

## Article court

# Désorption en ligne de spots de sang séché : une approche intéressante pour l'analyse par LC-MS/MS de microéchantillons de sang<sup>\*</sup>

## *On-line desorption of dried blood spots: an interesting approach for LC-MS/MS analysis of micro-whole blood samples*

Christian Staub<sup>\*\*</sup>, Julien Déglon, Aurélien Thomas, Patrice Mangin

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Unité de Toxicologie et Chimie Forensiques, 1 rue Michel Servet, 1211 Genève 4, Suisse

**Résumé – Objectifs :** Cet article présente un nouveau concept d'extraction en ligne de composés d'intérêt pharmaceutique à partir de spots de sang séché (DBS) et avant analyse par LC-MS/MS. **Méthodes :** Bien qu'il existe un nombre important de publications dédiées à l'analyse de composés d'intérêt pharmaceutique, le couplage en ligne DBS-LC-MS/MS reste encore un défi sérieux pour l'analyste toxicologue. Ce travail, à la lumière de données de la littérature et de la propre expérience des auteurs fait le point sur l'état de la question en 2010. **Conclusion :** Le couplage en ligne DBS-LC-MS/MS va sans aucun doute modifier l'approche analytique en toxicologie clinique et forensique.

**Mots clés :** Spots de sang séché, microéchantillons de sang, LC-MS/MS, désorption en ligne

**Abstract – Aim:** This paper presents a novel concept for on-line extraction of pharmaceutical compounds from dried blood spots (DBS) and before analysis by LC-MS/MS. **Methods:** Although an important number of publications dedicated to analysis of pharmaceutical compounds, the coupling on-line DBS-LC-MS/MS is still a challenge for the analyst toxicologist. This work, in the light of literature data and proper experiences of the authors, makes the point on the state of the art in 2010. **Conclusion:** The coupling on-line DBS-LC-MS/MS will with no doubt change the analytical approach in clinical and forensic toxicology.

**Key words:** Dried blood spots, micro-whole blood samples, LC-MS/MS on-line desorption

Reçu le 2 avril 2010, accepté après modifications le 22 avril 2010  
Publication en ligne le 6 juillet 2010

## 1 Introduction

Une pression croissante est exercée sur les toxicologues afin de réduire les volumes d'échantillons dont ils ont besoin pour leurs analyses. Le problème peut être en partie résolu en utilisant des gouttes de sang séché (*Dried Blood Spots*, ou DBS) comme alternative à du plasma conventionnel ou à du sang liquide. En effet, le papier buvard (ou papier filtre) permet de recueillir une goutte de sang et de la conserver sous forme desséchée. Ainsi un prélèvement sanguin classique, qui implique seringues, tubes, centrifugation et congélation, est évité.

\* Cet article fait suite à une communication orale présentée à la Journée SFTA sur la Préparation des échantillons (Paris, 29 janvier 2010)

\*\* Correspondance : Christian Staub, christian.staub@hcuge.ch

L'utilisation des gouttes de sang séché a été décrite par Bang [1] en 1913 pour l'estimation de la teneur en glucose. Et c'est dans les années 60 que le Professeur Robert Guthrie [2] développa son test de détection de la phénylcétonurie chez les nourrissons. Depuis lors, le papier buvard a de multiples applications en pédiatrie dans le domaine du dépistage des maladies métaboliques.

Cette procédure de prélèvement présente l'avantage par rapport à une prise de sang classique, d'être beaucoup moins invasive pour le patient, mais également une facilité de transport (envoi postal) et de stockage (à température ambiante). Pour certains composés (comme les opiacés), une stabilité accrue a été observée lors du stockage [3]. Un autre avantage est qu'il devient possible d'effectuer des études

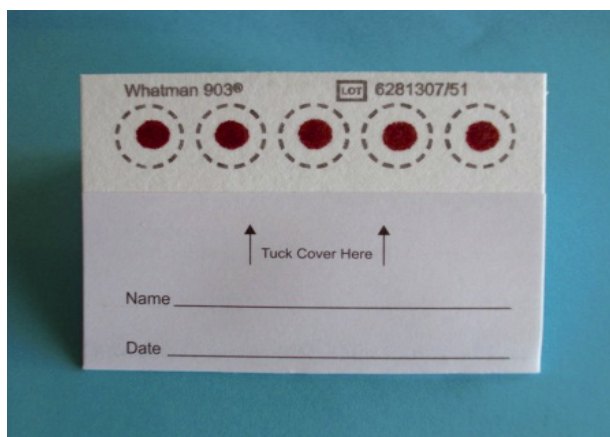


Fig. 1. Papier buvard après application de spots de sang séché.

pharmacocinétiques sur des échantillons prélevés par le patient lui-même avec un minimum de risques (figure 1).

