

## Aspects théoriques et pratiques de la quantification des classes lipidiques par usage des détecteurs universels et de la spectrométrie de masse

Spiro Khoury

#### ▶ To cite this version:

Spiro Khoury. Aspects théoriques et pratiques de la quantification des classes lipidiques par usage des détecteurs universels et de la spectrométrie de masse. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT: 2015SACLS191. tel-03091995

## HAL Id: tel-03091995 https://theses.hal.science/tel-03091995

Submitted on 1 Jan 2021

**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.





NNT: 2015SACLS191

## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY, préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° (571) Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat : Chimie

Par

## **M. Spiro KHOURY**

Aspects théoriques et pratiques de la quantification des classes lipidiques par usage des détecteurs universels et de la spectrométrie de masse

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 14 décembre 2015:

#### **Composition du Jury :**

M. VAN DER REST Guillaume, Professeur, Université paris-sud, Président du jury
M. GOOSSENS Jean-Francois, Professeur, Université Lille 2, Rapporteur
Mme. RATHAHAO-PARISEstelle, IR, AgroParisTech, Rapporteur
Mme. BERTRAND-MICHELJustine, IR, Inserm U1048 I2MC MetaToul, Examinatrice
Mme. PUJOS-GUILLOT Estelle, IR, UNH INRA Clermont, Membre invité
Mme. LIBONG Danielle, MCU, Université paris-sud, Membre invité
M. CHAMINADE Pierre, Professeur, Université paris-sud, Directeur de thèse
Mme. TFAILI Sana, MCU, Université paris-sud, Co-encadrante



## Remerciements

Je pense que c'est le moment pour un dernier mot personnel. A la fin de ce travail, je voudrais dire merci à tous ceux qui, plus ou moins directement, ont contribué à le rendre possible. Je voudrais profiter, à travers ces pages, pour éprouver une sincère gratitude aux personnes qui m'ont soutenu à leur manière pour réaliser agréablement un rêve qui était, un jour, sur le point d'être perdu...

**Professeur Pierre CHAMINADE,** mes premiers remerciements vont naturellement à vous. Je tiens à vous remercier sincèrement d'avoir accepté de diriger mes travaux de thèse après la réorientation de mon sujet malgré vos nombreuses charges. Je vous remercie pour la confiance que vous m'aviez accordée dans cette période. Je vous suis infiniment reconnaissant de m'avoir fait partager votre savoir pédagogique, scientifique et technique. Je n'oublie pas votre aide précieuse dans la lecture et la correction de ma thèse.

#### Aux membres du jury...

Je tiens à remercier cordialement Monsieur le Professeur **Jean-François GOOSSENS** et Madame le Docteur **Estelle RATHAHAO-PARIS**. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de rapporter cette thèse ainsi que de la juger. Au professeur **Guillaume VAN DER REST**, Dr **Justine BERTRAND-MICHEL**, Dr **Danielle LIBONG**. Je vous remercie pour avoir accepté de juger ce travail. Au Dr **Estelle PUJOS-GUILLOT** pour avoir accepté de juger mon travail de thèse ainsi que pour l'opportunité que vous m'avez offerte d'être un membre de votre équipe à l'INRA.

**Dr Sana TFAILI,** je te remercie pour l'aide et le soutien que tu m'as apporté. Je te suis reconnaissant pour tes encouragements et pour la confiance que tu m'as accordée pendant ce temps. Ce travail n'aurait pas été possible dans cette durée sans toi. Merci pour ta disponibilité et ta rigueur qui m'ont offert un encadrement de grande qualité. Je te remercie aussi pour ton aide dans la lecture et la correction de ma thèse.

**Professeur Arlette BAILLET GUFFROY,** je tiens à vous remercier de m'avoir accueilli au sein de l'équipe. Je vous remercie de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon Master 2 et mes stages dans votre équipe de recherche. Merci pour vos encouragements incessants, votre sympathie et vos qualités humaines.

**Professeur Patrice PROGNON,** j'adresse mes sincères remerciements à vous pour votre initiative à m'offrir les informations pédagogiques et administratives lors du besoin.

*Dr Audrey SOLGADI,* ma reconnaissance s'adresse à toi pour ton aide en spectrométrie de masse, tes conseils et surtout pour ta sympathie et ta grande amitié.

**Sonia,** je te remercie pour ta sympathie et ton amitié. J'apprécie beaucoup nos discussions personnelles ainsi que scientifiques surtout concernant la chromatographie, cela a abouti à enrichir mes expériences.

*Nadine & Sonia,* je vous remercie d'avoir collaboré à mes travaux durant vos stages M2 et M1 et surtout pour la qualité de votre travail. J'ai eu beaucoup de chance de faire vos connaissances.

**Nolwenn,** cela fût plaisir d'avoir un bureau à côté de toi! Merci pour ton soutien, ton amitié. Je te remercie infiniment de m'avoir motivé tout au long de cette thèse.

**Dr Emile & Dr Rime Jubeli,** merci pour vos conseils personnels ainsi que professionnels depuis mon arrivée en France, je vous suis vraiment reconnaissant.

*Rabei,* je te suis reconnaissant. J'apprécie beaucoup ta rapidité et efficacité. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et ta joie de vivre que je n'oublierai pas.

À tous les membres de l'équipe de chimie analytique EA 4041 pour votre accueil et votre gentillesse et pour les moments partagés (Ali, Donia, Guillaume, Aléssia, Daniel, Juliette, Elise, Raoul, Laetitia, Éric, Cécile, Athéna, Diem, Radhia, Cécile, Kamilia et Madeleine).

Aux personnelles de l'unité Lip(Sys)<sup>2</sup> de l'Université Paris Saclay pour tous les échanges scientifiques et administratifs. Merci pour votre sympathie aussi.

A titre personnel...

**Zahra,** je ne cesserai pas de te remercier de m'avoir supporté et soutenu tout au long de cette épreuve (et les prochaines ?). Merci de m'avoir remotivé dans les périodes difficiles. Merci d'être là pour moi chaque jour.

**Rouba,** ces remerciements ne peuvent s'achever sans penser à toi, merci d'être à mes côtés et de m'écouter toujours.

**A mes amis...**, Hisham, Nicolas, Maria, Michael, Nidaa, Abha, Lina, Mohammed, Adad, Layal, Alexandre, Simon, Rita, Hassan, Louai et Alaa. Je voudrais vous remercier d'avoir partagé mon quotidien, de m'avoir soutenu ou encouragé quand j'en avais besoin !

Je voudrais remercier mon pays la Syrie, encore saignant, merci d'avoir financé mes études. J'espère te retrouver un jour plus forte que maintenant. De même, je voudrais remercier la France aussi de m'avoir accueilli sur son territoire, et de me donner l'opportunité de réaliser mon master, ma thèse et mes expériences professionnelles. Egalement, mes remerciements s'adressent au Crous de Versailles et à Campus France d'avoir géré ma bourse.

A mes Parents **Gaberiel** & **Wadia**... A mes Grands-parents... A ma Sœur **Miray** et à mon Frère **Rami**...

Pour le soutien permanent et pour tous les sacrifices que vous avez faits

# RESUME

Ce travail s'intéresse à rationaliser l'approche empirique qui consiste à employer des standards d'origine animale ou végétale en fonction de l'origine de l'échantillon à quantifier. Ces standards sont des extraits naturels de sources variées, ils peuvent présenter des répartitions d'espèces moléculaires différentes.

Les lipides étant dépourvus de chromophores exploitables, leur quantification utilise des détecteurs « universels » ou détecteurs par nébulisation. Les performances des détecteurs «universels »: le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) et le détecteur d'aérosol chargé (Corona-CAD), ont été comparées pour l'analyse quantitative des classes phospholipidiques. Ainsi, la composition des espèces moléculaires d'une classe lipidique peut influencer la géométrie du pic chromatographique en NP-CLHP. Les échantillons naturels de la lécithine commerciale issus de source animale et végétale ont été utilisés comme modèles d'échantillons d'origine biologique dans ce travail en raison de leur richesse en phospholipides (PLs).

Une méthode de séparation par chromatographie liquide à haute performance à polarité de phases normale (NP-HPLC) sur une colonne PVA-Sil a été utilisée pour réaliser la séparation complète des classes phospholipidiques. Par ailleurs, la composition des standards ainsi que la composition de la lécithine a été explorée en spectrométrie de masse (SM) haute résolution LTQ-Orbitrap.

D'autre part, la réponse des espèces moléculaires de PLs en spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-SM) a été évaluée. Les molécules en SM ne sont pas détectées avec la même efficacité. Le rendement d'ionisation ou la réponse de SM dépend de nombreuses caractéristiques structurelles des analytes tels que la longueur de chaîne, le nombre et la position des insaturations et la tête polaire.

Ce travail a mis en évidence ces effets en utilisant un spectromètre de masse triple quadripôle (TQ) et LTQ-Orbitrap. La SM est reconnue comme spécifique et sensible cependant que des phénomènes de suppression d'ionisation peuvent modifier la réponse des solutés. Ce phénomène, qui peut se produire à l'intérieur de la source d'ionisation, possède des conséquences critiques sur les résultats analytiques.

## ABSTRACT

The aim of this PhD Thesis is to rationalize the empirical approach of employing lipid standards of animal or plant origin according to the origin of the sample to quantify. As these standards are natural extracts of various sources, they may have different distributions of molecular species.

Taking into account that lipids lack of exploitable chromophores, lipid quantification use nebulization-based universal detectors. The performance of universal detectors, the evaporative light scattering detector (ELSD) and the charged aerosol detector (Corona-CAD), were compared for the quantitative analysis of PLs classes. In addition, the composition of molecular species of a given lipid class can affect the geometry of chromatographic peak in NP-HPLC. In this work, natural samples of commercial lecithin derived from animal and plant sources were used as models of biological samples because of their PLs richness.

A separation method by high performance liquid chromatography in normal phase (NP-HPLC) using PVA-Sil column was used to achieve the complete separation of PLs classes. Moreover, the composition of lipid standards and lecithin samples was investigated by the high resolution mass spectrometry (LTQ-Orbitrap).

Furthermore, the response of PLs molecular species was evaluated by mass spectrometry equipped with electrospray ionization source (ESI-MS). In ESI-MS, the molecules are not detected with equal efficiency. MS response or ionization yield depends on many structural features of the analytes such as; the chain length, the number and the position of unsaturation and the polar head.

This work has highlighted these effects using a triple quadrupole mass spectrometer (TQ) and LTQ Orbitrap. MS is recognized as specific and sensitive, but the phenomenon of ion suppression can modify considerably the response of analytes. This phenomenon, which can occur within the ionization source, has critical implications on analytical results.

**Mots clés:** Phospholipides, Lipides, Chromatographie liquide en phase normale, Lipidomique, Quantification, Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière, Détecteur d'aérosol chargé, Spectrométrie de Masse, Electrospray, Lécithine.

**Keywords:** Phospholipids, Lipids, Normal phase liquid chromatography, Lipidomics, Quantification, Evaporative light scattering detector, Charged aerosol detector, Mass Spectrometry, Electrospray, Lecithin.

#### Adresse del'Unité de recherche d'accueil:

Unité Interdisciplinaire Lip(Sys)<sup>2</sup>: Lipides Systèmes analytiques et biologiques

Equipe de Chimie Analytique Pharmaceutique, ex-EA 4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud

Faculté de Pharmacie, tour D2 3<sup>ème</sup> étage

5 rue Jean-Baptiste Clément

92296 Châtenay-Malabry Cedex

## Sommaire: Table des matières

Sommaire	iv
Liste des tableaux	
Liste des figures	х
Liste des abréviations	xiv
1 <sup>ère</sup> partie : Introduction Générale	1
Chapitre 1: Introduction	5
1- Les lipides	5
1-1- Définition des lipides	5
1-2- L'importance des Lipides	8
1-3- Les membranes biologiques	9
1-4- Les phospholipides (PLs)	10
1-4-1- La structure des phospholipides	10
a) Les glycérophospholipides	10
b) Sphingomyélines	11
1-4-2- Les principales sources de phospholipides	11
a) Les phospholipides naturels	11
b) Les PLs synthétiques	12
1-4-3- L'importance des phospholipides	12
1-4-4- Propriétés physiologiques des phospholipides	12
2- Les stratégies pour l'analyse des lipides	15
La Séparation Chromatographique	16
3- L'analyse chromatographique des lipides	17
3-1- Le principe de la chromatographie	18
<ul> <li>a) Les généralités sur une méthode chromatographique</li> </ul>	18
b) La chromatographie des lipides	18
3-2- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	19
3-2-1- Principe général	19
3-2-2- Les détecteurs en CPG	19
<ul> <li>a) détecteurs à ionisation de flamme(FID)</li> </ul>	20
1- Principe	20
2- Les caractéristiques de FID	21
3- Les atouts de FID	21
4- Les applications de FID à l'analyse du lipide	21
b) Les détecteurs à capture d'électrons (ECD)	21
Principe	21
c) Spectrométrie de masse par impact électronique	22
Le principe	22

3-2	2-3- La chromatographie gazeuse et l'analyse des lipides	23
3-2	2-4- L'application de CPG à l'analyse des phospholipides	24
3-2	2-5- Les inconvénients de l'analyse des phospholipides par CPG	25
3-3-	La Chromatographie en Phase Supercritique (SFC)	26
a)	La définition d'un fluide supercritique	26
b)	Principe général de SFC	26
c)	Les caractéristiques de dioxyde de carbone	26
d)	Les colonnes utilisées en SFC	26
e)	Les détecteurs en SFC	27
f)	L'application de SFC dans le domaine des lipides	27
3-3	8-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)	28
a)	Introduction	28
b)	Le principe de la chromatographie sur couche mince	28
c)	Les phases stationnaires	30
d)	Le système de détection	30
e)	L'analyse des Lipides par CCM	30
f)	Les applications de CCM pour la séparation des phospholipides	31
3-3	3-2- Chromatographie en phase liquide sur colonne remplie	32
La	détection par nébulisation et évaporation de solvants	34
1-	Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL)	34
1-1	<ul> <li>La base de fonctionnement de DEDL</li> </ul>	34
a)	Nébulisation de la phase mobile	35
b)	Evaporation du solvant	36
c)	Diffusion de la lumière	36
1-2	2- Application à l'analyse des phospholipides	37
2-	Détecteur d'aérosol chargé (Corona-CAD®)	45
2-1	L- Généralités	45
2-2	2- Fonctionnement	45
a)	Nébulisation	45
b)	Evaporation du solvant	46
c)	Ionisation des particules	46
d)	Détection des particules	46
2-3	3- Type de réponse	46
2-4	4- Application à l'analyse de lipides	47
3-	La spectrométrie de masse	50
a)	Généralités	50
b)	Historique	50
3-1	L- Les sources d'ionisation	51
3-1	I-1- La source d'ionisation electrospray ESI	51
a)	Généralités	51
b)	Le principe de l'ESI	52
c)	Les atouts et les inconvénients de la source ESI	53
d)	Le phénomène de suppression d'ions en ESI	54
3-2	2- Les analyseurs (séparation des ions)	54

3-2-1- LTQ-Orbitrap	56
a) Trappe ionique linéaire	57
b) L'Orbitrap	57
3-2-2- Trappe ionique	59
3-2-3- Quadripôle	61
3-2-4- Les différents modes d'acquisition	62
a) Le mode full scan (balavage)	62
b) Le mode précurseur d'ions (en TQ)	62
c) Le mode MS <sup>n</sup> data dépendant (en LTQ-Orbitrap)	63
3-3- Le détecteur	63
3-4- Application à l'analyse des PLs	64
4- Problématique	67
La quantification des lipides	67
2 <sup>ème</sup> partie : Travail Personnel	70
Chapitre 2 : Article N° 1	71
INTRODUCTION ARTICLE 1	72
ELSD vs Corona for detection and quantification of phospholipid classes: a comparison between	
phospholipid extracts from animal and from plant tissue	75
Abstract	75
1- Introduction	75
2- Experimental	78
2-1- Standards and samples	79
2-2- Apparatus	79
2-3- Chromatographic conditions	79 00
2-4- ELSD, COTONA-CAD experiments	00 20
2-6- Sample preparation	81
Standards and lecithin samples for phospholipids quantitative analysis study	81
3- Results and discussion	81
3-1- Detector response models	82
3-2- Validation of analysis method	85
3-2-1- Dixon test	85
3-2-2- Linearity	86
3-2-3- Precision	87
3-2-4- Validation of the model (ANOVA test)	89
3-3- Quantification of phospholipid classes in soybean and egg yolk lecithin	93
3-3-1- Phospholipid classes quantification in lecithin as a function of detection methods	
(ELSD, Corona-CAD <sup>®</sup> )	93
3-3-2- Phospholipid classes quantification in lecithin samples according to the extraction	
sources of PLs standards	95
3-3-3- Study of peak geometry	96
Chromatographic peak parameters calculation	97
References	99
CONCLUSION DU PREMIER ARTICLE	101
Chapitre 3: Article N° 2	104

INTRODUCTION ARTICLE N°2	105		
A study of inter-species ion suppression in electrospray mass spectrometry of some phospholipid			
classes	108		
Abstract			
Keywords	108		
Introduction	109		
Materials and methods	110		
1- Phospholipids and chemicals	110		
2- PLs molecular species solutions preparation	111		
3- Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) for TQ and LTQ-Orbitrap	111		
4- Flow Injection Analysis (FIA)	112		
Results	113		
1- Phosphatidylcholine structure effect on MS response	116		
1-1- Assessment of fatty acids chain length on the response intensity of PLs	116		
1-2- Assessment of PLs intensity depending on the degree of unsaturation	117		
1-3- Assessment of regioisomerism and unsaturation position effects	118		
2- PLs polar head structure effect on MS response	120		
3- Mutual influence of PLs on their ESI-MS response	121		
3-1- Mixture of PLs with important difference in chain length	121		
3-2- Mixture of saturated and unsaturated PLs	123		
Discussion and conclusion	125		
Acknowledgments	131		
References	132		
CONCLUSION DU DEUXIEME ARTICLE	134		
3 <sup>ème</sup> partie : Discussion générale et conclusion	138		
Références	151		
Annexe 1	162		
Caractérisation des classes de standards phospholipidiques et caractérisation des lécithines			
(lécithine de soja et lécithine de jaune d'œuf)	162		
Annexe 2	175		
Les espèces moléculaires utilisées	175		
Annexe 3	177		
Les spectres de masse pour quelques espèces moléculaires de PLS	177		
A) Exemple des spectres de masse des espèces moléculaires de différentes classes de PLs e	en		
ionisation en mode négatif	177		
B) Exemple des spectres de masse des espèces moléculaires de PC en ionisation en mode			
positif	180		
C) Exemple des spectres de masse pour différents mélanges des espèces moléculaires de F	С		
en ionisation en mode négatif	182		
Annexe 4	183		
Publications, Communications et Prix	183		

# Liste des tableaux

Tableau 1: Méthodes HPLC – DEDL pour l'analyse de lipides
Tableau 2 : Résolution et gamme de rapport m/z analysable par les principaux analyseurs [155] 55
Table 3: Solvent program gradient based on Godoy-Ramos et al. work with slight modifications[25].
Table 4: The maximum and minimum values of the coefficient of determination obtained overall experiments for Corona-CAD <sup>®</sup> and ELSD detectors for all phospholipid classes standards from plant and animal origin (PA, PI, PE, and PC)
Table 5: Repeatability and intermediate precision study with ELSD and Corona-CAD detection forphospholipid standards and lecithin samples.88
Table 6: statistical tests of regression, Fisher test for phospholipid analysis by HPLC/Corona-CAD 91
Table 7: statistical tests of regression, Fisher test for phospholipid analysis by HPLC/ELSD
Table 8: The ratio between the area of a PLs class peak considering the asymmetry of the calibrationrange to the areas before correction for both detectors DEDL and Corona-CAD and the ratiosbetween corrected peak areas on both DEDL and Corona-CAD
Table 9: Parameters set for TQ analyses.    112
Table 10: Parameters set for LTQ-Orbitrap analyses in full scan negative ion mode.       112
Table 11 m/z of main PC ions produced by positive and negative full scan ion modes 116
Table 12 PC(8:0/8:0) to PC(24:0/24:0) ratios calculated at the different levels of the calibration curvefor both instruments with different ionization modes117
Table 13 m/z list of major ions in full scan negative ion mode for PA, PE and PI classes
Tableau 14: Structures hypothétiques pour PA de jaune d'œuf et PA de soja en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> 165
Tableau 15: Caractérisation de standard de PA, issu de jaune d'œuf, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative165
Tableau 16: Caractérisation de standard de PA, issu de soja, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 17: Structures hypothétiques pour PI de bovin et PI de soja en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup>
Tableau 18: Caractérisation de standard de PI, issu de Bovine, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative

Tableau 19: Caractérisation de standard de PI, issu de Soja, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 20: Structures hypothétiques pour PE de jaune d'œuf et PE de soja en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> 168
Tableau 21: Caractérisation de standard de PE, issu de jaune d'œuf, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 22: Caractérisation de standard de PE, issu de Soja, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 23: Structures hypothétiques pour PC de jaune d'œuf et PC de soja en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> 170
Tableau 24: Caractérisation de standard de PC, issu de jaune d'œuf, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 25: Caractérisation de standard de PC, issu de Soja, par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 26:Structures hypothétiques pour la lécithine de jaune d'œuf et de soja ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> 172
Tableau 27:Caractérisation des classes de phospholipides dans la lécithine de soja (PA, PI, PE et PC) par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 28: Caractérisation des classes de phospholipides dans la lécithine de jaune d'œuf (PE et PC) par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> . Les données sont affichées en abondance relative
Tableau 29: L'ensemble des espèces phospholipidiques utilisées

# Liste des figures

Figure1: Les différentes catégories de lipides, leurs abréviations et certaines familles appartenant à chaque catégorie [4]
Figure 2: Schéma d'une membrane cellulaire [7]9
Figure 3: La structure de différentes classes de glycérophospholipides issues de source animale et végétale
Figure 4 : Les différentes étapes de l'analyse des lipides à partir de n'importe quel échantillon (l'extraction, la séparation analytique, l'identification et la quantification) et toutes les techniques utilisées [5]
Figure 5: Détecteur à ionisation de flamme(FID) [29]20
Figure 6: principe de CCM
Figure 7: Séparation des lipides par chromatographie liquide à polarité de phase inversée/LTQ-FT [55]
Figure 8: La séparation des lipides du foie de rat par NP-HPLC avec une détection de masse [56] 34
Figure 9: Schéma de fonctionnement du DEDL qui montre la nébulisation, l'évaporation et la diffusion de la lumière [58]
Figure 10: Schéma de fonctionnement d'un détecteur d'aérosol chargé, le Corona-CAD <sup>®</sup> 45
Figure 11: Principe de l'ionisation par electrospray [143]
Figure 12: Schéma d'un spectromètre de masse hybride trappe à ions linéaire/Orbitrap [158] 57
Figure 13: Schéma représentant l'analyseur Orbitrap[161]58
Figure 14: Analyseur par trappe d'ions[161]60
Figure 15: Principe de la dissociation induite par collision
Figure 16: Principe de l'analyseur quadripolaire
Figure 17: Schéma d'un détecteur de type "chaneltron" 64
Figure 18: separation of phospholipid standards from plant and animal origin on PVA-SIL column with ELSD and Corona-CAD detectors (0.6g/L of PA, PI, PE and PC)
Figure 19: separation of phospholipids from the soybean lecithin and egg yolk lecithin on PVA-SIL culumn with ELSD and Corona-CAD detectors ( 2 g/L of soybean and egg yolk lecithin)

Figure 20: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the Corona-CAD detector, log-log transformation model
Figure 21: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the Corona-CAD detector, power model
Figure 22: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the ELSD detector, log-log transformation model
Figure 23: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the ELSD detector, power model
Figure 24: Quantification of PLs classes in soybean lecithin vs. standards of (A) plant source, (B) animal source
Figure 25: Quantification of PLs classes in egg yolk lecithin vs. standards of (A) animal source, (B) plant source
Figure 26: Quantification of PLs classes in soybean lecithin (A), and in egg yolk lecithin (B) with Corona-CAD <sup>®</sup> detection
Figure 27: Quantification of PLs in soybean lecithin (A), and in egg yolk lecithin (B) with ELSD detection
Fig. 28 Comparison of intensities between adducts for saturated PC species with short chains from 8 to 16 carbons at different concentration levels in LTQ-Orbitrap tuned to full scan negative ion mode. A: [PC+OAc] <sup>-</sup> , B: [PC+CI] <sup>-</sup> , C: [PC-CH3] <sup>-</sup> and D: sum of intensities of major adducts
Fig. 29 Comparison of intensities between adducts for saturated PC species with short chains from 8 to 16 carbons at different concentration levels in TQ tuned to full scan negative ion mode. A: [PC+OAc] <sup>-</sup> , B: [PC+CI] <sup>-</sup> , C: [PC-CH3] <sup>-</sup> and D: sum of intensities of major adducts
Fig. 30 Intensities of major ion obtained for saturated PC with chains from 8 to 24 carbons at different concentration levels; A: negative full scan mode in TQ; B: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; C: ion precursor mode of 184 in TQ; and D: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap 117
Fig. 31 Intensity of major ion of unsaturated PC according to the concentration. A: negative full scan mode in TQ; B: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; C: ion precursor mode of 184 in TQ; and D: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap
Fig. 32 PC(18:0/14:0) and PC(14:0/18:0) response and standard deviation according to the concentration in different ionization modes; A: negative full scan mode in TQ; B: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; C: ion precursor mode of 184 in TQ; and D: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap
Fig. 33 Intensities of major ion of PC(18:1(6Z)/18:1(6Z)) and PC(18:1(9Z)/18:1(9Z)) according to the concentration; A: negative full scan mode in TQ; B: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; C: ion precursor mode of 184 in TQ; and D: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap

Fig. 34 Major ion response of PA, PI, PE and PC 8:0 at different concentration levels in TQ (A) and LTQ-Orbitrap (B) tuned to full scan negative ion mode
Fig. 35 The MS response of acetate ion for PC(8:0/8:0) alone and in mixture with PC(24:0/24:0) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/ $\mu$ L (A); at 10 pmol/ $\mu$ L (B); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/ $\mu$ L (C), and at 10 pmol/ $\mu$ L (D)
Fig. 36 The MS response of acetate ion for PC(24:0/24:0) alone and in mixture with PC(8:0/8:0) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/ $\mu$ L (A), at 10 pmol/ $\mu$ L (B); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/ $\mu$ L (C), and at 10 pmol/ $\mu$ L (D)
Fig. 37 MS response of acetate ion for PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) alone and in mixture with PC(18:0/18:0) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/μL (A), at 10 pmol/μL (B); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/μL (C),and at 10 pmol/μL (D)
Fig. 38 MS response of acetate ion for PC(18:0/18:0) alone and in mixture with PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/μL (A), at 10 pmol/μL (B); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/μL (C), and at 10 pmol/μL (D)
Figure 39: Représentation du courant ionique total en MS d'une lécithine et des standards de phospholipides à 0,5g/L (mode négatif)162
Figure 40: Représentation du courant ionique total en MS de la lécithine d'origine animale et d'origine végétale à 0.5 g/L (mode négatif)162
Figure 41: Représentation du courant ionique total en MS, de la lécithine, des phospholipides d'origine animale, d'origine végétale et du chloroforme (les blancs), en ionisations positive et négative
Figure 42: Représentation du courant ionique total des PC de jaune d'œuf, (ionisation en mode positif); sélection de l'intervalle de rétention des ions les plus abondants, affichage de la MS <sup>1</sup> , la MS <sup>2</sup> et la MS <sup>3</sup> ; attribution des ions par calcul et recours à la base de données Lipid-Maps. L'exemple présenté est sur l'ion à 762.59 g.mol <sup>-1</sup> . Ce travail est réalisé sur tous les ions pour chaque phospholipide
Figure 43: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour la PC(8:0/8:0) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PC+OAc] <sup>-</sup> , [PC+CI] <sup>-</sup> , [PC-CH3] <sup>-</sup>
Figure 44: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour la PC(24:0/24:0) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PC+OAc] <sup>-</sup> , [PC+CI] <sup>-</sup>
Figure 45: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PC+OAc] <sup>-</sup> , [PC+CI] <sup>-</sup> , [PC-CH3] <sup>-</sup>
Figure 46: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PA(8:0/8:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PA-H] <sup>-</sup> , [PA-H+Na+OAc] <sup>-</sup> , [2PA-H] <sup>-</sup>

Figure 47:Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PE(8:0/8:0) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PE-H] <sup>-</sup> , [2PE-H] <sup>-</sup>
Figure 48: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PI(8:0/8:0) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PI-H] <sup>-</sup> , [2PI-H] <sup>-</sup>
Figure 49: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(8:0/8:0) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode positif). Les ions formés: [PC+H] <sup>+</sup> , [PC+TEA+H] <sup>+</sup>
Figure 50: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(24:0/24:0) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode positif). Les ions formés: [PC+H] <sup>+</sup> , [PC+TEA+H] <sup>+</sup>
Figure 51: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(18:2(9Ζ,12Ζ)/18:2(9Ζ,12Ζ)) 250 pmol/μL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode positif). Les ions formés: [PC+H] <sup>+</sup> , [PC+TEA+H] <sup>+</sup>
Figure 52: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour le mélange PC(8:0/8:0) et PC(24:0/24:0) à 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif)
Figure 53: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour le mélange PC(18:0/18:0) et PC(18:2/18:2) à 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif)

# Liste des abréviations

AG:	Acide gras
APCI:	Ionisation chimique à pression atmosphérique
APPI:	Atmospheric Pressure Photolonisation
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
CI:	Ionisation chimique
CID:	Collision Induced Dissociation
Corona-CAD <sup>®</sup> :	Détecteur d'aérosol chargé
CPG:	Chromatographie en phase Gazeuse
DEDL:	Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière
ECD:	Détecteur à capteur d'électrons
EI:	Ionisation électronique
ESI:	Ionisation par électronébulisation (électrospray)
FA:	Acide gras (fatty acid)
FAB:	Bombardement par atome rapide
FAMES:	Acides gras d'ester méthylés
FID:	Détecteur à ionisation de flamme
FT-ICR:	L'analyseur à résonance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier
GL:	Glycérolipides
GLC:	Chromatographie gaz-liquide
GP:	Glycérophospholipides
HPLC (CLHP):	Chromatographie liquide à haute performance
HPCCM ou HPTLC:	High performance thin layer chromatography
IRTF:	Infrarouge à transformée de Fourier
LC (CL):	Chromatographie Liquide (liquid chromatography)
LC-MS:	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LOD:	Limite de détection
LOQ:	Limite de quantification
LNj:	Lécithine de jaune d'œuf
LNs:	Lécithine de soja
MALDI:	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MS (SM):	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
m/z:	Rapport masse/charge
NSI:	Nano-spray Ionisation
NP-LC:	Chromatographie Liquide à polarité de Phase Normale
PA:	Acide phosphatidique (Phosphatidic Acid)
PC:	Phosphatidylcholine

PE:	Phoshatidyléthanolamine
PG:	Phosphatidylglycérol
PI:	Phosphatidylinositol
PLs:	Phospholipides
RI:	Indice de réfraction
PS:	Phosphatidylsérine
RP-LC:	Chromatographie Liquide à polarité de Phases Inversée
SFC:	Chromatographie en phase supercritique
SIMS:	spectrométrie de masse à ionisation secondaire
SMs:	Sphingomyélines
SP:	Sphingolipides
TCD:	Détecteur à conductivité thermique
TEA:	Triéthylamine
TIC:	Courant ionique total
TOF:	Temps de vol (Time-of-Flight)
TQ:	Triple quadripôle
UV:	Ultraviolet

# 1<sup>ère</sup> partie

Introduction Générale

Les travaux faisant l'objet de la présente thèse ont été réalisés au sein de l'Unité Universitaire Interdisciplinaire Lipides: Systèmes analytiques et biologiques Lip(Sys)<sup>2</sup>, équipe de Chimie Analytique Pharmaceutique (ex EA 4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud) à l' UFR de Pharmacie de l'Université Paris-Sud. Ces travaux ont pour objectif d'étudier les aspects théoriques et pratiques de l'analyse quantitative des classes lipidiques ou plus précisément les classes phospholipidiques dans les échantillons biologiques. Cette étude a été réalisée d'une part à l'échelle des classes de lipides par l'usage des détecteurs universels DEDL et Corona-CAD<sup>®</sup> et d'autre part, à l'échelle des espèces moléculaires de lipides, par l'usage de la spectrométrie de masse.

De nombreuses études ont déjà abordé la quantification des lipides. Plusieurs techniques analytiques ont été utilisées pour ces raisons. Pourtant, il reste toujours utile et nécessaire de s'investir dans ce domaine. Des avancées au niveau de développement ou de l'optimisation des méthodes analytiques pourront être apportées pour analyser les lipides contenus dans les échantillons naturels ou biologiques. D'autres progrès en termes de compréhension de l'impact de la structure des lipides sur les résultats analytiques obtenus peuvent être réalisés. Ce dernier point est principalement abordé alors que la spectrométrie de masse est sollicitée pour les propos quantitatifs.

Ce document qui présente mes travaux de thèse se focalise sur plusieurs points. Tout d'abord, un premier chapitre bibliographique est consacré aux lipides, à leur polarité ainsi qu'à leur variabilité. Les lipides diffèrent au niveau de leur composition structurale au niveau de leur tête polaire, de leurs acides gras aussi bien en termes de longueur de la chaîne alkyle que du nombre et la position des insaturations.

Par la suite, ce chapitre bibliographique sera consacré aux stratégies analytiques suivies pour analyser les lipides. Cette partie abordera les techniques appliquées à l'analyse des lipides et en particulier les aspects de détection. Dans ce contexte, plusieurs techniques analytiques utilisés dans le domaine de l'analyse des lipides seront abordées telles que les chromatographies en phase gazeuse, liquide et supercritique. De plus, la spectrométrie de masse basse et haute résolution sera abordés, et certains analyseurs utilisés au cours de ce

travail de thèse seront détaillés. De même, la source d'ionisation électrospray, qui est bien adaptée à l'analyse des PLs sera décrite.

La problématique de ce travail sera abordée, vis-à-vis d'abord des détecteurs universels (DEDL-Corona-CAD<sup>®</sup>) lors de couplage de la chromatographie liquide haute performance à polarité de phase normale. Le but de ce couplage est de quantifier l'ensemble des classes phospholipidiques existantes dans les échantillons naturels ou biologiques. La quantification des classes des lipides se fait via l'usage des standards lipidiques issus de différentes sources d'extraction.

Nous envisagerons ensuite cette problématique vis-à-vis du spectromètre de masse triple quadripôle et du spectromètre de masse haute résolution Orbitrap. L'effet de la structure des lipides sur la réponse de la spectrométrie de masse sera évalué. Nous allons nous intéresser ici au phénomène de suppression d'ionisation qui peut se produire lorsque la quantification des lipides utilise la spectrométrie de masse comme méthode de détection.

Les travaux personnels développés dans le cadre de cette thèse sont présentés sous forme de deux publications. Le deuxième chapitre correspond à une première publication qui concerne l'analyse quantitative des classes phospholipidiques dans les échantillons naturels par l'usage des détecteurs universels (DEDL, Corona-CAD®). Cet article traite de la quantification des PLs par l'usage des standards phospholipidiques provenant de source animale ou végétale. Pour cela, un système de CLHP en phase normale utilisant une colonne PVA a été couplé à des détecteurs universels DEDL et Corona-CAD®. Une méthode de séparation des classes de PLs a été optimisée et utilisée au cours de ce travail. L'effet de l'origine des standards, suivant la source d'extraction, a été évalué sur les résultats de quantification. De même, la composition par classes en espèces moléculaires des standards a été évaluée concernant la géométrie des pics chromatographiques.

La deuxième publication fait l'objet du troisième chapitre de cette thèse. Cet article se focalise sur l'évaluation de l'effet de la structure des PLs à l'échelle de l'espèce moléculaire sur la réponse en spectrométrie de masse. Deux types d'analyseurs ont été utilisés, en basse et en haute résolution (un triple quadripôle et un LTQ-Orbitrap respectivement). La compréhension de l'effet de la structure des PLs sur la réponse de SM permet, par la suite, de construire des mélanges des espèces de PLs. L'analyse de ces mélanges par SM a amené à

évaluer le phénomène de suppression d'ionisation qui existe entre ces espèces moléculaires. Ce phénomène peut se produire en couplage CLHP/SM lors de co-élutions, principalement lorsque la source électrospray est utilisée pour ioniser les PLs. Le fait de comprendre le phénomène de suppression d'ion entre les espèces de PLs permettra de corriger et d'améliorer la quantification dans les échantillons biologiques.

## **Chapitre 1: Introduction**

#### **1- Les lipides**

Les lipides sont plus connus sous le terme de graisses. Ils sont connus et utilisés par l'être humain depuis longtemps, mais ils n'ont été étudiés que récemment. Ce retard est dû aux difficultés rencontrées au niveau des méthodes employées, en particulier les méthodes de séparation, d'identification, et de quantification de ces composés complexes. De plus, les lipides peuvent varier sensiblement en terme de polarité, ils manquent de chromophores exploitables ce qui les écarte de toute détection spectrophotométrique.

#### 1-1- Définition des lipides :

Même si, de nos jours, une définition unique des lipides n'est pas encore donnée, nous essayerons dans un premier temps de définir ces composés de différentes manières.

Les lipides sont décrits dans la plupart des ouvrages en tant que groupe de composés très solubles dans les solvants organiques. Cependant, une définition de ce genre est moins utilisée de nos jours, car certaines classes lipidiques sont désormais considérées comme les lipides qui peuvent être presque aussi soluble dans l'eau que dans les solvants organiques. Ces lipides comprennent les isoprénoïdes et les sucres acylaminés [1, 2].

Des définitions plus précises sont possibles lorsque les lipides sont considérés d'un point de vue structurel et biosynthétique. De nombreux systèmes de classification ont été développés au cours des dernières années. Cependant, dans une volonté de classification globale, les lipides sont définis sous forme de petites molécules hydrophobes ou amphipathiques qui peuvent provenir entièrement ou en partie par la condensation basée sur le carbanion des thioesters (acides gras, des polykétides) et / ou par la condensation basée sur de carbocations de l'unité de l'isoprène (prénols, des stérols, etc.) [1].

En outre, les lipides ont été subdivisés en deux groupes «simples» et «complexes». Les lipides simples étant des produits de l'hydrolyse (par exemple, les acides gras, les stérols et

acylglycérols). Ils sont définis comme des molécules qui produisent par l'hydrolyse deux types de produits primaires par mole. Tandis que, les lipides complexes (glycérophospholipides et glycosphingolipides) donnent trois ou plusieurs produits hydrolysés primaires par mole [1]. La nouvelle subdivision des lipides en deux grandes classes est pratique surtout pour les applications en chromatographie. Les lipides complexes, pour de nombreuses raisons, sont mieux pris en compte en termes soit des glycérophospholipides (ou simplement en tant que phospholipides) qui contient une portion polaire phosphorée et un squelette glycérol, soit des glycolipides (les deux: glycoglycérolipides et glycosphingolipides) qui contiennent une portion carbohydrate polaire, puisque ceux-ci sont plus facilement analysés séparément. La situation est encore compliquée par la présence des phosphoglycolipides et sphingophospholipides.

Le site web LIPIDS MAPS (métabolites des lipides, et les voies métaboliques <u>http://www.lipidmaps.org</u>) fournit des ressources en ligne utiles pour avoir une vision globale de ces molécules et de leurs structures. Une classification décrit précisément les différents lipides, et les a classés au niveau de leur nomenclatures en 2005 [1]. Elle a été développée et mise à jour en 2009 en tenant compte des voies de biosynthèse des lipides [2, 3]. La première étape vers la classification des lipides est la mise en place d'une systématique extensible, flexible et évolutive. Ces molécules devaient être classées, nommées être présentées d'une manière logique, pour, par la suite, être liée à la base de données et à l'algorithmique informatique.

Une classification générale des lipides développée dans le cadre des « shotgun lipidomics » a été décrite tout en dépendant des propriétés analytiques ou des propriétés de charge de ces composés. Les différentes classes de lipides présentent ces propriétés en fonction de leurs groupes fonctionnels [4].

En se basant sur ces propriétés de charge, les lipides peuvent être classés en trois grandes catégories. D'abord, les espèces anioniques de lipides, ce sont des lipides porteurs au moins une charge négative nette dans des conditions faibles d'acidité (pH proche de 5), des exemples de ces lipides sont les cardiolipides, les phosphatidylglycérols et les phosphatidylinositols. Deuxièmement, les espèces anioniques faibles qui sont des classes des lipides électriquement neutres dans des conditions faibles d'acidité. Par contre, ils se

chargent négativement dans des conditions de pH alcalin (par exemple; l'éthanolamineglycérophospholipide (PE), lyso PE et les céramides). Troisièmement, les espèces électriquement neutres, ce sont des classes lipidiques électriquement neutres, mais polaires ou polarisables (par exemple, les cérébrosides, sphimgomyélines et le cholestérol avec ses esters) [5, 6].

En spectrométrie de masse, les lipides anioniques peuvent être directement ionisés. L'ionisation peut se faire sélectivement en mode négatif, et par la suite ces lipides sont analysés depuis leurs extraits lipidiques. L'extrait lipidique est ensuite alcalinisé légèrement par l'ajout d'une petite quantité de LiOH (ou d'une autre base appropriée). Les lipides faiblement anioniques peuvent également être analysés en ionisation négative. Toutes les espèces lipidiques électriquement neutres peuvent être analysées en mode positif [5].

