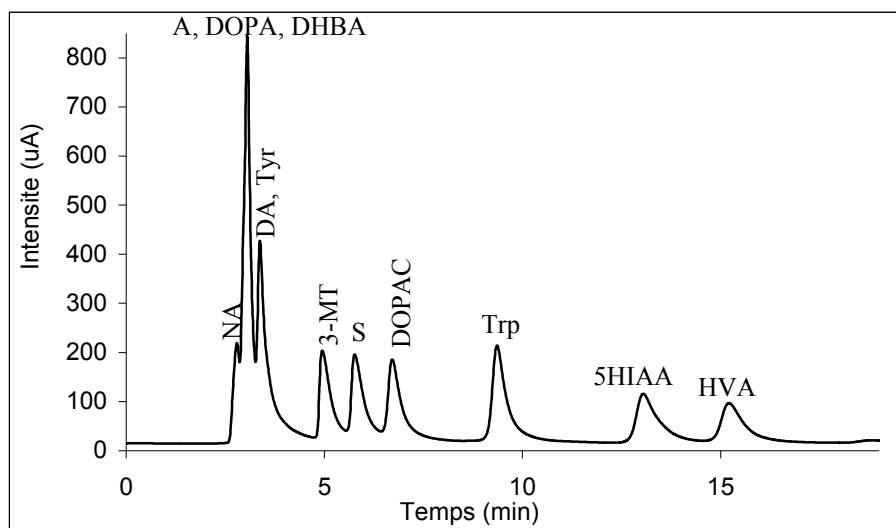


Figure II.14. Séparation des catécholamines sur la colonne Pursuit PFP

Colonne : Pursuit PFP (L x Ø= 150 x 2,1 mm, 5 µm) ; Phase mobile : MeOH/CH₃COONH₄ 10 mM, pH 2,9, (10/90 v/v) ; Débit : 0,2 mL.min⁻¹ ; Détection : UV

III.3.3. Influence de la température

L'influence de la température sur la séparation a été réalisée avec une phase mobile composée de 10% MeOH et de 90% NaH₂PO₄ 10 mM, pH 3 et la colonne a été thermostatée aux températures suivantes : 15°, 25°, 35°, 45° et 50°C.

La figure II.15 met en évidence une diminution de la rétention avec l'augmentation de la température. La décroissance linéaire de $\ln(k)$ avec l'inverse de la température exprimée en kelvins (K) démontre un comportement typique de rétention en mode phase inverse. A l'aide de l'équation de Van't Hoff (équation II.1) et du graphique $\ln(k)$ en fonction de la température, on peut calculer l'enthalpie de transfert du soluté de la phase mobile vers la phase stationnaire car le rapport $\Delta H^\circ/R$ de chaque composé est égal à l'opposé de la pente de la droite.

$$\ln k = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi \quad (II.1)$$

k = facteur de rétention ;

ΔH° = enthalpie ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$);

ΔS° = entropie ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$);

T = température (K) ;

R = constante des gaz ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$);

Φ = rapport des phases (volume de la phase stationnaire /volume de la phase mobile).

Comme les pentes des droites pour nos composés sont positives, nous obtenons des enthalpies négatives ce qui veut dire que les composés ont plus d'affinité pour la phase stationnaire que pour la phase mobile.

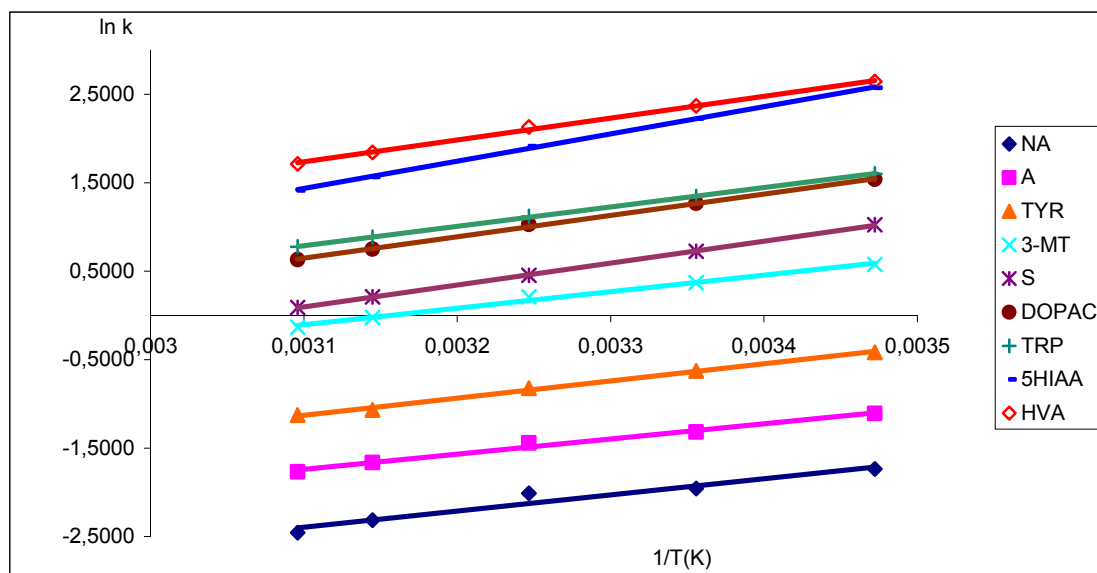


Figure II.15. Influence de la température sur la rétention des catécholamines

Colonne : Pursuit PFP (L x Ø= 150 x 2,1 mm, 5 µ) ; Phase mobile : MeOH/ NaH₂PO₄ 10 mM, pH 3, (10/90 v/v).

III.3.4. Bilan des séparations sur colonne perfluorée

Les résultats obtenus sur cette colonne ne sont pas satisfaisants car les premiers composés élués (NA, A, DOPA) sortent trop proches du volume mort ce qui ne permet pas d'éviter des interférences probables dans cette zone d'éluion avec des composés endogènes de la matrice lors de l'analyse par SM d'échantillons biologiques. La non-résolution entre

NA, A, DOPA, DHBA, DA et Tyr rend impossible leurs identification et quantification par électrochimie.

La non-symétrie des pics chromatographiques et leurs trainées n'ayant pas pu être supprimées, ni par la modification de la concentration en sel de la phase mobile, ni par l'augmentation de la température, les essais sur la colonne perfluorée n'ont pas été poursuivis.

III.4. Analyse sur colonne mixte mode (Stability IP)

Nous avons pu voir dans le premier chapitre que des séparations satisfaisantes peuvent être obtenues pour les catécholamines porteuses d'une charge positive (DA, NA, A, 3-MT et DHBA) par chromatographie d'échange de cations [26], alors que ces mêmes composés sont peu retenus et élués en premier en mode phase inverse. Le mode échange de cations n'est cependant pas adapté pour des séparations de mélanges contenant à la fois des produits positivement chargés et négativement chargés, tels que DOPAC, HVA et 5HIAA. Malgré tout, ces derniers analytes sont ceux qui ont les plus fortes rétentions en RPLC. Dans cette optique, nous avons voulu tester les colonnes de type « mode mixte » qui offrent la possibilité d'avoir simultanément des interactions de types échangeur de cations et phase inverse. Les premiers résultats présentés par H. Luo *et al* [27] pour la séparation d'un mélange de 9 catécholamines contenant à la fois des composés aminés et des composés acides sur la colonne mode mixte Primsep 200 sont prometteurs.

Nous avons à notre disposition une colonne Stability IP qui est une colonne de type silice greffée phase inverse avec un groupement acide incorporé dans le greffage (Figure II.16.). Ce dernier est responsable de la rétention des cations par un mécanisme complémentaire d'échange d'ions.

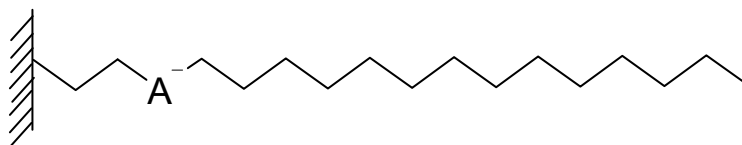


Figure II.16. Représentation du greffon de la colonne Stability IP

III.4.1. Influence de la nature et pourcentage du modificateur organique

La figure II.17 illustre le comportement très particulier du support Stability IP par rapport aux supports classiques de la phase inverse. L'ordre de rétention est complètement

modifié. Les composés acides (DOPAC, HVA et 5HIAA) qui étaient les plus retenus sur les colonnes précédemment étudiées sont maintenant élués en début de chromatogramme avec une séparation insuffisante dans des conditions de phase mobile ACN/formiate d'ammonium 20 mM (10/90 v/v). Cette faible rétention peut s'expliquer en partie par un effet de répulsion électrostatique entre ces composés chargés négativement et la charge portée par le greffon du support. À l'opposé, les composés positivement chargés (S et 3-MT) sont les plus retenus ce qui confirme des interactions complémentaires par rapport à un mécanisme simple de type RPLC. Parmi les 3 acides aminés du mélange, le Trp est le soluté le plus hydrophobe et celui qui a la rétention la plus élevée, mettant ainsi en évidence qu'un mécanisme de rétention de type phase inverse intervient également sur ce support. Ces interactions hydrophobes sont confirmées par l'augmentation de la rétention de tous les composés avec la diminution du pourcentage d'ACN (de 10% à 5%) dans la phase mobile.

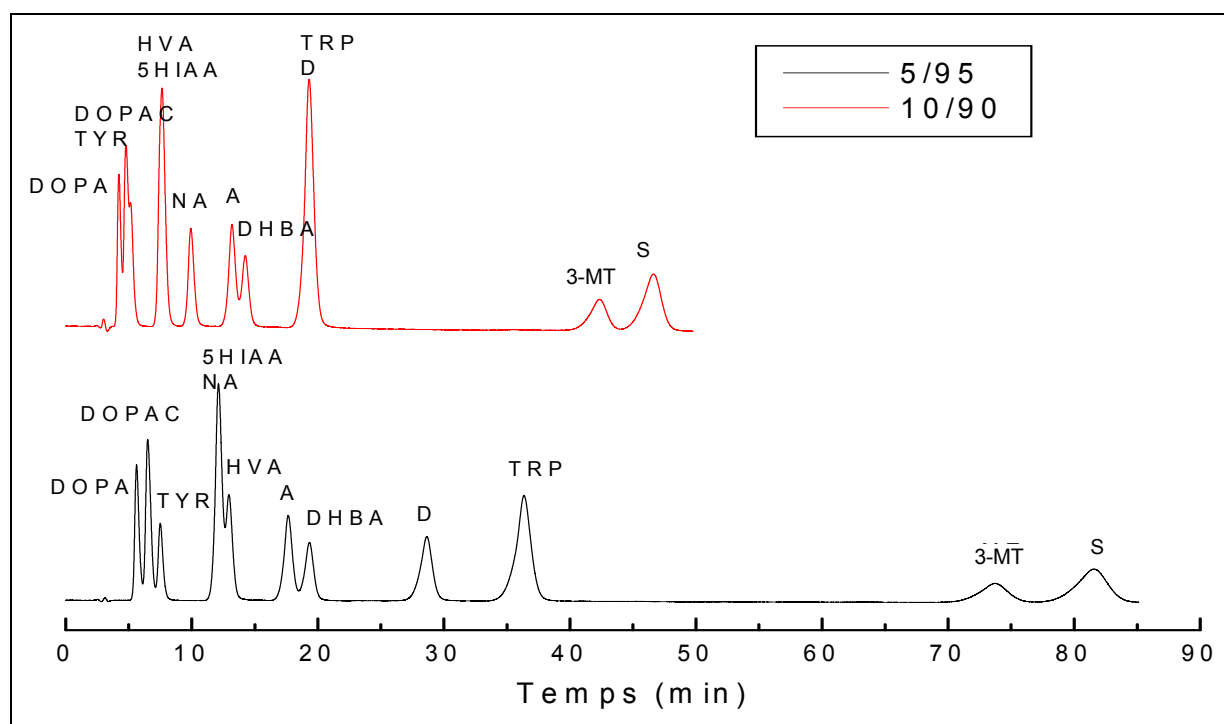


Figure II.17. Influence du pourcentage d'ACN sur la séparation des catécholamines

Colonne : Stability IP (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 5µm); Phase mobile : ACN / HCOONH₄ pH 3 (20 mM), (10/90 et 5/95 v/v); Débit : 0,2 mL.min⁻¹; Détection : UV.

La Figure II.18.a met en évidence que sur cette colonne, l'ACN a un pouvoir éluant plus important que le MeOH, ce qui a été précédemment observé en phase inverse (C18, PGC et PFP). De même, une augmentation de la rétention est enregistrée avec la diminution du pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile (Figure II.18.b).

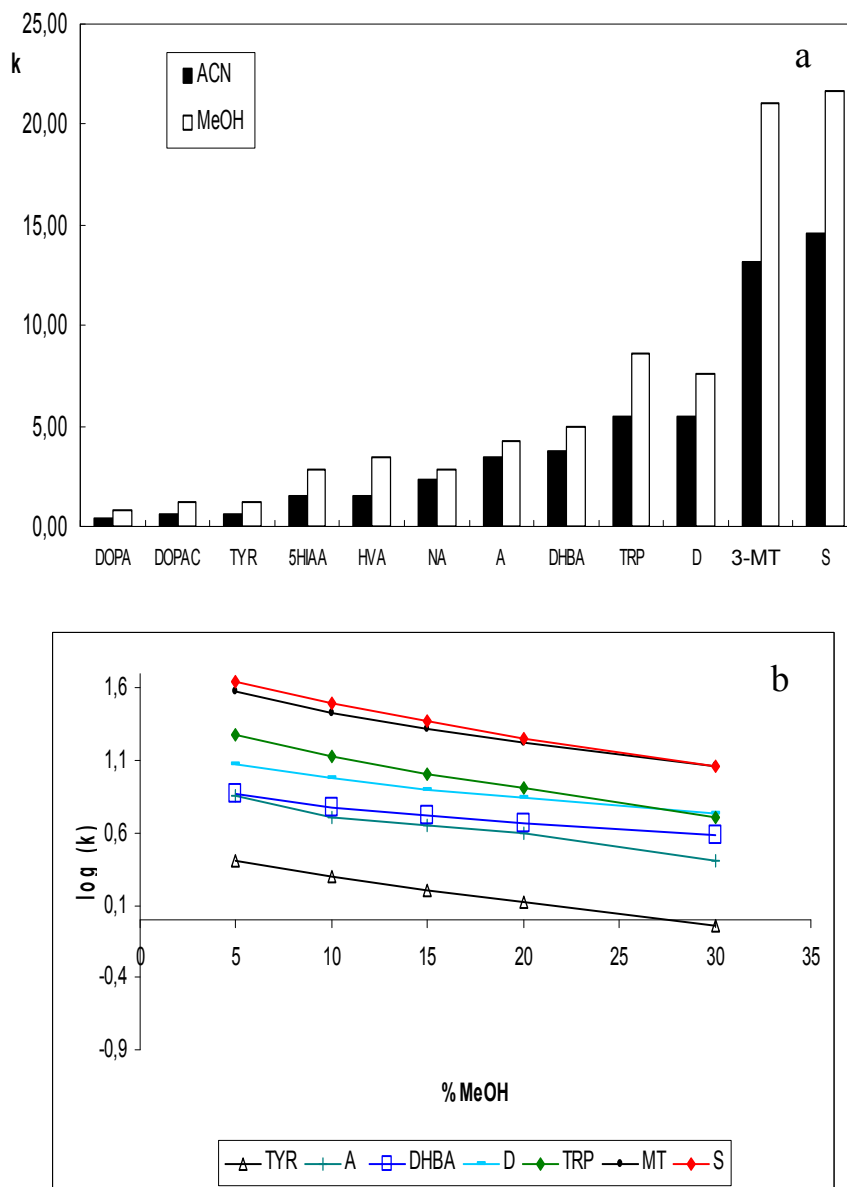


Figure II.18. Influence de la nature du modificateur organique sur la rétention des catécholamines

Colonne : Stability IP (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 5µm) ;

Phase mobile : a. ACN ou MeOH / HCOONH₄ 20 mM, pH 3 (20/80 v/v).

b. MeOH / HCOONH₄ 20 mM, pH 3

Pour la suite des manipulations, le MeOH sera préféré comme modificateur organique afin d'avoir une rétention plus importante qui nous donnera plus de souplesse pour l'optimisation des paramètres suivants.

III.4.2. Influence de la concentration et de la nature du sel

Une augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile conduit à des effets différents selon l'analyte. Si les facteurs de rétention des acides (DOPAC, 5HIAA, HVA) varient très peu avec la concentration, pour les autres analytes qui ont des amines dans leurs structures, la rétention diminue avec l'augmentation de la force ionique de la phase mobile, comme attendu lorsque la rétention est gouvernée par un mécanisme de type échange d'ions (figure II.19). Cette différence de comportement entraîne un ordre d'élution qui est dépendant de la concentration en sel et on peut donc jouer sur la force ionique de la phase mobile pour moduler la sélectivité entre les composés en fonction des besoins lors de l'analyse des échantillons biologiques.

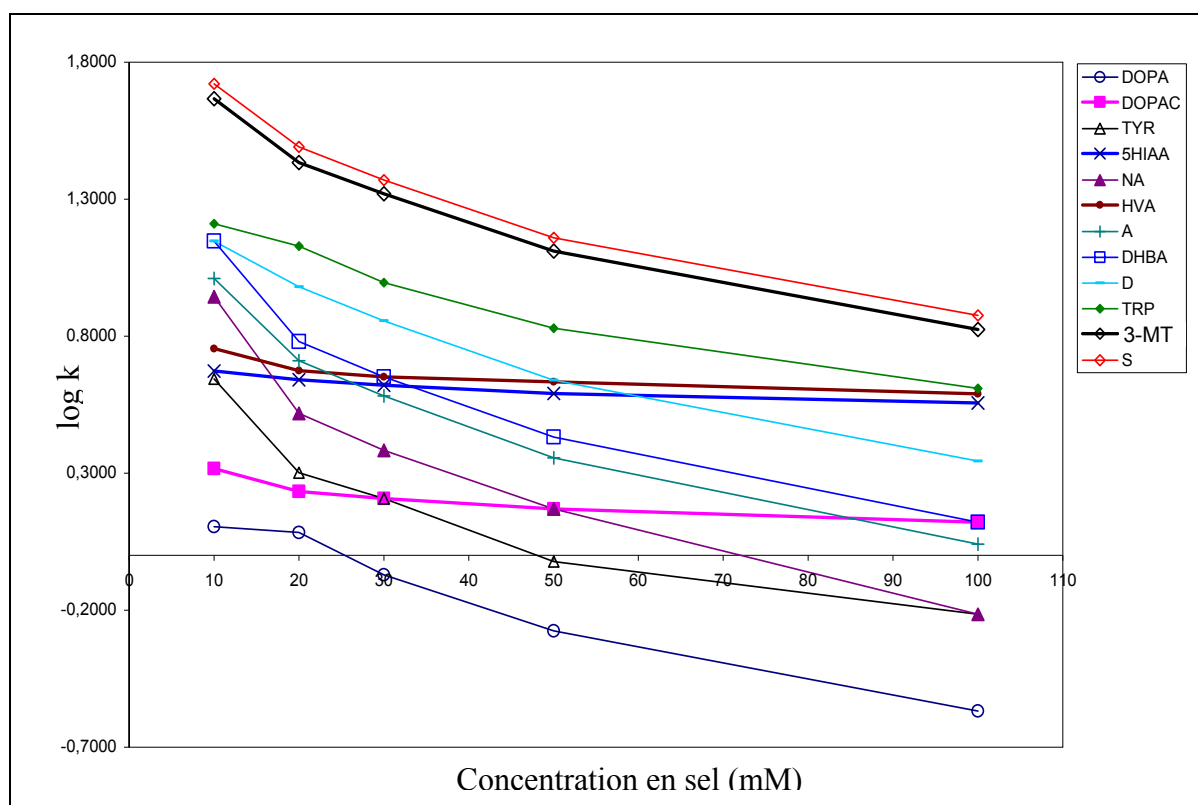


Figure II.19. Influence de la concentration en sel dans la phase mobile sur la rétention des composés

Colonne : Stability IP (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 5µm); Mobile phase : MeOH/HCOONH₄ pH 3,0 (10:90, v/v).

Quand on remplace le formiate d'ammonium par l'acétate de sodium, les effets sur la rétention ne sont pas les mêmes selon l'analyte (figure II.20). On observe deux tendances contraires :

- pour les composés acides et les 3 acides aminés (DOPA, DOPAC, HVA, 5HIAA et Trp), la rétention diminue en présence de NaCH_3COO .
- pour les composés aminés (NA, A, DA, S, 3-MT et DHBA) chargés positivement, le sel de sodium est moins éluant que le sel d'ammonium. On retrouve l'effet attendu en échange de cations, avec l'ion ammonium plus éluant que l'ion sodium.

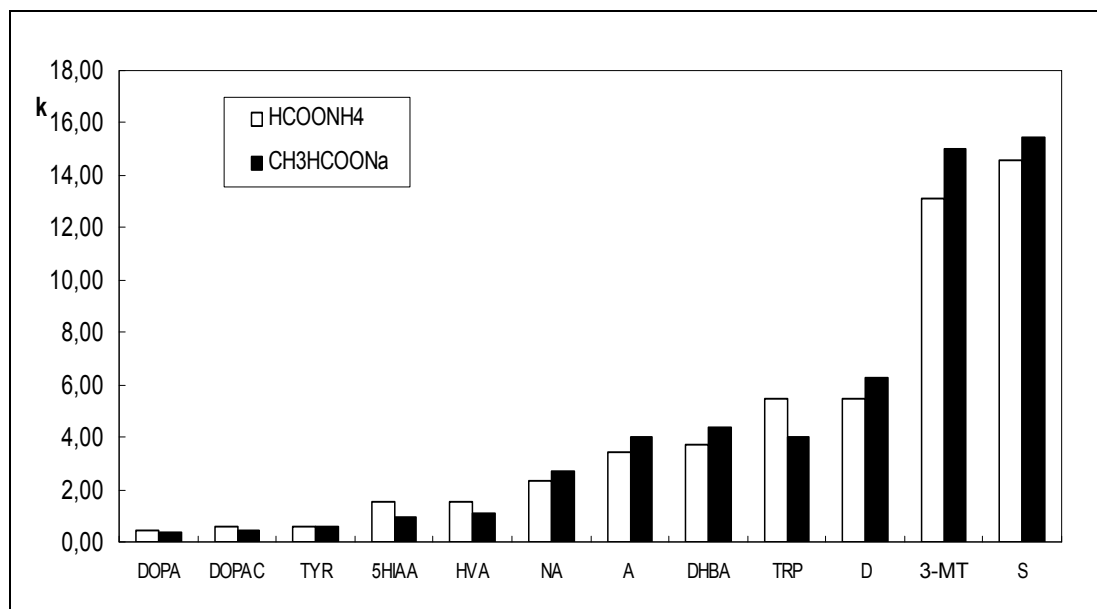


Figure II.20. Influence de la nature du sel sur la rétention des catécholamines

Colonne : Stability IP (L x Ø = 150 x 2,1 mm, 5µm) ; Phase mobile : ACN/ solution saline pH 3, 20 mM, (10/90 v/v).

Pour la suite, nous avons choisi d'utiliser, du fait de sa volatilité, le formiate d'ammonium comme sel dans la phase mobile à une concentration de 20 mM.

III.3.3. Optimisation du gradient d'éluion

Les différences importantes entre les facteurs de rétention des solutés, qui vont de la valeur 1,5 pour DOPA à 31 pour S (pour une phase mobile MeOH/HCOONH₄ 20mM, pH 3, (10/90 v/v)) impose la mise au point d'un gradient d'éluion, afin de diminuer le temps total d'analyse tout en gardant la séparation des premiers composés.

La bonne séparation des composés obtenue en début de chromatogramme avec une phase mobile MeOH/HCOONH₄ 20mM, pH 3, (10/90 v/v) (éluant A) (Voir Figure II.21) nous a conduit à choisir comme conditions initiales du gradient un palier de 5 min à cette composition avant d'augmenter le pourcentage de MeOH. La figure II.22 montre les meilleures conditions de gradient obtenues sur le support Stability IP.

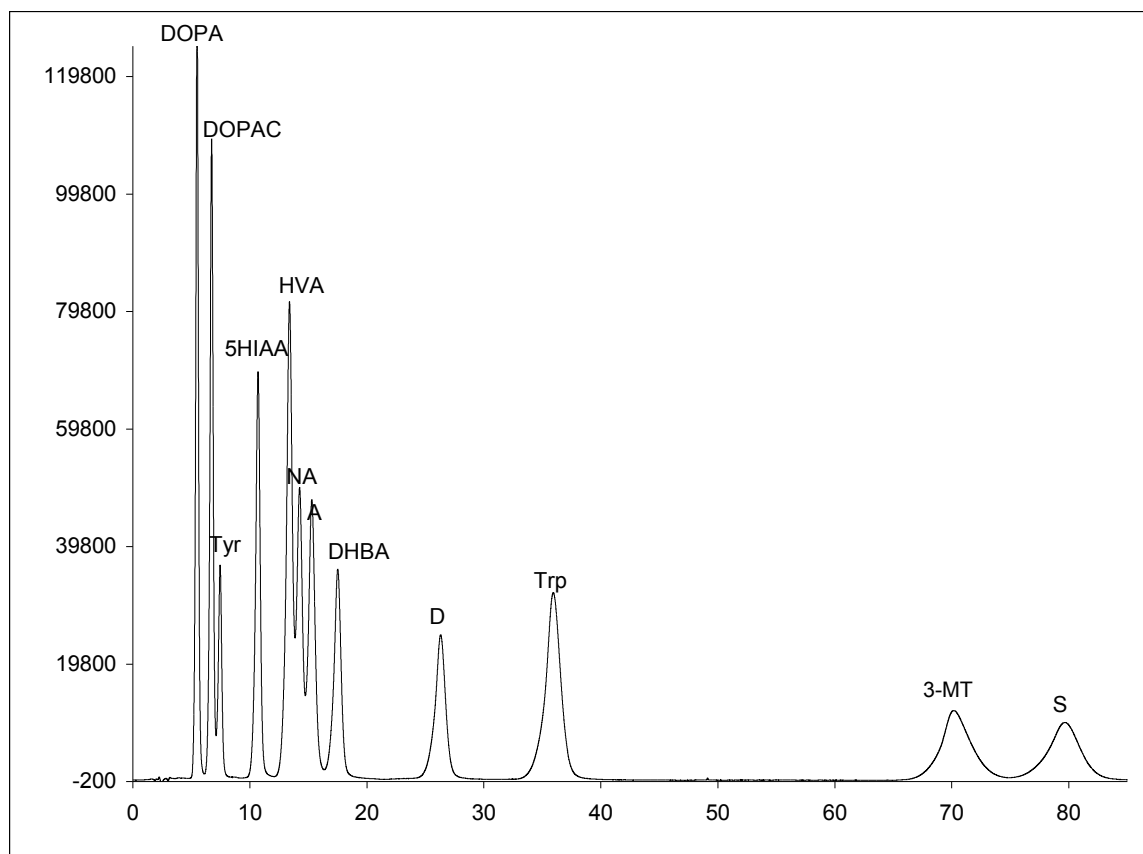


Figure II.21. Séparation des catécholamines sur la colonne Stability IP

Colonne : Stability IP (L x Ø= 150 x 2,1 mm) ; Phase mobile : MeOH / HCOONH₄ 20mM pH 3 (10/90 v/v) ; Débit : 0,2 mL.min⁻¹ ; Détection : UV

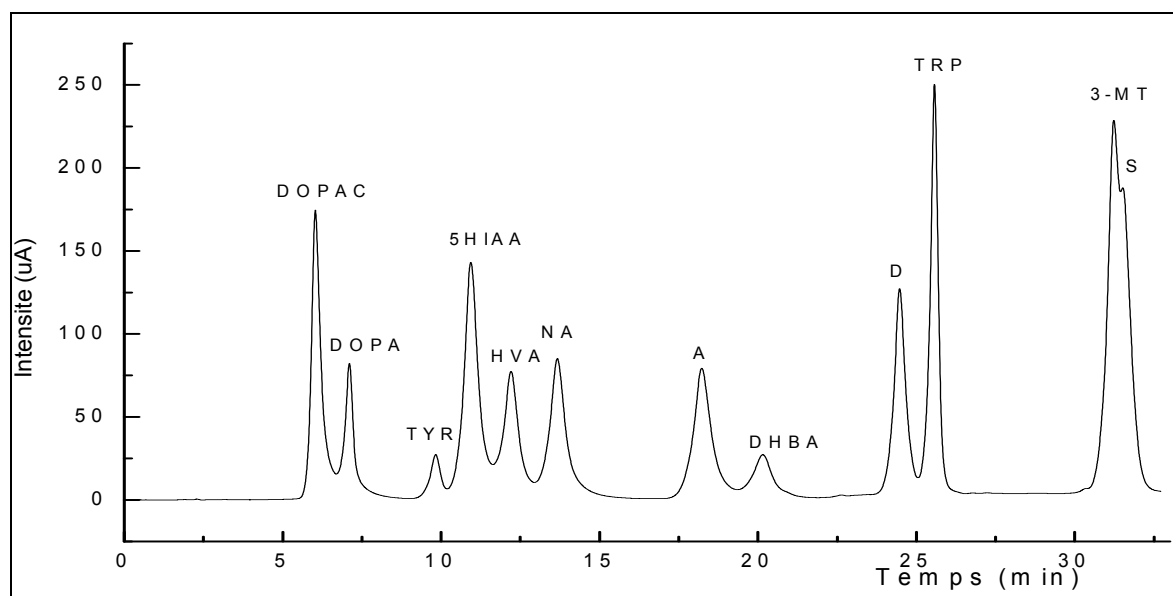


Figure II.22. Séparation des catécholamines en gradient

Colonne : Stability IP (L x Ø= 150 x 2,1 mm) ; Phase mobile : A : MeOH/HCOONH₄ 20 mM, pH=3 (10/90 v/v) et B : MeOH/HCOONH₄ 20 mM, pH 3, (50/50 v/v), avec 100% A de 0 à 5 min, suivi par une montée à 20% de B en 10 min et puis en 2 min à 70% de B et maintenue pour 8 min ; Détection : UV

III.4.4. Bilan sur les séparations en mode mixte

Une nouvelle sélectivité est obtenue sur cette colonne par rapport aux colonnes phase inverse classiques (PGC et C18) car un mécanisme supplémentaire de rétention, l'échange de cations, est disponible sur ce support.

Pour la première fois, une bonne séparation des composés de notre mélange est obtenue, à l'exception de la paire 3-MT/S, sur la colonne mode mixte Stability IP avec un gradient d'élution. Le gain de temps apporté par le gradient est très important, la durée de l'analyse est réduite de moitié par rapport à l'analyse isocratique.

Le couplage de ce système avec la SM doit pouvoir être une solution pour l'analyse du mélange des 12 catécholamines. La faible résolution de la paire 3-MT/S n'est pas un problème pour la détection en spectrométrie de masse puisque ces deux composés n'ont pas la même masse molaire et ne fragmentent pas de la même façon. Cependant, c'est un système qui ne sera pas adapté pour une quantification avec un détecteur électrochimique.

III.5. Conclusions sur les séparations en mode phase inverse

Dans cette première partie du chapitre II, nous avons présenté les méthodes que nous avons mises au point pour la séparation des catécholamines en mode phase inverse. Nous avons étudié l'influence des différents paramètres sur la séparation des catécholamines tels que la nature de la phase stationnaire, la nature et le pourcentage de solvant organique, la nature et la concentration en sel dans la phase mobile, le pH ou la température.

Nous avons pu voir que sur les supports typiquement utilisés pour ce mode chromatographique, les silices C18 et le PGC, une séparation de tous les analytes n'a pas pu être obtenue en mode d'élution isocratique. De meilleurs résultats en termes de séparation sont obtenus en mode gradient d'élution sur la colonne PGC, mais la mauvaise efficacité observée pour certains solutés (DOPAC) et l'élution non-reproductible de 5HIAA nous ont conduit à ne pas poursuivre les analyses sur ces colonnes.

La colonne fluorée de type PFP n'a pas apporté, elle non plus, la séparation désirée pour les composés de notre mélange. Encore une fois, la non-symétrie des pics chromatographiques, sans amélioration possible par augmentation de la concentration en sel dans l'éluant ou par modification de la température de la colonne, ne nous permet pas d'envisager le couplage de ce système avec la SM.

La colonne mode mixte, Stability IP, est la seule qui nous a permis l'obtention d'une séparation complète, en 30 minutes, de 10 de nos 12 composés en gradient d'élution. Le début de séparation entre les deux derniers composés (S et 3-MT) nous permettra au moins une analyse qualitative de ces composés en électrochimie. Par contre, en spectrométrie masse, la quantification de tous les composés sera possible car S et 3-MT ont des masses molaires différentes. Le couplage de ce système avec la SM est donc envisageable.

Dans la deuxième partie de ce chapitre nous allons présenter les résultats plus prometteurs que nous avons obtenus en chromatographie d'appariement d'ions.

IV. Séparation des catécholamines par chromatographie liquide d'appariement d'ions

Nous avons vu dans le chapitre I de ce mémoire que la chromatographie d'appariement d'ions représente une alternative intéressante pour la séparation des composés ionisables et est très développée pour l'analyse des catécholamines. Les agents d'appariement d'ions les plus utilisés sont les acides 1-octane et 1-décane sulfoniques [28-32]. L'inconvénient majeur de ces produits est leur manque de volatilité qui les rend incompatibles avec la détection par spectrométrie de masse. Les agents d'appariement d'ions volatils de la famille des acides perfluorés ou de la famille des «n» alkylamines constituent une alternative possible pour les détecteurs ayant besoin d'une phase mobile volatile. À pH 3, la majorité des composés que nous analysons porte une charge positive et n'ont donc pas la possibilité de former une paire d'ions avec les «n» alkylamines. Nous nous sommes donc tournées vers les acides carboxyliques perfluorés pour la préparation de nos phases mobiles.

Les acides perfluorés sont des acides forts, volatils, dont la formule générale est $C_nF_{2n+1}COOH$. Ils peuvent être classifiés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée en :

- agent à chaîne courte, si $n = 1$ ou 2 ,
- agent à chaîne moyenne, si $n = 3, 4$ ou 5 ,
- agent à chaîne longue, si $n > 5$.

Les acides à courte chaîne forment les paires d'ions les moins hydrophobes avec les composés polaires ce qui se traduit parfois par des retentions insuffisantes, mais l'utilisation d'agents perfluorés à longue chaîne implique de très longs temps d'équilibrage de colonnes pouvant aller jusqu'à 3 heures [33]. Le choix de l'agent d'appariement d'ions est donc un paramètre important à prendre en compte dans l'optimisation des analyses.

IV.1. Appariement d'ions sur colonnes conventionnelles (3 à 5 μm)

IV.1.1. Analyse en appariement d'ions sur support C18

Parmi toutes les colonnes de type C18 que nous avons à notre disposition, nous avons sélectionné la colonne Supelcosil ABZ + Plus (150 x 4,6 mm L x Φ) pour nos premiers essais. Cette colonne a donné de très bonnes séparations pour les acides aminés et les petits peptides en appariement d'ions [34,35], et son comportement vis-à-vis des acides perfluorés, notamment les temps nécessaires pour l'équilibrage de la colonne, nous était connu.

Nous avons tout d'abord choisi le modificateur organique. Ensuite, nous avons testé l'influence de la longueur de la chaîne de l'agent d'appariement d'ions sur le facteur de rétention et enfin, nous avons choisi la phase mobile offrant la meilleure séparation.

IV.1.1.1. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique

Pour nous assurer une rétention suffisante et un temps d'équilibrage pas trop important sur la colonne Supelcosil C18, nous avons sélectionné un agent à chaîne de longueur moyenne, l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA), pour étudier l'influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile. La figure II.23 met en évidence que l'ACN est beaucoup plus éluant que le MeOH et que même avec un faible pourcentage d'ACN (5%) dans la phase mobile, la rétention des 5 solutés élués en premier est insuffisante. Pour obtenir une séparation totale de nos composés, une rétention plus importante de ces solutés nous laissera davantage de possibilités pour faire varier d'autres paramètres en vue d'une optimisation. Nous avons donc choisi d'utiliser par la suite le MeOH comme modificateur organique.

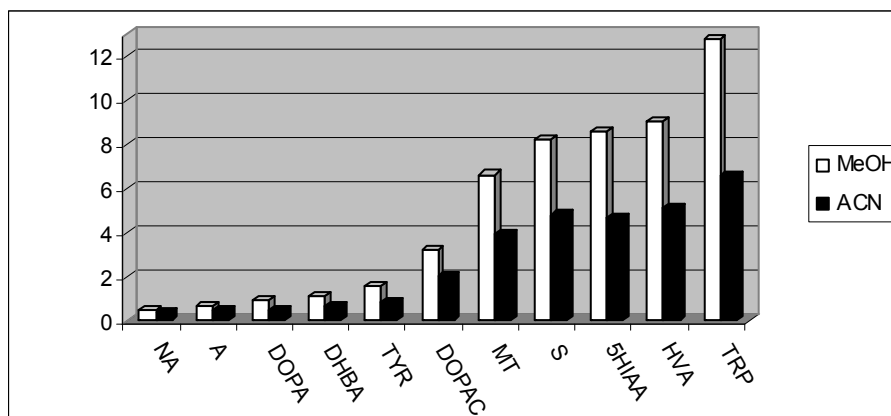


Figure II.23.

Influence de la nature du modificateur organique sur les facteurs de rétention

Colonne : Supelcosil ABZ + Plus (L x Ø = 150x4,6 mm) ; Phase mobile : NFPA pH 2,9 et MeOH ou ACN (95/5 v/v).

La variation des facteurs de rétention en fonction de l'augmentation du pourcentage de solvant organique est reportée sur la figure II.24. Nous constatons une diminution continue des facteurs de rétention (k) des analytes avec l'augmentation du pourcentage de MeOH. La pente des courbes $\log k=f(\%MeOH)$ est plus élevée pour Trp et 3-MT, plus douce pour HVA, 5HIAA, S et DOPAC et très faible, voire nulle, pour DA, Tyr, DHBA, A et NA. Ces variations de pentes entraînent des ordres d'élution différents selon le pourcentage de MeOH. Par exemple, avec 5% de MeOH, le Trp est le composé le plus retenu et est donc élué en dernier, tandis qu'avec 10% de MeOH, il est élué au milieu du chromatogramme.

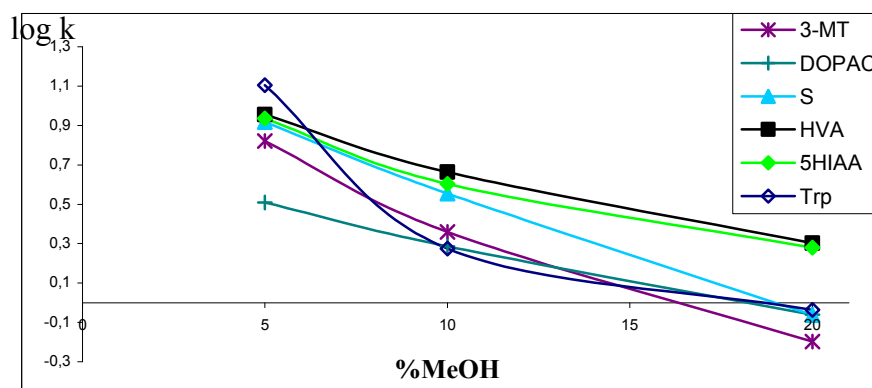


Figure II.24. Influence du pourcentage de MeOH sur le facteur de rétention

Colonne : Supelcosil ABZ + Plus (L x Ø = 150x4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA pH 2,9

À partir de 20% de MeOH, les coélutions se multiplient, les produits sortent groupés en fonction de leur $\log P$: le premier pic regroupe NA, A, DHBA, Tyr et DA, le deuxième, DOPAC, Trp et S et le dernier, HVA et 5HIAA.

L'influence du pourcentage de MeOH sur le facteur de séparation (α) n'est pas la même pour les différents couples de solutés. La valeur de α est maximale à 5% de MeOH pour la paire S/5HIAA, à 10 % pour HVA/5HIAA et 3-MT/S et à 20 % pour DOPAC/S (Figure II.25).

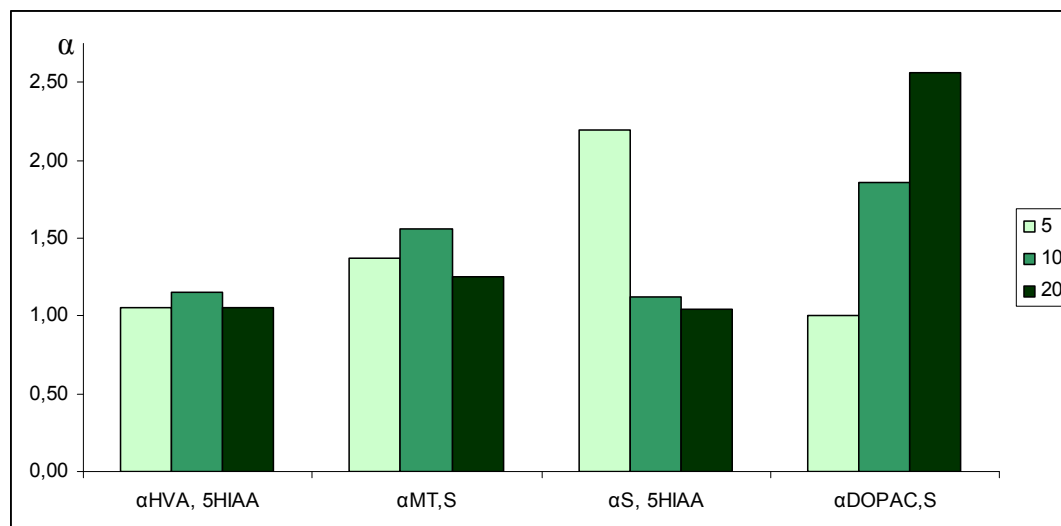


Figure II.25. Influence du pourcentage de MeOH sur la sélectivité entre différents couples de catécholamines

Colonne : Supelcosil ABZ + Plus (L x \varnothing = 150 x 4,6 mm). Phase mobile : NFPA pH 2,9 et MeOH ((100-x)/x v/v).

Même si avec 10% MeOH, on n'obtient pas une séparation totale de tous les composés, ce pourcentage de modificateur organique apparaît cependant le meilleur compromis pour la séparation sur cette colonne.

IV.1.1.2. Choix de l'agent d'appariement d'ions

En se basant d'une part sur les travaux de Wood *et al* [36] qui montrent une séparation de catécholamines avec l'utilisation du TFA dans la phase mobile, et d'autre part sur les travaux de Neubecker *et al* [37] qui utilisent avec succès l'acide heptafluorobutyrique pour l'analyse de la NA dans des urines, nous avons testé l'influence de trois agents d'appariement d'ions avec des longueurs de chaîne carbonée différentes : l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA) et l'acide pentadecafluorooctanoïque (PDFOA). Les résultats obtenus sont reportés dans la figure II.30.

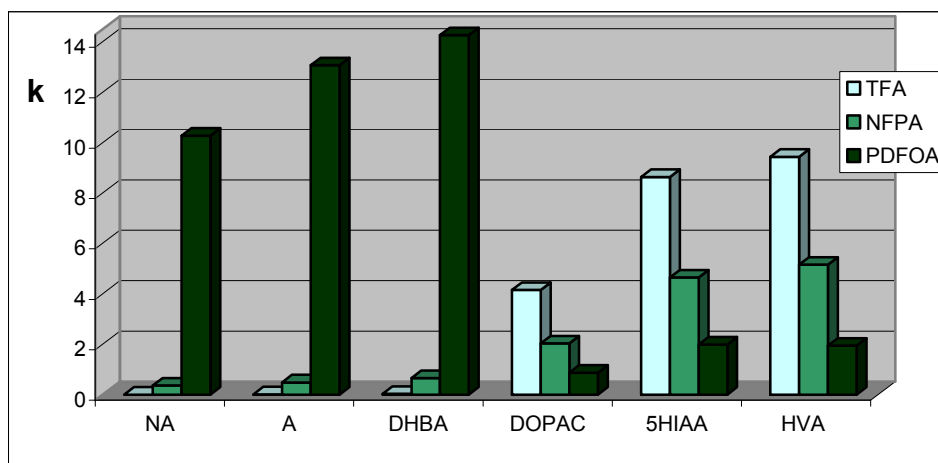


Figure II.26. Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent d'appariement d'ions sur les facteurs de rétention

Colonne : Supelcosil ABZ + Plus (L x Ø = 150 x 4,6 mm) ; Phase mobile : ACN et TFA ou NFPA ou PDFOA 1,25 mM, pH 2,9 (10/90 v/v).

Si pour les catécholamines ayant un groupement amino protonné à pH 2,9, l'influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent d'appariement d'ions est bien celle attendue en chromatographie d'appariement d'ions (augmentation de la rétention des solutés avec la longueur de la chaîne), pour les trois composés acides (DOPAC, 5HIAA et HVA) n'ayant pas de fonction amine primaire dans leur structure, un comportement inverse est observé. Pour ces trois composés, la rétention la plus élevée est observée avec le TFA dans la phase mobile.

Pour les composés aminés pouvant former une paire d'ions, contrairement à Wood *et al* [36], nous mettons en évidence que sur le support Supelcosil, la paire d'ions formée avec le TFA n'est pas suffisamment hydrophobe pour augmenter la rétention de ces composés par rapport à celle observée en RPLC. En revanche, les acides perfluorés avec des chaînes plus longues, tels le NFPA et le PDFOA, apportent une hydrophobie suffisante pour augmenter la rétention de ces catécholamines.

Pour les 3 composés acides, la paire d'ions ne pouvant pas se former, leur rétention ne peut être assurée que par un mécanisme type phase inverse (rétention basée sur l'hydrophobie de la molécule). Comme rappelé au chapitre I, en chromatographie d'appariement d'ions, une des hypothèses pour expliquer le mécanisme de rétention est basée sur l'adsorption sur le support des chaînes carbonées de l'agent d'appariement d'ions pour obtenir un échangeur d'ions dynamique. Petritis *et al.* [33] ont confirmé que l'adsorption des acides perfluorés sur les colonnes C18 est proportionnelle à la longueur de la chaîne carbonée et à la concentration de l'agent d'appariement d'ions utilisé. Dans ces conditions, il est pertinent de supposer que ce phénomène d'adsorption diminue le nombre de greffons C18 libres à la surface du support.

Il reste alors moins de possibilités pour les composés acides d'interagir avec le support et de plus, l'introduction de charges négatives à la surface du support entraîne des interactions électrostatiques répulsives vis-à-vis des composés portant la même charge. Ceci peut donc expliquer la diminution de rétention des composés acides lorsque l'on utilise le PDFOA à la place du TFA dans la phase mobile.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons étudié l'influence de la concentration de l'acide pentadécafluorooctanoïque (PDFOA) sur la rétention. Les concentrations de PDFOA pour cette étude sont les suivantes : 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mM. Il faut mentionner que la valeur du pH de la phase mobile (2,9) varie très peu dans cette gamme de concentration, ce qui n'implique pas de modification significative de l'état de charge des composés.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans la figure II.27. Il apparaît bien une augmentation de la rétention avec l'augmentation de la concentration du PDFOA dans la phase mobile pour les composés susceptibles de former des paires d'ions (DA, NA, A) et une très faible diminution de rétention pour les composés acides.

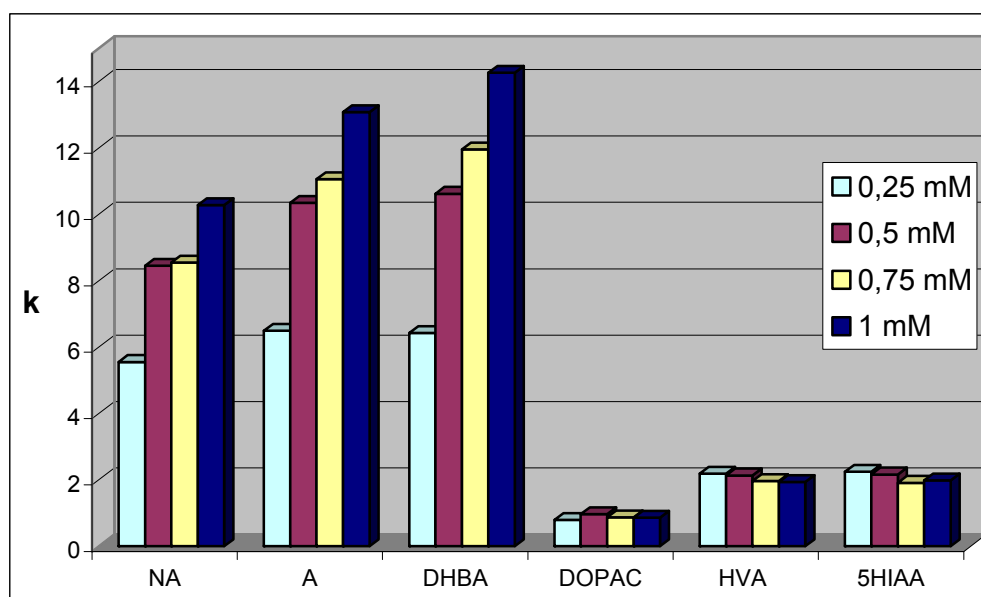


Figure II.27. Influence de la concentration de PDFOA en phase mobile sur les facteurs de rétention

Colonne : Supelcosil ABZ + Plus (L x Ø = 150 x 4,6 mm) ; Phase mobile : ACN et PDFOA (10/90 v/v).

Cette dernière expérience confirme donc l'hypothèse que nous avons formulée pour expliquer la différence de comportement des composés acides vis-à-vis des autres solutés. Le choix du NFPA comme agent d'appariement d'ions apparaît encore comme un bon compromis pour retenir l'ensemble des solutés dans ces conditions chromatographiques.

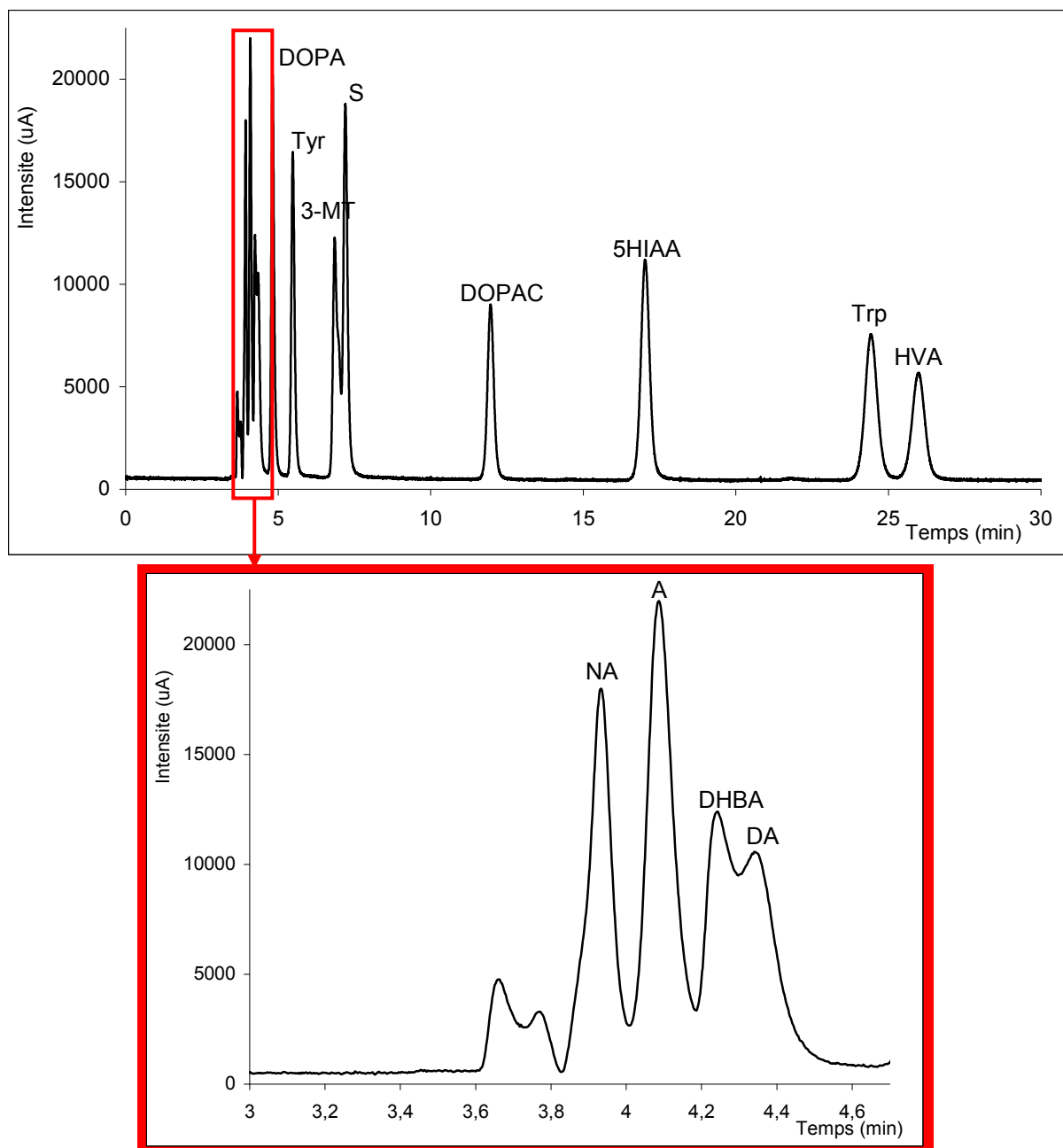


Figure II.28. Séparation des catécholamines avec TFA comme agent d'appariement d'ions

Colonne : Daisogel C18 B (LxØ= 250 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/ TFA 0,1% (10/90 v/v) ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : UV.

La figure III.28. montre la séparation des catécholamines obtenue avec le TFA comme agent d'appariement d'ions sur la colonne de silice greffée Daisogel C18. Le choix de la nature de l'agent d'appariement d'ions est donc influencé par le support de silice greffée C18 utilisé.

IV.1.1.3. Bilan sur l'appariement d'ions sur C18

En mode isocratique, une séparation suffisante pour une détection par spectrométrie de masse est obtenue à l'aide d'une phase mobile composée de MeOH/NFPA pH 2,9 (10/90 v/v) avec un temps d'analyse total d'environ 18 min. Ce sont ces conditions chromatographique qui ont été utilisées pour les premiers essais en CPL – SM/SM (figure II.29).

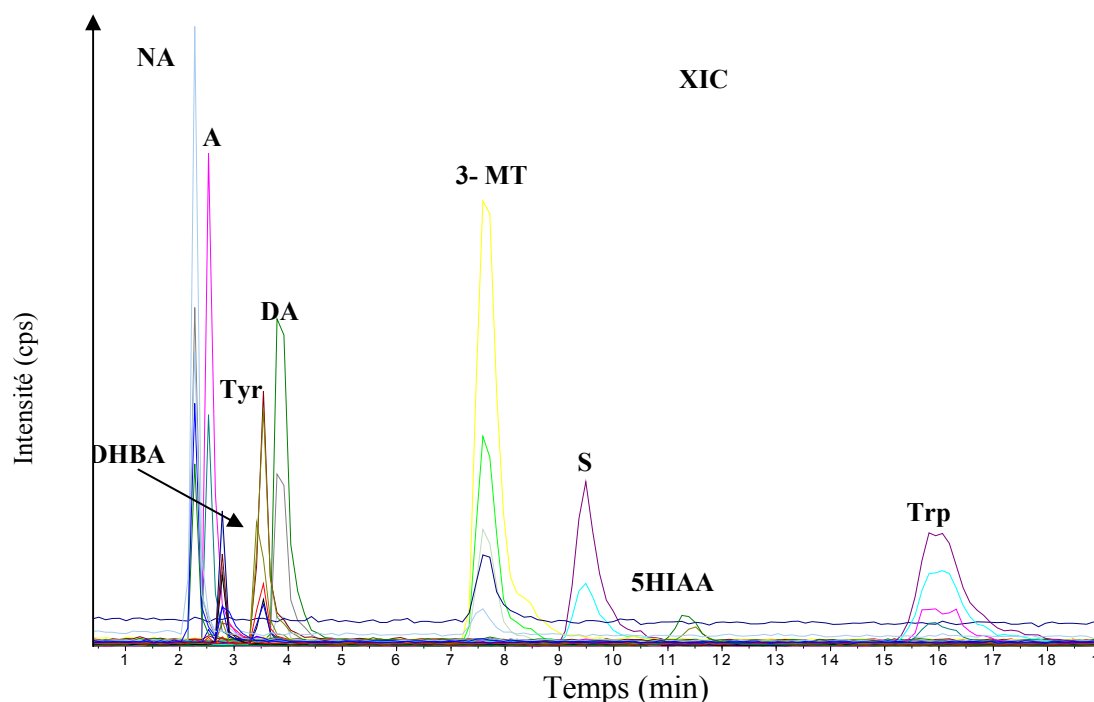


Figure II.29. Chromatogramme d'un mélange de 11 composés

Colonne : Supelcosil ABZ + Plus (L x Ø = 150 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA pH 2,9 (10/90 v/v) ; Détection : SM (Sciex API 300, source Turbo Ion Spray) ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Concentration des solutés : 10 µg.mL⁻¹

Nous voyons sur cette figure que la résolution entre certains composés (par exemple NA, A, DHBA) n'est pas suffisante pour une détection électrochimique puisque ce détecteur a besoin d'un retour à la ligne de base entre chaque soluté pour une analyse quantitative précise. Il paraît aussi évident que les premiers composés sont élués trop proches du volume mort avec tous les inconvénients que cela implique dans le cas de l'analyse d'échantillons réels.

Pour compléter notre démarche, nous avons voulu tester un autre support plus hydrophobe que les silices C18, le support PGC, afin d'augmenter la rétention et d'améliorer si possible la séparation entre les composés.

IV.1.2. Analyse en appariement d'ions sur PGC

En chromatographie de polarité de phase inverse, nous avons constaté que le PGC était un support plus rétentif qu'un support de silice greffée C18 et de ce fait, nécessitait d'utiliser des quantités plus importantes de modificateur organique dans la phase mobile pour éluer les composés. Des travaux réalisés antérieurement dans notre laboratoire sur l'analyse des acides aminés en appariement d'ions [33,38,39] ont montré que le PGC gardait cette rétention plus importante également dans ce mode chromatographique. En effet, sur le support PGC, le NFPA, un agent d'appariement d'ions de chaîne carbonée de longueur moyenne (5 atomes de carbone), offre des rétentions comparables à celles obtenues sur C18 avec le PDFOA, un agent d'appariement d'ions plus long (8 atomes de carbone) et une sélectivité différente. Thiébaud *et al.* [13] confirment lors de l'analyse comparée de 6 neurotransmetteurs (NA, A, DA, DOPA, Tyr, S) avec le même agent d'appariement d'ions (HFBA) sur PGC et sur différentes colonnes C18 cette différence de sélectivité. Ils suggèrent que les différences d'ordre d'élution entre C18 et PGC sont le résultat d'interactions différentes entre les solutés et les deux types de support.

Les exemples de séparations de catécholamines sur PGC à l'aide d'acides perfluorés comme agents d'appariement d'ions volatils, ne sont pas nombreux [13]. Nous allons donc réaliser une étude sur l'influence des différents paramètres, tels que la nature, le pourcentage de modificateur organique et la nature d'agent d'appariement d'ions dans la phase mobile sur la séparation des catécholamines, en vue d'améliorer la rétention des composés trop faiblement retenus dans les systèmes précédents.

IV.1.2.1. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile

La figure II.30 met en évidence que l'ACN est plus éluant que le MeOH et ce phénomène est plus accentué pour les composés qui présentent un groupement fonctionnel carboxyle au sein de leur structure (DOPA, Tyr, Trp, DOPAC, HVA et 5-HIAA). Il est probable que pour la rétention de ces composés acides, les mécanismes de rétention soient différents de ceux des autres analytes, d'autant plus que DOPAC, HVA et 5HIAA n'ont pas de groupement amine dans leur structure et ne peuvent donc pas former de paire d'ions avec les acides perfluorés. La rétention de ces composés acides est probablement le résultat des

interactions hydrophobes et des interactions de type électroniques spécifiques de ce support, vis-à-vis des composés négativement chargés.

Des sélectivités différentes sont observées lorsque l'ACN est remplacé par le MeOH dans la phase mobile. En présence de MeOH, la rétention des acides aminés (Tyr et DOPA) est plus importante que celle des amines possédant un noyau catéchol (NA, A, DA, DHBA, 3-MT), tandis qu'en présence d'ACN, la rétention de Tyr et DOPA reste comparable à celle des amines. Par ailleurs, avec le MeOH comme modificateur organique, on constate des différences de rétention très importantes entre les composés même avec 50% de MeOH. Pour réduire les temps d'analyse, il semble plus prometteur d'utiliser l'ACN comme modificateur organique pour la suite de notre travail.

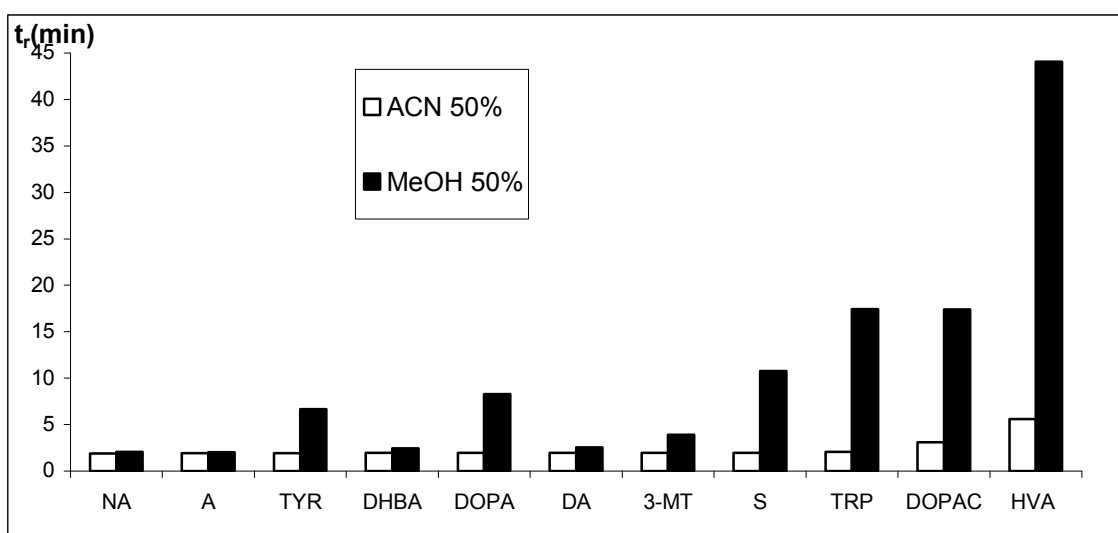


Figure II.30. Influence de la nature de modificateur organique sur la rétention et la sélectivité des catécholamines sur PGC

Colonne : PGC (L x Ø= 100 x 2,1 mm) ; Phase mobile : ACN ou MeOH / HFBA pH 2,9 (50/50 v/v).

La diminution du pourcentage d'ACN de 50% à 40% dans la phase mobile (Figure II.31) n'entraîne pas de différences importantes de rétention des solutés, on constate toujours une trop faible rétention pour la plupart de nos analytes (NA, A, Tyr, DA, DHBA, DOPA, 3-MT, S et Trp) élués dans le volume mort. La diminution de la concentration d'ACN dans la phase mobile à 20% se traduit, comme attendu, par une augmentation des t_r des analytes mais la séparation n'est pas améliorée pour autant : NA, A, DA et DHBA restent coélus au début du chromatogramme et dans ces conditions, les augmentations de t_r pour S, Trp, HVA et 5HIAA sont très importantes. Par exemple, 5HIAA est 10 à 30 fois plus retenue.

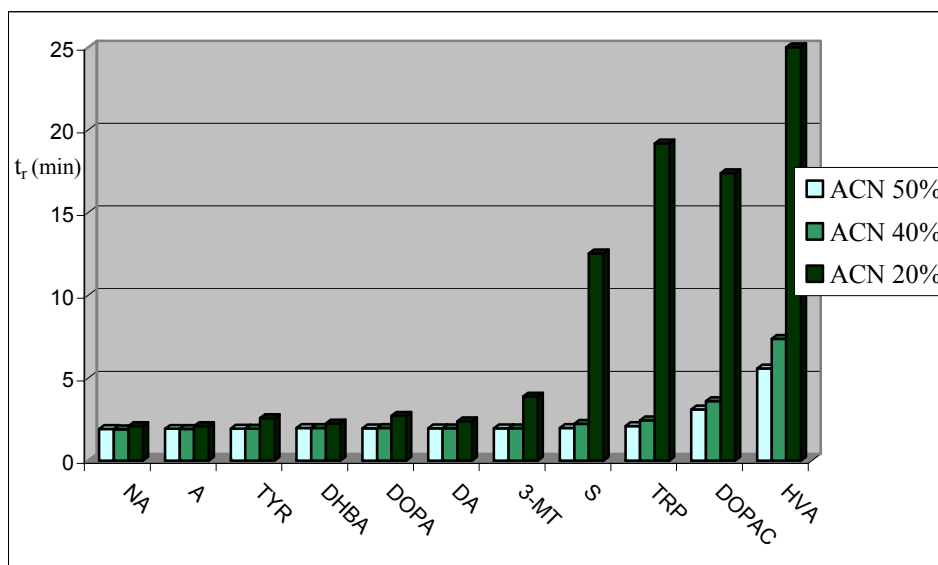


Figure II.31. Influence du pourcentage d'ACN sur la rétention des catécholamines
Colonne : PGC (L x Ø= 100 x 2,1 mm) ; Phase mobile: ACN/ HFBA pH 2,9.

Ces différences de rétention sont expliquées par les grandes différences en ce qui concernent les structures chimiques de nos analytes qui leur donnent des comportements chromatographiques différents, surtout sur un support particulier comme le PGC. La forte rétention de 5HIAA, composé élué en dernier, peut s'expliquer par l'action conjointe de sa planéité (liée au motif indole de sa structure) et de sa charge globale négative. D'une manière générale, l'apport d'une charge négative dans la structure entraîne une très forte rétention du composé sur support PGC, ce qui explique que DOPAC, HVA et 5HIAA sont élués en dernier.

Vue la large gamme des valeurs des facteurs de rétention même en utilisant l'ACN comme modificateur organique, il faut envisager un gradient d'élution pour homogénéiser les temps d'analyse.

IV.1.2.2. Choix de l'agent d'appariement d'ions

La rétention des composés aminés (Figure II.32) augmente avec la longueur de la chaîne carbonée de l'acide perfluoré utilisé comme additif dans la phase mobile ($tr_{TFA} < tr_{HFBA} < tr_{NFPA}$). Ces résultats sont en concordance avec ceux présentés dans la littérature [13]. Le remplacement de HFBA par NFPA n'est cependant pas suffisant pour améliorer de façon satisfaisante la résolution en début du chromatogramme entre : NA, A, Tyr, DA, DHBA et DOPA.

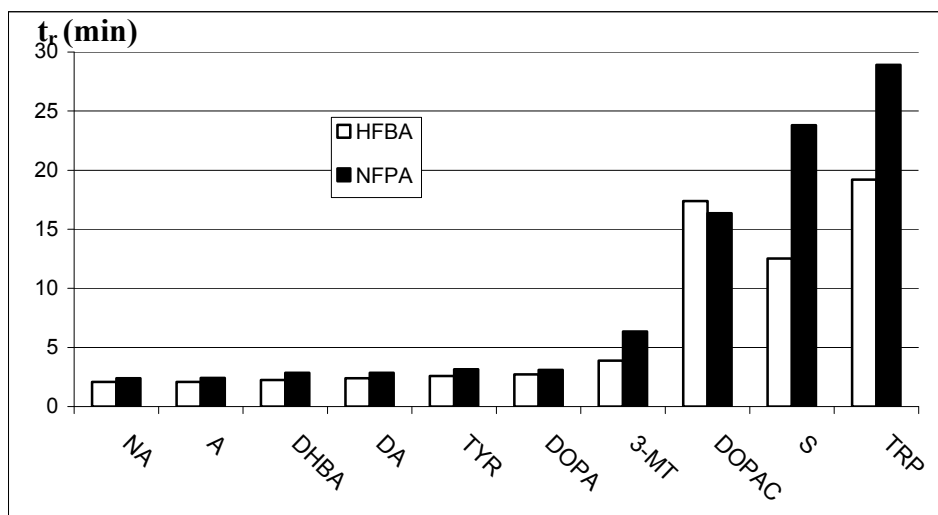


Figure II.32. Influence de la nature de l'acide perfluoré sur la rétention des composés aminés

Colonne : PGC (L x \varnothing = 100 x 2,1 mm) ; Phase mobile : ACN/HFBA ou NFPA pH 2,73 (20/80 v/v).

Sur PGC, les effets de la nature de l'agent d'appariement d'ions ne sont pas les mêmes pour les composés acides que pour les composés aminés protonés (Figure II.33), comme nous l'avons précédemment montré sur support C18 et cela, pour les mêmes raisons.

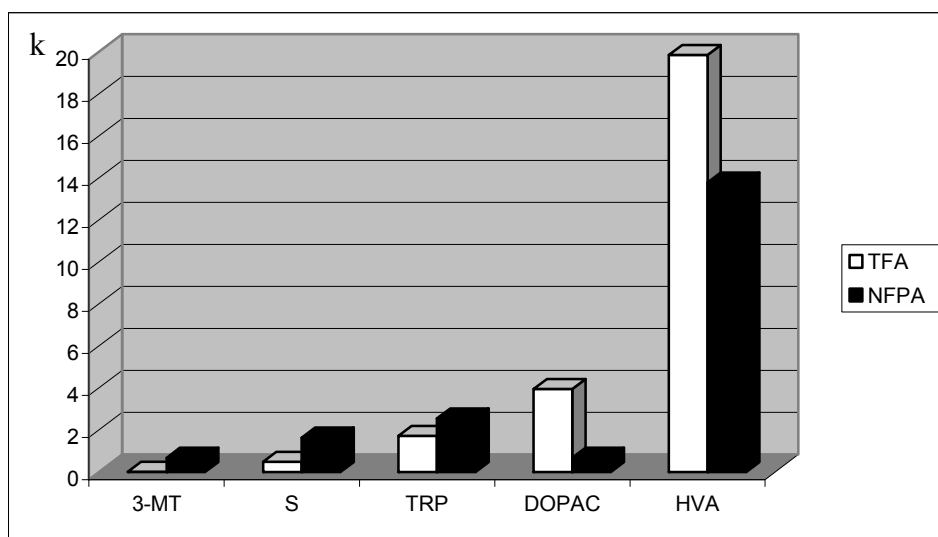


Figure II.33. Comparaison de l'effet nature de l'agent d'appariement d'ions sur le facteur de rétention des composés aminés et des composés acides

Colonne : PGC (L x \varnothing = 100 x 2,1 mm) ; Phase mobile : ACN/TFA ou NFPA pH 2,9 (10/90 v/v).

Comme nous avons obtenu des résultats comparables avec le HFBA et le NFPA, nous avons testé ces deux agents d'appariement d'ions en mode gradient d'éluion afin d'améliorer les séparations.

IV.1.2.3. Mise au point du gradient d'éluion

Dans un premier temps, nous avons testé sans succès des conditions d'éluion par gradient en utilisant une phase mobile composée d'une solution aqueuse de HFBA et de MeOH. La proportion de MeOH est augmentée progressivement de 20 à 80% dans des conditions de gradient linéaire selon différentes pentes. De meilleurs résultats sont obtenus avec l'ACN. Les conditions optimales sont présentées dans la figure II.34.

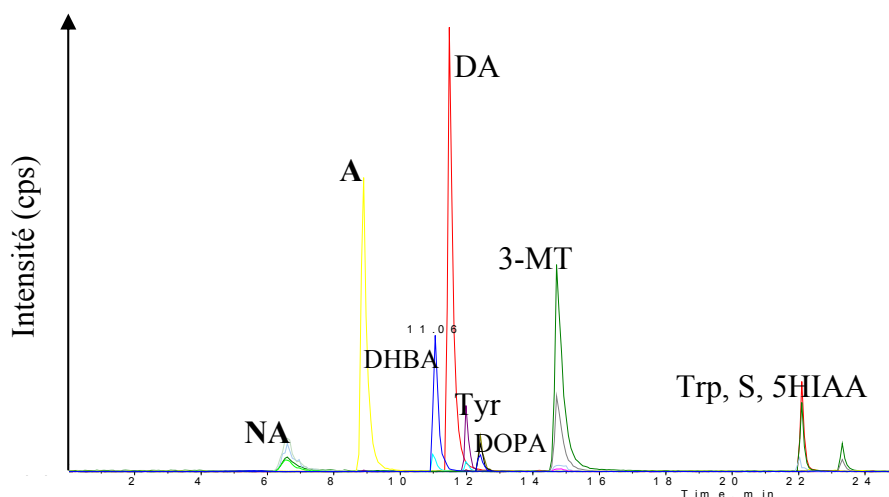


Figure II.34. Chromatogramme de mélange : NA, A, DA, DOPA, Tyr, 3-MT, DHBA, Trp, S, 5HIAA

Colonne : PGC (L x Ø= 100 x 4,6 mm) ; Phase mobile : ACN/HFBA pH 2,7 gradient d'éluion : 5% d'ACN de 0 à 5 min, de 5 à 15% d'ACN de 5 à 9 min, de 15 à 25% d'ACN de 9 à 20 min, 70% d'ACN entre 20.1 et 26 min ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détecteur : SM (Sciex, source Turbo Ion Spray API 300)

Des résultats comparables en termes de séparation et de temps d'analyse sont obtenus avec une phase mobile composée d'ACN et de NFPA en gradient d'éluion (figure II.35). Il est à noter cependant que de meilleures intensités de signal en SM sont obtenues spécifiquement pour : NA, Tyr, Trp, S et 3-MT avec le NFPA comparé au HFBA. Ces mêmes observations ont été rapportées précédemment dans le cas de l'analyse des acides aminés protéiques avec ces mêmes agents d'appariement d'ions [40].

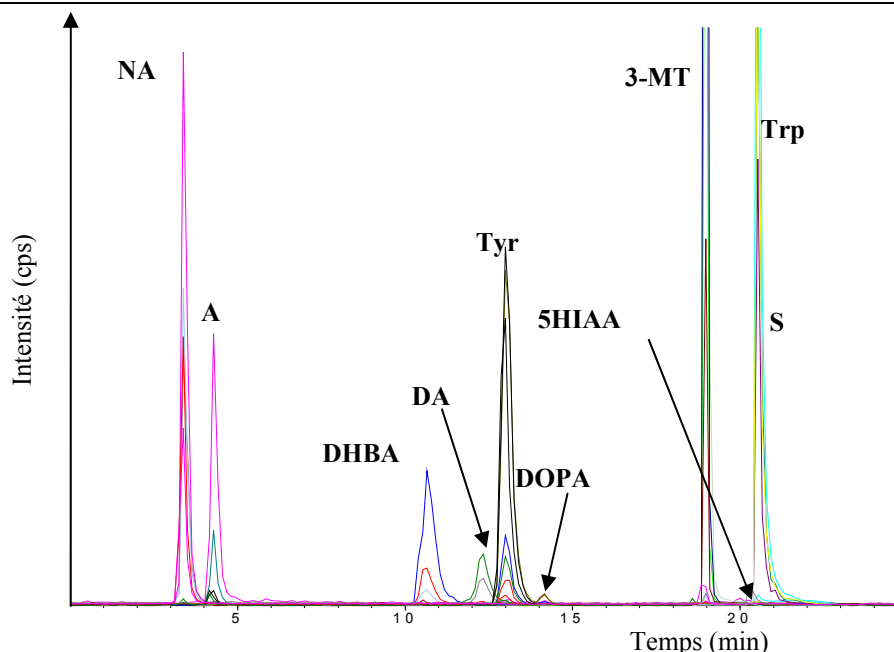


Figure II.35. Chromatogramme du mélange : NA, A, DA, DOPA, Tyr, 3-MT, DHBA, Trp, S, 5HIAA

Colonne : PGC (L x Ø= 100 x 4,6 mm) ; Phase mobile : ACN/ solution NFPA à pH 2,9 : 10% ACN pendant 5 min, puis 12% ACN en 5 min, 15% ACN en 5 min enfin augmentation à 70% ACN en 5 min ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détecteur : SM (Sciex API 300, source Turbo Ion Spray)

IV.1.2.4. Bilan sur l'appariement d'ions sur PGC

La séparation des catécholamines sur le PGC a été réalisée à l'aide d'un agent d'appariement d'ions perfluoré (HFBA ou NFPA) en utilisant l'ACN comme modificateur organique. Pour diminuer le temps d'analyse et obtenir la meilleure séparation, nous avons eu besoin de mettre au point un gradient d'élution. Un faible pourcentage d'ACN en début de gradient nous permet de dégager NA et A du volume mort et ainsi de limiter les suppressions de signal liées à la coélution avec des composants de la matrice.