En raison des avantages mentionnés ci-dessus, la technologie DBS a été utilisée récemment dans le dosage de composés pharmaceutiques comme les antimalariques, les antirétroviraux, les antiépileptiques, les antidépresseurs, les antibiotiques ainsi que les immunosuppresseurs. Des revues récentes [4, 5] présentent les avantages et inconvénients de cette nouvelle approche pour un grand nombre de composés d'intérêt pharmaceutique.

Ces techniques nécessitent le découpage d'un disque de papier buvard (correspondant à la surface où la tache de sang a été déposée), l'extraction de ce disque par un mélange de solvants organiques et l'injection de l'extrait final dans un système de couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse simple ou en tandem (LC-MS ou LC-MS/MS). Bien que ces méthodes permettent de travailler sur des petits volumes de sang (10 à 50 µL), aucune n'est utilisable en ligne.

Le besoin de méthodes automatisées en ligne est grand, deux types d'approches sont actuellement présentées :

- Une approche basée sur une interface développée pour la chromatographie sur couche mince, où la désorption du spot de sang séché est effectuée par balayage de la surface du papier buvard au moyen d'un solvant organique. Ce dernier est ensuite utilisé comme phase mobile pour la chromatographie liquide ou directement injecté dans le spectromètre de masse [6, 7].
- Une approche développée par notre groupe [8] où la désorption du papier buvard est effectuée par percolation d'un solvant organique au travers du disque de papier buvard. Ce dernier est ensuite traité en ligne par un système de couplage LC-MS ou LC-MS/MS.

## 2 Méthodes

### 2.1 Préparation des spots de sang séché

Un volume de 2 à 10 µL de sang est prélevé au bout du doigt et appliqué sur un papier buvard. Le papier utilisé le plus souvent dans la procédure DBS est fabriqué par Whatman, à

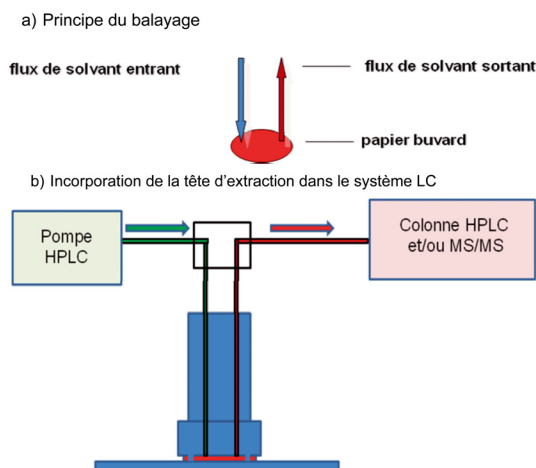


Fig. 2. Approche par balayage : principe et incorporation de la tête d'extraction dans le système HPLC/MS.

partir d'un coton de haute pureté assurant une absorption précise et répétable du sang (voir figure 1). La procédure DBS comprend deux étapes :

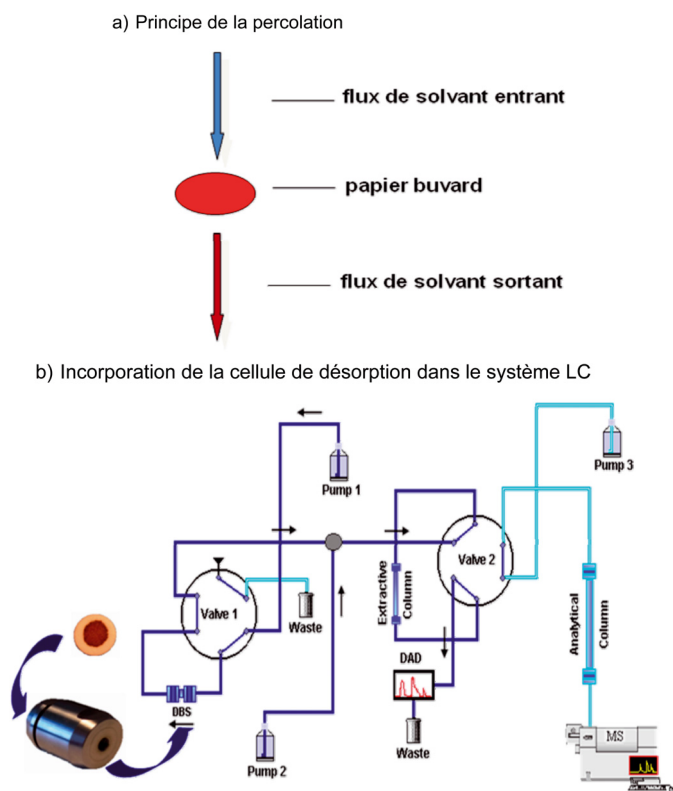
- (1) Appliquer le sang sur la carte et laisser sécher deux heures. Expédier et entreposer au besoin à température ambiante.
- (2) Découper le disque de l'échantillon.

