



**HAL**  
open science

# Développement analytique en chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse et application à l'analyse de métabolites dans des matrices biologiques

Adeline Bigard

## ► To cite this version:

Adeline Bigard. Développement analytique en chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse et application à l'analyse de métabolites dans des matrices biologiques. Chimie analytique. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR025 . tel-03899832

**HAL Id: tel-03899832**

**<https://theses.hal.science/tel-03899832>**

Submitted on 15 Dec 2022

**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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

**Développement analytique en chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse et application à l'analyse de métabolites dans des matrices biologiques**

Présentée et soutenue par  
**ADELINE BIGARD**

**Thèse soutenue le 07/07/2022  
devant le jury composé de**

MME KARINE FAURE	CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD	Rapporteur du jury
MME MARLENE LACROIX	CHARGE DE RECHERCHE, INRA de TOULOUSE	Rapporteur du jury
M. SERGE RUDAZ	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Geneve (SUISSE)	Membre du jury
M. PASCAL COSETTE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Président du jury
MME VALERIE PEULON-AGASSE	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. PASCAL CARDINAEL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

**Thèse dirigée par VALERIE PEULON-AGASSE (SCIENCES ET METHODES SEPARATIVES) et PASCAL CARDINAEL (SCIENCES ET METHODES SEPARATIVES)**



## REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué au déroulement de cette thèse.

Je souhaiterais premièrement remercier le Docteur Karine FAURE et le Docteur Marlène LACROIX d'avoir accepté d'être rapportrices pour ce travail. Merci également au Professeur Pascal COSETTE et au Professeur Serge RUDAZ d'avoir accepté d'examiner cette thèse. C'est un réel honneur mais également un réel défi pour moi de vous soumettre mon travail.

Je tiens également à remercier le Professeur Gérard COQUEREL, Directeur du laboratoire SMS (Sciences et Méthodes Séparatives) de m'avoir accueillie au sein du laboratoire depuis mon stage de licence et m'avoir permis de découvrir la recherche.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mes deux directeurs de thèse, le Docteur Valérie Peulon-Agasse et le Professeur Pascal Cardinaël. Aussi complémentaires dans le laboratoire que dans cette thèse, vous avoir tous les deux dans ma direction de thèse a été une réelle chance. Cette thèse n'aurait, à bien des égards, jamais pu voir le jour sans vous. Bien qu'ayant toujours voulu aller le plus loin possible dans les études, jamais je n'ai osé songer à atteindre la thèse jusqu'à ce que Pascal fasse germer cette idée dans ma tête à l'entretien du stage de L3. Sa passion contagieuse pour la recherche a fini par me convaincre. Merci à tous les deux d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la chance de vivre cette expérience qui, j'en suis sûre, restera gravée dans ma mémoire.

Valérie, il est vrai que l'on avait déjà eu l'occasion de travailler ensemble pour martyriser les puces de Pascal mais c'est durant cette thèse que j'ai vraiment pu découvrir toute l'étendue de ta créativité. Merci pour toutes ces bonnes idées. Ton optimisme, ta capacité à visualiser les choses et ta motivation m'ont souvent rassurée au cours de ce projet. Je voudrais te remercier aussi pour tous tes conseils avisés aussi bien professionnels que personnels. Merci pour toutes ces heures et cette énergie que tu m'as accordées, surtout pendant la rédaction. Enfin, merci pour ta joie de vivre et ta nature maternelle qui font de ce laboratoire un lieu encore plus accueillant. Je peux te garantir que tu es une directrice de thèse en or !

Pascal, après toutes ces années à travailler avec toi, je ne peux que te dire mon admiration pour ta capacité de management. Tu as cette faculté à te faire respecter tout en étant

accessible et amical qui fait de toi un chef d'équipe d'exception. Ces qualités couplées à ta technique de recrutement discutable mais efficace font de cette équipe un environnement dans lequel j'ai aimé m'épanouir. Je tenais également à t'exprimer toute ma gratitude pour toutes ces fois où tu m'as soutenue footballistiquement face à cette équipe de madrilènes. Et, plus sérieusement, je tiens à te remercier pour ton implication dans ce sujet et ta disponibilité malgré ton emploi du temps bien chargé. Merci pour ces heures à corriger mes « passes D à la Mbappé » et pour ta patience. Et désolée pour le budget supprimeur...

J'aimerais remercier Anne-Marie COMPIANO pour avoir accepté de partager son précieux savoir sur la chromatographie ionique lors de nos discussions.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler ou échanger au cours de ces années et notamment Nicolas COUVRAT, Marie VACCARO, Kateryna FATYEYEVA et Laurent MARCHANT.

Et parce qu'une thèse c'est aussi une expérience riche en émotions, je suis heureuse de les avoir partagées avec mes collègues de bureau. J'ai eu la chance de faire beaucoup de belles rencontres au cours de cette thèse : Axelle, Saida, Amel, Victoria, Ben, Lorris, Trevys et Tiffen. J'aimerais tous vous remercier pour les bons moments partagés dans le bureau, au restaurant du vendredi midi et pendant les congrès. Plus particulièrement, j'aimerais remercier mes Totally Spies. Bien plus que les Pokémons, on a partagé nos vies au quotidien, sans tabous.

« La Belarbi », merci de m'avoir fait profiter de ton expérience récente en me conseillant, me rassurant et en répondant à mes questions. Tout ce qu'on a pu vivre ensemble, bon ou mauvais, n'aura fait que renforcer le respect et l'amitié que je te porte. Tu es une femme forte, généreuse et très attachante et j'espère que tu ne douteras jamais de tes qualités. J'ai aimé toutes les discussions qu'on a partagées, tous les fous rires et toutes les larmes aussi. Peu importe où le vent te mènera, je sais que tu t'en sortiras !

« Mimel », merci pour ta douceur et ton empathie qui m'ont beaucoup rassurée quand je paniquais. Tes excellentes références humoristiques ont été un réel bonheur pour moi et nous aura valu de bons fous rires (même si tu refuses toujours de me dire « qui c'est qu'a dit d'attaquer la Russie ! »). Je sais que tu es la prochaine sur la liste mais je ne me fais aucun souci pour toi. Tu ne t'en rends pas compte parce que tu as explosé les scores au fameux test mais moi je sais que tu as toutes les qualités pour finir cette thèse avec succès. Tu le mérites non seulement pour tes qualités de chromatographe mais également pour tes nombreuses qualités humaines. Et surtout, ne laisse jamais la vie ou les gens t'enlever ton impressionnante gentillesse !

« Vivi », merci d'avoir été mon bras droit pour les dernières manip', tu m'as sauvée la vie ! Merci aussi d'avoir eu la patience de répondre à toutes mes questions et d'avoir été mon google traduction. Ton HPI m'a été très utile. Au-delà de ça, je voudrai te remercier aussi pour ton honnêteté sans faille qui peut parfois piquer mais qui finit toujours par être bénéfique. Merci également pour toutes ces conversations interminables sur nos sujets préférés et tes débats du midi. J'ai beaucoup aimé discuter avec toi, sauf les lendemains de match... Je sais que, si thèse il y a, tu t'en sortiras. Et je ne dis pas ça pour tes capacités de fayotte.

Spéciale dédicace à la Tatie du bureau, Nathalie. Merci d'avoir partagé ton expérience et tes connaissances avec moi. Ta rigueur et ton organisation au travail ont été très inspirantes et me serviront, à coups sûrs, dans ma vie professionnelle. J'aurai une pensée pour toi à chaque notice que je rédigerai. Merci de nous avoir toujours suivis dans nos délires. Si tu m'as souvent dit que tu appréciais la compagnie des jeunes, moi j'ai vraiment adoré que tu fasses partie de ce bureau.

Merci également à Séverine. D'abord pour m'avoir dispensé mes tout premiers cours de chromatographie quand je n'étais encore qu'une petite « iutienne ». Mais je tiens aussi à te remercier pour ton aide pendant la rédaction de cette thèse.

Enfin, puisqu'une thèse se vie 24h/24 et 7j/7, j'aimerais remercier mes proches qui ont aussi contribué à mon épanouissement et qui m'ont toujours soutenue pendant toutes ces années.

Marvin, mon amour, merci d'avoir été un soutien sans faille pour moi durant ces années de thèse et même avant. Tu m'as sauvée et sans tout cet amour, je n'aurais pas pu aller aussi loin. Merci de m'avoir écoutée me plaindre quand j'avais besoin d'une oreille et de m'avoir réconfortée quand j'avais besoin d'une épaule. Je ne sais pas comment tu fais mais tu sais toujours comment calmer mes maux. Tu as tout géré pour que je puisse me concentrer sur cette thèse et pour ça, merci aussi. Merci pour ta patience, ta compréhension et merci d'être toujours à mes côtés aujourd'hui même si j'ai parfois été difficile à vivre. Je te promets de me rattraper sur les nombreuses années qu'il nous reste à partager.

Maman, je ne saurai par où commencer mes remerciements... C'est grâce à ta patience que j'ai aimé apprendre, à ton soutien sans faille que je n'ai jamais rien lâché, à tes sacrifices que j'ai pu y arriver et à ton amour que j'ai eu la force pour tout surmonter. Je te dois beaucoup plus que je ne pourrai l'exprimer. La fierté que je lis dans tes yeux si expressifs a toujours été mon

moteur. Ta fierté mais aussi ta fameuse phrase « Il faut toujours viser la lune, car même en cas d'échec, on atterrit dans les étoiles ». Alors mille mercis. Merci pour tout, et bien plus encore !

Mes frères et ma sœur, mes meilleurs alliés dans cette vie. Notre complicité est ma plus grande force et nos éclats de rire sont mon plus grand remède. J'ai pu trouver auprès de vous du réconfort sans avoir eu à parler et vous avoir auprès de moi pendant cette période de rédaction a été mon petit rayon de soleil. Merci pour m'avoir apporté un peu de distraction avec vos discussions entendues à travers la porte. Merci Steven de m'avoir fournie en RED BULL quand les nuits étaient courtes et pour ces petites pauses à la fenêtre. Merci Célia pour tous les stratagèmes que tu as élaborés et pour m'avoir appris le russe pendant nos missions secrètes, tu as un talent impressionnant pour me faire évacuer mon stress. Merci Evan pour toutes ces fois où, du haut de tes huit ans, tu m'as proposé ton aide pour me soulager. J'ai hâte d'être de nouveau totalement disponible pour partager de bons moments avec vous.

J'aurais aimé remercier chaque personne de ma famille, de ma belle-famille et chaque ami(e)s individuellement mais je risque de doubler le volume de cette thèse... Je vais donc raccourcir ici mais je peux vous assurer que ma gratitude envers chacun d'entre vous est immense. Vous qui avez toujours eu un petit mot, une petite pensée à mon égard à chaque étape de mes études, depuis le début, vous qui vous êtes toujours intéressés à cette partie de ma vie, vous qui m'avez toujours poussée à continuer et qui m'avez toujours soutenue, mille mercis !

J'ai, en ces moments importants dans ma vie, une pensée émue pour Mamyvette. Ton départ laisse un grand vide dans nos vies mais je sais que tu nous surveilles tous de là où tu es...

Et si maintenant je peine à croire que ce fut réel, je sais que je n'en serai pas là aujourd'hui sans que tu aies fait partie de ma vie. Alors que je n'osais y croire, tu as fini par me convaincre que j'en étais capable. Pour toute cette confiance en moi que tu m'as donnée quand je me voyais à travers tes yeux, pour toute cette force que tu as révélée en moi, pour tout ce courage que tu m'as légué, merci. Je n'oublierai jamais. Il y a eu des moments dans cette thèse où j'ai cru ne pas pouvoir y arriver sans toi mais je suis fière aujourd'hui de pouvoir dire qu'une promesse de plus a été tenue. Alors, Minou, cette thèse elle est pour toi.

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

**Article I – Comparison of retention mechanisms of different commercialized columns and influence of the format.** Adeline Bigard, Anne-Marie Compiano, Christopher A. Pohl, Pascal Cardinaël<sup>a</sup> and Valérie P. Agasse, (*En relecture par les co-auteurs*)

**Article II – Anion exchange chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry: an efficient tool for food, environment, and biological analysis.** Adeline Bigard, Pascal Cardinaël and Valérie P. Agasse, *Critical Review in Analytical Chemistry*, 2022, 1–13.

**Article III – Development of an ion chromatography - mass spectrometry method for small organic acids analysis, importance of suppressor role.** Adeline Clergé, Adeline Bigard, Pascal Cardinaël, Valérie Peulon-Agasse, (*Soumis au Journal of Chromatography B*)

## COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

**Apport de la chromatographie ionique capillaire pour l'analyse de biomarqueurs**  
A. Bigard, N. Hebert, P. Cardinaël, V. Peulon-Agasse, 13<sup>ème</sup> congrès francophone de l'AFSEP, Paris, 25-28 mars 2019.

**Analysis of metabolites in ionic exchange chromatography coupled to mass spectrometry**  
Adeline Bigard and Adeline Clergé, Nathalie Hebert, Pascal Cardinaël, Valérie Peulon-Agasse, 36<sup>ème</sup> édition du congrès Internal Symposium of Microscale Separations and Bioanalysis (MSB2020), e-conférence, 12-15 juillet 2021

**Couplage de la chromatographie ionique à la spectrométrie de masse : application à l'analyse de composés très polaires dans des matrices complexes**  
Adeline Bigard, Pascal Cardinaël, Valérie Peulon-Agasse, 14<sup>ème</sup> congrès francophone de l'AFSEP, Paris, 5-7 octobre 2021.

## COMMUNICATION ORALE

**Method development for metabolites analysis in IC-ESI/MS.**  
Adeline Bigard, Journée de l'École Doctorale Normande de Chimie, e-conférence, 24-25 juin 2021



## LISTE DES ABREVIATIONS

2MET-GLU	Acide methyl-2-glutarique
ACES	Anion capillary electrolytic suppressor
Acétyl-CoA	Acétyl coenzyme A
ACN	Acétonitrile
ADP	Adénosine diphosphate
ADRS	Suppresseur anionique à régénération dynamique
AERS	Suppresseur anionique à régénération électrolytique
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
API	Ionisation à pression atmosphérique
ASP	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Réflectance totale atténuée
CD	Détection conductimétrique
CE	Électrophorèse capillaire
CIT	Acide citrique
CV%	Coefficients de variation
dAMP	Désoxyadénosine monophosphate
E4P	Érythrose 4-phosphate
EIC	Chromatogramme d'ions extraits
ESI	Ionisation électrospray
EVB-DVB	Éthylvinylbenzène-divinylbenzène
EVOH	Alcool vinyl éthylène
F-1,6-BP	Fructose-1,6-bisphosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
FAB	Fast Atom Bombardment
FT-ICR	Spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique
FUM	Acide fumarique
G1P	Glucose 1-phosphate
G6P	Glucose 6-phosphate
GC	Chromatographie en phase gazeuse

GlcN6P	Glucosamine 6-phosphate
GLU	Acide glutarique
GMP	Guanosine monophosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
HEPT	Hauteur équivalente à un plateau théorique
HILIC	Chromatographie d'interactions hydrophiles
HMDB	Human metabolome data base
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HYP	Hypotaurine
I3S	Indoxyl sulfate
IC	Chromatographie d'échange d'ions
IC-MS	Chromatographie d'échange d'ions couplée à la spectrométrie de masse
IC-MS/MS	Chromatographie d'échange d'ions couplée à la spectrométrie de masse en tandem
IMP	Inosine monophosphate
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ISO	Acide isocitrique
ITP	Inosine triphosphate
LAC	Acide lactique
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
LSSM	Linear solvent strength model
MAL	Acide malique
MeOH	Méthanol
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
n.d.	Non détecté
NAD <sup>+</sup>	β-nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP <sup>+</sup>	β-Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance de phase normale
OXA	Acide oxaloacétique
OXO	Acide oxoglutarique

PCr	Phosphocréatine
PEA	Phosphoéthanolamine
PEEK	Poly ether ether keton
PIC	Acide 2-picolinique
PM	Phase mobile
PRO	Acide propionique
PS	Phase stationnaire
PS-DVB	Polystyrène-divinylbenzène
pSer	Phosphosérine
PYR	Acide pyruvique
QqQ	Analyseur triple quadripôle
R5P	Ribose 5-phosphate
RFIC	Reagent free ion chromatography
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance de phase inverse
S/B	Signal/Bruit
SFC	Chromatographie en phase supercritique
SIM	Selected Ion Monitoring
SQ	Simple quadripôle
SRM	Single reaction monitoring
SUC	Acide succinique
TAU	Taurine
TIC	Total ion chromatogram
TMP	Thymidine monophosphate
TOF	Analyseur à temps de vol
$t_R$	Temps de rétention
UDP-GlcA	Uridine diphosphate acide glucuronique
UMP	Uridine monophosphate
URA	Acide urique
UTP	Uridine triphosphate
XAN	Acide xanthurenique



# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GRADIENT OBTENU SUR L'APPAREIL 1 (EN BLEU) ET L'APPAREIL 2 (EN ORANGE) PAR RAPPORT AU GRADIENT IMPOSE (POINTILLES) .....	28
FIGURE 2 : DEFINITION DU FACTEUR D'ASYMETRIE .....	29
FIGURE 3 : DEFORMATION DU PIC SELON LA DISTRIBUTION DES SOLUTES ENTRE LA PS ET LA PM. SCHEMA INSPIRE DE LA PRESENTATION « ASPECTS THEORIQUES DE LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE » <sup>[4]</sup> .....	29
FIGURE 4 : STRUCTURE D'UNE RESINE PS/DVB. INSPIRE DU SCHEMA DE J.WEISS <sup>[10]</sup> .....	34
FIGURE 5 : SCHEMA D'UNE RESINE GREFFEE .....	36
FIGURE 6 : STRUCTURE D'UNE RESINE HYPER-RAMIFIEE .....	37
FIGURE 7 : SCHEMA D'UNE RESINE PELLICULAIRE <sup>[10]</sup> .....	38
FIGURE 8 : RESUME SCHEMATIQUE DES DEUX TECHNOLOGIES DE SUPPRESSEUR ET DE LEURS MODES DE REGENERATION. FIGURES EXTRAITES DES MANUELS DE THERMOFISHER SCIENTIFIC <sup>[22, 23]</sup> ET DE METROHM <sup>[24]</sup> .....	40
FIGURE 9 : COMPARAISON DE LA GAMME DE MASSE ET DE POLARITE DES 3 SOURCES API ET LE SCHEMA DE LEUR STRUCTURE <sup>[27]</sup> .....	41
FIGURE 10 : SCHEMA D'UN ANALYSEUR SIMPLE QUADRIPOLE. INSPIRE DE LA FIGURE 4 DE L'ARTICLE « APPORT DES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROSCOPIE DE MASSE TANDEM AUX DOSAGES DES STEROÏDES » <sup>[28]</sup> .....	43
FIGURE 11 : SCHEMA D'UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLE. INSPIRE DE LA FIGURE C7 DE LA THESE DE CEDRIC MESMIN <sup>[29]</sup> .....	43
FIGURE 12 : SCHEMA DU PRINCIPE D'UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLE EN MODE SRM. INSPIRE DE LA FIGURE 3 DE L'ARTICLE « IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF PRO-METASTATIC TARGETS, PATHWAYS AND MOLECULAR COMPLEXES USING A TOOLBOX OF PROTEOMIC TECHNOLOGIES » <sup>[30]</sup> .....	44
FIGURE 13 : SCHEMA D'UN SUPPRESSEUR ACES300 D'APRES LE MANUEL DE THERMOFISHER SCIENTIFIC <sup>[44]</sup> .....	46
FIGURE 14 : CLASSES DE COMPOSES DES METABOLITES (A) ET REPARTITION DE CES METABOLITES SELON LEUR MASSE ET LEUR POLARITE (B).....	98
FIGURE 15 : SCHEMA DU COUPLAGE IC-MS .....	108
FIGURE 16 : CHROMATOGRAMME OBTENU POUR L'ANALYSE D'UN MELANGE D'ETALONS DE METABOLITES DANS L'EAU SUR LA COLONNE AS11-HC (DETECTION CONDUCTIMETRIQUE) .....	111
FIGURE 17 : COMPARAISON DES INTENSITES NORMALISEES DU SIGNAL EN SPECTROMETRIE DE MASSE ET DE LA STABILITE DU SPRAY (CV%) EN FONCTION DU SOLVANT « MAKE-UP » UTILISE.....	113
FIGURE 18 : RAPPORT S/B DE 5 COMPOSES EN FONCTION DU DEBIT D'ACN .....	114
FIGURE 19 : DIAGRAMME DE PREDOMINANCE DES METABOLITES PRIMAIRES PHOSPHATES SELON LES PKA CALCULES AVEC MARVINSKETCH AVEC EN GRIS LA GAMME DE PH D'ANALYSE IMPOSEE PAR LE GRADIENT (PH IC), EN BLEU LE PH MESURE APRES LA DETECTION EN CONDUCTIMETRIE (PH CD) ET EN VERT CELUI OBTENU AVANT LA SOURCE D'IONISATION ET APRES AJOUT DE L'ACN (PH MS).....	116
FIGURE 20 : COMPARAISON DES TIC OBTENUS POUR L'ACN AVEC L'AJOUT D'EAU, LE PH 7, LE PH 8, LE PH 8,5 ET LE PH 9 .....	119
FIGURE 21 : EIC OBTENUS POUR LES 4 GROUPES DE COMPOSES CO-DETECTES AVEC DIFFERENTS GRADIENTS IMPOSES. A) GROUPE 1 : G1P; G6P ET F6P B) GROUPE 2 : CIT ET ISO C) GROUPE 3 : 2MET-GLU ET OXO D) GROUPE 4 : GLU ET OXA .....	121

FIGURE 22 : CHROMATOGRAMME OBTENU POUR L'ANALYSE DU MELANGE DE METABOLITES AVEC DIFFERENTS MODES DE SUPPRESSION : COURANT CONSTANT (EN VIOLET) ET TENSION CONSTANTE (EN NOIR)(DETECTION CONDUCTIMETRIQUE).....	122
FIGURE 23 : EIC OBTENUS POUR LES RAPPORTS M/Z DES COMPOSES ELUES AUX PLUS FORTES CONCENTRATIONS DE GRADIENT : GMPC (A) ET UTP (B) AVEC LE SUPPESSEUR EN COURANT CONSTANT (EN NOIR) ET TENSION CONSTANTE (EN BLEU) .....	123
FIGURE 24: PROPORTIONS DE CHAQUE CLASSE DE COMPOSES SELON LA DETECTION.....	126
FIGURE 25 : EIC DES COMPOSES D'AMP (A) ET PEA (B) AVEC LE SUPPESSEUR CONVENTIONNEL (EN BLEU) ET LE SUPPESSEUR MODIFIE CHIMIQUEMENT (EN NOIR) .....	144
FIGURE 26 : SPECTRE ATR IRTF DE LA MEMBRANE DU SUPPESSEUR.....	145
FIGURE 27 : EIC SUPERPOSES DES METABOLITES DANS LA SALIVE DILUEE PAR 2.....	147
FIGURE 28 : CHROMATOGRAMME OBTENU POUR L'IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX ANIONS QUI COMPOSENT LA SALIVE (DETECTION CONDUCTIMETRIQUE). .....	147
FIGURE 29 : EIC SUPERPOSES DES METABOLITES DANS L'URINE DILUEE PAR 20.....	149
FIGURE 30 : CHROMATOGRAMME OBTENU EN DETECTION CONDUCTIMETRIQUE POUR L'URINE ET IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX ANIONS QUI LA COMPOSE .....	150
FIGURE 31 : RAPPORT SIGNAL/BRUIT DES COMPOSES DANS L'URINE EN FONCTION DU POURCENTAGE DE SOLVANT « MAKE-UP » AJOUTE .....	151
FIGURE 32 : ÉTUDE DE LA VARIATION DES DIFFERENTES GRANDEURS EN FONCTION DU POURCENTAGE D'ACN DANS LA PM ET COMPARAISON A CELLES OBTENUES AVEC 33% D'ACN EN SOLVANT « MAKE-UP ». A : ASYMETRIE ; B : LARGEUR DU PIC A LA BASE ET C : RAPPORT SIGNAL/BRUIT .....	153
FIGURE 33 : EFFET DE LA DILUTION SUR L'EFFET DE MATRICE POUR (A) LE PYR ET (B) L'OXO.....	155
FIGURE 34 : RUPTURE DE PENTE UTILISEE POUR DETERMINER LE VOLUME DE DELAI .....	161
FIGURE 35 : PERFORMANCES DE LA METHODE TRANSFEREE COMPAREE A LA METHODE ORIGINALE <sup>[3]</sup> .....	162
FIGURE 36 : SYNTHÈSE DU NOMBRE DE METABOLITES CIBLES CORRECTEMENT DETECTES SELON LA MATRICE AVEC LA METHODE DEVELOPPEE .....	171

# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : COMPARAISON DES PRINCIPAUX ANALYSEURS DE SPECTROMETRIE DE MASSE.....	42
TABLEAU 2 : COMPARAISON DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES TECHNOLOGIES DE COLONNES COMMERCIALISEES PAR THERMOFISHER SCIENTIFIC. ....	48
TABLEAU 3 : COMPARAISON DES DEUX DIFFERENTS TYPES DE SUPPRESSEURS .....	49
TABLEAU 4 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES METABOLITES ETUDIES SELON HMDB (HUMAN METABOLOME DATA BASE) <sup>[77]</sup> .	99
TABLEAU 5 : PARAMETRES DU SPECTROMETRE DE MASSE OPTIMISES POUR CHAQUE COMPOSE PHOSPHATE .....	110
TABLEAU 6 : VALEURS DES RAPPORTS M/Z POSSIBLEMENT FORMES DE L'ATP EN ESI NEGATIF. ....	118
TABLEAU 7 : GROUPES DE COMPOSES CO-DETECTES EN IC-MS AVEC UN ANALYSEUR SIMPLE QUADRIPOLE .....	120
TABLEAU 8 : PARAMETRES OPTIMISES DE LA METHODE EN IC-MS.....	124
TABLEAU 9 : ORDRE D'ELUTION DES COMPOSES ET TEMPS DE RETENTION OBTENUS AVEC LA METHODE OPTIMISEE. « N.D. » : NON DETECTE.....	125
TABLEAU 10 : LISTE DES COMPOSES PRESENTS OU NON NATURELLEMENT DANS L'URINE ET LA SALIVE .....	146
TABLEAU 11 : ORDRE D'ELUTION ET TEMPS DE RETENTION DES COMPOSES DANS LA SALIVE .....	148
TABLEAU 12 : CONCENTRATIONS MOYENNES DES METABOLITES NON DETECTES CHEZ DES INDIVIDUS ADULTES SAINS DANS LA MATRICE SALIVAIRE. ....	148
TABLEAU 13 : ORDRE D'ELUTION ET TEMPS DE RETENTION DES COMPOSES DANS L'URINE .....	151
TABLEAU 14 : PENTES ET COEFFICIENTS DE CORRELATION DE L'ETUDE DE LINEARITE DE LA METHODE .....	154
TABLEAU 15 : PENTES ET EFFETS DE MATRICE OBTENUS POUR LES GAMMES ETALON DANS LA MATRICE VIERGE A PLUSIEURS FACTEURS DE DILUTION .....	156
TABLEAU 16: CV% CALCULES SUR L'AIRES DES PICS DES EIC DES METABOLITES DANS L'URINE MIMEE DILUEE .....	157
TABLEAU 17 : CV% CALCULES SUR LES TEMPS DE RETENTION DES METABOLITES DANS L'URINE MIMEE DILUEE .....	158
TABLEAU 18 : LD DE LA METHODE CALCULEES SUR 3 REPLICAS POUR DE L'URINE VIERGE DILUEE 20 FOIS ET DOPEE AVEC LES ETALONS DES METABOLITES .....	158
TABLEAU 19 : LQ DE LA METHODE POUR LES METABOLITES DANS L'URINE MIMEE DILUEE 20 FOIS .....	160
TABLEAU 20 : VOLUMES DE DELAI DES DEUX SYSTEMES UTILISES .....	161
TABLEAU 21 : GRADIENT OPTIMISE POUR LA METHODE IC CAPILLAIRE-MS .....	161
TABLEAU 22 : PENTES ET COEFFICIENTS DE CORRELATION DE LA GAMME ETALON DES METABOLITES AVEC LA METHODE IC CAPILLAIRE- MS.....	163
TABLEAU 23: CV% CALCULES SUR L'AIRES DU PIC SUR 3 INJECTIONS POUR LES COMPOSES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS AVEC LA METHODE IC CAPILLAIRE-MS .....	164
TABLEAU 24 : CV% CALCULES SUR LE TEMPS DE RETENTION DES METABOLITES DANS L'EAU SUR 3 INJECTIONS .....	165
TABLEAU 25 : LD ET LQ ESTIMEES POUR L'ANALYSE DES METABOLITES EN IC CAPILLAIRE-MS.....	165



## **LISTE DES ANNEXES**

<b>ANNEXE 1 - OPTIMISATION DES PARAMETRES DE SPECTROMETRIE DE MASSE.....</b>	<b>184</b>
<b>ANNEXE 2 – APPAREILLAGE POUR LE COUPLAGE IC-MS/MS AVEC UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLE.....</b>	<b>185</b>
<b>ANNEXE 3 - PREPARATION DES SOLUTIONS DE "MAKE-UP" A DIFFERENTS PH .....</b>	<b>186</b>
<b>ANNEXE 4 – APPAREILLAGE POUR LE COUPLAGE IC-MS AVEC UN ANALYSEUR SIMPLE QUADRIPOLE.....</b>	<b>187</b>
<b>ANNEXE 5 - GRADIENTS TESTES POUR L’OPTIMISATION DE LA SEPARATION DE CERTAINS COMPOSES .....</b>	<b>188</b>
<b>ANNEXE 6 - APPAREILLAGE POUR LE COUPLAGE IC CAPILLAIRE-MS.....</b>	<b>189</b>



# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>5</b>
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES .....	5
COMMUNICATIONS PAR AFFICHE .....	5
COMMUNICATION ORALE .....	5
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>15</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE I - GENERALITES.....</b>	<b>25</b>
<b>I.1. RAPPEL SUR DES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES.....</b>	<b>26</b>
I.1.1 LES VOLUMES ET VARIANCES .....	26
I.1.1.1 Le volume mort et la variance totale .....	26
I.1.1.1 Le volume et la variance de la colonne .....	26
I.1.1.2 Les volumes et variances extra-colonne .....	26
I.1.1.3 Le volume de délai .....	27
I.1.2 LE FACTEUR DE RETENTION K.....	28
I.1.3 LE FACTEUR D'ASYMETRIE $A_s$ .....	28
I.1.4 LA SELECTIVITE $\alpha$ .....	30
I.1.5 L'EFFICACITE N.....	30
I.1.6 LA RESOLUTION R .....	31
<b>I.2. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE .....</b>	<b>31</b>
I.2.1 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE.....	32
I.2.2 LES PHASES STATIONNAIRES .....	32
I.2.2.1 Les caractéristiques des phases stationnaires .....	33
I.2.2.2 Les substrats.....	33
I.2.2.3 La dérivation chimique.....	36
I.2.2.4 Les résines greffées .....	36

I.2.2.5	La modification de la surface du substrat .....	37
I.2.2.6	Les résines hyper-ramifiées.....	37
I.2.2.7	Les résines pelliculaires .....	37
I.2.3	L'APPAREILLAGE .....	38
I.2.3.1	La détection conductimétrique .....	38
I.2.3.2	Le supprimeur .....	39
I.2.3.3	Le générateur d'éluant.....	40
<b>I.3.</b>	<b>LE COUPLAGE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (IC-MS) .....</b>	<b>41</b>
I.3.1	LA SOURCE D'IONISATION .....	41
I.3.2	LES ANALYSEURS.....	41
I.3.2.1	L'analyseur simple quadripôle .....	42
I.3.2.2	L'analyseur triple quadripôle .....	43
<b>I.4.</b>	<b>LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE AU FORMAT CAPILLAIRE .....</b>	<b>44</b>
I.4.1.1	Les tubulures.....	45
I.4.1.2	Le supprimeur .....	45
I.4.1.3	Les colonnes .....	46
I.4.1.4	Les autres modules .....	46
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>48</b>
<b>CHAPITRE II - CARACTERISATION DE PHASES STATIONNAIRES.....</b>		<b>51</b>
<b>ARTICLE I - COMPARISON OF RETENTION MECHANISMS OF DIFFERENT COMMERCIALIZED COLUMNS AND INFLUENCE OF THE FORMAT. ....</b>		<b>53</b>
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>75</b>
<b>CHAPITRE III - L'ANALYSE DE METABOLITES PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE .....</b>		<b>77</b>
<b>III.1.</b>	<b>ÉTAT DE L'ART .....</b>	<b>78</b>
III.1.1	LA PLACE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE DANS LA METABOLOMIQUE .....	78
III.1.1.1	L'analyse de métabolites par GC-MS.....	79
III.1.1.2	L'analyse de métabolites par SFC-MS .....	80
III.1.1.3	L'analyse de métabolites par électrophorèse capillaire (CE) .....	80
III.1.1.4	L'analyse de métabolites par chromatographie liquide (HPLC) .....	81
III.1.2	LE COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE .....	81
<b>ARTICLE II - ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY COUPLED TO ELECTROSPRAY-MASS SPECTROMETRY: AN EFFICIENT TOOL FOR FOOD, ENVIRONMENT, AND BIOLOGICAL ANALYSIS.....</b>		<b>83</b>

III.1.3	LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE POUR L'ANALYSE DE FLUIDES BIOLOGIQUES.....	96
<b>III.2.</b>	<b>LES METABOLITES PRIMAIRES ETUDIES.....</b>	<b>98</b>
<b>III.3.</b>	<b>OPTIMISATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE IC-MS .....</b>	<b>108</b>
III.3.1	OPTIMISATION DE LA METHODE IC-MS SUR UN COUPLAGE AVEC UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLE .....	108
III.3.1.1	Choix de la phase stationnaire .....	109
III.3.1.1	Le couplage IC-MS.....	112
III.3.1.1	Étude de l'influence du pH sur la détection .....	114
III.3.2	OPTIMISATION DE LA METHODE IC-MS SUR UN COUPLAGE AVEC UN ANALYSEUR SIMPLE QUADRIPOLE .....	118
III.3.2.1	Optimisation du gradient d'éluion.....	120
III.3.2.1	Suppresseur.....	122
<b>III.4.</b>	<b>ÉTUDE DE LA MODIFICATION CHIMIQUE DES MEMBRANES DU SUPPESSEUR .....</b>	<b>127</b>
<b>ARTICLE III - DEVELOPMENT OF AN ION CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY METHOD FOR SMALL</b>		
<b>ORGANIC ACIDS ANALYSIS, IMPORTANCE OF SUPPRESSOR ROLE.....</b>		
		<b>127</b>
<b>III.5.</b>	<b>ÉTUDE REALISEE SUR DES FLUIDES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>145</b>
III.5.1	ESSAIS PRELIMINAIRES SUR DES ECHANTILLONS COLLECTES .....	146
III.5.1.1	Analyse des métabolites dans la salive .....	146
III.5.1.2	Analyse des métabolites dans l'urine.....	149
III.5.2	PERFORMANCES DE LA METHODE POUR L'ANALYSE DES METABOLITES DANS L'URINE.....	153
III.5.2.1	Étude de la linéarité .....	154
III.5.2.2	Étude de l'effet de matrice.....	154
III.5.2.3	Étude de la répétabilité.....	156
III.5.2.4	Estimation des limites de détection.....	158
III.5.2.5	Estimation des limites de quantification .....	159
<b>III.6.</b>	<b>TRANSPOSITION AU FORMAT CAPILLAIRE .....</b>	<b>160</b>
III.6.1	STRATEGIE DE TRANSPOSITION DE LA METHODE.....	160
III.6.2	MODIFICATIONS DE L'APPAREILLAGE .....	162
III.6.3	ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE TRANSPSEEE.....	163
III.6.3.1	Étude de la linéarité .....	163
III.6.3.2	Étude de répétabilité.....	163
III.6.3.3	Estimation des limites de détection et de quantification .....	165
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>167</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>169</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>173</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>183</b>



## **INTRODUCTION**

---

La chromatographie d'échange d'ions ou chromatographie ionique a connu un essor important ces dernières décennies. Cet essor est notamment dû à l'apparition de solutions commerciales performantes de suppression permettant la neutralisation de la phase mobile et l'élimination des contre-ions avant la détection. Par conséquent, un développement de phases stationnaires contenant des échangeurs forts et un couplage à la spectrométrie de masse ont été rendus possible. Tout d'abord utilisée pour des analyses de petits anions inorganiques dans les eaux, les applications de la chromatographie ionique se sont ensuite étendues à des matrices plus complexes.

La métabolomique est basée sur l'identification et la quantification de métabolites permettant d'acquérir des connaissances supplémentaires sur le métabolisme. Elle conduit également à la compréhension de l'effet de contraintes externes sur le métabolisme et l'identification de nouveaux biomarqueurs de maladies afin d'en faciliter le diagnostic. L'analyse de métabolites est complexe, notamment en raison d'une grande diversité de structures moléculaires, de propriétés physico-chimiques et de concentrations au sein d'un échantillon. Ces différences de propriétés physico-chimiques et plus particulièrement la polarité et l'état d'ionisation induisent l'obligation d'utiliser plusieurs méthodes chromatographiques orthogonales pour la séparation des métabolites. La chromatographie ionique, par sa spécificité vis-à-vis des composés ionisés et/ou ionisables peut jouer un rôle important dans ce type d'étude.

Les travaux de cette thèse portent donc sur le développement d'une méthode de chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse de métabolites primaires. En collaboration avec l'Université de Genève, une liste de métabolites a été définie dans le but de comparer les performances de la chromatographie d'interactions hydrophiles, de l'électrophorèse capillaire et de la chromatographie ionique pour la séparation de ces composés. Cette liste contient 52 molécules polaires ionisables composés d'acides organiques de bas poids moléculaire et de molécules phosphatées appartenant à différentes voies métaboliques. Ainsi, l'objectif de ces travaux est de développer et d'optimiser une méthode de chromatographie ionique couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse de ces molécules. Une étude des mécanismes de rétention sera menée sur 4 phases stationnaires polymériques échangeuses d'anions afin de rationaliser le choix de la phase stationnaire pour l'application visée. Les performances d'une analyse ciblée de ces métabolites dans des fluides biologiques tels que l'urine et la salive avec une préparation d'échantillon minimale seront évaluées. Dans le but final d'élaborer une analyse de routine, les performances de systèmes conventionnel et

capillaire de chromatographie ionique seront comparées. En effet, le format capillaire présente de nombreux avantages, notamment pour le couplage à la spectrométrie de masse.

Dans ce manuscrit, après un rappel des grandeurs chromatographiques, la chromatographie ionique sera présentée avec, notamment, une description détaillée des phases stationnaires. Le couplage à la spectrométrie de masse sera ensuite introduit avec un rappel du principe des sources d'ionisation et des analyseurs utilisés lors de cette étude. Les avantages et adaptations nécessaires du chromatographe ionique au format capillaire seront ensuite décrits.

Le deuxième chapitre sera dédié plus particulièrement à l'étude des phases stationnaires afin d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes de rétention. Cette étude, dont le but est la sélection de la phase stationnaire la mieux adaptée à l'application de ces travaux, vise à appréhender les phénomènes de rétention de 4 phases stationnaires de propriétés variées dédiées à l'analyse d'acides organiques et d'anions inorganiques. Ainsi, les études thermodynamiques et cinétiques seront effectuées sur différentes phases stationnaires et différents formats de colonnes (conventionnel et capillaire).

Après sélection de la phase stationnaire, le troisième chapitre porte sur l'optimisation du couplage de la chromatographie ionique à la spectrométrie de masse à travers une étude de l'influence de la nature, du pH et du débit du solvant « make-up ». Le gradient d'élution sera optimisé et l'importance des différents paramètres de suppression sera estimée. La méthode développée sera ensuite évaluée pour l'analyse des métabolites dans des fluides biologiques (urine et salive) après une simple dilution de l'échantillon. Enfin, la transposition de la méthode au format capillaire et la comparaison des performances en termes de répétabilité, limites de détection et quantification obtenues aux deux formats seront présentées.



## **CHAPITRE I - GENERALITES**

---

## I.1. RAPPEL SUR DES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES

Avant d'entrer dans les détails des travaux réalisés, un rappel sur les grandeurs chromatographiques fondamentales est nécessaire.

### I.1.1 LES VOLUMES ET VARIANCES

#### I.1.1.1 Le volume mort et la variance totale

Le volume mort  $V_M$  qui est défini comme le volume de phase mobile (PM) contenu dans le système chromatographique équipé d'une colonne entre la vanne d'injection et le détecteur peut être calculé selon l'Équation 1.

Équation 1 
$$V_M = t_M \times d$$

Avec  $t_M$  le temps mort en min et  $d$  le débit en mL/min

Pour une mesure plus précise, les temps morts sont mesurés pour différents débits. La pente de la droite de  $t_m$  en fonction de l'inverse du débit correspond au volume mort. En chromatographie, tous les volumes morts participent à l'élargissement des pics. Cette contribution est représentée par la variance totale  $\sigma^2_{totale}$  qui correspond à la somme des variances de la colonne  $\sigma^2_c$  et extra-colonne  $\sigma^2_{e-c}$  (Équation 2)

Équation 2 
$$\sigma^2_{totale} = \sigma^2_c + \sigma^2_{e-c}$$

#### I.1.1.1 Le volume et la variance de la colonne

Le volume de la colonne comprend également le volume des frittés qu'elle contient. La variance de la colonne rend compte de sa contribution à l'élargissement des pics. Elle est calculée avec le volume mort de la colonne, le facteur de rétention  $k$  (partie I.1.2) et l'efficacité  $N$  (partie I.1.5) du composé selon l'Équation 3.

Équation 3 
$$\sigma^2_c = \frac{(V_M \times (1+k))^2}{N}$$

#### I.1.1.2 Les volumes et variances extra-colonne

Les volumes extra-colonne peuvent être calculés selon le même principe que les volumes morts mais pour un système sans colonne. Ces volumes participent à l'élargissement des pics et dépendent du système chromatographique utilisé. Afin de déterminer la contribution des volumes extra-colonne à la perte d'efficacité, il est important de déterminer la variance extra-colonne  $\sigma^2_{e-c}$  pour chaque système chromatographique utilisé [1]. Pour cela, la colonne est remplacée par un raccord union sans volume mort et le chlorure de sodium est injecté. Avec la

mesure de la largeur du pic à mi-hauteur  $\omega_{\frac{1}{2}}$  du pic obtenu, la variance extra-colonne est déterminée (Équation 4).

$$\text{Équation 4} \quad \sigma^2_{e-c} = \frac{\left(\frac{\omega_{1/2} \times d}{2}\right)^2}{5,54}$$

La variance extra-colonne représente la somme des variances de l'injecteur, du détecteur et des tubulures. La variance de l'injecteur dépend du volume injecté et du mode d'injection. L'augmentation du volume d'injection  $V_{inj}$  entraîne un gain en sensibilité mais une perte d'efficacité et donc de résolution. En revanche, pour des composés très retenus, l'effet des volumes extra-colonne est diminué ; il est donc possible d'augmenter le volume injecté sans subir trop de perte d'efficacité selon la rétention des composés. La variance extra-colonne liée au détecteur dépend de la constante de temps  $\tau$  choisie et du volume de sa cellule  $V_{cell}$  et de sa géométrie. La constante de temps est un paramètre électronique du détecteur et sa valeur contribue au carré à l'élargissement des pics (Équation 5). Ainsi, si sa valeur est élevée, les pics seront plus larges. Sa valeur doit donc être réduite au maximum sans générer un bruit de fond trop important. Les effets des tubulures sont également très importants en chromatographie. Les volumes morts au niveau des connections doivent être minimisés pour optimiser l'efficacité du système. Aussi, la longueur  $l_t$  mais surtout le diamètre des tubulures qui contribuent au carré à la variance extra colonne (Équation 5) doivent être réduits au maximum entre la vanne d'injection et l'entrée de la colonne et celui reliant la sortie de la colonne au détecteur. De plus, des connections zéro volume mort sont à privilégier.

$$\text{Équation 5} \quad \sigma^2_{e-c} = K_{inj} \frac{V_{inj}^2}{12} + K_{cell} \frac{V_{cell}^2}{12} + \tau^2 d^2 + \frac{r^2 l_t d}{7,6 D_m}$$

Avec  $K_{inj}$  et  $K_{cell}$  des constantes et  $D_m$  le coefficient de diffusion du soluté

Pour une bonne séparation, la variance extra-colonne ne doit pas être dépasser 10% de la variance totale.

### I.1.1.3 Le volume de délai

Ces travaux se partageant sur différents systèmes chromatographiques, un autre paramètre doit être rappelé : le volume de délai [2]. Ce volume est calculé à partir du temps de délai entre le gradient programmé et le gradient effectif après les pompes et/ou la chambre de mélange (Figure 1). En effet, le volume de délai étant dépendant d'un système, lors d'une transposition de méthode d'un système à un autre un retard d'établissement du gradient non désiré peut se créer dans la colonne. Ce phénomène peut provoquer d'importants changements de rétention et/ou de sélectivité. Ce délai se mesure sur un système sans colonne en imposant un gradient où la concentration en NaOH augmente rapidement. L'augmentation en NaOH, sans courant

de suppression, entraîne l'augmentation du signal de la ligne de base en fonction du temps. Le temps de rétention de la rupture de pente de la ligne de base multiplié par le débit correspond au volume de délai. La transposition d'une méthode sur un système doit se faire pour un rapport temps de délai sur temps mort constant [3].

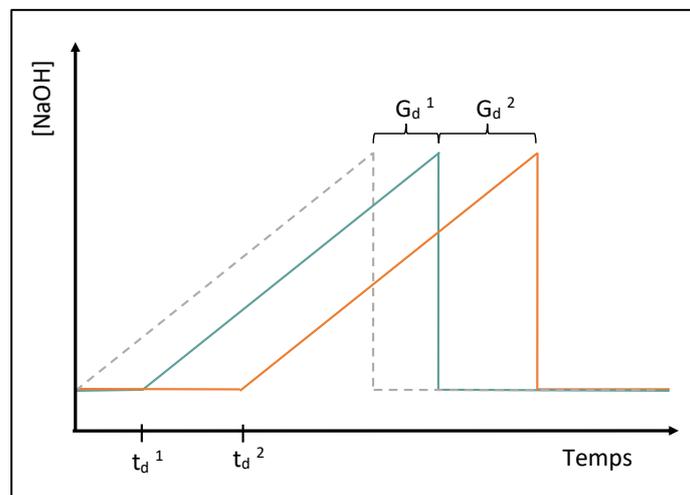


Figure 1 : Représentation schématique du gradient obtenu sur l'appareil 1 (en bleu) et l'appareil 2 (en orange) par rapport au gradient imposé (pointillés)

Avec  $G_d^1$  le délai de gradient entre le gradient imposé et le gradient effectif pour l'appareil 1 et  $G_d^2$  le délai de gradient entre l'appareil 1 et l'appareil 2.

### I.1.2 LE FACTEUR DE RETENTION K

La rétention d'un composé est fonction de sa distribution entre la phase stationnaire (PS) et la PM. Cet équilibre est représenté par le facteur de rétention  $k$ , grandeur sans dimension, défini par le rapport du temps de rétention réduit ( $t'_R$ ) sur le temps mort (Équation 6).

Équation 6 
$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Avec  $t_R$  le temps de rétention du soluté.

Le facteur  $k$  étant indépendant du débit et des dimensions de la colonne, il sera utile pour comparer la variation de la rétention des solutés sur les différents formats de chromatographie d'échange d'ions (IC) et différentes colonnes.

### I.1.3 LE FACTEUR D'ASYMETRIE $A_S$

Le pic chromatographique d'un composé obtenu après l'éluion de ce dernier dans une colonne est rarement parfaitement Gaussien, quelle que soit la technique chromatographique utilisée. Afin de caractériser l'asymétrie de pic, le facteur d'asymétrie peut être calculé à partir de l'Équation 7 généralement à 10% de la hauteur du pic chromatographique (Figure 2).

Équation 7 
$$A_S = \frac{b}{a}$$

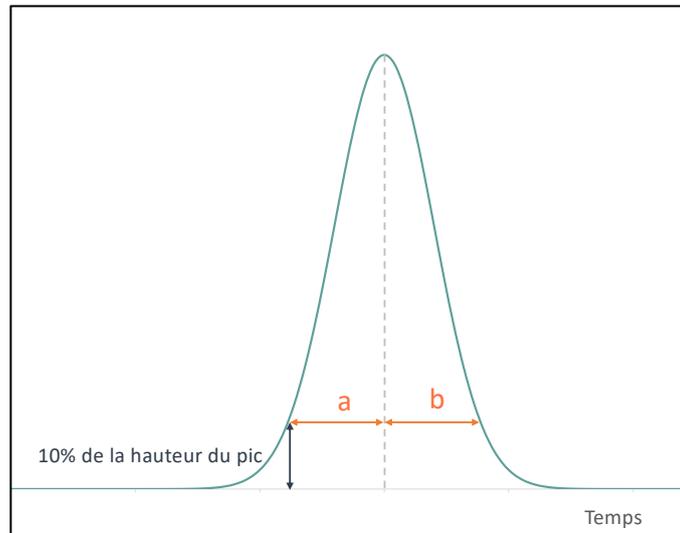


Figure 2 : Définition du facteur d'asymétrie

Une valeur de  $A_S$  supérieure à 1 correspond à une « traînée de pic ». C'est-à-dire que le signal du pic augmente rapidement et diminue lentement. A l'inverse, un signal avec une augmentation lente suivie d'une diminution rapide est caractéristique d'un « front diffus » dont le facteur d'asymétrie est inférieur à 1. En chromatographie, ces effets doivent être limités. Cette déformation des pics est liée à la distribution  $K$  des solutés entre la PS et la PM (Équation 8 et Figure 3). Pour une concentration plus élevée du composé dans la PM,  $K$  diminue et le pic est traînant. Pour une concentration plus faible dans la PM que dans la PS, le pic du composé présente un front diffus.

Équation 8 
$$K = \frac{C_{PS}}{C_{PM}}$$

Avec  $C_{PS}$  la concentration en soluté dans la PS et  $C_{PM}$  la concentration en soluté dans la PM.

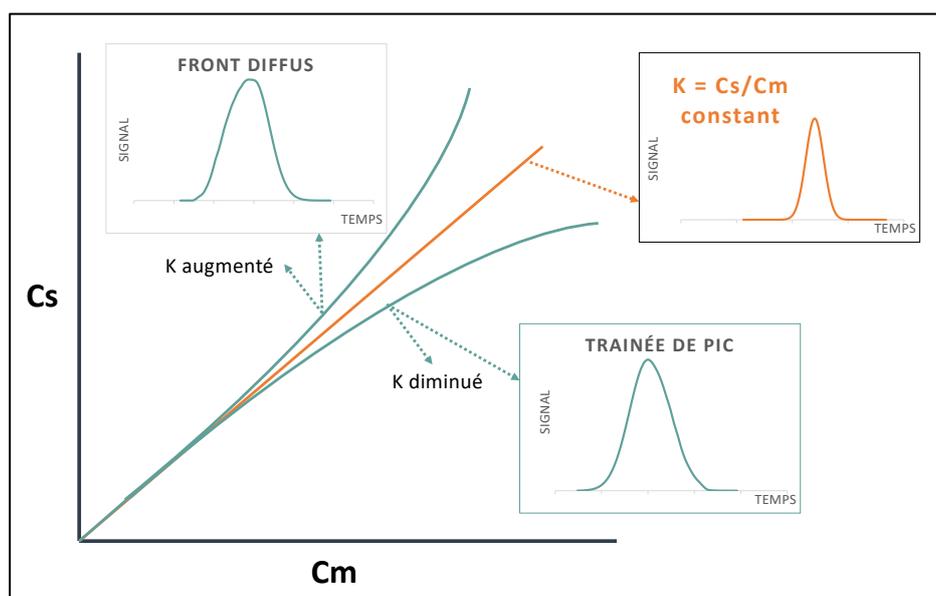


Figure 3 : Déformation du pic selon la distribution des solutés entre la PS et la PM. Schéma inspiré de la présentation « Aspects théoriques de la séparation chromatographique »<sup>[4]</sup>

#### I.1.4 LA SELECTIVITE $\alpha$

La sélectivité est un paramètre important pour la caractérisation de la séparation de deux composés. Le calcul de la sélectivité est fait à partir de l'Équation 9.

Équation 9 
$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{k_2}{k_1}$$

La sélectivité est dépendante de la PS, de la température de la colonne et de la composition de PM. Pour une sélectivité de 1, les deux composés ont le même comportement thermodynamique sous les conditions données et sont co-élus.

#### I.1.5 L'EFFICACITE N

L'efficacité permet de rendre compte des phénomènes de dispersion des molécules de soluté dans le système chromatographique. C'est une grandeur dépendante de tout paramètre influençant la rétention du composé mais également de la température. Dans des conditions données et pour des pics gaussiens, cette efficacité s'exprime selon l'Équation 10 en nombre de plateaux théoriques.

Équation 10 
$$N = 5,54 * \left( \frac{t_R}{\frac{\omega_1}{2}} \right)^2$$

L'efficacité peut également s'exprimer en fonction de la longueur L de la colonne et de la hauteur équivalente à un plateau théorique H (ou HEPT) (Équation 11).

Équation 11 
$$N = \frac{L}{H}$$

Cette grandeur chromatographique permet de comparer les performances des colonnes en chromatographie pour une PM, un composé et une température donnés. Cette théorie de plateau est basée sur les travaux de Martin et Synge [5] que van Deemter *et al.*[6] ont adaptés à la chromatographie. La corrélation est faite entre la technologie de distillation et la mesure de l'élargissement relatif des pics chromatographiques. La hauteur équivalente à un plateau théorique est exprimée selon l'Équation 12 et appelée équation de van Deemter.

Équation 12 
$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Avec  $\mu$  la vitesse linéaire en cm/s ; A l'anisotropie d'écoulement ;  $\frac{B}{\mu}$  la diffusion longitudinale et  $C\mu$  la résistance au transfert de masse entre la PS et la PM.

À l'intérieur de la colonne, différents phénomènes dispersifs entraînent un élargissement de la bande d'élution. Dans une colonne remplie, les molécules de soluté n'ont pas un trajet rectiligne et vont traverser la colonne en passant aléatoirement dans les interstices entre les particules de PS ce qui va induire des différences de longueur de parcours pour chaque

molécule. C'est l'anisotropie d'écoulement A. Ce facteur peut être minimisé par un remplissage homogène de particules de faibles diamètres et une faible distribution de la taille de ces dernières. Ce facteur peut être un indicateur de la qualité de remplissage. Un facteur A élevé est généralement marqueur d'un remplissage ou de distribution de taille de particules inhomogène. La diffusion longitudinale B intervient également dans l'élargissement des pics. Lors de l'élution d'un composé, un gradient de concentration du composé apparaît et une diffusion des solutés des régions les plus concentrées vers les régions les moins concentrées se fait. Le dernier phénomène, appelé résistance au transfert de masse C, correspond aux irrégularités de passage d'une molécule de soluté d'une phase à l'autre. En effet, plus elle est poreuse, plus les solutés peuvent prendre du retard par rapport à un soluté ne se diffusant pas à l'intérieur des pores. Un débit élevé accentue cette différence de vitesse du soluté.

Ces phénomènes sont affectés différemment par le débit ce qui induit l'existence d'un débit optimal pour lequel la combinaison de ces trois effets dispersifs sera minimale et l'efficacité maximale.

L'efficacité d'une colonne  $N_{\text{colonne}}$  annoncée par le constructeur pour un composé est de manière générale toujours supérieure à l'efficacité réelle  $N_{\text{réelle}}$  car les systèmes de nos laboratoires ne sont pas optimisés pour maximiser l'efficacité. Le nombre de plateaux réels peut être facilement calculé selon l'Équation 13.

Équation 13 
$$N_{\text{réelle}} = N_{\text{colonne}} \times \frac{1}{1 + \frac{\sigma^2_{e-c}}{\sigma^2_c}}$$

### I.1.6 LA RESOLUTION R

La résolution de deux pics consécutifs est une grandeur sans dimension exprimée selon l'Équation 14.

Équation 14 
$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Avec  $\omega_1$  et  $\omega_2$  la largeur à la base des pics 1 et 2

Pour une analyse quantitative, une résolution minimale de 1,5 permettant un retour quasi complet à la ligne de base est nécessaire. Une résolution supérieure induirait un temps d'analyse trop long.

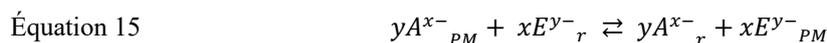
## I.2. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

Le terme « chromatographie ionique » a longtemps été utilisée au sens large et désignait toutes les techniques reposant sur les interactions ioniques. De nos jours, la chromatographie ionique désigne communément la chromatographie d'échange d'ions. C'est dans ce sens que ce terme sera employé au cours de ces travaux. Les échantillons analysés dans ces travaux étant chargés

négativement, c'est exclusivement la chromatographie d'échange anionique qui sera détaillée ci-dessous.

### I.2.1 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

En chromatographie ionique, la séparation est basée sur un processus d'échange des ions de l'éluant E de charge y et ceux du soluté A de charge x entre la PM et la résine r selon l'Équation 15.



Cet équilibre est défini par la constante d'équilibre K (Équation 16).

Équation 16 
$$K_{A,E} = \frac{[A^{x-}]^y_r [E^{y-}]^x_{PM}}{[E^{y-}]^x_r [A^{x-}]^y_{PM}}$$

La séparation résulte donc de l'affinité des ions et de la PM pour la PS. Plus un ion a d'affinité pour la PS, plus le temps de rétention est important. En chromatographie ionique cette affinité dépend, dans l'ordre de :

- La densité de charge de l'ion solvaté : Lorsque le soluté s'ionise dans la PM aqueuse, des interactions ion-dipôle conduisent à la formation d'une nouvelle structure. Plus l'ion est de petite taille, plus l'hydratation sera importante. La densité de charge et la rétention seront donc plus faibles. De manière générale, plus la valence d'un ion est importante, plus l'ion sera retenu.
- La polarisabilité : relate la capacité d'un ion à se déformer sous l'influence d'un champ électrique. Plus un ion aura un rayon ionique important, plus il sera polarisable et plus il sera retenu.

En réalité, si l'échange d'ions est l'interaction principale qui intervient dans la rétention en chromatographie ionique, ce n'est pas la seule : des interactions non ioniques interviennent également. Les interactions non ioniques les plus importantes peuvent être attribuées à des liaisons de type Van der Waals (interactions dipolaires),  $\pi$ - $\pi$  ou anions- $\pi$  et des interactions hydrophobes. En chromatographie ionique les interactions secondaires sont difficiles à identifier clairement et à estimer. Dans ces travaux, une étude de ces interactions et de leur influence sur la rétention a été menée et est présentée en chapitre II.

### I.2.2 LES PHASES STATIONNAIRES

Les phases stationnaires étudiées dans ces travaux étant exclusivement des phases stationnaires comportant des échangeurs forts d'anions et compatibles avec une PM hydroxyde, ce sont principalement ces technologies qui seront décrites ici. En chromatographie ionique, les phases stationnaires sont composées deux parties : le substrat et le groupement échangeur. Ces derniers

sont principalement des groupements ammoniums quaternaires en chromatographie d'échange d'anions.

#### I.2.2.1 Les caractéristiques des phases stationnaires

Les colonnes sont généralement caractérisées par leur capacité d'échange d'ions, c'est-à-dire leur nombre de site échangeurs d'ions par gramme de résine (en meq/g) ou pour tout le volume de colonne (en meq/col). Les colonnes de chromatographie ionique se différencient également selon le substrat utilisé, le groupement fonctionnel et le type de greffage. L'influence des caractéristiques des PS utilisées pour les colonnes (taille, distribution de la taille, porosité...) sur les grandeurs chromatographiques en IC suit les mêmes principes qu'en HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance)<sup>[7]</sup>.

La tendance actuelle pour les phases stationnaires de chromatographie liquide consiste à diminuer le diamètre de particules pour obtenir des colonnes plus efficaces et des séparations plus rapides. Seulement la diminution du diamètre des particules entraîne également une augmentation de la pression et un compromis doit être fait lors du choix de la PS. En chromatographie ionique, les particules sont généralement de tailles plus importantes que les particules de silice utilisées en HPLC. Les plus petites particules sont actuellement de 4 µm en IC ce qui fait des colonnes IC des colonnes moins efficaces que les colonnes d'HPLC.

