



HAL
open science

Que peut apporter la chromatographie liquide bidimensionnelle en heart-cutting à la métabolomique non ciblée ?

Carla Orlandi, Carine Jacques, Hélène Duplan, Laurent Debrauwer, Emilien Jamin

► To cite this version:

Carla Orlandi, Carine Jacques, Hélène Duplan, Laurent Debrauwer, Emilien Jamin. Que peut apporter la chromatographie liquide bidimensionnelle en heart-cutting à la métabolomique non ciblée ?. SEP 21, Oct 2021, Paris, France. hal-04530571

HAL Id: hal-04530571

<https://hal.science/hal-04530571>

Submitted on 3 Apr 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.

Que peut apporter la chromatographie liquide bidimensionnelle en heart-cutting à la métabolomique non ciblée ?

Carla ORLANDI

MetaboHUB-Metatoul-AXIOM

INRAE ToxAlim

Toulouse

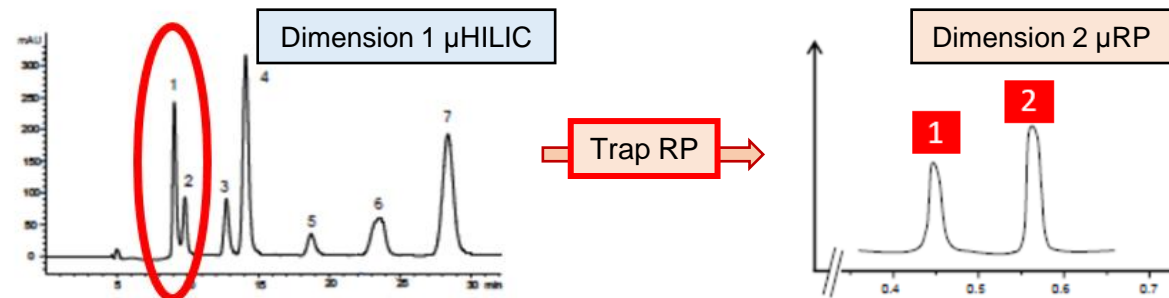


Objectifs

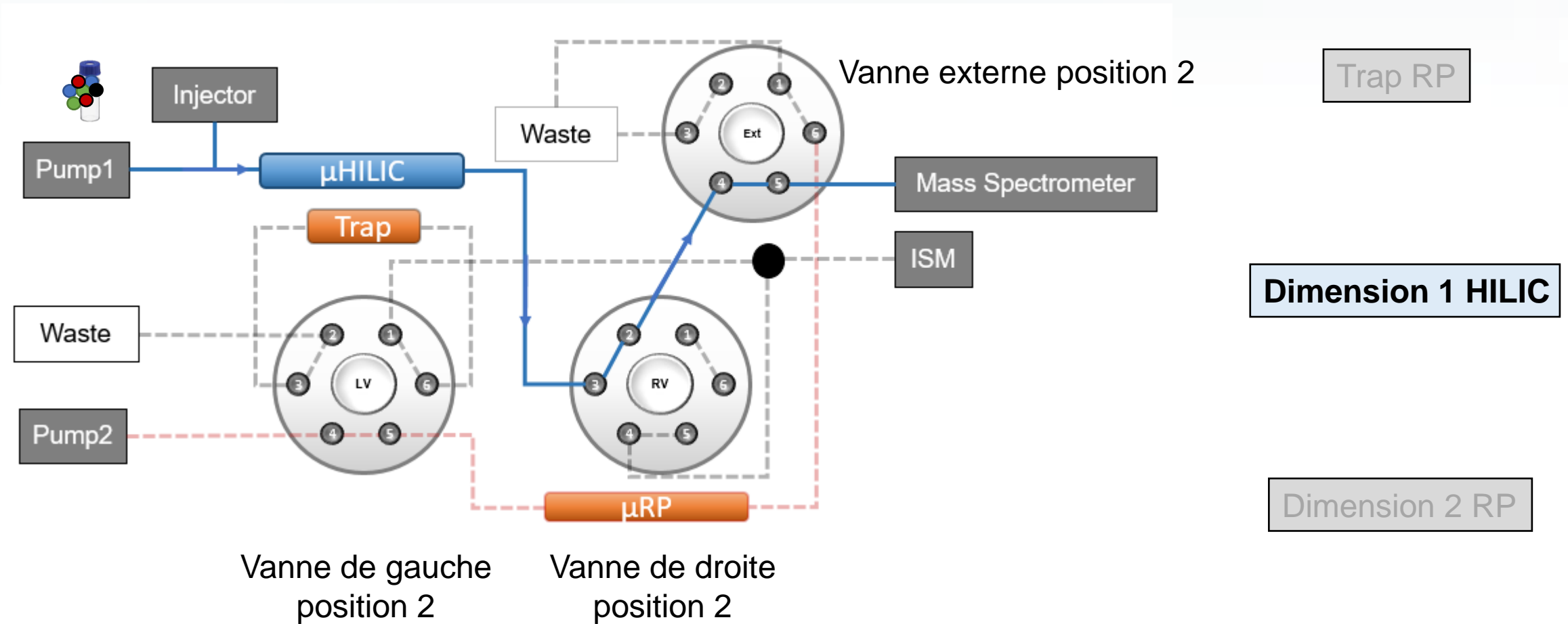
- Augmenter la couverture métabolique sur l'ensemble des analyses par LC-HRMS
- Miniaturisation des méthodes (μ LC)