Les meilleures intensités des signaux massiques en présence de NFPA comme agent d'appariement d'ions dans la phase mobile nous ont déterminées à adopter cet acide perfluoré pour les études ultérieures de limites de détection en couplage avec la SM.

Les séparations obtenues sont compatibles et suffisantes pour une détection SM mais ne permettent pas d'envisager un couplage avec le détecteur électrochimique car des coélutions sont encore enregistrées (S, Trp).

IV.1.3. C18 vs PGC pour l'appariement d'ions

Que cela soit sur un support C18 ou PGC, la chromatographie d'appariement d'ions offre plus de rétention pour nos solutés que la RPLC.

Sur ces deux types de support, le même phénomène a été observé, à savoir, des mécanismes différents de rétention pour les composés ayant un groupement amine protonable par rapport à ceux n'ayant pas cette fonction. Ces différences s'expliquent par le fait que pour les composés aminés (NA, DA, A, 3-MT, Tyr, DOPA, DHBA, S, Trp), les acides perfluorés jouent le rôle d'agent d'appariement d'ions tandis que, pour les composés n'ayant pas le groupement amine (DOPAC, HVA, 5HIAA), les acides perfluorés jouent le rôle d'ions compétiteurs.

Dans les mêmes conditions de phase mobile, la rétention des composés est nettement supérieure sur PGC que sur C18 (Figure II.36). Les ordres de sortie des composés sont légèrement changés sur PGC par rapport à C18. On constate des inversions pour les paires DA, Tyr d'une part et Trp, 5HIAA d'autre part. Ces différences sont probablement causées par l'affinité plus importante du PGC vis-à-vis des composés porteurs d'une charge négative.

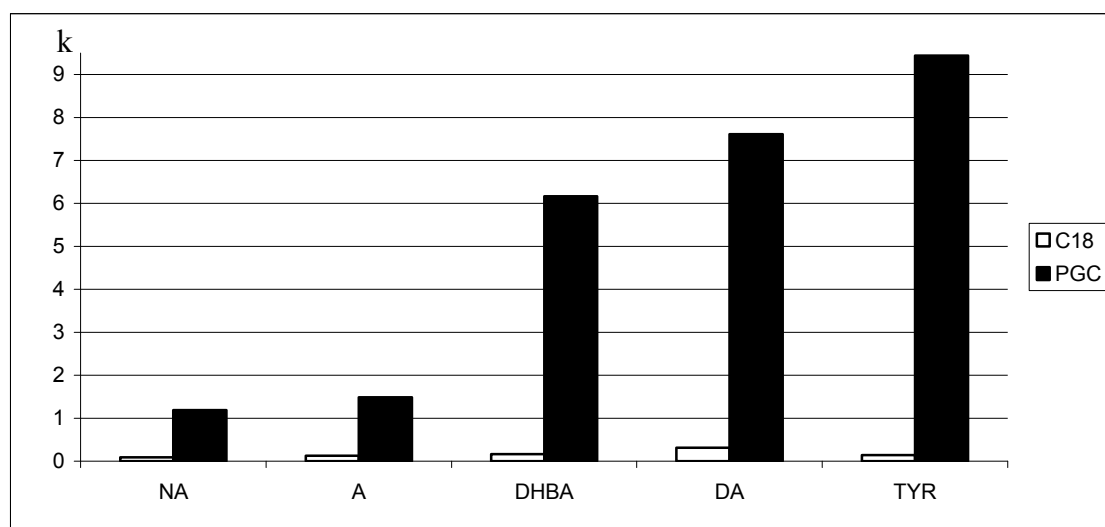


Figure II.36. Différences de rétention entre C18 et PGC dans les mêmes conditions de phase mobile

Colonnes : Supelcosil ABZ + Plus (L x Ø = 150 x 4,6 mm) et Hypercarb PGC (L x Ø = 100 x 2,1 mm) ; Phase mobile : ACN/NFPA pH 2,9 (10/90 v/v).

De meilleures résolutions sont obtenues pour la séparation des catécholamines sur PGC par rapport au C18 mais pour cela, un gradient d'élution a été nécessaire sur PGC. De

meilleures séparations sont obtenues sur PGC pour NA, A, DHBA, DA, Tyr et DOPA mais sans gain sur le temps d'analyse malgré l'emploi d'un gradient d'élution.

Aucun des deux supports ne nous offre la possibilité de réaliser une double détection électrochimie et SM car les séparations restent insuffisantes pour le détecteur électrochimique. De plus, sur les deux systèmes, les pics chromatographiques sont larges et présentent une asymétrie. Dans le but d'améliorer l'efficacité des séparations de nos solutés, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des colonnes destinées à la chromatographie rapide (fast chromatography) dont les supports sont réputés très efficaces.

IV.2. L'appariement d'ions sur colonnes à résolution rapide (fast chromatography)

L'utilisation de colonnes avec des diamètres de particules inférieurs à 2 μm est devenue une approche de choix dans le but d'augmenter la vitesse, la résolution ou l'efficacité des analyses en CPL. Toutefois, comme la pression est proportionnelle au carré de l'inverse de la taille des particules, l'utilisation de ces petites particules nécessite souvent l'utilisation de systèmes HPLC ultra-performants et spécifiques, généralement capables de supporter des pressions qui peuvent dépasser 1000 bars. Par contre, si on veut garder les équipements classiques conçus pour supporter au maximum 400 bars, deux solutions sont à notre disposition pour faire de la chromatographie rapide :

- les colonnes monolithiques,
- les colonnes avec des particules « fused core ».

Ces colonnes permettent de travailler à des débits plus élevés qu'avec les colonnes conventionnelles de même diamètre et ceci sans perte d'efficacité des pics, ni augmentation trop importante de la pression.

A notre connaissance, il n'y a pas d'exemples de séparations des catécholamines en chromatographie d'appariement d'ions sur les colonnes monolithique ou « fused core ». Nous avons donc essayé de transposer sur ces colonnes une méthode que nous avons mise au point précédemment pour la séparation isocratique des catécholamines en appariement d'ions, sur la colonne conventionnelle Supelcosil ABZ + Plus (figure II.29).

IV.2.1. Analyses sur colonnes monolithiques

IV.2.1.1. Généralités sur colonnes monolithiques

Les colonnes monolithiques ne contiennent pas de particules de silice fines comme les colonnes conditionnées de manière traditionnelle mais se composent d'un barreau continu de matériau.

En fonction de la nature du matériel avec lequel elles sont construites, les colonnes monolithiques peuvent être classifiées en colonnes à base de polymère organique et colonnes à base de silice. Les premières à avoir été construites sont les colonnes à base des polymères organiques mais ces polymères étaient instables d'un point de vue mécanique. Ces derniers gonflent ou rétrécissent en fonction du solvant organique utilisé, avec des conséquences néfastes sur leurs performances chromatographiques. Le développement des monolithes à base de silice par un processus sol-gel a représenté le point de départ pour un nouveau type des colonnes chromatographiques [41]. Cette technique permet la formation de deux types de pores au sein de la phase stationnaire : des macropores (larges pores) et des mésopores (pores de taille intermédiaire). D'une part, les macropores (généralement 2 μm) donnent à la colonne une faible perte de charge et rendent possible le travail à haut débit et d'autre part, les mésopores (généralement 12 nm) (figure II.37) assurent une surface de contact suffisante pour la réalisation de la séparation des analytes [42].

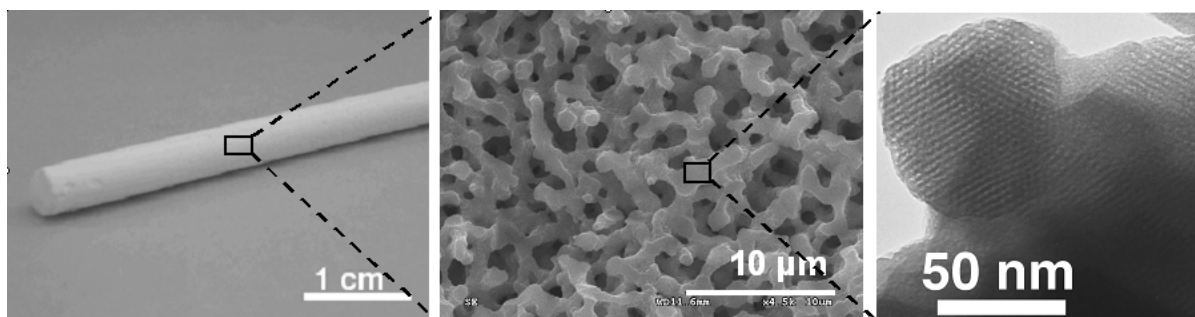


Figure II.37. Colonne monolithe – macropores et mesopores (document Merck)

L'équation de Van Deemter (équation II.1) relie l'efficacité des pics (à travers la hauteur équivalente à un plateau théorique (H)) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile dans la colonne (\bar{u}). Cette équation montre qu'il y a un débit optimal pour chaque colonne, correspondant à une valeur minimale de H (efficacité optimale).

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (II.1)$$

A – terme de remplissage de la colonne ;

B – terme de diffusion longitudinale;

C – terme de transfert de masse.

La courbe de Van Deemter présentée dans la figure II.38 montre que pour les colonnes de type monolithique la hauteur équivalente à un plateau théorique n'augmente pas aussi rapidement avec l'augmentation de la vitesse linéaire de la phase mobile que pour les colonnes conventionnelles (colonnes remplies avec des particules de phase stationnaire). On peut donc augmenter le débit de la phase mobile avec les colonnes monolithiques sans perdre au niveau de l'efficacité des pics chromatographiques.

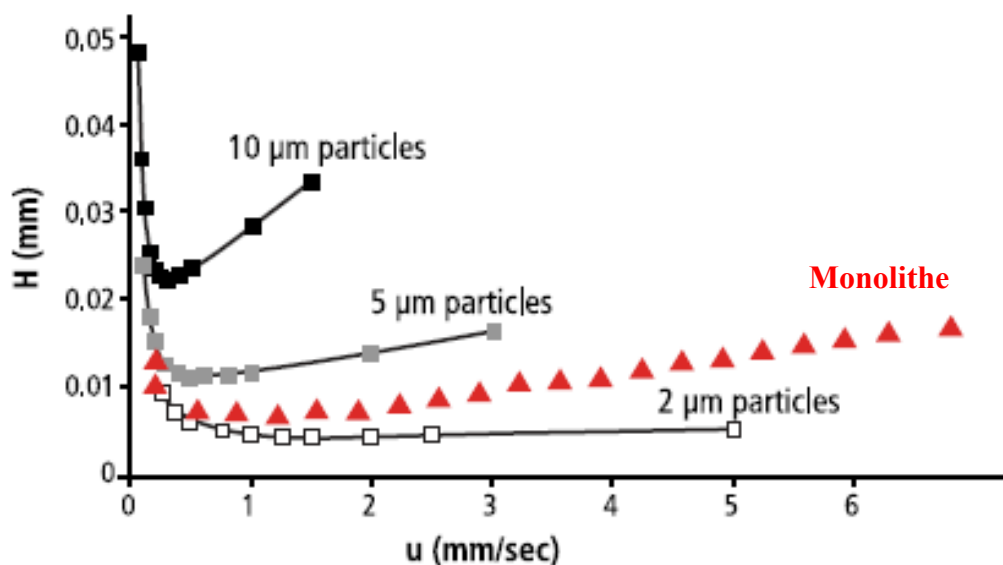


Figure II.38. Courbes de Van Deemter [43]

La plupart des travaux publiés sur les colonnes monolithiques traitent de la préparation des colonnes mais des exemples d'application de plus en plus nombreux sont publiés. Ils traitent entre autres de la séparation des impuretés de l'héroïne [44], des β -caroténoïdes [45], des pesticides et de leur métabolites [46], des constituants de différentes préparations pharmaceutiques [42,47] ou des bases et des nucléotides de l'ADN [48].

IV.2.1.2. Séparation en appariement d'ions sur colonne monolithique

Nous avons transposé, sur une colonne monolithique (Onyx, LxØ=100x4 mm), les conditions chromatographiques qui nous ont permis d'obtenir les meilleurs résultats sur la colonne C18 (Supelcosil ABZ + Plus LxØ=150x4,6 mm) utilisée lors de nos premiers essais en appariement d'ions. La phase mobile est composée de NFPA 1,25 mM, pH 2,9 et MeOH (90/10 v/v)). La figure II.39 montre les analyses réalisées sur la colonne monolithique.

Dans ces conditions de phase mobile, nous n'avons pas constaté de différences significatives de temps d'équilibrage entre les deux systèmes.

Le fait que la surface spécifique de la colonne Onyx ($300 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) soit presque deux fois plus importante que celle de la colonne Supelcosil ($170 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) a comme premier résultat une augmentation importante de la rétention des catécholamines au débit de $1 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$, même avec une longueur de colonne plus courte. Dans ces conditions, la durée de l'analyse du mélange des 12 catécholamines est de 55 min sur Onyx et de 18 min sur Supelcosil. Malgré cette importante augmentation de temps d'analyse, on n'observe toujours pas de séparation totale des 12 catécholamines. Il reste 2 coélutions : d'une part, DA et 5HIAA et d'autre part, S et 3-MT (ces composés sont parfaitement séparés sur la colonne Supelcosil Figure II.29). Les pics que nous obtenons sur la colonne monolithique sont plus fins donc plus efficaces que ceux obtenus sur la colonne conventionnelle.

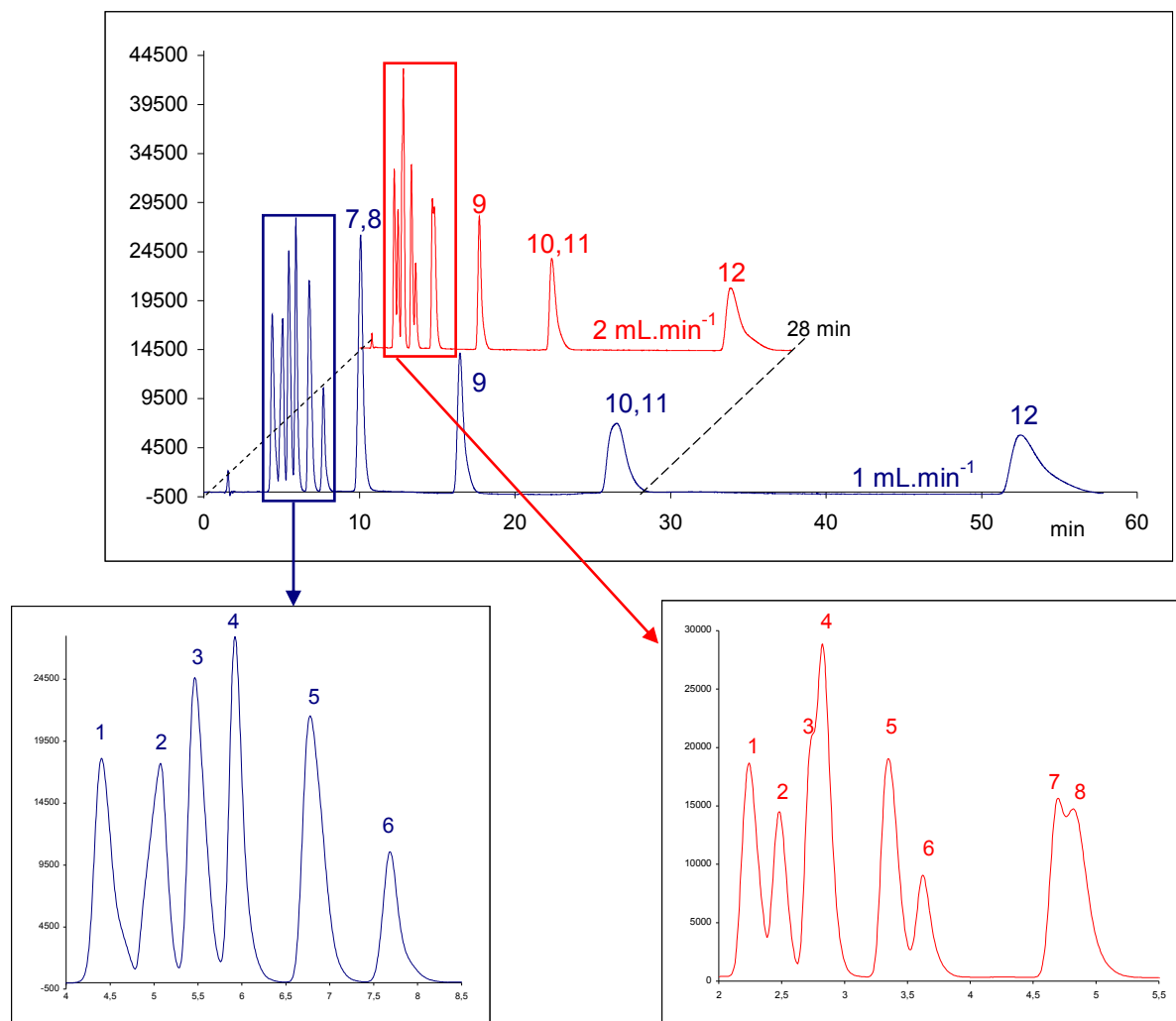


Figure II.39. Séparation des catécholamines sur la colonne monolithique à deux débits différents (1 et 2 mL.min⁻¹)

Colonne : Onyx (L x Ø = 100 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA 1,25 mM, pH 2,9 (10/90 v/v) ; Détection : UV

1. NA, 2. DOPA, 3. A, 4. DOPAC, 5. DHBA, 6. Tyr, 7. 5HIAA, 8. DA, 9. HVA, 10. S, 11. 3-MT, 12. Trp

Pour raccourcir les temps d'analyse, nous avons dans un premier temps augmenté le débit de la phase mobile de 1 mL.min⁻¹ à 2 mL.min⁻¹. Malheureusement, même si l'efficacité des pics est peu affectée par l'augmentation du débit, la séparation, quant à elle, est affectée et la résolution entre les premiers pics élués (NA, DOPA, A, DOPAC, DHBA et Tyr) diminue (Figure II.39).

Pour améliorer la séparation en début de chromatogramme à 1 mL.min⁻¹, nous avons testé une phase mobile contenant moins de MeOH. Nous avons observé qu'avec 5% de MeOH dans la phase mobile, les résolutions entre les premiers composés élués (NA, DOPA, A, DOPAC, DHBA et Tyr) étaient meilleures (Figure II.40).

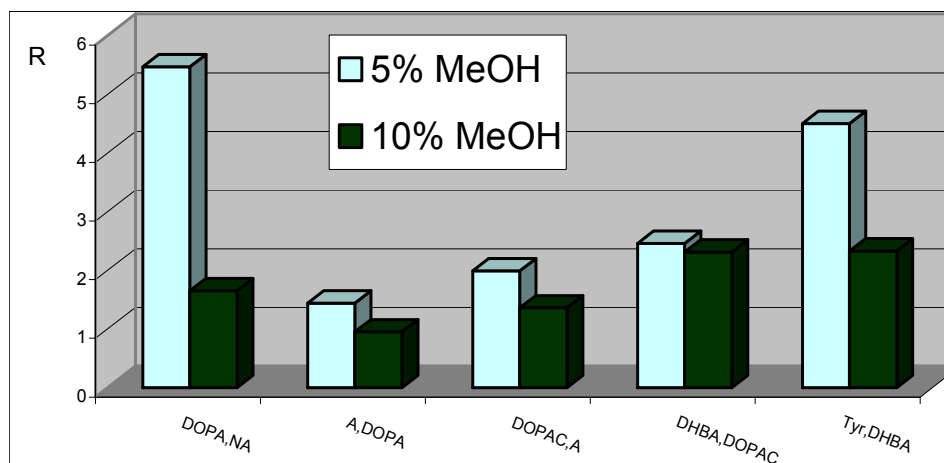


Figure II.40. Evolution de la résolution en fonction du pourcentage de MeOH dans la phase mobile

Colonne : Onyx (L x Ø = 100 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA 1,25 mM, pH 2,9, (x/(100-x) v/v) ; Débit : 1 mL.min⁻¹.

Afin de diminuer le temps d'analyse, il nous reste comme alternative un mode d'élution par gradient en maintenant un débit de phase mobile de 1 mL.min⁻¹. Les meilleurs résultats en termes de séparation et de temps d'analyse sont obtenus avec le gradient suivant : 5 % de MeOH de 0 à 5 min, augmente augmentation de 5 à 20% de MeOH de 5 à 8 min et augmente augmentation de 29 à 40% MeOH de 8 à 12 min. Dans ces conditions optimisées, le temps d'analyse est réduit à seulement 16 min, la coélution entre DA et 5HIAA est résolue mais il reste le couple 3-MT/S non résolu (Figure II.41).

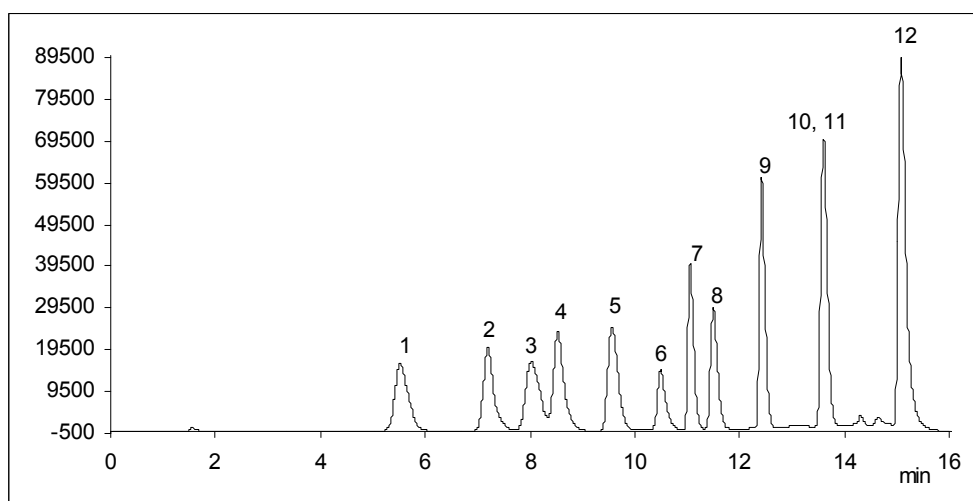


Figure II.41. Séparation des catécholamines sur la colonne monolithique en gradient d'élution

Colonne : Onyx (L x Ø = 100 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NPFA 1,25 mM, pH 2,9, 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min, et en 0,1 min retour aux conditions initiales pour le rééquilibrage de la colonne ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : UV. 1. NA, 2. DOPA, 3. A, 4. DOPAC, 5. DHBA, 6. Tyr, 7. 5HIAA, 8. DA, 9. HVA, 10. S, 11. 3-MT, 12. Trp

IV.2.1.3. Bilan sur la séparation en appariement d'ions sur colonne monolithique

Pour l'analyse des catécholamines en chromatographie d'appariement d'ions sur la colonne monolithique, nous avons pu constater qu'une augmentation de débit (1 à 2 mL.min⁻¹) n'était pas favorable à la séparation (multiplication des coélutions).

Nous avons mis au point une méthode en mode gradient d'élution avec un agent d'appariement d'ions volatil. Dans ces conditions, la séparation des catécholamines est obtenue en 16 min avec une seule coélution (S et 3-MT). De ce fait, le couplage de ce système avec une détection électrochimique ne pourra pas être utilisée pour l'identification et/ou la quantification des ces deux composés. Par contre, la méthode est parfaitement compatible avec la SM puisque les deux composés coélus ont des masses molaires et des fragmentations différentes. Les pics plus efficaces obtenus sur cette colonne par rapport à ceux obtenus sur la colonne conventionnelle devront nous permettre d'obtenir de meilleures limites de détection. Par ailleurs, le premier composé élué (NA) est suffisamment retenu pour envisager que son signal massif ne soit pas affecté par les autres constituants de la matrice élués en volume mort.

Ce système est le plus prometteur parmi tous ceux que nous avons optimisés auparavant, il sera donc intéressant de le coupler à la détection par SM.

IV.2.2. Analyse sur les colonnes « fused core »

IV.2.2.1. Généralités sur les colonnes « fused core »

Les colonnes avec des particules « fused core » (noyau solide) sont des colonnes remplies avec des particules de petit diamètre (2,7 µm), qui ont un noyau dur solide (non-poreux) de 1,7 µm de diamètre qui présente à l'extérieur un enrobage poreux de 0,5 µm d'épaisseur, par rapport aux particules conventionnelles qui sont totalement poreuses. La voie de diffusion plus courte des particules « fused core » réduit la dispersion axiale des solutés et minimise l'élargissement des pics. Les particules « fused core » ne disposent que d'une voie de diffusion de 0,5 µm par rapport à 1,5 µm pour des particules totalement poreuses de même diamètre (~3 µm) (figure II.42).

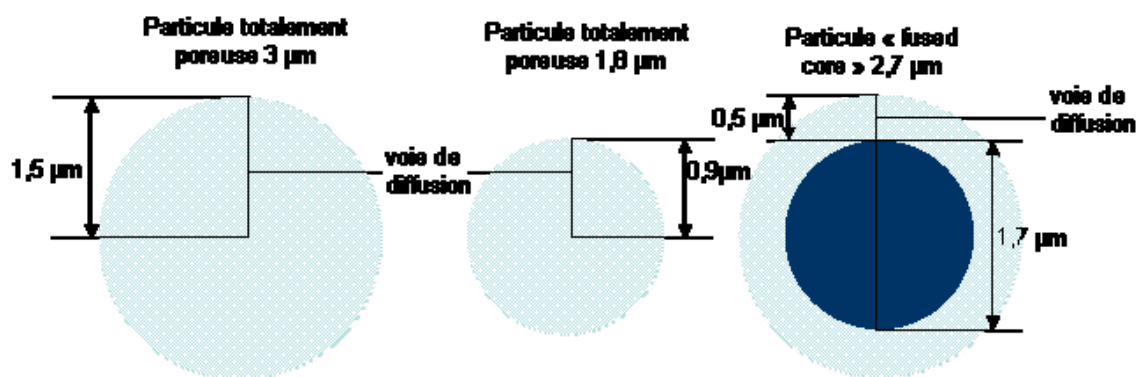


Figure II.42. Différence d'épaisseur des voies de diffusion pour les particules totalement poreuses et les particules « fused core » (documents Supelco)

La possibilité de réaliser des séparations rapides (fast LC) sur les colonnes de ce type ne vient pas seulement de la petite taille de particules mais aussi de la fabrication des particules. Sur les colonnes conventionnelles (avec des particules totalement poreuses), quand on augmente le débit de la phase mobile pour accélérer la séparation, la lenteur du transfert de masse des solutés à l'intérieur des particules limite la résolution. Les particules « fused core » répondent à cette limitation en fournissant un plus petit chemin (0,5 µm) pour la diffusion des solutés dans et hors de la phase stationnaire, ce qui réduit le temps passé par les solutés à l'intérieur des particules. Grâce à la technologie « fused core », l'augmentation de débit de la phase mobile implique une augmentation moins importante de la pression pour ces colonnes par rapport aux particules totalement poreuses de diamètre comparable (3µm) (figure II.43). Dans ces conditions, les colonnes sont compatibles avec les systèmes chromatographiques conventionnelles qui résistent à une pression maximale de 400 bars.

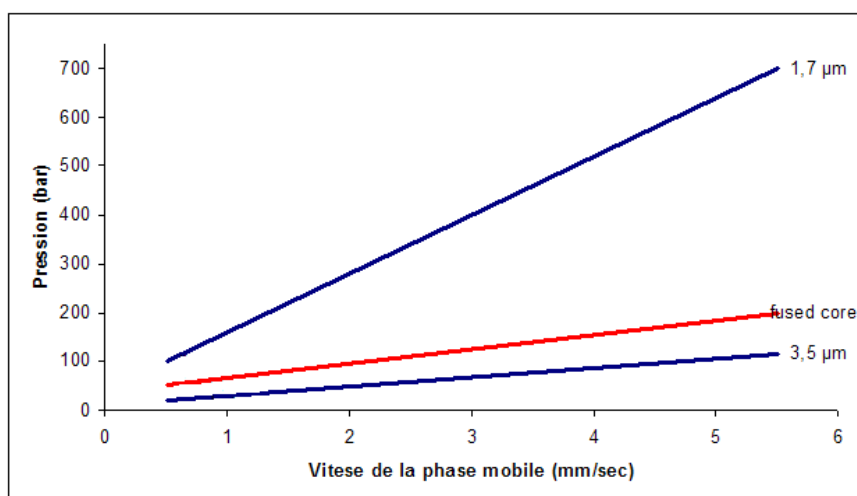


Figure II.43. Variation de la perte de charge en fonction de la vitesse de la phase mobile pour des particules de diamètre et de type différents

Dans la littérature, on retrouve des exemples d'utilisation des colonnes « fused core » pour l'analyse des caroténoïdes [49], des éthoxylates d'alcools gras [50], des composés pharmaceutiques [51,52].

IV.2.2.2. Analyse en appariement d'ions sur colonne « fused core »

Nous avons utilisé pour ces essais la colonne Halo C18 LxØ = 50x4,6 mm avec de particules « fused core » de 2,7 µm de diamètre. Malgré une surface spécifique pour cette colonne (150 m².g⁻¹) comparable à celle de la colonne remplie avec des particules totalement poreuses Supelcosil ABZ + Plus (170 m².g⁻¹) et malgré sa longueur 3 fois plus courte (5 cm pour la colonne « fused core » et 15 cm pour la colonne conventionnelle), dans les mêmes conditions de composition de la phase mobile (5% de MeOH et 95% d'une solution aqueuse de NFPA 1,25 mM) et de débit (1 mL.min⁻¹), une rétention plus importante et une plage de rétention plus étendue sont enregistrées sur le support « fused core ». Si pour le premier composé élué, le temps de rétention est inférieur à 3 min, pour le dernier composé, il est supérieur à 70 min, dans ces conditions.

Pour diminuer la durée d'analyse, nous avons augmenté le débit de la phase mobile. Ces analyses sont reportées dans la figure II.44.

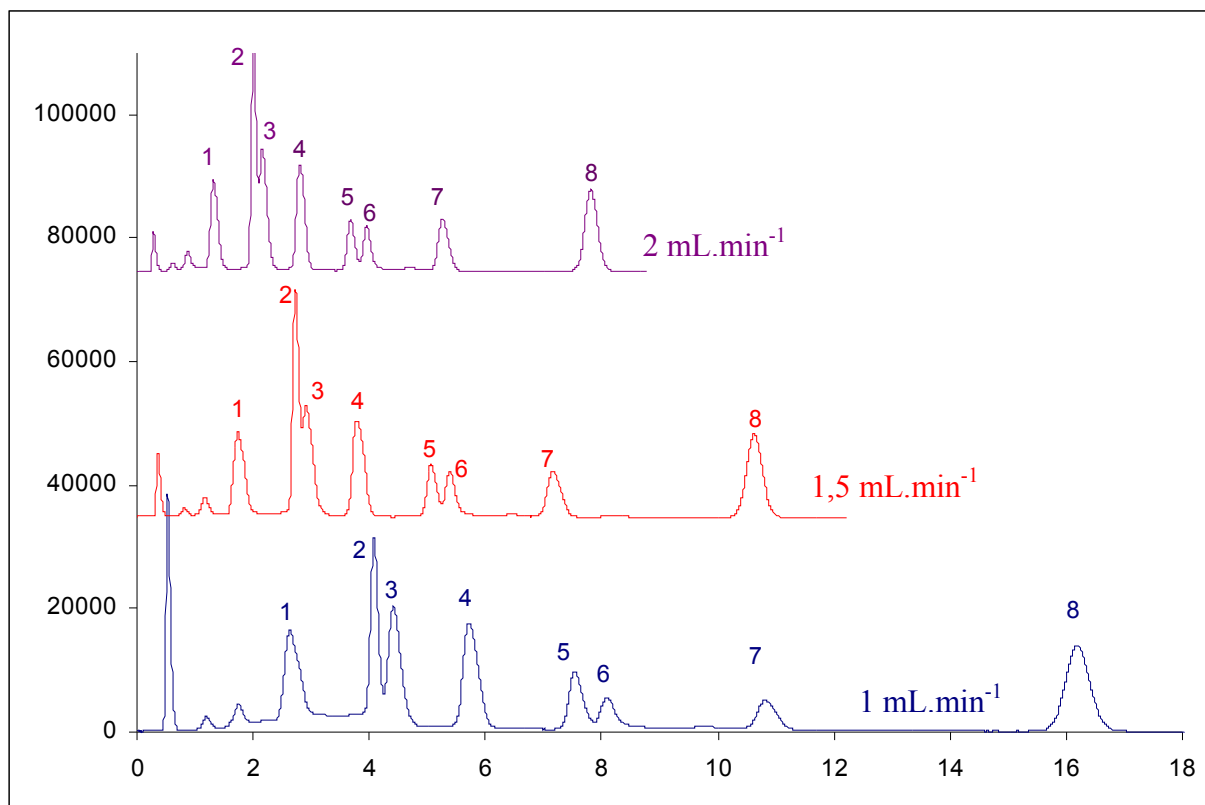


Figure II.44. Analyse isocratique d'un mélange de 8 catécholamines sur la colonne « fused core » à 3 débits différents

Colonne : Halo C18 (L x Ø = 50 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA 1,25 mM, pH 2,9 (5/95 v/v) ; Détection : UV.

1. NA, 2. DOPAC, 3. DOPA, 4. A, 5. DHBA, 6. Tyr, 7. 5HIAA, 8. DA

Sur la colonne « fused core », l'augmentation du débit de la phase mobile entraîne des pertes moins importantes de résolution que celles observées sur la colonne monolithique (Figure II.44).

A nouveau, afin de pouvoir obtenir une séparation optimale avec une durée d'analyse plus courte, nous avons fait appel à un gradient d'élution. En ayant toujours en vue un couplage possible de notre système chromatographique avec la SM, le débit que nous avons retenu pour la mise au point du gradient est un compromis (1,5 mL.min⁻¹), ceci afin de limiter les quantités de composés perdus lors de la division de flux à l'entrée de la source ESI. Dans ces conditions, nous avons réussi, pour la première fois, une séparation des 12 composés de notre mélange en moins de 20 min (Figure II.45).

Bien que les résolutions ne soient pas systématiquement supérieures à 1,5, ceci ne représente pas d'inconvénient pour une identification des composés en spectrométrie de masse aussi bien que par détection électrochimique. En revanche, la quantification de tous les composés ne sera précise qu'en SM.

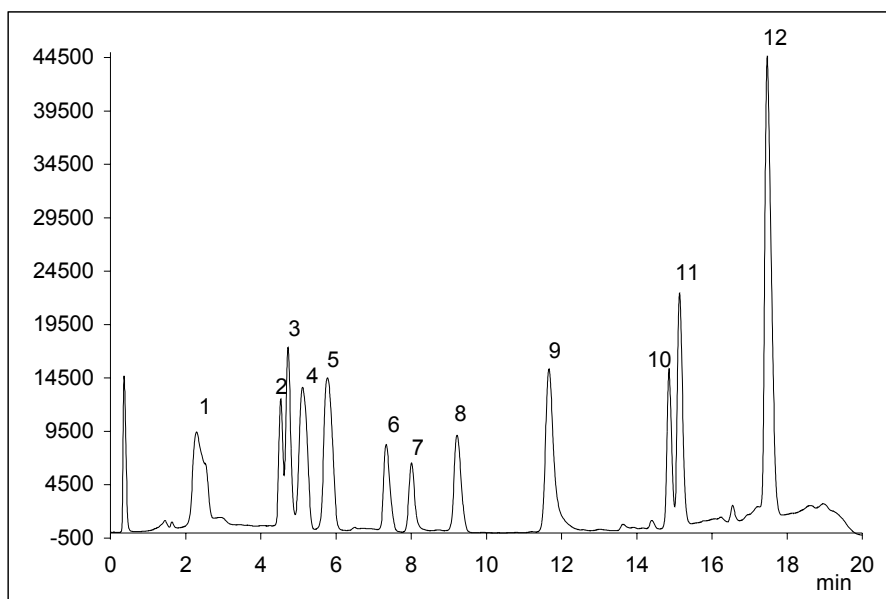


Figure II.45. Séparation des catécholamines sur la colonne « fused core » en gradient
Colonne : Halo C18 (L x Ø = 100 x 4,6 mm) ; Phase mobile : MeOH/NPFA 1,25 mM, pH 2,9, de 0% à 7% de MeOH en 10 min, de 7% à 30% MeOH en 8 min. Débit : 1,5 mL.min⁻¹ ; Détection : UV. 1. NA, 2. DOPAC, 3. DOPA, 4. A, 5. DHBA, 6. Tyr, 7. 5HIAA, 8. DA, 9. HVA, 10. S, 11. 3-MT, 12. Trp

IV.2.2.3. Bilan sur l'analyse en appariement d'ions sur colonne « fused core »

La colonne Halo C18 nous a permis de séparer pour la première fois les 12 composés de notre mélange et d'obtenir enfin une méthode compatible avec une double détection SM et électrochimie. La séparation est réalisée en mode appariement d'ions avec le NPFA comme agent d'appariement d'ions volatil et le MeOH comme modificateur organique à l'aide d'un gradient d'élution.

Pour réduire le temps d'analyse, nous avons pu augmenter le débit de la phase mobile sans pertes importantes au niveau de la séparation et de l'efficacité des pics chromatographiques.

Le seul inconvénient de cette méthode est lié à la déformation du pic chromatographique de NA (pic no 1) pour lequel nous n'avons aucune explication.

IV.2.3. Monolithe vs « fused core »

L'utilisation des colonnes de nouvelle génération de type monolithique et « fused core » nous a permis l'obtention d'une meilleure efficacité pour l'analyse de l'ensemble de

nos composés. Les pics chromatographiques fins et symétriques pourront nous donner de meilleures LODs par rapport à celles obtenues avec les colonnes conventionnelles.

Des gradients d'éluion ont été nécessaires pour la séparation des catécholamines sur ces deux types de colonnes. Les durées d'analyse sont comparables sur les deux systèmes mais avec un débit de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la colonne « fused core » et de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la colonne monolithique. Dans ces conditions, seule une coélution (S et 3-MT) est observée sur la colonne monolithique alors qu'une séparation totale pour les 12 composés est obtenue sur la colonne « fused core ».

Sur la colonne « fused core », l'augmentation du débit de la phase mobile de 1 à $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ n'affecte pas autant la séparation des composés que sur la colonne monolithique, tandis que l'augmentation de pression est plus importante.

Dans le cas de la séparation sur la colonne monolithique, les premiers composés sont suffisamment retenus, ce qui pourra représenter un avantage dans le cas de l'analyse d'échantillons réels pour lesquels un certain nombre de constituants endogènes sont élués dans le volume mort.

Ces deux systèmes devront être couplés à la SM afin de définir celui qui donnera les meilleures LODs en vue de l'analyse d'échantillons réels d'extrait de cerveau.

V. Conclusions

Ce chapitre présente les résultats que nous avons obtenus pour la séparation des catécholamines par chromatographie en mode phase inverse et en mode appariement d'ions, dans le but d'obtenir une méthode compatible avec une double détection par électrochimie et spectrométrie de masse.

La première partie du travail a été consacrée à la recherche de méthodes d'analyse en phase inverse en milieu basique et en milieu acide. L'instabilité de plusieurs solutés (NA, DA, A, DOPAC, DOPA et S) en milieu basique a rendu impossible leur analyse à des $\text{pH} > 8$.

Pour les analyses en milieu acide, plusieurs types de colonnes ont été testés afin de trouver un système séparant tous les composés à l'aide d'une phase mobile composée d'un minimum de 10% de modificateur organique (ACN ou MeOH) et un maximum de 90% d'une solution aqueuse de sel volatil. Les supports testés sont ceux couramment utilisés pour la chromatographie en phase inverse : silice greffée C18 et PGC, mais aussi d'autres moins courants tels que le pentafluorophényle et un support mode mixte phase inverse et échange de cations. Sur ces supports, nous avons étudié l'influence de différents facteurs, tels que la

nature et le pourcentage de modificateur organique, la nature et la concentration en sel, le pH ou la température, sur la séparation des catécholamines.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec la colonne en mode mixte, qui permet la séparation des 12 catécholamines (une seule coélution (S et 3-MT)) avec une phase mobile composée de MeOH et de formiate d'ammonium 20 mM, pH 3 en gradient de solvant organique. Ce sera le seul système pour lequel un couplage à la SM sera envisagé.

Dans la deuxième partie de ce chapitre nous nous sommes intéressés à la mise au point de méthodes d'analyse pour les catécholamines en chromatographie d'appariement d'ions avec des agents d'appariement d'ions volatils de la famille des acides perfluorés.

Nous avons d'abord étudié l'influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique ainsi que la nature de l'agent d'appariement d'ions sur la séparation des catécholamines sur support C18 et PGC. Les deux supports ont permis des séparations de nos composés compatibles avec une détection SM, une méthode en isocratique a été mise au point sur C18 et en gradient d'élution sur PGC.

Pour finir, la méthode optimisée sur le support C18 a été transposée sur deux colonnes de même greffage C18 dédiées à la chromatographie rapide : une colonne monolithique et une colonne avec des particules « fused core ». La rétention plus importante des composés sur ces deux supports par rapport à la colonne conventionnelle C18 nous a obligées à mettre au point des gradients d'élution de solvant organique.

De bons résultats sont obtenus sur ces deux dernières colonnes puisque pour la première fois, nous avons obtenu une séparation totale des 12 composés de notre mélange standard, sur la colonne « fused core », avec un temps d'analyse inférieur à 20 min. Ce sont aussi ces deux systèmes qui offrent la meilleure efficacité pour les séparations.

Les LODs déterminées lors du couplage de ces différents systèmes avec la SM nous permettront de choisir le meilleur système, qui pourra ensuite être utilisé pour les analyses d'échantillons réels.

Références bibliographiques

- [1] E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.Y. Ho, P.C. Ho, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 179.
- [2] M.A. Fotopoulou, P.C. Ioannou, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 179.
- [3] M. Lee, S.Y. Oh, T.S. Pathak, I.R. Paeng, B.Y. Cho, K.J. Paeng, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 340.
- [4] M. Machida, A. Sakaguchi, S. Kamada, T. Fujimoto, S. Takechi, S. Kakinoki, A. Nomura, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 249.
- [5] C. Sabbioni, M.A. Saracino, R. Mandrioli, S. Pinzauti, S. Furlanetto, G. Gerra, M.A. Raggi, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 65.
- [6] K. Miki, A. Sudo, *Clin. Chem.* 44 (1998) 1759.
- [7] F. Remiao, N. Milhazes, F. Borges, F. Carvalho, M.L. Bastos, F. Lemos-Amado, P. Domingues, A. Ferrer-Correia, *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 6.
- [8] G. Li, H. Zhang, F. Sader, N. Vadhavkar, D. Njus, *Biochemistry* 46 (2007) 6978.
- [9] J. Smythies, L. Galzigna, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1380 (1998) 159.
- [10] A. Törnkvist, P.J.R. Sjöberg, K.E. Markides, J. Bergquist, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 323.
- [11] T. Hasegawa, K. Wada, E. Hiyama, T. Masujima, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 814.
- [12] G.B. Martin, P. Chiap, P. Paquet, G. Pierard, P. de Tullio, Y. Martin, E. Rozet, P. Hubert, J. Crommen, M. Fillet, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 141.
- [13] D. Thiébaud, J. Vial, M. Michel, M.-C. Hennion, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 97.
- [14] A. Törnkvist, S. Nilsson, A. Amirkhani, L.M. Nyholm, L. Nyholm, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 216.
- [15] A. Törnkvist, P. J. R. Sjöberg, K. E. Markides, J. Bergquist, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 323–329.
- [16] P. Koivisto, A. Törnkvist, E. Heldin, K.E. Markides, *Chromatographia* 55 (2002) 39.
- [17] E. Forgács, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 229.
- [18] J.H. Knox, B. Kaur, G.R. Millward, *J. Chromatogr. A* 352 (1986) 3.
- [19] M. Przybyciel, *LC/GC North America* 24 (2006) 49.
- [20] S.R. Needham, P.R. Brown, K. Duff, D. Bell, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 159.
- [21] C.-H. Lin, J.-Y. Sheu, H.-L. Wu, Y.-L. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 414.
- [22] The Restek Advantage 710 5.
- [23] C.T. Santasania, D.S. Bell, *The Reporter Europe* 3.
- [24] D.S. Bell, A.D. Jones, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 99.
- [25] D.S. Bell, H.M. Cramer, A.D. Jones, *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 113.
- [26] C.A. Heidberder, L. Lacroix, A.R. Atkins, A.J. Organ, S. Murray, A. West, A.J. Shah, *J. Neurosci. Methods* 112 (2001) 135.
- [27] H. Luo, L. Ma, C. Paek, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 8.
- [28] Y. Wang, D. S. Fice, P.K.F. Yeung, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 519.
- [29] M. Lee, S. Y. Oh, T. S. Pathak, I. R. Paeng, B. Y. Cho, K. J. Paeng, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 340.
- [30] M.A. Saracino, R. Mandrioli, L. Mercolini, A. Ferranti, A. Zaimovic, C. Leonardi, M.A. Raggi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 107.
- [31] E. Rozet, R. Morello, F. Lecomte, G.B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K.S. Boos, P. Hubert, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 251.

- [32] B. A. Patel, M. Arundell, K. H. Parker, M. S. Yeoman, D. O'Hare, J. Chromatogr. B 818 (2005) 269.
- [33] K.N. Petritis, P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A 833 (1999) 147.
- [34] M. de Person, A. Sevestre, P. Chaimbault, L. Perrot, F. Duchiron, C. Elfakir, Anal. Chim. Acta 520 (2004) 149.
- [35] K. Petritis, S. Brussaux, S. Guenu, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A 957 (2002) 173.
- [36] A.T. Wood, M.R. Hall, J. Chromatogr. B 744 (2000) 221.
- [37] T.A. Neubecker, M.A. Coombs, M. Quijano, T.P. O'Neill, C.A. Cruze, R.L.M. Dobson, J. Chromatogr. B 718 (1998) 225–233.
- [38] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A 855 (1999) 191.
- [39] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A 870 (2000) 245.
- [40] M. de Person, P. Chaimbault, C. Elfakir, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 204.
- [41] D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, C. Schaefer, D. Cunningham, LC/GC Europe December (2001) 2.
- [42] L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich, J. Chromatogr. B 813 (2004) 191.
- [43] W.-D. Beinert, H.-P. Scholz, ChromJournal 5 (2008) 5.
- [44] I.S. Lurie, D.S. Anex, Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, J. Chromatogr. A 924 (2001) 421.
- [45] E. Lesellier, C. West, A. Tchaplá, J. Chromatogr. A 1018 (2003) 225.
- [46] M. Bedair, Z. El Rassi, Electrophoresis 23 (2002) 2938.
- [47] R. Papp, P. Luk, W.M. Mullett, E. Kwong, J. Chromatogr. B 858 (2007) 282.
- [48] M.C. Kelly, B. White, M.R. Smyth, J. Chromatogr. B 863 (2008) 181.
- [49] M. Herrero, F. Cacciola, P. Donato, D. Giuffrida, G. Dugo, P. Dugo, L. Mondello, J. Chromatogr. A 1188 (2008) 208.
- [50] A. Micó-Tormos, C. Collado-Soriano, J.R. Torres-Lapasió, E. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J. Chromatogr. A 1180 (2008) 32.
- [51] J.M. Cunliffe, C.F. Noren, R.N. Hayes, R.P. Clement, J.X. Shen, J. Pharm. Biomed. Anal. 50 (2009) 46.
- [52] W. Song, D. Pabbisetty, E.A. Groeber, R.C. Steenwyk, D.M. Fast, J. Pharm. Biomed. Anal. In Press, Accepted Manuscript.

Chapitre III
ANALYSE DE
NEUROTRANSMETTEURS PAR
CHROMATOGRAPHIE
D'INTERACTIONS HYDROPHILES
(HILIC)

CHAPITRE III.

ANALYSE DE NEUROTRANSMETTEURS PAR CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHILES (HILIC)

I. Introduction

La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) est un mode chromatographique approprié pour la séparation de petites molécules polaires sur une phase stationnaire polaire, à l'aide d'une phase mobile hydro-organique [1]. Le mode HILIC connaît depuis environ 5 ans un développement très rapide et important. Le nombre de colonnes dédiées au mode HILIC et proposées par les fabricants de supports chromatographiques a augmenté considérablement ainsi que le nombre d'applications.

Des mécanismes de rétention partiellement élucidés et un nombre de colonnes disponibles en hausse, sans aucune classification disponible, sont des difficultés auxquelles les opérateurs sont confrontés pour le choix du support approprié à leur analyse.

La polarité des composés que nous analysons (la plupart ont des $\log P < 1$, Annexe 1) nous autorise à penser que leur séparation en mode HILIC est envisageable. Un avantage de ce mode chromatographique provient de sa grande compatibilité avec une détection par spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray du fait de la proportion importante de solvant organique dans la phase mobile [2].

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressées non seulement à la séparation des neurotransmetteurs mais aussi à l'élucidation des mécanismes de rétention des composés en mode HILIC et à une proposition de classification des colonnes commercialement disponibles. Dans ce but, plusieurs supports couvrant les principaux types de phases stationnaires disponibles à l'heure actuelle sur le marché ont été testés.

Enfin, pour confirmer nos propos, nous avons fait appel aux outils chimiométriques, principalement à l'Analyse en Composantes Principales (ACP). Les résultats de l'ACP ont mis en évidence les groupes de supports présentant des similitudes de comportement.

Pour conclure ce chapitre, nous présentons un protocole pour l'optimisation des séparations en mode HILIC. Le protocole proposé a été ensuite appliqué à l'optimisation de la séparation de neurotransmetteurs de la famille des acides aminés (Asp, Glu, GABA et Gly) et

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

de quelques homologues organophosphorés utilisés comme herbicides (glufosinate d'ammonium, glyphosate et ethephon).

II. Etat de l'art sur la Chromatographie d'Interactions Hydrophiles (HILIC)

L'acronyme HILIC, pour chromatographie d'interactions hydrophiles a été introduit par Alpert en 1990 [1] pour décrire une technique chromatographique qui utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile hydro-organique pour la séparation de petites molécules très polaires (acides aminés, peptides, carbohydrates, acides nucléiques), mais cette technique avait été utilisée depuis 1975 pour la séparation des sucres.

Le mode HILIC combine les avantages de la chromatographie à polarité de phases normale (NPLC) (rétention et séparation des composés polaires) avec ceux de la chromatographie à polarité de phases inversée (utilisation de phases mobiles hydro-organiques). L'HILIC résout ainsi les problèmes de séparation des composés polaires et hydrophiles qui n'ont pas de rétention sur les supports apolaires de la RPLC et qui ont une solubilisation difficile voire impossible dans les phases mobiles 100% organiques de la NPLC.

Le développement de l'HILIC est dû au besoin croissant d'analyses de composés polaires dans des matrices complexes [3] et à l'avantage représenté par l'utilisation de phases mobiles compatibles avec une détection ESI-MS [2,3]. La popularité importante de l'HILIC est illustrée par le nombre croissant d'articles publiés. Si en 2003 il y avait moins de 20 publications sur ce sujet, en 2007 il y en avait environ 5 fois plus (figure III.1). Par ailleurs, en 2008 le Journal of Separation Science a sorti un premier volume spécial dédié intégralement au mode HILIC (vol 31, issue 9), avec plus de 20 revues et articles.

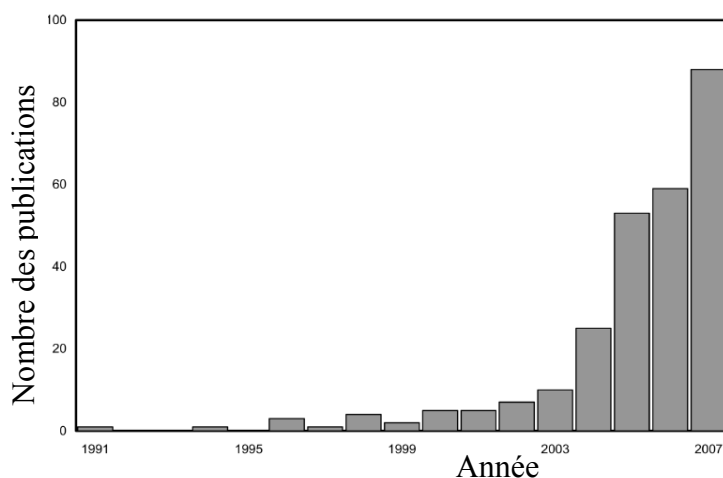


Figure III.1. Evolution du nombre de publications se rapportant aux séparations en mode HILIC d'après SCOPUS (mots clés : « HILIC » ou «phase normale aqueuse») [4]

II.1. Mécanisme principal de rétention en mode HILIC

Le mécanisme de la chromatographie en mode HILIC, tel que décrit par Alpert [1], implique un partage des solutés entre une couche de phase mobile enrichie en eau partiellement immobilisée à la surface de la phase stationnaire et une phase mobile plus hydrophobe. La chromatographie en mode HILIC se différencie de la NPLC par le fait que la présence de l'eau dans la phase mobile est cruciale pour la mise en place de la couche enrichie en eau adsorbée à la surface de la phase stationnaire. En HILIC, le mécanisme de rétention est basé sur le partage du soluté tandis qu'en NPLC il est basé sur l'adsorption du soluté à la surface de la phase stationnaire [5].

La chromatographie en mode HILIC est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire polaire en silice vierge ou silice/polymère greffée amide, amino, diol, etc. avec une phase mobile de type hydro-organique (eau/méthanol ou eau/acétonitrile), contenant un pourcentage d'eau compris entre 2 et 40%. Dans ce mode de séparation, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires (Figure III.2). De ce fait, des ordres de rétention inversés par rapport à la RPLC ont été rapportés [1,6] (Figure III.3).

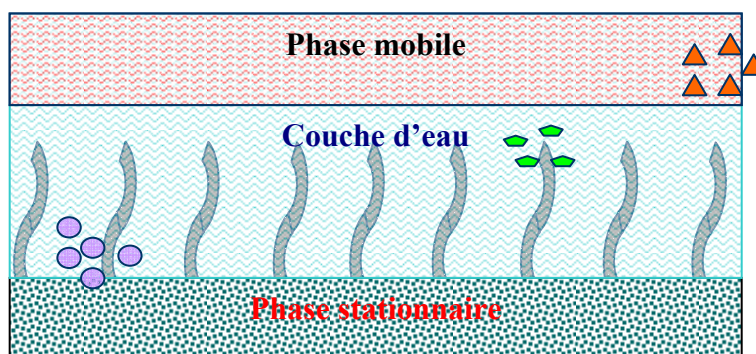


Figure III.2. Principe de la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

● molécules très polaires ; ◆ molécules moyennement polaires ; ▲ molécules apolaires

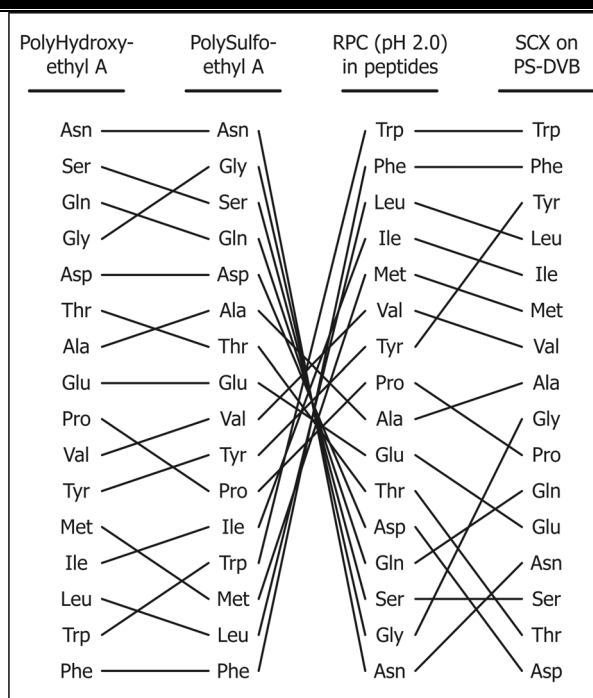


Figure III.3. Comparaison de l'ordre d'élution des acides aminés sur différents supports [1]

Supports HILIC : Polyhydroxyethyl A et Polysulfoethyl A (L x Ø = 200 x 4,6 mm). Phase mobile : ACN/ TEAP 10 mM (pH 2,8) (80/20 v/v).

Support RPLC : gradient d'eau à ACN (0,1% TFA dans chaque composante de la phase mobile).

Support échangeur de cations (SCX) : gradient d'élution en concentration en sel et en pH.

II.2. Mécanismes secondaires de rétention en mode HILIC

Dans leur revue sur l'HILIC, P. Hemström et K. Irgum [5] contestent le mécanisme de partage proposé par Alpert [1] et approuvent plutôt le mécanisme basé sur l'adsorption proposé par Yoshida [7]. En se basant sur l'équation utilisée en phase normale (équation III.1) pour décrire la relation entre la rétention des solutés et la composition de la phase mobile, Yoshida a mis en évidence une dépendance linéaire du logarithme du facteur de rétention de différents peptides avec le logarithme de la fraction volumique de l'eau dans la phase mobile et conclut à un mécanisme pour le mode HILIC, proche de celui de la phase normale (mécanisme d'adsorption) (Figure III.4).

$$\log k(\Phi) = \log k_0 - S \cdot \log \Phi \quad (III.1)$$

- Φ fraction volumique du solvant polaire dans la phase mobile
- k_0 facteur de rétention pour Φ égale ou très proche de 0
- S, pente de la droite = $- d[\log k] / d[\log \Phi]$ pour un soluté donné et un solvant polaire.

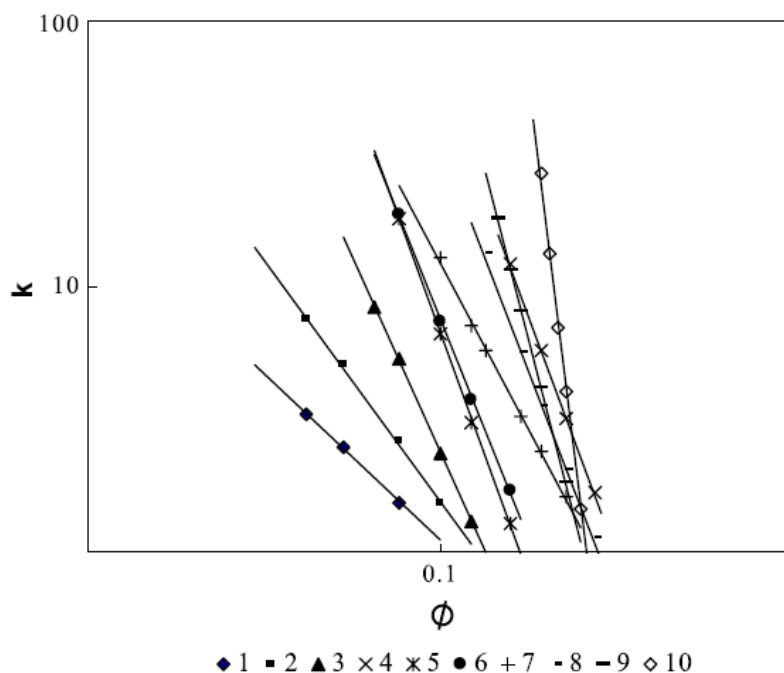


Figure III. 4. Variation du facteur de rétention des différents peptides avec la fraction volumique d'eau dans la phase mobile [7]

1=FY; 2=FGGF; 3=FLEEI; 4=DYMGWMDP-NH₂; 5=NFTYGGF; 6=AGSE;
7=WAGGDASGE; 8=YGGFMTSQKSQTPLVT; 9=ASTTTNYT;
10=VLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETLEKFDRFKHLKTEAE

Il est certain que même si on considère que le partage des solutés entre la couche d'eau immobilisée et la phase mobile est le mécanisme principal en HILIC, il y a des mécanismes secondaires qui impliquent des interactions solutés-phase stationnaire telles que des interactions électrostatiques [8-10] ou liaisons hydrogène [7,11]. L'existence d'interactions entre les solutés et la phase stationnaire est discutée par plusieurs auteurs [8,12,13] et ces interactions complémentaires sont mises en évidence par des différences de sélectivité offertes par les différents supports dans des conditions données de phase mobile (Figure III.5) [8,13].

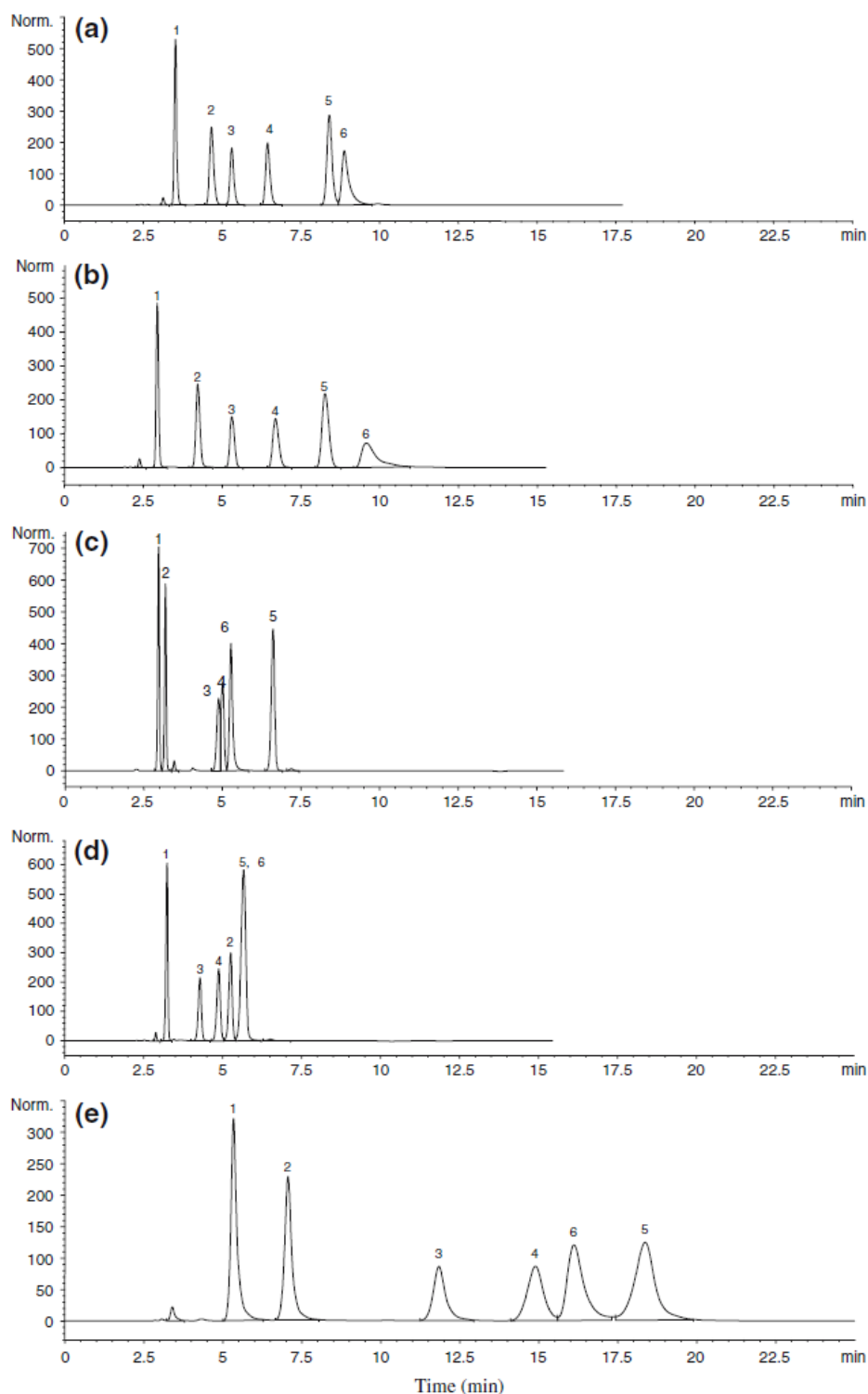


Figure III.5. Analyse de 6 acides organiques sur différents supports [14]

(a) TSK-gel Amide-80, (b) Polyhydroxyethyl A, (c) HILIC Silica, (d) ZIC-HILIC, (e) YMCPack NH₂

Phase mobile : ACN/HCOONH₄ (85/15 v/v). Débit : 1 mL.min⁻¹. Température : 30°C.
Détecteur : UV à 228 nm. 1. acide salicylique, 2. acide gentisique, 3. acide acétylsalicylique, 4. acide salicylurique, 5. acide hippurique, 6. acide α -hydroxyhippurique

II.3. Paramètres influant sur la séparation en mode HILIC

À partir des données de la littérature nous avons identifié plusieurs paramètres à prendre en compte pour l'optimisation des séparations en mode HILIC, parmi lesquels : la nature de la phase stationnaire, la nature et le pourcentage de modificateur organique, la nature et la concentration en sel dans la phase mobile ainsi que le pH.

II.3.1. Choix de la phase stationnaire

Le nombre de colonnes dédiées au mode HILIC est en croissance mais les types de phases stationnaires restent limités aux : silice vierge, silice ou polymères greffés amino, silice greffée amide, diol, polysuccinimide, cyano, sulfobetaine (figure III.6.) et les supports à base de cyclodextrines.

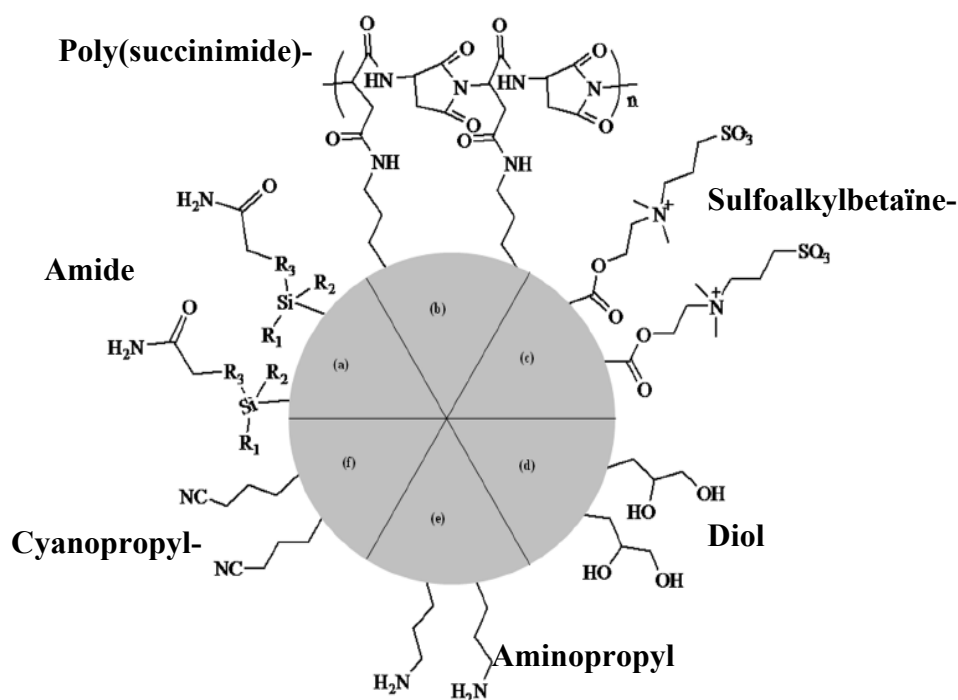


Figure III.6. Représentation des greffages les plus utilisés en HILIC [2]

Le tableau III.1 répertorie les colonnes commerciales et leurs principales applications HILIC.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Tableau III.1. Supports compatibles avec le mode HILIC et applications s'y référant

Support	Greffage	Nom commercial	Applications
Silice	Pas de greffage	Atlantis HILIC, ChromoLith, Betasil, Kromasil, Atlantis HILIC, Ascentis Express HILIC, Halo HILIC, Supelcosil SI	Pesticides organophosphorés [8], aminométhylepyridine [13], aniline, pyridine et leurs dérivés [15], miglustate [16], acides organiques [14], zanavir [17], xanthines et nucléotides [18-20], sucres [20], flavonoïdes [21], paroxetine [22], levosulpiride [23], fluconazole [24], fentanyl [25], composés basiques [26], posaconazole [27], impuretés de mildronate [28], acides aminés [29], peptides [29], composés d'Amadori [29], métabolites cellulaires [30], ions inorganiques [31], epirubicin et ses analogues [32], composés organophosphorés [33], carbadox et olaquinox [34], pseudoephedrine [35]
Silice	Diol	Luna Diol, YMC Pack Diol, Inertsil Diol, Lichrospher Diol	Nucléosides et nucléotides [11], hydrazines [12], aminométhylepyridine [13], xanthines et nucléotides [18], vitamines [36], acide urique [37], acides aminés et sucres [38], impuretés d'un produit pharmaceutique [39], choline et acétylcholine [40]
Silice ou polymère	Amino	Astec apHera NH ₂ , Zorbax NH ₂ , Luna NH ₂ , YMC pack NH ₂ , Nucleosil NH ₂	Hydrazines [12], aminométhylepyridine [13], acides organiques [14], impuretés de mildronate [28], métabolites cellulaires [30], taurine [41], sulfonamide [42], acide dichloroacétique [43], iminosaccharides [44]
Silice	Amide	TSK gel Amide 80	Pesticides organophosphorés [8], hydrazines [12], aminométhylepyridine [13], acides organiques [14], xanthines et nucléotides [18], sucres [20], nucléosides [20], métabolites cellulaires [30], iminosaccharides [44], protéomique [45], acides aminés [46], proanthocyanidines [47], toxines [48]
Silice ou polymère	Sulfo-betaïne	ZIC HILIC	Pesticides organophosphorés [8], hydrazines [12], aminométhylepyridine [13], acides organiques [14], xanthines et nucléotides [18], impuretés de mildronate [28], toxines [49], métallomique [50], oseltamivir [51], aminohydroxyphénylalanine [52], opioïdes et leurs glucuronoides [53], glucosinolates [54], métabolites urinaires [55]
Silice	Cyano	Kromasil Cyano, Modulocart CN	Aminométhylepyridine [13], impuretés de mildronate [28], métabolites cellulaires [30], catécholamines [56]
Silice	Triazole	Cosmosil HILIC	Pesticides organophosphorés [8]

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Support	Greffage	Nom commercial	Applications
Silice	Polysuccinimide	PolyCATA, PolySulfoethyl, PolyHydroxyethyl A, Poly-Glycoplex	Sucres [1], aminométhylepyridine [13], acides organiques [14], iminosaccharides [44], toxines [48], avoparcin [57], acides aminés [1,58,59], peptides [1,58-60], urée [61], allantoïne [61], lysine pyroglutamate [61], choline et acetylcholine [62]
Silice	Cyclo-dextrines	Cyclobond I 2000	Nucléotides [19], flavonoïdes [21],
Silice	Penta-fluoro-phényle	Varian PFP, Discovery HS F5	Aminométhylepyridine [13], phenylephrines [63]
Dioxyde de titane	Pas de greffage		Nucléosides et métabolites [64]

Ce tableau met en évidence que ce sont les silices vierges qui restent les supports les plus utilisés. Par ailleurs, la figure III.7 illustre que la qualité de la silice joue un rôle important dans les séparations en intervenant sur les temps de rétention et les efficacités de pics [10,15,65].

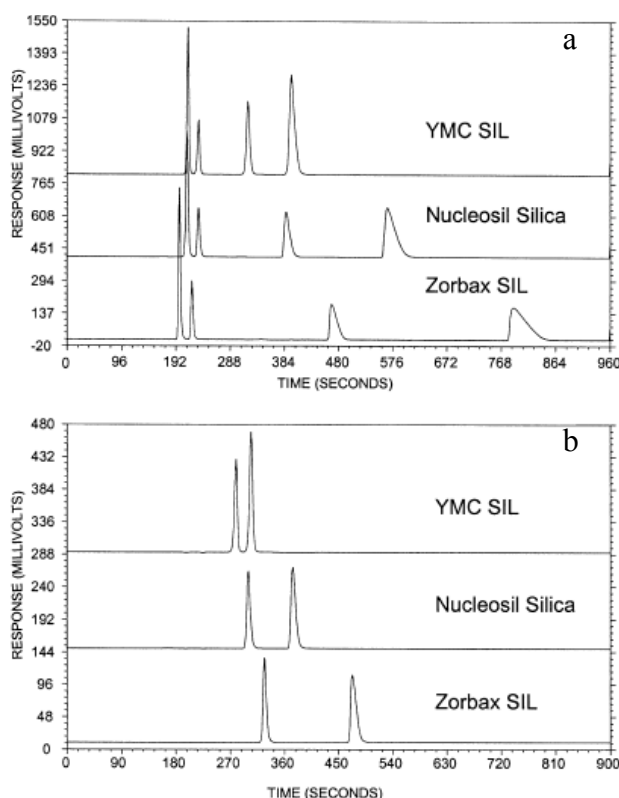


Figure III.7. Séparation des pyrimidines (a) et purines (b) sur colonnes en silice
Phase mobile : ACN/H₂O+H₃PO₄ 5 mM (70/30 v/v) pour les pyrimidines et (75/25 v/v) pour les purines. Détection : UV à 275 nm [10]
Pyrimidines : 5-fluorouracil, uracil, 5-fluorocytosine, cytosine; purines : acyclovir, guanine

II.3.2. Nature et pourcentage des solvants dans la phase mobile

En HILIC, le pouvoir éluant des solvants est inversé par rapport à celui connu en RPLC, l'eau étant le solvant le plus éluant. Il peut être schématisé de la façon suivante selon un ordre croissant :

acétonitrile < acétone < tétrahydrofurane < isopropanol < éthanol < méthanol < eau

En HILIC, les alcools sont des meilleurs solvants que l'acétonitrile grâce à leur aptitude à établir des liaisons hydrogène (Figure III.8) [13,32]. De plus, il a été démontré que le MeOH pouvait être utilisé comme bon solvant à la place de l'eau dans une phase mobile pour réaliser des séparations en mode HILIC non-aqueux [10,11,66]. Malgré sa polarité plus faible, le THF est lui aussi plus éluant que l'ACN du fait de sa possibilité d'être accepteur de liaisons hydrogène.

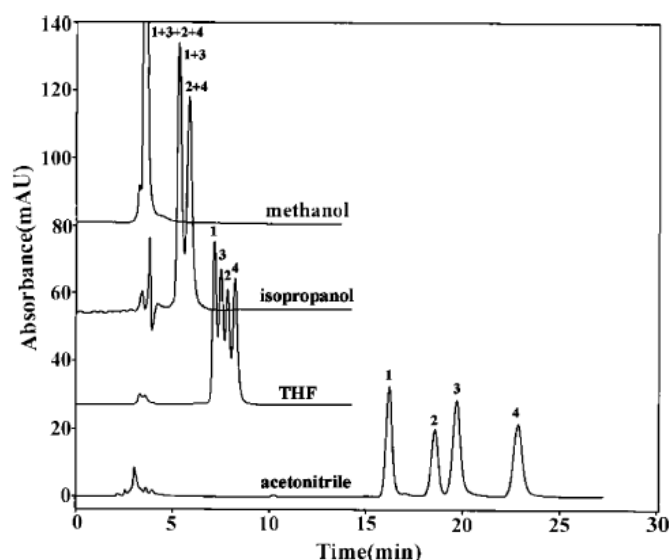


Figure III.8. Effet de la nature du modificateur organique sur la séparation de l'épirubicin et de ses analogues.

Colonne : Kromasil KR100-5SIL (5 μ m). Phase mobile : tampon formiate de sodium (20 mM, pH 2,9) avec différents modificateurs organiques (10:90 v/v). Détection : UV.