Category	Abbreviation	Sub-categories
Fatty acyls	FA	Fatty acids and conjugates [FA01] Octadecanoids [FA02] Eicosanoids [FA03] Docosanoids [FA04] Fatty alcohols [FA05] Fatty aldehydes [FA06] Fatty esters [FA07]
Glycerolipids	GL	Monoradylglycerols [GL01] Diradylglycerols [GL02] Triradylglycerols [GL03]
Glycerophospholipids	GP	Phosphatidic acids [GP10] Phosphatidylcholines [GP01] Phosphatidylserines [GP03] Phosphatidylglycerols [GP04] Phosphatidylethanolamines [GP02] Phosphatidylinositols [GP06] Phosphatidylinositides [GP07-09] Cardiolipins [GP12]
Sphingolipids	SP	Sphingoid bases [SP01] Ceramides [SP02] Phosphosphingolipids [SP03] Phosphonosphingolipids [SP04] Neutral glycosphingolipids [SP05] Acidic glycosphingolipids [SP06]
Sterol lipids	ST	Sterols [ST01] Steroids [ST02] Secosteroids [ST03] Bile acids and derivatives [ST04]
Prenol lipids	PR	Isoprenoids [PR01] Quinones and hydroquinones [PR02] Polyprenols [PR03]
Saccharolipids	SL	Acylaminosugars [SL01] Acylaminosugar glycans [SL02] Acyltrehaloses [SL03] Acyltrehalose glycans [SL04]
Polyketides	РК	Macrolide polyketides [PK01] Aromatic polyketides [PK02] Non-ribosomal peptide/polyketide hybrids [PK03]

Figure1: Les différentes catégories de lipides, leurs abréviations et certaines familles appartenant à chaque catégorie [4].

#### 1-2- L'importance des Lipides:

Les lipides sont considérés comme des matériaux de construction des membranes biologiques. En effet, les lipides, ont un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de la structure cellulaire en formant une membrane bicouche constituée de phospholipides dans les tissus animaux et les tissus des plantes.

Les lipides peuvent servir également comme des composants pour le stockage d'énergie (triglycérides), de même qu'ils fournissent un environnement hydrophobe approprié pour les interactions et les interactions membrane-protéine [4]. Les lipides jouent des rôles divers et importants dans la nutrition et la santé, et beaucoup de lipides sont absolument

essentiels pour la vie. L'être humain a besoin de certains acides gras essentiels (l'acide linoléique, l'acide alpha-linolénique) parce qu'ils ne peuvent pas être synthétisés. Par ailleurs, les lipides sont des biomarqueurs de certaines maladies telle que l'hypercholestérolémie où des niveaux anormaux de certains lipides, en particulier le taux de cholestérol peuvent être présents. Par ailleurs, les acides gras (Trans) sont des facteurs de risque pour les maladies cardiaques [4].

#### 1-3- Les membranes biologiques :

Une membrane biologique est un assemblage de molécules lipidiques et protéiques. Les composés lipidiques sont organisés sous forme d'une bicouche fluide tout au long de laquelle des protéines intrinsèques insérées et des protéines extrinsèques associées en périphérie sont trouvés (figure 3).



Figure 2: Schéma d'une membrane cellulaire [7].

Les membranes peuvent présenter la fonction d'isoler les cellules du milieu extérieur. Une autre fonction pour la vie cellulaire est l'échange permanent entre le cytosol et le milieu extracellulaire. Les différents complexes protéiques des membranes permettent une perméabilité très sélectivité grâce à la formation de canaux, de transporteurs et d'enzymespompes. La composition et la distribution des lipides constitutifs des membranes est différente en fonction de type de membrane. En général, les lipides membranaires appartiennent aux classes des sphingolipides, stérols, glycolipides et glycérophospholipides.

#### 1-4- Les phospholipides (PLs):

Les phospholipides sont des lipides contenant du phosphore. Une portion polaire et une portion non-polaire sont présentes dans leurs structures.

#### 1-4-1- La structure des phospholipides:

Les PLs sont des molécules dans lesquelles la tête hydrophile et les chaînes alkyles hydrophobes sont liés à un alcool. La variation dans les groupes de la tête, les chaînes et l'alcool conduit à l'existence d'une grande variété de PLs. Selon les alcools contenus dans les phospholipides, ils peuvent être divisés en glycérophospholipides ou sphingophospholipides.

#### a) Les glycérophospholipides:

La structure chimique des glycérophospholipides peut être classée par le groupe de tête polaire, la longueur, le nombre d'insaturations des chaînes hydrophobes et le type de liaison entre les fragments aliphatiques. La nature de la tête polaire conduit à différentes glycérophospholipides (différentes classes) telles que la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylinositol (PI), le phosphatidylglycérol (PG) et le cardiolipide (CL).



Figure 3: La structure de différentes classes de glycérophospholipides issues de source animale et végétale.

La longueur des chaines alkyles, le nombre et la position des doubles liaisons sur les chaînes dans une même classe conduit à différents glycérophospholipides (différentes espèces moléculaires). Le type de liaison (ester ou éther) entre les chaînes aliphatiques et le glycérol détermine des différents glycérophospholipides tels que les plasmalogènes [8].

#### b) Sphingomyélines:

Leurs structures est de N-acylsphingosine-1-phosphatidylcholine. Les SMs sont des composants importants des membranes de cellules animales.

#### 1-4-2- Les principales sources de phospholipides:

Selon les sources, PLs peuvent être divisés en phospholipides naturels et phospholipides synthétiques.

#### a) Les phospholipides naturels:

Les PLs ont été trouvé dans le cerveau humain en 1812 par Vauquelin. En 1846, Gobley a réussi à séparer les PLs du jaune d'œuf. Le terme "lécithine" qui est dérivé de *lekithos*en

grecs a été d'abord utilisé pour décrire un matériau orange collant isolé de jaune d'œuf. Vingt ans après, la choline a été mise en évidence dans la lécithine [9]. Selon la littérature, trois définitions de la "lécithine" existent. D'un point de vue commercial, la lécithine comprend principalement PI, PE, PC, PS et d'autres PLs ainsi que des triglycérides, des acides gras et des hydrates de carbone. D'un point de vue historique, la lécithine se réfère à des lipides contenant du phosphore isolé à partir d'œufs et de cerveaux. D'un point de vue scientifique, la lécithine se réfère à la phosphatidylcholine [10].

Les PLs sont largement distribués dans les animaux et les plantes. Les principales sources comprennent les huiles végétales (le soja, les graines de coton, le maïs, le tournesol et le colza), et les tissus animaux (le jaune d'œuf et le cerveau de bovin). En termes de production, le jaune d'œuf et le soja sont les sources les plus importantes pour les PLs [11].

#### b) Les PLs synthétiques:

La synthèse des PLs peut être divisée en synthèse totale et demi-synthèse, cette dernière demande moins d'étapes de réaction que la synthèse totale. Les PLs obtenus par des méthodes synthétiques ou demi-synthétiques sont normalement plus onéreux que les PLs isolés à partir de sources naturelles [8]. Les PLs isolés à partir de plantes et d'animaux peuvent correspondre à différents niveaux de pureté, y compris la qualité pharmaceutique et/ou nutritionnelle.

#### 1-4-3- L'importance des phospholipides:

Les PLs sont des matières de base pour maintenir l'activité de la vie. Leurs structures amphiphiles les rendent nécessairement largement utilisés. Ils sont des composants indispensables de toutes les membranes cellulaires et sous-cellulaires, ils peuvent s'organiser sous forme de bicouches membranaires.

#### 1-4-4- Propriétés physiologiques des phospholipides:

Les PLs forment des liposomes, qui peuvent être utilisés comme des vecteurs de médicaments [12]. Les PLs sont importants en physiologie et médecine humaine. Ils sont d'abord utilisés comme émulsifiants car ils ont de bonnes propriétés d'émulsification et peuvent stabiliser les émulsions [13]. Dans ce contexte, ils forment avec le cholestérol et les

acides biliaires des micelles mixtes dans la vésicule biliaire afin de promouvoir l'absorption de substances liposolubles. Deuxièmement, les PLs se comportent comme agents mouillants tensioactifs dans la plèvre et les alvéoles du poumon, du péricarde, les articulations. Le comportement des PLs comme agents mouillants tensioactifs peut aider à améliorer l'hydrophilie des médicaments hydrophobes [14].

Les PLs peuvent jouer un rôle dans la prévention du risque cardiovasculaire. Les maladies cardio-vasculaires sont, en général, l'une des premières causes de décès. Les facteurs nutritionnels constituent une des facteurs responsables de l'augmentation du risque cardiovasculaire. Les PLs alimentaires peuvent influencer des facteurs comme l'hyperhomocystéinémie et l'hypercholestérolémie. L'homocystéine est un composé intermédiaire formé au cours du métabolisme de la méthionine, c'est un métabolite dont l'élimination dépend directement de la choline [15].

Par ailleurs, des études dans la littérature ont déjà présenté la liaison directe entre le diabète et la consommation de graisses saturées. Cet effet est moins marqué chez les gens consommant une quantité plus importante de graisses polyinsaturées. La PC polyinsaturée montre un effet cytoprotecteur envers les cellules bêta du pancréas, le fait qui garde la synthèse de l'insuline et de sa sécrétion pour une homéostasie normale du glucose [16].

Les acides gras polyinsaturés trouvés dans les PLs membranaires jouent un rôle de régulateur sur les cellules. Une diminution de la synthèse de ces composés est observée lors du diabète, ce qui produit de problème au niveau du métabolisme des membranes ainsi qu'au niveau microcirculatoire, ce qui peut aboutir à des neuropathies. L'utilisation de PLs contenant (22:6) permet de rétablir le flux sanguin chez des patients diabétiques atteints de neuropathie [17].

Les PLs et en particulier ceux qui existent dans la lécithine procèdent un rôle de prévention dans certaines pathologies telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson » [18]. Certains aliments et surtout la lécithine peuvent faire progresser les capacités d'apprentissage grâce à son richesse en choline. L'augmentation de la concentration de la choline dans le plasma renforce sa concentration et la concentration de l'acétylcholine dans le cerveau. Par ailleurs, le manque des sources de la choline ou de la lécithine peut produire une accumulation des TG dans le foie et par la suite une accumulation de DG en raison du

métabolisme des TG en DG. Ce manque peut contribuer au développement du cancer du foie [18, 19].

#### 2- Les stratégies pour l'analyse des lipides:

L'analyse des lipides s'avère complexe car ces substances peuvent varier de façon marquée en termes de polarité de même qu'ils manquent de chromophores exploitables qui pourraient faciliter la détection spectrophotométrique. En prenant en compte les aspects précédemment décrits concernant la classification des lipides, l'amélioration et le développement des méthodes analytiques pour l'analyse complète des lipides sont des éléments fondamentaux dans les milieux universitaires, industriels et médicaux. En principe, une méthode d'analyse pour déterminer les composés lipidiques individuels comprend trois étapes. D'abord, l'extraction, ensuite la séparation analytique, et enfin l'identification et la quantification. Un des problèmes rencontrés lors de l'analyse des lipides est que les acides gras insaturés sont vulnérables à l'oxydation. Dans ce contexte, l'augmentation de nombre de doubles liaisons accélère le risque d'oxydation (par exemple, les phospholipides contenants un pourcentage élevé des acides gras insaturés principalement les acides linoléique et arachidonique sont plus susceptibles à l'oxydation).

Le but de cette partie de thèse est de fournir un aperçu de la plupart des possibilités que l'analyste peut considérer quand il s'intéresse à l'analyse du lipide, et d'essayer de comparer les potentialités des techniques.

Cette partie introductive détaille les systèmes de détection en les situant parmi les méthodes chromatographiques usuellement utilisées. Celles-ci étant maintenant classiques, leurs principes sont simplement rappelés cependant qu'une attention particulière est portée aux systèmes de détection.
# La Séparation Chromatographique

Le but final de la chromatographie des lipides est la résolution complète des classes lipidiques, ainsi que les différentes espèces moléculaires. L'analyse des lipides comprend deux aspects importants: la séparation et la détection.

D'une part, la séparation est réalisée au sein d'un système chromatographique qui se compose, d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Chaque composé ou soluté est reparti via ce système entre la phase stationnaire (qui le retient sélectivement) et une phase mobile (qui l'entraîne en fonction de sa solubilité). Cette répartition des solutés est gouvernée par leurs propriétés physicochimiques. La distribution des solutés dans les deux phases est influencée directement par ces propriétés.

D'autre part, et sachant que les lipides sont dépourvus de chromophore exploitable, leur détections utilise des méthodes adaptées comme le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière DEDL, le détecteur d'aérosol chargé Corona CAD<sup>®</sup> et la spectrométrie de masse SM.



Figure 4 : Les différentes étapes de l'analyse des lipides à partir de n'importe quel échantillon (l'extraction, la séparation analytique, l'identification et la quantification) et toutes les techniques utilisées [5].

# 3- L'analyse chromatographique des lipides:

En mars 1903, Mikhail Tswett, un botaniste d'origine russe a publié son premier travail sur l'utilisation de particules solides, tassées dans une colonne de verre remplie de carbonate de calcium pour séparer des pigments végétaux. Le nom de Tswett a été relié avec la notion de la chromatographie car il est bien connu que Tswett a inséré le terme chromatographie en 1906 quand il a écrit: "j'appelle une telle préparation, chromatogramme et la méthode correspondante est une méthode chromatographique" [20, 21]. Il a été mentionné par un certain nombre de personne que le nom Tswett signifie «couleur» en Russe.

Par ailleurs, il a été démontré que le terme chromatographie a été en utilisation depuis le 19<sup>ème</sup> siècle. George Field, le marchand de couleurs à cette époque, a publié son traité sur la chromatographie en 1835 [21], et cela est à 71 ans avant le terme déclenché par Tswett.

Puis, les travaux de Tswett ont été oubliés pendant longtemps. Il aurait fallu attendre la publication de Kuhn et Lederer en 1931 [22] sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour pouvoir décrire la chromatographie comme un outil analytique. Les travaux de Kuhn au sujet de la chromatographie sur phase mince, et la chromatographie d'échange d'ions ont fait l'objet d'un prix Nobel en 1938.

La théorie de la chromatographie et une application concernant le micro-détermination des monoamino-acides dans les protéines ont été développés par Martin et Synge en 1941 [23]. Leur travail de chromatographie de partage sur gel de silice a fait l'objet aussi d'un prix Nobel de chimie en 1952.

Ensuite, des développements de la chromatographie sur papier en 1944 sont réalisés par Consden-Gordon et Martin [24]. En 1948, le prix Nobel est attribué à Tiselius (premier détecteur optique par mesure du changement d'indice de réfraction, premier système de gradient d'élution). En 1959, la filtration sur gel (chromatographie d'exclusion stérique) est apparue [25], la chromatographie liquide moderne ou CLHP date de 1969.

Avec le développement successif des méthodes séparatives, des développements parallèles ont été mis en place concernant les colonnes chromatographiques surtout en ce qui concerne la taille des leurs particules en essayant de gagner toujours en performance.

# **3-1-** Le principe de la chromatographie:

### a) Les généralités sur une méthode chromatographique :

Une méthode chromatographique aboutit à la séparation des divers solutés d'un mélange. La base de cette séparation est la distribution des solutés entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire qui est fixe, l'autre mobile (phase mobile). Tous les solutés sont forcés au départ à parcourir un même chemin. La phase mobile est utilisée pour véhiculer les solutés, il peut être soit un liquide soit un gaz. La phase stationnaire est généralement immobilisée dans une colonne, peut être un solide ou un liquide fixé sur un solide, son rôle est d'immobiliser ces solutés. Ce système de deux phases est couplé à un système d'injection des échantillons à analyser et à un système de détection [26].

L'état physique de la phase mobile est important pour distinguer le type de la chromatographie appliquée. Le terme CPG est employé quand la phase mobile est un gaz, et les solutés sont menés sur la colonne soit directement ou après volatilisation dans le cas d'un échantillon gazeux ou liquide respectivement.

Quand la phase mobile est composée d'un solvant ou d'un mélange complexe des solvants nous parlons de la chromatographie en phase liquide (CPL), tandis que le terme chromatographie en phase supercritique (CPS) est abordé quand la phase mobile est un fluide à l'état supercritique.

## b) La chromatographie des lipides :

La découverte de la chromatographie gaz-liquide (GLC) en 1950 a révolutionné l'analyse des acides gras et cette technique est la plus fréquemment utilisée avec la détection par

ionisation de flamme (FID). La chromatographie sur couche mince (CCM) est la première méthode chromatographique qui a été employée pour l'analyse des phospholipides suivie de la CLHP qui est devenue plus récemment la méthode de choix pour séparer les classes phospholipidiques et les espèces moléculaires [27]. Plusieurs détecteurs peuvent être couramment utilisés en CLHP tel que le détecteur à indice de réfraction (RI), le spectrophotomètre (UV/Vis), le détecteur de fluorescence, et les détecteurs évaporatifs (DEDL et Corona CAD<sup>®</sup>).

Les couplages LC-MS essentiellement en mode d'ionisation ESI ont été largement avancés dernièrement pour les études du profilage lipidique permettant l'identification simultanée des classes lipidiques et des espèces moléculaires.

# 3-2- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

### 3-2-1- Principe général:

La technique de chromatographie en phase gazeuse (CPG) utilise comme fluide porteur un gaz et comme phase stationnaire un solide qui peut être imprégné par un liquide ou chimiquement modifié par un composé polymérisé à sa surface. L'échantillon volatilisé dans l'injecteur, est entraîné par le gaz communément appelé gaz vecteur ; il interagit avec la phase stationnaire au cours de son trajet à travers la colonne. La colonne est placée dans une enceinte thermostatée communément désignée sous le nom de « four ». Le rôle du four de CPG est de porter la colonne à une température suffisante pour assurer une volatilisation partielle des composants de l'échantillon et donc leur progression dans la colonne portés par le gaz vecteur. Les composés sont ainsi séparés en fonction de leurs points d'ébullition et de leurs affinités relatives pour la phase stationnaire [28].

Le chromatographe en phase gazeuse est donc constitué de trois composants : un injecteur, une colonne capillaire positionnée dans un four (la phase stationnaire) et un détecteur. Dans ce travail de thèse nous nous intéressons aux détecteurs qui peuvent être couplés au CPG.

#### 3-2-2- Les détecteurs en CPG:

En CPG, un grand nombre de détecteurs fonctionnant sur des principes différents ont été développés pour être utilisés, mais seuls quelques-uns continuent à être employés.

### a) détecteurs à ionisation de flamme:

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) est maintenant presque universellement adopté grâce à sa compatibilité avec pratiquement tous les composés organiques.

### 1- Principe:

Le principe du détecteur est que le soluté organique passe à travers une flamme de diffusion de l'hydrogène et de l'air où la combustion du soluté entraîne la formation de fragments qui sont ionisés par une électrode. Le gaz porteur provenant de la colonne peut être prémélangé avec de l'hydrogène. L'électrode de collecteur est cylindrique, il est placé juste audessus de la flamme. Le courant d'ions dont l'intensité est proportionnelle au nombre de carbones contenus dans le soluté est mesurée par l'établissement d'un potentiel entre le collecteur et la pointe de jet. Afin d'empêcher les ions de recombinaison, un potentiel est choisi dans la région de saturation, où l'augmentation du potentiel a relativement peu d'effet sur le courant ionique. Le courant de signal est transmis à un amplificateur, qui doit avoir une plage linéaire et de le transmettre à un enregistreur. La réponse est soumise à certaines variables expérimentales, dont les principaux sont les débits d'hydrogène, l'air et le gaz porteur [28].



Figure 5: Détecteur à ionisation de flamme(FID) [29].

#### 2- Les caractéristiques de FID:

Le FID possède une sensibilité et stabilité élevées, un faible volume mort, un temps de réponse rapide, ainsi que la réponse est linéaire sur une large gamme. Ce détecteur est simple à construire et exploiter. Seulement des gaz inertes, des composés à un seul carbone lié à l'oxygène ou le soufre (par exemple le dioxyde de carbone, le disulfure de carbone, etc.) et quelques autres substances volatiles ne donnent pas de signal. Le FID ne convient pas aux composés inorganiques.

### 3- Les atouts de FID:

Grâce à sa sensibilité, ce détecteur est le plus courant des détecteurs en CPG. Cette technique permet de travailler avec des gradients en température plus importants qu'en GC conventionnelle. Ceci présente plusieurs avantages tels que des temps d'analyse plus courts et des rapports signal sur bruit plus importants qui permettent d'améliorer ainsi les seuils de détection [30].

### 4- Les applications de FID à l'analyse du lipide:

La GC-FID est utile pour l'analyse des acides gras libres et des acylglycérols tels que les monoacylglycérols, diacylglycérols, et stérols. L'usage de FID permet la caractérisation des différentes graisses, ainsi qu'il aide au profilage des triglycérides, des cires ou des esters de stérols en utilisant des phases stationnaires stables à la chaleur. La séparation complète des acides gras communs est typiquement réalisée en utilisant des colonnes capillaires avec des phases stationnaires tout en dépendant de la classe de lipides à séparer [31].

Les autres détecteurs qui peuvent être utilisés avec GC comprennent le détecteur à capture d'électrons (ECD) dont les applications sont essentiellement tournées vers l'analyse de molécules fortement électrophiles. Le détecteur à conductivité thermique (TCD) permettant la détection de composés inorganiques. Le spectromètre de masse est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés en chromatographie

#### b) Les détecteurs à capture d'électrons (ECD):

#### Principe:

A l'intérieur du détecteur à capture d'électrons, une source radioactive est utilisée pour bombarder le gaz porteur avec des particules  $\beta$  qui passent dans une chambre d'ionisation. Chaque particule  $\beta$  peut générer jusqu'à un millier d'électrons thermiques, qui sont collectés en appliquant un potentiel. Lorsque les solutés contenant des fragments aptes à capturer des électrons entrent dans la cellule (en particulier les halogènes), ils interagissent avec les électrons thermiques et une diminution du courant est obtenue et mesurée avec une grande sensibilité et spécificité comme les molécules contenant des atomes d'halogène.



Figure 4:Détecteur à capture d'électrons (ECD) [32].

Bien que peu de lipides naturels contiennent des halogènes, il est possible, en utilisant des réactifs de dérivation appropriés, de convertir ces lipides à des dérivés halogénés pour profiter de la haute sensibilité et de la spécificité de l'ECD [28].

# c) Spectrométrie de masse par impact électronique

La spectrométrie de masse est devenue un outil précieux pour la détection et l'identification de lipides séparées par CPG.

# Le principe:

Dans cette technique, les molécules organiques subissent l'impact d'un faisceau d'électrons accélérés à 70 eV. L'impact amène les molécules à un état excité avec un excès d'énergie qui produit l'expulsion d'un électron conduisant à un ion moléculaire radicalaire chargé positivement. Cet ion moléculaire, lui-même en excès d'énergie, se fragmente ensuite en de plus petites entités ionisées. Ces ions sont propulsés à travers un champ magnétique ou électrostatique, et par la suite sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/z). Ensuite, le courant d'ions est amplifié et enregistré. Le pic majoritaire se voit attribuer une valeur d'intensité arbitraire de 100, et les intensités de tous les autres ions sont normalisées par rapport à ce pic dit pic de base. Avec des instruments de basse résolution, les pics apparaissent au nombre de masse de l'unité, mais à haute résolution les masses des ions individuels peuvent être mesurées avec une précision suffisante pour déterminer la formule moléculaire. L'interface entre la spectrométrie de masse et la GC est relativement simple dans sa conception compte tenu du faible de débit de gaz issu de l'appareil de chromatographie, elle doit cependant être inerte, sans points froids où la condensation de l'échantillon peut se produire [28].

Lors des études quantitatives sur les lipides, les résultats sont présentés usuellement en termes d'abondance relative. Lorsque la quantité absolue doit être mesurée, l'usage d'un standard interne est recommandé. Le standard interne peut être, de préférence, une substance qui ressemble aux composés à analyser dans ses propriétés chromatographiques mais non présent de façon naturelle dans l'échantillon. Théoriquement, le standard interne doit être ajouté lorsque le tissu est extrait, de sorte qu'il subisse l'extraction, la séparation et l'éventuelle dérivation. Cette situation idéale est rarement rencontrée dans la pratique, il est généralement suffisant d'ajouter le standard interne immédiatement avant l'étape de dérivation (Par exemple, la quantité absolue des classes lipidiques ainsi que la composition en acide gras sont fréquemment déterminées par l'addition à l'échantillon de l'ester méthylique d'un acide gras à chaîne impaire, avant la transestérification et une analyse par GC).

### 3-2-3- La chromatographie gazeuse et l'analyse des lipides:

Les lipides ont été analysés et quantifiés en utilisant la séparation chromatographique en phase gazeuse (CPG). Cette technique est une des méthodes les plus couramment utilisés dans ce domaine.

La CPG a été utilisée pour l'analyse des acides, et la première application a été réalisée dans les années 50 [33].

Le but principal ici est de décrire l'analyse des lipides par CPG, la technique qui exige que les lipides soient volatilisés. Généralement, les lipides simples peuvent parfois être analysés directement par ce procédé, mais les lipides complexes doivent être hydrolysés en fragments simples moins polaires. Une limitation principale de CPG est que les composés étudiés doivent être thermiquement stable avec une pression de vapeur suffisamment élevée pour être volatilisé pendant l'injection [5].

Si une analyse complète d'un échantillon de lipide à partir d'un organisme est envisagée, il reste nécessaire de séparer ces lipides en classes plus simples, en fonction de la nature des éléments constitutifs. Ensuite, ces classes peuvent être identifiés et quantifiés. La quantification peut s'effectuée en CPG couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) ou à la spectrométrie de masse.

# 3-2-4- L'application de CPG à l'analyse des phospholipides:

L'usage de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse directe des phospholipides est limité en raison de leur poids moléculaire et leur faible volatilité. Cependant diverses méthodes utilisent l'hydrolyse des phospholipides par la phospholypase C en diacylglycérols. Ensuite, les acides gras d'esters méthylés (FAMES) sont produits par transestérification, et sont analysés par CPG [34].

Tous les types de phases stationnaires peuvent être utilisés pour la séparation des phospholipides car elles sont robustes thermiquement (il est souvent nécessaire de monter les températures jusqu'à 340 °C afin d'éluer les acides gras). Les phases stationnaires non polaires sont généralement utilisées pour l'analyse des phospholipides, les plus utilisées sont les phases méthyl silicone OV-1 ou SE30 [35], et la Carbowax pour les phases de polarité intermédiaire.

La séparation des acides gras sur ce type de phase stationnaire est basée sur leur point d'ébullition. L'ordre d'élution augmente avec le nombre de carbones, les composés insaturés présentent des temps de rétention plus courts que les FAMES saturés. Il est d'ailleurs possible d'identifier les acides gras en fonction de leur temps de rétention en utilisant l'indice de Kovats en effectuant les analyses en isotherme. Les gaz vecteurs utilisés sont l'hydrogène et l'hélium [35].

# 3-2-5- Les inconvénients de l'analyse des phospholipides par CPG:

L'analyse des phospholipides par CPG présente certains inconvénients par rapport à l'analyse en CLHP, qui sont:

- La faible capacité de charge des colonnes capillaires [33].

- Les différentes étapes de dérivation et d'hydrolyse des phospholipides font que l'analyse en GC reste complexe. Ces étapes peuvent modifier la structure des acides gras polyinsaturés [36], ou produire des artéfacts avec les pics d'acides gras. Par ailleurs les acides gras à courtes chaînes sont très volatils et difficilement détectables [37].

# 3-3- La Chromatographie en Phase Supercritique (SFC):

### a) La définition d'un fluide supercritique:

Un fluide supercritique est une substance dont la température et à la pression sont audessus des valeurs critiques, il possède des caractéristiques telles qu'une faible viscosité et une diffusivité élevée [38].

### b) Principe général de SFC:

Cette méthode est d'introduction plus récente que les CPL et CPG. Elle est considérée comme intermédiaire entre ces deux dernières. La phase mobile est un fluide "supercritique" qui est un liquide compressible de très faible viscosité. (Par exemple, résultant de la compression du CO2 à basse température et à haute pression). Cette faible viscosité permet d'utiliser des débits élevés qui ne gêne pas l'efficacité de la séparation.

Le solvant produit représente la phase mobile pour la chromatographie, il peut être modifiable par des pourcentages de méthanol. Les fluides qui peuvent éventuellement être utilisés en chromatographie sont nombreux, cepedant, le dioxyde de carbone qui est quasiment le seul à être utilisé.

## c) Les caractéristiques de dioxyde de carbone:

Le dioxyde de carbone possède plusieurs avantages: il est ininflammable, non toxique, non réactif, peu coûteux et facile à manipuler. Sa température et sa pression critiques sont respectivement (31°C et 73,8 bar), miscible avec beaucoup de solvants, compatible avec les détecteurs de la CPG [39], et sa polarité est relativement faible [38].

La rétention peut être piloté par plusieurs facteur, une diminution de la masse volumique entraîne une diminution de la polarité du CO2 ce qui cause une augmentation des facteurs de rétention. Tandis que, une augmentation de la température à masse volumique constante implique une diminution de la rétention. A la fin, la rétention peut être gouvernée par l'addition des modificateurs polaires [39].

### d) Les colonnes utilisées en SFC:

Cette chromatographie peut s'effectuer aussi bien sur des colonnes remplies de la CPL que sur des colonnes capillaires de la CPG où la phase stationnaire est greffée. Les mêmes types des colonnes utilisées en CPL sont employés en CFS. Par contre, les silices greffées exigent l'addition d'un modificateur polaire dans le CO2, ce qui est du à la présence de groupements silanol résiduels. Concernant les colonnes capillaires utilisé en CFS, leur diamètres est de 50  $\mu$ m pour une longueur comprise entre 5 et 20 m. Les phases stationnaires doivent être greffées afin d'éviter leur dissolution et de les protéger du fluide. L'épaisseur du film de phase stationnaire varie entre 0,05 et 0,25  $\mu$ m [39].



Figure: Principe de la chromatographe en phase supercritique (colonnes remplies-détection UV) [24].

#### e) Les détecteurs en SFC:

Des détecteurs nombreux peuvent être employés avec ce système, aussi bien ceux de la chromatographie gaz-liquide après la décompression du fluide à l'état gazeux (ex. FID), ou de la CLHP directement dans le fluide à l'état supercritique ou subcritique (UV..). Le couplage avec SM est possible [40], la détection IRTF ainsi que le DEDL peuvent être utilisés.

# f) L'application de SFC dans le domaine des lipides

Le dioxyde de carbone supercritique est adapté pour analyser les composés hydrophobes tels que des lipides [38, 41]. Les lipides complexes ayant une polarité variée, en fonction de type des molécules hydrophiles attachés, peuvent être analysés par SFC tel que le mélange de caroténoïde qui a été analysé par SFC couplée à la spectrométrie de masse [42]. La séparation des esters de phénacyle des acides gras provenant d'un extrait d'huile de poisson a été effectué avec cette technique en utilisant le DEDL et l'UV comme méthodes de détections [42].

### 3-3-1- Chromatographie sur couche mince (CCM):

## a) Introduction:

L'origine de CCM se date aux années 1930, mais la CCM connue aujourd'hui a été établie en 1950 grâce aux efforts de Stahl et Kirchner [43]. La Chromatographie sur Couche Mince est une méthode physique de séparation rapide et relativement peu coûteuse pour analyser les mélanges complexes[44]. Dans certains cas, la CCM à haute performance peut offrir des avantages par rapport à la CLHP [44, 45].

La différence entre la CCM et la HPCCM est les différentes tailles de particules des phases stationnaires et les soins pris pour appliquer les échantillons et de traiter les données obtenues. En CCM, la détection ne se fait pas en continu comme CLHP [46]. Des aspects sur le principe de CCM et ses applications dans le domaine des lipides seront également discutés.

### b) Le principe de la chromatographie sur couche mince:

La différence d'affinité des solutés vers deux phases forme la base de séparation en CCM. Ces deux phases sont la phase stationnaire qui est fixé sur une plaque et la phase mobile qui est liquide composé d'un ou plusieurs solvants. En considérant qu'il y a un côté de la surface en contact avec l'atmosphère, nous pouvons parler d'un système à trois phases [46].

Les plaques utilisées sont composées d'un support inerte rigide ou souple (plaque de verre, feuille d'aluminium, de polyamide, etc.) sur lequel la phase stationnaire est déposée sous forme d'une couche mince (épaisseur de 200 à 250 µm) [46]. Comme dans le cas de la CLHP,

une optimisation de la composition de la phase mobile est nécessaire à l'obtention d'une séparation satisfaisante.

L'injection centrale en CLHP est remplacée par l'injection latérale en CCM. Le dépôt des solutés ou du mélange des solutés se fait à la surface de la phase stationnaire à l'aide d'un capillaire ou d'une seringue à un très petit volume et à une petite distance de l'extrémité de la couche.au contact de la phase mobile (1 cm en général).



Figure 6: principe de CCM.

La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité et la migration de chaque soluté se concrétise par son hauteur qui est caractéristique. En principe, les composés diffèrent en solubilité et efficacité d'adsorption d'une façon qui permet à certains composés de migrer plus hauts sur la plaque que les autres. Lorsque le solvant atteint la tête de la plaque, la plaque est retirée de la chambre, et puis séchée. Le facteur de rétention Rf pour un composé donné exprime la distance parcourue par le composé divisée par la distance parcourue par le solvant [47]. Ce facteur reste constant d'une expérience à l'autre à conditions que certains paramètres chromatographique restent constants tel que les solvants, l'adsorbant, la quantité de la matière disposé et la température. Ce facteur est substitué par Rf relatif dans le cas échéant. Un composé avec Rf plus grand qu'un autre présente moins de polarité, car il interagit moins fortement avec l'adsorbant polaire sur la plaque. Le facteur Rf peut mettre en évidence l'identité des composés.

A la fin de processus, les composés sont séparés de leurs mélanges. La visualisation est simple et directement fait si les composés sont colorés, tandis que la visualisation de la

séparation sur la plaque est effectuée par une lampe UV dans le cas ou les composés ne sont pas colorés.

# c) Les phases stationnaires:

Les phases stationnaires les plus utilisées pour la séparation des lipides sont le gel de silice «la phase dominante», et l'alumine. La silice peut être, en outre, modifiée par l'imprégnation avec d'autres substances pour optimiser les résultats de séparation des certaines classes de lipides. Parmi les différentes modifications de la phase stationnaire, le nitrate d'argent qui est utilisé pour séparer les lipides en différentes acide gras en se basant sur leur degré d'insaturation [48] et l'acide borique qui est utile pour la détection des différents isomères de DAG, et rarement le EDTA qui a été recommandé pour améliorer la séparation de PLs acidiques tel que le PS [49]. De même, sulfate d'ammonium a amélioré la séparation entre le PI et PS. Il a été montré aussi qu'un pourcentage de sulfate d'ammonium imprégné au gel de silice, et du chloroforme-méthanol-acide acétique-eau-acétone comme phase mobile peut séparer 5 différents PLs (PS, PE, PI, PC et SM) et trois lysophospholipides (LPS, LPE et LPC) [50]. Ces phases peuvent être classées comme normale ou inversée en se basant sur leurs caractéristiques de surface [44].

### d) Le système de détection:

Les fractions lipidiques séparées peuvent être visualisés par les lier à un colorant ou d'autres agents. Ces agents peuvent être, en fonction de leurs spécificités, destructives ou non destructives :

- Non spécifique non destructives.

- Non spécifique destructives.

- Destructives, spécifiques.

### e) L'analyse des Lipides par CCM :

La CCM est adaptée pour les plus petites molécules et les composés apolaires. Dans le domaine des lipides, CCM est généralement employée pour les séparations de routine, l'identification et la quantification des lipides [44]. Elle a été la première technique utilisée

pour analyser les phospholipides. Par contre, l'oxydation des lipides insaturés peut se produire si la plaque CCM est stockée pendant longtemps.

# f) Les applications de CCM pour la séparation des phospholipides :

La CCM est considéré comme une méthode qui est largement utilisée pour l'analyse des PLs. Le gel de silice est la majeure phase employée et beaucoup de méthodes et solvants ont été décrits dans la littérature [51]. Fondamentalement, les séparations des mélanges complexes des PLs se font en CCM à une ou deux dimensions.

La CCM à une dimension est appliqué lors que le but est de séparer un mélange de PLs non acides [52] avec dans certains cas une petite contribution de PLs acides. Le gel de silice contenant 7,5% d'acétate de magnésium a été utilisé avec une phase mobile de CHCl3-MeOH-NH4OH (65:25:4, v/v/v). Un mélange de CHCl3-MeOH-H2O (25:10:1, v/v/v) est encore aujourd'hui largement utilisé [53]. Un système de solvant plus approprié pour les mélanges de lipides complexes est l'acétate de méthyle-2Propanol-CHCl3-MeOH et 0,25% de KCl aqueux (25:25:25:10:9, v/v/v/v) [51, 54].

Par contre, la CCM à 2D est un outil puissant pour optimiser la séparation des mélanges complexe des lipides et les lipides typiques des mitochondries cérébrales.

La CCM à haute performance HPCCM a été utilisée pour séparer les PLs avec un temps plus court comme est décrit par Coene *et al.,* et par Alvarez et Ludmir [51].

#### 3-3-2- Chromatographie en phase liquide sur colonne remplie

La méthode globalement adaptée pour analyser les lipides est la chromatographie liquide haute performance. En chromatographie en phase liquide, il y plusieurs mécanismes de rétention. La principale contrainte de l'analyse des lipides est la solubilité. De ce fait, la chromatographie en phase normale ou à polarité de phases inversée (RP-HPLC) sont applicables.

Dans le cas de la RP-HPLC, la solubilité des lipides fait que des phases hydro-organiques sont rarement utilisées. La technique de CLHP « non aqueuse » à polarités de phases inversée est utilisée pour l'analyse des espèces moléculaires. Cette technique est utilisée par exemple pour l'analyse des huiles végétales ou les triglycérides sont séparés sur colonne greffée alkyle avec des gradients débutant à l'acétonitrile ou à l'acétone et se terminant avec des solvants tel le dichlorométhane. La RP-HPLC utilise des interactions faibles entre les chaînes alkyles des greffons et le squelette hydrocarboné et/ou les chaînes acides gras des solutés. L'ordre d'élution obtenu en RP-HPLC discrimine les lipides selon la nature des chaînes des acides gras constitutifs et permet d'obtenir l'analyse des « espèces moléculaires d'une classe ». La figure 7 présente le profilage des lipides par chromatographie liquide à polarité de phase inversée avec une colonne C18 décrit par Fauland et al. [55] en 2011 où on définit des zones de séparation. Sur ce chromatogramme, il y a plusieurs zones d'élution. Dans les premiers 10 min, nous trouvons les lipides les plus polaires à une seule chaine comme LPC. Entre 10-20 min, nous avons une zone qui contient toutes les espèces à deux chaines comme la plupart des PLs, les SMs et le DG. Entre 20-30 min, nous avons une zone pour les TG à trois chaines.



Figure 7: Séparation des lipides par chromatographie liquide à polarité de phase inversée/LTQ-FT [55].

Par ailleurs, la chromatographie en phase normale exploite des interactions polaires entre la phase stationnaire et les groupements fonctionnels polaires des solutés. Ces mêmes groupements définissant les classes de lipides, une telle chromatographie correspond à l'analyse par « classes de polarité » des lipides.

Les classes de lipides couvrent une telle gamme de polarité que les séparations recourent obligatoirement à des gradients d'élution. Ceux-ci sont particulièrement complexes et des gradients ternaires sont classiquement utilisés pour l'analyse par classes de polarité. Des éluants peu polaires tels l'heptane ou l'iso-octane sont utilisés en début de gradient cependant que le solvant final est constitué d'un alcool (couramment l'isopropanol), une phase intermédiaire de nature variable assurant la miscibilité des solvants initiaux et finaux. Les phases stationnaires usuelles sont la silice vierge (chromatographie d'adsorption) ou des phases greffées polaires telles les phases diol, amino ou poly (vinyl alcool). Ces dernières phases sont moins adaptées que la silice quand un large domaine de polarité doit être couvert (comme par exemple l'analyse d'extraits lipidiques totaux) mais sont intéressantes quand une partie seulement des classes est envisagée comme par exemple les sphingolipides ou les phospholipides.

Donc pour simplifier les analyses, il est préférable, face à un échantillon complexe, de gérer la complexité en phase normale d'une façon à avoir une répartition par classes de polarité. La figure 8 montre le profil de séparation des classes lipidiques par chromatographie en phase normale décrit par Christie en 1985 [56].



Figure 8: La séparation des lipides du foie de rat par NP-HPLC avec une détection de masse [56].

Donc, la chromatographie liquide en phase normale permet d'accéder aux classes de lipides « un pic par classe lipidiques » ce qui est biologiquement intéressant.

## La détection par nébulisation et évaporation de solvants:

Plusieurs détecteurs présentent ce principe de fonctionnement tel que le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL), le détecteur d'aérosol chargé (Corona CAD®) et la spectrométrie de masse SM couplée à un système CLHP. Ces trois détecteurs sont très importants dans le domaine de l'analyse de lipide et ont été employés largement dans ce travail et seront étudiés plus en détail.

## 1- Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL)

Ce détecteur a été d'abord décrit par Charesworth en 1978 [57], sa capacité de détecter tous les composés moins volatils que la phase mobile le rend particulièremet utilisable dans le domaine analytique et surtout dans l'analyse des lipides.

## 1-1- La base de fonctionnement de DEDL:

Le principe de fonctionnement de ce détecteur «universel» qui étudie toutes les molécules non volatiles est basé sur l'évaporation partielle de l'effluent sortant de la colonne chromatographique qui permet par la suite d'obtenir un nébulisât solide ou liquide du soluté qui traverse un faisceau lumineux. L'intensité de la lumière diffusée est détectée par un photomultiplicateur et permet d'obtenir un signal. Donc, trois étapes sont impliquées dans son fonctionnement: la nébulisation de la phase mobile, l'évaporation de la phase mobile et la diffusion de la lumière par le soluté.





# a) Nébulisation de la phase mobile:

La première étape de fonctionnement de DEDL est la nébulisation de la phase mobile provenant de la colonne chromatographique dans la chambre de nébulisation. Cela produit ainsi un aérosol liquide sous l'effet d'un gaz nébulisant classiquement l'azote. L'équation de Nukivama- Tanasawa est utilisée pour calculer la taille des gouttelettes [59]:

$$D_{sv} = \frac{585\sqrt{\sigma}}{(u_g - u_l)\sqrt{\rho_l}} + 597 \left[\frac{\mu}{\sqrt{\sigma_l \rho_l}}\right]^{0.45} \left[1000 \frac{Q_l}{Q_g}\right]^{1.5}$$

Où :

D<sub>SV</sub> ; est le diamètre de la gouttelette.

