



## La dérivation avec introduction de marquage isotopique pour l'analyse sélective des produits de peroxydation lipidique dans la lumière intestinale par des approches LC-MS ciblées et non-ciblées

Sylvie S. Chevolleau, Maria-Hélène Noguer-Meireles, Isabelle Jouanin, Loic Mervant, Jean-François Martin, Nathalie Naud, Fabrice H.F. Pierre, Françoise Guéraud, Laurent Debrauwer

### ► To cite this version:

Sylvie S. Chevolleau, Maria-Hélène Noguer-Meireles, Isabelle Jouanin, Loic Mervant, Jean-François Martin, et al.. La dérivation avec introduction de marquage isotopique pour l'analyse sélective des produits de peroxydation lipidique dans la lumière intestinale par des approches LC-MS ciblées et non-ciblées. 15ème congrès francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l'AFSEP (SEP 2021), Oct 2021, Paris, France. hal-04406225

**HAL Id: hal-04406225**

**<https://hal.science/hal-04406225>**

Submitted on 19 Jan 2024

**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.

# La dérivation avec introduction de marquage isotopique pour l'analyse sélective des produits de peroxydation lipidique dans la lumière intestinale par des approches LC-MS ciblées et non-ciblées.



S. CHEVOLLEAU<sup>1,2</sup>



M-H. MEIRELES<sup>1,2</sup>; I. JOUANIN<sup>1,2</sup>; L. MERVANT<sup>1,2</sup>; J-F. MARTIN<sup>1,2</sup>; N. NAUD<sup>1</sup>; F. PIERRE<sup>1</sup>; F. GUERAUD<sup>1</sup>; L. DEBRAUWER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Metatoul-AXIOM Platform, MetaboHUB, Toxalim, INRAE, Toulouse, France

<sup>2</sup> Toxalim, Toulouse University, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

## Introduction

- Les régimes alimentaires riches en viande rouge sont associés à un risque élevé de cancer colorectal (CCR). Une hypothèse majeure implique le fer héminique alimentaire qui induit la formation de produits d'oxydation des lipides tels que les aldéhydes réactifs [1].
- Les aldéhydes tels que le 4-hydroxyhexenal (HHE) ou le 4-hydroxynonanal (HNE) sont connus pour être cytotoxiques et génotoxiques et peuvent jouer un rôle favorisant dans le développement du CCR, en sélectionnant les cellules précancéreuses.
- Ces aldéhydes sont spécifiques de leurs acides gras précurseurs, mais ils ne sont pas tous identifiés.
- Afin d'obtenir une image qualitative et quantitative de la peroxydation lipidique dans la lumière intestinale, une stratégie basée sur la dérivation et le marquage isotopique stable simultanés de ces composés carbonylés est proposée, permettant à la fois un suivi ciblé d'aldéhydes représentatifs (HHE et HNE) et un profilage non ciblé des carbonylés.

## Stratégie

Des échantillons d'eau fécale provenant de rats nourris avec différents régimes pro-oxydants ont été dérivatisés par le Bromo benzène hydroxylamine (BBHA) [2] et analysés par LC-ESI-MS après extraction SPE.

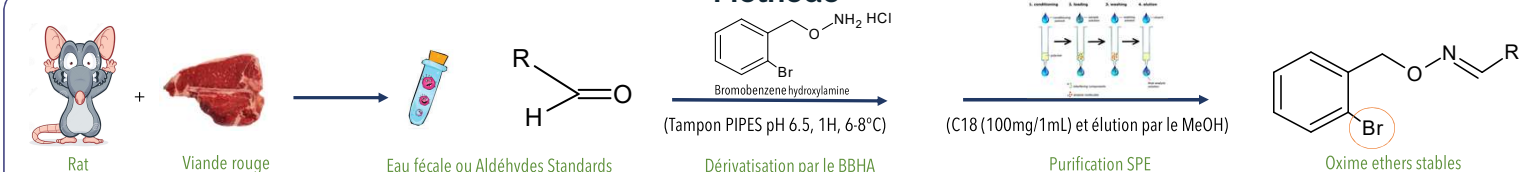
### Approche ciblée

Développement et validation d'une méthode par UHPLC-ESI-MS/MS en mode MRM (TSQ).  
Utilisée pour la quantification ciblée de deux aldéhydes (HHE et HNE) en étalonnage interne [3].

### Approche non-ciblée

Développement d'une méthode HPLC-HRMS (LTQ-Orbitrap).  
Utilisée pour le profilage non-ciblé d'aldéhydes dérivés basé sur le filtrage du signal des dérivés bromés [4].

## Méthode



### Approche ciblée UHPLC-ESI-MS/MS

Standards: HHE-BBHA / HNE-BBHA

Standards internes: HHEd5-BBHA / HNEd11-BBHA

Méthode MRM : détection sensible et sélective du HNE et HHE dérivatisés, sur la base de transitions caractéristiques suivies à partir des pics isotopiques du brome 79 et 81

Conditions UHPLC- ESI-MS/MS

- ✓ **LC** : Accela 600 (ThermoScientific), Colonne : Hypersil Gold C18 (50x2,1mm), 1,9µm + pre-filtre Phases mobiles : A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (85/15/0.1); B (5/95/0.1) Débit : 0,3mL/min, Température: 40°C, Volume d'injection : 5µL
- ✓ **MS** : TSQ Vantage (ThermoScientific) ESI positif, mode MRM, température du nébuliseur : 420 °C, température du capillaire de transfert : 320°C, voltage du capillaire de transfert : 4.8kV, débit de sheath gas : 25ua, débit de auxiliary gas : 15au, débit de sweep gas : 3au



### Approche non-ciblée HPLC-ESI-HRMS

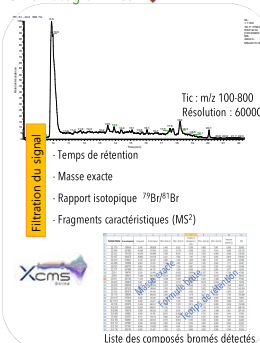
Standard interne : Benzaldehyded5-BBHA

Analyse HRMS : détection sensible et sélective des aldéhydes dérivatisés sur la base des pics isotopiques du brome 79 et 81 .