(1) epidaunorubicin, (2) daunorubicin, (3) epirubicin, (4) doxorubicin [32]

Le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile est un des facteurs les plus importants pour l'optimisation de la séparation [9]. Une augmentation de la rétention des composés est associée à une augmentation du pourcentage de modificateur organique [8-10,66] comme l'illustre la figure III.9.

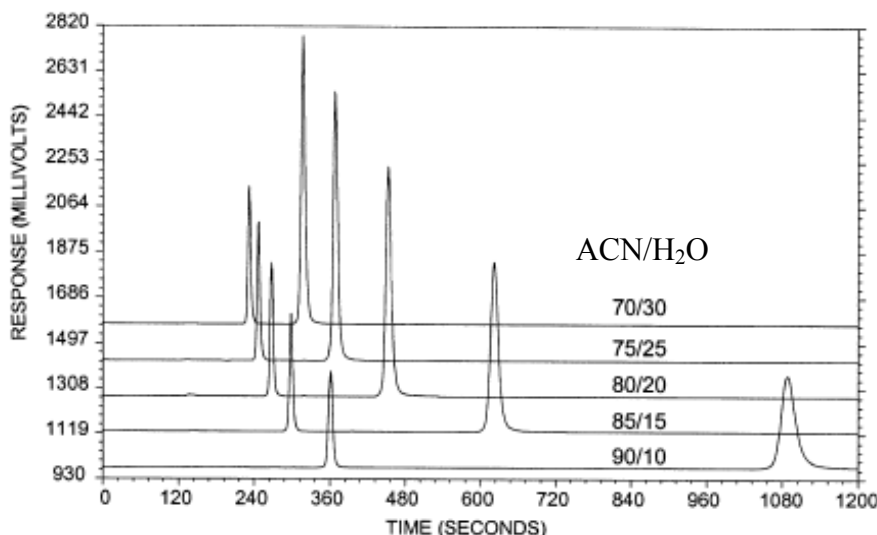


Figure III.9. Influence du pourcentage du modificateur organique sur la séparation de l'uracile et la cytosine [10]

Colonne : Zorbax NH₂ ; Phase mobile : ACN/H₂O ; Détection : UV ; Solutés : uracile et cytosine.

II.3.3. Nature et concentration des sels dans la phase mobile

La présence de sel dans la phase mobile est nécessaire lors de l'analyse de composés ioniques en mode HILIC, pour le contrôle de l'élution des composés et l'amélioration de l'efficacité de leurs pics chromatographiques. La plupart des sels utilisés en RPLC ne peuvent pas être utilisés en HILIC à cause de leur faible solubilité dans les phases mobiles riches en ACN. Les sels qui sont compatibles avec les phases mobiles du mode HILIC sont le formiate et l'acétate d'ammonium, les sels de bicarbonate, le phosphate de triéthylammonium et le perchlorate de sodium. Ces deux derniers ne sont pas volatils et de ce fait ne sont pas compatibles avec un couplage SM [9].

En mode HILIC, le comportement attendu est une augmentation de la rétention des solutés avec l'augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile (figure III.10.a) [8,9,13]. Ce phénomène est lié au fait que le sel étant plus soluble dans l'eau que dans la phase mobile riche en solvant organique, va préférentiellement se diriger vers la couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire, ce qui se traduit par une augmentation soit du volume d'eau à la surface du support, soit de l'hydrophilie de la couche immobilisée [37]. Pour les composés ionisés une diminution de la rétention est cependant possible avec l'augmentation de la concentration en sel quand des interactions électrostatiques induisent des mécanismes de rétention de type échange d'ions (figure III.10.b) [9,10,12,65].

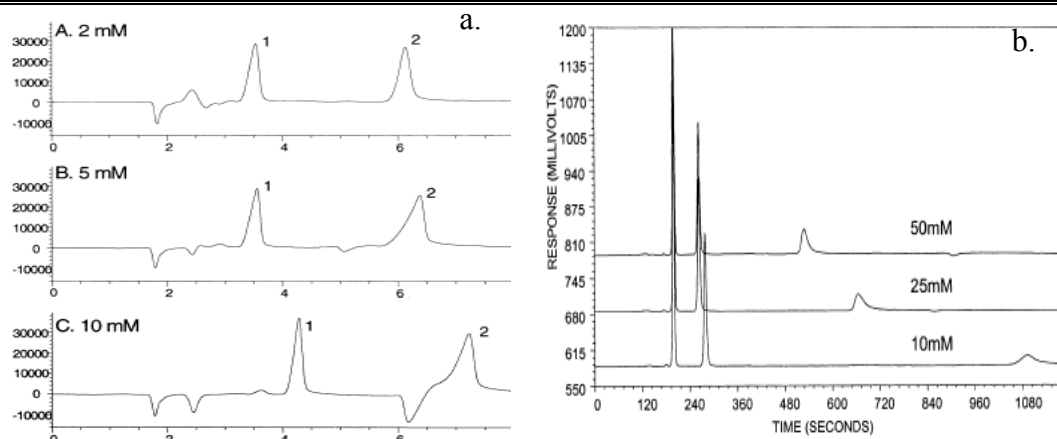


Figure III.10. Influence de la concentration en sel dans la phase mobile

a. sur la rétention de trométhamine et 2-amino-2-éthyle-1,3-propanediol [67]

Colonne : Zorbax NH₂ ; Phase mobile : ACN/CH₃COONH₄ (80/20 v/v) ; Détection : réfractométrique ;

b. sur la rétention de l'oxamide, l'acide oxamique et l'acide oxalique [10]

Colonne : Zorbax NH₂ ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate de potassium pH 7, (60/40 v/v) ; Détection : UV à 205 nm.

La figure III.11. montre que dans certains cas l'augmentation de la concentration du sel dans la phase mobile a comme effet en plus d'une diminution de rétention, l'amélioration de l'efficacité des pics due à la diminution voire l'élimination des interactions électrostatiques soluté – phase stationnaire au bénéfice exclusif des interactions ion développeur – phase stationnaire [68].

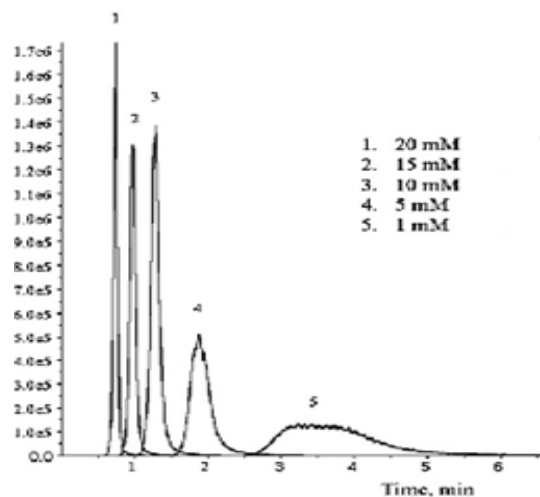


Figure III.11. Influence de la concentration en sel dans la phase mobile sur l'efficacité du pic chromatographique de la dipeptidyl peptidase [68]

Colonne : Atlantis HILIC silica ; Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 1-20 mM (90/10 v/v) ; Débit : 1 mL.min⁻¹. Détection : SM.

II.3.4. pH de la phase mobile

Le pH de la phase mobile peut jouer sur l'état de charge des analytes, mais aussi du support chromatographique. Différents comportements ont été rapportés dans la littérature en fonction des solutés et des supports utilisés pour les analyses.

Par exemple, Li *et al* [32] ont mis en évidence l'effet du pH dans l'intervalle 2,4 – 6,5 sur la séparation de l'epirubicin et de ses analogues sur une colonne de silice vierge (Figure III.12). La rétention des composés augmente jusqu'à pH 4,2, puis diminue jusqu'à pH 6,5. Cet effet est dû à la variation de l'état de charge des composés analysés. Ils sont positivement chargés entre pH 2,4 et 4,2 et sont donc retenus grâce aux interactions électrostatiques avec la silice négativement chargée (ionisation des silanols). Au delà de pH 4,2, même si le nombre de charges négatives présentes à la surface de la silice augmente, la rétention des solutés diminue car leur protonation diminue également et de ce fait l'apport des interactions électrostatiques dans la rétention est moins important. Un comportement similaire a été rapporté aussi par Gu *et al.* [56] pour la rétention des catécholamines (DOPAC, HVA, VMA, DOMA, MHPG) sur une colonne silice greffée cyanopropyle.

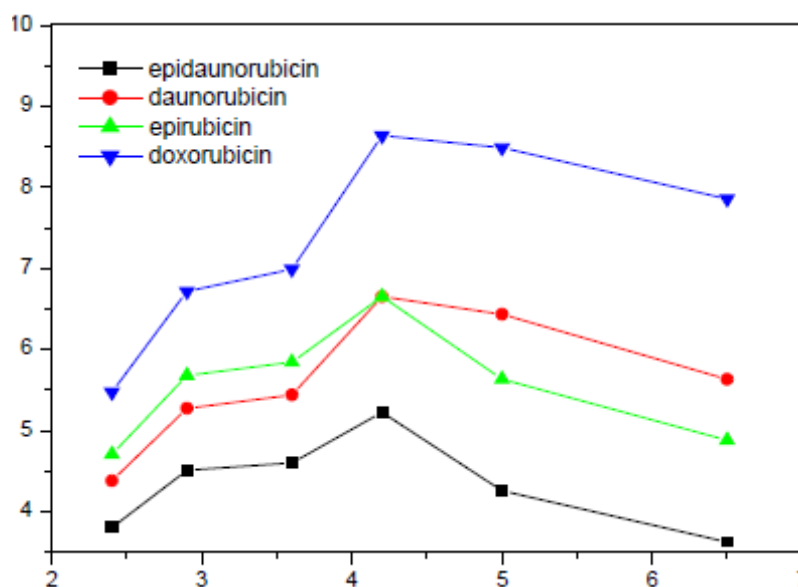


Figure III.12. Effet du pH sur le facteur de rétention de l'epirubicin et de ses analogues
Colonne : Kromasil KR100-5Sil (L x Ø = 250 x 4,6 mm) ; Phase mobile : ACN/HCOONa 20 mM (90/10 v/v).

II.3.5. Température

La température de la colonne est un facteur important en CPL, elle modifie la diffusion des solutés, la viscosité de la phase mobile et l'enthalpie de transfert du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En phase inverse, la relation entre $\log k$ et la température de la colonne est souvent représentée par l'équation de van't Hoff (équation II.1, chapitre II, page 98). Si la rétention en mode HILIC est gouvernée principalement par des interactions de partage alors on doit observer une variation linéaire de $\log k$ en fonction de $1/T$.

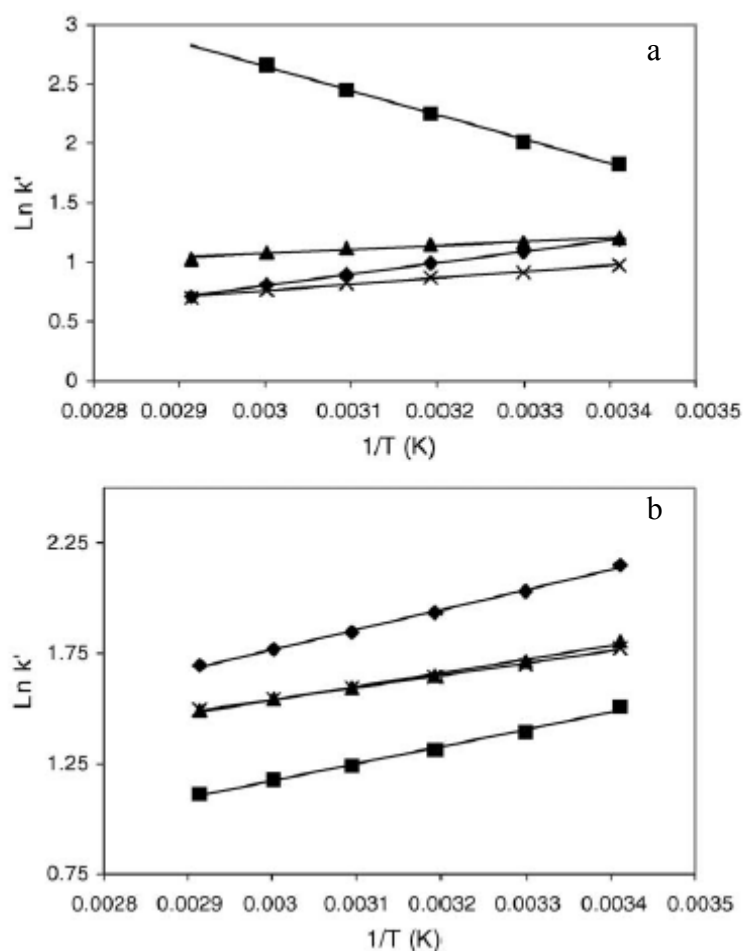


Figure III.13. Courbes de van't Hoff pour l'aspirine (a) et la cytosine (b) sur différentes colonnes [9]

Colonnes : (◆) TSKgel Amide-80, (■) YMC-Pack NH₂, (▲) HILIC Silica, et (×) ZIC HILIC ; Phase mobile : ACN/CH₃COONH₄ 10 mM (90/10, v/v).

Dans leur étude, Guo *et al.* [9] ont montré que pour la cytosine sur les 4 colonnes et pour l'aspirine sur 3 colonnes (exception YMC pack NH₂), la rétention diminue lorsque la température augmente de 20°C à 70°C (Figure III.13). De plus, la relation est linéaire (r^2 entre

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

0,960 et 0,998) comme habituellement observé en RPLC. Les pentes étant positives, les valeurs négatives calculées pour l'enthalpie de la majorité des composés peuvent être interprétées comme traduisant de faibles interactions soluté-phase stationnaire et de ce fait, viennent confirmer le mécanisme de partage proposé initialement par Alpert [1].

Le comportement singulier de l'aspirine sur support aminopropyle peut s'expliquer par des interactions secondaires de type échange d'ions très fortes au pH de la phase mobile. Ce phénomène est également observé avec d'autres acides (salicylique, 4-aminosalicylique).

II.3.5. Importance du solvant d'injection

Il est un fait bien connu en chromatographie liquide, que le solvant d'injection doit être moins éluant que la phase mobile ou de même composition afin d'avoir une distribution rapide des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile. En général, en RPLC une petite différence de composition entre le solvant d'injection et la phase mobile n'entraîne pas de perturbations notables, l'effet le plus commun est représenté par la diminution du temps de rétention si le solvant d'injection est plus éluant que la phase mobile. En mode HILIC, l'effet de diminution de temps de rétention est exacerbé et peut être provoqué par la moindre différence dans la proportion du solvant organique par rapport à l'eau entre le solvant d'injection et la phase mobile (Figure III.14.a et b). Dans le cas de l'analyse de composés ioniques (figure III.14. c et d) un phénomène supplémentaire peut également être observé : si la concentration de sel dans la phase mobile est supérieure à celle du solvant d'injection, la forme du pic chromatographique du soluté peut être gravement affectée. On observe un élargissement et un début de dédoublement pour le pic de l'analyte anionique (Gluf). Ainsi, il ne suffit pas uniquement de respecter la proportion entre solvant organique et eau de la phase mobile pour le solvant d'injection, il est impératif de respecter aussi la concentration en sel dans le but d'obtenir la meilleure efficacité pour la séparation.

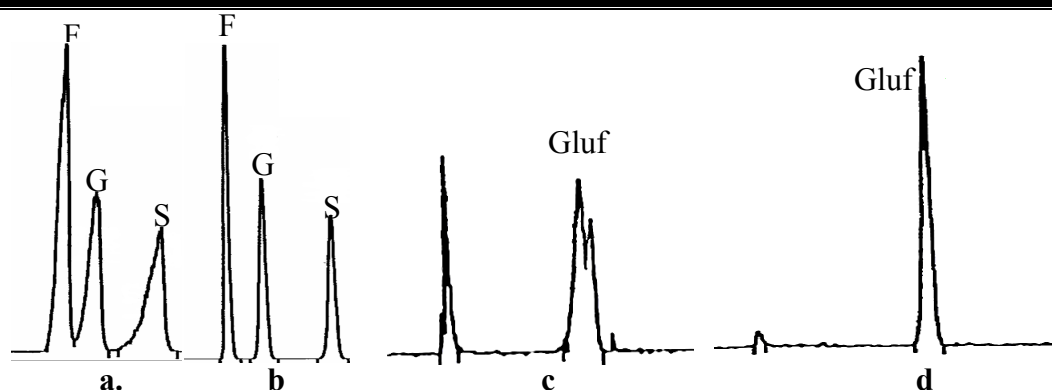


Figure III.14. Influence de la composition du solvant d'injection sur l'efficacité des pics [69]

Analyse d'un mélange de sucrose (S), glucose (G) et fructose (F).

Colonne : Astec apHera NH₂. Phase mobile : ACN/ H₂O (75/25 v/v) ; Solvant d'injection : a. eau et b. la phase mobile ACN/H₂O (75/25 v/v) ;

Analyse du glufosinate (Gluf)

Colonne : ZIC HILIC. Phase mobile : ACN/ CH₃COONH₄ 20 mM (70/30 v/v) ; solvant d'injection : c. ACN/ H₂O (70/30 v/v) et d. MeCN/ CH₃COONH₄ 20 mM pH 6,7 (70/30 v/v)

Détection : DEDL.

II.4. Résumé des deux références se rapportant à l'analyse des catécholamines en mode HILIC

À notre connaissance, il y a un nombre très faible de publications concernant l'analyse des catécholamines par chromatographie d'interactions hydrophiles.

En 2007, Zhang *et al.* [70] ont réalisé des essais pour la séparation de 6 neurotransmetteurs, parmi lesquels S et DA, sur une colonne capillaire conçue par les auteurs en silice greffée polyhydroxyéthyle aspartamide. La phase mobile composée d'ACN et de HCOONH₄ 20 mM en mode gradient en vue d'un couplage CPL-SM est compatible avec une détection par spectrométrie de masse. Comme on peut le voir sur la figure III.15, la séparation entre S et DA n'est pas complète (pas de retour à la ligne de base).

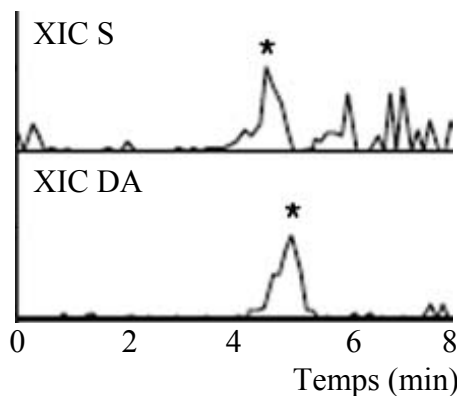


Figure III.15. Chromatogrammes de courants ioniques extraits pour S et DA dans le fluide cérébral extracellulaire de primate

Colonne : silice greffée polyhydroxyéthyle aspartamide (L x Ø = 30 cm x 200 µm) ; Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 20 mM en mode gradient. Détection : ESI-SM/SM

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Gu *et al.* [56] ont publié en 2008 des travaux sur l'analyse de 8 catécholamines (NA, Tyr, DOPA, A, DA, 3-MT, MN et NMN) sur une colonne commerciale de silice greffée cyanopropyle (Kromasil Cyano). La figure III.16 montre la séparation qu'ils ont obtenue en mode d'élution isocratique, avec une phase mobile ACN/HCOOH pH 3 (60/40 v/v). Le fort pourcentage de solution aqueuse de HCOOH dans la phase mobile entraîne les coélutions de plusieurs solutés : DOPA et Tyr, ou encore: A, NMN et DA.

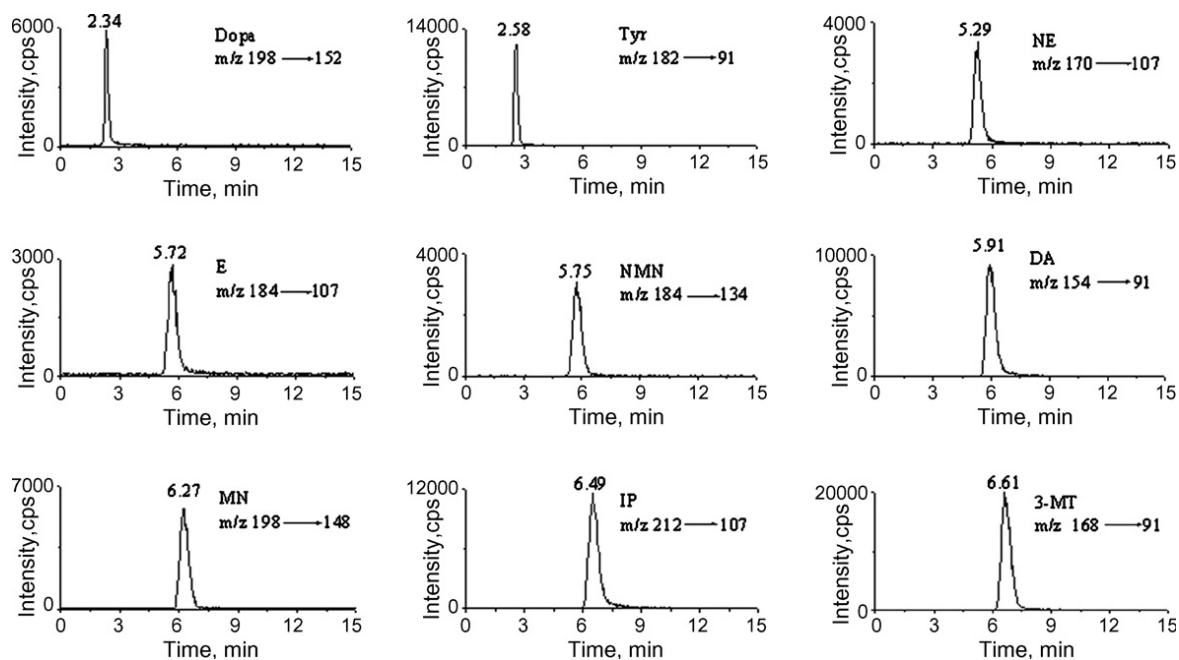


Figure III.16. Chromatogrammes de courants extraits pour un mélange standard
Colonne : Kromasil Cyano (L x Ø = 150 x 2,1 mm); Phase mobile : ACN/HCOOH pH 3 (60/40 v/v). Concentration des solutés : 0,5 µg.mL⁻¹ ; Détection : ESI-SM/SM.

Ces deux études montrent que la rétention et la séparation des catécholamines est envisageable en mode HILIC. Cependant les faibles séparations obtenues dans les deux exemples montrent qu'une optimisation des différents paramètres reste nécessaire et prometteuse dans le cadre de l'analyse des catécholamines en mode HILIC.

II.5. Conclusions

Nous avons vu dans cette première partie du chapitre que le mode HILIC est devenu une technique de choix pour l'analyse des composés polaires. Des études ont été réalisées pour expliquer les mécanismes de rétention des composés dans ce mode chromatographique. Il apparaît que le partage n'est pas le seul mécanisme de rétention des composés en HILIC, des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène jouent aussi un rôle important.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

À partir des données de la littérature, nous avons pu dégager les facteurs les plus importants pour l'optimisation des analyses.

Malgré le nombre important d'applications déjà publiées pour l'analyse en mode HILIC d'un certain nombre de familles de solutés polaires (Tableau III.1), les applications faisant référence aux catécholamines restent très limitées.

Nous allons dans la suite de ce chapitre présenter nos résultats sur l'optimisation sur différents colonnes HILIC commercialement disponibles de la séparation du mélange des 12 catécholamines sélectionnées. Les informations obtenues nous permettront de discuter les mécanismes de rétention et de proposer une classification des supports testés.

III. Approche détaillée pour la sélection des systèmes HILIC – Application à la séparation des catécholamines

Pour l'optimisation de la séparation en mode HILIC des catécholamines nous avons testé l'influence des paramètres suivants : la nature et le pourcentage de modificateur organique, la nature et la concentration en sel, le pH et la température, sur 12 colonnes différentes.

III.1. Comparaison des performances de phases stationnaires HILIC

Les phases stationnaires commerciales que nous avons testées peuvent être divisées en trois groupes : neutres (cyano, amide et diol), positivement (triazole et amino) ou négativement (silice) chargées ou chargeables en fonction du pH de la phase mobile. Un cas particulier est représenté par la colonne de type zwitterionique, de charge globale nulle, bien qu'ayant toujours sur son greffage une charge positive et une charge négative (colonne greffée sulfobetaine). Les principales caractéristiques de ces colonnes sont rassemblées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Caractéristique principales des colonnes utilisées

Colonne	LxØ (mm)	Diamètre des particules (µm)	Taille des pores	Support	Surface spécifique	Vendeur
Uptisphere Strategy HILIC	250x2	5	100 Å	Silice sphérique, ultra pure	450 m ² /g	Interchim
Pursuit XR.s Si	150x2	3		Silice sphérique, ultra pure	-	Varian
Ascentis Express HILIC	150x2.1	2.7	90 Å	Silice « Fused core »	-	Supelco
Luna DIOL	150x2	3	200 Å	Silice greffée diol	200 m ² /g	Phenomenex
Pursuit XR.s 3u Diol	150x2	3		Silice greffée diol	-	Varian
TSK.gel Amide 80	250x2	5	100 Å	$ \begin{array}{c} R_4 \\ \\ H - (CH - CH_2)_m - (CH_2 - C)_n - H \\ \qquad \qquad \qquad \\ C=O \qquad \qquad \qquad R_3 \\ \\ NH_2 \qquad \qquad \qquad R_1 - Si - R_2 \end{array} $	300 m ² /g	Tosoh Bio-sciences
				Groupe carboxoyl non ionique greffé sur la silice		

Tableau III.2. Caractéristique principales des colonnes utilisées (suite)

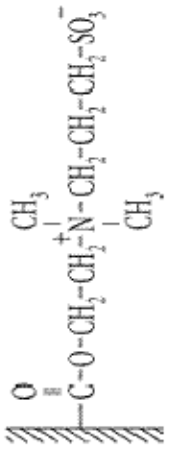

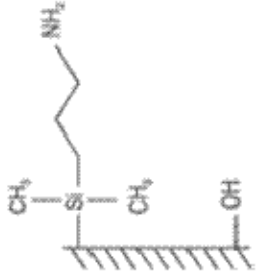
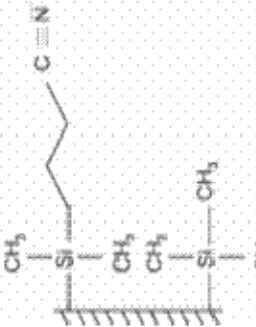
Colonne	LxØ (mm)	Diamètre des particules (µm)	Taille des pores	Support	Surface spécifique	Vendeur
ZIC HILIC	150x4.6	5	200 Å	 Silice avec un greffage sulfobetaine	140 m ² /g	SaQuant AB
Cosmosil HILIC	150x2	5	120 Å	 Silice greffée triazole	300 m ² /g	Nacal tesque
Astac spHera NEH2	150x2.1	5		Gel polymérique greffé polyamine	-	Advanced Separation Technologies Inc.
Polaris NEH2	150x2	3	180 Å	Silice greffée aminopropyle	-	Varian

Tableau III.2. Caractéristique principales des colonnes utilisées (suite)

Colonne	LxØ (mm)	Diamètre des particules (µm)	Taille des pores	Support	Surface spécifique	Vendeur
Silice Uptisphere 12 AA NE ₂	250x2	5	120 Å	 <p>Silice greffée aminopropyle</p>	340 m ² /g	Interchim
Uptisphere 5 CN	250x4.6	5 µm	120 Å	 <p>Silice greffée Cyanopropyle</p>	320 m ² /g	Interchim

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Bien qu'initialement considérées comme secondaires, les caractéristiques des phases stationnaires jouent un rôle important dans la séparation des solutés tels que les catécholamines, même en mode HILIC comme l'illustre la figure III.17. Des sélectivités différentes sont obtenues en utilisant une même phase mobile (ACN/ H₃CCOONH₄ 20 mM, pH 3, (80/20 v/v)) sur 4 supports : TSK gel Amide, Cosmosil HILIC; ZIC HILIC et Uptisphere CN. Cette observation est confirmée sur 4 autres supports Uptisphere Silice, Uptisphere NH₂, Ascentis HILIC et Luna Diol avec une autre phase mobile (ACN/ HCOONH₄ 150 mM pH 3 (85/15 v/v)). Ceci démontre une fois de plus que le partage des analytes entre la couche d'eau qui entoure la phase stationnaire et la phase mobile n'est pas le seul mécanisme qui assure la séparation des solutés en HILIC. Les interactions secondaires possibles entre la phase stationnaire et les analytes doivent être prises en considération pour le choix de la colonne.

La présence de charges sur la surface de la phase stationnaire offre la possibilité d'interactions électrostatiques (attraction ou répulsion) avec les solutés chargés (Figure III.17). Ainsi, nous avons pu observer ce type d'interactions sur la plupart des supports testés :

- sur la colonne de silice vierge porteuse de charges négatives, liées à la déprotonation de sa surface (-SiOH devient SiO⁻), les répulsions électrostatiques sont responsables de la faible rétention des composés chargés négativement (DOPAC, HVA, 5HIAA),
- à l'opposé, sur la colonne positivement chargée Cosmosil HILIC (greffée triazole), ce sont les analytes positivement chargés (S, 3-MT, A, DA, NA) qui sont peu retenus et mal séparés.

On constate que les forces d'interactions électrostatiques secondaires ont des intensités différentes d'un support à l'autre. Ainsi, les colonnes testées peuvent être divisées en deux groupes en fonction de la quantité de sel, à introduire dans la phase mobile, pour moduler ces interactions et ainsi obtenir les meilleurs résultats de séparation en termes de résolution et d'efficacité des pics :

- les colonnes qui nécessitent de faibles concentrations en sel (< 50 mM) sont les suivantes : ZIC HILIC, TSK gel Amide 80, Cosmosil HILIC, Uptisphere CN (Figure III.17.a)
- les colonnes qui nécessitent de fortes concentrations en sel (> 100 mM) sont les suivantes : Astec apHera NH₂, Uptisphere NH₂, Uptisphere HILIC Silica, Ascentis Express HILIC et Luna Diol (Figure III.17.b).

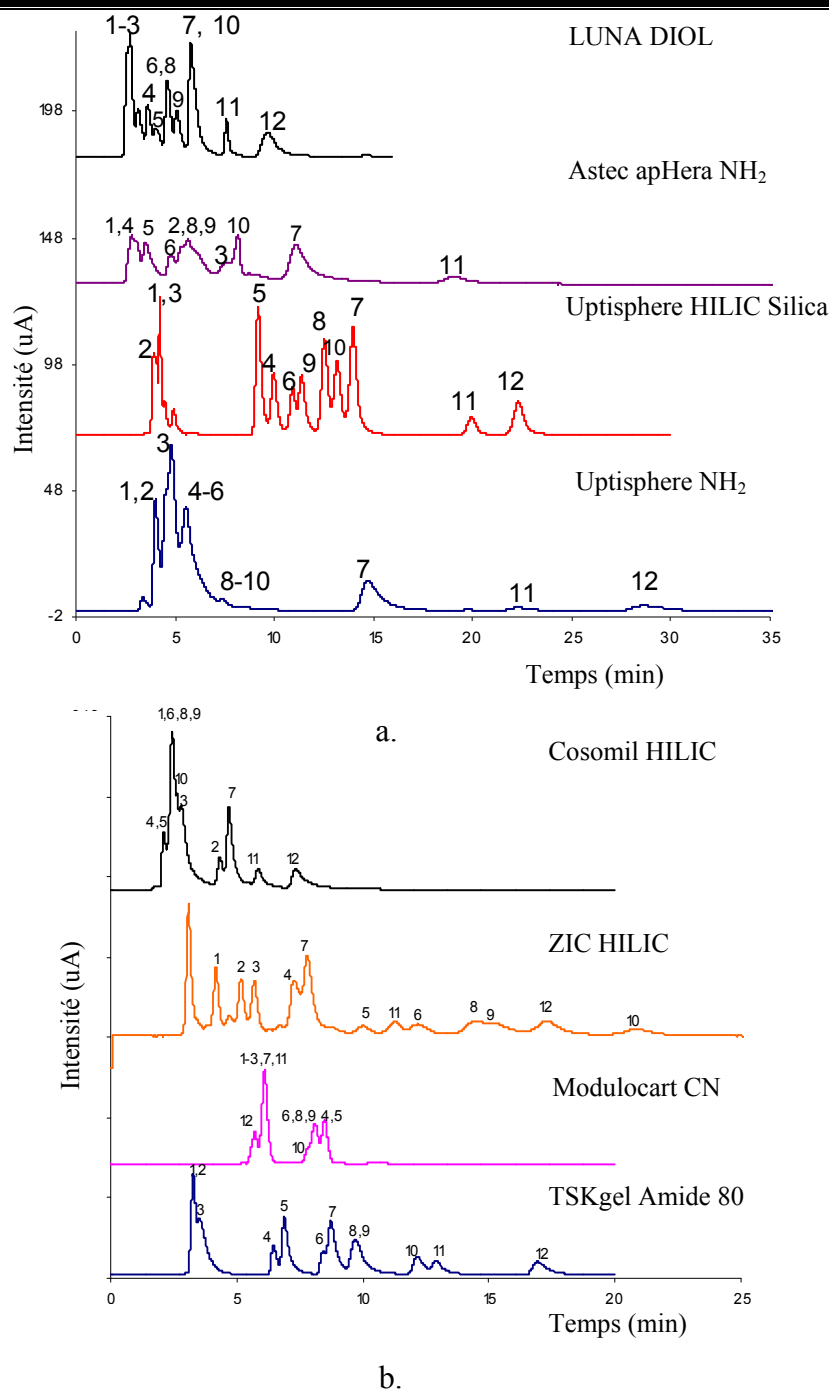


Figure III.17. Comparaison des performances de colonnes HILIC

a. Phase mobile : ACN/ CH₃COONH₄ 20 mM, pH 3, (80/20 v/v) ; Débit : 0,2 mL.min⁻¹ pour TSK gel Amide et Cosmosil HILIC ; 0,5 mL.min⁻¹ pour ZIC HILIC et 1 mL.min⁻¹ pour Uptisphere CN

b. Phase mobile : ACN/ HCOONH₄ 150 mM pH 3 (85/15 v/v) ; Débit : 0,2 mL.min⁻¹
 Détection : UV. 1. HVA; 2. 5HIAA; 3. DOPAC; 4. 3-MT; 5. S; 6. DA; 7. Trp; 8. A ; 9. DHBA ; 10. NA; 11. Tyr ; 12. DOPA.

La colonne Ascentis Express HILIC se différencie de toutes les autres colonnes en raison de la nature et la géométrie des particules de silice (2,7 µm de diamètre) qui la

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

constituent. Ces dernières sont partiellement poreuses (particules « fused core ») et enrobées d'un film poreux (0,5 μm d'épaisseur) déposé sur un noyau dur (non poreux). Cependant, son comportement vis-à-vis des catécholamines ne la distingue pas des autres colonnes conventionnelles de silice vierge, puisque des concentrations importantes de sel (>100 mM) sont également nécessaires pour obtenir des pics symétriques pour les composés basiques (S, DA, NA, A, 3-MT, DHBA). Contrairement aux résultats obtenus en chromatographie d'appariement d'ions (Chapitre II), en mode HILIC les colonnes « fused core » n'apportent pas de gain d'efficacité pour les séparations.

Devant les grandes différences de rétention offertes par les 12 colonnes testées, nous avons cherché à évaluer de façon plus approfondie les similitudes et l'orthogonalité entre elles. Dans ce but, nous avons réalisé des graphiques $\ln k - \ln k$ en reportant les facteurs de rétention des solutés dans les mêmes conditions de phase mobile sur les colonnes groupées deux par deux. La similitude de rétention est caractérisée dans ces conditions par le positionnement de tous les points sur la diagonale, toute autre disposition traduit une rétention plus importante sur l'une ou l'autre des colonnes. L'orthogonalité totale entre les deux colonnes est caractérisée par une dispersion maximale des points dans le plan.

Nous avons comparé en premier lieu d'une part les différentes silices vierges entre elles et d'autre part les différents supports greffés aminopropyle entre eux. Les graphiques $\ln k - \ln k$ (Figure III.18. a et b) montrent des similitudes entre le comportement de la colonne Uptisphere Si et celui de la colonne Ascentis ou de la colonne Pursuit Si (colonnes de silice vierge) vis-à-vis de la plupart des composés (un maximum des points est sur la diagonale). La colonne Uptisphere Si pourra donc être remplacée par l'une des deux autres colonnes sans grande modification des sélectivités. La comparaison de la colonne Ascentis Si à la colonne Pursuit Si (Figure III.18 c) met en évidence une rétention plus faible des solutés sur la première (tous les points sont situés sous la diagonale). Quelles que soient les colonnes comparées, les trois composés acides (DOPAC, HVA et 5HIAA) s'éloignent toujours de la diagonale mettant en évidence des interactions électrostatiques répulsives d'importance inégale selon le support considéré (les points entourés en rouge).

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

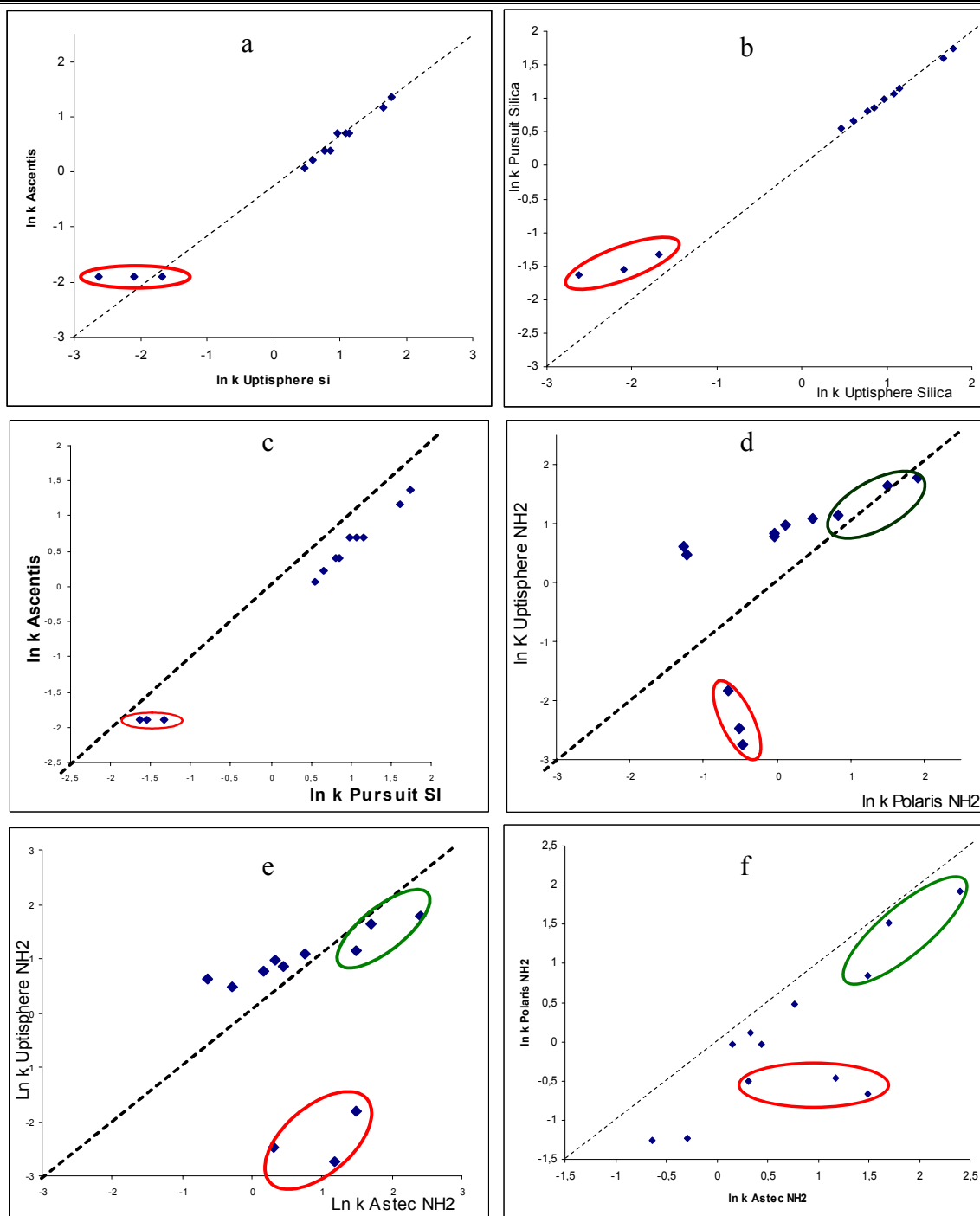


Figure III.18. Orthogonalité entre différentes colonnes en mode HILIC

Colonne : Ascentis Express HILIC (L x Ø= 150 x 2,1 mm), Uptisphere HILIC Silica (L x Ø= 250 x 2,1 mm), Pursuit Silica (L x Ø= 150 x 2,1 mm), Astec apHera NH₂ (L x Ø= 150 x 2,1 mm), Uptisphere 12 AA NH₂ (L x Ø= 250 x 2,1 mm), Polaris NH₂ (L x Ø= 150 x 2,1 mm) ; Phase mobile : ACN/ HCOONH₄ 150 mM, pH 3, (85/15 v/v)

Les 3 colonnes aminopropyle offrent des sélectivités et rétentions très différentes de l'une à l'autre, comme présenté sur la figure III.8 d, e et f. En effet, on peut voir que les 12 solutés se répartissent en 3 sous-groupes : les 3 acides aminés (points entourés en vert) sont

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

ceux qui ont des rétentions les plus comparables sur les 3 supports, les 3 composés acides (points entourés en rouge) et les 6 composés cationiques. Les 3 acides sont moins retenus sur les colonnes à base de silice (Uptisphere NH₂, Polaris NH₂) que sur la colonne polymérique (Astec apHera NH₂). A l'inverse, les 6 composés cationiques sont plus retenus sur les colonnes à base de silice, probablement à cause des interactions électrostatiques (répulsives pour les acides, attractives pour les cations) générées par la présence de silanols résiduels uniquement présents sur les colonnes à base de silice. En général, nous avons constaté des meilleures efficacités de pics sur la colonne à base de polymère que sur celles à base de silice probablement à cause de l'absence d'interactions électrostatiques sur polymère.

La figure III.19. traduit que d'un fabricant à un autre les différences de rétention entre un support de silice vierge et un support de silice greffée NH₂ ne sont pas les mêmes. Pour les supports Varian, on observe une dispersion prévisible des points (solutés cationiques plus retenus sur silice et supports anioniques que sur NH₂), par contre pour les supports Interchim, tous basés sur la même silice Uptisphere, beaucoup de similitudes de rétention sont observées.

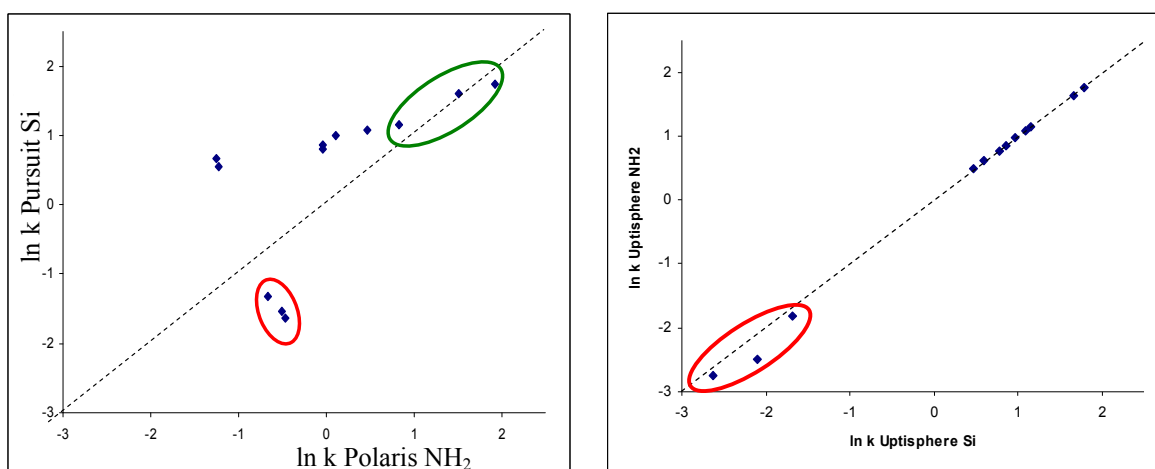


Figure III.19. Orthogonalité entre différentes colonnes en mode HILIC

Colonne : Uptisphere HILIC Silica (L x Ø= 250 x 2,1 mm), Pursuit Silica (L x Ø= 150 x 2,1 mm), Uptisphere NH₂ (L x Ø= 250 x 2,1 mm), Polaris NH₂ (L x Ø= 150 x 2,1 mm) ; Phase mobile : MeCN/ HCOONH₄ 150 mM, pH 3 (85/15 v/v)

Au vu du nombre important de données obtenues par l'analyse des 12 catécholamines sur les 12 colonnes HILIC, une analyse statistique des résultats (Analyse en Composantes Principales) s'est avérée nécessaire pour obtenir des renseignements plus complets. Cette étude est présentée dans le paragraphe III.7 de ce chapitre.

III.2. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique

Sur tous les supports testés, l'augmentation du pourcentage du modificateur organique a eu comme résultat pour l'ensemble des solutés une augmentation des temps de rétention, ce qui est attendu en mode HILIC (figure III.20). Des différences de rétention importantes sont enregistrées pour une modification même faible de pourcentage de solvant organique. Par exemple, sur la colonne TSK gel Amide 80 (figure III.20.a), les facteurs de rétention de presque tous les composés doublent leurs valeurs quand on passe de 85 à 90% d'ACN. Sur 4 colonnes parmi les 12 étudiées (ZIC HILIC (figure III.20.b), Uptisphere CN, TSK gel Amide 80 et apHera NH₂), cette augmentation de rétention n'est pas aussi importante pour tous les composés ce qui génère des ordres d'élution différents selon le pourcentage d'ACN dans la phase mobile. Ces 4 colonnes apparaissent intéressantes du fait qu'une simple modification du pourcentage de modificateur organique entraîne des sélectivités modulables.

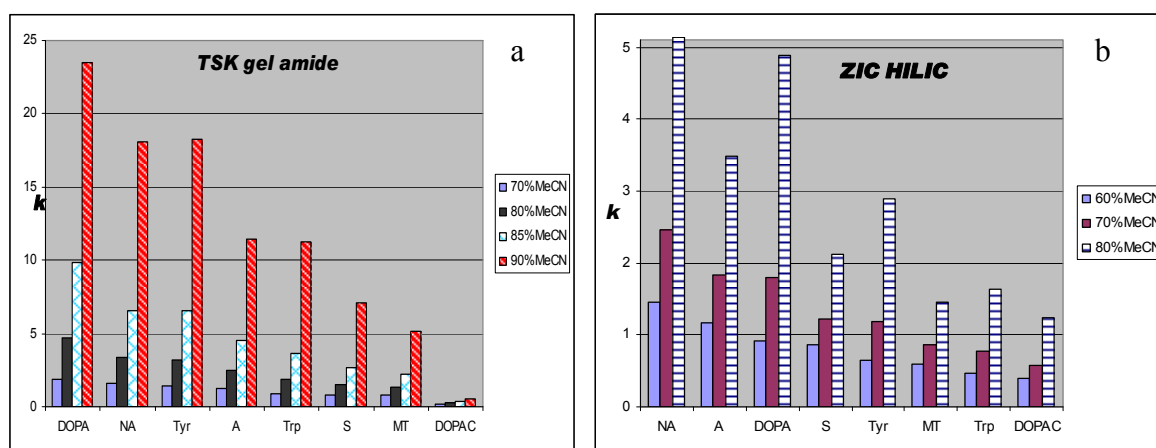


Figure III.20. Influence de pourcentage de modificateur organique sur la rétention
a. Colonne : TSK gel Amide 80 ; Phase mobile : ACN/ H₃CCOONH₄ 20 mM, pH 3. Débit : 0,2 mL.min⁻¹
b. Colonne : ZIC HILIC ; Phase mobile : ACN/ H₃CCOONH₄ 40 mM, pH 4 ; Débit : 0,5 mL.min⁻¹

Nous avons mis en évidence que la nature de modificateur organique a également de l'influence sur la rétention des composés. En comparant la force éluante des solvants organiques les plus utilisés (MeOH, éthanol (EtOH), ACN et acétone) sur les différents supports, nous avons obtenu des résultats en concordance avec ceux que nous avons publiés dans le cas des pesticides organophosphorés [8] et ceux de la littérature [13,32]. Parmi l'ensemble des modificateurs organiques, les alcools sont les plus éluants, suivis par l'acétone et enfin l'ACN (Figure III.21). Nous confirmons, avec l'étude de cette nouvelle famille de

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

solutés, que les alcools, spécialement le MeOH, sont des solvants très éluants pour le mode HILIC du fait de leur caractère fortement donneur de liaisons hydrogène (comme l'eau).

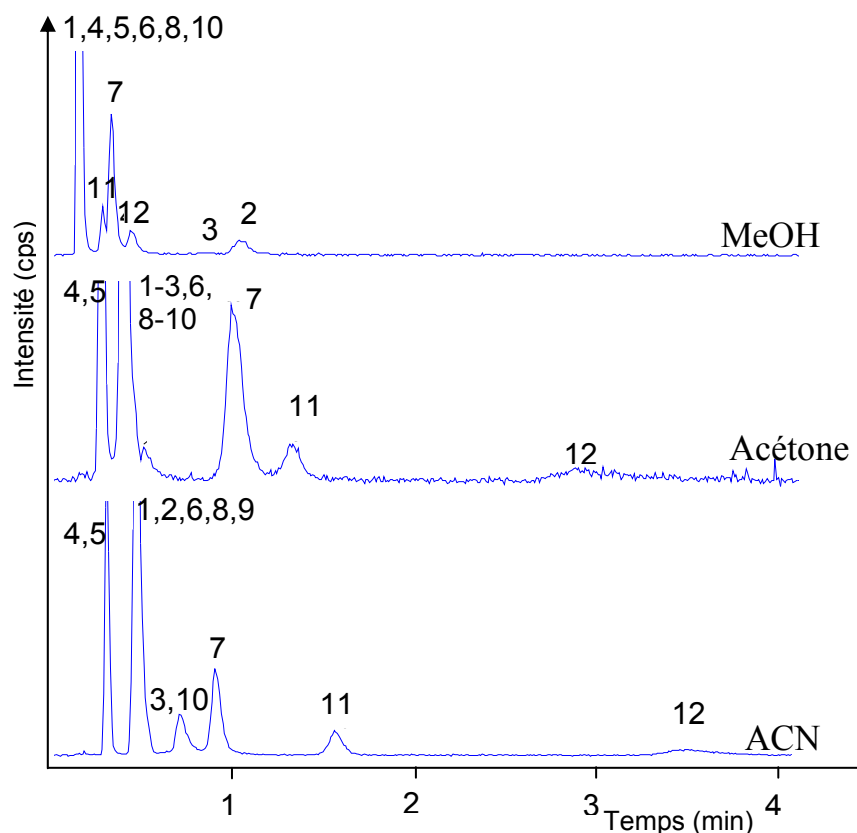


Figure III.21. Influence de la nature du modificateur organique sur la sélectivité entre les catécholamines

Colonne : Astec apHera NH₂; Phase mobile : modificateur organique / HCOOH₄ 150 mM, pH 2,7, (85/15 v/v). Débit : 0,2 mL.min⁻¹. Détection : ESI-SM/SM.

1. HVA; 2. 5HIAA; 3. DOPAC; 4. 3-MT; 5. S; 6. DA; 7. Trp; 8. A ; 9. DHBA ; 10. NA; 11. Tyr ; 12. DOPA

La figure III.21 montre, de plus, que la nature du modificateur organique influence non seulement la rétention des composés mais aussi l'ordre d'élution sur la colonne Astec apHera NH₂ (cette étude n'a pas été faite sur les autres colonnes). Si le remplacement du MeOH par l'EtOH n'influence pas l'ordre d'élution des composés, l'utilisation de l'acétone ou de l'ACN a comme résultat de nombreuses inversions d'élution. Le choix du solvant organique est un critère primordial à prendre en compte pour l'optimisation des séparations en mode HILIC car il peut intervenir à plusieurs niveaux.

III.3. Influence de la nature et de la concentration en sel

Pour l'analyse des composés ioniques, la présence de sels dans la phase mobile est indispensable afin d'obtenir de bonnes efficacités de pics. En ce qui concerne l'analyse des catécholamines, la présence de sels dans les phases mobiles a des effets différents selon le composé et le support testé.

Nous avons vu dans la partie introductive de ce chapitre que le nombre de sels volatils qui peut être utilisé en mode HILIC est limité et se réduit principalement à l'utilisation de formiate d'ammonium et d'acétate d'ammonium. Pour la majorité des colonnes (Luna Diol, Cosmosil HILIC, Uptisphere HILIC Silica, Uptisphere CN, Astec apHera NH₂, TSK gel Amide 80 et ZIC HILIC) peu de différences ont été observées quand l'un ou l'autre de ces sels a été utilisé. Par exemple, sur la colonne TSK gel Amide, nous avons pu observer des inversions de l'ordre d'éluion pour les couples NA/Tyr et Trp/DA (résultats non montrés).

La colonne Ascentis Express HILIC (figure III.22) a un comportement très spécifique vis-à-vis du choix du sel en phase mobile, ce qui la distingue de tous les autres supports. Sur cette phase stationnaire et pour une concentration en sel donnée, on constate que l'acétate d'ammonium est moins éluant que son homologue formiate et que les sélectivités dépendent du choix du sel.

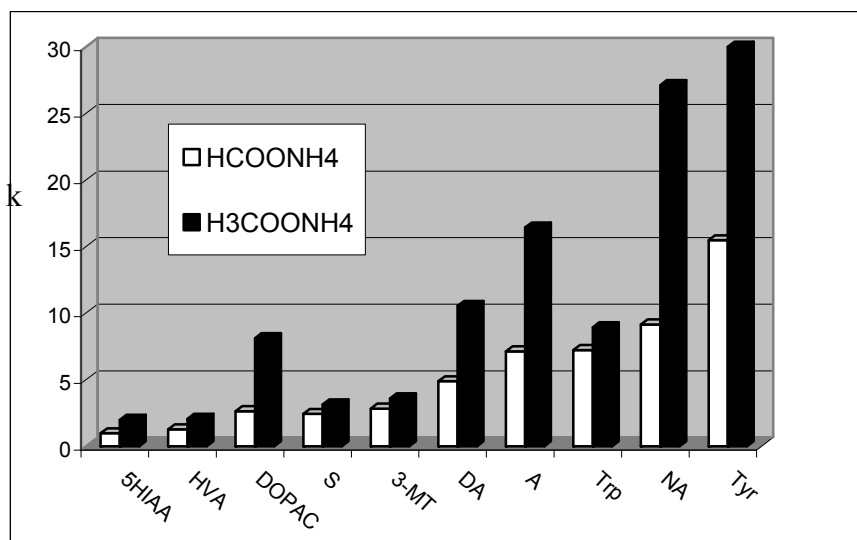


Figure III.22. Influence particulière de la nature du sel sur les facteurs de rétention des catécholamines sur la colonne Ascentis Express HILIC (L x Ø = 150 x 2,1 mm).
Phase mobile : ACN/ HCOONH₄ ou CH₃COONH₄ 150 mM, pH 3, (90/10 v/v).

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Pour l'ensemble des colonnes, la variation de la concentration du sel dans la phase mobile a des effets plus prononcés que ceux liés au changement de nature du sel. Typiquement en HILIC, une augmentation de la rétention est associée à l'augmentation de la concentration en sel de la phase mobile [12]. La Luna Diol est la seule colonne sur laquelle nous avons observé ce type de comportement pour tous les composés (Figure III.23.a).

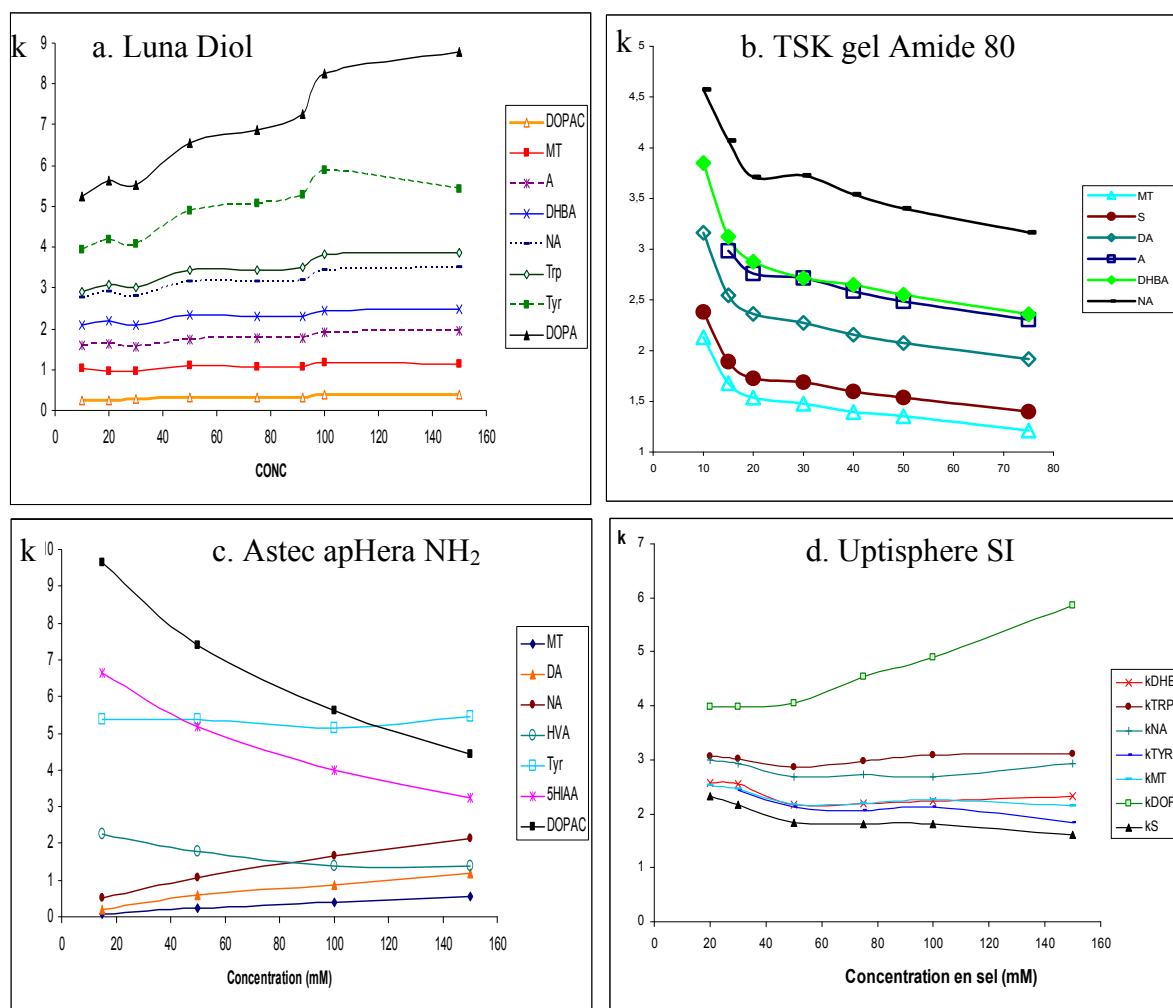


Figure III.23. Influence de la concentration en sel sur la rétention des analytes

a. Colonne : Luna Diol ; Phase mobile : ACN/ HCOOH₄ pH 3, (90/10 v/v).

b. Colonne : TSK gel Amide 80 ; Phase mobile : ACN/ HCOOH₄ pH 3, (80/20 v/v).

c. Colonne : Astec apHera NH₂ ; Phase mobile : ACN/ HCOOH₄ pH 3, (80/20 v/v).

d. Colonne : Uptisphere Si ; Phase mobile : ACN/ HCOOH₄ pH 3, (85/15 v/v).

Débit : 0,2 mL.min⁻¹

Pour les autres colonnes, les interactions électrostatiques (attraction/répulsion) entre le support et les solutés jouent un rôle important dans la rétention. De plus, des comportements de type échange d'ions sont enregistrés (Figure III.23.b, c, d). Cela implique la diminution de la rétention des composés de charge opposée à celle du support lorsque la concentration en sel

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

augmente. Sont concernés par ce phénomène, les composés positivement chargés (NA, A, DA, DHBA, 3-MT, S) sur les colonnes négativement chargées (Uptisphere HILIC Silica, Ascentis Express HILIC, TSK gel Amide 80, ZIC HILIC) et les composés négativement chargés (DOPA, DOPAC, 5HIAA, Tyr, Trp, HVA) sur les colonnes de charge opposée (Cosmosil HILIC, Astec apHera NH₂, Uptisphere NH₂). Par ailleurs, sur ces deux types de colonnes (positivement et négativement chargées) l'augmentation de la concentration en sel implique l'augmentation de la rétention des composés ayant la même charge que le support. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Guo *et al.* [9] pour l'analyse de l'aspirine, la cytosine et de l'acide salicylique (voir paragraphe II.3.3 de ce chapitre).

Les résultats de ces analyses ont révélé que la colonne TSK gel Amide 80 se comporte de façon similaire aux colonnes négativement chargées. A.J. Alpert [71] a fait le même constat (décroissance de la rétention avec l'augmentation de la concentration en sel) lorsqu'il a analysé les acides aminés basiques sur la colonne TSK gel Amide. Comme le greffage de cette phase stationnaire ne présente pas de sites déprotonables, la mise en évidence de charge négative à sa surface pourrait être liée soit à l'ionisation des silanols résiduels, comme constaté par Quiming *et al.* [37] pour une colonne diol, soit à une délocalisation d'électrons au niveau du greffage avec l'apparition d'une zone enrichie en électrons. La comparaison de la rétention de l'acide 4-aminosalicylique et de l'acide acétylsalicylique sur 3 colonnes : ZIC HILIC, TSK gel Amide et une silice vierge a permis à Guo *et al.* [9] de mettre en évidence un ordre d'élution identique sur les supports TSK gel et ZIC HILIC et inverse sur la colonne de silice. Ces travaux laissent alors penser que l'état de la charge de la colonne TSK gel Amide serait associé au greffage et non à la silice.

III.4. Influence du pH

Nous avons vu dans la partie introductive de ce chapitre que le pH de la phase mobile peut influencer l'état de charge des analytes et/ou du support chromatographique. Pour l'étude de l'influence du pH sur la rétention des catécholamines sur les différents supports, nous avons utilisé une phase mobile composée d'ACN et d'une solution aqueuse de HCOONH₄ dont le pH est ajusté à une valeur comprise entre 3 et 6,5 avec une solution de HCOOH 1M. Nous avons constaté que la tendance générale correspond à une augmentation de la rétention avec l'augmentation du pH.

Sur les supports positivement chargés : Cosmosil HILIC et Uptisphere NH₂, la rétention augmente nettement pour les produits porteurs d'une charge négative (HVA,

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

5HIAA et DOPAC), tandis qu'elle reste quasiment constante pour les autres composés du mélange (Figure III.24.a). De ce fait, des sélectivités différentes apparaissent en fonction du pH de la phase mobile. Sur la troisième colonne positivement chargée, Astec NH₂, l'augmentation du pH se traduit par une sévère détérioration de la forme des pics de tous les composés ce qui limite son utilisation à pH acide.

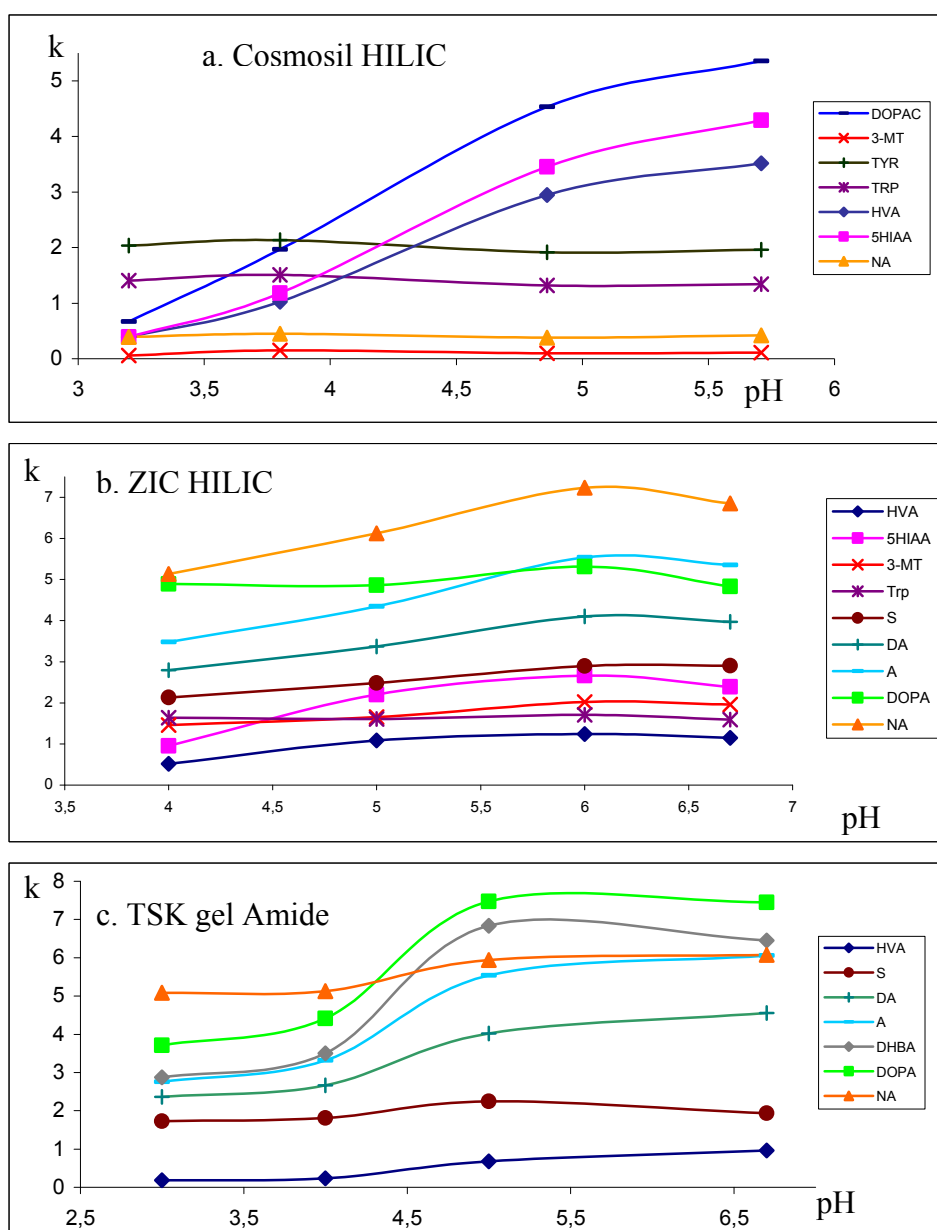


Figure III.24. Influence du pH sur la rétention des catécholamines

a. Colonne : Cosmosil HILIC ; Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 30 mM (80/20 v/v) ;

b. Colonne : ZIC HILIC ; Phase mobile : ACN/CH₃COONH₄ 40 mM (80/20 v/v) ;

c. Colonne : TSK gel Amide 80 ; Phase mobile : ACN/CH₃COONH₄ 20 mM (90/10 v/v).

L'étude de l'influence du pH met en évidence à nouveau que la colonne TSK gel Amide présente un comportement proche de celui des colonnes négativement chargées : Uptisphere

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Silica, Ascentis Express HILIC et ZIC HILIC. En effet sur tous ces supports, la rétention de tous les composés est plus importante lorsque la valeur du pH augmente (Figure III.24. b et c). Sur la colonne Ascentis Express HILIC, nous observons plus particulièrement des pertes d'efficacités de pics pour les composés basiques.

Les catécholamines présentent des comportements différents sur les deux supports non chargés, Luna Diol et Uptisphere CN. Si sur la colonne greffée diol la rétention des analytes restent constante quel que soit le pH, sur la colonne greffée cyano trois comportements différents ont été remarqués pour les trois classes de composés :

- pour les acides aminés : DOPA, Tyr et Trp, la rétention est constante ;
- pour les amines : 3-MT, A, NA, DA S et DHBA, la rétention augmente avec l'augmentation du pH ;
- pour les acides : HVA, 5HIAA et DOPAC, la rétention diminue avec l'augmentation du pH.

Ce phénomène est probablement dû à la déprotonation des silanols résiduels qui est d'autant plus importante que la valeur du pH est élevée, ce qui induit l'apparition d'une charge négative au niveau du support et crée de ce fait des interactions d'attractions électrostatiques avec les amines et de répulsion avec les acides. Les acides aminés se trouvent sous une forme très peu positive voire globalement neutre dans cet intervalle de pH, ils ne sont donc pas affectés par les modifications de charge au niveau du support.

III.5. Influence de la température

Nos expériences nous ont permis de constater que l'influence de la température (comme pour les autres paramètres) était fonction de la nature des solutés et des interactions soluté-phase stationnaire comme précédemment rapporté dans la littérature [4].

Sur quatre colonnes, Uptisphere HILIC Silica, Luna Diol, Uptisphere NH₂ et ZIC HILIC, tous les analytes donnent des réponses homogènes : soit toutes les rétentions augmentent avec la température (pour les 3 premières colonnes) soit elles diminuent toutes.

Sur toutes les autres colonnes la température a des effets différents selon le soluté. Sur les deux colonnes positivement chargées : Astec apHera NH₂ et Cosmosil HILIC, l'augmentation de la température a comme effet l'augmentation des facteurs de rétention des composés acides (DOPAC, HVA, 5HIAA), tandis que pour les autres composés la rétention reste constante. Sur la colonne TSK gel Amide 80, ce sont seulement pour les 3 composés

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

aminés (DA, DBHA et S) que l'on observe une augmentation de la rétention avec l'augmentation de la température.

La figure III.25 montre que l'augmentation de la température a comme effet des inversions d'ordre d'élution pour les solutés. Sur la colonne « fused core » Ascentis Express HILIC, comme la rétention de Trp et de S augmente avec l'augmentation de la température, alors que celle de NA, A, DA, DHBA, DOPA et Tyr décroît, des sélectivités différentes sont obtenues en faisant varier la température.

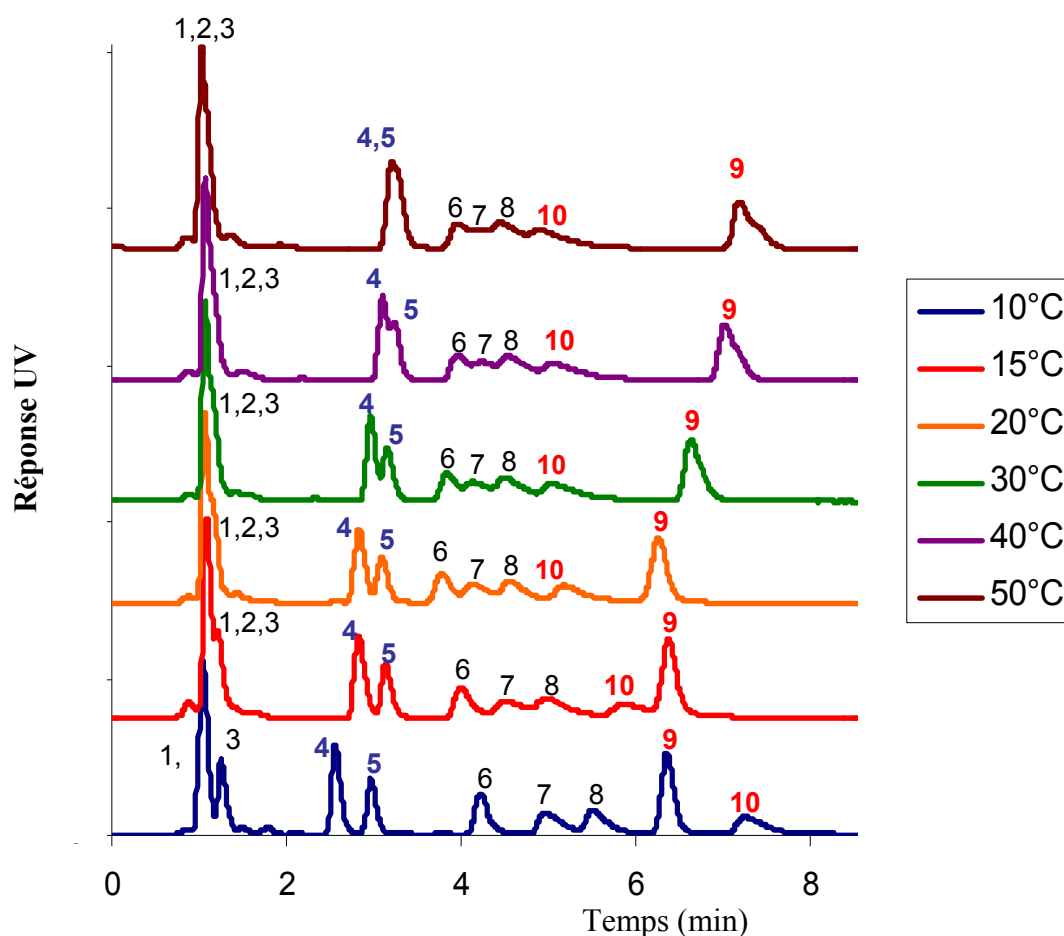


Figure III.25. Influence de la température sur la séparation des catécholamines

Colonne : Ascentis Express HILIC ; Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 150 mM, pH 3 (90/10 v/v), Débit : 0,5 mL.min⁻¹. Détection : UV

1. 5HIAA, 2. HVA, 3. DOPAC, 4. S, 5. MT, 6. DA, 7. DHBA, 8. A, 9. Trp, 10. NA

Contrôler la température lors de l'analyse en mode HILIC est donc important pour la répétabilité des rétentions et de plus dans le cas de l'analyse des catécholamines, une augmentation de la température ne semble pas apporter d'amélioration pour la séparation.

III.6. Systèmes retenus en vue d'un couplage aux détecteurs SM et électrochimique

Aucun des systèmes testés parmi les 12 envisagés n'a permis la séparation totale des 12 composés de notre mélange modèle. De ce fait les systèmes HILIC ne seront donc pas compatibles avec une détection par électrochimie, alors que la majorité des systèmes le seront avec une détection par spectrométrie de masse. La figure III.26 montre les systèmes que nous avons retenus en vue d'un couplage avec la SM.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence les paramètres qui sont importants pour l'optimisation des séparations en mode HILIC : le pourcentage et la nature du modificateur organique, la concentration en sel et le pH. En fonction de la phase stationnaire utilisée, l'un ou l'autre de ces paramètres joue un rôle plus important pour l'optimisation des séparations.

En raison des difficultés d'interprétation de nos résultats et le nombre important de données de rétention chromatographique recueillies, nous avons fait appel aux outils statistiques (l'analyse en composantes principales, ACP) pour nous aider à avoir une vision plus générale sur les similitudes de comportement des colonnes testées.