- ✓ Gagner en sensibilité de détection
- ✓ Améliorer la séparation des composés co-élués
- ✓ Diminuer le volume d'échantillon injecté et le nombre d'injections
- ✓ Diminuer la consommation de solvant
- ✓ Améliorer la rapidité des méthodes d'analyse
- ✓ Proposer une analyse globale

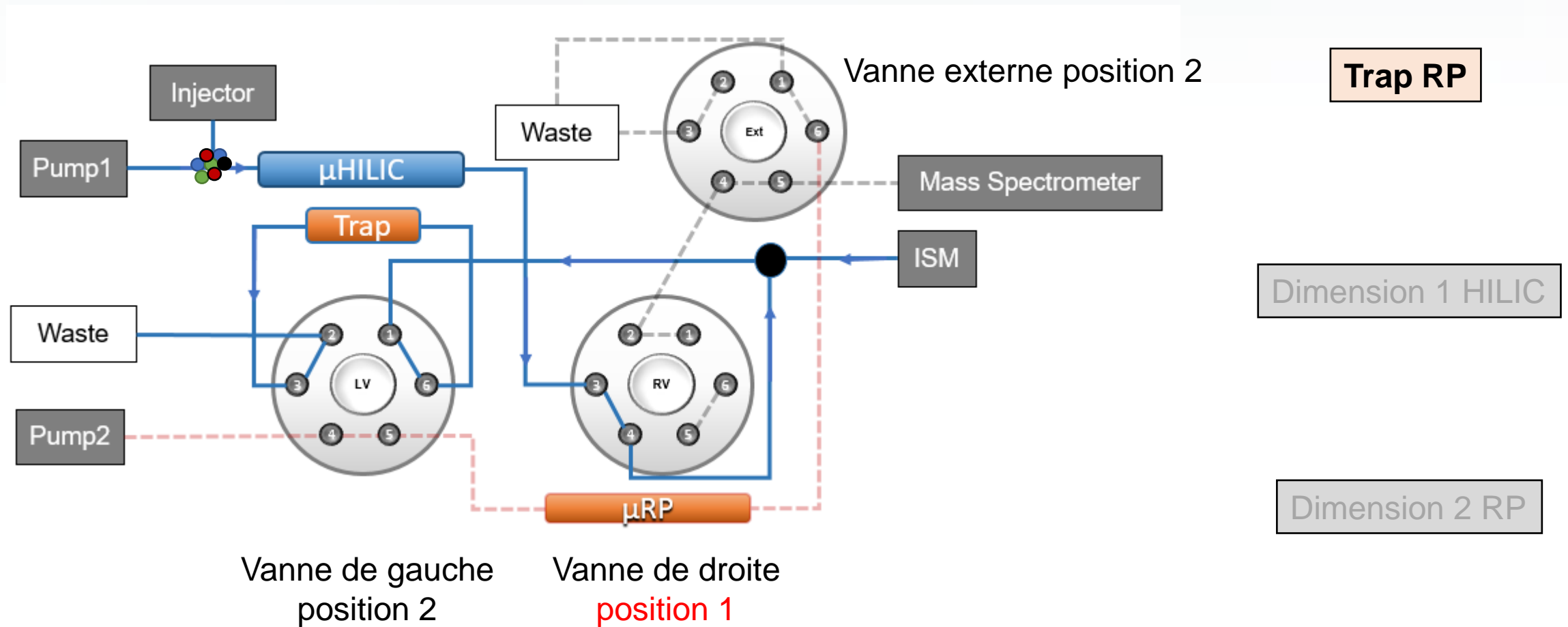
Heart-Cutting



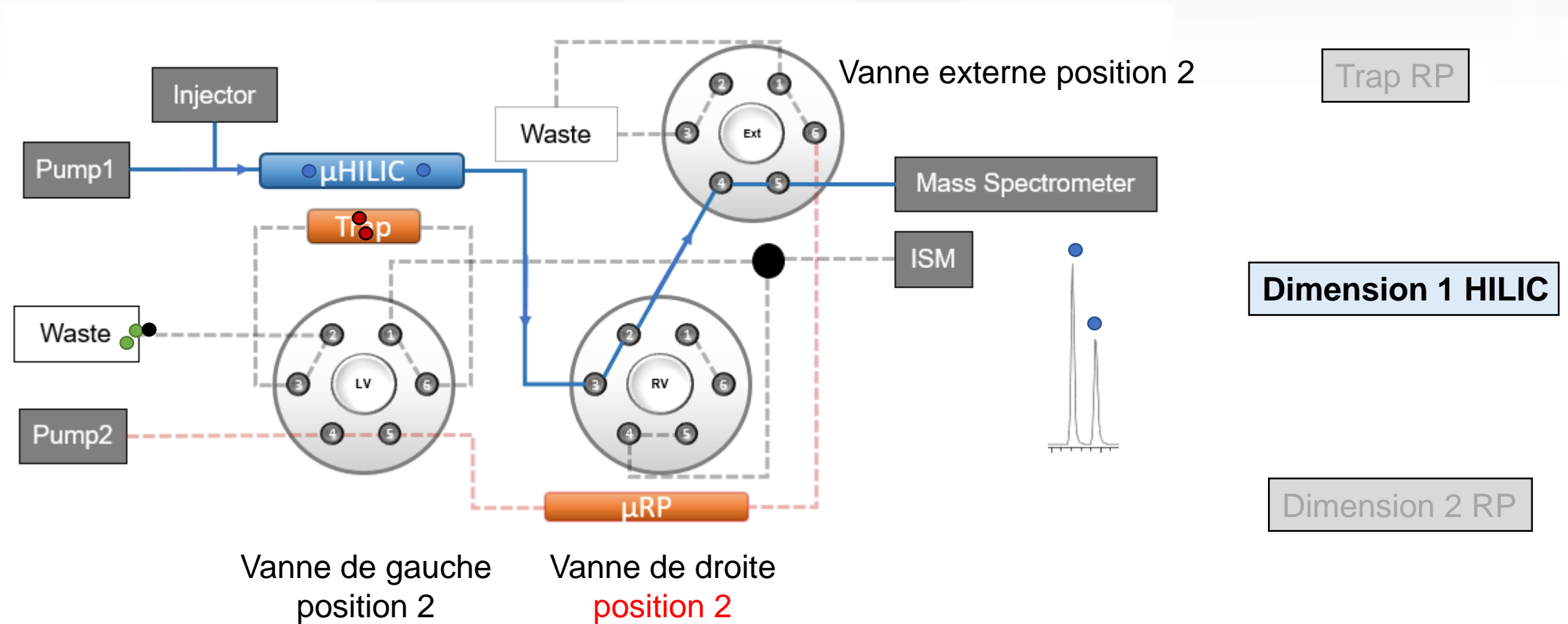
Principe Heart-Cutting: Injection de l'échantillon