De nos jours, une grande attention est portée sur la distribution en tailles de particules car une distribution trop large conduit à une perte d'efficacité et des performances chromatographiques <sup>[8]</sup>. Ce phénomène est d'autant plus important que les particules sont fines. La porosité d'une colonne comprend le volume entre les particules de PS et le volume des pores des particules. Une forte porosité permet d'augmenter la surface d'échange mais également de diminuer la pression induite par la colonne. En revanche, la diffusion des solutés dans les interstices induit un élargissement des pics et donc une perte d'efficacité.

Au début de la chromatographie ionique, afin de limiter le signal de la PM en l'absence du suppresseur, des électrolytes faibles étaient utilisés avec des colonnes de faibles capacités. Avec l'apparition du suppresseur, l'utilisation de colonnes de plus forte capacité a été rendu plus aisée. De nos jours, la recherche tend vers des colonnes avec des capacités de plus en plus élevées et donc de plus en plus rétentives. Cela a mené à la synthèse des phases stationnaires échangeuses d'anions que l'on connaît actuellement et qui sont décrites ci-dessous.

#### I.2.2.2 Les substrats

Il existe différents types de substrats pour les phases stationnaires en chromatographie ionique : les polymères, la silice et les monolithes. Bien que la silice greffée mène à des colonnes plus efficaces et plus résistantes mécaniquement <sup>[9]</sup>, elles ne sont utilisables que dans une gamme de

pH comprise entre 2 et 8 ce qui limite les possibilités en terme d'éluant et de solutés. En effet, pour des pH inférieurs à 2 la silice peut s'hydrolyser et pour des pH supérieurs à 8, la silice risque de se dissoudre. Ce type de phase n'est donc pas compatible avec l'utilisation de l'éluant hydroxyde, c'est pourquoi les colonnes à base de polymère sont les plus répandues.

Le copolymère polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) et le copolymère éthylvinylbenzène-divinylbenzène (EVB-DVB) sont les substrats les plus largement utilisés en chromatographie ionique en raison de leur résistance à une gamme de pH allant de 0 à 14 qui facilite la diversification des éluants à des concentrations variées. La copolymérisation du styrène avec le DVB permet également l'obtention d'une résine mécaniquement stable et de ce fait, d'obtenir une colonne plus résistante aux fortes pressions sur le long terme. La structure de la résine obtenue est présentée en Figure 4.

La porosité de la résine est liée aux pourcentages de DVB dans le copolymère défini comme le pourcentage de réticulation. De plus, lorsque ce degré de copolymérisation augmente, la solvation de la résine par un solvant polaire diminue ce qui permet d'éviter le gonflement de la PS avec l'utilisation de modifiants organiques. Ainsi, pour des copolymères ayant un pourcentage de réticulation supérieur ou égal à 55%, 100% de modifiant organique peut être utilisé sans risque d'altérer la PS. Les phases stationnaires Thermofisher Scientific étudiées ici étant généralement réticulées à 55%, elles sont compatibles avec la plupart des solvants organiques. Le tétrahydrofur en revanche ne peut être utilisé à plus de 20%.

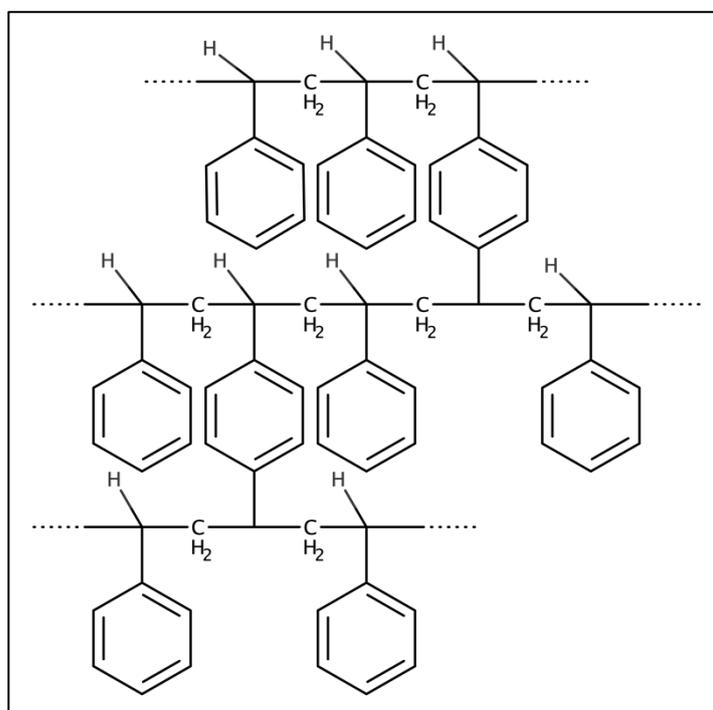


Figure 4 : Structure d'une résine PS/DVB. Inspiré du schéma de J.Weiss<sup>[10]</sup>

Il existe également d'autres polymères utilisés pour la formation des substrats : le polyméthacrylate et le polyvinylalcool mais en raison de leur manque de stabilité à des pH au-deçà de 2 et au-delà de 12, leur utilisation est limitée à une PM composée d'un mélange carbonate/hydrogénocarbonate. Ces phases stationnaires n'ont donc pas connu un aussi grand essor.

L'utilisation des copolymères PS-DVB et EVB-DVB présente cependant un problème d'interactions non-ionique entre la PS et les anions comme le nitrate, l'iodure et le perchlorate<sup>[11]</sup>. Des interactions secondaires du type van der Waals,  $\pi - \pi$ , anions- $\pi$  et autres peuvent intervenir et induire des traînées de pic et des temps de rétention plus longs notamment pour les anions polarisables. Ce phénomène peut être réduit en éloignant le groupement échangeur de la surface du polymère<sup>[12]</sup>.

Le substrat peut également être un monolithe. Les colonnes monolithiques sont très connues pour induire des pressions plus faibles que toutes les autres colonnes ce qui fait du monolithe un matériau de choix pour des analyses rapides à haut débit. Les premiers monolithes étaient à base de silice<sup>[13]</sup> ce qui rendait leur utilisation compatible sur une gamme de pH restreinte. Les monolithes à base de polymère ont, quant à eux, les mêmes avantages que les substrats à base de polymère en termes de résistance aux pH et à la pression.

Les colonnes monolithiques sont généralement préparées dans des capillaires de silice fondue car le monolithe doit être lié de manière covalente à la paroi interne de la colonne. Ces hardware, bien qu'encore très utilisés, ne sont pas très compatibles avec l'échange d'anions pour les mêmes raisons que les particules de silice. Le développement des techniques pour lier le monolithe à une tubulure en PEEK (Poly Ether Ether Keton) a permis l'élaboration de phases stationnaires davantage compatible avec la chromatographie ionique. En effet, il est important que le monomère soit lié aux parois internes du hardware pour éviter qu'un chemin préférentiel entre la paroi et le monolithe ne se crée. Cela induirait des pertes de performances chromatographiques.

La synthèse de ces monolithes se fait généralement *in situ* dans le capillaire de silice fondu et en très peu d'étapes. La polymérisation *in situ* permet à la colonne de servir de « moule » et que le monolithe remplisse le tube de manière uniforme. Le mélange permettant la synthèse d'un tel polymère poreux contient généralement un monomère et un co-monomère (en quantité dépendante du pourcentage de copolymérisation souhaité), un agent porogène et un initiateur de polymérisation. Les monomères les plus communément utilisés sont ceux à base de styrène, de (méth)acrylate<sup>[14-16]</sup> et d'acrylamide<sup>[17]</sup> mais une large gamme de monomères peut être utilisée contrairement aux substrats polymériques. Chaque composant de la synthèse peut avoir un impact sur les propriétés de la PS synthétisées. Il existe donc autant

de monolithes qu'il existe de combinaisons entre les différents mode d'initiations, types et quantités de co-monomère, compositions et concentration de l'agent porogène et températures de polymérisation. De plus, le monolithe peut être formé à partir de monomères comportant le groupement échangeur d'ions. Comme précisé précédemment, les colonnes monolithiques ont l'avantage de permettre des analyses plus rapides que les colonnes à base de particules de polymère.

Le groupement échangeur peut être fonctionnalisé directement sur la surface du substrat par dérivation chimique. Il existe également les résines avec un revêtement de surface ou les résines dites « greffées » ou « hyper-ramifiées ». Enfin, le groupement échangeur d'ions peut être fonctionnalisé sur une bille de latex liée au substrat, ce sont les résines pelliculaires<sup>[18]</sup>.

### I.2.2.3 La dérivation chimique

Cette technique consiste à dériver chimiquement les groupements de la surface du substrat, permettant une forte capacité d'échange<sup>[18]</sup>. Cependant, cette synthèse nécessite plusieurs étapes différentes menant à une faible reproductibilité des performances chromatographiques et de la capacité des colonnes. De plus, la dérivation n'étant pas limitée à la surface mais s'étendant sur les pores, ces colonnes présentent une faible efficacité<sup>[11]</sup>.

### I.2.2.4 Les résines greffées

Ces résines sont fonctionnalisées sur la surface de la bille de polymère PS/DVB en deux étapes : l'addition d'un groupement chlorométhyle et l'amination avec une amine tertiaire (Figure 5). Le terme « greffé » traduit donc la présence d'une liaison covalente entre le substrat et le groupement fonctionnel.

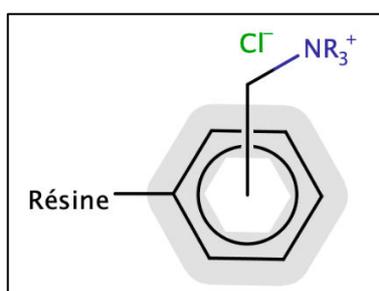
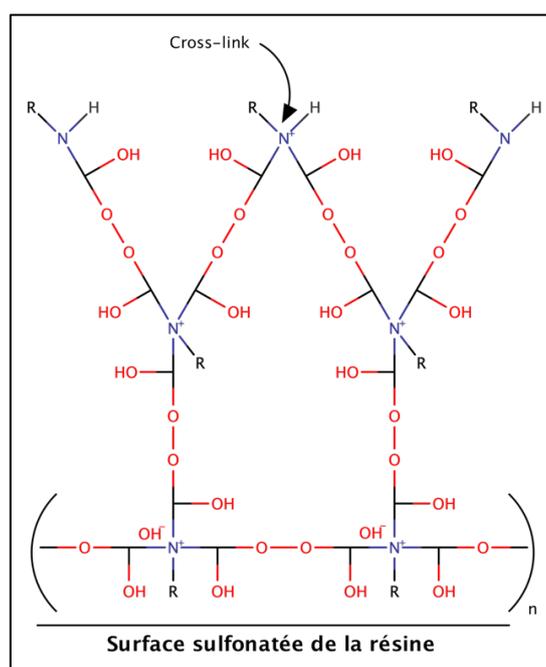


Figure 5 : Schéma d'une résine greffée

Ces résines sont composées de billes allant de 4 à 10  $\mu\text{m}$  et possèdent des capacités allant de 0,001 à 0,09 meq/g. Ces PS mènent à des interactions secondaires importantes car les groupements échangeurs d'anions sont directement fonctionnalisés sur la surface. Cette proximité des fonctions échangeuses et de la surface du substrat peut entraîner notamment la répulsion des solutés par la surface chargée du substrat.

### I.2.2.5 La modification de la surface du substrat

Cette technique est utilisée pour déposer une couche fonctionnalisée sur la surface du substrat. A la différence des résines greffées, cette couche est liée de manière non-covalente à la surface du substrat. Les interactions entre le groupement fonctionnel et le substrat peuvent être de l'adsorption, des liaisons hydrogènes ou des interactions électrostatiques<sup>[18]</sup>. De plus, l'hydrophobicité du substrat a un effet non négligeable sur la sélectivité et l'efficacité, et plus particulièrement sur les anions polarisables. Concernant les groupements échangeurs liés par une liaison hydrophobe au substrat, la PS présente une faible stabilité et n'est pas compatible



avec de fortes concentrations en solvant organique dans la PM<sup>[11]</sup>.

### I.2.2.6 Les résines hyper-ramifiées

Une PS dite « hyper-ramifiée » est composée d'un polymère lié électro-statiquement au substrat PS-DVB. Ce polymère est synthétisé par la réaction d'une molécule possédant deux groupements époxy avec une amine tertiaire. Des réactions successives avec des fonctions diépoxy et des amines tertiaires conduisent à l'obtention de la résine présentée en Figure 6. Cette réaction répétée permet de doubler le nombre de sites échangeurs d'ions et donc d'augmenter considérablement la capacité de la résine. Cependant, la forte densité de copolymérisation induite diminue la sélectivité de la PS.

Figure 6 : Structure d'une résine hyper-ramifiée

### I.2.2.7 Les résines pelliculaires

Cette PS possède une structure particulière : elle est composée d'un substrat lié par des interactions électrostatiques à des nanobilles de chlorure de polyvinyle ou de polyméthacrylate

dont la surface est poreuse et permet l'échange d'ions. Ces nanobilles ont un diamètre d'environ 0,1  $\mu\text{m}$ . Cela résulte en une PS composée deux régions avec des propriétés chimiques différentes (voir la Figure 7) :

- Un substrat mécaniquement stable sulfonaté (I.2.2.2).
- Une couche de nanobilles portant les groupements échangeurs d'anions

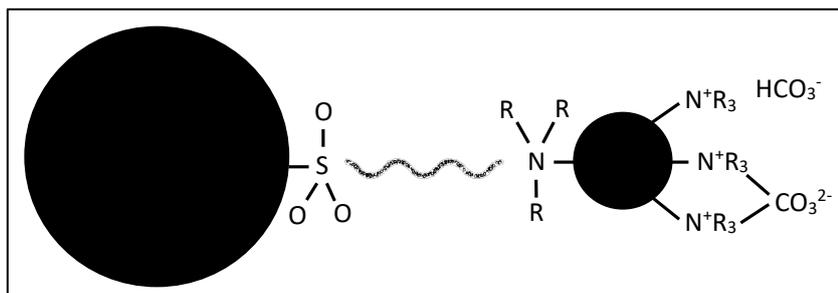


Figure 7 : Schéma d'une résine pelliculaire <sup>[10]</sup>

Ces phases stationnaires ont été créées par Small *et al.* <sup>[19]</sup> et développées ensuite par Thermofisher Scientific Dionex. Ces résines pelliculaires sont très intéressantes pour :

- Leur efficacité selon la taille des billes de latex et le degré de sulfonation de la surface
- La diminution du phénomène de gonflement et de rétractation grâce à la fonctionnalisation de la surface<sup>[10]</sup>.

En revanche, bien que l'amination totale des nanobilles permette un fort échange d'ions, la petite taille des billes limite la capacité de ces phases stationnaires.

Ce type de fonctionnalisation suscite un grand intérêt car la distance entre la surface du copolymère et les groupements échangeurs d'anions des nanobilles permet de limiter les interactions secondaires et donc les pertes de performances associées.

### I.2.3 L'APPAREILLAGE

Depuis sa création et au fil des avancées technologiques, le chromatographe ionique a beaucoup évolué. Il s'est petit à petit différencié de l'HPLC grâce à des tubulures non métalliques biocompatibles, la présence d'un supprimeur et d'un générateur d'éluant ionique.

#### I.2.3.1 La détection conductimétrique

L'analyse des composés sous forme ionique fait du conductimètre un détecteur de choix pour la chromatographie ionique. Tous les appareils de chromatographie ionique en sont d'ailleurs équipés. En effet, la résistance électrique  $R$  d'un électrolyte suit la loi d'Ohm (Équation 17)

Équation 17 
$$R = \frac{U}{I}$$

Avec U la tension et I l'intensité du courant

La résistivité  $\rho$ , dépendante de la résistance R (Équation 18), est inversement proportionnelle à la conductivité totale  $\Lambda$  (Équation 19).

Équation 18 
$$\rho = \frac{AR}{l}$$

Avec A la section transversale et l la longueur du conducteur.

Équation 19 
$$\Lambda = \frac{1}{\rho}$$

La conductivité totale est définie par l'Équation 20 comme étant la somme des conductivités électriques  $\lambda$  des charges positives et négatives.

Équation 20 
$$\Lambda = \sum \lambda_+ + \sum \lambda_-$$

La conductivité électrique dépendant de la concentration, un lien direct peut donc être établi entre la résistance d'un ion et sa concentration.

Le détecteur conductimétrique est composé de deux électrodes entre lesquelles est appliquée une tension. La conductance G, mesurée par le détecteur au cours de l'analyse, varie lorsqu'une espèce ionique traverse la cellule. Cette conductance étant définie comme l'inverse de la résistance, elle est donc dépendante de la concentration des espèces ioniques.

L'eau fréquemment utilisée comme diluant pour les échantillons, possède une conductivité considérée comme nulle. Lorsque l'eau traverse la cellule, sa conductance étant plus faible que celle de l'éluant, le signal devient négatif. Ce pic négatif est utilisé comme mesure du temps mort.

### I.2.3.2 Le suppresseur

Les colonnes de très haute capacité (environ 1 meq/g) mènent à des temps de rétention élevés qu'il faut corriger avec l'utilisation d'un éluant fort. Ce dernier induit généralement une difficulté voire une impossibilité à utiliser la détection conductimétrique en raison de la forte concentration de l'éluant. Dans un premier temps, deux solutions ont été envisagées pour palier à ce problème : la première était d'utiliser une détection UV<sup>[20]</sup> et la seconde était d'utiliser des colonnes de plus faibles capacités d'échange avec des éluants eux aussi moins forts<sup>[21]</sup>. Ces deux solutions limitant les applications aux composés contenant des chromophores ou augmentant considérablement le temps d'analyse, une autre solution a rapidement vu le jour : l'utilisation d'un suppresseur. Ce dispositif est aujourd'hui largement utilisé en chromatographie ionique pour augmenter le rapport signal sur bruit car il permet de supprimer le signal de la PM en la neutralisant tout en maximisant la réponse du soluté.

Le principe du suppresseur, son utilité pour un couplage à la spectrométrie de masse et les différentes technologies de suppresseurs sont décrites dans l'Article II. Un résumé schématique de ces suppresseurs est présenté en Figure 8.

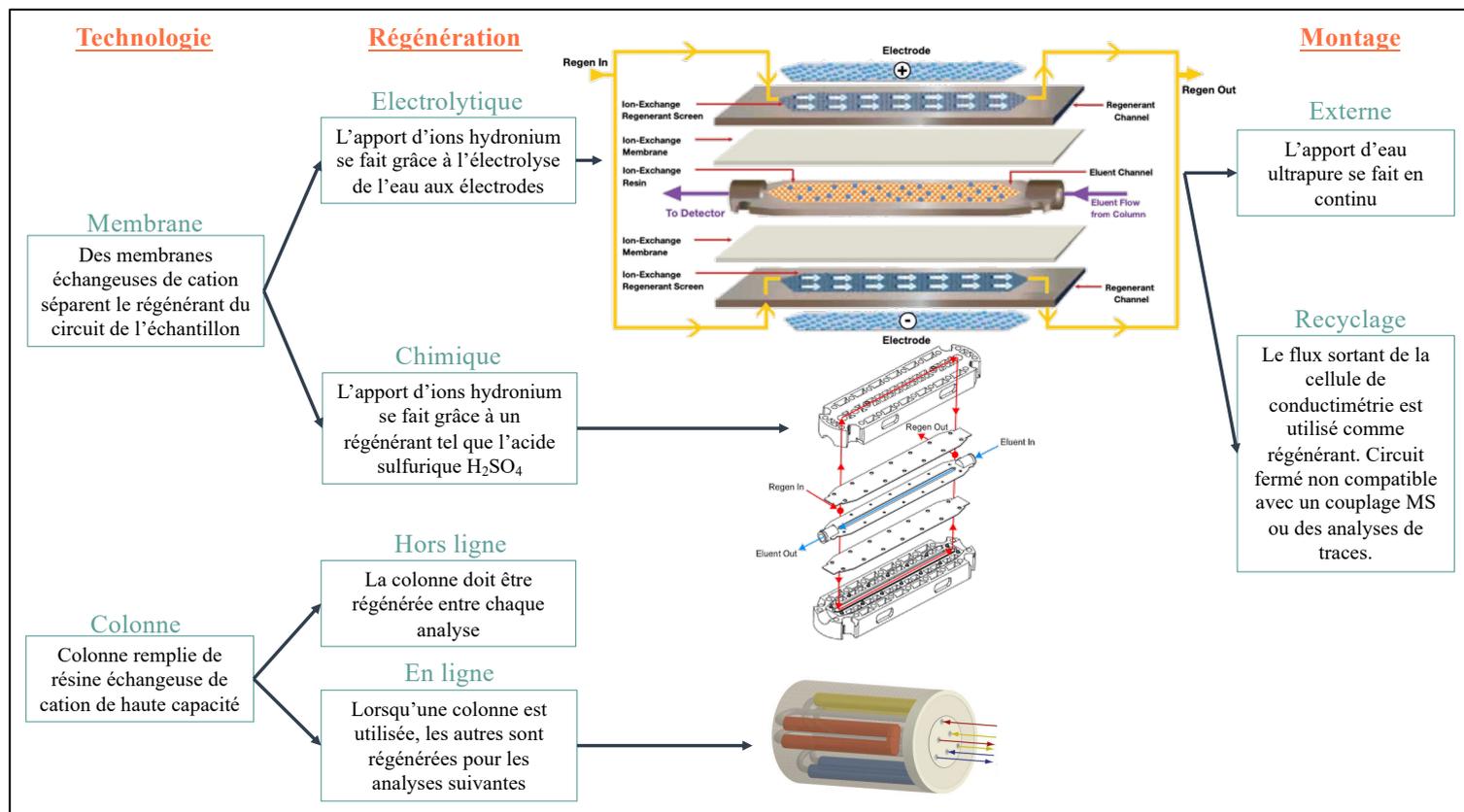


Figure 8 : Résumé schématique des deux technologies de suppresseur et de leurs modes de régénération. Figures extraites des manuels de Thermofisher Scientific<sup>[22, 23]</sup> et de Metrohm<sup>[24]</sup>.

### I.2.3.3 Le générateur d'éluant

Les éluants les plus classiquement utilisés en échange d'anions sont l'hydroxyde de sodium ou de potassium et le carbonate de sodium. L'utilisation répandue de ces éluants est principalement due à leur facilité d'utilisation puisque des suppresseurs électrolytiques et des générateurs d'éluants sont dédiés pour ces phases mobiles. Le générateur d'éluant repose sur un principe simple. Dans le cas de l'éluant hydroxyde, il est composé d'une anode et d'une cathode qui produisent respectivement des ions H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup> grâce à l'électrolyse de l'eau. Les ions H<sup>+</sup> produits par l'électrode vont remplacer les ions K<sup>+</sup> du réservoir électrolytique. Ces ions K<sup>+</sup> vont traverser la membrane échangeuse de cations pour rejoindre les ions OH<sup>-</sup> produits par la cathode et former du KOH.

Ce type de système permet un gain de reproductibilité et de répétabilité. Il permet également d'éviter la carbonatation de l'hydroxyde de potassium. Le principal inconvénient d'un tel système est l'impossibilité d'ajouter un pourcentage de modifiant organique pour l'éluant.

### I.3. LE COUPLAGE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (IC-MS)

D'abord largement utilisé en chromatographie liquide, le couplage au spectromètre de masse (MS) est maintenant couramment utilisé avec la chromatographie ionique. L'essor de ce couplage est dû à la possibilité d'identification, la spécificité et la sensibilité qu'apporte la MS. Le couplage de la IC à la MS n'étant pas trivial, plusieurs optimisations sont nécessaires et seront davantage détaillées dans l'Article II.

#### I.3.1 LA SOURCE D'IONISATION

Comme en HPLC, le couplage IC-MS nécessite une interface appelée « source d'ionisation ». Les premières interfaces utilisées pour un couplage IC-MS ont été le Fast Atom Bombardment (FAB)<sup>[25]</sup> et le particle beam<sup>[26]</sup>. Les sources d'ionisation à pression atmosphériques (API) ont ensuite vu le jour, simplifiant le couplage notamment en tolérant des débits plus élevés. En raison du caractère polaire à très polaire des solutés en IC, la source d'ionisation la plus communément utilisée pour le couplage IC-MS est l'électrospray (ESI) dont le principe est détaillé dans l'Article II (Figure 9).

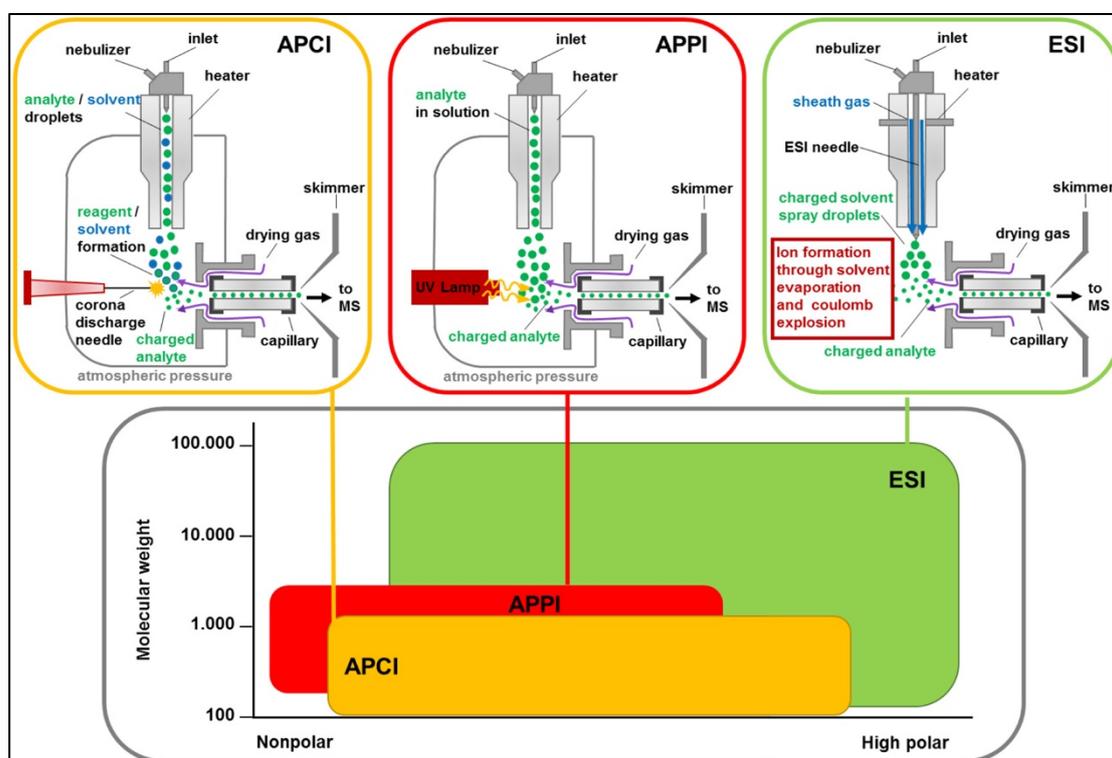


Figure 9 : Comparaison de la gamme de masse et de polarité des 3 sources API et le schéma de leur structure<sup>[27]</sup>.

#### I.3.2 LES ANALYSEURS

L'analyseur permet la séparation des ions selon leurs rapports  $m/z$ . Il existe différents analyseurs tels que le piège à ions, le quadripôle, le triple quadripôle (QqQ), l'analyseur à temps

de vol (TOF : Time Of Flight), le FT-ICR (spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique) ou encore l'orbitrap. Les analyseurs sont caractérisés par leur gamme de rapport mass/charge ( $m/z$ ), leur vitesse de balayage, leur précision et leur résolution. Ces données sont résumées pour les principaux analyseurs dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des principaux analyseurs de spectrométrie de masse

<b>Analyseur de masse</b>	<b>Résolution</b>	<b>Précision (ppm)</b>	<b>Vitesse de balayage (Hz)</b>	<b>Gamme <math>m/z</math></b>
Piège à ion	500-4000	100-1000	10	50 - 6000
Quadripôle	500-2000	100-1000	1 - 20	50 - 4000
QqQ	500-2000	100-1500	1 - 20	50 - 1500
TOF	10000-20 000	5-50	30	Pas de limite
Orbitrap	100000-200000	< 5	1	50 - 50000
FT-ICR	200000-1000000	< 2	1	50 - 30000

Les vitesses de balayage présentées dans le Tableau 1 sont données à titre indicatif car la vitesse de balayage est dépendante de la gamme de  $m/z$  balayée, du mode de balayage choisi ainsi que du fournisseur de l'appareil.

Les principes des deux analyseurs utilisés dans ces travaux, le simple et le triple quadripôle, sont détaillés ci-après.

### I.3.2.1 L'analyseur simple quadripôle

Le simple quadripôle (SQ) est composé de quatre barres parallèles dont chaque paire opposée sont reliées entre elles et soumise au même potentiel (Figure 10). Les électrodes adjacentes sont de même valeur de potentiel mais de signe opposé afin de créer un champ électrique quadripolaire. Les ions vont traverser ces pôles en oscillant. Les ions dont l'oscillation est stable durant la traversée du triple quadripôle seront analysés, les autres seront éliminés. Cette stabilité étant dépendante du champ électrique imposé, il est possible de sélectionner un ion de rapport  $m/z$  selon le courant sélectionné.

Le simple quadripôle permet un balayage en mode Full Scan dans lequel tous les ions de rapport  $m/z$  compris dans la gamme de masse sélectionnée sont envoyés vers le détecteur ou en mode SIM (Selected Ion Monitoring) où un seul rapport  $m/z$  est sélectionné. Le mode SIM permet d'obtenir une meilleure sensibilité pour la quantification.

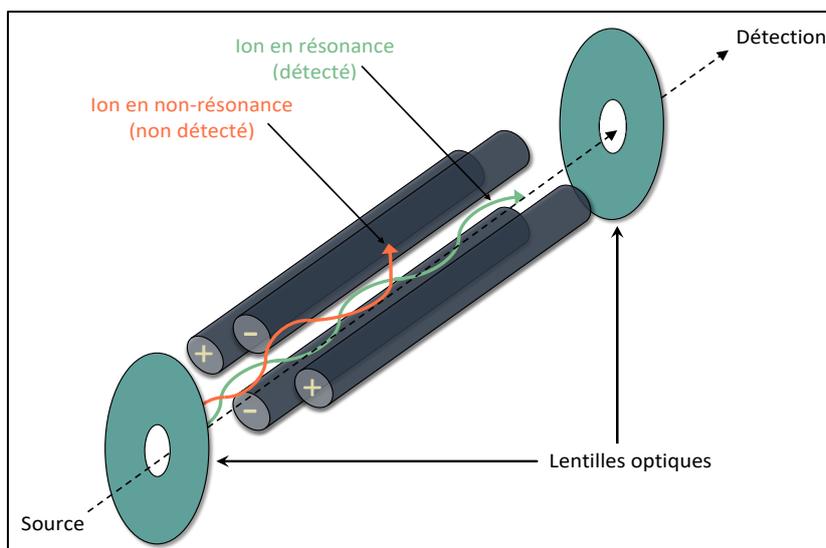


Figure 10 : Schéma d'un analyseur simple quadripôle. Inspiré de la figure 4 de l'article « Apport des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse tandem aux dosages des stéroïdes »<sup>[28]</sup>

### I.3.2.2 L'analyseur triple quadripôle

Le triple quadripôle est un analyseur en tandem (MS/MS). Comme son nom l'indique, il est composé de trois quadripôles en ligne et permet de suivre une transition (Figure 11). En effet, le premier quadripôle Q1 permet la sélection d'un ion précurseur issu de la source d'ionisation. Cet ion est ensuite fragmenté dans le deuxième quadripôle q2. Le dernier quadripôle Q3 permet la sélection d'un ion produit pour l'envoyer dans le détecteur.

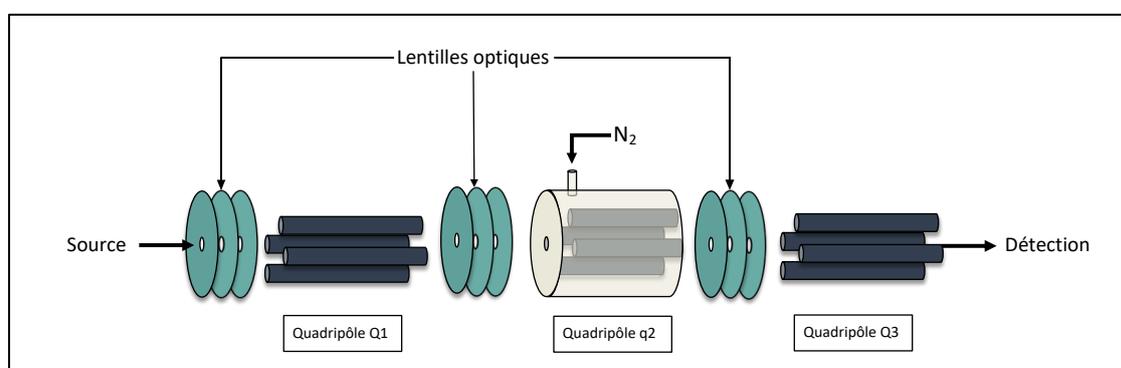


Figure 11 : Schéma d'un analyseur triple quadripôle. Inspiré de la figure C7 de la thèse de Cédric Mesmin<sup>[29]</sup>

Les analyseurs en tandem permettent différents modes de balayage dont :

- Le mode Full Scan
- Le mode SIM
- Le mode « Product ion scan » ou balayage des ions produits
- Le mode « Precursor ion scan » ou balayage des ions précurseurs
- Le mode SRM (Single Reaction Monitoring) ou MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ce dernier mode permet de suivre une ou plusieurs transitions entre un ion précurseur donné et un ion produit donné. Ce mode est très sélectif car deux ions produits de même  $m/z$  qui

proviennent de la fragmentation de deux ions précurseurs de  $m/z$  distincts sont différenciés. De la même manière, il est possible de différencier deux ions précurseurs de même masse si ceux-ci se fragmentent différemment. Ce mode consiste à envoyer tous les ions dans le premier quadripôle et de sélectionner une ou plusieurs valeurs de  $m/z$  à suivre. Ces ions sont ensuite fragmentés dans le deuxième quadripôle et un ou plusieurs ions fragments peuvent être sélectionnés dans le Q3 pour la détection (Figure 12).

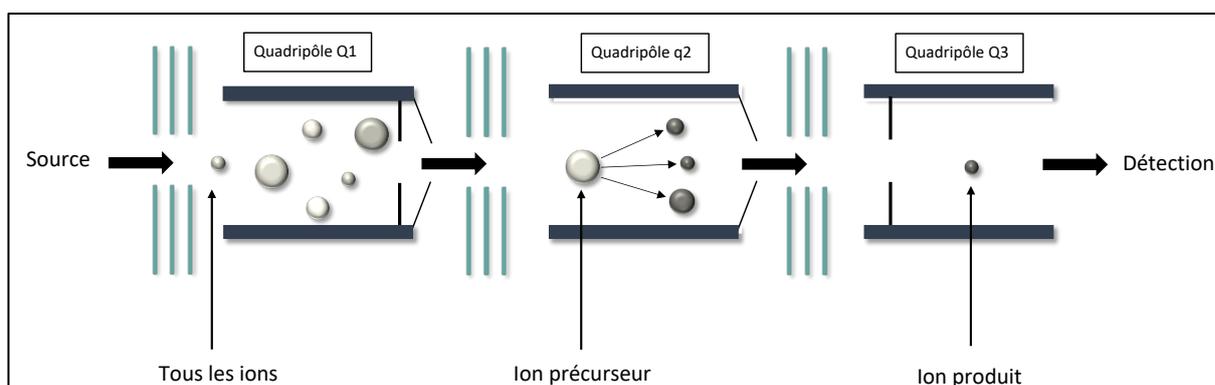


Figure 12 : Schéma du principe d'un analyseur triple quadripôle en mode SRM. Inspiré de la figure 3 de l'article « Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies »[30]

Un tel analyseur permet des analyses beaucoup plus sensibles et sélectives qu'un simple quadripôle. En revanche, son prix est beaucoup plus élevé.

#### I.4. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE AU FORMAT CAPILLAIRE

La chromatographie d'échange d'ions a beaucoup évolué depuis sa création en 1975 par Small *et al.*<sup>[19]</sup> et la dernière tendance, comme en tous types de chromatographie consiste à la miniaturisation de l'appareillage. La miniaturisation a pour avantage la portabilité des appareils ce qui a permis notamment aux sous-marins d'être équipés de chromatographe ionique pour les analyses sur site.

L'un des principaux avantages du format capillaire en chromatographie, et spécialement dans les travaux présentés, est le débit réduit de l'analyse qui facilite le couplage à la spectrométrie de masse. La miniaturisation permet également l'économie de PM et d'échantillon tout en permettant un gain en sensibilité pour un même volume injecté par une réduction du facteur de dilution  $D$  (Équation 21).

Équation 21 
$$D = \frac{\varepsilon \pi r^2 (1+k) \sqrt{2\pi L N}}{v_{inj}}$$

Avec  $r$  le rayon,  $\varepsilon$  la porosité de la PS et  $L$  la longueur de la colonne

Lorsque l'on réduit le diamètre de la colonne, la variance de la colonne  $\sigma_c^2$  est également réduite ce qui induit une contribution de l'appareillage à l'élargissement des pics encore plus importante (Équation 2). En chromatographie, le terme miniaturisation induit la diminution du

diamètre des colonnes utilisées mais également l'adaptation de tous les composants de l'appareillage à ces volumes. Se pose alors deux principales questions :

- Comment réduire les volumes d'un chromatographe ?
- Quels sont les variations de performances induites par la variation du format de l'appareil ?

Un chromatographe ionique capillaire a été pour la première fois commercialisé par Thermofisher Scientific dans les années 2000 sous le nom d'ICS4000. Avant cette option commerciale et puisque la chromatographie liquide miniature existait déjà, plusieurs laboratoires désireux de faire de la chromatographie ionique au format réduit ont adapté leur HPLC miniature. Deux composants devaient donc être ajoutés à l'appareil : la colonne et le suppresseur. Les hardware pour les colonnes au format réduits n'étant pas répandus, les capillaires de silice fondue <sup>[31]</sup> étaient utilisés et remplis de PS échangeuse d'ions. Les capillaires en silice fondue sont toujours beaucoup utilisés dans la littérature grâce à leur facilité d'obtention et d'utilisation pour le remplissage de colonne <sup>[14-16,32-37]</sup>. Cependant, en plus d'être limitées par la non-inertie de l'inox des tubulures HPLC, les phases mobiles utilisées sont limitées par la gamme de stabilité de pH de la silice. Les suppresseurs commercialisés n'étant pas adaptés aux volumes réduits, plusieurs solutions ont été envisagées : la chromatographie ionique capillaire sans suppression <sup>[20]</sup> et la création d'un suppresseur adapté aux petits volumes du système <sup>[38-42]</sup>.

#### I.4.1.1 Les tubulures

La principale contrainte lors de la miniaturisation d'un appareil chromatographique est la nécessité de réduire les volumes extra-colonne. En effet, comme abordé dans la partie I.1.1, ces volumes contribuent à l'élargissement des pics chromatographiques <sup>[43]</sup> et doivent être minimisés dans l'appareil. Avec l'utilisation de colonnes de plus faibles volumes, le rapport du volume extra-colonne sur le volume de la colonne peut être plus important et la perte d'efficacité peut être d'autant plus grande. Pour limiter l'élargissement des pics, les tubulures utilisées sont de plus faible diamètre et leur longueur est également optimisée. La réduction des volumes extra-colonne conduit également à l'utilisation de connexions zéro volume réputées pour limiter le volume mort.

#### I.4.1.2 Le suppresseur

Avec l'apparition d'un appareil miniaturisé par Thermofisher Scientific, un suppresseur capillaire fut commercialisé sous le nom d'Anion Capillary Electrolytic Suppressor (ACES). Le principal objectif dans la conception de ce suppresseur fut de minimiser le volume mort

induit par ce module pour limiter le temps mort mais également limiter les traînées de pics. Afin d'optimiser le volume de ce module et induire une capacité suffisante pour neutraliser des éluants forts tels que la soude en forte concentration, tout le design du supprimeur a été repensé. Comme on peut le voir sur la Figure 13, le supprimeur ACES est divisé en deux parties : deux compartiments d'électrodes (en vert) et un compartiment d'éluant (en jaune). Le compartiment d'éluant ne diffère des autres supprimeurs présentés en partie I.2.3.2 que par son volume réduit. Cette partie est séparée des compartiments d'électrodes par des résines échangeuses de cations. L'anode et la cathode permettent, avec un courant de suppression imposé, la génération d'ions  $\text{OH}^-$  et  $\text{H}_3\text{O}^+$  respectivement à partir de l'eau déionisée (régénérant). Ce régénérant passe premièrement par la résine échangeuse de cations puis par la chambre de la cathode et enfin dans la chambre de l'anode. Ce supprimeur est utilisé exclusivement en mode recyclage.

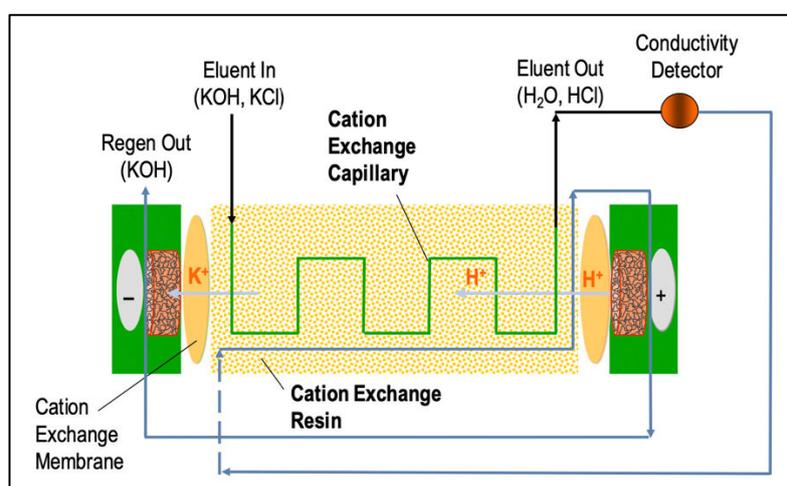


Figure 13 : Schéma d'un supprimeur ACES300 d'après le manuel de Thermofisher Scientific [44]

#### I.4.1.3 Les colonnes

Les colonnes capillaires sont remplies de la même manière que les colonnes conventionnelles dans des tubulures en PEEK souple de plus petit diamètre. La faisabilité repose uniquement sur la taille des particules qui doit être compatible avec le diamètre interne de la colonne à remplir soit 0,4 mm. Des particules de PS de 4  $\mu\text{m}$  sont généralement utilisées dans les colonnes pelliculaires modernes, permettant le remplissage des colonnes de format conventionnel et capillaire avec les mêmes particules. Comme détaillé dans la partie I.2.2.2, différents supports peuvent être utilisés comme PS. Pour les colonnes monolithiques, elles sont généralement synthétisées dans des tubes capillaires en silice fondue.

#### I.4.1.4 Les autres modules

Les débits pour des colonnes capillaires de dixièmes de millimètres de diamètre ne dépassent généralement pas les 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Pour cela, des pompes délivrant de faibles débits de manière

stable et répétable doivent être utilisées. Il a également été reporté l'utilisation d'un splitter pour diviser le débit avant l'entrée de l'injecteur <sup>[38]</sup> ou encore l'utilisation d'un pousse seringue <sup>[45]</sup>. Cependant, ces techniques peuvent mener à l'élargissement des pics. Toujours dans une optique d'optimisation des volumes, la cellule de conductimétrie est diminuée également.

## CONCLUSION

---

Depuis 1975, la chromatographie ionique a évolué en fonction des applications. A l'heure actuelle, l'appareillage tel qu'il est commercialisé semble répondre correctement aux besoins des utilisateurs. En revanche, en ce qui concerne les colonnes, les phases stationnaires sont en constante évolution selon, notamment, l'évolution des normes en contrôle qualité. Aujourd'hui, les substrats les plus utilisés sont de loin ceux à base de PS-DVB et de EVB-DVB qui n'ont pas encore d'égal en ce qui concerne la stabilité. Ce sont par ailleurs les substrats les plus utilisés par Thermofisher Scientific pour leurs échangeurs anioniques. Le Tableau 2 schématise les avantages et les inconvénients des principales technologies utilisées par ce fournisseur pour la synthèse de leurs phases stationnaires (●●●●● pour une valeur élevée et ●○○○○ pour une valeur basse)

Tableau 2 : Comparaison des avantages et inconvénients des technologies de colonnes commercialisées par Thermofisher Scientific.

	Greffée	Pelliculaire	Hyper ramifiée
Resistance chimique et mécanique	●●●●●	●●●●●	●●●●●
Efficacité	●●●○○	●●●●●	●●●○○
Capacité	●●●●○	●●○○○	●●●●●
Interactions secondaires	●●●●●	●●●○○	●●○○○
Pression	●●●○○	●●●●●	●●●○○

Ces technologies de colonne étant toutes basées sur un substrat PS/DVB, elles font preuve d'une très bonne résistance chimique et mécanique. Les colonnes pelliculaires étant composée de billes de latex de faible diamètre, elles présentent une meilleure efficacité que les autres technologies de colonnes et induisent une forte pression dans le système chromatographique et ne peuvent donc être utilisées avec des débits importants. La structure particulière des colonnes hyper ramifiées leur confère une forte capacité et une réduction de la contribution des interactions non-ioniques à la rétention.

La PM étant problématique avec certaines détections (conductimétrie, MS), un module a été développé pour permettre de neutraliser cette PM : le suppresseur. Il en existe maintenant différents modèles dont les propriétés sont regroupées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Comparaison des deux différents types de suppresseurs

Suppresseurs	Capacité	Compatibilité éluants	Volume mort (en $\mu\text{L}$ )	Régénération
Colonne	- (Sauf pour les modèles de haute capacité)	- (Concentrations peu élevées)	2000	Après chaque utilisation, en ligne ou hors ligne
Membranes	+	+ (Hydroxyde, Carbonate, fortes concentrations, solvants organique (40% maximum))	< 50	Électrolytique en mode recyclage ou externe / Chimique

En chromatographie, les volumes extra-colonne doivent être minimisés afin d'éviter l'élargissement des pics et donc l'altération des performances chromatographiques. Ces effets sont d'autant plus importants que le volume de la colonne est faible comme en chromatographie ionique capillaire. C'est pourquoi, ce format de colonne réduit nécessite un appareillage adapté où le volume de chaque module est diminué. Le format capillaire offre plusieurs avantages comme des analyses plus sensibles, une consommation réduite d'échantillon et de PM et un couplage plus facile à la spectrométrie de masse. Par ailleurs, l'IC-MS nécessite l'optimisation de plusieurs paramètres comme le débit d'analyse, l'utilisation d'un suppresseur et l'interface entre l'IC et la MS.



**CHAPITRE II - CARACTERISATION DE PHASES  
STATIONNAIRES**

---

Pour le développement de la méthode d'analyse de métabolites en IC-MS, et plus particulièrement en raison de l'utilisation d'un analyseur simple quadripôle qui ne permet pas la séparation des composés isobares, une optimisation de la séparation chromatographique est nécessaire. Pour cela, une PS appropriée à l'application visée doit être sélectionnée parmi les solutions commerciales existantes. Cependant, concernant les PS en chromatographie ionique, leurs propriétés étant méconnues, une étude de ces dernières a été menée.

L'objectif de ces travaux étant la séparation d'un mélange de métabolites polaires ionisables composés principalement de métabolites contenant un groupement phosphate et de petits acides organiques, le choix des PS étudiées s'est porté sur celles recommandées pour les analyses d'anions inorganiques et d'acides organiques. Cette étude étant menée en chromatographie d'échange d'anions au format capillaire, le choix des PS a également été limité par la disponibilité des colonnes à ce format. De plus, afin d'étudier l'influence de chaque caractéristique sur la rétention, les colonnes ont été choisies pour représenter différentes technologies de PS, structure de l'échangeur d'anions, hydrophobicité et capacités. Quatre colonnes ont donc été sélectionnées : l'AS11-HC, l'AS18-Fast, l'AS19, l'AS28-Fast. Des modèles classiques permettant la compréhension de la rétention ont été appliqués afin d'estimer notamment l'influence des interactions non-ioniques sur la rétention.

Une autre partie de l'étude a permis d'évaluer l'impact du diamètre de la colonne sur la qualité de remplissage et l'effet de cette dernière sur la rétention.

La rédaction de cette étude sera soumise sous la forme d'un article au « Journal of Separation Sciences » et est présentée ci-dessous.

**ARTICLE I - COMPARISON OF RETENTION MECHANISMS OF DIFFERENT  
COMMERCIALIZED COLUMNS AND INFLUENCE OF THE FORMAT.**

4 Adeline Bigard<sup>1</sup>, Anne-Marie Compiano<sup>2</sup>, Christopher A. Pohl<sup>3</sup>, Pascal  
5 Cardinaël<sup>1</sup> and Valérie P. Agasse<sup>1\*</sup>

6 <sup>1</sup>*Normandie Univ, Laboratoire SMS-EA3233, FR3038 INC3M, UNIROUEN, Mont-Saint-*  
7 *Aignan, France*

8 <sup>2</sup>*Thermo Fisher Scientific Villebon/Yvette, France*

9 <sup>3</sup>*Thermo Fisher Scientific, 1228 Titan Way, Sunnyvale, CA 94085, USA*

10

11 \*corresponding author: Dr. Valérie Agasse, Laboratoire SMS-EA3233, UFR Sciences &  
12 Techniques, Place Emile Blondel, F-76821, Mont-Saint-Aignan Cedex, France

13 E-mail: [valerie.agasse@univ-rouen.fr](mailto:valerie.agasse@univ-rouen.fr)

14

15 **Keywords**

16

17 Column formats, Hydrophobicity, Ion exchange columns, Retention behavior, Stationary  
18 phase

19

20 **Non-standard abbreviations**

21

22 HETP: Height Equivalent to a Theoretical Plate

23 LSSM: Linear Solvent Strength Model

24 RFIC: Regent Free Ion Chromatograph

25

26

27 **Abstract**

28

29 Ion exchange chromatography is now largely used for applications in different fields, but the  
30 retention behavior of the different columns is often not well-known. In order to choose the  
31 appropriate stationary phase for a future application, 4 capillary anion exchange columns  
32 commercialized by Thermo Fisher Scientific (AS11-HC, AS18-Fast, AS19 and AS28-Fast)  
33 were compared. Although these columns are designed for the same range of applications, they  
34 possess diverse properties (resin compositions and skeleton, hydrophobicities, capacities, and  
35 ion exchange group structure). Different investigations using classical models as the linear  
36 solvent strength model and the van't Hoff model were achieved. The hydrophobicity of the  
37 stationary phases was also calculated. Huge differences between nano-bead and hyper-  
38 branched stationary phases behaviors, especially the temperature sensitivity, were observed.  
39 Finally, with the development of the capillary scale in chromatography, the influence of the  
40 column format was also studied on the AS11-HC stationary phase at 0.4 and 2 mm i.d. by  
41 evaluating the volume impact and the differences in column packing. Repercussions of such  
42 differences on retention were evaluated.

43

44

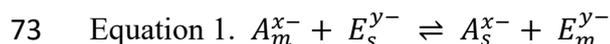
45

46 **1. Introduction**

47 Ion exchange chromatography (IEC) was already well used for the separation of inorganic  
48 anions and cations[1]. In the literature, in recent years, the applications of IEC have been  
49 more diversified and expanded in different fields such as bioanalyses, food, and  
50 environment[2]. This recent broad array of applications is mainly due to the development of  
51 “omics” studies[3–6] and ever more stringent quality controls[7–11], where IEC plays an  
52 important role.

53 To answer to the consumer’s needs, IEC column manufacturers have developed many  
54 stationary phases with various resin types and ion exchanger group providing different  
55 selectivities[12]. Each column is recommended for given applications generally detailed in  
56 column’s manual. However, for innovative research applications, it may be difficult to choose  
57 the appropriate column due to a lack of knowledge concerning the stationary phase and its  
58 retention behavior. This can lead, in the literature, to the use of different columns for the same  
59 type of applications as for the separation of bromates in water which is done with the AS11  
60 column[13], the AS21 column[14], the AS19 column[15] or Metrosep A Supp 7 column[9].  
61 In this paper, different models for the retention behavior understanding will be applied to four  
62 stationary phases designed for the same type of application in order to obtain a better  
63 knowledge of the interaction mechanisms.

64 In IEC, the retention depends on two main factors. The first one is the eluent strength.  
65 In modern IEC the choice of the mobile phase is generally limited to those which can be  
66 easily suppressed. The convenience of online eluent generation further limits this choice to  
67 available generated eluents. Thus, hydroxide and carbonate/bicarbonate eluent are most  
68 common mobile phases for anion exchange chromatography. In anion exchange  
69 chromatography, the separation is based on the exchange of anion analytes ( $A^-$ ) and anion  
70 eluents ( $E^-$ ) between the mobile phase (m) and the stationary phase (s). This exchange is  
71 represented by Equation 1.



74 Where x is the analyte charge, y is the eluent charge

75 This equilibrium can be quantified by the determination of the constant  $K_{A,E}$  with the  
76 concentrations of each anions in each phase according to Equation. 2.

77

78 Equation 2.  $K_{A,E} = \frac{[A^{x-}]_s [E^{y-}]_m}{[A^{x-}]_m [E^{y-}]_s}$

79 In order to predict the retention in IEC, a simple and popular model was described using this  
80 constant  $K_{A,E}$ : the Linear Solvent Strength Model (LSSM)[16] (Equation 3).

81

82 Equation 3.  $\log k_A = \frac{1}{y} \log(K_{A,E}) + \frac{x}{y} \log\left(\frac{C_E}{y}\right) + \log\left(\frac{w}{V_{PM}}\right) - \frac{x}{y} \log[E^{y-}]_m$

83 Where  $k_A$  is the retention factor of the analyte,  $C_E$  is the exchange capacity of the stationary  
84 phase,  $w$  the mass of stationary phase, and  $V_{PM}$  the volume of mobile phase. Equation 3 can  
85 be simplified by gathering constants (Equation 4)

86

87 Equation 4.  $\log k_A = C - \frac{x}{y} \cdot \log[E^{y-}]_m$

88 Where  $C$  is a constant for a given column

89

90 Thus, the plot of  $\log k_A$  vs  $\log [E^{y-}]_m$  is linear, and the slope is equal to the charge ratio when  
91 the ion exchange is the only retention mechanism involved. Additional interactions can be  
92 highlighted by a slope value different from the theoretical value. Slopes of the LSSM for  
93 different stationary phases will be determined to study the influence of additional interactions  
94 on retention depending on the type of resin and ion exchange sites. Although Madden and  
95 Haddad concluded that the linear solvent strength model gave the worst results compared to  
96 other models when applied to analytes with a charge greater than -1, it is commonly used to  
97 discriminate many commercialized columns. Liang and Lucy[17] modified the equation of  
98 this model into two different forms to compare AS10, AS11-HC, AS15, AS16, AS18, AS19,  
99 AS20 and AS24 anion exchange columns in terms of retention in one case and selectivity in  
100 the other. Indeed, expression of linear solvent strength model can be simplified to characterize  
101 the eluent strength or the selectivity, depending on the change of equation. Li *et al.*[18]  
102 applied the LSSM on cation exchange columns (CS19, CS12A and CS17) to study the  
103 selectivity of 5 biogenic amines and amino acids.

104 The second factor which influences the retention is the temperature. Rey and Pohl[19]  
105 have demonstrated that the temperature can be useful to improve resolution and peak  
106 efficiency and also change the selectivity. The van't Hoff model allows describing the  
107 influence of temperature on a given compound for a given stationary phase. The model relies  
108 on the free enthalpy  $\Delta G^\circ$ , the enthalpy  $\Delta H^\circ$  and the entropy  $\Delta S^\circ$  definitions to give the  
109 Equation 5:

110 Equation 5.  $\ln k_A = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi$

111 Where R is the gas constant ( $R = 8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ), T is the temperature (in K) and  $\Phi$  is the  
112 phase volume ratio. By plotting  $\ln k$  vs.  $(1/T)$ , the influence of the temperature will be  
113 determined for each column using the slope of the linear regression. The interaction  
114 mechanisms between the solute and the stationary phase can be exothermic or endothermic  
115 and lead to a different elution order depending on the retention.

116 Strong ion exchange columns studied in this work are mainly governed by ionic  
117 interactions, but some other interactions could influence the retention as the hydrophobic  
118 interaction. Thermo Fisher Scientific indicates qualitatively the hydrophobicity for their  
119 columns. However, it was demonstrated by Liang and Lucy[17] that these indications may not  
120 be correlated with the determination of hydrophobicity by the slope of  $\log k$  vs carbon  
121 number of an homologous series of alkyl sulfonates. Nesterenko *et al.*[20] explained that  
122 hydrophobicity of a column depends on the polarity of the resin composition, the type of  
123 resin, the porosity, the surface (area, density) and the structure of ion exchange groups. Thus,  
124 they used the  $\alpha(\text{CH}_2)$  to determine the hydrophobicity which corresponding to the slope of  
125  $\log k$  vs carbon number determined by Liang and Lucy[17].

126 Other nonspecific interactions can affect the retention in IEC as the Van der Waals  
127 interactions[21], H-bonding and electrostatic repulsion. With these different supplementary  
128 interactions, IEC has been sometimes considered mixed-mode chromatography. Indeed, Li *et*  
129 *al.*[18] showed that hydrophobic interactions and H-bonding with a cationic stationary phase  
130 influence the retention of biogenic amines and amino acids as ion exchange interactions.  
131 Furthermore, Révész *et al.*[22] considered that carboxylic acids interact with the aminated  
132 latex layer of the AS4A-SC pellicular stationary phase as well as there are repulsed by the  
133 sulfonated surface of the resin. Moreover, Dean and Jezorek[23] demonstrated that strong  
134 anion-exchange stationary phases such as the Nucleosil quaternary ammonium phase supplied  
135 by Macherey-Nagel, can behave in a reversed-phase mode. They used a mobile phase  
136 composed of methanol, water, and phthalate to separate inorganic anions and neutral organics  
137 analytes. They proved that, depending on the volume ratio of methanol in mobile phase,  
138 different type of analytes exhibited reversed-phase behavior. These mixed-mode behaviors of  
139 ion exchange column may complicate the retention prediction. However, different models for  
140 the prediction of retention have already been described in the review of J. Ståhlberg[24]. This  
141 prediction depends on the size of analytes, the stationary phase geometry (charges on the

142 surface or in a random three-dimensional network), the electrostatic potential of the stationary  
143 phase (gradient or constant through the resin surface).

144 In this study, we proposed to apply commonly used models to compare commercial  
145 hydroxide-selective anionic stationary phases designed for the same application range at the  
146 capillary scale. The influence of resin composition and hydrophobicity of the stationary phase  
147 on retention behavior were studied. Moreover, with the growing interest in capillary scale, it  
148 was interesting to investigate the influence of column dimensions. The impact of the extra-  
149 column volumes is estimated before the evaluation of the column packing quality of the  
150 column packing. This estimation was made with the van Deemter curves, and the impact of  
151 these differences were evaluated by comparing the influence of eluent strength and  
152 temperature on the retention.

153

## 154 **2. Materials and Methods**

155

### 156 **1. Ion chromatograph**

157

158 A Thermo Fisher Scientific ICS4000 ion capillary chromatography (Sunnyvale, CA, USA)  
159 equipped with an EGC-KOH capillary eluent generator cartridge, a CR-ATC reagent free ion  
160 chromatograph (RFIC) capillary continuously regenerated trap column, an EG DEGAS  
161 degasser, an ACES 300 suppressor and a conductimetric detector was used.

162 For the conventional column, a Thermo Fisher Scientific ICS6000 equipped with an AERS  
163 500e suppressor was used. The eluent is prepared in the mixing chamber with NaOH 0.1M in  
164 channel A and deionized water in channel B. For detection, this device is equipped with a  
165 conductimetric detector.

166

167

### 168 **2. Materials**

169

170 Sodium fluoride and sodium nitrite (Prolabo, Paris, FRANCE), sodium bromide and sodium  
171 iodide (Fisher Scientific, Geel, BELGIUM), sodium bromate and potassium chloride (Acros  
172 Organics, New Jersey, USA), sodium nitrate (Carlo Erba, Val de Reuil, FRANCE), sodium  
173 phosphate (Fluka, Seelze, GERMANY), 1-propanesulfonic acid (Fisher Scientific, Acros,  
174 CHINA), 1-pentanesulfonic acid (Fischer Scientific, Acros, INDIA), sodium 1-  
175 butanesulfonate and sodium 1-hexanesulfonate (Alfa Aesar, Kandel, GERMANY) were

176 reagent grade and diluted in deionized water (18 MΩ, Aquadem osmosis E500, Veolia water,  
177 FRANCE)

178

### 179 3. Results and discussion

180

#### 181 I. Retention behavior

182

##### 183 1. Choice of columns

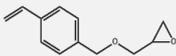
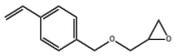
184

185 The aim of the study was the selection of an appropriate stationary phase for a future  
186 separation of some targeted primary metabolites in biological matrices. The capillary format  
187 was chosen for this study because it is reputed to allow the reduction of the consumption of  
188 sample and eluent, the reduction of the maintenance, and the increase of sensitivity for  
189 concentration-dependent detectors[25]. The choice among columns available at capillary  
190 format was first done regarding the applications. Selected metabolites being composed of two  
191 different classes of compounds, namely phosphometabolomes and organic acids, the  
192 stationary phase must separate the inorganic anions (especially phosphate) and/or the organic  
193 acids.