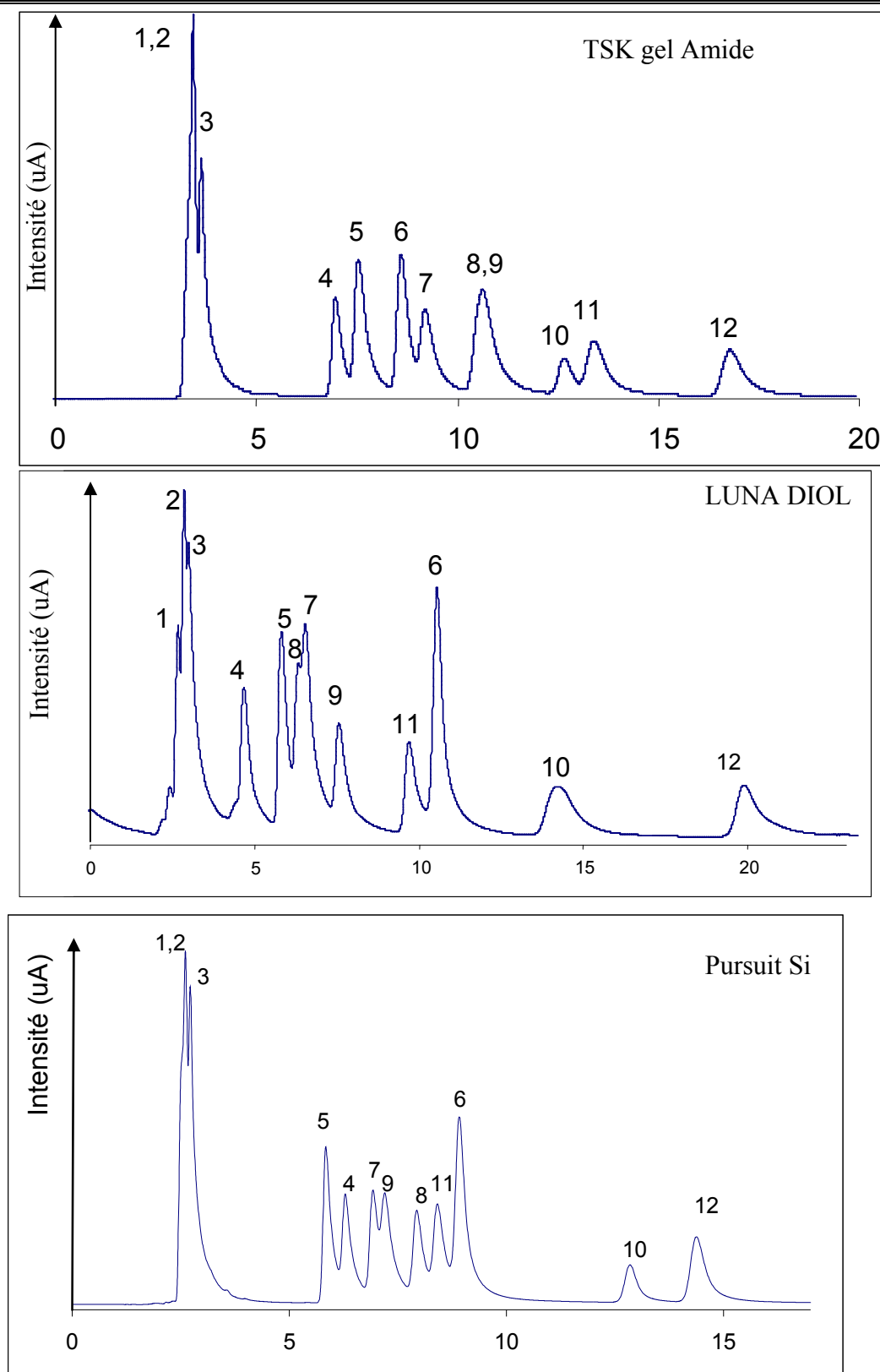


Figure III.26. Systèmes retenus en vue d'un couplage aux détecteurs SM

- a. Colonne : TSK gel Amide, Phase mobile : ACN/CH₃COONH₄ 20 mM (80/20 v/v), pH 3.
b. Colonne : Luna Diol, Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 100 mM (90/10 v/v), pH 3.
c. Colonne : Pursuit Si, Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 150 mM (85/15 v/v), pH 3.
Détection : UV; Débit : 0,2 mL.min⁻¹. 1. HVA, 2. 5HIAA, 3. DOPAC, 4. 3-MT, 5. S, 6. Trp, 7. DA, 8. A, 9. DHBA, 10. Tyr, 11. NA, 12. DOPA

III.7. Traitement des résultats par l'analyse en composantes principales (ACP)

III.7.1. Généralités sur les ACP

L'étude d'une population statistique de taille « n » passe le plus souvent par le recueil d'un nombre élevé « p » de données par élément observé. L'analyse de ces données doit tenir compte de leur caractère multidimensionnel et révéler les liaisons existantes entre leurs composantes. L'analyse en composantes principales (ACP), introduite en 1901 par K. Pearson et développée par H. Hotelling, est une méthode très puissante pour explorer la structure de telles données. Chaque donnée étant représentée dans un espace (R) à « p » dimensions, l'ensemble des données forme un "nuage de n points" dans R^p . Le principe de l'ACP est d'obtenir une représentation approchée du nuage dans un sous-espace de dimension faible k par projection sur des axes bien choisis. Une métrique dans R^p étant choisie (en général normalisée par l'utilisation de variables centrées et réduites), les k axes principaux sont ceux qui maximisent l'inertie du nuage projeté, c'est-à-dire la moyenne pondérée des carrés des distances des points projetés à leur centre de gravité. Les composantes principales sont les n vecteurs ayant pour coordonnées celles des projections orthogonales des n éléments du nuage sur les k axes principaux (Figure III.27). C'est un peu comme faire une photo d'un objet : on passe de 3 à 2 dimensions. Le but de l'ACP est de trouver l'endroit où poser l'appareil photo pour que l'on reconnaisse le mieux le sujet. L'ACP construit ainsi de nouvelles variables, artificielles, et des représentations graphiques permettant de visualiser les relations entre variables, ainsi que l'existence éventuelle de groupes d'éléments et de groupes de variables. L'interprétation de ces représentations est délicate et doit respecter une démarche rigoureuse [72].

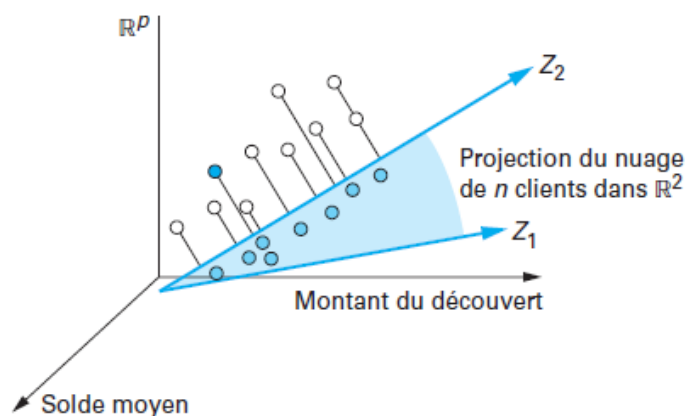


Figure III.27. Projections des points sur le meilleur plan factoriel [72]

III.7.2. Interprétation des ACP à l'analyse des catécholamines sur les 12 colonnes HILIC

Les ACP ont été réalisées à l'aide du programme XLStat à partir de données recueillies sur toutes les colonnes et dans toutes les conditions chromatographiques testées et pour lesquelles nous avons des données vis-à-vis des rétentions de tous les solutés.

Pour l'ACP, les calculs ont été effectués à partir des logarithmes des facteurs de rétention après avoir centré et réduit leurs valeurs pour donner à toutes les variables la même importance. De ce fait, cette opération garantit que la position des colonnes dans le graphique de l'ACP est bien liée à leurs propriétés séparatives. Les graphiques de l'ACP basée sur les données brutes non centrées et non réduites auraient fait apparaître les différences de rétention des colonnes.

Nous avons réalisé une première ACP en combinant toutes les données concernant la rétention des 12 catécholamines de notre mélange (figures III.28). Pour nous assurer que les 6 solutés cationiques, plus nombreux que les autres (3 acides et 3 neutres) ne pesaient pas trop sur les résultats de cette première ACP, nous avons calculé une deuxième ACP en réduisant le nombre de solutés cationiques à 3 (A, DA, et S). En prenant en compte tous les résultats obtenus sur les 12 phases stationnaires avec toutes les conditions de phases mobiles étudiées pour lesquelles les données étaient disponibles pour l'ensemble de ces 9 composés, le calcul de cette deuxième ACP est basé sur 87 données. Les deux axes principaux PC1-PC2 du graphique d'observations pour les deux ACPs sont présentés figures III.28 et III.29 a, respectivement, et la représentation graphique de variables de la deuxième ACP est donnée dans la figure III.29 b. On peut voir sur les figures III.28 et III.29a que la réduction du nombre de solutés n'a pas entraîné de perte notable d'information.

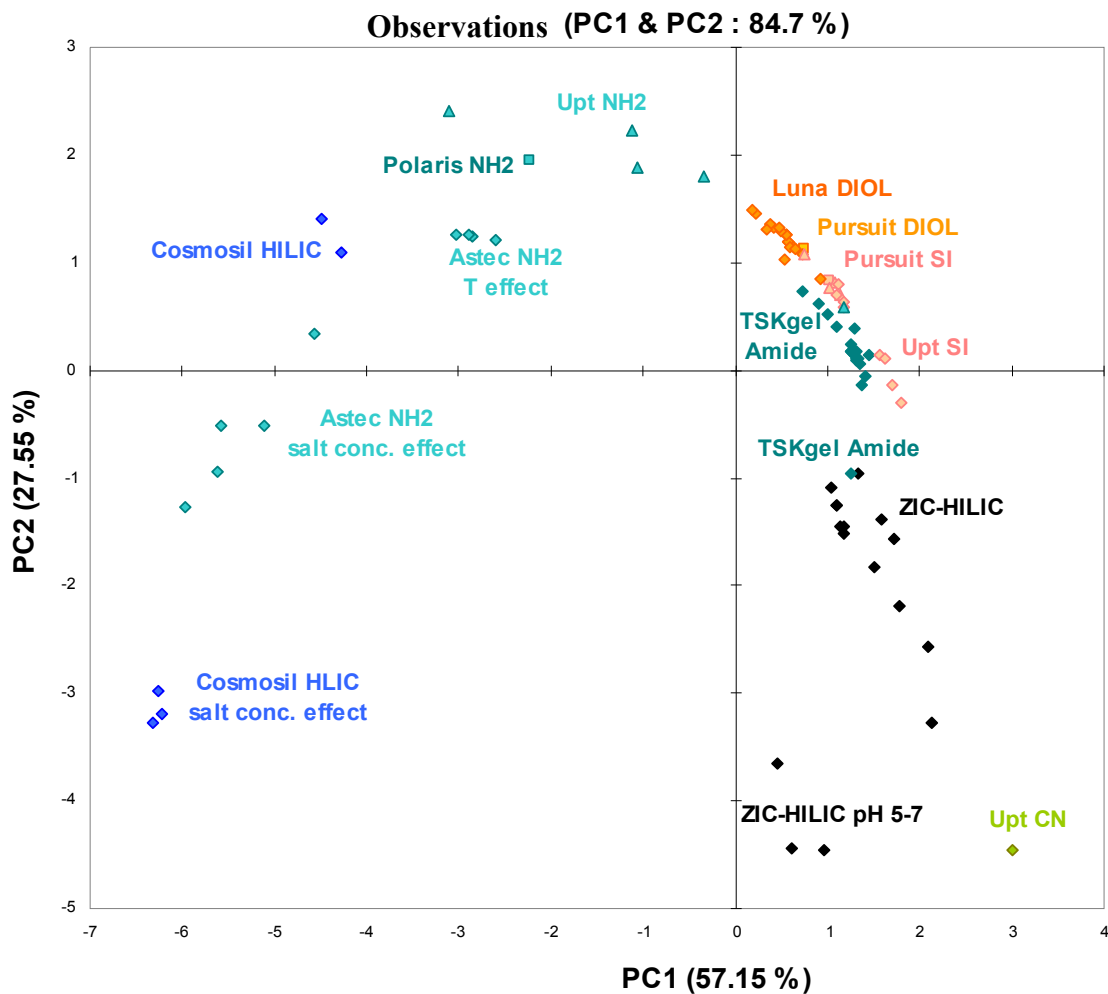


Figure III.28. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des 12 catécholamines sur les 12 phases stationnaires et dans toutes les conditions chromatographiques testées

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

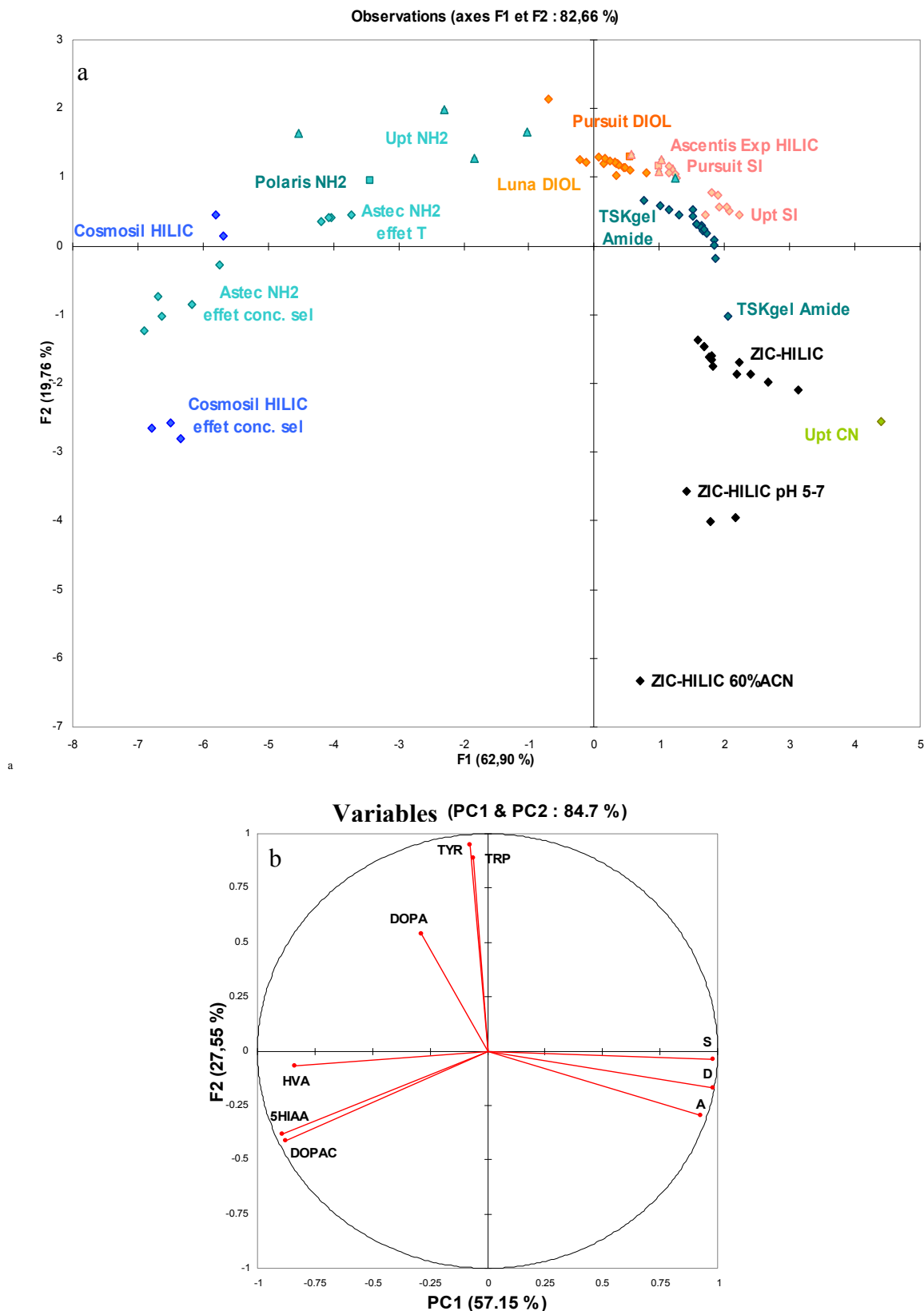


Figure III.29. Analyse en composantes principales basée sur la séparation des 9 catécholamines sélectionnées (A, DA, S, HVA, DOPAC, 5HIAA, DOPA, Tyr, TRP) sur les 12 phases stationnaires et dans toutes les conditions chromatographiques testées

- a. PC1-PC2 graphique d'observations
- b. PC1-PC2 graphique de variables.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Les deux axes principaux PC1 et PC2 couvrent ensemble environ 85% de la variance et peuvent être considérés comme une représentation assez complète de l'ensemble des résultats, donc les graphes PC1-PC2 se prêtent à l'interprétation. Comme nous pouvons le voir sur la figure III.29.b, les trois groupes de solutés (anioniques, cationiques et neutres) se distinguent clairement sur le graphique de variables, ce qui révèle qu'ils se comportent d'une manière différente sur les phases stationnaires testées.

En combinant les informations données par les deux graphiques de la figure III.29, on peut noter que sur le côté gauche du graphique d'observations (figure III.29a), les phases stationnaires cationiques (Cosmosil HILIC, Astec NH2, Uptisphere NH2 et Polaris NH2) sont, bien celles responsables de la rétention des composés anioniques (HVA, 5HIAA, DOPAC), à l'opposé sur le côté droit du graphique d'observations, les phases stationnaires anioniques (Ascentis Express HILIC, Pursuit SI et Uptisphere SI), neutres (Luna DIOL, Pursuit DIOL, TSK-gel Amide et Uptisphere CN) et zwitterionique (ZIC-HILIC) sont celles responsables principalement de la rétention des composés cationiques. Les colonnes ZIC-HILIC et Uptisphere CN se distinguent cependant des autres colonnes adaptées à la rétention des composés cationiques, par leur position relative par rapport à l'axe PC2, et aussi par le fait qu'elles sont les plus éloignées du centre des points sur le graphique PC2-PC3 (résultats non montrés). Tout ceci indique un comportement rétentif global par rapport aux composés que l'on peut schématiser de la façon suivante :

- (i) sur les phases stationnaires anioniques et neutres (à l'exception de la colonne Uptisphere CN), les composés anioniques sont moins retenus que les composés cationiques, eux-mêmes moins retenus que les composés zwitterioniques (les acides aminés);
- (ii) sur les phases stationnaires cationiques, les composés cationiques sont moins ou autant retenus que les composés acides, et moins retenus que les acides aminés;
- (iii) la phase zwitterionique (ZIC-HILIC), vue sa position par rapport à l'axe PC2, se distingue des autres phases. Sur cette phase, les anions sont moins retenus que les acides aminés et moins ou également retenus que les cations ;
- (iv) sur la colonne Uptisphere CN, les anions sont moins retenus que les acides aminés, moins retenus que les cations.

A l'intérieur de chaque groupe de phases stationnaires offrant des ordres d'élution semblables quelques différences sont trouvées. Tout d'abord, entre les phases stationnaires cationiques, une importante dispersion est trouvée le long de l'axe PC2, principalement liée à la rétention des acides aminés. Il est clair que pour ces phases la concentration en sel a un

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

effet important sur la rétention des composés, vue l'importante dispersion des points sur le graphique d'observations (par exemple pour Cosmosil HILIC et Astec NH2). Sur la phase zwitterionique (ZIC-HILIC), le pH a une grande influence sur la séparation, puisque les points correspondant aux retentions observées à $\text{pH} \geq 5$ sont éloignés de ceux à $\text{pH} 4$. Cela est probablement dû à la variation de l'état d'ionisation des solutés avec l'augmentation du pH, qui influe sur leur rétention et leur séparation.

Pour obtenir une vision plus claire sur la séparation des différents composés sur les différentes phases stationnaires, nous avons effectué trois nouvelles ACP : la première repose uniquement sur la séparation des trois composés anioniques (HVA, 5HIAA et DOPAC), graphique d'observations présenté dans la figure III.30, la deuxième uniquement sur la séparation des six composés cationiques (A, DA, S, 3-MT, NA et DHBA), graphique d'observations présenté dans la figure III.31 et la troisième, sur la séparation des trois composés zwitterioniques (Trp, Tyr et DOPA), graphique d'observations présenté dans la figure III.32. Ces trois graphiques sont réalisés toujours à partir des valeurs qui ont été centrées et réduites, et reposent donc sur les propriétés séparatives des colonnes testées.

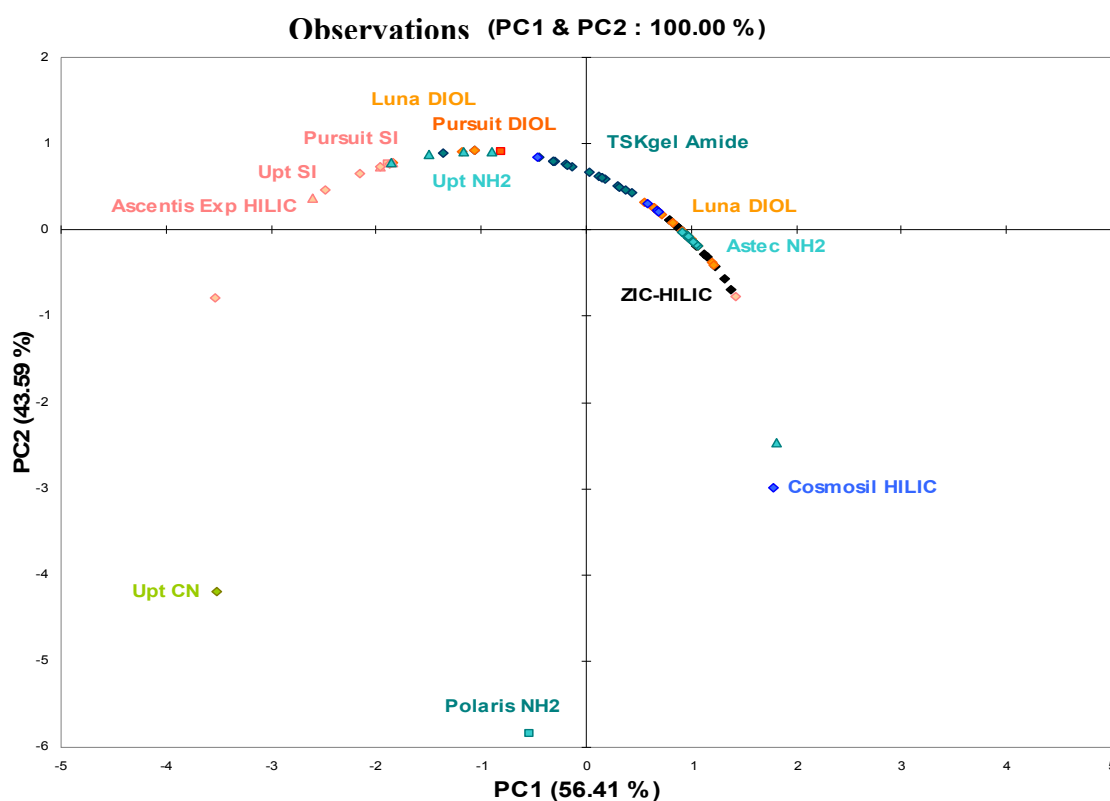


Figure III.30. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des composés anioniques (HVA, 5HIAA, DOPAC) sur les douze phases stationnaires testées dans toutes les conditions chromatographiques

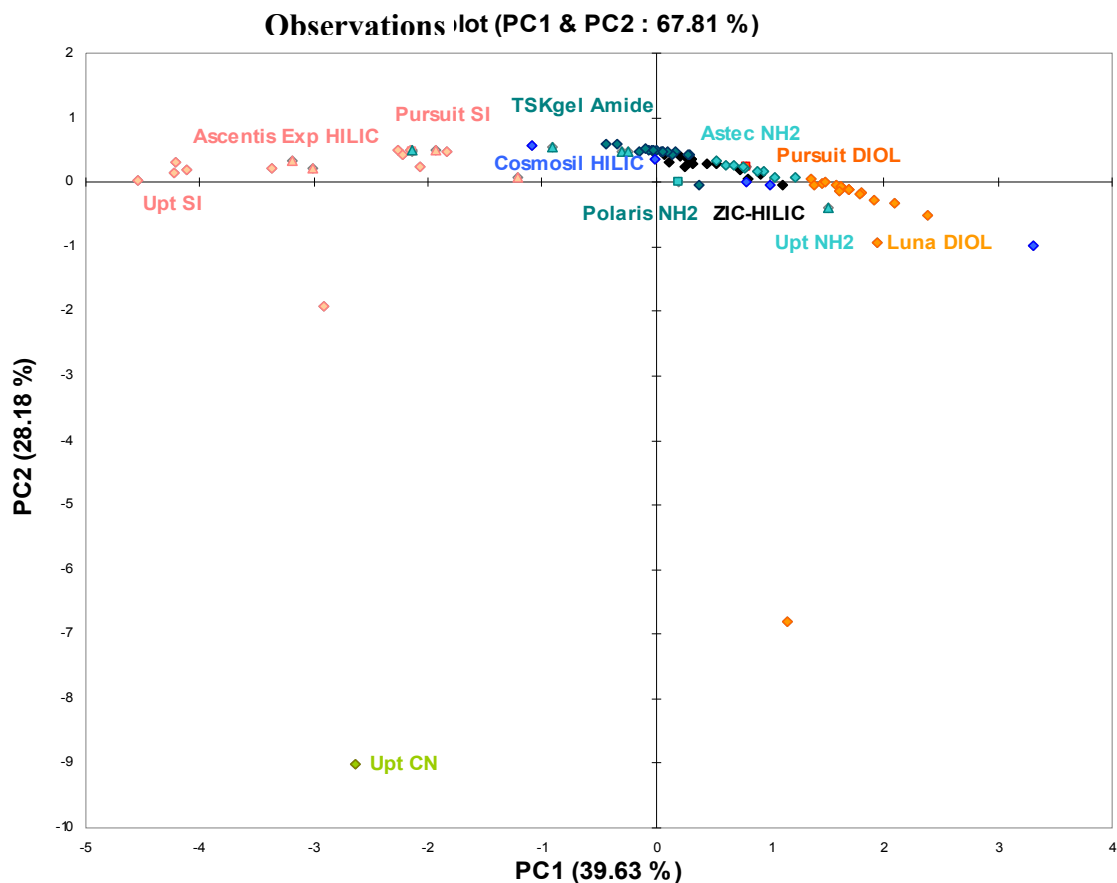


Figure III.31. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la séparation des 6 composés cationiques (A, DA, S, 3-MT, NA et DHBA) sur les douze phases stationnaires testées dans toutes les conditions chromatographiques

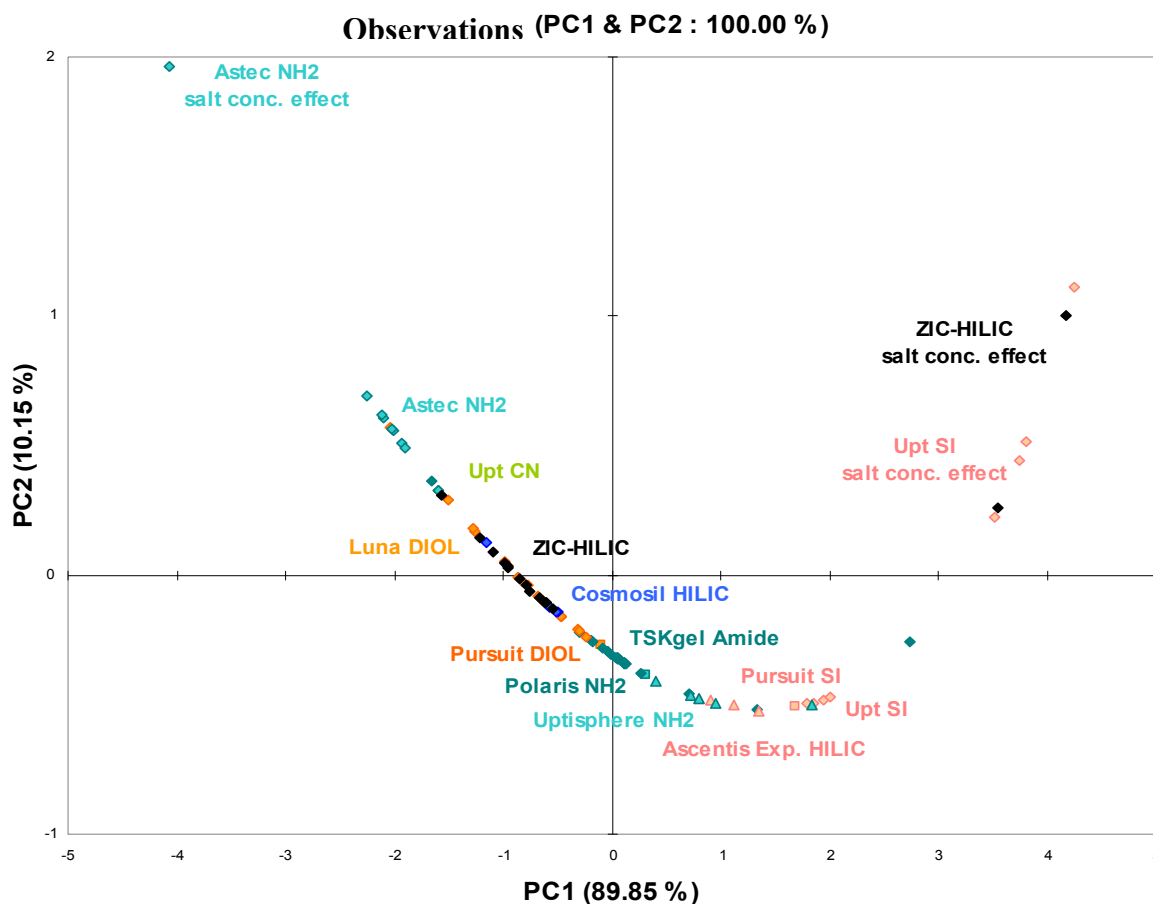


Figure III.32. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la séparation des 3 composés zwitterioniques (DOPA, Tyr, Trp) sur les douze phases stationnaires testées dans toutes les conditions chromatographiques

Nous pouvons noter d'une part, que les propriétés rétentes des composés ayant la même charge étant similaires et d'autre part, que le nombre de ces composés étant petit, les deux axes PC1 et PC2 révèlent toutes les informations (ou une majorité pour les composés cationiques, qui sont plus nombreux). Les graphiques sont facilement interprétables, puisque aucune des informations ne manque (avec quelques nuances cependant pour les composés cationiques).

On peut voir à partir de ces trois figures que la séparation des composés appartenant à une même famille n'est pas toujours celle qui était prévue en se basant sur les observations de la figure III.29 :

- (i) La colonne Uptisphere CN se distingue pour la séparation des cations et des anions, mais pas pour celle des acides aminés (voir aussi les graphiques d'observations sur la rétention présentés dans les figures III.38 – III.40) ;
- (ii) les phases diol et les phases silice vierge sont toujours séparées les unes des autres, ce qui indique qu'elles fournissent des ordres d'élution différents pour les solutés

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

d'une même famille, ou, lorsque les ordres d'élution sont identiques, les sélectivités sont différentes. Par exemple, les phases diol fournissent des faibles séparations entre HVA et 5HIAA, tandis que les phases de silice permettent leur séparation. Au contraire, les phases de silice fournissent des faibles séparations entre TYR et DOPA, alors que ces deux composés sont généralement mieux séparés sur phases diol.

- (iii) la colonne ZIC-HILIC est généralement située entre les phases diol et les phases silice vierge, tout en étant très proche des premières.
- (iv) on peut aussi remarquer des différences entre les phases cationiques vis-à-vis de la séparation des composés anioniques et zwitterioniques. La colonne Polaris NH₂ offre une mauvaise séparation des anions, alors que le support Uptisphere NH₂, tout en offrant des retentions plus faibles que toutes les autres colonnes amino réussit à les séparer (Figure III.33 à III.35). La colonne Astec NH₂ se distingue particulièrement pour la séparation des acides aminés ; ce constat est en concordance avec les données de la littérature [41].
- (v) pour la séparation des acides aminés la concentration en sel semble avoir une grande influence puisque pour les colonnes : ZIC-HILIC, Astec NH₂ et Uptisphere SI, sur lesquelles l'effet de la concentration en sel a été étudié, on observe une très large dispersion sur le graphique d'observations.

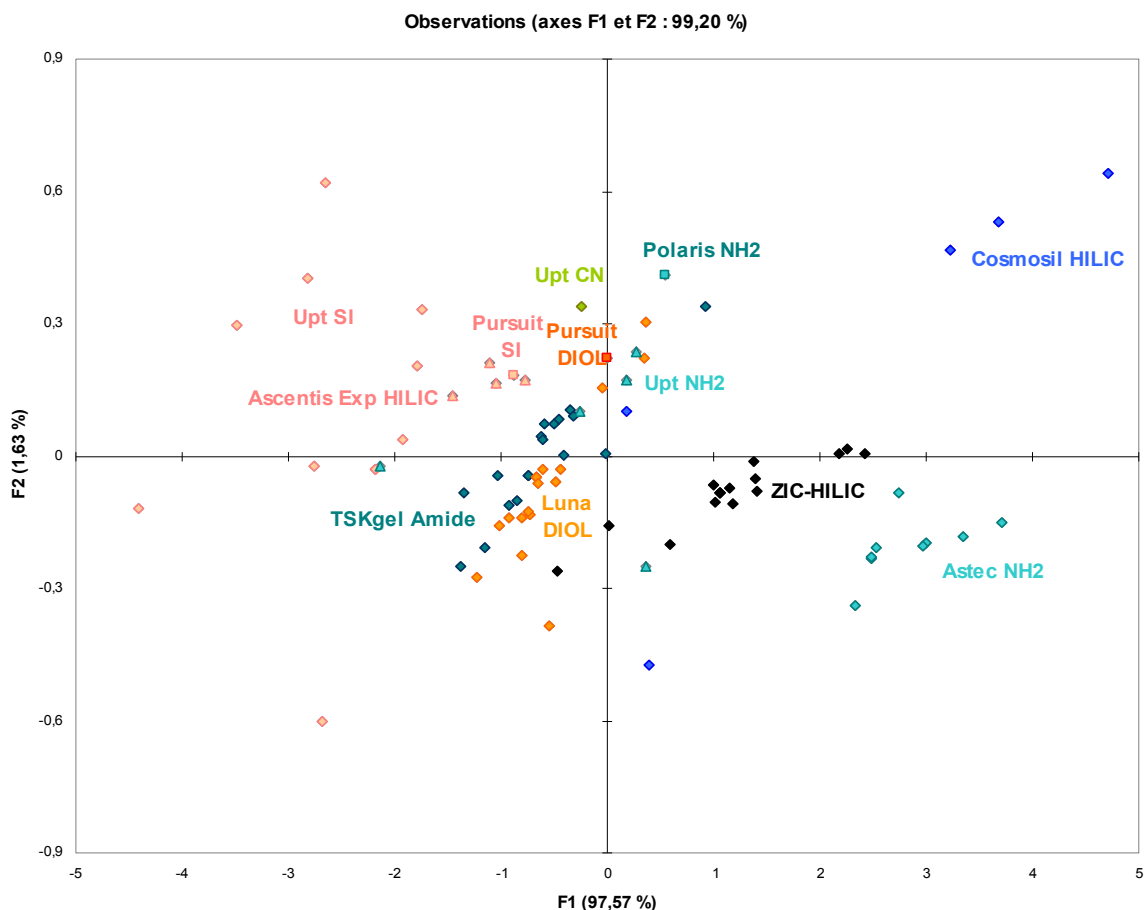


Figure III.33. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des composés anioniques (HVA, 5HIAA, DOPAC) sur les douze phases stationnaires testées dans toutes les conditions chromatographiques (données non centrées non réduites)

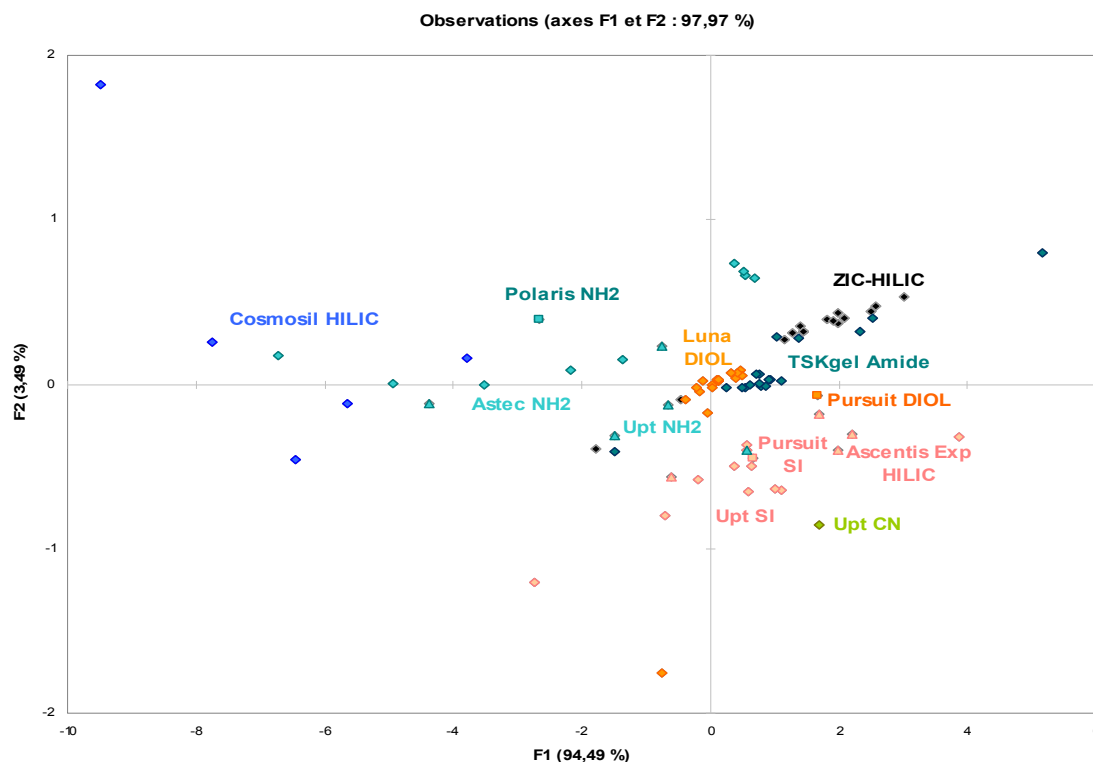


Figure III.34. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des 6 composés cationiques (A, DA, S, 3-MT, NA et DHBA) sur les douze phases stationnaires testées dans toutes les conditions chromatographiques (données non centrées non réduites)

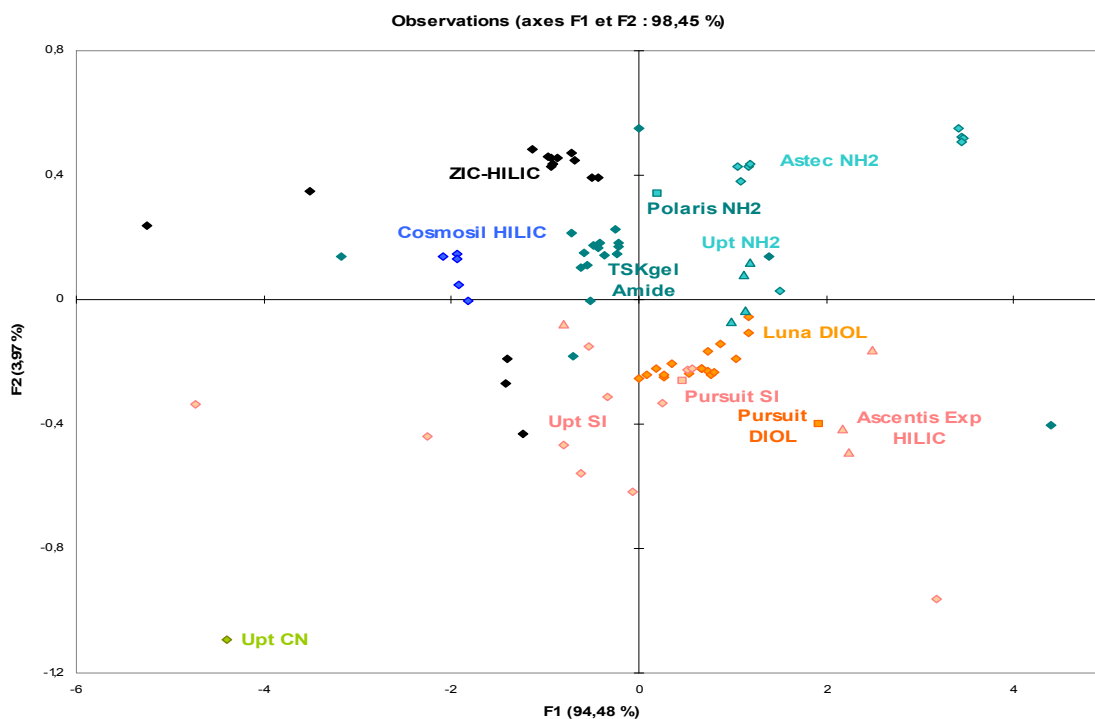


Figure III.35. Analyse en composantes principales (graphique d'observations) basée sur la rétention des 3 composés zwitterioniques (DOPA, Tyr, Trp) sur les douze phases stationnaires testées dans toutes les conditions chromatographiques (données non centrées non réduites)

III.7.3. Procédure proposée pour l'optimisation d'une séparation en mode HILIC

Les résultats de notre étude en ACP montrent qu'il reste difficile voire impossible de proposer une démarche globale qui permettrait dès le premier essai d'obtenir une séparation satisfaisante en mode HILIC pour n'importe quel mélange de solutés. Néanmoins, nous pouvons proposer une démarche méthodologique en vue de l'optimisation d'une séparation en mode HILIC en se basant sur les principales conclusions de nos traitements de données en ACP. Cette démarche est résumée dans l'arbre de décision reporté sur la figure Figure III.36.

Vue l'importance des interactions secondaires pour la rétention des composés en mode HILIC, et particulièrement des attractions/répulsions électrostatiques vis-à-vis des composés ioniques, le type de support doit être choisi en fonction de l'état de charge de la majorité des composés recherchés dans l'échantillon à analyser. Ainsi, il est préférable de choisir une colonne positivement chargée pour l'analyse des composés négativement chargés et pour les composés positivement chargés il est plus utile d'avoir une colonne négativement chargée comme point de départ. Pour les composés neutres, on peut envisager l'utilisation, en premier lieu d'une colonne diol ou d'une colonne zwitterionique. Comme composition initiale de phase mobile à tester, nous proposons un mélange constitué de 75% d'ACN et de 25% d'une solution aqueuse de formiate d'ammonium à 10 mM. Si la rétention ou la séparation ne sont pas suffisantes il faudra suivre les étapes décrites dans l'arbre de décision de la figure III.36. Si par contre, une rétention trop importante des composés est obtenue dans ces conditions de phase mobile il sera possible d'envisager le remplacement de l'ACN par le MeOH, solvant de force éluante plus élevée.

Pour obtenir de la rétention, le premier facteur à prendre en compte sera l'augmentation du pourcentage d'ACN et sinon, dans un deuxième temps, il faudra envisager de tester une autre phase stationnaire de la même famille.

Pour améliorer la séparation le paramètre prioritaire à modifier sera la concentration en sel, puis si cela n'est pas suffisant il faudra envisager de changer la nature du sel. Le changement de valeur du pH de la phase mobile sera testé en dernier lieu puisque cette variation pourra modifier à la fois l'état de charge des solutés et celui de la surface de la phase stationnaire entraînant alors des variations de rétention difficilement prévisibles.

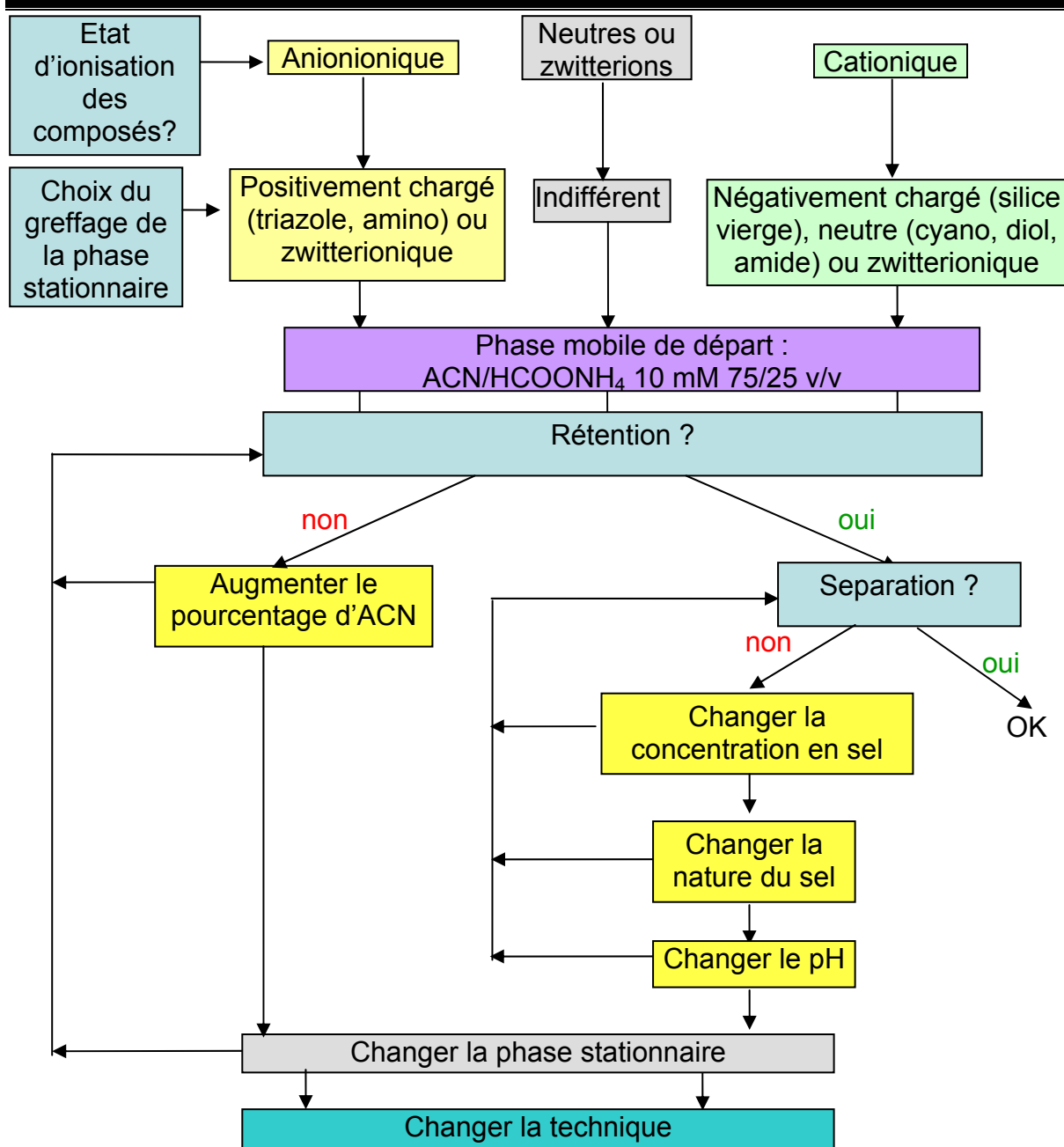


Figure III.36. Arbre de décision pour l'optimisation d'une séparation HILIC

IV. Application du modèle proposé à l'optimisation de la séparation d'une autre famille de composés très polaires

En nous appuyant sur le raisonnement établi et résumé dans l'arbre de décision ci-dessus, nous avons pu réaliser avec succès l'analyse de 3 herbicides organophosphorés particulièrement polaires et de leurs métabolites et analogues de la famille des acides aminés

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

(Glu, Asp, GABA). Ces résultats ont fait objet d'une publication parue en 2008 dans LC/GC en français que nous reportons ci-après.

IV.1. Performances comparées de différents supports polaires en vue de l'analyse d'herbicides organophosphorés par chromatographie d'interactions hydrophiles

LC/GC en français juin 2008 8-14

Résumé

La capacité rétentive de 5 phases stationnaires polaires commerciales différentes (amino, amide, silice HILIC, sulfobétaine et triazole) a été évaluée en vue de développer une méthode d'analyse de 3 herbicides organophosphorés (glyphosate, glufosinate, ethephon) et de leurs métabolites et analogues par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC). L'effet sur la rétention et la sélectivité de différents paramètres expérimentaux tels que la nature et la proportion du solvant organique en phase mobile, la nature et concentration du sel, le pH de la phase mobile ainsi que l'effet de la température de colonne ont été étudiés en détail. Les données expérimentales montrent clairement que la nature des groupements fonctionnels greffés sur le support de silice influent sur la sélectivité par l'intermédiaire d'interactions secondaires supplémentaires (de type électrostatique) avec les solutés.

IV.1.1. Introduction

Le glyphosate (N-(phosphonométhyl)glycine) (Glyph) et le glufosinate (homoalanine-4-yl(méthyl) phosphonate d'ammonium) (Gluf) (structures présentées Figure III.37) sont deux herbicides non sélectifs parmi les plus utilisés dans le monde. Bien que ces composés ne soient pas considérés comme présentant de risques majeurs pour la santé humaine, des études ont montré qu'une exposition à ces composés pouvait causer des désordres neurologiques [73]. Leur utilisation intensive en agriculture pose des problèmes de contamination environnementale et nécessite de suivre leur teneur ainsi que celle de leurs principaux métabolites (l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), l'acide 3-méthylphosphinopropionique (MPPA) et le N-acétyl-glufosinate) (NAGluf), dans les eaux potables, les sols, les fruits et légumes, les céréales ainsi que dans les fluides biologiques.

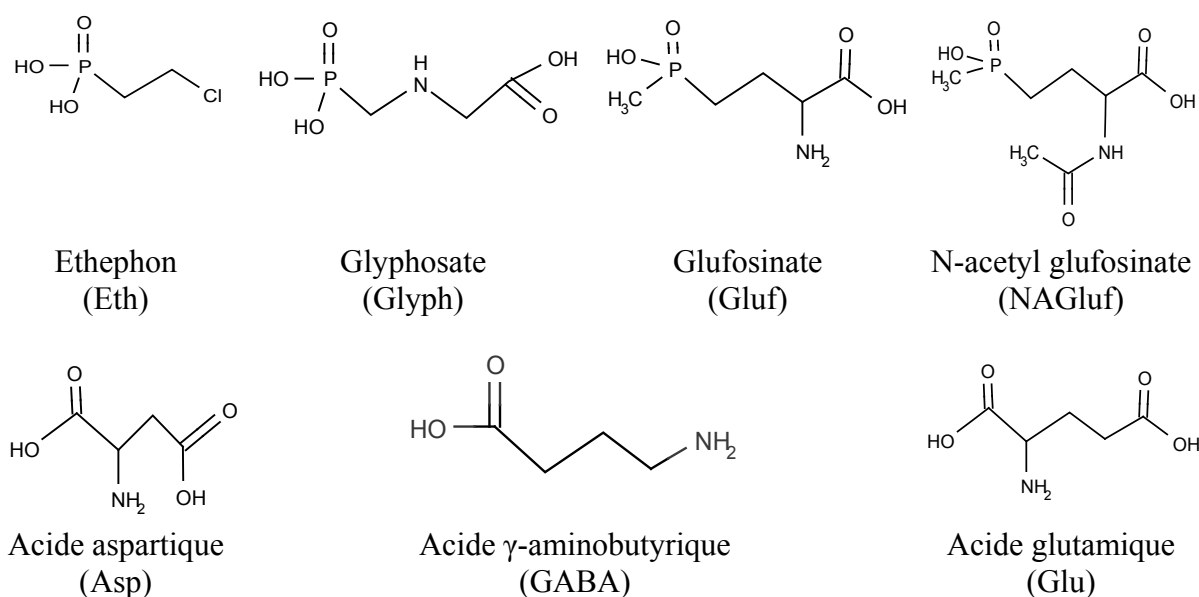


Figure III.37. Structure des différents solutés

Différents décrets fixent les limites maximales de résidus de pesticides et de leurs produits de dégradation, admissibles dans les denrées alimentaires [74], les eaux potables (teneur limite inférieure à $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour chacun de ces pesticides) [75].

Dans ce contexte, développer des méthodes d'analyse, simples, rapides, sensibles et spécifiques pour quantifier à l'état de traces la présence simultanée de ces résidus dans l'eau ou les milieux biologiques représente un challenge analytique intéressant. Ces molécules sont très polaires, ioniques sur toute la gamme de pH, très solubles dans l'eau, peu solubles dans les solvants organiques et non volatiles. Par ailleurs, elles ne possèdent pas de groupement chromophore ou fluorescent pour faciliter leur détection.

Les méthodes d'analyse décrites le plus souvent dans la littérature pour Glyph, Gluf et leurs métabolites [76], font appel après une étape de dérivation, à la chromatographie en phase gazeuse (CPG), à la chromatographie en phase liquide (CPL) ou à l'électrophorèse capillaire (EC). En CPL, une dérivation précolonne est principalement utilisée pour réaliser une séparation en mode phase inverse sur des colonnes de type C18 associée à une détection UV [76,77] ou par spectrométrie de masse [78-80]. Dans un contexte d'analyse sans dérivation de résidus d'herbicides organophosphorés et de leurs métabolites, l'électrophorèse capillaire combinée à la spectrométrie de masse [81,82] ou à la détection indirecte par fluorescence [83,84] a été évaluée mais, un manque de sensibilité et/ou de sélectivité de ces méthodes, limite leurs applications. Quelques méthodes chromatographiques se basant sur la

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

chromatographie ionique ou la chromatographie d'appariement d'ions couplées à la spectrométrie de masse associée à la torche à plasma (ICP-MS) ont également été décrites [85-87] mais c'est l'utilisation de la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) particulièrement adaptée à la séparation des composés très polaires [5] qui apparaît comme une alternative prometteuse en vue du couplage direct CPL-SM. En 2007, Coutinho *et al.* [88] ont mis en évidence une limite de détection de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le dosage du glyphosate dans des jus de fruit en mode HILIC couplé à une détection coulométrique.

La chromatographie en mode HILIC associe à une phase stationnaire polaire, une phase mobile hydro-organique contenant classiquement 5 à 40 % d'eau en mélange avec de l'acétonitrile ou du méthanol [1]. Dans le cas de solutés ionisables, la présence en plus, de sel dans la phase mobile sera nécessaire pour l'élution. Le mode HILIC est caractérisé par un partage du soluté polaire entre la phase mobile hydro-organique et une fine couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire ainsi, comme en chromatographie à polarité de phases normale, plus un soluté sera polaire plus sa rétention sera importante en mode HILIC. Dans le cas de l'analyse de composés polaires en couplage avec la spectrométrie de masse, le mode HILIC offre des conditions d'ionisation par électrospray nettement plus favorables que le mode phase inverse dans la mesure où les phases mobiles utilisées en mode HILIC sont très riches en solvant organique. Le mode HILIC est donc potentiellement mieux adapté aux besoins de sensibilité de détection nécessaire pour le dosage de traces de résidus [2].

Pour répondre à la demande croissante d'analyse de composés polaires dans des milieux biologiques de plus en plus complexes, on assiste actuellement à un regain d'intérêt pour le mode HILIC qui se traduit par une mise sur le marché de nouveaux supports polaires de plus en plus diversifiés. Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté ici, est d'évaluer la capacité rétentive de 5 phases stationnaires commerciales fonctionnalisées avec des groupements polaires variés (amino, amide, silice ultrapure, sulfobétaïne et triazole) vis-à-vis de 3 herbicides organophosphorés (glyphosate, glufosinate, ethephon), de leurs métabolites et analogues afin d'une part, de mieux comprendre le phénomène de rétention en mode HILIC et d'autre part, d'apporter des informations facilitant un choix raisonné de phase stationnaire en fonction de la nature des solutés d'intérêt. Cette méthode HILIC optimisée pourra ultérieurement être couplée à la spectrométrie de masse afin d'évaluer les seuils de détection limite et de les comparer à ceux fixés par les différentes réglementations.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

IV.1.2. Partie expérimentale

Le glufosinate sous la forme de son sel d'ammonium, le glyphosate et l'ethephon proviennent de chez Riedel-de-Haën (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). L'acide aspartique (Asp), l'acide 4-amino-n-butyrique (GABA) et l'acide glutamique (Glu) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'acétate d'ammonium et le formiate d'ammonium ainsi que l'acide formique et l'acide acétique sont de marque Fluka (Saint Quentin Fallavier, France). L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) et l'acétone, sont de pureté analytique et achetés chez JT Baker (Noisy le Sec, France). Les phases mobiles et les solutions d'étalons ont été préparées en utilisant de l'eau purifiée et déionisée dans notre laboratoire au moyen d'un système UHQ II (Elga, Antony, France). Pour chacun des solutés, une solution mère à 1000 mg.L^{-1} a été préparée dans l'eau déionisée et stockée au réfrigérateur à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Les solutions filles injectées ont été préparées à partir de ces solutions mères par dilution dans la phase mobile. Les dilutions sont faites dans la phase mobile afin que le solvant d'injection soit de composition la plus proche possible de celle de l'éluant. Un mélange standard contenant le glyphosate à la concentration de 200 mg.L^{-1} et chacun des 6 autres solutés à la concentration respective de 100 mg.L^{-1} a été également préparé dans la phase mobile juste avant l'analyse.

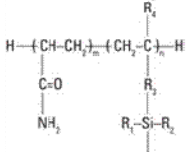

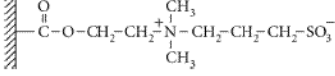
Le système chromatographique comprend une pompe quaternaire Merck Hitachi (Darmstadt, Allemagne) modèle Lachrom L-7100, une vanne d'injection Rheodyne (Cotati, Californie, USA) modèle 7725 munie d'une boucle d'injection de $10 \text{ }\mu\text{L}$ et un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL), modèle Sedex 85 (Sedere, Alfortville, France) (température de nébulisation 50°C , pression du gaz nébuliseur 2,3 bars, gain 8). Le choix d'un mode de détection par DEDL est lié au fait que les solutés sont non volatils et pourront donc être détectés directement sans dérivation. Par ailleurs, le DEDL ayant les mêmes contraintes de volatilité pour la phase mobile que la spectrométrie de masse, celui ci facilite la transposition directe du système chromatographique optimisé avec le DEDL au couplage ultérieur avec la spectrométrie de masse. Les colonnes sont thermostatées à 25°C à l'aide d'un four Jetstream II Plus (Jasco, Nantes, France). L'acquisition des données est effectuée à l'aide du logiciel EZChrom Elite version 3.1.7 (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Les 5 supports testés sont les suivants : une colonne polymérique Astec apHera NH2 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$) (Whippany, New Jersey, USA), une colonne ZIC HILIC ($150 \times 4,6 \text{ mm}$) (SeQuant AB, Umeå, Suède) via (A.I.T., Houilles, France), une colonne TSKgel Amide 80 ($250 \times 2 \text{ mm}$) (Tosoh Biosciences, USA), une colonne Cosmosil HILIC ($150 \times 2 \text{ mm}$)

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

(Nacalai Tesque, Japon) et une colonne Uptisphere Strategy HILIC HSI (250 x 2 mm) (Interchim, Montluçon, France). Les caractéristiques physico-chimiques de ces colonnes sont répertoriées dans le Tableau III.3.

Tableau III.3. Propriétés physico-chimiques des phases stationnaires polaires

Colonne	Dimension s(mm)	Diamètre des particules	Taille des pores	Groupe fonctionnel	Surface spécifique	Fournisseur
Uptisphere Strategy HILIC	250x2	5 µm	100 Å	Silice sphérique ultra pure	450 m ² /g	Interchim
Astec apHera NH2	150x4.6	5 µm		Gel polymérique greffé polyamine	-	Advanced Separation Technologies Inc.
TSKgel Amide 80	250x2	5 µm	100 Å	 $\begin{array}{c} \text{H} - \left(\text{CH} - \text{CH}_2 \right)_n - \left(\text{CH}_2 - \text{C} \right)_m - \text{H} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{C} = \text{O} \qquad \qquad \text{R}_1 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{R}_2 - \text{Si} - \text{R}_2 \end{array}$	300 m ² /g	Tosoh Biosciences
				Groupe carbamoyl non ionique greffé sur la silice		
Cosmosil HILIC	150x2	5 µm	120 Å		300 m ² /g	Nacalai tesque
				Groupement triazole greffé sur la silice		
ZIC HILIC	150x4.6	5 µm	200 Å	 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_3^- \end{array}$	140 m ² /g	SeQuant AB
				Groupement zwitterionique greffé sur la silice		

IV.1.3. Résultats et discussion

Pour développer une nouvelle méthodologie d'analyse de résidus de pesticides dans des échantillons plus ou moins complexes – notamment dans le cas d'échantillons biologiques — il est nécessaire (i) que la séparation chromatographique permette d'exclure suffisamment les composés d'intérêt du volume mort, zone dans laquelle sont élués la plupart des autres constituants de la matrice mais également et (ii) qu'elle offre une sélectivité satisfaisante entre les composés d'intérêt, leurs métabolites et leurs homologues tels que certains acides aminés présents conjointement dans la matrice. 7 composés ont ainsi été sélectionnés pour notre étude : 3 herbicides organophosphorés (le glufosinate, le glyphosate et l'éthephon), un résidu du glufosinate (le N-acétyl-glufosinate) et 3 acides aminés de structure proche et présents en quantité importante dans les tissus cérébraux (l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'acide γ -aminobutyrique).

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Afin de trouver les meilleures conditions chromatographiques en terme de séparation mais aussi en terme de durée d'analyse, 5 colonnes polaires représentatives de la diversité des phases stationnaires HILIC commercialisées, ont été sélectionnées pour notre étude. Ces colonnes ont des propriétés similaires en termes de diamètre des particules et taille de pores (à l'exception de la colonne ZIC HILIC qui a des pores plus gros), mais des surfaces spécifiques et des groupements fonctionnels différents tels que représentés dans le Tableau III.3. La colonne Uptisphere Strategy HILIC HSI est constituée de silice vierge ultrapure de haute densité. Selon les conditions de pH de la phase mobile, il faudra prendre en compte la possibilité d'avoir des charges négatives à la surface de la silice du fait de la déprotonation de certains silanols. La colonne Astec NH2 est une phase polymérique aminopropyle qui sera plus ou moins chargée positivement selon le pH de la phase mobile. La phase TSK gel Amide 80 est constituée de groupements carbamoyles non ionisables, greffés à la surface de la silice via une chaîne carbonée aliphatique. C'est une phase qui ne présentera pas de ce fait, d'interactions électrostatiques secondaires avec les solutés ioniques. La colonne Cosmosil HILIC est constituée d'un support de silice greffée avec un groupement triazole qui pourra plus ou moins être chargé positivement en fonction du pH de la phase mobile. La colonne ZIC HILIC est zwitterionique avec des groupements sulfobetaines greffés de façon covalente à la surface de la silice. Les charges négatives du greffon étant situées à l'extrémité de la chaîne carbonée, seront plus accessibles que les charges positives pour des interactions électrostatiques complémentaires avec les solutés positifs.

La Figure III.38 présente l'analyse des 7 solutés dans les mêmes conditions de phase mobile (ACN/solution aqueuse d'acétate d'ammonium 40 mM 70:30) sur les différents supports. Les temps de rétention et les sélectivités dépendent du choix de la phase stationnaire. Quel que soit le support polaire utilisé, c'est toujours le glyphosate qui est élué en dernier et l'ethephon qui est le composé ayant le moins d'interactions avec la phase stationnaire neutre (TSK gel Amide), la phase zwitterionique (ZIC HILIC) et la phase de silice ultra pure (Uptisphere HILIC). La Figure III.38 illustre le fait que la séparation en mode HILIC ne se résume pas seulement à un partage des solutés entre la couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire et la phase mobile. Des interactions secondaires sont à considérer pour justifier les différences importantes de rétention et de sélectivité. Dans ces conditions de phase mobile, tous les solutés sont chargés négativement et malgré la présence de sel dans l'éluant (12 mM globalement dans le mélange ACN/eau), il n'est pas possible de les éluer sur la phase aminopropyle (résultats non montrés). Cet effet important d'échange d'ions de la phase amino vis-à-vis des composés acides avait déjà été rapporté précédemment

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

par d'autres auteurs [5,10]. Ces résultats confirment que ce type de greffage n'est pas approprié à l'analyse en mode HILIC d'un certain nombre de solutés anioniques. La colonne Cosmosil dont les groupements triazoles peuvent également se charger positivement, offre une rétention importante pour les solutés mais contrairement au support aminopropyle, permet leur élution. Les pics chromatographiques sont relativement larges avec des traînées (le glyphosate est élué après 45 min et son pic s'étale sur 5 min). La présence de groupements triazoles protonnés à la surface de la silice n'est donc pas favorable à une distribution rapide des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire. Une absence de sélectivité entre les 2 acides aminés Asp et Glu dont la structure ne diffère que par un groupement méthylène, est par ailleurs observée sur ce support. En comparaison, sur la colonne TSKgel Amide-80, colonne non chargée, les rétentions sont beaucoup plus faibles mais c'est la colonne la moins résolutive de toutes les colonnes testées dans ces conditions de phase mobile : les 3 acides aminés Asp, Glu et GABA, sont coélusés avec le N-acétylglufosinate à plus de 10 minutes. Les meilleures séparations sont observées avec les colonnes présentant des charges négatives accessibles. Ceci met en évidence qu'en mode HILIC, les interactions secondaires de type électrostatiques qui peuvent avoir lieu entre les solutés ionisés et les groupements fonctionnels à la surface du support sont largement responsables des différences de sélectivité. La colonne ZIC-HILIC offre une séparation des 7 solutés en moins de 20 minutes et une seule coélution (Glu et Asp). Mais cette colonne est aussi celle pour laquelle le bruit de fond enregistré par le DEDL est le plus important, indiquant de ce fait un faible relargage du greffage ou de la phase stationnaire au fur et à mesure de la percolation de la phase mobile. La meilleure séparation du mélange est obtenue sur la colonne Uptisphere Strategy HILIC HSI et c'est sur ce support que sont observés les pics les plus fins et symétriques.

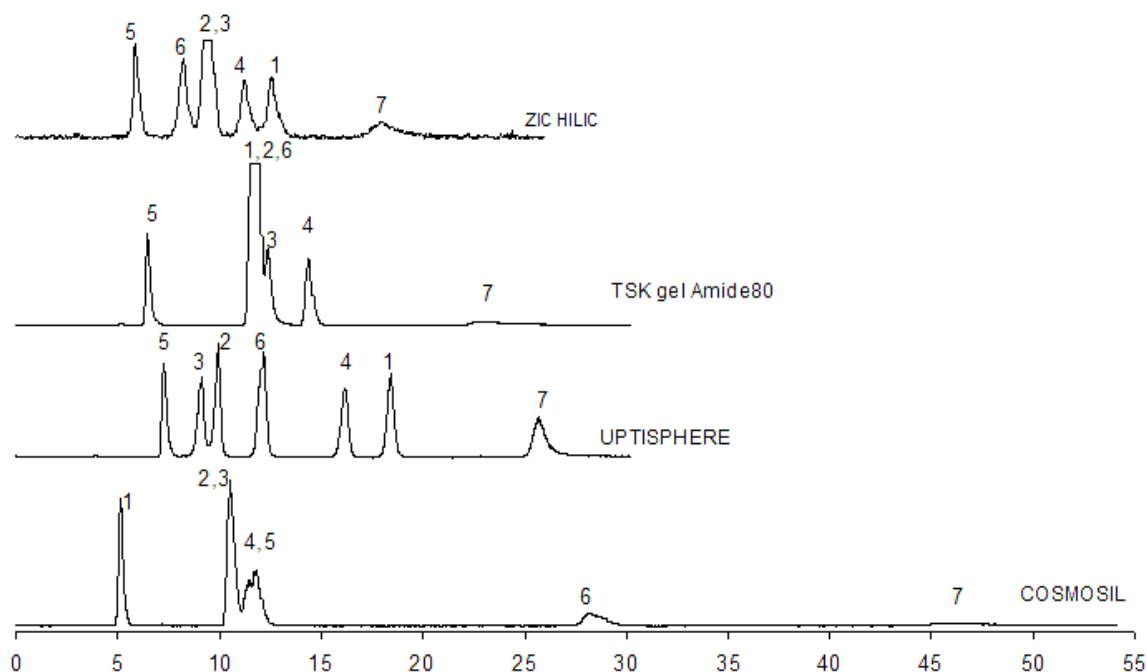


Figure III.38. Analyse des solutés test sur 4 colonnes de silice différentes

Phase mobile : ACN/ CH₃COONH₄ 40mM (70:30 v/v). Débit : 0,2 mL min⁻¹ sauf pour la colonne ZIC-HILIC (débit 1 mL min⁻¹). Détection : DEDL

Ordre d'éluion : 1 = GABA, 2 = Glu, 3 = Asp, 4 = Gluf, 5 =Eth, 6 =NAGluf, 7 = Glyph

IV.1.3.1. Influence du pourcentage et de la nature du modificateur organique

En mode HILIC, la phase mobile contient habituellement entre 5 et 50 % d'eau pour éluer les composés sur les différents types de supports polaires et le solvant organique le plus couramment utilisé est l'acétonitrile mais d'autres solvants tels que le méthanol, l'isopropanol, le THF ou l'acétone ont été utilisés [32]. Toutes les colonnes testées ont présenté un même comportement propre au mode HILIC, à savoir, une augmentation du facteur de rétention avec l'augmentation de la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile. Comme l'illustre la Figure III.39, la teneur en solvant organique est un des paramètres les plus influents sur la rétention puisque l'on observe une diminution de moitié des temps de rétention en modifiant le pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile de 70 à 50 %. La Figure III.40 met en évidence le comportement chromatographique des 7 solutés avec des phases mobiles incluant, le méthanol, l'acétone ou l'acétonitrile comme modificateur organique en présence de 30 % de solution aqueuse d'acétate d'ammonium.

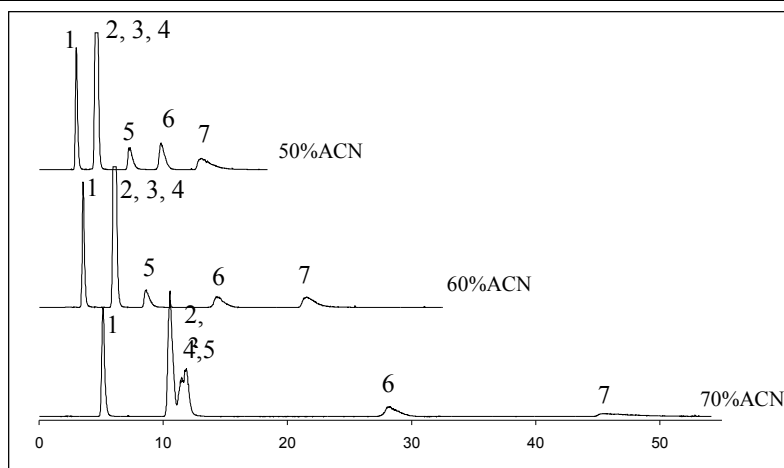


Figure III.39. Effet du pourcentage d'acétonitrile sur la rétention des solutés

Colonne : Cosmosil HILIC (150x2 mm). Phase mobile : $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 40 mM avec x% d'ACN. Détection : DEDL

1. GABA, 2. Glu, 3. Asp, 4. Gluf, 5. Eth, 6. NAGluf, 7. Glyph

Sur la colonne TSKgel Amide (Figure III.40.a), les 7 solutés analysés avec du méthanol n'ont qu'une très faible rétention et aucune sélectivité entre eux n'est observée. Ces résultats sont également représentatifs de ceux obtenus sur les colonnes ZIC-HILIC et Uptisphere Strategy HILIC HSI. Ce comportement très éluant du méthanol est celui observé habituellement en mode HILIC et s'explique par le fort caractère donneur de liaisons hydrogène du méthanol. L'acétone présente une force éluante intermédiaire entre celle très forte du méthanol et celle plus faible de l'acétonitrile. L'acétone peut donc constituer une alternative intéressante pour diminuer les rétentions tout en gardant une sélectivité comparable à celle de l'acétonitrile. La force d'éluant des solvants sur le support Cosmosil semble plus difficile à établir (Figure III.40.b). En effet sur cette colonne, pour 2 solutés, le *N* acetyl-glufosinate et le glyphosate, une importante augmentation de rétention est observée lorsque l'on remplace l'acétonitrile par du méthanol (Figure III.40.b) tandis qu'une diminution de rétention, comme attendue en mode HILIC, est constatée pour les 5 autres solutés dont les 3 acides aminés (Asp, Glu et GABA).

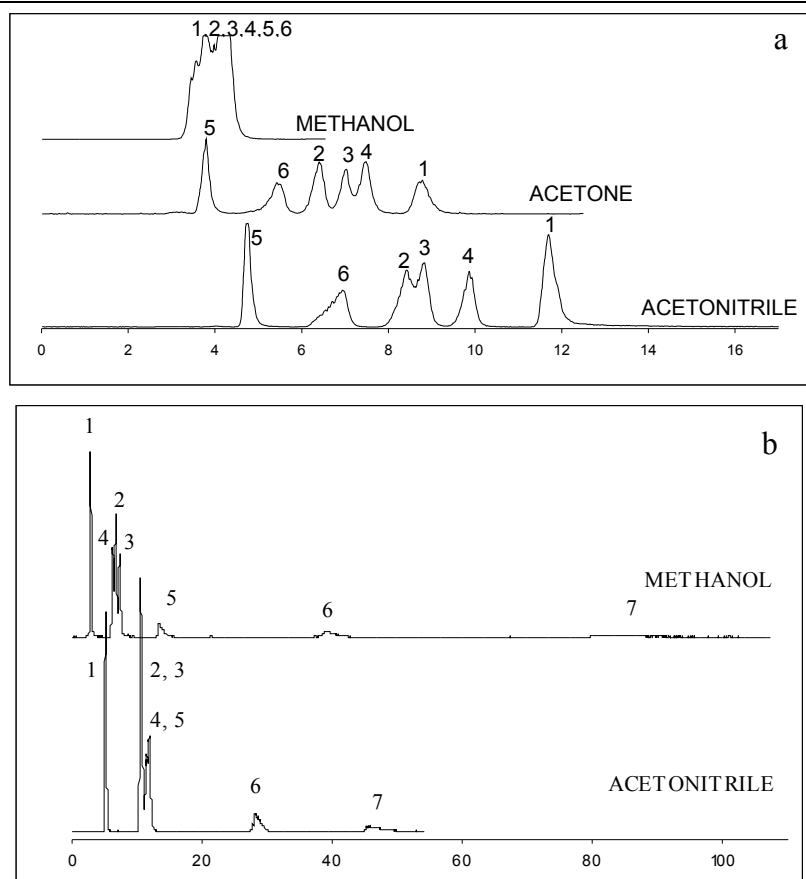


Figure III.40. Comparaison de la force éluante de 3 modificateurs organiques.

a. Colonne : TSKgel Amide 80 (250x2 mm). Phase mobile : solvant organique/ solution aqueuse d'acétate d'ammonium 10 mM (70 :30 v/v).

b. Colonne Cosmosil HILIC (150x2 mm). Phase mobile : solvant organique/ solution aqueuse d'acétate d'ammonium 40mM (70 :30 v/v).

Détection : DEDL. 1. GABA, 2. Glu, 3. Asp, 4. Gluf, 5. Eth, 6. NAGluf, 7. Glyph

IV.1.3.2. Influence de la nature et de la concentration du sel

Beaucoup de sels utilisés en chromatographie phase inverse ne conviennent pas au mode HILIC en raison de leur faible solubilité dans une phase mobile riche en solvant organique. Par ailleurs, les contraintes liées à l'exigence de volatilité des phases mobiles pour une détection aussi bien par DEDL que par spectrométrie de masse, limitent le choix de ces sels. En se basant sur ces considérations, nous avons comparé la force d'éluion de 2 sels volatils : l'acétate et le formiate d'ammonium. Le remplacement d'un sel par l'autre ne modifie pas l'ordre d'éluion des composés et les temps de rétention sont très comparables d'un sel à l'autre. La force d'éluion de l'acétate d'ammonium est cependant légèrement supérieure à celle du formiate d'ammonium pour tous les solutés et sur toutes les colonnes.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

Guo *et al.* [9] ont constaté que pour les composés acides tels que l'acide salicylique et ses homologues, la rétention augmentait avec l'augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile sur les supports négativement chargés ou neutres, mais diminuait sur les supports positivement chargés. Le même phénomène est observé pour le mélange des 7 solutés anioniques étudiés. La rétention augmente lorsque la concentration en acétate d'ammonium passe de 10 à 40 mM dans la phase aqueuse sur la colonne neutre (colonne TSKgel Amide 80) (Figure III.41) et sur les deux colonnes porteuses de charges négatives (colonnes ZIC HILIC et Uptisphere Strategy HILIC HSI) (résultats non présentés). Par contre, sur la colonne greffée triazole (colonne Cosmosil), porteuse d'une charge positive, le phénomène inverse est observé, la rétention diminue avec l'augmentation de la concentration en sel. Ceci peut s'expliquer par des interactions secondaires de type échange d'anions spécifiques au support chargé positivement. L'augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile est alors équivalente, comme en échange d'ions, à une augmentation de la quantité d'ions développeurs en phase mobile ce qui se traduit par une élution plus rapide. La Figure III.41 met en évidence par ailleurs que pour la colonne TSKgel Amide, une augmentation de rétention des solutés par ajout d'une quantité plus importante de sel dans l'éluant n'est pas toujours synonyme de meilleure sélectivité. Une meilleure résolution entre les composés est obtenue avec une phase mobile contenant 10 mM plutôt que 40 mM d'acétate d'ammonium.