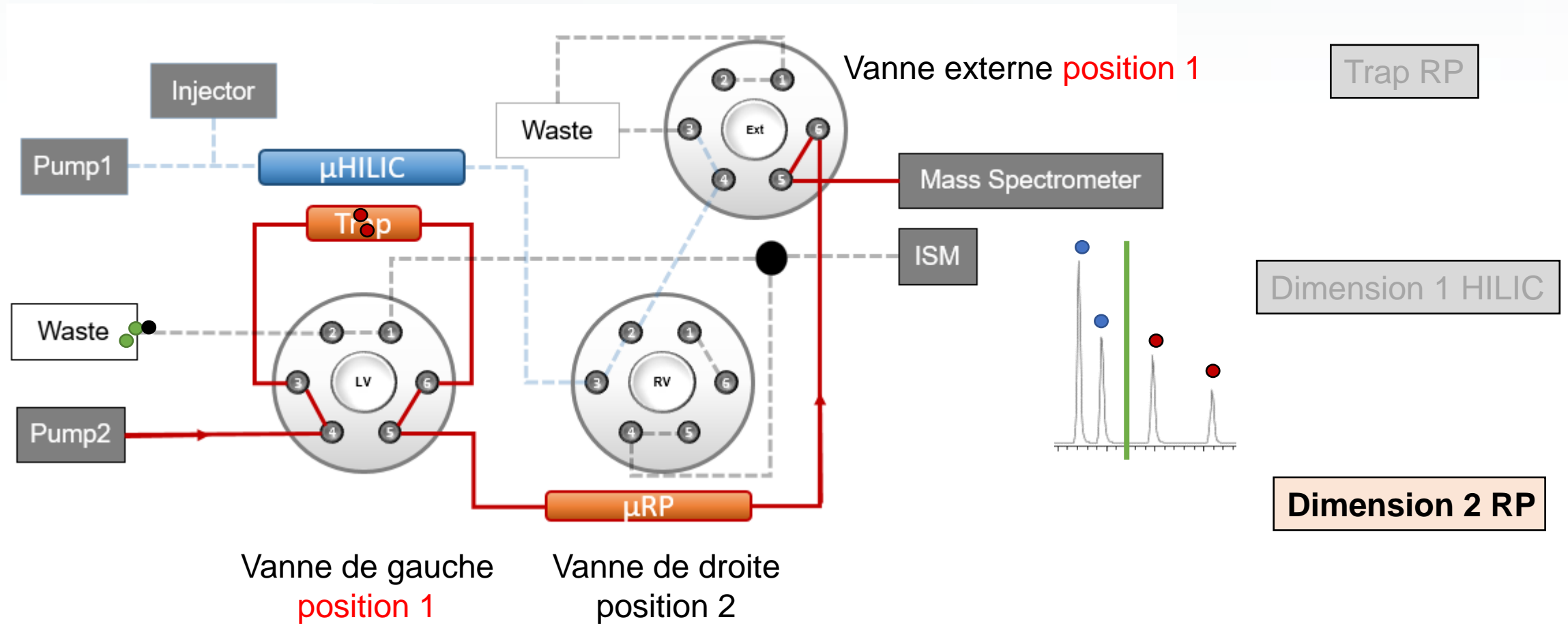
Principe Heart-Cutting: Etape de piégeage



Principe Heart-Cutting: Analyse 1^{ère} dimension μ HILIC



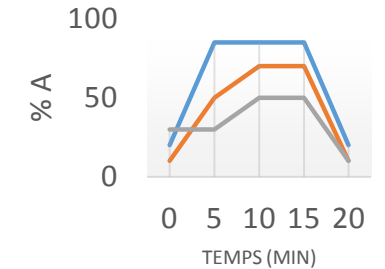
Principe Heart-Cutting: Elution et analyse sur la 2^{ème} dimension μ RP



