

Revue générale

Préparation en ligne des échantillons

Biological samples on-line extraction

Christian Lacroix^{*}, Élodie Sausseureau, Jean-Pierre Goullé

Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Cliniques, Groupe Hospitalier du Havre, BP 24, 76083 Le Havre Cedex, France

Résumé – La préparation en ligne des échantillons biologiques (PEL) apparaît clairement ces dernières années comme une technique en plein essor par sa rapidité : sa conception est simple et doit le rester. L'utilisateur doit effectuer des choix (nature du support des colonnes de purification, matériel industriel ou montage personnel...). Dans cet article sont résumées les trois méthodes développées au laboratoire : elles ont en commun la même colonne de purification, la même colonne analytique et les mêmes phases mobiles. Seule change l'évolution du gradient en fonction des besoins. La qualité des résultats de la PEL est fonction de la dilution (au 1/100 et plus si possible) de l'échantillon (sang, plasma, sérum, urines, cheveux).

Mots clés : Préparation en ligne, LC-MS/MS

Abstract – Biological samples on-line extraction, a no time consuming pre-treatment method, is in full expansion. The conception is very simple and should remain so. Some choices have to be done: pre-column type (several phases), industrial system or "home" system... Here we describe three methods developed in our laboratory. These on-line methods use the same pre-column, analytical column and mobile phases. Only the analytical gradient changes depending on analytical needs. On-line extraction efficiency depends on sample (blood, plasma, serum, urine, hair) dilution (1/100, more if possible).

Key words: On-line extraction, LC-MS/MS

Reçu le 22 avril 2010, accepté après modifications le 11 mai 2010
Publication en ligne le 4 août 2010

1 Objectif

Le couplage LC-MS/MS permet, compte tenu de la grande spécificité du système de détection et de sa sensibilité, de simplifier, en amont, la préparation d'échantillons biologiques complexes. Ce couplage permet également des cycles chromatographiques de plus en plus rapides puisque la séparation des molécules de transition différentes ne s'impose plus. C'est pourquoi, ces dernières années, la préparation en ligne (PEL) connaît un essor significatif tout en cohabitant avec différentes techniques encore plus directes comme par exemple :

- *high flow and ballistic gradient*
- *dilute and shoot*

- PEL sur différents supports :
 - RAM (*restricted access media*)
 - LPS (*large particle supports*)
 - colonne monolithique

Les techniques de PEL peuvent utiliser la colonne de concentration comme colonne chromatographique, la phase de chargement étant suivie d'une phase d'éluion-chromatographie. Mais le plus souvent, l'étape de purification est suivie d'une éluion en « back flush » ; l'éluat est alors chromatographié sur une colonne différente de la première. La frontière entre les procédés énumérés précédemment n'est pas toujours nette et souvent les auteurs mettent à profit les différentes solutions existantes. À titre d'exemple, le tableau I réunit les éléments essentiels de deux travaux publiés à un an d'intervalle par Ayrton et coll. [1, 2]. Les auteurs, après une simple dilution du plasma, ont utilisé la même colonne de purification (OA-SIS HLB) dont le diamètre évolue de 1 mm (1997) à 0,18 mm

^{*} Correspondance :
Christian Lacroix, Tél. 02 32 73 32 18, Fax 02 32 73 32 38,
christian.lacroix@ch-havre.fr

Tableau I. Exemple de « High Flow and Ballistic Gradient ».

Plasma	Au demi	Au demi
Colonne	Oasis HLB 50 × 1 mm ; 30 µm	Oasis HLB 50 × 0,18 mm ; 30 µm 50 × 0,18 mm ; 30 µm
Vol inject	50 µL	5 µL
Gradient	100 % AF, 0,2 min (évier) 0,2–0,8 min → 95 % ACN	100 % AF, 0,2 min (évier) 0,2–0,8 min → 95 % ACN
Temps de rétention	0,7 min	1,1 min
Run	1,2 min	2 min
Détection	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Débit	4 mL/min (split : 1/10)	130 µL/min
Loq	5 ng/mL	0,5 ng/mL

Tableau II. Exemple de technique « Dilute and shoot ».