 $\sigma$  ; présente la tension de surface du solvant (N/m).

 $\mu$  ; est la viscosité du solvant (Pa.S).

 $\rho$  ;présente la masse volumique (kg\*m<sup>-3</sup>).

 $(\gamma_g - \gamma_l)$ ; présente la différence entre la vitesse du gaz nébuliser et la vitesse de la phase mobile (m/s).

QI/Qg ; correspond au rapport entre le débit volumique de la phase mobile et le débit volumique du gaz.

Cette équation possède deux termes, et présente dans ces deux termes des facteurs influençant la nébulisation. Ces facteurs sont la tension de surface, la viscosité, la densité, le débit du gaz nébuliseur et le débit de la phase mobile. Dans les deux termes, lors que le débit du gaz est augmenté, une diminution des tailles des gouttelettes est observée.

## b) Evaporation du solvant:

La deuxième étape de fonctionnement de ce détecteur est l'évaporation de la phase mobile. Ici, le nébulisât formé dans la chambre de nébulisation passe à travers un tube d'évaporation, et sous l'effet de la température l'évaporation du solvant est produite. L'évaporation entraine une diminution de la taille de particules. La taille des particules formées à cette étape peut être calculée suivant l'équation:

$$d = D_0 (c/\rho_s)^{1/3}$$

d ; est la taille de particules après l'évaporation.

D<sub>0</sub>; présente la taille initiale de gouttelettes.

C ; est la concentration du soluté.

 $\rho_s$ ; présente la masse volumique du soluté.

Selon l'équation, le diamètre de particules est en fonction de la concentration.

### c) Diffusion de la lumière:

Suite à l'évaporation achevée à l'étape précédente, les particules arrivent à la cellule de détection. Dans cette cellule, les particules peuvent diffuser la lumière lors de leur passage à travers d'un faisceau lumineux. La quantité de lumière diffusée est mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur. Ici, nous pouvons rencontrer plusieurs mécanismes de diffusion de la lumière en fonction de la taille de particule et le rapport D/I (avec D pour le diamètre de la particule et I correspond à l'intensité de la lumière incidente):

Quant le rapport D/I < 0.1, la diffusion est de Rayleigh.

Quand le rapport D/I est entre 0.1 et 1.0, la diffusion est de Mie.

Quand le rapport D/l > 1, nous parlons de la réfraction-réflexion.

La diffusion de la lumière dépend de la taille et la morphologie des particules, l'angle de collection de la lumière, la surface, et le logeur d'onde de la lumière incidente.

La réponse de ce détecteur, n'importe quel le type de diffusion de la lumière, n'est pas linéaire, elle est défini par l'équation:

$$Y = a * m^b$$

Où: a ; représente la sensibilité.

b ; correspond au type de réponse.

m ; représente la quantité injectée.

Le coefficient b est lié à la taille de particule et peut donc varier entre 2/3 et 2. De plus, la taille de particule va influencer le mécanisme de diffusion de la lumière concerné:

Quand la taille de particule est petite, le mécanisme prédominant est le Rayleigh avec valeurs de b proches de 2.

Quand la taille de particule est grande, la réfraction-réflexion de la lumière est rencontrée et la valeur de b se rapproche de 2/3.

Pour des valeurs intermédiaires de b (entre 2/3 et 2), le mécanisme aperçu est la diffusion de Mie.

# 1-2- Application à l'analyse des phospholipides:

Plusieurs méthodes de détection peuvent être utilisées pour détecter les lipides ou les phospholipides par classes. Parmi les détecteurs disponibles en chromatographie liquide, le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière se considère un instrument largement utilisé et un des plus sollicité dans ce domaine ces dernières années.

En NP-CLHP, plusieurs études, des investigations fondamentales et de nombreuses applications ont sollicité le DEDL pour analyser les PLs au cours de ces dernières années.

Dans les années 80, Christie a réussi à séparer des classes lipidiques les plus abondantes dans des tissus animaux. A propos de cette séparation : la phase stationnaire était la silice, les solvants étaient des mélanges apportés par un programme de gradient tertiaire composés de : A : hexane - méthylterbuthyl éther (98:2 v/v). B : 2 - propanol - chloroforme (80:20 v/v) et C : 2 - propanol - sérine aqueuse 0.05 M (pH 7.5, 1:1 v/v).

La détection de ces classes a été effectuée à l'aide d'un DEDL [56, 60]. Le choix du gradient d'élution et la phase mobile ici a été fait d'une façon qui permet de s'évaporer cette phase dans le détecteur tout en gardant les composés d'intérêt. A ces conditions, la séparation des classes lipidiques a été achevée en à peu près 20 à partir des composés les plus apolaires jusqu'à les plus polaires tels que les PLs. De plus, dérives de la ligne de base n'ont pas été remarqués malgré la variabilité des solvants utilisés [56].

La séparation de différentes classes phospholipidiques se faisait initialement avec la colonne de silice. Ensuite, les colonnes de diol ont été utilisées avec des mélanges de solvants constitués de hexane - isopropanol - acide acétique et de l'eau - isopropanol - acide acétique [61]. Avec ce système, les PLs acidiques (PI et PS) sont élués après la PC. La séparation par classe dans cette méthode a été optimisée à l'aide du couplage à la spectrométrie de masse.

Des nouvelles performances ont été atteintes lors de la commercialisation de nouvelles phases stationnaires. Dans ce contexte, une phase de polyvynil alcool (PVA-Sil®) greffé à un support de silice a été développée. Cette phase est fabriquée par polymérisation des molécules de polyvinyl alcool avec les particules de silice. Ainsi l'on obtient une phase dont la surface est revêtue d'une couche uniforme de PVA avec seulement des groupes hydroxyles disponibles pour les échanges. Ce progrès représente un réel avantage pour l'analyse de lipides étant donné l'utilisation de gradients complexes où un ré-équilibrage rapide est conseillé et donc l'on peut atteindre des temps d'analyse plus courts.

Au cours de dernières années, la phase PVA-Sil<sup>®</sup> a été largement employée, cela en raison de la robustesse des résultats par rapport aux phases conventionnelles [62]. Deschamps et al ont évalué les propriétés de rétention de la phase stationnaire PVA pour l'analyse par classe

lipidique [62]. Cette étude a été développée pour l'obtention d'une méthode par NP-CLHP permettant l'analyse de lipides par classe avec l'utilisation de gradients d'élution simples basés sur des mélanges de phases mobiles binaires.

En règle générale, les solvants utilisés pour l'élution des composés doivent être plus volatiles que ces composés et ne doivent pas contenir des ions organiques [35]. Le DEDL peut être couplé à un système chromatographique en permettant de travailler en gradient d'élution [63].

Les travaux achevés avec l'usage de l'HPLC couplé au détecteur DEDL sont très bien détaillés dans la thèse de Godoy Ramos [7] comme ils sont résumés dans le tableau suivant.

Auteur	Année	Matrice
Privett et al [64]	1973	Soybean lipid composition
Van der Meeren[65]	1988	Soybean phospholipids
Breton at al [66]	1989	PS, PC, PE, PG, PI
Becart et al [67]	1990	PE, PI, PS, PC, PA, SM, LPC
Letter [68]	1992	PC, PE, SM, PS
Mounts et al [69]	1992	Soybean phospholipids
Conforti et al [70]	1993	Phospholipids of wheat flour
Bunger and Pison[71]	1995	Lung lavage
Abidi and Mounts [72]	1995	PA in several matrices
Vaghela and Kilara[73]	1995	Phospholipids of whey proteins
Olsson et al [74]	1996	Human brain

Tableau 1: Méthodes HPLC – DEDL pour l'analyse de lipides.

Gunnarsson et al [75]	1997	PI, PA, PG, PE, PC, PS, SM
Silversand and Haux [76]	1997	Eggs and liver
Landi et al [77]	1998	Phospholipids of LDL proteins
Homan and Anderson [78]	1998	Rat liver, heart, brain
Christie [79]	1998	Chromatographic lipid analysis
Eckard et al [80]	1998	DPPA, DPPC, DPPE, DPPG, DCPC
Gunnarsson et al [81]	1998	Phosphatidylethanol in blood
Sas et al [82]	1999	PA, PC, PE, PI, PG
De Miguel et al [83]	1999	DPPC from liposomes
Sugawara and Miyazawa [84]	1999	Glycolipids and phospholipids from plants
Grizzard et al [85]	2000	Spermehumaine
Stith et al [86]	2000	Xenopuslaevis oocytes
Yao et al [87]	2000	Phospholipids of brain membranes
Cert et al [88]	2000	Phospholipids in vegetable oils
Seppanen-Laakso et al [85]	2001	Plasma humain
Deschamps at al [62]	2001	Lipid class profiling
Kang and Row [89]	2002	Soybean Phospholipids (PE, PI, PC)
Yoon and Kim [90]	2002	PC from egg yolk phospholipids
Genge et al [91]	2003	Lipids from bovine and avian matrix vesicles
Descalzo et al [92]	2003	PE, PG, PS, PC, LPC, SM

Sala-Vila et al [93]	2003	Phospholipids in human milk
Neron et al [94]	2004	Phospholipids of main wheat flour
Fagan and Wijesundera [95]	2004	Milk phospholipids
Perona and Ruiz-Gutierrez [96]	2004	PE in lipoproteins
Rabinovich-Guilatt et al [97]	2005	Pharmaceutical phospholipids
Sala-Vila et al [98]	2005	Lipid composition in human milk
Avalli and Contarini[99]	2005	Phospholipids in dairy products
Rombaut et al [100]	2005	Phospholipids in dairy products
Suzumura [101]	2005	Phospholipids in marine environments
Aradottir and Olsson [102]	2005	Blood Phosphatidylethanol
Rombaut and Dewettinck [103]	2006	Milk polar lipids
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104]	2006 2006	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105]	2006 2006 2007	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105] Fong et al [106]	2006 2006 2007 2007	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products Lipid composition in milk-fat-globule membrane
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105] Fong et al [106] Ramos, R G et al [107]	2006 2006 2007 2007 2008	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products Lipid composition in milk-fat-globule membrane Leishmania membrane phospholipids
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105] Fong et al [106] Ramos, R G et al [107] Lopez et al [108]	2006 2006 2007 2007 2008 2008	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products Lipid composition in milk-fat-globule membrane Leishmania membrane phospholipids Phospholipid and sphingolipid in milk
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105] Fong et al [106] Ramos, R G et al [107] Lopez et al [108] NairandWerling[109]	2006 2007 2007 2008 2008 2009	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products Lipid composition in milk-fat-globule membrane Leishmania membrane phospholipids Phospholipid and sphingolipid in milk Free fatty acids in a pharmaceutical suspension
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105] Fong et al [106] Ramos, R G et al [107] Lopez et al [108] NairandWerling[109] Graeveand Janssen [110]	2006 2007 2007 2008 2008 2009 2009	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products Lipid composition in milk-fat-globule membrane Leishmania membrane phospholipids Phospholipid and sphingolipid in milk Free fatty acids in a pharmaceutical suspension Lipid classes of marine zooplankton
Rombaut and Dewettinck [103] Jonnala et al [104] Rombaut et al [105] Fong et al [106] Ramos, R G et al [107] Lopez et al [108] NairandWerling[109] Graeveand Janssen [110] Mengesha and Bummer [111]	2006 2007 2007 2008 2008 2009 2009 2010	Milk polar lipids Phospholipid composition of peanuts Phospholipids in dairy products Lipid composition in milk-fat-globule membrane Leishmania membrane phospholipids Phospholipid and sphingolipid in milk Free fatty acids in a pharmaceutical suspension Lipid classes of marine zooplankton PC, Lyso-PC and Free Fatty Acids FFA

Donato et al [113]	2011	Phospholipids in milk samples
Narvaez-Rivas et al [114]	2011	Cardiolipin, PE, PI, PS, PC and SMs in Iberian pig
Imbert et al [115]	2012	Membrane phospholipids of Leishmaniadonovani
Montealegre et al [116]	2012	Phospholipids in Romanian oat samples
Giuffrida et al [117]	2013	Phospholipids classes in human milk
Chamorro et al [118]	2013	Lipid classes in blood
Lopez et al [119]	2014	Lipids from bovine milks
Abrahamsson et al[120]	2015	Lipid in crushed linseed
Serna et al [121]	2015	Lipids in plasma
Ferreiro et al [122]	2015	PE, PI, PC, PS and SM in milk

Les méthodes abordées dans ce tableau présentent l'importance de l'usage du DEDL pour détecter et quantifier les PLs à partir des matrices très différentes (soja, blé, cerveau humain, œuf, sang, plasma, lait, etc...).

La plupart des méthodes utilise des systèmes binaires ou ternaires de mélanges de solvants. Les systèmes gradients sont préférés en raison du domaine de polarité couvert par les classes lipidiques. Par exemple, R. Godoy Ramos a comparé dans son travail entre l'usage de détecteur DEDL et Corona-CAD pour l'analyse des PLs majeurs dans la membrane de la leishmanie (PA, PG, Cardiolipidne, PI, PE, PS, LPE, SMs, LPC et PC) par CL en phase normale avec une colonne PVA. Le gradient d'élution utilisé pour la séparation des classes de PLs était un système ternaire. La phase A a été constituée de n-heptane/ 2-Propanol (98:2), La phase B se composait de CHCl3/2-Propanol (65:35), et la phase C comprenait MeOH/H2O (95 :5). Toutes ces phases ont été supplémentées par 0.08 % TEA et 1 % CH3COOH (v/v). La durée de ce gradient était de 68 min. Il a été montré dans ce travail que la réponse des détecteurs n'est pas linéaire et que le Corona-CAD est plus sensible que le DEDL aux gammes basses de masse. Ramos a montré qu'en NP-HPLC/DEDL la limite de détection était entre 71-1195 ng et la limite de quantification entre 215-3622 ng. Par contre, en NP-HPLC/Corona, la LOD était entre 15-249 ng alors que la LOQ était entre 45-707 ng.

En ce qui concerne les analyses quantitatives effectuées par l'usage du DEDL comme détecteur, des paramètres au niveau de détecteur peuvent être optimisés. Ces paramètres comprennent la pression, l'atténuation, le débit du gaz nébuliseur, les températures de nébulisation et d'évaporation. Cette optimisation peut améliorer la détection parce que la réponse du détecteur est différente en fonction des classes lipidiques analysées. De plus, les analyses quantitatives peuvent être améliorées par l'usage des étalons interne.

Des modifications ont été réalisés afin d'optimiser la détection. Pour augmenter la force ionique, il est possible d'ajouter du bicarbonate d'ammonium ou l'acétate, si besoin, en combinaison avec les acides ou les bases mentionnées ci-dessous. En pratique, le modificateur acide ou basique peut être utilisé à pas plus de 0,1mLpar litre de solvant.

L'addition de 0,1% (v/v) de triéthylamine et une quantité équimolaire d'acide formique dans la phase mobile a amélioré la réponse de DEDL (forme du pic et résolution) par 2 jusqu'à 50 fois pour plusieurs espèces lipidiques sauf avec des PLs zwitterioniques[123]. L'amélioration de la réponse est plus marquée à faible débit et dépend de solutés et de solvants [124]. Les modificateurs choisis agissent principalement comme amplificateur par l'inclusion des clusters de triéthylamine-acide formique à l'intérieur des gouttelettes.

En NP-CLHP, la quantification de chaque classe de PLs doit être calibrée séparément et la non-linéarité est commune à des faibles concentrations [85]. Généralement, les PLs acides tels que PI et PS ont des signaux plus petits [86]. Cependant, des études récentes ont montré que les additifs tels que le nitrate d'argent permettent de contrôler la réponse du détecteur et à accroître la précision de la quantification [125].

Le pH de solvants peut être modifié par l'ajout des modificateurs de solvant. La sensibilité de DEDL doit être regardée lors de l'usage des additifs contenant des cations métalliques. Le modificateur doit être efficacement choisi pour pouvoir garder la bonne séparation des PLs. Normalement, l'acide formique, l'acide nitrique, l'acide acétique et trifluoroacétique

peuvent être utilisés pour acidifier. Par contre, l'utilisation de l'ammoniaque, la triéthylamine et la pyridine est possible pour alcaliniser.

Par ailleurs, des types de réponses différentes ont été obtenues pour les classes de PLs. Des réponses linéaires ne peuvent être obtenues que sur un intervalle de concentrations resserré. En général, une réponse non linéaire est aperçue lors de des études quantitatives pour les classes lipidiques [125].

En conclusion, ce détecteur présente beaucoup d'avantage, il n'est pas sensible au débit de la phase mobile ou à la température [86], il est également indépendante du degré de saturation de l'analyte. Au contraire, la réponse dépend de la masse des PLs [71]. Le DEDL peut aussi quantifier des quantités nano-molaires des PLs [63]. Cependant, le DEDL possède des inconvénients, il est un détecteur destructif, mais cela peut être corrigé par l'installation d'un diviseur de débit sur le système CLHP, de sorte qu'une partie de l'analyte peut être gardé pour une analyse ultérieure [35].

Bien qu'il existe des applications très variées pour l'analyse de PLs. Le choix du détecteur DEDL semble d'être la plus pertinente par rapport à la nature physico-chimique des molécules à analyser et le type de réponse du détecteur.

# 2- Détecteur d'aérosol chargé (Corona-CAD®):

# 2-1- Généralités

Ce détecteur a été introduit comme une alternative au DEDL, au détecteur de chimiluminescence et au détecteur d'indice de réfraction pour la détection des composés non détectés ou faiblement détectés en UV. Le principal avantage de détecteur Corona est d'avoir une meilleure sensibilité à basse concentration par rapport au DEDL.

# Fonctionnement

Le principe de fonctionnement de détecteur d'aérosol chargé Corona-CAD<sup>®</sup> peut se deviser en en 4étapes (figure 7) :



Figure 10: Schéma de fonctionnement d'un détecteur d'aérosol chargé, le Corona-CAD®.

# a) Nébulisation

Cette étape est similaire à celle de DEDL, l'éluant d'un système chromatographique est nébulisée dans la chambre de nébulisation à l'aide d'un gaz de nébulisation (classiquement l'azote), et l'aérosol résultant de gouttelettes contenant le soluté est ainsi formé. La taille des gouttelettes formées à l'étape de nébulisation peut être prédite par l'équation de Nukiyama et Tanasawa.

#### b) Evaporation du solvant

Le nébulisât formé est transporté au tube d'évaporation où il est volatilisé par une augmentation de température, ce qui entraîne une diminution de la taille des gouttelettes jusqu'à l'obtention de particules de diamètre « d », qui dépend du diamètre (D<sub>0</sub>) des gouttelettes dans l'aérosol en sortie de la chambre de nébulisation (aérosol primaire). L'équation qui gouverne cette étape est :

$$d = D_0 (C/\rho_s)^{1/3}$$

Où : C= concentration du soluté

P<sub>s</sub>= densité du soluté

D<sub>0</sub>= diamètre de gouttelettes dans l'aérosol primaire

### c) Ionisation des particules

Les solutés contenus dans les gouttelettes sont ensuite acheminés grâce à l'azote jusqu'à une chambre d'ionisation. Ces particules vont alors entrer en collision avec un second flux d'azote qui aura été préalablement ionisé par décharge Corona. Ces collisions entraînent un transfert de charge du gaz vers les particules de solutés.

### d) Détection des particules

Les particules sont ensuite acheminées vers un collecteur. La charge des particules est alors mesurée grâce à un électromètre qui produit un signal proportionnel au nombre de charges.

### 2-2- Type de réponse

La relation entre le signal et la quantité d'analyte est non linéaire en Corona-CAD, comme en DEDL, dans lequel la relation entre l'aire et la masse de l'analyte peut être décrite par l'équation suivante [126]:

$$Y = a * m^b$$

Où Y= l'aire de la réponse

m= la masse de l'analyte

a et b sont des valeurs qui dépendent de l'analyte et les conditions chromatographiques.

Cette équation peut être transformée à :

$$\log Y = b \cdot \log m + \log a$$

Cette équation peut être utilisée pour l'étalonnage comme un tracé log-log linéaire des aires des pics en fonction de la quantité d'analyte.

## 2-3- Application à l'analyse de lipides :

Les stratégies analytiques les plus efficaces pour l'analyse quantitative des lipides ou des extrais lipidiques impliquent l'utilisation les détecteurs universels ou les détecteurs de masse tels que les (FID, DEDL et Corona CAD<sup>®</sup>). Ces détecteurs ont la possibilité de détecter les lipides saturés et insaturés. En tenant compte que le détecteur Corona-CAD<sup>®</sup> est un instrument récent, le nombre des études disponibles dans la littérature qui abordent cet aspect est un peu limité. Le détecteur d'aérosol chargé peut détecter des composés lipidiques tels que les triacylglycérols, les diacylglycérols, les glycolipides, les PLs et les stérols.

Dixon et Peterson ont évalué la réponse de CAD en utilisant le sulfate de sodium en injection directe FIA « flow injection analysis » avec H<sub>2</sub>O comme phase mobile. Ils ont testé un montage préfigurant le détecteur en utilisant le glucose injecté dans un système CLHP en phase inverse. Les tests de FIA et les tests de CLHP ont démontré une réponse linéaire sur près de 3 ordres de grandeur avec des limites de détection de masse de 0,2-0,6 ng [126].

La première méthode HPLC couplée au détecteur Corona-CAD<sup>®</sup> était une méthode chromatographique en phase normale. Cette méthode a été développée pour l'analyse quantitative des classes lipidiques non polaires (esters de phytostérols, triacylglycérols, FA et

phytostérols libres) dans les huiles végétales et les extraits de l'hexane [127]. Un mélange commercial contenant des masses égales de cinq non polaire classes de lipides (cholestérol: l'oléate, la trioléine, l'acide oléique, méthyle: oléate et cholestérol) ont été injectés dans le système. La réponse du détecteur (des aires des pics) pour le cholestérol: l'oléate et la trioléine étaient similaires, alors que le cholestérol et l'acide oléique ont montré une réponse environ 10 % et 80 % inférieure respectivement. Par contre, le méthyl-oléate n'a pas été détecté par la CAD. Des résultats similaires concernant les esters méthyliques ont été montrés en utilisant le DEDL. Les particules sont évaporées partiellement à 40°C et complètement à des températures plus élevées. Avec cette méthode de CLHP, les limites minimales de détection avec la CAD étaient d'environ 1 ng, et le rapport de masse/aire de pic a été presque linéaire à partir d'environ 1 ng à 20 ng par injection.

Une méthode NP-CLHP a été évaluée avec le détecteur CAD. Cette méthode a été développée pour quantifier les classes de lipides polaires tels que les glycolipides et les PLs dans des extraits de matières végétales extraites avec des solvants polaires [128]. Avec ce système, le cholestérol, PE, PC et Lyso PC ont été bien séparés quand ils sont injectés dans un mélange à masse égale. La limite de détection était à 25 ng et la relation masse/aire de pic a été évaluée entre 10 µg et 25 ng par injection. Les mêmes glycolipides et les PLs (PE, PC, lyso PC et PI) ont été détectées par le CAD lors de l'injection d'un échantillon de lécithine de soja avec ce système. La même conclusion a été trouvée avec le DEDL [129].

Une autre méthode chromatographique en phase normale qui implique l'utilisation de CAD a été développée dans le but de séparer les huit isomères naturels de tocophérols et tocotriénols [130]. Bien que le CAD pourrait être utilisé pour quantifier certains tocophérols et les tocotriénols, mais la présence des autres pics inconnus ayant le même temps de rétention complique le chromatogramme. En conséquence, dans tels conditions, il semble que la détection de fluorescence reste encore la méthode de choix en chromatographie pour l'analyse quantitative de tocophérols et tocotriénols [131].

Plus récemment, une méthode de CLHP en phase inverse couplée à la détection par charge d'aérosol a été développée pour séparer et quantifier de triacylglycérols extraits d'huiles végétales. Cette méthode a séparé les espèces moléculaires des triglycérides (trioléine et trilinoléine), et les autres lipides non polaires [132]. La ligne de base était plus bruitant avec

ce système chromatographique en phase inverse en comparaison avec la ligne de base avec les systèmes chromatographiques en phase normale, les limites minimales de détection avec ce système semblent être d'environ 25 ng, cela est certainement due à l'augmentation du bruit. La raison de cette augmentation du bruit n'a pas été examinée, mais le solvant utilisé a un effet majeur sur ce bruit.

Dernièrement, la première méthode quantitative des PLs pégylés associées à des microcapsules polymères a été développée par Diaz-Lopez et ses collègues [133]. Cette méthode CLHP-CAD était simple, sensible, précise et reproductible pour quantifier le 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N- (méthoxy (polyéthylèneglycol) -2000). Dans cette méthode, la préparation des échantillons pour la quantification ne demandait aucune extraction complexe des PLs. Le temps d'acquisition était 20 min en produisant des résultats quantitatifs adéquats. Les résultats ont été évalués avec le modèle linéaire et le modèles puissance. Il a été observé pour les PLs pégylés avec ce système de CLHP-CAD que le modèle puissance décrit les valeurs expérimentales mieux que le modèle linéaire.

Une autre méthode de CLHP couplée au détecteur Corona-CAD a été développée par Nair et Werling pour quantifier des acides gras libres résultant de l'hydrolyse de PLs dans une suspension pharmaceutique formulé avec des PLs comme agent stabilisant [109]. Dans cette étude, la méthode de Corona-CAD a été comparée avec la méthode de DEDL. En conclusion, la méthode avec Corona a montré une meilleure sensibilité, fidélité, récupération et aussi une meilleure linéarité pour les paramètres évalués.

Le Corona CAD<sup>®</sup> se caractérise par des avantages principaux : sa capacité à détecter des faibles quantités des matières, la relation masse/aire de pic presque linéaire pour de nombreux types de lipides. De plus, quelques aspects de l'identification et de la quantification des échantillons par le détecteur Corona doivent être regardés. Par exemple, l'optimisation des paramètres contrôlables peut améliorer la réponse. Parmi ces paramètres : la pression du gaz, la température, la gamme de réponse sur le système CAD. Par contre, le débit de la phase mobile ne peut pas être aussi élevé que par UV, car à des débits élevés, il est difficile de garantir qu'un certain degré de volatilisation de la phase mobile soit transporté jusqu'au détecteur. Des études à long terme sont nécessaires pour confirmer que les résultats sont reproductibles.

#### 3- La spectrométrie de masse:

### a) Généralités

La spectrométrie de masse a progressé récemment pour devenir un outil analytique puissant pour les applications quantitatives et qualitatives. Les spectromètres de masse peuvent être divisés en trois parties fondamentales; la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse et seuls les principes de fonctionnement de ceux utilisés au cours de cette thèse seront détaillés. Il s'agit des analyseurs à haute et à basse résolution, LTQ-Orbitrap et triple quadripôle respectivement, ainsi que la source d'ionisation electrospray ESI.

La spectrométrie de masse se repose sur la capacité de manipuler les ions à l'état gazeux sur la base des rapports masse sur charge (m/z). Donc, une étape cruciale est d'obtenir des analytes ionisés dans une phase gazeuse.

### b) Historique:

La découverte de la spectrométrie de masse remonte au début du XX<sup>ème</sup> siècle [134]. En 1886 Goldstein a découvert les ions positifs. En 1912, Joseph John Thomson (Prix Nobel de Physique en 1906 pour ses travaux sur la conduction de l'électricité par les gaz) obtient les premiers spectres de masse de gaz (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO...). Il observe ensuite des ions négatifs, des ions multichargés et des ions métastables [135]. En 1918, Dempster construit un spectromètre de masse à secteur magnétique. En 1942, il y a eu la commercialisation du premier appareil. Très vite se développent de nouvelles techniques d'ionisation (SIMS en 1949, l'ionisation électronique en couplage GC en 1957, l'ionisation chimique en 1967, le thermospray en 1980, FAB en 1981, MALDI en 1985, ESI en 1988...) et de détection (TOF en 1948, ICR en 1949, filtre quadripolaire en 1953).Le premier piège à ions est commercialisé en 1984 [135, 136].

Depuis sa création et jusqu'en 1942, la spectrométrie de masse a été essentiellement utilisée dans le cadre de l'analyse élémentaire, puis elle a servi à l'analyse de composés organiques jusque vers 1980. Depuis plus de 25 ans, elle s'est adaptée aux exigences des

chimistes et des biologistes en s'orientant vers l'analyse de mélanges de plus en plus complexes et de forte polarité ainsi qu'en permettant la détermination de masses moléculaires de plus en plus élevées [137].

### **3-1-** Les sources d'ionisation:

La production des ions en phase gazeuse à partir des molécules introduites se fait dans une partie qui s'appelle « la source ». Les solutés sont volatilisés et ionisés grâce à cette source.

Les sources d'ions se divisent en sources d'ionisation dure ou d'ionisation douce. Les ionisations dures produisent souvent des ions moléculaires à nombre impair d'électrons qui se fragmentent beaucoup, parfois même totalement, avant leur sortie de la source. Les ionisations douces produisent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons qui sont relativement stables. Ce type d'ionisation produit peu ou pas de fragments [138].

Les propriétés de l'analyte a analyser (caractéristiques physico-chimiques) précisent la nature de la source utilisée. Quand l'analyte est un solide, une source d'ionisation-désorption peut être utilisée. Une source d'ionisation-désolvatation est employée lorsqu'il s'agit d'un liquide. Lors le couplage avec un chromatographe gazeux, où les composés élués parviennent au spectromètre à l'état gazeux, une source El ou Cl peut être utilisée [139]. Les sources ESI, APCI et APPI sont utilisées en couplage avec la chromatographie liquide.

## 3-1-1- La source d'ionisation electrospray (ESI):

# a) Généralités

Le développement de l'ionisation par electrospray a révolutionné l'analyse par SM de biomolécules, y compris les phospholipides. Dans les dernières années, la littérature de la lipidomique montre que très peu d'articles mentionnent des techniques d'ionisation autres qu'ESI. Elle est largement utilisée, et essentiellement adaptée à l'analyse des molécules polaires. En 1984, Yamashita et Fennont décrit le premier coulage entre une source ESI et un SM à quadripôle. Avec cet appareil, et à partir de molécules non volatiles, il a été montré qu'il est possible d'obtenir des ions non fragmentés [140]. En 1989, le premier spectromètre de masse équipé d'une source ESI a été commercialisé. Ensuite, des développements sur l'ESI ont conduit à la création de sources NSI. L'ionisation par ESI est une méthode
d'ionisation douce qui produit des ions en phase gazeuse à partir d'ions préformés en solution [141, 142]. L'ajout des métaux (Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ou bien l'ajout de NH4+, CH3COO- peut optimiser l'ionisation par former des adduits de ces composés.

#### b) Le principe de l'ESI:

Le mécanisme de fonctionnement commence par introduire le soluté dans un fin capillaire métallique où se forme à son extrémité, par action d'un champ électrique intense (2000 à 4000V), à pression atmosphérique, des gouttelettes chargées. Ensuite, une pulvérisation de gouttelettes chargées de l'analyte et l'évaporation ultérieure du solvant à partir de ces gouttelettes est effectuée. Cela conduit alors à une augmentation de la charge à la surface des gouttelettes.



Figure 11: Principe de l'ionisation par electrospray [143].

Selon la valeur de la différence de potentiel entre l'aiguille de nébulisation et l'entrée du spectromètre de masse, les gouttelettes seront chargées positivement ou négativement. Si la différence de potentiel est positive, les gouttelettes seront chargées négativement et l'ionisation sera en mode négatif (ESI<sup>-</sup>). L'ionisation par electrospray en mode positif (ESI<sup>+</sup>) est possible lorsque la différence de potentiel est négative.

En présence d'un gaz inerte (par exemple l'azote), le solvant contenu dans les gouttelettes est évaporé. Au fur et à mesure de l'évaporation, la taille des gouttelettes diminue. La répulsion électrostatique entre les charges étant devenue trop importante, les gouttelettes explosent en libérant ainsi des microgouttelettes qui formeront des ions désolvatés [144].

Lorsque la tension de surface de la gouttelette ne suffit plus à vaincre les forces de répulsion des ions de surface (la limite de Rayleigh), les gouttelettes se séparent en gouttelettes plus petites, ce qui augmente la surface spécifique disponible [145]. Les réactions de transfert de protons en phase gazeuse peuvent, en outre, contribuer à l'ionisation de l'analyte [146].

La performance d'ESI dépend principalement de la phase mobile à pulvériser. Lors de l'optimisation d'une procédure LC-MS/ESI, plusieurs choses doivent être considérées. Tout d'abord, la formation initiale des gouttelettes chargées, au cône de Taylor à la pointe du pulvérisateur, est entraînée par la séparation de charge [141, 147, 148]. En mode positif, des ions négatifs s'orientent vers l'émetteur chargé positivement et sont neutralisés, tandis que les ions positifs se dirigent vers la pointe du cône, car ils sont repoussés par l'aiguille. Pour que ce procédé soit efficace, le solvant doit être suffisamment conducteur. En NP-CLHP des PLs, l'éluant au début de gradient ne peut pas répondre à ces exigences vue de la présence de pourcentages élevés de l'hexane et l'absence d'eau. Dans ces cas, l'addition de post-colonne de polarité plus élevée peut être nécessaire pour réaliser une ionisation suffisante.

Deuxièmement, une viscosité élevée des solvants a un impact négatif sur la séparation de charge. Cet effet est contrecarré par la présence abondante de solvants organiques, comme c'est habituellement le cas à l'analyse des PLs. En LC-MS des PLs, la présence de niveaux élevés des solvants organiques volatils a un effet positif sur la formation d'ions, car cela accroît l'évaporation du solvant à partir des gouttelettes et accélère l'ensemble du processus d'ESI [149].La présence d'eau dans le solvant a probablement un effet positif additionnel sur l'ionisation des PLs.

#### c) Les atouts et les inconvénients de la source ESI:

La source ESI présente plusieurs avantages : elle est compatible avec la chromatographie liquide vu que les analytes sont introduits en solution. L'ionisation est douce, ce qui permet d'observer des molécules intactes, et permet d'étudier des interactions non covalentes. Elle permet aussi l'analyse de molécules de très haute masse moléculaire parce qu'il est possible de former des ions multichargés. De plus, elle est particulièrement adaptée à l'ionisation des molécules qui contiennent des groupements polaires. En revanche, le principal inconvénient d'une source ESI réside dans les phénomènes de suppression d'ion liés à la présence d'autres composés en solution. Ces phénomènes se traduisent par une diminution notable de la réponse chromatographique de l'analyte considéré.

#### d) Le phénomène de suppression d'ions en ESI:

La quantification des lipides et d'autres composés par LC-MS/ESI est une question délicate. Un problème majeur se pose en raison du phénomène de suppression d'ions [150, 151]. La suppression d'ions en ESI-SM est produite lorsque l'ionisation d'un analyte est réduite en raison de la présence simultanée d'autres composés qui entrent en compétition pour la charge disponible. Ceci résulte en un changement de la concentration des analytes à l'interface d'ionisation. La suppression d'ions est liée à la concentration des analytes, mais aussi à la composition de la phase mobile, un solvant idéal possède une conductivité suffisante pour produire une bonne séparation, favorise la formation de petites gouttelettes, et est volatil pour assurer l'évaporation rapide de solvant et ensuite les ions de l'analyte. En outre, ce solvant ne doit pas induire de suppression d'ions.

La suppression d'ion peut être dûe aussi à la présence de composés de la matrice (comme souvent observé dans des échantillons biologiques), ou à la présence d'électrolytes tels que des tampons dans la phase mobile. Ces tampons sont couramment utilisés en CL.

Etant donné que tous les PLs contiennent au moins un groupe phosphate acide, auquel s'ajoutent parfois des groupes basiques tels que PE et PS ou des groupes acides comme (également) PS, l'utilisation de tampons par LC-MS est très fréquent. Cependant, la suppression d'ions de PLs est observée si la concentration de tampons est trop élevée, ou des tampons incompatibles sont utilisés [152].

#### **3-2-** Les analyseurs (séparation des ions):

La partie d'un spectromètre de masse qui sépare les ions, en fonction de leur rapport m/z s'appelle l'analyseur. Afin de sélectionner des ions et de déterminer leur rapport m/z, les

analyseurs peuvent utiliser un champ magnétique (secteurs magnétiques, résonance cyclotronique ionique), un champ électrique (temps de vol, filtres de masse quadripolaires, pièges à ions) ou bien la combinaison des deux. Différents types d'analyseurs sont existants: le quadripôle et la trappe d'ions (les plus utilisés), le temps de vol (TOF), l'analyseur à champ magnétique, l'analyseur à transformée de Fourier.

Les analyseurs sont généralement comparés sur la base de quatre critères technologiques: la vitesse de balayage, la gamme de rapports masse/charge balayée, la transmission et la résolution.

La résolution étant le pouvoir séparateur de l'analyseur, c'est-à-dire la capacité d'un instrument à séparer deux ions de masses voisines (en toute rigueur de rapports masse/charge voisins). En spectrométrie, la résolution signifie aussi la finesse des pics. La résolution en spectrométrie de masse est définie normalement par le rapport m/ $\Delta$ m, où m est la masse d'un ion considéré et  $\Delta$ m désigne la plus petite différence de masse pour laquelle il est encore possible de « séparer » le pic m du pic m +  $\Delta$ m [144], elle peut être améliorée en optimisant les paramètres d'analyse [153].

Quand on considère la largeur du pic, comme pour un quadripôle et pour le LTQ-Orbitrap, la résolution est déterminée dans ce cas par le rapport m/ $\Delta$ m où  $\Delta$ m est le largueur du pic à mi-hauteur ou "Full Width at Half Height (= FWHH). Le fait de travailler en haute résolution permet un filtrage plus important des ions en conduisant à des pics plus fins et à un nombre moins important d'ions qui arrive au détecteur. Par contre, un filtrage des ions moins important peut est réalisé lors du travail en basse résolution en menant à des pics plus larges et à un nombre plus important d'ions arrivant au détecteur.

Les analyseurs à « basse résolution », quadripôle et trappe d'ions ont une résolution unitaire. Ceux à « haute résolution », temps de vol (TOF), Orbitrap et cyclotron, ont une résolution supérieure à 10000 et permettent une détermination directe de la composition élémentaire et confirment l'identité d'un composé [154].

Tableau 2 : Résolution et gamme de rapport m/z analysable par les principaux analyseurs [155].

Analyseur Résolution Gamme m/z	Analyseur
--------------------------------	-----------

Quadripôle	2 000	8 000	
Magnétique	60 000	20 000	
Temps de Vol (TOF)	20 000	500 000	
Piège à ions (IT)	5 000	6 000	
Orbitrap	>240 000	4 000	
Résonance cyclotronique (FT-ICR)	>1 000 000	4 000	
(FT-ICR) Cellule harmonisé	10 000 000	4000	

La combinaison de plusieurs analyseurs permet d'analyser les ions formés et de sélectionner les ions d'intérêt après leur passage dans le premier analyseur, les faire passer dans une cellule de collision, les fragmenter spécifiquement avant de les repasser dans l'analyseur suivant. C'est la méthode de spectrométrie en tandem (MS/MS) [144, 156]; les combinaisons les plus populaires étant les triples quadripôles et quadripôles/TOF ainsi que le LTQ Orbitrap qui résulte de la combinaison d'une trappe d'ions linéaire et d'un Orbitrap. La combinaison de l'analyseur avec le détecteur détermine la qualité et la fiabilité de l'analyse.

# 3-2-1- LTQ-Orbitrap:

Le LTQ Orbitrap est un spectromètre de masse hybride constitué de deux analyseurs de masse, une trappe à ions linéaire et d'un Orbitrap, qui peuvent agir en parallèle ou en série les uns avec les autres [157].



Figure 12: Schéma d'un spectromètre de masse hybride trappe à ions linéaire/Orbitrap [158].

#### a) Trappe ionique linéaire:

La trappe linéaire est constituée d'un quadripôle hyperbolique segmenté en trois parties. Cette segmentation permet de garantir une parfaite homogénéité du champ électrique dans la zone de piégeage, limitant la perte d'ions une fois le piégeage réalisé. La géométrie de ce quadripôle offre un volume de piégeage des ions 10 à 100 fois supérieur à celui d'une trappe ionique conventionnelle.

Elle dispose de deux fentes d'éjection radiale: les ions sont alors détectés par deux détecteurs, permettant de doubler le rapport signal/bruit. Le Trappe linéaire dispose de différents modes et vitesses de balayage permettant de faire un spectre MS complet, une analyse d'un ion spécifique (SIM) et des spectres MS/MS des ions sélectionnés. Ce dernier se fait grâce au mode CID (Dissociation induite par collision). De plus, il est possible de réaliser des spectres MS/MS sans le seuil de coupure (cut off) basse de masse grâce au mode PQD (Pulse Q Detection). La trappe linéaire dispose d'un mode d'acquisition automatique MS/MS permettant de sélectionner de façon intelligente les ions précurseurs. L'exclusion dynamique permet d'obtenir les spectres MS/MS sur les ions de faible intensité et de résoudre des problèmes de co-élution. Il sera possible d'exclure les ions en fonction de leur intensité, leur état de charge, leur profil isotopique, de listes d'exclusion. Ce mode permet notamment d'augmenter le nombre de MS/MS par acquisition, en sélectionnant les ions précurseurs de plus faible intensité dans des mélanges [159].

#### b) L'Orbitrap:

Présenté en 1999, par Alexander Makarov, lors d'une conférence de l'American Society for Mass Spectrometry, l'Orbitrap a rapidement fait ses débuts en 2005 comme un détecteur de masse précis et compact. La performance analytique de l'Orbitrap peut prendre en charge une large gamme d'applications, de l'identification de composés de routine à l'analyse de composés à l'état de trace dans des mélanges complexes [160].



Figure 13: Schéma représentant l'analyseur Orbitrap[161].