### 2.2 Éluion par balayage

La firme Camag commercialise une interface permettant de traiter des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM). Les substances d'intérêt sont extraites de la plaque de CCM et ensuite elles peuvent être introduites, soit dans un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC), soit directement dans le spectromètre de masse (MS). Cette tête d'extraction a été développée et présentée par Gutmann [9, 10]. Kertesz et Van Berkel [6] ont montré le potentiel de cette interface pour l'éluion directe ainsi que la détection par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) de spots de sang séchés et de coupes de tissus. La même année, Abu-Rabier et Spooner [7] montrèrent que cette interface était utilisable pour extraire des substances d'intérêt pharmaceutique (paracétamol, ibuprofène, sitamaquine) à partir d'échantillons DBS. Le principe de fonctionnement de cette tête d'extraction est illustré à la figure 2. Les auteurs effectuent ensuite l'analyse de l'extrait DBS au moyen d'un spectromètre de masse de type 4000 QTRAP (AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada). La technique d'ionisation est dépendante du composé analysé : ESI pour le paracétamol et APCI pour le sitamaquine, par exemple.

### 2.3 Éluion par percolation

Une autre approche, par percolation, a été présentée récemment par notre groupe [8]. Dans ce concept (appelé « on-line DBS »), le spot de sang est traversé par un solvant et l'extrait est ensuite directement introduit dans le système LC (figure 3).



**Fig. 3.** Approche par percolation : principe et incorporation de la cellule de désorption dans le système HPLC/MS.

Le système comprend une cellule en inox, dans laquelle un disque de papier filtre avec le spot de sang séché est placé (figure 4). Cette cellule est conçue pour être incorporée à n'importe quel système LC. L'étanchéité est assurée par un joint en téflon (diamètre interne et externe de 12 et 14 mm, respectivement, et une épaisseur de 1,5 mm). L'intérieur de la pièce a été usiné de manière à recevoir un spot de sang séché de 50 µL. La cellule de désorption est placée ensuite dans un système LC (Agilent series 1100 system, Waldbronn, Germany). Afin d'assurer l'automatisation de la procédure de désorption, un système de commutation de colonnes est employé [11]. À cet effet, une vanne 6-voies (valve 1) assure la connexion entre la cellule de désorption et le système chromatographique, comprenant une colonne extractive (Chromolith Flash RP-18e, 25 mm × 4,6 mm) et une colonne analytique (Chromolith Performance RP-18e, 100 mm × 4,6 mm), connectées entre elles par une seconde vanne 6-voies (valve 2). Une vanne 12-voies supplémentaire permet une semi-automatisation de la procédure, puisque six supports peuvent ainsi être placés en ligne et le passage à la prochaine cellule de désorption est assuré à la fin de chaque cycle d'analyse.

Dans cette configuration, la pompe 1 (100 % acétonitrile) assure la désorption et le transfert des analytes du papier filtre à la colonne extractive avec un débit de 0,25 mL/min. Le débit de la pompe 2 (100 % eau, 0,1 % acide formique) est fixé à 2,25 mL/min et le débit global est maintenu à 2,5 mL/min au moyen d'un connecteur en forme de té. Enfin la pompe 3 assure le passage de la phase mobile, constituée d'un mélange d'acétonitrile (A) et d'eau (B), additionné de 0,1 %



**Fig. 4.** Détails de la cellule de désorption utilisée dans l'approche DBS par percolation.

d'acide formique, dans la colonne analytique avec un débit de 1,5 mL/min.

Après un temps d'extraction de 5,5 min, la vanne 2 est commutée en position 1, afin de connecter les colonnes extractive et analytique. Les composés retenus sont ensuite élués en mode « back flush » et transférés en tête de la colonne analytique. Finalement, un gradient de solvants est appliqué afin d'assurer une séparation optimale des composés d'intérêt pharmaceutiques en un temps acceptable.