Urines	Au demi	Au demi
Colonne	UPLC, BEH C18 50 × 2,1 mm ; 17 µm	UPLC, BEH C18 100 × 2,1 mm ; 1,7 µm
Vol inject	5 µL	10 µL
Gradient	Acétate NH ₄ -méthanol	AF-ACN
Run	7,5 min	9 min
Détection	LC-MS/MS	QTOF-MS
Débit	400 µL/min	400 µL/min
Loq	1 → 50 ng/mL	10 → 500 ng/mL
Molécules détectées	130	103

(1998). Le volume injecté a été divisé par 10, les gradients, temps de rétention et la composition des phases mobiles sont à peu près identiques dans les deux méthodes. Le débit baisse de 4 mL/min à 130 µL/min et la limite de quantification pour la même molécule est passée de 5 ng/mL à 0,5 ng/mL. Ces deux techniques conjuguent :

- un « High Flow and Ballistic Gradient » ;
- une technique proche de la technique de « Dilute and Shoot » ;
- une préparation en ligne puisque sur 0,2 min le flux après chargement est dirigé vers l'évier ;
- une chromatographie directe, car c'est la colonne de purification qui sert de colonne chromatographique (si courte soit-elle).

Les auteurs concluent à la supériorité de la technique de 1998, puisqu'elle permet de réaliser une grande économie de solvant, alliée à une meilleure sensibilité.

Un exemple de la technique « dilute and shoot » est illustrée par les travaux de Thörngren et coll. [3] et Badou et coll. [4] (tableau II). Ces deux équipes, dans le cadre de la lutte antidopage, injectent un simple échantillon urinaire dilué sur des colonnes de même phase solide, de longueurs légèrement différentes. Les phases mobiles et les gradients sont comparables, la détection se fait pour l'un en LC-MS/MS et pour l'autre en QTOF-MS. Il existe quelques différences dans les limites de quantification, mais sur des cycles analytiques de 7,5 ou de 9 min, le nombre de substances détectées dépasse la centaine de molécules. Les avantages sont importants : simplicité de la préparation de l'échantillon, rapidité de la phase chromatographique. Les effets de matrice sont importants, mais les

auteurs concluent que les limites de détection, malgré cet inconvénient, restent néanmoins inférieures au MRPL (minimal required performance limit).

La préparation en ligne sur supports RAM ou LPS [5] est basée sur un principe unitaire : la possibilité pour certains supports de retenir certains analytes par interaction hydrophobe ou électrostatique et d'exclure les macromolécules (protéines, lipides, ...).

2 Les supports RAM

Ce terme a été introduit par Desilets et coll. [5]. Il s'agit d'une famille de supports de granulométries conventionnelles de 5 à 15 µm qui permet l'injection de fluides biologiques en limitant l'accessibilité des sites d'interaction à l'intérieur des pores uniquement aux petites molécules (exclusion physique). Les macromolécules, quant à elles, sont exclues et interagissent seulement avec la surface externe des particules, surface recouverte de groupement hydrophiles, lesquels minimisent l'absorption de la matrice protéique (exclusion chimique). Sans entrer dans le mécanisme fin de fonctionnement de ces supports, on peut noter qu'il existe deux possibilités de greffage sur ces colonnes : un groupement hydrophobe interne, différent bien sûr des groupements hydrophiles externes, comme par exemple le groupement glycine-L-phénylalanine-L-phénylalanine ou plus classiquement les groupements C₄, C₈, C₁₈, nitrile, phényl, acide sulfonique... Mais il peut s'agir aussi de greffons mixtes, comportant à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe (tableaux III et IV).

Tableau III. Supports de type « RAM » avec barrière physique.

Dénomination	ISRP Pinkerton Hagestam 1985	ADS (Alkyl-diol-silice)	Ligand combiné Chromospher Biomatrix
Nature	Silice	Silice	silice
Pores	6 nm	6 nm	13 nm
Groupements hydrophobes internes	Glycine-L- phénylalanine-L- phénylalanine	C4, C8, C18, ac sulfonique	Phényl
Groupements hydrophiles externes	Diol-glycine	Glycérylpropyl	Polyglycidol

Tableau IV. Supports de type « RAM » avec barrière chimique.