194 Thus, 4 hydroxide-selective columns of 0.4 mm of internal diameter filled with 4 μm  
195 particles were selected. The selection was made to obtain a diversity of hydrophobicity,  
196 capacity, and type of resin to induce different selectivities. The characteristics of these  
197 columns given by ThermoFisher Scientific are described in the Table 1.

198

199 Table 1. Characteristics of selected columns[20]

	Resin composition	Type of resin	Reactive monomer for the ion-exchange surface	Ion-exchange group structure	Capacity (μeq/col)	Hydrophobicity
IonPac AS11-HC (250x0.4mm)	Sulfonated PEVB-DVB <sup>a)</sup> with a layer of 140 nm microporous PVBGE-DVB <sup>b)</sup> (6%) beads	Nanobead		CH(OH)CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>	2.9	Med-Low
IonPac AS18-Fast (150x0.4mm)	Sulfonated PEVB-DVB* with layer of	Nanobead		N <sup>+</sup> R <sub>2</sub> R' <sup>+</sup> OH	1.71	Low

	65 nm PVBGE-DVB* (8%) beads					
IonPac AS19 (250x0.4mm)	Sulfonated PEVB-DVB <sup>c)</sup> layer of hyperbranched BDDGE-methylamine <sup>d)</sup> polymer	Hyperbranched		$N^+(CH_3)(CH(CH_2OH)O^-)_3$	2.4	Ultralow
IonPac AS28-Fast (150x0.4mm)	Sulfonated PEVB-DVB <sup>a)</sup> (55%) with layer of Microbead	Nanobead		Not available	2.3	Med-high

200

201 a) PEVB-DVB: Poly(ethylvinylbenzene-*co*-divinylbenzene); b) PVBGE-DVB:

202 poly(vinylbenzylglycidylether-*co*-divinylbenzene) (55%,  $d_{\text{pore}}$  200 nm, 20 m<sup>2</sup>/g); c) PVBGE-DVB:

203 poly(vinylbenzylglycidylether-*co*-divinylbenzene); d) BDDGE-methylamine: butanedioldiglycidyl ether-  
204 methylamine

205

206 The AS11-HC being the oldest of studied resins, it is the most used in the literature. This  
207 column was designed to separate many organic anions and organic acid anions. It allows rapid  
208 elution of strongly retained ions without interference from the broad chloride peak of many  
209 biological samples. This column was then widely employed in the field of metabolomics for  
210 the analysis of cells [3,26–31], biofluids [4,32,33], and plants [34,35]. This column is also  
211 widely used to quantify hazardous compounds in the environment [13,36,37].

212 The AS18-Fast column was first designed for the analysis of inorganic anions in an  
213 aqueous sample in less than 10 minutes with isocratic eluent. It was then used to quantify  
214 hazardous or prohibited compounds in different matrices as the bisphosphate in horse  
215 plasma[38], the glycerophosphate in toothpaste [39] and monofluorophosphate,  
216 glycerophosphate, sorbate and saccharin in mouthwash [40]. These matrices contain inorganic  
217 anions such as fluoride or phosphate that were well separated from compounds of interest  
218 using this column.

219 The AS19 column was designed for the analysis of inorganic anions and oxyhalides using  
220 an isocratic eluent. Now, this column is used for food applications with pesticides[7,41,42] or  
221 hazardous compounds such as bromates[15]. Thermo Fisher Scientific developed methods  
222 with this column for thiosulfate and pyrophosphate determination in crayfish wash  
223 powder[43] or glyphosate and AMPA analysis in water.[44]

224 The AS28-Fast column is the most recent among the columns of this study. It was  
225 designed for the trace analysis of inorganic anions and monovalent organic acids and

226 particularly to separate the low molecular weight organic acids from the common anions of  
227 water.

228

## 229 2. Choice of solutes

230

231 Polarizable monovalent and divalent inorganic anions were selected as models. These anions  
232 have different molecular weights and thus different charge densities, except bromide and  
233 nitrate. The mixture with these 7 selected solutes is prepared in water with equal mass  
234 concentration of each anion.

235

## 236 3. Hydrophobicity

237

238 The hydrophobicity (ultra-low, low, med-low and med-high) for each column in a qualitative  
239 way was given by Thermo Fisher Scientific, and the differences between these designations  
240 can be difficult to appreciate. Furthermore, Liang and Lucy[17] measured the hydrophobicity  
241 of 8 columns using alkylsulfonic acid homologues and obtained a different classification from  
242 those proposed by Thermo Fisher Scientific. To quantify the hydrophobicity of columns, a  
243 series of alkyl sulfonic acids (1-propanesulfonic acid, 1-butanesulfonic acid, 1-  
244 pentanesulfonic acid and 1-hexanesulfonic acid) was injected. The logarithm of the retention  
245 factor vs. the number of carbons of alkyl sulfonic acids was drawn, and the slopes of the  
246 regression line, also called the retention increment for the methylene groups[20], are  
247 presented in Table 2.

248

249 Table 2. Hydrophobicity values corresponding to the slope of the regression line for columns  
250 obtained with the retention of a homologous series of alkyl sulfonic acids on three replicates.

	AS11-HC	AS18-Fast	AS19	AS28-Fast
Hydrophobicity	0.364	0.343	0.089	0.266

251

252 The higher the slope value, the greater is the hydrophobicity of the stationary phase. So, the  
253 experimental hydrophobicity order can be deduced: AS19 < AS28-Fast < AS18-Fast < AS11-  
254 HC while the Thermo Fisher Scientific hydrophobicity order is the following: AS19 < AS18-  
255 Fast < AS11-HC < AS28-Fast. Classification of columns regarding their hydrophobicity is

256 different from Thermo Fisher Scientific data. Indeed, the AS28-Fast is less hydrophobic than  
 257 expected.

258 As mentioned before, the hydrophobicity depends on the polarity of a polymer matrix, the  
 259 type of resin, the porosity, the surface (area, density), and the structure of functional  
 260 groups[20]. AS19 is clearly the less hydrophobic column, which is mainly due to the  
 261 hyperbranched structure of the resin which lacks the aromaticity of the polymers used in the  
 262 other phases. AS11-HC and AS18-Fast, which possess the same reactive monomer for the  
 263 ion-exchange surface, have hydrophobicities of same order of magnitude. AS28-Fast is a  
 264 nanobead column, so it has a relatively strong hydrophobicity but lower than the two others,  
 265 namely AS11-HC and AS18-Fast.

266

#### 267 4. Linear Solvent Strength Model

268

269 Mechanisms of retention in IEC are not very clearly understood for each stationary phase.  
 270 The LSSM allows highlighting engaged mechanism and comparing the retention behavior of  
 271 each column. In this model and in case of retention governed by ionic interactions, slopes  
 272 values, determined with the Equation 4, must be equal to the ratio of the eluent and the  
 273 analyte charges. A deviation of this value indicates that additional interactions are involved in  
 274 retention. The slopes for each solute and the associated correlation coefficient are presented in  
 275 the Table 3.

276

277 Table 3. Absolute slope values of LSSM (Equation 4) and correlation coefficients for each  
 278 solute on each column between 5mM and 45 mM [OH<sup>-</sup>] each 5 mM at 30°C and 0.015  
 279 mL/min for each column in 3 replicates.

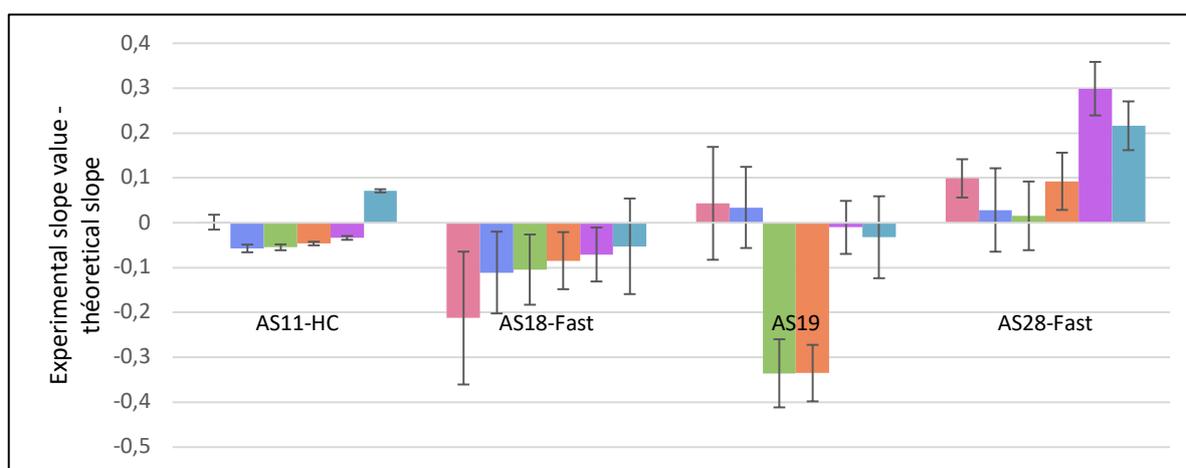
Solute	Theoretical slope	AS11 - HC		AS18 - Fast		AS19		AS28 - Fast	
		Slope	r <sup>2</sup>	Slope	r <sup>2</sup>	Slope	r <sup>2</sup>	Slope	r <sup>2</sup>
Fluoride	<b>1</b>	<b>0.993 ± 0.004</b>	0.999	<b>0.641 ± 0.004</b>	0.999	<b>1.061 ± 0.004</b>	0.999	<b>1.069 ± 0.005</b>	0.999
Bromate	<b>1</b>	<b>0.992 ± 0.001</b>	0.999	<b>0.960 ± 0.004</b>	0.999	<b>1.031 ± 0.003</b>	0.999	<b>1.028 ± 0.003</b>	0.999
Nitrite	<b>1</b>	<b>0.977 ± 0.006</b>	0.999	<b>0.954 ± 0.003</b>	0.999	<b>0.996 ± 0.002</b>	0.999	<b>1.015 ± 0.002</b>	0.999
Bromide	<b>1</b>	<b>0.974 ± 0.006</b>	0.999	<b>0.953 ± 0.004</b>	0.999	<b>0.989 ± 0.001</b>	0.999	<b>1.011 ± 0.001</b>	0.999
Nitrate	<b>1</b>	<b>0.986 ± 0.003</b>	0.999	<b>0.968 ± 0.003</b>	0.999	<b>0.999 ± 0.002</b>	0.999	<b>1.024 ± 0.001</b>	0.999
Phosphate	<b>2 or 3</b>	<b>2.833 ± 0.006</b>	0.999	<b>2.807 ± 0.002</b>	1.000	<b>2.770 ± 0.010</b>	0.999	<b>3.105 ± 0.002</b>	0.999
Iodide	<b>1</b>	<b>0.960 ± 0.005</b>	0.999	<b>0.935 ± 0.007</b>	0.999	<b>0.972 ± 0.001</b>	1.000	<b>1.027 ± 0.0003</b>	1.000

280 First of all, we can observe that the retention order is the same for all columns following the  
 281 order given in Table 3. Linearity was largely obtained for inorganic anions on each column.  
 282 However, slopes values are slightly different from those expected, particularly for the  
 283 orthophosphate ion. To further compare the influence of the additional interactions depending  
 284 on columns and compounds, differences between the experimental value and the theoretical  
 285 value are presented in Figure 1. The behavior of the orthophosphate ion retention can be  
 286 explained by the predominant form of this anion at the pH of the analysis. Indeed, this slope is  
 287 determined for  $[\text{OH}^-]$  concentrations ranging from 5 mM to 45 mM which correspond to a pH  
 288 comprised between 11.7 and 12.7. The pKa of phosphate being 12.32 between the divalent  
 289 and the trivalent forms, the average charge can be reduced. Madden and Haddad[16] also  
 290 demonstrated that the LSSM model is not verified for molecules with charges higher than 1.  
 291 For these reasons, the orthophosphate ion will be not further studied here.

292

293 Figure 1. Differences between experimental and theoretical slope values with all columns for  
 294 inorganic anions fluoride (■), bromate (■), nitrite (■), bromide (■), nitrate (■) and iodide (■)  
 295 and coefficient of variation calculated on the three replicates.

296



297

298

299 For each compound, the AS18-Fast seems to be the most impacted by additional interactions.  
 300 These non-ionic interactions could be van der Waals, H bonding, repulsion and/or  
 301 hydrophobic interactions. Indeed, as explained before, the hydrophobicity plays an important  
 302 role in retention[46]. However, AS18-Fast being less hydrophobic than AS11-HC which have  
 303 not the same deviation from the theory, hydrophobic interactions seem to be not the main  
 304 non-ionic interaction involved in the retention of AS18-fast stationary phase. Overall, fluoride  
 305 is the most deviant ion from the theory which can be due to its short retention. For the AS28-

306 Fast column, the nitrate is more impacted by nonspecific interactions than on other columns,  
 307 especially AS19 where the slope is very close to its theoretical value.

308

### 309 5. Van't Hoff Model

310

311 In chromatography, the temperature can affect the retention and thus, changes the separation.  
 312 To determine the role of temperature and its impact on the selectivity, the van't Hoff plots are  
 313 established for each column at 20mM KOH for AS11-HC, AS18-Fast, AS19 and at 30mM for  
 314 AS28-Fast (Table 5). To obtain a satisfying separation of all inorganic anions in less time,  
 315 eluent strength has been adapted for each column. It was recognized that it can slightly affect  
 316 slopes values without changing the order of magnitude[47]. Van't Hoff plots were established  
 317 for the 4 columns between 20 and 40°C, each 5°C, in triplicate. The range of studied  
 318 temperature is limited by Thermo Fisher Scientific recommendations to avoid damage to the  
 319 stationary phase.

320

321 Table 5. Slopes values and correlation coefficient of van't Hoff plots (Equation 5)

322

Solute	AS11-HC 20mM		AS18-Fast 20mM		AS19 20mM		AS28-Fast 30 mM	
	Slope (K)	r <sup>2</sup>	Slope (K)	r <sup>2</sup>	Slope (K)	r <sup>2</sup>	Slope (K)	r <sup>2</sup>
Fluoride	<b>-970 ± 30</b>	0.999	<b>-920 ± 130</b>	0.991	<b>-340 ± 10</b>	0.992	<b>-1650 ± 10</b>	0.993
Bromate	<b>-270 ± 1</b>	0.999	<b>-280 ± 30</b>	0.995	<b>-610 ± 10</b>	0.999	<b>-230 ± 1</b>	0.998
Nitrite	<b>-500 ± 1</b>	0.999	<b>-350 ± 60</b>	0.990	<b>-1370 ± 10</b>	0.998	<b>-130 ± 10</b>	0.999
Bromide	<b>190 ± 5</b>	0.999	<b>240 ± 30</b>	0.996	<b>-1540 ± 10</b>	0.994	<b>700 ± 1</b>	0.998
Nitrate	<b>260 ± 2</b>	0.999	<b>400 ± 90</b>	0.982	<b>-2010 ± 10</b>	0.995	<b>670 ± 1</b>	0.997
Phosphate	<b>-25000 ± 740</b>	0.999	<b>-13840 ± 30</b>	0.990	<b>-35700 ± 1500</b>	0.999	<b>-3000 ± 10</b>	0.998
Iodide	<b>20500 ± 30</b>	0.995	<b>14640 ± 20</b>	0.998	<b>-2840 ± 10</b>	0.999	<b>2000 ± 1</b>	0.999

323 As presented in Table 5, the temperature does not have the same influence on each compound  
 324 and column. A positive slope describes the exothermic behavior of the retention when, on the  
 325 contrary, a negative slope traduces an endothermic behavior.

326 In a general manner, the same tendency is observed in all columns, except for the  
 327 AS19 column. This stationary phase exhibits a different behavior for bromide, nitrate, and  
 328 iodide. While the retention of these compounds on the 3 other stationary phases exhibits an  
 329 exothermic process, slopes are negative on the AS19 column. AS19 being the only column

330 with a hyperbranched skeleton, this structure or the ion exchange group could be reasons for  
331 this special behavior. Furthermore, regarding the coefficient, this column is very sensitive to  
332 temperature changes.

333 The elution order of the solute following the order given in Table 5, it is easy to see that the  
334 impact of temperature increases for highly retained compounds as phosphate and iodide. The  
335 results obtained for AS11-HC correspond to those obtained by Hatsis and Lucy[47] on the  
336 same stationary phase with higher slopes values. This higher impact of temperature in our  
337 results is due to the high capacity and thus, the high retention of compounds on the AS11-HC  
338 stationary phase. Hatsis and Lucy[47] identified three different groups of compounds which  
339 are differently affected by temperature changes. They distinguish weakly retained singly  
340 charged anions, multiply charged anions, and strongly retained ones. The first group has a  
341 non-predictable behavior but is less impacted by the temperature change. For the second  
342 group, the retention significantly increases with increasing temperature, and for the third  
343 group, it is the opposite. Thus, a change of selectivity can occur only between anions of  
344 different groups. This rule has proved to be true with phosphate since the slope of the  
345 logarithm of retention time vs. the opposite of temperature is negative. Concerning fluoride,  
346 bromate and nitrite, considered as poorly retained group, the rule is also confirmed. In  
347 conditions of the experiment, bromide and nitrate are enough retained to be considered as the  
348 third group with the iodide. They might have an exothermic behavior. This rule is confirmed  
349 on the AS11-HC, AS18-Fast and AS28-Fast. It should be noted that in IEC, the impact of  
350 temperature on retention is more pronounced than in RPLC.

351 Regarding obtained results for the four columns, the AS11-HC is the most relevant for the  
352 future anionic metabolites analyses. First, this column is high capacitive that, for a complex  
353 matrix, it could separate compounds of interest from the plentiful ions of the matrix.

354 Secondly, this stationary phase is obviously governed by the ion exchange and leads to weak  
355 supplementary interactions which made the prediction of retention feasible. As mentioned  
356 before, this column is already often use for the separation of metabolomic analyses[2].

357

## 358 **II. The influence of column diameter**

359

360 With the recent development of capillary columns, many methods could be performed at this  
361 advantageous format. Indeed, it reduces the consumption of eluent and samples and facilitates  
362 the hyphenation with mass spectrometry. A reduction of column diameter could also decrease  
363 the dilution factor of the sample in the eluent and thus increase the sensitivity of a method

364 with a concentration-dependent detector. However, this reduced format must be used with a  
365 suitable apparatus to reduce extra-column volumes and avoid the peak distortion and the  
366 decrease in chromatographic efficiency. The capillary ion chromatography is not just about  
367 reducing volumes, it is also a novel equipment design[25].

368

#### 369 1. Evaluation of extra-column volumes

370

371 The influence of format being studied on two different adapted apparatus, it is important to  
372 determine the importance of extra-column volume for each format.[48] The extra-column  
373 volumes correspond to the volumes of the injector, the tubing, and the detector cell. Variances  
374 allow estimating the contribution of both column and extra-column volume at the peak  
375 broadening. Column variances ( $\sigma^2_c$ ) (Equation 6) and extra-column variance ( $\sigma^2_{e-c}$ ) (Equation  
376 7) are estimated and results are summarized in Table 6.

377

378 Equation 6. 
$$\sigma^2_c = \frac{V_0*(1+k)}{\sqrt{N}}$$

379 Where  $V_0$  is the dead volume of the column,  $k$  is the retention factor and  $N$  is the efficiency of  
380 the column.

381

382 For higher accuracy, the dead volumes are determined by using the slope of dead retention  
383 time vs the inverse of the flow rate for deionized water analysis. These analyses are  
384 performed in triplicate at 0.01, 0.012, 0.015 and 0.02 mL/min at the capillary scale and at  
385 0.15, 0.2, 0.25, 0.30, 0.38 mL/min at the conventional scale. The retention factor and the  
386 efficiency are obtained by analyzing a KCl solution at 10 mg/L.

387

388 Equation 7. 
$$\sigma^2_{e-c} = \frac{(\omega_{1/2} * F)^2}{5,54}$$

389 Where  $\omega_{1/2}$  is the width at the half-height and  $F$  is the flow rate.

390

391

392

393

394

395 Table 6. Dead volumes, column, and extra-column variance of AS11-HC at the capillary and  
 396 the conventional format with the adapted apparatus.

	AS11-HC (0.4x250mm)	AS11-HC (2x250mm)
Column dead volume	26 $\mu\text{L}$	755 $\mu\text{L}$
Column variance	0.032 $\mu\text{L}^2$	11.200 $\mu\text{L}^2$
Extra-column variance	0.001 $\mu\text{L}^2$	0.073 $\mu\text{L}^2$
Ratio of extra-column variance and total variance	3.0 %	0.6 %
Efficiency for KCl	1769	9078

397 On the capillary scale, the extra-column volumes have a higher influence on the peak  
 398 broadening than at conventional scale. However, Guillarme *et al.*[48] consider that the  
 399 capillary chromatograph is well adapted for a ratio between extra-column variance and total  
 400 variance below 10%. It has to be noted that this estimation of extra-column volumes does not  
 401 take into account the volume of frits which are contained in the column volume.

402

## 403 2. Column packing

404

405 It is also important to confirm that the format does not change the packing quality. Indeed, the  
 406 packing of the column with the stationary phase can be complicated by reducing the diameter  
 407 of the tube. A study has been already done on capillary AS18-Fast in 2012, compared to a  
 408 column of 4 mm i.d by isocratic analysis of five-anion standard mixture[49]. They conclude  
 409 with the reduced plate-height value (lower than 2) that the quality of packing was good.  
 410 However, peak broadening was observed, and it can be associated with both extra-column  
 411 volume effect and packaging heterogeneities. The van Deemter curves (linear velocity vs the  
 412 height equivalent to a theoretical plate (HETP) of the column) (Equation 8) are established for  
 413 the chloride ion on both columns between 0.001 and 0.015 mL/min for the capillary column  
 414 and between 0.1 and 0.35 mL/min for the conventional column (Figure 2). The HETP is  
 415 determined with the calculated efficiency which taking account extra-column and column  
 416 variances with the Equation 9.

417

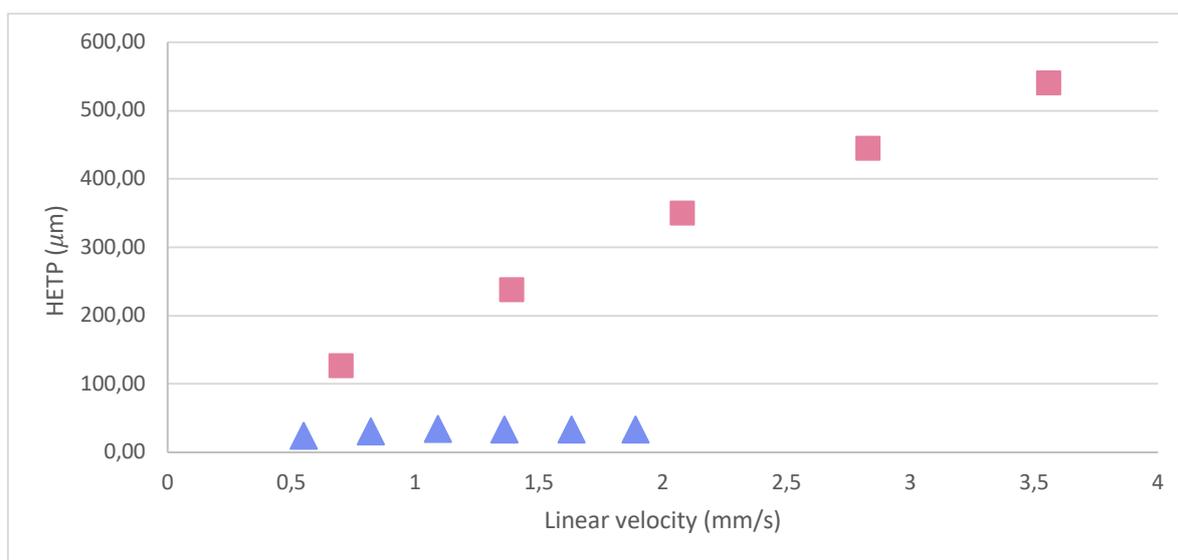
418 Equation 8.  $HETP = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$

419 Where A is the eddy diffusion, B is the longitudinal molecular diffusion, C is the mass  
420 transfer and  $\mu$  is the linear velocity

421

422 Equation 9. 
$$N_{calculated} = N_{observed} * \frac{1}{1 + \frac{\sigma^2_{e-c}}{\sigma^2_c}}$$

423 Figure 2. Van deemter curves of the conventional ( $\blacktriangle$ ) and the capillary ( $\blacksquare$ ) AS11-HC  
424 columns.



425

426

427 Van Deemter curves can be related to a linear regression in the range of linear velocities  
428 authorized by the apparatus. Indeed, lower flow rate does not induce enough pressure to  
429 perform an analysis between the range of recommended pressure. None of the columns  
430 exhibits the B-term since no curve is observed. The A and C-terms column are respectively 20  
431 and 10 for the conventional column and 38 and 143 for the capillary column. Considering that  
432 the high A-term is a marker of packing or particle size inhomogeneity, the capillary column  
433 seems to be much less well-packed than the conventional one. Furthermore, it has a higher  
434 mass-transfer resistance. The higher coefficients for the capillary format has already been  
435 noted by Eghbali *et al.*[49] on the AS18-Fast stationary phase. They conclude that this  
436 phenomenon can be explained by the effect of extra-column volumes or a packing  
437 heterogeneity or a combination of both factors. As explained before, the extra-column  
438 variance is taking account in the calculation of HETP. However, the C-term can still be  
439 influenced by the frits volumes that are comprised in the column variance.

440

441 3. Retention behavior

442

443 To study the influence of the column dimensions between a column of 0.4 mm and 2 mm i.d,  
444 in terms of retention behavior the LSSM and the van't Hoff plots models were applicated at  
445 the conventional scale with adapted conditions and compared with those mentioned above.

446 This study is done on the AS11-HC (2x250 mm) column and compared to previous results of  
447 the capillary AS11-HC (0.4x250 mm). To compare these two models in isocratic mode, the  
448 flow rate and the injected volume are adjusted by calculating the factor with the square of the  
449 diameters ratio. This leads to 25-fold increase in flow rate and injected volume for the  
450 conventional scale.

451 Results of the LSSM on these two columns are presented in the Table 7. The  
452 logarithm relation between the retention factor and the eluent concentration is linear.  
453 Concerning the slopes values, the conventional and the capillary scale leads to values from  
454 the same order of magnitude. In a general manner, for both formats, the ion exchange is the  
455 main retention mechanism. However, in a general manner, we can consider that conventional  
456 AS11-HC column can be more impacted by supplementary interactions than capillary  
457 column.

458

459 Table 7: Slope absolute values and correlation coefficients calculated on three replicates of  
460 LSSM for each solute between 5mM and 45 mM [OH<sup>-</sup>] incremented by 5 mM at 30°C and  
461 0.015 mL/min for the AS11-HC (0.4x250mm) and 0.375 mL/min for the AS11-HC  
462 (2x250mm).

463

Solute	AS11-HC (0.4x250 mm)			AS11-HC (2x250 mm)		
	Slope	r <sup>2</sup>	k	Slope	r <sup>2</sup>	k
Fluoride	<b>0.993 ± 0.004</b>	0.999	0.10<k<0.55	<b>1.068 ± 0.001</b>	0.996	0.08<k<0.43
Bromate	<b>0.992 ± 0.001</b>	0.999	0.34<k<0.63	<b>0.910 ± 0.003</b>	0.997	0.36<k<2.06
Nitrite	<b>0.977 ± 0.006</b>	0.999	0.53<k<4.11	<b>0.906 ± 0.003</b>	0.999	0.56<k<3.23
Bromide	<b>0.974 ± 0.006</b>	0.999	1.09<k<8.79	<b>0.907 ± 0.002</b>	0.999	1.21<k<6.94
Nitrate	<b>0.986 ± 0.003</b>	0.999	1.17<k<9.63	<b>0.911 ± 0.002</b>	0.999	1.29<k<7.53
Phosphate	<b>2.833 ± 0.006</b>	0.999	0.83<k<25.45	<b>2.681 ± 0.020</b>	0.999	2.27<k<14.60
Iodide	<b>0.960 ± 0.005</b>	0.999	6.69<k<55.13	<b>0.882 ± 0.001</b>	1.000	7.51<k<15.88

464 The influence of temperature at these two different column diameters is also studied (Table  
465 8). The temperature range was reduced for the conventional scale due to the excessively high  
466 pressure induced by the mobile phase viscosity at low temperatures.

467

468 Table 8. Slopes values and correlation coefficient calculated on three replicates of van't Hoff  
 469 plots between 30°C and 40°C at 20 mM [OH<sup>-</sup>] and 0.375 mL/min for AS11-HC (2x250mm)  
 470 and between 20°C and 40°C at 20 mM [OH<sup>-</sup>] and 0.015 mL/min for AS11-HC (0.4x250mm).

471

Solute	AS11-HC (0.4x250 mm)			AS11-HC (2x250 mm)		
	Slope	r <sup>2</sup>	k	Slope	r <sup>2</sup>	k
Fluoride	<b>-970 ± 20</b>	0.999	1.21<k<1.30	<b>-3530 ± 40</b>	0.997	1.48<k<1.53
Bromate	<b>-270 ± 1</b>	0.999	2.25<k<2.39	<b>-1040 ± 10</b>	0.999	2.49<k<2.55
Nitrite	<b>-500 ± 1</b>	0.999	2.99<k<3.18	<b>-830 ± 10</b>	0.999	1.95<k<2.08
Bromide	<b>190 ± 5</b>	0.999	4.45<k<4.58	<b>-160 ± 5</b>	0.982	5.47<k<5.54
Nitrate	<b>260 ± 2</b>	0.999	5.83<k<5.98	<b>-150 ± 5</b>	0.972	5.79<k<5.87
Phosphate	<b>-25000 ± 740</b>	0.999	12.64<k<24.08	<b>-1240 ± 5</b>	0.999	8.13<k<9.26
Iodide	<b>20500 ± 30</b>	0.995	25.53<k<34.43	<b>1520 ± 5</b>	0.998	10.45<k<12.26

472 As expected, the influence of the temperature on retention leads to a linear relation. The  
 473 variation of temperatures seems to have the same influence on the retention of compounds at  
 474 the two different column scales except for bromide and nitrate. Bromide and nitrate, which  
 475 are considered as enough retained in the capillary scale to belong to the third group, may be  
 476 considered as poorly retained in the conventional scale for the same range of retention factors.  
 477 However, for the iodide, which is highly retained, retention decreases with increasing  
 478 temperature for both formats. For less retained compounds, namely fluoride, bromate and  
 479 nitrite, the temperature is more influent on the retention for the conventional scale than the  
 480 capillary one. Whereas, for the others, it is the opposite trend. This discrepancy between the  
 481 two scales may be due to the larger extra-column effects at capillary scale for the less retained  
 482 analytes. For the strongly retained ones, it might be related to more efficient control of  
 483 temperature for the reduced diameter.

#### 484 4. Concluding remarks

485

486 A comparison of the retention behavior of 4 stationary phases with different resin, ion-  
 487 exchange structure, capacity, and hydrophobicity was achieved for the optimization of a  
 488 future primary metabolite separation. In IEC, the retention is governed by ionic interactions,  
 489 but the LSSM model proved that supplementary interactions are ubiquitous, especially for the  
 490 AS18-Fast column.

491 Hydrophobic interaction plays an important role in retention behavior. Although the  
492 experimental hydrophobicity leads to a different classification of columns than those given by  
493 the supplier, AS19 remains the less hydrophilic column due to its resin skeleton.

494 The temperature influence is different regarding the type of analyte. As previously  
495 described, three different groups of compounds can be determined, explaining their behavior  
496 with temperature changes. One exception was observed with the column AS19 which leads to  
497 an endothermic process, regardless the charge or retention of the analyte. This is explained by  
498 the skeleton of this resin which is hyper-branched whereas the others are nanobead columns.  
499 Besides its high capacity, the AS11-HC column seems to be less impacted by the  
500 supplementary interactions and to be less temperature sensitive. Thus, the retention can be  
501 more easily predicted, and it will be selected to the future applications.

502 Concerning the influence of the column dimensions, the study showed that the extra-  
503 column volume/total volume ratio is 5-time higher on the capillary scale than on the  
504 conventional scale. This volume has not only a huge impact on separation efficiency but also  
505 on the determination of the C-term of the van Deemter curve, leading to a difficult estimation  
506 of the column filling. This demonstrates that further improvement must be done to the  
507 apparatus.

508 Concerning the retention behavior, the conventional scale is more impacted by  
509 supplementary interactions than the capillary one. There is no uniform tendency for the  
510 influence of temperature on the retention behavior. Indeed, for less retained compounds, the  
511 retention is more impacted on the conventional column, and for the more retained ones, the  
512 retention is more impacted on the capillary column. Bromide and nitrate tend differently on  
513 the two column dimensions, depending on the retention strength.

519 **References**

- 520 [1] Jackson, P. E., Determination of inorganic ions in drinking water by ion  
521 chromatography. *TrAC* 2001, 20, 320–329.
- 522 [2] Bigard, A., Cardinael, P., Agasse, V., Anion exchange chromatography coupled to  
523 electrospray-mass spectrometry: an efficient tool for food, environment, and biological  
524 analysis. *null* 2022, 1–13.
- 525 [3] Schwaiger, M., Rampler, E., Hermann, G., Miklos, W., Berger, W., Koellensperger,  
526 G., Anion-exchange chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry: a  
527 powerful tool for merging targeted and non-targeted metabolomics. *Anal. Chem.* 2017, 89,  
528 7667–7674.
- 529 [4] Sun, Y., Saito, K., Iiji, R., Saito, Y., Application of ion chromatography coupled with  
530 mass spectrometry for human serum and urine metabolomics. *SLAS DISCOVERY: Advancing*  
531 *the Science of Drug Discovery* 2019, 24, 778–786.
- 532 [5] Catherman, A. D., Skinner, O. S., Kelleher, N. L., Top Down proteomics: facts and  
533 perspectives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014, 445, 683–693.
- 534 [6] Shi, R. L., Xiao, G., Dillon, T. M., Ricci, M. S., Bondarenko, P. V., Characterization  
535 of therapeutic proteins by cation exchange chromatography-mass spectrometry and top-down  
536 analysis. *mAbs* 2020, 12, 1739825.
- 537 [7] Adams, S., Guest, J., Dickinson, M., Fussell, R. J., Beck, J., Schoutsen, F.,  
538 Development and validation of ion chromatography–tandem mass spectrometry-based method  
539 for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food. *J. Agric. Food Chem.*  
540 2017, 65, 7294–7304.
- 541 [8] Bauer, K.-H., Knepper, T. P., Maes, A., Schatz, V., Voihsel, M., Analysis of polar  
542 organic micropollutants in water with ion chromatography–electrospray mass spectrometry.  
543 *Journal of Chromatography A* 1999, 837, 117–128.
- 544 [9] Wu, S., Anumol, T., Gandhi, J., Snyder, S. A., Analysis of haloacetic acids, bromate,  
545 and dalapon in natural waters by ion chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of*  
546 *Chromatography A* 2017, 1487, 100–107.
- 547 [10] De Borba, B. M., Rohrer, J. S., Pohl, C. A., Saini, C., Determination of trace  
548 concentrations of bromate in municipal and bottled drinking waters using a hydroxide-  
549 selective column with ion chromatography. *Journal of Chromatography A* 2005, 1085, 23–32.
- 550 [11] Aggrawal, M., Rohrer, J. S., Selective and sensitive determination of bromate in bread  
551 by ion chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2020, 1615,  
552 460765.
- 553 [12] Weiss, J., Handbook of Ion Chromatography. Wiley-VCH 2016.
- 554 [13] Cavalli, S., Polesello, S., Valsecchi, S., Chloride interference in the determination of  
555 bromate in drinking water by reagent free ion chromatography with mass spectrometry  
556 detection. *Journal of Chromatography A* 2005, 1085, 42–46.
- 557 [14] West, D. M., Mu, R., Gamagedara, S., Ma, Y., Adams, C., Eichholz, T., Burken, J. G.,  
558 Shi, H., Simultaneous detection of perchlorate and bromate using rapid high-performance ion  
559 exchange chromatography–tandem mass spectrometry and perchlorate removal in drinking  
560 water. *Environ Sci Pollut Res* 2015, 22, 8594–8602.
- 561 [15] Shi, Y., Liang, L., Cai, Y., Mou, S., Determination of trace levels of bromate in flour  
562 and related foods by ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5217–5219.
- 563 [16] Madden, J. E., Haddad, P. R., Critical comparison of retention models for the  
564 optimisation of the separation of anions in ion chromatography. *Journal of Chromatography*  
565 *A* 1999, 850, 29–41.
- 566 [17] Liang, C., Lucy, C. A., Characterization of ion chromatography columns based on  
567 hydrophobicity and hydroxide eluent strength. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217,  
568 8154–8160.

569 [18] Li, Y., Nesterenko, P. N., Stanley, R., Paull, B., Macka, M., Comparison of cation-  
570 exchange capillary columns used for ion chromatographic separation of biogenic amines.  
571 *Journal of Chromatography A* 2018, 1571, 193–200.

572 [19] Rey, M. A., Pohl, C. A., Novel cation-exchange stationary phase for the separation of  
573 amines and of six common inorganic cations. *Journal of Chromatography A* 1996, 739, 87–  
574 97.

575 [20] Nesterenko, P. N., Nesterenko, E. P., Hydrophobicity of polymer based anion-  
576 exchange columns for ion chromatography. *Heliyon* 2021, 7, e07290.

577 [21] Combined effect of coulombic and van der Waals interactions in the chromatography  
578 of proteins | Analytical Chemistry, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00048a009> (last  
579 time accessed: April 14, 2020).

580 [22] Révész, G., Hajós, P., Csiszár, H., Mixed-mode liquid chromatography of carboxylic  
581 acids and inorganic anions on a latex-based pellicular stationary phase. *Journal of*  
582 *Chromatography A* 1996, 753, 253–260.

583 [23] Dean, T. H., Jezorek, J. R., Demonstration of simultaneous anion-exchange and  
584 reversed-phase behavior on a strong anion-exchange column. *Journal of Chromatography A*  
585 2004, 1028, 239–245.

586 [24] Ståhlberg, J., Retention models for ions in chromatography. *Journal of*  
587 *Chromatography A* 1999, 855, 3–55.

588 [25] Yang, B., Zhang, F., Liang, X., Recent development in capillary ion chromatography  
589 technology. *Open Chemistry* 2012, 10, 472–479.

590 [26] Petucci, C., Zelenin, A., Culver, J. A., Gabriel, M., Kirkbride, K., Christison, T. T.,  
591 Gardell, S. J., Use of ion chromatography/mass spectrometry for targeted metabolite profiling  
592 of polar organic acids. *Anal. Chem.* 2016, 88, 11799–11803.

593 [27] Stafsnes, M. H., Røst, L. M., Bruheim, P., Improved phosphometabolome profiling  
594 applying isotope dilution strategy and capillary ion chromatography-tandem mass  
595 spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2018, 1083, 278–283.

596 [28] Wang, J., Christison, T. T., Misuno, K., Lopez, L., Huhmer, A. F., Huang, Y., Hu, S.,  
597 Metabolomic profiling of anionic metabolites in head and neck cancer cells by capillary ion  
598 chromatography with orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2014, 86, 5116–5124.

599 [29] Hirayama, A., Tabata, S., Kudo, R., Hasebe, M., Suzuki, K., Tomita, M., Soga, T.,  
600 The use of a double coaxial electrospray ionization sprayer improves the peak resolutions of  
601 anionic metabolites in capillary ion chromatography-mass spectrometry. *Journal of*  
602 *Chromatography A* 2020, 1619, 460914.

603 [30] Kiefer, P., Nicolas, C., Letisse, F., Portais, J.-C., Determination of carbon labeling  
604 distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography  
605 tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2007, 360, 182–188.

606 [31] Walsby-Tickle, J., Gannon, J., Hvinden, I., Bardella, C., Abboud, M. I., Nazeer, A.,  
607 Hauton, D., Pires, E., Cadoux-Hudson, T., Schofield, C. J., McCullagh, J. S. O., Anion-  
608 exchange chromatography mass spectrometry provides extensive coverage of primary  
609 metabolic pathways revealing altered metabolism in IDH1 mutant cells. *Commun Biol* 2020,  
610 3, 247.

611 [32] Cui, L., Liu, J., Yan, X., Hu, S., Identification of metabolite biomarkers for gout using  
612 capillary ion chromatography with mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2017, 89, 11737–11743.

613 [33] Perala, A. W., Filary, M. J., Bartels, M. J., McMartin, K. E., Quantitation of  
614 diethylene glycol and its metabolites by gas chromatography mass spectrometry or ion  
615 chromatography mass spectrometry in rat and human biological samples. *Journal of*  
616 *Analytical Toxicology* 2014, 38, 184–193.

617 [34] Sánchez, M. I. G., McCullagh, J., Guy, R. H., Compton, R. G., Reverse iontophoretic  
618 extraction of metabolites from living plants and their identification by ion-chromatography

614 coupled to high resolution mass spectrometry: reverse iontophoretic extraction of metabolites  
615 from living plants. *Phytochem. Anal.* 2017, 28, 195–201.

616 [35] Alonso, A. P., Piasecki, R. J., Wang, Y., LaClair, R. W., Shachar-Hill, Y., Quantifying  
617 the labeling and the levels of plant cell wall precursors using ion chromatography tandem  
618 mass spectrometry. *Plant Physiol.* 2010, 153, 915–924.

619 [36] Brent, L. C., Reiner, J. L., Dickerson, R. R., Sander, L. C., Method for characterization  
620 of low molecular weight organic acids in atmospheric aerosols using ion chromatography  
621 mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2014, 86, 7328–7336.

622 [37] Niu, Y.-M., Liang, Y., Liu, J.-Y., Liu, J.-F., Highly sensitive determination of dialkyl  
623 phosphinate acids in environmental samples by ion chromatography tandem mass  
624 spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2015, 1394, 26–35.

625 [38] Garcia, P., Pinètre, J., Morel, S., Jaubert, M., Deruy, X., Perot, I., Delcourt, V., Loup,  
626 B., Popot, M., Bailly-Chouriberry, L., An innovative derivatization-free IC-MS/MS method  
627 for the detection of bisphosphonates in horse plasma. *Drug Test Anal* 2020, 12(10), 1452–  
628 1461.

629 [39] Chen, Y., Ye, M., Cui, H., Wu, F., Zhu, Y., Fritz, J. S., Determination of  
630 glycerophosphate and other anions in dentifrices by ion chromatography. *Journal of*  
631 *Chromatography A* 2006, 1118, 155–159.

632 [40] Zhang, Y., Zhou, Y., Liu, L., Zhu, Y., Simultaneous determination of fluoride,  
633 chloride, sulfate, phosphate, monofluorophosphate, glycerophosphate, sorbate, and saccharin  
634 in gargles by ion chromatography. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 2007, 8, 507–511.

635 [41] Melton, L. M., Taylor, M. J., Flynn, E. E., The utilisation of ion chromatography and  
636 tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) for the multi-residue simultaneous determination of  
637 highly polar anionic pesticides in fruit and vegetables. *Food Chemistry* 2019, 298, 125028.

638 [42] Rajska, Ł., Díaz Galiano, F. J., Cutillas, V., Fernández-Alba, A. R., Coupling ion  
639 chromatography to Q-orbitrap for the fast and robust analysis of anionic pesticides in fruits  
640 and vegetables. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 2018, 101, 352–359.

641 [43] Dongli, L., Zhongyang, H., Mingli, Y., Qun, X., Lina, L., Rohrer, J., Determination of  
642 Thiosulfate and Pyrophosphate in Crayfish Wash Powder. Thermo Fisher Scientific, San Jose,  
643 CA. 2014.

644 [44] Yang, C., Henday, S., Wang, L., Schnute, B., Analysis of Glyphosate and AMPA in  
645 Environmental Water by Ion Chromatography Eletspray Tandem Mass Spectrometry (IC-  
646 ESI-MS/MS). Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA 2010.

647 [45] Barron, R. E., Fritz, J. S., Effect of functional group structure on the selectivity of low-  
648 capacity anion exchangers for monovalent anions. *Journal of Chromatography A* 1984, 284,  
649 13–25.

650 [46] Bruzzoniti, M. C., Mentasti, E., Pohl, C. A., Riviello, J. M., Sarzanini, C., Effect of  
651 ion-exchange site and eluent modifiers on the anion-exchange of carboxylic acids. *Journal of*  
652 *Chromatography A* 2001, 925, 99–108.

653 [47] Hatsis, P., Lucy, C. A., Effect of temperature on retention and selectivity in ion  
654 chromatography of anions. *Journal of Chromatography A* 2001, 920, 3–11.

655 [48] Guillarme, D., Nguyen, D. T.-T., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Method transfer for fast  
656 liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with  
657 small particle. Part I: Isocratic separation. *European Journal of Pharmaceutics and*  
658 *Biopharmaceutics* 2007, 66, 475–482.

659 [49] Eghbali, H., Bruggink, C., Agroskin, Y., Pohl, C. A., Eeltink, S., Performance  
660 evaluation of ion-exchange chromatography in capillary format: Liquid Chromatography. *J.*  
661 *Sep. Science* 2012, 35, 3461–3468.

662

## CONCLUSION

---

Comme attendu, la rétention en IC est largement gouvernée par les échanges d'ions, quelle que soit la PS. Cependant, des interactions non-ioniques participent également à la rétention et particulièrement pour la colonne AS18-Fast. L'importance de ces interactions dépend de la structure de la phase et la phase AS19 étant une phase hyper-ramifiée (partie I.2.2.6), elle devrait présenter de plus faibles contributions des interactions non-ioniques à la rétention. Cependant, la rétention des anions fortement polarisables est hautement impactée par ces interactions.

Pour la phase AS19, la rétention est également fortement dépendante de la température. Cela peut s'expliquer par sa structure hyper-ramifiée ou son groupement échangeur d'ions. Pour les autres PS, la température influençant différemment les composés selon leur rétention, 3 groupes de rétention ont été déterminés pour les solutés.

Bien qu'apportant une sélectivité supplémentaire, les interactions non-ioniques conduisent à un élargissement des pics et une difficulté à prédire la rétention pour l'optimisation. La rétention de la colonne AS11-HC étant peu affectée par ces interactions et la température, elle semble adaptée à l'application visée. De plus, elle possède une haute capacité appropriée à l'analyse de matrices chargée en sels.

En ce qui concerne l'étude des formats, comme attendu et malgré un système chromatographique adapté, les performances du format capillaire souffrent de l'importance des volumes extra-colonne du système. De plus, d'après l'étude des courbes de van Deemter, le format capillaire présente une phase stationnaire remplie de manière moins homogène. Néanmoins, l'étude a démontré que le format capillaire mène à des comportements de rétention similaires.

L'utilisation de colonnes à ce format permettant un gain de sensibilité pour la méthode et une facilité de couplage à la MS, le développement d'une méthode IC capillaire-MS est présenté dans le chapitre III.



**CHAPITRE III - L'ANALYSE DE METABOLITES PAR  
CHROMATOGRAPHIE IONIQUE COUPLEE A LA  
SPECTROMETRIE DE MASSE**

---

Cette thèse repose sur le développement d'une méthode d'IC-MS permettant l'analyse de métabolites polaires et ionisés ou ionisables. Cette méthode a été optimisée pour 52 composés dont l'analyse s'est révélée problématique en HILIC (Chromatographie d'Interactions Hydrophiles) et en RP-HPLC. Cette liste a été établie en collaboration avec l'Université de Genève. Les paramètres de MS, le type et le débit de solvant « make-up », le pH, le gradient d'éluion et la suppression ont été optimisés.

La méthode développée et optimisée a été appliquée à l'analyse de routine de fluides biologiques tels que l'urine et la salive après une préparation d'échantillon succincte consistant en une simple dilution. Cette méthode a été évaluée pour l'analyse de métabolites dans l'urine en termes d'effets matrice, de répétabilité et de sensibilité.

Finalement, la chromatographie ionique capillaire présentant de nombreux avantages adaptés au développement d'une méthode de routine, la transposition de cette méthode à ce format a été évaluée.

### **III.1. ÉTAT DE L'ART**

#### **III.1.1 LA PLACE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE DANS LA METABOLOMIQUE**

La métabolomique ou « le profilage métabolique » est l'étude de la corrélation des profils et des concentrations des métabolites de bas poids moléculaires dans les échantillons biologiques sous l'influence de l'état de croissance, du régime alimentaire, de l'effet du stress, de l'effet de l'exercice physique et d'autres contraintes. De nouvelles connaissances sont ainsi générées, révélant de nouveaux mécanismes et voies de biosynthèse souvent inattendus et permettant de mieux comprendre le rôle de chaque métabolite en fonction de la contrainte imposée au corps humain. Deux principales approches sont utilisées pour l'étude du métabolisme : l'étude ciblée qui permet d'identifier et quantifier certains métabolites connus dans un échantillon et l'étude non ciblée qui permet notamment l'identification de nouveaux biomarqueurs par comparaison des profils métaboliques de deux échantillons (un échantillon sain et un échantillon ayant subi une contrainte).

Cette étude « omique » connaît un retard technologique important par rapport à la génomique ou la protéomique. Ce retard est principalement dû à la grande diversité de structures moléculaires et de propriétés physico-chimiques au sein d'un échantillon ainsi que de grandes différences dans les gammes de concentration entre les métabolites, pouvant varier de quelques picomoles à des millimoles selon la matrice<sup>[46]</sup>. De plus, contrairement aux gènes et aux protéines, les métabolites ne sont pas représentatifs d'une seule voie métabolique mais un même métabolite peut être produit par différentes réactions biochimiques, ce qui complique

d'avantage l'interprétation. Kumar *et al.*<sup>[47]</sup> ont, par exemple, découvert des biomarqueurs de la toxicité hépatique dans l'urine appartenant à 3 différentes voies métaboliques.

La première étape de la métabolomique consiste à déterminer la méthode appropriée à l'identification et la quantification des métabolites. La RMN et la MS se sont montrées très efficaces pour l'identification des métabolites<sup>[48]</sup>. Pour la quantification, la spectrométrie de masse nécessitait tout de même l'ajout d'un étalon interne avant l'extraction<sup>[49]</sup>. Cette extraction, bien que nécessaire pour diminuer l'effet de matrice lors d'une injection directe en MS, peut en effet provoquer la perte de solutés dans l'échantillon. Avec le développement des couplages, la chromatographie est devenue une technique importante dans la métabolomique, apportant une séparation supplémentaire parfois nécessaire pour une séparation complète des métabolites.

La grande variété de propriétés physico-chimiques induit une obligation d'utiliser différentes méthodes chromatographiques orthogonales pour obtenir une vue globale d'un métabolisme. L'analyse ciblée de certains des métabolites étudiés dans ces travaux a été comparée par Büscher *et al.*<sup>[50]</sup> par GC, HPLC et EC couplées à la spectrométrie de masse. Concernant les acides aminés et les acides organiques, la GC est apparue plus résolutive mais a nécessité une étape de dérivation des solutés. En revanche, l'HPLC en mode paire d'ions ou HILIC ont été déterminées comme étant les méthodes permettant la séparation d'un plus grand nombre de composés et menant à des analyses plus robustes que la GC et l'EC pour les solutés étudiés. L'EC possède un pouvoir de séparation et une sensibilité comparable à celles obtenues en HPLC et en GC mais elle souffre d'un manque de robustesse ce qui la rend peu adaptée à l'analyse de matrices telles que les matrices biologiques. La chromatographie en phase supercritique couplée à la spectrométrie de masse (SFC-MS) a également été reportée pour l'analyse des métabolites. Une description succincte des applications de chacune de ces techniques est proposée ci-dessous.

#### III.1.1.1 L'analyse de métabolites par GC-MS

Les métabolites volatils et thermiquement stables sont analysés préférentiellement par GC-MS. Un tel couplage se fait par l'intermédiaire d'une source IE (Impact électronique).

Les biomarqueurs volatils du cancer du poumon dans le sang ont notamment été étudiés par GC-MS après une désorption SPME (Micro-Extraction en Phase Solide)<sup>[51]</sup>. Cette méthode a permis l'observation de quantités plus importantes d'heptanal et d'hexanal dans le sang d'un individu infecté par le cancer du poumon par rapport à un sang sain. Une étude des composés organiques volatils dans le souffle a également été menée en GC-MS<sup>[52]</sup>, permettant l'identification de 1259 composés. L'analyse de ces composés dans la même matrice a

également permis l'identification de biomarqueurs de la sclérodémie systémique par GC×GC-TOF haute résolution<sup>[53]</sup>.

Peu de métabolites étant analysables en GC, une étape de dérivation est nécessaire afin les rendre plus volatils et diminuer leur polarité. Cependant, au-delà du temps que prend la dérivation, cela mène à des composés moins stables<sup>[46, 54]</sup>.

#### III.1.1.2 L'analyse de métabolites par SFC-MS

Premièrement, la SFC a été considérée comme une technique d'analyse de composés apolaires en raison des forts taux de CO<sub>2</sub> dans la PM qui induisaient une faible performance pour l'analyse de composés polaires. Ensuite, avec l'ajout de modifiants organiques et d'additifs, la SFC a mené à des analyses correctes de composés polaires. C'est donc aujourd'hui une technique qui permet l'analyse d'une large gamme de polarité de composés. Une méthode d'échange d'ions en SFC a notamment été appliquée avec succès à l'analyse de dopants polaires dans l'urine humaine<sup>[55]</sup>. L'analyse d'acides aminés a également été présentée par Wolrab *et al.*<sup>[56]</sup> avec deux différentes sources d'ionisation : l'ESI et l'APCI. Le couplage SFC-APCI-MS/MS a permis la séparation des composés de la voie métabolique du tryptophane et des acides aminés.

Sur une liste de 597 métabolites, l'université de Genève en collaboration avec l'université de Ferrare est parvenue à une détection majoritaire de plusieurs familles de composés telles que les acides aminés, les composés sulfonates ou encore les nucléosides avec une méthode SFC-HRMS. Cependant, cette technique n'est pas adaptée à la détection de métabolites phosphatés<sup>[57]</sup>.

#### III.1.1.3 L'analyse de métabolites par électrophorèse capillaire (CE)

En CE, les composés sont séparés selon leur vitesse de migration différentielle dans une phase liquide électriquement conductrice sous l'influence d'un courant électrique externe<sup>[58]</sup>. Elle permet donc l'analyse de métabolites ionisés ou ionisables. Avec l'ajout d'additif, les applications de la CE peuvent s'étendre également à l'analyse des molécules neutres et/ou chirales. Dans certains cas, l'analyse en CE-MS nécessite une dérivation des composés. Cette technique a permis notamment l'identification de 32 métabolites composés d'acides carboxyliques dans l'urine de rat avec une sensibilité de détection accrue grâce à l'utilisation de standards marqués<sup>[59]</sup>.

La CE présente l'avantage d'un temps d'analyse réduit par rapport à la GC ou l'HPLC mais elle est moins sensible et moins reproductible en ce qui concerne les temps de migration et l'aire des pics, particulièrement lors de l'analyse de l'urine<sup>[54]</sup>.

#### III.1.1.4 L'analyse de métabolites par chromatographie liquide (HPLC)

La chromatographie liquide, par ses différents modes, permet une analyse de métabolites de polarités variées. Bien que la RP-HPLC et la NP-HPLC permettent de couvrir une gamme totale de polarités, la HILIC et l'IC sont mieux adaptés à l'analyse de composés polaires à très polaires ionisés ou ionisables et permettent d'obtenir une meilleure sensibilité avec un détecteur MS.

La RP-HPLC est largement utilisée dans la métabolomique non ciblée grâce à sa robustesse et la bonne rétention des métabolites apolaires à moyennement polaire<sup>[60]</sup>. Pour les métabolites de plus haute polarité, un mode tel que la HILIC semble beaucoup plus adapté<sup>[61]</sup>. En revanche, la HILIC souffre d'un manque de reproductibilité des temps de rétention et est davantage impactée par les effets matrices que la RP-HPLC.

La NP-HPLC semble également présenter une bonne complémentarité de la RP-HPLC. En effet, Putluri *et al.*<sup>[62]</sup> ont réalisé une étude de l'urine pour la détermination des biomarqueurs du cancer de la vessie avec des méthodes de RP-HPLC et de NP-HPLC aqueuses. La combinaison de ces deux méthodes complémentaires en termes de polarité de solutés a permis d'identifier 25 métabolites biomarqueurs de la maladie.

L'IC a longtemps été peu adaptée pour l'analyse de métabolites en raison d'un manque de compatibilité avec la spectrométrie de masse. Le couplage étant maintenant simplifié avec des adaptations qui seront détaillées ci-après, cette technique est de plus en plus développée pour l'analyse des composés ionisés dans les matrices biologiques. Souvent comparée à la HILIC ou l'IP (chromatographie de Paire d'Ions) en raison de son domaine d'application, elle présente l'avantage d'une plus forte rétention que la HILIC et ne nécessite pas d'agent de paires d'ions, peu compatibles avec la MS<sup>[63]</sup>. En effet, l'IC présente l'avantage d'une PM compatible à la MS après suppression combinée à des solutés déjà ionisés dans la phase liquide avant l'entrée dans la source ESI<sup>[64]</sup> ce qui permet d'obtenir une sensibilité accrue en MS (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

#### III.1.2 LE COUPLAGE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

L'association d'une méthode de séparation comme l'IC et d'une méthode d'identification et de quantification des faibles concentrations comme la MS est nécessaire pour la métabolomique. Ce couplage non trivial est rendu possible grâce à plusieurs optimisations comme le débit de PM, l'utilisation d'un solvant « make-up » et d'un supprimeur. Ces optimisations sont plus amplement décrites dans la revue bibliographique ci-dessous (Article II).



# ARTICLE II - ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY COUPLED TO ELECTROSPRAY-MASS SPECTROMETRY: AN EFFICIENT TOOL FOR FOOD, ENVIRONMENT, AND BIOLOGICAL ANALYSIS

CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY  
<https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2036942>



REVIEW ARTICLE



## Anion Exchange Chromatography Coupled to Electrospray-Mass Spectrometry: An Efficient Tool for Food, Environment, and Biological Analysis

Adeline Bigard, Pascal Cardinael , and Valérie Agasse 

Normandie Univ, Laboratoire SMS-EA3233, FR3038 INC3M, UNIROUEN, Mont-Saint-Aignan, France

### ABSTRACT

For over 50 years, ion chromatography has been demonstrated to be a successful technique used to quantify a wide range of ions and ionizable compounds, either organic or inorganic, in various matrices using conductimetric or electrochemical detection. It was only since 1996 that ion chromatography was coupled to electrospray-mass spectrometry, opening the field to new applications in complex matrices and the detection of compounds at trace levels. This review covers the recent developments of ion exchange chromatography and mass spectrometry. It focuses on the choice of mobile phases, column geometry, suppressors, make-up solvents and type of ionization sources reported in the literature. A brief overview of a large range of applications in food analysis, environmental analysis and bioanalysis is presented, and performances are discussed.

### KEYWORDS

biological analysis;  
environmental analysis;  
food analysis; ion exchange  
chromatography; mass  
spectrometry

### Introduction

High-performance liquid chromatography (HPLC) has commonly been combined with mass spectrometry for 30 years, but ion chromatography was first coupled to fast-atom bombardment (FAB) mass spectrometry for various ionic compounds in 1989<sup>[1]</sup> and to electrospray-mass spectrometry in 1996<sup>[2]</sup> for bromate quantification. This coupled system allows a decrease in the limit of quantification of bromate in water by combining the capability of ionic stationary phases to separate polar and charged molecules and the sensitivity of mass spectrometry. This hyphenated system is now currently used to analyze contaminants such as oxyhalides and haloacetic acids (HAAs) in drinking water.<sup>[3,4]</sup> Since then, several applications have been reported in the literature, especially for contaminant and pesticide quantification<sup>[5-9]</sup> in food matrices and the analysis of biological matrices, mainly for the identification and/or quantification of metabolites.<sup>[10]</sup>

As shown in [Figure 1](#), interest in IC-MS has rapidly increased. The number of publications increased gradually from 2000 to today, and this technique is now adapted and used in many important fields of research, such as metabolomics. However, this hyphenated system is not trivial compared to well-known liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and needs some specific optimization. The main constraint comes from the ionic mobile phase, which is an aqueous basic or acidic solution containing nonvolatile salts as well as a corrosive solution incompatible with a mass spectrometer system. This review intends to report the different alternatives used to overcome this drawback, from the use of a suppressor to the addition

of a make-up solvent. This review also proposes to cover different recent applications in food, environmental, and biological analyses published since 2000 and focuses on a comparison in terms of analyzed matrices, sensitivity (LOD/LOQ) and applicability.