L'Orbitrap est un piège à ions qui utilise un champ électrostatique mais ne met pas en jeu des radiofréquences. L'Orbitrap est composée de deux électrodes, une électrode interne en forme de fuseau et une électrode externe qui est scindée en deux par une bague de céramique isolante. Pour obtenir des mesures de haute précision, les ions du piège linéaire sont injectés dans un piège à ions en forme de C, appelé C-Trap. La C-trap n'est pas utilisée comme dispositif de collision, mais seulement comme dispositif de stockage. Une augmentation rapide du voltage des électrodes de la C-trap permet d'éjecter les ions de façon orthogonale vers l'Orbitrap.

Lors de l'introduction dans l'Orbitrap, les ions adoptent une trajectoire circulaire autour de l'électrode centrale et se déplacent également le long de l'axe Z. Les ions oscillant axialement, produisent un signal périodique sur les électrodes extérieures, qui est détecté comme un courant d'image. Après amplification, les signaux du courant d'image sont convertis en un spectre de fréquences en utilisant l'algorithme de la transformée de Fourier. Étant donné que la fréquence d'oscillation est directement liée au rapport masse sur charge, le spectre de fréquences est facilement converti en un spectre de masse [158, 162, 163]. L'Orbitrap présente un compromis significatif entre la résolution et la sensibilité.

#### 3-2-2- Trappe ionique :

Le fonctionnement d'une trappe d'ions, ou piège à ions, est basé sur l'action d'un champ de radiofréquence, sur les ions formés. Le piège à ions est constitué d'une électrode en anneau et de deux électrodes chapeaux. L'électrode annulaire est utilisée pour générer un champ électrique quadripolaire qui permet de piéger les ions et les retenir.

Le principe consiste à confiner, dans la trappe d'ions, des ions dans une certaine gamme de masse. Les ions décrivent, au centre de la trappe, des mouvements d'oscillations. L'hélium est introduit en continu dans la trappe. D'un côté, il permet de freiner les ions et d'augmenter l'efficacité de piégeage de la trappe. De l'autre côté, il a la capacité à contracter la trajectoire des ions piégés au centre de la trappe, permettant ainsi d'augmenter la résolution. Si la trappe est remplie par une quantité trop élevée d'ions, les ions génèrent eux-mêmes des forces qui provoquent leur dispersion. Ce phénomène s'appelle « effet de charge ». En pratique, l'effet de charge se traduit par une dégradation de la résolution et de la précision de mesure. Pour éviter cet inconvénient, le nombre d'ions dans la trappe est contrôlé par un processus permettant de remplir toujours la trappe par une quantité connue d'ions. Lorsque la trappe s'accumule une quantité d'ions correspondant à la valeur de seuil, les tensions des lentilles et multi pôles de l'interface de transmission sont modifiées pour stopper la transmission des ions en permettre à la trappe de passer en mode "scanning".

Ces ions sont ensuite éjectés vers le détecteur grâce à une augmentation de la tension de l'électrode annulaire. L'éjection se fait suivant l'axe z dans l'ordre croissant des rapports m/z. Chaque tension de l'électrode annulaire correspond à l'éjection d'un m/z particulier [144].A noter que la résolution augmente si la vitesse de balayage des tensions (i.e. la vitesse d'éjection des ions) diminue. Les trappes à ions utilisent donc différentes vitesses de balayage pour proposer différentes résolutions.



Figure 14: Analyseur par trappe d'ions[161].

En isolant un ion dans le piège, de la MS/MS peut être effectuée. La spectrométrie de masse en tandem est une technique permettant la détermination de structure des molécules. Le principe consiste à fragmenter les ions parents, obtenus par ionisation, en ions fils afin d'étudier la structure des molécules.

Il est donc possible d'isoler un seul ion d'intérêt dans l'analyseur et de ne fragmenter que celui-ci. Les autres ions sont éjectés de la trappe en utilisant d'une part le processus d'éjection résonante pour les ions plus lourds que l'ion d'intérêt, et d'autre part par l'application sur les électrodes d'entrée et sortie des fréquences de résonance des ions à éjecter.

Ces électrodes appliquent l'ensemble des fréquences à un voltage important (de l'ordre de 100 V) à l'exception de la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt qui est alors seul retenu dans la trappe. Cette fois-ci, les électrodes de sortie sont utilisées pour appliquer la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt. L'objectif est de faire résonner l'ion d'intérêt tout en le conservant dans la trappe. Le voltage appliqué sur les électrodes d'entrée et de sortie est ici bien inférieur aux 100 V précédents. L'ion résonne et percute un gaz rare (Ar, He) présent dans la trappe. Suite à ces collisions avec les atomes du gaz, une énergie est apportée à l'ion parent, formant ainsi un ion excité qui produira par la suite des fragments neutres ou ioniques. Les ions sont fragmentés par dissociation induite par collision (CID).



#### Figure 15: Principe de la dissociation induite par collision.

Les fragments n'ont pas la même fréquence de résonance que celle de l'ion parent. Ils n'entrent donc pas en résonance et sont immédiatement focalisés au centre de la trappe. Les fragments sont ensuite analysés suivant le même principe que la spectrométrie de masse classique.

Lorsqu'une étape comporte n collisions, c'est-à-dire plusieurs niveaux de fragmentation, pour un ion sélectionné, il s'agit d'une MS<sup>n</sup>. L'utilisation des trappes linéaires peut, néanmoins, présenter des limitations. En effet, sa faible résolution (5000) ne permet pas de détecter les ions précurseurs et les ions fragments avec une grande précision.

# 3-2-3- Quadripôle:



Figure 16: Principe de l'analyseur quadripolaire.

La plupart des analyseurs employés en couplage LC/MS et GC/MS sont les analyseurs quadripolaires pour certains raisons: une vitesse de balayage élevée, un coût raisonnable et la facilité de maintenance. Un analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes barres parallèles, de section idéalement hyperbolique mais le plus souvent circulaire. Ces électrodes sont soumises deux à deux à un potentiel  $\pm \Phi_0$  composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V:

#### $\Phi_0 = U-V.cos\omega t$

Au cours d'une analyse, pour un quadripôle linéaire, les tensions des électrodes sont modulées créant un champ électrique. Ce champ est constitué par un champ alternatif (tension alternative V.cosωt) quadripolaire superposé à un champ constant (tension continue V0) résultant de l'application sur les barres de potentiels de forme alternative qui guide les ions, dont les caractéristiques (m/z) s'accordent avec le champ électrostatique généré entre les électrodes, vers le détecteur. Pour chaque tension appliquée Ui un seul type d'ions avec un rapport m/z spécifique peut passer. En balayant toutes les tensions, les ions sont séparés par groupe de même rapport m/z [144].

#### 3-2-4- Les différents modes d'acquisition :

Les analyseurs peuvent présenter plusieurs modes d'acquisition, seuls ceux qui ont été étudié dans ce travail sont détaillés :

#### a) Le mode full scan (balayage):

Le mode full scan est la première étape pour explorer les échantillons avant l'analyse structurale et spécifiques en MS<sup>n</sup>. Ce mode d'acquisition peut offrir des informations sur tous les ions produit suite à l'ionisation. Les valeurs des tensions sont balayées afin de laisser passer tous ces ions. Ces informations produites par le mode full scan, en accompagnant avec d'autres informations chromatographiques, peuvent aider à identifier des composés d'un mélange lors du couplage LC-SM. Le full scan peut être employé lors d'introduction directe des analytes dans la source afin d'optimiser les paramètres. Ce mode est moins sensible en comparaison avec d'autres modes d'acquisition, mais il peut fournir plus d'informations utiles à l'identification des composés que le mode SIM (single ion monitoring) [164].

#### b) Le mode précurseur d'ions (en TQ).

Dans ce mode d'acquisition, le premier quadripôle (Q1) fonctionne en balayage, puis les ions sont fragmentés dans le deuxième quadripôle Q2 ou cellule de collision, tandis que le troisième quadripôle Q3 n'isole qu'un seul ion fragment, par exemple la tête polaire des PLs ou leurs chaînes d'acide gras, et le spectre obtenu va illustrer tous les ions parents qui produisent le fragment chargé sélectionné. Il est alors possible de mettre en évidence les ions conduisant à un fragment déterminé. Ce mode est utile lors d'études structurales. Le mode précurseur d'ions permet une analyse spécifique et pointue des PLs. Cette analyse permet une identification plus sensible en mode d'ionisation positive [165]. Par exemple, la recherche de PC dans un échantillon peut être réalisée en recherchant les molécules conduisant à la formation d'un fragment m/z=184 (ion phosphocholine) en ionisation positive.

# c) Le mode MS<sup>n</sup> data dépendant (en LTQ-Orbitrap):

La trappe ionique d'un LTQ-Orbitrap dispose d'un mode d'acquisition automatique MS/MS permettant de sélectionner de façon intelligente les ions précurseurs. Ce mode permet de déclencher une fragmentation ultérieure MS<sup>3</sup> si et seulement si un fragment donné apparait en MS<sup>2</sup> ce qui permet de sélectionner et fragmenter les ions parents donnant ce fragment en MS<sup>2</sup>. Les fragmentations peuvent se faire grâce au mode CID (Dissociation induite par collision) ou PQD (Pulse Q Dissociation).

# 3-3- Le détecteur:

Les ions sont détectés par un détecteur suite à leur sortie de l'analyseur. Un détecteur en SM peut à la fois détecter les ions proportionnellement à leur nombre, et amplifier le courant correspondant (de l'ordre de 10<sup>-12</sup> ampère) pour le rendre détectable par l'électronique du système. Plusieurs détecteurs peuvent être rencontrés, les principaux étant les suivants: multiplicateur d'électrons, multiplicateur de photons, *channeltron* et galette micro-canaux.



Figure 17: Schéma d'un détecteur de type "chaneltron".

Les détecteurs de type chaneltron (Fig. 15) sont largement utilisés et surtout en GC-MS. Ce détecteur a la forme d'un entonnoir courbe. L'intérieur est enduit d'un alliage plomb/oxyde de plomb qui a la propriété d'émettre des électrons sous l'effet d'un choc. Une différence de potentiel de 1000 à 3000 V est appliquée entre l'entrée et la sortie de l'entonnoir. Une émission d'électrons peut se produire lorsque l'ion heurte la paroi interne, et chaque choc décroche de nouveaux électrons. Ces émissions sont accélérées par la différence de potentiel. Un "chaneltron" produit un gain de l'ordre de 105 (1 ion arrivé résulte un courant de 105 électrons) [7].

#### 3-4- Application à l'analyse des PLs:

La spectrométrie de masse est devenue un outil indispensable de l'analyse des PLs. Dans les premières années d'application de la technique, l'analyse directe des PLs était possible avec SM à bombardement atomique rapide (FAB-MS) [166]. L'introduction de l'ionisation électrospray(ESI) qui présente un meilleur rapport signal sur bruit permet d'obtenir de faibles seuils de détection [167, 168].

L'ESI-MS montre un avantage supplémentaire en raison de sa capacité à être couplée à la CLHP en phase normale ou à polarités de phases inversées pour la séparation des classes phospholipidiques ou des espèces moléculaires respectivement. Le couplage ESI-MS aux

techniques séparatives permet d'améliorer l'efficacité et le débit d'analyse. Actuellement, le mode d'ionisation ESI est le mode le plus utilisé pour l'analyse de PLs [6].

Les PLs sont généralement mieux ionisés avec ESI qu'avec les autres sources d'ionisation, cela est dû à leur polarité [169]. L'ionisation des PLs a lieu soit au niveau du groupe phosphate ou sur le groupe de la tête polaire de PLs. Généralement, les lipides anioniques sont analysés en mode d'ionisation négative et les neutres ou les cationiques en mode d'ionisation positive [167]. La phosphatidylcholine est zwitterionique, car possédant une charge négative sur le groupe phosphate et une charge positive sur le groupe d'ammonium quaternaire de sa tête polaire. La PC est moins favorablement ionisée en mode négatif que dans le mode positif, elle nécessite un seul cation monovalent pour devenir chargé positivement [170]. Les autres glycérophospholipides (PA, PE et PI) sont facilement ionisés en mode négatif [171].

En ionisation positive, la PC est le phospholipide principal qui est détecté. Il peut produire de fortes intensités en s'ionisant en mode positif en comparaison avec le mode négatif. Par conséquence, la PC peut souvent cacher la réponse des PLs qui répondent moins tels que le PE. Pour cette raison, il semble nécessaire de séparer d'abord les classes de PLs en utilisant la chromatographie liquide en phase normale [172, 173].

Quand la classe phospholipidique est connue, le poids moléculaire des espèces moléculaires présents peut être calculé. Toutefois, il ne sera toujours pas possible d'identifier la distribution des chaînes et la double liaison. Par exemple, un phospholipide qui contient 28 carbones avec une double liaison peut être composé des chaînes d'acides gras de 14:0-14:1 ou 12:0 -16 0:1 qui ont le même poids moléculaire. Par conséquent, si une information structurelle est demandée en ce qui concerne une espèce spécifique, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) doit être employée.

Les ions produits en utilisant la source d'ionisation ESI sont plus stables que les ions produits par FAB parce que les ions sont générés par ESI avec des énergies internes inférieures. Cependant, la plupart des études publiées utilisant MS/MS pour l'analyse des PLs sont été effectuées en utilisant le FAB parce que cette technique d'ionisation a été interfacée plus tôt avec des spectromètres de masse [174]. De plus, la formation des fragmentations est affectée par le type de l'analyseur utilisé. Les spectromètres de masse quadripolaires en tandem se caractérisent par la possibilité de détecter les PLs et les autres composés avec des modes spécifiques : la perte de neutre et le précurseur d'ion. Le balayage en mode perte de neutre dans le domaine des PLs a été introduit en 1991 par Cole et Enke [175] avec l'ionisation FAB pour pouvoir détecter certains classes de GP en positive mode. Les classes phospholipidiques PA, PE et PI peuvent être détectés en balayage perte de neutre par la perte de 98, 141 et 260 Da de l'ion  $[M+H]^+$  respectivement. L'ESI-SM accordé au mode précurseur d'ion peut être utilisé pour détecter les PLs. En mode négatif, la m/z = 241 a été utilisé pour détecter les espèces moléculaires de PI, le PE a été détecté suivant le précurseur de m/z = 196. En mode positif, la PC est détectée en utilisant le précurseur de m/z = 184.

# 4- Problématique:

#### La quantification des lipides

Le lipidome désigne la sous-fraction lipidique du métabolome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme. L'analyse lipidomique représente un changement majeur d'échelle par rapport à l'analyse des lipides telle que pratiquée classiquement. L'objectif dans ce travail de thèse est d'atteindre l'échelle de l'espèce moléculaire lipidique ou plus précisément phospholipidiques en termes d'identification et de quantification afin de pouvoir décrire l'ensemble des perturbations d'un réseau métabolique liées à un état physiologique ou pathologique.

La quantification des phospholipides dans les échantillons biologiques s'avère essentielle et est de plus en plus étudiée en lipidomique. Elle utilise souvent de standards de classes phospholipidiques afin de mimer au mieux les échantillons biologiques.

La nature des espèces moléculaires ou des classes lipidiques des standards est particulière dans le domaine de l'analyse des lipides. La quantification des classes lipidiques s'effectue normalement par comparaison de la réponse de quantité connue de standards lipidiques correspondant à la même classe mais qui peuvent présenter des répartitions d'espèces moléculaires différentes. Ceci dépend d'une part de l'échantillon analysé (origine animale ou végétale, tissus ou fluide biologique, individu sain ou pathologique...) mais aussi de l'origine du standard commercial.

La chromatographie liquide en phase normale NP-CLHP est utilisée régulièrement pour la séparation des lipides par classes. La quantification des classes lipidiques peut solliciter les détecteurs « universels » ou détecteurs par nébulisation tel que (DEDL, Corona-CAD<sup>®</sup>).

Le DEDL et le Corona-CAD<sup>®</sup> sont des détecteurs « universels » dans la mesure où ils procurent une réponse pour tout soluté moins volatil que la phase mobile ce qui est très généralement le cas dans l'analyse des lipides. Ces détecteurs ne présentent pas de phénomènes de suppression d'ionisation. Leur réponse est cependant influencée par la nature des solvants et la géométrie du pic chromatographique du soluté. De même, la composition des espèces moléculaires d'une classe lipidique donnée influence la géométrie du pic chromatographique. Cette variation de profil peut être à l'origine de différences de coefficients de réponse aussi bien avec le détecteur Corona<sup>®</sup>-CAD qu'avec le détecteur DEDL. La quantification de classes lipidiques par l'utilisation des détecteurs DEDL et Corona-CAD<sup>®</sup> peuvent conduire à des résultats discordants.

L'analyse quantitative des PLs est essentiellement menée en chromatographie liquide en phase normale, couplée à la spectrométrie de masse équipée d'une source d'ionisation électrospray ESI-MS. Lors du couplage LC-MS, les composants matriciels et la co-élution de plusieurs espèces phospholipidiques génèrent un phénomène de suppression d'ions. Une réduction de la réponse des phospholipides en spectrométrie de masse MS est ainsi observée. La suppression d'ions peut altérer l'efficacité d'ionisation des phospholipides en MS donc diminuer l'efficacité et la reproductibilité d'une analyse quantitative.

L'objectif de ce travail est d'étudier d'une part le phénomène de suppression d'ions en spectrométrie de masse ESI en triple quadripôle TQ et en LTQ-Orbitrap, dans le cas des espèces phospholipidiques pour améliorer la quantification des phospholipides dans les échantillons biologiques. Dans un premier temps, l'étude de l'effet de la longueur de chaîne, du nombre et de la position des insaturations et de la tête polaire sur la réponse en MS est réalisée pour un nombre d'espèces moléculaires. En fonction des résultats, des mélanges de différentes espèces ont été établis pour mieux comprendre l'effet de la suppression d'ions.

# 2<sup>ème</sup> partie

**Travail Personnel** 

# Chapitre 2

# Article N° 1:

ELSD vs Corona for detection and quantification of phospholipid classes: a comparison between phospholipid extracts from animal and from plant tissue

Article en préparation

# **INTRODUCTION ARTICLE 1 :**

Les phospholipides sont d'une grande importance et sont largement utilisés dans les domaines alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Du point de vue biologique, les composés phospholipidiques se retrouvent dans les membranes biologiques et ont une implication majeure dans divers processus physiologiques. L'identification et la quantification des classes et des espèces de phospholipides sont d'un intérêt majeur pour la compréhension des processus physiopathologiques.

Ce travail s'appuie sur l'usage des standards de lipides ou plus précisément des standards de phospholipides lors de la quantification de ces composés lipidiques dans les échantillons naturels/biologiques. Les standards de lipides, utilisés lors des études quantitatives, sont des extraits naturels issus de différentes sources d'extraction, soit de source animale ou de source végétale. Cette variation concernant l'origine de ces standards peut présenter des répartitions des espèces moléculaires différentes.

Lors des études quantitatives des lipides dans les échantillons biologiques, le standard lipidique employé devrait avoir théoriquement la même composition que l'échantillon à quantifier. Pour des raisons de disponibilité commerciale, cette situation idéale n'est pas toujours réalisable. Cette difficulté est usuellement résolue en pratique par l'utilisation d'un standard issue d'une source proche de celle de l'échantillon. Par exemple, pour quantifier un échantillon de source végétale, on utilisera un standard issu, lui-même, de source végétale. Compte tenu de la variabilité de la composition des espèces moléculaires en fonction de la source d'extraction, la quantification des PLs ainsi que la géométrie de pic chromatographique peuvent être impactées ce qui influence les résultats analytiques.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'effet de l'origine des standards sur les résultats analytique. Ainsi, lors d'une analyse par classe de polarité telle que pratiquée en NP-HPLC, la répartition des espèces moléculaires de la classe considérée influence la forme du pic chromatographique. Même si la rétention de la classe est principalement gouvernée par les interactions de la « tête » polaire du phospholipide avec la phase stationnaire, la nature des espèces influence suffisamment la rétention pour que l'enveloppe globale du pic soit modifiée. Par exemple, le pic d'un standard naturel composé de plusieurs espèces est

toujours plus large qu'un standard mono-moléculaire. En conséquence, le profil de concentration qui traverse le détecteur diffère selon que l'on considère le pic issu du standard ou celui de l'échantillon. Les détecteurs utilisés pour la détection des lipides sont les détecteurs DEDL ou Corona-CAD<sup>®</sup>. L'un comme l'autre ont pour principe de nébuliser la phase mobile puis de détecter les particules (ou gouttelettes) de soluté après évaporation du solvant. La réponse de ses deux détecteurs diffère dans la mesure où la diffusion de la lumière est utilisée dans le cas du DEDL et la charge de particules dans le cas du Corona-CAD<sup>®</sup>. Dans les deux cas, courbe réponse vs concentration est une fonction non linéaire ce qui amplifie la déformation du pic.

Les échantillons naturels de lécithine commerciale ont été sélectionnés dans ce travail comme modèle d'application en raison de leur richesse en PLs car renfermant 65 à 75 % de PLs (en plus d'autres composés lipidiques). Les lécithines sont issues de source végétale (lécithine de soja) et de source animale (lécithine de jaune d'œuf). La lécithine présente une distribution différente de classe de PLs en fonction de la source d'extraction. La lécithine de soja contient quatre classes de PLs qui sont PA, PI, PE et PC alors que la PC montre un pourcentage important dans la lécithine de jaune d'œuf avec un pourcentage plus faible de la PE.

Au cours de ce travail, une méthode de séparation par chromatographie liquide haute performance à polarité de phase normale sur une colonne de PVA-Sil thérmostatée à 35°C a été optimisée dans le but d'achever la séparation complète des classes de PLs dans les lécithines ainsi que dans le mélange des standards.

La réponse des détecteurs en fonction de la concentration suit une fonction de type puissance. Celle-ci est comparée en fonction de l'origine des standards de phospholipides. La composition de ceux-ci est par ailleurs explorée en spectrométrie de masse haute résolution.

La comparaison de ces deux méthodes de quantification des classes de PLs a été faite à partir des résultats d'analyse en appliquant des tests statistiques de validations analytiques. La fidélité de la méthode a été étudiée (écart-type de répétabilité, écart-type de la fidélité intermédiaire et inter-groupes, la variance et le coefficient de variation). L'analyse de la variance a été évaluée, et des tests statistiques basés sur la méthode des moindres carrés

ont été appliqués dans le but de calculer l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement de notre modèle pour les deux détections (DEDL et Corona-CAD).

Les performances des détecteurs ou des détecteurs universels, par nébulisation, a été comparé dans cette étude pour l'analyse quantitative des classes de PLs dans des échantillons naturels.

# ELSD vs Corona for detection and quantification of phospholipid classes: a comparison between phospholipid extracts from animal and from plant tissue

# Spiro Khoury<sup>1</sup>, Sana Tfaili<sup>1</sup>\*, and Pierre Chaminade<sup>1</sup>

\*Corresponding author: <a href="mailto:sana.tfaili@u-psud.fr">sana.tfaili@u-psud.fr</a>

<sup>1</sup>Lip(Sys)<sup>2</sup>- Chimie Analytique Pharmaceutique<sup>§</sup>, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.

<sup>§</sup>(FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud)

#### Abstract:

This work focuses on the use of standards of phospholipid classes (PLs) coming from animal or vegetal origin according to the origin of the sample to quantify. The standards of phospholipid classes from animal or plant origin may present different distributions of PLs molecular species. Lipids are devoid of exploitable chromophores, thus, PLs quantification makes use of universal detectors. The performance of universal detectors or detectors by nebulization such as the evaporative light scattering detector (ELSD) and the charged aerosol detector (Corona-CAD<sup>®</sup>) was compared for the quantitative analysis of phospholipids. Natural samples of commercial lecithin, used as models of biological samples in this study, were selected according to their lipid content because they contain 65-75% phospholipids. They are derived from animal sources (egg yolk lecithin) and plant source (soybean lecithin). A separation method by High Performance Liquid Chromatography in Normal Phase (NP-HPLC) using a PVA-Sil column was optimized and used in this work. The detector response as a function of the concentration follows a power model. The comparison of these two methods of quantification of phospholipids classes is made from analytical results by applying statistical tests of analytical validations. A study of the geometry of chromatographic peaks was conducted also throughout this work.

## 1- Introduction:

Metabolome refers to the entire set of chemical species with low molecular weight in cell or biological systems. Disorders in the metabolic network are related to physiological changes or pathological conditions. To find the biomarkers responsible of these alterations, metabolomic analysis is necessary. Phospholipids (PLs) are one of the most interesting

biomarkers in metabolomic and represent an important constituent of lipidomic [1]. Phospholipidome is made up taking together glycerophospholipids and sphingophospholipids. Besides their biological importance, and due to their amphiphilic nature, the use of PLs increased lately in cosmetic and modern pharmaceutical industries [2, 3]. PLs are widely used as main raw material, many drugs based on PLs are continually developed, such as nanoemulsions, liposomes, micelles, solid lipid nanoparticules [4, 5]. They are also used as stabilization agents: emulsion stabilizers [6]. For this, PLs identification and quantification in natural and biological samples is important. Once the PLs classes and species are identified and precisely quantified, we can build up the diagnostic competence and improve scientific skills to recognize various diseases [7].

Several techniques has been used for lipid quantification as thin layer chromatography-TLC (traditional way), but the lack of accuracy and the use of clinical samples made the analysis of different lipid classes difficult to carry out [8]. Some lipid classes in plasma, triglycerides (TG), free fatty acids (FFA) and PLs (PS, PE, PC, SPM) were quantified by enzymatic methodologies [9-11]. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry has been used principally to identify lipid classes and species. Mass spectrometry is the tool of choice when the specificity and low detection limits are required. Normal-phase liquid chromatography (LC) has become the technique of choice for class identification. Several polar stationary phases have been investigated: silica [12], diol [13], cyano [14], and poly vinyl alcohol grafted to silica [15]. Several NP-HPLC methods have been developed for lipid analysis with different chromatographic parameters [16, 17]. Being free of exploitable chromophores, lipids cannot be detected by classic methods as UV. To quantify total lipid classes in NP-HPLC, "universal" nebulizers detectors are used: evaporative light scattering detector (ELSD) or charged aerosol detector (CAD-Corona®). Both detectors have nonlinear response. Among all detectors used for lipid analysis, ELSD presents numerous advantages over the others: ELSD is a universal detector, compatible with all solvents being more volatile than the solute [18] and no baseline drift occurs when multi solvent and many gradient elution are used to improve resolution. In addition, the degree of unsaturation and the chains length do not affect the signal. Christie et al. were the first to introduce the use of NP-HPLC coupled to evaporative light scattering detector (ELSD) [19], enabling the separation of lipid classes according to their polarity (different polar heads).

The operating principle is very close between both evaporative light scattering and charged aerosol detectors, precisely in the first two steps of functioning (nebulization and evaporation), and is different in the subsequent steps. The major dissimilarity comes at the third stage of operating. Corona mechanism depends on particle ionization which is performed in the ionization chamber, followed by the detection of the charged particle by an electrometer; while diffusion of light by many phenomenons is a distinguishing mark in ELSD response. Details of mechanisms are explained later on in this paper and a large amount of literature is accessible to understand the basis of the response of these two detectors. Charlesworth et *al.*, described the principle of ELSD [20], whereas the much more recent detector Corona-CAD was described by Dixon and Peterson [21]. The performance of universal detectors, or detectors by nebulization, was compared in this study for the quantitative analysis of phospholipids class in natural samples.

Quantification of phospholipids using these detectors is made up generally by employing PLs standards, with in some cases the ability to quantify compounds in mixtures without using any corresponding standards. Based on the preliminary determination of the calibration curve of the ELSD detector, the quantification of compounds in a mixture is possible by defining the coefficients b and log a representing the non-linear response of this detector through the relation A=a.m<sup>b</sup>. This method is very important in the cases where some of lipid molecular species are not available as standards [22]. In fact, the commercial standards usually used for lipid quantification studies consist of lipid classes not lipid species, which implicates that standards are composed of several molecular species of a specific class. The lipid class standards extract originates from different sources. Therefore, these commercial standards do not present an identical composition in terms of molecular species. This makes the lipid quantification difficult in biological systems. On one hand, the use of these standards aims to mimic biological samples. And on the other hand, standards of lipid molecular species are neither always affordable nor available.

Commercial lecithin was used in this work, it was selected as an application model of natural biological samples for their richness in PLs. Lecithin comes up from diverse extraction sources, generally, animal and plant sources. It is a complex mixture containing about 65 to 75% of PLs, triglycerides and other substances comprising carbohydrates, pigments, sterols and sterol glycosides in a smaller amount [23]. The Lecithin presents a different composition

in terms of molecular classes and species of PLs according to the extract source. In this study, lecithin extracted from animal source (egg yolk or bovine) contains two PLs classes: phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC), while lecithin extract from plant source (soybean) contains four PLs classes: phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC).

A gradient elution method in NP-HPLC method, using a YMC PVA-Sil column as a stationary phase, has been developed in this work. The developed method permitted the separation and quantification of phospholipid classes ranging from PA with a low polarity to highly polar PC in lecithin samples (based on differences in the polar head groups). Ionization modifiers have been employed to improve the response of PA [15]. After quantification, the responses of phospholipids originating from animal and vegetal sources were compared in this study. Comparison was made up by applying statistical validation tests. Standard deviation and coefficient of variation were calculated to evaluate the precision of the results. And the analysis of variance was evaluated to studying the strength of the model expressed by calculating the lack of fit and the experimental error.

Differences related to extraction source and to molecular species composition in the PLs class standards could affect the quantification studies. In addition, the distribution of the lipid molecular species in each class depending on extraction source can modify the chromatographic peak shape. Exponentially modified Gaussian (EMG) formula describes best the chromatographic peak shape. An improved EMG model permits also to describe the chromatographic peak shape by applying making a peak deconvolution routine based on linear optimization methods [24].

The aim of this work is to rationalize the empirical approach for lipid quantification based on the extraction source. Another goal is to understand the consequence of standards composition on PLs quantification using both ELSD and corona-CAD detectors. And the last target is to study the geometry of the chromatographic peak in order to understand on one side whether the PLs standards composition influences the peak geometry, and to evaluate dissimilarities in peak geometry according to the employed detector.

## 2- **Experimental**:

## 2-1- Standards and samples:

Phospholipids standards extract originated from animal source (egg yolk or bovine) and from plant source (soybeans). L- $\alpha$ -phosphatidic acid (PA)-(Egg, chicken- Monosodium Salt), l- $\alpha$ -phosphatidic acid (PA)-(Soy- Monosodium Salt), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC)-(Egg, Chicken), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC)-(Soy), L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine (PE)-(Egg, Chicken), L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine (PE)-(Soy), L- $\alpha$ -phosphatidylinositol (PI)(Soy- Sodium Salt), L- $\alpha$ -phosphatidylinositol (PI)-(Liver, Bovine) were purchased from Avanti Polar Lipids, INC and had a purity degree of > 99%. Standards were prepared in chloroform 100% with a concentration of 5.0 mg/ml, then stored at -20°C, and diluted after according to our experimental conditions.

Two different lecithin samples (lipid mixture), one extracted of Egg yolk, ~60% (TLC), the other from Soybean 14-23% choline basis were purchased from Sigma-Aldrich in powder format, and prepared in solution or experiments. Egg yolk lecithin in powder state was stored at -20 °C, while soybean lecithin was stored in the refrigerator at 5°C.

#### 2-2- Apparatus:

Chromatographic system included Jasco PU-980 Intelligent HPLC pump, Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit attached with a degasser DEGASYS DG-130, and HPLC 565 AUTOSAMPLER, BIO-TEK KONTRON instruments.

The separation was carried out with YMC PVA column, Sil-grafted with a vinyl alcohol polymer coating (150  $\mu$ m length, internal diameter 2.1 mm, and particle size 5  $\mu$ m). The column temperature was thermostatically controlled with a column oven CTO-GA Shimadzu.

Detection system consisted of an evaporative light scattering detector Chromachem ELSD and Corona CAD systems (both from ESA, Chelmsford, MA, USA) supplied by Eurosep (Cergy, France). The analog signal was acquired with Kroma System 2000 software provided by Kontron Instruments (St Quentin en Yvelines, France).

# 2-3- Chromatographic conditions:

The solvent program used for phospholipids separation is summarized in Table 1, was based on the work of Godoy-Ramos *et al.* [25], and was slightly optimized in this work. The composition of solvents A, B and C is the following: Solvent A was a n-heptane/2-propanol (98:2 v/v) mixture; solvent B was a chloroform/2-propanol (65:35 v/v) mixture and solvent C was a methanol/water (95:5 v/v). All mobile phases contained 0.08% of triethylamine TEA and 1.00% of acetic acid CH<sub>3</sub>COOH to modify the ionization of lipids and their retention time. The total flow was 0.4 mL/min, and 5 µL of sample were injected. The temperature was maintained at 35°C. The total time analysis was 44 min, including 15 min for column reequilibration.

Time (minutes)	Phase A (%)	Phase B (%)	Phase C (%)
0	98	2	0
2	98	2	0
8	12	88	0
22	0	60	40
26	0	60	40
27	0	100	0
29	0	100	0
30	98	2	0
44	98	2	0

Table 3: Solvent program gradient based on Godoy-Ramos et al. work with slight modifications[25].

# 2-4- ELSD, corona-CAD experiments:

Detection for NP-HPLC analysis was performed with two detectors: firstly, the corona-CAD, a charged aerosol detector with the PVA-column. CAD experiments were performed at 35 psi air pressure and with a range optimized to be at 200, with "non filter" setting.

For the second detector ELSD, the nebulization and evaporation temperatures were set at 25 °C and 40 °C, respectively after signal optimization. The air pressure was maintained at 55 psi, and the attenuation was set at 6 based on the best signal to noise ratio. Signal was with non filter position.

# 2-5- Chemicals:

HPLC grade water and chloroform were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Triethylamine (TEA, analytical reagent grade, 99.5%), acetic acid (LC-MS grade) and n-heptane (HPLC grade, ≥99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Methanol was from Sigma-Aldrich (FLUKA-HPLC grade). 2-propanol (ULC-MS grade) was from Biosolve (Dieuze, France).

# 2-6- Sample preparation:

## Standards and lecithin samples for phospholipids quantitative analysis study:

Two calibration ranges (animal source "egg yolk and bovine", and plant sources "soybean") were prepared for each day of experiment at five concentration levels: 0.1; 0.35; 0.6; 0.85; 1.1 g/L over three days.  $CHCl_3$  was used for all samples, standards, and calibration ranges preparation.

From the 5 g/L solution of each phospholipid standard, we prepared two series. Each serie presented two mixtures of four phospholipid classes. One mixture represents the plant extract source and the second the animal extract source. For the five levels of concentration in the calibration range, the mixture contained an equal concentration of PA, PI, PE and PC. These mixtures are a mimic of a biological sample.

Soybean, and egg yolk lecithin samples were prepared at 2 g/L in  $\text{CHCl}_3$  and represent a natural mixture of phospholipid classes. The concentration of 2 g/L was chosen in a manner that the concentrations of each class in the lecithin cover across various phospholipids concentrations in the calibrating range. The lecithin samples were prepared each day according to the source of the calibrating range.

Analysis of all calibration range points and lecithin samples has been programmed in a random way. Each concentration level was analyzed once, except the central point 0.6 g/L, which was examined four times. Two blanks of CHCl<sub>3</sub> were injected at the start of each experiment day. Experiments took approximately nineteen and half hours per day. Retention time, peak areas and heights were recorded for further statistical validation test.

# 3- Results and discussion:

Major PLs classes in standard mixtures or in lecithin samples were separated by NP-HPLC method. The PVA-Sil column allowed the complete separation of the PLs classes in lecithin and in standards mixtures in a single run following the increase of the polarity of the polar

head of PLs classes. Chromatograms of PLs standard mixtures and lecithin samples obtained with both ELSD and Corona-CAD detectors is shown in (Fig. 18, 19). The order of elution for PLs classes was: PA, PI, PE, and PC, depending on PLs class polarity.



Figure 18: separation of phospholipid standards from plant and animal origin on PVA-SIL column with ELSD and Corona-CAD detectors (0.6g/L of PA, PI, PE and PC).



Figure 19: separation of phospholipids from the soybean lecithin and egg yolk lecithin on PVA-SIL culumn with ELSD and Corona-CAD detectors (2 g/L of soybean and egg yolk lecithin).

#### **3-1-** Detector response models:

To study the relationship between phospholipid concentrations and the detector response represented by the peak areas, a power model was evaluated firstly and then log-log transformation was established. Given that the detector response is not linear, the response of the detectors, thus the intensity of the signal depending on analyte concentration follows a power function. Power regression was used to fit ELSD and Corona-CAD data to the power model, the quantification of the phospholipids classes in lecithin samples was carried out based on the following regression equation:  $Y = A.X^b$ , where Y is the output signal from the

detector (peak area in our case), x is the concentration of PLs injected, A and b are two numerical coefficients; A represents the response intensity and b the response shape. Linear regression was used to fit ELSD and CAD data to log-log model. As the response of detectors is described by Eq: Y=A.X<sup>b</sup>, Plotting log y = log A + b log x was often used to linearize the ELSD or CAD response function and to transform the power type to a logarithmic scale. When this step is achieved, statistical tests can be applied improving the fit of points on regression curve. Applying this formula to data, intensities logarithm depending on concentration logarithm, follows a linear function where the phospholipid concentration is explained, modeled by an affine function to peak area. Fig. 20, 21 and Fig. 22, 23 show an example that compare the classical log-log transformation and the power model for Corona-CAD<sup>®</sup> and ELSD responses respectively.



Figure 20: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the Corona-CAD detector, log-log transformation model.



Figure 21: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the Corona-CAD detector, power model.



Figure 22: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the ELSD detector, log-log transformation model.



Figure 23: Plots of peak area vs. concentration of phospholipid standards mixture (PA, PI, PE, PC) of plant and animal source according to the ELSD detector, power model.

Regarding these figures, the classical log-log transformation of both x and y data (corresponding to the concentration, peak areas respectively) was preferred over power regression because it has improved the adjustment of calibration points on regression curve. This transformation from power model to log-log regression was used from another point of view to calculate the residual error, including the experimental error and the lack of fit of the model. Negligible variations of PLs class quantification results are expressed according to the regression model and the observed values of A and b coefficients permits to know the type of scattering phenomenon for ELSD detection. The variations observed of A and b can be explained by the type of detection. Following this applied transformation, all statistical tests can be calculated to validate the model as described previously.

## **3-2-** Validation of analysis method:

#### 3-2-1- Dixon test:

Based on the peak areas of PLs classes, Dixon test was applied for both standard mixtures in the calibration range and also to soybean, and egg yolk lecithin samples in order to eliminate the outlier values [26]. Concerning PLs standard mixtures, the central point of the calibration range, which corresponds to the concentration 0.6 g/L, was selected to apply Dixon test and this for each day of experiments. Following Dixon test, one replicate from four at the point 0,6g/L was removed. The remaining three replicates of each central point in the calibration ranges were used for the following statistical tests. In the same way for lecithin sample, one

replicate of five was eliminated and four replicates were kept to the second step of statistical tests. The method validation aims to evaluate the linearity of the model, the precision and the analysis of variance (ANOVA). Statistical tests were applied for PLs mixture standards (three replicates) as well as lecithin samples (four replicates) results for both Corona-CAD, ELSD detections. Two series of analysis were evaluated over three days for each detector.

# 3-2-2-Linearity:

The linearity of an analysis method is the capacity, within a certain range, to obtain results directly related to the analyte concentration. For validation purpose, the method linearity was tested. For this and after linearization of the equation Y=a\*m<sup>b</sup>, the coefficient of determination (R<sup>2</sup>) was evaluated. The coefficient of determination determines how well the regression equation is suitable to describe the distribution of points. In other words, R<sup>2</sup> express the variability explained by the regression divided to the total variability. The calibration range was defined here over the range of 80 to 120%. Then, the coefficient of determination was calculated for all calibration curves related to all phospholipid classes standards. The minimum and the maximum value of the coefficient of determination obtained for each calibration curve related to each phospholipid class is sited in table 4. Results showed that the method in linear (obtained values >80%) which means that, at least, more than 80% of the total variation in peak area can be explained by the linear relationship between the concentration and peak area. These results were observed whatever the extraction source of standard in the mixtures with Corona and ELSD detection methods.

		Corona-CAD <sup>®</sup>		ELSD	
Source	PLs classe	coefficient of determination R <sup>2</sup>			
		minimum	maximum	minimum	maximum
		value	value	value	value
Standards of plant source	ΡΑ	0.811	0.963	0.893	0.988
	PI	0.841	0.991	0.894	0.977
	PE	0.847	0.990	0.898	0.977
	PC	0.856	0.992	0.907	0.980

Table 4: The maximum and minimum values of the coefficient of determination obtained overall experiments for Corona-CAD<sup>®</sup> and ELSD detectors for all phospholipid classes standards from plant and animal origin (PA, PI, PE, and PC).