2D- μ LC-MS: axes de développements

🔗 Développement des méthodes μ HILIC et μ RP sur un mélange de standards

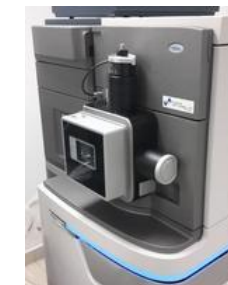
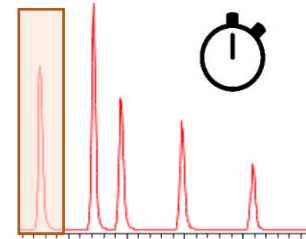
- Colonnes de dimensions et phases stationnaires
- Tampons, [C] et pH
- Gradients et compatibilité phases mobiles



🔗 Combinaison des 2 méthodes \rightarrow 1 méthode 2DLC

➤ Optimisations:

- HILIC//RP avec cartouche de piégeage RP
- Temps de piégeage et solvant de rinçage
- Paramètres de reconditionnements
- Paramètres d'ionisation MS



🔗 Evaluation par rapport à une méthode RP-HRMS existante [1]

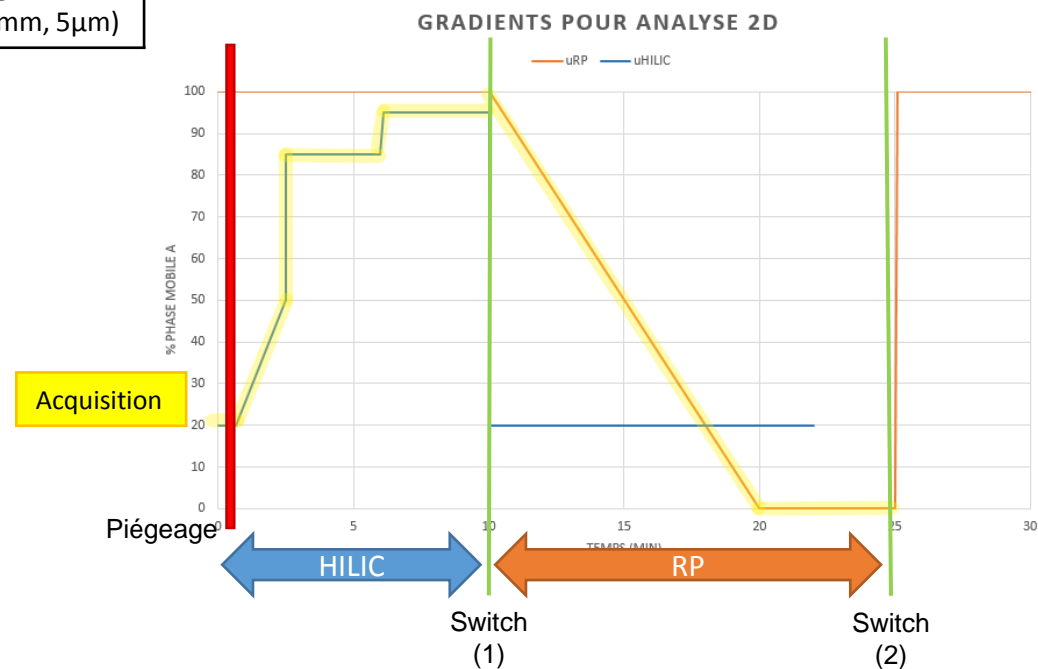
[1] Jacques C. and Jamin E.L. et al. *Archive Tox.* (2021) 95, 3303-3322

Conditions chromatographiques et d'ionisation

	μHILIC (Dimension1)	μRP (Dimension 2)	ISM et Trap
Phase A	10 mM ammonium formate pH 10.5 (NH ₄ OH)	H ₂ O/ACN/HCOOH (95/5/0.1)	100 % H ₂ O
Phase B	ACN 100%	ACN/HCOOH (100/0.1)	
Débit	0.05 mL/min	0.15 mL/min	0.5 mL/min
P° initiales	90 bars	512 bars	
SealWash	ACN/H ₂ O (20/80)		
Wash, A2, B2	ACN/H ₂ O (75/25)		
Colonne	Acquity BEH Amide (1.0 x 100 mm, 1.7μm)	Acquity HSS T3 (1.0 x 100 mm, 1.8μm)	XBridge C18 (2.1 x 20 mm, 5μm)
Température	40 °C		
V _{injection}	1 μL		
Capillary Voltage	1.8 kV		
Sampling Cone	20		
Source Offset	80		
T° Source	100 °C		
T° Desolvation	500°C		
Cone Gas	40		
Desolvation Gas	600		
Nebuliseur	6.5		