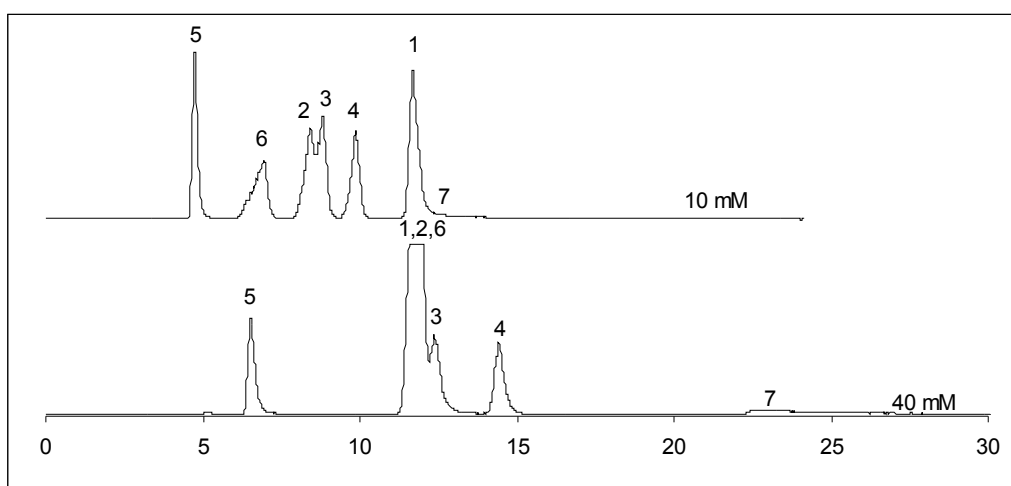


Figure III.41. Effet de la concentration en sel

Colonne : TSK gel Amide 80. Phase mobile : ACN/ CH₃COONH₄ 10 mM ou 40 mM (70 :30 v/v). Détection : DEDL. 1. GABA, 2. Glu, 3. Asp, 4. Gluf, 5. Eth, 6. NAGluf, 7. Glyph

IV.1.3.3. Influence du pH de la phase mobile sur la rétention

Pour effectuer cette étude, le pH de la phase mobile a été ajusté aux valeurs désirées par ajout soit d'acide acétique lorsque le sel utilisé était l'acétate d'ammonium soit d'acide formique dans le cas du formiate d'ammonium. Pour les 3 colonnes ZIC HILIC, TSKgel Amide et Cosmosil HILIC, la tendance générale (Figure III.42.a-c) montre une augmentation des facteurs de rétention avec la diminution du pH à l'exception près du GABA. En ce qui concerne la colonne Cosmosil HILIC, les augmentations de rétention sont si importantes que le glyphosate, le glufosinate et son métabolite ont des temps de rétention supérieurs à une heure. La colonne Uptisphere Strategy HILIC HSI (Figure III.42.d) présente un comportement singulier. La diminution du pH entraîne une diminution du facteur de rétention pour l'ethephon, GABA et le glyphosate, tandis qu'une augmentation de rétention est observée pour les 4 autres composés (Glu, Asp, Gluf et NAGluf). De ce fait, sur ce support, la variation du pH de la phase mobile constitue un facteur complémentaire pour modifier l'ordre de rétention des solutés.

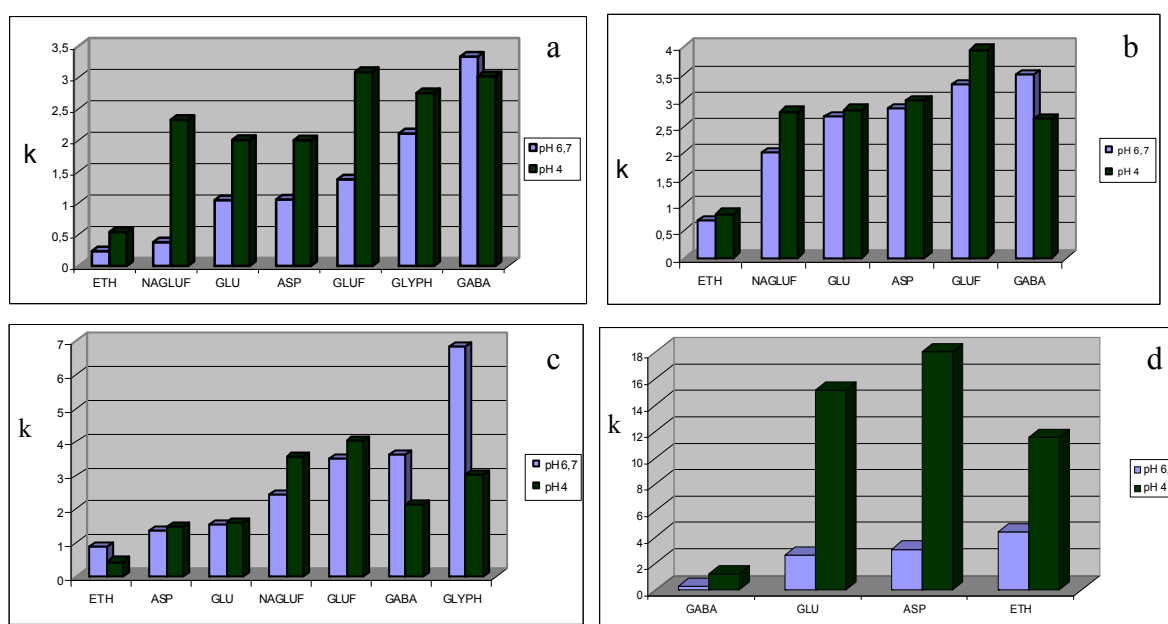


Figure III.42. Effet du pH sur les facteurs de rétention:

a. Colonne : ZIC HILIC. Phase mobile : ACN/solution aqueuse d'acétate d'ammonium 10mM (70 :30 v/v) pH 6,7 ou pH ajusté à 4 avec l'acide acétique.

b. Colonne : TSKgel Amide 80. Phase mobile : ACN/solution aqueuse d'acétate d'ammonium 10mM (70 :30 v/v) pH 6,7 ou pH ajusté à 4 avec l'acide acétique.

c. Colonne : Uptisphere Strategy HILIC. Phase mobile : ACN/solution aqueuse d'acétate d'ammonium 40mM (70 :30 v/v) pH 6,7 ou pH ajusté à 4 avec l'acide acétique

d. Colonne : Cosmosil HILIC. Phase mobile : MeOH/solution aqueuse de formiate d'ammonium 40mM (70 :30 v/v) pH 6,5 ou pH ajusté à 4 avec l'acide formique.

IV.1.3.4. Influence de la température

L'effet de la température dépend du support polaire utilisé. Sur les colonnes Cosmosil HILIC et TSKgel Amide, l'augmentation de la température a comme effet une diminution globale des facteurs de rétention. Par contre, sur les deux colonnes négativement chargées l'effet de la température n'est pas prévisible. Sur le support zwitterionique, ZIC-HILIC, les 2 solutés GABA et ethephon ont des temps de rétention non modifiés par l'augmentation de température de 25 à 50 °C tandis que les 5 autres solutés sont plus retenus à 50°C qu'à 25°C. Dans ces conditions chromatographiques à 50 °C, la séparation est moins bonne qu'à 25°C car un nombre plus important de coélutions est observé. Sur la colonne Uptisphere Strategy HILIC HSI (Figure III.43), l'effet d'une augmentation de température sur la rétention des 3 acides aminés (GABA, Asp et Glu) est quasiment nul tandis que l'on observe une très nette augmentation de rétention pour le glyphosate, composé élué en dernier, et un élargissement du pic chromatographique correspondant. Pour le glufosinate et son métabolite, le N-acétylglufosinate, un effet d'augmentation de rétention est également observé mais de façon plus atténuée dans le cas du glufosinate. Pour l'ethephon, soluté élué en premier, une diminution de rétention est constatée lorsque la température de la colonne passe de 25°C à 50°C. A la différence du support ZIC HILIC, l'augmentation de température sur la colonne Uptisphere Strategy HILIC HIS ne conduit pas à une perte de sélectivité entre les solutés mais entraîne une perte d'efficacité de la séparation notamment pour le glyphosate.

Globalement, il apparaît que pour les 4 types de support différents testés, l'augmentation de température de colonne n'entraîne pas d'amélioration de séparation. Il reste préférable de travailler avec une température de colonne de 25°C.

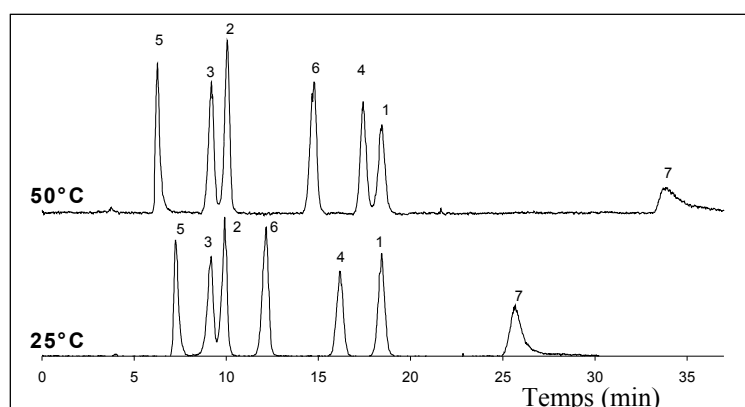


Figure III.43. Influence de la température de la colonne

Colonne : Uptisphere Strategy HILIC. Phase mobile : ACN / CH₃COONH₄ 40mM (70 :30 v/v). Détection : DEDL. 1. GABA, 2. Glu, 3. Asp, 4. Gluf, 5. Eth, 6. NAGluf, 7. Glyph

IV.1.4. Conclusions

Cette étude de la rétention de 3 herbicides organophosphorés, d'un métabolite et de 3 acides aminés sur différents supports de chromatographie HILIC confirme que le mécanisme de rétention en chromatographie d'interactions hydrophiles ne se résume pas à un simple partage des composés entre la phase mobile et la couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire. Les mécanismes secondaires d'interactions électrostatiques ou de type échange d'ions jouent un rôle important dans la rétention et la sélectivité.

A la lumière des résultats obtenus sur les différents supports polaires, nous pouvons proposer deux systèmes chromatographiques prometteurs en vue d'un couplage ultérieur avec la spectrométrie de masse avec ionisation par electrospray : en premier lieu, le système constitué de la colonne Uptisphere Strategy HILIC HSI à 25 °C associée à une phase mobile constituée d'un mélange (70:30 v/v) d'acétonitrile et de solution aqueuse d'acétate d'ammonium 40 mM. Dans ces conditions chromatographiques, tous les solutés sont séparés et dégagés du volume mort, ce qui correspond à des conditions favorables à l'analyse d'échantillons complexes telle que l'analyse des eaux ou celle d'échantillons biologiques. Le deuxième système adapté à la problématique est celui constitué de la phase stationnaire TSK gel Amide 80 associée à une phase mobile constituée d'un mélange (70:30 v/v) d'acétonitrile et de solution aqueuse d'acétate d'ammonium 10 mM à 25 °C. Ce système est moins performant que le premier en terme de séparation mais présente l'avantage de nécessiter un temps d'analyse 2 fois plus court que le premier système.

Des travaux complémentaires en couplage CPL-SM nous permettront d'évaluer les limites de détection des systèmes proposés et de choisir si besoin est, le système d'extraction sur support solide (SPE) le plus approprié pour une pré-concentration et/ou une purification des échantillons.

V. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une étude approfondie des mécanismes de rétention en chromatographie en mode HILIC. Après un bref état de l'art des connaissances actuelles du mode HILIC, concernant les mécanismes de rétention et les paramètres jouant un rôle prédominant pour les séparations HILIC, nous avons présenté les résultats que nous avons obtenus pour la séparation des catécholamines sur 12 colonnes commerciales.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

L'influence des paramètres tels que la nature et le pourcentage de modificateur organique, la nature et la concentration en sel, le pH et la température, a été étudiée afin d'évaluer le rôle de chacun dans la séparation des catécholamines, et d'une manière plus générale pour les séparations en mode HILIC. Nous avons ainsi vu que trois de ces facteurs : le pourcentage de modificateur organique, la concentration en sel et le pH de la phase mobile, ont une contribution plus marquante pour optimiser les séparations HILIC.

L'utilisation de l'analyse en composantes principales a permis de mettre en évidence des similitudes entre les colonnes vis-à-vis de la rétention et la séparation des composés.

Enfin, nous avons proposé une procédure simple pour l'optimisation des séparations en mode HILIC, cette procédure a été ensuite appliquée à l'optimisation de la séparation d'herbicides organophosphorés.

En ce qui concerne l'analyse des catécholamines, aucun des systèmes HILIC optimisés n'offre de séparations suffisantes pour permettre le couplage avec le détecteur électrochimique, par contre la majorité des systèmes sont compatibles avec une détection SM. Les 3 systèmes offrant les meilleures séparations ont été couplés à la spectrométrie de masse afin d'établir les limites de détection et de comparer la sensibilité des systèmes HILIC-SM/SM à celle des systèmes en appariement d'ions-SM/SM. Ces résultats sont présentés dans le chapitre IV.

Références bibliographiques

- [1] A.J. Alpert, *J. Chromatogr. A* 499 (1990) 177.
- [2] H.P. Nguyen, K.A. Schug, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1465.
- [3] P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1421.
- [4] Z. Hao, X. Baiming, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1449.
- [5] P. Hermstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [6] J.Y. Wu, W. Bicker, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1492.
- [7] T. Yoshida, *J. Biochem. Bioph. Methods* 60 (2004) 265.
- [8] R. Chirita, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir, *LC/GC en Français* 1 (2008) 8.
- [9] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71.
- [10] B.A. Olsen, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 113.
- [11] W. Bicker, J.Y. Wu, M. Lammerhofer, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2971.
- [12] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2362.
- [13] M. Liu, E.X. Chen, R. Ji, D. Semin, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 255.
- [14] Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, *Chromatographia* 66 (2007) 223.
- [15] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 85.
- [16] J. Guittou, S. Coste, N. Guffon-Fouilhoux, S. Cohen, M. Manchon, M. Guillaumont, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 149.
- [17] T.M. Baughman, W.L. Wright, K.A. Hutton, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 505.
- [18] M. Lammerhofer, M. Richter, J. Wu, R. Nogueira, W. Bicker, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2572.
- [19] G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang, *Talanta* 76 (2008) 522.
- [20] T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 578.
- [21] H. Zhang, Z. Guo, F. Zhang, Q. Xu, X. Liang, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1623.
- [22] W. Naidong, A. Eerkes, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 28.
- [23] I.B. Paek, Y. Moon, H.Y. Ji, H.-H. Kim, H.W. Lee, Y.-B. Lee, H.S. Lee, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 345.
- [24] A. Eerkes, W.Z. Shou, W. Naidong, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 917.
- [25] Y.-W. Chang, H.-T. Yao, Y.-S. Chao, T.-K. Yeh, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 195.
- [26] W.Z. Shou, W. Naidong, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 186.
- [27] J.M. Cunliffe, C.F. Noren, R.N. Hayes, R.P. Clement, J.X. Shen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 46.
- [28] J. Hmelnickis, O. Pugovics, H. Kazoka, A. Viksna, I. Susinskis, K. Kokums, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 649.
- [29] Z. Hao, C.-Y. Lu, B. Xiao, N. Weng, B. Parker, M. Knapp, C.-T. Ho, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 165.
- [30] S.U. Bajad, W. Lu, E.H. Kimball, J. Yuan, C. Peterson, J.D. Rabinowitz, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 76.
- [31] B.W. Pack, D.S. Risley, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 269.
- [32] R. Li, J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 163.
- [33] D.B. Mawhinney, E.I. Hamelin, R. Fraser, S.S. Silva, A.J. Pavlopoulos, R.J. Kobelski, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 235.
- [34] G. Kesiunaite, E. Naujalis, A. Padarauskas, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 83.
- [35] M.S. Ali, M. Ghorri, S. Rafiuddin, A.R. Khatri, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 158.
- [36] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 909.
- [37] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, A.P. Catabay, K. Jinno, *Chromatographia* 67 (2008) 507.
- [38] H. Tanaka, X. Zhou, O. Masayoshi, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 119.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

- [39] X. Wang, W. Li, H.T. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 58.
- [40] P. Uutela, R. Reinila, P. Piepponen, R.A. Ketola, R. Kostianen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2950.
- [41] M. de Person, A. Hazotte, C. Elfakir, M. Lafosse, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 174.
- [42] M.-M. Zheng, M.-Y. Zhang, G.-Y. Peng, Y.-Q. Feng, *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 160.
- [43] A.D. Delinsky, D.C. Delinsky, S. Muralidhara, J.W. Fisher, J.V. Bruckner, M.G. Bartlett, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1075.
- [44] V.V. Tolstikov, O. Fiehn, *Analysis and Biochemistry* 301 (2002) 298.
- [45] P.J. Boersema, S. Mohamed, A.J.R. Heck, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 151.
- [46] T. Langrock, P. Czihal, R. Hoffmann, *Amino Acids* 30 (2006) 291.
- [47] A. Yanagida, H. Murao, M. Ohnishi-Kameyama, Y. Yamakawa, A. Shoji, M. Tagashira, T. Kanda, H. Shindo, Y. Shibusawa, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 153.
- [48] C. Dell'Aversano, P. Hess, M.A. Quilliam, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 190.
- [49] M. Diener, K. Erler, B. Christian, B. Luckas, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1821.
- [50] P. Hemstrom, Y. Nygren, E. Bjorn, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 599.
- [51] N. Lindegårdh, W. Hanpithakpong, Y. Wattanagoon, P. Singhasivanon, N.J. White, N.P.J. Day, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 74.
- [52] D. Nezirevic, K. Årstrand, B. Kågedal, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 70.
- [53] S. Vikingsson, R. Kronstrand, M. Josefsson, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 46.
- [54] K.L. Wade, I.J. Garrard, J.W. Fahey, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 469.
- [55] H. Idborg, L. Zamani, P.-O. Edlund, I. Schuppe-Koistinen, S.P. Jacobsson, *J. Chromatogr. B* 828 (2005) 9.
- [56] Q. Gu, X. Shi, P. Yin, P. Gao, X. Lu, G. Xu, *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 192.
- [57] M.S.S. Curren, J.W. King, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 41.
- [58] R.S. Hodges, Y. Chen, E. Kopecky, C.T. Mant, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 161.
- [59] E. Hartmann, Y. Chen, C.T. Mant, A. Jungbauer, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A* 1009 (2003) 61.
- [60] C.T. Mant, L.H. Kondejewski, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A* 816 (1998) 79.
- [61] P. Dallet, L. Labat, E. Kummer, J.P. Dubost, *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 447.
- [62] Y. Wang, T. Wang, X. Shi, D. Wan, P. Zhang, X. He, P. Gao, S. Yang, J. Gu, G. Xu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 870.
- [63] P. Ptacek, J. Klima, J. Macek, *J. Chromatogr. B* 858 (2007) 263.
- [64] T. Zhou, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 87.
- [65] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 46.
- [66] E.S. Grumbach, D.M. Wagrowski-Diehl, J.R. Mazzeo, B. Alden, P.C. Iraneta, *LC/GC North America* 22 (2004) 1010.
- [67] Y. Guo, A. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 1191.
- [68] E.P. Kadar, C.E. Wujcik, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 471.
- [69] R. Chirita, B. Rhourri, M. de Person, R. Delépée, P. Morin, C. Elfakir, Poster présenté au 6ème congrès francophone de l'AFSep sur les sciences séparatives et les couplages 20-22 mars 2007, Grenoble (2007).
- [70] X. Zhang, A. Rauch, H. Lee, H. Xiao, G. Rainer, N.K. Logothetis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3621.
- [71] A.J. Alpert, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62.
- [72] D.A. Zighed, R. Rakotomalala, *Technique de l'ingénieur H* 3744 1.
- [73] N. Matsumura, C. Takeuchi, K. Hishikawa, T. Fujii, T. Nakaki, *Neurosci. Lett.* 304 (2001) 123.

Chapitre III. Analyse de neurotransmetteurs par chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

- [74] Règlement (CE) n° 396/2005 du Parlement et du Conseil, du 23 février 2005, concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans les produits d'origine végétale et animale.
- [75] Règlement (CE) n° 2455/2001 du Parlement et du Conseil, du 20 novembre 2001, établissant la liste des substances dans le domaine de l'eau.
- [76] C.D. Stalikas, C.N. Konidari, J. Chromatogr. A 907 (2001) 1.
- [77] Y. Hori, M. Fujisawa, K. Shimada, M. Sato, M. Kikuchi, M. Honda, Y. Hirose, J. Chromatogr. B 767 (2002) 255.
- [78] R.J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, T.H.M. Noij, J. Chromatogr. A 794 (1998) 187.
- [79] M. Ibáñez, Ó.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, J. Chromatogr. A 1081 (2005) 145.
- [80] E.A. Lee, L.R. Zimmerman, B.S. Bhullar, E.M. Thurman, Anal. Chem. 74 (2002) 4937.
- [81] L. Goodwin, J.R. Startin, B.J. Keely, D.M. Goodall, J. Chromatogr. A 1004 (2003) 107.
- [82] R.G. Wuilloud, Shah M., Kannamukumarath S. S., J.C. Altamirano, Electrophoresis 26 (2005) 1598.
- [83] S.Y. Chang, C.-H. Liao, J. Chromatogr. A 959 (2002) 309.
- [84] E. Orejuela, M. Silva, Electrophoresis 26 (2005) 4478.
- [85] B.B.M. Sadi, A.P. Vonderheide, J.A. Caruso, J. Chromatogr. A 1050 (2004) 95.
- [86] Z.-X. Guo, Q. Cai, Z. Yang, J. Chromatogr. A 1100 (2005) 160.
- [87] Z.-X. Guo, Q. Cai, Z. Yang, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 1606.
- [88] C.F.B. Coutinho, L.F.M. Coutinho, L.H. Mazo, S.L. Nixdorf, C.A.P. Camara, F.M. Lanças, Anal. Chim. Acta 592 (2007) 30.

CHAPITRE IV
ANALYSE DES CATECHOLAMINES
PAR COUPLAGE CPL-SM/SM

CHAPITRE IV. ANALYSE DES CATECHOLAMINES PAR COUPLAGE CPL-SM/SM

I. Introduction

Dans ce chapitre sont présentés les couplages CPL-SM/SM des systèmes chromatographiques les plus performants en appariement d'ions et en mode HILIC en vue du dosage de traces de catécholamines dans des matrices naturelles. Pour ce travail trois spectromètres de masse ont été utilisés :

- 2 spectromètres Sciex de deux générations différentes : l'API 300 (le plus ancien) et l'API 3000 ;

- 1 spectromètre Micromass Quatro Ultima.

Les trois appareils sont équipés d'une source d'ionisation de type electrospray (ESI). Les deux spectromètres Sciex ont des géométries de source très similaires et possèdent une interface à rideau de gaz entre la source et l'analyseur. L'appareil Micromass présente une source orthogonale de type Z spray (voir Figure I.17 Chapitre I).

Après l'optimisation des différents paramètres de chaque spectromètre, les limites de détection (LOD) des différents systèmes ont été déterminées afin de distinguer le système le plus sensible, pour chacun des deux modes chromatographiques.

L'analyse directe de l'extrait de cerveau par CPL-SM/SM a permis d'identifier la présence de deux composés parmi ceux du mélange de composés standards : Tyr et Trp. A l'aide du spectromètre de masse API 3000 un dosage par la méthode des ajouts dosés a été réalisé afin de déterminer les quantités de Tyr et Trp présentes dans cet extrait. Nous avons également réalisé des courbes d'étalonnage externe pour chaque composé du mélange afin de vérifier si la méthode que nous avons mise au point peut être utilisée pour le dosage des catécholamines. Une pré-validation des méthodes de dosage a ainsi été réalisée.

II. Etude des paramètres de production et de transmission des ions

En spectrométrie de masse, pour obtenir la meilleure sensibilité (intensité maximale du signal), une optimisation des paramètres les plus importants est nécessaire pour chaque appareil utilisé. Les valeurs optimales de ces paramètres peuvent être différentes d'un appareil à un autre et même pour des appareils de même modèle.

Le premier paramètre important à optimiser est le débit de phase mobile envoyé vers le spectromètre. Dans le premier chapitre de ce mémoire nous avons en effet mentionné le fait

que les sources de type electrospray peuvent être utilisées en couplage avec la chromatographie liquide avec des débits de phase mobile en entrée de source ESI n'excédant pas $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour les colonnes chromatographiques de diamètre interne 2 mm pour lesquelles le débit optimal de phase mobile est de $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, le couplage direct a pu être réalisé. Pour les autres colonnes de diamètre plus important une division (split) du flux d'entrée a dû être mise en œuvre, de manière à envoyer vers le spectromètre seulement $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pour l'étude de l'optimisation des paramètres de fragmentation et ceux de la source des solutions standards préparées pour chaque soluté à la concentration de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sciex API 3000) ou $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sciex API 300 et Micromass Quatro Ultima) ont été infusées directement dans la source du spectromètre de masse à un débit de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ à l'aide d'une pousse seringue. Ces solutions ont été préparées dans différents mélanges de solvants : ACN/ HCOONH_4 20 mM (50/50 v/v) et MeOH/ NFPA 1,25 mM (10/90 v/v) de composition proche de celle des phases mobiles utilisées dans les systèmes chromatographiques optimisés (HILIC et appariement d'ions). Si le premier mélange de solvants est compatible avec un mode d'ionisation aussi bien positif que négatif, le deuxième mélange, du fait de la présence de l'agent d'appariement d'ions (NFPA), n'est compatible qu'avec le mode positif.

L'objectif de notre travail étant de doser des traces de catécholamines, nous ne reporterons dans la suite de ce chapitre que les résultats que obtenus en spectrométrie de masse tandem.

II.1. Etude des spectres de masse et de la fragmentation

Les analyses de masse par infusion ont mis en évidence que les molécules à analyser sont très fragiles et qu'elles fragmentent déjà beaucoup dans la source. Une mauvaise ionisation, en mode positif, pour les molécules acides a également pu être observée: elle est faible pour 5HIAA et pratiquement inexistante pour HVA et DOPAC. Pour ces deux derniers composés de meilleurs résultats ont été obtenus en mode d'ionisation négative.

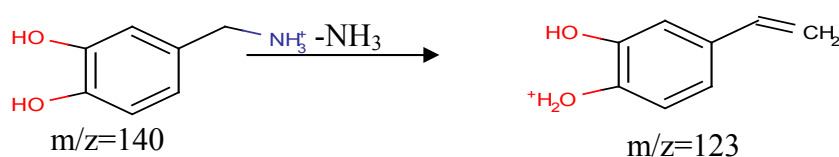
Sur les trois spectromètres de masse utilisés nous avons observé que les 12 catécholamines du mélange standard conduisent principalement aux mêmes fragments et ceci quelque soit le solvant utilisé. Seules les intensités relatives des fragments pour certains composés (A, 3-MT, S, DA et DOPA) sont différentes, les spectres de masse correspondant sont reportés dans l'Annexe 4. Le tableau IV.1 rassemble les principaux fragments obtenus pour chaque composé.

Tableau IV.1. Principaux ions fragments obtenus pour les catécholamines en ESI

Soluté	Ion parent	Fragments observés
	m/z	
	$[M+H]^+$	
DHBA	140	123; 105; 95; 77
DA	154	137; 119; 82
3-MT	168	151; 119; 91; 136
DOPAC	169	123, 77
NA	170	152; 135; 107
S	177	160; 143; 132; 115
TYR	182	165; 136; 123; 119; 147
HVA	183	137; 122; 95
A	184	166; 152; 135; 123; 107
5HIAA	192	383, 146; 118
DOPA	198	181; 152; 139; 135; 163; 111; 107
TRP	205	188; 159; 146; 132; 118
	$[M-H]^-$	
DOPAC	167	123, 107
HVA	181	137, 107

Nous constatons que la plupart du temps le fragment majoritaire en mode d'ionisation positive correspond à une perte du groupement NH_3 (S, DA, DHBA, Tyr, Trp, DOPA, 3-MT). La figure IV.1 récapitule les chemins de fragmentation les plus importants pour chaque catécholamine. L'interprétation des fragments est en accord avec les données présentées dans la littérature [1,2].

DHBA



DA

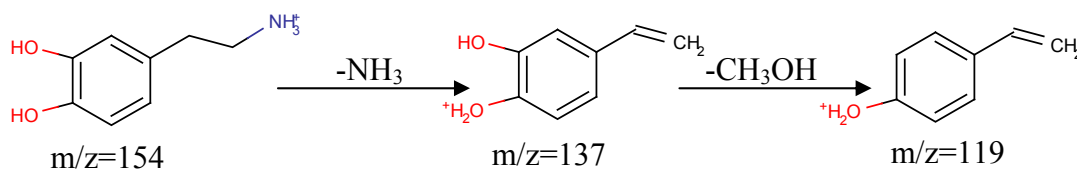
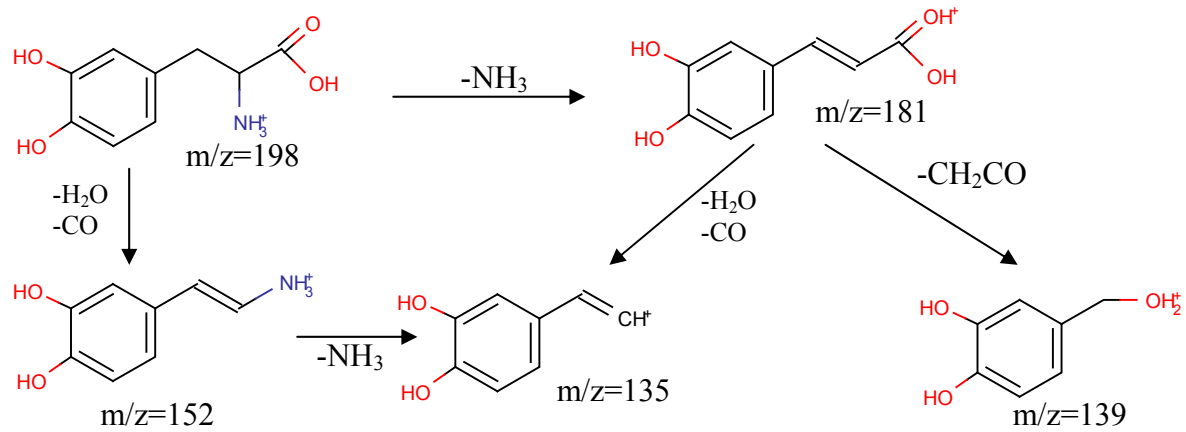
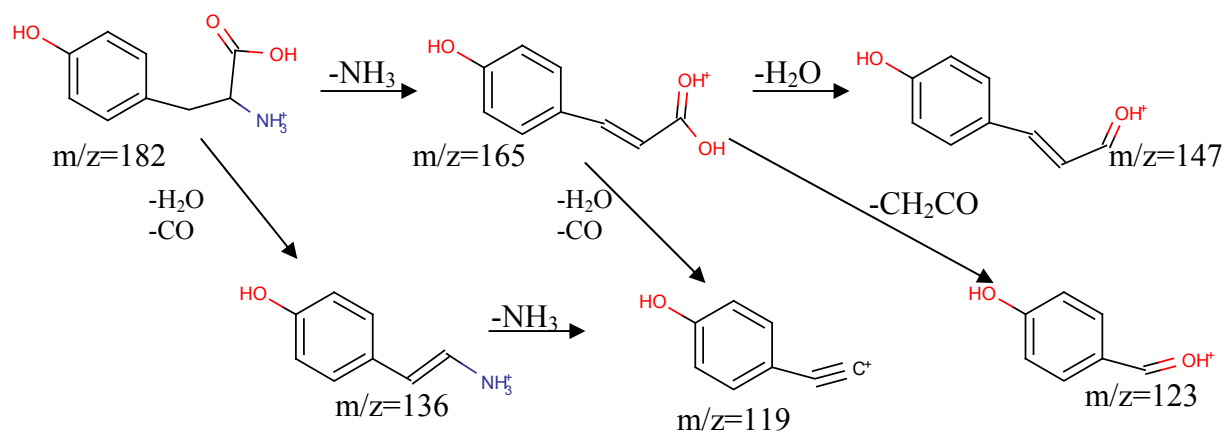


Figure IV.1. Schémas de fragmentation des catécholamines

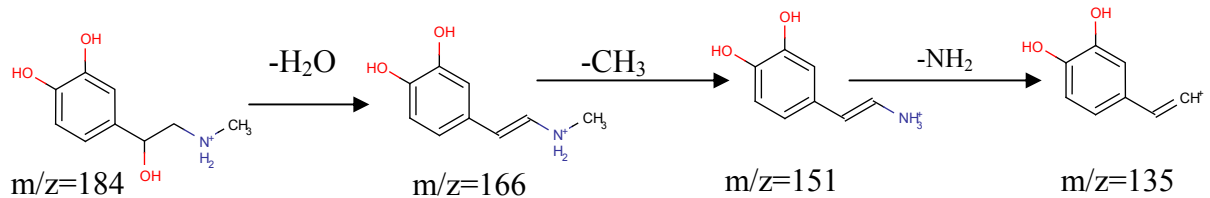
DOPA



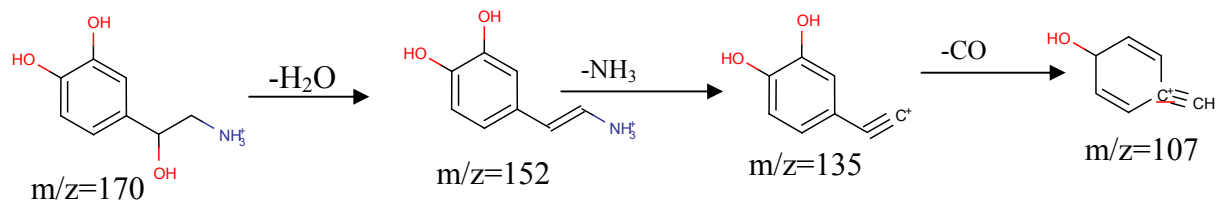
Tyr



A



NA



3-MT

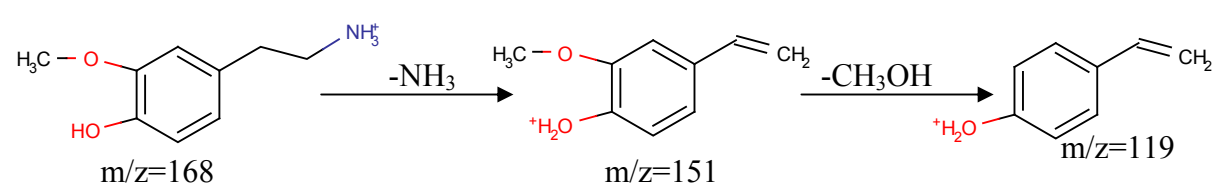
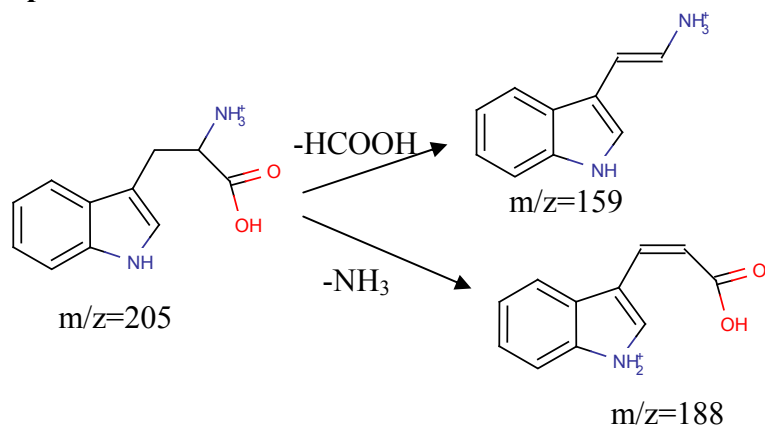
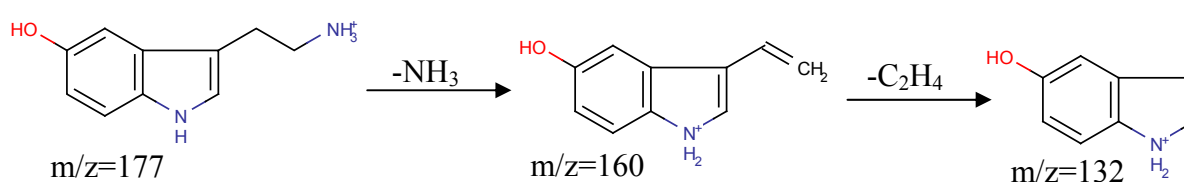
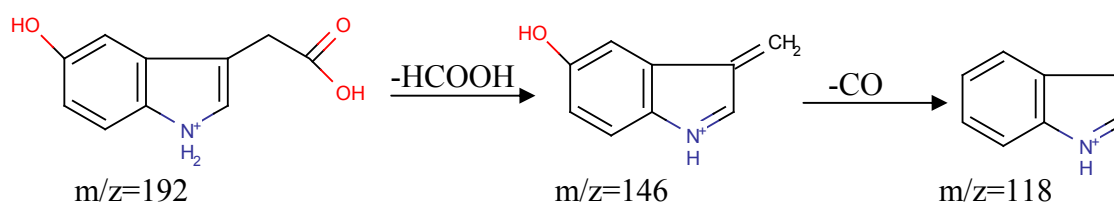
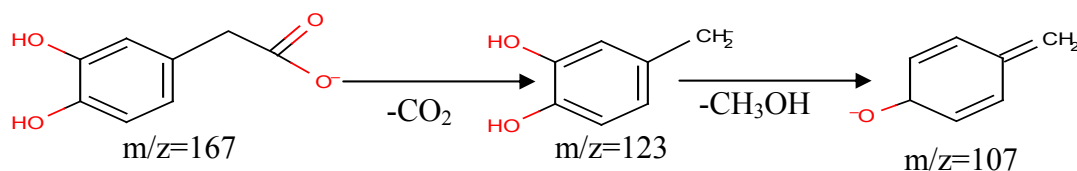
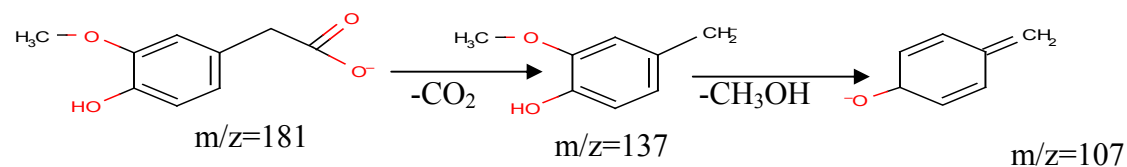


Figure IV.1. Schémas de fragmentation des catécholamines (suite)

Trp

S

5HIAA

DOPAC

HVA

Figure IV.1. Schémas de fragmentation des catécholamines (suite)

L'étude de fragmentation des molécules nous montre que pour une détection par spectrométrie de masse la séparation chromatographique n'est pas indispensable. En effet pour les paires de catécholamines dont la masse molaire ne diffère que d'une unité : (3-MT et DOPAC), (DOPAC et NA) et (Tyr et HVA) la différence se fait aisément puisque les deux

acides DOPAC et HVA sont détectés en mode négatif tandis que les trois autres solutés sont détectés en mode positif.

II.2. Optimisation des paramètres de la source et de la cellule de collision

II.2.1. Spectromètre de masse Sciex API 300

Les premières analyses de masse ont été effectuées avec un spectromètre de masse **Sciex API 300** doté d'une source **Turbo Ion Spray**. Après une étape d'optimisation par infusion (composés solubilisés dans la phase mobile) et par FIA (Flow Injection Analysis – injection dans le système chromatographique sans colonne) les paramètres optimaux pour l'analyse en SM/SM sont les suivants:

- Tension du capillaire : + 5800 kV ;
- Gaz de collision : N₂ à 6 L.min⁻¹ ;
- Gaz de nébulisation : N₂ à 8 L.min⁻¹ ;
- Température de la source : 300°C ;
- Potentiel de focalisation (Focusing potential FP) : 100 V.

En ce qui concerne le potentiel d'entrée (Entrance potential EP), le « declustering potential » (DP – potentiel pour éliminer les clusters de solvant) et l'énergie de collision de la chambre de collision (Collision energy CE), leurs valeurs optimales sont spécifiques pour chaque soluté et sont répertoriées dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2. Valeurs optimisées des paramètres de source et cellule de collision pour les catecholamines analysées sur l'appareil Sciex API 300

Soluté	[M+H] ⁺ m/z	Transitions suivies	CE (eV)	EP (V)	DP (V)
DHBA	140	140<123	12	10	20
DA	154	154<137	13	10	15
3-MT	168	168<151	12	2	10
		168<91	29		
DOPAC	169	169<123	14	10	60
NA	170	170<152	13	2	10
		170<135	25		
S	177	177<160	14	10	20
		160<115	30		
TYR	182	182<165	14	10	45
		182<136	18		
		182<123	22		
HVA	183	183<137	14	10	70

Soluté	[M+H] ⁺ m/z	Transitions suivies	CE (eV)	EP (V)	DP (V)
A	184	184<166	14	2	10
5HIAA	192	192<146	20	10	40
DOPA	198	198<181	13	10	50
		198<152	17		
		198<139	20		
TRP	205	205<188	14	10	10
		205<146	23		

II.2.2. Spectromètre de masse Sciex API 3000

Pour l'appareil Sciex API 3000, compte tenu des similitudes de construction avec l'API 300, les valeurs optimisées des différents paramètres sont très proches de celles obtenues pour l'API 300 :

- Tension de cône : + 5800 kV ou - 4200 kV (pour le mode négatif)
- Gaz de collision: N₂ à 6 L.min⁻¹ ;
- Gaz de nébulisation : N₂ à 8 L.min⁻¹ ;
- Température de la source: 300°C.

Pour le reste des paramètres (CE, DP, EP et FP) les valeurs optimales sont spécifiques pour chaque soluté et reportées dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3. Valeurs optimisées des paramètres de source et cellule de collision pour les catecholamines analysées sur l'appareil Sciex API 3000

Soluté	m/z	Transitions suivies	CE (ev)	DP (V)	FP (V)	EP (V)
	[M+H] ⁺					
DHBA	140	140<123	10	5	70	5
DA	154	154<137	15	20	110	10
3-MT	168	168<151	14	25	150	2
DOPAC	169	169<123	8	30	150	10
NA	170	170<152	11	15	120	2
S	177	177<160	15	20	130	7
TYR	182	182<165	13	40	200	2
HVA	183	183<137	20	25	100	7
A	184	184<166	14	25	160	5
5HIAA	192	192<146	20	25	160	10
DOPA	198	198<152	20	25	130	10
TRP	205	205<188	17	25	150	5
	[M-H] ⁻					
DOPAC	167	167<123	-12	-20	-140	-10
HVA	181	181<137	-11	-30	-140	-5

II.2.3. Spectromètre de masse Micromass Quatro Ultima

Pour le Micromass Quatro Ultima, comme pour les autres appareils, les valeurs des paramètres pour obtenir la valeur optimale de rapport signal/bruit sont les suivantes :

- Tension de cône : + 35 V ou – 35 V ;
- Tension du capillaire : + 3,5 kV ou – 3,4 kV ;
- température de la source : 100°C ;
- température de désolvation : 400°C ;
- débit du gaz de cône : 70 L.h⁻¹ ;
- débit du gaz de désolvation : 650 L.h⁻¹.

Le gaz de collision est l'argon (Ar). Les valeurs de l'énergie de collision optimisée pour chaque soluté sont présentées dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4. Valeurs optimisées des paramètres de la cellule de collision pour les catecholamines analysées sur l'appareil Micromass Quatro Ultima

Soluté	Ion moléculaire (m/z)	Transitions suivies	CE (eV)
	[M+H] ⁺		
DHBA	140	123 > 95	20
DA	154	137 > 91	20
3-MT	168	151 > 91	20
NA	170	152 > 107	15
S	177	160 > 115	25
TYR	182	182 > 136	15
A	184	166 > 123	25
5HIAA	192	192 > 146	15
DOPA	198	198 > 152	15
TRP	205	205 > 188	10
	[M-H] ⁻		
DOPAC	167	123 > 94	20
HVA	181	181 > 123	15

II.2.4. Choix des transitions suivies

Les transitions suivies (ion parent > ion fragment) sont sélectionnées pour chaque soluté à partir de son spectre de masse afin d'obtenir la meilleure intensité du signal détecté par SM/SM. Sur les appareils Sciex, la transition du pic pseudo moléculaire vers son principal fragment a été retenue pour six composés (DA, DHBA, A, 5HIAA, HVA et DOPAC). Pour

les autres composés (3-MT, NA, DOPA, Tyr, Trp et S) on observe plusieurs ions fragments d'abondance comparable (Annexe 5), ce qui permet de suivre pour chacun plusieurs transitions en même temps (tableau IV.2). Au cours des analyses réalisées par la suite nous avons constaté que le suivi d'une seule de ces transitions n'entraînait pas de perte d'information. La possibilité de suivre simultanément plusieurs transitions pour un même soluté reste néanmoins un avantage dans le cas de l'analyse des matrices naturelles pour confirmer l'identification effectuée à partir de la transition principale.

Nous avons constaté qu'avec l'appareil Micromass une fragmentation plus importante avait lieu dans la source orthogonale de type Z, notamment pour A, NA, DA, DOPAC, S, DHBA et 3-MT. Pour ces 7 composés, l'ion moléculaire n'est plus le pic de base (pic le plus intense) de leur spectre de masse. Dans ces conditions la transition suivie avec cet appareillage sera celle du pic de base (généralisé par la perte d'eau ou d'ammoniaque) vers le pic fragment le plus important (tableau IV.4) et non plus la transition à partir de l'ion pseudo moléculaire comme sur les appareils Sciex.

II.2.5. Bilan sur l'optimisation des paramètres en SM

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence que les fragmentations dans la source sont plus abondantes pour l'appareil Micromass que pour ceux de la marque Sciex, ce qui s'explique par la géométrie différente des sources d'ionisation.

Dans le but d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit en SM nous avons créé des méthodes d'acquisition du signal à partir des valeurs optimisées des paramètres de la source et de la cellule de collision pour réaliser ensuite les analyses en couplage CPL-SM/SM. Les transitions suivies sont celles du pic de base de chaque composé vers son fragment principal.

Le couplage de la chromatographie d'appariement d'ions avec la SM ne pourra se faire qu'en mode d'ionisation positif. En effet, en mode négatif, l'anion NFPA présent en permanence dans la phase mobile peut entrer dans l'analyseur, contrairement au mode positif. Malgré la volatilité de cet anion organique l'augmentation du bruit du fond et la pollution rapide de l'appareil sont observées dans ces conditions de fonctionnement. Il ne sera donc pas possible d'analyser dans ces conditions chromatographiques, les deux acides (HVA et DOPAC), puisqu'ils ne donnent un signal SM qu'en mode négatif. En revanche, le couplage de la chromatographie en mode HILIC avec la SM doit être compatible avec les deux modes d'ionisation, puisque la phase mobile ne contient que du solvant organique de l'eau et un sel volatil.

III. Couplage des systèmes en appariement d'ions à la spectrométrie de masse

Dans ce paragraphe nous présentons les résultats obtenus en couplage CPL-SM/SM des systèmes optimisés en chromatographie d'appariement d'ions et choisis pour leurs capacités séparatives par rapport aux exigences d'une double détection SM et électrochimique. Ils ont été décrits dans le deuxième chapitre de ce mémoire et sont rappelés dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5. Conditions chromatographiques des systèmes optimisées en appariement d'ions

Colonne	Phase mobile
PGC	ACN/ solution NFPA 1,25 mM, pH 2,9 en gradient d'élution : 10% ACN de 0 à 5 min, de 10 à 12% ACN de 5 à 10 min, de 12 à 15% ACN de 10 à 15 min et de 15 à 70% ACN de 15 à 20 min
Halo C18	MeOH/NPFA 1,25 mM, pH 2,9, en gradient d'élution : de 0% à 7% de MeOH en 10 min, de 7% à 30% MeOH en 8 min
Supelcosil ABZ + Plus	MeOH/NPFA pH 2,9 (10/90 v/v) élution isocratique ;
Onyx C18	MeOH/NPFA 1,25 mM, pH 2,9, en gradient d'élution : 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min ;

Pour la colonne Halo C18 la division de flux en entrée de la source d'ionisation est de 1/5 car le débit de la phase mobile est de 1,5 mL.min⁻¹ et pour les trois autres colonnes, le débit de la phase mobile étant de 1 mL.min⁻¹, la valeur du split est de 1/3.

Ces systèmes ont été évalués du point de vue des limites de détection (LOD) en couplage avec la spectrométrie de masse, afin de définir le système le plus approprié pour l'analyse d'un extrait de tissu cérébral. Dans le mélange standard de catécholamines préparé pour cette étude, nous avons éliminé les deux acides (HVA et DOPAC) puisque dans ces conditions chromatographiques l'ionisation négative ne peut pas être envisagée.

III.1. Evaluation des limites de détection (LOD) des différents systèmes en appariement d'ions couplés à la spectrométrie de masse

Les valeurs des LODs ont été déterminées à partir de mélanges standards préparés dans la phase mobile (solution aqueuse de NFPA 1,25 mM). Pour cela, des injections successives de solutions diluées à partir d'un mélange à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour chaque soluté, ont été réalisées. Les LODs correspondent aux concentrations pour lesquelles la valeur de rapport signal/bruit est égale à 3. Le tableau IV.6 présente les résultats obtenus avec les différentes colonnes dans les conditions de phase mobile optimisées antérieurement.

Tableau IV.6. LODs (ng.mL^{-1}) des 10 catécholamines qui répondent en ionisation positive

Système LC	PGC	HALO C18		Supelcosil ABZ +		ONYX C18		
	Sciex API 300	API 300	API 3000	API 300	API 3000	Sciex API 300	Micromass Quatro ultima	Sciex API 3000
DHBA	800	50	25	10	2,5	2,5	100	2
DA	500	1000	100	10	5	2,5	2,5	1
3-MT	5	20	2,5	5	3	2,5	1	0,5
NA	1000	100	50	5	10	5	5	10
S	5	>1000	100	5	10	2	10	1
TYR	40	10	5	10	2,5	4	5	3
A	1000	75	50	1	5	3	2,5	2,5
5HIAA	500	>1000	300	100	50	10	50	5
DOPA	100	250	50	10	25	5	5	10
TRP	5	*	*	10	5	*	*	*

* : pour les systèmes chromatographiques Onyx C18 et Halo C18 les conditions de gradient ont conduit à l'apparition d'un pic système détecté sur les transitions sélectionnées pour le Trp et au temps de rétention de Trp. Ce qui empêche la détermination de la LOD pour ce soluté.

La première évaluation des LODs a été réalisée pour les quatre systèmes sur l'appareil Sciex API 300. Comme le montre le tableau IV.6, pour cet appareil, les moins bonnes valeurs

de LODs, pour la majorité des solutés, ont été obtenues avec le système PGC, tandis que les meilleures sont obtenues avec la colonne monolithique (Onyx C18). Malgré les bonnes efficacités des pics chromatographiques observés, le système « fused core » Halo C18 conduit à de moins bonnes limites de détection que les deux autres systèmes employant des colonnes de type C18 (colonne conventionnelle ou monolithique). Cela pourrait s'expliquer par la division de flux plus importante réalisée en entrée de source SM pour ce système (en lien direct avec le débit plus élevé utilisé) et/ou par le fait que c'est le seul système dans lequel la composition initiale du gradient ne contient pas de solvant organique.

De Person *et al.* [3] ont montré que pour les acides aminés, analysés en chromatographie d'appariement d'ions, des améliorations en ce qui concerne les valeurs de LODs sont enregistrées en remplaçant le spectromètre ayant une source Turbo Ion spray (Sciex API 300) par un spectromètre ayant une source Z spray (Micromass Quatro Ultima). Dans ces conditions nous avons couplé le système le plus sensible avec l'API 300 (système Onyx C18) au spectromètre Micromass Quatro Ultima. Les LODs obtenues pour les catécholamines sont similaires à celles obtenues précédemment sur l'appareil Sciex API 300 (tableau IV.6), excepté pour DHBA, 5HIAA et S pour lesquels une perte de sensibilité est remarquée.

En conclusion, pour l'analyse des catécholamines, en chromatographie d'appariement d'ions, une source de type Turbo Ion spray semble plus adaptée qu'une source de type Z spray puisqu'on obtient de meilleures LODs et des valeurs plus homogènes pour l'ensemble des solutés. Par ailleurs, la nouvelle acquisition par notre laboratoire, d'un spectromètre Sciex à source Turbo Ion spray d'une génération plus récente (API 3000), nous a permis d'améliorer légèrement ces LODs (Tableau IV.6).

III.2. Analyse qualitative de l'extrait de cerveau en couplage appariement d'ions-SM/SM

Pour les premières analyses de l'extrait de cerveau (préparation Annexe 6.a) nous avons choisi d'utiliser parmi les systèmes les plus performants celui qui était le plus facile à mettre en œuvre, à savoir le système Supelcosil ABZ qui utilise une phase mobile en mode isocratique. La figure IV.2. montre l'analyse effectuée avec la colonne Supelcosil ABZ + Plus couplée au spectromètre Sciex API 300. Pour cette analyse plusieurs transitions ont été suivies pour chaque composé afin d'avoir une confirmation de l'identification effectuée à

partir de chaque transition principale. Parmi les 10 catécholamines qui donnent des réponses en ionisation positive, seules deux ont été détectées dans l'extrait de cerveau de mouton : Trp et Tyr. La détection de constituants de la matrice élués en début de chromatogramme (avant 3 min) et donnant un signal sur certaines des transitions suivies pour NA et DA, empêche une possible mise en évidence de la présence des 3 composés élués dans ce laps de temps (A, NA et DOPA).

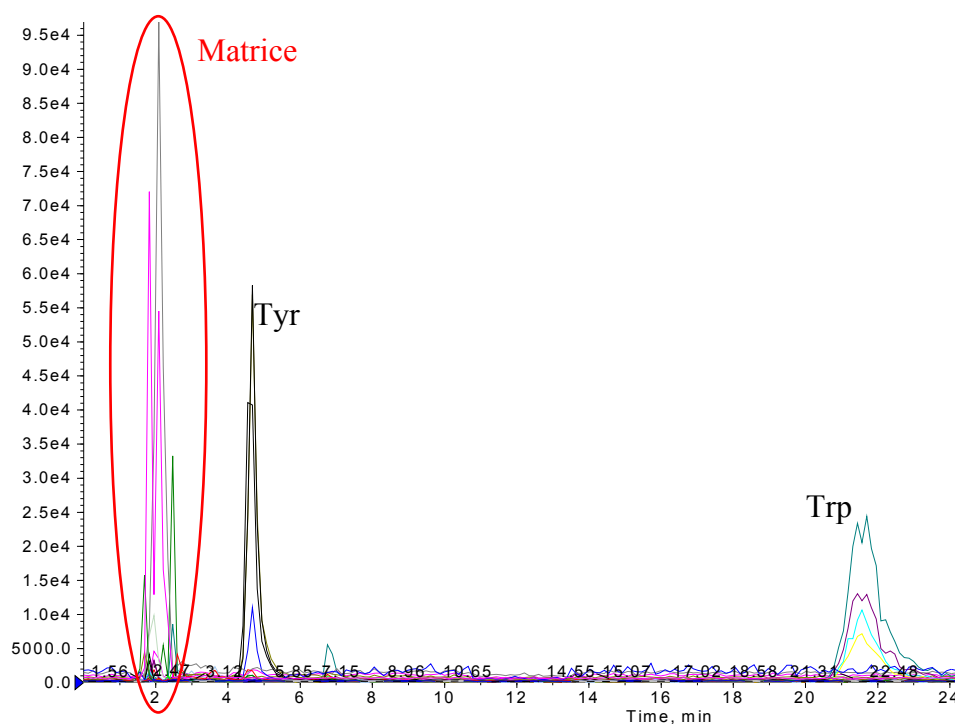


Figure IV.2. Superposition des courants extraits pour l'analyse isocratique de l'extrait de cerveau par LC en appariement d'ions -SM/SM

Colonne: Supelcosil ABZ + Plus (LxØ = 150 x 4,6 mm, 5 µm) ; Précolonne: Supelcosil ABZ + Plus (LxØ = 10 x 4,6 mm, 5 µm) ; Phase mobile: MeOH/NFPA pH= 2,9 (10/90 v/v) ; Détection : SM Sciex API 300. Extrait de cerveau: 20 mg de tissu pour 100 µL de HClO₄ 0.2 M. Solution injectée : 20 µL de l'extrait de cerveau dilué 1/1 avec NFPA 1,25 mM.

Dans ces conditions il est apparu intéressant de faire une analyse en gradient d'élution pour augmenter la rétention de NA, A et DOPA et ainsi les séparer des constituants de la matrice. La figure IV.3 montre que dans les conditions de gradient optimisé pour l'analyse d'un échantillon de cerveau, dopé avec le mélange des 10 catécholamines il est bien possible de distinguer les trois solutés (A, NA, DOPA) par rapport aux autres constituants de la matrice.

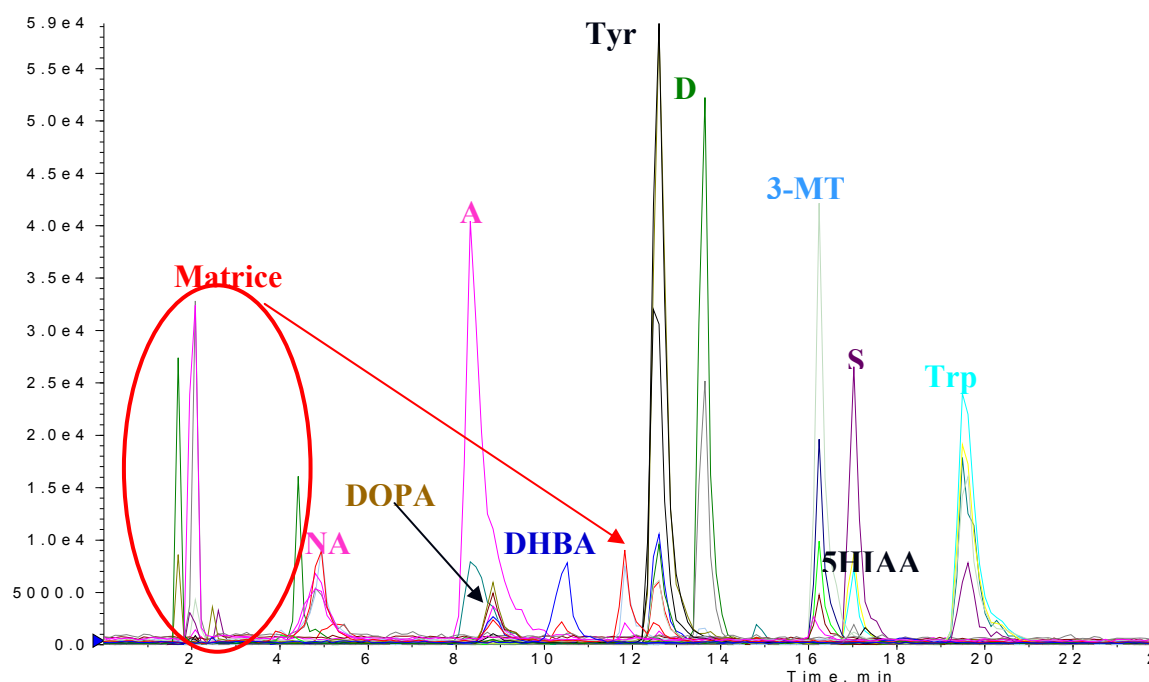


Figure IV.3. Analyse de l'extrait dopé de cerveau avec le mélange de 10 catécholamines par LC en appariement d'ions -SM/SM

Colonne: Supelcosil ABZ + Plus (LxØ = 150 x 4,6 mm, 5 µm) ; Précolonne: Supelcosil ABZ + Plus (LxØ = 10 x 4,6 mm, 5 µm) ; Phase mobile: MeOH/NFPA pH= 2,9, de 0 à 5 min 0% MeOH, de 5 à 10 min de 0 à 10 % MeOH, de 10 à 10,1 de 10 à 20% de MeOH, et de 10,1 à 20 min 20% MeOH; Détection : SM Sciex API 300. Extrait de cerveau: 20 mg de tissu pour 100 µL de HClO₄ 0.2 M. Solution injectée : 20 µL de l'extrait de cerveau dilué 1/1 avec NFPA 1,25 mM dopé à 10 µg.mL⁻¹.

L'analyse dans ces conditions de gradient de l'extrait de cerveau non-dopé révèle l'absence de NA, A et DOPA et confirme la seule détection possible de Tyr et Trp.

La figure IV.4. montre que même dans les conditions d'analyse les plus sensibles (avec le système Onyx – API 3000) les seuls solutés présents dans l'extrait de cerveau de mouton en quantités supérieures au LODs sont les deux acides aminés : Trp et la Tyr. On observe également qu'entre 1,5 et 3,5 min, des constituants de la matrice sont élués et donnent des signaux sur deux des transitions suivies pour NA (courbe rouge) et pour DA (courbe bleu clair). Leur potentielle présence dans l'échantillon n'affecterait cependant pas l'analyse de NA et DA puisque NA, soluté élué en premier, a un temps de rétention supérieur à 4,5 min.

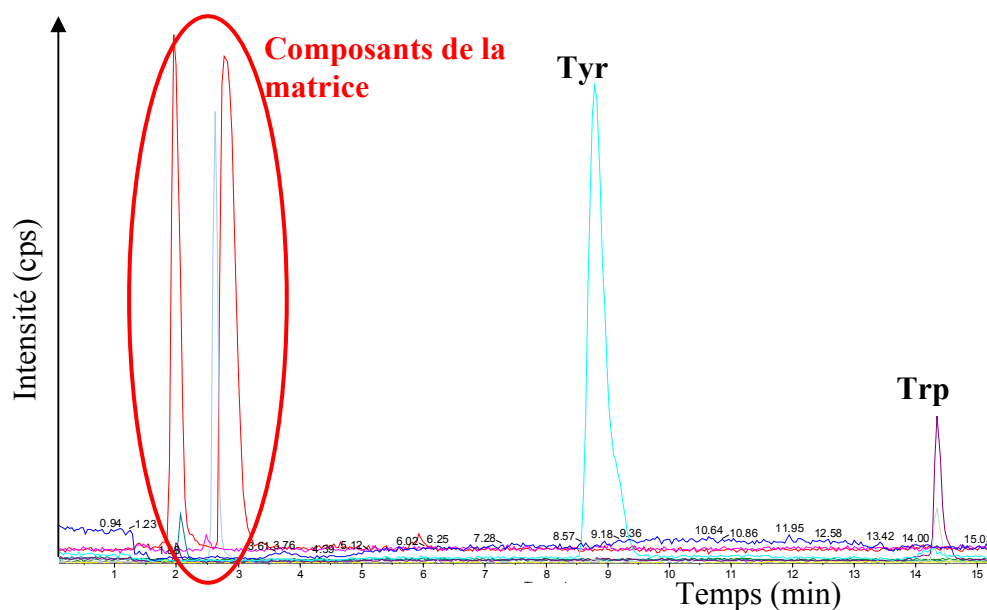


Figure IV.4. Superposition des courants extraits pour l'analyse de l'extrait de cerveau de mouton en CPL-SM/SM ionisation positive

Colonne : Onyx (LxØ = 100 x 4 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA 1,25 mM, pH 2,9, 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : Sciex API 3000. Extrait de cerveau: 20 mg de tissu pour 100 µL de HClO₄ 0,2 M. Solution injectée : 20 µL de l'extrait de cerveau dilué 1/1 avec NFPA 1,25 mM.

III.3. Evaluation des LODs dans l'extrait de cerveau

Les grandes spécificité et sensibilité de détection par spectrométrie de masse sont les raisons pour lesquelles des méthodes avec peu ou pas de préparation d'échantillon ont pu être mises au point pour l'analyse de différents composés dans des matrices complexes [4,5]. Cependant, les constituants endogènes de la matrice qui coéluent avec les composés d'intérêt peuvent influencer leur ionisation en causant soit une suppression, soit une exaltation de signal. Ceci a comme effet des différences de réponse pour des composés analysés en présence ou en absence de matrice [6]. En conséquence, la détermination des limites de détection en présence de matrice s'impose.

Pour déterminer ces LODs, des injections de matrice dopée avec le mélange des 10 catécholamines ont été effectuées selon le principe décrit pour cette même détermination dans la phase mobile (dilutions successives). Bien entendu la présence de Tyr et de Trp dans la matrice rend impossible la détermination de leurs LODs.

Tableau IV.7. Comparaison des LODs pour des mélanges préparés dans la phase mobile ou dans la matrice

Système Soluté	Supelcosil C18 (API 300)		Onyx C18 (API 3000)	
	LOD en phase mobile (ng.mL ⁻¹)	LOD dans la matrice (ng.mL ⁻¹)	LOD en phase mobile (ng.mL ⁻¹)	LOD dans la matrice (ng.mL ⁻¹)
DHBA	10	100	2	5
DA	10	50	1	1
3-MT	5	50	0,5	1
NA	5	25	10	50
S	5	-	1	1
A	1	25	2,5	5
5HIAA	100	100	5	7
DOPA	10	200	10	10

Comme on peut le voir dans le tableau IV.7, la présence de la matrice a comme effet une suppression de signal pour certains ions (valeurs marquées en rouge), ce qui se traduit par des valeurs plus élevées des LODs pour ces composés. Cet effet a été remarqué sur les deux appareils Sciex (API 300 et API 3000) et confirmé avec des systèmes chromatographiques différents (colonne conventionnelle Supelco ABZ C18 et colonne monolithique Onyx C18).

Les valeurs des limites de détection obtenues sont du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature pour l'analyse de certains de ces solutés en couplage CPL-SM/SM [4,7-10] dans différentes matrices biologiques et avec d'autres systèmes chromatographiques associés à la SM.

III.3. Analyse quantitative de catécholamines dans l'extrait de cerveau par couplage chromatographie d'appariement d'ions-SM/SM

Le dosage des 10 catécholamines, répondant en ionisation positive (A, NA, DA, DOPA, DHBA, S, Tyr, Trp, 3-MT et 5HIAA) a été réalisé sur le système le plus performant : colonne monolithique Onyx C18 couplée au spectromètre Sciex API 3000. Ce système est satisfaisant aussi bien du point de vue de la séparation de catécholamines (une seule coélution entre S et 3-MT) (Figure IV.5.) que de celui des valeurs de LODs obtenues.

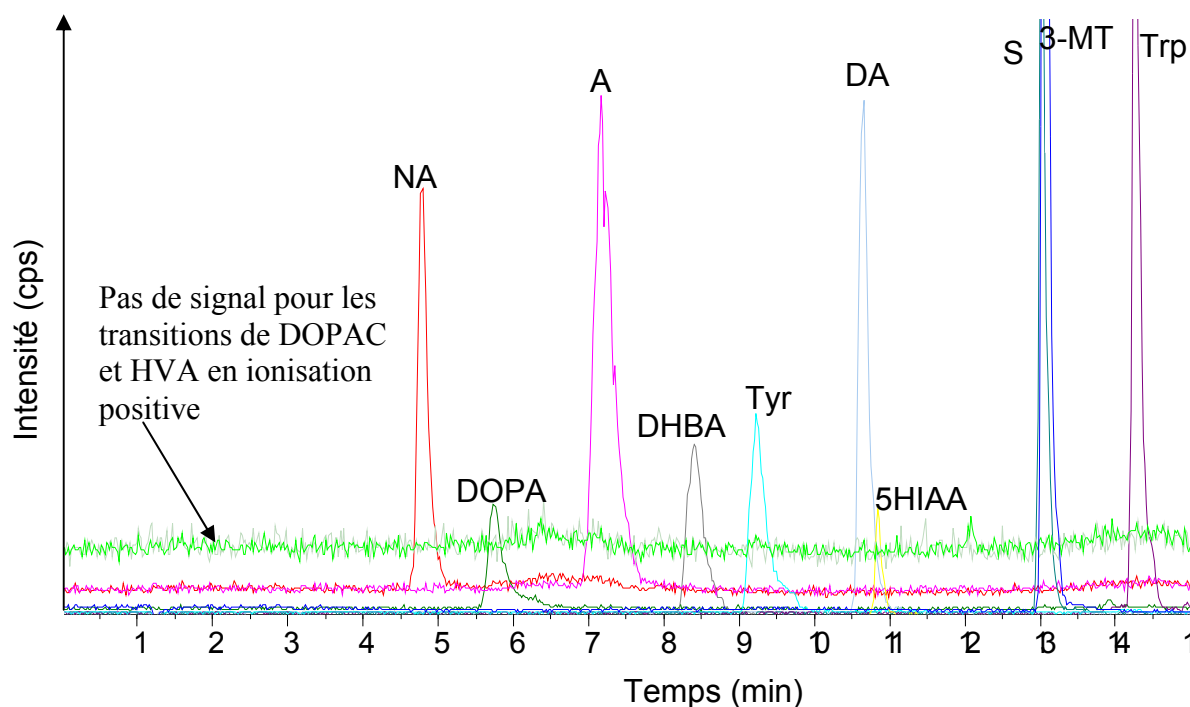


Figure IV.5. Superposition des courants extraits du mélange des catécholamines en ESI positif

Colonne : Onyx (LxØ = 100 x 4 mm) ; Phase mobile : MeOH/NFPA 1,25 mM, pH 2,9, en gradient : 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min ; Débit : 1 mL.min⁻¹ ; Détection : Sciex API 3000. Volume d'injection : 20 µL d'un mélange standard des 12 catécholamines à la concentration de 1 µg.mL⁻¹ chacune.

Le dosage a été réalisé par deux méthodes : celle de l'étalonnage externe et celle des ajouts dosés. Le but de ce travail est de pré-valider la méthode afin de doser ces composés dans d'autres échantillons que celui que nous avons analysé jusqu'à présent.

III.3.1. Méthode de l'étalonnage externe

Pour le dosage des catécholamines par la méthode de l'étalonnage externe nous avons réalisé des gammes d'étalonnage à partir de solutions standards préparées dans la phase mobile. Deux plages de concentrations ont été retenues en fonction des valeurs de LODs pour chaque composé : 10 - 35 ng.mL⁻¹ pour les solutés ayant les meilleures LODs (A, DA, 3-MT, S, 5HIAA) et 25 - 200 ng.mL⁻¹ pour DOPA et NA. Pour Trp et Tyr les gammes ont été choisies de sorte à encadrer leurs teneurs dans l'extrait de cerveau. Les gammes de concentration, les équations de régression linéaire et les coefficients de détermination (r^2) associés à chaque catécholamine dosée sont reportés dans le tableau IV.8. Comme on peut le constater, les valeurs de la majorité des coefficients de détermination sont supérieures à 0,99, démontrant ainsi une bonne linéarité de réponse entre les aires des pics chromatographiques et

la concentration des catécholamines. Pour les études de recouvrements nous avons préparé deux échantillons contrôle :

- un mélange des 10 catécholamines préparé dans la phase mobile aux concentrations théoriques suivantes : 15 ng.mL⁻¹ pour : A, DA, 5HIAA, S et 3-MT ; 100 ng.mL⁻¹ pour : NA, DHBA, Trp et DOPA et 1000 ng.mL⁻¹ pour : Tyr (valeurs en noir dans le tableau) ;
- un échantillon de cerveau de mouton dopé avec les 10 catécholamines (concentrations identiques à celles du mélange préparé dans la phase mobile) (valeurs en rouge dans le tableau).

Le taux de recouvrement pour un soluté donné est égal au rapport de la valeur de concentration recalculée à partir de l'équation de régression linéaire correspondante sur la valeur connue de concentration. Il est exprimé en pourcentage.

Tableau IV.8. Paramètres des droites d'étalonnage préparées dans la phase mobile

Soluté	Gamme d'étalonnage (ng.mL ⁻¹)	Equation de régression linéaire	r ²	Recouvrement (%)	CV* (%)
DA	10 – 30	y = 780x + 2880	0,9894	102±6	4,0
				127±11	6,8
3-MT	10 – 35	y = 2415,5x - 6047,7	0,9996	96±2	2,5
				106±4	3,5
NA	25 – 200	y = 963,9x + 11490	0,9850	96±10	8,2
				44±4	7,1
S	10 – 30	y = 1833,3x - 6411,6	0,9977	90±1	1,7
				107±6	5,9
A	10 – 35	y = 3401,4x - 6090,7	0,9840	90±7	7,9
				115±2	2,2
5HIAA	15 – 35	y = 188,6x + 259	0,9920	97±7	5,8
				96±13	10,8
DOPA	25 – 200	y = 451,07x + 2313,3	0,9954	95±15	12,6
				95±8	6,8
TRP	25 – 200	y = 1830,6x + 22409	0,9992	95±6	2,9
TYR	250 – 2000	y = 737,33x - 1533,3	0,9994	105±2	2,0

* les CV ont été calculés pour n = 3 analyses de la même solution

La fiabilité de la méthode est mise en évidence par les bonnes valeurs de recouvrement pour les échantillons contrôle préparés dans la phase mobile (entre 90 et 105 %). Néanmoins les valeurs des coefficients de variation pour ces valeurs sont relativement importants, ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons utilisé pour nos calculs les valeurs absolues des aires de pic et non pas les valeurs corrigées par l'aire de l'étalonne interne. En effet, il est bien

connu que le signal en spectrométrie de masse à source electrospray tend à décroître ou à s'accroître avec le temps suivant les situations. Cette variation de signal met en évidence le problème de la justesse et de la fidélité des analyses quantitatives. L'utilisation d'un composé jouant le rôle d'étalon interne est indispensable pour compenser l'instabilité du signal au cours du temps. Malheureusement l'étalon classiquement utilisé pour le dosage des catécholamines (DHBA) et que nous avons utilisé pour établir ces droites d'étalonnage n'a pas bien compensé ces différences de signal voire a entraîné des résultats incohérents, c'est pourquoi nous avons préféré utiliser les valeurs absolues des aires pour cette première étude, tout en sachant que pour valider la méthode il faudra sélectionner un autre étalon interne plus approprié.

Les différences importantes constatées entre les valeurs de recouvrement calculées pour l'échantillon de cerveau dopé et celles obtenues pour le mélange préparé dans la phase mobile, pour un nombre important de composés (NA, A, DA et S) mettent en évidence, encore une fois, l'important effet matrice que ces composés subissent. Dans ces conditions, il est évident que le dosage de ces solutés ne pourra pas être réalisé en utilisant des droites d'étalonnage préparées dans la phase mobile. En revanche, pour 5HIAA et DOPA, des valeurs de recouvrement similaires sont observées. On peut, donc, envisager pour ces deux composés un dosage à partir des droites d'étalonnage préparées dans la phase mobile.

Nous avons utilisé les droites d'étalonnage externe de Trp et Tyr pour quantifier ces deux acides aminés dans l'extrait non dopé. Les valeurs obtenues rapportées à un gramme de cerveau sont de $0,56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le Trp et de $13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la Tyr. Par la suite nous avons réalisé un dosage de ces deux solutés par la méthode des ajouts dosés pour vérifier l'exactitude de ces résultats.

III.3.2. Méthode des ajouts dosés

La méthode des ajouts dosés a été appliquée à la détermination de Tyr et de Trp qui sont les deux seuls composés détectés dans ces conditions dans l'extrait de cerveau de mouton. Cette méthode de dosage est réalisée par l'ajout de quantités connues de Tyr et Trp directement dans l'échantillon à analyser ce qui permet de prendre en compte l'effet matrice. Les résultats obtenus doivent être **plus (précis) juste** que ceux obtenus par l'étalonnage externe.

Trois ajouts de 50, 100 et 150 % de la valeur estimée par la méthode de l'étalonnage externe pour Tyr et Trp ont été réalisés pour tracer la droite des ajouts dosés. La figure IV.6

présente les droites obtenues pour les deux composés ainsi que leurs équations et leurs coefficients de détermination (R^2). On peut constater qu'une excellente valeur de R^2 a été obtenue pour la Tyr (0,9995), tandis que pour le Trp la valeur est moins bonne (0,9774).