Surface semi-perméable (SPS)	Silice recouverte de protéines Protéine-coated silica. Biot Trap	Support à fc mélangées Mixed-functional Material. Capcell Pak MF	Phase à écran hydrophobe (shielded hydrophobic phase) Hisep
Grpts hydrophobes internes : Nitrile, phényl, C8, C18	Grpts hydrophobes internes : C8, C18	Silice enrobée de silicone	Réseau polymérique de polyoxyéthylène hydrophile
Grpts hydrophiles Réseau polymérique de polyoxyéthylène	α 1glycoprotéine acide	recouverte de polymères hydrophiles (polyoxyéthylène) et hydrophobes (groupements styrène)	comportant des groupements phényl hydrophobes

3 Support à grosses particules (LPS, large particle supports)

Il s'agit là d'utiliser des particules de grosses granulométrie (30–60 μ m) autorisant des débits élevés sans générer de fortes pressions : sur une colonne de 1 mm de diamètre et de longueur de 30 à 50 mm, des débits de 2 à 5 mL/min sont couramment utilisés. Les protéines et autres substances hydrophiles traversent la colonne alors que les petites molécules sont retenues par interaction hydrophobe. Il s'agit d'un concept des années 1960 appliqué aux colonnes remplies en 1982 et nommées en 1997 *turbulent flow chromatography*, que l'on pourrait traduire par chromatographie en flux turbulent ou tourbillonnant. Les phases stationnaires sont des phases à groupement alkyle (C2, C8, C18), phényl ou des phases polymériques de type HLB (copolymère de divinylbenzène-N-vinylpyrrolidone). Ce copolymère possède à la fois des propriétés hydrophobes et hydrophiles, d'où le nom de HLB (hydrophilic-lipophilic balance).

4 Phases monolithiques

Récemment apparues sur le marché, ces phases monolithiques constituent une évolution intéressante, puisque l'on passe de silice sous forme particulaire à une structure gélifiée très poreuse. Les avantages sont multiples : haute perméabilité, basse pression à haut débit, un flux qui reste laminaire et une excellente séparation. L'utilisateur devra faire un choix analytique et économique entre ces colonnes supportant de hauts

débits avec un temps chromatographique court ou d'autres colonnes, plus conventionnelles, à débit plus faible, mais avec un cycle chromatographique plus long. Ces phases représentent peut-être une voie d'évolution pour la chromatographie liquide en l'affranchissant de la structure granulométrique des phases solides : plus la granulométrie diminue (UPLC) plus la pression s'élève ce qui nécessite un matériel spécifique, adapté et coûteux. La longueur des colonnes peut être réduite, mais avec une diminution concomitante du nombre de plateaux théoriques.

5 Aspects pratiques de la PEL

Les aspects pratiques jouent un rôle très important et le choix des colonnes, des phases mobiles, les méthodes retenues et les commentaires ci-dessous reflètent l'organisation actuelle de notre laboratoire et sont donc, bien sur, discutables.

Le but essentiel de la préparation en ligne est d'automatiser l'extraction des molécules d'intérêt sans rupture entre cette extraction et la chromatographie. Les réflexions des utilisateurs devront concerner les trois modules nécessaires :

- le détecteur retenu ;
- la pompe et la colonne analytique ;
- la pompe et la colonne préparative.

Pour élaborer une technique, décoder une panne, ou résoudre un problème quel qu'il soit, il faudra revenir sur le fonctionnement et l'imbrication de chacun de ces systèmes. Toute modification d'un paramètre, même minime, dans la technique aura de toute façon une répercussion sur la méthode globale.

5.1 Choix du matériel

La première question de l'utilisateur va porter sur le choix d'un matériel de préparation en ligne : option industrielle ou montage personnalisé. La PEL nécessite une pompe annexe basale à deux canaux, mais pilotée par l'informatique du système et capable de débiter 2 à 4 mL/min. Cette pompe est reliée au système chromatographique par une vanne 6 voies. Il apparaît peut-être plus judicieux de réaliser un montage personnel de préparation en ligne peu coûteux et de porter l'effort financier sur le niveau de qualité du système de détection : sensibilité, vitesse d'acquisition, ...

5.2 Le choix des supports : RAM ou LPS

Jusqu'aux années 2000, les supports RAM ont été les plus utilisés : les supports LPS (type HLB) n'existaient pas, ou étaient en voie de commercialisation. Le problème posé par les supports RAM sont les suivants : il s'agit de greffons classiques (C4, C8, C18, phényl...) sur une phase solide de silice, avec les contraintes de pH inhérentes à ce matériau et une rétention fonction du greffage choisi. En revanche les colonnes LPS de type copolymères (type HLB) montrent une rétention extrêmement large, d'où une grande polyvalence d'emploi, et ne sont absolument pas limitées par une échelle de pH.