### How to couple IC with a mass spectrometer?

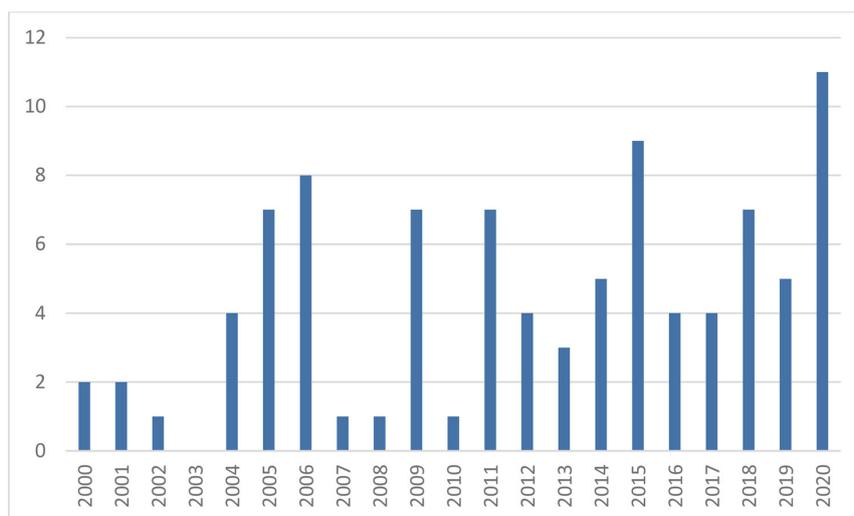
Ion chromatography can be coupled to different element-specific detectors, such as AAS (atomic absorption spectrometry),<sup>[11]</sup> ICP (inductively coupled plasma)<sup>[12]</sup> and mass spectrometry detectors. Nevertheless, applications using the first two abovementioned detectors will not be detailed here. This review will focus on the necessary adaptation of operating conditions when using mass spectrometers. All these parameters will be illustrated below with a concrete state-of-the-art example.

### MS source

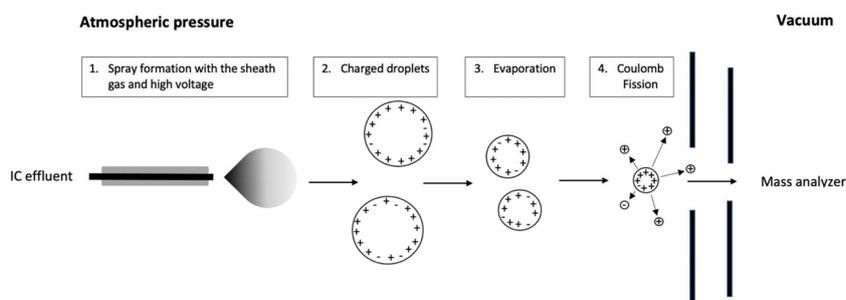
The electrospray ionization (ESI) source is the most commonly used ion source in liquid chromatography (LC) – MS in general and it is also the most common ionization source reported in the IC-MS literature. ESI is an atmospheric pressure ionization technique that permits the column effluent to be changed into a spray before its transfer into the mass analyzer. As in LC-MS, the mobile phase flow rate must be well adapted to the MS source for optimized ionization, sufficient desolvation and stable spraying. As shown in the schematic representation in [Figure 2](#), in the ESI source, the column effluent passes through a needle to which a high

**CONTACT** Valérie Agasse  [valerie.agasse@univ-rouen.fr](mailto:valerie.agasse@univ-rouen.fr)  Laboratoire SMS-EA3233, UFR Sciences & Techniques, Place Emile Blondel, F-76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.

© 2022 Taylor & Francis Group, LLC



**Figure 1.** Number of publications per year corresponding to the term of “ion chromatography” and “mass spectrometry” on sci-finder. This research was made the 28th of August 2021 and filtered by journals in English between 2000 and 2020 including the concept of “mass spectrometry”, “chromatography, ion exchange” and “ion exchange chromatography” and excluding the concepts of “inductively coupled plasma mass spectrometry”.



**Figure 2.** Schematic representation of an electrospray source.

voltage is applied to form a spray if the field is sufficiently high. This fine jet leads to charged droplets that shrink with solvent evaporation thanks to thermal energy. Due to coulombic repulsion, the charged droplets fragment and decrease in size until they reach a limit. Then, they are transferred into the mass analyzer.

Since compounds are eluted in a charged form, ESI sources appear particularly suitable. Nevertheless, desolvation and salt elimination remain critical processes regarding the nature of IC eluents. The flow rate of the mobile phase must be adapted to the amount of eluent that the source can correctly nebulize and evaporate. Moreover, two critical points must be kept in mind or monitored: the sensitivity and the stability of the spray, which can both be affected by the flow rate. Since the commercialization of the modern generation of mass spectrometers, ESI sources have become more robust and are now compatible with higher flows. For modern IC-MS systems, the flow rate of the mobile phase can now classically vary between 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  and 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ . All providers have developed their own source design to allow the use of columns with different diameters and associated flow rates without a significant loss in sensitivity. The

review by Rodriguez-Aller et al.<sup>[13]</sup> details all these improvements.

Another solution consists of adjusting some source parameters to favor desolvation. Indeed, gas flow and temperature sources can be increased to enhance desolvation and allow the use of high flow rates.

### Mobile phase flow

In most of the studies cited in this review, good sensitivity and stability were obtained for flow rates ranging from 200 to 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  with mass spectrometers from different suppliers. Furthermore, for a 4 mm-i.d. column, the recommended flow rate is approximately 1 mL/min, which is too high for the MS source. To overcome this problem, some solutions were investigated to reduce the flow. Some authors<sup>[14–16]</sup> reported the use of a splitter before the ESI source to reduce the flow between 100 and 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . When another detector was combined with MS detection, the detectors were then used in parallel.<sup>[17,18]</sup> A variant was

to use a valve to transfer only some selected fractions in the mass spectrometer.<sup>[19]</sup>

The use of columns with an internal diameter of 2 mm i.d. appears to be the best compromise since their use is recommended with flow rates of 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Furthermore, 2  $\times$  250 mm is the most common geometry reported in the literature. Nevertheless, a change to a smaller column diameter induces a reduction in injection and extra column volumes to avoid a loss in chromatographic resolution, and the use of a suppressor designed for the chosen dimensions is necessary. Capillary columns are well-adapted for optimal ionization. Indeed, columns with an internal diameter of 0.4 mm are used with a maximal mobile phase flow rate of 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Moreover, better sensitivities were obtained using capillary columns than conventional columns for the same injected volume of sample due to the reduced dilution factor. However, the use of the capillary columns requires the use of a capillary scale IC system that most laboratories do not have.

### Suppression

The most powerful device for removing salts from the mobile phase is called a suppressor. Suppressors are already well known for their crucial role in ion chromatography when using a conductivity detector. They allow neutralization of the mobile phase and a decrease in its conductivity, thus increasing the sensitivity. Indeed, the counterion of the analyte is involved in the Kohlrausch law, which states that for a dilute solution, the electrical conductivity is proportional to the sum of the limiting equivalent conductivity of all ions multiplied by their concentration. Moreover, the counterion is exchanged in the suppressor by a hydronium ion with a higher limiting equivalent conductivity, which leads to an increase in signal. In the case of hyphenation with mass spectrometry, the suppressor plays a more important role because it must be able to eliminate nonvolatile salts and neutralize the mobile phase into water, which is an MS-compatible eluent unlike basic or acidic eluents. Because the pH values are clearly different before and after the suppression step, ionization of target molecules could be affected. The ionized compounds transferred in the mass spectrometer could then be different from the eluted compounds in terms of charge.

Different suppressors were developed and commercialized. There are two main types of suppressors: packed-bed suppressors and membrane suppressors. Packed-bed suppressors are now mainly commercialized by Metrohm. They consist of a rotor composed of three cartridges filled with ion exchange resin. This resin, in the case of anion exchange chromatography, is composed of a strong acidic cation exchanger in hydrogen form. When one cartridge is used during a run, the other cartridges are regenerated by an external regenerant. During a run, sodium or potassium ions from the mobile phase are exchanged by hydronium ions to form the corresponding acid. The main drawback of this system, aside from the necessity of an external dilute acid regenerant, is that weak and strong electrolytes are

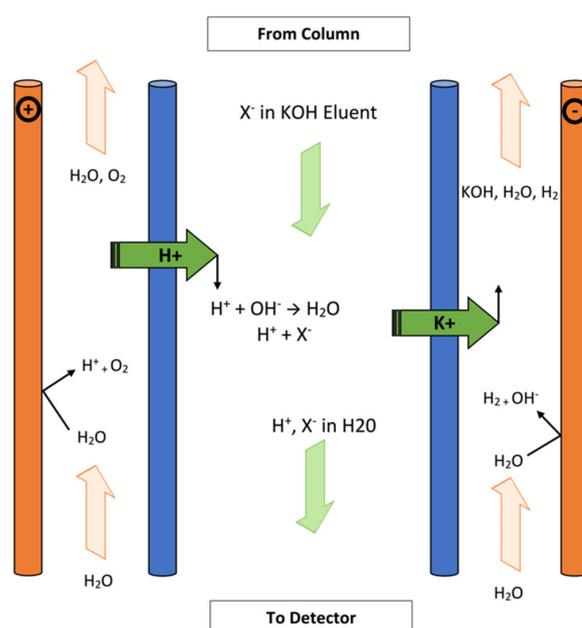
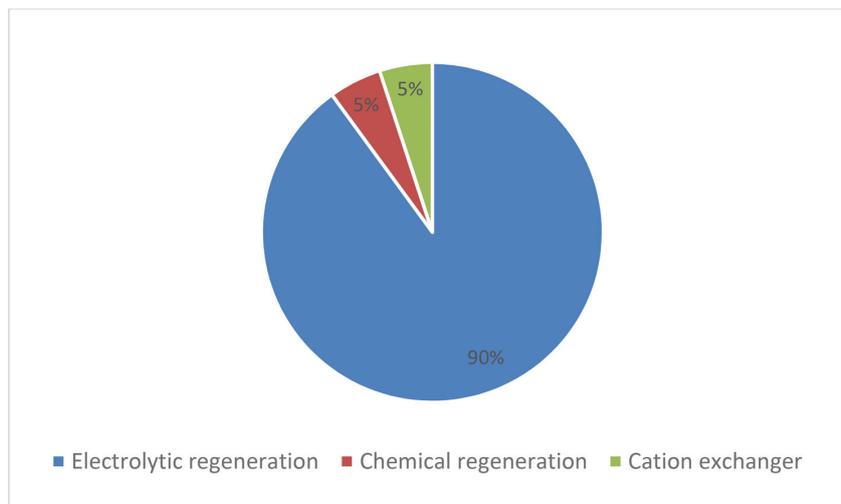


Figure 3. Principle of suppression using a micromembrane suppressor inspired by Thermofisher Scientific.

subject to the Donnan effect. Weiss<sup>[20]</sup> explained the following: “weak acids such as nitrite and acetate, which can be partly non-dissociated, may pass through the Donnan layer and may be adsorbed on the surface of the stationary phase. This results in a small increase in the retention times for weak acids, which depends on the  $\text{pK}_a$  value of the respective species, the total volume of the packed-bed suppressor, and the degree of its use”. Due to these drawbacks, membrane suppressors are the most commonly used.

Membrane suppressors are divided into two types: electrolytic and chemical suppressors. The main difference is the presence of electrodes. For an electrolytic suppressor, there is a cathode and an anode that electrolyze water to produce  $\text{OH}^-$  and  $\text{H}_3\text{O}^+$ , respectively. If KOH is used as the eluent,  $\text{K}^+$  ions of the mobile phase cross the membrane through the cathode side. At the same time,  $\text{H}_3\text{O}^+$  ions cross the exchange membrane from the anode to neutralize  $\text{OH}^-$  ions in water (Figure 3). Due to water regeneration, these suppressors can be used in recycling mode. In this mode, the eluent is used as a regenerant for the suppressor, so no external pump is needed. This mode cannot be used for trace analysis due to the excessively high noise induced or with destructive detectors such as MS detectors. However, Perala et al.<sup>[21]</sup> used a splitter after the suppressor, which allows the flow to be divided into two parts: one part for MS (with an adapted flow rate) and the other part for the suppressor to benefit from the advantage of recycling mode. The drawbacks of this device are that it prevents the use of organic solvents in the mobile phase and require the use of a splitter. Indeed, organic solvents must sometimes be added to avoid nonionic interactions and thus improve the peak shape, but recycled electrolytic suppression is not compatible with organic solvent because contaminating ions from the



**Figure 4.** Percentage of each type of suppressors used in 40 of publications listed in this review.

oxidation of solvents can accumulate. For chemical suppressors, neutralization of the mobile phase is performed using an external regenerant and thus is not based on water electrolysis. The main drawback of this device is the use of an acidic or basic solution as the regenerant.

Membrane suppressors are popular but present some drawbacks, such as low resistance to backpressure and the loss of compounds due to the interaction between analytes with cationic charge and membranes. To overcome membrane weakness toward backpressure, a new design of suppressor was commercialized and especially recommended for coupling with mass spectrometry. In addition, when using an anionic suppressor, cationic compounds are removed by passing through the cation permeable membrane, which can limit the analysis of a mixture containing both anionic and cationic compounds by IC-MS. For instance, cationic compounds were not detected in trypanosome extracts.<sup>[22]</sup> Membrane suppressors can also lead to other inconveniences. Bauer et al.<sup>[23]</sup> hypothesized that a suppressor could distort the peak shape of amino-methylphosphonic acid (AMPA) due to the protonation of the AMPA amino group interacting with the cation exchanger membrane. Granby et al.<sup>[24]</sup> also postulated that AMPA can interact with the cation exchanger membrane, resulting in extra retention and the broadening of peaks. To avoid AMPA retention in suppressors, Geerdink et al.<sup>[25]</sup> modified an anionic chemically regenerated suppressor (ACRS) by converting the membranes into ammonium form by flushing the suppressor with a 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution for 24 h at 5 ml/min. Then, a solution containing 200 mM  $\text{NH}_4^+$  at pH 9 was used as the regenerant, leading to a 100-fold increased signal that confirmed the role of the suppressor in the loss in efficiency.

Therefore, three main types of suppressors exist: packed column ion-exchangers, electrolytically regenerated membranes and chemically regenerated membranes. Repartition of these three types of suppressors in cited publications is

represented in Figure 4, which only considers publications with clearly identified suppressors.

Regardless of the suppressor technology, neutralization of the mobile phase leads to a variation in pH, which can sometimes become weakly acidic. This is very important to consider when analytes are detected in mass spectrometry. Indeed, depending on the pKa of analytes, the variation in pH can change the state of charge and therefore the  $m/z$  ratio in target mode. In the same manner, several organic acids (medium polar to nonpolar) are not detected or are weakly detected in negative mode. Some hypotheses were stated concerning the absence of a signal or insufficient sensitivity, which were attributed to the precipitation of analytes in the suppressor and to low ionization (acidic pH).<sup>[26]</sup>

### **Make-up optimization**

#### **Nature of the solvent**

Even if a mobile phase of 100% water is compatible with ESI/MS, it is not the most suitable for desolvation. To enhance solvent evaporation, sensitivity and spray stability, the addition of a volatile solvent is recommended in addition to the use of a high nebulizer gas flow and high temperature in the MS source. The nature of the make-up solvent must be optimized considering that it must be volatile, be MS compatible and have a low viscosity to minimize the induced backpressure, especially for membrane suppressors that cannot operate above a backpressure of 450 psi. However, the use of a splitter combined with the dilution of the column effluent can lead to a loss in efficiency and a decrease in sensitivity. A significant part of the IC-MS analysis was performed without any make-up solvent. For example, Brent et al.<sup>[27]</sup> investigated the MS signal intensity using acetonitrile and methanol as make-up solvents for the analysis of organic acids. The addition of a make-up solvent did not improve sensitivity, so they decided to operate without it.

However, when a make-up is used, acetonitrile is the most commonly employed. Rajska et al.<sup>[5]</sup> demonstrated that acetonitrile leads to a better sensitivity than methanol for analysis of pesticides and contaminants in fruits and vegetables and their metabolites. More generally, acetonitrile was the most commonly used make-up solvent in the listed publications dedicated to pesticide analysis. Adams et al.<sup>[8]</sup> justified the choice of acetonitrile instead of methanol by the suppressor damage that methanol could cause due to its viscosity and induced backpressure.

For metabolite analysis, different trends were reported, but most of the time, no make-up solvent<sup>[21,28–30]</sup> or methanol<sup>[22,31,32]</sup> was chosen. Tedesco et al.<sup>[33]</sup> studied the influence of the make-up solvent nature on the carbohydrate analysis and concluded that methanol was better than water or acetonitrile for applications in terms of its ionization capability.

Sometimes, acetonitrile and methanol lead to worse ionization than other solvents, as described by Lewis et al. for amine analysis.<sup>[34]</sup> The effect of acetonitrile, methanol and ethanol on MS sensitivity was investigated. Ethanol was considered the best solvent for producing protonated amines in the electrospray source. Hirayama et al.<sup>[35]</sup> studied methanol, acetonitrile and isopropanol and selected isopropanol for metabolite analysis due to its improved peak area despite its high viscosity.

#### Organic modifier

Organic solvent can also be added directly into the mobile phase.<sup>[7,25,36–38]</sup> On the one hand, this avoids diluting the effluent before the ESI source and allows to maintain the gain in sensitivity induced by the organic solvent without increasing the backpressure after the suppressor. On the other hand, such an organic modifier changes the retention behavior of an ionic stationary phase by limiting nonionic interactions and thus reduces the peak broadening of some compounds. However, some parts of the chromatography system, such as the column, can be damaged using an organic solvent. Most of columns limit the use of tetrahydrofuran to 20%. For suppressor, it is recommended to verify the compatibility with organic solvent depending on the nature of solvent, the type of suppressor (chemical or electrolytic) and the operating mode. Moreover, Reagent-Free Ion Chromatography (RFIC) system is not compatible with organic solvent. Chen et al.<sup>[39]</sup> and Wu et al.<sup>[37]</sup> reported the addition of methanol and acetonitrile with the use of a suppressor, but the amount of the organic modifier did not exceed 15% in these examples. However, Bertoletti et al.<sup>[40]</sup> studied the effect of mobile phase composition on the chromatogram and the sample equilibrium by adding up to 50% acetonitrile to the mobile phase, but no suppressor was used. It is interesting to note that in most cases, the use of an organic solvent does not improve the analysis performances.

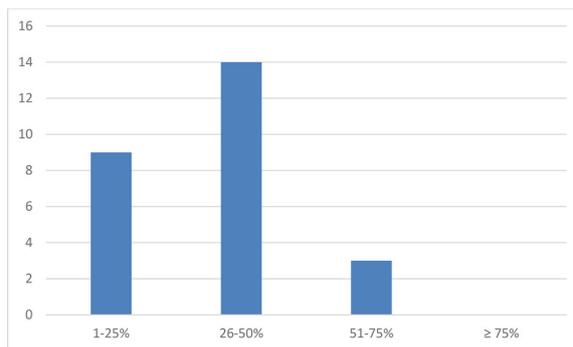


Figure 5. Distribution of publications listed in this review according to the percentage of make-up flow compared to the total flow transferred into the ESI source.

#### Make-up flow rate

Concerning the flow of the make-up solvent, it must be a compromise between good desolvation, a low induced backpressure and column effluent dilution. Figure 5 shows the percentage of the flow of the make-up solvent compared to the total flow transferred into the ESI source. Most of the methods are developed with a make-up percentage between 26% and 50%, which appears to be a good compromise. No method with a make-up percentage greater than 75% was reported, probably due to an excessively high backpressure and a loss in sensitivity induced by effluent dilution.

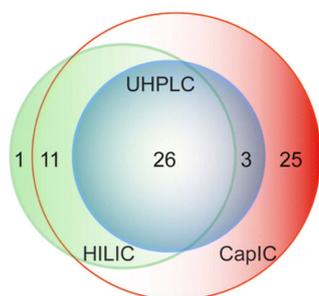
#### Nature of the additive

An acid, a base or a salt can be added to the make-up solvent for many purposes:

- to facilitate adduct formation;
- to modify the pH to charge eluted compounds; and
- to help desolvation.

A sodium salt could be added at a low concentration (0.25 mmol/L) to form sodium adducts<sup>[41–43]</sup> and facilitate the identification of molecules, such as sugars, with mass spectrometry for some applications or improve the sensitivity of the detection. The formation of sodium adducts led to a change in the charge state and induced the use of ESI in positive mode despite the use of an anionic exchanger for chromatography, where analytes were eluted in negative form. Analysis of monosaccharides was also facilitated by adding LiOH to form lithium adducts that were specific.<sup>[44]</sup> Additives were also used to enhance protein analysis. Shi et al.<sup>[45]</sup> analyzed therapeutic proteins by cation exchange chromatography, and formic acid was added to help unfold proteins, increase intensity and facilitate top-down analysis.

A dicationic reagent can also be added to further increase the selectivity and the sensitivity. This is the case for perchlorate analysis which can be associated, even in gas phase, with a long chain positive cationic reagent ( $D^{2+}$ ) to be detected in MS as  $DClO_4^+$ . This ion association can be done post-column with different reagents.<sup>[46]</sup> The obtained LOD for perchlorate is 20 ng/L with a single quadrupole.<sup>[47]</sup>



**Figure 6.** Complementarity between UHPLC, HILIC and capIC. Reprinted with permission from Wang, J.; Christison, T. T.; Misuno, K.; Lopez, L.; Huhmer, A. F.; Huang, Y.; Hu, S. Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites in Head and Neck Cancer Cells by Capillary Ion Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 2014, 86 (10), 5116–5124. <https://doi.org/10.1021/ac500951v>. Copyright 2014 American Chemical Society.<sup>[50]</sup>

## Applications

Ion chromatography is well known to be efficient for analyzing ionic or ionizable compounds in complex matrices such as environmental, food and biological samples. The ever-growing interest in ion chromatography is based on its complementarity with other types of chromatography, such as hydrophilic interaction chromatography (HILIC),<sup>[26,48]</sup> reversed phase liquid chromatography (RPLC)<sup>[22]</sup> and gas chromatography (GC)<sup>[21]</sup> in terms of retention and selectivity. The high retention capacity of ion chromatography toward highly polar molecules and organic acids is particularly interesting to separate these target analytes in complex matrices. For metabolomics analysis, the complementarity between HILIC with a SeQuant ZIC pHILIC column, UHPLC with a Hypersil Gold C18 column and capillary IC with an AS11-HC column is illustrated in Figure 6 for the anionic metabolites in head and neck cancer cells.<sup>[48]</sup> Furthermore, ion chromatography does not require the derivatization step needed for analysis of highly polar compounds, such as glyphosate and bisphosphonates, which are weakly retained using conventional HPLC, simplifying sample preparation.<sup>[49]</sup> This chromatographic technique coupled to mass spectrometry makes it a method of choice for the analysis of environmental, food, and biological matrices.

In ion chromatography, there is a lack of knowledge concerning stationary phases, which complicates selection of an appropriate column. For example, many stationary phases are suitable for the separation of anions in water, but the differences between them are not very clear. However, for more particular research applications for which there is no dedicated column, the choice is not convenient.

## Environmental analysis

Ion exchange chromatography appears to be the most suitable technique for water analysis because extraction of polar analytes from water, which can be difficult, is not necessary and direct injection of aqueous samples can be achieved. Thus, IC-MS was first developed for environmental analysis to quantify bromates at sub-ppb level in water.<sup>[2]</sup> Then, other applications dedicated to the analysis of disinfection

byproducts (DBPs) of water<sup>[37,50]</sup> or hazardous compounds in water,<sup>[15,51]</sup> soil,<sup>[52]</sup> and other complex matrices<sup>[27,44,53]</sup> were developed.

As we can see in Table 1, water analysis is the main concern in environmental analysis using IC-MS. The injection of water samples without any sample preparation can be performed directly due to the compatibility of IC with aqueous matrices, allowing time savings and avoiding a loss of sample information. Moreover, the identification power and the sensitivity of mass spectrometry allowed the detection and quantification of DBPs, including haloacetic acids (HAAs) and oxyhalides (bromate, perchlorate, etc.), at the sub-ppb level.

In 2011, perchlorate anions were detected and quantified at very low levels in drinking and seawater by Her et al.<sup>[54]</sup> using IC-MS/MS with a LOD of 0.005 µg/L and a LOQ of 0.032 µg/L. In 2015, West et al.<sup>[55]</sup> succeeded in developing a method for perchlorate and bromate detection using a hybrid MS analyzer (triple quadrupole/ion trap). The LOD for perchlorates was 0.04 µg/L, and the LOQ was 0.12 µg/L for 50 µL of injected filtered water. The LOD and LOQ for bromates were also satisfactory at 0.01 µg/L and 0.05 µg/L, respectively. In 2017, Wu et al.<sup>[37]</sup> developed a target method with similar performances in terms of sensitivity using a triple quadrupole mass spectrometer. They reached a LOQ for bromates of 0.011 µg/L by injecting twice more. Barron and Paull<sup>[52]</sup> developed a method to separate bromates, perchlorates and other oxyhalides with HAAs using an ion trap mass spectrometer. In 2016, Xue et al.<sup>[50]</sup> developed a rapid method in MRM mode with a Q-Trap spectrometer to analyze 17 HAAs and halogenated contaminants, which was validated on both untreated and treated water. The LOD varied from 0.01 to 1 µg/L for 50 µL samples depending on the compound.

In 2014, an IC-MS/MS method was used to characterize organic acids by class in atmospheric aerosols despite incomplete chromatographic separation.<sup>[27]</sup> Low detection limits were obtained; for malic acid, its LOD was 0.003 µg/g.

Mädler et al.<sup>[51,53]</sup> succeeded in quantifying Cr(VI) at ultratrace levels (ppt) in water and lake sediments using an IC-MS/MS method with speciated isotope dilution.

Ivey and Foster<sup>[19]</sup> developed an IC-MS method for phosphorous oxyanion analysis in water, which allowed to obtain a LOD 200 times lower than that reported using conductivity detection. Chelating agents, including ethylenediamine tetraacetate (EDTA) and diethylenetriamino pentaacetate (DTPA), were also quantified in water using an IC-MS system with a LOQ down to a concentration level of 1 µg/L.<sup>[15]</sup>

An original IC-MS method was elaborated to identify and quantify monosaccharides hydrolyzed from polysaccharides in activated sludge to understand water treatment mechanisms.<sup>[44]</sup> Separation was performed on a CarboPac column using online pretreatment of the column switching technique to eliminate the matrix.

The detection and quantification of pesticides in water are of primary importance for health concerns. IC-MS/MS is becoming the method of choice to analyze highly polar pesticides. Wu et al.<sup>[37]</sup> also succeeded in detecting and

**Table 1.** Summary of publications listed in this review dedicated to environmental analysis using IC-MS from 2000 to 2020.

Authors	Year	Analytes	Column	Suppressor	Matrix	MS analyzer	Injected volume	LOD	LOQ
Knepper et al. <sup>[15]</sup>	2005	Chelating agents	Metrosep A Supp 5 (4 × 150mm)	Yes	Water	Single quadrupole	200 µL /	/	< 1 µg/L
Ivey and Foster <sup>[19]</sup>	2005	Hypophosphite Phosphite	AS17 (4 × 250mm)	Yes	Water	Ion Trap	800 µL	0.011 µM 0.002 µM	/
Cavalli et al. <sup>[65]</sup>	2005	Bromate	AS11-HC (2 × 250mm)	Yes	Water	Single quadrupole	/ /	/	/
Barron and Paull <sup>[52]</sup>	2006	Oxyhalides HAA	AS16 (2 × 250mm)	Yes	Water and Soil	Ion Trap	100 µL	2 to 138 µg/L	/
Her et al. <sup>[54]</sup>	2011	Perchlorate	AS21 (2 × 250mm)	Yes	Water	Triple quadrupole	100 µL	0.005 µg/L	0.032 µg/L
Brent et al. <sup>[27]</sup>	2014	Low molecular weight organic acids	AS17 (2 × 250mm) & AS11	Yes	Atmospheric Aerosols	Triple quadrupole	10 µL	0.0002 to 0.023 µg/g	0.0005 to 0.078 µg/g
West et al. <sup>[55]</sup>	2015	Perchlorate Bromate	AS21 (2 × 250mm)	No	Water	Triple quadrupole/ Ion Trap	50 µL	0.04 µg/L 0.01 µg/L	0.12 µg/L 0.05 µg/L
Niu et al. <sup>[66]</sup>	2015	Dialkyl phosphinate acids	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Water, soil, and sediment	Triple quadrupole	200 µL	0.02 to 0.03 µg/kg	0.06 to 0.09 µg/kg
Xue et al. <sup>[50]</sup>	2016	17 water contaminants	AS21 (2 × 250mm)	No	Water	Q Trap	5 µL 50 µL	0.02 to 5 µg/L 0.01 to 1 µg/L	0.05 to 10 µg/L 0.02 to 2 µg/L
Mädler et al. <sup>[51]</sup>	2016	Chromium VI	AS20 (2 × 250mm)	Yes	Water	Triple quadrupole	200 µL	0.007 µg/L	0.035 µg/L
Mädler et al. <sup>[53]</sup>	2016	Chromium VI	AS20 (2 × 250mm)	Yes	Lake Sediment	Triple quadrupole	200 µL	0.014 µg/g	/
Wu et al. <sup>[37]</sup>	2017	HAAs Bromate Dalapon	Metrosep A Supp 7 (4 × 250mm)	Yes	Water	Triple quadrupole	100 µL	0.01 to 0.14 µg/L 0.0051 µg/L 0.44 µg/L	0.022 to 0.26 µg/L 0.011 µg/L 0.62 µg/L
Geerdink et al. <sup>[25]</sup>	2020	Glyphosate AMPA Glufosinate MPPA	AS24 (2 × 250mm)	Yes	Water	Triple quadrupole	100 µL	9.6 ng/L 7.8 ng/L 6.5 ng/L 8.1 ng/L	10 ng/L
Zhao et al. <sup>[44]</sup>	2020	Monosaccharide	CarboPac PA200 (3 × 150mm)	Yes	Activated sludge	Ion Trap/Time of flight	20 µL	0.34 to 2.15 µg/L	1.14 to 7.18 µg/L

quantifying dalapon (2,2-dichlorodipropionic acid) with the method described above. They detected dalapon at a low level (0.44 µg/L) with an injection volume of 100 µL. Geerdink et al.<sup>[25]</sup> recently developed an IC-MS/MS method to detect and quantify glyphosate and glufosinate and their metabolites (aminomethylphosphonic acid (AMPA) and 3-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]propionic acid (MPPA)) in water at the ppt level. The key points to obtain this high sensitivity are to convert the suppressor membranes into ammonium form as described before and to use 40% methanol in the mobile phase to enhance ionization.

### Biological analysis

Biological analysis is a broad term describing analysis of complex biological matrices such as blood, saliva, urine, cells, and plants. It includes the identification and/or quantification of pesticides, contaminants, and pools of molecules with various polarities, molecular weights, states of charge, etc. Bioanalysis can have many purposes related to health, such as the determination of biomarkers of diseases or the understanding of biological mechanisms. This can be gathered under the term of “metabolomics”.

Currently, there is great interest in metabolomics using many orthogonal analytical methods. Ion chromatography is an orthogonal method compared to conventional RPLC due to its incomparable ability to separate hydrophilic, charged,

and polar compounds. Combination with mass spectrometry detection is very useful to identify unknown metabolites and/or quantify them at very low concentrations.

Table 2 shows that, in some cases, IC-MS is only used for metabolite profiling, i.e., to identify compounds without quantification.<sup>[31,40,41]</sup> Profiling is the identification of molecules and requires high-resolution mass spectrometry techniques such as time of flight or orbitrap spectrometry. Metabolite profiling can be used for the identification of novel biomarkers of diseases, as reported by Cui et al.<sup>[56]</sup> or Walsby-Tickle et al.<sup>[29]</sup>

Moreover, IC-MS can be used to separate protein isoforms for diagnosis, as reported by Leblanc et al.<sup>[57]</sup> They developed a method to monitor human serum albumin (HSA) structural integrity and thus to make a diagnosis of liver disease, ascertain a treatment and study HSA as a therapeutic protein. HSA displays a complex charge variant profile that is well separated by ion exchange chromatography. This method led to the separation and identification of 9 variants. Proteins were also analyzed by Bertolotti et al.<sup>[40]</sup> to separate and identify protein conformers to monitor the conformers involved in amyloidosis. Depending on the goal of the metabolomics study, quantification may be crucial.

For metabolomics studies, IC-MS demonstrated its high capacity to separate and quantify a wide variety of small polar organic molecules. Among them, three sugars,

**Table 2.** Summary of publications listed in this review dedicated to bioanalysis using IC-MS from 2000 to 2020.

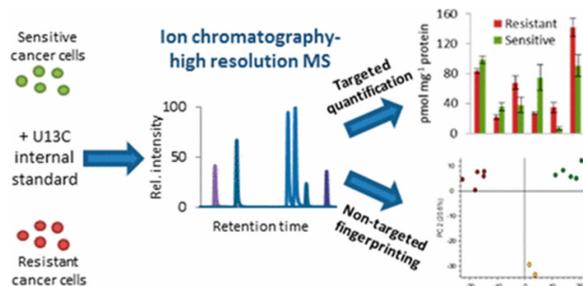
Authors	Year	Analytes	Column	Suppressor	Matrix	MS analyzer	Injected volume	LOD	LOQ
Van Dam et al. <sup>[14]</sup>	2002	Glycolytic intermediates	AS11 (4 × 250mm)	Yes	Saccharomyces cerevisiae (yeast)	Triple quadrupole	10 µL	1.5 to 15.7 nmol/g	5 to 52.3 nmol/g
Bruggink et al. <sup>[41]</sup>	2005	Oligosaccharide	CarboPAC PA200 (0.381 × 250mm)	Yes	Urine	Ion Trap	0.41 µL	/	/
Kiefer et al. <sup>[36]</sup>	2007	Phosphorylated Metabolites	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Cells	Triple quadrupole/Ion Trap	15 µL	/	/
Valentín-Blasini et al. <sup>[60]</sup>	2007	Nitrate Perchlorate Thiocyanate Iodide	AS20 (2 × 250mm)	Yes	Urine	Triple quadrupole	24 µL	500 µg/L 0.05 µg/L 5 µg/L 0.33 µg/L	/
Chen et al. <sup>[39]</sup>	2009	Pesticides	AS11 (4 × 250mm)	Yes	Serum	Ion Trap	25 µL	/	0.2 to 0.5 ng/mL
Alonso et al. <sup>[30]</sup>	2010	Metabolites	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Plant cells	Triple quadrupole	/	0.3 to 34 nM	1 to 111 nM
Burgess et al. <sup>[22]</sup>	2011	Trypanosome's metabolome	AS19 et AS20	Yes	Trypanosome	Orbitrap	/	0.01 to 100 pmol	/
Bruggink et al. <sup>[43]</sup>	2012	Oligosaccharides	CarboPac PA200 (0.4 × 250mm)	Yes	Urine	Ion Trap	1 µL	/	/
Bertoletti et al. <sup>[40]</sup>	2013	Protein beta2-microglobulin	Propac SAX-10 (2 × 250mm)	No	/	Ion Trap/Orbitrap	1 µL	/	/
Perala et al. <sup>[21]</sup>	2014	Diethylene glycol and its metabolites	AS11 (4 × 250mm)	Yes	Rat blood Rat urine Rat tissues	Single quadrupole	/	/	1.6 to 15.6 µg/mL 25.3 to 50.5 µg/mL 2 to 25.7 µg/mL
Wang et al. <sup>[48]</sup>	2014	Anionic metabolites	AS11 (0.4 × 250mm)	Yes	Cancer cells	Orbitrap	/	0.04 to 0.5 nmol/L	/
Kvitvang et al. <sup>[58]</sup>	2014		(0.25 × 250mm)	Yes	Cells	Phosphometabolomes and organic acids Triple quadrupole	Ion Swift 5 µL	MAX-100 <1 to 100 nM	1 to 500 nM
Fa et al. <sup>[42]</sup>	2015	Glycosylglycerol sucrose	CarboPac PA200 (0.4 × 150mm)	Yes	Cyanobacteria	Triple quadrupole/Ion Trap	0.4 µL	6 µg/L 20 µg/L	20 µg/L 70 µg/L
Petucci et al. <sup>[26]</sup>	2016	28 organic acids	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Muscle	Triple quadrupole	/	/	/
Sánchez et al. <sup>[28]</sup>	2016	Metabolites	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Plants	Quadrupole/Orbitrap	10 µL	/	/
Schwaiger et al. <sup>[32]</sup>	2017	Metabolomics	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Cancer cells	Quadrupole/Orbitrap	5 µL	0.4 to 219 nM	1 to 413 nM
Cui et al. <sup>[56]</sup>	2017	Biomarker for gout	AS11 (0.4 × 250mm)	Yes	Saliva	Orbitrap	/	/	/
Leblanc et al. <sup>[57]</sup>	2018	Albumin	Proteomix SAX-NP5 (2.1 × 150mm)	No	Human serum	Time Of Flight	10 µg	/	/
Stafsnes et al. <sup>[59]</sup>	2018		(0.4 × 250mm)	Yes	Microorganisms Human cells	Phosphometabolomes Triple quadrupole	AS11 /	/	0.5 to 500 nM
Zhong et al. <sup>[61]</sup>	2018	Perfluorinated alkyl acids	AS20 (2 × 250mm)	Yes	Human serum	Single quadrupole	25 µL	/	0.5 to 2 µg/L
Sun et al. <sup>[31]</sup>	2019	Metabolomes	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Urine and Saliva	Orbitrap	5 µL	/	/
Walsby-Tickle et al. <sup>[29]</sup>	2020	Primary metabolites	AS11 (2 × 250mm)	Yes	Cells, tissues, and bio-fluids	Quadrupole/Orbitrap	5 µL	0.2 to 1400 nM	/
Hirayama et al. <sup>[35]</sup>	2020	Anionic metabolites	AS11 (0.4 × 250mm)	Yes	Cells	Orbitrap	0.4 µL	1 to 500 nmol/L	/
Garcia et al. <sup>[49]</sup>	2020	Bisphosphonates	AS18 Fast (2 × 150mm)	Yes	Horse plasma	Triple quadrupole	50 µL	100 to 500 pg/mL	/

glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, and fructose-6-phosphate, involved in energetic metabolism are isobars. These compounds are well separated by using an adapted gradient in ion chromatography before Orbitrap<sup>[35,48]</sup> or triple quadrupole<sup>[14,58]</sup> detection. For these 3 compounds, van Dam et al.<sup>[14]</sup> achieved a detection limit less than 2 pmol.

Plant cellular metabolites have also been identified and characterized by performing IC-MS/MS<sup>[30]</sup> on 16 hexose phosphates and nucleotide sugars involved in biosynthesis of

the cell wall and IC-HRMS<sup>[28]</sup> on a mixture of metabolites, including organic acids, sugars and nucleotides.

Nucleotides are also often analyzed in the case of metabolomics due to their implication in many metabolite cycles. Different nucleosides, adenosine (A), guanosine (G), cytosine (C), uridine (U) and thymidine (T), are present in monophosphate (MP), diphosphate (DP), triphosphate (TP), and/or cyclic (c) forms. In nucleotide analysis,<sup>[31,35,58]</sup> an IC-MS method using an orbitrap mass



**Figure 7.** Simultaneous targeted metabolic profiling by non-targeted fingerprinting and isotope dilution for cancer cell studies using IC coupled to HRMS. Reprinted with permission from Schwaiger, M.; Rampler, E.; Hermann, G.; Miklos, W.; Berger, W.; Koellensperger, G. Anion-Exchange Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Merging Targeted and Non-Targeted Metabolomics. *Anal. Chem.*, 2017, 89 (14), 7667–7674. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01624>. Copyright 2017 American Chemical Society.<sup>[37]</sup>

spectrometer developed by Sun et al.<sup>[31]</sup> for 200 compounds demonstrated the lowest detection limits for cAMP, AMP, ADP and ATP, with LODs between 25 and 250 fmol. Phosphometabolome profiling was investigated using capillary IC-MS/MS, allowing the separation of almost 80 metabolites in a run time of 60 minutes.<sup>[59]</sup> An original strategy was also developed by Kiefer et al.<sup>[36]</sup> to determine the carbon labeling distribution of phosphorylated intracellular metabolites.

Low-molecular-weight organic acids (LMWOAs) are also frequently included in metabolite mixture studies. Pyruvate and lactate were detected at 0.01 pmol and 0.1 pmol, respectively.<sup>[22]</sup> Succinate, malate, *cis*-aconitate, isocitrate, and citrate were also detected at the pmol level in this study and in another IC-MS method using the same type of high-resolution mass analyzer.<sup>[31]</sup>

Schwaiger et al.<sup>[32]</sup> developed simultaneous targeted metabolic profiling by nontargeted fingerprinting and isotope dilution for cancer cell studies using IC coupled to HRMS. This approach (Figure 7) allowed to identify metabolite phenotypes of drug-sensitive and drug-resistant human colon carcinoma cells. Urinary oligosaccharide fingerprints were established using capillary IC coupled with ion trap MS/MS as a diagnostic for potential lysosomal storage disorders.<sup>[41,43]</sup> Fa et al.<sup>[42]</sup> developed a capillary IC-MS method to quantify glucosylglycerol and sucrose in intracellular extracts of cyanobacteria, with LOQs of 20 and 70  $\mu\text{g/L}$ , respectively. In horse doping control, an interesting IC-MS/MS method was developed to detect bisphosphonate in horse plasma, avoiding the need for a tedious derivatization step.<sup>[49]</sup> LODs for all bisphosphonates were estimated to be in the concentration range of 100 pg/ml to 500 pg/ml in plasma.

Metabolomics can also be used for the analysis of biomatrices to quantify hazardous compounds.<sup>[21,60]</sup> For instance, the indandione rodenticide class, which is a class of pesticides considered toxic to mammals, was quantified at trace levels in serum by Chen et al.<sup>[39]</sup> Perfluorinated compounds (PFCs) are a family of manmade chemicals used in textiles, additives, paper products, etc. These compounds

can accumulate in blood and some tissues and lead to harmful health effects. These compounds were quantified with LOQs between 0.5 and 2  $\mu\text{g/L}$  in human serum.<sup>[61]</sup>

### Food analysis

Food analyses are divided in two main groups. The first is dedicated to the analysis of food composition, including lipids, proteins, and sugars. The second focuses on trace analyses of contaminants. IC-MS is preferentially used to detect and quantify polar and ionizable pesticides and contaminants. Table 3 shows publications dedicated to food analysis using IC-MS.

For a few years, pesticide trace analysis has been of prime concern due to its health effects. Some pesticides, especially most polar pesticides, can be separated and quantified with other contaminants using IC-MS. The low maximum residue level (MRL) imposes the use of MS detection due to its sensitivity and selectivity. Therefore, triple quadrupole analyzers are the most popular for targeted trace analysis. In 2018, Bauer et al.<sup>[7]</sup> reached a low MRL concentration for chlorate, perchlorate, ethephon and 2-hydroxyethylphosphonic acid (HEPA) detection using only 5  $\mu\text{L}$  of tomato, apple, lemon, sultana, avocado and wheat extract. Quantification of the same contaminants and pesticides in addition to AMPA, glyphosate and fosetyl-aluminum was also reported using the IC-MS/MS method in other matrices, such as pea, pepper, pineapple and melon.<sup>[9]</sup>

Rajski et al.<sup>[5]</sup> used a Q-Orbitrap spectrometer to quantify chlorate, perchlorate, fosetyl-aluminum, glyphosate, AMPA, phosphonic acid, N-acetyl AMPA and N-acetyl glyphosate. This high-resolution mass spectrometer combined with MS<sup>2</sup> mode allowed LOQ values of 0.01 mg/kg by diluting methanol extracts 5-fold.

MRLs in infant food are lower due to public concern. A multiresidue method for the quantification of contaminants such as perchlorate, chlorate, ethephon, glyphosate, AMPA, glufosinate, and MPPA in infant food was developed using a triple quadrupole mass analyzer.<sup>[8]</sup> This method allows the quantification of pesticide concentrations from 0.01 to 100 mg/kg depending on the matrix. Moreover, three studies<sup>[38,62,63]</sup> focused on perchlorates, allowing quantification below 3  $\mu\text{g/L}$ , 1  $\mu\text{g/kg}$  and 0.95  $\mu\text{g/kg}$  respectively depending on the matrix.

Aggrawal and Rohrer<sup>[64]</sup> quantified bromates in bread with a LOD of 0.1  $\mu\text{g/L}$  and a LOQ of 0.34  $\mu\text{g/L}$  using a single quadrupole. Even though the single quadrupole is a low-resolution mass analyzer, its use allows to obtain LODs and LOQs 7–8-fold lower than those of conductivity detection.

IC-MS analyses are also useful for characterizing the carbohydrate composition in food. Indeed, Tedesco et al.<sup>[33]</sup> developed a method to discriminate between different honeys according to their floral characteristics by determining their carbohydrate compositions. This method using a single quadrupole allowed to obtain LOQs between 0.02 and 1 mg/L in honey extracts.

**Table 3.** Summary of publications listed in this review dedicated to food analysis using IC-MS from 2000 to 2020.

Authors	Year	Analytes	Column	Suppressor	Matrix	MS analyzer	Injected volume	LOD	LOQ
Krynitsky et al. <sup>[38]</sup>	2004	Perchlorate	Water IC-Pak Anion HR	No	Lettuce Cantaloupe Bottled water Milk	Triple quadrupole	50 µL	/	1 µg/kg 2 µg/kg 0.5 µg/kg 3.0 µg/kg
Krynitsky et al. <sup>[63]</sup>	2006	Perchlorate	Water IC-Pak Anion HR	No	Fruits Vegetable Infant foods Low moisture food	Triple quadrupole	50 µL	/	1.0 µg/kg 1.0 µg/kg 1.0 µg/kg 3.0 µg/kg
Wang et al. <sup>[62]</sup>	2011	Perchlorate	AS20 (2 × 250mm)	Yes	Liquid infant formula Powered infant formula	Triple quadrupole	100 µL	/	0.4 µg/L 0.95 µg/kg
Adams et al. <sup>[8]</sup>	2017	Pesticides	AS19 (2 × 250mm)	Yes	Cereal Grapes Infant food	Triple quadrupole	100 µL	/	0.01 to 20 mg/kg 0.15 to 100 mg/kg 0.01 to 0.02 mg/kg 0.01 mg/kg
Rajski et al. <sup>[5]</sup>	2018	Pesticides	AS19 (2 × 250mm)	Yes	Fruits and vegetables	Q-Orbitrap	50 µL	/	/
Bauer et al. <sup>[7]</sup>	2018	Pesticides	Metrosep A Supp 5 (2 × 150mm)	No	Tomato Apple Lemon Avocado Wheat Sultana	Triple quadrupole	5 µL	/	/
Melton et al. <sup>[9]</sup>	2019	Pesticides	AS19 (2 × 250mm)	Yes	Pea Pepper Pineapple Melon	QTrap	100 µL	/	/
Tedesco et al. <sup>[33]</sup>	2020	Carbohydrate	CarboPac PA10 (2 × 250mm)	Yes	Honey	Single quadrupole	25 µL	0.005 to 0.4 mg/L	0.02 to 1 mg/L
Aggrawal and Rohrer <sup>[64]</sup>	2020	Bromate	AS31 (2 × 250mm)	Yes	Bread	Single quadrupole	62.5 µL	0.1 µg/L	0.34 µg/L

### Concluding remarks

Even if IC-MS is not trivial compared to other hyphenated systems, it has become increasingly popular due to apparatus improvements. Modern ESI sources are now compatible with higher flow (up to 500 µL/min), enabling the use of IC columns with common diameters (2–4 mm). The development of the hyphenation of IC with MS is mainly based on the different commercially available suppressors according to the nonvolatile nature of the mobile phase. This device can now resist higher backpressure, which favors the use of a make-up flow before MS spectrometry to enhance ionization. Furthermore, for LC-MS, the addition of an organic solvent was successful in obtaining good spray stability and desolvation of ions. Depending on the applications, the type and flow rate of make-up solvent can vary. An additive can also be used to improve desolvation and favor adduct formation. Moreover, adduct formation was favored using salts or acid/base additives in the make-up solution.

A wide range of applications dedicated to polar and ionized compounds were developed with such a hyphenated system, from environmental analysis to biological analysis, including food analysis. IC-MS is now commonly used to monitor the quality of food and water. Indeed, anionic and polar contaminants, including perchlorates, bromates, HAA and pesticides, are now commonly quantified by IC-MS with low LOQs at the sub-ppb level.

IC-MS is now becoming an orthogonal method for metabolomics analysis. Indeed, many polar compounds, especially phosphate species, of metabolomics pathways were quantified. Depending on the mass analyzer, some biomarkers can be identified, and some diagnosis can be done with this coupled system.

Furthermore, the use of ion chromatography simplified sample preparation for aqueous matrices (water, urine, etc.) and saved time.

### Acknowledgments

The authors are thankful to A.M. Compiano from Thermo Fisher Scientific for our exchanges on ion chromatography and his valuable knowledge.

### Disclosure statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### ORCID

Pascal Cardinael  <http://orcid.org/0000-0001-8828-4527>  
Valérie Agasse  <http://orcid.org/0000-0001-8747-5954>

## References

- [1] Al-Omar, A. S.; Todd, J. F. J. Preliminary Studies on Ion Chromatography/Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry for the Characterization of Various Ionic Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 405–409. DOI: 10.1002/rcm.1290031108.
- [2] Charles, L.; Pépin, D.; Casetta, B. Electrospray Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry of Bromate at Sub-ppb Levels in Water. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2554–2558. DOI: 10.1021/ac960175k.
- [3] Beck, J. R.; Christison, T.; Schweingruber, H.; Yang, C. T. EPA Method 557 Quantitation of Haloacetic Acids, Bromate, and Dalapon in Drinking Water Using Ion Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. **2016**.
- [4] Gilchrist, E. S.; Healy, D. A.; Morris, V. N.; Glennon, J. D. A. A Review of Oxyhalide Disinfection By-Products Determination in Water By Ion Chromatography and Ion Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *942*, 12–22. DOI: 10.1016/j.aca.2016.09.006.
- [5] Rajski, L.; Díaz Galiano, F. J.; Cutillas, V.; Fernández-Alba, A. R. Coupling Ion Chromatography to Q-Orbitrap for the Fast and Robust Analysis of Anionic Pesticides in Fruits and Vegetables. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 352–359. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0410.
- [6] Nardin, T.; Barnaba, C.; Abballe, F.; Trenti, G.; Malacarne, M.; Larcher, R. Fast Analysis of Quaternary Ammonium Pesticides in Food and Beverages Using Cation-Exchange Chromatography Coupled with Isotope-Dilution High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40*, 3928–3937. DOI: 10.1002/jssc.201700579.
- [7] Bauer, A.; Luetjohann, J.; Rohn, S.; Kuballa, J.; Jantzen, E. Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry (IC-MS/MS) Multimethod for the Determination of Highly Polar Pesticides in Plant-Derived Commodities. *Food Control* **2018**, *86*, 71–76. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.11.007.
- [8] Adams, S.; Guest, J.; Dickinson, M.; Fussell, R. J.; Beck, J.; Schoutsen, F. Development and Validation of Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Method for the Multiresidue Determination of Polar Ionic Pesticides in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7294–7304. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00476.
- [9] Melton, L. M.; Taylor, M. J.; Flynn, E. E. The Utilisation of Ion Chromatography and Tandem Mass Spectrometry (IC-MS/MS) for the Multi-Residue Simultaneous Determination of Highly Polar Anionic Pesticides in Fruit and Vegetables. *Food Chem.* **2019**, *298*, 125028. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125028.
- [10] Zhang, T. G.; Watson, D. High Performance Liquid Chromatographic Approaches to Mass Spectrometry Based Metabolomics. *Curr. Metab.* **2012**, *1*, 58–83. DOI: 10.2174/2213235X11301010058.
- [11] Frankowski, M.; Ziola-Frankowska, A.; Siepak, J. Speciation of Aluminium Fluoride Complexes and Al<sup>3+</sup> in Soils from the Vicinity of an Aluminium Smelter Plant by Hyphenated High Performance Ion Chromatography Flame Atomic Absorption Spectrometry Technique. *Microchem. J.* **2010**, *95*, 366–372. DOI: 10.1016/j.microc.2010.02.019.
- [12] Chen, B.-H.; Jiang, S.-J.; Sahayam, A. C. Determination of Cr(VI) in Rice Using Ion Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2020**, *324*, 126698. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126698.
- [13] Rodriguez-Aller, M.; Gurny, R.; Veuthey, J.-L.; Guillaume, D. Coupling Ultra High-Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry: Constraints and Possible Applications. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1292*, 2–18. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.061.
- [14] van Dam, J. C.; Eman, M. R.; Frank, J.; Lange, H. C.; van Dedem, G. W. K.; Heijnen, S. J. Analysis of Glycolytic Intermediates in *Saccharomyces Cerevisiae* Using Anion Exchange Chromatography and Electrospray Ionization with Tandem Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *460*, 209–218. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00240-4.
- [15] Knepper, T. P.; Werner, A.; Bogenschütz, G. Determination of Synthetic Chelating Agents in Surface and Waste Water by Ion Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1085*, 240–246. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.045.
- [16] Mohsin, S. B. Use of Ion Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Ionic Compounds in Agricultural Chemicals. *J. Chromatogr. A* **2000**, *884*, 23–30. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00280-6.
- [17] Yi, L.; Ouyang, Y.; Sun, X.; Xu, N.; Linhardt, R. J.; Zhang, Z. Qualitative and Quantitative Analysis of Branches in Dextran Using High-Performance Anion Exchange Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1423*, 79–85. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.10.064.
- [18] Yan, Y.; Liu, A. P.; Wang, S.; Daly, T. J.; Li, N. Ultrasensitive Characterization of Charge Heterogeneity of Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Strong Cation Exchange Chromatography Coupled to Native Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 13013–13020. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03773.
- [19] Ivey, M. M.; Foster, K. L. Detection of Phosphorus Oxyanions in Synthetic Geothermal Water Using Ion Chromatography-Mass Spectrometry Techniques. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1098*, 95–103. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.08.061.
- [20] Weiss, J. *Handbook of Ion Chromatography*, 4th ed.; Wiley-VCH: Germany, **2016**, Vol. 1.
- [21] Perala, A. W.; Filary, M. J.; Bartels, M. J.; McMartin, K. E. Quantitation of Diethylene Glycol and Its Metabolites by Gas Chromatography Mass Spectrometry or Ion Chromatography Mass Spectrometry in Rat and Human Biological Samples. *J. Anal. Toxicol.* **2014**, *38*, 184–193. DOI: 10.1093/jat/bku018.
- [22] Burgess, K.; Creek, D.; Dewsbury, P.; Cook, K.; Barrett, M. P. Semi-Targeted Analysis of Metabolites Using Capillary-Flow Ion Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry: Analysis of Metabolites Using Ion Chromatography and Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 3447–3452. DOI: 10.1002/rcm.5247.
- [23] Bauer, K.-H.; Knepper, T. P.; Maes, A.; Schatz, V.; Voihsel, M. Analysis of Polar Organic Micropollutants in Water with Ion Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *837*, 117–128. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00048-5.
- [24] Granby, K.; Johannesen, S.; Vahl, M. Analysis of Glyphosate Residues in Cereals Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 692–698. DOI: 10.1080/0265203031000109477.
- [25] Geerdink, R. B.; Hassing, M.; Ayarza, N.; Bruggink, C.; Wielheesen, M.; Claassen, J.; Epema, O. J. Analysis of Glyphosate, AMPA, Glufosinate and MPPA with ION Chromatography Tandem Mass Spectrometry Using a Membrane Suppressor in the Ammonium Form Application to Surface Water of Low to Moderate Salinity. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1133*, 66–76. DOI: 10.1016/j.aca.2020.05.058.
- [26] Petucci, C.; Zelenin, A.; Culver, J. A.; Gabriel, M.; Kirkbride, K.; Christison, T. T.; Gardell, S. J. Use of Ion Chromatography/Mass Spectrometry for Targeted Metabolite Profiling of Polar Organic Acids. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11799–11803. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03435.
- [27] Brent, L. C.; Reiner, J. L.; Dickerson, R. R.; Sander, L. C. Method for Characterization of Low Molecular Weight Organic Acids in Atmospheric Aerosols Using Ion Chromatography Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7328–7336. DOI: 10.1021/ac403937e.
- [28] Sánchez, M. I. G.; McCullagh, J.; Guy, R. H.; Compton, R. G. Reverse Ionophoretic Extraction of Metabolites from Living Plants and Their Identification by Ion-Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry: Reverse

- Iontophoretic Extraction of Metabolites from Living Plants. *Phytochem. Anal.* **2017**, *28*, 195–201. DOI: [10.1002/pca.2660](https://doi.org/10.1002/pca.2660).
- [29] Walsby-Tickle, J.; Gannon, J.; Hvinden, I.; Bardella, C.; Abboud, M. I.; Nazeer, A.; Hauton, D.; Pires, E.; Cadoux-Hudson, T.; Schofield, C. J.; et al. Anion-Exchange Chromatography Mass Spectrometry Provides Extensive Coverage of Primary Metabolic Pathways Revealing Altered Metabolism in IDH1 Mutant Cells. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 247. DOI: [10.1038/s42003-020-0957-6](https://doi.org/10.1038/s42003-020-0957-6).
- [30] Alonso, A. P.; Piasecki, R. J.; Wang, Y.; LaClair, R. W.; Shachar-Hill, Y. Quantifying the Labeling and the Levels of Plant Cell Wall Precursors Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 915–924. DOI: [10.1104/pp.110.155713](https://doi.org/10.1104/pp.110.155713).
- [31] Sun, Y.; Saito, K.; Iiji, R.; Saito, Y. Application of Ion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry for Human Serum and Urine Metabolomics. *SLAS DISCOVERY: Adv. Sci. Drug Discov.* **2019**, *24*, 778–786. DOI: [10.1177/2472555219850082](https://doi.org/10.1177/2472555219850082).
- [32] Schwaiger, M.; Rampler, E.; Hermann, G.; Miklos, W.; Berger, W.; Koellensperger, G. Anion-Exchange Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Merging Targeted and Non-Targeted Metabolomics. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 7667–7674. DOI: [10.1021/acs.analchem.7b01624](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01624).
- [33] Tedesco, R.; Barbaro, E.; Zangrando, R.; Rizzoli, A.; Malagnini, V.; Gambaro, A.; Fontana, P.; Capodaglio, G. Carbohydrate Determination in Honey Samples by Ion Chromatography-Mass Spectrometry (HPAEC-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 5217–5227. DOI: [10.1007/s00216-020-02732-3](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02732-3).
- [34] Lewis, Z.; Jackson, B. A.; Crampton, A.; Ray, A. D.; Holman, S. W. Towards a Generic Method for Ion Chromatography/Mass Spectrometry of Low-Molecular-Weight Amines in Pharmaceutical Drug Discovery and Development. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, *34*, e8680. DOI: [10.1002/rcm.8680](https://doi.org/10.1002/rcm.8680).
- [35] Hirayama, A.; Tabata, S.; Kudo, R.; Hasebe, M.; Suzuki, K.; Tomita, M.; Soga, T. The Use of a Double Coaxial Electrospray Ionization Sprayer Improves the Peak Resolutions of Anionic Metabolites in Capillary Ion Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1619*, 460914. DOI: [10.1016/j.chroma.2020.460914](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460914).
- [36] Kiefer, P.; Nicolas, C.; Letisse, F.; Portais, J.-C. Determination of Carbon Labeling Distribution of Intracellular Metabolites from Single Fragment Ions by Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 182–188. DOI: [10.1016/j.ab.2006.06.032](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.06.032).
- [37] Wu, S.; Anumol, T.; Gandhi, J.; Snyder, S. A. Analysis of Haloacetic Acids, Bromate, and Dalapon in Natural Waters by Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1487*, 100–107. DOI: [10.1016/j.chroma.2017.01.006](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.006).
- [38] Krynitisky, A. J.; Niemann, R. A.; Nortrup, D. Determination of Perchlorate Anion in Foods by Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5518–5522. DOI: [10.1021/ac049281+](https://doi.org/10.1021/ac049281+).
- [39] Chen, X.; Cai, M.; OuYang, X.; Jin, M. Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Confirmation and Determination of Indandione Rodenticides in Serum. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 1217–1226. DOI: [10.1002/bmc.1246](https://doi.org/10.1002/bmc.1246).
- [40] Bertolotti, L.; Regazzoni, L.; Aldini, G.; Colombo, R.; Abballe, F.; Caccialanza, G.; De Lorenzi, E. Separation and Characterisation of Beta2-Microglobulin Folding Conformers by Ion-Exchange Liquid Chromatography and Ion-Exchange Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *771*, 108–114. DOI: [10.1016/j.aca.2013.01.058](https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.058).
- [41] Bruggink, C.; Wuhrer, M.; Koeleman, C. A. M.; Barreto, V.; Liu, Y.; Pohl, C.; Ingendoh, A.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M. Oligosaccharide Analysis by Capillary-Scale High-PH Anion-Exchange Chromatography with on-Line Ion-Trap Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *829*, 136–143. DOI: [10.1016/j.jchromb.2005.10.006](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.006).
- [42] Fa, Y.; Liang, W.; Cui, H.; Duan, Y.; Yang, M.; Gao, J.; Liu, H. Capillary Ion Chromatography-Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Glucosylglycerol and Sucrose in Intracellular Extracts of Cyanobacteria. *J. Chromatogr. B* **2015**, *1001*, 169–173. DOI: [10.1016/j.jchromb.2015.07.054](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.054).
- [43] Bruggink, C.; Poorthuis, B. J. H. M.; Deelder, A. M.; Wuhrer, M. Analysis of Urinary Oligosaccharides in Lysosomal Storage Disorders by Capillary High-Performance Anion-Exchange Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1671–1683. DOI: [10.1007/s00216-012-5968-9](https://doi.org/10.1007/s00216-012-5968-9).
- [44] Zhao, Z.; Lin, Q.; Feng, Y.; Zhou, Y.; Wang, X. Determination of Monosaccharides Hydrolyzed from Polysaccharides in Activated Sludge by Ion chromatography-mass spectrometry with online pretreatment of column switching technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 8061–8071. DOI: [10.1007/s00216-020-02955-4](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02955-4).
- [45] Shi, R. L.; Xiao, G.; Dillon, T. M.; Ricci, M. S.; Bondarenko, P. V. Characterization of Therapeutic Proteins by Cation Exchange Chromatography-Mass Spectrometry and Top-down Analysis. *mAbs.* **2020**, *12*, 1739825. DOI: [10.1080/19420862.2020.1739825](https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1739825).
- [46] Martinelango, P. K.; Anderson, J. L.; Dasgupta, P. K.; Armstrong, D. W.; Al-Horr, R. S.; Slingsby, R. W. Gas-Phase Ion Association Provides Increased Selectivity and Sensitivity for Measuring Perchlorate by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4829–4835. DOI: [10.1021/ac050479j](https://doi.org/10.1021/ac050479j).
- [47] Martinelango, P. K.; Dasgupta, P. K. Dicationic Ion-Pairing Agents for the Mass Spectrometric Determination of Perchlorate. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7198–7200. DOI: [10.1021/ac0709899](https://doi.org/10.1021/ac0709899).
- [48] Wang, J.; Christison, T. T.; Misuno, K.; Lopez, L.; Huhmer, A. F.; Huang, Y.; Hu, S. Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites in Head and Neck Cancer Cells by Capillary Ion Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5116–5124. DOI: [10.1021/ac500951v](https://doi.org/10.1021/ac500951v).
- [49] Garcia, P.; Pinère, J.; Morel, S.; Jaubert, M.; Deruy, X.; Perot, I.; Delcourt, V.; Loup, B.; Popot, M.; Bailly-Chouriberry, L. An Innovative Derivatization-Free IC-MS/MS Method for the Detection of Bisphosphonates in Horse Plasma. *Drug Test. Anal.* **2020**, *12*, 1452–1461. DOI: [10.1002/dta.2892](https://doi.org/10.1002/dta.2892).
- [50] Xue, R.; Donovan, A.; Shi, H.; Yang, J.; Hua, B.; Inniss, E.; Eichholz, T. Rapid Simultaneous Analysis of 17 Haloacetic Acids and Related Halogenated Water Contaminants by High-Performance Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 6613–6622. DOI: [10.1007/s00216-016-9773-8](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9773-8).
- [51] Mädler, S.; Todd, A.; “Skip” Kingston, H. M.; Pamuku, M.; Sun, F.; Tat, C.; Tooley, R. J.; Switzer, T. A.; Furdul, V. I. Ultra-Trace Level Speciated Isotope Dilution Measurement of Cr(VI) Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry in Environmental Waters. *Talanta* **2016**, *156–157*, 104–111. DOI: [10.1016/j.talanta.2016.04.064](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.064).
- [52] Barron, L.; Paull, B. Simultaneous Determination of Trace Oxyhalides and Haloacetic Acids Using Suppressed Ion Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. *Talanta* **2006**, *69*, 621–630. DOI: [10.1016/j.talanta.2005.10.032](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.10.032).
- [53] Mädler, S.; Sun, F.; Tat, C.; Sudakova, N.; Drouin, P.; Tooley, R. J.; Reiner, E. J.; Switzer, T. A.; Dyer, R.; Kingston, H. M. S.; et al. Trace-Level Analysis of Hexavalent Chromium in Lake Sediment Samples Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Environ. Prot.* **2016**, *07*, 422–434. DOI: [10.4236/jep.2016.73037](https://doi.org/10.4236/jep.2016.73037).
- [54] Her, N.; Jeong, H.; Kim, J.; Yoon, Y. Occurrence of Perchlorate in Drinking Water and Seawater in South Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2011**, *61*, 166–172. DOI: [10.1007/s00244-010-9616-0](https://doi.org/10.1007/s00244-010-9616-0).