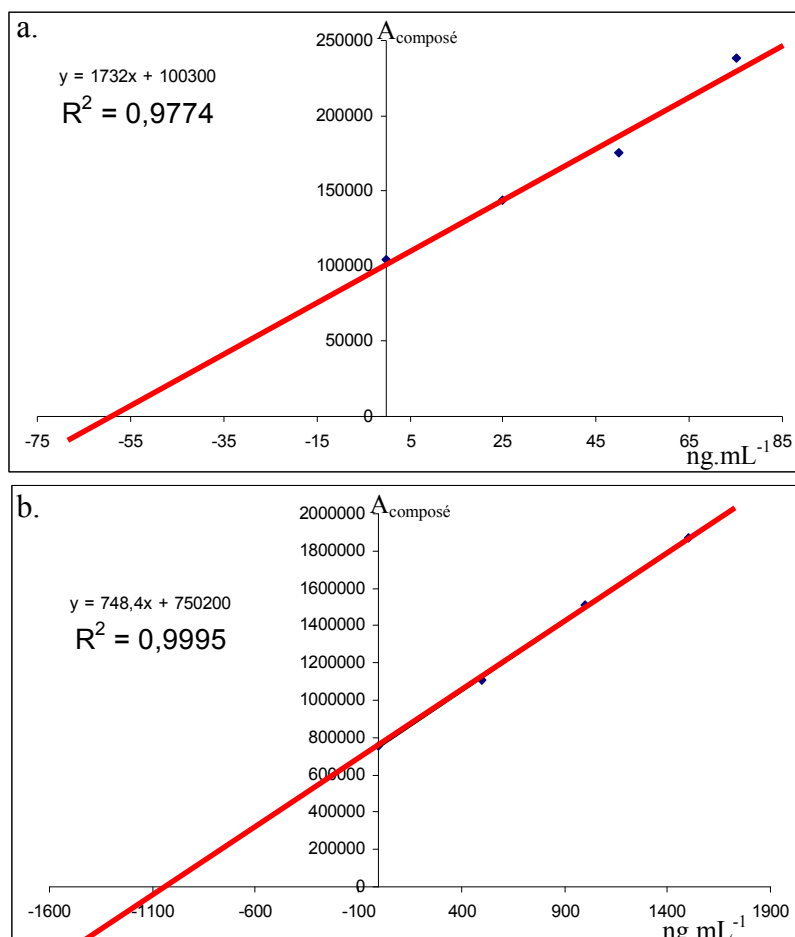


Figure IV.6. Dosage de Trp (a) et Tyr (b) de cerveau de mouton par ajout dosés

Par cette méthode nous avons pu établir que les teneurs des deux acides aminés dans le cerveau de mouton sont respectivement de $0,58 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Trp et de $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la Tyr. Si pour le Trp la valeur de la concentration calculée par cette méthode est très proche de celle obtenue à partir de la droite d'étalonnage externe réalisée dans la phase mobile, pour la Tyr des différences plus importantes sont observées. On peut donc conclure que l'effet matrice est plus important vis-à-vis de la Tyr. Pour son dosage **précis** il sera préférable d'utiliser la méthode des ajouts dosés.

Les teneurs que nous avons déterminées pour Tyr et Trp sont, par ailleurs, du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature [4] pour le dosage de Tyr dans le cerveau de porc (tableau I.1 du Chapitre I).

III.4. Bilan de l'analyse de catecholamines en chromatographie d'appariement d'ions en couplage avec la spectrométrie de masse

Parmi les systèmes en appariement d'ions testés nous avons vu que les meilleurs résultats du point de vue des LODs sont obtenus pour le couplage de la colonne monolithique avec le spectromètre Sciex API 3000. En conséquence nous avons utilisé ce système pour le dosage des catécholamines dans l'extrait de cerveau.

Nous avons pu réaliser le dosage des deux acides aminés (Tyr et Trp) présents dans la matrice par étalonnage externe et par ajouts dosés. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont concordants et comparables aux valeurs données dans la littérature pour les traces de ces mêmes solutés dans le cerveau d'autres mammifères.

Lors de ces analyses nous avons observé un important effet matrice qui se manifeste principalement par un effet de suppression d'ions. Dans ces conditions il paraît évident qu'une méthode de préparation d'échantillon permettant une purification et/ou une préconcentration de l'échantillon doit être développée pour gagner en exactitude de dosage.

L'inconvénient majeur de l'analyse de catécholamines par chromatographie d'appariement d'ions vient de son incompatibilité avec le mode d'ionisation négative en SM, du fait de la présence de l'agent d'appariement d'ions acide (NFPA) dans la phase mobile. Cette incompatibilité rend impossible la détection des deux solutés acides (HVA et DOPAC) qui répondent mieux en ionisation négative.

IV. Couplage des systèmes en mode HILIC avec la SM

Un avantage du mode HILIC vient de sa grande compatibilité avec une détection par spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray du fait de la proportion importante de solvant organique dans la phase mobile hydro-organique utilisée [11].

Avant de coupler à la spectrométrie de masse, les systèmes HILIC optimisés précédemment et répertoriés dans le Tableau IV.9, nous avons réalisé une étude sur l'influence des différents paramètres chromatographiques (nature et pourcentage de modificateur organique, nature et concentration en sel, pH) sur l'intensité du signal en SM.

Tableau IV.9. Description des systèmes HILIC couplés à la SM

Colonne	Phase mobile	Appareil SM :	
		Micromass Quatro Ultima	Sciex API 3000
TSK gel Amide 80	ACN/CH ₃ COONH ₄ 20 mM (80/20 v/v), pH 3.	oui	oui
Luna Diol	ACN/HCOONH ₄ 100 mM (90/10 v/v), pH 3.	oui	oui
Pursuit Si	ACN/HCOONH ₄ 150 mM (85/15 v/v), pH 3.	non	oui

Nous avons ensuite déterminé les LODs des systèmes optimisés sur deux appareils et avons réalisé le dosage :

- des 9 catécholamines (DA, DOPA, A, NA, 3-MT, S, Trp, Tyr et 5 HIAA) par la méthode de l'étalonnage externe : couplage TSK gel Amide – Micromass ;
- du Trp et de la Tyr par la méthode des ajouts dosés : couplage Pursuit Si – Sciex API 3000.

IV.1. Influence de la composition de la phase mobile HILIC sur l'ionisation des solutés

Compte tenu du peu d'informations disponibles dans la littérature au sujet du couplage de la chromatographie en mode HILIC à la spectrométrie de masse, nous avons évalué l'influence de la composition de la phase mobile (pourcentage et nature du modificateur organique, nature et concentration en sel, pH) sur l'intensité du signal massique. Tous les tests ont été réalisés en mode FIA (flow injection analysis – sans colonne), les solutions injectées contiennent les 12 catécholamines à une concentration de 5 ng.mL⁻¹ dans la phase mobile.

IV.1.1. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique

L'influence sur l'intensité du signal en SM de 4 solvants organiques différents (MeOH, EtOH, ACN et acétone) en mélange avec de l'eau en proportions (70/30 v/v) a été évaluée dans un premier temps (figure IV.7). Les meilleures conditions d'ionisation sont obtenues avec le MeOH comme modificateur organique, à l'exception de DA et 3-MT pour lesquels des intensités plus importantes sont notées en présence d'ACN. Les intensités les plus faibles sont obtenues en présence d'acétone comme modificateur organique.

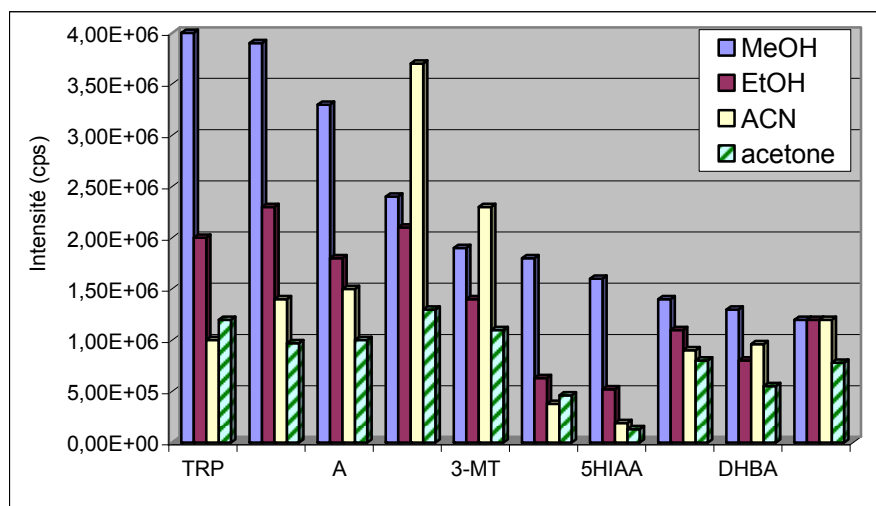


Figure IV.7. Influence de la nature du modificateur organique dans la phase mobile sur l'intensité du signal en SM

Analyses en FIA. Débit : $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Phase mobile: ACN ou MeOH ou EtOH ou Acétone / H_2O (70/30 v/v).

Même si du point de vue de l'intensité du signal massique, le MeOH donne les meilleurs résultats, les séparations chromatographiques des catécholamines obtenues en mode HILIC avec le MeOH dans la phase mobile sont insuffisantes quelque soit la phase stationnaire polaire utilisée (Chapitre III. paragraphe : *III.2. Influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique*), c'est l'ACN qui a été néanmoins retenu comme solvant organique dans la phase mobile pour la suite de notre étude en couplage HILIC-SM/SM.

Pour les tests concernant l'influence du pourcentage de solvant organique, la phase mobile a été composée d'eau et d'ACN, avec un pourcentage d'ACN variant entre 50 et 90%. En général l'augmentation du pourcentage d'ACN a comme effet une diminution de l'intensité du signal massique des catécholamines (figure IV.8). Cet effet est plus marqué pour certains solutés tels que 3-MT et DA. Ces résultats sont en conformité avec ceux présentés par Gu *et al.* [12] pour certains solutés de cette famille. Le 5HIAA présente la particularité d'avoir une intensité de signal qui tend plutôt à augmenter avec le pourcentage d'ACN.

Entre deux systèmes HILIC offrant une séparation satisfaisante d'un même mélange, il sera donc préférable de coupler à la SM le système utilisant le plus faible pourcentage d'ACN en phase mobile, pour avoir une intensité de signal plus élevée en SM.

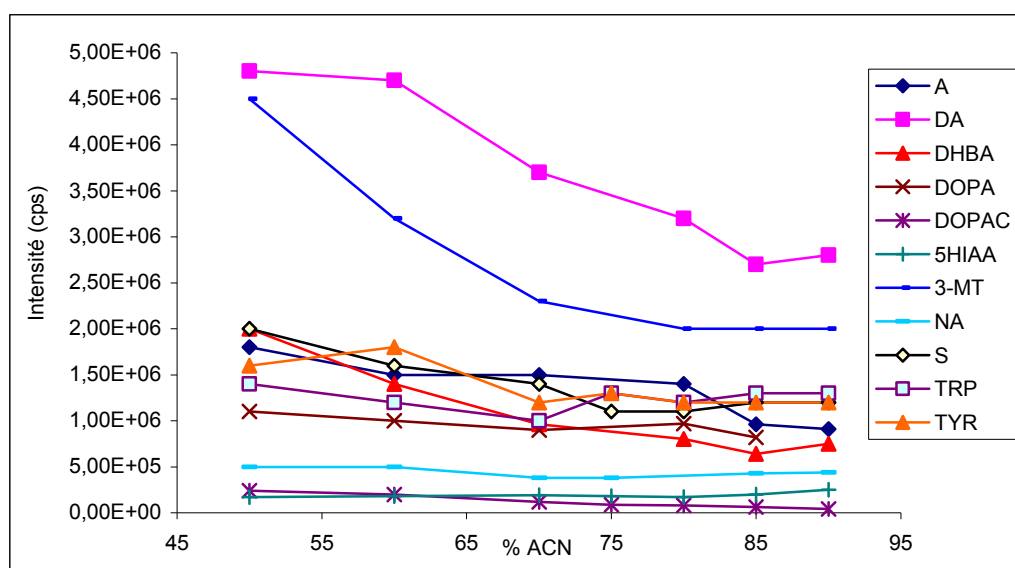


Figure IV.8. Influence du pourcentage d'ACN dans la phase mobile sur l'intensité de la réponse SM

Analyses en FIA. Débit : 1 mL.min⁻¹, split 1/3 ; Phase mobile : ACN/H₂O (X/(100-X) v/v) ;

IV.1.2. Influence de la nature et de la concentration en sel

En ce qui concerne la nature du sel, seuls le formiate et l'acétate d'ammonium ont été testés pour des raisons de volatilité et solubilité dans les phases mobiles riches en ACN. Nous n'avons pas remarqué de différences notables pour les rendements d'ionisation entre ces deux sels. Comme la plupart du temps nos phases mobiles optimisées en mode HILIC contiennent du formiate d'ammonium, c'est ce sel qui a été retenu pour la suite de ce travail.

L'influence de la concentration en sel a été testée en utilisant une phase mobile composée de 70 % d'ACN et 30% d'une solution aqueuse de formiate d'ammonium à pH 3, en concentration variant entre 10 et 150 mM (correspondant à une variation de concentration globale en sel dans la phase mobile comprise entre environ 3 et 45 mM). La figure IV.9. montre qu'une diminution de l'intensité du signal SM est enregistrée avec l'augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile. Cette diminution est plus importante entre 10 et 40 mM, et beaucoup moins au delà de cette valeur (40 - 150 mM). Dans ces conditions, les systèmes HILIC qui ne nécessitent pas de fortes concentrations de sel dans la phase mobile pour la résolution de la séparation devraient être plus sensibles. Pour les systèmes HILIC qui ont besoin de concentrations importantes en sel (100 à 150 mM, voir chapitre III) il vaut mieux privilégier l'obtention de la meilleure efficacité de pic plutôt que de diminuer la concentration en sel dans l'optique d'avoir un meilleur rapport signal / bruit.

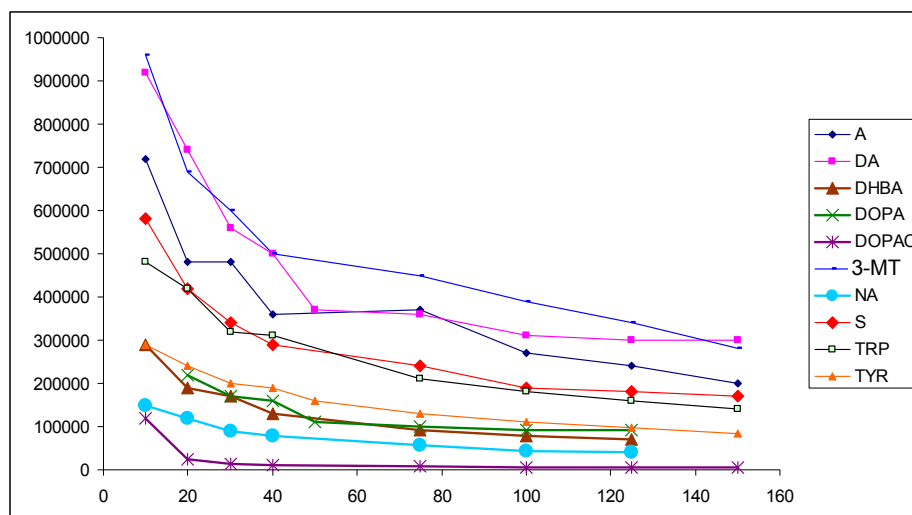


Figure IV.9. Influence de la concentration en sel dans la phase mobile sur l'intensité de la réponse SM

Analyses en FIA. Débit : $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, Phase mobile: ACN/HCOONH₄ 10 à 150 mM, pH 3 (70/30 v/v),

IV.1.3. Influence du pH

Pour les tests de l'influence du pH de la phase mobile sur l'intensité du signal SM nous avons utilisé une phase mobile composée d'ACN et de solution aqueuse de formiate d'ammonium à 50 mM (70/30 v/v). Comme on peut le voir sur la figure IV.10. une très faible augmentation de l'intensité du signal avec le pH (variant entre 3 et 6,5) est remarquée pour tous les solutés (excepté A). L'effet du pH sur l'intensité du signal SM des catécholamines est donc moins important que celui du pourcentage de modificateur organique ou de la concentration en sel.

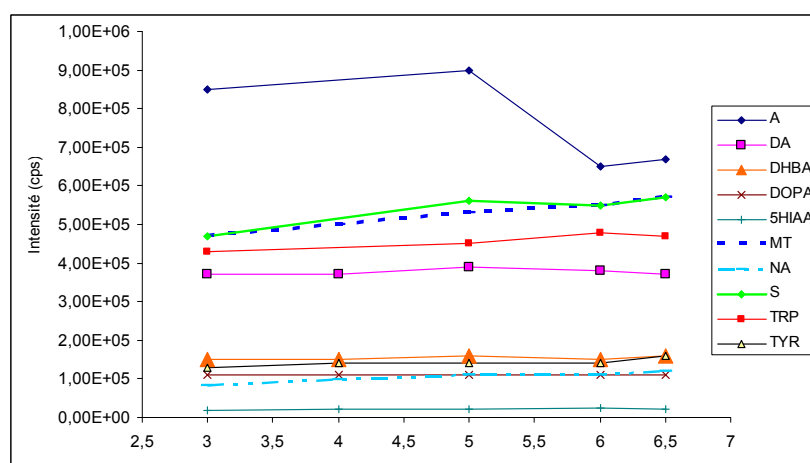


Figure IV.10. Influence du pH de la phase mobile sur l'intensité de la réponse SM

Analyses en FIA. Débit : $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Phase mobile: ACN/HCOONH₄ 50 mM, pH 3 (70/30 v/v).

IV.1.4. Analyse des données par ACP

Pour avoir une vue plus synthétique de l'ensemble des effets de tous les paramétrés de la phase mobile l'intensité du signal massique des catécholamines nous avons réalisé des analyses en composante principale.

Nous avons réalisé une première ACP en combinant la totalité les données concernant l'intensité des signaux SM pour les 12 catécholamines en fonction de la composition de la phase mobile (les valeurs ont été centrées et réduites) (Figure IV.11). Les deux axes principaux PC1 et PC2 couvrent ensemble environ 88% de la variance et peuvent donc être considérés comme une représentation assez complète de l'ensemble des résultats. On peut ainsi, s'appuyer uniquement sur ces figures pour les interprétations, sans perdre trop d'information. Le pourcentage de variance associée à l'axe PC1 (axe des abscisses) étant très élevé (72%), on s'attachera essentiellement aux différences sur cet axe pour l'interprétation. L'information manquante, présente sur les axes suivants (non représentés) est essentiellement portée par le DOPAC. On voit en effet, sur la Figure IV.11 b que c'est le seul point éloigné de la périphérie du cercle. On voit que la nature du solvant favorise l'ionisation de certaines espèces au détriment d'autres : le MeOH donne généralement les meilleures intensités, sauf pour certains composés (DA, 3-MT) pour lesquels l'ACN donne des résultats meilleurs. C'est ce qui explique que les points MeOH et ACN soient répartis de part et d'autre de l'axe des abscisses, selon la position des variables constituées par les composés.

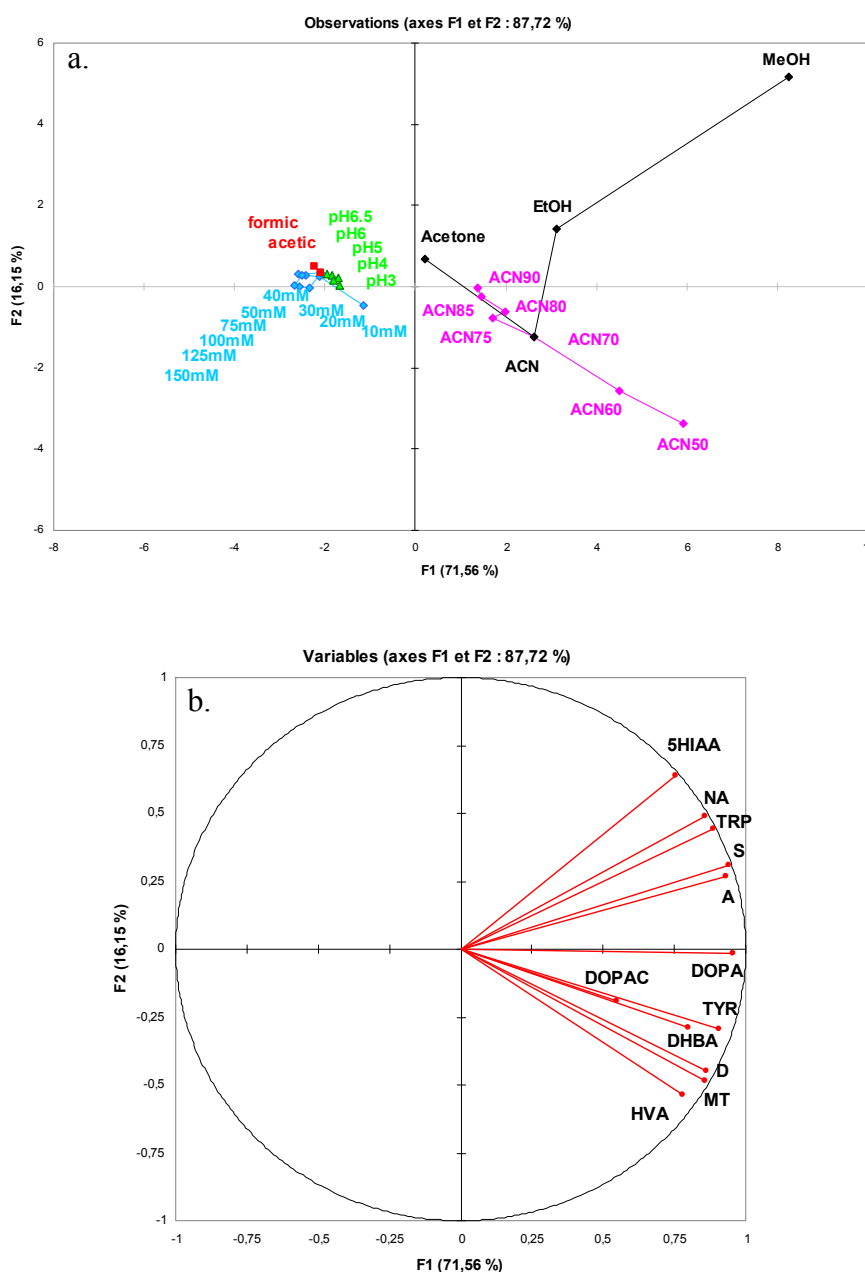
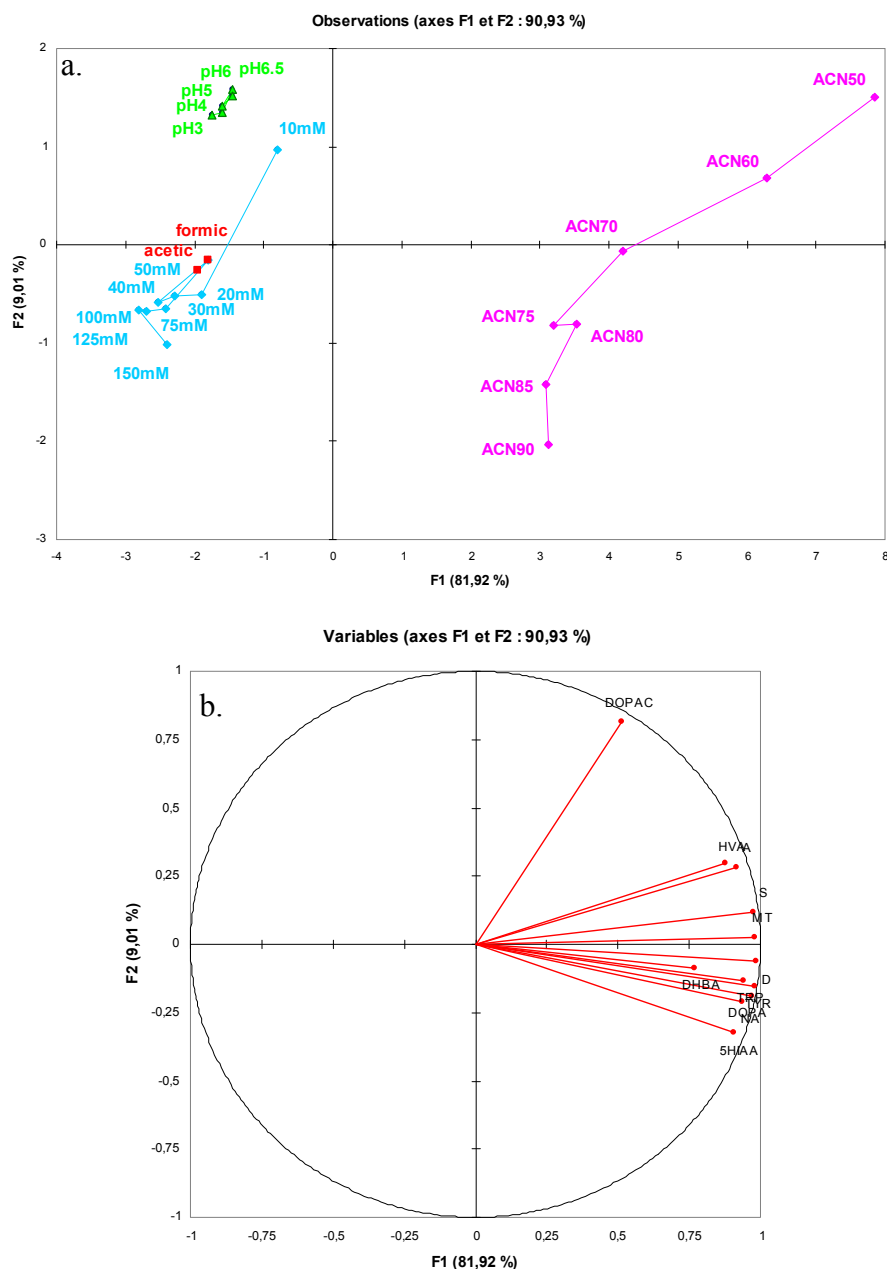


Figure IV.11: ACP réalisée sur toutes les mesures d'intensité du signal en MS effectuées dans les différentes conditions. (a) graphique d'observations (b) graphique de variables

En tenant compte du fait qu'à l'exception de l'étude de l'influence de la nature du modificateur organique, tous les autres points ont été réalisés avec l'ACN comme co-solvant, nous avons calculés une deuxième ACP excluant les points obtenus avec les solvants : MeOH, EtOH et Acétone (Figure IV.12).



**Figure IV.12. ACP réalisée sur toutes les mesures du signal en MS effectuées dans les différentes conditions avec l'ACN
 (a) graphique d'observations (b) graphique de variables**

Comme pour la première ACP, le pourcentage de variance associé au graphique est élevé (91%), avec un important pourcentage de variance (82%) associé à l'axe PC1 (axe des abscisses). On peut voir que DOPAC a, encore une fois, un comportement légèrement différent de celui des autres composés puisque la droite reliant le centre du graphe à ce point (figure IV.12. b) forme un angle significatif avec les autres, qui reste d'importance limitée, si on tient compte du fait que le pourcentage de variance associé à l'axe des ordonnées n'est que de 9%.

Si on classe les différents paramètres en fonction de l'importance de leur effet sur l'ionisation, on peut dire sans ambiguïté que le pourcentage de solvant organique est le facteur qui a le plus d'influence, suivi ensuite par la concentration en sel (bien que sa variation ne provoque d'effet significatif que dans les faibles valeurs, entre 0 et 30 mM). Enfin, la nature du sel et le pH n'ont que très peu d'influence.

Pour préciser un peu plus l'importance des effets, nous avons réalisé une troisième ACP, qui inclut les valeurs centrées et réduites pour la concentration de sel, le pH et le pourcentage d'ACN (Figure IV.13).

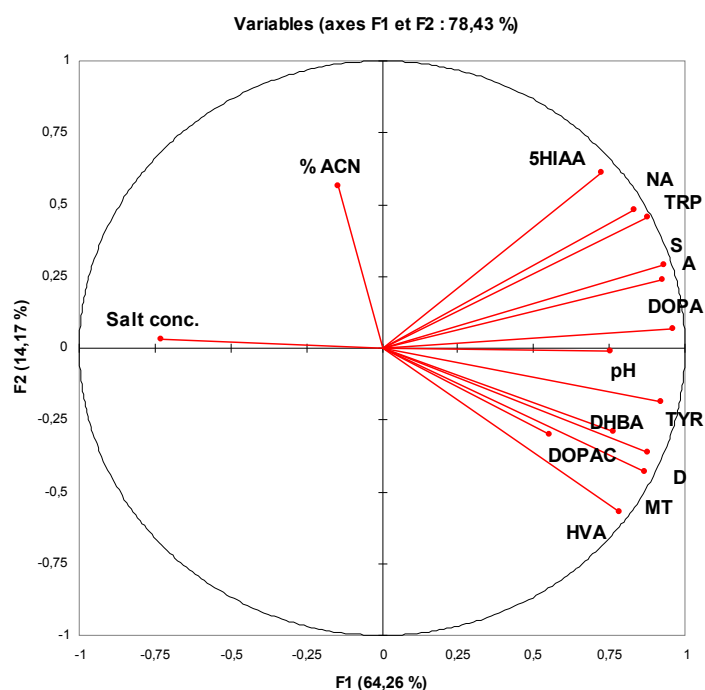


Figure IV.13. ACP réalisée sur toutes les mesures du signal en MS effectuées dans les différentes conditions (graphique de variables)

On voit clairement que :

- l'augmentation de pH favorise l'ionisation puisque la droite qui relie le point pH ne forme pas d'angle avec le plan formé par les variables-composées ;
- l'augmentation de la concentration de sel défavorise l'ionisation puisque la droite qui relie le point « concentration en sel » est positionnée à 180° des variables-composées ;
- l'augmentation du pourcentage d'ACN a des effets beaucoup moins nets : le fait que ce point soit positionné à 90° des variables-composées indique que son effet sur l'ionisation ne peut pas être généralisé à tous les composés. Ce fait est en cohérence avec les courbes présentées antérieurement (figure IV.8).

L'augmentation du pourcentage d'ACN provoque un recul de l'ionisation pour certains composés (ceux qui se trouvent plutôt en-dessous de l'axe des abscisses en opposition avec la variable %ACN) mais favorise l'ionisation des autres composés comme NA et 5HIAA (plutôt ceux qui se trouvent au-dessus de l'axe des abscisses, en corrélation positive avec %ACN).

Les conclusions de l'ACP sont en total accord avec toutes les observations que nous avons pu faire lors de l'étude de l'influence de la composition de la phase mobile sur l'ionisation et nous ont permis de mieux cerner l'effet du pH.

IV.1.5. Conclusions

L'étude de l'influence des différents paramètres chromatographiques sur l'intensité du signal en SM nous a montré que les meilleures conditions d'ionisation en SM pour les catécholamines, seront obtenues avec des phases mobiles contenant de faibles concentrations en sel, le MeOH comme modificateur organique et un pH supérieur à 6. En revanche, nous avons vu dans le chapitre précédent que ces conditions de phase mobile ne sont pas les plus favorables du point de vue de la séparation chromatographique. Dans ces conditions un compromis doit être trouvé entre les conditions optimales pour la séparation et celles pour l'intensité du signal SM.

Pour la suite des analyses en couplage nous avons préféré privilégier les conditions chromatographiques offrant la séparation optimale pour les 12 catécholamines de notre mélange standard au détriment de l'ionisation en gardant en mémoire que l'objectif final de notre travail reste de proposer un système d'analyse compatible avec une double détection SM/électrochimie.

IV.2. Evaluation des LODs des systèmes HILIC

Comme nous l'avons dit précédemment les conditions de phase mobile HILIC conduisent à la même fragmentation que les conditions de phase mobile en chromatographie d'appariement d'ions. En mode HILIC comme en appariement d'ions on retrouve que les intensités relatives des fragments pour certains composés (A, 3-MT, S, DA et DOPA) sont différentes selon le type de source. Les transitions sélectionnées pour l'étude des LODs en mode HILIC sont celles du tableau IV.4 pour l'appareil Micromass et du tableau IV.3 pour l'appareil Sciex API 3000.

Pour déterminer les LOD des systèmes en mode HILIC couplés à la SM tandem, la même approche que celle utilisée en chromatographie d'appariement d'ions a été mise en œuvre (paragraphe III.1.). Seuls les deux spectromètres de masse : Micromass Quatro Ultima et Sciex API 3000 ont été couplés. Pour des questions d'organisation du laboratoire, les premières manipulations exploratoires ont été réalisées sur l'appareil Micromass (LODs et dosage) et après l'acquisition de l'appareil Sciex API 3000 les méthodes ont ensuite été transposées pour gain de sensibilité, sur cet appareil.

IV.2.1. LODs dans la phase mobile

Le tableau IV.10 présente les LODs obtenues pour des mélanges standards préparés dans chacune des phases mobiles optimisées pour les trois systèmes chromatographiques HILIC testées en couplage Tableau IV.9.

Tableau IV.10. LODs dans la phase mobile des 12 catécholamines pour différents systèmes HILIC-SM/SM

Système Soluté	TSK gel Amide 80 (ng.mL ⁻¹)		Luna diol (ng.mL ⁻¹)		Pursuit SI (ng.mL ⁻¹)	Mode d'ionisation
	Micromass Quatro Ultima	Sciex API 3000	Micromass Quatro Ultima	Sciex API 3000	Sciex API 3000	
DHBA	50	10	30	5	1	ESI +
DA	10	10	30	5	1	ESI +
3-MT	1	2,5	0,5	1	1	ESI +
DOPAC	>5000	500	500	1000	>1000	ESI -
NA	10	10	40	10	5	ESI +
S	2,5	2,5	10	1	0,5	ESI +
TYR	10	5	50	7,5	10	ESI +
HVA	>5000	500	1000	1000	1000	ESI -
A	10	7,5	10	2,5	0,5	ESI +
5HIAA	5	25	100	30	20	ESI +
DOPA	100	30	500	50	50	ESI +
TRP	2,5	2,5	10	5	1	ESI +

Le mode HILIC nous permet la détection simultanée des 12 solutés du mélange grâce à sa compatibilité avec les deux modes d'ionisation positif et négatif. Les deux solutés DOPAC et HVA qui ne s'ionisent qu'en mode négatif sont détectés mais avec les moins bonnes LODs (de l'ordre du µg.mL⁻¹) tandis que les solutés détectés en positif ont des LODs

de l'ordre de la dizaine de ng.mL^{-1} (environ cent fois plus sensible). Quelque soit le système utilisé la détection de 3-MT est la plus sensible.

Les premières manipulations réalisées en couplage avec le Micromass mettent en évidence que le système Luna Diol est moins performant que le système TSK gel en ce qui concerne les LODs ($1 - 10 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour le système TSK gel et $10 - 50 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour le système Luna Diol). Cela est en accord avec les conclusions faites lors de l'étude de l'influence de la composition de la phase mobile sur l'ionisation des solutés en SM, puisque le système Luna Diol utilise une composition de phase mobile plus riche en sel que le système TSK gel.

Comme dans le cas de la chromatographie d'appariement d'ions, nous avons confirmé que pour la majorité des solutés la meilleure sensibilité est obtenue en couplage avec le Sciex API 3000.

IV.2.2. LODs dans la matrice

Les LODs ont été évaluées en dopant la matrice selon le protocole décrit en Annexe 6, les résultats sont résumés dans le tableau IV.11.

Tableau IV.11. LODs (ng.mL^{-1}) obtenus pour les 10 catécholamines en couplage avec l'API 3000 et le Micromass Quatro Ultima

Système Soluté	Micromass Quatro Ultima				Sciex API 3000	
	TSK gel Amide		Luna Diol		PURSUIT SI	
	Phase mobile	Matrice	Phase mobile	Matrice	Phase mobile	Matrice
A	10	5	10	7	0,5	0,3
DA	10	200	30	-	1	5
DOPA	100	35	500	-	50	10
DHBA	50	200	30	25	1	1
5HIAA	5	0,5	100	50	20	40
3-MT	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5
NA	10	1	40	500	5	0,5
S	2,5	1	10	5	0,5	0,5
HVA	1000	200	1000	>1000	1000	-
DOPAC	500	250	500	500	>1000	-

Globalement, en mode HILIC, on constate un effet d'exaltation du signal plus ou moins intense lors de la détermination des valeurs de LODs dans la matrice. En revanche pour DA une extinction est observée sur tous les systèmes. Pour les autres composés des effets de

matrice plus ou moins marqués selon le système d'analyse ont été observés, les valeurs en rouge marquent l'exaltation du signal et celles en bleu les quelques extinctions.

Les valeurs de LODs dans la matrice confirment que parmi les systèmes couplés avec l'appareil Micromass, le système TSK gel est le plus approprié pour la détection de traces. C'est ce système qui a été retenu pour évaluer la linéarité de la méthode en couplage. Par ailleurs, le système Pursuit Si en couplage avec le spectromètre Sciex API 3000 est le système le plus prometteur pour une analyse plus sensible.

IV.3. Dosage des catécholamines par couplage HILIC-SM/SM

IV.3.1. Analyse d'un extrait de cerveau

Pour assurer la détection des 12 composés de notre mélange une méthode avec une alternance mode positif / mode négatif pour l'ionisation du soluté a été utilisée. La figure IV.14. montre les deux chromatogrammes correspondant à l'analyse d'un mélange standard des 12 catécholamines en ionisation positive et négative.

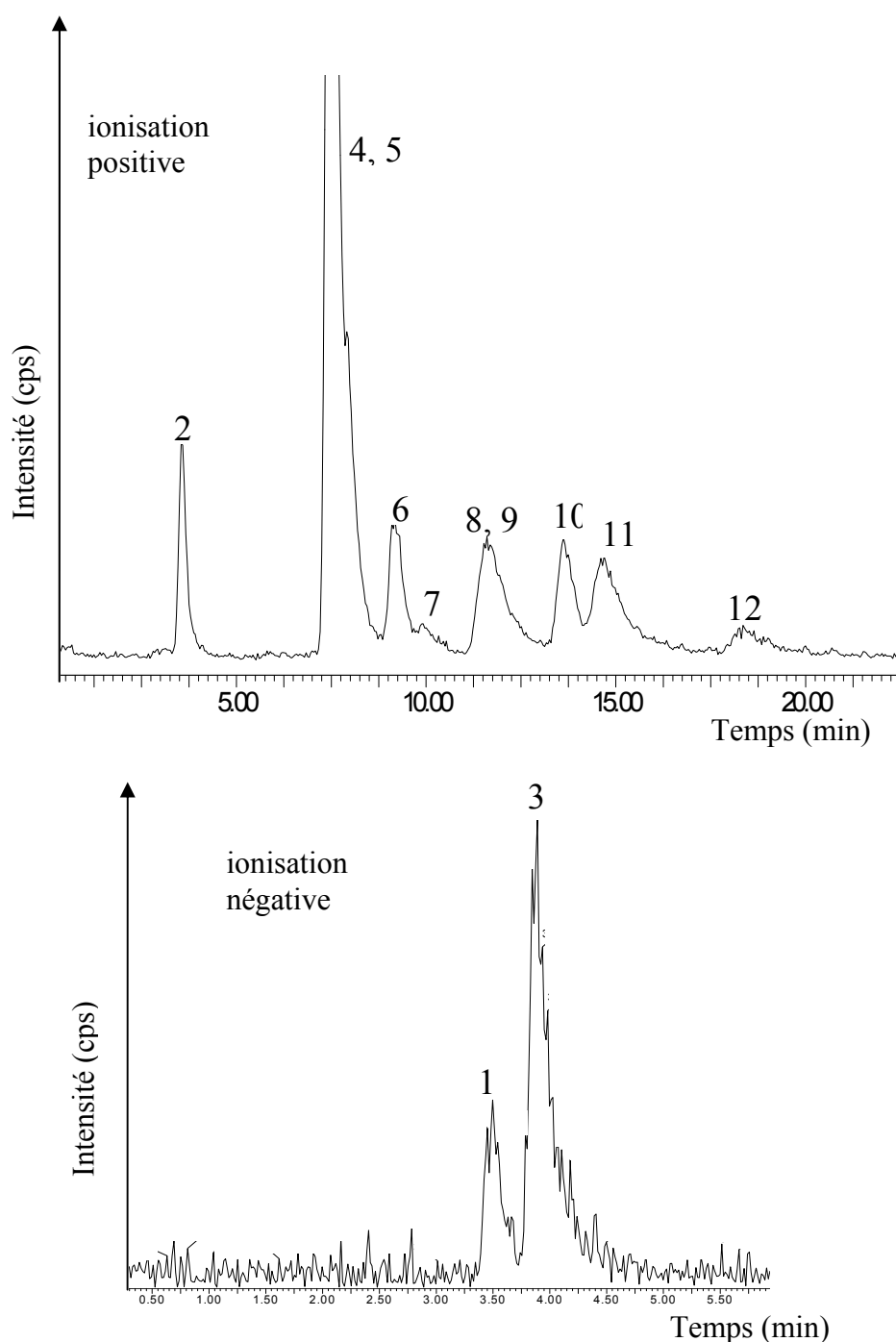


Figure IV.14. Courant ionique total (TIC) pour l'analyse d'un mélange standard de catécholamines préparé à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour chaque composé dans la phase mobile

Colonne : TSK gel Amide 80 ; Phase mobile : ACN/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 20 mM (80/20 v/v), pH 3 ;
Détection : SM/SM Micromass

Suivi de dix transitions en mode positif : 2. 5HIAA, 4. 3-MT, 5. S, 6. Trp, 7. DA, 8.A, 9. DHBA, 10. Tyr, 11. NA, 12. DOPA

Suivi de deux transitions en mode négatif : 1. HVA, 3. DOPAC

Pour l'identification des catécholamines présentes dans l'extrait de cerveau, la solution injectée correspond à la solution d'extrait diluée par un mélange eau+sel/ACN, afin

d'avoir une composition de solvant d'injection la plus proche possible de celle de la phase mobile (Annexe 6b) et ainsi ne pas affecter la séparation des catécholamines [13].

En couplage HILIC-SM/SM, comme en couplage chromatographie d'appariement d'ions-SM/SM, les seuls solutés identifiés dans l'extrait de cerveau sont le Trp et la Tyr (figure IV.15). Si l'on compare cette figure IV.15 à la figure IV.4 (page 223) l'intensité du signal SM des deux solutés détectés en HILIC-SM/SM apparait beaucoup plus faible que dans le système d'appariement d'ions-SM/SM, mais il faut tenir compte que pour l'analyse d'un même extrait de tissu, en mode HILIC, il est nécessaire de faire une dilution plus importante de l'échantillon (exigence du solvant d'injection). En mode HILIC on constate des pics détectés sur les transitions suivies pour DHBA et DA à des temps de rétention qui ne sont pas ceux attendus pour ces solutés, ceci met en évidence la présence d'autres composés polaires dans la matrice puisqu'ils présentent une rétention (5 min et 6,7 min) dans ces conditions chromatographiques. Les transitions pour lesquelles on observe des pics correspondant à des composés de la matrice ne sont pas les mêmes qu'en chromatographie d'appariement d'ions (NA et DA pour ce type de chromatographie).

Une fois encore cette analyse illustre la complémentarité de la chromatographie et de la spectrométrie de masse pour l'analyse de matrices complexes, les solutés étant identifiés par leur temps de rétention (CPL) et leur transition spécifique (SM/SM).

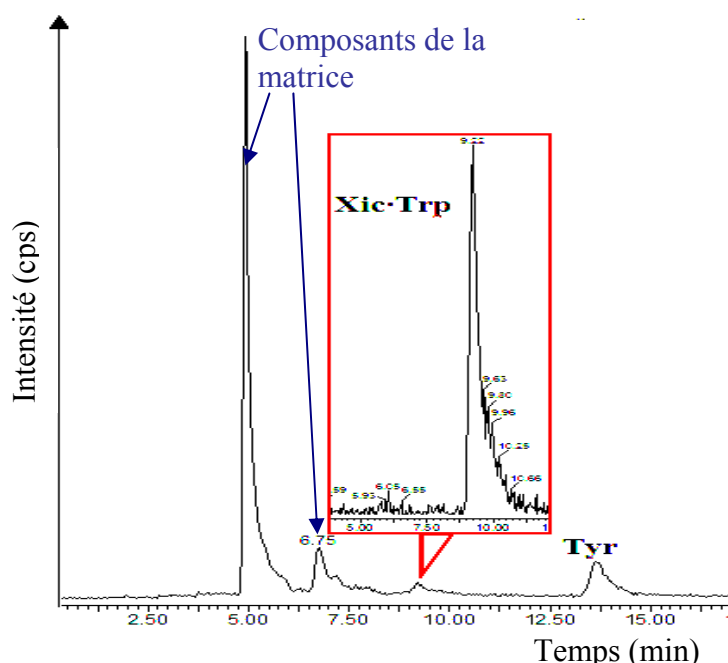


Figure IV.15. Courant ionique total (TIC) pour l'analyse d'extrait de cerveau

Colonne : TSK gel Amide 80 ; Phase mobile : ACN/CH₃COONH₄ 20 mM (80/20 v/v), pH 3 ;
Détection : SM/SM Micromass

Extrait de cerveau: 20 mg de tissu pour 100 μ L de HClO₄ 0.2 M. Solution injectée : 20 μ L de l'extrait de cerveau dilué 20/80 avec l'ACN.

IV.3.2. Méthode de l'étalonnage externe

Les solutions utilisées pour les droites d'étalonnage ont été préparées dans la phase mobile. Les droites d'étalonnage de 9 solutés sur les 10 qui s'ionisent en mode positive (DHBA sert d'étalon interne), ont été établies en reportant le rapport (aire du soluté / aire du DHBA) en fonction de la concentration correspondante de soluté, selon la méthode des moindres carrés. Les gammes de concentration pour chaque composé ainsi que les équations des droites et leurs coefficients de détermination sont reportés dans le tableau IV.12.

Table IV.12. Paramètres des droites d'étalonnage préparées dans la phase mobile

Soluté	Gamme d'étalonnage (ng.mL ⁻¹)	Equation de régression linéaire	r ²	Recouvrement (%)	CV (%)* (n=3)
DA	100 – 300	y = 0,0004x+0,01	0,9953	105±2	1,2
3-MT	10 – 100	y = 0,0254x+0,0942	0,9956	112±6	2,8
NA	50 – 200	y = 0,0114x+0,0818	0,9974	97±4	4,3
S	25 – 200	y = 0,0051x+0,1559	0,9979	103±5	5,3
TYR	50 – 250	y = 0,0022x+0,0222	0,9972	105±15	14,7
A	50 – 200	y = 0,0066x+0,1528	0,9969	99±4	4,5
5HIAA	50 – 200	y = 0,0042x+0,6044	0,9941	62±3	1,2
DOPA	300 – 800	y = 0,002x+0,0979	0,9758	103±6	1,1
TRP	25 – 200	y = 0,007x-0,0337	0,9830	96±6	5,5

* les CV ont été calculés pour 3 analyses d'une même solution contrôle (n = 3)

La majorité des coefficients de détermination (r²) est supérieure à 0,99 (à l'exception de ceux pour Trp et DOPA) mettant, ainsi, en évidence une relation linéaire entre les aires relatives des pics chromatographiques et la concentration des catécholamines. Les recouvrements calculés (comme décrit à la page 226) pour des échantillons contrôles préparés dans la phase mobile à différentes concentrations comprises dans la gamme (Annexe 7b), sont généralement compris entre 96% et 112% (exception pour 5HIAA, 62%) et la plupart des CVs correspondant sont inférieurs ou égaux à 5%, ils sont donc acceptables du point de vue des normes STP Pharma [13] pour la validation des méthodes. La forte valeur de CV calculée pour Tyr dénote une compensation insuffisante des variations de signal massique de ce composé par le signal de l'étalon interne.

Les recouvrements calculés pour l'échantillon préparé dans la matrice (Annexe 7b) sont inférieurs à 70% (excepté pour A), ce qui indique un important effet matrice que l'étalon interne ne compense pas suffisamment pour ces composés. Pour l'adrénaline coéluée avec le DHBA un recouvrement supérieur à 90% est cependant constaté. Ceci confirme que lors de l'analyse d'un échantillon naturel le choix d'un étalon interne est primordial. Il doit avoir un temps de rétention le plus proche possible de celui du composé à doser et l'idéal est évidemment, de disposer d'un étalon correspondant au même composé marqué aux isotopes stables.

Les droites d'étalonnage ont été également réalisées dans la matrice avec des points de gamme préparés selon le protocole décrit dans l'Annexe 6. Comme on peut le voir dans le tableau IV.13, de bons coefficients de détermination sont observés dans la matrice comme dans la phase mobile, mettant en évidence à nouveau une relation linéaire entre les aires relatives des pics chromatographiques et la concentration des catécholamines. Les valeurs de recouvrement obtenues pour l'échantillon contrôle de matrice dopée sont comprises entre 81% et 101% pour les 7 catécholamines analysées, avec des coefficients de variation inférieurs à 5% (sauf pour Trp et S).

Tableau IV.13. Paramètres des droites d'étalonnage préparées dans la matrice

Soluté	Gamme d'étalonnage (ng.mL ⁻¹)	Equation de régression linéaire	r ²	Recouvrement (%)	CV* (%)
3-MT	10 – 100	$y = 0,0184x - 0,2364$	0,9961	95±1	3,9
NA	50 – 200	$y = 0,0083x - 0,1362$	0,9955	81±5	5,1
S	25 – 200	$y = 0,0043x + 0,0864$	0,9927	101±7	7
A	50 – 200	$y = 0,0080x + 0,0906$	0,9975	97±2	2,2
5HIAA	50 – 200	$y = 0,0067x + 0,1528$	0,9588	93±4	3,6
DOPA	300 – 800	$y = 0,0005x + 0,0637$	0,954	87±27	4,9
TRP	25 – 200	$y = 0,0021x + 0,2922$	0,9943	93±8	7,7

* les CV ont été calculés pour n = 3 analyses

En conclusion, les meilleurs résultats en terme de recouvrement sont obtenus lorsque les droites d'étalonnage sont préparées dans la matrice. A défaut de disposer de standards internes marqués aux isotopes stables, il serait préférable de disposer d'une matrice blanche pour améliorer la justesse des dosages.

IV.3.3. Méthode des ajouts dosés

L'analyse de l'extrait de cerveau de mouton par la méthode des ajouts dosés a été effectuée en utilisant le système HILIC-SM/SM le plus sensible du point de vue des limites de détection : colonne Pursuit Si associée au spectromètre de masse Sciex API 3000 . La figure IV.16 confirme la présence du Trp et Tyr dans l'extrait de cerveau, ainsi que l'interférence des composants de la matrice sur les transitions de la DA et 3-MT.

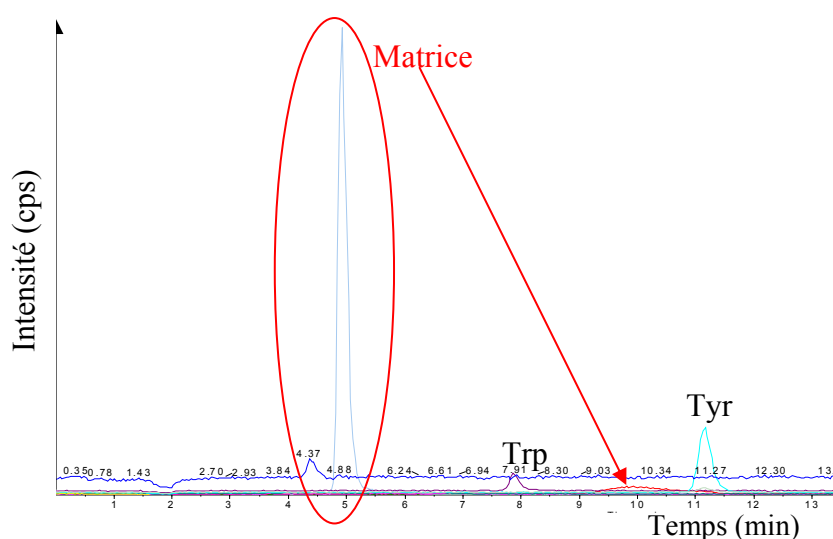


Figure IV.16. Superposition des courants extraits pour l'analyse de l'extrait de cerveau de mouton en CPL-SM/SM ESI positive

Colonne : Pursuit Si (LxØ = 150 x 2 mm) ; Phase mobile : ACN/HCOONH₄ 150 mM, pH 3 (85/15 v/v) ; Détection : SM/SM Sciex API 3000

Extrait de cerveau: 20 mg de tissu pour 100 µL de HClO₄ 0,2 M. Solution injectée : 20 µL de l'extrait de cerveau dilué (15/85 v/v) avec l'ACN.

Trois ajouts de 50, 100 et 150 % de la valeur estimée par le dosage de l'extrait en chromatographie d'appariement d'ions couplée à la SM, ont été effectués pour tracer la droite des ajouts dosés. La figure IV.17 présente les droites obtenues pour les deux composés ainsi que leurs équations et leurs coefficients de détermination (R²). On peut constater que de très bonnes valeurs pour les R², supérieures à 0,997, ont été obtenues dans les deux cas.

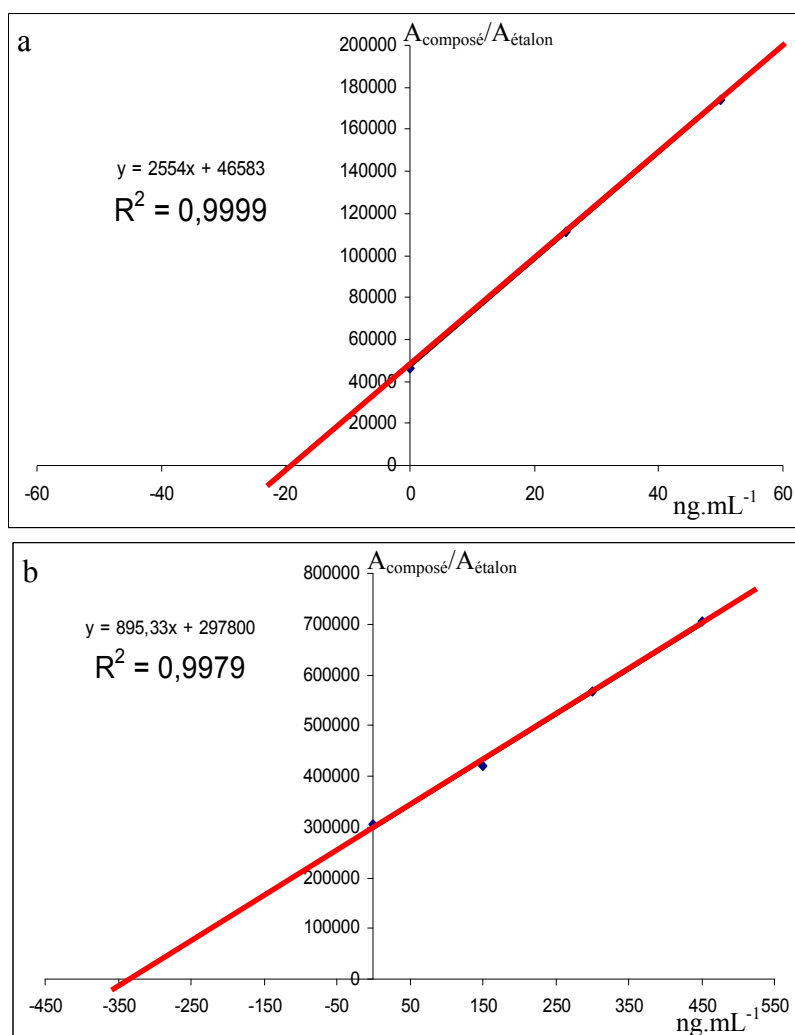


Figure IV.17. Dosage de Trp (a) et Tyr (b) dans un extrait de cerveau par la méthode des ajouts dosés

Les concentrations calculées à partir des équations des droites des ajouts dosés et rapportées à un g de cerveau ($0,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Trp et $11 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour la Tyr) sont très proches des valeurs obtenues antérieurement en chromatographie d'appariement d'ions selon les deux méthodes de dosage.

IV.4. Bilan de l'analyse de catécholamines en mode HILIC en couplage avec la spectrométrie de masse

L'avantage principal de la chromatographie d'interactions hydrophiles est sa compatibilité avec l'ionisation en mode positif et négatif, ce qui permet la détermination de tous les composés de notre mélange.

Les meilleures valeurs de LODs ont été obtenues pour l'analyse des catécholamines sur la colonne en silice vierge, Pursuit Si, en couplage avec le spectromètre de masse Sciex API 3000.

Lors de la détermination des LODs dans la matrice et du dosage des catécholamines par la méthode de l'étalonnage externe un important effet matrice a été mis en évidence. En ce qui concerne les LODs, un effet d'exaltation de signal a été mis principalement en évidence en présence de matrice.

Pour l'échantillon contrôle de matrice dopée de mauvais taux de recouvrement ont été enregistrés pour des calculs effectués en utilisant les droites d'étalonnage préparées dans la phase mobile. Des résultats satisfaisants ont été obtenus pour des calculs réalisés à partir des droites d'étalonnage préparées dans la matrice.

Les droites d'étalonnage externe préparées aussi bien dans la phase mobile que dans la matrice mettent en évidence une bonne linéarité de la méthode.

V. Comparaison des systèmes en appariements d'ions et en mode HILIC

Du point de vue de la séparation chromatographique, les systèmes les plus performantes ont été obtenus en chromatographie d'appariement d'ions : une séparation complète des 12 catécholamines est observée sur la colonne « fused core » et une seule coélution (S et 3-MT) sur la colonne monolithique. Ces systèmes offrent aussi les meilleures symétries et efficacités des pics. Ces performances séparatives n'ont pas été atteintes en chromatographie HILIC. Un autre avantage de la chromatographie d'appariement d'ions par rapport au mode HILIC est la meilleure robustesse des systèmes. Tous ces avantages font que les systèmes optimisés en chromatographie d'appariement d'ions sont les meilleurs candidats pour le couplage avec la détection électrochimique.

Du point du vue de la détection en SM, le mode HILIC offre des séparations suffisantes et l'avantage majeur d'être compatible avec une ionisation en mode positif et en mode négatif. La détection en une seule analyse de la totalité des composés sélectionnés est ainsi possible en mode HILIC. La chromatographie d'appariement d'ions n'étant pas compatible avec l'ionisation négative, l'analyse de DOPAC et HVA ne peut pas être réalisée dans ces conditions, à cause de l'utilisation d'un acide (le NFPA) comme agent d'appariement d'ions.

Du point de vue des limites de détection en couplage CPL-SM/SM, quand on compare les systèmes les plus sensibles de ces deux modes chromatographiques (Tableau IV.14), on observe que les meilleures valeurs de LODs, pour la majorité des composés, sont obtenues en mode HILIC.

Tableau IV.14. Comparaison des LODs obtenues pour les meilleurs systèmes en appariement d'ions et en mode HILIC

Système Soluté	Appariement d'ions		HILIC	
	Onyx Monolith C18 (ng.mL ⁻¹)		Pursuit SI (ng.mL ⁻¹)	
	Phase mobile	Matrice	Phase mobile	Matrice
DHBA	2.0	5.0	1.0	1.0
DA	1.0	1.0	1.0	5.0
3-MT	0.5	1.0	1.0	0.5
NA	10.0	50.0	5.0	0.5
S	1.0	1.0	0.5	0.5
TYR	3.0	Déjà présent	10.0	Déjà présent
A	2.5	5.0	0.5	0.3
5HIAA	5.0	7.0	20.0	40.0
DOPA	10.0	10.0	50.0	10.0
TRP	?	Déjà présent	1.0	Déjà présent

De plus, l'effet matrice mis en évidence en mode HILIC correspond plus à une exaltation qu'à une suppression de signal massique, contrairement au mode appariement d'ions. Pour toutes ces raisons le mode HILIC est une alternative plus prometteuse pour l'analyse des catécholamines en couplage CPL-SM/SM.

VI. Conclusions

Dans ce chapitre nous avons présenté les résultats des systèmes chromatographiques optimisés en appariement d'ions et en mode HILIC couplés à la détection par spectrométrie de masse en mode tandem. Les systèmes ont été évalués en termes de LODs, linéarité de réponse et exactitude (justesse et précision). Nous avons vu que pour les deux types de chromatographie, des LODs comparables ont été obtenus avec toutefois, une meilleure

sensibilité pour le système HILIC. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature pour le couplage CPL – SM/SM.

Quelque soit le système utilisé pour l'analyse de l'extrait de cerveau de mouton les seuls composés observés sont Tyr et Trp. Nous avons pu réaliser leur dosage par la méthode des ajouts dosés dans les deux méthodes chromatographiques (appariement d'ions et HILIC). Les valeurs calculées pour les concentrations de ces deux acides aminés dans les deux cas, sont très similaires ce qui met en évidence la fiabilité des systèmes que nous avons mis au point.

Pour les deux types de chromatographie nous avons observé des effets matrice opposées sur l'ionisation des solutés en SM : pour l'appariement d'ions c'est de la suppression de signal, tandis que pour le mode HILIC c'est principalement une exaltation du signal qui est remarquée.

L'effet matrice mis en évidence lors de ces analyses pourra être limité de plusieurs façons différentes :

- réalisation des gammes d'étalonnage dans la matrice blanche ;
- utilisation de standards internes marqués aux isotopes stables ;
- purification de l'échantillon par extraction sur phase solide avant injection en CPL.

Les deux premières propositions sont plus difficiles à mettre en œuvre : d'une part, c'est quasiment impossible d'obtenir des matrices biologiques blanches (sans les composés d'intérêt) et d'autre part les standards internes marqués aux isotopes stables sont, en général, très onéreux et pas tous commercialement disponibles.

La troisième proposition semble plus facile à mettre en œuvre. Nous allons donc aborder dans le dernier chapitre de ce mémoire l'extraction sur phase solide, méthode qui a l'avantage de pouvoir aussi bien convenir pour une purification, que pour une préconcentration des échantillons. Ce qui devrait conduire au final à une amélioration des conditions de détection.

Références bibliographiques

- [1] S. Bourcier, J.F. Benoist, F. Clerc, O. Rigal, M. Taghi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1405.
- [2] F. Rogalewicz, S. Bourcier, Y. Hoppilliard, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 743.
- [3] M. de Person, P. Chaimbault, C. Elfakir, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 204.
- [4] A. Törnkvist, P.J.R. Sjöberg, K.E. Markides, J. Bergquist, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 323.
- [5] R.N. Xu, L. Fan, M.J. Rieser, T.A. El-Shourbagy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 342.
- [6] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2198.
- [7] V. Carrera, E. Sabater, E. Vilanova, M.A. Sogorb, *J. Chromatogr. B* 847 (2007) 88.
- [8] X.-E. Zhao, Y.-R. Suo, *Talanta* 76 (2008) 690.
- [9] W. Li, D.T. Rossi, S.T. Fountain, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 325.
- [10] T.A. Neubecker, M.A. Coombs, M. Quijano, T.P. O'Neill, C.A. Cruze, R.L.M. Dobson, *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 225–233.
- [11] H.P. Nguyen, K.A. Schug, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1465.
- [12] Q. Gu, X. Shi, P. Yin, P. Gao, X. Lu, G. Xu, *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 192.
- [13] P. Hubert, J.J. Nauyen-Hu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, *STP Pharma Pratiques* 13 (2003) 101.

CHAPITRE V
OPTIMISATION D'UNE METHODE
D'EXTRACTION SUR PHASE
SOLIDE (SPE) POUR LES
CATECHOLAMINES

CHAPITRE V. OPTIMISATION D'UNE METHODE D'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE) POUR LES CATECHOLAMINES

I. Introduction

En tenant compte des difficultés que nous avons rencontrées dans le chapitre précédent vis-à-vis des limites de détection et de l'effet matrice, dans ce chapitre nous nous sommes intéressées aux méthodes de purification et pré-concentration des catécholamines par extraction sur phase solide (SPE) en vue de leur analyse dans des échantillons biologiques.

Actuellement on estime que la préparation de l'échantillon représente environ 60% du temps nécessaire pour une analyse par chromatographie. Afin de réduire ce temps une optimisation laborieuse est souvent nécessaire. La tendance actuelle pour les analyses réalisées en routine est de coupler la SPE avec la CPL par des systèmes d'analyse « on line » ce qui permet un gain important de temps grâce à l'automatisation.

La purification de l'échantillon permet de protéger d'une part, les colonnes chromatographiques et ainsi prolonger leur durée de vie et d'autre part, de protéger le détecteur SM en limitant son encrassement. De ce fait, des résultats plus fiables et un nombre plus grand d'analyses entre deux nettoyages sont possibles.

Nous nous sommes d'abord intéressées aux méthodes présentées dans la littérature se rapportant à l'analyse des catécholamines, méthodes que nous avons résumées dans la première partie de ce chapitre. Nous avons pu conclure qu'aucune des méthodes proposées n'était directement applicable pour la purification et la pré-concentration de notre mélange standard non dérivé contenant à la fois des composés aminés et acides.

Dans ce chapitre nous avons essayé de mettre au point une méthode simple et rapide pour l'extraction de toutes les catécholamines par un seul passage sur cartouche SPE. Dans ce but nous avons testé plusieurs cartouches SPE commercialement disponibles : des supports échangeurs d'ions, des supports hydrophile-lipophile, des supports greffés C18 et le support PGC. Ces supports ont été utilisés ensuite pour l'extraction des catécholamines d'un extrait de cerveau dopé.

II. Etat de l'art sur l'extraction sur phase solide des catécholamines

II.1. Principe de l'extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (SPE) est devenue l'une des techniques les plus utilisées pour la préparation d'échantillon. Le principe de la SPE est similaire à celui de l'extraction liquide-liquide (LLE), mais implique le partage des solutés entre deux phases : une solide et une liquide [1]. L'extraction solide-liquide d'un échantillon a pour but d'extraire certains composés présents dans des échantillons complexes avant leur analyse par CPL, CPG ou EC. Cette démarche permet de remédier à l'absence de sélectivité du système de séparation entre les constituants de la matrice et les composés d'intérêt, ou à la faible sensibilité du détecteur dans le cas de solutions diluées ou d'un effet matrice. Enfin, l'extraction solide-liquide permet de purifier l'échantillon avant son injection, et de préserver ainsi le matériel chromatographique.

Parmi les avantages de la SPE, les plus importants sont les suivants :

- la consommation plus faible de solvants organiques par rapport à l'extraction liquide-liquide ;
- et la grande variété de supports disponibles commercialement [2].

En revanche un problème clé de la SPE est lié à la mise au point de protocoles adaptés aux composés à extraire. Une première difficulté est représentée par le choix du support (nature et quantités d'adsorbant) le mieux adapté à l'échantillon, parmi les différents adsorbants disponibles sur le marché.

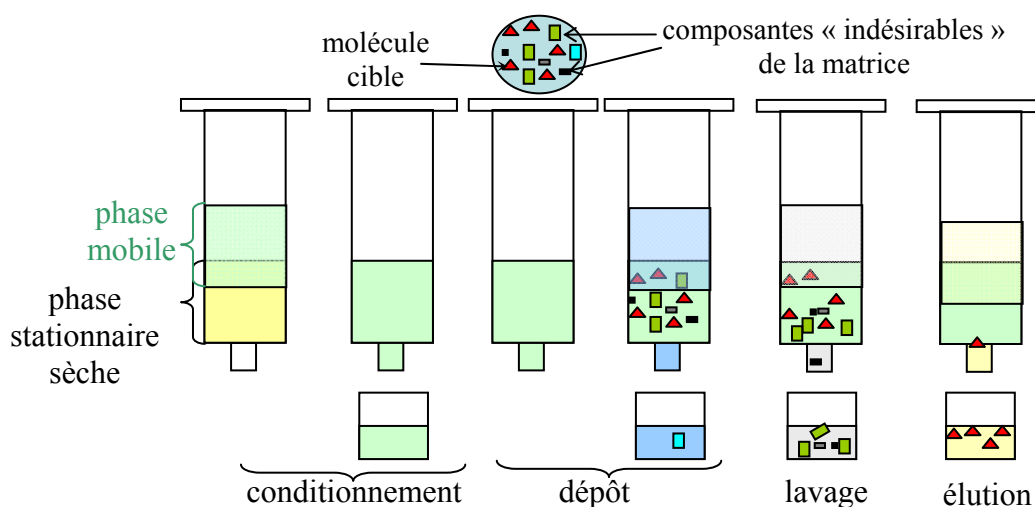


Figure V.1. Étapes de la SPE

Une méthode SPE est composée la plupart du temps de 4 étapes successives illustrées dans la figure V.1. :

- 1^{er} étape : le conditionnement: il correspond au passage d'un solvant approprié pour mouiller la cartouche, suivi par le passage d'un deuxième solvant de même composition que celui dans lequel est dissous l'échantillon à déposer. Cette étape a pour but d'assurer la solvataion des groupements fonctionnalisés du support, d'éliminer l'air et les impuretés éventuelles présentes sur la cartouche. Il est recommandé de ne pas sécher la cartouche avant l'étape suivante, afin d'assurer une bonne rétention des solutés.

- 2^{ème} étape : le dépôt : il correspond à la percolation de l'échantillon. En fonction du système (volume disponible pour échantillon et quantité d'adsorbant) les volumes déposés varient de quelques μL à 1 L. La vitesse de passage doit être suffisamment faible pour assurer la rétention des solutés. La plupart du temps pendant cette étape, les solutés sont concentrés sur l'adsorbant, certains composants de la matrice peuvent être retenus, eux aussi, sur le support, et d'autres passer à travers. On réalise ainsi une purification de l'échantillon.

- 3^{ème} étape : le lavage: il correspond au passage de solvants appropriés pour éliminer les composants de la matrice qui ont pu être retenus sur le support, mais sans affecter la rétention des solutés. Ces solvants doivent donc avoir une faible force d'élution par rapport aux solutés. Le séchage de la cartouche lors de cette étape peut être envisagé, spécialement dans le cas de matrices aqueuses, afin d'éliminer les traces d'eau du support.

- 4^{ème} étape : l'élution: elle correspond à l'élution spécifique des solutés à l'aide d'un solvant approprié, tout en évitant l'élution des composants de la matrice qui seraient encore retenus sur le support. Le volume de solvant doit être optimisé de manière à éluer l'intégralité de la quantité de soluté retenu sur le support tout en limitant au maximum la dilution. La vitesse de passage du solvant doit être ajustée de manière à assurer l'élution efficace des solutés [1].

La SPE est utilisée pour la purification des échantillons complexes tels les fluides biologiques et aussi pour leur concentration, soit directement par l'élution des solutés dans un volume de solvant plus petit que le volume d'échantillon déposé initialement, soit par l'évaporation de la fraction récupérée lorsque le volume d'élution est égal ou plus grand que celui déposé.

II.2. SPE des catécholamines

Nous avons montré dans le premier chapitre de ce mémoire que les concentrations physiologiques des catécholamines sont très faibles et que généralement les limites de détection en spectrométrie de masse ou en électrochimie ne sont pas suffisantes pour permettre l'analyse directe des échantillons biologiques. De plus la complexité de ces échantillons alourdit l'analyse. Dans ce contexte un nombre important d'auteurs font appel à des procédures de purification et de pré-concentration par extraction sur phase solide [3-6].

Dans une revue de 2001 sur l'analyse des catécholamines urinaires, Nikolajesen et Hansen [7] mettent en évidence le fait qu'il existe principalement trois types de procédure pour la purification des catécholamines :

- les méthodes qui utilisent la complexation par l'acide phénylboronique ;
- celles qui utilisent l'échange d'ions ;
- et celles qui utilisent l'extraction sur alumine.

Le tableau V.1. récapitule les principaux exemples de supports utilisés dans la littérature pour la SPE des catécholamines, ainsi que les protocoles associés. Il montre ainsi une évolution des supports utilisés pour la purification des échantillons contenant des catécholamines.