D'une façon générale, il convient d'éviter les colonnes d'échange d'ions (de type MCX ou MAX) sauf pour solutionner des problèmes spécifiques. En effet, l'élution des composés d'intérêt à partir de ces phases nécessitent des concentrations élevées de solvant (méthanol ou acétonitrile) et l'utilisation de pH quelques fois extrêmes, qui entraîneront des problèmes sur la colonne analytique, à savoir : faible rétention des molécules recherchées, voire leur élution immédiate au front du solvant, dissolution de la phase de silice à pH élevés et encrassement de la source du détecteur. La solution à ce problème est de placer entre la colonne de purification et la colonne analytique, une troisième pompe délivrant une phase mobile, dont le rôle sera de diminuer la concentration du solvant et de normaliser le pH. La complexification de ce montage n'est justifiée que pour la résolution d'un problème précis.

5.3 Traitement de l'échantillon

Les échantillons, qu'il s'agisse de sang, de plasma ou de sérum, doivent autant que possible être dilués au 1/100 dans l'eau. La boucle d'injection est une boucle de 100 µL qui permet d'injecter dans l'appareil l'équivalent d'un microlitre de sang, de plasma ou de sérum. La dilution des urines est plus élevée, puisqu'il ne faut pas hésiter à diluer ces échantillons au 1/500, voire au 1/1000.

Les avantages de la dilution sont multiples :

- injection de prélèvements dégradés (sang post-mortem) ;
- dissociation des liaisons protéiques ;
- meilleure résolution chromatographique des pics sur la colonne analytique ;

- non saturation du signal et meilleure linéarité ;
- amélioration du bruit de fond, qui se résume à celui de l'appareil et des solvants ;
- une diminution importante, voire une annulation des effets de matrice ;
- longévité accrue des colonnes de purification qui peuvent résister à plus de mille injections.

Cette dilution au 1/100 doit avantageusement être remplacée par une dilution au 1/200, voire au 1/500 si la sensibilité de l'appareil le permet.

5.4 Choix des colonnes et des phases mobiles

L'intérêt de la préparation en ligne réside, autant que faire se peut, dans l'unification des colonnes et des phases mobiles. Cela permet d'enchaîner différentes techniques sans rupture chromatographique et l'utilisation, dans notre laboratoire, de deux LC-MS/MS en miroir équipée de façon identique :

- la colonne de chargement choisie est une Oasis HLB (20 × 2,1 mm ; 30 µm). Le chargement s'effectue à un débit de 2 mL/min pendant 30 secondes (suffisant pour un échantillon déjà très dilué) par un mélange d'eau et de 0,2 % d'ammoniaque. Après élution des solutés en « backflush », la colonne de chargement est rincée par un mélange méthanol-acide formique à 0,1 % (90-10 ; V/V) ;
- la colonne analytique est toujours identique, il s'agit d'une Atlantis (150 × 2,1 mm ; 3 µm). Une longueur de 15 cm permet à la fois des éluions très rapides avec un gradient flash ou une chromatographie plus séparative par un gradient modéré ;
- la première phase mobile consiste en une solution de formate d'ammonium 20 mmol/L, pH 3,2 ; la seconde phase comprend de l'acétonitrile et 10 % de la solution de formate d'ammonium pH 3,2.

Les différentes méthodes analytiques se résument en trois gradients différents. Il est important dans la PEL de toujours opérer en gradient afin de refocaliser en tête de colonne analytique, les molécules éluées en « backflush » de la colonne préparative.

5.5 Technique

Les applications basées sur ces trois gradients sont les suivantes :

- dosage des médicaments : gradient de 8 % à 50 % en 1 minute puis à 95 % en 0,1 minute. Un plateau de 3 minutes est suivi d'un rééquilibrage de la colonne aux conditions initiales. Tous les temps de rétention s'établissent entre 3 et 4,7 minutes et une injection peut se faire toutes les 6 minutes. Afin de minimiser encore plus les effets de suppression d'ions, déjà atténués par la dilution, il faut éviter une élution trop rapide des molécules d'intérêt (c'est-à-dire un temps de rétention inférieur à 2,50-3 min) ;