Standards of animal source	ΡΑ	0.908	0.996	0.853	0.993
	PI	0.908	0.994	0.859	0.994
	PE	0.881	0.993	0.886	0.994
	РС	0.915	0.993	0.869	0.989

# 3-2-3-Precision:

After applying Dixon test, the intermediate precision and repeatability were evaluated. These tests were applied for all standard mixtures of both plant and animal origin and also for lecithin samples using always the two detection methods ELSD and Corona-CAD<sup>®</sup>. All statistical tests were achieved at the intermediate level of calibration range 0,6 g/L in the case of standard mixtures which corresponds to the central point, and were achieved also at lecithin samples 2g/L. These tests were produced throughout three days, in three repetitions and were reproduced on two series of experiments in the same conditions. In this context, method precision was examined at several levels. First of all, the standard deviation:

$$\begin{split} S_{x_k} &= \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_{i,k} - \bar{x}_k)^2 / (n-1)} \quad , \quad \text{standard deviation between-group } : S_g = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k (\bar{x}_j - \bar{x})^2}{k-1} - S_r^2}}, \text{ standard deviation of intermediate precision: } S_F = \sqrt{S_r^2 + S_g^2}, \text{ standard deviation of repeatability: } S_r = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k S_{x,j}^2}{k(n-1)}}, \text{ where } k= \text{ number of days, } n= number of repetition per days, and also the coefficient of variation was examined at two levels : } CV_r = 100^{S_r} / \bar{\chi}, CV_F = 100^{S_F} / \bar{\chi}. \end{split}$$
			Со	rona-CAD	®				DEDL		
		Sr	Sg	SF	CVr%	CVF%	Sr	Sg	SF	CVr%	CVF%
	ΡΑ	16.58	0.00	16.58	5.48	5.48	6.38	0.00	6.38	3.78	3.78
Standards of	PI	8.97	0.00	8.97	5.01	5.01	8.25	40.29	41.13	2.07	10.30
0.6 g/L	PE	6.84	0.00	6.84	4.60	4.60	5.75	33.33	33.82	1.81	10.66
	РС	6.38	0.00	6.38	4.47	4.47	5.59	27.56	28.13	2.02	10.15
	ΡΑ	15.33	17.78	23.48	5.86	8.97	6.33	5.87	8.63	4.50	6.13
Standards of	PI	6.80	0.00	6.80	3.88	3.88	10.15	33.16	34.68	2.81	9.61
0.6 g/L	PE	5.84	0.00	5.84	3.90	3.90	7.95	26.59	27.76	2.74	9.58
	РС	5.59	0.00	5.59	4.03	4.03	8.47	24.94	26.34	3.35	10.41
	ΡΑ	2.60	0.00	2.60	11.40	11.40	1.28	0.76	1.49	2.92	3.40
Soybean	PI	3.54	5.35	6.42	3.79	6.87	3.15	8.55	9.11	2.53	7.30
lecithin 2 g/L	PE	3.96	5.51	6.78	4.68	8.03	2.59	11.22	11.51	1.86	8.27
	РС	3.65	6.51	7.46	4.01	8.21	2.50	13.79	14.01	1.66	9.27
Egg yolk	PE	4.013	0.000	4.013	8.542	8.542	3.13	3.29	4.54	7.39	10.71
lecithin 2 g/L	РС	12.506	0.000	12.506	6.127	6.127	29.88	53.61	61.37	6.11	12.56

Table 5: Repeatability and intermediate precision study with ELSD and Corona-CAD detection for phospholipid standards and lecithin samples.

Results in table 5 show a good precision for both detectors. A better precision is found for Corona-CAD® detector and this is in agreement with a previous study of Godoy Ramos *et al.*, [25]. For the range of calibration corresponding to phospholipids standards, the coefficient of variation CV<sub>F</sub> is better with Corona detector whereas CV<sub>R</sub> is better with ELSD detection (CV<sub>F</sub> is expressed in terms of the standard deviation of intermediate precision whereas CV<sub>R</sub> is expressed in terms of the standard deviation of repeatability). For lecithin samples, the same results are obtained. Concerning all remaining statistical tests; standard deviation of intermediate precision, corona detector presented the best results with PLs standard mixture and with lecithin samples for all PLs classes (PA, PI, PE, PC) whatever is the extraction source. In conclusion, intermediate precision study including several tests showed better results for Corona-CAD compared to ELSD.

#### 3-2-4- Validation of the model (ANOVA test):

As previously mentioned, validation of the model is required to verify that the chosen model describes adequately the relationship between the two variables (the concentration and peak area ) or to confirm that there is no lack of fit of the model. Statistical tests are applied to control the force of the chosen model, and to evaluate whether the variation in responses is globally due to the variation of analytes concentration, or just related to experimental noise. For this reason, an examination of residuals is performed, the analysis of variance is evaluated, and statistical tests based on least squares method were used to calculate experimental error, and the lack of fit [27] of our model for all calibration ranges response of both detectors (ELSD, and Corona-CAD). Linear regressions are applied as described previously for all calibration ranges of standard mixtures from different extraction sources. Following the log-log linear regression, slope function, and intercept function were used in excel 2007 to output slope value for regression, and intercept, respectively. Therefore, the matrix LINEST (y known, x known, constant, statistics) was used to calculate regression statistics by least squares method. Additional statistics of regression released by this function are: Slope, intercept, standard deviation on slope, standard deviation on intercept,

coefficient of determination, standard deviation of prediction  $\lambda$ , stat F, degrees of freedom, sum of squares from the regression SS<sub>E</sub>, and residual sum of squares SS<sub>R</sub>. Two Fisher that comparing explained variance and the residual one were finally applied. The choice of linear regression (log-log) is detailed later.

Corona-CAD	PLS	Standard deviation of prediction	Stat F	Degrees of freedom	Sum of squares of the regression SSe	The residual sum of squares SSr	The total sum of squares of deviations SSt	The total variance Vt	The variance explained Ve	Residual variance Vr	Experimental error (pure error)	Fit error (lack of fit)	MS LOF	MS <sub>PE</sub>	Experimental F= MS <sub>REG</sub> /MS <sub>R</sub>	F= MS <sub>LOF</sub> /MS <sub>PE</sub>
	ΡΑ	0.143	21.391	5.000	0.438	0.102	0.541	0.090	0.438	0.020	0.000	0.102	0.034	0.000	21.391	156.82
source	PI	0.142	26.460	5.000	0.533	0.101	0.634	0.106	0.533	0.020	0.001	0.099	0.033	0.001	26.460	49.408
Plant s	PE	0.158	27.787	5.000	0.694	0.125	0.819	0.137	0.694	0.025	0.002	0.123	0.041	0.001	27.787	41.766
	PC	0.146	29.824	5.000	0.635	0.106	0.741	0.123	0.635	0.021	0.004	0.102	0.034	0.002	29.824	17.126
a	ΡΑ	0.083	49.558	5.000	0.340	0.034	0.374	0.062	0.340	0.007	0.006	0.028	0.009	0.003	49.558	3.126
sourc	PI	0.095	49.357	5.000	0.448	0.045	0.493	0.082	0.448	0.009	0.010	0.035	0.012	0.005	49.357	2.342
nimal	PE	0.118	37.183	5.000	0.521	0.070	0.591	0.099	0.521	0.014	0.018	0.052	0.017	0.009	37.183	1.928
A	PC	0.099	63.750	5.000	0.624	0.049	0.673	0.112	0.624	0.010	0.004	0.045	0.015	0.002	63.750	8.005

Table 6: statistical tests of regression, Fisher test for phospholipid analysis by HPLC/Corona-CAD.

ELSD	PLS	Standard deviation of prediction	Stat F	Degrees of freedom	Sum of squares of the regression SS <sub>E</sub>	The residual sum of squares SS <sub>R</sub>	The total sum of squares of deviations SSt	The total variance Vt	The variance explained Ve	Residual variance Vr	Experimental error (pure error)	Fit error (lack of fit)	MS I <sub>LOF</sub>	MS <sub>PE</sub>	Experimental F= MS <sub>REG</sub> /MS <sub>R</sub>	F= MS <sub>LOF</sub> /MS <sub>PE</sub>
	ΡΑ	0.256	41.815	5.000	2.747	0.329	3.076	0.513	2.747	0.066	0.011	0.318	0.106	0.005	41.815	19.800
source	PI	0.188	50.660	5.000	1.790	0.177	1.966	0.328	1.790	0.035	0.008	0.169	0.056	0.004	50.660	13.876
Plant s	PE	0.192	52.553	5.000	1.937	0.184	2.122	0.354	1.937	0.037	0.010	0.174	0.058	0.005	52.553	11.315
	PC	0.214	48.994	5.000	2.234	0.228	2.462	0.410	2.234	0.046	0.012	0.216	0.072	0.006	48.994	12.031
a	ΡΑ	0.307	29.621	5.000	2.796	0.472	3.268	0.545	2.796	0.094	0.033	0.439	0.146	0.016	29.621	8.951
source	PI	0.221	30.525	5.000	1.493	0.244	1.737	0.290	1.493	0.049	0.019	0.225	0.075	0.010	30.525	7.734
nimal	PE	0.212	38.899	5.000	1.745	0.224	1.969	0.328	1.745	0.045	0.020	0.204	0.068	0.010	38.899	6.810
A	PC	0.247	33.173	5.000	2.021	0.305	2.325	0.388	2.021	0.061	0.037	0.268	0.089	0.018	33.173	4.866

Table 7: statistical tests of regression, Fisher test for phospholipid analysis by HPLC/ELSD.

In order to calculate the lack of fit of our model, it is important to know that the total variation of Y is decomposed into the sum of squares due to regression  $SS_{REG}$ , and the residual variation  $SS_R$  (residual sum of squares):

#### $SS_T = SS_{REG} + SS_R$ .

The ratio between regression sums of squares  $SS_{REG}$  to the total sums of squares  $SS_T$  represents the coefficient of determination  $r^2 = SS_{REG/} SS_T$ . Therefore, this coefficient is related to the amount of y variance explained by the fitted model.  $SS_R$  can be separated into a component which measures the variation due to pure experimental uncertainly  $SS_{PE}$ , and the sum of squares due to lack of fit  $SS_{LOF}$ .

The lack-of-fit test is performed by comparing the ratio  $F=MS_{LOF}/MS_{PE}$  with the F-distribution at (k-2) and (n-k) degrees of freedom. Another Fisher test based on comparing the ratio  $F=MSS_{REG}/MSS_R$  was made. Results of all these statistical tests performed on both detection methods for a chosen day of manipulation are shown in tables 6, 7. Similar results were reproduced for all experiment days and for the two experiment series.

The first Fisher test  $F=MSS_{REG}/MSS_R$  showed that the explained variance  $MSS_{REG}$  is higher than the residual variance  $MSS_R$ . The second Fisher test  $F=MS_{LOF}/MS_{PE}$  displayed a comparable ratio between the variance due to the lack of fit and the variance due to the experimental error. Results justified the model and demonstrated its efficiency to describe the data because the  $MS_{LOF}$  and  $MS_{PE}$  are comparable [27]. ANOVA test results in table 6, 7 show that a significant amount of the variation of y can be explained by the variation in the independent variable x.

# 3-3- Quantification of phospholipid classes in soybean and egg yolk lecithin:

3-3-1-Phospholipid classes quantification in lecithin as a function of detection methods (ELSD, Corona-CAD<sup>®</sup>)

The response of detectors was studied in this work by injecting PLs class standard mixtures. Two mixtures of four phospholipid classes (PA, PI, PE, PC) were prepared at five concentration levels. One represents the plant extract source and the second the animal extract source. These experiments were reproduced twice on each detector in order to confirm and validate the results provided from the first time of PLs class quantification in the lecithin.

Peak areas, heights, and retention time are measured for each analysis in order to evaluate the influence of the extraction source on the detector response. Quantification results of PLs classes in soybean lecithin and egg yolk lecithin for both ELSD and CAD detections are shown, respectively, in Fig. 24 and Fig. 25. According to experimental data and standard deviation values, we notice that quantification results for PLs classes in egg yolk lecithin samples using ELSD detector are close to quantification results obtained with Corona-CAD detector. Meanwhile, a significant variation in the dosage of phosphatidic acid has been noticed in soybean lecithin when the comparing results between ELSD and CAD. More precisely, a better response is obtained with ELSD detection for PA extract originating from soybean lecithin. Concerning the quantification of the other phospholipid classes in soybean lecithin (PI, PE, PC), no significant difference was observed in quantification results when comparing between the two detection methods.



Figure 24: Quantification of PLs classes in soybean lecithin vs. standards of (A) plant source, (B) animal source.



Figure 25: Quantification of PLs classes in egg yolk lecithin vs. standards of (A) animal source, (B) plant source.

# 3-3-2-Phospholipid classes quantification in lecithin samples according to the extraction sources of PLs standards:



Quantification with Corona-CAD ® detection

Regardless the origin of PLs standards (from plant or animal source), we obtained the same quantification results for all phospholipid classes in soybean and egg yolk lecithin samples. In fact, results of Corona-CAD<sup>®</sup> detector has been taken firstly to quantify all major phospholipid classes existing in the two lecithin samples (soybean and egg yolk) to see whether the variation in composition in term of molecular species between the sources of extraction can influence the results of PLs class quantification in lecithin sample. Fig. 26 shows a comparison of the quantification results of PLs classes that exist in soybean lecithin (A) and egg yolk lecithin (B). The calibration range was built the first time from phospholipid

Figure 26: Quantification of PLs classes in soybean lecithin (A), and in egg yolk lecithin (B) with Corona-CAD® detection.

class standards extracted from plant source. Secondly, the calibration range was established from phospholipid class standards extracted from animal source. Indeed, neither significant variation in the quantification results was observed concerning all phospholipid classes in soybean lecithin (PA, PI, PE, PC), nor in phospholipid classes in egg yolk lecithin (PE, PC) depending on the source of extraction.



Quantification with ELSD detection

Similar results were obtained with ELSD detection. As we can see in Fig. 27, the quantity of PLs classes in soybean lecithin (plant source) by establishing a calibration range of PLs class standards derived from plant or animal origin did not show a significant difference in all PLs class quantification results (PA, PI, PE, PC). In conclusion, using a calibration range from PLs class standards derived from plant or animal sources did not produce any significant variation to quantify PLs classes (PE, PC) in egg yolk lecithin samples using ELSD detection.

#### 3-3-3- Study of peak geometry:

It has been shown that the variation of composition in term of molecular species between PLs class standards following their extraction source did not show any significant variation in quantification results. It has been shown also using both ELSD, Corona-CAD<sup>®</sup> detection methods in order to quantify PLs classes in the lecithin sample that the dosage of PA in soybean lecithin shown a significant variation when it is compared between the two detection methods while all other PLs classes in soybean

Figure 27: Quantification of PLs in soybean lecithin (A), and in egg yolk lecithin (B) with ELSD detection.

lecithin (PE, PI, PC) and all the major PLs classes in egg yolk lecithin did not show this variation. Furthermore, it is not the only factor to be regarded. The geometry of chromatographic peaks is probably affected, variation in heights, width and areas are observed when we compare the peak forms between the two detection methods. According to our results, the response of both detectors differs in terms of chromatographic peak form. It should be noted that the molecular species composition in a given PLs class extracted from various sources is not the same. This can explain the difference in peak geometry. An increase in peak areas and heights was observed with ELSD detector compared to Corona-CAD for the same concentration level of all PLs classes in PLs standards mixture, or lecithin samples (Fig. 19).

#### Chromatographic peak parameters calculation:

To evaluate the peak geometry, we calculated the parameters that describe the chromatographic peak based on Foley and Dorsey work [28]. For this, data were processed using R language. For each chromatogram, the retention time  $t_R$ , the symmetry 'As' or 'B/A', the number of theoretical plates 'N<sub>sys</sub>', the peak height 'h<sub>MAX</sub>', the peak width at 10% 'W<sub>0.10</sub>', the exponentially modified Gaussian 'EMG' parameters: the exponential modifier '**t**', the retention time 't<sub>G</sub>', the standard deviation ' $\sigma_G$ ', the maximum efficiency 'N<sub>MAX</sub>', the peak area 'M<sub>0</sub>', the first second third and fourth central moment M<sub>1</sub>,  $\overline{M}_2$ ,  $\overline{M}_3$ , and  $\overline{M}_4$ .were calculated after baseline correction. And finally, the area of the EMG peak was calculated based on the following equation:

$$A_{EMG} = 0.586 \, h_{MAX} \, w_{10\%} \left(\frac{B}{A}\right)^{-0.133}$$

After recording all these parameters for calibration ranges and for samples, we sought to find what would be the peak area of a given PLs class if the chromatographic peak had the same geometry as the peaks of the calibration range. This part of work was realized on PC, PE and PI classes. Then, the ratio between the area of a given PLs class peak considering the asymmetry of the calibration range  $A'_{EMG}$  to its area before correction  $M_0$  was calculated. Ratios between corrected peak areas on both DEDL and Corona-CAD were also evaluated.

Table 8: The ratio between the area of a PLs class peak considering the asymmetry of the calibration range to the areas before correction for both detectors DEDL and Corona-CAD and the ratios between corrected peak areas on both DEDL and Corona-CAD.

PLs classes and detector type	$A'_{EMG}/M_0$	Standard deviation	$\frac{A'_{EMG_{DEDL}}}{A'_{EMG_{Corona} - CAD}}$	Standard deviation	
PC Corona-CAD	0.7991	0.0662	1 6692	0.6610	
	0.8888	0.0514	1.0082	0.0010	
PC DEDL	1.2514	0.4093	1 6 2 8 7	0 4272	
	1.1266	0.2501	1.0287	0.4373	
PE Corona-CAD	0.3607	0.2687	1 25 49	0.4010	
	0.7845	0.0553	1.2548	0.4919	
PE DEDL	2.0229	1.5477	1 2262	0.2615	
	1.9861	0.7352	1.2303	0.3615	
PI Corona-CAD	0.5125	0.0486	1 1 4 2 5	0.4600	
	0.6397	0.0095	1.1425	0.4009	
PI DEDL	1.3567	0.4256	1 2081	0.1626	
	1.5045	0.4162	1.2981		

#### **References:**

- 1. Jia, L., et al., *Metabolomic identification of potential phospholipid biomarkers for chronic glomerulonephritis by using high performance liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **860**(1): p. 134-40.
- 2. Satoshi, K., et al., *Possible utilization of the pearl oyster phospholipid and glycogen as a cosmetic material.* Dev. Food Sci., 2004. **42**: p. 179–190.
- 3. Huiyi, W., et al., *Combined use of phospholipid complexes and self-emulsifying microemulsions for improving the oral absorption of a BCS class IV compound, baicalin* Acta Pharm, 2014. **4**(3): p. 217–226.
- 4. Wang, Q., et al., *Structural characterization of novel phospholipid lipid nanoparticles for controlled drug delivery.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **84**(2): p. 406-12.
- 5. Peng, Q., et al., *A rapid-acting, long-acting insulin formulation based on a phospholipid complex loaded PHBHHx nanoparticles.* Biomaterials, 2011. **33**(5): p. 1583-8.
- 6. Park, K.M., et al., *Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process.* Int J Pharm, 1999. **183**(2): p. 145-54.
- 7. Diaz-Lopez, R., et al., *Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector.* J Pharm Biomed Anal, 2008. **48**(3): p. 702-7.
- 8. Peterson, B.L. and B.S. Cummings, *A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples.* Biomed Chromatogr, 2006. **20**(3): p. 227-43.
- 9. Ohkawa, R., et al., *Development of an enzymatic assay for sphingomyelin with rapid and automatable performances: Analysis in healthy subjects and coronary heart disease patients.* Clin Biochem, 2012. **45**(16-17): p. 1463-70.
- 10. Morita, S.Y., et al., *Enzymatic measurement of phosphatidylserine in cultured cells*. J Lipid Res, 2012. **53**(2): p. 325-30.
- 11. Hokazono, E., et al., *Enzymatic assay of phosphatidylethanolamine in serum using amine oxidase from Arthrobacter sp.* Clin Chim Acta, 2011. **412**(15-16): p. 1436-40.
- 12. Becart, L., C. Chevalier, and J.P. Biesse, *Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light scattering evaporating detector application to raw materials for cosmetic use.* Sep. Sci., 1990. **13**(2): p. 126–129.
- 13. Arnoldsson, K.C. and P. Kaufmann, *Lipid class analysis by normal phase high performance liquid chromatography, development and optimization using multivariate methods.* Chromatographia, 1994. **38**(5-6): p. 317-324.
- 14. Benedikt, S.U., E. PEYS, and M. HELSEN, *Efficient method for (lyso)phospholipid class separation by high-performance liquid chromatography using an evaporative light-scattering detector.* J. Chromatogr. A, 1999. **864**(1): p. 179-182.
- 15. Deschamps, F.S., et al., Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. J Chromatogr A, 2001. **928**(2): p. 127-37.
- 16. Graeve, M. and D. Janssen, *Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: application to exceptional marine lipids.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(20-21): p. 1815-9.
- 17. Homan, R. and M.K. Anderson, *Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **708**(1-2): p. 21-6.

- 18. Sala Vila, A., et al., *High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids.* J Chromatogr A, 2003. **1008**(1): p. 73-80.
- 19. Christie, W.W., *Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection.* J Lipid Res, 1985. **26**(4): p. 507-12.
- 20. Charlesworth, J.M., *Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography.* Anal. Chem., 1978. **50**(1414-1420).
- 21. Dixon, R.W. and D.S. Peterson, *Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging.* Anal. Chem., 2002. **74**(13): p. 2930-7.
- 22. Heron, S., et al., *Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporative light-scattering detector.* J Chromatogr A, 2007. **1161**(1-2): p. 152-6.
- 23. Scholfield, C.R., *Composition of soybean lecithin*. J AM OIL CHEM SOC, 1981. **58**(10): p. 889-892.
- 24. Kalambet, Y., et al., *Reconstruction of chromatographic peaks using the exponentially modified Gaussian function.* J Chemometr, 2010. **25**(7): p. 352-356.
- 25. Ramos, G.R., et al., *Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids.* J Chromatogr A, 2008. **1209**(1–2): p. 88-94.
- 26. CHARLOT, G., *Statistiques appliquées à l'exploitation des mesures, 2ème édition*. Exposé pratique illustré d'exemples concrets, ed. Cetama-MASSON. 1986: Cetama-MASSON. page 80.
- 27. Vandeginstr, B.G.M., et al., *DATA HANDLING IN SCIENCE AND TECHNOLOGY*. Handbook of chemometrics and qualimetrics ed. E. Science. Vol. 20A. 1997: Elsevier Science. 180-186.
- 28. Foley, J.P. and J.G. Dorsey, *Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks*. Anal. Chem., 1983. **55**(4): p. 730-737.

#### **CONCLUSION DU PREMIER ARTICLE :**

Ce travail fournit une étude comparative par NP-CLHP avec deux différents modes de détection : un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière ou DEDL, et un détecteur à aérosol chargé (Corona-CAD<sup>®</sup>), pour l'identification et la quantification des classes phospholipidiques dans les échantillon biologiques/naturels.

Dans ce travail, en utilisant chromatographie liquide en phase normale avec la phase stationnaire de PVA-Sil et un gradient d'élution de 44 minutes, nous avons réalisé la séparation complète de quatre classes de PLs dans la lécithine de soja allant de l'acide phosphatidique ayant une faible polarité jusqu'à la phosphatidylcholine, le PLs le plus polaire dans notre étude (sur la base de différences de polarité dans les groupes de tête). De même, deux classes de PLs dans la lécithine de jaune d'œuf ont été séparées et quantifiées.

Les valeurs observées pour le coefficient de détermination dans le cas de deux des détecteurs ont confirmé la linéarité de la méthode. Tous les tests statistiques ont été réalisés au niveau intermédiaire de la gamme d'étalonnage dans le cas du mélange des standards et aussi ont été appliqué sur les échantillons de la lécithine. Cette comparaison des deux méthodes de détection a donné des valeurs similaires pour les paramètres de validation évalués sur les deux détecteurs, avec une préférence pour le détecteur Corona-CAD.

En regardant le test de Fisher F=MSS<sub>REG</sub>/MSS<sub>R</sub>, nous avons trouvé que la variance expliquée MSS<sub>REG</sub> est plus élevée que la variance résiduelle MSS<sub>R</sub>. De même, à partir d'autre test de Fisher F=  $MS_{LOF}$  /  $MS_{PE}$ , nous avons vu que le rapport entre la variance due à la manque de l'ajustement et la variance due à l'erreur expérimentale est comparable. L'ensemble de ces résultats a évidemment montré que notre modèle est justifiée et suffisamment efficace pour décrire les données. Les résultats de ANOVA ont montré également qu'une quantité significatif de la variation de y peut être expliquées par la variation de la variable indépendante x.

Ainsi, cette étude a permis la quantification des phospholipides dans la lécithine à partir des standards lipidiques de sources variées par deux modes universels de détection.

Pour étudier la relation entre les concentrations de PLs et la réponse de détecteurs représentés par l'aire des pics, le modèle puissance a été évalué. La transformation classique log-log de la concentration et de l'aire des pics a été préférée à la régression puissance.

La quantification des classes phospholipidiques dans les échantillons de la lécithine (La lécithine de soja et la lécithine de jaune d'œuf) a été comparée en fonction des sources des standards utilisés. De même, cette quantification a été comparée en fonction de la méthode de détection.

Les résultats expérimentaux trouvés montrent que la quantification de PE et PC dans la lécithine de jaune d'œuf n'a pas montré de différence lorsque ces résultats sont comparés entre les deux méthodes de détection. D'un autre côté, une variation significative de dosage de l'acide phosphatidique a été remarquée dans la lécithine de soja lorsque les résultats sont comparés entre DEDL et Corona-CAD. Plus précisément, nous avons trouvé une quantité plus élevé lors de l'utilisation de la détection DEDL. En ce qui concerne la quantification des autres classes de PLs dans la lécithine de soja (PI, PE et PC), il n'y a pas vraiment de différence significative dans les résultats de quantification lors de la comparaison entre les deux méthodes de détection.

Par ailleurs, nous n'avons pas remarqué une variation significative des résultats de quantification concernant toutes les classes de PLs dans la lécithine de soja (PA, PI, PE et PC), ou concernant les classes de PLs dans la lécithine de jaune d'œuf (PE et PC) en fonction de la source d'extraction des standards. Quelle que soit l'origine des standards (source végétale ou animale), les résultats de quantification étaient identiques toutes les classes de PLs.

Les méthodes proposées dans cette publication peuvent être utiles pour quantifier les classes phospholipidiques dans les échantillons naturelles/biologiques.

### Chapitre 3

#### Article N° 2:

# A study of inter-species ion suppression in electrospray mass spectrometry of some phospholipid classes

Journal de « Analytical and Bioanalytical Chemistry » Ananl.Bioanal.Chem

February 2016, Volume 408, Issue 5, pp 1453-1465.

DOI:10.1007/s00216-015-9245-6.

#### **INTRODUCTION ARTICLE N°2 :**

Le premier article a abordé l'aspect quantitatif des classes de PLs dans les échantillons biologiques/naturels en utilisant les standards lipidiques de sources variées. Deux types de détections ont été utilisés, le DEDL et le Corona-CAD<sup>®</sup>. Les performances de ces deux méthodes de détection ont été comparées pour l'analyse quantitative des classes de PLs. Ces modes de détection montrent une réponse dite « universelle ».Ces détecteurs ne présentent pas de phénomènes de suppression d'ion, ils sont compatibles avec les systèmes solvants complexes utilisés dans le domaine de l'analyse des PLs. Ce système nécessite un programme de gradient d'élution pour atteindre la séparation complète des classes lipidiques.

Comme l'objectif de la première publication était de quantifier l'ensemble des classes lipidiques, le choix de l'utilisation de détecteurs « universels » ou détecteurs par nébulisation a été effectué. Par ailleurs, La quantification des PLs peut faire appel aussi à la spectrométrie de masse quand une faible limite de détection ou des informations structurales sont demandées.

En analyse lipidomique, comme mentionné dans la publication 1, l'étalonnage est souvent basé sur l'utilisation de standards de classes de PLs. Ces derniers ont la particularité d'être des extraits de PLs d'une classe donnée provenant de sources d'origine différente, animale ou végétale. Il s'agit donc de standards par classe phospholipidique et non pas par espèce. Les études sont menées normalement en NP-CLHP couplé à la spectrométrie de masse pour séparer des classes lipidiques et en RP-CLHP pour séparer les espèces moléculaires. En NP-CLHP, le couplage à la MS permet d'analyser des espèces contenues dans chaque classe et peut fournir des informations structurales.

Cette analyse bidimensionnelle LC-MS permet d'accéder à des informations supplémentaires des molécules sauf que la co-élution de plusieurs espèces moléculaires conduit au phénomène de suppression d'ion. Le but de ce travail est d'étudier le phénomène de suppression d'ion entre-espèce de PLs par l'usage deux types d'analyseur, TQ et LTQ-Orbitrap dans l'objectif final d'améliorer la quantification des PLs dans les échantillons biologiques/naturels.

En NP-CLHP couplé à la spectrométrie de masse, des phénomènes de suppression d'ionisation peuvent modifier la réponse des solutés, et la réponse des espèces d'une même classe phospholipidique peut diminuer en mélange par rapport à la réponse de l'espèce seule.

Chaque classe phospholipidique renferme différentes espèces moléculaires. Une espèce phospholipidique se caractérise par une combinaison spécifique de longueur des chaînes carbonées et de degré d'insaturation des deux acides gras, conférant ainsi des fonctions spécifiques à chaque espèce phospholipidique.

La source d'ionisation electrospray (ESI) est la technique préférée et largement décrite dans la littérature pour ioniser les PLs. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'ESI est une technique d'ionisation dite « douce » qui s'utilise préférentiellement pour des molécules à caractère polaire comme c'est le cas de PLs.

La réponse des espèces moléculaires de PLs en spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-SM) est variée. Les molécules en SM ne sont pas détectées avec la même efficacité. Le rendement d'ionisation ou la réponse de SM dépend de nombreuses caractéristiques structurelles des analytes tels que la longueur de chaîne, le nombre et la position des insaturations et la tête polaire. Ce travail a mis en évidence ces effets en utilisant un spectromètre de masse triple quadripôle (TQ) et LTQ-Orbitrap.

Toutes ces analyses ont été faites en Analyse par Injection en Flux Continu, plus couramment désignée par les initiales « FIA » de l'anglais Flow Injection Analysis. L'étude en mode full scan négatif sur le TQ et sur le LTQ-Orbitrap de l'effet de la structure des PLs sur leur quantification en ESI-MS est réalisée sur 20 espèces de la classe phosphatidylcholine PC. L'effet de la tête polaire est étudié sur les PC, PE, PI et PA saturés à 8 carbones. Dans un premier temps, ces effets ont été étudiés pour chaque espèce seule à partir des gammes d'étalonnage avec une concentration molaire allant de 2.5 à 250 pmol/µL. Ensuite les gammes des 20 espèces des PCs sont analysées en mode MS/MS sur les deux appareillages pour vérifier les résultats obtenus en full scan. En complément, d'autres modes MS/MS ont été utilisés pour mieux comprendre l'effet des chaînes d'acides gras après perte de la tête polaire sur les PC.

En Triple Quadripôle, nous avons utilisé le mode précurseur d'ions en ionisation positive, où tous les PCs présentent une perte de tête polaire [phosphocholine]<sup>+</sup> de m/z =184. En LTQ-Orbitrap, nous avons essayé le mode full scan positif, MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup> Data Dependent.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mélanges intraclasse (les espèces de PC) à différentes concentrations en mode full scan négatif sur le TQ et le LTQ-Orbitra

### A study of inter-species ion suppression in electrospray mass spectrometry of some phospholipid classes

Spiro Khoury<sup>1#</sup>, Nadine El Banna<sup>1#</sup>, Sana Tfaili<sup>1\*</sup> and Pierre Chaminade<sup>1</sup>

<sup>#</sup>Both authors contributed equally to this work

\*Corresponding author: <a href="mailto:sana.tfaili@u-psud.fr">sana.tfaili@u-psud.fr</a>

<sup>1</sup>Lip(Sys)<sup>2</sup>- Chimie Analytique Pharmaceutique<sup>§</sup>, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92290 Châtenay-Malabry, France.

<sup>§</sup>(FKA EA4041 Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud)

#### Abstract:

Phospholipid quantification in biological samples is crucial and is increasingly studied in lipidomics. Quantitative studies are often performed using commercially available standards of phospholipid classes in order to mimic the composition of biological samples. For this, studies are conducted by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. In LC-MS analysis, the matrix components and the co-elution of several phospholipid species lead to the phenomenon of ion suppression. As a result, a decrease in the response of phospholipid species in mass spectrometry MS is observed. In fact, interspecies ion suppression affects the efficiency of PLs ionization and might also influence the quantitative results. The aim of this work is to study the PLs inter-species ion suppression phenomenon in ESI-mass spectrometry on a triple quadrupole TQ and an LTQ-Orbitrap in order to improve quantification in natural and biological samples. Thus, the phospholipids MS response was evaluated to study the effect of acyl chain length, the degree and the position of unsaturation on acyl chain and the effect of the polar head group structure. A number of saturated and unsaturated phospholipid species and mixtures were analyzed in different ionization modes to a better understanding of inter-species ion suppression phenomenon. PLs molecular species responded differently according to the length of fatty acid chains, the number of unsaturation and the nature of the polar head group. Fatty acid chains length showed to have the most marked effect on MS response.

#### **Keywords:**

Electrospray ionization, mass spectrometry, phospholipids, quantification, ion suppression

#### Introduction:

Phospholipids (PLs) are a major component of biological membranes and have an essential role in cell membrane functions [1]. Because of their physiological occurrence, the use of PLs is growing in pharmaceutical industry and PLs studies became an attractive research field [2, 3]. The qualitative and quantitative analyses of PLs in biological samples are generally based on the use of standards of PLs classes. These compounds are an extract from animal or plant sources of a specific PLs class. Each standard of PLs classes contain several species of the same PLs class. Species are characterized by a combination of the length of the acyl chains and the degree of unsaturation of fatty acids (FA). The two FA chains attached to the first and second carbons of the glycerol molecule refer to the sn1 and sn2 positions, respectively. Classes are defined according to the polar head group.

High performance liquid chromatography (HPLC) allows the separation of classes in normal phase and of species in reverse phase. Chromatographic analysis of lipids involves the use of universal detectors such as Corona-CAD<sup>®</sup> and ELSD or mass spectrometry [4]. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) is widely used for sensitive detection and quantification purposes of PLs [5, 6]. Mass spectrometry (MS) is characterized by its selectivity and high sensitivity [7]. One additional advantage stands in its applicability to different sample types in clinical and biological research fields [8].

Despite the advantages provided by MS, quantification can be affected by the ion suppression [9]. This phenomenon occurs in electrospray ionization (ESI) mode due to the composition of the matrix or to the presence of potentially ionizable compounds in the samples. The ion suppression is much more severe with ESI than atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [10, 11].

It has been revealed that molecules of higher mass suppress the signal of smaller ones and that polar analytes are more disposed to suppression [11, 12]. Beside the composition of the matrix, co-eluting compounds can also contribute to this phenomenon as well as the mass and the charge of analytes. When ion suppression occurs, equimolar molecular species are not detected with equal efficiency, leading to an under/over-estimation of analyte quantification [13, 14].

A previous study by Koivusalo *et al.* [14] on PLs standard mixtures infused to an electrospray source and analyzed using both ion trap and quadrupole analyzers, showed that mass spectrometry response depends on the acyl chain length, the unsaturation degree, the polar head group and the concentration of PLs molecular species. Another study realized on phosphatidylcholine PC molecular species standards, using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOF-MS) in positive mode, showed also that the response increases with the decrease of the acyl chain length (between PC26:0 and PC36:0) for the same molecular species concentration [15].

However, more details concerning the influence of PLs molecular species structure on mass spectrometry response remain to be revealed. Assessment of the influence of PLs structure on instrument response can lead to a better understanding of PLs inter-species ion suppression. Therefore, the aim of this work is to improve PLs quantification in biological and natural samples conducted by ESI-MS. For this, the effect of the chain length of PLs molecular species, the number and the position of unsaturation on instrument response are studied at different concentration levels, and in different preparations. The effect of the polar head of PLs classes was also considered. Finally, ion suppression phenomenon between PLs molecular species has been highlighted.

#### Materials and methods:

#### 1- Phospholipids and chemicals:

Twenty molecular species standards of phosphatidylcholine PC were used to study the structural effects of PLs on their quantification in ESI-MS by TQ and LTQ-Orbitrap in full scan negative and positive ion mode. Effects related to the polar head were studied on saturated PA, PI, PE, and PC with 8 atoms of carbon. Thus, saturated and unsaturated molecular species of phosphatidylcholine (PC): 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine PC(12:0/12:0) (DLPC), PC(14:0/14:0) (DMPC), PC(16:0/16:0) (DPPC), PC(8:0/8:0), PC(18:0/18:0) (DSPC), PC(20:0/20:0), PC(22:0/22:0), PC(24:0/24:0), PC(14:0/16:0), PC(16:0/18:0), PC(18:0/14:0), PC(14:0/18:0), PC(16:0/18:1(9Z)), PC(16:0/18:2(9Z,12Z)), PC(18:0/18:1(9Z)), PC(18:0/18:2(9Z,12Z)), PC(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) (DLPC), PC(18:1(6Z)/18:1(6Z)), PC(18:1(9Z)/18:1(9Z)) (DOPC);

saturated phosphatidic acid molecular specie 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt) PA(8:0/8:0); saturated phosphatidylethanolamine molecular specie 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine PE(8:0/8:0); and saturated phosphatidylinositol 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol) (ammonium salt) PI(8:0/8:0) were purchased from Avanti Polar Lipids, INC-COGER (Paris, France) with a purity > 99%. HPLC grade water and chloroform were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Triethylamine (TEA, analytical reagent grade, 99.5%), acetic acid (LC-MS grade) and n-heptane (HPLC grade, ≥99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Methanol was from Sigma-Aldrich (FLUKA-HPLC grade). 2-propanol (ULC-MS grade) was from Biosolve (Dieuze, France).

#### 2- PLs molecular species solutions preparation:

All PLs molecular species standards were initially prepared in chloroform at the concentration of 5 g/L. After dilution, a calibration range with five concentration levels (250; 100; 50; 10 and 2.5 pmol/ $\mu$ L) was prepared. The lowest value of the calibration curve was set at 2.5 pmol/ $\mu$ L as it corresponds to the less favorable LOQ value among the studied PLs species (for 5  $\mu$ L injected solution). Those values were measured as ten times the S/N ratio as recorded with TQ spectrometer (the same samples achieved S/N ratio of more than 10 with the LTQ-Orbitrap spectrometer). Taking into consideration the results of species responses, two mixtures of PC molecular species were used. Preparations are not supplemented with acetic acid, or ionic modifiers.

#### 3- Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) for TQ and LTQ-Orbitrap:

Experiments were carried out on API 3000 triple quadrupole instrument (Sciex, Toronto, Canada) and a LTQ-Orbitrap Velos pro (Thermo Scientific, Waltham, USA). Several ionization modes were applied including full scan negative ion mode and precursor ion scanning in positive ion mode in TQ. For LTQ-Orbitrap, full scan negative and positive ion mode were purchased.

**3-1- TQ:** With the triple quadrupole instrument, a Turbo Ion Spray ESI ion source was used (Artisan Scientific). The mass range was set between 100-1500 uma. Parameters were optimized and are defined in table 9. Experiments were led in full scan negative ion mode

and in precursor ion scanning with positive ion mode. For ion positive mode, collision energy was of 40eV and collision gas of 3. TQ results are processed using Analyst<sup>®</sup> software (Analyst 1.4.2 Sciex).

 Table 9: Parameters set for TQ analyses.

Heated ESI Source						
Source temperature (C)	290					
Spray voltage (KV)	-4					
Curtain gas: Nitrogen N2 (arb)	7					
Nebulizer gas: compressed air (arb)	6					
Scan time (s)	2.4					
Ion Optics						
Declustering potential DP (V)	-40					
Focusing potential FP (V)	-400					
Entrance potential EP (V)	-10					

**3-2- LTQ-Orbitrap:** For LTQ-Orbitrap, an electrospray ionization source was used. The scanned range covered m/z from 250 to 1500 uma. Experiments were done in negative and positive ionization modes. For full scan negative ion mode, parameters are set as defined in table 10.

Heated ESI Source						
Heater Temp (C)	300					
Sheath Gas Flow Rate (arb)	50					
Aux Gas Flow Rate (arb)	15					
Sweep Gas Flow Rate (arb)	0					
I Spray Voltage (KV)	3,3					
Capillary Temp (C)	350					
S-Lens RF Level (%) 60						
Ion Optics						
Multipole 00 Offset (V)	2					
Lens 0 Voltage (V)	3					
Multipole 0 Offset (V)	9					
Lens 1 Voltage (V)	15					
Multipole 1 Offset (V) 20						
Multipole RF Amplitude (V pp) 8						
Front Lens (V)	8,5					

 Table 10: Parameters set for LTQ-Orbitrap analyses in full scan negative ion mode.

For positive ionization, full scan mode was used and PC class was studied. For LTQ-Orbitrap, results were processed using Xcalibur<sup>®</sup> software (Thermo Xcalibur 2.2).

#### 4- Flow Injection Analysis (FIA):

Triple quadrupole mass spectrometry was coupled with a chromatographic system including an Agilent 1260 quaternary gradient HPLC pump (Agilent, Santa Clara, USA) and an Hewlett Packard 1050 autosampler (Agilent). Whereas, LTQ-Orbitrap mass spectrometry was coupled with ultra-high pressure liquid chromatography system composed of a Dionex U-3400 quaternary pump (Thermo Scientific) and a Dionex WPS3000 autosampler. All analyses were carried out in FIA (without any chromatographic column), using a capillary generating a pressure about 29 Bar in TQ and 20 Bar in LTQ-Orbitrap. The flow rate was set to 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. A volume of 5  $\mu$ L was injected for 3 minutes of run. The mobile phase was optimized based on previous work of Godoy-Ramos *et al.* [16]; and consisted of 6.4% nheptane, 48.9% chloroform, 26.4% isopropanol, 17.4% methanol, 0.9% H<sub>2</sub>O, 1% acetic acid and 0.08% TEA.

#### **Results:**

Generated ions depend on the PLs class. While for PC, the major ion is the acetate adduct; PA, PE and PI have [M-H]<sup>-</sup> as major ion in full scan negative ion mode. Other produced ions differ also between PLs classes.

In full scan negative ion mode, phosphatidylcholine ionization shows three ions. The major ion results from the addition of an acetate group to PC forming the [PC+OAc]<sup>-</sup> adduct, m/z=[M+59]<sup>-</sup>. The second is the chloride adduct [PC+Cl]<sup>-</sup>, m/z=[M+35]<sup>-</sup> and the third ion is formed by demethylation of the choline group [PC-CH3]<sup>-</sup>, m/z=[M-15]<sup>-</sup>. Comparison to define data processing method was realized on PC species with short chains (8 to 16 carbons), considering the major ion intensity and the sum of all ion intensities.