Tableau V.1. Résumé des protocoles SPE présentés dans la littérature

Cartouche	Echantillon	Solutés recherchés	Procédure SPE	Recouvrement (%)	Réf
Oasis HLB	urine	MN et NMN	C : 1 mL MeOH ; 1 mL H ₂ O D : 1 mL urine (pH 6,5) L : 1 mL H ₂ O E : 1 mL de MeOH	91-114	[6]
	urine	DA, A NMN, MN, DHBA, HMBA, NA, 3-MT	C : 1 mL MeOH ; 1 mL tampon phosphate 0,5 M (pH 7) D : urine +0,5mL tampon phosphate 0,5 M (pH 7) L : 1 mL H ₂ O E : 1 mL MeOH	96-124	[4,8-10]
	plasma	HVA, DOPAC, MHPG	C : 1 mL MeOH ; 2 x 1 mL H ₂ O D : 400 µL extrait de plasma dans HClO ₄ L : 3x1 mL H ₂ O E : 200 µL MeOH	95-103	[11]
	plasma	MN et NMN	C : 1 mL MeOH ; 1 mL H ₂ O D : 1 mL plasma L : 2 mL H ₂ O E : 1 mL MeOH	96-100	[12]
ISOLUT CBA (cartouche WXC)	plasma	A, NA, DA, DHBA	C : 2x1 mL MeOH, 5x1 mL H ₂ O, 1 mL tampon phosphate pH 7,4 D : 500 µL plasma, 600µl H ₂ O+ IS L : 1 mL H ₂ O+0,1 mL HClO ₄ E : 250 µL HClO ₄	79-90	[3]
Oasis HLB et C18	plasma	VMA, HVA, DOPAC, DA, NA, DHBA, MHPG, A, DPHG	1 ^{er} passage sur HLB suivis par dérivation avec DPBA et passage sur C18	64-86	[5]
Oasis HLB, C30, MFC18	plasma	NA, DHPG, DHBA, DA, DOPA, A	C : 1 mL MeOH ; 1 mL H ₂ O; 0,5 mL DBAE ¹ D : (500 µL plasma+ metabisulphite de sodium 1,9 g.L ⁻¹ + 0,5 mL DBAE ¹) L : 1 mL (MeOH 20%+ TBA ² 0,4% + EDTA 2Na 5 mg.L ⁻¹ + NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5) E : 500 µL MeOH/(Acide citrique 10,5 g.L ⁻¹ + EDTA 2Na 20 mg.L ⁻¹)	91-129	[13]

Chapitre V. Optimisation d'une méthode d'extraction sur phase solide (SPE) pour les catécholamines

Cartouche	Echantillon	Solutés recherchés	Procédure SPE	Recouvrement (%)	Réf
Oasis HLB et IST 101 mixte mode	urine	5HIAA, HVA, VMA, DOPA et VMA	C : 1 mL MeOH ; 1 mL H ₂ O D : 1 mL urine L : MeOH /H ₂ O 5/95 E : MeOH	-	[14]
C18	urine	DA, DOPA, NA, A	C : 2 mL MeOH ; 2 mL (NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5) D : 1,5 mL (urine + agent complexant DPBA ³) L1: 2 mL (NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5) L2: 2 mL MeOH/(NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5) 20/80 E : 1,5 mL CH ₃ COOH 1 M	99-104	[15]
	urine	DA, A, NA,	C : 5 mL MeOH ; 5 mL (NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5 + EDTA 0,05%) D : 5 mL (urine + agent complexant DBAE ²) L1: 5 mL (NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5) L2: 15 mL MeOH/(NH ₄ Cl-NH ₄ OH 0,2 M pH 8,5) 30/70 E : 2x0,5 mL CH ₃ COOH 6 M	98-107	[16,17]
C18 **	urine	NA, A	D : urine E : (NaH ₂ PO ₄ 0,1 M + octylsulphonate de sodium 5mM+ azide de sodium+ H ₃ PO ₄ 20%)/MeOH 8/2	91-100	[18]
ICT Isolute (échangeur des cations)	Plasma	HMBA, NMN, MN	C : 3x5mL MeOH+NH ₃ 2,5 mL MeOH + KOH (1g/L) D : plasma + eau acidifiée L1 : 6 mL MeOH+CH ₃ COOH 5mL H ₂ O, 5mL phosphate d'ammonium 10 mM (pH 7.8) L2: 2x5mL 5mL H ₂ O E : 3,5mL vol MeOH+NH ₃	90-105	[19]
Bond elut SAX	Plasma	HVA	C : 5x1 mL MeOH ; 5x1 mL H ₂ O D : plasma +H ₂ O L : 1 mL H ₂ O; 1 mL MeOH E : 1 mL MeOH avec 5% NH ₄ OH	97-99	[20]

Chapitre V. Optimisation d'une méthode d'extraction sur phase solide (SPE) pour les catécholamines

Cartouche	Echantillon	Solutés recherchés	Procédure SPE	Recouvrement (%)	Réf
Oasis MCX	Urine	DHBA, A, DA, HMBA, 3-MT, NA, NMN, MN	C : 1 mL MeOH ; 1 mL H ₂ O D : urine pH 7 L : 1-2 mL HCl 0,1 M ; 1-2 mL MeOH E : 1, 4 mL MeOH avec 5% NH ₄ OH (dans des vials avec 30µL CH ₃ COOH glacial)	75-93	[21]
Oasis WCX **	Urine	MN, NMN, 3-MT	C : 1 mL ACN ; 2 mL H ₂ O D : urine pH 7 L1: 1 mL H ₂ O L2: 1 mL ACN/H ₂ O 9/1 E : ACN/HCOONH ₄ 100 mM gradient	74-99	[22]
Strata X-CW (weak cation exchanger)	Urine	A, NA	C : 1 mL MeOH ; 1 mL H ₂ O D : 2mL urine pH 6,5-7 L : 1 mL CH ₃ COONH ₄ 25mM pH 6,5 1 mL MeOH E : 300µL MeOH +5% HCOOH	104-111	[23]
HySphere Resin GP** (polydivinyl benzène)	Urine	5HIAA	C : ACN ; H ₂ O D : urine L : HCOONH ₄ 10mM pH 3 E : 200µL phase mobile (HCOOH 0,2%/ACN gradient)	81-98	[24]
HySphere Resin SH**	Urine	5HIAA, S, Trp	C : ACN ; H ₂ O, EDTA 5 g.L ⁻¹ D : urine E : (KH ₂ PO ₄ 50 mM)/ (KH ₂ PO ₄ 50 mM/ MeOH 70/30) en gradient	91-104	[25]
Une résine échangeuse de cations et une d'anions	Urine	NA, A, DA, DHBA	Passage sur la résine échangeuse de cations et puis sur la résine échangeuse d'anions	54-80	[26]
Bio-Rex 70 (résines échangeuses des cations)	Urine	NA, A, DA, MN, MNM, DHBA	D : (5 mL urine + 400 µL IS + 100 µL EDTA Na 0,1 g.mL ⁻¹ + 100 µL metabisulphite de sodium 0,1 g.mL ⁻¹ L : 10 mL H ₂ O E : 7 mL HCOOH 4M	69-84	[27]

Chapitre V. Optimisation d'une méthode d'extraction sur phase solide (SPE) pour les catécholamines

Cartouche	Echantillon	Solutés recherchés	Procédure SPE	Recouvrement (%)	Réf
Extraction à l'alumine	Urine	NA	(500 µL plasma+500 nL IS+ 1 mL tampon tris 1 M + 50 mg alumine) – agitation pendant 10 min Centrifugation et élimination de surnageant Lavage de l'alumine avec 5 mL H ₂ O - vortex Désorption : 1 mL HCOOH 1M - agitation 10 min - centrifugation	97-100	[28]
	Plasma	DA, DOPA	(100 µL plasma+25 µL IS+25 µL solution aqueuse de metabisulphite de sodium 10%+ 300 µL (tampon TRIS 2 M + EDTA 5%)+ 30 mg alumine) – agitation pendant 10 min Élimination de surnageant Lavage de l'alumine avec 4 x 300 µL H ₂ O Désorption : 100 µL HCOOH 2,5% - vortex 10 min	54-68	[29]
	Plasma	DHPG	20 mg alumine pour 1 mL plasma Procédure similaire aux précédentes	56	[30]
	Plasma	A, NA, DOPA, m, o et pTYR, DA, nitroTyr	30 mg alumine pour 1 mL plasma Procédure similaire aux précédentes	71-103	[31]
	Plasma	NA, DA, 5HIAA, A, VMA, DOPAC,	5 mg alumine pour 0,5 mL plasma Procédure similaire aux précédentes	52-90	[32]
Crown ether sorbant (Polymère avec PBA)	Urine	DA, DHBA, NA, A	C : 3 mL MeOH; 1 mL H ₂ O D : 1 mL urine E : 1 mL CH ₃ COOH 6 M	79-95	[33]
CAT-PBA**	Urine	NA, A, DA, DHBA	Dépôt à pH 8,7 et élution à pH 3,5	95-97	[34,35]

Chapitre V. Optimisation d'une méthode d'extraction sur phase solide (SPE) pour les catécholamines

Cartouche	Echantillon	Solutés recherchés	Procédure SPE	Recouvrement (%)	Réf
AccuCAT (échangeur des cations)	Plasma	NMN, MN, MHPEA, HMBA	C : 15 mL MeOH/NH ₃ 1/3; 2 mL KOH 10g.L ⁻¹ dans MeOH D : 1mL plasma L1 : 5 mL CH ₃ COOH 10 mM /MeOH 9/1 L2 : 5 mL phosphate d'ammonium 10 mM L3 : 5 mL H ₂ O E : 2 mL MeOH+NH ₃	54-68%	[36]

* C= conditionnement ; D = dépôt ; L = lavage ; E = élution

** SPE on line

¹DBAE = ester 2-aminoethyle de l'acide diphényle bromique

² TBA = bromure de tetrabutylammonium

³DPBA = acide diphényle bromique

En analysant le tableau V.1. on peut constater que les extractions sur alumine correspondent aux protocoles les plus lourds et aux rendements d'extraction les moins satisfaisants. Les méthodes de purification sur les échangeurs d'ions, résines [25] ou silices/polymères greffés [21], ne sont utilisées que pour la purification des mélanges de catécholamines qui portent la même charge. Pour un mélange contenant des composés acides et aminés, comme le nôtre, les solutés sont donc fractionnés en deux groupes: cations d'une part et anions d'autre part. Une de ces fractions contient toujours d'autres constituants de la matrice (en fonction de la nature de l'échangeur d'ions).

Les méthodes qui utilisent l'acide phenylboronique, qu'il soit immobilisé sur un support [34] ou rajouté dans l'échantillon pour réaliser une dérivation des solutés [15], ne sont adaptées que pour les catécholamines ayant deux fonctions hydroxyle vicinale sur le noyau aromatique. La figure V.2 montre le mécanisme de formation des complexes entre un diol et l'acide phenylboronique. Le complexe formé est stable en milieu basique, c'est pourquoi le dépôt et le lavage sont réalisés dans ce cas à pH basique. Pour détruire le complexe et éluer les catécholamines il suffit alors de passer en milieu acide.

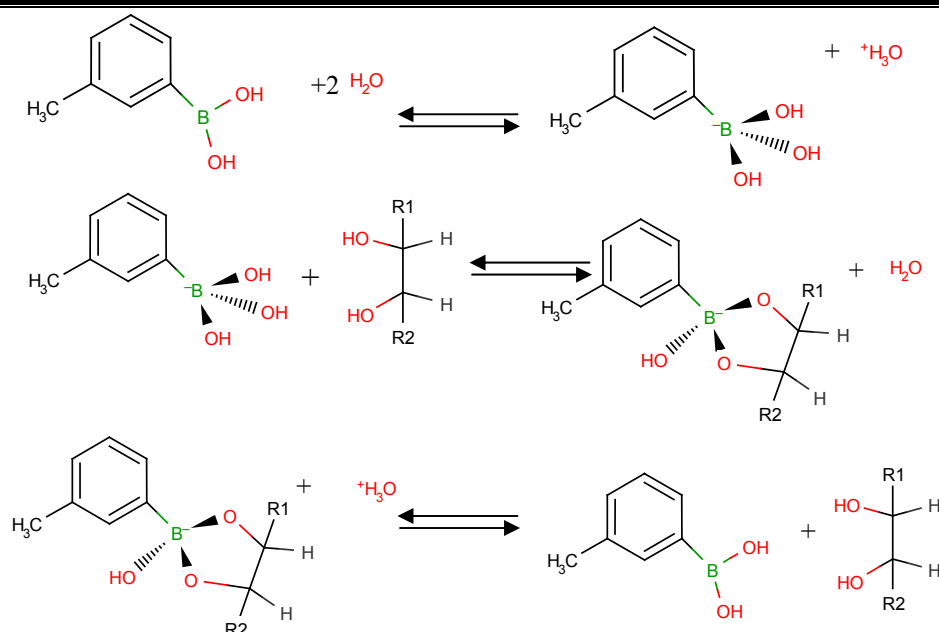


Figure V.2. Mécanisme en trois étapes de complexation/décomplexation d'un diol par l'acide phenylboronique

Cette méthode d'extraction n'est pas adaptée pour les composés n'ayant qu'un groupement hydroxyle (Tyr, S et 5HIAA) ou pas du tout (Trp) sur le noyau aromatique, ni pour les métabolites pour lesquels un des groupements hydroxyle est méthoxylé (HVA, 3-MT). De ce fait, cette méthode n'est pas adaptée à nos exigences d'extraction.

Les mécanismes de rétention des solutés en SPE étant identiques à ceux mis en œuvre en CPL, si on connaît le comportement des composés sur un support chromatographique on pourra alors anticiper celui observé sur une cartouche de même phase stationnaire. Nous avons vu dans le chapitre I que la rétention des catécholamines sur support C18 n'est possible que si les solutés sont dérivés, pour augmenter leur hydrophobie. S'ils ne sont pas dérivés on ajoute un agent d'appariement d'ions dans la phase mobile pour augmenter leur rétention. Pour l'extraction des catécholamines sur support C18 on fait ainsi appel soit à la dérivation des solutés avec le DPBA ou le DBAE [5,13,15-17] soit à l'ajout d'un agent d'appariement d'ions (octylsulfonate de sodium) lors du conditionnement [18]. La dérivation avec le DPBA présente, en plus des inconvénients habituels d'une réaction de dérivation (voir Chapitre I), les inconvénients mentionnés antérieurement vis-à-vis des molécules qui ne peuvent pas être complexées par le DPBA. De leur côté les méthodes en appariement d'ions avec des agents d'appariement d'ions acides assurent la rétention sur la cartouche des solutés aminés chargés positivement à pH 3 uniquement. Les mélanges contenant des composés acides et des composés aminés ne peuvent donc pas être extraits simultanément par un seul passage sur cartouche C18.

Une alternative prometteuse est représentée par le support hydrophile/lipophile proposé par la société Waters : OASIS HLB (figure V.3.). Ce support universel est adapté, d'après le fabricant, pour être utilisable aussi bien pour l'extraction des composés acides, que pour celle des solutés basiques et neutres. Il est constitué d'un copolymère réalisé à partir des deux monomères suivants : un hydrophile, la *N*-vinylpyrrolidone, et un lipophile, le divinylbenzène. Sa surface spécifique très importante (environ $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) lui confère des capacités rétentions plus importantes que celles des supports en silice greffées C18. Par exemple, le facteur de rétention du catéchol est deux fois plus important sur support HLB que sur support C18 [2].

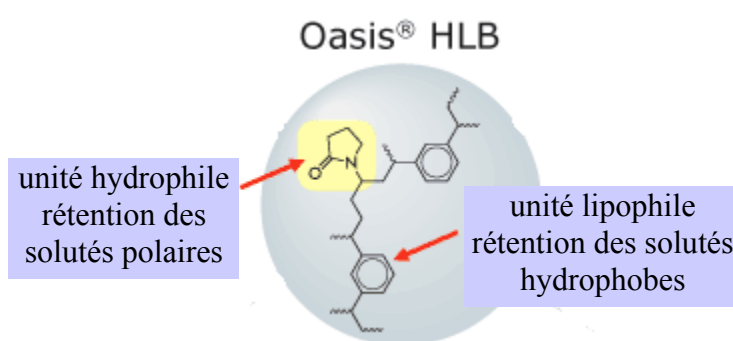


Figure V.3. Structure du support Oasis HLB (documents Waters)

Le tableau V.1 présente quelques exemples d'extraction des catécholamines sur support Oasis HLB. Deux types de protocoles sont possibles :

- un protocole avec un dépôt à pH neutre (6,5-7) [6,8]
- et un protocole avec un dépôt à pH acide [11].

On peut voir dans les exemples résumés dans le tableau V.1. que ce support a été utilisé pour l'extraction des solutés aminés [4,12] aussi bien que pour celle des solutés acides [11] avec des rendements d'extraction supérieurs à 90%, mais jamais pour l'extraction simultanée de ces deux familles de solutés.

III. Optimisation d'une méthode SPE pour le mélange de 12 catécholamines sélectionné

Pour l'optimisation de la méthode d'extraction des catécholamines nous avons utilisé différents types de cartouches SPE :

- des supports de type hydrophile/lipophile (Oasis HLB) ;
- des supports échangeurs de cations:
 - o fort (Oasis MCX et Bond Elut Plexa PCX) ;
 - o faible (Oasis WCX) ;
- un support mode mixte contenant un échangeur fort de cations et un échangeur fort d'anions (Bond Elut AccuCat) ;
- un support acide boronique (Bond Elut PBA) ;
- des supports en silice greffée C18 (Chromabond C18 et Supelco C18) ;
- des supports carbone graphite poreux (Hyper SEP Hypercarb).

Les caractéristiques de ces supports sont présentées dans l'Annexe 8.

Pour l'optimisation des protocoles d'extraction des catécholamines les différentes fractions recueillies ont été analysées par CPL-UV. Dans ces conditions nous avons eu besoin de sélectionner une méthode chromatographique parmi celles que nous avons précédemment optimisées pour offrir la résolution maximale des 12 composés. Nous avons utilisé une des méthodes chromatographiques optimisées en appariement d'ions, utilisant la colonne monolithe Onyx C18 et une phase mobile composée de MeOH et d'une solution aqueuse de NFPA selon le gradient mis au point dans le chapitre II (page 126).

En partant des informations de la littérature nous avons essayé en premier lieu de mettre au point un protocole pour l'extraction des 12 composés de notre mélange standard de catécholamines sur cartouche Oasis HLB.

III.1. Cartouche de type hydrophile/lipophile (Oasis HLB)

III.1.1. Protocole type phase inverse

Nous avons testé d'abord le protocole proposé par le fabricant pour une cartouche Oasis HLB 30 mg de phase. Ce protocole que nous allons appeler par la suite Protocole I est le suivant :

Protocol I Oasis HLB :

- *conditionnement*: 2 mL MeOH suivis par 2 mL H₂O;
- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M;

Chapitre V. Optimisation d'une méthode d'extraction sur phase solide (SPE) pour les catécholamines

- *lavage*: 3 mL H₂O;

- *élution* : 0,5 mL MeOH.

La fraction récupérée après l'élution est évaporée à sec sous flux léger d'azote, puis reprise avec 0,5 mL de phase mobile et injectée dans le système chromatographique. Dans ces conditions, sur les 12 solutés du mélange standard, seuls 5 sont retrouvés dans la fraction d'élution : DOPAC, Trp, HVA, 5HIAA et S. Les autres composés de notre mélange ne sont pas retenus sur le support et ils sont retrouvés soit dans les fractions récupérées après le dépôt et/ou après le lavage.

On remarque que les 5 solutés retenus sur la cartouche HLB sont les plus hydrophobes ($\log P > 1$) (Annexe 1) et ils ont des charges différentes, ce qui implique qu'un mécanisme de rétention de type phase inverse est principalement responsable de la rétention de ces solutés dans ces conditions.

Pour les 5 solutés retenus nous avons réalisé une étude de répétabilité des rendements d'extraction, dont les résultats sont présentés dans le tableau V.2. Pour DOPAC, HVA, 5HIAA et Trp on peut voir que de très bons rendements d'extraction (supérieurs à 90%) et des coefficients de variation (CV) acceptables (la plupart inférieurs à 5%), ont été obtenus. En revanche pour S le rendement d'extraction est inférieur à 75% avec une variabilité plus importante (CV supérieur à 8%). Ces résultats sont en concordance avec ceux présentés dans la littérature pour des composés et des protocoles similaires [11,12].

Tableau V.2. Répétabilité des rendements d'extraction sur cartouche Oasis HLB

Soluté	Rendement d'extraction (%)						Moyenne (%)	Ecart-type	CV (%)
	1	2	3	4	5	6			
DOPAC	97,0	102,4	100,9	93,9	95,0	91,8	96,8	3,7	3,9
HVA	96,7	103,6	100,9	95,0	95,4	90,7	97,0	4,2	4,3
5HIAA	91,3	95,2	83,9	89,0	94,7	87,2	90,2	4,0	4,4
TRP	90,0	100,2	97,9	88,0	91,8	88,0	92,6	4,7	5,1
S	68,1	83,6	71,9	81,9	68,1	73,7	74,5	6,2	8,3

Dans le but de retenir un nombre plus important de solutés présents dans notre mélange nous avons essayé trois autres protocoles type phase inverse, basés sur un conditionnement et un dépôt non plus en milieu acide mais à pH neutre (tableau V.3). Nous avons choisi, pour tester ces protocoles, la NA comme soluté modèle des composés non retenus sur la cartouche HLB avec le protocole précédent. Dans ces nouvelles conditions les résultats restent insatisfaisants, puisque la NA n'a pas pu être retenue. Un protocole de type phase inverse ne permet donc pas la rétention des 12 catécholamines.

Tableau V.3. Protocoles d'extraction sur Oasis HLB

Etapes	Protocole II Oasis HLB	Protocole III Oasis HLB	Protocole IV Oasis HLB
Conditionnement	2 mL MeOH 2 mL CH ₃ COONH ₄ 0,5 M	2 mL MeOH 2 mL CH ₃ COONH ₄ 0,5 M	2 mL MeOH 2 mL tampon phosphate pH 7, 0,5 M
Dépôt	1 mL solution NA à 5 µg.mL ⁻¹ dans HClO ₄ 0,2 M	1 mL solution NA à 5 µg.mL ⁻¹ dans CH ₃ COONH ₄ 0,5 M	1 mL solution NA à 5 µg.mL ⁻¹ dans tampon phosphate 0,5 M
Lavage	3 mL H ₂ O	3 mL H ₂ O	3 mL H ₂ O
Elution	1 mL MeOH	1 mL MeOH	1 mL MeOH

III.1.2. Protocole type appariement d'ions

Dans le deuxième chapitre de ce mémoire nous avons montré que la rétention des amines est augmentée, sur les deux types de supports testés (silice greffée C18 et PGC), quand on rajoute des agents d'appariement d'ions (type acide carboxylique perfluoré) dans la phase mobile. Dans cette optique, nous avons essayé d'augmenter la rétention des catécholamines sur la cartouche HLB par ajout d'un agent d'appariement d'ions dans le solvant de conditionnement de la cartouche. Les chaînes hydrocarbonées présentes sur le support (figure V.3.) pourront alors assurer la fixation des chaînes fluoro-carbonées des agents d'appariement d'ions perfluorés (Protocole V).

Protocole V Oasis HLB :

- *conditionnement* : 2 mL MeOH suivis par 5 mL de solution aqueuse d'acide perfluoré à 1% ;

- *dépôt* : 1 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M ;

- *lavage* : 3 mL H₂O ;

- *élution* : 1 mL MeOH.

Les acides perfluorés que nous avons utilisés sont le NFPA, le TDFHA et le PDFOA. Malheureusement la présence d'aucun de ces agents d'appariement d'ions n'a permis d'augmenter significativement les interactions avec le support des sept solutés non retenus dans les conditions précédentes. Les solutés ne sont pas mieux retenus qu'avec les protocoles antérieurs.

III.1.3. Bilan sur les méthodes d'extraction sur support de type hydrophile/lipophile

Sur la cartouche Oasis HLB nous avons réussi l'extraction des 5 solutés les moins polaires: S, HVA, DOPAC, Trp et 5HIAA par un protocole simple qui n'implique que l'utilisation de MeOH et d'eau. Les rendements d'extraction obtenus pour ces 5 solutés sont pour la plupart supérieurs à 90 %. Aucune autre catécholamine de notre mélange n'a pu être retenue sur la cartouche HLB par aucun des autres protocoles testés.

En conséquence cette cartouche ne peut pas être utilisée pour l'extraction simultanée de toutes les catécholamines de notre mélange. Elle pourra cependant, être utilisée si les solutés d'intérêt sont les 5 composés retenus ou en combinaison avec une autre cartouche qui sera capable d'assurer la rétention des solutés non retenus sur support Oasis HLB.

III.2. Cartouche de type échangeur de cations

Deux échangeurs forts de cations porteurs de groupements SO_3^- ont été testés, un échangeur faible de cations type acide carboxylique et un échangeur mode mixte (cations et anions).

III.2.1. Echangeurs forts de cations

III.2.1.1. Cartouche Oasis MCX

La cartouche Oasis MCX (Waters) est constituée du même squelette que celui de la cartouche Oasis HLB avec en plus des groupements sulfonates greffés (figure V.4). Sa capacité d'échange d'ions est donnée égale à 1 meq.g^{-1} , ce qui lui offre un caractère mode mixte échangeur fort de cations et phase inverse. D'après le fabricant, ce support est adapté pour l'extraction des composés basiques, aussi bien que pour celle des composés acides et neutres. Toutefois, deux protocoles différents d'extraction sont proposés: un pour les solutés basiques et un autre pour les solutés neutres et acides.

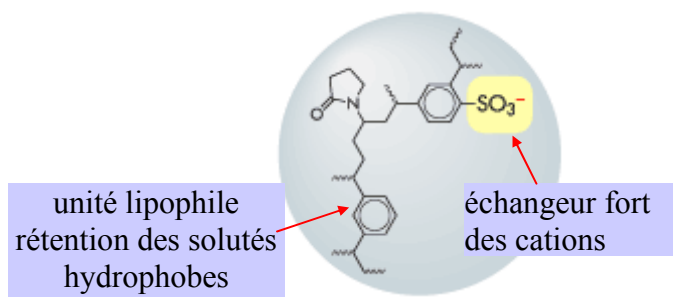


Figure V.4. Structure du support Oasis MCX (document Waters)

Nos premiers essais ont été effectués à partir d'un protocole d'extraction basé sur celui proposé par le fabricant pour l'extraction des solutés basiques sur une cartouche contenant 200 mg de phase :

Protocole I Oasis MCX :

- *conditionnement* : 6 mL MeOH;

6 mL HCOONH₄ à 5% dans le MeOH;

6 mL H₂O;

- *dépôt* : 3 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M;

- *lavage* : 3 mL solution aqueuse de HClO₄ 0,1 M;

3 mL MeOH ;

- *élution* : 3 mL HCOONH₄ à 5% dans le MeOH.

La fraction récupérée après l'élution est évaporée à sec sous flux léger d'azote. Nous avons pu constater qu'une quantité importante de sel ne s'est pas évaporée mais a cristallisé sur les parois du flacon d'évaporation. Le résidu récupéré après l'évaporation est repris avec 0,5 mL de solution aqueuse de NFPA 1,25 mM, puis analysé dans le système chromatographique. La présence d'une quantité importante de sel dans la solution reconstituée après l'évaporation a comme effet une modification des temps de rétention des solutés. Ainsi pour la DA (soluté choisi comme modèle représentant les composés aminés de notre mélange) nous avons enregistré une différence de 1,5 min entre son temps de rétention comme standard préparé directement dans une solution aqueuse de NFPA 1,25 mM (7,72 min) et celui de sa solution reconstituée dans une solution aqueuse de NFPA 1,25 mM après élution sur la cartouche et évaporation à sec (6,17 min).

Les résultats d'analyse mettent en évidence qu'un rendement d'extraction modeste (seulement 60%) est obtenu pour l'extraction d'une solution standard de DA préparée à une concentration de 10 µg.mL⁻¹ et pour laquelle le rendement est calculé en rapportant l'aire du pic chromatographique obtenue pour la solution reconstituée à l'aire du pic obtenu pour la solution standard avant le dépôt. En revanche si les calculs de rendement sont faits par rapport à une solution de DA préparée dans une solution méthanolique de HCOONH₄ à 5%, et ayant subi une étape d'évaporation puis une reconstitution dans 0,5 mL de NFPA, de meilleurs rendements d'extraction sont obtenus (supérieurs à 95%). En tenant compte de ces résultats nous avons conclu qu'une perte importante des solutés avait lieu pendant l'étape d'évaporation. Par conséquent, pour la suite de notre étude en échange d'ions, tous les rendements d'extraction ont été calculés par rapport aux solutions standards évaporées et reconstituées.

Nous avons testé l'influence sur les rendements d'extraction de 3 concentrations en sel (1, 2,5 et 5 %) dans le solvant d'élution. Comme on peut le voir dans la figure V.5. il n'y a pas de différences significatives entre les rendements d'extraction obtenus, on peut donc réduire la concentration en sel dans le solvant d'élution à une valeur minimale de 1%. Le protocole II que nous avons utilisé par la suite garde les trois premières étapes (conditionnement, dépôt et lavage) identiques au précédent, un seul changement intervient au niveau de la dernière étape, l'élution est réalisée avec 3 mL d'une solution méthanolique de HCOONH₄ à 1 %.

Protocole II Oasis MCX :

- *conditionnement* : 6 mL MeOH;

6 mL HCOONH₄ à 5% dans le MeOH;

6 mL H₂O;

- *dépôt* : 3 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M;

- *lavage* : 3 mL solution aqueuse de HClO₄ 0,1 M;

3 mL MeOH ;

- *élution* : 3 mL HCOONH₄ à 1 % dans le MeOH.

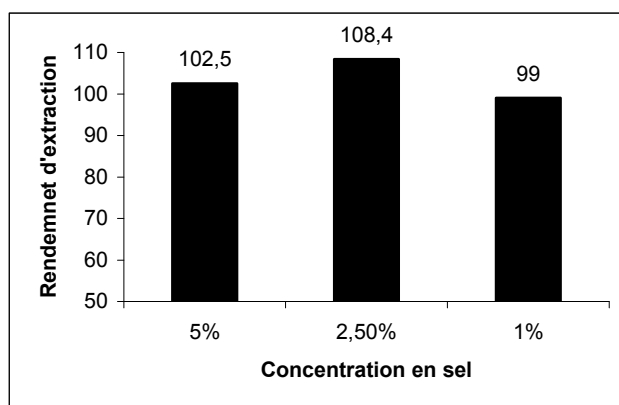


Figure V.5. Evolution du rendement d'extraction en fonction de la concentration en HCOONH₄ dans le solvant d'élution

Ce nouveau protocole a été utilisé pour l'extraction de DOPA et DOPAC, sélectionnés comme solutés modèle pour représenter respectivement les acides aminés (DOPA, Trp, Tyr) et les composés acides (DOPAC, HVA et 5HIAA) de notre mélange. Nos résultats montrent que ce protocole convient pour l'extraction de DOPA, puisque nous obtenons un bon rendement d'extraction (97%). Par contre l'extraction de DOPAC pose des problèmes, ce composé négativement chargé est bien retenu sur le support mais récupéré dans la fraction de

lavage au MeOH. En fait ce composé ne serait retenu que par les parties hydrophobes du support par un mécanisme de rétention de type phase inverse semblable à celui observé sur la cartouche Oasis HLB (même polymère à la base pour ces deux cartouches), ainsi le MeOH utilisé comme solvant de lavage provoque comme sur la cartouche Oasis HLB l'élution du DOPAC.

En tenant compte de ces résultats nous avons éliminé de notre mélange les trois composés acides, et réalisé l'extraction d'un mélange standard de 9 composés (NA, A, DOPA, DHBA, Tyr, DA, Trp, 3-MT et S) potentiellement retenus sur le support Oasis MCX. La figure V.6. montre le chromatogramme obtenu pour la solution récupérée après l'élution en SPE (courbe verte) et pour comparaison les chromatogrammes de deux mélanges standard des 9 solutés préparés soit directement dans une solution aqueuse de NFPA (courbe noire), soit dans une solution méthanolique de HCOONH₄ à 1% évaporé puis repris avec une solution de NFPA (courbe rose).

Comme on peut le voir sur la figure V.6. la présence de sel dans l'échantillon injecté a comme effet une diminution des temps de rétention pour les 5 solutés élués en premier, et une perte de symétrie pour ces pics chromatographiques, ce qui rend difficile les calculs de rendement d'extraction (problèmes d'intégration des pics) pour ces composés. En revanche, pour les 4 composés élués en dernier (DA, S, 3-MT et Trp) on observe une parfaite superposition des pics chromatographiques quel que soit le mode de préparation. Les intégrations de pics pourront être réalisées dans des bonnes conditions.

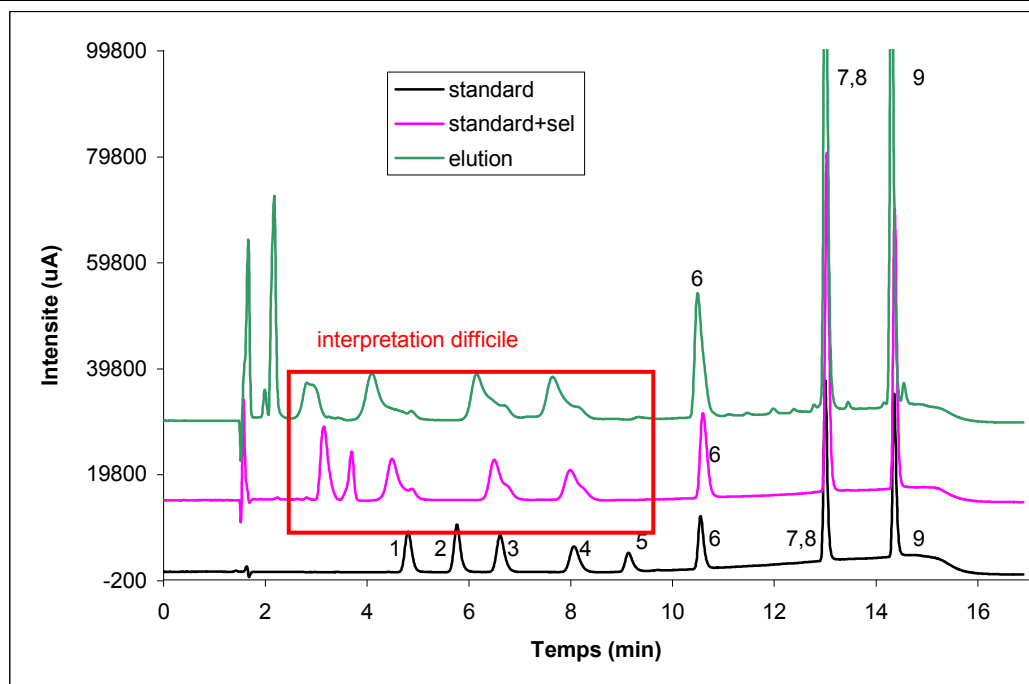


Figure V.6. Analyse d'un mélange de 9 catécholamines préparé de trois façons différentes: mélange standard préparé dans le NFPA, mélange standard préparé avec ajout de sel et solution récupérée après l'élution en SPE

Colonne : Onyx (L x Ø = 100 x 4,6 mm). Phase mobile: MeOH/NFPA 1,2 mM pH 2,9 en gradient d'élution : 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min, et en 0,1 min retour aux conditions initiales pour le rééquilibrage de la colonne. Débit : 1 mL.min⁻¹. Détection : UV.

1. NA, 2. DOPA, 3. A, 4. DHBA, 5. Tyr, 6. DA, 7. S, 8. 3-MT, 9. Trp

Le système chromatographique utilisé étant celui avec lequel nous avons obtenu les meilleurs résultats en couplage CPL-SM, la méthode d'extraction optimisée doit donc être compatible avec ces conditions chromatographiques. En conséquence afin d'adapter nos conditions d'extraction, nous avons testé l'influence sur la rétention et la symétrie de pics des différents sels volatils (acétate, formiate et carbamate d'ammonium) et solubles dans le MeOH. Les résultats sont reportés dans la figure V.7.

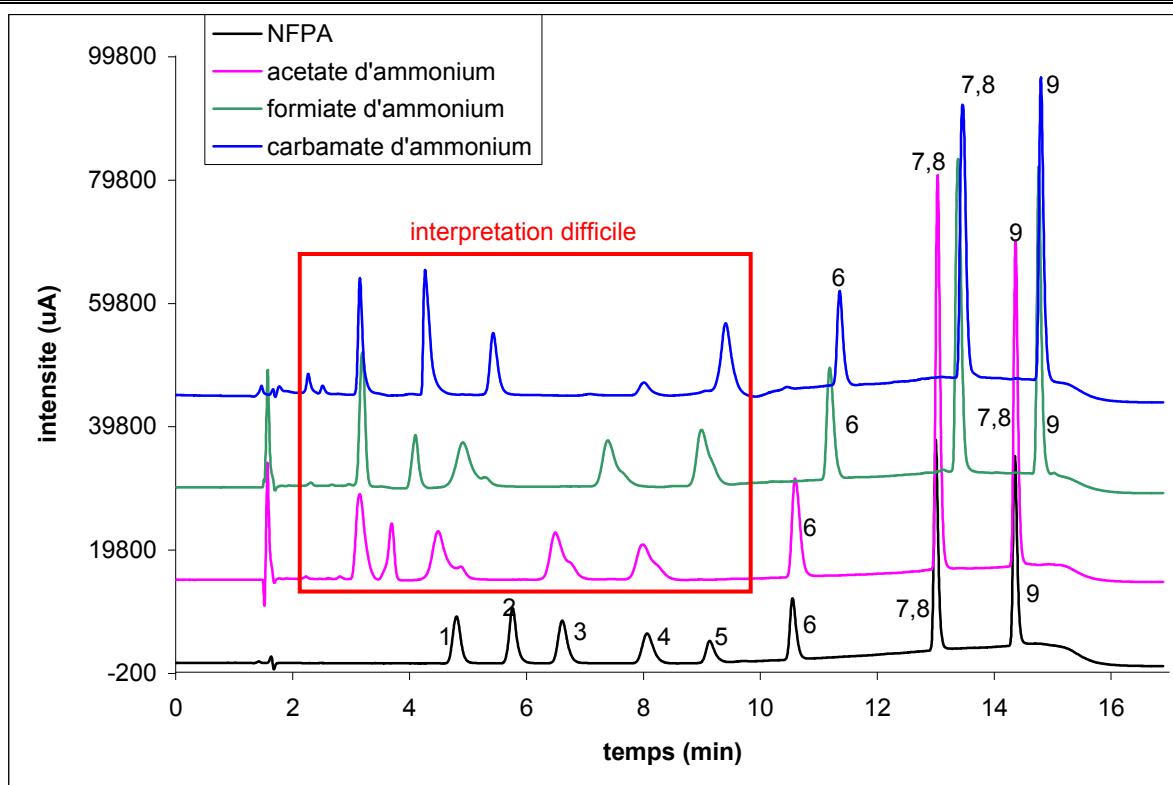


Figure V.7. Influence de la nature du sel présent dans le solvant d'injection sur la rétention et la symétrie des pics des catécholamines

Colonne : Onyx (L x Ø = 100 x 4,6 mm). Phase mobile : MeOH/NFPA 1,2 mM pH 2,9 en gradient d'élution : 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min, et en 0,1 min retour aux conditions initiales pour le rééquilibrage de la colonne. Débit : 1 mL.min⁻¹. Détection : UV.

1. NA, 2. DOPA, 3. A, 4. DHBA, 5. Tyr, 6. DA, 7. S, 8. 3-MT, 9. Trp

On peut observer que des profils chromatographiques similaires sont obtenus en présence de formiate et d'acétate d'ammonium, ces profils étant différents, par ailleurs, de ceux obtenus pour la solution injectée sans sel (courbe noire). Des résultats semblables sont obtenus en présence de carbamate d'ammonium, mais avec une détérioration encore plus marquée pour les pics des composés élués en premier. Nous avons aussi remarqué en présence de formiate de triéthylammonium une dégradation importante de la symétrie des pics et des rétentions des solutés, à l'exception de la sérotonine. On peut donc conclure que le remplacement de l'acétate d'ammonium par un autre des sels testés n'entraînera pas d'améliorations des conditions de séparation.

III.2.1.2. Cartouche Bond Elut Plexa PCX

Nous avons aussi testé un autre support échangeur fort de cations le support Bond Elut Plexa PCX commercialisé par Varian. Le support est constitué d'un polymère avec une couche externe hydroxylée, ce qui permet l'accumulation de l'eau à la surface du polymère, permettant un bon transfert des solutés vers le centre du polymère.

Nous avons utilisé le même protocole que sur la cartouche Oasis MCX en réduisant seulement les volumes de solvant puisque la quantité de phase (60 mg) était plus faible pour la cartouche Bond Elut Plexa PCX dont nous disposions:

Protocole Bond Elut Plexa PCX :

- *conditionnement*: 3 mL MeOH ;
3 mL HCOONH₄ à 2,5% dans le MeOH;
3 mL H₂O ;
- *dépôt*: 1,5 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ avec HClO₄ 0,2 M;
- *lavage*: 1,5 mL solution aqueuse de HClO₄ 0,1 M;
1,5 mL MeOH ;
- *élution* : 1,5 mL HCOONH₄ à 2,5% dans le MeOH.

Dans ces conditions nous avons mis en évidence que les deux cartouches (Oasis MCX et Plexa PCX) donnaient des résultats similaires vis-à-vis de la rétention des catécholamines et des rendements de leur extraction. Aucune amélioration dans les performances d'extraction n'est observée.

III.2.2. Echangeurs faibles des cations

Lors de l'étude des supports échangeurs forts de cations nous avons constaté qu'il était nécessaire d'utiliser des quantités importantes de sels pour éluer nos composés. Ces quantités n'arrivent pas à s'évaporer et se retrouvent concentrées dans l'échantillon injecté. Pour minimiser la proportion de sel nécessaire pour l'élution nous avons voulu tester un échangeur faible de cations offrant la possibilité de moduler par le pH de la phase mobile le nombre de sites actifs sur le support. Dans la gamme Oasis, Waters propose aussi une cartouche avec un support échangeur faible des cations, pour ce support c'est un groupement acide carboxylique qui est greffé sur le même support polymérique (figure V.8).

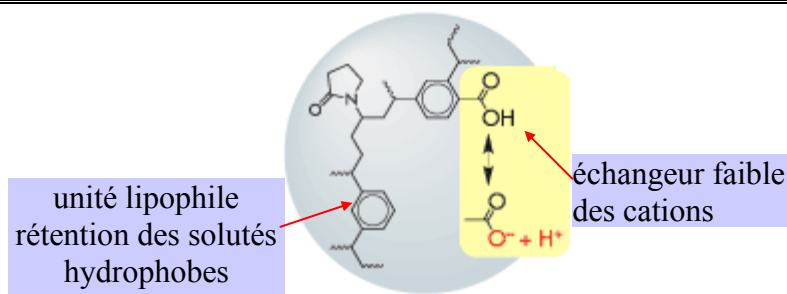


Figure V.8. Structure du support Oasis WCX (document Waters)

Le protocole que nous avons appliqué pour l'extraction d'un mélange standard de Trp, NA, DOPA et HVA sur la cartouche WCX (30 mg de phase) est le suivant :

Protocole Oasis WCX :

- *conditionnement*: 1 mL MeOH ;
2 mL HCOOH à 2 % dans le MeOH ;
2 mL HCOONH₄ 5 % ;
1 mL H₂O ;
- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M ;
- *lavage*: 1 mL HCOONH₄ 5 %;
- *élution* : 1 mL MeOH ;
1 mL HCOOH à 2% dans le MeOH.

Dans ces conditions sur les quatre solutés testés, deux ne sont pas retenus du tout (NA et DOPA) et se retrouvent dans la fraction récupérée au dépôt et deux (HVA et Trp) ont été récupérés lors de l'élution avec le MeOH avec des taux de recouvrement de 80% et 103% respectivement. La rétention de HVA et Trp sur la cartouche est donc plutôt le résultat d'interactions lipophiles avec le polymère, comme dans le cas de l'échangeur MCX.

Nous avons aussi testé le même protocole mais avec des dépôts à pH plus élevé (pH 5 et 6). Non seulement NA et DOPA ne sont toujours pas retenus mais encore les rendements d'extraction de HVA et Trp ont sensiblement diminué. Cette approche échangeur de cations faible a donc été définitivement abandonnée.

III.2.3. Cartouche mode mixte échangeur d'anions et de cations (Bond Elut AccuCAT)

Nous avons vu que les supports échangeurs forts de cations testés offrent de la rétention pour les composés ayant un groupement amine protoné dans leur structure (DOPA, DA, S, DHBA, NA, A, Tyr, Trp et 3-MT), mais une rétention insuffisante pour les trois

acides de notre mélange (DOPAC, HVA et 5HIAA). Dans ces conditions nous avons testé la cartouche Bond Elut AccuCAT (Varian), support de silice avec un greffage mixte échangeur de cations (acide benzène sulfonique) et échangeur d'anions (amine quaternaire). Ce support est présenté par le fabricant comme efficace pour l'extraction des composés acides, neutres et basiques, cependant avec des étapes de lavage et d'élution différentes selon la charge du soluté.

En se basant sur des protocoles proposés par le fabricant et par Lenders *et al.* [36] pour les composés basiques, nous avons réalisé l'extraction d'un mélange standard contenant le 3-MT, composé aminé, et le HVA, composé acide, sur une cartouche AccuCAT avec 200 mg de phase, selon le protocole suivant :

Protocole I AccuCAT

- *conditionnement*: 5 mL HCOONH₄ à 2,5% dans le MeOH;
2 mL NaOH à 1% dans le MeOH;
2 mL H₂O ;
- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M;
- *lavage*: 5 mL solution aqueuse de CH₃COONH₄ 10 mM et MeOH (9/1 v/v);
5 mL solution aqueuse de (NH₄)₃PO₄ 10 mM pH 6;
5 mL H₂O;
- *élution* : 2 mL HCOONH₄ à 2,5% dans le MeOH.

L'analyse CPL des différentes fractions récupérées a montré que le HVA n'est pas retenu par la cartouche dans ces conditions (récupération au niveau du lavage), mais que le 3-MT est bien retenu et qu'il est récupéré avec un rendement de 102% après l'étape d'élution. Nous avons ainsi vérifié que les composés acides ne pouvaient pas être retenus dans des conditions de protocole favorables à la rétention des composés aminés.

Nous avons alors évalué si une rétention des composés aminés pouvait être envisagée en appliquant un protocole adapté à l'extraction des solutés acides :

Protocole II AccuCAT

- *conditionnement*: 9 mL solution aqueuse de NaHCOO 100 mM, pH 6;
4 mL MeOH;
4 mL H₂O ;
- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à 10 µg.mL⁻¹ dans HClO₄ 0,2 M;
- *lavage*: 4 mL acétone;
- *élution* : 4 mL HCOOH à 200 mM dans le MeOH.

Dans ces nouvelles conditions, malheureusement une rétention simultanée des solutés acides et basiques n'a pas pu être mise en évidence.

III.2.4. Bilan sur l'extraction sur support échangeur d'ions

Dans ce paragraphe nous avons pu voir que seul un support polymérique échangeur fort de cations permet la rétention par échange d'ions de toutes les catécholamines ayant dans leur structure un groupement amine protonable. Les composés acides de notre mélange ne sont retenus sur ce support que par des interactions lipophiles, puisqu'ils sont élués de la cartouche lors de l'étape de lavage au MeOH. Nous n'avons donc pas réussi à trouver un protocole unique permettant l'extraction simultanée des composés aminés et acides de notre mélange de 12 catécholamines sur support échangeur d'ions.

Par ailleurs, un problème important dans l'extraction sur support échangeur fort de cations est lié aux quantités importantes de sels nécessaires pour l'élution des composés aminés, quantités qui n'arrivent pas à s'évaporer et se retrouvent concentrées dans l'échantillon reconstitué et injecté entraînant des déformations des pics et une quantification difficile dans le système chromatographique. Nous nous sommes donc orientées vers l'utilisation d'autres types de supports.

III.3. Cartouche de type C18

Dans le chapitre II nous avons vu que les catécholamines étaient retenues et séparées sur support C18 seulement en présence d'agents d'appariement d'ions. Comme nous l'avons mentionné précédemment les mécanismes de rétention en SPE sont très similaires à ceux de la CPL, nous avons donc testé les capacités d'extraction des cartouches C18 en ajoutant du NFPA comme agent d'appariement d'ions lors des 3 premières étapes (conditionnement, dépôt et lavage) pour favoriser la rétention de nos solutés sur ce support de type C18.

Le protocole suivant a été testé sur une cartouche remplie d'un polymère greffé C18 (100 mg de phase) pour l'extraction d'un mélange standard de 8 catécholamines (A, NA, DHBA, DOPA, DA, Tyr, Trp et S) qui détiennent un groupement fonctionnel aminé capable de former la paire d'ions avec l'acide perfluoré ; bien qu'il détienne un groupement amine primaire dans sa structure, le 3-MT ne fait pas partie de ce mélange car ce composé coélué avec la S en CPL (pas de quantification possible en UV).

Protocole C18 en appariement d'ions :

- *conditionnement*: 6 mL MeOH ;
8 mL solution aqueuse NFPA 10 mM;
- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans HClO_4 0,2 M et NFPA 5 mM;
- *lavage*: 4 mL solution aqueuse de NFPA 1,25 mM;
- *élution* : 0,5 mL TFA 0,1% dans MeOH.

Ce protocole ne nous a pas permis de retenir sur la cartouche 4 solutés (NA, A, DHBA et DOPA) récupérés dans le dépôt et le lavage. Des quantités importantes de DA et Tyr ont aussi été perdues lors de l'étape de lavage. En revanche S et Trp sont extraits avec des rendements satisfaisants (supérieurs à 85%).

Cette approche d'une rétention sur support C18 avec formation de paire d'ions ne s'est pas avérée satisfaisante puisque seules deux catécholamines peuvent être retenues, nous nous sommes donc orientées vers le support PGC qui est plus rétentif que le support C18 en CPL [37].

III.4. Cartouche de type PGC

III.4.1. Optimisation d'un protocole SPE en appariement d'ions

Rinne *et al.* [38] ont déjà testé pour l'extraction de NA, DA, A et S une précolonne capillaire en PGC sur un système SPE-CPL en ligne. Pour le dépôt sur la précolonne, ils ont utilisé une phase mobile aqueuse contenant 0,1% d'acide pentafluoropropionique (PFPA) comme agent d'appariement d'ions.

En se basant sur les résultats que nous avons obtenus en chromatographie d'appariement d'ions sur support PGC et sur ceux de Rinne *et al.* [38], nous avons testé le protocole suivant pour une cartouche PGC avec 25 mg de phase pour un mélange standard de Trp, DHBA et 5HIAA. Ces solutés sont choisis comme représentants des trois classes des composés de notre mélange : les acides aminés, les amines et les acides, respectivement.

Protocole I PGC :

- *conditionnement*: 3 mL MeOH;
4 mL solution aqueuse NFPA 20 mM;
- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans HClO_4 0,2 M;
- *lavage*: 4 mL H_2O ;
- *élution* : 0,5 mL TFA 5% dans MeOH;
0,5 mL TFA 5% dans ACN.

Si la rétention et l'élution de Trp, dans ces conditions, ne posent pas de problèmes en ce qui concerne le DHBA une partie importante est perdue lors du dépôt et seulement une petite partie est récupérée lors de l'élution. De plus, comme nous l'avons déjà observé en CPL, l'élution de 5HIAA du support PGC n'est pas possible à cause de sa structure plane associée à son caractère anionique. Dans le site de notre étude, le 5HIAA ne sera plus introduit dans le mélange déposé, du fait de sa trop grande rétention, ainsi que les deux autres composés acides (HVA et DOPAC).

Nous avons ensuite modifié le conditionnement de la cartouche en augmentant la concentration de la solution de NFPA de 20 mM à 100 mM. Avec ce nouveau protocole nous avons essayé l'extraction d'un mélange de 6 solutés : DHBA, Tyr, DA, 3-MT, NA et A. De nouveau une partie des composés n'est pas bien retenue sur la cartouche : DHBA, NA, DA et une quantité importante de A est récupérée dans la fraction de lavage. L'augmentation de la concentration de l'agent d'appariement d'ions, uniquement lors du conditionnement, n'ayant pas amélioré la rétention des solutés test nous avons évalué l'effet des agents d'appariement avec une chaîne carbonée plus longue (TDFHA et PDFOA), mais sans succès. Nous avons donc conservé le NFPA pour nos essais ultérieurs.

Pour favoriser la formation de la paire d'ions entre nos solutés et l'acide perfluoré nous avons, d'une part, ajouté l'agent d'appariement d'ions directement dans la solution déposée sur la cartouche (solution de dépôt) et, d'autre part, remplacé le lavage à l'eau (**Protocole I PGC**) par un lavage avec une solution aqueuse de NFPA, afin de garder un pH acide durant l'extraction. Le nouveau protocole que nous avons appliqué au mélange des 6 composés sélectionnés est le suivant:

Protocole II PGC

- *conditionnement*: 3 mL MeOH;

5 mL solution aqueuse NFPA 1,25 mM;

- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans HClO_4 0,2 M/NFPA 1,25 mM (50/50 v/v);

- *lavage*: 2 mL solution aqueuse NFPA 1,25 mM;

- *élution* : 2 x 0,5 mL TFA 0,1% dans MeOH.

Dans ces conditions la rétention des 6 composés a été obtenue, sans perte au niveau des étapes de dépôt et de lavage. Nous avons pu observer aussi que la deuxième élution (0,5 mL TFA 0,1% dans MeOH) n'était pas nécessaire, étant donné qu'aucun pic n'était détecté dans ce deuxième volume d'élution. A l'exception de la NA, pour tous les autres composés les rendements de récupération excèdent 60%. La formation de paire d'ions entre le soluté et

l'agent d'appariement d'ions avant le dépôt sur le support est donc indispensable pour obtenir de la rétention.

Afin d'améliorer les rendements d'extraction nous avons étudié l'influence de la concentration en NFPA aussi bien dans la solution utilisée pour le conditionnement de la cartouche que dans la solution de dépôt. La figure V.9. récapitule les résultats obtenus.

Pour l'influence de la concentration de NFPA dans la solution de dépôt, nous avons gardé constante la concentration de NFPA dans la solution de conditionnement de la cartouche (1,25 mM). Les rendements d'extraction semblent très peu affectés par l'augmentation de la concentration de NFPA (entre 1,25 et 50 mM) dans la solution de dépôt (figure V.9.a). L'essentiel est donc la présence de l'agent d'appariement d'ions dans le solvant de dépôt pour que la paire d'ions avec les catécholamines se forme. Toutefois nous pouvons constater que le rendement maximal est obtenu avec 5 ou 10 mM de NFPA (selon le composé). Au-delà, une perte de rendement est à nouveau observée pour tous les solutés. Nous avons donc retenu pour la suite de notre travail une concentration de 5 mM en NFPA dans la solution de dépôt.

La figure V.9.b met en évidence l'influence de la concentration de NFPA dans la solution de conditionnement. Même en l'absence de NFPA, la rétention des catécholamines est suffisante, ce qui prouve que la paire d'ions est majoritairement formée dans la phase mobile au moment du dépôt, avant de s'adsorber sur la phase stationnaire. À l'exception de NA, pour tous les autres composés les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec une concentration de 10 mM de NFPA dans la solution de conditionnement.

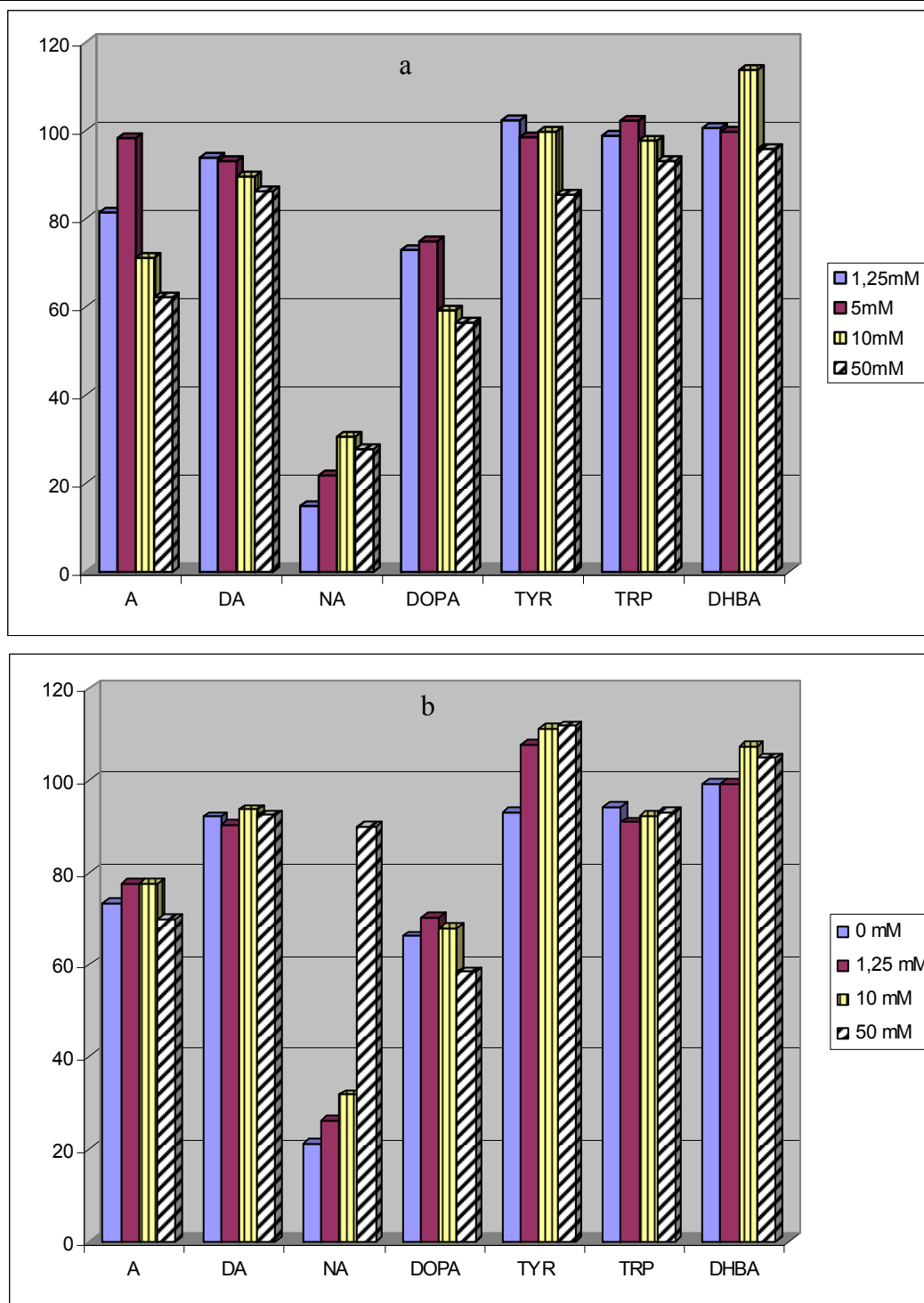


Figure V.9. Influence de la concentration de NFPA sur les rendements d'extraction
a. concentration de NFPA dans la solution de dépôt
b. concentration de NFPA dans la solution de conditionnement de la cartouche

En conclusion de ces études, les conditions optimales que nous avons retenues pour le protocole sont les suivantes (cartouche PGC, 25 mg de phase):

Protocole III PGC :

- conditionnement: 3 mL MeOH;

5 mL solution aqueuse NFPA 10 mM;

- *dépôt*: 1 mL solution standard préparée à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans HClO_4 0,2 M/NFPA 5 mM (50/50 v/v);

- *lavage*: 2 mL solution aqueuse NFPA 1,25 mM;

- *élution* : 0,5 mL TFA 0,1% dans MeOH.

Dans les conditions de ce nouveau protocole de bons rendements d'extraction (excédant 60%) sont obtenus pour la majorité des solutés. Pour NA le rendement reste inférieur à 50%. L'utilisation d'une cartouche PGC contenant 50 mg de phase au lieu de 25 mg conduit à une amélioration du rendement d'extraction pour NA qui, dans ces conditions, dépasse 80%.

Nous avons réalisé une étude de répétabilité des rendements d'extraction pour les 7 solutés suivants : A, NA, DA, DHBA, Trp, Tyr et S. Les résultats sont présentés dans le tableau V.4. Pour NA, DA, DHBA, Tyr et Trp on peut voir que de très bons rendements d'extraction (supérieurs à 90%) et des coefficients de variation (CV) acceptables (la plupart inférieurs à 5%), ont été obtenus. Par contre pour la S et A des rendements d'extraction inférieurs à 80% sont observés avec une variabilité plus importante (CV supérieur 7%).

Tableau V.4. Répétabilité des rendements d'extraction sur support PGC

Produit	Rendement d'extraction				Moyenne	Ecartype	CV
	1	2	3	4			
A	64,0	60,2	77,6	86,1	72,0	10,4	14,5
DA	96,5	88,5	97,5	99,8	95,6	4,3	4,5
NA	97,0	91,9	97,3	96,4	95,7	2,2	2,3
TYR	102,4	96,4	106,0	92,9	99,4	5,1	5,1
TRP	100,5	93,1	100,7	98,8	98,3	3,1	3,1
S	76,6	87,6	75,6	70,7	77,6	6,2	7,9
DHBA	102,3	98,3	103,8	102,6	101,7	2,1	2,1

* les rendements d'extraction ont été calculés par rapport aux aires des pics obtenus lors de l'analyse CPL-UV de la solution déposée sur la cartouche

III.4.2. Bilan sur l'extraction sur PGC

La cartouche PGC utilisée dans des conditions d'appariement d'ions offre une rétention pour les composés ayant un groupement amine dans leur structure. Ce système ne convient pas pour l'extraction des composés acides, car ils ne peuvent pas être élués dans ces conditions.

Ce système de préparation d'échantillon, même s'il n'est pas adapté à l'ensemble de nos 12 catécholamines, est complémentaire du système mis au point sur la cartouche

polymérique hydrophile-lipophile Oasis HLB pour l'extraction des composés acides. Une combinaison de ces deux systèmes pourra assurer l'extraction de tous les solutés sélectionnés.

IV. Application des 2 protocoles SPE optimisés à l'analyse d'un échantillon biologique (extrait de cerveau de mouton)

Pour l'analyse d'échantillons biologiques nous avons retenu les deux supports (Oasis HLB et PGC) qui ensemble devraient assurer l'extraction de tous les solutés du mélange standard.

A l'appui des protocoles différents d'extraction sur les deux cartouches et en vue de leur couplage, il apparaît évident de placer en premier la cartouche HLB, car cette cartouche assure la rétention des composés acides que l'on n'arrive pas à éluer de la cartouche PGC et ne nécessite pas de conditionnement particulier.

Nous avons réalisé d'abord séparément sur les deux cartouches, des extractions de catécholamines dans des échantillons d'extrait dopé de cerveau de mouton afin de vérifier d'une part l'influence de la présence de la matrice sur les rendements d'extraction et d'autre part l'efficacité de la SPE pour éliminer les constituants « indésirables » de la matrice. Puis nous avons ensuite réalisé la préparation d'échantillon en couplant les 2 cartouches.

IV.1. SPE de l'extrait du cerveau du mouton sur support Oasis HLB

Dans un premier temps nous avons réalisé la SPE d'un extrait de cerveau non dopé pour vérifier si les constituants de la matrice autres que les catécholamines sont éliminés avant l'étape d'élution.

L'extraction a été réalisée selon le Protocole I Oasis HLB (page 266). Les fractions récupérées après chaque étape de la SPE ont été analysées en HPLC-UV à 2 longueurs d'onde (λ) différentes : 280 nm (λ_{max} des catécholamines) et 254 nm (λ moins spécifique). La figure V.10. présente les chromatogrammes (enregistrés à 280 nm) des différents fractions de la SPE.

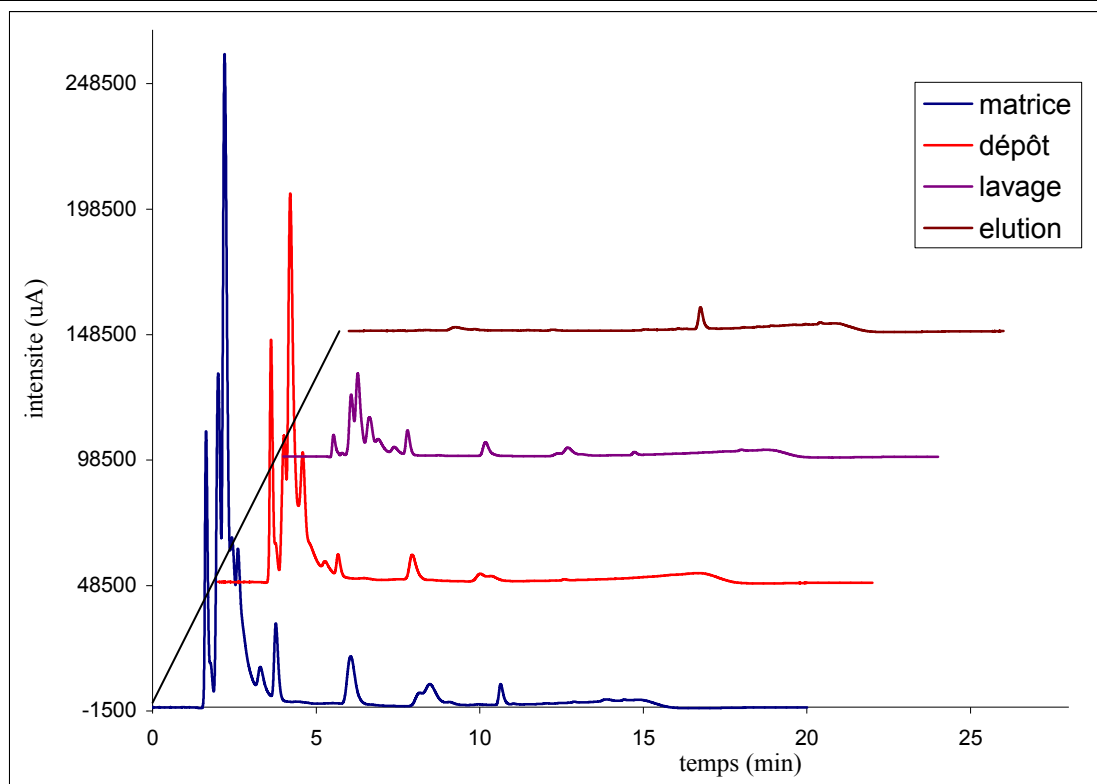


Figure V.10. Analyses des différentes fractions correspondant aux étapes de la SPE d'un extrait de cerveau sur support Oasis HLB

Colonne : Onyx (L x Ø = 100 x 4,6 mm). Phase mobile: MeOH/NFPA 1,2 mM pH 2,9 en gradient d'élution : 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min, et en 0,1 min retour aux conditions initiales pour le rééquilibrage de la colonne. Débit : 1 mL.min⁻¹. Détection : UV à 280 nm.

Sur le chromatogramme de la matrice non-extraite (trace bleue) on peut voir qu'une partie importante des constituants de la matrice est éluée entre 1 et 4 min. La quasi-totalité des ces composés est éliminée lors des étapes de dépôt et de lavage démontrant ainsi l'efficacité de notre système SPE en ce qui concerne la purification de l'échantillon. Dans la fraction obtenue lors de l'élution principalement un pic à 10,6 min est apparu, son temps de rétention correspond au temps de rétention du 5HIAA, mais étant donné que l'intensité de ce pic à 254 nm (donnée non présentée) est deux fois plus importante qu'à 280 nm, il ne s'agit pas d'une catécholamine, mais d'un autre constituant de la matrice retenu par la cartouche dans les conditions d'extraction de nos solutés.

Nous avons procédé ensuite à l'extraction d'un échantillon d'extrait de cerveau dopé à 10 µg.mL⁻¹ avec DOPAC, 5HIAA, HVA, TRP et S. Le tableau V.5 montre les résultats que nous avons obtenus en termes de rendements d'extraction des catécholamines pour une même solution déposée sur deux cartouches en parallèle.

Tableau V.5. Rendements d'extraction de la matrice dopée sur support Oasis HLB

Produit	Rendement Série 1 (%)	Rendement Série 2 (%)	Moyenne	Ecartype	CV
DOPAC	94,8	94,1	94,4	0,4	0,4
HVA	94,1	91,8	92,9	1,1	1,2
5HIAA	105,9	104,7	105,3	0,6	0,5
TRP	84,6	81,1	82,9	1,8	2,2
S	63,7	59,5	61,6	2,1	3,4

* les rendements d'extraction ont été calculés par rapport aux aires des pics obtenus pour l'injection d'une solution standard préparée dans le NFPA 1,25 mM à la même concentration que la matrice dopée déposée sur la cartouche

On peut voir que les rendements d'extraction de DOPAC et HVA sont très proches de ceux obtenus pour l'extraction d'un mélange standard (97 %) (Tableau V.2). Pour 5HIAA un rendement supérieur à celui obtenu pour le mélange standard est très probablement causé par le pic parasite qui est élué au même temps de rétention. La présence de la matrice n'a pas d'effet négatif sur la rétention attendue des composés acides du mélange. Pour S et Trp des rendements inférieurs d'au moins 10% par rapport à ceux observés en mélange standard sont observés, ce qui traduit une perte de ces molécules pendant la SPE, probablement entraînées par des constituants de la matrice éliminés de la cartouche au moment du dépôt et/ou du lavage. Ce phénomène n'est pas dommageable dans la mesure où ces deux composés sont retenus aussi sur la cartouche PGC.

IV.2. SPE d'un extrait de cerveau de mouton sur support PGC

Comme sur cartouche Oasis HLB, nous avons d'abord réalisé l'extraction de la matrice non-dopée sur support PGC. Nous avons effectué deux SPE selon le protocole optimisé sur PGC (*Protocole III PGC* page 282). Pour la première SPE nous avons déposé directement 1 mL d'extrait de cerveau préparé dans l'acide perchlorique 0,2 M et pour la deuxième SPE le dépôt a été effectué après avoir mélangé 500 µL d'extrait de cerveau préparé dans l'acide perchlorique et 500 µL d'une solution aqueuse de NFPA 10 mM. La figure V.11 présente les chromatogrammes des différentes fractions obtenues après les deux SPE.

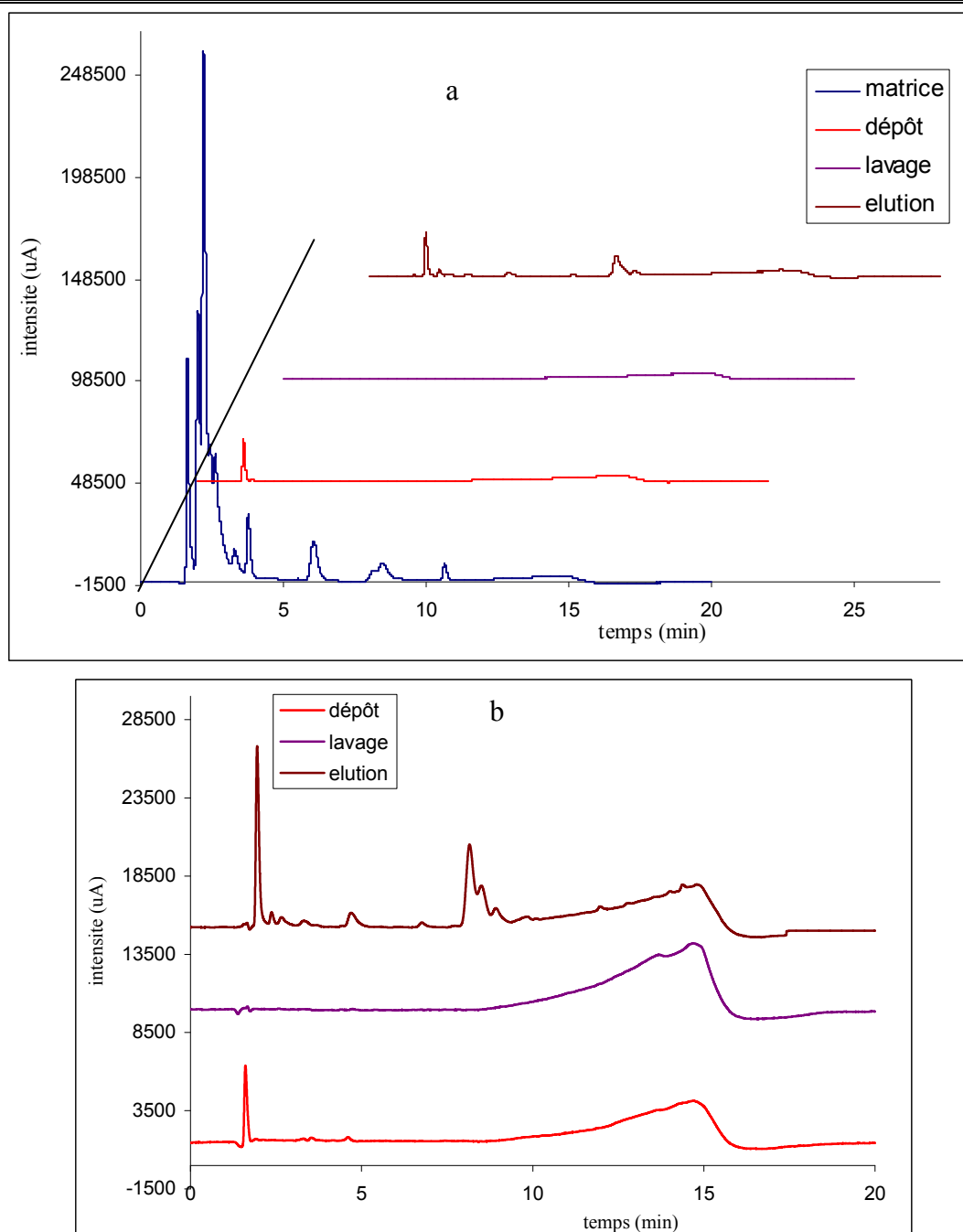


Figure V.11. Analyses des différentes fractions correspondant aux étapes de la SPE d'un extrait de cerveau sur support PGC :

a. première SPE (dépôt 1 mL extrait de cerveau)

b. deuxième SPE (dépôt 1 mL extrait de cerveau dilué 1/1 avec NFPA)

Colonne : Onyx C18 (L x Ø = 100 x 4,6 mm). Phase mobile: MeOH/NFPA 1,2 mM pH 2,9 en gradient d'élution : 5% de MeOH de 0 à 5 min, de 5 à 20% MeOH de 5 à 8 min, de 20 à 40% MeOH de 8 à 12 min, et en 0,1 min retour aux conditions initiales pour le rééquilibrage de la colonne. Débit : 1 mL.min⁻¹. Détection : UV à 280 nm.

Les deux figures V.11 a et b mettent en évidence clairement que l'ajout de NFPA dans l'échantillon avant son dépôt ne modifie pas globalement la composition des différentes solutions analysées (aucun pic supplémentaire dans la figure V.11. b par rapport à la figure

V.11. a. n'est observé), seul l'effet de dilution est remarqué. Par rapport au support HLB où la plupart des constituants de la matrice sont éliminés lors du dépôt et du lavage, sur le PGC ces constituants sont complètement retenus sur le support, puisqu'on ne les retrouve qu'en très faible proportion dans la fraction d'élution et qu'ils ne sont pas présents dans la fraction de dépôt ou dans la fraction de lavage. Trois groupes de pics d'intensité non négligeable sont identifiés dans la fraction d'élution : le premier groupe élué dans le volume mort n'entraîne pas de difficultés lors de l'analyse de l'extrait dopé puisque dans les conditions d'analyse chromatographique les catécholamines ont des temps de rétentions supérieurs. Les deux autres groupes correspondent à des solutés qui ont des rétentions comparables à celles de NA, Tyr et DHBA. La présence de ces constituants dans la matrice pourra rendre difficile la quantification de ces trois catécholamines lors de l'analyse CPL-UV de la matrice dopée due à des déformations probables de pics pour les 3 solutés (NA, Tyr et DHBA). Les rendements d'extraction de NA, DHBA et Tyr ne pourront pas être calculés avec précision (intégration difficile des pics chromatographiques pour ces composés). Le tableau V.6 montre les résultats que nous avons obtenus en termes de rendement d'extraction des catécholamines de la matrice dopée à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec NA, A, DOPA, DA, DHBA, S, Tyr et Trp, sur la cartouche PGC avec analyse en CPL-UV.

Tableau V.6. Rendements d'extraction de la matrice dopée sur support PGC

Produit	Rendement (%)
NA	120,5
DOPA	61,2
A	78,2
DHBA	128,9
TYR	123,4
DA	90
S	86,6
Trp	93

** les rendements d'extraction ont été calculés par rapport aux aires des pics obtenus pour l'analyse CPL-UV d'une solution standard préparée dans le NFPA 1,25 mM à la même concentration que la matrice dopée déposée sur la cartouche*

Pour 5 catécholamines (A, DA, Trp, DOPA, S) les rendements d'extraction obtenus sont semblables à ceux du mélange standard indiquant une bonne récupération de ces composés et l'absence d'effet matrice. Comme attendu les rendements d'extraction dans la matrice dopée pour NA, Tyr et DHBA sont supérieurs à ceux obtenus pour le mélange standard (tableau V.4), l'interférence avec les pics de la matrice est bien confirmée. Une

analyse SM devrait nous permettre de nous affranchir de l'influence de ces constituants de la matrice pour une quantification plus exacte. Nous l'avons vu dans le chapitre précédent, parmi ces trois solutés (NA, DHBA, Tyr) seule Tyr est présente dans l'extrait du cerveau du mouton.

IV.3. SPE d'un extrait de cerveau de mouton sur les deux supports Oasis HLB et PGC

En dernier lieu nous avons procédé à l'extraction d'un extrait dopé de cerveau de mouton à 10 ppm avec les 12 catécholamines de notre mélange sur les deux cartouches sélectionnées : l'Oasis HLB et la PGC. 1 mL d'extrait de cerveau dopé a été déposé sur la cartouche Oasis HLB, les fractions récupérées après le dépôt (~1 mL) et après le lavage (~3 mL) ont été réunies et mélangées avec 4 mL de solution aqueuse de NFPA 10 mM avant d'être déposées sur la cartouche PGC. Les extractions ont été réalisées sur chaque cartouche selon le protocole optimisé pour chacune, les fractions d'élution étant récupérées dans un même flacon et ensuite évaporées sous flux d'azote.

Le tableau V.7 présente les rendements d'extraction moyens obtenus pour l'extraction sur les deux supports. La coélution de 3-MT et de S rendant impossible le calcul de rendement d'extraction de chacun de ces solutés, le tableau V.7 présente un rendement global pour ces deux composés.

Tableau V.7. Rendements d'extraction de la matrice dopée sur les deux supports Oasis HLB puis PGC

Produit	Rendement (%)
NA	34,0
DOPA	66,3
A	69,6
DOPAC	94,7
DHBA	149,5
TYR	207,9
DA	86,0
5HIAA	99,1
HVA	106,7
S	76,4
3-MT	
Trp	92,3

** les rendements d'extraction ont été calculés par rapport aux aires des pics obtenus pour l'analyse CPL-UV d'une solution standard préparée dans le NFPA 1,25 mM à la même concentration que la matrice dopée déposée sur la cartouche*

A l'exception de la NA pour laquelle un faible rendement d'extraction est obtenu (perte de NA lors du lavage sur PGC), pour le reste des composés des rendements

d'extraction semblables à ceux obtenus pour les SPE réalisées séparément sur chacune des cartouches ont été obtenus. Comme remarqué précédemment, la coélution de la DHBA et de la Tyr avec d'autres composants de la matrice rend impossible leur dosage en LC-UV. La spécificité de la spectrométrie de masse pourra résoudre ce problème ainsi que celui de la quantification de S et 3-MT (composés coélus).

V. Conclusions

Ce dernier chapitre présente nos essais concernant la mise au point d'une méthode d'extraction des catécholamines. Dans le but de réaliser l'extraction de tous les solutés en utilisant une seule cartouche SPE, plusieurs types de support ont été testés, parmi eux : des supports échangeurs de cations, des supports hydrophiles-lipophiles, des supports C18 et des supports PGC.

Nous avons vu que les cartouches échangeuses faible de cations n'offrent pas une rétention suffisante pour les catécholamines, mais que par contre, la rétention trop importante des supports échangeurs forts de cations nous oblige à l'utilisation de fortes concentrations en sel dans le solvant d'élution avec des effets néfastes sur l'allure du chromatogramme de la fraction d'élution.

Les supports hydrophiles-lipophiles offrent une rétention suffisante seulement pour les composés ayant des $\log P > 1$ (DOPAC, HVA, 5HIAA, S et Trp).

Les supports de type C18 et PGC n'offrent de la rétention qu'en mode appariement d'ions. Dans ces conditions des meilleurs résultats sont obtenus sur la cartouche PGC qui assure la rétention d'un nombre plus important de composés que la C18.