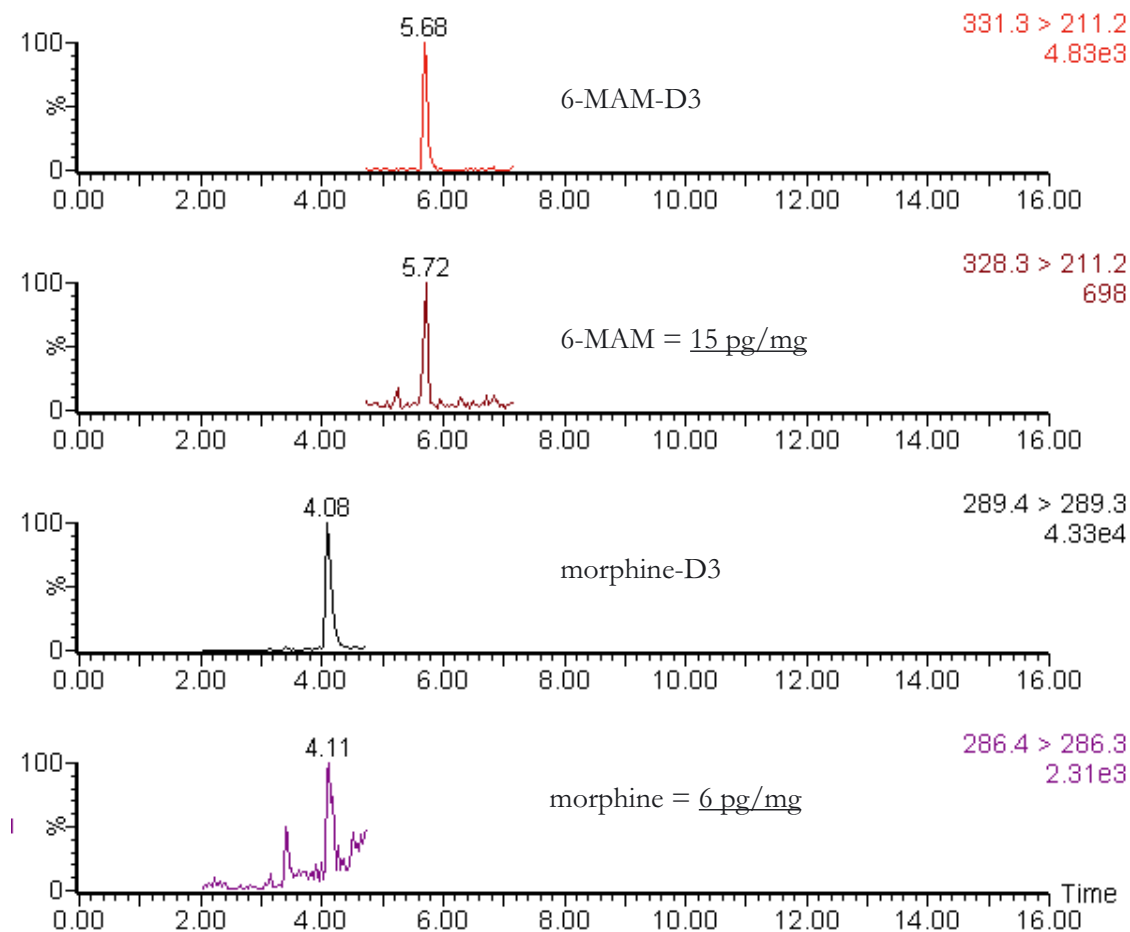


Fig. 1. Chromatogrammes de la morphine et de la 6-MAM à partir de 1 mg de cheveux après préparation en ligne de l'échantillon.