The signal in LTQ-Orbitrap was more intense than in TQ. For example, the S/N ratio recorded for PC(8:0/8:0) at the 2.5 pmol/µL concentration is about 20 when considering the acetate adduct with the TQ instrument and about 350 with the LTQ-Orbitrap. For LTQ-Orbitrap, as shown in Fig. 28A, acetate adduct intensities (main adduct) were the same for all PC species whatever is the concentration level of the calibration range. Chloride adduct (Fig. 28B) was more expressed for PC(8:0/8:0) and desmethyl ion (Fig. 28C) for PC(12:0/12:0). The response of [PC+CI]<sup>-</sup> and [PC-CH3]<sup>-</sup> was twice to ten times less than the response of the major ion. When calculating the sum of ion intensities for the different PC species (Fig. 28D), the overall

response of PC(8:0/8:0) and PC(12:0/12:0) appears to be slightly higher than for PC(14:0/14:0) and PC(16:0/16:0).

For TQ, as displayed in Fig. 29, the obtained trends are noticeably different from LTQ-Orbitrap. Indeed, the intensities of PC(8:0/8:0) for acetate adduct and desmethyl ion were significantly higher than PC with chains of 12 to 16 carbons (Fig. 29A, 29C). The PC(12:0/12:0) showed a higher intensity for chloride adduct (Fig. 29B). However, the chloride adduct and the desmethyl ion represented barely one tenth of the acetate adduct intensity. As a consequence, the same results are obtained if data processing is realized considering the major ion intensity (acetate adduct) or if considering the sum of all major ion intensities in TQ (Fig. 29A, 29D).

No inter-class difference was observed between the major ion intensity or the sum of all major ion intensities (data not shown). Regarding the signal difference of produced ions between TQ and LTQ-Orbitrap, between classes, and within the same species in negative ion mode; we considered the intensity of major ion for data processing.

In positive ion mode, phosphatidylcholine forms two major ions, protonated PC  $[PC+H]^+$ ,  $m/z=[M+1]^+$  and the  $[PC+TEA+H]^+$  adduct,  $m/z=[M+102]^+$ . Relative abundance for these ions differs between TQ and LTQ-Orbitrap. Experiences realized with LTQ-Orbitrap on PC species in full scan mode showed that the  $[PC+H]^+$  is the major ion, whereas with TQ,  $[PC+TEA+H]^+$  was the major adduct. Produced ions for the PC species used in this study are listed in table 11.

Working with the sum of intensities could induce some variability due to a more expressed ion for specific specie. For example, the PC(8:0/8:0) chloride adduct could false quantitative results within PC species (Fig. 28B). In addition, the number of major adducts differs between classes. Considering the sum would give more weight for a given class and could false quantitative results.



**Fig. 28** Comparison of intensities between adducts for saturated PC species with short chains from 8 to 16 carbons at different concentration levels in LTQ-Orbitrap tuned to full scan negative ion mode. **A**: [PC+OAc]<sup>-</sup>, **B**: [PC+CI]<sup>-</sup>, **C**: [PC-CH3]<sup>-</sup> and **D**: sum of intensities of major adducts.



**Fig. 29** Comparison of intensities between adducts for saturated PC species with short chains from 8 to 16 carbons at different concentration levels in TQ tuned to full scan negative ion mode. **A**: [PC+OAc]<sup>-</sup>, **B**: [PC+CI]<sup>-</sup>, **C**: [PC-CH3]<sup>-</sup> and **D**: sum of intensities of major adducts.

	m/z of major ions forme	n	egative full sca	positive full scan			
			[PC+OAc]	[PC+CI] <sup>-</sup>	[PC-CH3]	[PC+TEA+H] <sup>+</sup>	[PC+H] <sup>+</sup>
	PC(8:0/8:0)	509.614	568	494	544	611	510.34
	PC(12:0/12:0)	621.826	680	656	606	723	622.42
	PC(14:0/14:0)	677.933	736	712	663	780	678.51
	PC(16:0/16:0)	734.039	793	769	—	836	734.59
	PC(18:0/18:0)	790.145	849	825	—	892	790.59
	PC(20:0/20:0)	846.252	905	881	—	948	846.68
	PC(22:0/22:0)	902.358	961	937	—	1004	902.85
	PC(24:0/24:0)	958.464	1017	993	—	1060	958.85
	PC(14:0/16:0)	705.986	764	740	—	807	706.56
cies	PC(16:0/18:0)	762.092	821	797	—	836	762.56
pe	PC(18:0/14:0)	734.039	793	769	—	836	734.59
S	PC(14:0/18:0)	734.039	793	769	—	836	734.59
	PC(16:0/18:1(9Z))	760.076	819	795	—	862	760.59
	PC(16:0/18:2(9Z,12Z))	758.06	817	793	—	862	758.59
	PC(18:0/18:1(9Z))	788.129	847	823	—	890	788.59
	PC(18:0/18:2(9Z,12Z))	786.113	845	821	—	888	786.59
	PC(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	782.082	841	817	—	883	782.59
	PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))	782.082	841	817	—	883	782.59
	PC(18:1(6Z)/18:1(6Z))	786.113	845	821	—	888	786.59
	PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))	786.113	845	821	_	888	786.59

Table 11 m/z of main PC ions produced by positive and negative full scan ion modes

#### 1- Phosphatidylcholine structure effect on MS response:

#### 1-1- Assessment of fatty acids chain length on the response intensity of PLs

For TQ, data are recorded on saturated PC species in full scan negative ion mode and precursor ion scanning in positive ion mode. For LTQ-Orbitrap, data are registered in full scan negative and positive ion modes. PC molecular species with different chain length are analyzed at different concentration levels. Results showed that the MS response decreases when the number of carbon atoms increases. The effect of fatty acid chain length on the response intensity of PC is more pronounced with high concentrations (Fig. 30A, 30B, 30C, 30D). It should be noted that in positive ion mode, the major ion differed between TQ and LTQ-Orbitrap as mentioned in the introductive part of our results. Therefore, the ratio of the intensity of the major ion from PC(8:0/8:0) and PC(24:0/24:0) between the concentrations of 2.5 and 250 pmol/µL was evaluated and is presented in table 12. The response of the PC(8:0/8:0) across the concentration range was substantially higher than the signal of

PC(24:0/24:0) for all ionization modes. For TQ, the values of this ratio was from 2  $\sim$  4 in negative mode, and from 1  $\sim$  7 in positive mode. In LTQ-Orbitrap, the values go from 1  $\sim$  3 in negative mode, and from 9  $\sim$  19 in positive mode (table 12).



**Fig. 30** Intensities of major ion obtained for saturated PC with chains from 8 to 24 carbons at different concentration levels; **A**: negative full scan mode in TQ; **B**: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; **C**: ion precursor mode of 184 in TQ; and **D**: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap.

 Table 12 PC(8:0/8:0) to PC(24:0/24:0) ratios calculated at the different levels of the calibration curve for both instruments with different ionization modes

analyzar	mada	ionization	Ratio PC8:0/PC24:0 at different concentration(pmol/µL)							
analyzer	mode	ionization	250	100	50	10	2.5			
70	Full scan	negative	4.2	3.8	4.2	1.7	1.7			
īų	lon precursor	positive	7.1	4.4	6.8	3.6	1.3			
LTQ-	Full scan	negative	3	2.2	2.6	1.1	0.5			
Orbitrap	Full scan	positive	19	14.8	14.9	19.4	8.6			

#### 1-2- Assessment of PLs intensity depending on the degree of unsaturation

This part of study considered firstly PC molecular species with a total 36 carbons and presenting different degree of unsaturation. The effect of the unsaturation is less pronounced than the effect of the chain length for the studied concentrations (Fig. 31A, 31B and 31D). This effect is mostly noticeable with TQ tuned to precursor ion scanning in positive ion mode (Fig. 31C): the intensity of the major adduct showed that the signal increased with

the number of unsaturation on PC fatty acid chains. The response of PC species containing 4 unsaturations on FA chains such as PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) or PC(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) at the uppermost concentration of 250 pmol/µL is 3 times higher than the response of PC(18:0/18:0). Analysis of PC species containing 18:0 on sn1 and 18:0, 18:1, 18:2 on sn2 showed no significant difference in response when the analyses are realized in full scan negative and positive ion mode in LTQ-Orbitrap and in full scan negative ion mode in TQ (Fig. 31A, 31B and 31D). The analyses conducted with precursor ion scanning in positive ion mode in TQ showed a significant variation (Fig. 31C). Species response increased according to the total number of unsaturation on the two FA chains of the PL. When the degree of unsaturation is identical, no significant differences are seen between species with both saturated and unsaturated FAs (such as PC 18:0 18:2) and species with both FAs unsaturated (such as PC 18:1 18:1).



**Fig. 31** Intensity of major ion of unsaturated PC according to the concentration. A: negative full scan mode in TQ; B: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; C: ion precursor mode of 184 in TQ; and D: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap.

#### 1-3- Assessment of regioisomerism and unsaturation position effects:

The regioisomerism of PLs corresponds to the positional arrangement of FAs on the glycerol backbone. The inversion of fatty acid chains showed no statistically significant variation for the studied concentrations (Fig. 32, 33). The intensity of major ion of PC(18:0/14:0) and PC(14:0/18:0) response showed a slightly higher response in TQ for a shorter chain in sn2 for PC(18:0/14:0) (Fig. 32A). The intensity of major ion for the PC(18:1(6Z)/18:1(6Z)) and PC(18:1(9Z)/18:1(9Z)) showed that the response does not vary according to the unsaturation position on fatty acid chains. At least, a slightly higher response is noted when the unsaturation is next to the polar head in negative full scan mode (Fig. 33A, 33B).



**Fig. 32** PC(18:0/14:0) and PC(14:0/18:0) response and standard deviation according to the concentration in different ionization modes; **A**: negative full scan mode in TQ; **B**: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; **C**: ion precursor mode of 184 in TQ; and **D**: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap.



**Fig. 33** Intensities of major ion of PC(18:1(6Z)/18:1(6Z)) and PC(18:1(9Z)/18:1(9Z)) according to the concentration; **A**: negative full scan mode in TQ; **B**: negative full scan mode in LTQ-Orbitrap; **C**: ion precursor mode of 184 in TQ; and **D**: positive full scan mode in LTQ-Orbitrap.

#### 2- PLs polar head structure effect on MS response:

PLs saturated classes (PA, PI, PE and PC) with 8 carbon chains are evaluated in different ionization modes on TQ and LTQ-Orbitrap. Adducts differ between PLs classes (table 13). In full scan negative ion mode, phosphatidic acid PA forms three major ions. The first is [PA-H]<sup>-</sup>, m/z=[M-1]<sup>-</sup>, the second ion is acetate adduct [PA-H+Na+OAc]<sup>-</sup>, m/z=[M+82]<sup>-</sup>, the third is the dimer [2PA-H]<sup>-</sup>. Phosphatidylethanolamine PE gives two major ions, [PE-H]<sup>-</sup>, m/z=[M-1]<sup>-</sup> and the dimer [2PE-H]<sup>-</sup>. Phosphatidylinositol PI has two major ions [PI-H]<sup>-</sup> m/z=[M-1]<sup>-</sup> and the second ion is the dimer [2PI-H]<sup>-</sup>.

Results of the intensity of major ion using TQ and LTQ-Orbitrap tuned to negative full scan ion mode revealed that the response of PLs molecular species varies depending on the nature of their polar head functional group (Fig. 34A, 34B). Difference is observed for the high concentrations in the calibration range (more than 50 pmol/µL). In the range of 50 ~ 250 pmol/µL, PI(8:0/8:0) provides the highest response, whereas PC has the lowest for both instruments. PE and PA possess an intermediate behavior: they equally respond using the LTQ-Orbitrap, whereas the response of PE is higher than PA in TQ for these concentrations.

species	MM g/mol	m/z list
		<b>[PA-H]</b> <sup>-</sup> , 423.21482
PA(8:0/8:0)	424.22264	[PA-H+Na+OAc] <sup>-</sup> , 505.21791
		<b>[2PA-H]</b> <sup>-</sup> , 847.43747
DI/Q.Q.(Q.Q)		<b>[PI-H]</b> <sup>-</sup> , 585.26767
PI(8:0/8:0)	580.27550	<b>[2PI-H]</b> <sup>-</sup> , 1171.54317
	467 26404	<b>[PE-H]</b> , 466.25702
PE(8:0/8:0)	467.26484	<b>[2PE-H]</b> <sup>-</sup> , 933.52187

Table 13 m/z list of major ions in full scan negative ion mode for PA, PE and PI classes



**Fig. 34** Major ion response of PA, PI, PE and PC 8:0 at different concentration levels in TQ (**A**) and LTQ-Orbitrap (**B**) tuned to full scan negative ion mode.

#### 3- Mutual influence of PLs on their ESI-MS response:

In normal phase liquid chromatography, PLs from the same class co-elute as a single peak. When coupled to mass spectrometry, the ionization of species constituting the chromatographic peak will be affected. In this part of our study, we try to understand the PLs inter-species ion suppression phenomenon.

#### 3-1- Mixture of PLs with important difference in chain length:

As shown in part 1-1, PC(8:0/8:0) provides significantly higher response than PC(24:0/24:0) when injected at the same concentration. In order to appreciate the effect of ion suppression in PLs mixture with important difference in chain length, a mixture of two saturated symmetric PC molecular species having 8 and 24 carbons was analyzed. Three concentration levels are evaluated (10; 50 and 250 pmol/ $\mu$ L).

When comparing the intensity of acetate adducts TQ and LTQ-Orbitrap in full scan negative ionization mode, we observed that the response of species decreases when co-injected with other PC specie. This observation is more significant if the specie is present with a high concentration in the mixture (Fig. 35). The response of PC(8:0/8:0) analyzed alone at 250 pmol/µL is higher by 1.4 times compared to its response when it is analyzed in mixture with PC(24:0/24:0) at 250 pmol/µL using a TQ tuned to negative full scan ion mode (Fig. 35A). This response is similar in LTQ-Orbitrap (Fig. 35C).

At 10 pmol/ $\mu$ L in the presence of PC(24:0/24:0) at 250 pmol/ $\mu$ L, PC(8:0/8:0) showed a twofold decrease compared to its response when analyzed alone by TQ (Fig. 35B), and remained similar in LTQ-Orbitrap (Fig. 35D). Response of PC(8:0/8:0) molecular specie in mixture with PC(24:0/24:0) at high concentrations is affected by inter-species ion suppression and a decrease in the response is especially observed in TQ (Fig. 35, 36).



**Fig. 35** The MS response of acetate ion for PC(8:0/8:0) alone and in mixture with PC(24:0/24:0) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/ $\mu$ L (**A**); at 10 pmol/ $\mu$ L (**B**); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/ $\mu$ L (**C**), and at 10 pmol/ $\mu$ L (**D**).



**Fig. 36** The MS response of acetate ion for PC(24:0/24:0) alone and in mixture with PC(8:0/8:0) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/ $\mu$ L (**A**), at 10 pmol/ $\mu$ L (**B**); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/ $\mu$ L (**C**), and at 10 pmol/ $\mu$ L (**D**).

The response of PC(24:0/24:0) analyzed alone at 250 pmol/ $\mu$ L is similar compared to its response in mixture with PC(8:0/8:0) at the same concentration in TQ (Fig. 36A). This response is higher of 5 times in LTQ-Orbitrap (Fig. 36C). The response of PC(24:0/24:0) at 10 pmol / $\mu$ L in mixture with PC(8:0/8:0) at 250 pmol / $\mu$ L showed a decrease in response for both analyzers (Fig. 36B, 36D), this decrease is more marked in LTQ-Orbitrap (Fig. 36D).

The response of PC species decreases in mixture with high concentrations of other PLs species. Inter-species ion suppression phenomenon is encountered with both TQ and LTQ-Orbitrap (Fig. 36B, 36D). In presence of lower or equal concentrations of other PLs species that possess a better response, the signal of the specie (that has the weaker signal) is increased. For example, in presence of PC(8:0/8:0), PC(24:0/24:0) response in MS increases compared to its response when analyzed alone. An equimolar mixture of 10 pmol/ $\mu$ L from PC(24:0/24:0) and PC(8:0/8:0) analyzed by TQ, showed a higher signal for PC(24:0/24:0) in mixture compared to its response alone (Fig. 36B).

#### **3-2-** Mixture of saturated and unsaturated PLs:
In part 1-2-, no difference in response was observed according to the degree of unsaturation except for TQ in positive ion mode. To evaluate the unsaturation effect on MS response, a mixture of two PC molecular species PC(18:0/18:0) and PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) is analyzed at 10; 50 and 250pmol/ $\mu$ L. These species were the farthest in terms of acyl chain unsaturation degree among available PC species.

Taking into account the intensity of major ion for each PLs specie analyzed in the different conditions by TQ and LTQ-Orbitrap in negative full scan ion mode, we observed that the response of PLs species decreases in mixture. This phenomenon is considerably more concentrations 38). The important for high (Fig. 37, response of PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) at 250 pmol/µL in ESI-MS analyzed alone by TQ and LTQ-Orbitrap is 1.5 times higher compared to its response in equimolar mixture in presence of PC 18:0 (Fig. 37A, 37C). The response of PC18:2 at 10 pmol/µL in mixture with PC18:0 at 250 pmol/µL showed a decrease of 2.5 times in both TQ and LTQ-Orbitrap (Fig. 37B, 37D) compared to its response when analyzed alone.



**Fig. 37** MS response of acetate ion for PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) alone and in mixture with PC(18:0/18:0) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/ $\mu$ L (**A**), at 10 pmol/ $\mu$ L (**B**); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/ $\mu$ L (**C**), and at 10 pmol/ $\mu$ L (**D**).



**Fig. 38** MS response of acetate ion for PC(18:0/18:0) alone and in mixture with PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) in negative full scan ion mode in TQ at 250 pmol/ $\mu$ L (**A**), at 10 pmol/ $\mu$ L (**B**); and in LTQ-Orbitrap at 250 pmol/ $\mu$ L (**C**), and at 10 pmol/ $\mu$ L (**D**).

The response of PC(18:0/18:0) at 250 pmol/ $\mu$ L when analyzed alone is 1.4 times higher by TQ (Fig. 38A) and similar in LTQ-Orbitrap (Fig. 38C), compared to its response in presence of PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) at 250 pmol/ $\mu$ L.

The response of PC 18:0 at 10 pmol/µL decreased in presence of PC18:2 at 250 mol/µL compared to its response when analyzed alone by LTQ Orbitrap (Fig. 38D). At low concentrations, PC18:0 exhibits a stronger response in mixture than when analyzed alone (Fig. 38B, D). For example, the response of PC 18:0 at 10 pmol/µL in equimolar mixture with PC 18:2 is higher of 1.3~2 times compared to its response when it is analyzed alone in LTQ-Orbitrap and TQ respectively (Fig. 38B, 38D). Same results are also observed at 50 pmol/µL where the response of PC 18:0 in mixture is higher than its response when analyzed alone by TQ or LTQ-Orbitrap (data not shown).

#### Discussion and conclusion:

Structural effects of PLs molecular species are evaluated by electrospray ionization mass spectrometry response ESI-MS using both low and high resolution mass spectrometers

tuned to positive and negative ionization modes. Several studies were carried out to understand the relationship between the PLs structure and their response in MS [14, 17]. To a better understanding of inter-species ion suppression phenomenon, PLs species (PA, PI, PE and PC) were analyzed alone or in mixtures at different concentration levels in our study. For TQ, full scan negative ion mode and precursor ion scanning in positive ion mode were applied. For LTQ-Orbitrap, experiences were assessed in full scan negative and positive ionization modes. PLs are better ionized with ESI in term of polarity [18]. PC is less ionized in negative mode than in positive ionization mode. Other glycerophospholipids (PA, PE and PI) are readily ionized in negative mode [19].

In this study, we firstly compared the results for PC species in terms of the intensity of major ion and in terms of the sum of ion intensities. Regarding the signal difference of produced ions between TQ and LTQ-Orbitrap, between classes, and within the same species in negative and positive ion modes; results were processed considering the intensity of major ions. At equal concentration and under the same analysis conditions, PLs molecular species respond differently according to their structures: the length of fatty acid chains, the number of unsaturation and the nature of the polar head group. Fatty acid chains length showed to have the most marked effect on MS response.

PLs molecular species of short chains were detected with much higher sensitivity than those with long chains and this effect was more important for high concentrations of the calibration range. Our findings are in agreement with the studies conducted by Brugger *et al.* on TQ [17] and by Koivusalo *et al.* on linear trap and TQ [14]. Both studies were realized by directly infusing the lipid mixture into an ESI source. This work comes in supplement as we decided to study the PLs standards individually in flow injection analysis. We evaluated the response of PLs species from individual solutions as, apart the differences arising from the structure, discrepancies in response between the PLs species may be provoked by an ion suppression phenomenon when PLs are injected in mixture. Also, we adopt FIA as our interest is to analyze PLs mixture by coupling MS to chromatography. For this reason, our calibration range covered higher concentration levels compared to reference number [14].

As a general statement, the MS response of short chains species was greater than the response of species with long chains whatever is the instrument or the ionization mode. This

phenomenon depends on concentration and is particularly noticed at the upper end of the calibration range. The TQ response of PC(8:0/8:0) at the highest concentration of 250 pmol/µL (100xLOQ) was from 4 to 7 times higher than PC(24:0/24:0) response in full scan negative ion mode and in positive precursor ion mode respectively. In LTQ-Orbitrap, PC(8:0/8:0) response was higher than PC(24:0/24:0) response by 3 times in full scan negative ion mode and by 19 times in full scan positive ion mode. In conclusion, ratios were comparable between both TQ and LTQ-Orbitrap in full scan negative ion mode.

The same trend between short and long chain species responses was noticed with a ratio of 7 in precursor ion scan with TQ and of 19 with LTQ-Orbitrap in full scan positive mode. As stated as an hypothesis in reference [14]: at high concentrations, the surface of sprayed droplets becomes crowded; and in such conditions, the molecules having a short acyl chain reach more easily the surface layer and a larger number will be ionized.

Moreover, the effect of unsaturation was evaluated using PC species presenting different levels of unsaturation on their FA chains. According to our results, the effect of unsaturation on MS response was found to be less marked than the effect of the chains length for both TQ and LTQ-Orbitrap. Significant variation in MS response as a function of the number of FA unsaturation was mainly observed for TQ analyses realized in precursor ion scanning in positive mode. The major ion intensity of unsaturated PC is higher than the signal of its saturated homologue presenting the same chain length. The ratio between MS response of PC species having 4 unsaturations and MS response of saturated specie was about 3 at the concentrations of 50, 100 and 250 pmol/µL. This ratio is about 2 between PC species having 1 unsaturation and saturated PC specie. Hence, the effect on MS response becomes significant once the specie presents a double bond and increases progressively with respect to the number of unsaturation in the molecule. As well, PC(18:2/18:2) and PC(16:0/20:4) differing in the chains length and the position of the double bond showed a comparable MS response. Previous lipid studies addressed the relationship between MS response and the number of unsaturation on acyl chains. Koivusalo et al. showed that the MS response depends noticeably on the degree of PLs unsaturation at the highest concentration used in their study. Their analyses were realized on an equimolar mixture of PC species using ESI source and ion trap analyzer [14]. Duffin et al. [20] displayed also the effect of unsaturation with a mixture of triglycerides presenting different degrees of unsaturation with C14, C16 and

 $C_{18}$  FA chains using ESI/TQ. Laakso *et al.*, [21] showed this effect for triacylglycerols analyzed using an APCI/TQ (The Finnigan MAT TSQ-700). As supposed by Koivusalo *et al.*, [14], unsaturated molecular species are, like the short-chain saturated ones, are more surface active and thus become more efficiently ionized. In our work, this effect was confirmed between unsaturated and saturated PC and was observed at the concentrations of 50, 100 and 250 pmol/µL. In addition, our results showed that the inversion of fatty acids chains or the position of the unsaturation on the acyl chains had no significant effect. Subtle differences in response were observed for a shorter acyl-chain on sn2 and a position of the unsaturation closer to the polar head. Our findings lead on one side, to take into account the effect of unsaturation on FA chains when using TQ tuned to precursor ion scanning for quantitative studies. On another side, this effect was neither observed in full scan for the LTQ-Orbitrap (negative and positive ionization modes) nor for the TQ (negative ionization mode).

The ESI-MS response depends mainly on the structure of the polar head of PLs classes [22]. Our results showed that PI was detected with a much higher sensitivity compared to all other PLs classes in both TQ and LTQ-Orbitrap using full scan negative ion mode. The ratio PI/PC was about 3 in both analyzers. PE and PA response was comparable in LTQ-Orbitrap, but the response of PE was higher than PA in TQ for the high concentrations of the calibration range (more than 50 pmol/µL). The ratio PA/PC was from 1 to 2 in TQ and LTQ-Orbitrap respectively. The ratio PE/PC was of 2 in both analyzers. In negative ionization mode, Koivusalo et al. found that PI and PA classes are detected with higher sensitivity than PE class, and PE has a stronger response compared to PC (chloride adduct, [PC+CI]) [14]. Fridriksson et al., compared the response of PI, PA and PE and showed that the response order was PI > PA > PE [23]. These results seem to not be fully in accord with our data. Actually, the formation of ions is related to the analysis conditions, in particular to the composition of the mobile phase and the analyzer type. This explains the observed dissimilarities between our data and other studies. In our work, the mobile phase composition was based on previous studies of Godoy-Ramos et al., [16] and Imbert et al., [6] where a good detection of PLs classes is observed when coupling MS to NP-LC. In these conditions, the major molecular species of PLs gives [M-H]<sup>-</sup> and [M+OAc]<sup>-</sup> in negative ion mode. Therefore, we should pay attention to the composition of the mobile phase and the analyzer type when comparing PLs classes according to their polar head.

Furthermore, the MS response for PCs species in non-equimolar mixture showed a marked decrease for the minor specie compared to its response when analyzed alone, whether in TQ or in LTQ-Orbitrap, while the response of major specie was not affected. PCs species response in equimolar mixture of 250 pmol/µL diminished with respect to their response when analyzed alone. Surprisingly, the MS response of PC species in equimolar mixture at low concentration of 10 pmol/µL increased to their response when analyzed alone with both TQ and LTQ-Orbitrap. According to our results, a signal correction is required when analyses are realized for PLs mixture in both TQ and LTQ-Orbitrap.

The variation of PLs species response when analyzed in mixture is probably due to ion suppression. This phenomenon results from the competition between analytes in the ionization source. Ion-suppression effects make it difficult to observe minor analyte when major ones are also present in the ion source [22] and affects the quantification of co-eluted PLs species [24]. In NP-HPLC, PLs are separated according to their polar heads. The species from the same class are eluted constituting one chromatographic peak. When coupling NP-LC to MS, the response of PLs species is affected by ion suppression. In this work, we studied the interdependency between species that co-elute, in particular PC species, to be subsequently able to correct the quantification of PLs in natural/biological samples analyzed by NP-LC/MS.

This study showed that MS response depends on several factors, including PLs structure and instrument parameters. Two instruments were used. LTQ-Orbitrap has the advantage of very high resolution and mass precision superior to 1 ppm. It offers different modes and scan speed which allows full MS spectrum and MS/MS spectra of selected ions. This modes provides the polyvalence and facilitates the structural characterization and identification of species in biological samples [25]. Furthermore, TQ has the advantage of a high-performance. It allows direct analysis of crude lipid extracts using selective detection modes, i.e., the ion precursor mode or neutral loss. In both TQ and LTQ-Orbitrap, when biological samples are analyzed, a good cleanup and purification of the sample is necessary in order to

decrease the effect of ion suppression and to get a high-repeatability and a better quantification by ESI-MS [13, 14, 26].

For NP-LC/MS quantitative studies, the ion suppression phenomenon should be considered. Conforming to our results, the response of both TQ and LTQ-Orbitrap was affected by the chains length of PLs species. LTQ-Orbitrap response was less affected by the number of unsaturation on FA whether in negative or positive full scan modes. The response of TQ was impacted by unsaturation presence when tuned to precursor ion scanning in positive ion mode. These effects were more important for the upper concentrations of the calibration curve. LTQ-Orbitrap presents an advantage to conduct quantitative studies especially that its response was only affected by the length chain. A dilution of samples would reduce the effect of PLs structure on both TQ and LTQ-Orbitrap response. Another solution is to use internal standards with the advantage to include the daily variation of the detector response [13, 14]. The key remains to choose correctly the composition of these internal standards in order to avoid the ion suppression phenomenon.

#### Acknowledgments:

We gratefully acknowledge Dr. Audrey Solgadi from the SAMM Mass Spectrometry facility of the UMS IPSIT for technical assistance and advices when using the LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

This study was realized in the framework of the "lipidomic profiling project" funded by the CORDDIM and MALINF initiative of Région IIe de France and Université Paris-Sud.

#### **References:**

- 1. Dowhan, W., M.T. Alan, and E.D. Ross, *Role of phospholipids in Escherichia coli cell function*. Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles, 1995. **4**: p. 189-217.
- 2. Huiyi, W., et al., Combined use of phospholipid complexes and self-emulsifying microemulsions for improving the oral absorption of a BCS class IV compound, baicalin Acta Pharm, 2014. **4**(3): p. 217–226.
- 3. Wang, Q., et al., *Structural characterization of novel phospholipid lipid nanoparticles for controlled drug delivery.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **84**(2): p. 406-12.
- 4. Diaz-Lopez, R., et al., *Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector.* J Pharm Biomed Anal, 2008. **48**(3): p. 702-7.
- 5. Arpino, P. (2007) *Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. I.* Techniques de l'ingénieur **Volume**, 1-18
- 6. Imbert, L., et al., *Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in Leishmania donovani cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis.* Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(3): p. 1169-82.
- 7. Imbert, L., et al., *Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of Leishmania donovani.* J Chromatogr A, 2012. **1242**(0): p. 75-83.
- 8. Kushnir, M.M., et al., *Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories.* Clinical Biochemistry, 2011. **44**(1): p. 77-88.
- 9. Thomas, M.A., *Ion Suppression in Mass Spectrometry*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1041-1044.
- 10. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization.* J Am Soc Mass Spectrom, 2000. **11**(11): p. 942-50.
- 11. Sterner, J.L., et al., Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples. J Mass Spectrom, 2000. **35**(3): p. 385-91.
- 12. Bonfiglio, R., et al., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds.* Rapid Commun Mass Spectrom, 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
- 13. Antignac, J.-P., et al., *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis.* Analytica Chimica Acta, 2005. **529**(1-2): p. 129-136.
- 14. Koivusalo, M., et al., *Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response.* J Lipid Res, 2001. **42**(4): p. 663-672.
- 15. Serna, J., et al., *Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry.* Chem Phys Lipids, 2015. **189**: p. 7-18.
- 16. Ramos, R.G., et al., *Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids.* J Chromatogr A, 2008. **1209**(1-2): p. 88-94.
- 17. Brugger, B., et al., *Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2339-44.
- 18. Seppanen, L.T. and M. Oresic, *How to study lipidomes*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(3): p. 185-190.
- 19. Myers, D.S., et al., *Quantitative analysis of glycerophospholipids by LC-MS: acquisition, data handling, and interpretation.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 748-57.

- 20. Duffin, K.L., J.D. Henion, and J.J. Shieh, *Electrospray and tandem mass spectrometric characterization of acylglycerol mixtures that are dissolved in nonpolar solvents.* Anal Chem, 1991. **63**(17): p. 1781-8.
- 21. Laakso, P. and P. Voutilainen, *Analysis of triacylglycerols by silver-ion high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Lipids, 1996. **31**(12): p. 1311-22.
- 22. Pulfer, M. and R.C. Murphy, *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. Mass Spectrom. Rev., 2003. **22**(5): p. 332-364.
- 23. Fridriksson, E.K., et al., *Quantitative Analysis of Phospholipids in Functionally Important Membrane Domains from RBL-2H3 Mast Cells Using Tandem High-Resolution Mass Spectrometry*. Biochemistry, 1999. **38**(25): p. 8056-8063.
- 24. Remane, D., et al., *Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multianalyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. **24**(21): p. 3103-8.
- 25. Wu, W.W., et al., *Discovery- and target-based protein quantification using iTRAQ and pulsed Q collision induced dissociation (PQD).* J Proteomics, 2012. **75**(8): p. 2480-7.
- 26. Mallet, C.R., Z. Lu, and J.R. Mazzeo, *A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(1): p. 49-58.

#### **CONCLUSION DU DEUXIEME ARTICLE :**

Ce deuxième article propose une étude quantitative des PLs par spectrométrie de masse à basse et à haute résolution TQ et LTQ-Orbitrap respectivement. Cette études a été achevée en FIAà l'aide d'une source electrospray. Ce travail a pour objectif d'étudier, d'un côté l'effet de la structure des PLs sur la réponse de SM. De l'autre côté d'évaluer le phénomène de suppression pour améliorer la quantification de PLs en spectrométrie de masse dans les échantillons biologiques.

Compte tenu du nombre d'espèces moléculaires résultant de la variation de longueur et du nombre de doubles liaisons présentes au niveau de la chaîne d'acide gras, nous nous sommes intéressés, au sein d'une classe donné ou inter-classes, à l'étude de l'influence de la structure des espèces de PLs sur la réponse de la spectrométrie de masse.

La réponse des différentes espèces de PCs, étudiées dans les modes décrites ci-dessus a montré que la structure des chaînes des acides gras a un effet sur la réponse en SM. L'intensité des ions formés est plus importante en LTQ-Orbitrap qu'en TQ. En plus, l'ion majoritaire qui se forme n'est pas nécessairement le même entre le TQ et Le LTQ-Orbitrap.

Dans tous les modes utilisés, nous avons trouvé que la réponse diminue en fonction de l'augmentation du nombre d'atomes de carbones des chaînes d'acides gras des PCs et ce phénomène augmente nettement en fonction de la concentration.

En observant les résultats obtenus entre les espèces de PC à 36 carbones dans les gammes de concentrations, la réponse augmente en fonction du nombre d'insaturations des chaînes d'acides gras des PCs et ce phénomène augmente nettement en fonction de la concentration. L'effet de l'insaturation reste moins prononcé que l'effet de la longueur des chaînes et s'avère inaperçue pour les concentrations étudiées sauf en TQ en mode précurseur d'ions. Seul en mode précurseurs d'ions sur le TQ, l'augmentation de la réponse des espèces avec le nombre d'insaturations des chaînes des acides gras est aperçue. Dans ce cas, la réponse de PC(18:2/18:2)-cis à la concentration maximale de la gamme de 250 pmol/µL est plus élevée que la réponse de PC(18:0/18:0).

Concernant les effets de l'inversion des chaînes d'acides gras et de la position des insaturations, les résultats ont montré peu de variations de la réponse en fonction l'inversion des chaînes d'acides gras.

Par ailleurs, La réponse a montré une variation en fonction de la nature du groupement fonctionnel de la tête polaire des PLs. La réponse de PI 8:0 à la concentration maximale de la gamme de 250 pmol/ $\mu$ L est > de celle de PC 8:0 selon les conditions d'analyse. Le PA 8:0 et le PE 8:0 qui ont des réponses intermédiaires.

Pour évaluer le phénomène de suppression d'ion, des mélanges des espèces ont été définis en fonction des résultats obtenus précédemment. Ces mélanges des espèces phospholipidiques ont été faites à différentes concentrations en considérant l'effet de la longueur des chaînes des acides gras et le nombre des insaturations.

En considérant l'effet de la longueur des chaines des acides gras dans le mélange, nous avons vu que la réponse de l'espèce diminue en mélange et cette diminution augmente nettement en fonction de la concentration. Donc, la réponse d'une espèce présente en mélange avec d'autres espèces à concentrations élevées, serait affectée par la suppression d'ions et une diminution de sa réponse est observée. La suppression d'ions est présente en TQ et en LTQ-Orbitrap pour les espèces en mélange. L'effet de la longueur de chaînes est toujours conservé. Par contre et avec des concentrations plus faibles ou égales d'autres espèces qui répondent mieux en ESI, l'espèce semble répondre mieux que lorsqu'elle est seule.

Pour étudier de l'effet de l'insaturation des chaînes des acides gras des espèces lors qu'elles sont présentes en mélange, un mélange des deux espèces extrêmes en termes de nombre d'insaturations des chaînes le PC(18:0/18:0) et le PC(18:2/18:2) cis est réalisé à trois niveaux de concentrations. La réponse de l'espèce diminue en mélange et cette diminution augmente nettement en fonction de la concentration. Cette observation a été trouvée en TQ et LTQ-Orbitrap. Par contre et à des faibles concentrations, l'espèce de PC en mélange semble répondre mieux que lorsqu'elle est analysée seule.

Cette publication a clairement montré qu'une considération du phénomène de suppression d'ions durant le développement et la validation d'une méthode LC-MS s'avère indispensable pour la quantification des PLs co-élués.

# 3<sup>ème</sup> partie

## Discussion générale et conclusion

Ce travail de thèse s'intéresse à la problématique de quantification des phospholipides dans les échantillons biologique/naturels. Nous avons essayé au cours de cette thèse d'apporter des éléments permettant d'identifier ce problème et d'évaluer certains points sur les standards phospholipidiques utilisés lors de la quantification. Ces éléments permettent, par la suite, d'améliorer la quantification de ces composés phospholipidiques.

L'influence de la composition des standards lipidique joue un rôle essentiel sur le résultat de la quantification des lipides. En prenant en considération la variation en composition des standards, nous avons développé une analyse comparative afin d'évaluer l'effet de la composition des standards sur les résultats analytiques. De plus, nous décrivons l'effet de la structure de PLs sur les résultats de quantification.

Afin de répondre aux objectifs de ce travail, nous nous sommes intéressés aux stratégies analytiques utilisées pour analyser les lipides (Détails dans la partie introduction). Par ailleurs, les progrès dans le domaine de la lipidomique ont été fortement accélérés par le développement de méthodes de détection. Les méthodes appliquées pour détecter les lipides ont pour objectif d'accomplir la détection complète de toute une gamme de lipides dans un mélange complexe. D'après la littérature, une vaste gamme de méthodes de détection peut être utilisée pour l'analyse de phospholipides. Parmi les méthodes usuelles, nous pouvons citer la réfractométrie [176], la spectrophotométrie dans l'ultraviolet-visible de même que la spectrophotométrie de fluorescence [177].

Hormis la réfractométrie, ces techniques ne permettent pas l'analyse directe des phospholipides qui sont dépourvus de chromophores exploitables de même que de flurophores. La réfractométrie est d'un usage limité compte tenu de sa faible sensibilité de même qu'a son incompatibilité avec le gradient d'élution. Le changement de composition de la phase mobile en cours d'analyse induisant une dérive de la ligne de base incompatible avec la détection des solutés. Les lipides doivent être chimiquement modifiés pour être valablement détectés par les spectroscopies électroniques. Ces étapes intermédiaires ou préalables à la détection, communément appelées réactions de dérivation allongent le temps total d'analyse. De plus, si elles favorisent la détection, l'introduction d'un groupe chromophore ou fluorophore incorpore un motif structural constant et, le plus souvent volumineux dans la structure des analytes ce qui complexifie la séparation. Ainsi, ces

techniques ne peuvent pas représenter une méthode directe pour l'analyse des phospholipides. De plus, la majorité des méthodes publiées ne couvre pas l'analyse de toute la gamme de classes de lipides. D'où la nécessité d'utiliser une méthode permettant d'effectuer l'analyse simultanée de l'ensemble de toutes les classes lipidiques renfermées dans un tel échantillon biologique/naturel.

Dans un premier temps, nous avons optimisé une méthode de chromatographie liquide en phase normale sur une phase stationnaire polyvinyl alcool (PVA-Sil) développée au laboratoire lors de sujets de recherche précédents [107, 115]. Ensuite, nous avons validé la méthode en se basant sur des tests statistiques et sur les critères de la validation analytique appropriée. Dans ce contexte, la fidélité de la méthode analytique a été étudiée à plusieurs niveaux et l'analyse de la variance a été évaluée. Les résultats des tests statistiques justifient l'efficacité du modèle de régression.

Cette méthode comporte un gradient d'élution composé d'un mélange complexe de solvants. L'optimisation de cette méthode a abouti à effectuer la séparation complète des classes phospholipidiques depuis les échantillons durant 44 minutes.

La détection des classes de phospholipides dans ce travail a été réalisé à l'aide de deux types de détecteurs universels : le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière DEDL et le détecteur d'aérosol chargé Corona-CAD<sup>®</sup>. Ces détecteurs sont caractérisés par une réponse universelle dans la mesure où l'analyte est moins volatil que la phase mobile.

D'une part, le DEDL est un détecteur qui mesure la diffusion de la lumière produite lors du passage de particules de soluté à travers un faisceau lumineux. Les particules de soluté sont issues de l'évaporation de la phase mobile qui a été préalablement nébulisée par un flux de gaz à la sortie de la colonne chromatographique [59]. Ce mécanisme de réponse est particulièrement adapté pour des molécules qui ne possèdent pas des groupements chromophores et permet la détection de composés non volatils ou bien moins volatils que les solvants des phases mobiles utilisés. D'où l'intérêt pour l'analyse de lipides en général et des phospholipides en particulier. Ce détecteur est compatible avec le gradient d'élution : la ligne de base ne présente qu'une faible dérive lors du changement de composition de la phase mobile.

D'autre part, le Corona-CAD<sup>®</sup> est un détecteur qui a été présenté récemment comme une alternative à DEDL. Les deux détecteurs sont masse-dépendants, leur réponse ne dépend pas des propriétés spectrales ou physico-chimiques de l'analyte. Le détecteur Corona-CAD<sup>®</sup> se caractérise par une sensibilité meilleure que celle du DEDL [107]. De plus, il peut être couplé à la chromatographie liquide en offrant des facteurs de réponse constants pour des analyses quantitatives. Par contre, le détecteur Corona est affecté par la composition de la phase mobile [178], ce problème a été résolu en utilisant la compensation inverse de gradient comme l'on peut voir en chromatographie liquide à haute pression et en chromatographie en fluide supercritique.

Les composés sont détectés par Corona-CAD de la manière suivante. Dans un premier temps, la phase mobile est nébulisée puis le solvant est évaporé afin de générer un brouillard de particules. Ces particules entrent, par la suite, en collision avec un flux d'azote positivement chargé. En conséquence, la charge est transférée vers les particules, ces dernières sont transférées vers un collecteur associé à un électromètre. Ce principe est capable de produire un signal lié à la quantité de l'analyte [126].