Comme malheureusement aucun des supports testés ne nous a offert la possibilité de réaliser l'extraction des 12 catécholamines de notre mélange standard, nous avons choisi d'utiliser un couplage de deux cartouches différentes : Oasis HLB et PGC qui ensemble, assurent l'extraction de tous les composés du mélange avec des bons rendements d'extraction et avec des protocoles simples.

Les cartouches sélectionnées ont été testées avec succès pour l'extraction d'un échantillon dopé de cerveau du mouton avec les 12 catécholamines de notre mélange. La méthode SPE que nous avons mise au point permet la purification des échantillons (une partie importante des composants de la matrice est éliminée lors de cette étape) et aussi une préconcentration des échantillons.

Références bibliographiques

- [1] V. Camel, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 58 (2003) 1177.
- [2] M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3.
- [3] M.A. Raggi, C. Sabbioni, G. Nicoletta, R. Mandrioli, G. Gerra, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1141.
- [4] K. Vuorensola, H. Sirén, U. Karjalainen, *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 277.
- [5] N. Unceta, E. Rodriguez, Z.G. de Balugera, C. Sampedro, M.A. Goicolea, S. Barrondo, J. Sallés, R.J. Barrio, *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 211.
- [6] R.L. Taylor, R.J. Singh, *Clin. Chem.* 48 (2002) 533–539.
- [7] R.P.H. Nikolajsen, Å.M. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 449 (2001) 1.
- [8] K. Vuorensola, H. Sirén, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 317.
- [9] K. Vuorensola, H. Sirén, R. Kostianen, T. Kotiaho, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 179.
- [10] H. Sirén, R. Kuldvee, T. Karla, T. Ekström, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 89.
- [11] M.A. Raggi, V. Pucci, C. Sabbioni, S. Furlanetto, G. Gerra, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 275.
- [12] S.A. Legerstedt, D.J. O'Kane, R.J. Singh, *Clin. Chem.* 50 (2004) 603.
- [13] M. Machida, A. Sakaguchi, S. Kamada, T. Fujimoto, S. Takechi, S. Kakinoki, A. Nomura, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 249.
- [14] H. Sirén, M. Mielonen, M. Herlevi, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 289.
- [15] E. Nalewajko, A. Wiszowata, A. Kojlo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1673.
- [16] D. Talwar, C. Williamson, A. McLaughlin, A. Gill, D.S.J. O'Reilly, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 341.
- [17] M.A. Fotopoulou, P.C. Ioannou, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 179.
- [18] Å.M. Hansen, J. Kristiansen, J.L. Nielsen, K. Byrialsen, J.M. Christensen, *Talanta* 50 (1999) 367.
- [19] M. Roden, W. Rafflesberg, W. Raber, E. Bernroider, B. Niederle, W. Waldhausl, S. Gasic, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1061.
- [20] M.A. Saracino, R. Mandrioli, L. Mercolini, A. Ferranti, A. Zaimovic, C. Leonardi, M.A. Raggi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 107.
- [21] Z.D. Peterson, M.L. Lee, S.W. Graves, *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 101.
- [22] W.H.A. de Jong, K.S. Graham, J.C. van der Molen, T.P. Links, M.P. Morris, H.A. Ross, E.G.E. de Vries, I.P. Kema, *Clin. Chem.* 53 (2007) 1684.
- [23] A. Thomas, H. Geyer, H.J. Mester, W. Schonzer, E. Zimmermann, M. Thevis, *Chromatographia* 64 (2006) 587.
- [24] W.H.A. de Jong, K.S. Graham, E.G.E. de Vries, I.P. Kema, *J. Chromatogr. B* 868 (2008) 28.
- [25] I.P. Kema, W.G. Meijer, G. Meirborg, B. Ooms, P.H.B. Willemse, E.G.E. de Vries, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1811.
- [26] M. Hay, P. Mormède, *J. Chromatogr. B* 703 (1997) 15.
- [27] E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.C. Ho, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 515.
- [28] T.A. Neubecker, M.A. Coombs, M. Quijano, T.P. O'Neill, C.A. Cruze, R.L.M. Dobson, *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 225–233.
- [29] W. Li, D.T. Rossi, S.T. Fountain, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 325.
- [30] S. Xie, R.F. Suckow, T.B. Cooper, *J. Chromatogr. B* 677 (1996) 37.
- [31] P. Kumarathanan, R. Vincent, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 349.
- [32] Y. Wang, D.S. Fice, P.K.F. Yeung, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 519.
- [33] M. Lee, S.Y. Oh, T.S. Pathak, I.R. Paeng, B.Y. Cho, K.J. Paeng, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 340.

- [34] E. Rozet, R. Morello, F. Lecomte, G.B. Martin, P. Chiap, J. Crommen, K.S. Boos, P. Hubert, J. Chromatogr. B 844 (2006) 251.
- [35] E. Rozet, W. Dewé, R. Morello, P. Chiap, F. Lecomte, E. Ziemons, K.S. Boos, B. Boulanger, J. Crommen, P. Hubert, J. Chromatogr. A 1189 (2008) 32.
- [36] J.W.M. Lenders, G. Eisenhofer, I. Armando, H. Keiser, D.S. Goldstein, I.J. Kopin, Clin. Chem. 39 (1993) 97.
- [37] M.-C. Hennion, J. Chromatogr. A 885 (2000) 73.
- [38] S. Rinne, A. Holm, E. Lunadanes, T. Greibrokk, J. Chromatogr. A 1119 (2006) 285.

Conclusions generales

CONCLUSIONS GENERALES

Les neurotransmetteurs sont des substances chimiques qui assurent la transmission de l'information à l'intérieur du cerveau. Les catécholamines et les indolamines font partie de la famille de neurotransmetteurs. Des déséquilibres dans leurs concentrations ont été associés à différentes maladies neurodégénératives telles : la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, ou bien à des troubles psychiques tels : la schizophrénie, la dépression et les troubles anxieux.

La mise au point de méthodes d'analyse rapides, précises et sensibles pour les catécholamines et les indolamines dans les fluides biologiques a fait l'objet de ce travail. De nouveaux systèmes compatibles avec une détection par spectrométrie de masse ont été développés. Pour la séparation chromatographique des composés d'intérêt, deux approches ont été explorées : la chromatographie d'appariement d'ions (IP-LC) et la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC).

La chromatographie à polarité de phases inversée sur des supports couramment utilisés, de type silice greffée C18 et PGC, mais aussi sur d'autres moins courants tels le support pentafluorophényle ou un support mode mixte phase inverse et échange de cations, n'a pas permis d'obtenir de séparations satisfaisantes pour le mélange de catécholamines sélectionnées.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à la chromatographie d'appariement d'ions avec des agents d'appariement d'ions volatils de la famille des acides perfluorés. Ainsi nous avons étudié l'influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique et l'influence de la nature de l'agent d'appariement d'ions sur la séparation des catécholamines en utilisant divers supports C18 et carbone graphite poreux (PGC). Ces deux supports ont permis des séparations de catécholamines compatibles avec une détection SM.

Nous avons transposé, ensuite, sur deux colonnes dédiées à la chromatographie rapide : une colonne monolithique et une colonne avec des particules « fused core », la méthode optimisée sur le support C18 conventionnel. Des bons résultats ont été obtenus sur ces colonnes en mode gradient d'élution, étant donné que, sur la colonne « fused core », nous avons obtenu une séparation totale des 12 composés de notre mélange standard. Ce sont aussi ces deux types de supports qui offrent la meilleure efficacité pour les séparations.

Les systèmes optimisés en appariement d'ions ont été couplés à la spectrométrie de masse et leurs limites de détection ont été déterminées. Les meilleures valeurs de LODs (1 à 50 ng.mL⁻¹) ont été obtenues pour le système composé de la colonne monolithique C18 couplée au spectromètre de masse Sciex API 3000.

Ces systèmes IP-LC présentent le désavantage d'être incompatibles avec l'ionisation négative en SM à cause des acides utilisés comme agents d'appariement d'ions. Dans ces conditions la détection de DOPAC et HVA ne peut donc pas être réalisée.

Une solution à ce problème a pu être apportée grâce à la chromatographie d'interactions hydrophiles. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de rétention en mode HILIC, l'influence des paramètres tels que la nature et le pourcentage de modificateur organique, la nature et la concentration en sel, le pH et la température, a été étudiée afin d'évaluer le rôle de chacun dans la séparation des catécholamines, et d'une manière plus générale pour les séparations en mode HILIC. Nous avons mis en évidence le fait que trois de ces facteurs : le pourcentage de modificateur organique, la concentration en sel et le pH de la phase mobile, ont une contribution importante dans l'optimisation des séparations en mode HILIC. Des similitudes entre les colonnes vis-à-vis de la rétention et la séparation des composés étudiés ont été mises en évidence à l'aide de traitements statistiques (analyse en composantes principales). Grâce à ce travail nous avons pu proposer une procédure simple pour l'optimisation des séparations en mode HILIC.

Les 3 systèmes HILIC offrant les meilleures séparations ont été couplés à la spectrométrie de masse afin d'établir les limites de détection et de comparer la sensibilité des systèmes HILIC-SM/SM à celle des systèmes en appariement d'ions-SM/SM. Ainsi, nous avons mis en évidence le fait que la meilleure sensibilité est obtenue pour le système en mode HILIC composé de la colonne Pursuit Si et le spectromètre Sciex API 3000.

Les meilleurs systèmes (IP-LC et HILIC) ont été utilisés pour l'analyse d'un extrait de cerveau de mouton. La présence de Tyr et de Trp a été détectée dans cet extrait. Par la méthode des ajouts dosés la concentration de ces deux composés dans le cerveau de mouton a été évaluée à 0,6 µg.g⁻¹ pour le Trp et à 10 µg.g⁻¹ pour la Tyr. Le dosage des autres catécholamines a été réalisé par chromatographie d'appariement d'ions et par HILIC pour des échantillons dopés de cerveau.

Ces études ayant mis en évidence un important effet matrice ainsi que des LODs insuffisantes pour l'analyse directe des catécholamines dans l'extrait de cerveau, nous avons mis au point une méthode de purification et préconcentration par extraction sur phase solide.

Plusieurs types de support d'extraction ont été testés, parmi eux : des supports échangeurs de cations, des supports hydrophiles-lipophiles, des supports C18 et des supports PGC. À défaut d'un support capable de retenir tous les solutés de notre mélange, nous avons opté pour le couplage de deux cartouches différentes : Oasis HLB et PGC qui ensemble, assurent l'extraction de tous les composés du mélange avec des bons rendements d'extraction et avec des protocoles simples.

Les cartouches sélectionnées ont été testées avec succès pour l'extraction d'un échantillon de cerveau de mouton dopé avec les 12 catécholamines de notre mélange. La méthode SPE que nous avons mise au point permet:

- (i) la purification des échantillons (une partie importante des composants de la matrice est éliminée lors de cette étape);
- (ii) une préconcentration des échantillons.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de réaliser la mise au point d'un système de préparation d'échantillons ainsi que celle de nouveaux systèmes d'analyse des catécholamines compatibles avec une détection par spectrométrie de masse.

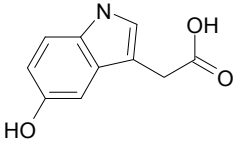
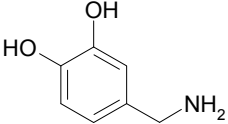
A la suite de ce travail plusieurs perspectives sont envisageables :

- i) le couplage SPE-CPL-MS/MS et l'automatisation du système par la réalisation de la SPE en ligne avec la CPL ;
- ii) le couplage de la méthode SPE – CPL optimisée avec le détecteur électrochimique par l'ajout d'un liquide additionnel à la sortie de la colonne chromatographique, pour pouvoir réaliser une détection électrochimique ;
- iii) la validation de la méthode en vue d'une utilisation en routine pour le dosage des catécholamines ;
- iv) tester la méthode sur d'autres fluides biologiques.

Annexes

ANNEXES Annexe 1. Structures chimiques des catécholamines étudiées

Nom (abréviation)	Structure chimique	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	pK _a *	Log P**
Adrénaline ou épinephrine (A ou E)		183	pK _{a1} = 8,66 pK _{a2} = 9,95	0,33
Noradrénaline ou norépinephrine (NA ou NE)		169	pK _{a1} = 8,64 pK _{a2} = 9,7	-0,08
Dopamine (DA)		153	pK _{a1} = 8,9 pK _{a2} = 10,6	0,85
Dihydroxyphényl alanine (DOPA)		197	pK _{a1} = 2,32 pK _{a2} = 8,72 pK _{a3} = 9,96 pK _{a4} = 11,79	0,58
Acide dihydroxyphényl acétique (DOPAC)		167	pK _{a1} = 4,4	1,11
3-méthoxytyramine (3-MT)		167	-	0,88
Acide homovanillique (HVA)		181	pK _{a1} = 4,43 pK _{a2} = 7,85	1,54
Tyrosine (Tyr)		181	pK _{a1} = 2,20 pK _{a2} = 9,11 pK _{a3} = 10,13	0,87
Tryptophane (Trp)		204	pK _{a1} = 2,43 pK _{a2} = 9,44	1,25
Sérotonine (S)		176	pK _{a1} = 9,80 pK _{a2} = 11,1	1,23

Nom (abréviation)	Structure chimique	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	pK _a *	Log P**
Acide 5 hydroxyindole acétique (SHIAA)		191	pK _{a1} = 4,51 pK _{a2} = 15,59 pK _{a3} = 9,92	1,49
Dihydroxybenzyle amine (DHBA)		139		0,59

* Valeurs de pKa d'après :

- D. Thiébaud, J. Vial, M. Michel, M.-C. Hennion, T. Greibrokk, J. Chromatogr. A 1122 (2006) 97

- R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Chromatographies en phases liquide et supercritique, 3^{ème} édition, Masson, Paris, 1991, pp 397-399

- Heli Sirén, Marjo Mielonen, Mare Herlevi, J. Chromatogr. A, 1032 (2004) 289

** Valeurs de Log P calculées par le logiciel Marvin 4.1.11

P (coefficient de partage eau – octanol) = C_{octanol}/C_{eau}

Annexe 2. Valeur cut off en UV pour les solvants les plus utilisés*

Solvant	UV cut off (nm)
Acétone	330
Acetonitrile	200
Acétate d'éthyle	265
Benzène	280
Chloroforme	245
Cyclohexane	210
Diéthyle éther	220
Diméthyle sulphoxyde	270
Ethanol	210
Hexane	255
Méthanol	200
Pentane	210
1-Propanol	200
Tétrachlorure de carbone	210
Tetrahydrofurane	215
Toluène	285

* Lough, W. J., Wainer, I. W. – High Performance Liquid Chromatography - Fundamental principles and practice, 1996, Blackie Academic & Professional

Annexe 3. Charges apparentes (z_i) de certains solutés en fonction du pH

$$z_i = \frac{\sum n[A^n]}{[A_0]}$$

n – charge de l'espèce A^n

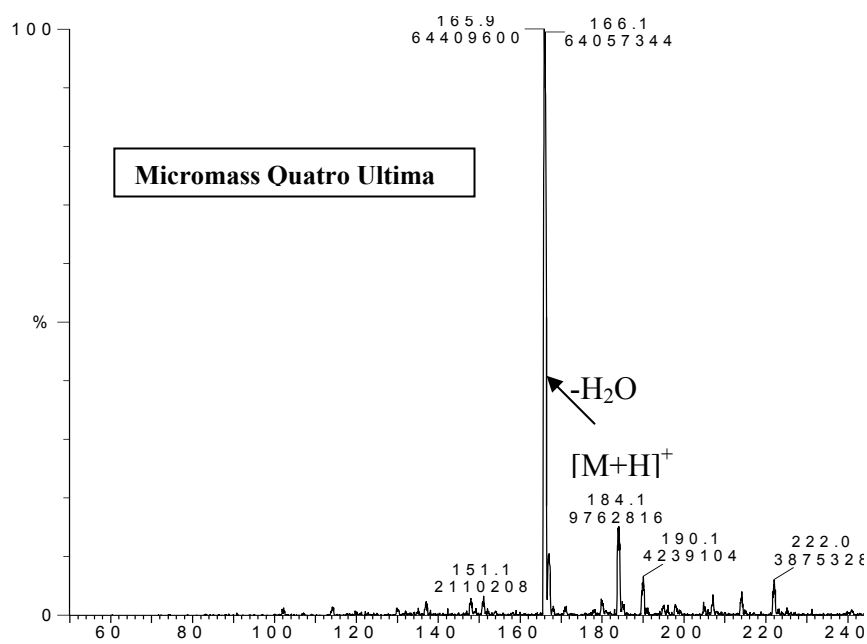
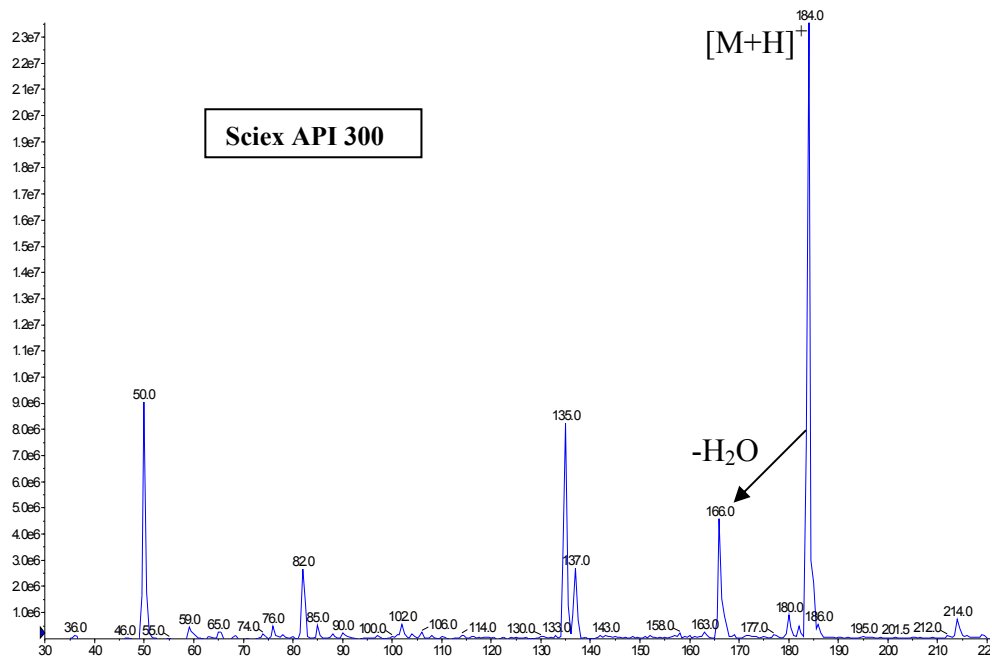
pH	DA	NA	A	Trp	S	Tyr	DOPA	DOPAC
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,00
0,1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,00
0,2	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,00
0,3	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,00
0,4	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,98	0,99	0,00
0,5	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,98	0,99	0,00
0,6	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,98	0,98	0,00
0,7	1,00	1,00	1,00	0,98	1,00	0,97	0,98	0,00
0,8	1,00	1,00	1,00	0,98	1,00	0,96	0,97	0,00
0,9	1,00	1,00	1,00	0,97	1,00	0,95	0,96	0,00
1	1,00	1,00	1,00	0,97	1,00	0,94	0,95	0,00
1,1	1,00	1,00	1,00	0,96	1,00	0,93	0,94	0,00
1,2	1,00	1,00	1,00	0,95	1,00	0,91	0,93	0,00
1,3	1,00	1,00	1,00	0,94	1,00	0,89	0,91	0,00
1,4	1,00	1,00	1,00	0,92	1,00	0,86	0,89	0,00
1,5	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	0,83	0,87	0,00
1,6	1,00	1,00	1,00	0,88	1,00	0,80	0,84	0,00
1,7	1,00	1,00	1,00	0,85	1,00	0,76	0,81	0,00
1,8	1,00	1,00	1,00	0,82	1,00	0,72	0,77	0,00
1,9	1,00	1,00	1,00	0,78	1,00	0,67	0,72	0,00
2	1,00	1,00	1,00	0,74	1,00	0,61	0,68	0,00
2,1	1,00	1,00	1,00	0,70	1,00	0,56	0,62	0,00
2,2	1,00	1,00	1,00	0,65	1,00	0,50	0,57	-0,01
2,3	1,00	1,00	1,00	0,59	1,00	0,44	0,51	-0,01
2,4	1,00	1,00	1,00	0,53	1,00	0,39	0,45	-0,01
2,5	1,00	1,00	1,00	0,48	1,00	0,33	0,40	-0,01
2,6	1,00	1,00	1,00	0,42	1,00	0,28	0,34	-0,02
2,7	1,00	1,00	1,00	0,37	1,00	0,24	0,29	-0,02
2,8	1,00	1,00	1,00	0,31	1,00	0,20	0,25	-0,02
2,9	1,00	1,00	1,00	0,27	1,00	0,17	0,21	-0,03
3	1,00	1,00	1,00	0,22	1,00	0,14	0,17	-0,04
3,1	1,00	1,00	1,00	0,19	1,00	0,11	0,14	-0,05
3,2	1,00	1,00	1,00	0,15	1,00	0,09	0,12	-0,06
3,3	1,00	1,00	1,00	0,13	1,00	0,07	0,09	-0,07
3,4	1,00	1,00	1,00	0,10	1,00	0,06	0,08	-0,09
3,5	1,00	1,00	1,00	0,08	1,00	0,05	0,06	-0,11
3,6	1,00	1,00	1,00	0,07	1,00	0,04	0,05	-0,14
3,7	1,00	1,00	1,00	0,05	1,00	0,03	0,04	-0,17
3,8	1,00	1,00	1,00	0,04	1,00	0,02	0,03	-0,20
3,9	1,00	1,00	1,00	0,04	1,00	0,02	0,03	-0,24
4	1,00	1,00	1,00	0,03	1,00	0,02	0,02	-0,28
4,1	1,00	1,00	1,00	0,02	1,00	0,01	0,02	-0,33

pH	DA	NA	A	Trp	S	Tyr	DOPA	DOPAC
4,2	1,00	1,00	1,00	0,02	1,00	0,01	0,01	-0,39
4,3	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,01	0,01	-0,44
4,4	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,01	0,01	-0,50
4,5	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,00	0,01	-0,56
4,6	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,00	0,01	-0,61
4,7	1,00	1,00	1,00	0,01	1,00	0,00	0,00	-0,67
4,8	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,72
4,9	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,76
5	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,80
5,1	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,83
5,2	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,86
5,3	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,89
5,4	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,91
5,5	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,93
5,6	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,94
5,7	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,95
5,8	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,96
5,9	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,97
6	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,98
6,1	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,98
6,2	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,98
6,3	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,99
6,4	1,00	0,99	0,99	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,99
6,5	1,00	0,99	0,99	0,00	1,00	0,00	-0,01	-0,99
6,6	1,00	0,99	0,99	0,00	1,00	0,00	-0,01	-0,99
6,7	0,99	0,99	0,99	0,00	1,00	0,00	-0,01	-1,00
6,8	0,99	0,99	0,99	0,00	1,00	0,00	-0,01	-1,00
6,9	0,99	0,98	0,98	0,00	1,00	-0,01	-0,01	-1,00
7	0,99	0,98	0,98	0,00	1,00	-0,01	-0,02	-1,00
7,1	0,98	0,97	0,97	0,00	1,00	-0,01	-0,02	-1,00
7,2	0,98	0,96	0,97	-0,01	1,00	-0,01	-0,03	-1,00
7,3	0,98	0,96	0,96	-0,01	1,00	-0,02	-0,04	-1,00
7,4	0,97	0,95	0,95	-0,01	1,00	-0,02	-0,05	-1,00
7,5	0,96	0,93	0,93	-0,01	1,00	-0,02	-0,06	-1,00
7,6	0,95	0,92	0,92	-0,02	0,99	-0,03	-0,07	-1,00
7,7	0,94	0,90	0,90	-0,02	0,99	-0,04	-0,09	-1,00
7,8	0,93	0,87	0,88	-0,02	0,99	-0,05	-0,11	-1,00
7,9	0,91	0,84	0,85	-0,03	0,99	-0,06	-0,13	-1,00
8	0,89	0,81	0,82	-0,04	0,98	-0,07	-0,16	-1,00
8,1	0,86	0,77	0,78	-0,05	0,98	-0,09	-0,20	-1,00
8,2	0,83	0,72	0,73	-0,06	0,98	-0,11	-0,24	-1,00
8,3	0,80	0,67	0,68	-0,07	0,97	-0,14	-0,29	-1,00
8,4	0,76	0,61	0,63	-0,09	0,96	-0,17	-0,34	-1,00
8,5	0,71	0,54	0,57	-0,11	0,95	-0,21	-0,40	-1,00
8,6	0,66	0,47	0,50	-0,13	0,94	-0,25	-0,46	-1,00
8,7	0,61	0,39	0,43	-0,16	0,93	-0,30	-0,53	-1,00
8,8	0,55	0,31	0,36	-0,20	0,91	-0,36	-0,60	-1,00
8,9	0,49	0,23	0,29	-0,24	0,89	-0,42	-0,67	-1,00
9	0,42	0,14	0,22	-0,28	0,86	-0,49	-0,75	-1,00
9,1	0,36	0,06	0,15	-0,33	0,83	-0,57	-0,82	-1,00
9,2	0,30	-0,03	0,08	-0,38	0,79	-0,65	-0,90	-1,00

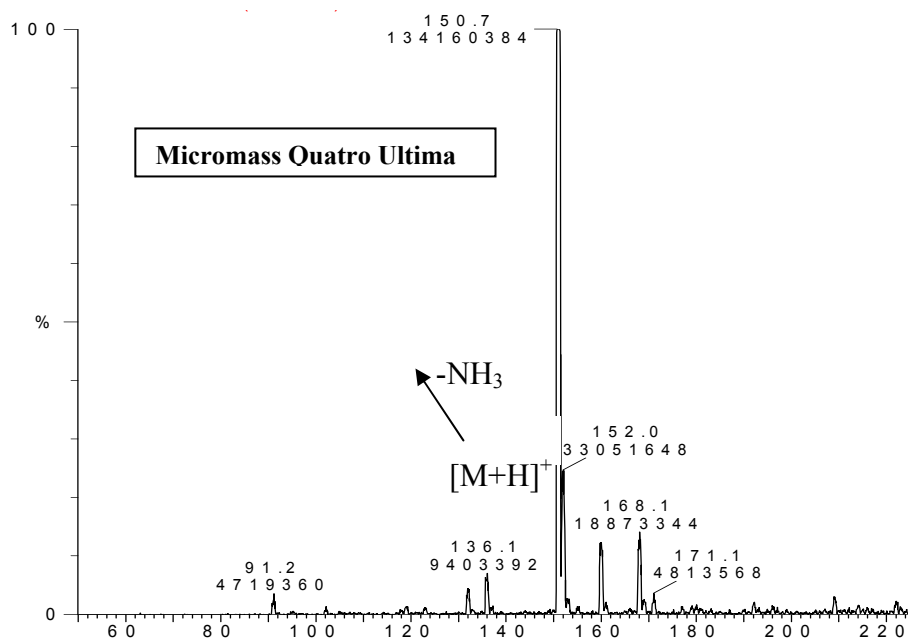
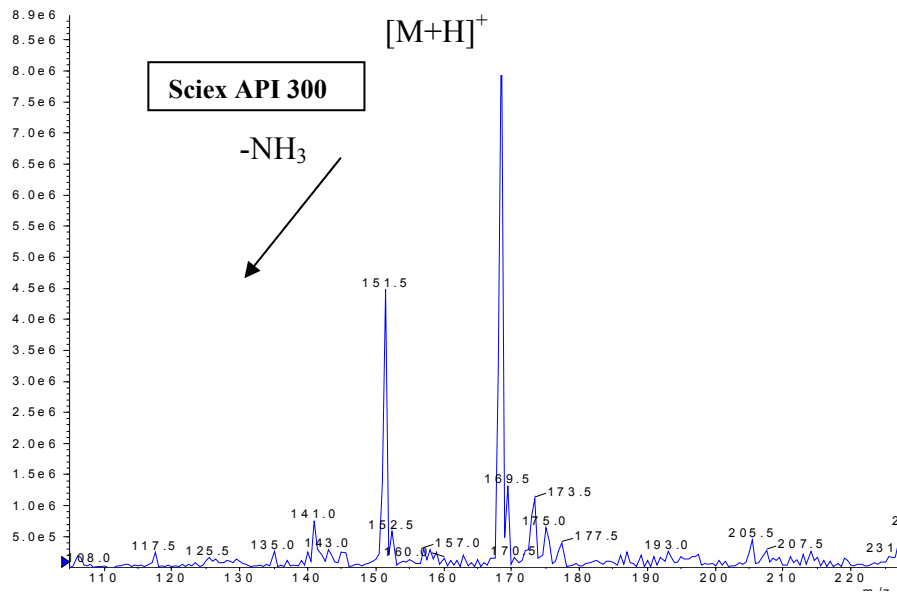
pH	DA	NA	A	Trp	S	Tyr	DOPA	DOPAC
9,3	0,24	-0,11	0,00	-0,44	0,75	-0,73	-0,97	-1,00
9,4	0,18	-0,20	-0,07	-0,49	0,71	-0,82	-1,05	-1,00
9,5	0,13	-0,28	-0,14	-0,55	0,65	-0,91	-1,12	-1,00
9,6	0,08	-0,36	-0,21	-0,61	0,59	-1,00	-1,20	-1,00
9,7	0,03	-0,44	-0,28	-0,66	0,53	-1,09	-1,27	-1,00
9,8	-0,03	-0,51	-0,36	-0,71	0,46	-1,17	-1,35	-1,00
9,9	-0,08	-0,58	-0,43	-0,76	0,39	-1,26	-1,42	-1,00
10	-0,13	-0,64	-0,50	-0,80	0,32	-1,35	-1,50	-1,00
10,1	-0,18	-0,70	-0,56	-0,83	0,25	-1,43	-1,57	-1,00
10,2	-0,24	-0,75	-0,62	-0,86	0,18	-1,50	-1,64	-1,00
10,3	-0,30	-0,79	-0,68	-0,89	0,11	-1,57	-1,70	-1,00
10,4	-0,36	-0,83	-0,73	-0,91	0,04	-1,64	-1,76	-1,00
10,5	-0,42	-0,86	-0,77	-0,92	-0,04	-1,70	-1,82	-1,00
10,6	-0,49	-0,89	-0,81	-0,94	-0,11	-1,75	-1,87	-1,00
10,7	-0,55	-0,91	-0,85	-0,95	-0,18	-1,79	-1,92	-1,00
10,8	-0,61	-0,93	-0,87	-0,96	-0,25	-1,83	-1,96	-1,00
10,9	-0,66	-0,94	-0,90	-0,97	-0,32	-1,86	-2,01	-1,00
11	-0,71	-0,95	-0,92	-0,97	-0,39	-1,89	-2,06	-1,00
11,1	-0,76	-0,96	-0,93	-0,98	-0,46	-1,91	-2,10	-1,00
11,2	-0,80	-0,97	-0,95	-0,98	-0,53	-1,93	-2,15	-1,00
11,3	-0,83	-0,98	-0,96	-0,99	-0,59	-1,94	-2,20	-1,00
11,4	-0,86	-0,98	-0,97	-0,99	-0,65	-1,95	-2,26	-1,00
11,5	-0,89	-0,98	-0,97	-0,99	-0,71	-1,96	-2,31	-1,00
11,6	-0,91	-0,99	-0,98	-0,99	-0,75	-1,97	-2,37	-1,00
11,7	-0,93	-0,99	-0,98	-0,99	-0,79	-1,98	-2,43	-1,00
11,8	-0,94	-0,99	-0,99	-1,00	-0,83	-1,98	-2,50	-1,00
11,9	-0,95	-0,99	-0,99	-1,00	-0,86	-1,98	-2,56	-1,00
12	-0,96	-1,00	-0,99	-1,00	-0,89	-1,99	-2,61	-1,00
12,1	-0,97	-1,00	-0,99	-1,00	-0,91	-1,99	-2,67	-1,00
12,2	-0,98	-1,00	-0,99	-1,00	-0,93	-1,99	-2,72	-1,00
12,3	-0,98	-1,00	-1,00	-1,00	-0,94	-1,99	-2,76	-1,00
12,4	-0,98	-1,00	-1,00	-1,00	-0,95	-2,00	-2,80	-1,00
12,5	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-0,96	-2,00	-2,84	-1,00
12,6	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-0,97	-2,00	-2,87	-1,00
12,7	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-0,98	-2,00	-2,89	-1,00
12,8	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-0,98	-2,00	-2,91	-1,00
12,9	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,98	-2,00	-2,93	-1,00
13	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,99	-2,00	-2,94	-1,00
13,1	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,99	-2,00	-2,95	-1,00
13,2	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,99	-2,00	-2,96	-1,00
13,3	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-0,99	-2,00	-2,97	-1,00
13,4	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,98	-1,00
13,5	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,98	-1,00
13,6	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,98	-1,00
13,7	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,99	-1,00
13,8	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,99	-1,00
13,9	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,99	-1,00
14	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-2,00	-2,99	-1,00

Annexe 4. Exemples de spectres de masse obtenus sur l'un ou l'autre des spectromètres de masse en mode ESI (source turboIonspray Sciex et source en Z Micromass)

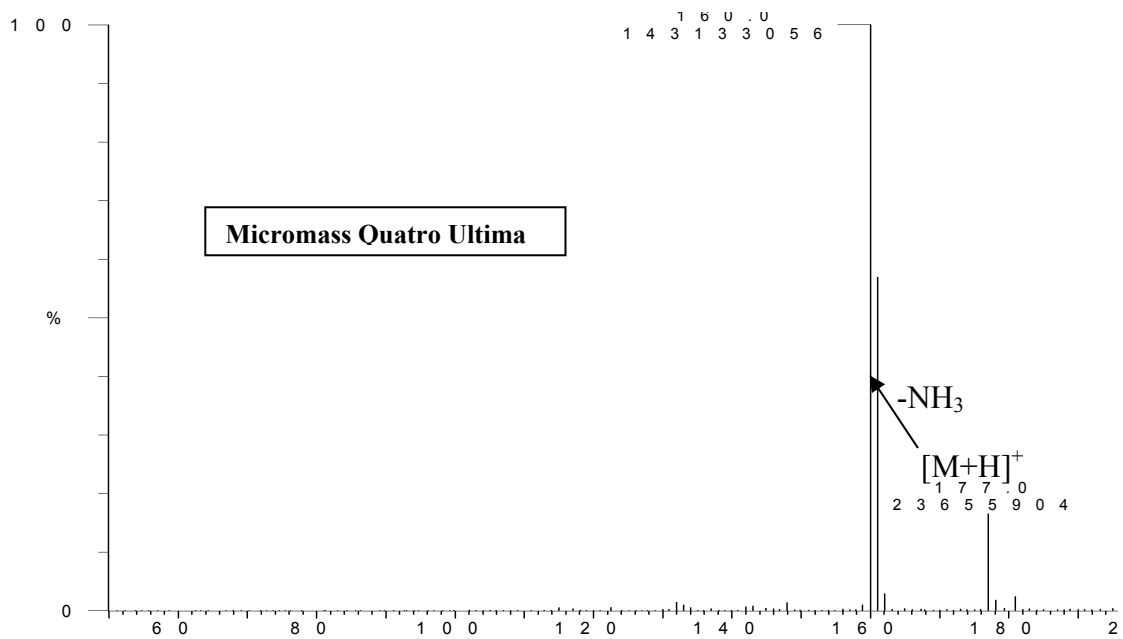
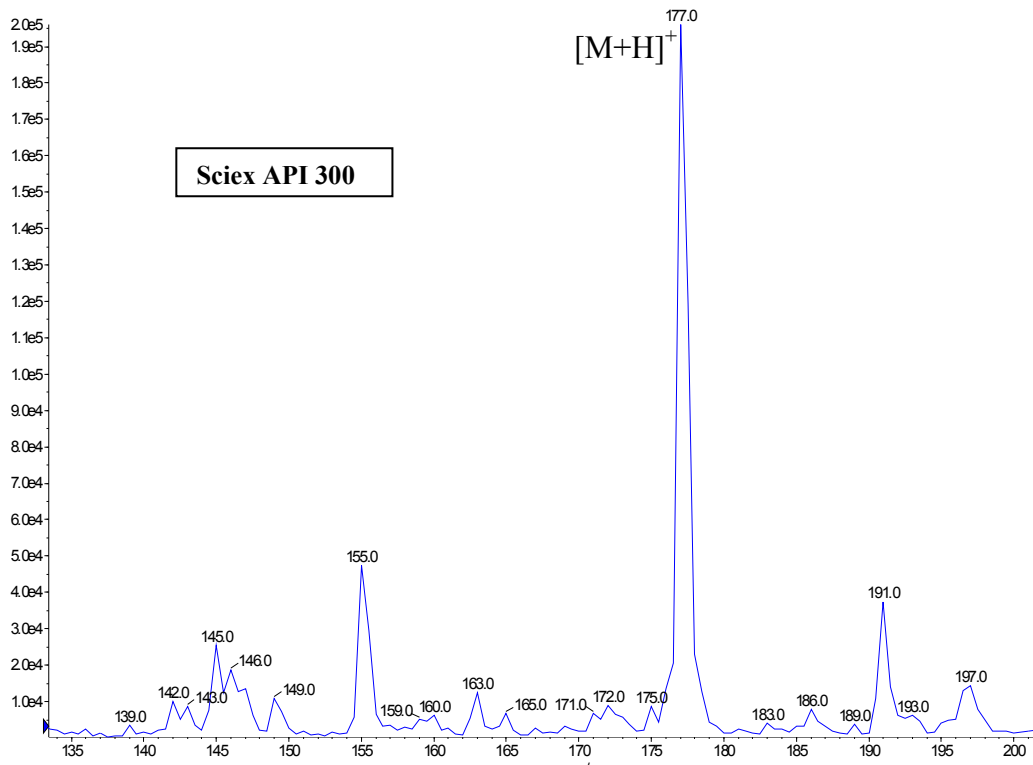
Annexe 4a. Spectre de masse de l'adrénaline (A)



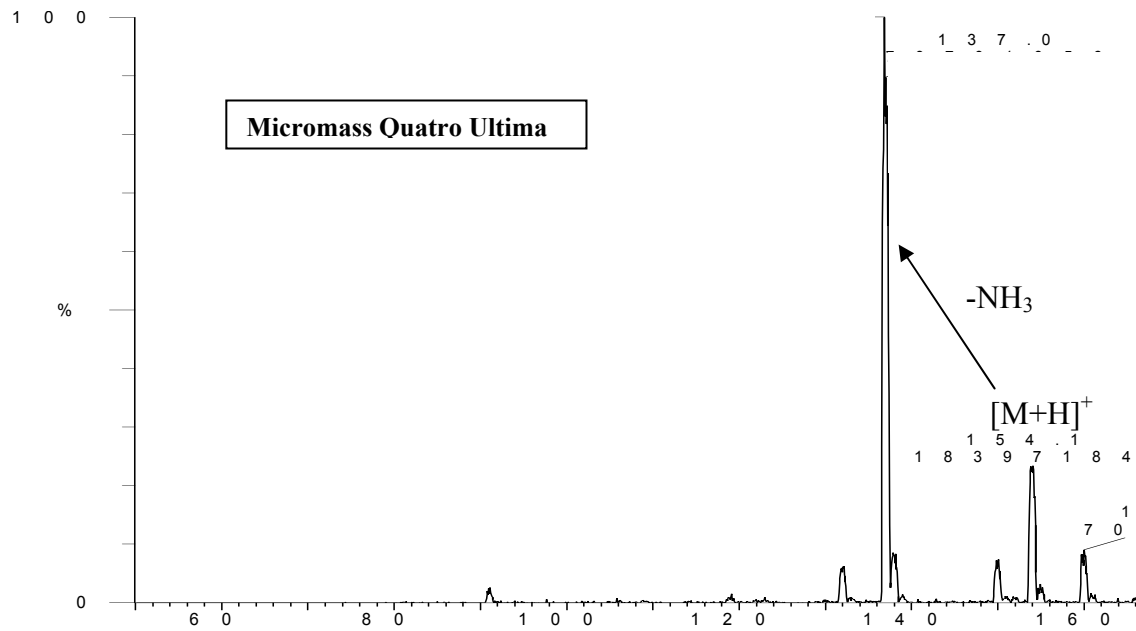
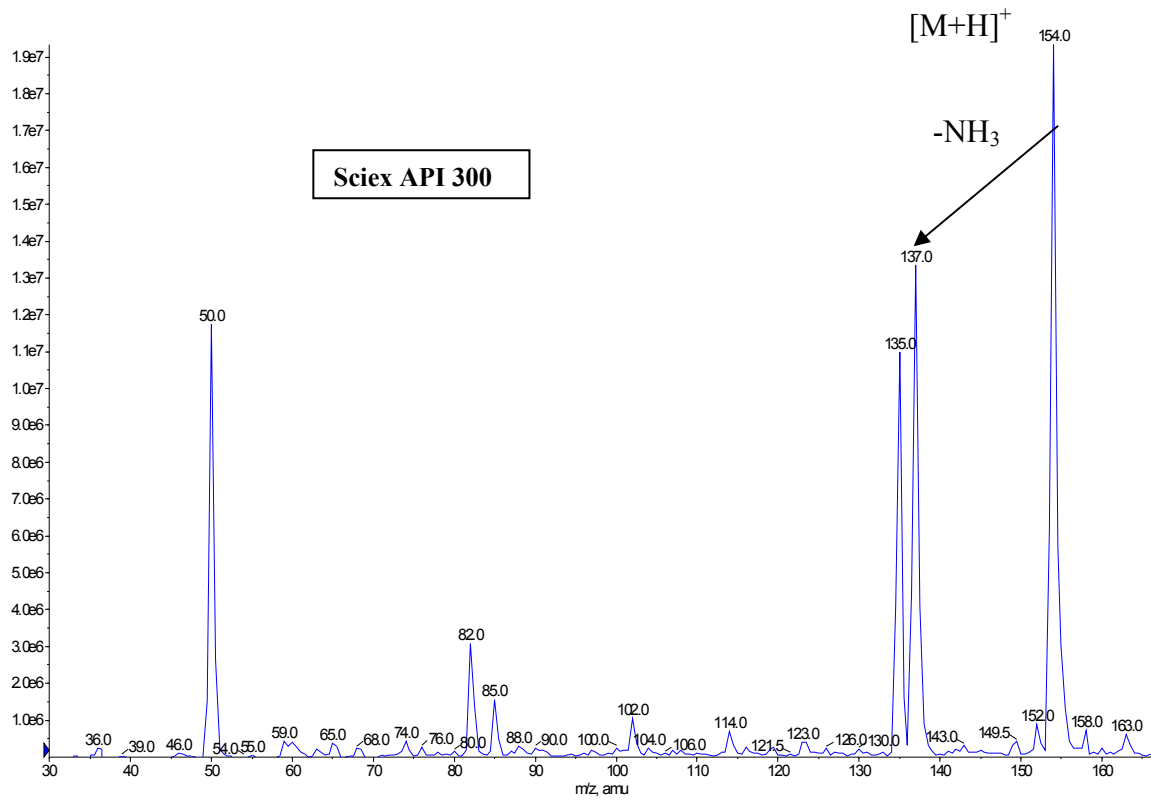
Annexe 4b. Spectre de masse de la 3- methoxytyramine (3-MT)



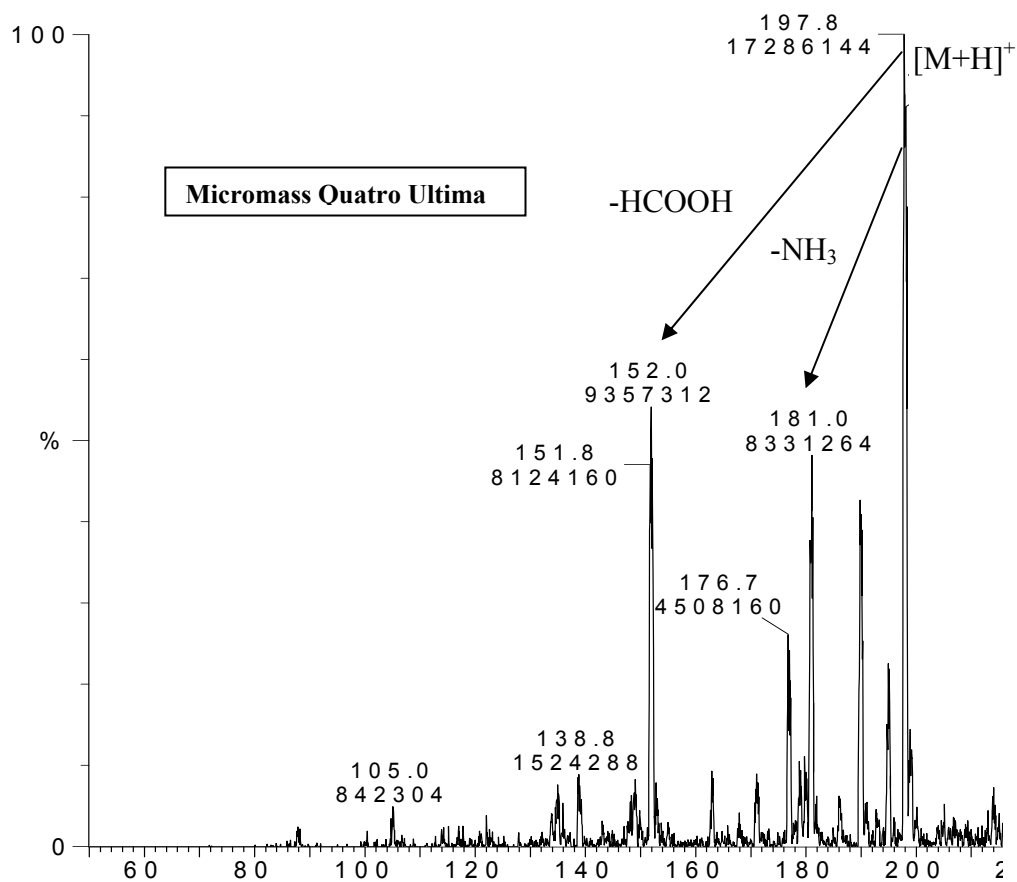
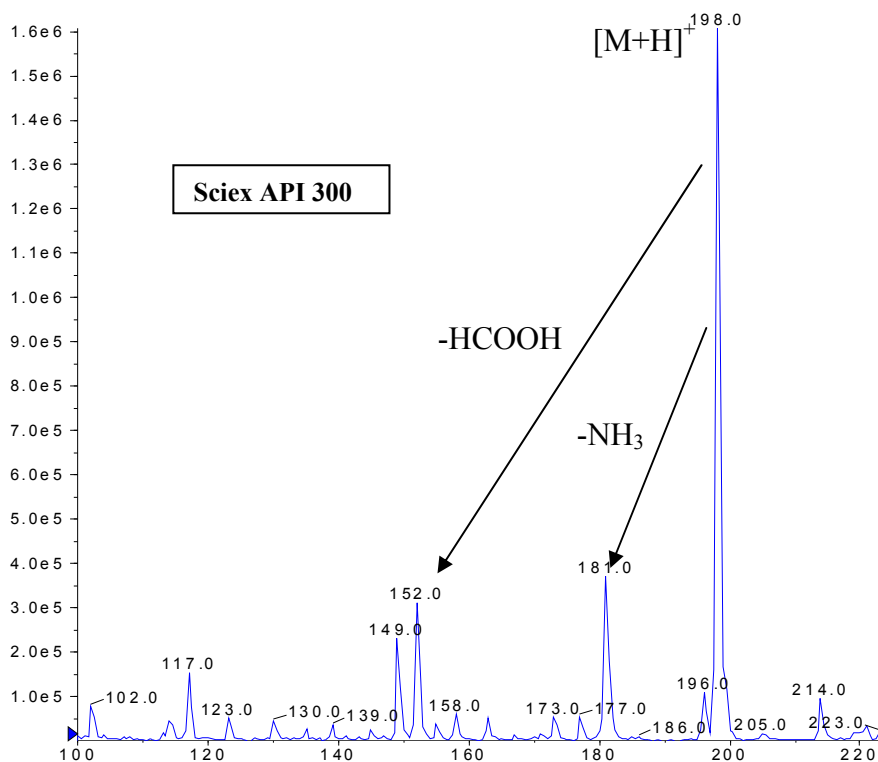
Annexe 4c. Spectre de masse de la sérotonine (S)

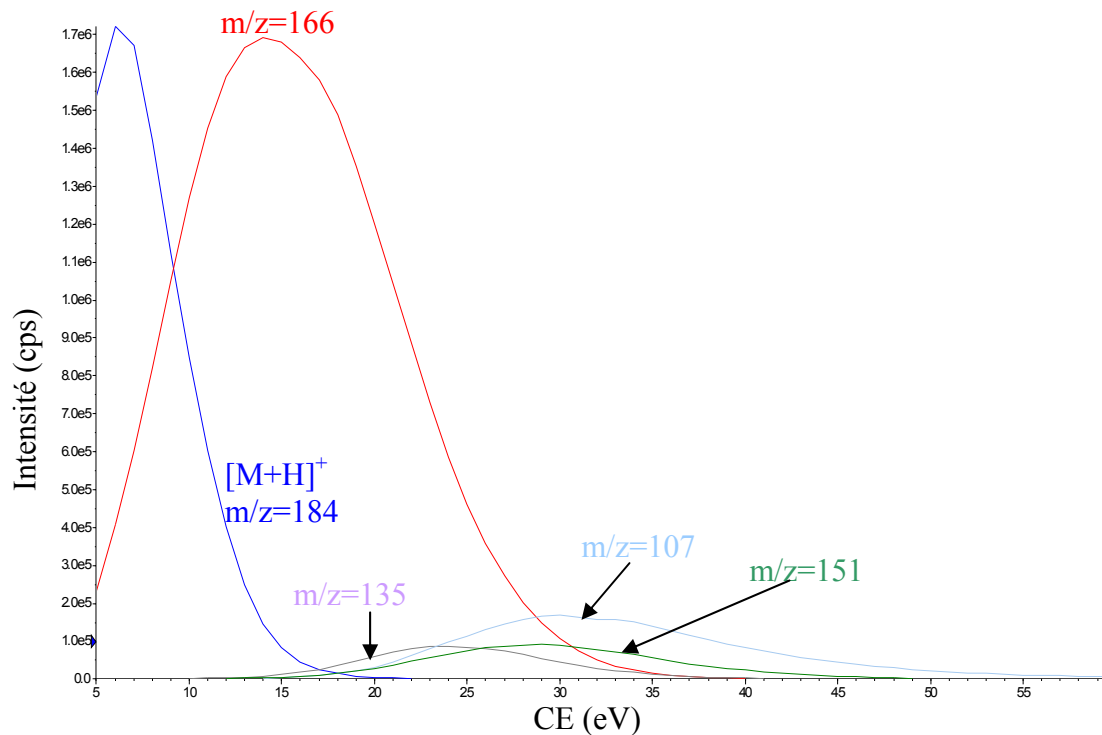
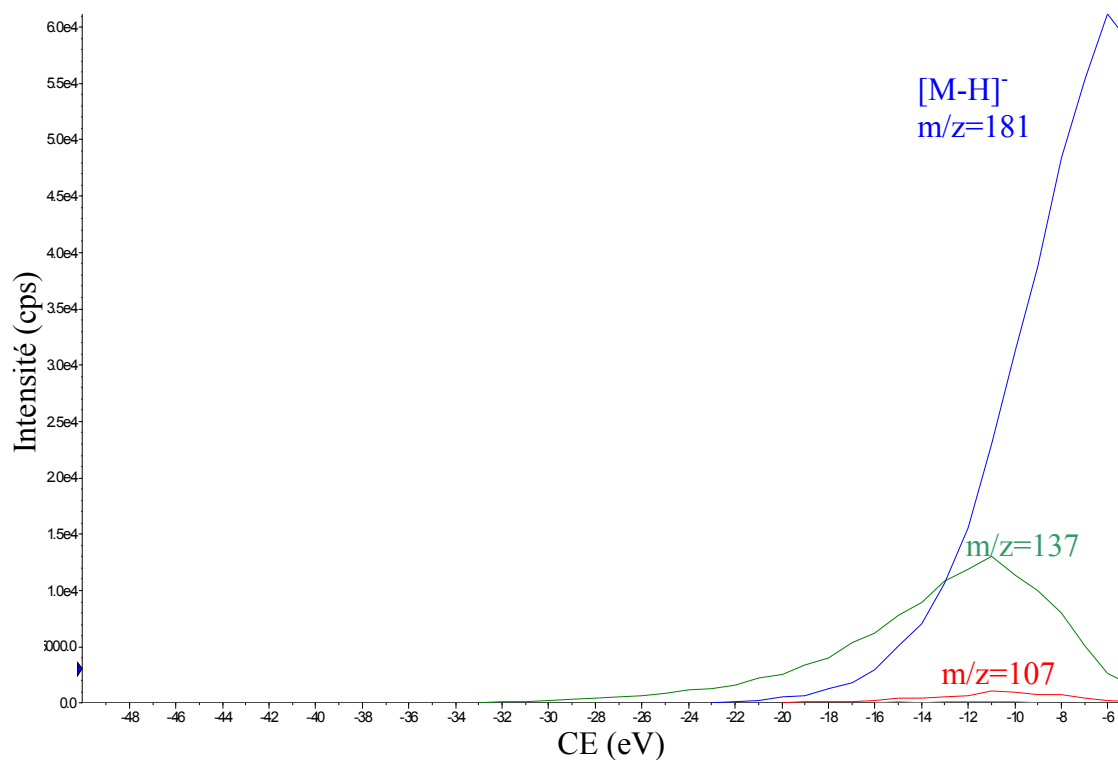


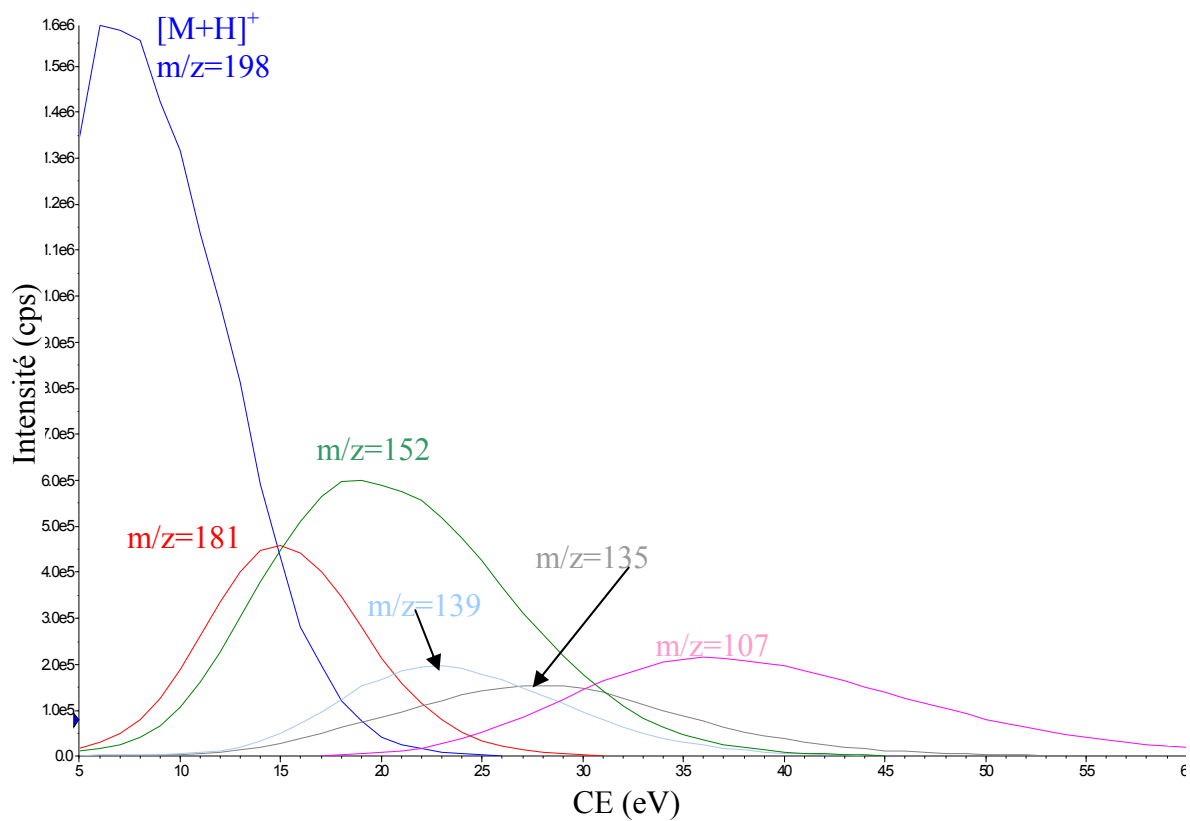
Annexe 4d. Spectre de masse de la dopamine (DA)



Annexe 4e. Spectre de masse de la Dihydroxyphenyle alanine (DOPA)



Annexe 5. Exemples de fragmentation de catécholamines en fonction de l'énergie de collision Sciex API 3000**Annexe 5 a. Fragmentation de l'adrénaline (A) en mode ESI positif
plusieurs fragments mais un seul fragment majoritaire****Annexe 5 b. Fragmentation de HVA en mode ESI négatif
plusieurs fragments de faible intensité**

**Annexe 5 c. Fragmentation de DOPA en mode ESI positif
plusieurs fragments d'intensités comparables**

Annexe 6. Protocole de préparation de l'extrait de cerveau pour la détermination des LODs et les analyses qualitative et quantitative

Annexe 6.a. Extrait de cerveau non dopé

L'extrait de cerveau a été préparé selon le protocole suivant : l'encéphale de mouton a été retiré du crâne (immédiatement après la mort de l'animal) et a été séparé selon les différentes régions qui ont été pesées, puis immergées dans l'acide perchlorique froid $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, dans la proportion de 5 ml d'acide pour 1 g de tissu. Le tissu cérébral a été ensuite homogénéisé par sonication ou à l'aide d'un appareil de Potter. L'homogénat de tissu a été centrifugé à 20 000 g pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant a été utilisé comme l'extrait de cerveau et il a été stocké à -80 °C.

Annexe 6.b. Solution analysée non dopé de l'extrait de cerveau (dosage de Tyr et Trp)

Au moment de l'analyse, l'extrait de cerveau est filtré sur un filtre seringue $0,45 \mu\text{m}$, puis le volume de filtrat est dilué soit:

- 1 :1 avec la solution de NFPA 1,25 mM avant son injection dans le système chromatographique en appariement d'ions ;
- soit 1 :5 ou 1 :10 avec un mélange ACN – solution aqueuse de sel (formiate ou acétate d'ammonium) avant son injection dans le système chromatographique HILIC pour être au plus près de la composition de la phase mobile du système utilisé.

Annexe 6.c. Solution analysée dopé de l'extrait de cerveau (étude des LODs)

Pour obtenir 1 mL d'extrait dopé à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de chaque standard, l'un des protocoles suivants est appliqué en fonction du système chromatographique utilisé:

- mode Chromatographique d'appariement d'ions - **500 μL** de filtrat + **10 μL** de chacune des solutions mères à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ des 12 catécholamines s'ionisant en mode positif (au total **100 μL**) + **400 μL** de solution de NFPA 1,25 mM;
- mode HILIC :
 - TSKgel Amide 80 : **100 μL** de filtrat + **10 μL** d'un mélange des 12 catécholamines à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ chacune, préparé dans HClO_4 0,2 M+ **90 μL** de solution aqueuse de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 20 mM (pH 3) + **800 μL** ACN;
 - Luna Diol : **100 μL** de filtrat + **10 μL** d'un mélange des 12 catécholamines à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de chacune préparé dans une solution aqueuse de HCOONH_4 100 mM (pH 3) + **890 μL** d'ACN

- *Poursuit Si* : **100 μL** de filtrat + **10 μL** d'un mélange des 12 catécholamines à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de chacune préparé dans une solution de HClO_4 0,2 M + **40 μL** d'une solution aqueuse d' HCOONH_4 150 mM (pH 3) + **850 μL** ACN

Pour la détermination des LODs, ces solutions dopées à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été diluées successivement avec la solution correspondante d'extrait de cerveau non dopé (préparée selon l'annexe 6b), jusqu'à obtenir un rapport signal / bruit voisin de 3.

Annexe 6.d. Préparation de solutions standard pour les droites d'étalonnage établies dans la matrice

Pour la préparation des différents mélanges ayant servi à la construction des droites d'étalonnage nous avons préparé plusieurs mélanges de catécholamines à partir des solutions mères préparées à $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans HClO_4 0,2 M:

- 1) deux mélanges de A, NA, DA, Tyr et 5HIAA : un à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de chaque soluté;
- 2) deux solutions de 3-MT : un à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- 3) trois mélanges de Trp, S: un à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, un à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de chaque soluté;
- 4) deux solutions de DOPA : un à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- 5) une solution de DHBA à $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$;

Pour chacun des 6 points de gamme, 10 mL de mélange des catécholamines ont été préparés selon le protocole décrit dans le tableau suivant :

Point de gamme	Composition et concentration du mélange standard	Mode de préparation du mélange
1	200 ng.mL^{-1} DHBA 50 ng.mL^{-1} A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 10 ng.mL^{-1} 3-MT; 25 ng.mL^{-1} Trp, S ; 300 ng.mL^{-1} DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat ; 50 μL solution DHBA à $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 50 μL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 10 μL solution 3-MT à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 50 μL mélange Trp, S à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 60 μL solution de DOPA à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Ramené à 10 mL avec une solution de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 50mM pH 3
2	200 ng.mL^{-1} DHBA 75 ng.mL^{-1} A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 20 ng.mL^{-1} 3-MT; 50 ng.mL^{-1} Trp, S ; 400 ng.mL^{-1} DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat ; 50 μL solution DHBA à $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 75 μL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 20 μL solution 3-MT à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 100 μL mélange Trp, S à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 80 μL solution de DOPA à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Ramené à 10 mL avec une solution $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 50mM pH 3

Point de gamme	Composition et concentration du mélange standard	Mode de préparation du mélange
3	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 100 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 50 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 75 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 500 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange Trp, S à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
4	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 150 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 75 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 100 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 600 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 60 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
5	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 200 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 100 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 150 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 700 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 100 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL solution 3-MT à 20 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 70 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
6	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 250 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 150 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 200 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 800 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 125 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL solution 3-MT à 20 µg.mL ⁻¹ ; 100 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 80 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3

Annexe 7. Préparation de points de gamme dans la phase mobile**Annexe 7a. Système Onyx C18 couplé au spectromètre Sciex API 3000**

Pour la préparation des différents mélanges ayant servis à la construction des droites d'étalonnage nous avons préparés plusieurs mélanges des catécholamines à partir des solutions mères préparées à $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le HClO_4 :

- 1) un mélange aux concentrations suivantes : $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Tyr, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ NA, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Trp et $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ DOPA = **mélange A**
- 2) un mélange aux concentrations suivantes : $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ DA, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ A, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ S, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 3-MT et $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 5HIAA = **mélange B**
- 3) une solution de DHBA à la concentration de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$;

Pour chaque point de gamme 10 mL de mélange des catécholamines ont été préparés selon le protocole décrit dans le tableau suivant :

Point de gamme	Concentration des catécholamines	Mode de préparation des mélanges
1	100 ng.mL^{-1} DHBA 25 ng.mL^{-1} Trp, NA; DOPA 250 ng.mL^{-1} Tyr 10 ng.mL^{-1} DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 250 μL mélange A ; 100 μL mélange B ; Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM
2	100 ng.mL^{-1} DHBA 50 ng.mL^{-1} Trp, NA; DOPA 500 ng.mL^{-1} Tyr 15 ng.mL^{-1} DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 500 μL mélange A ; 150 μL mélange B ; Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM
3	100 ng.mL^{-1} DHBA 100 ng.mL^{-1} Trp, NA; DOPA 1000 ng.mL^{-1} Tyr 20 ng.mL^{-1} DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 1 mL mélange A ; 200 μL mélange B ; Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM
4	100 ng.mL^{-1} DHBA 125 ng.mL^{-1} Trp, NA; DOPA 1250 ng.mL^{-1} Tyr 25 ng.mL^{-1} DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 1,25 mL mélange A ; 250 μL mélange B ; Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM
5	100 ng.mL^{-1} DHBA 150 ng.mL^{-1} Trp, NA; DOPA 1500 ng.mL^{-1} Tyr 30 ng.mL^{-1} DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 1,5 mL mélange A ; 300 μL mélange B ; Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM
6	100 ng.mL^{-1} DHBA 200 ng.mL^{-1} Trp, NA; DOPA 2000 ng.mL^{-1} Tyr 35 ng.mL^{-1} DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 2 mL mélange A ; 350 μL mélange B ; Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM

Point de gamme	Concentration des catécholamines	Mode de préparation des mélanges
EC*dans la phase mobile	Identique au 3^{ème} point de gamme	
EC*dans la matrice	100 ng.mL ⁻¹ DHBA 100 ng.mL ⁻¹ Trp, NA; DOPA 1000 ng.mL ⁻¹ Tyr 20 ng.mL ⁻¹ DA, A, S, 3-MT, 5HIAA	1 mL solution de DHBA 1 µg.mL ⁻¹ ; 1 mL mélange A ; 200 µL mélange B ; 5 mL filtrat (Annexe 6) Ramené à 10 mL avec une solution NFPA 1,25 mM

*EC = échantillon contrôle

Annexe 7b. Système TSK gel Amide 80 couple au spectromètre Micromass

Point de gamme	Concentration des catécholamines	Mode de préparation des mélanges
1	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 50 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 10 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 25 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 300 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 10 µg.mL ⁻¹ ; 10 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange Trp, S à 5 µg.mL ⁻¹ ; 60 µL solution de DOPA à 50 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
2	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 75 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 20 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 50 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 400 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 10 µg.mL ⁻¹ ; 20 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 100 µL mélange Trp, S à 5 µg.mL ⁻¹ ; 80 µL solution de DOPA à 50 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
3	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 100 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 50 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 75 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 500 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange Trp, S à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
4	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 150 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 75 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 100 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 600 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 60 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
5	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 200 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 100 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 150 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 700 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 100 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL solution 3-MT à 20 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 70 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3

Point de gamme	Concentration des catécholamines	Mode de préparation des mélanges
6	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 250 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 150 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 200 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 800 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 125 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 75 µL solution 3-MT à 20 µg.mL ⁻¹ ; 100 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 80 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
EC*dans la phase mobile	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 100 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 20 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 100 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 600 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 20 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 60 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3
EC*dans la matrice	200 ng.mL ⁻¹ DHBA 100 ng.mL ⁻¹ A, NA, DA, Tyr et 5HIAA 20 ng.mL ⁻¹ 3-MT; 100 ng.mL ⁻¹ Trp, S ; 600 ng.mL ⁻¹ DOPA	8 mL ACN ; 1 mL filtrat (Annexe 6) 50 µL solution DHBA à 40 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange A, NA, DA, Tyr et 5HIAA à 20 µg.mL ⁻¹ ; 20 µL solution 3-MT à 10 µg.mL ⁻¹ ; 50 µL mélange Trp, S à 20 µg.mL ⁻¹ ; 60 µL solution de DOPA à 100 µg.mL ⁻¹ Ramené à 10 mL avec une solution CH ₃ COONH ₄ 50mM pH 3

*EC = échantillon contrôle

Annexe 8. Caractéristiques des supports utilisés pour l'extraction sur phase solide

Oasis HLB (Waters)

Support : polymérique
Surface spécifique: $810 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
Diamètre des pores : 80 \AA
Volume total des pores : $1,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$
Stabilité entre pH 1 et 14

Oasis MCX (Waters)

Support : polymérique
Diamètre des particules : $60 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 80 \AA
Volume total des pores : $1,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$
Stabilité entre pH 0 et 14
Capacité d'échange d'ions : $1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$

Bond Elut Plexa PCX

Support : polymérique
Surface spécifique: $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
Diamètre des particules : $45 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 120 \AA
Stabilité entre pH 1 et 14
Capacité d'échange d'ions : $1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$

Oasis WCX (Waters)

Support : polymérique
Diamètre des particules : $30 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 80 \AA
Stabilité entre pH 0 et 14

Bond Elut Plexa AccuCAT (Varian)

Support : polymérique
Surface spécifique: $450 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
Diamètre des particules : $45 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 120 \AA
Stabilité entre pH 1 et 14
Capacité d'échange d'ions : $1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$
Taux de carbone : 7%

C18 (Sigma Aldrich - Supelco)

Support : polymérique
Surface spécifique: $475 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$
Diamètre des particules : $45 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 60 \AA
Volume total des pores : $0,8 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$
Taux de carbone : 17%
Stabilité entre pH 2 et 8

Chromabond C18 (Macherey – Nagel)

Support : Silice
Surface spécifique: $500 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$
Diamètre des particules : $45 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 60 \AA
Taux de carbone : 14%

PGC (Thermo Fisher)

Support : graphite poreux (PGC)
Diamètre des particules : $30 \text{ }\mu\text{m}$
Diamètre des pores : 250 \AA
Stabilité entre pH 0 - 14

Annexe 8. Communications écrites et orales réalisées durant la thèse

Publications dans des revues internationales

A. mode HILIC

(1) *Development of a hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of catecholamines and related molecules in brain extract*, **R. Chirita**, A. Finaru, T. Hevor, C. Elfakir – soumis à Journal of Separation Sciences en octobre 2009

(2) *A Comprehensive Approach to Appropriate Hydrophilic Interaction Chromatography Column selection: Application to Neurotransmitters Analysis*, **R. Chirita**, C. West, A. Finaru, C. Elfakir – soumis à Journal of Chromatography A en août 2009

(3) *Simultaneous analysis of taurine and caffeine in energy drink using hydrophilic interaction chromatography with UV and evaporative light scattering detection in line*, **R. Chirita**, C. Dascalu, A. Finaru, C. Elfakir – soumis à Revista de Chimie en août 2009

(4) *Performances comparées de différents supports polaires en vue de l'analyse d'herbicides organophosphorés par chromatographie d'interactions hydrophiles*, **R. Chirita**, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir – LC-GC en français, juin 2008, 8-14

B. Validation des méthodes

(5) *Development of a LC-MS/MS method to monitor palmitoyl peptides content in anti-wrinkle cosmetics*, **R. Chirita**, P. Chaimbault, J-C. Archambault, I. Robert, C. Elfakir, - Analytica Chimica Acta 641 (2009) 95–100

Communications orales

(1) *Ion pairing chromatography vs. HILIC for the determination of neurotransmitters in brain extract by LC – MS/MS* – Euroanalysis 2009, Innsbruck, Austria, 6 -10 septembre 2009

R. Chirita, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir,

(2) *Analyses des acides aminés dans différentes matrices* - Congrès Franco-Roumain de Chimie Appliquée CoFrRoCA 2008, Bacau, Roumanie, 25-29 juin 2008

R. Chirita, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir

(3) *Analyse de catécholamines, indolamines et leurs métabolites* – Science en Sologne mai 2007, Orléans, France

R. Chirita, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir

Communications par affiches

(1) *Hydrophilic interaction liquid chromatography commercial available supports comparison for the catecholamine analysis*– **R. Chirita**, A. Fînaru, C. Elfakir - Euroanalysis 2009, 6 -10 septembre, 2009, Innsbruck, Autriche.

(2) *Determination of catecholamines, indolamines and their metabolites by HILIC-MS/MS*. **R. Chirita**, A. Ziemianin, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir – 27th International Symposium of Chromatography (ISC 2008) , 21-25 septembre 2008, Münster, Allemagne.

(3) *Hydrophilic interaction liquid chromatographic analysis of organophosphorus pesticides*. **R. Chirita**, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir – 27th International Symposium of Chromatography (ISC 2008), 21-25 septembre 2008, Münster, Allemagne.

(4) *Analysis of catecholamines using ion pairing chromatography and mass spectrometry detection*. **R. Chirita**, L. Fougere, P. Chaimbault, A. Finaru, C. Elfakir –31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2007), 17- 21 juin 2007 Ghent – Belgique.

(5) *Validation d'une méthode chromatographique en mode HILIC pour le dosage simultané de la caféine et de la taurine dans des boissons énergisantes*. **R. Chirita**, C. Dascalu, M. de Person, C. Elfakir, A. Fînaru - 6^{ème} congrès francophone de l'AFSep sur les sciences séparatives et les couplages, SEP 07, 20 – 22 mars 2007, Grenoble, France

(6) *Colonne SeQuant ZIC-HILIC vs Astec ApHera pour la séparation de molécules polaires en mode HILIC*. **R. Chirita**, B. Rhourri, M. de Person, R. Delépée, P. Morin, C. Elfakir - 6^{ème} congrès francophone de l'AFSep sur les sciences séparatives et les couplages, SEP 07, 20-22 mars 2007, Grenoble, France

Raluca-Ioana CHIRITA

Développement de nouvelles méthodes séparatives compatibles avec une détection par spectrométrie de masse et par électrochimie pour l'analyse de traces de catécholamines et molécules apparentées

Les catécholamines et les indolamines font partie de la famille des neurotransmetteurs. Un déséquilibre dans leur concentration peut être associé à différentes maladies telles les maladies de Parkinson et Alzheimer, la dépression ou la schizophrénie. C'est pourquoi le développement de méthodes de dosage spécifiques et très sensibles du fait de leurs très faibles teneurs dans les fluides biologiques est nécessaire.

Dans un premier temps nous avons développé une méthode chromatographique en appariement d'ions (IP-LC) utilisant des colonnes C18 de nouvelle génération (monolithique et « fused core ») et l'acide nonafluoropentanoïque, comme agent d'appariement d'ions volatil. Cette méthode est compatible avec une détection SM en mode d'ionisation positive.

Dans un deuxième temps, différents systèmes en mode HILIC ont été évalués. Le choix raisonné de la phase stationnaire offrant la meilleure séparation du mélange de catécholamines a pu être réalisé après avoir testé l'influence sur la séparation des différents groupements fonctionnels disponibles : groupement soit neutre (greffage diol, amide, ou cyano), soit positivement chargé (greffage amino ou triazole) soit négativement chargé (silice vierge avec particules totalement poreuses ou partiellement poreuses « fused core ») ou zwitterionique (greffage sulfobetaine). La méthode HILIC présente l'avantage d'être compatible aussi bien avec une détection SM en mode d'ionisation positive que négative.

Les deux méthodes (IP-LC et HILIC) ont été comparées en termes de résolution, efficacité et limites de détection (LOD), linéarité et répétabilité. Les LODs obtenues sont comprises entre 1 et 100 ng.mL⁻¹.

Pour pouvoir doser des teneurs plus faibles, une méthode de pré-concentration de l'échantillon a été développée en associant 2 supports différents (Oasis HLB et PGC). La méthode optimisée SPE-CPL-MS/MS a été enfin appliquée à un extrait de cerveau de mouton.

Mots clés : Neurotransmetteurs, chromatographie d'appariement d'ions, HILIC, ACP, SPE, spectrométrie de masse

Development of new chromatographic methods compatibles with mass spectrometric detection and electrochemical detection for catecholamines and related molecules

As neurotransmitters, catecholamines play an important role in the control and regulation of numerous brain functions. They are also believed to be implicated in different neurodegenerative disorders.

First an ion pairing chromatography method using nonafluoropentanoic acid as volatile ion pairing agent was developed on the new generation of C18 columns (monolith and fused core). This method is compatible with MS detection in positive ionization mode.

Secondly an HILIC method was optimized using different commercially available HILIC supports, they can be classified as follows: neutral (diol, amide, and cyano bounded), positively charged (amino, triazole bounded), negatively charged (bare silica as wholly porous particles or fused core particles columns) and zwitterionic (sulfobetaine bounded). Our studies lead us to a better understanding of the HILIC retention mechanism and also to the selection of the most appropriated column for catecholamine analysis. Only the HILIC system was compatible with both positive and negative ionization modes.

The two chromatographic systems were then compared in terms of resolution, efficiency, detection and quantification limits (LOD/LOQ), calibration linearity and repeatability.

The LODs obtained were in the range of 1-100 ng.mL⁻¹. A simple pre-concentration method using Oasis HLB and PGC solid phase extraction cartridges has been optimized in order to enhance the LODs.

Finally the optimized SPE-LC-MS/MS method has been applied to the identification of these compounds present in brain extracts.

Key words : neurotransmitters, ion pairing chromatography, HILIC, PCA, SPE, mass spectrometry

Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS FR 2708, UMR-6005, UFR Sciences, Université d'Orléans, BP 6759, F-45067 Orléans Cedex 2, France.