- dosage des stupéfiants : même gradient de 8 % à 50 %, mais en 6 minutes [7] suivi d'un plateau et d'un rééquilibrage comme précédemment, ce qui permet de réaliser une injection toutes les 15 minutes ;
- screening de 80 médicaments, à raison de deux transitions par molécule : gradient de 20 % à 50 % en 25 minutes, puis plateau de 6 minutes à 90 %, et rééquilibrage de la colonne, ce qui permet une injection toutes les 35 minutes. Ce screening médicamenteux est limité par les possibilités de l'appareil. Une machine plus performante en terme d'acquisition permettrait un « run » chromatographique plus court, un rythme d'injection plus rapide et l'acquisition d'un plus grand nombre de molécules ;
- stupéfiants dans les cheveux : primitivement, la prise d'essai était de 10 mg de cheveux broyés, placés dans 200 µL de tampon formate d'ammonium pH 3,2 suivie de 2 heures dans un bac à ultrasons. Cette incubation était suivie d'une injection de 100 µL du surnageant dans la colonne préparative. Compte tenu de la sensibilité importante de cette technique qui dispense de la phase d'extraction par un solvant, il a été possible de réduire la prise d'essai à 5 mg pour 200 µL de formate. À titre expérimental, le chromatogramme (figures 1-3) a été réalisé par pesée de 1 mg de cheveux et incubé dans 150 µL de formate suivi d'une injection de 100 µL du surnageant ;
- médicaments dans les cheveux : la technique est identique, mais avec un tampon de pH 8,6. Ce procédé est actuellement réévalué, afin de l'aligner sur la technique des stupéfiants dans les cheveux (incubation dans un tampon formate pH 3,2) ce qui permettrait d'effectuer simultanément la recherche et le dosage des médicaments et des stupéfiants dans les cheveux ;
- dosage des stupéfiants sur spots de papier (*dried blood spots*). Cette technique consiste après avoir laissé sécher une goutte de sang, à découper une rondelle de 3 mm de diamètre, qui est vortexée ensuite dans 150 µL d'eau. L'injection de 100 µL du surnageant permet d'effectuer le dosage des stupéfiants : opiacés, amphotaminiques, cocaïniques [8]. Cette technique, actuellement validée, suscite une autre question : est-il possible sur cette même petite rondelle de trois millimètre d'effectuer le screening simultané des médicaments et des stupéfiants ?
- dosage des cyanures après dérivation préalable par la technique fluométrique de Sano et coll. [9] et son adaptation en LC-MS/MS par utilisation d'un dérivé isotopique du cyanure [10] ;

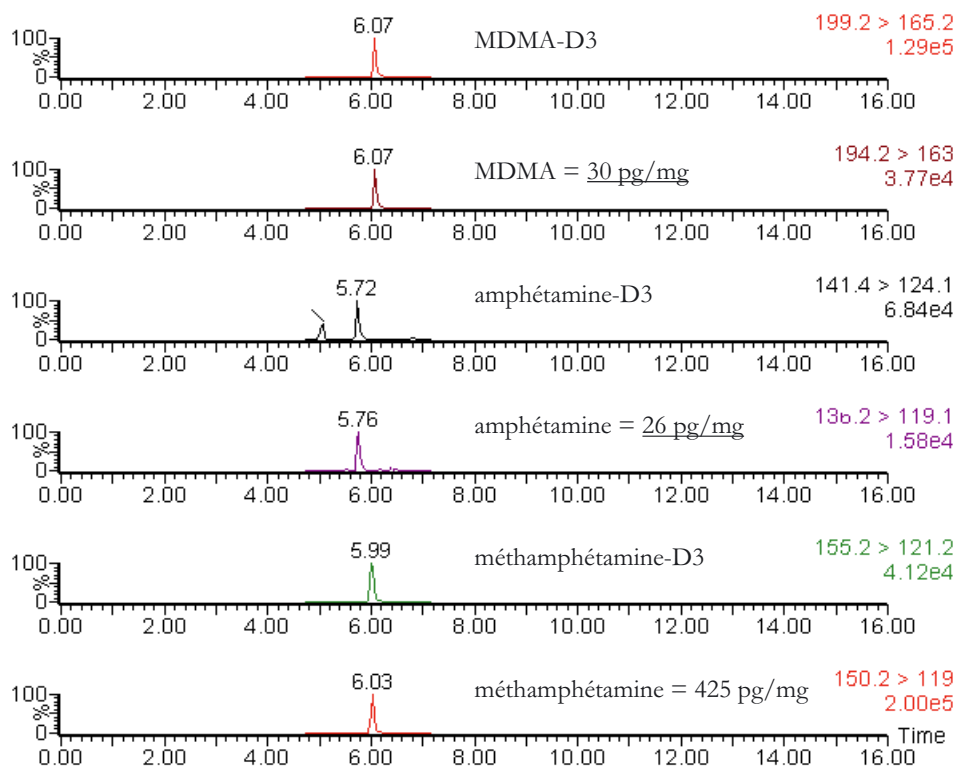


Fig. 2. Chromatogrammes des molécules amphétaminiques après préparation de l'échantillon.