- [55] West, D. M.; Mu, R.; Gamagedara, S.; Ma, Y.; Adams, C.; Eichholz, T.; Burken, J. G.; Shi, H. Simultaneous Detection of Perchlorate and Bromate Using Rapid High-Performance Ion Exchange Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Perchlorate Removal in Drinking Water. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22*, 8594–8602. DOI: [10.1007/s11356-014-4028-8](https://doi.org/10.1007/s11356-014-4028-8).
- [56] Cui, L.; Liu, J.; Yan, X.; Hu, S. Identification of Metabolite Biomarkers for Gout Using Capillary Ion Chromatography with Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11737–11743. DOI: [10.1021/acs.analchem.7b03232](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03232).
- [57] Leblanc, Y.; Bihoreau, N.; Chevreux, G. Characterization of Human Serum Albumin Isoforms by Ion Exchange Chromatography Coupled on-Line to Native Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1095*, 87–93. DOI: [10.1016/j.jchromb.2018.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.014).
- [58] Kvitvang, H. F. N.; Kristiansen, K. A.; Bruheim, P. Assessment of Capillary Anion Exchange Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry for the Quantitative Profiling of the Phosphometabolome and Organic Acids in Biological Extracts. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1370*, 70–79. DOI: [10.1016/j.chroma.2014.10.029](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.029).
- [59] Stafnes, M. H.; Røst, L. M.; Bruheim, P. Improved Phosphometabolome Profiling Applying Isotope Dilution Strategy and Capillary Ion Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1083*, 278–283. DOI: [10.1016/j.jchromb.2018.02.004](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.004).
- [60] Valentín-Blasini, L.; Blount, B. C.; Delinsky, A. Quantification of Iodide and Sodium-Iodide Symporter Inhibitors in Human Urine Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1155*, 40–46. DOI: [10.1016/j.chroma.2007.04.014](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.014).
- [61] Zhong, Z.; Li, G.; Guo, L.; Yao, J.; Liu, Z.; Deng, J. Solid-Phase Extraction Based on Amino-Functionalized Graphene Oxide Nanocomposites for Analysis of Short-Chain Perfluorinated Alkyl Acids in Human Serum by Ion Chromatography Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2018**, *32*, e4223. DOI: [10.1002/bmc.4223](https://doi.org/10.1002/bmc.4223).
- [62] Wang, Z.; Lau, B. P.; Y.; Tague, B.; Sparling, M.; Forsyth, D. Determination of Perchlorate in Infant Formula by Isotope Dilution Ion Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. A* **2011**, *28*, 799–806. DOI: [10.1080/19440049.2010.521959](https://doi.org/10.1080/19440049.2010.521959).
- [63] Krynitsky, A. J.; Niemann, R. A.; Williams, A. D.; Hopper, M. L. Streamlined Sample Preparation Procedure for Determination of Perchlorate Anion in Foods by Ion chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *567*, 94–99. DOI: [10.1016/j.aca.2006.01.005](https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.005).
- [64] Aggrawal, M.; Rohrer, J. S. Selective and Sensitive Determination of Bromate in Bread by Ion Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1615*, 460765. DOI: [10.1016/j.chroma.2019.460765](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460765).
- [65] Cavalli, S.; Polesello, S.; Valsecchi, S. Chloride Interference in the Determination of Bromate in Drinking Water by Reagent Free Ion Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1085*, 42–46. DOI: [10.1016/j.chroma.2004.12.089](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.089).
- [66] Niu, Y.-M.; Liang, Y.; Liu, J.-Y.; Liu, J.-F. Highly Sensitive Determination of Dialkyl Phosphinate Acids in Environmental Samples by Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1394*, 26–35. DOI: [10.1016/j.chroma.2015.03.041](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.041).

### III.1.3 LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE POUR L'ANALYSE DE FLUIDES BIOLOGIQUES

Comme décrit dans la partie III.1.2 - « Biological analysis », plusieurs méthodes d'IC-MS permettant une étude de métabolites dans des matrices biologiques ont été décrites dans la littérature. On retrouve notamment l'analyse des cellules, des tissus, du sang mais également des fluides sécrétés naturellement comme l'urine et la salive. Chacune de ces matrices contient divers métabolites permettant la compréhension ou le suivi de différentes voies métaboliques.

Parmi les fluides biologiques, l'urine est l'un des plus faciles à collecter et l'un des plus riches en métabolites. Cette matrice contient également des métabolites provenant de différentes voies métaboliques, permettant une vue globale sur le fonctionnement de l'organisme biologique, à des concentrations relativement élevées par rapport à des matrices telles que le plasma<sup>[65]</sup>.

L'exemple le plus connu d'utilisation de l'urine pour un diagnostic est celui de la détection de l'hormone  $\beta$ -HCG ( $\beta$ -Human Chorionic Gonadotropin) pour la grossesse. Les métabolites de l'urine peuvent également permettre de suivre l'évolution d'une grossesse. En effet, Trivedi et Iles<sup>[66]</sup> ont établi le profil métabolique de la femme enceinte et ont déterminé une augmentation ou une diminution de la concentration de certains métabolites selon le semestre de la grossesse.

A l'heure où les recherches sur le domaine biopharmaceutique ont comme axe l'étude des matrices dont la collection est peu invasive<sup>[67-71]</sup>, l'urine est donc une matrice très prometteuse pour nombre de diagnostics. Ce fluide étant composé de 95% d'eau et contenant des sels et des métabolites principalement solubles dans l'eau, la préparation d'échantillon en est facilitée pour certaines méthodes analytiques. En revanche, en GC-MS, l'analyse de l'urine nécessite l'élimination de l'urée qui peut interférer avec la dérivation des métabolites et mener à une dérivation incomplète<sup>[72]</sup>. En HPLC-MS, la forte concentration en sels de l'urine peut entraîner une mauvaise répétabilité des injections, une suppression d'ion voire un colmatage du capillaire de la source ESI. Il est donc recommandé de diminuer la concentration par dilution ou simplement éliminer les sels par un dessalage (en ligne ou hors-ligne). Les métabolites contenus dans l'urine étant principalement des métabolites moyennement à hautement polaires, la dilution se fait dans un mélange d'eau et de solvants organiques comme l'acétonitrile (ACN) ou le méthanol. Pour éliminer les protéines pouvant être contenues dans l'urine, ces dernières sont précipitées dans le solvant organique ou éliminées par centrifugation<sup>[73]</sup>.

En chromatographie ionique, les sels étant retenus, il est possible d'optimiser un gradient d'élution de manière à les séparer des solutés étudiés et ainsi simplifier la préparation

de l'échantillon. De plus, la présence du suppresseur permet de remplacer le contre-ion des sels pour augmenter la volatilité de certains d'entre eux et limiter l'encrassement de la source ESI. Par exemple, la méthode développée par Valentín-Blasini *et al.*<sup>[74]</sup> a simplement nécessité une dilution par 10 de l'urine avec de l'eau. Cette méthode a permis l'analyse quantitative du nitrate, du thiocyanate, du perchlorate et de l'iodure dans l'urine grâce à l'ajout d'un mélange d'étalons internes pour compenser les effets matrices et ne pas altérer la quantification des composés d'intérêt.

Pourtant, la majorité des méthodes reportées jusqu'ici ont nécessité une extraction des composés de la matrice. Baygildiev *et al.*<sup>[75]</sup> ont notamment développé une méthode permettant de détecter et quantifier l'acide méthylphosphonique dans l'urine de rat. Les échantillons d'urine ont été décongelés, mélangés et centrifugés. Le surnageant a été récupéré et filtré et enfin dilué avant l'analyse menée par IC-MS/MS. Cette méthode a permis de détecter le composé d'intérêt à une concentration de 4 ng/mL. Sun *et al.*<sup>[76]</sup> ont analysé de l'urine et du sérum humain en IC-MS. La préparation d'échantillon était identique pour les deux fluides biologiques : l'échantillon a été dilué dans un mélange d'eau et de méthanol contenant un étalon interne (l'acide hippurique d5) et l'extraction a ensuite été réalisée sur un système automatisé permettant d'éliminer les protéines avant une seconde dilution. Les échantillons d'urine ont davantage été dilués que les échantillons de sérum en raison de la forte contamination croisée qu'induit l'urine. L'analyse non-ciblée de l'urine avec cette préparation d'échantillon a conduit à l'identification de 62 métabolites présents en forte concentration dans l'urine contre 4 dans le sérum.

La concentration des composés de l'urine étant dépendante du volume d'urine excrété par l'individu, il est commun de normaliser les analyses par rapport à la concentration de la créatinine<sup>[73]</sup>. En revanche, au vu de sa structure, la créatinine n'est pas retenue en chromatographie d'échange d'anions et n'est donc pas utilisée pour la normalisation dans ces conditions<sup>[75, 76]</sup>.

Le couplage IC-MS étant maintenant facilité, la chromatographie ionique peut jouer un rôle important dans l'étude métabolomique et plus particulièrement pour l'analyse de métabolites polaires. De plus, elle semble adaptée à l'analyse de composés dans les fluides biologiques tels que l'urine et la salive avec un minimum de préparation d'échantillon.

Une méthode IC-MS pour la séparation et la détection de métabolites primaires polaires et ionisés a donc été optimisée et appliquée à l'analyse d'échantillons d'urine et de salive avec une simple dilution. La sensibilité et la répétabilité de cette méthode ont été étudiées sur l'analyse de l'urine avec un analyseur simple quadripôle pour évaluer la pertinence de cette

méthode dans le cadre d'une analyse de routine. Cette méthode ne permettant pas la détection de tous les composés, des hypothèses sur ces problèmes de détection ont été proposées et des solutions, comme la modification chimique du suppresseur, ont été envisagées. Enfin, cette méthode a été transposée au format capillaire afin d'estimer les performances de ce format pour l'analyse de fluides biologiques en routine.

### III.2. LES METABOLITES PRIMAIRES ETUDIES

L'Université de Genève est à l'initiative d'une étude de développement des techniques de séparation orthogonales à la RP-HPLC pour l'analyse des métabolites polaires. Ainsi, la rétention de ces composés a été étudiée en HILIC, EC et SFC<sup>[57]</sup>. L'objectif de cette étude est donc la séparation d'une liste de métabolites polaires et ionisables dont la séparation ne s'est pas montrée satisfaisante avec les 3 techniques énoncées ci-dessus par IC-MS. La liste de ces composés, leur formule brute, formule développée, rôle biologique connu, masse exacte et log P sont présentés dans le Tableau 4.

Ces composés sont séparés en deux catégories distinctes : les petits acides (●) et les composés phosphatés (●). Ces métabolites appartiennent à différentes classes de molécules et possèdent des masses et des polarités variées (Figure 14). Parmi ces composés, 5 (choline, acétylcholine, lauroylcarnitine, spermidine et putrescine) ne sont pas sous forme anionique dans les conditions de chromatographie d'échange d'anions et ne pourront donc pas être séparés avec la méthode développée. Ces composés pourraient cependant être correctement séparés avec une méthode de chromatographie d'échange de cations. La présente étude portera donc sur les 47 autres composés.

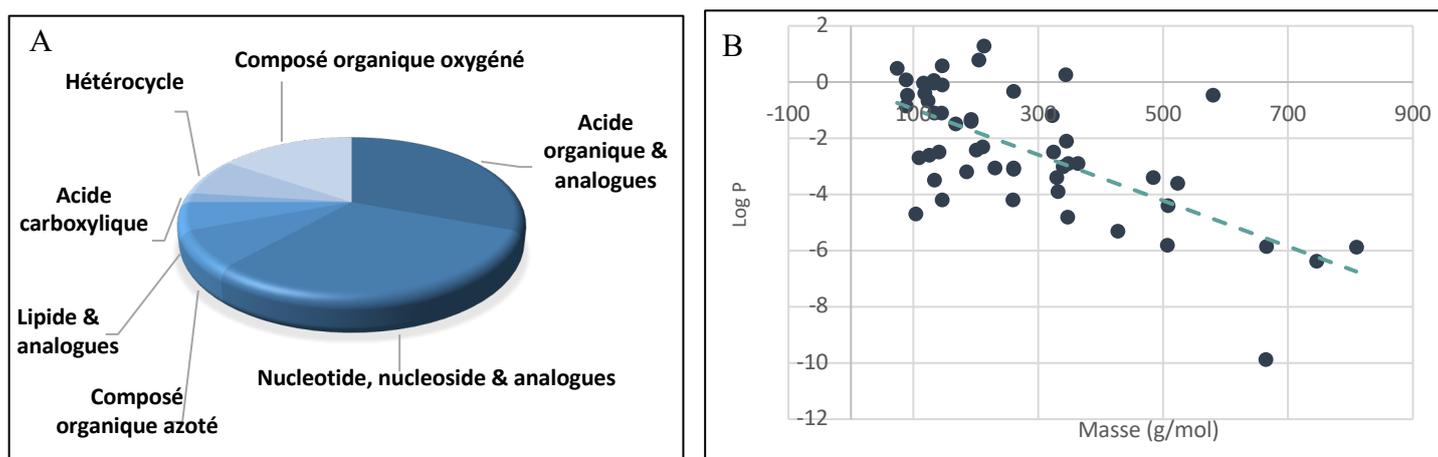
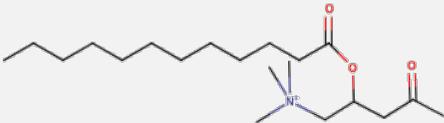
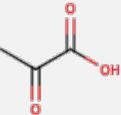
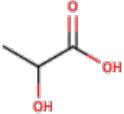
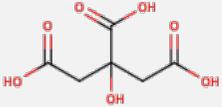
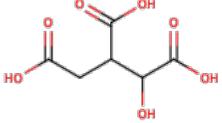
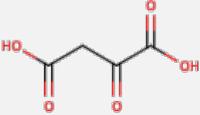
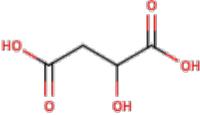
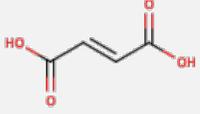
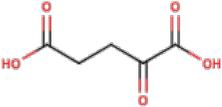
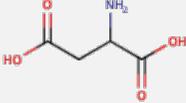
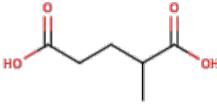
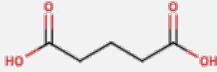
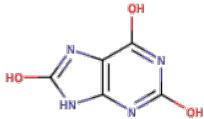
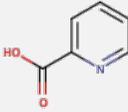
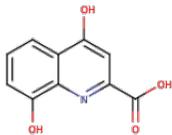
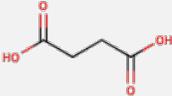


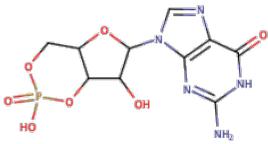
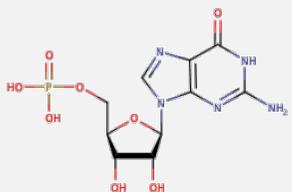
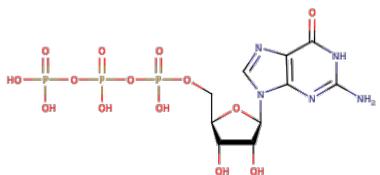
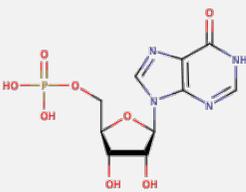
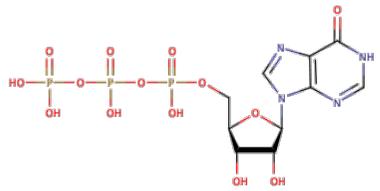
Figure 14 : Classes de composés des métabolites (A) et répartition de ces métabolites selon leur masse et leur polarité (B)

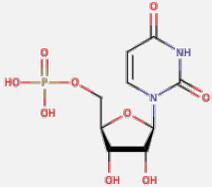
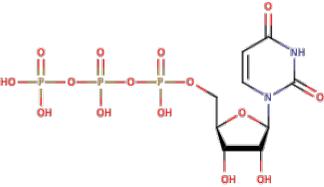
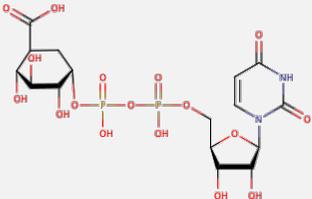
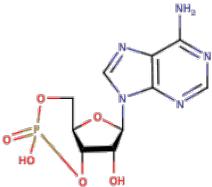
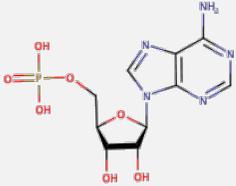
Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des métabolites étudiés selon HMDB (Human Metabolome Data Base)<sup>[77]</sup>

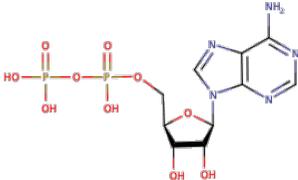
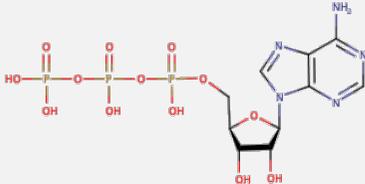
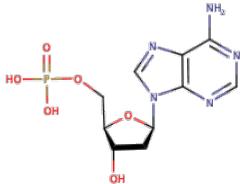
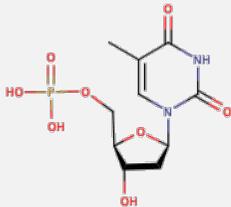
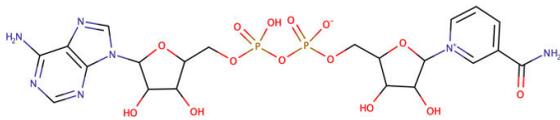
Métabolite	Formule brute	Formule développée	Rôle biologique connu	Masse mono-isotopique (Da)	LogP
●Choline	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO		Vitamine	104,1075	-4,7
●Acetylcholine	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>		Neurotransmetteur	146,1175	-4,2
●Lauroylcarnitine	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>4</sub>		Transporte les acides organiques et les acides gras	343,2722	0,26
●Spermidine	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>		Participe à certaines réactions enzymatiques	145,1579	-1,1
●Putrescine	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>		Produit par la dégradation des acides aminés dans les organismes	88,1000	-0,85
●Acide propionique (PRO)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		Produit final de la digestion microbienne des glucides	74,0368	0,48
●Acide pyruvique (PYR)	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		Intermédiaire dans les voies métaboliques du glucide, des protéines et des acides gras.	88,0160	0,07

●Acide lactique (LAC)	$C_3H_6O_3$		Produit dans les muscles durant l'activité physique	90,0317	-0,47
●Acide citrique (CIT)	$C_6H_8O_7$		Impliqué dans le cycle de Krebs	192,0270	-1,32
●Acide isocitrique (ISO)	$C_6H_8O_7$		Impliqué dans le cycle de Krebs	192,0270	-1,4
●Acide oxaloacétique (OXA)	$C_4H_4O_5$		Impliqué dans le cycle de Krebs	132,0059	-0,04
●Acide malique (MAL)	$C_4H_6O_5$		Impliqué dans le cycle de Krebs	134,0215	-1,11
●Acide fumarique (FUM)	$C_4H_4O_4$		Impliqué dans le cycle de Krebs	116,0109	-0,04
●Acide oxoglutarique (OXO)	$C_5H_6O_5$		Impliqué dans le cycle de Krebs	146,0215	-0,11

●Acide aspartique (ASP)	$C_4H_7NO_4$		Acide aminé impliqué dans le cycle de l'urée, neurotransmetteur et participe à la glycogénèse.	133,0375	-3,5
●Acide methyl-2-glutarique (2MET-GLU)	$C_6H_{10}O_4$		/	146,0579	0,59
●Acide glutarique (GLU)	$C_5H_8O_4$		Impliqué dans le métabolisme de certains acides aminés	132,0423	0,05
●Acide urique (URA)	$C_5H_4N_4O_3$		Impliqué dans le métabolisme de la purine	168,0283	-1,5
●Acide 2-picolinique (PIC)	$C_6H_5NO_2$		Impliqué dans le catabolisme du tryptophane	123,0320	-0,67
●Acide xanthurénique (XAN)	$C_{10}H_7NO_4$		Impliqué dans le métabolisme du tryptophane	205,0375	0,78
●Acide succinique (SUC)	$C_4H_6O_4$		Impliqué dans le cycle de Krebs	118,0266	-0,4

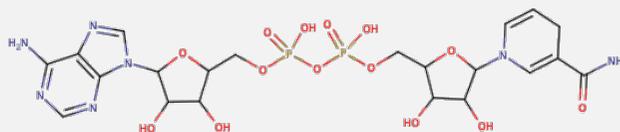
●Guanosine monophosphate cyclique (GMPc)	$C_{10}H_{12}N_5O_7P$		Impliqué dans le fonctionnement des canaux ioniques	345,0474	-2,1
●Guanosine monophosphate (GMP)	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$		Nucléotide dans l'ARN	363,0580	-2,9
●Guanosine triphosphate (GTP)	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$		Nucléotide dans l'ARN	522,9907	-3,6
●Inosine monophosphate (IMP)	$C_{10}H_{13}N_4O_8P$		Nucléotide	348,0471	-2,9
●Inosine triphosphate (ITP)	$C_{10}H_{15}N_4O_{14}P_3$		Intermédiaire dans le métabolisme de la purine	507,9798	-4,4

<ul style="list-style-type: none"> <li>● Uridine monophosphate (UMP)</li> </ul>	$C_9H_{13}N_2O_9P$ 	Nucléotide dans l'ARN	324,0359	-2,5
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Uridine triphosphate (UTP)</li> </ul>	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$ 	Nucléotide dans l'ARN	483,9685	-3,4
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique (UDP-GlcA)</li> </ul>	$C_{15}H_{22}N_2O_{18}P_2$ 	Nucléotide impliqué dans la biosynthèse des polysaccharides	580,0343	-0,47
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Adénosine monophosphate cyclique (AMPc)</li> </ul>	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$ 	Méiateur de l'activité de certaines hormones	329,0525	-3,39
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Adénosine monophosphate (AMP)</li> </ul>	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$ 	Nucléotide dans l'ARN	347,0631	-4,8

● Adénosine diphosphate (ADP)	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$		Nucléotide impliqué dans la synthèse de l'ATP.	427,0294	-5,3
● Adénosine triphosphate (ATP)	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$		Nucléotide impliqué dans le cycle de Krebs et participant à l'équilibre énergétique.	506,9957	-5,8
● Désoxyadénosine monophosphate (dAMP)	$C_{10}H_{14}N_5O_6P$		Monomère constituant l'ADN	331,0682	-3,9
● Thymidine monophosphate (TMP)	$C_{10}H_{15}N_2O_8P$		Monomère constituant l'ADN	322,0566	-1,2
● β-Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD <sup>+</sup> )	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$		Coenzyme impliquée dans le cycle de Krebs et utilisé comme oxydant dans les réactions du métabolisme	663,1991	-9,87

●β-Nicotinamide  
adénine dinucléotide  
réduite  
(NADH)

C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>



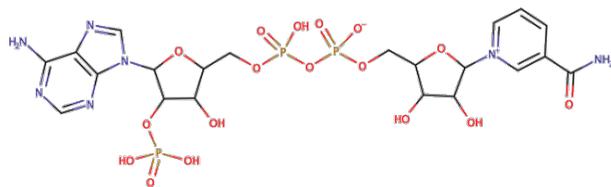
Coenzyme impliquée dans le cycle  
de Krebs et utilisée comme réducteur  
dans les réactions du métabolisme

665,1248

-5,86

●β-Nicotinamide  
adénine dinucléotide  
phosphate  
(NADP<sup>+</sup>)

C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>



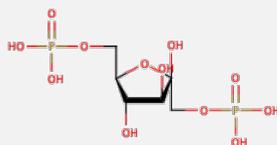
Coenzyme utilisée comme  
réducteur ou oxydant dans les  
réactions du métabolisme

743,0754

-6,38

●Fructose  
bisphosphate  
(F-1,6-BP)

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>12</sub>P<sub>2</sub>



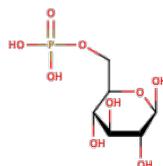
Impliqué dans la voie  
métabolique de la glycolyse

339,9961

-3,01

●Glucose 6-phosphate  
(G6P)

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>9</sub>P



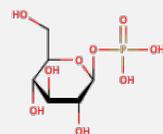
Impliqué dans la glycogénèse

260,0297

-3,06

●Glucose 1-phosphate  
(G1P)

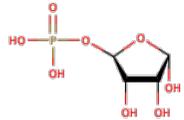
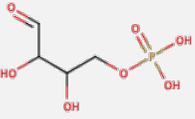
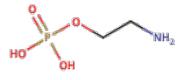
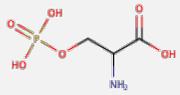
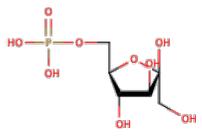
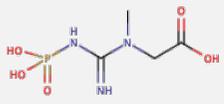
C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>9</sub>P



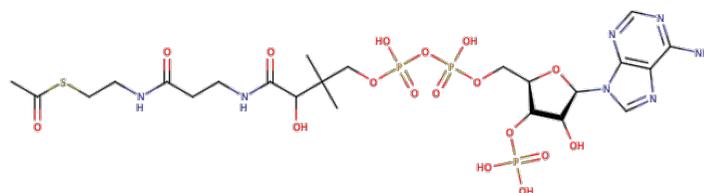
Impliqué dans la glycogénèse  
et associé à l'UTP pour former  
de l'UDP-glucose.

260,0297

-3,1

●D-Ribose 5-phosphate (R5P)	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> P		Impliqué dans le métabolisme de la purine	230,0192	-3,06
●Érythrose 4-phosphate (E4P)	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> P		Participe à certaines réactions enzymatiques	200,0086	-2,43
●Phosphoéthanolamine (PEA)	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> P		Participes à certaines réactions enzymatiques	141,0191	-2,5
●Phosphoserine (pSer)	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>6</sub> P		Présent dans de nombreuses protéines	185,0089	-3,2
●Fructose 6-phosphate (F6P)	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P		Formé à partir du glucose dans la glycolyse	260,0297	-0,34
●Phosphocréatine (PCr)	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> P		Sert de réserve rapidement mobilisable de phosphate dans le muscle	211,0358	-2,3

● Acétyl coenzyme A  
(Acétyl-CoA)

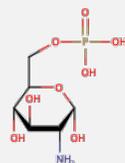


Impliqué dans le cycle de Krebs

809,1258

-5,88

● Glucosamine 6-phosphate  
(GlcN6P)

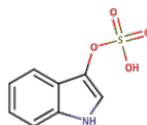


Précurseur des biosynthèses des osamines

259,0457

-4,2

● Indoxyl sulfate  
(I3S)

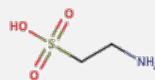


Agit comme une cardiotoxine et une toxine urémique

213,0096

1,29

● Taurine  
(TAU)

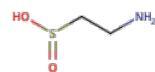


Sert de neurotransmetteur dans le cerveau et de stabilisateur des membranes cellulaires

125,0147

-2,6

● Hypotaurine  
(HYP)



Participe à certaines réactions enzymatiques

109,0197

-2,7

### III.3. OPTIMISATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE IC-MS

L'optimisation a été effectuée sur un couplage IC-MS/MS avec un analyseur triple quadripôle acquis par le laboratoire dans le cadre d'un « seed unit » avec Thermofisher Scientific. Dans l'optique d'estimer les performances d'une méthode de routine pour l'analyse de fluides biologiques et le laboratoire ayant fait l'acquisition d'un couplage IC-MS avec un analyseur simple quadripôle, l'étude a été finalisée sur cet appareil. En effet, l'analyseur simple quadripôle est moins sensible que le triple quadripôle mais plus accessible financièrement et est donc l'analyseur le plus répandu en laboratoire.

#### III.3.1 OPTIMISATION DE LA METHODE IC-MS SUR UN COUPLAGE AVEC UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLE

Les composés ayant dans un premier temps été séparés en deux groupes distincts : les 28 métabolites contenant un groupement phosphate et les 19 petits acides organiques, seule l'optimisation pour les métabolites phosphatés sera présentée ici. L'optimisation de la séparation pour les acides organiques a été effectuée en partie par la post-doctorante Adeline Clergé et a fait l'objet de la rédaction d'une publication présentée en partie III.4.

L'optimisation a été effectuée sur un système IC Dionex ICS3000 couplé à un spectromètre Thermofisher Scientific TSQ Quantiva équipé d'une source ESI (Annexe 1). Le montage de ce couplage est présenté en Figure 15.

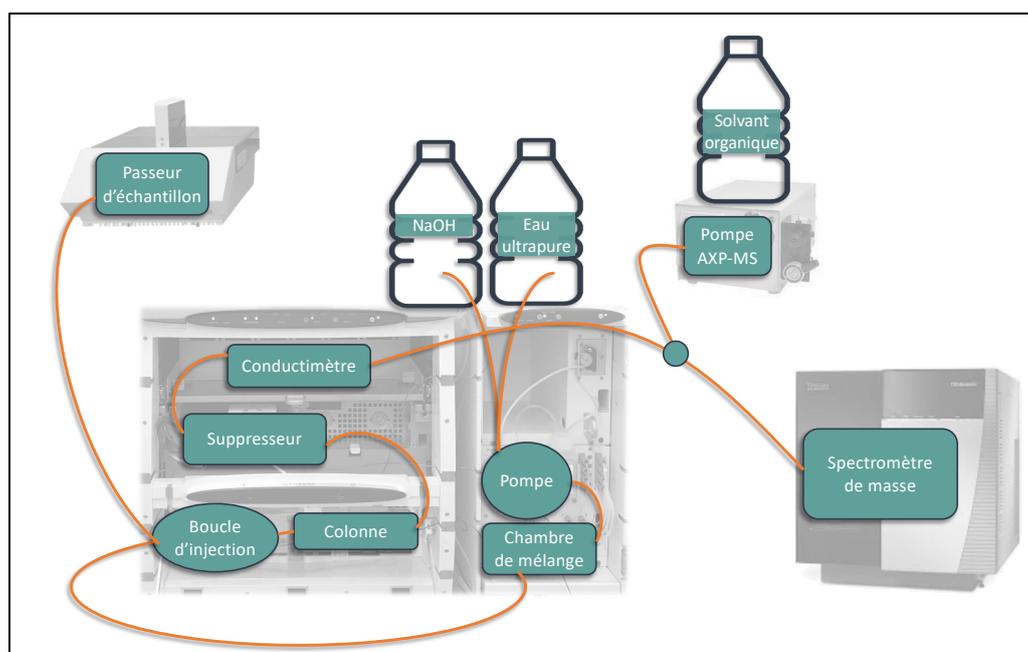


Figure 15 : Schéma du couplage IC-MS

Chaque composé est infusé en spectrométrie de masse afin d'obtenir le rapport  $m/z$  de l'ion précurseur, les débits de gaz et l'énergie d'ionisation optimale pour la détection de chaque

composé. Ces données sont rassemblées dans le Tableau 5. Chaque paramètre est considéré comme optimal lorsque l'intensité du rapport  $m/z$  obtenu est le plus intense et le plus stable possible. Cette dernière donnée est déterminée avec les coefficients de variation calculés sur l'intensité du rapport  $m/z$ . Pour optimiser tous ces paramètres, les composés ont été préparés individuellement à une concentration d'environ 1 000  $\mu\text{g/L}$  dans un mélange de solvants correspondant aux conditions d'analyse. La PM neutralisée a donc été récupérée en sortie du système et un solvant « make-up » a été ajouté dans des proportions 70/30 v/v PM/ACN. Les composés ont ensuite été infusés à l'aide d'un pousse seringue à 0,4 mL/min correspondant au débit d'éluant ajouté au débit de solvant « make-up » utilisé pour les premiers essais.

Les transitions ainsi optimisées ont été utilisées pour la méthode en mode SRM avec l'analyseur triple quadripôle. Les paramètres de la source ont été moyennés pour déterminer les paramètres de la méthode. L'énergie d'ionisation retenue est de -2800 V, le gaz auxiliaire, le gaz de gainage et le gaz de balayage sont fixés à 10, 29 et 1,5 arb respectivement.

La résolution des deux quadripôles et la température de vaporisation ont également été étudiés. Les résolutions ont été fixées à des valeurs de 0,7 ; 1,2 et 2 et la température de vaporisation à des valeurs de 150, 100 et 50°C. Des résolutions de 1,2 pour Q1 et Q2 et une température de vaporisation de 150°C ont conduit à l'obtention des signaux les plus intenses en spectrométrie de masse (Annexe 1).

### III.3.1.1 Choix de la phase stationnaire

La colonne a été choisie sur la base de l'étude de la rétention de 4 colonnes au format capillaire présentée dans l'Article I. Lors de cette étude, il a été conclu que la colonne AS11-HC semblait être la plus appropriée à notre application. En effet, cette colonne de haute capacité permet l'injection d'échantillons chargés en sels avec un minimum de préparation d'échantillon et ainsi, une meilleure séparation des interférents d'un mélange complexe.

La séparation obtenue pour un mélange de solutés préparés dans l'eau sur cette colonne, dans les premières conditions chromatographiques établies, est présentée en Figure 16 . Ce premier gradient choisi est un gradient linéaire partant de 5 mM de NaOH et allant jusqu'à 100 mM de NaOH, concentration maximale recommandée pour l'utilisation optimale du suppresseur, en 30 min pendant 10 min avant une période d'équilibration de 10 min à 5 mM. Le débit d'analyse est fixé à 0,3 mL/min et le courant de suppression imposé est de 75 mA.

Tableau 5 : Paramètres du spectromètre de masse optimisés pour chaque composé phosphaté

Métabolite	Ion précurseur		Ion produits ( <i>m/z</i> )	Énergie de collision (V)	Énergie d'ionisation (V)	Gaz auxiliaire (arb)	Gaz de gainage (arb)	Gaz de balayage (arb)
	Masse ( <i>m/z</i> )	Forme						
GMPc	344,150	[M-H] <sup>-</sup>	133,14 150,10	36 25	-3100	11	15	1
GMP	362,070	[M-H] <sup>-</sup>	133,00 150,00	41 30	-3000	5	35	2
GTP	521,975	[M-H] <sup>-</sup>	133,05 150,03	53 40	-2900	7	20	1
IMP	347,100	[M-H] <sup>-</sup>	135,10	30	-3000	50	15	3
ITP	506,950	[M-H] <sup>-</sup>	210,88	18	-1900	5	20	1
UMP	323,100	[M-H] <sup>-</sup>	210,98 280,00	17 16	-3500	5	35	1
UTP	482,925	[M-H] <sup>-</sup>	403,00 385,00	25 21	-3000	15	25	1
UDP-GlcA	579,075	[M-H] <sup>-</sup>	408,05 426,03	22 27	-3500	5	35	1
AMPc	328,125	[M-H] <sup>-</sup>	107,08 134,05	5 26	-2900	7	25	2
AMP	346,075	[M-H] <sup>-</sup>	134,15 211,08	33 18	-3400	5	50	4
ADP	426,100	[M-H] <sup>-</sup>	328,05 408,03	18 20	-2900	9	10	1
ATP	506,025	[M-H] <sup>-</sup>	408,05 426,03	22 27	-2300	23	50	1
dAMP	330,080	[M-H] <sup>-</sup>	194,98 177,00	18 19	-3100	15	15	3
TMP	321,040	[M-H] <sup>-</sup>	125,40 195,28	24 18	-2900	5	50	3
NAD <sup>+</sup>	662,180	[M-H] <sup>-</sup>	328,08 540,05	34 18	-2750	10	10	1
NADH	664,100	[M-H] <sup>-</sup>	397,07 346,04	32 33	-2600	5	15	1

NADP <sup>+</sup>	742,080	[M-H] <sup>-</sup>	408,03	34	-2700	7	15	1
			620,05	18				
F-1,6-BP	339,025	[M-H] <sup>-</sup>	176,95	19	-2800	15	35	1
			241,15	15				
G6P	259,000	[M-H] <sup>-</sup>	168,95	11	-3300	25	30	3
			199,00	11				
G1P	259,000	[M-H] <sup>-</sup>	138,98	17	-3000	23	30	1
			240,95	13				
R5P	229,040	[M-H] <sup>-</sup>	96,95	16	-2900	5	30	2
			138,98	16				
E4P	199,010	[M-H] <sup>-</sup>	78,95	32	-2900	5	30	1
			97,00	11				
PEA	140,020	[M-H] <sup>-</sup>	62,98	56	-2900	15	20	1
			73,95	19				
pSer	184,190	[M-H] <sup>-</sup>	62,98	59	-3300	5	45	1
			78,95	34				
F6P	259,150	[M-H] <sup>-</sup>	71,00	31	-3500	5	35	1
			97,03	18				
PCr	210,240	[M-H] <sup>-</sup>	103,03	17	-2800	11	35	1
			191,83	5				
Acétyl-CoA	403,655	[M-2H] <sup>2-</sup>	133,94	32	-3500	7	10	2
			79,02	24				
GlcN6P	258,250	[M-H] <sup>-</sup>	198,96	12	-2900	7	30	1
			239,98	12				

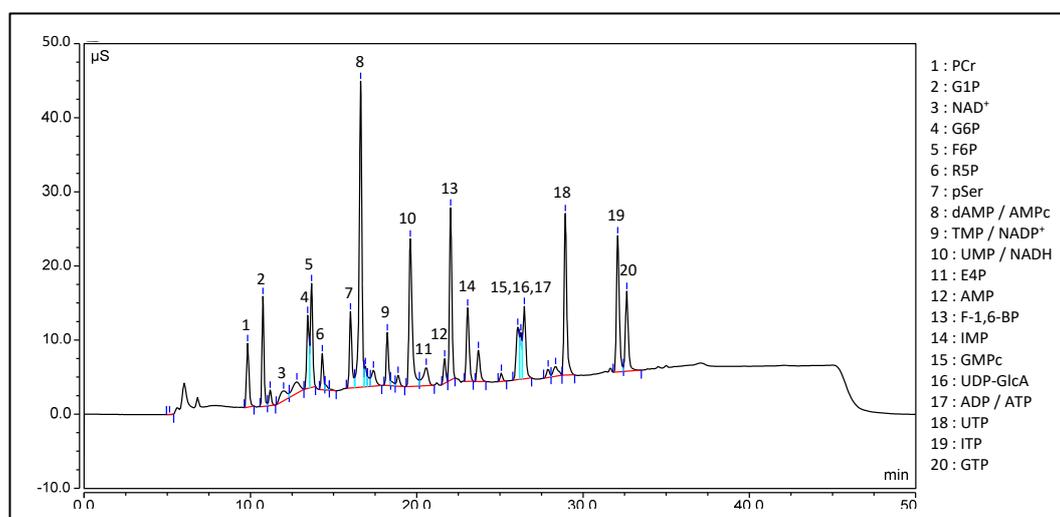


Figure 16 : Chromatogramme obtenu pour l'analyse d'un mélange d'étalons de métabolites dans l'eau sur la colonne AS11-HC (détection conductimétrique)

### III.3.1.1 Le couplage IC-MS

Comme décrit dans la partie III.1.2, le couplage de la chromatographie ionique à la spectrométrie de masse n'est pas trivial en raison de la nature de la PM non compatible. Avec l'apparition du suppresseur, la PM étant neutralisée, le couplage IC-MS s'est considérablement développé. Cependant, plusieurs optimisations sont nécessaires et la principale réside dans l'ajout d'un solvant « make-up ». Ce solvant organique ajouté avant l'entrée dans la source du spectromètre de masse permet de favoriser la désolvatation et donc l'ionisation et de stabiliser le spray formé. En revanche, l'ajout d'un débit supplémentaire entraîne une dilution de l'échantillon et une contre-pression supplémentaire. Cette contre-pression peut être problématique car elle peut endommager le suppresseur.

Deux solvants organiques, miscibles avec l'eau, sont comparés en termes de stabilité de spray (coefficients de variation (CV%) calculés sur l'aire du signal en MS) et d'efficacité de désolvatation (aire du pic sur le chromatogramme d'ion extraits (EIC)) : l'ACN et le méthanol (MeOH). L'isopropanol peut également être utilisé<sup>[78-80]</sup> mais sa viscosité étant plus importante que les deux autres solvants, le risque d'endommager le suppresseur est accru. Il a été décidé de ne pas l'utiliser dans ces travaux.

L'optimisation est faite avec un mélange de métabolites phosphatés à environ 10 mg/L à un débit de solvant « make-up » de 0,1 mL/min sur 4 répliques. Dans un souci de représentation graphique, les données sont normalisées par rapport à l'intensité la plus forte pour chaque composé et présentées en Figure 17. Les barres d'erreur de la figure représentent le CV% calculé sur l'intensité du pic EIC obtenu sur 4 injections.

Le signal obtenu pour l'Acétyl-CoA étant inexploitable, aucune donnée pour ce composé n'est présentée dans la Figure 17. Concernant le PCr, les intensités n'étant pas stables, ce composé ne sera pas conservé pour la suite de l'étude. Les signaux mesurés avec le méthanol comme solvant « make-up » sont plus intenses pour la majorité des composés (20/27 composés) alors qu'un signal plus stable pour tous les composés, sauf la GMP, est mesuré avec l'ACN.

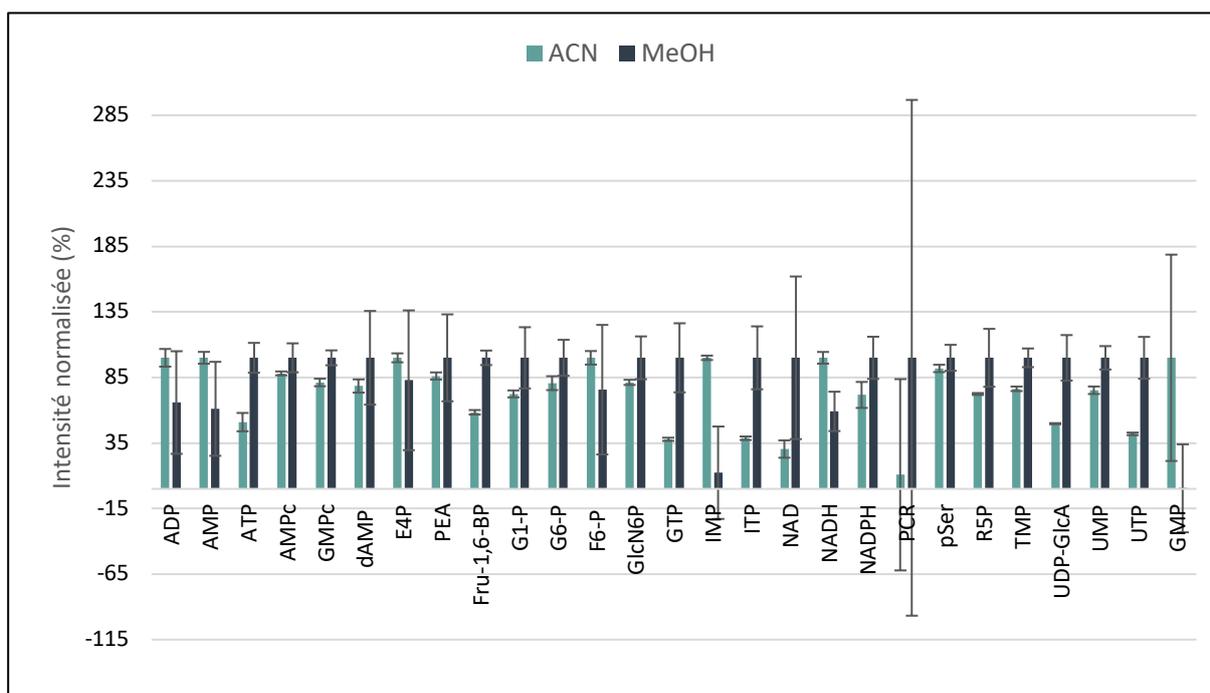


Figure 17 : Comparaison des intensités normalisées du signal en spectrométrie de masse et de la stabilité du spray (CV%) en fonction du solvant « make-up » utilisé

Il a été décidé de choisir le solvant organique en privilégiant la stabilité du spray par rapport à l'efficacité d'ionisation. L'ACN a donc été conservé pour la suite des analyses et différents débits ont été testés afin de déterminer le meilleur compromis entre une bonne désolvation, une faible contre-pression pour le suppresseur et un effet de dilution limité. Les rapports signal/bruit (S/B) des métabolites phosphatés ont été étudiés à plusieurs débits de solvant « make-up ». Comme détaillé dans la partie III.1.2 – « Make-up flow rate », dans la littérature, les débits de solvant utilisés sont généralement compris entre 26 et 50% du débit total entrant dans la source ESI (débit de solvant « make-up » + débit de PM). Les débits fixés sont donc de 0,1 et 0,15 mL/min pour un débit d'analyse de 0,3 mL/min. Les métabolites phosphatés, préparés à 10 mg/L dans l'eau, ont été analysés en deux répliques en utilisant la même méthode chromatographique. Les rapports S/B pour un échantillon représentatif des composés phosphatés analysés sont représentés en Figure 18.

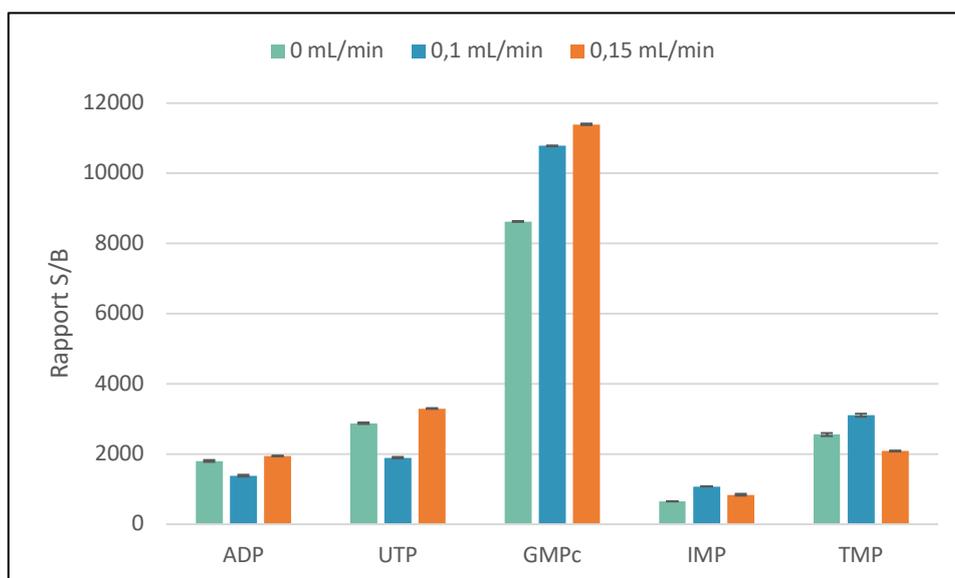


Figure 18 : Rapport S/B de 5 composés en fonction du débit d'ACN

Le débit de solvant « make-up » doit être optimisé pour obtenir le meilleur compromis entre une désolvation plus efficace et une dilution limitée de l'échantillon. Pour certains composés comme le GMPc, augmenter le débit de solvant organique permet d'augmenter la désolvation et donc l'intensité du signal. En revanche, pour des composés comme l'IMP et le TMP, l'intensité du signal augmente jusqu'à un débit optimal. Pour des débits supérieurs à celui-ci l'effet de la dilution devient trop important, entraînant une perte de signal. Pour d'autres composés comme l'ADP et l'UTP, l'inverse est observé.

De manière générale, pour la majorité des composés, le signal le plus intense est obtenu pour 0,15 mL/min de solvant organique pour un débit d'analyse de 0,3 mL/min soit un taux de solvant équivalent à 33% du débit total entrant dans la source ESI. Ce rapport a donc été conservé pour la suite des analyses. Il est à noter qu'un débit plus élevé de solvant « make-up » a également été testé. Ce débit a conduit à des rapports S/B supérieurs à ceux obtenus avec un débit de 0,15 mL/min. Cependant, la contre-pression générée est trop importante et peut entraîner la détérioration des membranes du suppresseur. Ce débit n'a donc pas été retenu pour la suite de l'étude.

### III.3.1.1 Étude de l'influence du pH sur la détection

Lors de l'utilisation d'un suppresseur électrolytique, le courant de suppression imposé au suppresseur est dépendant de la concentration en hydroxyde de sodium et du débit de la PM. Lors d'un gradient de concentration, le choix du courant à imposer doit être optimisé. Il est recommandé par Thermofisher Scientific de tenir compte de la concentration maximale en NaOH du gradient pour le calcul du courant de suppression pour obtenir une suppression efficace. Dans notre cas, un courant de suppression de 75 mA a été appliqué (pour une

concentration maximale de NaOH de 100 mM et un débit de 0,3 mL/min). Cependant, après vérification, le pH à la sortie du conductimètre est faiblement acide (pH 5,5) ce qui peut être indicateur d'une génération d'ions hydronium trop importante. Un courant inférieur a donc été imposé afin de tenter d'obtenir une PM neutralisée en sortie de suppresseur. Il a été décidé de calculer le courant de suppression à imposer à partir de la concentration moyenne en NaOH au cours du gradient. Un courant de suppression de 44 mA a donc été appliqué. Dans ces conditions, le bruit de fond a augmenté de manière considérable, altérant également l'ionisation en spectrométrie de masse et donc la sensibilité. Pour ces raisons, le courant de suppression de 75 mA est donc conservé.

Pour comprendre la rétention des composés au cours de la séparation et la forme des espèces détectées, il est important d'étudier leur état d'ionisation en fonction du pH à chaque étape. Il faut tout d'abord considérer le pH dans la colonne avec le gradient qui influence la rétention des solutés. Les concentrations en hydroxyde de sodium variant de 5 à 100 mM dans le gradient, le pH d'analyse des composés varie de 11,7 à 13,0. Il y a ensuite le pH après la suppression qui peut influencer la détection des composés. Comme expliqué précédemment, dans ces travaux, le pH après suppression est faiblement acide (pH 5,5). Avec l'ajout d'ACN avant l'entrée de la source, ce pH augmente jusqu'à un pH apparent de 6,6. Ce pH a été mesuré à l'aide d'une électrode pour les milieux non-aqueux InLab Science (Mettler Toledo, Pays-Bas). Cette variation de pH signifie que, selon leur pKa, certains composés pourraient changer d'état d'ionisation entre l'espèce éluée et celle qui entrera dans l'interface d'ionisation et, pour certains, être sous forme neutre. Le diagramme de prédominance de l'espèce en fonction du pH est tracé pour tous les métabolites phosphatés avec les pKa calculés par le logiciel MarvinSketch (Figure 19).

Sur la Figure 19, on peut constater que, comme attendu, au pH d'élution en chromatographie, tous les composés sont ionisés négativement. Ils sont donc tous théoriquement retenus sur la colonne. Concernant la détection conductimétrique, tous les composés semblent détectables sauf le GlcN6P et le PEA qui seraient majoritairement sous forme neutre avant la détection. Cette hypothèse est confirmée puisqu'aucun pic n'a été observé pour ces deux composés en conductimétrie ou sur l'EIC en MS.

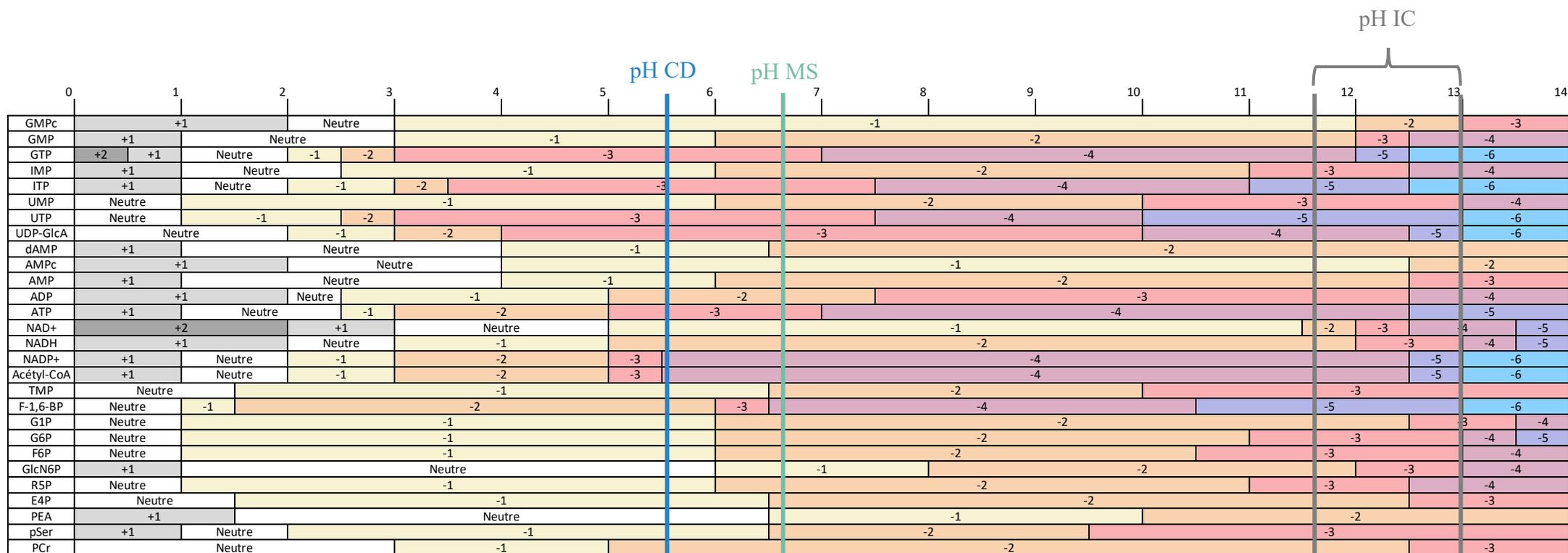


Figure 19 : Diagramme de prédominance des métabolites primaires phosphatés selon les pKa calculés avec MarvinSketch avec en gris la gamme de pH d'analyse imposée par le gradient (pH IC), en bleu le pH mesuré après la détection en conductimétrie (pH CD) et en vert celui obtenu avant la source d'ionisation et après ajout de l'ACN (pH MS).

Avant l'entrée dans la source ESI, au pH apparent de 6,6, les composés semblent tous chargés ce qui permet d'améliorer l'ionisation en ESI. Cependant, les composés étant dans un mélange de phase aqueuse et organique, les pKa peuvent varier. Ce résultat est donc à considérer avec précaution. Il a également été démontré que l'ionisation dans la source ESI est un processus compliqué. En dehors de la présence d'espèces préchargées, des réactions chimiques complexes, des transferts de charge entre le solvant et les solutés ainsi que la formation d'adduits peuvent entraîner un changement du rapport  $m/z$  du soluté<sup>[64]</sup>. Dans cette étude, les rapports  $m/z$  étant définis dans les conditions d'analyse, on peut observer que tous les composés sont ionisés sous la forme  $[M-H]^-$ , excepté pour l'Acétyl-CoA qui est dichargé.