La détection des composés est effectuée au moyen d'un spectromètre de masse MSD 1100 version VL, équipé d'une source APCI (Agilent, Waldbronn, Allemagne). Le spectromètre de masse travaille en mode positif avec des paramètres de réglage classiques [8].

### 3 Résultats

#### 3.1 Choix de composés modèles

Afin d'évaluer les performances du concept « on-line DBS », nous avons choisi trois composés modèles, dont les teneurs thérapeutiques restent compatibles avec une détection par un spectromètre de masse classique :

- (a) Le saquinavir, un antirétroviral, inhibiteur de la protéase.
- (b) L'imipramine, un antidépresseur tricyclique.
- (c) Le vérapamil, un antagoniste du calcium.

#### 3.2 Désorption du papier filtre

Le meilleur compromis entre une bonne désorption du papier filtre et un effet de matrice négligeable est obtenu avec l'acétonitrile. Bien que l'acétonitrile possède d'excellentes propriétés de désorption, ce n'est de loin pas le meilleur solvant pour retenir les analytes dans la colonne extractive. Partant de ces considérations, l'utilisation du connecteur en té permet de contourner ce problème et d'ajuster la polarité de la

**Tableau I.** Paramètres instrumentaux de la procédure « on-line DBS ».

Temps (min)	Vanne 1 position	Vanne 2 position	Pompe 1 (mL/min)	Pompe 2 (mL/min)
0,00	0	0	0,00	0,00
0,01	1	0	0,25	0,00
0,49	1	0	0,25	0,00
0,50	1	0	0,25	2,25
5,00	0	0	0,25	2,25
5,01	0	0	0,00	2,25
5,50	0	1	0,00	2,25
7,50	0	0	0,00	2,25
14,50	0	0	0,00	2,25
14,51	0	0	0,00	0,00
16,00	0	0	0,00	0,00
16,10	0	0	0,00	0,00
18,00	0	0	0,00	0,00

phase mobile par ajout d'eau. Les paramètres instrumentaux de notre procédure « on-line DBS » sont donnés dans le tableau I.

Le débit de désorption a été fixé à 0,25 mL/min et est un bon compromis entre une efficacité de désorption optimale et une compatibilité avec notre système de commutation de colonnes.

### 3.3 Effet de matrice et sélectivité

En raison du couplage direct de la procédure DBS avec le système LC/MS, une attention toute particulière a été portée aux interférences provoquées par les effets de matrice. Ces derniers ont été évalués par infusions post-colonnes. Ce type d'expériences consiste à placer un spot de sang séché dans la cellule en inox et d'infuser les analytes dans la phase mobile après la colonne analytique. Aucune variation du signal MS n'a été observée dans la fenêtre de détection des composés. La sélectivité a aussi été étudiée en appliquant six spots sanguins différents sur le papier buvard. Aucune interférence n'a été observée pour les temps de rétention correspondant aux composés étudiés.

### 3.4 Performances du système

La procédure « on-line DBS » doit permettre l'analyse quantitative de spots de sang séché de 10 µL. Afin de tester les performances du système, nous avons évalué les paramètres d'exactitude et de précision pour les trois composés modèles, en déposant l'échantillon de sang à la pipette à partir d'un tube primaire. Le standard interne (trimipramine D3 pour la l'imipramine et le vérapamil, saquinavir D9 pour le saquinavir) est ajouté directement sur le spot de sang avant son découpage. Les résultats présentés dans le tableau II sont tout à fait promoteurs, tant du point de vue de l'exactitude que du point de vue de la précision pour les trois composés étudiés.

De plus nous avons évalué l'effet mémoire de notre système en injectant un échantillon « blanc » après un autre échantillon correspondant à deux fois la concentration du point de calibration le plus élevé. Aucun effet mémoire significatif (<0,01 %) n'a été observé lors de nos expériences.

**Tableau II.** Paramètres de quantification obtenus pour les trois composés modèles.

Critères	Saquinavir	Imipramine	Vérapamil
<b>Exactitude (%)</b>			
50 ng/mL	–	97,7	116,1
100 ng/mL	105,2	–	–
500 ng/mL	–	90,8	104,0
1000 ng/mL	90,5	–	–
<b>Précision (%)</b>			
50 ng/mL	–	13,8	6,8
100 ng/mL	8,4	–	–
500 ng/mL	–	8,1	13,9
1000 ng/mL	8,9	–	–

Des essais préliminaires ont été effectués avec un spectromètre du type 5500 QTrap (AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada). Par rapport aux performances présentées dans cet article, le volume de sang appliqué peut être diminué d'un facteur deux à cinq selon le type de composés recherchés, sans compromettre les résultats en termes d'exactitude et de précision. De plus, ce type de spectromètre permet d'analyser des composés médicamenteux à basses teneurs thérapeutiques (de l'ordre du ng/mL).