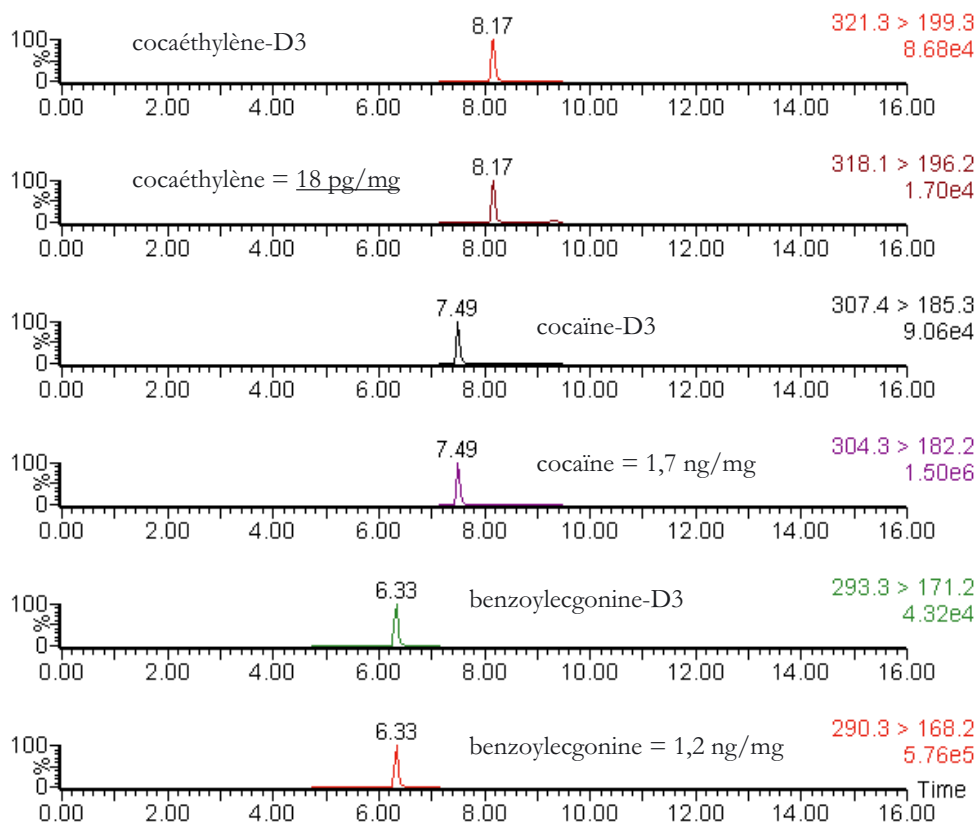


Fig. 3. Chromatogrammes des molécules cocaïniques après préparation de l'échantillon.

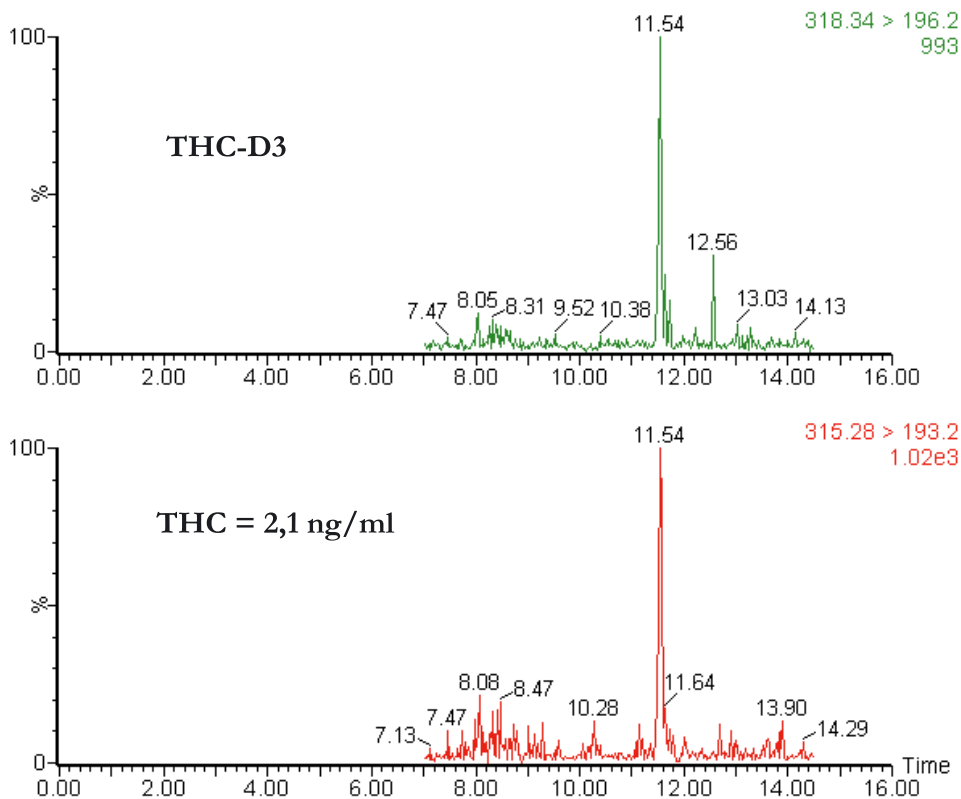


Fig. 4. Chromatogrammes du THC après préparation en ligne de l'échantillon « sanguin ».