Cependant, même si le pH n'a pas de sens propre en phase gazeuse, il a été déterminé que le pH de la PM en HPLC-MS peut exercer une influence sur l'ionisation en ESI<sup>[64, 81]</sup>. Afin d'étudier l'influence du pH sur l'ionisation des composés et ainsi déterminer s'il existait un pH optimal pour lequel on obtiendrait un signal d'intensité maximal pour chacun des composés, le pH a été contrôlé à l'aide d'additifs dans le solvant « make-up ». Selon les pKa, le pH optimal permettant d'obtenir une forme largement prédominante de chaque composé se situe vers 8,5 (pKa +/-2). Plusieurs pH plus basiques vont donc être testés afin de se rapprocher le plus possible de cette valeur. Une solution de pH contrôlé est préparée pour limiter la variation de pH à l'aide d'additifs compatibles avec la spectrométrie de masse. Les solutions « make-up » sont donc préparées à partir d'une solution de  $NH_4OH$  à 50 mM dans l'ACN avec un ajout d'acide acétique en quantité suffisante pour atteindre le pH souhaité. Une même quantité d'eau est ajoutée dans chaque solution préparée afin de prévenir la formation d'acétate d'ammonium. Le mode opératoire utilisé est décrit en Annexe 3.

Les résultats obtenus à pH 7 ; 8 ; 8,5 et 9 ont été comparés à une analyse avec une solution « make-up » sans additif à laquelle de l'eau ultrapure a été ajoutée pour correspondre au protocole de préparation des solutions avec additif. La même solution de métabolites primaires est analysée avec ces 5 solutions « make-up » avec une méthode Full Scan permettant de suivre les solutés quels que soient leur état d'ionisation ou les adduits formés. Les rapports  $m/z$  des composés sous toutes les formes possiblement présentes sont calculés. La stratégie adoptée est présentée avec l'exemple de l'ATP. Les rapports  $m/z$  de l'ATP pour les formes classiquement retrouvées en ionisation négative entre 100 et 800 Da sont calculés (Tableau 6). Les TIC (Total Ion Chromatogram) de l'ATP pour chaque solution « make-up » ont été comparés (Figure 20).

Tableau 6 : Valeurs des rapports  $m/z$  possiblement formés de l'ATP en ESI négatif.

Forme	$m/z$	Forme	$m/z$
[M-H] <sup>-</sup>	506,0	[M+K-2H] <sup>-</sup>	544,0
[M-2H] <sup>2-</sup>	252,5	[M+Hac*-H] <sup>-</sup>	566,0
[M-3H] <sup>3-</sup>	168,0	[M+ACN-H] <sup>-</sup>	547,0
[M-4H] <sup>4-</sup>	125,8	[M+Na-2H] <sup>-</sup>	528,0
[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	488,0	[M+Cl] <sup>-</sup>	542,0

\*Hac : Acide acétique

Sur la Figure 20, les mêmes rapports  $m/z$  sont observés à des proportions différentes selon le pH. Il est à noter que l'ion de  $m/z$  212,4 provient d'une contamination et n'est pas à prendre en compte dans les résultats. Concernant les rapports  $m/z$  observés, parmi les formes classiquement retrouvées en ESI négatif (Tableau 6), seule la forme [M-H]<sup>-</sup> est présente sur ces spectres. De plus, aucun autre rapport  $m/z$  n'est observé donc aucune nouvelle forme de l'ATP n'a été détectée avec l'ajout d'hydroxyde d'ammonium et d'acide acétique.

De manière générale, lorsqu'on observe les intensités des rapports  $m/z$ , on peut remarquer que l'ajout de sel dans la solution « make-up » diminue considérablement l'ionisation en spectrométrie de masse. Cette perte étant trop importante pour être compensée par l'obtention de la forme prédominante des tous les composés, le solvant « make-up » 100% ACN est conservé pour la suite.

### III.3.2 OPTIMISATION DE LA METHODE IC-MS SUR UN COUPLAGE AVEC UN ANALYSEUR SIMPLE QUADRIPOLE

Il a été décidé de développer une méthode de routine en poursuivant les études sur un analyseur simple quadripôle qui est un appareil dont les laboratoires sont plus facilement équipés, notamment en raison de son prix. La suite de cette étude est donc menée sur un couplage IC-MS avec un analyseur simple quadripôle (Annexe 4).

Tous les spectromètres de masse fournis par Thermofisher Scientific étant équipés de la même source ESI Ion Max, les paramètres précédemment optimisés restent valables sur ce nouveau couplage, ce que nous avons vérifié. Concernant le mode de balayage, les ions précurseurs déterminés lors de l'optimisation pour le mode SRM sont utilisés pour le mode SIM (partie I.3.2.2) du simple quadripôle.

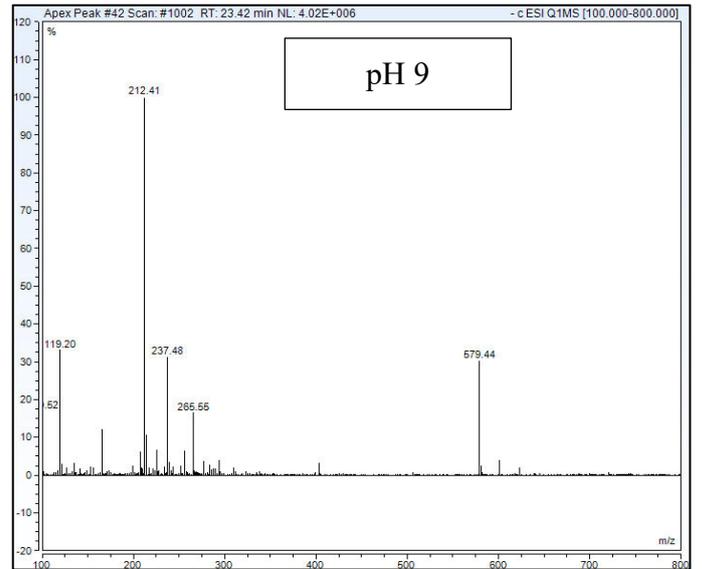
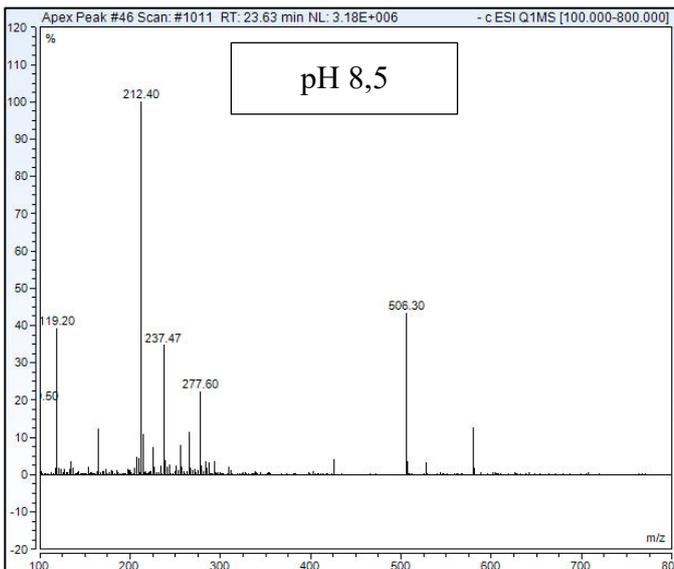
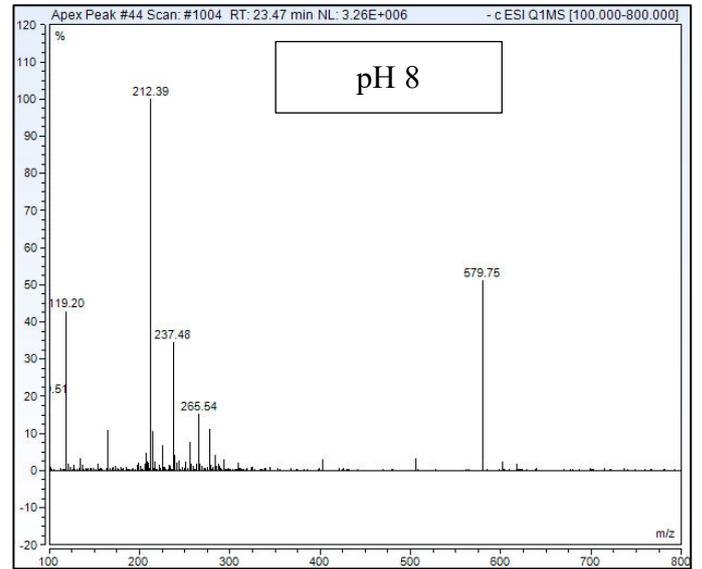
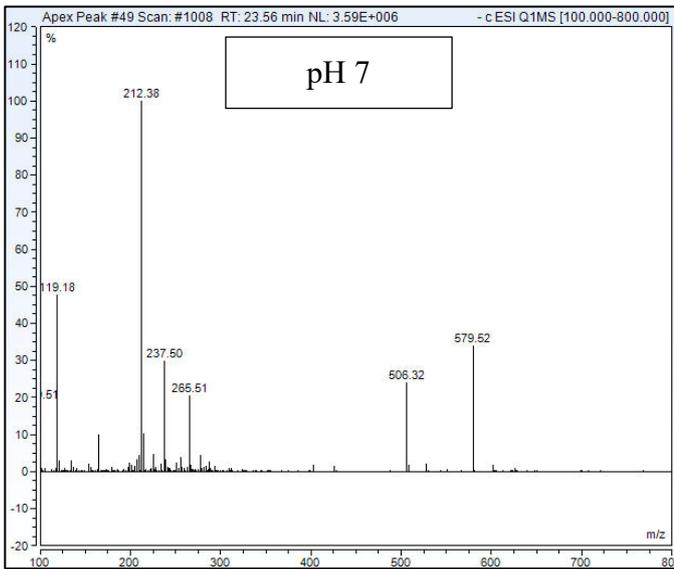
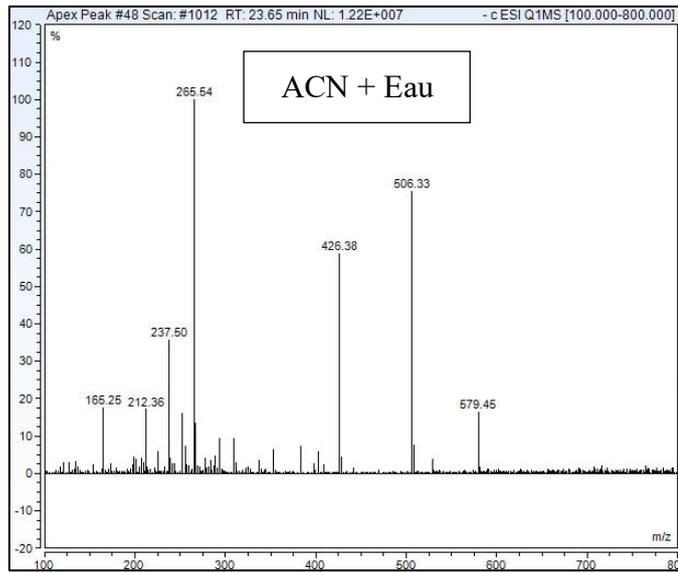


Figure 20 : Comparaison des TIC obtenus pour l'ACN avec l'ajout d'eau, le pH 7, le pH 8, le pH 8,5 et le pH 9

### III.3.2.1 Optimisation du gradient d'élution

Comme évoqué précédemment, les premiers essais de séparation ayant été menés sur un couplage avec un triple quadripôle, la sélectivité de cet analyseur était suffisante pour détecter tous les composés phosphatés individuellement. Il est à noter que pour la séparation des composés phosphatés en IC-MS, seuls le G1P, le G6P et le F6P, étant des molécules isobares possédant des ions produits identiques, ne pouvaient être séparés avec un tel analyseur sans séparation chromatographique.

Lorsque la méthode a été transposée sur le couplage avec le simple quadripôle, le manque de sélectivité du spectromètre de masse a entraîné la co-détection sur les EIC de plusieurs composés isobares ou de rapport  $m/z$  proches qu'il faudra impérativement séparer par chromatographie. En effet, le simple quadripôle détecte les composés dans une gamme de 1 Da ( $m/z - 0,5 < m/z \text{ sélectionné} < m/z + 0,5$ ). Les co-détectations théoriquement induites par ce changement d'analyseur sont répertoriées dans le Tableau 7 pour l'ensemble des composés (métabolites phosphatés et petits acides organiques).

Tableau 7 : Groupes de composés co-détectés en IC-MS avec un analyseur simple quadripôle

Groupes de composés	Gamme de $m/z$	Composés
1	258,50-259,50	G1P
	258,50-259,50	G6P
	258,60-259,60	F6P
	257,75-258,75	GlcN6P
2	190,50-191,50	CIT
	190,50-191,50	ISO
3	144,53-145,53	2MET-GLU
	144,50-145,50	OXO
4	130,50-131,50	GLU
	130,58-131,58	OXA

Une modification du gradient d'élution doit donc permettre de séparer ces groupes de composés. Plusieurs gradients et débits d'analyse ont été testés et comparés afin de trouver le meilleur compromis pour la séparation de ces solutés. Certains d'entre eux sont présentés en Annexe 5 et la séparation des 4 groupes de composés pour chacun d'entre eux est présentée en Figure 21.

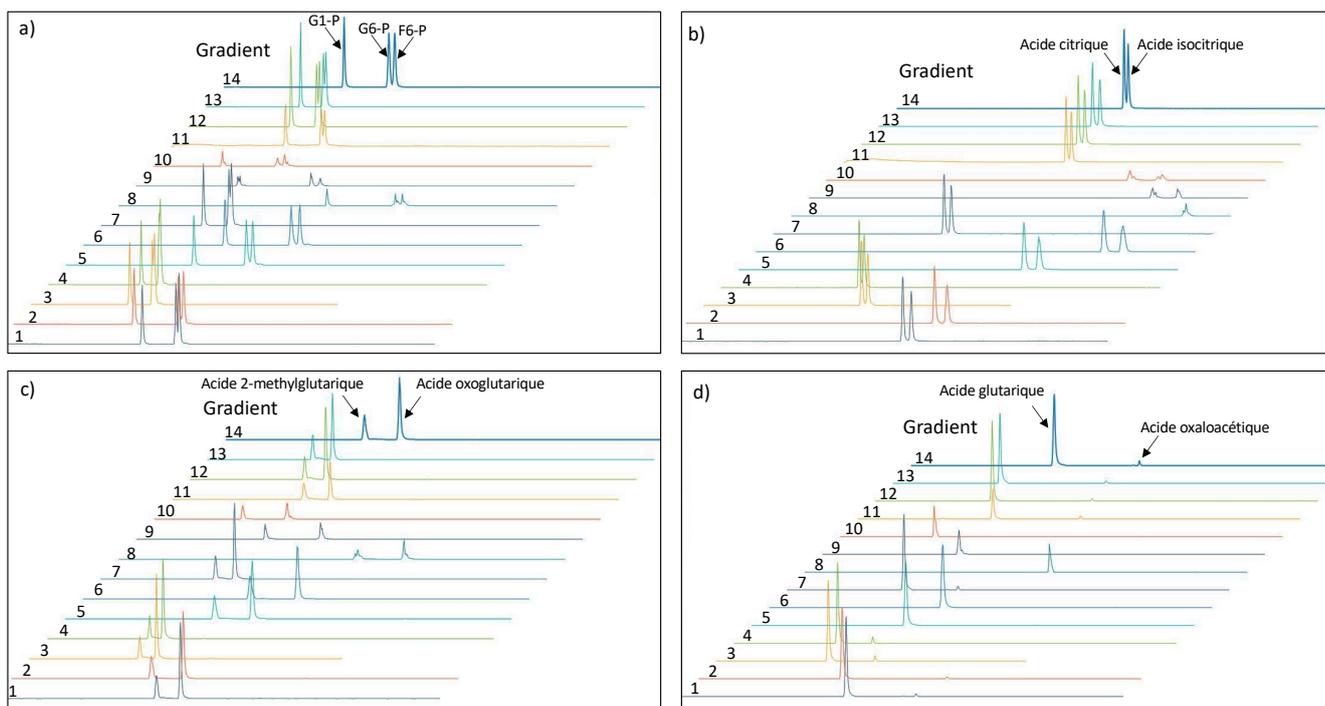


Figure 21 : EIC obtenus pour les 4 groupes de composés co-détectés avec différents gradients imposés. a) Groupe 1 : G1P; G6P et F6P b) Groupe 2 : CIT et ISO c) Groupe 3 : 2MET-GLU et OXO d) Groupe 4 : GLU et OXA

Parmi ces composés, la GlcN6P n'est pas détectée en raison de sa forme neutre au pH de détection du conductimètre. Le meilleur compromis pour la séparation de ces 4 groupes de composés et l'élution complète des autres composés dans un temps ne dépassant pas les 50 minutes a été obtenu avec le gradient 14. Les paramètres de chromatographie retenus sont donc les suivants :

Débit : 0,2 mL/min

Température : 21°C

Courant de suppression : 35 mA

Gradient :

Temps (min)	[NaOH] (en mM)
0,0	5
10,0	20
15,0	20
20,0	60
40,0	70
40,1	5
50,0	5

### III.3.2.1 Suppresseur

Comme expliqué précédemment, le supprimeur AERS 500e a spécialement été conçu pour mieux résister aux pressions induites par le couplage à la spectrométrie de masse. Lors de l'utilisation d'un gradient, bien que la concentration en  $[OH^-]$  varie au cours de l'analyse, le courant de suppression est maintenu constant à une valeur calculée pour la concentration la plus forte. Un supprimeur adapté à l'utilisation d'un gradient a récemment été développé par Thermofisher Scientific: l'ADRS 600. Ce supprimeur à régénération dynamique permet de travailler à courant constant comme l'AERS 500e ou à tension constante. Ce dernier mode permet d'adapter le courant au cours de l'analyse et donc de réduire la dérive de la ligne de base induite par un gradient améliorant ainsi le rapport signal/bruit. Le mode tension constante a été comparé au mode courant constant afin d'étudier l'intérêt d'un tel système pour nos analyses (Figure 22).

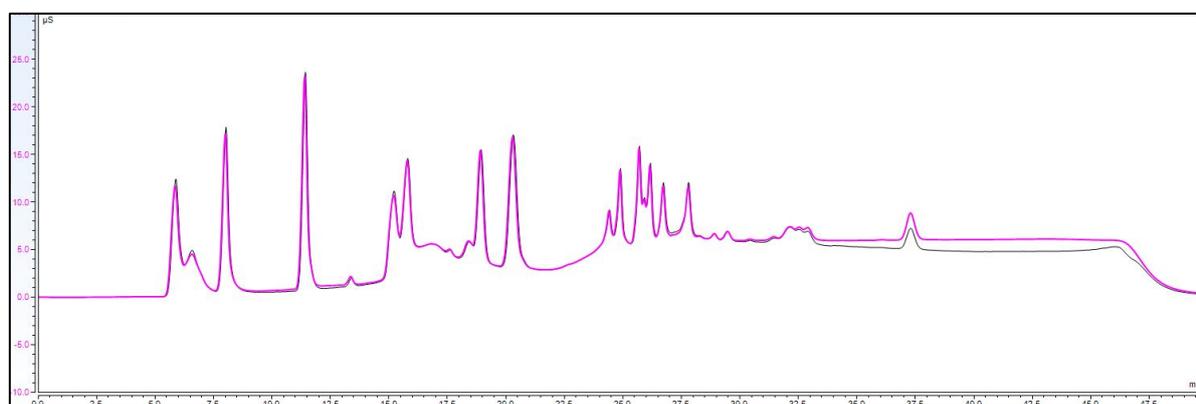


Figure 22 : Chromatogramme obtenu pour l'analyse du mélange de métabolites avec différents modes de suppression : courant constant (en violet) et tension constante (en noir)(détection conductimétrique)

Cet essai n'est pas concluant, peu de différences ont été observées entre le mode tension constante et le mode courant constant sur le signal conductimétrique. La dérive de la ligne de base est plus faible avec le mode tension constante pour les concentrations les plus élevées de NaOH dans la PM, soit à partir de 33 min. Les EIC de deux composés élués à partir de 33 min sont présentés en Figure 23

Pour le GMPc, aucune différence n'est observée sur l'intensité du signal entre les deux modes de suppression, comme pour le reste des composés. Cependant, pour l'UTP, le bruit de fond reste très important avec le mode tension constante et le composé pourtant correctement détecté en mode courant constant ne l'est plus en tension constante. Le mode courant constant est donc conservé pour la suite de l'étude.

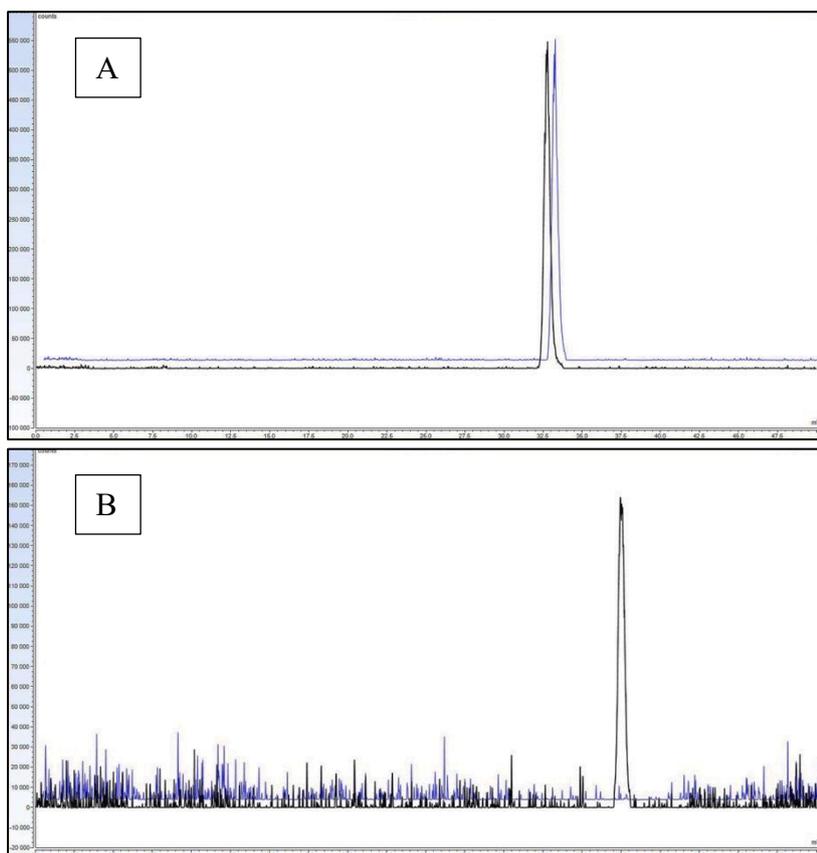


Figure 23 : EIC obtenus pour les rapports m/z des composés élués aux plus fortes concentrations de gradient : GMPc (A) et UTP (B) avec le suppresseur en courant constant (en noir) et tension constante (en bleu)

Tous les paramètres ont été optimisés afin d'obtenir une méthode sensible, répétable et permettant d'obtenir la meilleure résolution possible entre les différents solutés tout en limitant la durée globale de l'analyse. Cette méthode a permis la détection de 35/47 composés. Les paramètres optimisés de la méthode sont présentés dans le Tableau 8.

Pour la détection en spectrométrie de masse, les ions ciblés en mode SIM sont les ions précurseurs répertoriés dans le Tableau 5. L'ordre d'élution obtenu dans les conditions optimisées et les temps de rétention de chaque composé sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 8 : Paramètres optimisés de la méthode en IC-MS

<b>Colonne</b>	AG11-HC (2x50mm) + AS11-HC (2x250mm)
<b>Débit de PM</b>	0,2 mL/min
<b>Gradient</b>	<p>Le diagramme illustre le gradient de concentration en mM au cours du temps en minutes. Les points clés sont : 0 min (5 mM), 10 min (20 mM), 15 min (20 mM), 20 min (60 mM), 40 min (70 mM), et 50 min (5 mM).</p>
<b>Suppression</b>	AERS 500 e à 35 mA
<b>Volume injecté</b>	10 µL
<b>Solvant « make-up »</b>	ACN à 0,1 mL/min
<b>Température de vaporisation</b>	150°C
<b>Température de tube de transfert d'ions</b>	300°C
<b>Pression de gaz de gainage</b>	29 arb
<b>Pression de gaz auxiliaire</b>	10 arb
<b>Pression de gaz de balayage</b>	1,5 arb

Ordre d'élution	Composé	t <sub>R</sub> (en min)	Ordre d'élution	Composé	t <sub>R</sub> (en min)
1	LAC	6,2	25	NADH	27,0
2	TAU	6,6	26	F-1,6-BP	28,0
3	PRO	6,9	27	URA	28,1
4	PYR	8,4	28	ADP	28,2
5	PCr	12,5	29	IMP	29,3
6	G1P	13,8	30	GMP	29,9
7	GLU	15,6	31	UDP-GlcA	32,7
8	2MET-GLU	15,6	32	ATP	32,8
9	SUC	16,2	33	ITP	32,
10	MAL	16,3	34	GMPc	33,1
11	G6P	18,9	35	UTP	38,4
12	F6P	19,6		PEA	n.d.
13	OXO	19,6		HYP	n.d.
14	FUM	20,9		GlcN6P	n.d.
15	R5P	21,5		GTP	n.d.
16	pSer	24,6		ASP	n.d.
17	E4P	24,7		PIC	n.d.
18	AMPc	24,8		I3S	n.d.
19	OXA	25,8		XAN	n.d.
20	CIT	25,9		Acétyl-CoA	n.d.
21	TMP	26,2		NAD <sup>+</sup>	n.d.
22	NADP <sup>+</sup>	26,2		dAMP	n.d.
23	ISO	26,4		AMP	n.d.
24	UMP	26,9			

Tableau 9 : Ordre d'élution des composés et temps de rétention obtenus avec la méthode optimisée. « n.d. » : non détecté

Avec la méthode développée, 35 des 47 composés ont été détectés avec succès quel que soit l'analyseur utilisé. Le PCr a été supprimé de l'étude en raison de la non-stabilité de son signal mais son temps de rétention a cependant été correctement identifié. Les 12 composés non détectés peuvent être répartis en 2 catégories :

- 7 composés seulement détectés en IC-MS/MS :  
dAMP, GlcN6P, NAD<sup>+</sup>, AMP, GTP, PEA, XAN
- 5 composés qui n'ont été observés sur aucun analyseur :

## ASP, PIC, HYP, I3S et Acétyl-CoA

La proportion des acides organiques de bas poids moléculaire et des composés phosphatés dans ces catégories est présenté en Figure 24.

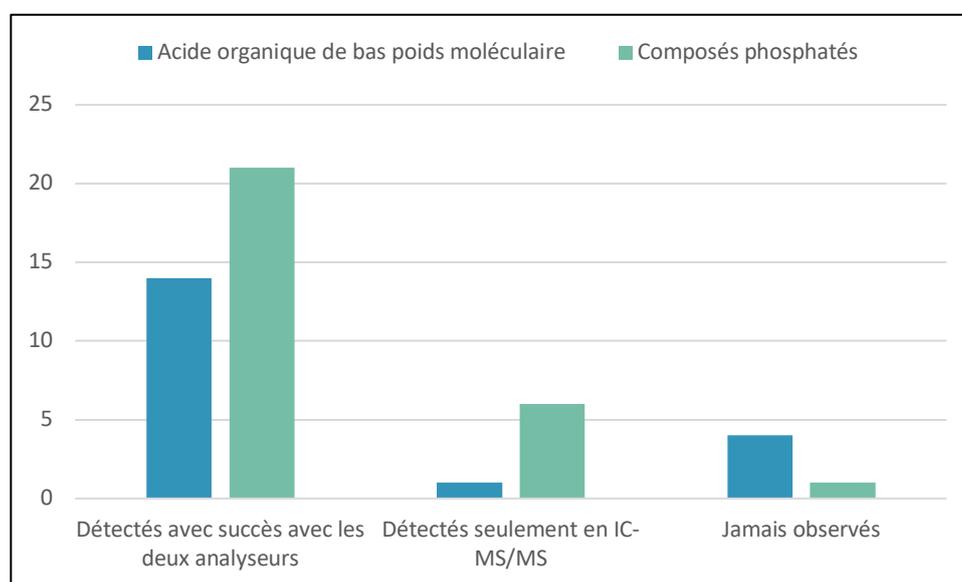


Figure 24: Proportions de chaque classe de composés selon la détection

Concernant les composés détectés avec succès uniquement avec l'analyseur QqQ, cela s'explique par des interférences isobariques avec les ions de la PM entraînant un fort bruit de fond lors de l'utilisation d'un analyseur simple quadripôle.

Pour les 5 composés qui n'ont jamais été détectés, ces métabolites étant correctement identifiés en infusion en MS, c'est donc au niveau du système chromatographique que le problème doit se situer. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées telles qu'une rétention trop forte du composé, un composé neutre au pH d'élution ou une interaction avec le suppresseur. En effet, il a déjà été reporté dans la littérature que des interactions peuvent intervenir entre le suppresseur à membrane et les solutés<sup>[82, 83]</sup>. Bauer *et al.*<sup>[84]</sup> ont notamment démontré l'influence de tels phénomènes lors de la rétention de l'AMPA (l'acide aminométhylphosphonique). Ces interactions peuvent être une précipitation, une adsorption sur les membranes du suppresseur ou une perméation à travers les membranes échangeuses de cations du suppresseur et concernent surtout les bases et les acides faibles<sup>[83]</sup>.

Parmi les 5 métabolites non détectés, 3 possèdent une amine primaire comme l'AMPA. Une modification chimique du suppresseur a donc été réalisée afin d'étudier son impact.

### III.4. ÉTUDE DE LA MODIFICATION CHIMIQUE DES MEMBRANES DU SUPPRESSEUR

Pour éviter les interactions avec la surface du polymère des membranes, une solution consistant à modifier la charge de la surface des membranes a été proposée par Geerdink *et al.*<sup>[85]</sup>. Cette solution a été appliquée au suppresseur AERS 500e pour essayer d'améliorer la détection des composés non détectés (ASP, PIC, HYP, I3S, Acétyl-CoA) ou mal détectés (dAMP, GlcN6P, NAD<sup>+</sup>, AMP, GTP, PEA et XAN). Le protocole et les résultats obtenus sur les petits acides sont présentés dans l'Article III (version soumise au Journal of Chromatography B).

#### ARTICLE III - DEVELOPMENT OF AN ION CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY METHOD FOR SMALL ORGANIC ACIDS ANALYSIS, IMPORTANCE OF SUPPRESSOR ROLE.

**Development of an ion chromatography - mass spectrometry method for small organic acids analysis, importance of suppressor role.**

Adeline Clergé, Adeline Bigard, Pascal Cardinael, Valérie Peulon-Agasse

*Normandie Univ, UNIROUEN, SMS EA 3233, place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France*

#### Highlights:

- Development of an IC/MS-MS method for the separation and detection of 18 acids
- Addition of acetonitrile as make-up solvent enhanced the sensibility detection
- A suppressor chemical modification was mandatory to detect three specific compounds
- Successfully applied for detection in urine and saliva without sample preparation

Corresponding Author:

Valérie Peulon-Agasse – Laboratory SMS, Normandie Univ, UNIROUEN, 76130 Mont-Saint-Aignan, France

valerie.agasse@univ-rouen.fr

phone: +33 235 522 961

## **Abstract**

The functional status of a complex biological system can be studied by measurement of metabolites concentrations. Among these metabolites, there exist organic acids that are small polar compounds belonging to energetic cycles such as Krebs cycle. In this study, an ion chromatography-MS/MS method was developed allowing separation and detection of 18 small organic acids. IC separation, MS/MS parameters, composition of make-up solvent and suppressor operating mode were optimized. The Relative Standard Deviations (RSD) were below 1% for retention times and 5% for peak areas. Moreover, RSD values of the peak area in three replicates of each compound were between 1.5-5.5% for the interday repeatability. Chemical modification of the suppressor appeared necessary for the detection of aspartic acid, hypotaurine and picolinic acid. This method was successfully applied for the detection of the small organic acids in human urine and saliva without any sample preparation. According to the results, 14 out of 18 metabolites were successfully detected in sample of urine (xanthurenic acid, aspartic acid, 2-picolinic acid, and hypotaurine were not detected) and 13 in samples of saliva (2-picolinic acid and hypotaurine were not detected).

**Keywords:** ion chromatography, make-up solvent, mass spectrometry, metabolomic, suppressor membrane

## 1. Introduction

The number of cancer cases is increasing around the world [1]. In order to improve diagnosis, prognosis and therapeutic developments, many studies deal with genomics and proteomics [2, 3]. In 1971, Arthur Robinson and Linus Pauling referred to the fact that the functional status of a complex biological system can be related to the measurement of the concentration of different metabolites [4]. Quantification of these individual metabolites provides essential information concerning biological functions of cells, tissues, or organism in response to different stimuli such as physiology or environment. The term of “metabolome” was first introduced in 1998 by analogy with the terms of “genome” and “proteome” [5, 6]. Metabolomic is a scientific field studying all metabolites contained in the organism and also allows for monitoring of the entire activity of a biological system [7]. Moreover, metabolomic is associated to the identification and the quantification of metabolites groups, called biomarkers, which are specific to a disease. The study of these biomarkers allows to take into account both intrinsic and extrinsic information (environmental exposure or diet) thus providing a view of the whole system [8].

The metabolome is composed of different compounds (from small polar compounds to large hydrophobic lipids). Among them, organic acids are intermediates of energetic cycles such as Krebs cycle or glycolysis which are fundamental for cellular life. Different studies demonstrated that mutations in genes coding for proteins of Krebs cycle disturbed metabolic continuum which could be at the origin of different tumoral process [9–12]. Thus, it is necessary to determine and monitor their concentration to understand the process at the origin of a disease.

Most of the technics used for the detection of organic acids are based on mass spectrometry (MS) and NMR spectroscopy [13]. Compared to NMR, direct MS detection offers higher selectivity and the simultaneous profiling of tens of metabolites. In order to overcome the matrix effect caused by the biological extracts, a separation step is needed prior to MS detection. The combination of chromatographic separation and MS detection allows to provide quantitative and/or qualitative information on selected metabolites [14]. Different chromatographic techniques could be used for the quantification of metabolites: gas chromatography (GC), liquid chromatography in reverse mode (RP-LC), hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), or ion chromatography (IC). GC-MS is commonly used for the analysis of volatile compounds such as organic acids [15,16]. However, this technic has some limitations. A derivatization step is often required to decrease polarity and enhance compound’s volatility [17]. RP-LC-MS is the most widely used for this kind of analysis. This method offers many advantages in the field of metabolites analysis thanks to the large variety of stationary phases associated to the use of electrospray ionization (ESI), allowing the analysis of a great number of compounds [18]. The development of HILIC-MS improved retention and detection of polar compounds. However, in comparison to RP-LC, this method presents poor reproducibility [19]. The metabolome is composed of several charged species thus, the IC is the most suitable separation method to study these

compounds in their native forms [12]. Until recently, IC was not the method of interest due to the limitations of conductimetric and UV detection and the pH of the eluent. Whereas the hyphenation of IC with MS is not trivial, it is now more widespread thanks to different development and optimizations as the development of a suppressor enable to continuously neutralize the eluent, the development of ESI sources supporting flow rate until 1 ml/min, or the adding of make-up solvent with or without additive. Since then, IC has been widely used for trace level analyses of ions in environmental, biological and food analysis with MS detection [20]. However, IC is largely untested for the separation of ionic and polar compounds in the field of metabolomic. Few applications have coupled IC to MS for profiling or quantitation of phosphate sugars, organic acids, and nucleotides in biological samples [12, 22, 23]. In this study, we present the development of an IC-MS/MS method that separates a selection of 18 polar, low molecular weight organic acids from glycolysis, Krebs cycle and the nucleotide metabolism. First of all, transitions were optimized on negative ESI mode for each compound. Then, after the optimization of ion chromatographic conditions (flow rate, NaOH eluent gradient, temperature), the MS detection was improved. The make-up solvent was studied including the nature of the organic solvent, the flow rate, and the additives. This method was successfully applied to the preliminary analysis of these compounds in urine and saliva. Despite optimizations, 3 of the 18 compounds were not detected in IC-MS/MS in these conditions. However, these compounds were detected using MS/MS infusion so the influence of ion chromatography and more particularly the suppressor was investigated. Geerdink *et al.* modified an anion chemically regenerated suppressor (ACRS) to avoid any interaction between the suppressor membranes and AMPA (aminomethylphosphonic acid) by changing the pH of membranes [23]. This technique was applied to an AERS 500e suppressor to improve the detection of the three undetected compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Most of the standards were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) except for 2-methylglutaric acid and isocitric acid which came from Acros organics (Geel, Belgium). They were weighed out and dissolved according to the specifications given by providers. Stock solutions were prepared at 10 mM or 2,5 mM depending on the amount of each substance available. Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) are of HPLC quality and were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Sodium hydroxide (0.1 M) was supplied by Fisher scientific (Illkirch-Graffenstaden, France) and ammonium sulfate was supplied by VWR (Fontenay-sous-bois, France).

### 2.2. IC-MS/MS analysis

Samples were analyzed on an ICS 3000 system (Dionex) coupled to a TSQ Quantiva™ triple quadrupole (Thermo Fisher scientific). The IC system was equipped with an AS40 autosampler with an injection loop of

10  $\mu$ L and a conductivity detector. Injections were performed on a Dionex AS11 HC column (2 x 250 mm, 4  $\mu$ m) and Dionex IonPac AG11 Guard column (2 x 50 mm) at 21 °C. The mobile phases were A, water and B, sodium hydroxide (NaOH) 0.1 M. The elution pump gradient ramped from 5 mM of NaOH, up to 100 mM at 30 min, which was held for 10 min and then re-equilibrated to the starting conditions for 10 min at 0.3 mL/min thus, the run time was 50 min. Suppression was ensured by an electrochemical anion exchange suppressor (AERS 500e) at 75 mA using an external regeneration at 0.3 mL/min. The suppressor is regenerated by an external AXP pump with water for the conventional suppressor and with 200 mM  $\text{NH}_4^+$  at pH 9 for the modified one. A T-connection (Tees connection, Valco) was used to combine IC system with AXP-MS pump (make-up solvent) before MS system.

The TSQ Quantiva<sup>TM</sup> triple quadrupole was operated in heated ESI (HESI source, Thermo Fisher scientific) mode. The HESI conditions were optimized (*i.e.* drying gas flow, drying gas temperature and capillary voltage) for an efficient production of a fine and stable aerosol. A capillary voltage of -3.5 kV and ion-source temperature of 150 °C were applied. The desolvation gas was argon and the flow was set to 3.5 L/min at a temperature of 300 °C.

### 2.3. Optimization of MS/MS transitions

All MS conditions were optimized for each individual compound prepared into a solution of mobile phase mixed with make-up solvent (75/25 v/v). Samples were first analyzed in full scan mode and at least three times in selected ion monitoring (SIM) mode. The initial product was characterized by its  $m/z$  (precursor ion, [M-H]). Product ion scans of initial products were performed at different collision energies and single reaction monitoring (SRM)<sup>TM</sup> mode was then chosen for optimization of standard transitions.

The two most intense mass transitions were selected for each compound associated to a time segment approach during data acquisition allowing enhancement of the sensitivity detection.

### 2.4. Human urine and saliva analysis

To study organic acids in urine and saliva, samples were collected in sterile flask and were diluted respectively by 20 for urine and 2 for saliva in pure water.

### 2.5. Suppressor modification

The AERS 500e suppressor is converted to ammonium form with a protocol inspired by Geerdink *et al.* [24]. The suppressor was first flushed at 0.3 mL/min during one day with a 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution through the regenerant channel. The regenerant was put in closed-circuit loop.

The regenerant used during analysis is a solution of 200 mM  $\text{NH}_4^+$  at pH9. This solution is composed of 22.2g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 10 mL of 25% (v/v)  $\text{NH}_4\text{OH}$  for a solution of 2 L. In this case, the suppressor is used as a chemical one, without applying any suppressor current.

## 2.6. Data analysis

Data were processed using Chromeleon software (Thermo Fisher Scientific, version 7.2.9). Peak identification was achieved by matching their  $m/z$  values, retention times (RT) and MS/MS spectra with those of standard solutions.

### 3. Results and discussion

#### a. Optimization of mass spectrometric settings

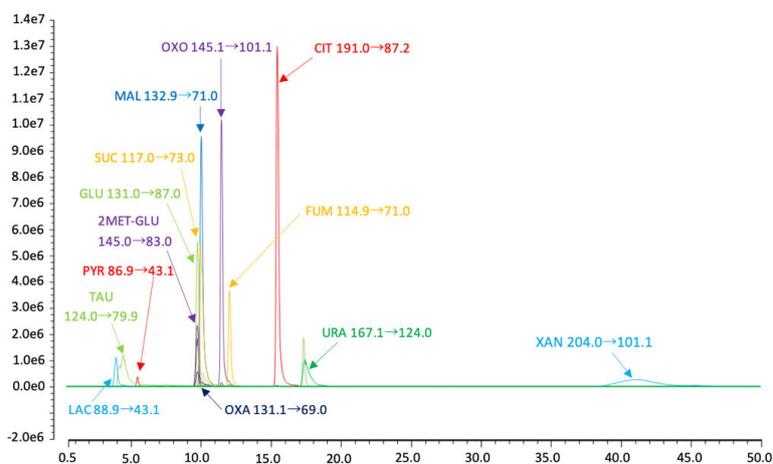
MS optimization was achieved with one standard solution per compound infused directly into the ESI source. This infusion was done with a mixture of the mobile phase and the make-up solvent to achieve true ionization conditions. The MS parameters, abbreviations and retention times for all compounds are shown in Table 1. All SRM transitions (precursor ion, product ion and collision energy) were individually optimized in negative ESI mode (according to compound of interest), while the capillary voltage setting was selected as a compromise among all compounds (-3.5 kV). The main product ions observed from the fragmentation of parent molecular ions were the molecular ions with a loss of neutral fragment corresponding to H<sub>2</sub>O and/or CO<sub>2</sub> (table 1).

#### b. IC/MS-MS method development

In the IC system, the highly alkaline eluent used for the separation of anionic compounds was neutralized in the suppressor and finally eluted as water into the MS system. This 100% aqueous solution is not suitable for an efficient ionization in the ion source. The addition of a make-up solution corresponding to an organic solvent can solve this problem. These two solvents were mixed before the HESI source using a T-connection. A low make-up flow compared to the analysis flow was used to limit the dilution of analytes and to avoid a high backpressure that might compromise the performance and decrease the life-time of the suppressor and conductivity detector flow cell [14]. An AERS 500e suppressor (Thermo Fisher scientific) designed for the hyphenation with mass spectrometer was chosen. The make-up solvent composition and its flow were optimized in part 3.c. Except for three compounds, most of organic acids were detected with RT in the range of 4 min to 38 min. Aspartic acid, hypotaurine and picolinic acid were not detected using this method (Figure 1) whereas they have been identified by direct infusion. Their non-detection is probably due to an adsorption on the suppressor membranes. This phenomenon was previously described for the AMPA [24] and a modification of the suppressor was proposed to change the charge state of membranes to avoid the loss of compounds. This strategy was applied to the AERS suppressor and was described in the paragraph 3.e. As the developed method was well adapted for the separation of 18 small organic acids, it will be optimized in terms of detection (nature and flow of make-up solvent and additives).

**Table 1.** Complete IC-MS/MS settings for metabolites included in the method.

Compound	Abbreviation	RT in IC (min) n=4	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Collision energy (V)
Propionic acid	PRO	5.17	72.93	58.05	49.0
				55.03	13.5
Pyruvic acid	PYR	5.93	86.90	43.08	5.0
				41.03	32.0
Lactic acid	LAC	4.35	88.90	43.10	10.5
				41.08	17.5
Citric acid	CIT	15.53	191.03	111.05	13.5
				87.18	19.0
DL-isocitric acid, trisodium salt hydrate	ISO	15.85	191.05	172.98	7.0
				73.03	23.5
Oxaloacetic acid	OXA	13.60	131.08	69.03	16.0
				59.10	18.0
D(+)-malic acid	MAL	10.31	132.95	115.03	10.0
				71.00	16.0
Fumaric acid	FUM	12.23	114.90	71.05	5.0
				45.03	27.5
2-oxoglutaric acid monosodium salt	OXO	11.69	145.05	101.08	5.0
				57.03	11.5
L-aspartic acid sodium salt monohydrate	APS	-	131.98	115.03	10.5
				71.03	16.5
2-methylglutaric acid	2MET-GLU	10.03	145.03	126.98	10.0
				83.03	16.0
Glutaric acid	GLU	9.99	131.00	113.05	9.0
				87.05	12.0
Uric acid	URA	17.77	167.10	124.03	16.5
				96.05	18.5
2-picolinic acid	PIC	-	121.88	94.05	12.5
				78.00	10.0
Xanthurenic acid	XAN	37.01	204.00	160.05	16.5
				116.08	26.5
Succinic acid	SUC	10.28	117.05	98.95	8.5
				72.99	12.0
Taurine	TAU	4.69	124.05	106.90	15.0
				80.00	22.0
Hypotaurine	HYP	-	108.05	64.93	8.5
				63.95	16.5



**Figure 1.** Superposed Extracted Ion Chromatogram of detected transitions.

### c. Make-up solvent optimization

After the suppression step, the mobile phase is only composed of water which is not the most favorable condition for solvent evaporation and spray stability. To obtain a better vaporization and increased sensitivity during analyses, MeOH and ACN were tested as make-up solvent (at 0.1 mL/min for 0.3 mL/min of mobile phase, Figure 2.A). Lactic acid (RT = 4.35 min), malic acid (RT = 10.31 min), oxoglutaric acid (RT = 11.69 min), fumaric acid (RT = 12.23 min), and citric acid (RT = 15.53 min) were selected as target compounds. Their peak areas were used to estimate the gain of sensitivity of the different make-up solvents (Figure 2.A.). As expected, adding a make-up solvent (ACN or MeOH) increases the peak area. However, the use of ACN allowed to obtain the highest peak areas (ranging from a factor of 1.4 for lactic acid to 2.3 for citric acid). Subsequently, this solvent was selected.

These results demonstrated the importance of the addition of an organic solvent to enhance the sensitivity. They are consistent with those obtained by Bathena *et al.* [25] and Wang and Schnute [26] demonstrating that ACN is preferred to MeOH. In addition, the viscosity of ACN/water mixture is lower than MeOH/water one preventing a high backpressure that could damage the suppressor.

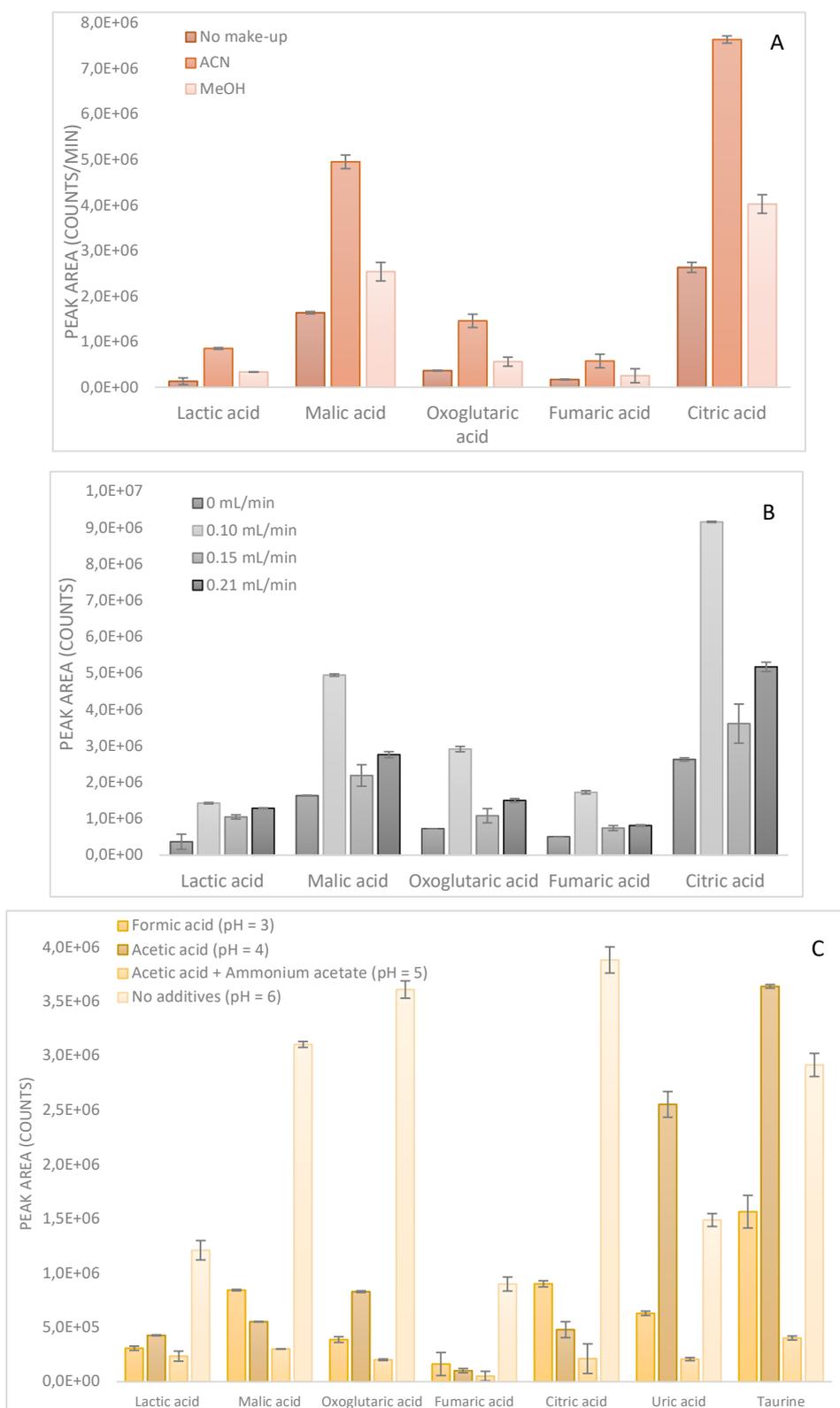
Afterwards, different flow rates of ACN were studied (Figure 2.B.) including 0 mL/min, 0.1 mL/min (33 % of the mobile phase flow rate), 0.15 mL/min (50 %), and 0.21 mL/min (70 %) of ACN for a mobile phase flow rate of 0.3 mL/min. At flow rates of 0.15 mL/min and 0.21 mL/min, peak area drastically decreased in comparison to 0.1 mL/min, which gave the maximum area. Moreover, the lower RSD values were obtained for 0.1 mL/min demonstrating the electrospray stability. Consequently, for a better compromise between

stable electrospray formation, mobile phase evaporation, and sample dilution, the flow rate of make-up solvent was selected at 0.1 mL/min of ACN with 0.3 mL/min of mobile phase.

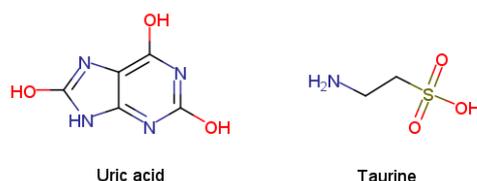
The last part of this optimization concerns the use of additive in make-up solution. Some publications demonstrated that the use of additive increases efficiency of ionization [25, 26]. Three different additives were tested in ACN to fix the pH and to evaluate the impact on efficiency of ionization: (i) 0.5 % of formic acid (pH = 3), (ii) 0.6 % of acetic acid (pH = 4), (iii) 0.6 % of acetic acid with 0.2 % of ammonium acetate (pH = 5), and (iv) no additives (pH = 6) (figure 2.C.). Lactic acid, malic acid, oxoglutaric acid, fumaric acid, and citric acid were kept as target compounds. All the voltages used in the HESI were held constant for each experiment. For most of the compounds, a good signal was obtained without any additive. A significant signal suppression was observed when adding formic acid, acetic acid, and especially with ammonium acetate. Acetic acid gave better ionization efficiency in comparison to formic acid. However, addition of ammonium acetate to acetic acid decreased drastically peak areas of all compounds. A different behavior was observed for two compounds, uric acid and taurine, which were added to figure 2.C. Concerning uric acid and taurine (structures given figure 3), high peak areas were observed with 0.6 % of acetic acid into make-up solvent (1.6 times larger for uric acid and 1.3 times larger for taurine, figure 2.C.). With a pKa of 5.4 for uric acid, ionization should be better at pH 6. At this pH, peak area was high but lower than that of pH 4. For taurine, monocharged form is predominant at each tested pH. Variation of this pH should not influence ionization of the compound. However, a good ionization was observed at pH 6 and a better one was obtained at pH 4. This phenomenon could be due to ion competition related to the ammonium ion. Different hypothesis could be formulated:

- As shown in Figure 3, the presence of nitrogen atom into a cyclic (uric acid) or linear structure (taurine) may require the addition of acetic acid to obtain a better ionization.
- Uric acid is composed of an aromatic cycle. In presence of acid, the formed charge could be stabilized by resonance leading to an easier formation. Similar results were observed with xanthurenic acid which also possess a nitrogen atom (data not shown).
- In presence of acid, sulfonate function of taurine can also lead to a better ionization.

Consequently, analysis was performed without additives. However, for further analysis of uric acid and taurine at low concentration in biological samples, make-up solvent with 0.6 % acetic acid could be used. Indeed, obtained results for the MS detection are better without any additives in make-up solvent that is consistent for simple routine analysis.



**Figure 2.** Optimization of the make-up solvent. (A) Effect of different organic solvents (flow rate: 0.1 mL/min) on the peak area; (B) Effect of the flow rate of ACN on the peak area; (C) Effect of additive addition in ACN.



**Figure 3.** Structures of uric acid and taurine.

d. Method accuracy

The accuracy and intraday repeatability of the injections were evaluated to ensure that method would be reliable. Repeatability of retention time and area was studied by injecting five compounds three times (Table 2). The obtained Relative Standard Deviation (RSD) were below 1% for retention times and 5% for peak areas demonstrating the repeatability of this method. Furthermore, the intraday repeatability of retention times was assessed from samples analyzed on three different days (Table 3). The RSD values of the peak area in three replicates of each compound were also calculated and showed values between 1.5-5.5%. These results are satisfying for this method development.

**Table 2.** Intraday repeatability of retention times (average) and areas (average) of five compounds.

	RT (min)	RSD (%)	Area (counts)	RSD (%)
<b>Lactic acid</b>	4.36	0.32	222970	2.77
<b>D(+)-malic acid</b>	10.38	0.01	6230172	1.55
<b>2-oxoglutaric acid</b>	11.80	0.01	1779213	0.95
<b>Uric acid</b>	17.71	0.14	468566	2.50
<b>Taurine</b>	4.88	0.68	17099	4.87

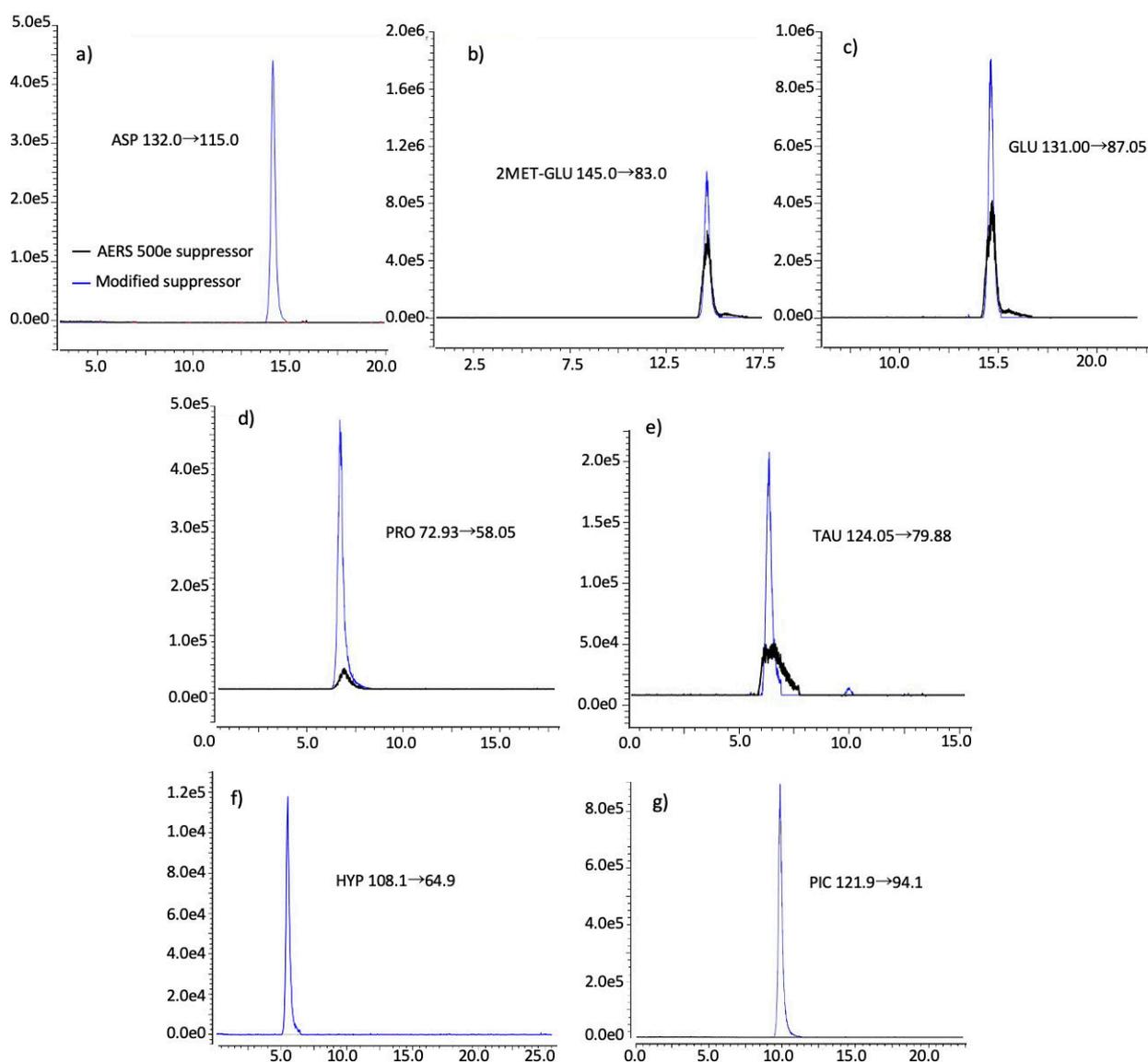
**Table 3.** Repeatability on three different days.

	Day 1		Day 2		Day 3		Mean		RSD (%)	
	RT (min)	Area (counts)								
<b>Lactic acid</b>	4.38	220498	4.40	205906	4.35	228875	4.38	218426	0.67	5.32
<b>D(+)-malic acid</b>	10.38	6203503	10.38	6405205	10.57	6355281	10.44	6321330	1.09	1.66
<b>2-oxoglutaric acid</b>	11.81	1765753	11.91	1794940	12.04	1697050	11.92	1752581	0.98	2.87
<b>Uric acid</b>	17.73	457210	18.01	444284	17.67	492432	17.80	464642	1.04	5.36
<b>Taurine</b>	4.84	15990	4.93	16692	5.16	16098	4.98	16260	3.30	2.32

#### e. Modification of the suppressor

Three compounds (aspartic acid, hypotaurine, and picolinic acid) were not detected in IC-MS/MS but were correctly identified using direct infusion in MS. The ion chromatographic system and more particularly the suppressor can be at the origin of this phenomenon. It is well known that the membrane-based suppressor can induce a loss of some compounds, especially weak acids or weak basic ones or those with multiple dissociation constant. Karu *et al.* [28, 29] demonstrated that physico-chemical interactions between analytes and suppressor membranes can occur such as precipitation, hydrophobic adsorption, or permeation of analytes through the suppressor membranes. It can also change the state of charge on the analytes, inducing peak broadening [24]. Karu *et al.* propose to add acetonitrile to overcome these problems but suppressor may be affected by a high rate of organic solvent [30]. The modification of the suppressor described by Geerdink *et al.* was applied on the AERS 500e in order to improve the detection [24]. The AERS 500e is a cation-exchange membranes suppressor that allows to exchange the positive counter ion of the basic mobile phase by protons, neutralizing the eluent. During the modification step, membranes are modified by adding a layer of  $\text{NH}_4^+$  at the surface.

The analysis of the 18 organic acids was done before and after the chemical modification of the suppressor. The three undetected compounds were detected with the modified suppressor and the signal of four others was improved (taurine, propionic acid, 2-methylglutaric acid, and glutaric acid) (Figure 4). The role of the suppressor on the non-detected compounds is confirmed in these conditions. The  $\text{NH}_4^+$  layer on the suppressor membranes allows to avoid the total or partial adsorption of the compounds by repulsion of positive charges. On the contrary, for compounds possessing only negative charges in these analytical conditions such as citric acid, malic acid or oxoglutaric acid, the modification of membrane suppressor induces a partial adsorption leading to a decrease of peak area.