### 3.5 Comparaison procédure « on-line DBS » versus LC-MS/MS classique

Nous avons comparé notre procédure avec une méthode LC-MS/MS entièrement validée et utilisée en routine pour la mesure des teneurs plasmatiques en saquinavir [12]. Comme décrit précédemment, 10 µL de sang ont été appliqués sur un papier buvard pendant que le reste de l'échantillon était chauffé à 60 °C pendant 30 min et centrifugé à la Division de pharmacologie clinique du centre hospitalier universitaire Vaudois (CHUV, Lausanne, Suisse). Les analyses ont ensuite été pratiquées sur la fraction plasmatique. Les résultats de l'étude, portant sur 13 patients, montrent une excellente corrélation entre les deux techniques avec une pente de 1,12 et un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,9614. Compte tenu du nombre restreint de patients, ces résultats semblent confirmer les données obtenues précédemment par d'autres chercheurs [13].

## 4 Conclusion

Le papier buvard est devenu un classique dans le dépistage des maladies génétiques chez le nouveau né, son utilisation comme prélèvement sanguin remonte déjà à 1960 et au test de Guthrie. Il ne fait aucun doute que la technique DBS va pénétrer encore des domaines nouveaux comme le monitoring thérapeutique, les études pharmacocinétiques, l'analyse quantitative de biomarqueurs ainsi que les tests de phénotypage. La procédure DBS présente l'avantage, par rapport à une prise de sang veineux, d'être beaucoup moins invasive pour le patient (prélèvement particulièrement intéressant chez les nouveaux nés), mais également une facilité de transport (envoi par la poste) et de stockage (à température ambiante, pas besoin



d'un congélateur ou d'un réfrigérateur). De plus cette technique permet de diminuer le volume de sang nécessaire aux analyses, rendant ainsi possibles des études pharmacologiques et pharmacocinétiques sur des petits animaux où les volumes de liquides biologiques sont très limités. Cependant, la clé du succès repose dans le couplage en ligne des techniques DBS et LC-MS/MS. En effet, c'est seulement lorsque que la procédure sera entièrement automatisée qu'il sera possible d'entreprendre des études avec un nombre important de patients. Il est donc souhaitable que des automates soient développés afin de pouvoir traiter en série non plus six échantillons, mais trente voire cinquante spots de sang séché. Si grâce aux travaux présentés par notre groupe, nous pouvions modestement contribuer à montrer la voie à suivre, nous en serions que plus heureux.

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

## Références

- Bang I. Ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen. *Biochem Ztschr.* 1913; 49: 19-39.
- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963; 32: 338-343.
- Garcia Boy R, Henseler J, Mattern R, Skopp G. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther Drug Monit.* 2008; 30:733-739.
- Li W, Tse FLS. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr.* 2010; 24: 49-65.
- Edelbroek PM., Van der Heijden J, Stolk LML. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit.* 2009; 31: 327-336.
- Kertesz V, Van Berkel GJ. Application of a didiqu extraction based sealing surface sampling probe for mass spectrometric analysis of dried blood spots and mouse whole-body thin tissue sections. *Anal Chem.* 2009; 81: 9146-9152.
- Abu-Rabie P, Spooner N. Direct quantitative bioanalysis of drugs in dried blood spot samples using a thin-layer chromatography mass spectrometer interface. *Anal Chem.* 2009; 81: 10275-10284.
- Déglon J, Thomas A, Cataldo A, Mangin P, Staub C. On-line desorption of dried blood spot: a novel approach for the direct LC/MS analysis of  $\mu$ -whole blood samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 49:1034-1039.
- Luftmann H. A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem.* 2004; 378:964-968.
- Lufmann H, Aranda M, Morlock GE. Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21: 3772-3776.
- Bugey A, Staub C. Application of monolithic supports to online extraction and LC-MS analysis of benzodiazepines in whole blood samples. *J Sep Sci.* 2007; 30: 2967-2978.
- Colombo S, Beguin A, Telenti J, Biollaz J, Buclin T, Rochat B, Decosterd LA. J. Intracellular measurements of anti-HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir, efavirenz and nevirapine in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Chromatogr B.* 2005; 819: 259-276.
- Koal T, Burhenne R, Römling R, Svoboda M, Resch K, Kaefer V. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19: 2995-3001.