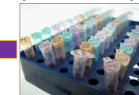
Conditions HPLC- ESI-HRMS/MS?

- ✓ **LC** : RSLC3000 (ThermoScientific), Colonne : Kinetex C18 (150 x 2.1 mm, 2.6 µm) + colonne de garde (Phenomenex) Phases mobiles : A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (95/5/0.1); B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH (5/95/0.1) Débit : 0,2mL/min, Température: 40°C, Volume d'injection : 2µL
- ✓ **MS** : LTQ Orbitrap XL (ThermoScientific) ESI positif, température du capillaire de transfert : 300°C, voltage du capillaire de transfert : 25V, débit de sheath gas : 55ua, débit de auxiliary gas : 10au, Tube lens : 100V

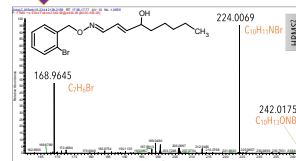
### Chromatogrammes



### Synthèse d'aldéhydes standards



### Identification MS<sup>n</sup>

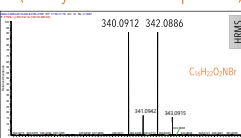


### Inconnus

### Liste d'aldéhydes dans les eaux fécales

| Aldéhydes BBHA             | Formules brutes                                    | Masses exactes théoriques<br>[M+H] <sup>+</sup> | T <sub>r</sub><br>(min) | Masses exactes mesurées<br>[M+H] <sup>+</sup> |          |          |          |          |
|----------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| HHE (4-hydroxy-2E-hexenal) | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub> NBr | 298.04372                                       | 300.04167               | 15.6/15.8                                     | 298.0442 | 300.0416 |          |          |
| OHE (4-oxo-2E-hexenal)     | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> NBr | 296.02807                                       | 298.02402               | 16.8                                          | 296.0281 | 298.0259 |          |          |
| HNE (4-hydroxy-2E-nonanal) | C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub> NBr | 340.09067                                       | 342.08862               | 17.6/17.8                                     | 340.0912 | 342.0886 |          |          |
| ONE (4-oxo-2E-nonanal)     | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> NBr | 338.07502                                       | 340.07297               | 18.6/18.7                                     | 338.0748 | 340.0727 |          |          |
| EDE (4,5-époxy-2E-décenal) | C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> NBr | 352.09067                                       | 354.08862               | 17.8                                          | 352.0911 | 354.0886 |          |          |
| DDE (2E,4E-décadienal)     | C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> NBr | 336.09575                                       | 338.09371               | /                                             | /        | /        |          |          |
| DNA (9-oxo-nonanoic acid)  | C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub> NBr | 356.08558                                       | 358.08354               | 16.7                                          | 356.0859 | 358.0836 |          |          |
| MDA (malondialdehyde)      | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> NBr | 255.99677                                       | 257.99472               | 14.5                                          | 255.9967 | 257.9947 |          |          |
|                            | C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> NBr | 438.16513                                       | 440.16308               | 442.16104                                     | 18.7     | 438.1659 | 440.1635 | 442.1611 |
| OHN (4-hydroxy-nonanal)    | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub> NBr | 342.10632                                       | 344.10427               | 17.7                                          | 342.1068 | 344.1043 |          |          |

### Connus (aldéhydes standards disponibles)



### Application

Les résultats obtenus sur des régimes alimentaires contrastés (précurseurs d'acides gras) indiquent que (i) plusieurs dérivés aldéhydiques attendus tels que le 4-HHE et/ou le 4-HNE ont pu être détectés, (ii) la méthode a pu être utilisée de manière semi-quantitative pour comparer différents régimes alimentaires et (iii) plusieurs autres aldéhydes inconnus ont également été détectés et identifiés.

## Conclusion

- Une stratégie originale de dérivation a été développée pour la stabilisation des aldéhydes et composés carbonylés issus de la peroxydation lipidique.
- La méthodologie permet à la fois une analyse ciblée des aldéhydes basée sur des transitions MRM caractéristiques et un profilage non-ciblé des aldéhydes basé sur le filtrage du signal des dérivés bromés.

## References

- [1] F. Guéraud et al., 2015, Free Radic. Biol. Med., 83, 192-200
- [2] I. Jouanin et al. 2015, Synth. Commun., 45, 1585-1591
- [3] S. Chevolleau et al. 2018, Journal of Chromatography B., 1083, 171-179
- [4] S. Chevolleau et al. 2021, Antioxidants, 10, 1261
- [5] Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/192217/2009/rev.1 Corr.2.21 July 2011

Poster présenté à SEP 2021, 5-7 octobre 2021, Paris, France

## Remerciements

MetaboHUB (MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010)

Contact : sylvie.chevolleau@inrae.fr