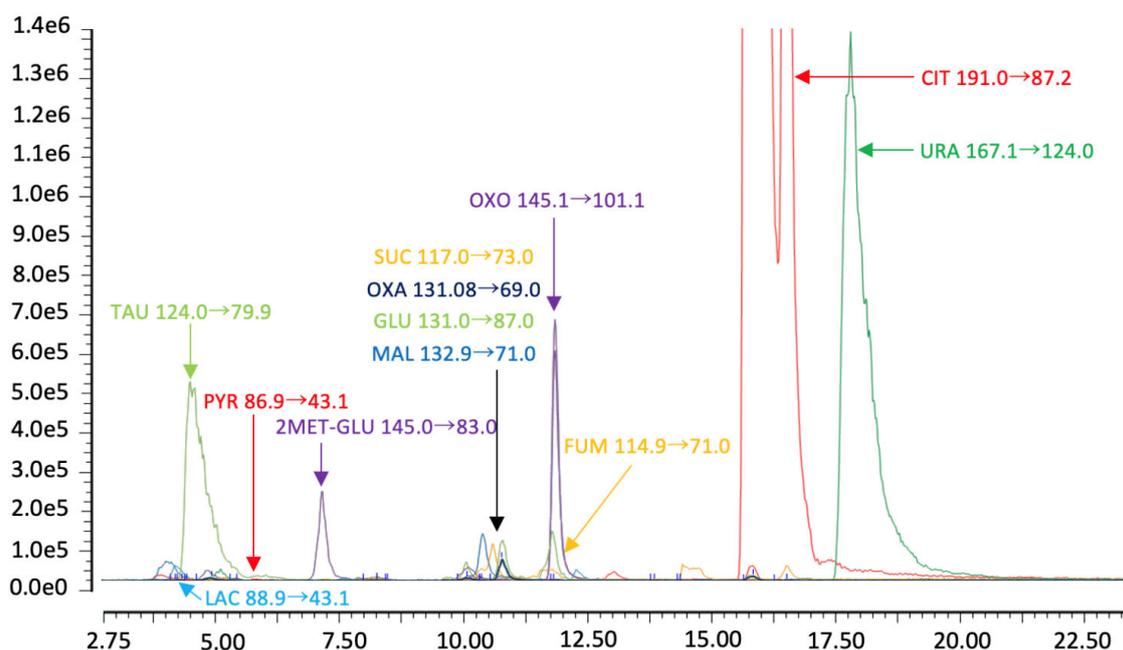


**Figure 4.** Extracted Ion Chromatogram of the aspartic acid, 2-methylglutaric acid, glutaric acid, propionic acid, taurine, hypotaurine and picolinic acid with a conventional suppressor (in black) and the modified suppressor (in blue).

#### f. Study of small organic acids in urine and saliva

The method using non-modified suppressor was applied to the analysis of small organic acids in biological matrices (urine and saliva). Human saliva is a valuable body fluid for disease diagnosis and prognosis because saliva testing is simple, safe, and non-invasive. For patients, the non-invasive collection of saliva reduces anxiety, discomfort, and simplify procurement of repeated samples for monitoring over time [31]. Similarly, urine is a commonly used biofluids due to its non-invasive sampling, its low protein concentration, and its high concentration of low molecular mass compounds [13]. After a sample dilution as described in section

2.4., 14 of the 18 metabolites were successfully detected in sample of urine (xanthurenic acid, aspartic acid, 2-picolinic acid, and hypotaurine were not detected) (Figure 5) and 13 in samples of saliva (2-picolinic acid and hypotaurine were not detected). These analyses were semi-quantitative and detected concentrations were in the order of 370  $\mu\text{M}$  for urine and 420  $\mu\text{M}$  for saliva. As explained in part 3.b, aspartic acid, hypotaurine, and 2-picolinic acid were not detected because of the non-modification of the suppressor membrane. Concerning xanthurenic acid and 2-methylglutaric acid, concentrations were probably too low to be detected with this method. These first analyses demonstrated that sample preparation is not necessary to detect most of the compounds of these biological samples.



**Figure 5.** Superposed Extracted Ion Chromatogram of detected transitions in urine.

#### 4. Concluding remarks

In this study, we developed an IC-MS/MS method for the analysis of small organic acids. After an optimization of MS/MS parameters, IC separation and make-up solution conditions, good repeatability was obtained. The use of an additive in the make-up solution was not relevant due to the possible ion competition in the ESI source. So, the developed method with acetonitrile as make-up solvent at 0.1 mL/min for 0.3 mL/min eluent flow rate was used. Despite the MS detection optimization, three compounds (hypotaurine, aspartic acid, and picolinic acid) remained not detected. The AERS 500e suppressor was modified by flushing a 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution and using a 200 mM solution of  $\text{NH}_4^+$  at pH 9 as regenerant in order to keep the

membrane in the ammonium form. This modification leads to the detection of these three compounds and the increase of the peak area of four other compounds (taurine, propionic acid, 2-methylglutaric acid and glutaric acid). Therefore, the decreasing area of the eleven other compounds demonstrate that the tendency of compounds to be adsorbed on the suppressor membranes is reversed. The role of the suppressor in this analysis was clearly shown and the complete and optimized analysis of these 18 small organic acids requires the development of two different methods using two different suppression modes.

To conclude, the method using non-modified suppressor was successfully applied for the detection of the small organic acids in human urine and saliva without any sample preparation. Detection of these metabolites can contribute to the understanding of disease pathogenesis and could reveal novel biomarkers for clinical applications such as disease detection and prognosis prediction.

#### **Acknowledgements:**

The present work was performed thanks to the IC-MS/MS seed unit provided by Thermofisher. The authors gratefully acknowledge Olivier Chapeau (Thermofisher) and Serge Rudaz (University of Geneva) for discussions and help.

#### **Conflict of interest statement**

The authors declare no competing financial interest.

#### **Funding:**

This work was supported by funding from the Région Normandie and FEDER through the RIN CHIMICSain.

#### **Author contributions**

**Adeline Clergé:** Methodology, investigation, data curation, writing – original draft. **Adeline Bigard:** Investigation, Writing - review & editing. **Pascal Cardinael:** Conceptualization, Supervision, Project administration. **Valerie Peulon-Agasse:** Conceptualisation, Supervision, Project administration.

## References

- [1] National cancer institute, Evolution de l'incidence et de la mortalité nationale de l'ensemble des cancers entre 1980 et 2012, (2017). <https://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/Incidence-mortalite-nationale/Incidence-et-mortalite-nationales-des-cancers> (accessed July 8, 2021).
- [2] C.A. Granville, P.A. Dennis, An Overview of Lung Cancer Genomics and Proteomics, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (2005) 169–176. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F290>.
- [3] A. Carpi, J.I. Mechanick, S. Saussez, A. Nicolini, Thyroid tumor marker genomics and proteomics: Diagnostic and clinical implications, *J. Cell. Physiol.* 224 (2010) 612–619. <https://doi.org/10.1002/jcp.22187>.
- [4] L. Pauling, A.B. Robinson, R. Teranishi, P. Cary, Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68 (1971) 2374–2376. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.10.2374>.
- [5] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 29 (1999) 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>.
- [6] S.G. Oliver, M.K. Winson, D.B. Kell, F. Baganz, Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1).
- [7] F. Faucon-Lahalle, D. Montagu, La révolution génomique animale, France agricole, Paris, France, 2011. <http://idele.fr/recherche/publication/idelesolr/recommends/la-revolution-genomique-animale.html> (accessed December 21, 2020).
- [8] E. Escalona, J. Leng, A. Dona, C. Merrifield, E. Holmes, C. Proudman, J. Swann, Dominant components of the Thoroughbred metabolome characterised by 1H-NMR spectroscopy: A metabolite atlas of common biofluids, *Equine Vet. J.* 47 (2014). <https://doi.org/10.1111/evj.12333>.
- [9] H.A. Krebs, E. Salvin, W.A. Johnson, The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body, *Biochem. J.* 32 (1938) 113–117. <https://doi.org/10.1042/bj0320113>.
- [10] H.A. Krebs, W.A. Johnson, The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues, *FEBS Lett.* 117 Suppl (1980) K1-10. <https://doi.org/10.4159/harvard.9780674366701.c143>.
- [11] D.D. Tyler, *The Mitochondrion in Health and Disease*, VCH, 1992.
- [12] C. Petucci, A. Zelenin, J.A. Culver, M. Gabriel, K. Kirkbride, T.T. Christison, S.J. Gardell, Use of Ion Chromatography/Mass Spectrometry for Targeted Metabolite Profiling of Polar Organic Acids, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11799–11803. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03435>.
- [13] G.A.N. Gowda, S. Zhang, H. Gu, V. Asiago, N. Shanaiah, D. Raftery, Metabolomics-based methods for early disease diagnostics, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8 (2008) 617–633. <https://doi.org/10.1586/14737159.8.5.617>.
- [14] H.F.N. Kvitvang, K.A. Kristiansen, P. Bruheim, Assessment of capillary anion exchange ion chromatography tandem mass spectrometry for the quantitative profiling of the phosphometabolome and organic acids in biological extracts, *J. Chromatogr. A.* 1370 (2014) 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.029>.
- [15] G.X. Xie, T.L. Chen, Y.P. Qiu, P. Shi, X.J. Zheng, M.M. Su, A.H. Zhao, Z.T. Zhou, W. Jia, Urine metabolite profiling offers potential early diagnosis of oral cancer, *Metabolomics.* 8 (2012) 220–231. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0302-7>.
- [16] G. Ye, Y. Liu, P. Yin, Z. Zeng, Q. Huang, H. Kong, X. Lu, L. Zhong, Z. Zhang, G. Xu, Study of Induction Chemotherapy Efficacy in Oral Squamous Cell Carcinoma Using Pseudotargeted Metabolomics, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 1994–2004. <https://doi.org/10.1021/pr4011298>.
- [17] F. Xu, L. Zou, C.N. Ong, Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics, *Trends Anal. Chem.* 3 (2010) 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.007>.
- [18] D.-Q. Tang, L. Zou, X.-X. Yin, C.N. Ong, HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 574–600. <https://doi.org/10.1002/mas.21445>.

- [19] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [20] A. Bigard, P. Cardinael, V. Agasse, Anion Exchange Chromatography Coupled to Electrospray-Mass Spectrometry: An Efficient Tool for Food, Environment, and Biological Analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 0 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2036942>.
- [21] M.H. Stafsnes, L.M. Røst, P. Bruheim, Improved phosphometabolome profiling applying isotope dilution strategy and capillary ion chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1083 (2018) 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.004>.
- [22] A. Hirayama, S. Tabata, R. Kudo, M. Hasebe, K. Suzuki, M. Tomita, T. Soga, The use of a double coaxial electrospray ionization sprayer improves the peak resolutions of anionic metabolites in capillary ion chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1619 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460914>.
- [23] R.B. Geerdink, M. Hassing, N. Ayarza, C. Bruggink, M. Wielheesen, J. Claassen, O.J. Epema, Analysis of glyphosate, AMPA, Glufosinate and MPPA with ION chromatography tandem mass spectrometry using A membrane suppressor in the ammonium form application to surface water of low to moderate salinity, *Anal. Chim. Acta.* 1133 (2020) 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.058>.
- [24] R.B. Geerdink, M. Hassing, N. Ayarza, C. Bruggink, M. Wielheesen, J. Claassen, O.J. Epema, Analysis of glyphosate, AMPA, Glufosinate and MPPA with ION chromatography tandem mass spectrometry using A membrane suppressor in the ammonium form application to surface water of low to moderate salinity, *Anal. Chim. Acta.* (2020) 66–76.
- [25] S.P. Bathena, J. Huang, A.A. Epstein, H.E. Gendelman, M.D. Boska, Y. Alnouti, Rapid and reliable quantitation of amino acids and myo-inositol in mouse brain by high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 893–894 (2012) 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.035>.
- [26] J. Wang, W.C. Schnute, Optimizing mass spectrometric detection for ion chromatographic analysis. I. Common anions and selected organic acids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 3439–3447. <https://doi.org/10.1002/rcm.4263>.
- [27] B. Preinerstorfer, S. Schiesel, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 312–328. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.051>.
- [28] J. Wang, T.T. Christison, K. Misuno, L. Lopez, A.F. Huhmer, Y. Huang, S. Hu, Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites in Head and Neck Cancer Cells by Capillary Ion Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5116–5124. <https://doi.org/10.1021/ac500951v>.
- [29] N. Karu, G.W. Dicoski, M. Hanna-Brown, P.R. Haddad, Determination of pharmaceutically related compounds by suppressed ion chromatography: I. Effects of organic solvent on suppressor performance, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 9037–9045. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.011>.
- [30] N. Karu, G.W. Dicoski, M. Hanna-Brown, P.R. Haddad, Determination of pharmaceutically related compounds by suppressed ion chromatography: II. Interactions of analytes with the suppressor, *J. Chromatogr. A.* 1224 (2012) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.022>.
- [31] S. Hu, J.A. Loo, D.T. Wong, Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery, *Expert Rev. Proteomics.* 4 (2007) 531–538. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.531>.

Concernant les composés phosphatés, le dAMP et le PEA (Figure 25) non détectés dans les conditions optimisées de la méthode l'ont été avec le suppresseur modifié. Le signal de l'AMP, inexploitable avec le suppresseur commercial, s'est nettement amélioré avec la modification du suppresseur.

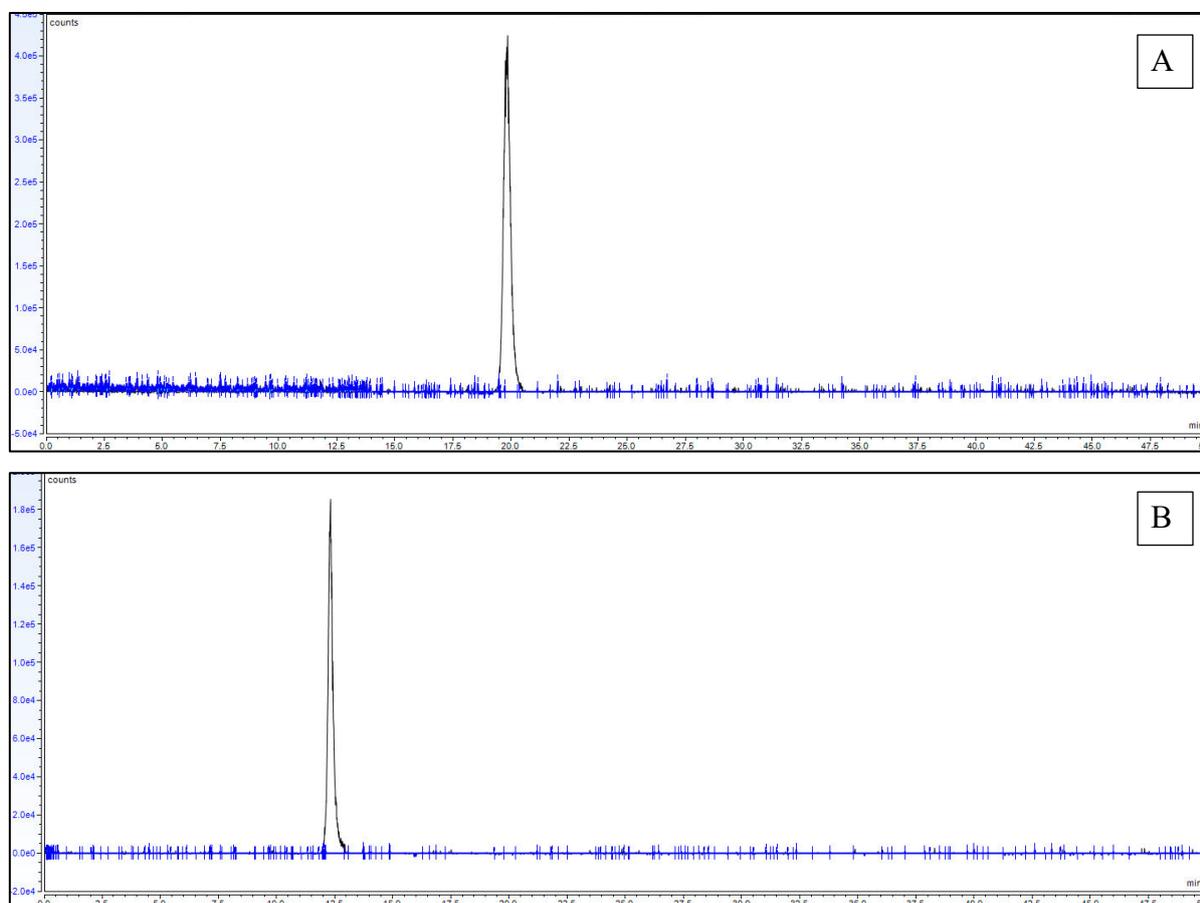


Figure 25 : EIC des composés dAMP (A) et PEA (B) avec le suppresseur conventionnel (en bleu) et le suppresseur modifié chimiquement (en noir)

Une étude par ATR IRTF (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier muni d'un accessoire de Réflectance Totale Atténuée) des membranes du suppresseur a révélé qu'elles étaient constituées de polymère EVOH (alcool vinyl éthylène). L'EVOH est un copolymère d'éthylène et d'alcool vinylique et son spectre est présenté en Figure 26.

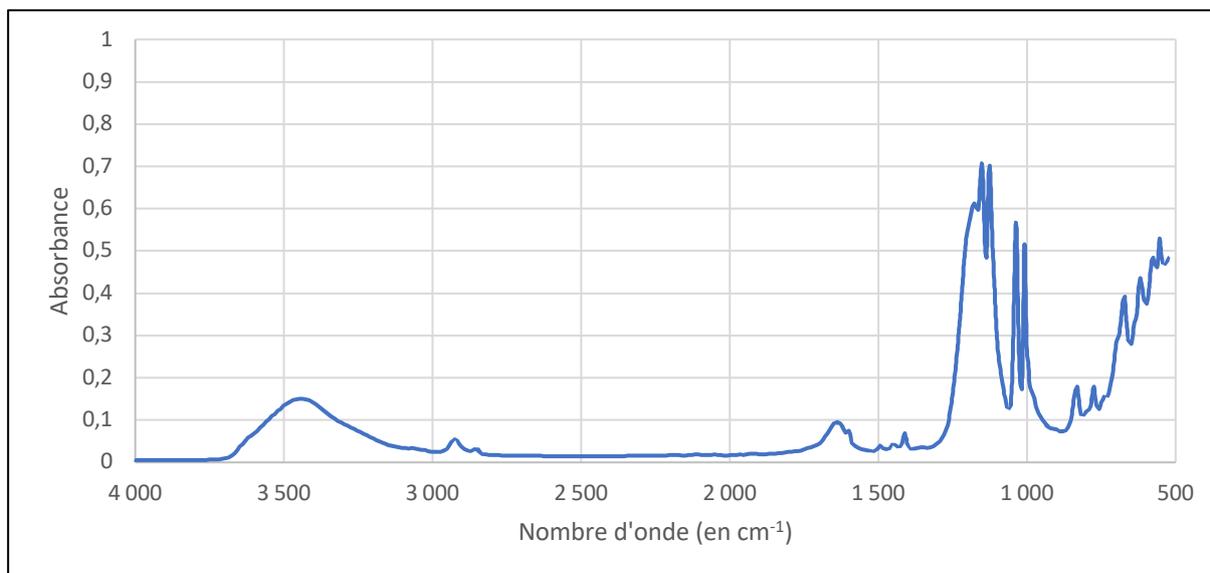


Figure 26 : Spectre ATR IRTF de la membrane du supprimeur

Il apparait donc, avec la modification chimique du supprimeur, deux tendances : les composés qui sont détectés seulement après la modification chimique (ASP, PIC, dAMP, PEA et HYP) ou dont la détection est fortement améliorée (PRO, 2MET-GLU, GLU, TAU et AMP). On note que 6 d'entre eux possèdent un groupement amine primaire ou amine aromatique sous forme ammonium au pH d'élution. Une interaction spécifique entre l'ammonium et les groupements alcoolates de la membrane pourraient expliquer l'adsorption totale ou partielle de ces composés. Cependant, la détection de tous les autres composés s'est détériorée avec ce même processus et plus particulièrement les composés possédant un groupement uracile (UMP, UTP et UDP-GlcA) pour lesquels la détection a été totalement perdue.

Pour la suite des analyses, le supprimeur non-modifié est conservé et les composés non-détectés ou dont le signal est inexploitable sont exclus.

### III.5. ÉTUDE REALISEE SUR DES FLUIDES BIOLOGIQUES

Certains des métabolites correctement détectés avec la méthode précédemment développée sont contenus dans l'urine (18 composés) et la salive (20 composés) (Tableau 10). Ces fluides biologiques ont donc été analysés avec la méthode précédemment développée et les performances de la méthode ont été évaluées pour une analyse des métabolites dans l'urine avec un minimum de préparation d'échantillon. En raison de la pandémie, seule une étude préliminaire a été effectuée sur la salive.

Tableau 10 : Liste des composés présents ou non naturellement dans l'urine et la salive

<b>Composés</b>	<b>Urine</b>	<b>Salive</b>
<b>PRO</b>	Oui	Oui
<b>PYR</b>	Oui	Oui
<b>LAC</b>	Oui	Oui
<b>SUC</b>	Oui	Oui
<b>FUM</b>	Oui	Oui
<b>MAL</b>	Oui	Oui
<b>TAU</b>	Oui	Oui
<b>GLU</b>	Oui	Oui
<b>2MET-GLU</b>	Oui	Non
<b>OXO</b>	Oui	Oui
<b>URA</b>	Oui	Oui
<b>pSer</b>	Oui	Non
<b>CIT</b>	Oui	Oui
<b>ISO</b>	Oui	Oui
<b>G1P</b>	Non	Oui
<b>G6P</b>	Oui	Oui
<b>F6P</b>	Non	Oui
<b>AMPc</b>	Oui	Non
<b>ADP</b>	Oui	Oui
<b>OXA</b>	Oui	Non
<b>R5P</b>	Non	Oui
<b>GMP</b>	Non	Oui
<b>UTP</b>	Non	Oui
<b>ATP</b>	Non	Oui

### III.5.1 ESSAIS PRELIMINAIRES SUR DES ECHANTILLONS COLLECTES

Des essais préliminaires ont été effectués sur des échantillons collectés de salive et d'urine. Pour ces essais, plusieurs facteurs de dilution ont été testés afin de diminuer la concentration des sels tout en conservant une intensité des rapports  $m/z$  des composés en MS satisfaisante. La salive et l'urine ont été diluées par un facteur 2 et un facteur 20, respectivement.

#### III.5.1.1 Analyse des métabolites dans la salive

Un échantillon de salive est collecté, dilué par un facteur 2 et analysé en IC-MS avec la méthode précédemment développée (Tableau 8 et Figure 27).

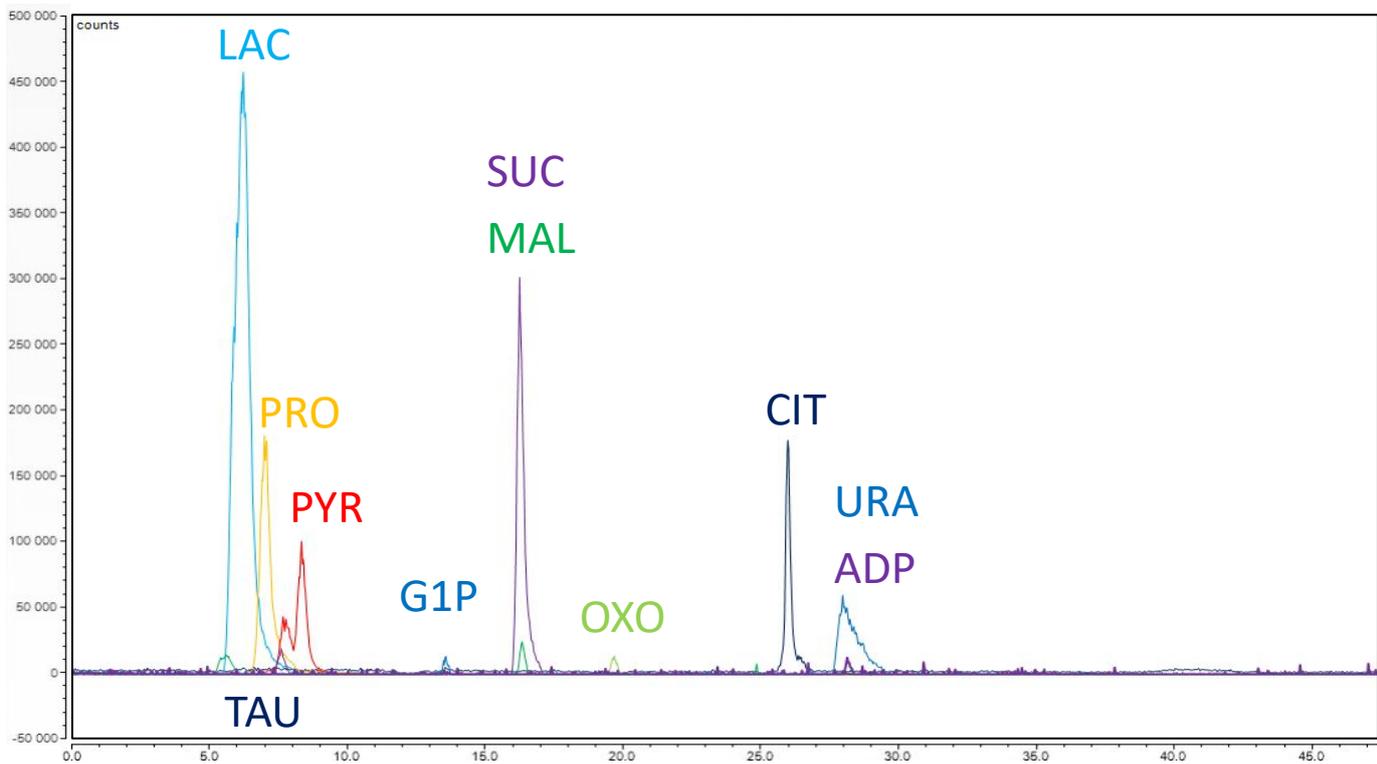


Figure 27 : EIC superposés des métabolites dans la salive diluée par 2

Les temps de rétention des anions contenus dans la salive sont comparés avec les temps de rétention obtenus pour des étalons d'anions inorganiques afin d'identifier chacun des pics du chromatogramme de conductimétrie (Figure 28).

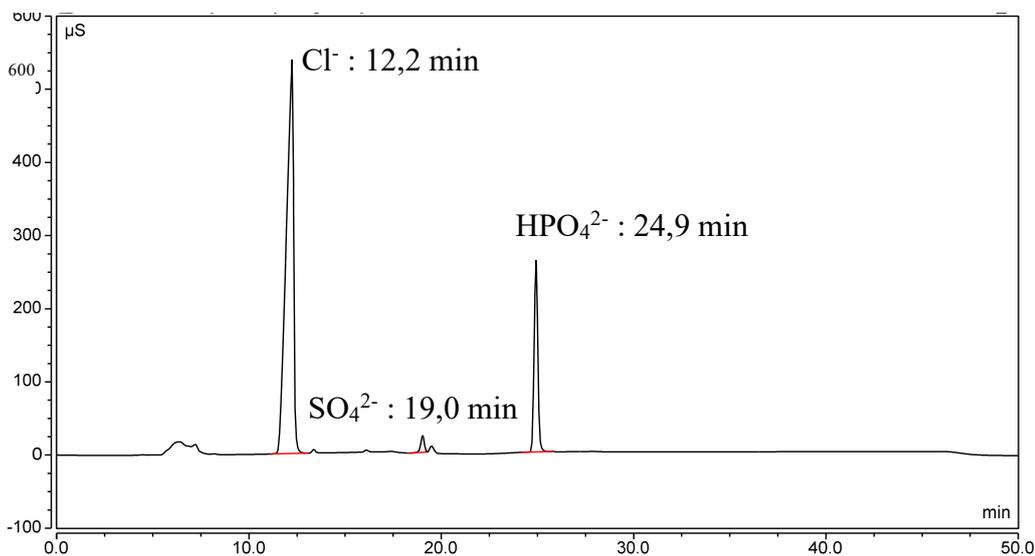


Figure 28 : Chromatogramme obtenu pour l'identification des principaux anions qui composent la salive (détection conductimétrique).

L'analyse d'un échantillon de salive en IC-MS avec une simple dilution a permis la détection de 11 des métabolites ciblés avec succès (Tableau 11). Les métabolites G6P, ISO, GLU, FUM, GMP, ATP, UTP, R5P et F6P théoriquement contenus dans la salive et dont les étalons ont été correctement détectés ne l'ont pas été dans l'échantillon collecté. Il est à noter que cette

différence est très probablement due à une concentration des métabolites dans la salive inférieure à la limite de détection de cette méthode.

Afin d'obtenir un premier aperçu de ces limites de détection, la concentration moyenne de chaque métabolite non détecté est présentée en Tableau 12. Ces concentrations proviennent de la base de données HMDB<sup>[77, 86]</sup> et correspondent à des concentrations chez des individus adultes sains.

Tableau 11 : Ordre d'éluion et temps de rétention des composés dans la salive

Ordre d'éluion	Composé	tr (en min)	Ordre d'éluion	Composé	tr (en min)
1	LAC	6,2	11	ADP	28,1
2	TAU	6,6		G6P	n.d.
3	PRO	6,9		ISO	n.d.
4	PYR	8,2		GLU	n.d.
5	G1P	13,6		FUM	n.d.
6	SUC	16,2		GMP	n.d.
7	MAL	16,3		ATP	n.d.
8	OXO	19,6		UTP	n.d.
9	CIT	26,0		R5P	n.d.
10	URA	28,0		F6P	n.d.

Tableau 12 : Concentrations moyennes des métabolites non détectés chez des individus adultes sains dans la matrice salivaire.

Composé	Concentration moyenne (en $\mu\text{mol/L}$ )
G6P	3,0
ISO	1,0
GLU	0,3
FUM	1,0
GMP	0,2
ATP	0,8
UTP	1,0
R5P	0,8
F6P	0,5

D'après les quantifications déjà reportées sur ces composés dans la salive, les limites de détection des composés pour la méthode développée et une salive diluée par un facteur 2 seraient globalement supérieures à quelques dixièmes de  $\mu\text{moles/L}$ .

### III.5.1.2 Analyse des métabolites dans l'urine

Une urine a été collectée, diluée par un facteur 20 et analysée en IC-MS avec les conditions précédemment optimisées (Tableau 8 et Figure 29).

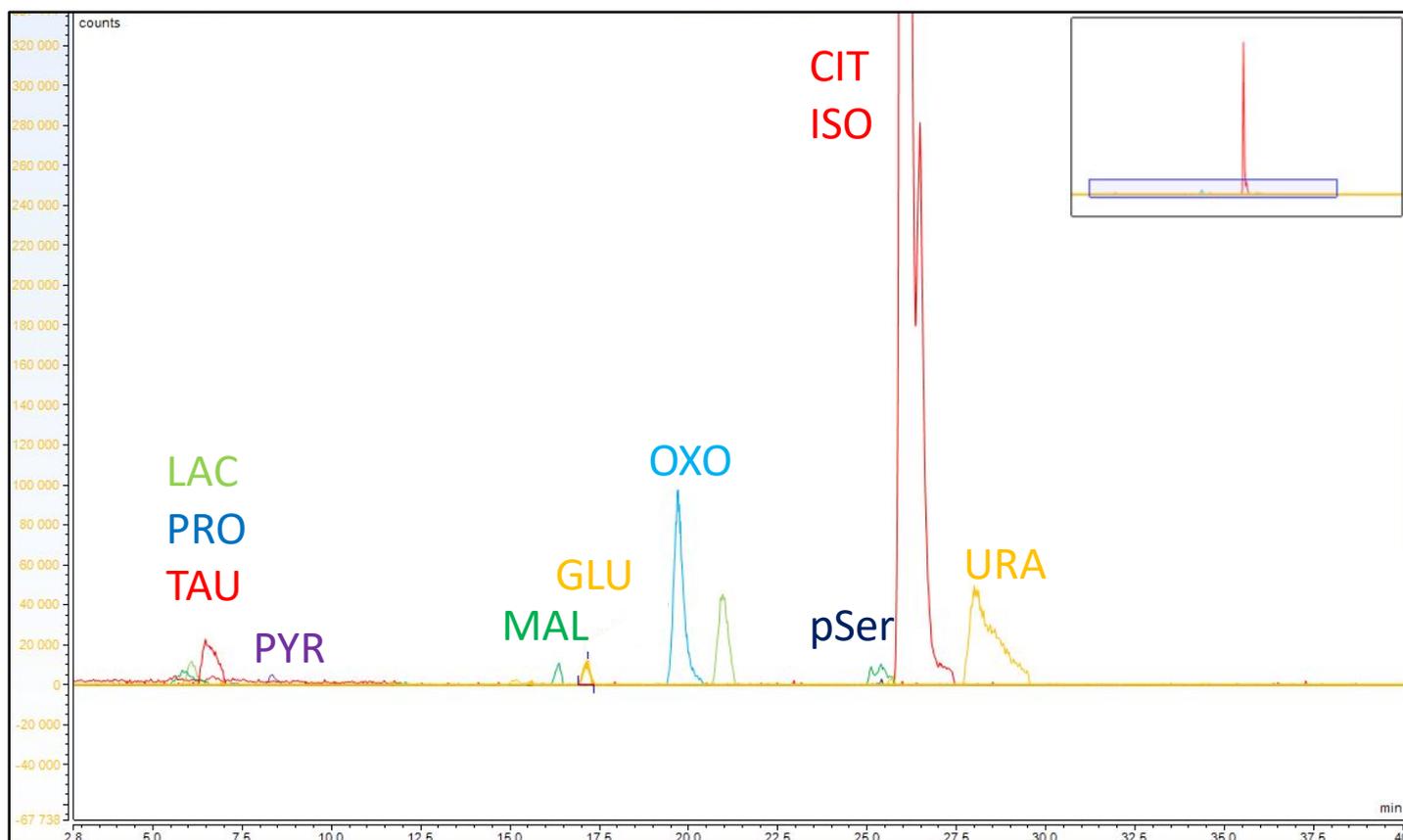


Figure 29 : EIC superposés des métabolites dans l'urine diluée par 20

Les temps de rétention des anions de l'urine sont comparés avec les temps de rétention obtenus pour des étalons d'anions inorganiques afin d'identifier chacun des pics du chromatogramme de conductimétrie. (Figure 30).

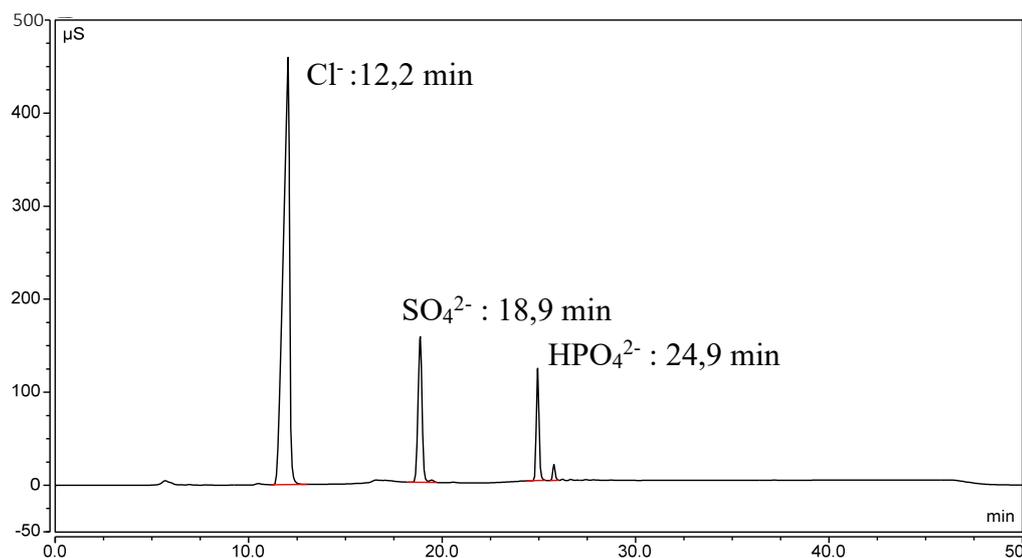


Figure 30 : Chromatogramme obtenu en détection conductimétrique pour l'urine et identification des principaux anions qui la compose

L'analyse d'un échantillon d'urine en IC-MS avec une simple dilution a permis la détection avec succès de 12 des 18 métabolites ciblés (Tableau 13). Les métabolites FUM, AMPc, 2MET-GLU, G6P, ADP et OXA) théoriquement contenus dans l'urine et dont les étalons ont été correctement détectés ne l'ont pas été dans l'échantillon collecté. Tous ces composés ont également été correctement détectés dans une matrice vierge mimant l'urine (Surine Negative Urine control, Cerilliant, Sigma-Aldrich, USA) dopée avec les étalons. Cette absence de détection est donc due à une concentration de ces métabolites dans l'urine plus faible que leur limite de détection avec la méthode. Pour des raisons de rationalité, ces composés sont supprimés de l'étude des performances de la méthode pour cette matrice.

La méthode IC-MS développée pour l'analyse des métabolites dans des fluides biologiques s'est révélée adaptée à la séparation et la détection de 11/20 et 12/18 composés dans la salive et l'urine respectivement. Afin d'évaluer les performances de la méthode appliquée à l'urine, l'optimisation précédente de la quantité optimale de solvant « make-up » est vérifiée. De plus, l'ajout du solvant organique directement dans la PM a également été étudié pour l'analyse de ce fluide biologique.

Tableau 13 : Ordre d'élution et temps de rétention des composés dans l'urine

Ordre d'élution	Composé	t <sub>R</sub> (en min)	Ordre d'élution	Composé	t <sub>R</sub> (en min)
1	LAC	6,0	10	CIT	25,9
2	TAU	6,3	11	ISO	26,4
3	PRO	7,3	12	URA	28,0
4	PYR	8,2		FUM	n.d.
5	MAL	16,3		AMPc	n.d.
6	SUC	16,6		2MET-GLU	n.d.
7	GLU	15,6		G6P	n.d.
8	OXO	19,6		ADP	n.d.
9	pSer	25,3		OXA	n.d.

### Vérification de la quantité optimale de solvant « make-up »

L'étude du solvant « make-up » menée ci-dessus (III.3.1.1) a été faite sur un mélange d'étalons dans l'eau. Afin de vérifier l'influence de la matrice et notamment de la présence de sels sur l'ionisation, cette étude a été refaite sur un échantillon d'urine collectée et diluée 20 fois. Les rapports signal/bruit (S/B) de cinq composés correctement détectés sont comparés sur un seul réplica à 0,05 ; 0,08 et 0,1 mL/min (Figure 31).

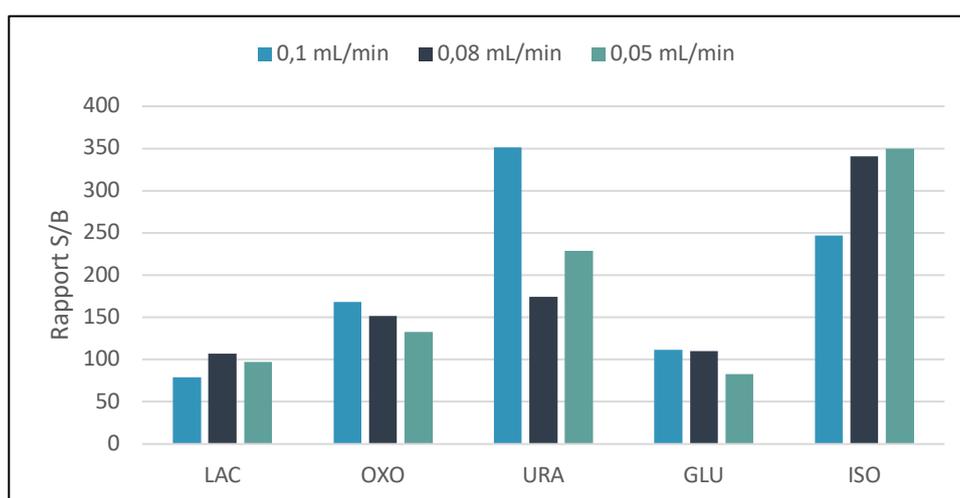


Figure 31 : Rapport signal/bruit des composés dans l'urine en fonction du pourcentage de solvant « make-up » ajouté

D'après les résultats présentés en Figure 31, un meilleur rapport signal/bruit est obtenu pour un débit de solvant de 0,05 mL/min pour l'ISO alors qu'un meilleur S/B est obtenu pour le LAC pour 0,08 mL/min. Pour les 3 autres composés (OXO, URA et GLU) le rapport S/B le plus élevé est obtenu pour un débit de solvant de 0,1 mL/min. Cette tendance a été observée, de

manière générale, pour la majorité des composés. Ce débit correspond à 33% du débit total entrant dans l'ESI, l'ajout de la matrice n'a donc pas modifié l'optimisation du solvant « make-up » effectuée précédemment.

### *Ajout d'un modifiant organique dans la phase mobile*

Dans la littérature, il est commun d'ajouter le solvant organique dans la PM (partie III.1.2- Organic modifier) plutôt qu'en tant que solvant « make-up ». Cette technique permet de limiter les interactions non-ioniques dans la colonne et ainsi affiner les pics chromatographiques et modifier la sélectivité. La séparation entre les espèces organiques et inorganiques pourrait ainsi être améliorée. Cela évite également l'ajout d'une pompe externe supplémentaire pour le solvant « make-up » et sa pression associée ainsi que la dilution de l'échantillon. En revanche, même si la majorité PS sont généralement compatibles avec des PM avec un taux de solvant organique allant jusqu'à 100%, ce n'est pas le cas des supprimeurs. Pour le supprimeur AERS 500e, seulement 40% de solvant organique dans la PM est toléré. De plus, le mode recyclage n'est pas compatible avec l'ajout d'un solvant dans la PM et le supprimeur doit être régénéré de manière externe.

L'optimisation de la nature du solvant adapté à l'ionisation des composés en MS ayant déjà été effectuée, l'ACN sera donc utilisé pour cette étude. La méthode précédemment optimisée a été comparée en termes d'asymétrie, de largeur de pic chromatographique et de rapport S/B à l'ajout de différents pourcentages d'ACN dans la PM sur un échantillon d'urine dilué 20 fois (Figure 32).

D'après les résultats présentés en Figure 32, l'ajout de solvant organique dans la PM a permis globalement d'obtenir des pics plus fins (à 5% d'ACN dans la PM pour GLU et URA et 10% pour LAC et FUM) et plus symétriques (à 15% d'ACN dans la PM pour LAC et FUM ; à 10% pour OXO et GLU et 5% pour URA). En revanche, cela a mené à une moins bonne ionisation avec des rapports signal/bruit pour la majorité des composés, plus faibles que pour l'ajout d'ACN comme solvant « make-up ». De manière générale, l'ajout de solvant organique dans la PM a également diminué la sélectivité, notamment entre le CIT et l'ISO.

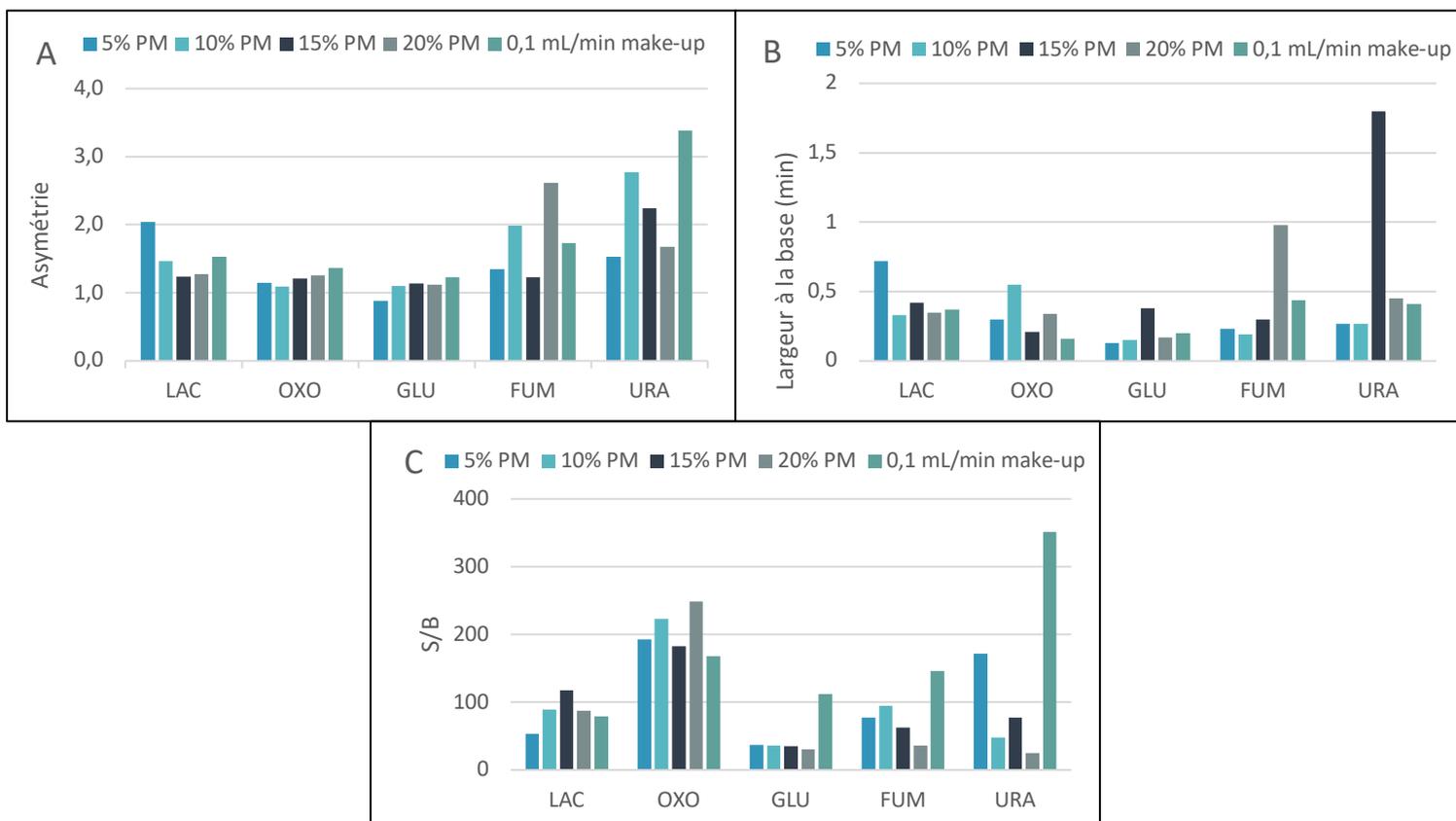


Figure 32 : Étude de la variation des différentes grandeurs en fonction du pourcentage d'ACN dans la PM et comparaison à celles obtenues avec 33% d'ACN en solvant « make-up ». A : Asymétrie ; B : Largeur du pic à la base et C : Rapport signal/bruit

La méthode développée précédemment (partie III.3) a été conservée pour la suite de cette étude car la perte de sélectivité induite par l'ajout de solvant organique dans la PM était préjudiciable à la séparation.

Pour gagner en sensibilité, les temps de rétention des composés étant connus, les ions précurseurs du mode SIM ont été associés à une gamme de temps dans la méthode. Le rapport  $m/z$  sélectionné sera ainsi balayé seulement dans l'intervalle choisi.

### III.5.2 PERFORMANCES DE LA METHODE POUR L'ANALYSE DES METABOLITES DANS L'URINE

Les performances de la méthode sont évaluées pour les 12 composés correctement détectés dans l'urine (Tableau 13) en termes de sensibilité, de linéarité, de répétabilité et d'effet de matrice. La ligne directrice suivie pour cette évaluation est inspirée de celles recommandées par « l'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use » (l'ICH)<sup>[87]</sup> pour la validation d'une méthode. Cette méthode a été évaluée en termes de limites de détection et de quantification, de linéarité, de répétabilité mais également en termes d'effet de matrice.

### III.5.2.1 Étude de la linéarité

La linéarité d'une méthode est définie comme « sa capacité à donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon »<sup>[87]</sup>. La linéarité de la réponse en mode SIM de chaque composé en fonction de la concentration a été étudiée pour 6 concentrations d'étalons entre 10 et 1 000 µg/L (10, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/L) dans l'eau (Tableau 14). Il a été considéré que la réponse suivait un modèle linéaire du type  $y = ax$  (coefficients de corrélation > 0,98).

Tableau 14 : Pentés et coefficients de corrélation de l'étude de linéarité de la méthode

Composé	pen $t$ e a	r <sup>2</sup>	Composé	pen $t$ e a	r <sup>2</sup>
LAC	18,67	0,996	GLU	18,23	0,987
TAU	5,50	0,980	OXO	36,45	0,994
PRO	2,01	0,984	pSer	3,26	0,999
PYR	19,06	0,986	CIT	32,01	0,995
MAL	34,10	0,995	ISO	38,07	0,990
SUC	18,69	0,985	URA	9,06	0,993

### III.5.2.2 Étude de l'effet de matrice

L'effet de matrice est l'influence que porte la matrice sur la justesse de la quantification des composés d'intérêt. Cette influence peut être l'exagération ou la diminution des concentrations déterminées des échantillons. Cette estimation de l'effet de matrice se base sur les droites d'étalonnage des composés dans l'eau et celles établies dans la matrice vierge dopée avec les mêmes concentrations que dans l'eau (Équation 22).

Équation 22 
$$\text{Effet de matrice (EM\%)} = \left( \frac{\text{pen $t$ e de la matrice}}{\text{pen $t$ e du solvant}} - 1 \right) \times 100$$

La matrice vierge utilisée dans ces travaux est la « Surine Negative Urine control » (Cerilliant, Sigma-Aldrich, USA). Cette solution est une urine de synthèse mimant la composition en sels de l'urine.

L'ESI-MS est connue comme peu adaptée à l'analyse de l'urine en raison de la présence de sels pouvant interférer dans le processus d'ionisation et ainsi diminuer le signal. Ce phénomène, peu étudié d'un point de vue fondamental, peut avoir plusieurs origines. Il pourrait y avoir en effet une compétition d'ions au niveau de la formation des gouttelettes chargées pendant la solvatisation mais également un encrassement de la source dû aux sels de la matrice. Bien qu'un tel phénomène ne soit pas un frein à l'obtention de résultats corrects, il peut mener à des limites de quantifications supérieures<sup>[88]</sup>. Plusieurs solutions sont donc envisageables pour y palier : une extraction des composés de la matrice<sup>[89]</sup>, l'ajout d'une division du flux avant l'entrée dans la source<sup>[90]</sup>, l'ajout d'un étalon interne ou une dilution de l'échantillon<sup>[91]</sup>. L'un des objectifs de ces travaux étant d'étudier la faisabilité d'une analyse de l'urine avec un minimum de préparation d'échantillon, la stratégie de la dilution est envisagée. En effet, bien que paraissant contre-intuitif de prime abord, une dilution de l'échantillon permet de diminuer voire supprimer l'effet de matrice induit. Afin d'étudier l'influence de la dilution sur l'effet de matrice, plusieurs facteurs de dilution (DIL2, DIL10 et DIL20) de la matrice ont été testés avec un ajout des métabolites étalons aux mêmes concentrations que dans l'eau (partie III.5.2.1). Des exemples de droites obtenues sont présentés en Figure 33.

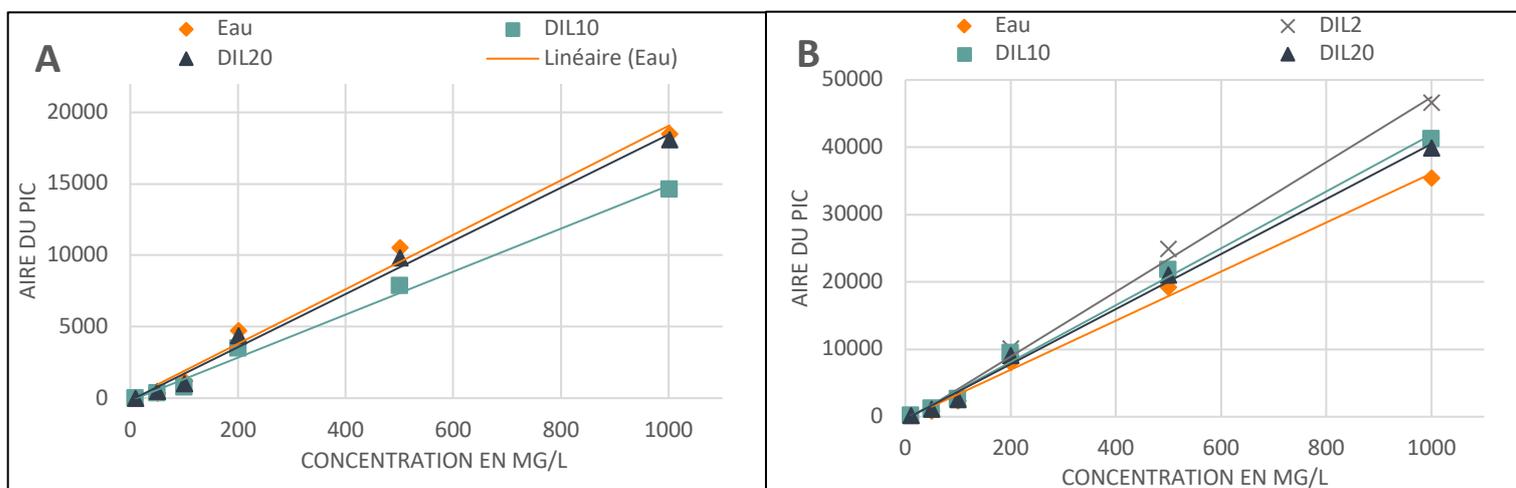


Figure 33 : Effet de la dilution sur l'effet de matrice pour (A) le PYR et (B) l'OXO

Comme observé sur la Figure 33, la matrice diminue le signal du PYR tandis qu'elle exalte le signal de l'OXO. De plus, une dilution par 20 permet d'obtenir une droite dont la pente se rapproche de celle obtenue pour une gamme préparée dans l'eau et donc de diminuer drastiquement l'effet de matrice. Les effets de matrice de l'urine à différents facteurs de dilution ont été calculés pour les 12 composés selon l'Équation 22 et sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Pentas et effets de matrice obtenus pour les gammes étalon dans la matrice vierge à plusieurs facteurs de dilution

Composés	Eau	DIL2		DIL10		DIL20	
	penle	penle	EM%	penle	EM%	penle	EM%
LAC	18,67	n.d.	n.d.	13,36	-28	17,01	-9
TAU	5,50	n.d.	n.d.	4,38	-20	4,64	-16
PRO	2,02	n.d.	n.d.	0,96	-52	1,38	-32
PYR	19,06	n.d.	n.d.	15,05	-21	18,60	-2
MAL	34,10	20,98	-39	35,81	5	38,91	14
SUC	18,69	10,21	-45	19,19	3	17,50	-6
GLU	18,23	8,26	-55	14,77	-19	17,33	-5
OXO	36,45	48,16	32	42,23	16	40,87	12
pSer	3,26	3,60	10	3,66	12	3,74	15
CIT	32,01	32,76	2	32,96	3	33,48	5
ISO	38,07	39,02	3	38,14	-2	38,64	2
URA	9,06	8,71	-4	10,67	18	8,52	-6

Comme observé dans le Tableau 15, pour une dilution de facteur 2, plusieurs composés n'ont pas été détectés en raison d'un effet de matrice trop élevé. De plus, seule la dilution par 20 de la matrice permet d'obtenir des effets de matrice largement inférieurs à 50% pour tous les composés.

Un effet de matrice négatif résulte d'une suppression tandis qu'un effet de matrice positif représente une exaltation du signal. Le signal est diminué pour 7 composés et exalté pour 5 d'entre eux à une dilution par 20. Il est à noter que le signal de certains composés peut être supprimé puis exalté (ou inversement) en augmentant la dilution.

L'effet de matrice étant dans une gamme acceptable pour un facteur de dilution de 20, la répétabilité, les limites de détection et de quantifications ont donc été déterminées dans ces conditions.

### III.5.2.3 Étude de la répétabilité

La répétabilité est définie comme étant « une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps »<sup>[87]</sup>. Cette répétabilité a été déterminée à l'aide du CV% de l'aire de 3 mesures pour chaque concentration et est présentée dans le Tableau 16.

Tableau 16: CV% calculés sur l'aire des pics des EIC des métabolites dans l'urine mimée diluée

Métabolite	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
PRO	71	50	45	6	2	5
PYR	173	2	2	0	1	2
LAC	2	4	2	3	3	3
MAL	22	1	3	3	2	2
SUC	7	6	2	2	3	4
TAU	6	10	3	2	2	2
GLU	9	1	7	3	4	5
OXO	9	4	0	1	1	2
URA	41	4	6	1	2	2
pSer	26	5	2	0	1	1
CIT	28	8	5	1	1	1
ISO	13	8	1	1	1	2

D'après les CV% répertoriés dans le Tableau 16, on remarque qu'une excellente répétabilité (<20%) est obtenue pour les composés LAC, SUC, TAU, GLU, OXO et ISO même à la plus faible concentration de la gamme. De plus, le signal de tous les composés présente une répétabilité satisfaisante dès 50 µg/L excepté pour le PRO pour lequel le signal ne se stabilise que pour des concentrations à partir de 200 µg/L.

La répétabilité des temps de rétention a également été étudiée avec leur CV% sur 3 réplicas pour chaque concentration d'étalons dans l'urine mimée diluée (Tableau 17).

Comme présenté dans le Tableau 17, les temps de rétention obtenus pour chaque composé sont très répétables avec des CV% allant de 0,0 à 1,6%.

Tableau 17 : CV% calculés sur les temps de rétention des métabolites dans l'urine mimée diluée

Métabolite	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
PRO	1,6	0,5	0,4	0,6	0,0	0,2
PYR	1,0	0,4	0,4	0,6	0,5	0,0
LAC	0,4	0,7	0,2	0,5	0,1	0,0
MAL	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
SUC	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
TAU	0,2	0,7	0,9	0,8	0,4	0,2
GLU	0,5	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2
OXO	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2
URA	0,8	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0
pSer	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
CIT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ISO	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

#### III.5.2.4 Estimation des limites de détection

La limite de détection (LD) est définie comme « la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter »<sup>[87]</sup>. Elle est généralement définie comme étant la concentration pour laquelle un rapport S/B supérieur ou égal à 3 est obtenu. Les LD ont été estimées de manière statistique à partir de l'écart type sur l'ordonnée à l'origine  $\sigma_{o,o}$  de la droite d'étalonnage des étalons dans l'eau (Équation 23 et

Tableau 18). Ces limites sont déterminées pour un intervalle de confiance de 95%.

Équation 23

$$LD = \frac{3 \sigma_{o,o}}{\text{pente}}$$

Tableau 18 : LD de la méthode calculée sur 3 répliques pour de l'urine vierge diluée 20 fois et dopée avec les étalons des métabolites

Composé	LD (en µg/L)	Composé	LD (en µg/L)
LAC	88	GLU	100
TAU	159	OXO	67
PRO	113	pSer	29
PYR	104	CIT	163
MAL	95	ISO	108
SUC	110	URA	76

Comme attendu, l'utilisation d'un détecteur de spectrométrie de masse équipé d'un analyseur simple quadripôle mène à une méthode avec des LD plus haute que celles obtenues auparavant

dans la littérature avec un triple quadripôle<sup>[92-94]</sup> ou un analyseur orbitrap<sup>[76, 78, 95]</sup> (partie III.1.2 – Table 2) et des méthodes d'extractions des composés dosés.

En revanche, même si cette méthode est peu sensible, il est important de déterminer si sa sensibilité peut être suffisante pour la quantification des composés dans l'urine en routine. La plupart des concentrations des métabolites dans l'urine sont normalisés par rapport à la créatinine pour tenir compte de la variation naturelle de la concentration de l'urine. Il est donc difficile de se rendre compte de la gamme de concentration des métabolites dans ce fluide biologique et donc d'évaluer l'adéquation de la méthode avec l'abondance naturelle de ces composés. Cependant, Saude *et al.*<sup>[65]</sup> ont rapporté la concentration de quelques métabolites dans une urine saine. Ils ont notamment rapporté que la concentration normale de l'acide citrique était de  $2,54 \pm 1,81$  mM et celle de l'acide lactique de  $0,38 \pm 1,28$  mM. La variabilité de concentration de l'urine selon les individus est responsable des incertitudes élevées de ces valeurs. D'après les LD déterminées ci-dessus, l'acide citrique et l'acide lactique sont détectables jusqu'à des concentrations de 849 nM et 977 nM respectivement avec cette méthode. Ces LD impliquant une dilution par 20 de l'urine, les concentrations normales en acide citrique et lactique sont de 127  $\mu$ M et de 19  $\mu$ M dans l'urine diluée. Sigler *et al.*<sup>[96]</sup> ont également déterminé la gamme de concentration de l'acide pyruvique dans l'urine diluée 50 fois. Cette concentration varie de 2,36 à 5,84 mg/L pour un panel d'échantillon. Ces trois composés peuvent donc être correctement détectés dans l'urine en IC-MS.