- dosage du cannabis : le dosage du cannabis est délicat, mais les conditions de la préparation en ligne sont clairement définies (figure 4). Les limites actuelles sont celles de notre appareillage, déjà un peu ancien, qui ne permet pas d'obtenir les concentrations souhaitées au niveau national c'est-à-dire entre 0,2 et 0,5 ng/mL : ces valeurs pourront sans problème être atteintes à l'aide d'un système de détection plus sensible ;
- charge médicamenteuse des eaux usées : cette application est actuellement en développement au laboratoire. Il suffit d'alimenter la colonne de chargement de type Oasis en sélectionnant par une vanne basse pression, les différents flacons contenant les échantillons filtrés à analyser. Du volume passé sur la colonne de chargement (10, 20, 50 mL ...) à raison de 2 à 3 mL/min dépendra la limite de quantification finale. Cette étape de chargement est suivie d'une élution en « back-flush » sur la colonne analytique avec le gradient utilisé lors du screening médicamenteux.

6 Conclusion

La préparation en ligne couplée à la LC-MS/MS a complètement modifié l'organisation du laboratoire, puisque l'on peut à la fois faire rapidement sur des colonnes et phases mobiles identiques :

- des dosages de médicaments dans le sang, l'urine et les cheveux ;

- des dosages de stupéfiants (amphétaminiques, opiacés, cocaïniques) dans le sang, les urines, les cheveux et sur des SPOTS ;
- des screening médicamenteux, ciblés ou plus large en fonction du matériel, sur le sang, les urines, les cheveux et peut être les SPOTS ;
- le problème du cannabis est tributaire d'une sensibilité augmentée du système de détection.

La PEL représente un gain de temps incontestable par rapport aux méthodes d'extraction « off line ». La qualité de la préparation en ligne passe d'abord et impérativement par la dilution importante des échantillons biologiques qui, seule, permettra d'éviter ou de fortement diminuer les effets de matrice sur des prélèvements souvent dégradés.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Ayrton J, Dear GJ, Leavens WJ, Mallett DN, Plumb RS. The use of turbulent flow chromatography/mass spectrometry for the rapid, direct analysis of a novel pharmaceutical compound in plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1997; 11: 1953-1958.
2. Ayrton J, Dear GJ, Leavens WJ, Mallett DN, Plumb RS. Optimisation and routine use of generic ultra-high flow-rate liquid chromatography with mass spectrometric detection for

- the direct on-line analysis of pharmaceuticals in plasma. *J Chromatogr A*. 1998; 828: 199–207.
3. Thörngren JO, Ostervall F, Garle M. A high-throughput multi-component screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS. *J Mass Spectrom*. 2008; 43: 980–992.
 4. Badou F, Grata E, Perrenoud L, Avois L, Saugy M, Rudaz S, Veuthey JL. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry I. Screening analysis. *J Chromatogr A*. 2009; 4423–4433.
 5. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J Chromatogr B*. 2004; 801: 141–56.
 6. Desilets CP, Rounds MA, Regnier FE. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1991; 17: 25–39.
 7. Lacroix C, Saussereau E, Bodin G, Goullé JP. Quantification des opiacés cocaïniques et amphétaminiques par chromatographie liquide haute performance/spectrométrie de masse en tandem après préparation en ligne de l'échantillon. *Ann Toxicol Anal*. 2008; 20: 25–38.
 8. Saussereau E, Lacroix C, Goullé JP. Dosage des opiacés, amphétaminiques et cocaïniques à partir de spots de sang séché par LC-MS-MS. Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie Analytique. 2010 (Juan Les Pins).
 9. Sano A, Kakimoto N, Takitani S. High-performance liquid chromatographic determination of cyanide in human red blood cells by pre-column fluorescence derivatization. *J Chromatogr* 1992; 582: 131–135.
 10. Lacroix C, Saussereau E, Goullé JP. Dosage des cyanures par LC-MS-MS couplée à une préparation en ligne des échantillons. Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie Analytique. 2010 (Juan-Les-Pins).