Ces caractéristiques du détecteur CAD lui permet d'être largement utilisé en biopharmacie et biotechnologie [179]. Il est souvent employé pour analyser de petites/grosses molécules, des biomolécules y compris les lipides [180, 181] et en particulier les phospholipides [133, 182].

Les deux modes de détection ont été appliqués à l'analyse des classes de PLs. Les deux modes de détection permettent la détermination simultanée et directe des classes de phospholipides s'étendant des phospholipides moins polaires jusqu'à les PLs les plus polaires. Par ailleurs, les résultats expérimentaux montrent que la réponse obtenue lors du couplage HPLC-CAD et HPLC-DEDL présente une différence importante au niveau de la géométrie de pics chromatographiques. Ainsi, certains PLs sont mieux détectés avec le détecteur DEDL.

Le type de réponse obtenu lors de l'application de la méthode aux gammes d'étalonnage des PLs dans les intervalles de concentrations a été étudié. D'après la littérature, le modèle linéaire et le modèle puissance ont été précédemment étudiés pour évaluer la réponse des détecteurs universels [126, 178]. Comme il a été confirmé que la réponse de détecteur n'est

pas linéaire [107], le modèle puissance a été utilisé au cours de ce travail. La transformation log-log de l'équation a= y\*m<sup>b</sup> nous a permis de linéariser cette équation.

Pour réaliser cette étude, il était essentiel de sélectionner un échantillon avec une composition riche en phospholipides qui soit issu de différentes sources naturelles. D'où l'intérêt d'utiliser les échantillons de la lécithine [183]. Ces détecteurs ont permis la quantification des classes de PLs dans la lécithine. L'exploration de la composition de la lécithine de ces différentes sources a été achevée en spectromètre de masse haute résolution LTQ-Orbitrap. Cette analyse a montré la variabilité de la composition en espèces moléculaires, pour chaque classe, en fonction de la source d'extraction. (Résultats en Annexe).

Les résultats de la quantification des classes de PLs suivant cette méthode ont été traités de deux manières; d'abord une comparaison de la quantification de classes de PLs a été effectuée en fonction de la source d'extraction des standards. Deuxièmement, une comparaison a été réalisée en fonction de détecteur employé. Les PLs présents dans la lécithine de source animale (PE et PC) n'ont pas montré de différence lorsque les résultats sont comparés en fonction des méthodes de détection. Concernant les PLs dans la lécithine de source végétale; PI, PE et PC n'ont pas montré de différence contrairement à PA. Cette classe phospholipidique a présenté un résultat de quantification significativement différente entre DEDL et Corona-CAD.

La comparaison de la quantification de classes de PLs en fonction de la source d'extraction de standards a abouti à la conclusion suivante. Pour les deux sources de lécithines, aucune variation significative pour toutes les classes de PLs n'a été observée. Par exemple, la quantification de classe PC dans la lécithine de soja a donné les mêmes résultats en établissant la gamme d'étalonnage à partir de standards de source végétale ou animale.

Les deux modes de détection DEDL et Corona<sup>®</sup>-CAD permettent l'évaluation de l'aspect quantitatif des phospholipides présents dans les échantillons naturels en utilisant différentes source de standards. Cependant, pour atteindre l'échelle de la distribution des différentes espèces moléculaires de chaque classe, il est indispensable de disposer d'une technique spécifique de ces espèces telle que la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une méthode sensible d'identification, elle permet la caractérisation structurale des molécules. Cette technique est souvent couplée à des techniques séparatives tels que la CG [184] et la CL [56].

Dans ce travail, le système de chromatographie liquide a été couplé à la spectrométrie de masse (SM) avec une interface electrospray (ESI). Cette technique d'ionisation douce s'avère pertinente pour l'analyse proposée en raison de sa capacité à fournir des informations structurales par fragmentation de l'ion quasi-moléculaire [156]. De plus, la source electrospray est bien adaptée à l'étude des molécules à caractère polaire tels que les PLs [169, 171]. La source ESI est largement utilisée dans ce domaine car elle permet une sensibilité élevée, avec la possibilité d'utiliser des débits pouvant dépasser 1 mL/min lors du couplage LC-SM.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de la structure des espèces moléculaires de PLs sur les résultats quantitatifs. Pour cette raison, deux types d'analyseurs ont été exploités au cours de ce travail, le triple quadripôle et le LTQ-Orbitrap.

Le LTQ-Orbitrap a l'avantage de très haute résolution et la précision de masse supérieure à 1 ppm. Il se caractérise par sa vitesse de balayage, il propose différents modes d'acquisition en réalisant des spectres en balayages complet MS et des spectres MS/MS des ions sélectionnés. Ces modes facilitent la caractérisation structurale et l'identification des espèces [185].

Le TQ permet une analyse directe des extraits lipidiques bruts en utilisant des modes caractéristiques et sélectifs de détection, tels que le mode de précurseur d'ions ainsi que le mode de perte de neutre. L'identification des espèces moléculaires lipidiques à faible résolution en TQ doit être réalisée par l'analyse MS<sup>n</sup>, car ce genre d'analyse fournit un degré élevé d'information structurelle.

Les analyses pour évaluer l'effet structural de PLs sur la réponse de SM ont été réalisées principalement sur les classes de PC ainsi que sur d'autres classes (PA, PI et PE). Les données sont enregistrées avec différentes modes d'acquisitions. Pour TQ, les analyses ont été exécutées en mode balayage complet « full scan » en ionisation négative et en mode

précurseur d'ion en ionisation positive. Pour LTQ-Orbitrap, les données sont enregistrées en balayage complet en ionisation négative et positive.

La phase mobile utilisée dans ce travail en CLHP-SM a été optimisée, un mélange de solvant a permis d'avoir un meilleur rendement d'ionisation pour toutes les classes utilisées de PLs. En ionisation négative, le PC a formé trois ions. L'adduit acétate était l'adduit majeur, l'adduit chlorure [PC+Cl]<sup>-</sup> a été secondaire, et le troisième ion était [PC-CH3]<sup>-</sup>. Concernant les classes PA, PE et PI, l'ion [M-H]<sup>-</sup> était majoritaire. L'adduit [PA-H+Na+OAc]<sup>-</sup> était secondaire chez le PA, et le troisième était le dimère [2PA-H]<sup>-</sup>. La PE a formé le dimère comme ion secondaire [2PE-H]<sup>-</sup> ainsi que le PI [2PI-H]<sup>-</sup>.En ionisation positive, PC a formé deux ions majeurs, l'adduit protoné [PC+H]<sup>+</sup> et l'adduit [PC+TEA+H]<sup>+</sup>.

La génération des ions pour chaque classe de PLs, ainsi que l'abondance des ions dépend de deux éléments : la classe phospholipidiques elle-même et le type d'analyseur employé. Par exemple, l'ion majeur pour une classe donné PC n'est pas le même en mode positive en fonction de l'analyseur employé (TQ et LTQ-Orbitrap), [PC+H]<sup>+</sup> était l'adduit majeur avec LTQ-Orbitrap, et [PC+TEA+H]<sup>+</sup> était majoritaire avec TQ.

En ESI-SM, l'analyse des espèces moléculaires contenues dans chaque classe de lipide produit des ions différents. Il est apparu nécessaire de choisir un critère pour permettre de comparer la réponse des espèces de PLs en SM. Pour cela, des espèces moléculaires de la classe de PC ont été considérées et analysées en TQ et LTQ-Orbitrap. Ces espèces possèdent un nombre de carbone allant de 12 à 16 sur les deux chaines alkyles.

Pour LTQ-Orbitrap, nous avons trouvé que l'intensité de l'adduit acétate était la même pour toutes ces espèces à tous les niveaux de concentrations. L'adduit chlorure est plus présent chez PC(8:0/8:0), et l'ion [PC-CH3]<sup>-</sup> chez PC(12:0/12:0). Lors de calcul de la somme des intensités des ions, la réponse totale de PC(8:0/8:0) et PC(12:0/12:0) était plus élevée que la réponse de PC(14:0/14:0) et PC(16:0/16:0).

Pour TQ, les mêmes résultats sont obtenus quand on traite les données en considérant la somme des intensités de tous les ions formés ou en considérant l'intensité de l'ion majeur. Dans le même contexte, nous n'avons pas trouvé de différences entre les classes de PLs en

comparant l'intensité de l'ion majeur ou la somme de toutes les intensités. En conclusion, nous avons considéré l'intensité de l'ion majeur en traitant les données.

En NP-CLHP couplé à la spectrométrie de masse avec la source ESI, les classes de PLs sont séparées en ordre de polarité croissante. Un pic correspond à une classe donnée, les différentes espèces d'une même classe seront présentes sous le même pic chromatographique. Ces espèces moléculaires peuvent présenter le phénomène de suppression d'ion ce qui entraînera un problème lors des études quantitative en ESI-SM.

En SM, la structure des molécules joue un rôle important sur l'efficacité de détection. Selon la littérature, le rendement d'ionisation des PLs ou d'autres molécules est affecté par certaines caractéristiques des analytes. La longueur de chaîne alkyle, le nombre et la position des insaturations et la nature de la tête polaire des espèces moléculaires peut modifier la réponse [186, 187].

L'effet de la longueur des chaines d'acide gras de PLs sur la réponse en SM a été précédemment abordé par Koivusalo *et* al. [186] en utilisant une trappe ionique, et aussi par Brugger *et* al. [187] en utilisant TQ. Ces auteurs ont aperçu que la réponse en SM augmente avec la diminution du nombre de carbones sur les chaines des espèces moléculaires de PLs. Ces résultats ont été obtenus par l'infusion d'un mélange des standards de PLs. Notre travail vient en supplément à ces travaux car nous avons décidé d'étudier l'effet de la structure des PLs sur la réponse en SM individuellement en FIA. Le fait de travailler en FIA permet de mimer les conditions de l'analyse chromatographique parce que notre objectif finale est de faire la quantification des PLs en couplage CL à la spectrométrie de masse.

Comme résultats, nous avons trouvé que la réponse en SM (TQ et LTQ-Orbitrap) diminue en fonction de l'augmentation du nombre d'atomes de carbone des chaînes d'acides gras. En TQ, nous avons observé que la réponse de PC(8 :0/8 :0) à la concentration la plus élevée de notre gamme d'étalonnage 250 pmol/µL est de 4 à 7 fois plus élevée que la réponse de PC(24 :0/24 :0) en full scan ionisation négative et en mode précurseur d'ion en ionisation positive respectivement. En LTQ-Orbitrap, la réponse de PC(8 :0/8 :0) était supérieur à la réponse de PC(24 :0/24 :0) par 3 fois en full scan ionisation négative et par 19 fois en full scan ionisation positive.

Nous avons souligné dans ce travail l'intérêt de certains modes d'acquisition pour visualiser des effets que nous ne pouvons pas les apercevoir par autres modes. Par exemple, le mode précurseur d'ion en TQ nous a permis de distinguer que la réponse de SM augmente en fonction de nombre d'insaturations des chaînes des acides gras. Nous avons montré dans notre travail que le ratio entre la réponse des espèces de PC ayant 4 insaturations et la réponse des espèces saturées est presque 3 aux concentrations 50, 100, et 250 pmol/µL. Ce ratio est à peu près 2 entre les espèces de PC avec une insaturation et les espèces saturées. Parallèlement, le PC(18 :2/18 :2) et le PC(16 :0/20 :4), qui varient au niveau de la longueur des chaînes et le positionnement de double liaison, ont montré une réponse comparable.

Des études précédentes décrites dans la littérature ont abordé l'effet des insaturations de différentes classes lipidiques sur la réponse en SM. Koivusalo *et* al. ont montré que la réponse en SM dépend largement du nombre d'insaturation des PLs aux concentration élevées lors de l'infusion d'un mélange équimolaires des standards sur la source d'ionisation électrospray couplée à une trappe ionique [186]. Duffin *et* al ont montré aussi l'effet des insaturations sur la réponse en SM avec un mélange de triglycérides présentant des niveaux différents des insaturations en utilisant ESI/TQ [188]. Egalement, cet effet concernant les insaturations a été observé par Laakso *et* al. sur les triacylglycérols analysés par APCI/TQ [189].

En outre, et contrairement à la littérature, nous avons trouvé que l'effet de longueur des chaînes est plus prononcé que l'effet des insaturations avec tous les modes d'acquisition utilisés. Ce travail n'a pas observé d'influence sur la réponse de SM liés à l'inversion sn1/sn2 des chaînes d'acides gras et de la position des insaturations. L'effet de la longueur de chaine et des insaturations était, en général, dépendant de la concentration. Cet effet était plus remarqué à l'extrémité supérieure de la gamme d'étalonnage.

Ainsi, une variation de la réponse en fonction de la nature de la tête polaire des classes de PLs a été précédemment décrite [6]. Cet effet de la tête polaire a été nettement observé dans notre travail. Quatre classes de PLs ont été utilisées pour cette comparaison. Les analyses ont été effectuées en full scan ionisation négative sur l'ion majoritaire parce que ces classes ne forment pas les mêmes ions en mode négatif. La formation des adduits dépend, en général, des conditions appliquées de l'analyse telle que la phase mobile utilisée

et aussi le type d'instrument employé. Nos résultats montrent que la classe de PI a la réponse la plus forte et la PC a la réponse la plus faible sur les deux instruments utilisés. La PE et le PA avaient une réponse intermédiaire et comparable en LTQ-Orbitrap. Par contre, la réponse de la PE était plus forte que la réponse du PA sur les concentrations élevées (>50 pmol/μL) en TQ ce qui montre bien que cet effet est instrument-dépendant. En comparaison avec la littérature, Koivusalo *et* al. ont observé que le PI et le PA avaient une réponse de PE en ionisation négative. La réponse de PE était supérieur de celle de PC [PC+CI]<sup>-</sup> [186]. L'ordre suivant PI>PA>PE a été remarqué par Fridriksson *et* al.[190]. Ces résultats ne sont pas totalement en accord avec nos résultats. L'effet de la tête polaire des PLs sur la réponse en SM peut être modifié en fonction de la polarité de la méthode utilisée.

Un autre avantage de cette étude est qu'elle a pu montrer ces effets structuraux des PLs sur un type d'analyseur à haute résolution LTQ-Orbitrap, ce qui n'a pas été observé auparavant.

Après avoir observé l'effet de la structure de PLs sur la réponse de SM, nous avons évalué l'effet mutuel des espèces de PLs lors qu'ils sont en mélange.

Comme précédemment décrit, des études dans la littérature ont montré les effets structuraux des PLs sur la réponse en spectrométrie de masse. Ces études ont été réalisées en infusion directe du mélange des espèces moléculaires de standards de PLs. Cette infusion directe du mélange a réussi à montrer l'effet de la structure chimique sur la réponse de SM [186]. En revanche, nous pouvons supposer que des effets mutuels des différentes espèces sur leurs réponses respectives n'ont pu être mis en évidence. L'influence mutuelle des espèces moléculaires lors qu'elles sont en mélange peut modifier le rendement d'ionisation. La co-injection des PLs dans la source ESI permet de mettre en évidence le phénomène de suppression d'ion.

Les espèces moléculaires de PLs ont montré le phénomène de suppression d'ion lors ils sont présents en mélange. Ce phénomène a eu lieu quel que soit le type d'analyseur utilisé (TQ et LTQ-Orbitrap). Une diminution ou une augmentation de la réponse des espèces sont notées en fonction de la structure des espèces et de la concentration des espèces dans le mélange. Ce phénomène peut se produire par la compétition entre les analytes à la source d'ionisation. Ce phénomène rend difficile d'observer l'analyte mineur lors de la présence des

ions majoritaire en même temps dans la source [6]. Cela peut affecter l'efficacité de l'analyse et peut impacter aussi la quantification des espèces moléculaires co-éluées en CL en phase normale couplée à la spectrométrie de masse [191]. Une solution proposée face au problème de suppression d'ionisation lors des analyses quantitatives est de diluer les échantillons. La dilution de l'échantillon permet de réduire l'effet de la structure sur la réponse en SM. Une autre solution est d'utiliser des étalons internes. En pratique, les analyses quantitatives des PLs avec la source ESI exige l'utilisation de standards internes en raison de sa sensibilité aux effets de matrice, ce qui produit une variation du signal. Dans ce cas, il semble essentiel de choisir correctement la composition de ces étalons internes afin d'éviter le phénomène de suppression d'ions.

**En conclusion**, l'objectif de ce travail doctoral était d'améliorer la quantification des phospholipides dans les échantillons biologiques/naturels. Cette amélioration peut se faire en introduisant des facteurs de correction.

D'une part, ces facteurs permettent de corriger la forme de pics chromatographiques lors de la quantification des classes phospholipidiques par chromatographie liquide en phase normale en utilisant les détecteurs universels (DEDL et Corona-CAD<sup>®</sup>).

D'autre part, les facteurs de corrections sont demandés lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse pour la quantification des lipides. Dans ce cas, la quantification des lipides par ESI-SM est gênée par le phénomène de suppression d'ion, ce phénomène peut fausser les résultats quantitatifs pour une analyse donnée.

Dans le contexte de cette étude, deux détecteurs universels (DEDL et Corona-CAD<sup>®</sup>) ont été couplés à ce système chromatographique. La performance de ces détecteurs a été comparée pour l'analyse quantitative de PLs dans les lécithines. La lécithine a été sélectionnée comme modèle d'application d'échantillon biologique issu de différentes sources. L'originalité de ce travail est qu'il a pu mettre en évidence l'effet de la source de standards sur les résultats analytiques obtenus.

Du point de vue de l'avancée des techniques chromatographiques, ce travail a mis au point une méthode analytique de chromatographie liquide en phase normale capable de séparer, d'identifier et de quantifier les classes phospholipides depuis les échantillons. Les classes de PLs quantifiées dans ce travail étant parmi les plus fréquemment rencontrées dans les échantillons biologiques. Cette méthode de chromatographie liquide en phase normale prend le relais des anciens travaux réalisés au sein de laboratoire de chimie analytique EA4041 par Ricardo GODOY RAMOS et Laurent IMBERT [107, 115].

Des avancées ont été apportées au cours de cette thèse aussi concernant la quantification des phospholipides en ESI/MS par le couplage chromatographique à la spectrométrie de masse. Ce travail a permis de visualiser l'effet de la structure de PLs sur la réponse d'un spectromètre de masse, TQ et LTQ-Orbitrap. La nouveauté dans de cette partie de travail est d'éclairer le phénomène de suppression d'ionisation lors de l'analyse quantitative des phospholipides en NP-HPLC/ ESI-SM.

### Références

- 1. Fahy, E., et al., *A comprehensive classification system for lipids*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 839-61.
- 2. Fahy, E., et al., *Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids.* J Lipid Res, 2009. **50**: p. 9-14.
- 3. Bou Khalil, M., et al., *Lipidomics era: accomplishments and challenges.* Mass. Spectrom. Rev., 2010. **29**(6): p. 877-929.
- 4. Navas-Iglesias, N., A. Carrasco-Pancorbo, and L. Cuadros-Rodreguez, *From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics.* TrAC, Trends Anal. Chem., 2009. **28**(4): p. 393-403.
- 5. Carrasco-Pancorbo, A., N. Navas-Iglesias, and L. Cuadros-Rodriguez, *From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis.* TrAC, Trends Anal. Chem, 2009. **28**(3): p. 263-278.
- 6. Pulfer, M. and R.C. Murphy, *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. Mass Spectrom. Rev., 2003. **22**(5): p. 332-64.
- 7. RAMOS, R.G., Developpement d'outils analytiques pour l'etude du mecanisme d'action de la miltefosine(hexadecylphosphocholine) chez les leishmanies, in UNIVERSITE PARIS-SUD 11. 2008.
- 8. Hanin, I., et al., *Phospholipids-Natural, Semisynthetic, Synthetic*, in *Phospholipids*. 1990, Springer US. p. 1-12.
- 9. Baer, E., From the Trioses to the Synthesis of Natural Phospholipids: A Research Trial of Forty Years. J Am Oil Chem Soc, 1965. **42**: p. 257-66.
- 10. Szuhaj, B.F., *Lecithins: Sources, Manufacture and Uses*. 1989: Am. Oil Chem. Soc.
- 11. Wendel, A. and U. by Staff, *Lecithin*, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2000, John Wiley & Sons, Inc.
- 12. Cullis, P.R. and B. de Kruijff, *Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes.* Biochim. Biophys. Acta, 1979. **559**(4): p. 399-420.
- 13. Yang, R., et al., *Role of phospholipids and copolymers in enhancing stability and controlling degradation of intravenous lipid emulsions.* Colloids Surf., A, 2013. **436**: p. 434-442.
- 14. Haynes, D.H., *Phospholipid-coated microcrystals: injectable formulations of water-insoluble drugs*. 1992, Google Patents.
- 15. Zeisel, S.H. and J.K. Blusztajn, *Choline and human nutrition*. Annual review of nutrition, 1994. **14**(1): p. 269-296.
- Lee, S.-H., et al., Cytoprotective effects of polyenoylphosphatidylcholine (PPC) on î<sup>2</sup>-cells during diabetic induction by streptozotocin. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2003. 51(8): p. 1005-1015.
- 17. Coste, T.C., et al., *Les supplémentations nutritionnelles en acides gras polyinsaturés dans le traitement de la neuropathie diabétique périphérique.* Cahiers de Nutrition et de Diététique, 2004. **39**(3): p. 185-194.
- 18. Shahidi, F., *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*, ed. P.D. FEREIDOON SHAHIDI, FACS, FCIC, FCIFST, FIFT, FRSC. 2006: Taylor&Francis Group, LLC.
- 19. Grandois, J.L., *Caractérisation et stabilité de sources de phospholipides polyinsaturés a intérêt nutritionnels*. 2009: Strasbourg.
- 20. Tswett, M., Ber dtsch bot ges, 1906. **24**: p. 316.

- 21. Abraham, M.H., *100 years of chromatography- or is it 171?* J Chromatogr A, 2004. **1061**(1): p. 113-114.
- 22. Lederer, E., *La renaissance de la méthode chromatographique de M. Tswett en 1931.* J Chromatogr A, 1972. **73**(2): p. 361-366.
- 23. Martin, A.J. and R.L. Synge, *A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins.* Biochem J, 1941. **35**(12): p. 1358-68.
- 24. Consden, R., A.H. Gordon, and A.J. Martin, *Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper.* Biochem J, 1944. **38**(3): p. 224-32.
- 25. Porath, J. and P. Flodin, *Gel filtration: a method for desalting and group separation*. Nature, 1959. **183**(4676): p. 1657-9.
- 26. Caude, M. and A. Jardy, *Méthodes chromatographiques- Introduction.* TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR, 1996. **1445**: p. 2-6.
- 27. Chevreul, M.E., CYBERLIPID CENTER.
- 28. Christie, W.W., *Gas Chromatography and Lipids: a Practical Guide*. Clin. Chem, 1989. **35**(9): p. 2021-2021.
- 29. CNRS. *Le détecteur à ionisation de flamme*. [cited; Available from: <u>http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato\_gaz4.html</u>.
- 30. Mondello, L., et al., *Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatographymass spectrometry in the analysis of lipids.* J Chromatogr A, 2004. **1035**(2): p. 237-47.
- 31. Cruz-Hernandez, C., F. Destaillats, and C.F. Poole, *Chapter 23 Analysis of Lipids by Gas Chromatography*, in *Gas Chromatography*. 2012, Elsevier: Amsterdam. p. 529-544.
- 32. Technologies, U.d.I.S.e. *Electron Capture Detector ou détecteur à capture d'électrons*. 2004 [cited; Available from: <u>http://atechimie.univ-lille1.fr/Chromatographie-Phase-Gazeuse/Detecteurs/Specifiques/</u>.
- 33. Bondia-Pons, I., A.I. Castellote, and M.C. Lopez-Sabater, *Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **809**(2): p. 339-44.
- 34. Tserng, K.Y. and R. Griffin, *Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography.* Anal. Biochem., 2003. **323**(1): p. 84-93.
- 35. Hoving, E.B., *Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids.* J Chromatogr B Biomed Appl, 1995. **671**(1-2): p. 341-62.
- 36. Eder, K., *Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1995. **671**(1-2): p. 113-31.
- 37. Barroso, B. and R. Bischoff, *LC-MS analysis of phospholipids and lysophospholipids in human bronchoalveolar lavage fluid.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **814**(1): p. 21-8.
- 38. Lee, J.W., et al., Application of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry to lipid profiling of soybean. J Biosci Bioeng, 2011. **113**(2): p. 262-8.
- 39. Thiébaut, D., *Chromatographie en phase supercritique* TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR, 2010. **2645**: p. 1-14.
- 40. Li, F. and Y. Hsieh, *Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for chemical analysis.* J Sep Sci, 2008. **31**(8): p. 1231-7.
- 41. Bamba, T., Application of supercritical fluid chromatography to the analysis of hydrophobic metabolites. J Sep Sci, 2008. **31**(8): p. 1274-8.
- 42. Francois, I. and P. Sandra, *Comprehensive supercritical fluid chromatography x reversed phase liquid chromatography for the analysis of the fatty acids in fish oil.* J Chromatogr A, 2009. **1216**(18): p. 4005-12.
- 43. Stahl, E., [Thin layer chromatography for characterization of pharmacopeia drugs. 5. Chamomile flowers flores Chamomillae]. Arzneimittelforschung, 1969. **19**(11): p. 1892-5.

- 44. Fuchs, B., et al., *Lipid analysis by thin-layer chromatography- A review of the current state.* J Chromatogr A, 2011. **1218**(19): p. 2754-2774.
- 45. Srivastava, M., *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, M.M. SRIVASTAVA, Editor. 2011, Springer Ser. Sci.
- 46. SIOUFFI, A.M., C. DAUPHIN, and D. PRADEAU, *Chromatographie planaire. Partie 1.* TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR, 2007. **1473**: p. 1-19.
- 47. BRENNER, M., et al., *H. Theoretical Aspects of Thin-Layer Chromatography* Anal. Biochem, 1963. **6**(555): p. 75-133.
- 48. Dobson, G., W.W. Christie, and B. Nikolova-Damyanova, *Silver ion chromatography of lipids and fatty acids.* J Chromatogr B Biomed Appl, 1995. **671**(1-2): p. 197-222.
- 49. Allan, D. and S. Cockcroft, *A modified procedure for thin-layer chromatography of phospholipids*. J Lipid Res, 1982. **23**(9): p. 1373-4.
- 50. Wang, W.Q. and A. Gustafson, *One-dimensional thin-layer chromatographic separation* of phospholipids and lysophospholipids from tissue lipid extracts. J. Chromatogr., 1992. **581**(1): p. 139-42.
- 51. Touchstone, J.C., *Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation.* J Chromatogr B Biomed Appl, 1995. **671**(1-2): p. 169-95.
- 52. Turner, J.D. and G. Rouser, *Precise quantitative determination of human blood lipids by thin-layer and triethylaminoethylcellulose column chromatography. II. Plasma lipids.* Anal. Biochem., 1970. **38**(2): p. 437-45.
- 53. Wang, G. and T. Wang, *The role of plasmalogen in the oxidative stability of neutral lipids and phospholipids.* J Agric Food Chem, 2010. **58**(4): p. 2554-61.
- 54. Vitiello, F. and J.P. Zanetta, *Thin-layer chromatography of phospholipids*. J. Chromatogr., 1978. **166**(2): p. 637-40.
- 55. Fauland, A., et al., *A comprehensive method for lipid profiling by liquid chromatographyion cyclotron resonance mass spectrometry.* J. Lipid Res., 2011. **52**(12): p. 2314-2322.
- 56. Christie, W.W., Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. J. Lipid Res., 1985. **26**(4): p. 507-512.
- 57. Charlesworth, J.M., *Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography*. Anal. Chem, 1978. **50**(11): p. 1414-1420.
- 58. ChromaChem<sup>®</sup>. *Evaporative Light Scattering Detector*. [cited; Available from: <u>http://www.spectrotech.com.tw/esa/elsd.htm</u>.
- 59. Nukiyama, S. and Y. Tanasawa, *Reports 1-6.* Transactions of the Society of Mechanical Engineers, 1938: p. 1938-1940.
- 60. Christie, W.W., Separation of lipid classes by high-performance liquid chromatography with the mass detector•. J. Chromatogr. A, 1986. **361**: p. 396-399.
- 61. Hanin, I., et al., *Characterization of Lecithins and Phospholipids by HPLC with Light Scattering Detection*, in *Phospholipids*. 1990, Springer US. p. 295-298.
- 62. Deschamps, F.S., et al., Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. J. Chromatogr. A 2001. **928**(2): p. 127-137.
- 63. Grizard, G., et al., Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. J. Chromatogr. B : Biomedical Sciences and Applications, 2000. **740**(1): p. 101-107.
- 64. Privett, O.S., et al., *Studies on the lipid composition of developing soybeans*. J. Am. Oil Chem. Soc. , 1973. **50**(12): p. 516-520.
- 65. Der Meeren, P.V., et al., Simple and rapid method for high-performance liquid chromatographic separation and quantification of soybean phospholipids. J. Chromatogr. A, 1988. **447**: p. 436-442.

- 66. Breton, L., et al., *A new rapid method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection.* J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications, 1989. **497**: p. 243-249.
- 67. Becart, I., C. Chevalier, and J.P. Biesse, *Quantitative analysis of phospholipids by HPLC* with a light scattering evaporating detector application to raw materials for cosmetic use. J. High. Resolut. Chromatogr., 1990. **13**(2): p. 126-129.
- 68. Letter, W.S., A Rapid Method For Phospholipid Class Separation by HPLC using an Evaporative Light-Scattering Detector. J. Liq. Chromatogr., 1992. **15**(2): p. 253-266.
- 69. Mounts, T.L., S.L. Abidl, and K.A. Rennick, *HPLC analysis of phospholipids by evaporative laser light-scattering detection.* J. Am. Oil Chem. Soc. , 1992. **69**(5): p. 438-442.
- 70. Conforti, F.D., C.H. Harris, and J.T. Rinehart, *High-performance liquid chromatographic analysis of wheat flour lipids using an evaporative light scattering detector.* J. Chromatogr. A 1993. **645**(1): p. 83-88.
- Bunger, H. and U. Pison, *Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection*. J. Chromatogr. B : Biomedical Sciences and Applications, 1995. 672(1): p. 25-31.
- 72. Abidi, S.L. and T.L. Mounts, *High-performance liquid chromatography of phosphatidic acid.* J. Chromatogr. B : Biomedical Sciences and Applications, 1995. **671**(1-2): p. 281-297.
- 73. Vaghela, M.N. and A. Kilara, *Quantitative analysis of phospholipids from whey protein concentrates by high-performance liquid chromatography with a narrow-bore column and an evaporative light-scattering detector.* J. Am. Oil Chem. Soc. , 1995. **72**(6): p. 729-733.
- 74. Olsson, N.U., et al., *High-performance liquid chromatography method with light-scattering detection for measurements of lipid class composition: analysis of brains from alcoholics.* J. Chromatogr. B : Biomedical Sciences and Applications, 1996. **681**(2): p. 213-218.
- 75. Gunnarsson, T., et al., Separation of Polyphosphoinositides Using Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection or Electrospray Mass Spectrometry. Anal. Biochem., 1997. **254**(2): p. 293-296.
- 76. Silversand, C. and C. Haux, *Improved high-performance liquid chromatographic method* for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids. J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications, 1997. **703**(1-2): p. 7-14.
- 77. Landi, L., et al., *HPLC and light scattering detection allow the determination of phospholipids in biological samples and the assay of phospholipase A2.* IUBMB Life, 1998. **44**(6): p. 1157-1166.
- 78. Homan, R. and M.K. Anderson, *Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection.* J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **708**(1-2): p. 21-26.
- 79. Christie, W.W., *Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids.* Analusis, 1998. **26**(3): p. 34-39.
- 80. Eckard, P.R., L.T. Taylor, and G.C. Slack, *Method development for the separation of phospholipids by subcritical fluid chromatography.* J. Chromatogr. A 1998. **826**(2): p. 241-247.
- 81. Gunnarsson, T., et al., Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **705**(2): p. 243-249.
- 82. Sas, B., E. Peys, and M. Helsen, *Efficient method for (lyso)phospholipid class separation by high-performance liquid chromatography using an evaporative light-scattering detector.* J. Chromatogr. A 1999. **864**(1): p. 179-182.

- 83. De Miguel, I., A. Roueche, and D. Betbeder, Separation of dipalmitoyl phosphatidyl choline, cholesterol and their degradation products by high-performance liquid chromatography on a perfluorinated stationary bonded phase. J. Chromatogr. A 1999. **840**(1): p. 31-38.
- 84. Sugawara, T. and T. Miyazawa, Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. Lipids, 1999. **34**(11): p. 1231-1237.
- 85. Seppanen-Laakso, T., et al., *Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids.* J. Chromatogr. B : Biomedical Sciences and Applications, 2001. **754**(2): p. 437-445.
- 86. Stith, B.J., et al., *Quantification of major classes of Xenopus phospholipids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection.* J. Lipid Res., 2000. **41**(9): p. 1448-1454.
- 87. Yao, J.K., S. Leonard, and R.D. Reddy, *Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients*. Schizophrenia Research, 2000. **42**(1): p. 7-17.
- 88. Cert, A., W. Moreda, and M.C. Perez-Camino, *Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils.* J. Chromatogr. A, 2000. **881**(1-2): p. 131-148.
- 89. Hui Kang, D. and K. Ho Row, *Fractionation of soybean phospholipids by preparative highperformance liquid chromatography with sorbents of various particle size.* J. Chromatogr. A 2002. **949**(1-2): p. 217-223.
- 90. Yoon, T.H. and I.H. Kim, *Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2002. **949**(1-2): p. 209-216.
- 91. Genge, B.R., L.N.Y. Wu, and R.E. Wuthier, Separation and quantification of chicken and bovine growth plate cartilage matrix vesicle lipids by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection. Anal. Biochem., 2003.
  322(1): p. 104-115.
- 92. Descalzo, A.M., E.M. Insani, and N.A. Pensel, *Light-scattering detection of phospholipids resolved by HPLC.* Lipids, 2003. **38**(9): p. 999-1003.
- 93. Sala Vila, A., et al., *High-performance liquid chromatography with evaporative lightscattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids.* J. Chromatogr. A 2003. **1008**(1): p. 73-80.
- 94. Neron, S., et al., Separation and quantification by high-performance liquid chromatography with light scattering detection of the main wheat flour phospholipids during dough mixing in the presence of phospholipase. J. Chromatogr. A 2004. **1047**(1): p. 77-83.
- 95. Fagan, P. and C. Wijesundera, *Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids* with on-line pre-concentration. J. Chromatogr. A 2004. **1054**(1-2): p. 241-249.
- 96. Perona, J.S. and V. Ruiz-Gutierrez, *Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection.* J. Sep. Sci. , 2004. **27**(9): p. 653-659.
- 97. Rabinovich-Guilatt, L., et al., *Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2005. **61**(1-2): p. 69-76.
- 98. Sala-Vila, A., et al., *Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation.* Nutrition, 2005. **21**(4): p. 467-473.
- 99. Avalli, A. and G. Contarini, *Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD.* J. Chromatogr. A 2005. **1071**(1-2): p. 185-190.
- 100. Rombaut, R., J.V. Camp, and K. Dewettinck, *Analysis of Phospho- and Sphingolipids in Dairy Products by a New HPLC Method.* J. Dairy Sci. , 2005. **88**(2): p. 482-488.

- 101. Suzumura, M., *Phospholipids in marine environments: a review*. Talanta, 2005. **66**(2): p. 422-434.
- 102. Aradottir, S. and B. Olsson, Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. BMC Biochemistry, 2005. **6**(1): p. 18.
- 103. Rombaut, R. and K. Dewettinck, *Properties, analysis and purification of milk polar lipids.* J. Dairy Sci. , 2006. **16**(11): p. 1362-1373.
- 104. Jonnala, R.S., N.T. Dunford, and K.E. Dashiell, *Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars.* J. Food Comp. Anal., 2006. **19**(6-7): p. 601-605.
- 105. Rombaut, R., K. Dewettinck, and J. Van Camp, *Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD).* J. Food Comp. Anal., 2007. **20**(3-4): p. 308-312.
- 106. Fong, B.Y., C.S. Norris, and A.K.H. MacGibbon, *Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane*. J. Dairy Sci. , 2007. **17**(4): p. 275-288.
- 107. Ramos, R.G., et al., Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids. J Chromatogr A, 2008.
  1209(1-2): p. 88-94.
- 108. Lopez, C., et al., *Phospholipid, Sphingolipid, and Fatty Acid Compositions of the Milk Fat Globule Membrane are Modified by Diet.* J. Agric. Food. Chem., 2008. **56**(13): p. 5226-5236.
- Nair, L.M. and J.O. Werling, Aerosol based detectors for the investigation of phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical suspension formulation. J. Pharm. Biomed. Anal., 2009. 49(1): p. 95-99.
- 110. Graeve, M. and D. Janssen, *Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids.* J. Chromatogr. B, 2009. **877**(20-21): p. 1815-1819.
- 111. Mengesha, A. and P. Bummer, *Simple Chromatographic Method for Simultaneous Analyses of Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylcholine, and Free Fatty Acids.* AAPS PharmSciTech, 2010. **11**(3): p. 1084-1091.
- 112. Pelillo, M., et al., *Characterisation of the phospholipid fraction of hulled and naked tetraploid and hexaploid wheats.* J CEREAL SCI, 2010. **51**(1): p. 120-126.
- 113. Donato, P., et al., *Determination of phospholipids in milk samples by means of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to evaporative light scattering and mass spectrometry detection.* J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(37): p. 6476-6482.
- 114. Narvaez-Rivas, M., et al., *A new high-performance liquid chromatographic method with evaporative light scattering detector for the analysis of phospholipids. Application to Iberian pig subcutaneous fat.* J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(22): p. 3453-3458.
- 115. Imbert, L., et al., *Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in Leishmania donovani cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis.* Anal. Bioanal. Chem., 2012. **402**(3): p. 1169-82.
- 116. Montealegre, C., et al., *Molecular Characterization of Phospholipids by High-Performance Liquid Chromatography Combined with an Evaporative Light Scattering Detector, High-Performance Liquid Chromatography Combined with Mass Spectrometry, and Gas Chromatography Combined with a Flame Ionization Detector in Different Oat Varieties. J. Agric. Food. Chem., 2012.* **60**(44): p. 10963-10969.
- 117. Giuffrida, F., et al., *Quantification of Phospholipids Classes in Human Milk*. Lipids, 2013.
  48(10): p. 1051-1058.
- 118. Chamorro, L., et al., *Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: Application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis.* Clin. Chim. Acta, 2013. **421**: p. 132-139.

- 119. Lopez, C., V. Briard-Bion, and O. Menard, *Polar lipids, sphingomyelin and long-chain unsaturated fatty acids from the milk fat globule membrane are increased in milks produced by cows fed fresh pasture based diet during spring.* FOOD RES INT, 2014. **58**: p. 59-68.
- 120. Abrahamsson, V., I. Rodriguez-Meizoso, and C. Turner, *Supercritical fluid extraction of lipids from linseed with on-line evaporative light scattering detection.* Anal. Chim. Acta, 2015. **853**: p. 320-327.
- 121. Serna, J., et al., *Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry.* Chem. Phys. Lipids, 2015. **189**: p. 7-18.
- 122. Ferreiro, T., L. Gayoso, and J.L. Rodriguez-Otero, *Milk phospholipids: Organic milk and milk rich in conjugated linoleic acid compared with conventional milk.* J. Dairy Sci., 2015.
  98(1): p. 9-14.
- 123. Deschamps, F.S., et al., Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species. Chromatographia, 2001.
  54(9-10): p. 607-611.
- 124. Deschamps, F.S., A. Baillet, and P. Chaminade, *Mechanism of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid.* Analyst, 2002. **127**(1): p. 35-41.
- 125. Heron, S., M. Dreux, and A. Tchapla, *Post-column addition as a method of controlling triacylglycerol response coefficient of an evaporative light scattering detector in liquid chromatography-evaporative light-scattering detection.* J. Chromatogr. A, 2004. **1035**(2): p. 221-225.
- 126. Dixon, R.W. and D.S. Peterson, *Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging*. Anal Chem, 2002. **74**(13): p. 2930-7.
- 127. Moreau, R.A., M.J. Powell, and K.B. Hicks, *Extraction and Quantitative Analysis of Oil from Commercial Corn Fiber.* J. Agric. Food. Chem., 1996. **44**(8): p. 2149-2154.
- 128. Moreau, R., M. Powell, and V. Singh, *Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol.* J. Am. Oil Chem. Soc., 2003. **80**(11): p. 1063-1067.
- 129. Moreau, R. and K. Hicks, *The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes.* Lipids, 2004. **39**(8): p. 769-776.
- 130. Moreau, R. and K. Hicks, *The composition of corn oil obtained by the alcohol extraction of ground corn.* J. Am. Oil Chem. Soc., 2005. **82**(11): p. 809-815.
- 131. Kamal-Eldin, A., et al., Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: Comparison of different chromatographic columns. J. Chromatogr. A, 2000. **881**(1-2): p. 217-227.
- 132. Lisa, M., et al., *Quantitation of triacylglycerols from plant oils using charged aerosol detection with gradient compensation.* J. Chromatogr. A, 2007. **1176**(1-2): p. 135-142.
- 133. Diaz-Lopez, R., et al., *Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector.* J Pharm Biomed Anal, 2008. **48**(3): p. 702-7.
- 134. De Hoffman, E., J. Charrette, and V. Stroobant, *Spectrométrie de Masse. 1ère Ed.* Masson, 1994: p. 1-10.
- 135. Richardin, P., Les Techniques d'Ionisation en Spectrométrie de Masse Application à l'Étude des Œuvres d'Art.
- 136. Hoppillard, Y., 20 ans de rétrospective en spectrométrie de masse organique et bioorganique. Spectra 2000, 1991. **19**(159): p. 16-24.
- 137. Botter, R., *Développements récents en spectrométrie de masse* Spectra 2000 analyse, 1996. **25**(191): p. 13-16.
- 138. Sanglier, S., Cours de spectrométrie de masse. 2005.
- 139. Bouchonnet, S. and D. Libong, *Le couplage chromatographie en phase gazeusespectrométrie de masse.* L'actualité chimique, 2004. **275**: p. 7-14.