### III.5.2.5 Estimation des limites de quantification

La limite de quantification (LQ) d'une méthode pour un composé est définie comme étant « la plus faible quantité de substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude. La LQ est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faibles quantités dans les matrices d'échantillon »<sup>[87]</sup>. Comme pour les LD, les LQ ont été estimées statistiquement avec l'écart type de l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage dans l'eau selon l'Équation 24. Les LQ calculées avec un intervalle de confiance de 95% sont présentées dans le Tableau 19.

Équation 24

$$LQ = \frac{10 \sigma_{o.o}}{\text{pente}}$$

Tableau 19 : LQ de la méthode pour les métabolites dans l'urine mimée diluée 20 fois

<b>Composé</b>	<b>LQ (en µg/L)</b>	<b>Composé</b>	<b>LQ (en µg/L)</b>
<b>LAC</b>	294	<b>GLU</b>	334
<b>TAU</b>	531	<b>OXO</b>	222
<b>PRO</b>	376	<b>pSer</b>	98
<b>PYR</b>	345	<b>CIT</b>	542
<b>MAL</b>	316	<b>ISO</b>	360
<b>SUC</b>	366	<b>URA</b>	253

Si l'on reprend les exemples de concentration des métabolites annoncés par Saude *et al.*<sup>[65]</sup> et Sigler *et al.*<sup>[96]</sup>, la méthode est assez performante pour être utilisée pour la quantification de CIT, LAC et PYR dans l'urine.

### III.6. TRANSPOSITION AU FORMAT CAPILLAIRE

Les avantages précédemment évoqués (partie I.4) du format capillaire sont très intéressants pour les matrices de haute valeur ajoutée comme le sont les échantillons biologiques. Le système IC capillaire étant opérationnel en tout temps, c'est également un avantage indéniable pour une analyse de routine. En effet, ce système consommant peu de PM, il est possible et même conseillé de ne pas l'éteindre. Afin d'évaluer la compatibilité du format capillaire pour ces travaux, la méthode développée précédemment est transposée à ce format sur un système HPIC (High-pressure ion chromatography) ICS4000 (Dionex) couplé à l'ESI-ISQ EC présenté en Annexe 6.

#### III.6.1 STRATEGIE DE TRANSPOSITION DE LA METHODE

Pour la transposition de la méthode précédemment développée, le système est équipé d'une colonne AS11-HC au format 0,4x250 mm. Cette colonne contient la même PS que le format conventionnel avec les mêmes tailles de particules (4 µm). La transposition du débit d'analyse a été faite avec un rapport égal à celui des diamètres de colonne au carré, soit un rapport de 25. Le débit imposé est donc de 8 µL/min. La méthode reposant sur un gradient de concentration d'éluant, la transposition sur un autre appareil doit se faire par rapport au volume de délai des deux appareils<sup>[1]</sup> (partie I.1.1.3). Ce volume de délai est déterminé avec la rupture de pente obtenue pour un gradient de pente élevée imposé sans suppression. Ce gradient débute à 0 mM et fini à 100 mM en 15 min avec un débit de 0,3 mL/min en IC conventionnelle et de 0,012 mL/min en IC capillaire (Figure 34).

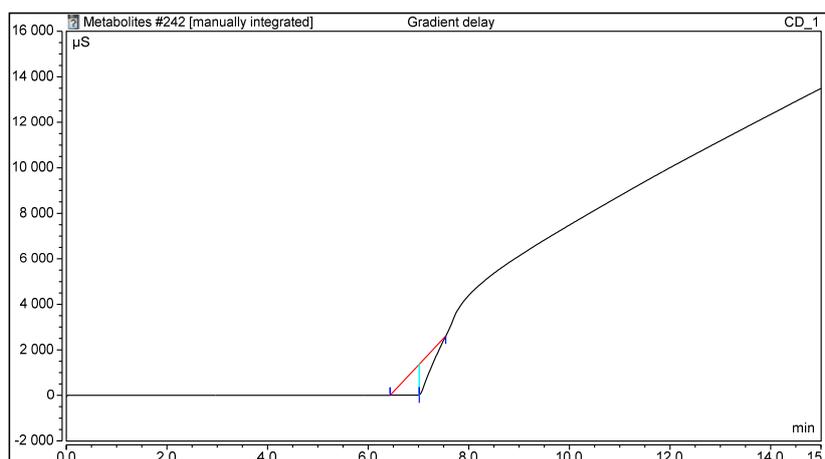


Figure 34 : Rupture de pente utilisée pour déterminer le volume de délai

Avec le temps de la rupture de pente et le débit, le volume de délai est calculé (Tableau 20).

Tableau 20 : Volumes de délai des deux systèmes utilisés

	IC conventionnelle	IC capillaire
Volume de délai (mL)	1,403	0,028

Guillarme *et al.*<sup>[3]</sup> ont mis au point une feuille de calcul disponible en ligne permettant le transfert d'un gradient d'un système à un autre en prenant en compte le volume de délai, les dimensions de la colonne et des tailles de particules. Le gradient recommandé est présenté dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Gradient optimisé pour la méthode IC capillaire-MS

Temps (min)	[NaOH] (en mM)
0,0	5
3,56	5
13,56	20
18,56	20
23,56	60
43,56	70
43,66	5
53,56	5

D'après cette feuille de calcul, les performances de la méthode transférée seront sensiblement les mêmes que la méthode originale, avec une consommation de solvant diminuée (Figure 35). Ces prédictions de performances sont données pour des volumes injectés équivalents ( $V_{inj}^{conv} = 10 \mu\text{L}$  et  $V_{inj}^{cap} = 0,4 \mu\text{L}$ ).

Flow rate: 8 $\mu$ L/min	
Efficiency	+ 0.1
Pressure	+ 0.1
Analysis time	x 0.1
Solvent consumption	+ 2.3

Figure 35 : Performances de la méthode transférée comparée à la méthode originale<sup>[3]</sup>

Avant l'évaluation des performances de la méthode sur ce format, il a été vérifié que les optimisations de débit de solvant « make-up » précédemment établies étaient les mêmes pour le format capillaire. Un débit de 4  $\mu$ L/min d'ACN a donc été imposé pour correspondre à 33% de solvant « make-up ».

La méthode transposée est donc la suivante :

Débit : 8  $\mu$ L/min

Gradient : Tableau 21

Volume injecté : 0,4  $\mu$ L

Débit de solvant « make-up » : 4  $\mu$ L/min

### III.6.2 MODIFICATIONS DE L'APPAREILLAGE

L'un des avantages de la chromatographie au format capillaire est un effet de dilution par la PM réduit et donc une sensibilité accrue. Cependant, cet avantage n'est possible que pour des volumes d'injection identiques. L'appareil de chromatographie ionique capillaire étant équipé d'une vanne dans laquelle la boucle d'injection de faible volume est gravée, un changement de la vanne d'injection par une vanne 6 voies a été nécessaire. Cette vanne a ensuite été équipée d'une boucle d'injection de 10  $\mu$ L.

En chromatographie ionique capillaire, le suppresser est conçu pour être utilisé en mode recyclage. Ce mode n'étant pas compatible avec le couplage à la MS, le suppresser a donc été alimenté en eau par une pompe externe.

L'ajout de solvant « make-up » avant la source ESI nécessite une pompe externe supplémentaire. Cependant, les faibles débits requis nécessitent l'utilisation d'une pompe appropriée non disponible au laboratoire. La pompe HPG 3400 RS est recommandée pour une utilisation allant de 0,05 à 8 mL/min mais permet de fixer des débits jusqu'à 0,001 mL/min. Le volume délivré pour cette pompe à 4  $\mu$ L/min pendant un temps donné a été vérifié et correspond à la valeur attendue. Cette pompe est donc utilisée pour délivrer le débit de solvant « make-up ».

### III.6.3 ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE TRANSPOSEE

#### III.6.3.1 Étude de la linéarité

La linéarité de la réponse SIM de chaque composé en fonction de la concentration est étudiée pour 4 concentrations entre 10 et 1 000 µg/L (10, 50, 100 et 1000 µg/L) dans l'eau pour les 12 composés déjà analysés sur l'appareil conventionnel uniquement (III.5.2.1) (Tableau 22).

Tableau 22 : Pentés et coefficients de corrélation de la gamme étalon des métabolites avec la méthode IC capillaire-MS.

<b>Composé</b>	<b>Pente a</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Composé</b>	<b>Pente a</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>PRO</b>	4,40	0,998	<b>GLU</b>	20,31	0,999
<b>PYR</b>	18,64	0,998	<b>OXO</b>	35,99	0,999
<b>LAC</b>	13,35	0,999	<b>URA</b>	7,12	0,998
<b>SUC</b>	22,34	1,000	<b>pSer</b>	17,75	0,999
<b>TAU</b>	2,66	1,000	<b>CIT</b>	37,50	0,999
<b>MAL</b>	49,30	0,999	<b>ISO</b>	76,79	0,999

Comme précédemment, la linéarité suit un modèle du type  $y = ax$ . Des coefficients de corrélation plus proches de 1 sont obtenus sur ce format. Cela peut s'expliquer par une meilleure ionisation des composés dans la source lorsque de faibles débits sont utilisés.

#### III.6.3.2 Étude de répétabilité

Pour cette étude, le CV% calculé sur l'aire du pic sur 3 mesures est déterminé pour chaque concentration des étalons dans l'eau et présenté dans le Tableau 23.

Dans ces conditions, comme on peut le constater, les composés PRO, LAC et GLU ont un signal répétable pour toute la gamme de concentration et les composés PYR, OXO, URA et pSer ne sont pas détectés à la plus faible concentration de la gamme. Pour le PYR, l'URA, la TAU et le SUC, des valeurs de CV% supérieures à 20% ne suivant aucune logique par rapport à la concentration sont obtenues. Concernant l'OXO, aucune répétabilité satisfaisante n'a été obtenue sur la gamme de concentration. Enfin, le CIT, l'ISO et le MAL ont atteint une répétabilité satisfaisante à partir d'une certaine concentration (1000, 500 et 50 µg/L respectivement).

Tableau 23: CV% calculés sur l'aire du pic sur 3 injections pour les composés à différentes concentrations avec la méthode IC capillaire-MS

	CV%				
	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
PRO	16	4	19	9	2
PYR	n.d.	10	32	1	4
LAC	13	8	6	8	8
SUC	7	24	4	3	3
TAU	20	3	27	27	3
GLU	12	18	8	3	1
OXO	n.d.	21	33	87	25
URA	n.d.	19	44	11	4
pSer	n.d.	11	14	9	6
CIT	152	35	48	23	14
ISO	131	48	29	2	6
MAL	55	13	6	10	7

La réduction des débits d'analyse et de solvant « make-up » améliorent théoriquement l'ionisation du spray en MS et donc la répétabilité du signal. Cependant, comme observé dans le Tableau 23, ce n'est pas le cas pour cette méthode. Ce manque de répétabilité peut provenir de la fluctuation du débit d'ACN délivré par la pompe HPG 3400 RS qui induit une fluctuation de l'efficacité d'ionisation des composés.

La répétabilité des temps de rétention a également été étudiée par la détermination des CV% calculés sur le temps de rétention (Tableau 24).

L'analyse en IC capillaire-MS s'est montrée très répétable avec des CV% calculés sur le temps de rétention des composés dans l'eau compris entre 0,0 et 3,4%.

Tableau 24 : CV% calculés sur le temps de rétention des métabolites dans l'eau sur 3 injections

Métabolite	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L
PRO	3,4	0,3	0,3	0,8	0,5
PYR	n.d.	0,7	0,6	0,6	0,3
LAC	3,2	0,3	0,2	0,2	0,4
MAL	0,4	0,2	0,3	0,3	0,5
SUC	0,5	0,3	0,4	0,5	0,1
TAU	3,1	1,8	1,6	2,1	2,2
GLU	0,8	0,3	0,2	0,4	0,3
OXO	n.d.	0,4	0,2	0,2	0,1
URA	n.d.	0,1	0,2	0,0	0,2
pSer	n.d.	0,1	0,2	0,0	0,3
CIT	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1
ISO	0,9	0,3	0,7	0,4	0,1

### III.6.3.3 Estimation des limites de détection et de quantification

Les LD et LQ sont déterminées, comme précédemment, selon une méthode statistique (Équation 23 et Équation 24). Ces limites sont déterminées pour chaque étalon dans l'eau et répertoriées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : LD et LQ estimées pour l'analyse des métabolites en IC capillaire-MS

Composé	LD (en µg/L)	LQ (en µg/L)	Composé	LD (en µg/L)	LQ (en µg/L)
LAC	37	122	GLU	42	139
TAU	7	23	OXO	25	82
PRO	41	136	pSer	35	116
PYR	59	198	CIT	34	114
MAL	28	92	ISO	34	114
SUC	5	17	URA	47	156

Conformément à la théorie et aux attentes, la chromatographie ionique capillaire conduit à des LD inférieures à celles obtenues pour le format conventionnel pour un même volume d'injection. Cette sensibilité accrue est due à un effet de dilution diminué et une ionisation facilitée pour des petits débits d'analyse.

La méthode développée adaptée au format capillaire s'est donc montrée très répétable et plus sensible que la méthode appliquée sur le format conventionnel. De plus, l'appareil d'IC capillaire dont la consommation en éluant est faible, il peut être laissé en fonctionnement et donc être toujours prêt à être utilisé. Ces avantages en font un appareil adapté à l'analyse en routine et donc à l'application visée.

## CONCLUSION

---

Afin de développer une méthode en IC-MS pour l'analyse de 52 métabolites polaires ionisés ou ionisables, plusieurs optimisations ont été nécessaires. D'abord, les paramètres de spectrométrie de masse ont été optimisés et les rapports  $m/z$  des composés étudiés ont été déterminés. Ensuite, la nature et le débit du solvant « make-up » ont été choisis pour obtenir un spray stable et un signal de MS intense. Enfin, une étude de pH a été menée pour tenter d'obtenir des formes largement prédominantes ( $pK_a \pm 2$ ) de tous les composés. Cependant, la quantité de sels ajoutés pour modifier le pH a entraîné une importante suppression du signal. Pour le développement de la méthode de routine, l'étude a été poursuivie sur un analyseur simple quadripôle dont les laboratoires sont plus facilement équipés. La plus faible sélectivité de cet analyseur ayant entraîné la détection de plusieurs composés pour le même rapport  $m/z$ , il a été nécessaire d'améliorer la séparation chromatographique par la modification du gradient d'éluant. Cette méthode ainsi optimisée a permis de détecter avec succès 35 composés sur les 47 analysés.

Parmi les 12 composés non détectés en IC-MS, 5 ne l'ont jamais été, 7 l'étaient avec l'analyseur triple quadripôle et 6 l'ont été avec la modification chimique des membranes du suppresseur. La tendance des amines primaires à être adsorbées sur la surface des membranes a été mise en évidence et la composition des membranes a été déterminée comme étant un copolymère EVOH.

La méthode IC-MS développée a été appliquée à l'analyse des métabolites dans la salive et dans l'urine. 11 des 20 métabolites contenus dans la salive ont été détectés avec succès. Pour l'urine, 12 composés sur 18 ont été détectés. Les composés n'ayant pas été détectés dans les matrices collectées sont probablement présents à des concentrations inférieures aux LD. Les performances de la méthode pour l'analyse des métabolites dans l'urine ont été estimées en termes de linéarité, de LD et LQ, de répétabilité et d'effets de matrice. Les effets de matrice ont été fortement réduits avec une simple dilution et la méthode s'est révélée être répétable pour des concentrations à partir de 50  $\mu\text{g/L}$  pour tous les composés excepté l'acide propionique. De plus, les limites de quantification et de détection semblent suffisamment faibles pour permettre l'analyse des métabolites dans des échantillons d'urine.

Les avantages de la chromatographie au format capillaire sont nombreux. Parmi ces avantages, le gain en sensibilité et en stabilité lors d'un couplage à la spectrométrie de masse semblaient appropriés au développement d'une méthode de routine. En comparant les résultats obtenus sur les deux appareils pour des paramètres adaptés et un même volume d'échantillon

injecté, l'IC capillaire-MS a conduit à des analyses répétables en termes de temps de rétention et plus sensibles. Ces avantages ajoutés à la faible consommation en éluant et un système toujours opérationnel font du format capillaire un système adapté au développement d'une méthode de routine.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

L'objectif principal de cette thèse était de développer une méthode de routine en IC-MS pour l'analyse de métabolites polaires ionisés et/ou ionisables dans divers fluides biologiques. Cette technique chromatographique étant spécifique de l'analyse de composés polaires à très polaires sous forme ionique, elle a été appliquée à l'analyse de 52 métabolites dont le LogP varie de -9,87 à 1,29.

En chromatographie ionique, les phases stationnaires étant peu caractérisées, le choix d'une PS pour une application peut être difficile. L'étude des mécanismes de rétention de plusieurs phases stationnaires polymériques échangeuses d'anions a donc été effectuée. Plusieurs modèles d'étude de la rétention selon la concentration de l'éluant et de la température ont été appliqués et l'influence des interactions secondaires a été mise en évidence. D'après cette étude, la colonne AS11-HC s'est révélée être la plus adaptée à l'application visée. En effet, au-delà de sa haute capacité, cette colonne présente également une faible contribution des interactions non-ioniques ce qui permet d'éviter un élargissement des pics chromatographiques. De plus, l'influence du format de la colonne et de l'appareillage sur les performances chromatographiques a été étudié. Il a été conclu des courbes de Van Deemter que l'impact des volumes extra-colonne n'est pas négligeable au format capillaire, même en utilisant un appareillage commercial dédié, diminuant les performances chromatographiques.

Le couplage de la chromatographie ionique à la spectrométrie de masse est indispensable en raison des faibles concentrations des métabolites selon les matrices et de la nécessité d'identification. Pour un tel couplage, alors que les solutés sont déjà sous forme ionique, la source ESI apparaît comme la plus adaptée. En revanche, ce type de couplage nécessite l'utilisation d'un supprimeur pour neutraliser la PM et l'ajout d'un solvant « make-up » pour faciliter la désolvatation des solutés dans la source. Pour le développement de la méthode en IC-MS pour la séparation des métabolites, une grande attention a donc été portée sur le supprimeur (type, courant) et l'ajout du solvant organique (nature, débit). Il a été démontré qu'un supprimeur électrolytique régénéré en mode externe avec un courant de suppression calculé par rapport à la concentration maximale du gradient était le plus adapté. Pour l'ajout de solvant organique, il a été démontré que l'ACN menait à un spray plus stable et que le méthanol conduisait à une meilleure sensibilité. Notre choix s'est porté sur l'ACN pour favoriser la robustesse de la méthode. Un débit de 0,1 mL/min correspondant à 33% du débit total s'est révélé être le meilleur compromis pour obtenir la sensibilité la plus élevée. La méthode développée a ainsi permis la séparation et la détection de 35 métabolites en moins de 40 minutes dans l'eau.

Des interactions entre certains métabolites et les membranes échangeuses de cations du supprimeur ont été mises en évidence. Ces interactions ont pu être supprimées par une

modification chimique de la surface des membranes échangeuses de cations. Cependant, des interactions avec d'autres composés ont été créées, diminuant l'intensité du signal pour la majorité des composés. Si une conclusion globale devait être faite sur l'utilisation du suppresseur : bien qu'indissociable de la chromatographie ionique moderne, ce module très onéreux souffre d'un manque de robustesse pour des travaux de recherche et notamment lors d'un couplage à la spectrométrie de masse avec une durée de vie moyenne de 6 mois. De plus, les interactions possibles des solutés avec les membranes du suppresseur en font une limitation supplémentaire à certaines applications.

Une étude du pH a été effectuée avec, notamment, l'ajout d'un additif dans le solvant « make-up » pour optimiser l'intensité du signal. Cependant, les résultats n'ont pas été satisfaisants et le solvant organique sans additif a finalement été conservé pour la suite de l'étude.

L'analyse des métabolites dans les fluides biologiques avec une source ESI est compliquée par la teneur en sels de cette matrice pouvant induire la suppression de certains ions et l'encrassement de la source. C'est pourquoi, dans la littérature, l'analyse de l'urine se fait généralement après l'extraction des composés. Cependant, les avantages de la chromatographie ionique étant la rétention des sels et la modification des contre-ions de ce dernier grâce au suppresseur, il est possible de limiter cet effet sur les composés élués. Après l'analyse d'échantillons d'urine et de salive simplement dilués, l'étude des performances d'une analyse des métabolites dans l'urine a été réalisée. La synthèse du nombre de métabolites correctement identifiés avec cette méthode selon les matrices (eau ou urine) par rapport à la liste ciblée est présentée en Figure 36.

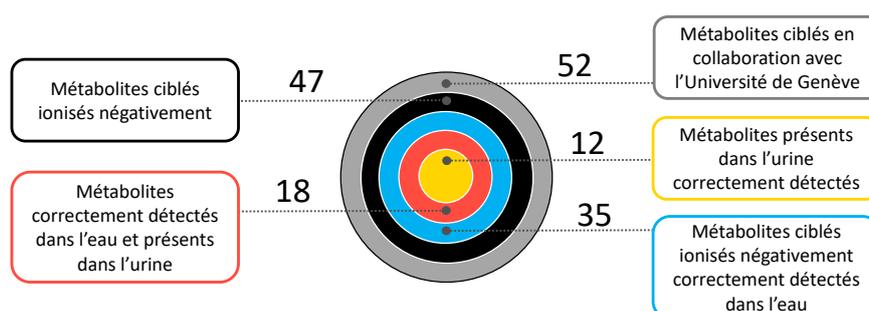


Figure 36 : Synthèse du nombre de métabolites ciblés correctement détectés selon la matrice avec la méthode développée

Appliquée à l'analyse de ces métabolites dans l'urine diluée, la méthode a permis de détecter 12 composés sur 18. Une simple dilution s'est révélée suffisante pour limiter les effets de matrice. Ces derniers sont compris dans une gamme allant de -31,5 à 14,8% avec une dilution par un facteur 20. La méthode développée est répétable et possède des limites de détection et de quantification compatibles avec les concentrations des métabolites dans l'urine.

Les performances de la méthode au format conventionnel et au format capillaire ont été comparées. Les débits d'analyse réduits en chromatographie ionique capillaire diminuent l'effet de dilution de l'échantillon et favorisent l'ionisation des composés dans la source ESI. Ainsi, la méthode transposée à ce format réduit se trouve être plus sensible que la méthode appliquée sur le format conventionnel avec des temps de rétention répétables. Ce format est donc très adapté à l'analyse de routine développée.

Des essais préliminaires prometteurs ont été obtenus sur la salive diluée mais ont été interrompus en raison de la pandémie. En effet, parmi les 20 métabolites contenus dans la salive, 11 ont été détectés avec succès avec une simple dilution par un facteur 2. L'évaluation de la méthode développée pourra être également étendue à d'autres matrices biologiques.

Afin notamment de pouvoir ajouter à la méthode des métabolites cationiques ainsi que la créatinine pour la normalisation, une méthode pourrait être développée en IC anionique-IC cationique couplées à la spectrométrie de masse. Un même échantillon est injecté successivement en IC anionique puis en IC cationique au format capillaire avant détection par spectrométrie de masse. Des essais préliminaires prometteurs de ce couplage ont d'ailleurs été réalisés.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Guillaume, D.; Nguyen, D. T.-T.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed with Small Particle. Part I: Isocratic Separation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2007**, *66* (3), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.027>.
- [2] Guillaume, D.; Nguyen, D.T.T; Rudaz, S.; Veuthey, J.L. Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed with Small Particle. Part II: Gradient Experiments. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *68*, 430–440. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.018>.
- [3] Guillaume, D.; Nguyen, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L. Sciences analytiques - HPLC Calculator <https://ispso.unige.ch/labs/fanal/hplc-calculator> (accessed Feb 11, 2021).
- [4] Mortier, A. Aspects théoriques de la séparation chromatographique <https://slideplayer.fr/slide/3683759/> (accessed Apr 3, 2021).
- [5] Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases. *Biochem. J.*, **1941**, *35* (12), 1358–1368. <https://doi.org/10.1042/bj0351358>.
- [6] van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A. Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography. *Chem. Eng. Sci.*, **1956**, *5* (6), 271–289. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(56\)80003-1](https://doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1).
- [7] Guillaume, D.; Bobaly, B.; Veuthey, J.L. Sciences analytiques - Practical HPLC simulator [https://ispso.unige.ch/labs/fanal/practical\\_hplc\\_simulator](https://ispso.unige.ch/labs/fanal/practical_hplc_simulator) (accessed Feb 25, 2021).
- [8] Billen, J.; Guillaume, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Ritchie, H.; Grady, B.; Desmet, G. Relation between the Particle Size Distribution and the Kinetic Performance of Packed Columns. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1161* (1–2), 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.088>.
- [9] Matsushita, S.; Tada, Y.; Baba, N.; Hosako, K. High-Performance Ion Chromatography of Anions. *J. Chromatogr. A*, **1983**, *259*, 459–464. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88034-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88034-1).
- [10] Weiss, J. *Handbook of Ion Chromatography*, 4th ed.; Wiley-VCH, 2016; Vol. 1.
- [11] Zatirakha, A. V.; Smolenkov, A. D.; Shpigun, O. A. Preparation and Chromatographic Performance of Polymer-Based Anion Exchangers for Ion Chromatography: A Review. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, *904*, 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.012>.
- [12] Warth, L. M.; Fritz, J. S. Effect of Length of Alkyl Linkage on Selectivity of Anion-Exchange Resins. *J. Chromatogr. Sci.*, **1988**, *26* (12), 630–635. <https://doi.org/10.1093/chromsci/26.12.630>.

- [13] Tanaka, N.; Kobayashi, H.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T. Monolithic Silica Columns for High-Efficiency Chromatographic Separations. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *965* (1–2), 35–49. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01582-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01582-5).
- [14] Wieder, W.; Bisjak, C. P.; Huck, C. W.; Bakry, R.; Bonn, G. K. Monolithic Poly(Glycidyl Methacrylate-Co-Divinylbenzene) Capillary Columns Functionalized to Strong Anion Exchangers for Nucleotide and Oligonucleotide Separation. *J. Sep. Sci.*, **2006**, *29* (16), 2478–2484. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600146>.
- [15] Ueki, Y.; Umemura, T.; Li, J.; Odake, T.; Tsunoda, K. Preparation and Application of Methacrylate-Based Cation-Exchange Monolithic Columns for Capillary Ion Chromatography. *Anal. Chem.*, **2004**, *76* (23), 7007–7012. <https://doi.org/10.1021/ac040079g>.
- [16] Li, Y.; Gu, B.; Dennis Tolley, H.; Lee, M. L. Preparation of Polymeric Monoliths by Copolymerization of Acrylate Monomers with Amine Functionalities for Anion-Exchange Capillary Liquid Chromatography of Proteins. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216* (29), 5525–5532. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.037>.
- [17] Nordborg, A.; Hilder, E. F. Recent Advances in Polymer Monoliths for Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, *394* (1), 71–84. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2636-9>.
- [18] Liu, X.; Wang, Y.; Cong, H.; Shen, Y.; Yu, B. A Review of the Design of Packing Materials for Ion Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2021**, *1653*, 462313. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462313>.
- [19] Small, Hamish.; Stevens, T. S.; Bauman, W. C. Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductimetric Detection. *Anal. Chem.*, **1975**, *47* (11), 1801–1809. <https://doi.org/10.1021/ac60361a017>.
- [20] Haddad, P. R.; Croft, M. Y. The Determination of Lactate, Acetate, Chloride and Phosphate in an Intravenous Solution by Non-Suppressed Ion Chromatography. *Chromatographia*, **1986**, *21* (11), 648–650. <https://doi.org/10.1007/BF02311921>.
- [21] Foley, R. C. L.; Haddad, P. R. Conductivity and Indirect UV Absorption Detection of Inorganic Cations in Non-Suppressed Ion Chromatography Using Aromatic Bases as Eluents. *J. Chromatogr. A*, **1986**, *366*, 13–26. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93451-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93451-X).
- [22] Thermo Scientific. Dionex Eluent Suppressor for Ion Chromatography, 2015.
- [23] Thermofisher Scientific. Dionex CRS 500 Product Manual, 2015.
- [24] Metrohm. La Suppression En Chromatographie Anionique, 2022.
- [25] Al-Omar, A. S.; Todd, J. F. J. Preliminary Studies on Ion Chromatography/Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry for the Characterization of Various Ionic Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1989**, *3* (11), 405–409. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290031108>.

- [26] Buchberger, W.; Haider, K. Studies on the Combination of Ion Chromatography-Particle-Beam Mass Spectrometry with Capillary Columns. *J. Chromatogr. A*, **1997**, *770* (1–2), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00023-X).
- [27] Parr, M. K.; Wüst, B.; Teubel, J.; Joseph, J. F. Splitless Hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI Exemplified by Steroids as Model Compounds. *J. Chromatogr. B*, **2018**, *1091*, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.017>.
- [28] Leban, M. Apport des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse tandem aux dosages des stéroïdes. *Médecine Nucléaire*, **2013**, *37* (1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2012.12.001>.
- [29] Mesmin, C. Application de la spectrométrie de masse à l'identification et la quantification de peptides biomarqueurs. **2012**. <https://doi.org/10.13140/2.1.3627.0405>.
- [30] Faktor, J.; Dvorakova, M.; Maryas, J.; Struharova, I.; Bouchal, P. Identification and Characterisation of Pro-Metastatic Targets, Pathways and Molecular Complexes Using a Toolbox of Proteomic Technologies. *Klin Onkol*, **2012**, *25 Suppl 2*, 2S70-77.
- [31] Rokushika, S.; Zong, Y. Q.; Zhuo, L. S.; Hatano, H. Microbore Packed-Column Anion Chromatography Using a UV Detector. *J. Chromatogr. A*, **1983**, *280*, 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91539-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91539-5).
- [32] Linda, R.; Lim, L. W.; Takeuchi, T. Poly(Ethylene Oxide)-Bonded Stationary Phase for Separation of Inorganic Anions in Capillary Ion Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2013**, *1294*, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.052>.
- [33] Zakaria, P.; Hutchinson, J. P.; Avdalovic, N.; Liu, Y.; Haddad, P. R. Latex-Coated Polymeric Monolithic Ion-Exchange Stationary Phases. 2. Micro-Ion Chromatography. *Anal. Chem.*, **2005**, *77* (2), 417–423. <https://doi.org/10.1021/ac048747l>.
- [34] Lin, S.-L.; Fuh, M.-R. Separation of Inorganic Anions by Capillary Ion Chromatography with UV Detection Using Poly(Vinylimidazole-Co-Ethylene Dimethacrylate) Monolithic Column. *Talanta*, **2019**, *194*, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.011>.
- [35] Hilder, E.; Svec, F.; Frechet, J. Latex-Functionalized Monolithic Columns for the Separation of Carbohydrates by Micro Anion-Exchange Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1053* (1–2), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01090-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01090-8).
- [36] Liu, J.; Ren, L.; Liu, Y.; Li, H.; Liu, Z. Weak Anion Exchange Chromatographic Profiling of Glycoprotein Isoforms on a Polymer Monolithic Capillary. *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1228*, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.079>.
- [37] Chen, X.; Tolley, H. D.; Lee, M. L. Polymeric Strong Cation-Exchange Monolithic Column for Capillary Liquid Chromatography of Peptides and Proteins. *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32* (15–16), 2565–2573. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900255>.

- [38] Rokushika, S.; Qiu, Z. Y.; Hatano, H. Micro Column Ion Chromatography with a Hollow Fibre Suppressor. *J. Chromatogr. A*, **1983**, *260*, 81–87. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(83\)80009-0](https://doi.org/10.1016/0021-9673(83)80009-0).
- [39] Sedyohutomo, A.; Lim, L. W.; Takeuchi, T. Development of Packed-Column Suppressor System for Capillary Ion Chromatography and Its Application to Environmental Waters. *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1203* (2), 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.055>.
- [40] Wouters, S.; Bruggink, C.; Agroskin, Y.; Pohl, C.; Eeltink, S. Microfluidic Membrane Suppressor Module Design and Evaluation for Capillary Ion Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2017**, *1484*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.078>.
- [41] Huang, X.; Foss, F. W.; Dasgupta, P. K. Multilayer Chitosan-Based Open Tubular Capillary Anion Exchange Column with Integrated Monolithic Capillary Suppressor. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, *707* (1–2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.028>.
- [42] Zhang, F.; Li, Y.; Yang, B.; Liang, X. A Cation Exchange Resin Bead-Based Microscale Electrolytic Suppressor for Capillary Ion Chromatography. *Talanta*, **2011**, *83* (5), 1496–1500. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.043>.
- [43] Rimmer, C. A.; Simmons, C. R.; Dorsey, J. G. The Measurement and Meaning of Void Volumes in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *965* (1–2), 219–232. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00730-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00730-6).
- [44] Thermofisher Scientific. Dionex CES 300 Product Manual, 2014.
- [45] Sjögren, A.; Boring, C. B.; Dasgupta, P. K.; Alexander. Capillary Ion Chromatography with On-Line High-Pressure Electrolytic NaOH Eluent Production and Gradient Generation. *Anal. Chem.*, **1997**, *69* (7), 1385–1391. <https://doi.org/10.1021/ac961215n>.
- [46] Dunn, W.B.; Ellis, D.I. Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies. *TrAC*, **2005**, *24* (4), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
- [47] Kumar, B. S.; Chung, B. C.; Kwon, O.-S.; Jung, B. H. Discovery of Common Urinary Biomarkers for Hepatotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride, Acetaminophen and Methotrexate by Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Biomarkers for Hepatotoxicity by Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *J. Appl. Toxicol.*, **2012**, *32* (7), 505–520. <https://doi.org/10.1002/jat.1746>.
- [48] Liu, X.; Locasale, J. W. Metabolomics: A Primer. *Trends Biochem. Sci.*, **2017**, *42* (4), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>.
- [49] Dunn, W. B.; Broadhurst, D. I.; Atherton, H. J.; Goodacre, R.; Griffin, J. L. Systems Level Studies of Mammalian Metabolomes: The Roles of Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40* (1), 387–426.

<https://doi.org/10.1039/B906712B>.

[50] Büscher, J. M.; Czernik, D.; Ewald, J. C.; Sauer, U.; Zamboni, N. Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism. *Anal. Chem.*, **2009**, *81* (6), 2135–2143. <https://doi.org/10.1021/ac8022857>.

[51] Deng, C.; Zhang, X.; Li, N. Investigation of Volatile Biomarkers in Lung Cancer Blood Using Solid-Phase Microextraction and Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2004**, *808* (2), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.05.015>.

[52] Phillips, M. Method for the Collection and Assay of Volatile Organic Compounds in Breath. *Anal. Biochem.*, **1997**, *247* (2), 272–278. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2069>.

[53] Zanella, D.; Guiot, J.; Stefanuto, P.-H.; Giltay, L.; Henket, M.; Guissard, F.; André, B.; Malaise, M.; Potjewijd, J.; Schleich, F.; et al. Breathomics to Diagnose Systemic Sclerosis Using Thermal Desorption and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2021**, *413* (14), 3813–3822. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03333-4>.

[54] Khamis, M. M.; Adamko, D. J.; El-Aneed, A. Mass Spectrometric Based Approaches in Urine Metabolomics and Biomarker Discovery. *Mass Spec. Rev.*, **2017**, *36* (2), 115–134. <https://doi.org/10.1002/mas.21455>.

[55] Xhaferaj, M.; Naegele, E.; Parr, M. K. Ion Exchange in Supercritical Fluid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (SFC-MS/MS): Application for Polar and Ionic Drugs and Metabolites in Forensic and Anti-Doping Analysis. *J. Chromatogr. A*, **2020**, *1614*, 460726. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460726>.

[56] Wolrab, D.; Frühauf, P.; Gerner, C. Direct Coupling of Supercritical Fluid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Amino Acids and Related Compounds: Comparing Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Chemical Ionization. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, *981*, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.005>.

[57] Losacco, G. L.; Ismail, O.; Pezzatti, J.; González-Ruiz, V.; Boccard, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; Guillarme, D. Applicability of Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry to Metabolomics. II–Assessment of a Comprehensive Library of Metabolites and Evaluation of Biological Matrices. *J. Chromatogr. A*, **2020**, *1620*, 461021. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461021>.

[58] von Brocke, A.; Nicholson, G.; Bayer, E. Recent Advances in Capillary Electrophoresis/Electrospray-Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, **2001**, *22* (7), 1251–1266. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200105\)22:7<1251::AID-ELPS1251>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:7<1251::AID-ELPS1251>3.0.CO;2-9).

[59] Yang, W.-C.; Regnier, F. E.; Adamec, J. Comparative Metabolite Profiling of Carboxylic Acids in Rat Urine by CE-ESI MS/MS through Positively Pre-Charged and 2H-

Coded Derivatization. *Electrophoresis*, **2008**, *29* (22), 4549–4560. <https://doi.org/10.1002/elps.200800156>.

[60] Pezzatti, J.; Boccard, J.; Codesido, S.; Gagnebin, Y.; Joshi, A.; Picard, D.; González-Ruiz, V.; Rudaz, S. Implementation of Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry Methods for Untargeted Metabolomic Analyses of Biological Samples: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta*, **2020**, *1105*, 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.062>.

[61] Tang, D.-Q.; Zou, L.; Yin, X.-X.; Ong, C. N. HILIC-MS for Metabolomics: An Attractive and Complementary Approach to RPLC-MS: HILIC-MS FOR METABOLOMICS. *Mass Spec. Rev.*, **2016**, *35* (5), 574–600. <https://doi.org/10.1002/mas.21445>.

[62] Putluri, N.; Shojaie, A.; Vasu, V. T.; Vareed, S. K.; Nalluri, S.; Putluri, V.; Thangjam, G. S.; Panzitt, K.; Tallman, C. T.; Butler, C.; et al. Metabolomic Profiling Reveals Potential Markers and Bioprocesses Altered in Bladder Cancer Progression. *Cancer Res.*, **2011**, *71* (24), 7376–7386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1154>.

[63] Qin, X.; Wang, X. Quantification of Nucleotides and Their Sugar Conjugates in Biological Samples: Purposes, Instruments and Applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2018**, *158*, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.013>.

[64] Kostianen, R.; Kauppila, T. J. Effect of Eluent on the Ionization Process in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216* (4), 685–699. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.095>.

[65] Saude, E. J.; Adamko, D.; Rowe, B. H.; Marrie, T.; Sykes, B. D. Variation of Metabolites in Normal Human Urine. *Metabolomics*, **2007**, *3* (4), 439–451. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0091-1>.

[66] Trivedi, D. K.; Iles, R. K. HILIC-MS-Based Shotgun Metabolomic Profiling of Maternal Urine at 9–23 Weeks of Gestation - Establishing the Baseline Changes in the Maternal Metabolome: Shotgun Metabolomics of Pregnancy Urine. *Biomed. Chromatogr.*, **2015**, *29* (2), 240–245. <https://doi.org/10.1002/bmc.3266>.

[67] Pham, Y. L.; Beauchamp, J. Breath Biomarkers in Diagnostic Applications. *Molecules*, **2021**, *26* (18), 5514. <https://doi.org/10.3390/molecules26185514>.

[68] Aksenov, A. A.; Zamuruyev, K. O.; Pasamontes, A.; Brown, J. F.; Schivo, M.; Foutouhi, S.; Weimer, B. C.; Kenyon, N. J.; Davis, C. E. Analytical Methodologies for Broad Metabolite Coverage of Exhaled Breath Condensate. *J. Chromatogr. B*, **2017**, *1061–1062*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.038>.

[69] Wilde, M. J.; Cordell, R. L.; Salman, D.; Zhao, B.; Ibrahim, W.; Bryant, L.; Ruszkiewicz, D.; Singapuri, A.; Free, R. C.; Gaillard, E. A.; et al. Breath Analysis by Two-Dimensional Gas Chromatography with Dual Flame Ionisation and Mass Spectrometric

- Detection – Method Optimisation and Integration within a Large-Scale Clinical Study. *J. Chromatogr. A*, **2019**, *1594*, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.001>.
- [70] McBride, E. M.; Lawrence, R. J.; McGee, K.; Mach, P. M.; Demond, P. S.; Busch, M. W.; Ramsay, J. W.; Hussey, E. K.; Glaros, T.; Dhummakupt, E. S. Rapid Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Targeted Quantitation of Human Performance Metabolites in Saliva. *J. Chromatogr. A*, **2019**, *1601*, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.071>.
- [71] Al-Shehri, S.; Henman, M.; Charles, B. G.; Cowley, D.; Shaw, P. N.; Liley, H.; Tomarchio, A.; Punyadeera, C.; Duley, J. A. Collection and Determination of Nucleotide Metabolites in Neonatal and Adult Saliva by High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2013**, *931*, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.05.001>.
- [72] Palmas, F.; Mussap, M.; Fattuoni, C. Urine Metabolome Analysis by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS): Standardization and Optimization of Protocols for Urea Removal and Short-Term Sample Storage. *Clin. Chim. Acta*, **2018**, *485*, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.07.006>.
- [73] Roca, M.; Alcoriza, M. I.; Garcia-Cañaveras, J. C.; Lahoz, A. Reviewing the Metabolome Coverage Provided by LC-MS: Focus on Sample Preparation and Chromatography-A Tutorial. *Anal. Chim. Acta*, **2021**, *1147*, 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.025>.
- [74] Valentín-Blasini, L.; Blount, B. C.; Delinsky, A. Quantification of Iodide and Sodium-Iodide Symporter Inhibitors in Human Urine Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1155* (1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.014>.
- [75] Baygildiev, T.; Zatirakha, A.; Rodin, I.; Braun, A.; Stavrianidi, A.; Koryagina, N.; Rybalchenko, I.; Shpigun, O. Rapid IC–MS/MS Determination of Methylphosphonic Acid in Urine of Rats Exposed to Organophosphorus Nerve Agents. *J. Chromatogr. B*, **2017**, *1058*, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.005>.
- [76] Sun, Y.; Saito, K.; Iiji, R.; Saito, Y. Application of Ion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry for Human Serum and Urine Metabolomics. *SLAS DISCOV.*, **2019**, *24* (7), 778–786. <https://doi.org/10.1177/2472555219850082>.
- [77] Wishart, D. S.; Jewison, T.; Guo, A. C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; et al. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, *41* (D1), D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>.
- [78] Hirayama, A.; Tabata, S.; Kudo, R.; Hasebe, M.; Suzuki, K.; Tomita, M.; Soga, T. The

Use of a Double Coaxial Electrospray Ionization Sprayer Improves the Peak Resolutions of Anionic Metabolites in Capillary Ion Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2020**, *1619*, 460914. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460914>.

[79] Shi, R. L.; Xiao, G.; Dillon, T. M.; Ricci, M. S.; Bondarenko, P. V. Characterization of Therapeutic Proteins by Cation Exchange Chromatography-Mass Spectrometry and Top-down Analysis. *mAbs*, **2020**, *12* (1), 1739825. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1739825>.

[80] Kochmann, S.; Matysik, F.-M. Hyphenation of Capillary High-Performance Ion-Exchange Chromatography with Mass Spectrometry Using Sheath-Flow Electrospray Ionization: Capillary Ion Chromatography with Sheath-Flow ESI-MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2014**, *28* (23), 2670–2680. <https://doi.org/10.1002/rcm.7056>.

[81] Liigand, J.; Laaniste, A.; Kruve, A. PH Effects on Electrospray Ionization Efficiency. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2017**, *28* (3), 461–469. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1563-1>.

[82] Karu, N.; Dicoski, G. W.; Hanna-Brown, M.; Haddad, P. R. Determination of Pharmaceutically Related Compounds by Suppressed Ion Chromatography: I. Effects of Organic Solvent on Suppressor Performance. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218* (50), 9037–9045. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.011>.

[83] Karu, N.; Dicoski, G. W.; Hanna-Brown, M.; Haddad, P. R. Determination of Pharmaceutically Related Compounds by Suppressed Ion Chromatography: II. Interactions of Analytes with the Suppressor. *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1224*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.022>.

[84] Bauer, K.-H.; Knepper, T. P.; Maes, A.; Schatz, V.; Voihsel, M. Analysis of Polar Organic Micropollutants in Water with Ion Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *837* (1–2), 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00048-5).

[85] Geerdink, R. B.; Hassing, M.; Ayarza, N.; Bruggink, C.; Wielheesen, M.; Claassen, J.; Epema, O. J. Analysis of Glyphosate, AMPA, Glufosinate and MPPA with ION Chromatography Tandem Mass Spectrometry Using A Membrane Suppressor in the Ammonium Form Application to Surface Water of Low to Moderate Salinity. *Anal. Chim. Acta*, **2020**, 66–76.

[86] Wishart, D. S.; Guo, A.; Oler, E.; Wang, F.; Anjum, A.; Peters, H.; Dizon, R.; Sayeeda, Z.; Tian, S.; Lee, B. L.; et al. HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*, **2022**, *50* (D1), D622–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>.

[87] ICH. L'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (I'ICH) : Validation Des Méthodes d'analyse : Texte et Méthodologie, 2015.

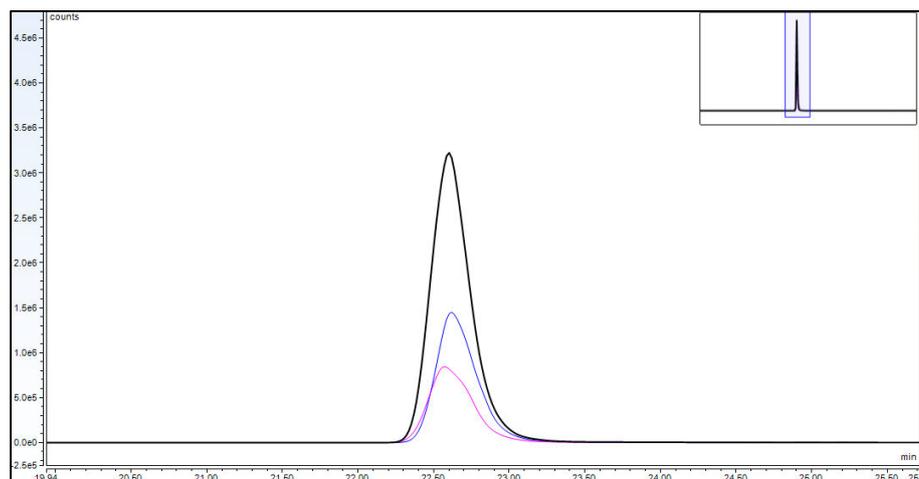
- [88] Kruve, A.; Leito, I.; Herodes, K. Combating Matrix Effects in LC/ESI/MS: The Extrapolative Dilution Approach. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, *651* (1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.060>.
- [89] Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses. *J. Chromatogr. B*, **2007**, *852* (1–2), 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.030>.
- [90] Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. Operational Options to Reduce Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation–Mass Spectrometry Analysis of Aqueous Environmental Samples. *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1067* (1–2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.101>.
- [91] Villagrasa, M.; Guillamón, M.; Eljarrat, E.; Barceló, D. Matrix Effect in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Benzoxazinoid Derivatives in Plant Material. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1157* (1–2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.040>.
- [92] Alonso, A. P.; Piasecki, R. J.; Wang, Y.; LaClair, R. W.; Shachar-Hill, Y. Quantifying the Labeling and the Levels of Plant Cell Wall Precursors Using Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Plant Physiol.*, **2010**, *153* (3), 915–924. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155713>.
- [93] Kvitvang, H. F. N.; Kristiansen, K. A.; Bruheim, P. Assessment of Capillary Anion Exchange Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry for the Quantitative Profiling of the Phosphometabolome and Organic Acids in Biological Extracts. *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1370*, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.029>.
- [94] Stafsnes, M. H.; Røst, L. M.; Bruheim, P. Improved Phosphometabolome Profiling Applying Isotope Dilution Strategy and Capillary Ion Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2018**, *1083*, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.004>.
- [95] Schwaiger, M.; Rampler, E.; Hermann, G.; Miklos, W.; Berger, W.; Koellensperger, G. Anion-Exchange Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Merging Targeted and Non-Targeted Metabolomics. *Anal. Chem.*, **2017**, *89* (14), 7667–7674. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01624>.
- [96] Sigler, A.; He, X.; Bose, M.; Cristea, A.; Liu, W.; Nam, P. K.; James, D.; Burton, C.; Shi, H. Simultaneous Determination of Eight Urinary Metabolites by HPLC-MS/MS for Noninvasive Assessment of Traumatic Brain Injury. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2020**, *31* (9), 1910–1917. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00181>.



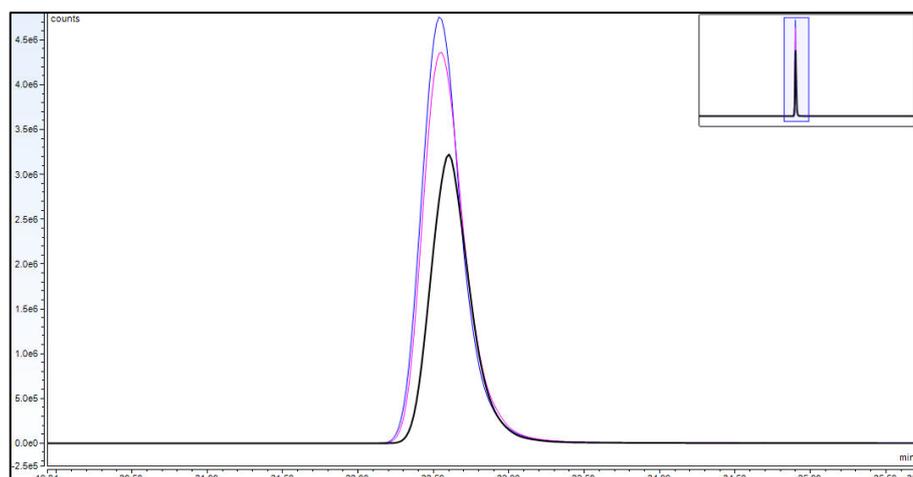
## **ANNEXES**

---

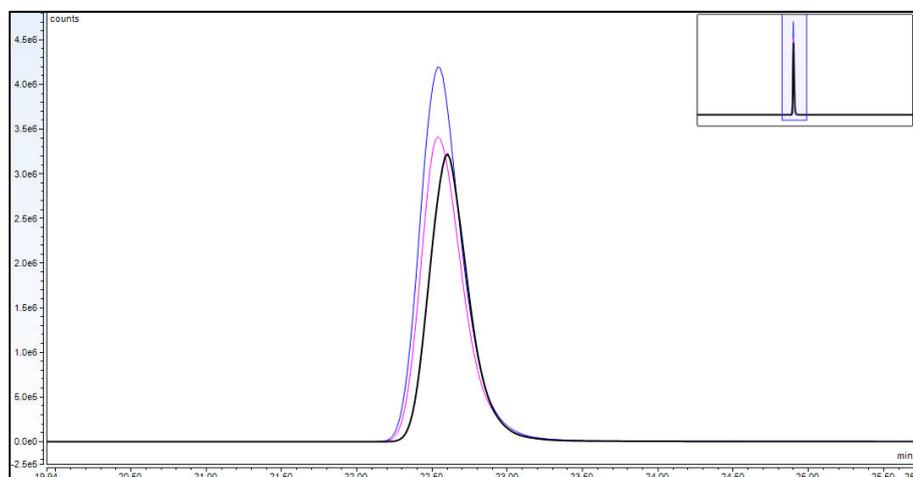
## Annexe 1 - Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse



EIC du GMPc pour des températures de vaporisation de 150°C (en noir), 100°C, en bleu et 50°C en rose



EIC du GMPc pour une résolution du premier quadripôle à 1 (en noir), 1,2 (en bleu) et 2 largeurs à mi-hauteur (en rose) Q3 fixé à 1.



EIC du GMPc pour une résolution du troisième quadripôle à 1 (en noir), 1,2 (en bleu) et 2 largeurs à mi-hauteur (en rose) Q1 fixé à 1.

## **Annexe 2 – Appareillage pour le couplage IC-MS/MS avec un analyseur triple quadripôle**

Le système Dionex ICS3000 de chromatographie ionique est composé d'un système de double pompe (permettant l'utilisation d'un gradient d'élution) transportant l'éluant NaOH à travers le système, un injecteur Dionex AS-40, une boucle d'injection de 10 µL, un supprimeur AERS 500e et un détecteur conductimétrique. Le supprimeur AERS 500e est un supprimeur à membrane électrolytique (partie I.2.3.2) alimenté en eau par une pompe externe AXP Thermofisher Scientific. Ce supprimeur a été conçu spécialement pour les couplages à la spectrométrie de masse car il résiste davantage aux fortes contre-pressions. Toutes les tubulures du système sont en PEEK (Poly Ether Keton) pour assurer l'inertie du système par rapport à la PM basique. Ce système est couplé par une union « T » à un spectromètre Thermofisher Scientific TSQ Quantiva équipé d'une source « electrospray » (ESI) et à une pompe AXP-MS Thermofisher Scientific pour l'ajout de solvant « make-up ». Le pilotage de ce couplage et le retraitement des données ont été effectués via le logiciel Chroméléon version 7.2.10.

### Annexe 3 - Préparation des solutions de "make-up" à différents pH

Une solution de 50 mM de  $\text{NH}_4\text{OH}$  est préparée par la dilution de 1,95 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dans 200 mL d'ACN. Pour éviter la formation d'acétate d'ammonium, 30 mL d'eau ultrapure sont ajoutés. Afin d'appréhender le changement de pH qu'implique le mélange de la PM neutralisée avec le solvant de « make-up », ces conditions sont mimées en mélangeant 30 mL de PM moyennée avec 10 mL de la solution « make-up » basifiée. Le pH est ensuite acidifié par ajouts mesurés d'acide acétique jusqu'à la valeur souhaitée. La quantité d'ajout est rapportée au volume souhaité de solvant « make-up », soit 200 mL, par le calcul. Les quantités ajoutées selon les pH désirés sont répertoriées dans le tableau.

Quantités d'ajout d'acide acétique pour obtenir le pH désiré

pH	7	8	8,5	9
Ajout d'acide acétique ( $\mu\text{L}$ )	160	140	120	100

Ces 4 solutions ainsi préparées sont conservées à  $-4^\circ\text{C}$ .

## **Annexe 4 – Appareillage pour le couplage IC-MS avec un analyseur simple quadripôle**

L'ICS5000 est équipé d'un système de doubles pompes avec un éluant NaOH, d'un injecteur AS-AP, d'une boucle d'injection de 10  $\mu$ L, d'une colonne de garde AG11-HC (2x50 mm), d'une colonne analytique AS11-HC (2x250 mm) et d'un détecteur conductimétrique. Comme sur le couplage précédemment décrit, l'ICS6000 est couplé au spectromètre de masse ESI-simple quadripôle ISQ-EC avec l'ajout d'un solvant « make-up » délivré par une pompe AXP-MS. Deux supprimeurs ont été connectés au système pendant l'étude. Ces deux supprimeurs étaient des supprimeurs à membrane électrolytique régénéré par de l'eau ultrapure grâce à une pompe externe AXP. Le premier, l'AERS 500e a été conçu pour mieux résister aux pressions et est donc adapté pour un couplage à la MS. Le deuxième supprimeur est l'ADRS 600 permettant de travailler en mode tension constante ou courant constant pour adapter davantage la suppression aux gradients d'élution.

## Annexe 5 - Gradients testés pour l'optimisation de la séparation de certains composés

<b>Gradient 1</b>		<b>Gradient 2</b>		<b>Gradient 3</b>		<b>Gradient 4</b>		<b>Gradient 5</b>	
0,2 mL /min									
min	[OH <sup>-</sup> ] en mM								
0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
5	5	35	50	20	70	10	10	35	40
35	70	40	50	25	70	40	70	40	40
40	70	40,1	5	25,1	5	40,1	5	40,1	5
40,1	5	50	5	50	5	50	5	50	5
50	5								
<b>Gradient 6</b>		<b>Gradient 7</b>		<b>Gradient 8</b>		<b>Gradient 9</b>		<b>Gradient 10</b>	
0,2 mL /min		0,2 mL /min		0,2 mL /min		0,2 mL /min		0,2 mL /min	
min	[OH <sup>-</sup> ] en mM								
0	5	0	5	0	5	0	10	0	15
35	30	20	60	10	5	35	30	35	30
40	30	40	70	35	30	40	30	40	30
40,1	5	40,1	5	40	30	40,1	10	40,1	15
50	5	50	5	50	5	50	10	50	15
<b>Gradient 11</b>		<b>Gradient 12</b>		<b>Gradient 13</b>		<b>Gradient 14</b>			
0,2 mL /min		0,2 mL /min		0,2 mL /min		0,2 mL /min			
min	[OH <sup>-</sup> ] en mM								
0	5	0	5	0	5	0	5		
10	25	6	15	4	15	10	20		
15	25	15	15	15	15	15	20		
20	60	20	60	20	60	20	60		
40	70	40	70	40	70	40	70		
40,1	5	40,1	5	40,1	5	40,1	5		
50	5	50	5	50	5	50	5		

## **Annexe 6 - Appareillage pour le couplage IC capillaire-MS**

Le système utilisé pour les analyses au format capillaire est l'HPIC (High-pressure ion chromatography) ICS4000 (Dionex) est équipé d'un générateur d'éluant ECG, d'une cartouche purifiante CR-TC, d'un dégazeur en ligne EG-DEGAS, d'un supprimeur ACES 300 et d'un détecteur conductimétrique. Le supprimeur de ce système est conçu pour ne fonctionner qu'en mode recyclage. Cependant, pour le couplage à la spectrométrie de masse, ce module est alimenté en eau par une pompe externe AXP-MS. L'ajout du solvant « make-up » se fait par l'intermédiaire d'une pompe HPG 3400 RS reliée par une union « T » au spectromètre de masse ESI-simple quadripôle ISQ-EC. L'injection est effectuée par un échantillonneur automatique AS-AP et le volume est contrôlé par la boule d'injection de 0,4  $\mu\text{L}$  gravée dans la vanne d'injection de 4 voies puis par une boucle de 10  $\mu\text{L}$  avec une vanne d'injection de 6 voies.

Mots clés : Chromatographie d'échange d'ion, Suppresseur, Métabolites, Urine, Salive

### Résumé

Depuis quelques années, la métabolomique est au centre des intérêts dans le domaine de la chimie analytique et de la chromatographie. La grande variété de propriétés des métabolites induit la nécessité d'utiliser plusieurs techniques chromatographiques orthogonales. Ces techniques chromatographiques sont classiquement couplées à la spectrométrie de masse pour obtenir une sélectivité supplémentaire, une meilleure sensibilité et, dans le cas d'analyses non-ciblées, une identification des métabolites. Lorsqu'il s'agit de métabolites polaires ionisés ou ionisables, la chromatographie ionique apparaît comme l'une des techniques de choix. Le but de ces travaux a été d'optimiser une méthode de routine pour la séparation de métabolites anioniques polaires ionisables en chromatographie d'échange d'anions couplée à un spectromètre de masse simple quadripôle. Dans un premier temps, une étude de la rétention de plusieurs phases stationnaires a permis la sélection d'une colonne appropriée à l'application visée. Ensuite, le couplage de la chromatographie ionique à la spectrométrie de masse n'étant pas trivial, l'interface entre les deux appareils a été optimisée par, notamment, le choix de la nature, du pH et du débit de solvant « make-up ». La méthode ainsi développée a été appliquée à l'analyse de matrices réelles dont la collecte est peu invasive : l'urine et la salive. Les performances de cette méthode ont été évaluées pour l'analyse des métabolites dans l'urine. La méthode s'est révélée fiable, répétable et présente une sensibilité satisfaisante pour l'application visée.

Key words: Ion exchange chromatography, Suppressor, Metabolites, Urine, Saliva

### Summary

Since few years, the metabolomic study is the main focus in the analytical chemistry and chromatography fields. The wide range of metabolite properties induces the need of several orthogonal chromatographic techniques. These are classically hyphenated to mass spectrometry to obtain an additional selectivity, a better sensitivity and, in the case of non-targeted analysis, the identification of metabolites. When dealing with ionized or ionizable polar metabolites, ion chromatography is one of the most suitable techniques.

The aim of this work was the optimization of a routine method for anionic polar ionized or ionizable metabolite separation in anion exchange chromatography hyphenated to single quadrupole mass spectrometer. First, the retention study of several stationary phases allowed to select the appropriate column for the application. Then, the hyphenation of the ion chromatography with the mass spectrometry being not trivial, the interface between these two apparatuses was optimized by choosing the appropriate composition, pH, and flow rate of make-up solvent.

Finally, this developed method was applied to the analysis of real matrices whose collection is not invasive: urine and saliva. Performances of this method were evaluated for the metabolites analysis in urine. This method proved to be reliable, repeatable and provide a satisfactory sensitivity for the application.