- 140. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme.* J. Phys. Chem. C, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
- 141. Hayati, I., A.I. Bailey, and T.F. Tadros, *Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids: I. Effect of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization.* J. Colloid Interface Sci., 1987. **117**(1): p. 205-221.
- 142. Hendricks, J.C.D. and R.J. Pfeifer, *Parametric studies of electrohydrodynamic spraying*. AIAA Journal, 1968. **6**(3): p. 496-502.
- 143. Staniforth, M. and V.G. Stavros, *Recent advances in experimental techniques to probe fast excited-state dynamics in biological molecules in the gas phase: dynamics in nucleotides, amino acids and beyond.* Proc Math Phys Eng Sci, 2013. **469**(2159): p. 20130458.
- 144. Bouchoux, G. and M. Sablier, *Spectrométrie de masse Principe et appareillage*. Techniques de l'Ingénieur, 2005. **2645**: p. 1-32.
- 145. Nguyen, S. and J.B. Fenn, *Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1111-7.
- 146. Amad, M.H., et al., Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. J Mass Spectrom, 2000. **35**(7): p. 784-9.
- 147. Ikonomou, M.G., A.T. Blades, and P. Kebarle, *Electrospray mass spectrometry of methanol and water solutions suppression of electric discharge with SF6 gas.* J Am Soc Mass Spectrom, 1991. **2**(6): p. 497-505.
- 148. Taylor, G., *Disintegration of water drops in an electric field.* Proc. R. Soc. London, Ser. , 1964. **280**(1382): p. 383-397.
- 149. Kostiainen, R. and T.J. Kauppila, *Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry.* J Chromatogr A, 2009. **1216**(4): p. 685-99.
- 150. Antignac, J.-P., et al., *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis.* Anal. Chim. Acta, 2005. **529**(1-2): p. 129-136.
- 151. Sterner, J.L., et al., *Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples.* J. Mass Spectrom., 2000. **35**(3): p. 385-91.
- 152. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization.* J Am Soc Mass Spectrom, 2000. **11**(11): p. 942-50.
- 153. Blaum, K., et al., *Properties and performance of a quadrupole mass filter used for resonance ionization mass spectrometry*. Int J Mass Spectrom, 1998. **181**(1–3): p. 67-87.
- 154. Scigelova, M., et al., *Fourier Transform Mass Spectrometry*. Mol Cell Proteomics : MCP, 2011. **10**(7): p. M111.009431.
- 155. IMBERT, L., Développement d'outils chimiométriques pour l'étude des traitements antileishmaniens. 2012, Paris-sud. p. 52.
- 156. Imbert, L., et al., *Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of Leishmania donovani.* J. Chromatogr. A, 2012. **1242**(0): p. 75-83.
- 157. Moehring, T., et al., *Essential Lipidomics Experiments using the LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer*, T.F. Scientific, Editor. 2006, Thermo Fisher Scientific.
- 158. Denisov, E., et al., *Tandem Mass Spectrometry in an LTQ Orbitrap Mass Spectrometer using Multiple Fills*, T.F. Scientific, Editor. 2006, Thermo Fisher Scientific.
- 159. Protéines, P.d.I.C.A.d. *Caractéristiques du spectromètre de masse LTQ-Orbitrap*. [cited; Available from: https://<u>www.u-picardie.fr/plateforme/icap/orbitrap.html</u>.
- 160. Makarov, A. and M. Scigelova, *Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry.* J Chromatogr A, 2010. **1217**(25): p. 3938-45.
- 161. Rusconi, F., *Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes*. Tec & Doc Lavoisier ed. 2011.

- 162. *Thermo Scientific Orbitrap Technology Principle of Operation*, T.F. Scientific, Editor. 2006, Thermo Fisher Scientific.
- 163. LTQ Orbitrap: a novel hybrid mass spectrometer with superior mass accuracy, mass resolution, dynamic range and detection power, T.F. Scientific, Editor. 2006, Thermo Fisher Scientific.
- 164. Lydic, T.A., et al., Complementary precursor ion and neutral loss scan mode tandem mass spectrometry for the analysis of glycerophosphatidylethanolamine lipids from whole rat retina. Anal. Bioanal. Chem., 2009. **394**(1): p. 267-75.
- 165. Taguchi, R., et al., *Focused lipidomics by tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **823**(1): p. 26-36.
- 166. Clay, K., L. Wahlin, and M. RC, *Interlaboratory reproducibility of fast atom bombardment mass spectral data.* Biomed Mass Spectrom, 1983. **10**: p. 489-494.
- 167. Han, X. and R.W. Gross, *Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples.* Mass Spectrom. Rev., 2005. **24**(3): p. 367-412.
- 168. Han, X. and R.W. Gross, Structural Determination of Lysophospholipid Regioisomers by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. J. Amer. Chem. Soc., 1996. **118**(2): p. 451-457.
- 169. Seppanen, L.T. and M. Oresic, *How to study lipidomes.* J Mol Endocrinol, 2009. **42**: p. 185-190.
- 170. Estrada, R. and M.C. Yappert, *Regional phospholipid analysis of porcine lens membranes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.* J. Mass Spectrom, 2004. **39**(12): p. 1531-1540.
- 171. Myers, D.S., et al., *Quantitative analysis of glycerophospholipids by LC-MS: acquisition, data handling, and interpretation.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 748-57.
- 172. Ivanova, P.T., et al., *Electrospray ionization mass spectrometry analysis of changes in phospholipids in RBL-2H3 mastocytoma cells during degranulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7152-7157.
- 173. Lessig, J., et al., Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and 31 P NMR spectroscopy. Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol., 2004. **137**(2): p. 265-277.
- 174. Griffiths, W.J., *Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids.* Mass Spectrom. Rev., 2003. **22**(2): p. 81-152.
- 175. Cole, M.J. and C.G. Enke, Direct determination of phospholipid structures in microorganisms by fast atom bombardment triple quadrupole mass spectrometry. Anal Chem, 1991. **63**(10): p. 1032-8.
- 176. Lindgren, F.T., et al., *Analysis of low-density lipoproteins by preparative ultracentrifugation and refractometry*. J. Lipid Res., 1964. **5**(1): p. 68-74.
- 177. Bernhard, W., et al., *High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Phospholipids from Different Sources with Combined Fluorescence and Ultraviolet Detection.* Anal. Biochem., 1994. **220**(1): p. 172-180.
- 178. Vehovec, T. and A. Obreza, *Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector.* J. Chromatogr. A, 2010. **1217**(10): p. 1549-1556.
- 179. Almeling, S., D. Ilko, and U. Holzgrabe, *Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis.* J. Pharm. Biomed. Anal., 2012. **69**: p. 50-63.
- 180. Moreau, R.A., *The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector*. Lipids, 2006. **41**(7): p. 727-734.
- 181. Moreau, R.A., *Lipid analysis via HPLC with a charged aerosol detector*. Lipid Technology, 2009. **21**(8-9): p. 191-194.
- 182. Kielbowicz, G., P. Micek, and C. Wawrzenczyk, A new liquid chromatography method with charge aerosol detector (CAD) for the determination of phospholipid classes. Application to milk phospholipids. Talanta, 2013. **105**: p. 28-33.
- 183. Scholfield, C.R., *Composition of soybean lecithin*. J AM OIL CHEM SOC, 1981. **58**(10): p. 889-892.
- 184. Christie, W.W., *Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids.* Lipids, 1998. **33**(4): p. 343-353.
- 185. Wu, W.W., et al., *Discovery- and target-based protein quantification using iTRAQ and pulsed Q collision induced dissociation (PQD).* J Proteomics, 2012. **75**(8): p. 2480-7.
- 186. Koivusalo, M., et al., *Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response.* J Lipid Res, 2001. **42**(4): p. 663-672.
- 187. Brugger, B., et al., *Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2339-44.
- 188. Duffin, K.L., J.D. Henion, and J.J. Shieh, *Electrospray and tandem mass spectrometric characterization of acylglycerol mixtures that are dissolved in nonpolar solvents*. Anal Chem, 1991. **63**(17): p. 1781-8.
- 189. Laakso, P. and P. Voutilainen, Analysis of triacylglycerols by silver-ion high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Lipids, 1996. **31**(12): p. 1311-22.
- 190. Fridriksson, E.K., et al., *Quantitative Analysis of Phospholipids in Functionally Important Membrane Domains from RBL-2H3 Mast Cells Using Tandem High-Resolution Mass Spectrometry.* Biochemistry, 1999. **38**(25): p. 8056-8063.
- 191. Remane, D., et al., *Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. **24**(21): p. 3103-8.

Caractérisation des classes de standards phospholipidiques et caractérisation des lécithines (lécithine de soja et lécithine de jaune d'œuf)



Figure 39: Représentation du courant ionique total en MS d'une lécithine et des standards de phospholipides à 0,5g/L (mode négatif).



Figure 40: Représentation du courant ionique total en MS de la lécithine d'origine animale et d'origine végétale à 0.5 g/L (mode négatif).



Figure 41: Représentation du courant ionique total en MS, de la lécithine, des phospholipides d'origine animale, d'origine végétale et du chloroforme (les blancs), en ionisations positive et négative.



Figure 42: Représentation du courant ionique total des PC de jaune d'œuf, (ionisation en mode positif); sélection de l'intervalle de rétention des ions les plus abondants, affichage de la MS<sup>1</sup>, la MS<sup>2</sup> et la MS<sup>3</sup>; attribution des ions par calcul et recours à la base de données Lipid-Maps. L'exemple présenté est sur l'ion à 762.59 g.mol<sup>-1</sup>. Ce travail est réalisé sur tous les ions pour chaque phospholipide.

<b>L-α-acide phosphatidique, PA,</b> Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids, Inc.				
Source	animale	Ionisation positive	Ionisation négative	
			PA (16:0/18:1) <i>m/z 674,4887</i>	
Sel de	sodium		PA (16:0/18:2) <i>m/z 672,4730</i>	
Formule : 0 Masse molécu	$C_{37}H_{70}NaO_8P$ laire moyenne :	PA (16:0/18:1) <i>m/z 674.4887</i>	PA (18:0/18:2) et PA (18:1/18:1) m/z 700.5043	
706 Chaînes d	acides gras	PA (16:0/18:2) <i>m/z 672.4730</i>	PA (18:0/18:1) <i>m/z 702,5200</i>	
attendues	: C16 et C18		PA (18:0/20:4) <i>m/z 724,5043</i>	
			PA (16:0/22:5) <i>m/z 722,4887</i>	
Source	végétale	Ionisation positive	Ionisation négative	
Sel de	sodium		PA (18:2/18:2) m/z 696,4730	
Formule : C	C <sub>37</sub> H <sub>68</sub> NaO <sub>8</sub> P	PA (16:0/18:1) <i>m/z 674.4887</i>	PA (16:0/18:2) m/z 672,4730	
Masse molecu 711	laire moyenne :	PA (16:0/18:2) <i>m/z 672.4730</i>	PA (18:1/18:2) m/z 698,4887	
Chaînes d' attendues	'acides gras : C16 et C18	PA (16:1/18:2) <i>m/z 670.4574</i>	PA (18:0/18:2) ou PA (18:1/18:1) m/z 700.5043	
lons observés	MS	$[PA+TEA+H]^{+}$ $[PA+TEA+Na]^{+}$	[PA-H] <sup>-</sup>	
	MS <sup>2</sup> et MS <sup>3</sup>	$\left[ fa(sn)+H  ight]^{+}$ $\left[ fa(sn1)+fa(sn2)+H  ight]^{+}$	[lysoPA-H] <sup>-</sup> [Glycérolphosphate-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	

Tableau 14: Structures hypothétiques pour PA de jaune d'œuf et PA de soja en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>.

Tableau 15: Caractérisation de standard de PA, issu de jaune d'œuf, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

PA (Jaune d'œuf)			
Intensité relative %	lonisation positive	Ionisation négative	Intensité relative %
		РА	
100	PA(16:0/18:1)	PA(16:0/18:1)	100
63.52	PA(16:0/18:2)	PA(16:0/18:2)	61.17
		PA(18:0/18:2) and PA(18:1/18:1)	35.99
		PA(18:0/18:1)	25.95
		PA(18:0/20:4)	18.51
		PA(16:0/22:5)(+), PA(18:1/20:4)(-)	8.79

Tableau 16: Caractérisation de standard de PA, issu de soja, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

PA (soja)			
Intensité relative %	Ionisation positive	Ionisation négative	Intensité relative %
		РА	
100	PA(16:0/18:1)	PA(18:2/18:2)	100
53.57	PA(16:0/18:2)	PA(16:0/18:2)	65.34
5.15	PA(16:1/18:2)	PA(18:1/18:2)	50.41
		PA(18:0/18:2) or PA(18:1/18:1)	22.4
		PA(16:0/18:1)	10.15

Tableau 17: Structures hypothétiques pour PI de bovin et PI de soja en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>.

L-α-phosphatidylinositol, PI, Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids, Inc.				
Source	animale	lonisation positive	Ionisation négative	
			PI (18:0/20:4) m/z <i>886,5571</i>	
		PI (18:1/20:2) m/z 888.5728	PI (18:0/20:3) m/z <i>888,5728</i>	
Sel de Formule : C	sodium <sub>47</sub> H <sub>82</sub> NaO <sub>13</sub> P	PI (18:1/20:3) m/z <i>886.5571</i>	PI (18:0/18:2) et PI (19:0/17:2) m/z <i>862,5571</i>	
Masse molécul	laire moyenne :	PI (18:1/18:1) m/z <i>862.5571</i>	PI (18:0/18:1) m/z <i>864,5728</i>	
902 Chaînes d'acides	.133 gras attendues :	PI (18:0/18:1) m/z <i>864.5728</i>	PI (18:0/20:2) m/z <i>890,5884</i>	
C18 e	et C20	PI (16:0/18:1) m/z <i>836.5415</i>	PI (16:0/18:1) m/z <i>836,5415</i>	
			PI (18:0/22:4) m/z <i>914,5884</i>	
			PI (18:0/22:5) m/z <i>912,5728</i>	
Source	végétale	lonisation positive	Ionisation négative	
			PI (16:0/18:2) m/z <i>834,5228</i>	
Sel de	sodium		PI (18:0/18:2) m/z <i>862,5571</i>	
Formule : C	<sub>43</sub> H <sub>78</sub> NaO <sub>13</sub> P	PI (34:2) m/z <i>834.5258</i>	PI (16:0/18:1) m/z <i>836,5415</i>	
Masse molecul	laire moyenne :	PI (36:2) m/z <i>862.5571</i>	PI (16:0/18:3) m/z <i>832,5102</i>	
Chaînes d'acides	gras attendues :	PI (18:1/18:3) m/z <i>858.5258</i>	PI (18:2/18:2) m/z <i>858,5258</i>	
C	18		PI (18:1/18:2) m/z <i>860,5415</i>	
			PI (18:2/18:3) m/z <i>856,5102</i>	
long	MS	[PI+TEA+H] <sup>+</sup>	[PI-H] <sup>-</sup>	
ions observés	MS <sup>2</sup> et MS <sup>3</sup>	$\left[ fa(sn)+H  ight]^{+}$ [fa(sn1)+fa(sn2)+Na] <sup>+</sup>	[lysoPI-H] <sup>-</sup> [Inositolphosphate] <sup>-</sup> m/z 241	

PI (Bovin)			
Intensité relative %	Ionisation positive	Intensité relative %	
		PI	
100	PI(20:2/18:1)	PI (18:0/20:4)	100
93.24	PI(20:3/18:1)	PI(18:0/20:3)	98.47
69.19	PI(18:1/18:1)	PI(18:0/18:2) and PI (19:0/17:2)	65.47
66.71	PI(18:0/18:1)	PI(18:0/18:1)(+)and PI(19:0/17:1)(-)	62.7
23.94	PI(16:0/18:1)	PI(18:0/20:2)	24.85
		PI (16:0/18:1)	20.69
		PI (18:0/22:4)	12.4
		PI(18:0/22:5)	10.06

Tableau 18: Caractérisation de standard de PI, issu de Bovine, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

Tableau 19: Caractérisation de standard de PI, issu de Soja, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

	PI (Soja)			
Intensité relative %	lonisation positive	lonisation négative	Intensité relative %	
		PI		
100	PI(34:2)	PI(16:0/18:2)	100	
22.84	PI(36:2)	PI (18:0/18:2)	21.01	
16.38	PI(18:1/18:3)	PI(16:0/18:1)	18.67	
		PI(16:0/18:3)	15.22	
		PI(18:2/18:2)	13.92	
		PI(18:2/18:1)	12.57	
		PI(18:2/18:3)	2.37	

#### Tableau 20: Structures hypothétiques pour PE de jaune d'œuf et PE de soja en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>.

L-α-phosphatidyléthanolamine, PE, Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids, Inc.				
Source a	nimale	lonisation positive	lonisation négative	
			PE (16:0/18:1) m/z <i>717,5309</i>	
			PE (18:0/20:4) m/z <i>767,5465</i>	
		PE (16:0/18:1) m/z <i>717,5309</i>	PE (18:0/18:2) m/z <i>743,5465</i>	
		PE (18:1/18:1) m/z <i>743,5465</i>	PE (18:0/18:1) m/z <i>745,5622</i>	
Formule : C	41H78NO8P	PE (16:1/18:1) ou PE(16:0/18:2) m/z	PE (16:0/18:2) m/z 715,5152	
Masse molécula	ire moyenne :	715,5152	PE (18:1/18:3) m/z 739,5152	
746.0 Chaînes d'acides	gras attendues :	PE (16:0/18:0) m/z 719,5465	PE (16:0/22:5) m/z <i>765,5309</i>	
C12	8	PE (36:0) m/z <i>747,5778</i>	PE (18:1/18:2) m/z 741,5309	
			PE (18:0/22:6) m/z <i>791.5465</i>	
			PE (18:0/22:5) m/z <i>793.5622</i>	
			PE (18:0/20:3) m/z 769.5622	
			PE (16:0/18:0) m/z 719.5465	
Source v	égétale	Ionisation positive	lonisation négative	
			PE (16:0/18:2) m/z 715,5152	
Formule : C	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> NO <sub>8</sub> P	PE (16:0/18:2) m/z 715,5152	PE (18:2/18:2) m/z <i>739,5152</i>	
Masse molécula	iire moyenne :	PE (16:0/18:1) m/z <i>717,5309</i>	PE (18:1/18:2) m/z <i>741,5309</i>	
Chaînes d'acides	ras attendues :	PE (16:0/20:3) m/z <i>741,5309</i>	PE (16:0/18:1) m/z <i>717,5309</i>	
C16 et	C18	PE (16:0/20:2) m/z 743,5465	PE (18:2/18:3) m/z 737,4996	
			PE (18:0/18:2) m/z 743,5465	
		[PE+TEA+H] <sup>+</sup>	[PE-H] <sup>-</sup>	
long cheamsta	MS	[PE+TEA+Na] <sup>+</sup>	[PE-(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )-H] <sup>-</sup>	
ions observes	MS <sup>2</sup> et MS <sup>3</sup>	$[fa(sn)+H]^+$	[fa(sn)-H]	
		[DG(sn1/sn2)]⁺	[lysoPE-H]	

	PE (Jai	une d'œuf)	
Intensité relative %	lonisation positive	Ionisationnégative	Intensité relative %
		PE	
100	PE(16:0/18:1)	PE (16:0/18:1)	100
79.15	PE(18:1/18:1)	PE (18:0/20:4)	93.22
53.35	PE(16:1/18:1) or PE(16:0/18:2)	PE (18:0/18:2)	78.22
16.47	PE (16:0/18:0)	PE (18:0/18:1)	69.04
15.77	PE(36:0)	PE(16:0/18:2), PE(16:1/18:1)()	54.12
		PE (18:1/18:3)	25.31
		PE(16:0/22:5)	24.48
		PE (18:1/18:2)	16.44
		PE (18:0/22:6) (++)	11.56
		PE (18:0/22:5)	11.37
		PE (18:0/20:3)	11.02
		PE (16:0/18:0)	9.49
		PE(18:0/22:6)(++),PE (18:1/22:5)()	7.41

Tableau 21: Caractérisation de standard de PE, issu de jaune d'œuf, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

Tableau 22: Caractérisation de standard de PE, issu de Soja, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

PE (Soja)			
Intensité relative %	lonisation positive	lonisation négative	Intensité relative %
		PE	
100	PE(18:2/16:0)	PE (16:0/18:2)	100
86.79	PE(18:1/16:0)	PE (18:2/18:2)	88.47
39.87	PE(16:0/20:3)	PE (18:1/18:2)	37.6
16.55	PE(16:0/20:2)	PE (16:0/18:1)	22.93
		PE (18:2/18:3)	16.31
		PE (18:0/18:2)	16.26

Tableau 23: Structures hypothétiques pour PC de jaune d'œuf et PC de soja en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>.

L-α-phosphatidylcholine, PC, Avanti <sup>®</sup> Polar Lipids, Inc.				
Source a	nimale	lonisation positive	Ionisation négative	
		PC (16:0/18:1) m/z <i>759,5778</i>	PC (16:0/18:1) m/z <i>759,5767</i>	
Formule : C	<sup>12</sup> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PC (16:1/18:1) m/z 757,5622	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	
Masse moleculaire n Chaînes d'acides gra	noyenne : 770.123	PC (16:0/18:0) m/z 761,5935	PC (18:0/18:2) m/z <i>785,5935</i>	
et C	18	PC (18:1/18:1) m/z 786,6007	PC (18:0/18:1) m/z <i>787,6091</i>	
			PC (16:0/18:0) m/z <i>761,5935</i>	
Source ve	égétale	Ionisation positive	Ionisation négative	
		PC (18:2/18:2) m/z 781,5622	PC (18:2/18:2) m/z <i>781,5622</i>	
Formule : C	<sup>12</sup> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	PC (16:0/18:2) m/z <i>757,5622</i>	
Masse moleculaire n Chaînes d'acides gra	noyenne : 775.037	PC (18:1/18:2) m/z <i>783,5778</i>	PC (18:1/18:2) m/z <i>783,5778</i>	
et C	18	PC (16:0/18:1) m/z <i>759,5778</i>	PC (18:0/18:2) m/z 785,5935	
			PC (16:0/18:1) m/z <i>759,5767</i>	
lons observés	MS	$[PC+H]^{+}$ $[PC+Na]^{+}$ $[PC+TEA+H]^{+}$ $[2PC+H]^{+}$	[PC+CI] <sup>-</sup> [PC+OAc] <sup>-</sup> [PC-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
ions observes	MS <sup>2</sup> et MS <sup>3</sup>	$\left[ DG(sn1/sn2)  ight]^{+}$ $\left[ lysoPC+H  ight]^{+}$ $\left[ Phosphocholine  ight]^{+} m/z=184$	[fa(sn)-H] <sup>¯</sup> [lysoPC-CH₃] <sup>¯</sup>	

PC (Jaune d'œuf)				
Intensité relative %	lonisation positive	lonisation négative	Intensité relative %	
PC				
100	PC(16:0/18:1)	PC (16:0/18:1)	100	
63.26	PC(16:1/18:1)	PC (16:0/18:2)	62.27	
44.79	PC(16:0/18:0)	PC (18:0/18:2)	29.73	
30.64	PC(18:1/18:1)	PC (18:0/18:1)	21.81	
		PC (16:0/18:0)	11.96	

Tableau 24: Caractérisation de standard de PC, issu de jaune d'œuf, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

Tableau 25: Caractérisation de standard de PC, issu de Soja, par LTQ-Orbitrap en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

PC (Soja)			
Intensité relative %	lonisation positive	lonisation négative	Intensité relative %
		РС	
100	PC(18:2/18:2)	PC (18:2/18:2)	100
64.61	PC(16:0/18:2)	PC (16:0/18:2)	67.19
48.06	PC(18:1/18:2)	PC (18:1/18:2)	49.26
30	PC(18:1/16:0)	PC(18:0/18:2) and PC(18:1/18:1)	21.16
		PC (16:0/18:1)	14.88

Tableau 26:Structures hypothétiques pour la lécithine de jaune d'œuf et de soja ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>.

Lécithine Sigma-Aldrich®						
Source animale	Ionisation positive	Ionisation négative				
		PE				
-		PE (18:0/20:4) m/z 767,5465				
	PE (18:2/20:2) <i>m/z 767.5465</i>	PE (18:0/18:2) m/z 743,5465				
	PE (16:0/20:2) m/z <i>743,5465</i>	PE (18:0/18:1) m/z 745.5622				
	PE (16:0/18:2) m/z 715,5152	PE (16:0/18:1) m/z 717.5309				
	PE (17:0/19:0) m/z <i>761,5935</i>	PE (16:0/18:2) m/z 715.5152				
	PE (16:0/22:2) m/z 771.5778	PE (18:0/22:6) m/z 791.5465				
Informations non disponibles dans la		PE (36:4) m/z 739.5152				
fiche de spécification du fournisseur		PE (18:1/18:2) m/z 741.5309				
-		PC				
-		PC (16:0/18:1) m/z 759,5767				
	PC (16:0/18:1) m/z 759.5778	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622				
	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	PC (18:0/18:2) m/z 785,5935				
	PC (18:1/18:1) m/z 786,6007	PC (18:0/18:1) m/z 787,6091				
	PC (16:0/18:0) m/z 761,5935	PC (16:0/18:0) m/z 761,5935				
		PC (18:1/18:2) m/z 783.5778				
Source végétale	Ionisation positive	Ionisationnégative				
		РА				
		PA (18:2/18:2) m/z <i>696,4730</i>				
		PA (16:0/18:2) m/z <i>672,4730</i>				
		PA (18:1/18:2) m/z <i>698,4887</i>				
	PA (16:0/18:1) m/z <i>674.4887</i>	PA (16:0/18:3) m/z <i>670.4574</i>				
		PA (18:0/18:2) ou PA (18:1/18:1)				
		m/z <i>700.5043</i>				
		PA (16:0/18:1) m/z <i>674.4887</i>				
-		PA (18:2/18:2) m/z <i>696,4730</i>				
		PI				
<u>Composition theorique:</u> 64% C18:2 (acide lipoláique)	PI (34:2) m/z <i>834,5258</i>	PI (16:0/18:2) m/z <i>834,5258</i>				
13% C16:0 (acide palmitique)	PI (17:1/19:1) m/z <i>862,5571</i>	PI (18:0/18:2) m/z <i>862,5571</i>				
10% C18:1 (acide oléique)		PI (16:0/18:3) m/z <i>832,5102</i>				
6% C18:3 (acide linolénique)		PI (18:2/18:2) m/z <i>858,5258</i>				
4% C18:0 (acide stearique)		PE				
		PE (16:0/18:2) m/z 715,5152				
	PE (16:0/18:1) m/z <i>717,5309</i>	PE (18:2/18:2) m/z 739,5152				
	PE (16:0/18:0) m/z <i>719,5465</i>	PE (18:1/18:2) m/z 741,5309				
	PE (18:0/19:2) m/z 757,5622	PE (16:0/18:1) m/z 717,5309				
		PE (36:2) m/z 743,5465				
-		PC				
	PC (18:2/18:2) m/z 781,5622	PC (18:2/18:2) m/z 781,5622				
	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622				
	PC (18:1/18:2) m/z <i>783,5778</i>	PC (18:1/18:2) m/z <i>783,5778</i>				
	PC (16:0/18:1) m/z 759.5778					

	Lécithi	Lécithine de soja						
Intensité relative %	Ionisation positive Ionisation négative		Intensité relative %					
	ΡΑ							
		PA (18:2/18:2) m/z 696,4730	100					
		PA (16:0/18:2) m/z 672,4730	79.9					
		PA (18:1/18:2) m/z 698,4887	47.37					
100	PA (16:0/18:1) m/z <i>674.4887</i>	PA (16:0/18:3) m/z 670.4574	43.71					
		PA (18:0/18:2) or PA (18:1/18:1) m/z 700.5043	22					
		PA (16:0/18:1) m/z 674.4887	13.85					
		PA (18:2/18:2) m/z 696,4730	4.89					
	PI							
100	PI (34:2) m/z 834,5258	PI (16:0/18:2) m/z 834,5258	100					
21.07	PI (17:1/19:1) m/z 862,5571	PI (18:0/18:2) m/z 862,5571	19.8					
		PI (16:0/18:3) m/z 832,5102	13.02					
		PI (18:2/18:2) m/z 858,5258	12.67					
PE								
		PE (16:0/18:2) m/z 715,5152	100					
100	PE (16:0/18:1) m/z 717,5309	PE (18:2/18:2) m/z 739,5152	89.31					
45.01	PE (16:0/18:0) m/z 719,5465	PE (18:1/18:2) m/z 741,5309	42.24					
35.62	PE (18:0/19:2) m/z 757,5622	PE (16:0/18:1) m/z 717,5309	24.14					
		PE (36:2) m/z 743,5465	23.83					
PC								
100	PC (18:2/18:2) m/z 781,5622	PC (18:2/18:2) m/z 781,5622	100					
69.12	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	30.47					
54.21	PC (18:1/18:2) m/z 783,5778	PC (18:1/18:2) m/z 783,5778	24.23					
17.2	PC (16:0/18:1) m/z 759.5778							

Tableau 27:Caractérisation des classes de phospholipides dans la lécithine de soja (PA, PI, PE et PC) par LTQ-Orbitrap en ESI <sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup>. Les données sont affichées en abondance relative.

Tableau 28:	Caractérisation des classes de phospholipides dans la lécithine de jaune d'œuf (PE et PC) par LTQ-Orbit	trap en
ESI <sup>+</sup> et ESI <sup>-</sup> .	Les données sont affichées en abondance relative.	

Lécithine de jaune d'œuf							
Intensité relative %	lonisation positive	Ionisation négative	Intensité relative %				
	PE						
		PE (18:0/20:4) m/z 767,5465	100				
100	PE (18:2/20:2) m/z 767.5465	PE (18:0/18:2) m/z 743,5465	78.98				
75.25	PE (16:0/20:2) m/z 743,5465	PE (18:0/18:1) m/z 745.5622	60.68				
37.77	PE (16:0/18:2) m/z 715,5152	PE (16:0/18:1) m/z 717.5309	57.67				
28.64	PE (17:0/19:0) m/z 761,5935	PE (16:0/18:2) m/z 715.5152	41.55				
15.93	PE (16:0/22:2) m/z 771.5778	PE (18:0/22:6) m/z 791.5465	21.24				
		PE (36:4) m/z 739.5152					
		PE (18:1/18:2) m/z 741.5309	15.9				
PC							
		PC (16:0/18:1) m/z 759,5767	100				
100	PC (16:0/18:1) m/z 759.5778	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	68.89				
70.92	PC (16:0/18:2) m/z 757,5622	PC (18:0/18:2) m/z 785,5935	37.6				
17.78	PC (18:1/18:1) m/z 786,6007	PC (18:0/18:1) m/z 787,6091	27.06				
10.21	PC (16:0/18:0) m/z 761,5935	PC (16:0/18:0) m/z 761,5935	11.36				
		PC (18:1/18:2) m/z 783.5778	9.37				

#### Les espèces moléculaires utilisées

	AVANTI POLAR LIPIDS					
	Nom	Référence	Stabilité	Masse moléculaire en g/mol	Structure	Nomenclature LM_ID
	I	I	I	Γ	1	ſ
PA	08:0 PA	830842P	1 an	446.448		LMGP10010021
	16:0 PA	830855P	1 an	670.873	Долого он у обно он Nat	LMGP10010027
	08:0 PC	850315P	1 an	509.614		LMGP01011251
	12:0 PC (DLPC)	850335P	1 an	621.826		LMGP01010429
	14:0 PC (DMPC)	850345P	2 ans	677.933		LMGP01010477
	16:0 PC (DPPC)	850355P	2 ans	734.039		LMGP01010564
PC	18:0 PC (DSPC)	850365P	2 ans	790.145		LMGP01010006
	20:0 PC	850368P	1 an	846.252		LMGP01011014
	22:0 PC	850371P	1 an	902.358		LMGP01011099
	24:0 PC	850373P	1 an	958.464		LMGP01011159
	14:0- 16:0 PC	850445P	1 an	705.986		LMGP01010481
	16:0- 18:0 PC	850456P	1 an	762.092		LMGP01010573

	18:0- 14:0 PC	850464P	1 an	734.039		LMGP01010739
	14:0- 18:0 PC	850446P	1 an	734.039	Look of the state	LMGP01010488
	16:0- 18:1 PC	850457P	6 mois	760.076		LMGP01010005
	16:0- 18:2 PC	850458P	3 mois	758.06		LMGP01010594
	18:0- 18:1 PC	850467P	6 mois	788.129		LMGP01010761
	18:0- 18:2 PC	850468P	3 mois	786.113		LMGP01010768
	16:0- 20:4 PC	850459C	3 mois	782.082		LMGP01010007
	18:2 (Cis) PC (DLPC)	850385P	3 mois	782.082		LMGP01010930
	18:1 (Δ6-Cis) PC	850374P	6 mois	786.113		LMGP01010868
	18:1 (Δ9-Cis) PC (DOPC)	850375P	6 mois	786.113		LMGP01010890
PE	08:0 PE	850699P	1 an	467.534		LMGP02010102
	16:0 PE	850705P	1 an	691.959		LMGP02010037
Id	08:0 PI	850181P	1 an	603.637		LMGP06010000

Les spectres de masse pour quelques espèces moléculaires de PLS

A) Exemple des spectres de masse des espèces moléculaires de différentes classes de PLs en ionisation en mode négatif



Figure 43: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour la PC(8:0/8:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PC+OAc]<sup>-</sup>, [PC+CH3]<sup>-</sup>.



Figure 44: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour la PC(24:0/24:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PC+OAc]<sup>-</sup>, [PC+CI]<sup>-</sup>.







Figure 46: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PA(8:0/8:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PA-H]<sup>-</sup>, [PA-H+Na+OAc]<sup>-</sup>, [2PA-H]<sup>-</sup>.



Figure 47:Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PE(8:0/8:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PE-H]<sup>-</sup>, [2PE-H]<sup>-</sup>.



 $\begin{array}{c} {\tt LMGP06010000\_0\_250b~\#4-13} \ \mbox{RT: 0.06-0.31} \ \ \mbox{AV: 10 } \ \mbox{NL: 3.71E7} \ PI(8:0/8:0) \\ {\tt T: FTMS - p \ ESI \ \ Full \ \mbox{ms} s_{250.00-1500.00]} \end{array}$ 

Figure 48: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PI(8:0/8:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif). Les ions formés: [PI-H]<sup>-</sup>, [2PI-H]<sup>-</sup>.

# B) Exemple des spectres de masse des espèces moléculaires de PC en ionisation en mode positif



Figure 49: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(8:0/8:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode positif). Les ions formés: [PC+H]<sup>+</sup>, [PC+TEA+H]<sup>+</sup>.



Figure 50: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(24:0/24:0) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode positif). Les ions formés: [PC+H]<sup>+</sup>, [PC+TEA+H]<sup>+</sup>.



Figure 51: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)) 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode positif). Les ions formés: [PC+H]<sup>+</sup>, [PC+TEA+H]<sup>+</sup>.

#### C) Exemple des spectres de masse pour différents mélanges des espèces moléculaires de PC en ionisation en mode négatif



Figure 52: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour le mélange PC(8:0/8:0) et PC(24:0/24:0) à 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif).



 $\begin{array}{l} \label{eq:product} {\sf PC18-0\_250+PC18-2\_250+\#4-13\ RT:\ 0.06-0.31\ AV:\ 10\ NL:\ 4.31E6\ Mclange: PC(18:0/18:0) - PC(18:2/18:2) \\ {\sf T:\ FTMS - p\ ESI\ Full\ ms\ [250.00-1500.00] \end{array} \right) \\ \end{array}$ 

Figure 53: Spectre ESI-MS en LTQ-Orbitrap pour le mélange PC(18:0/18:0) et PC(18:2/18:2) à 250 pmol/µL. Spectre enregistré en full scan (ionisation en mode négatif).

# Publications, Communications et Prix

# **Publications**

- Khoury S, El Banna N, Tfaili S, Chaminade P

A study of inter-species ion suppression in electrospray mass spectrometry of some phospholipid classes.

Anal. Bioanal. Chem. February 2016, Volume 408, Issue 5, pp 1453-1465. DOI:10.1007/s00216-015-9245-6. (Research article)

### - Khoury S, Tfaili S, Chaminade P

ELSD vs Corona for detection and quantification of phospholipid classes: a comparison between phospholipid extract from animal and from plant tissue. Article in preparation (Research article)

## **Communications orales**

### - Khoury S, Tfaili S, Abreu S, Chaminade P

Évaluation de l'usage des standards phospholipidique en NP-CLHP/DEDL et Corona-CAD®: aspects quantitatifs.

Congrès du réseau Français des Lipidomystes. 9-10 avril 2015 (CEA Grenoble)

#### - Khoury S, Tfaili S, Abreu S, Libong D, Chaminade P

L'analyse quantitative des phospholipides dans les échantillons naturels par l'usage des détecteurs « universels » DEDL, Corona.

11<sup>ème</sup> congrès francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages. 31 mars-2 avril 2015 (Paris)

#### - Khoury S, Tfaili S, Abreu S, Libong D, Chaminade P

Analyse des phospholipides par les détecteurs universels en CLHP et spectrométrie de masse : approche quantitative, et caractérisation.

Journée scientifiques de la Fédération de Chimie Physique de Paris Saclay «ED Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentations et Biosystèmes» (2MIB). 13 Janvier 2015 (Orsay)

## - Khoury S, Abreu S, Tfaili S, Libong D, Chaminade P

Comparaison entre l'usage des détecteurs «universels» DEDL, CORONA pour la quantification des classes phospholipidiques dans la lécithine.

# Communications affichées

- Khoury S, Tfaili S, Pieuchot S, Abreu S, Libong D, Chaminade P

L'analyse quantitative des phospholipides dans les échantillons naturels par l'usage des détecteurs « universels » DEDL, Corona.

11<sup>ème</sup> congrès francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages. 31-2 avril 2015(Paris)

## <u>Prix</u>

**Prix de la meilleure communication orale** délivré par le comité d'organisation du 11<sup>ème</sup> congrès francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages. 2 avril 2015, Paris expo Porte de Versailles.



**Titre :** Aspects théoriques et pratiques de la quantification des classes lipidiques par usage des détecteurs universels et de la spectrométrie de masse.

Mots clés : Phospholipides, Détecteurs universels, Spectrométrie de masse, CLHP, Quantification

**Résumé :** Ce travail s'intéresse à rationaliser l'approche empirique qui consiste à employer des standards d'origine animale ou végétale en fonction de l'origine de l'échantillon à quantifier. Ces standards sont des extraits naturels de sources variés, ils peuvent présenter des répartitions d'espèces moléculaires différentes. Les lipides étant dépourvus de chromophores exploitables, leur quantification utilise des détecteurs «universels» ou détecteurs par nébulisation. Les performances des détecteurs «universels», le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) et le détecteur d'aérosol chargé (Corona-CAD), ont été comparées pour l'analyse quantitative des classes phospholipidiques. Ainsi, la composition des espèces moléculaires d'une classe lipidique peut influencer la géométrie du pic chromatographique en NP-CLHP.Les échantillons naturels de la lécithine commerciale issus de source animale et végétale ont été utilisés comme modèles d'échantillons d'origine biologique dans ce travail vue de leur richesse en PLs. Une méthode de séparation par chromatographie liquide à haute performance à polarité dephase normale (NP-HPLC) sur une colonne PVA-Sil

a été utilisée pour réaliser la séparation complète des classes phospholipidiques. Par ailleurs, la composition des standards ainsi que la composition de la lécithine a été explorée en spectrométrie de masse (SM) haute résolution LTQ-Orbitrap. D'autre part, la réponse des espèces moléculaires de PLs en spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-SM) a été évaluée. Les molécules en SM ne sont pas détectées avec la même efficacité. Le rendement d'ionisation ou réponse de SM dépend de nombreuses la caractéristiques structurelles des analytes tels que la longueur de chaîne, le nombre et la position des insaturations et la tête polaire. Ce travail a mis en évidence ces effets en utilisant un spectromètre de masse triple quadripôle (TQ) et LTQ-Orbitrap. La SM est reconnue comme spécifique et sensible cependant que des phénomènes de suppression d'ionisation peuvent modifier la réponse des solutés. Ce phénomène, qui peut se produire à l'intérieur de la source d'ionisation, possède des conséquences critiques sur les résultats analytiques.

**Title :**Theoretical and practical aspects of the quantification of lipid classes by use of universal detectors and mass spectrometry.

Keywords : Phospholipids, Universal detectors, Mass spectrometry, HPLC, Quantification

Abstract : The aim of this PhD Thesis is to rationalize the empirical approach of employing lipid standards of animal or plant origin according to the origin of the sample to quantify. As these standards are natural extracts of various sources, they may have different distributions of molecular species. Taking into account that lipids lack of exploitable chromophores, lipid quantification use nebulizationbased universal detectors. The performance of universal detectors, the evaporative light scattering detector (ELSD) and the charged aerosol detector (Corona-CAD), were compared for the quantitative analysis of PLs classes. In addition, the composition of molecular species of a given lipid class can affect the geometry of chromatographic peak in NP-HPLC. In this work, natural samples of commercial lecithin derived from animal and plant sources were used as models of biological samples because of their PLs richness. A separation method by high performance liquid chromatography in normal phase (NP-HPLC)

using PVA-Sil column was used to achieve the complete separation of PLs classes. Moreover, the composition of lipid standards and lecithin samples was investigated by the high resolution mass spectrometry (LTQ-Orbitrap). Furthermore, the response of PLs molecular species was evaluated by mass spectrometry equipped with electrospray ionization source (ESI-MS). In ESI-MS, the molecules are not detected with equal efficiency. MS response or ionization yield depends on many structural features of the analytes such as; the chain length, the number and the position of unsaturation and the polar head. This work has highlighted these effects using a triple quadrupole mass spectrometer (TQ) and LTQ Orbitrap. MS is recognized as specific and sensitive, but the phenomenon of ion suppression can modify the response of analytes. considerably This phenomenon, which can occur within the ionization source, has critical implications on analytical results.