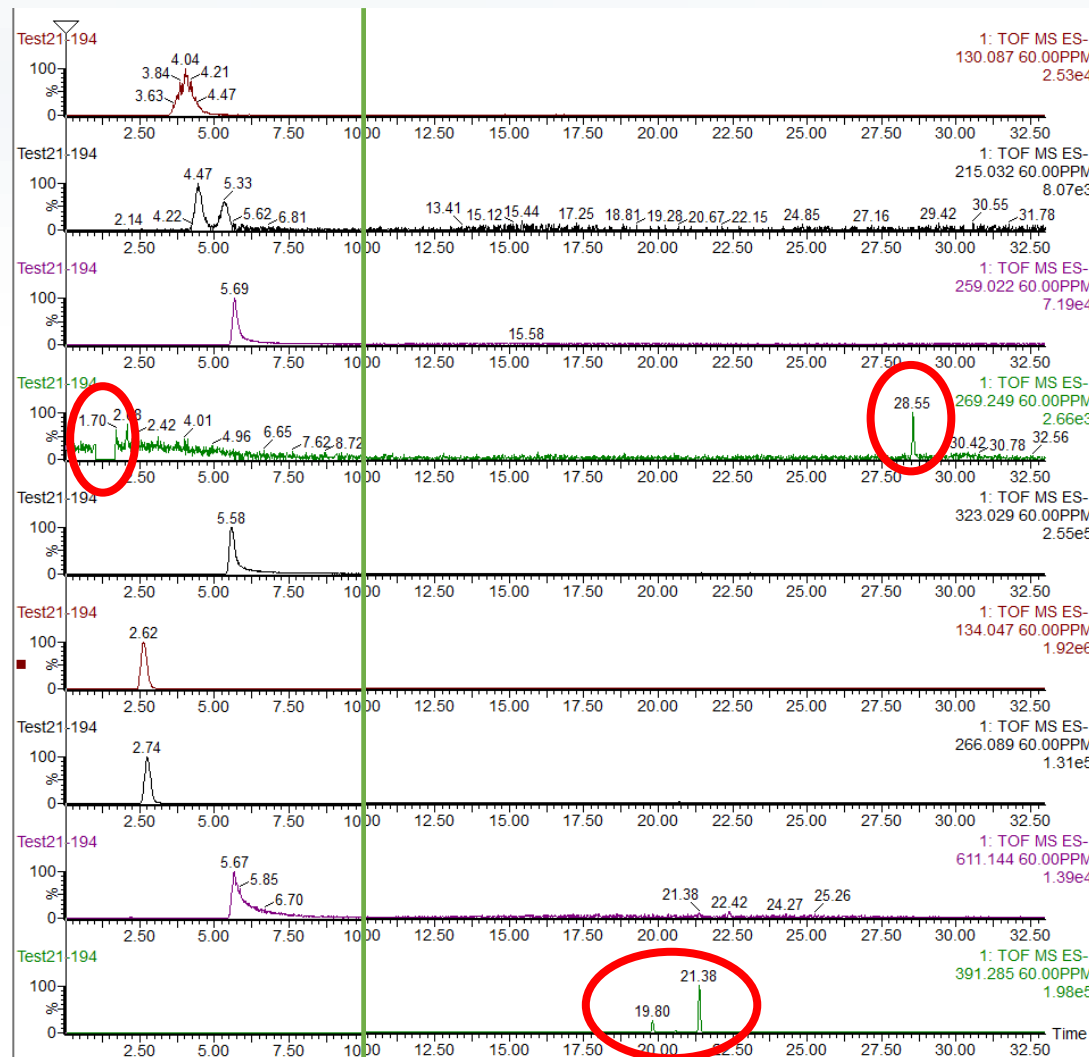
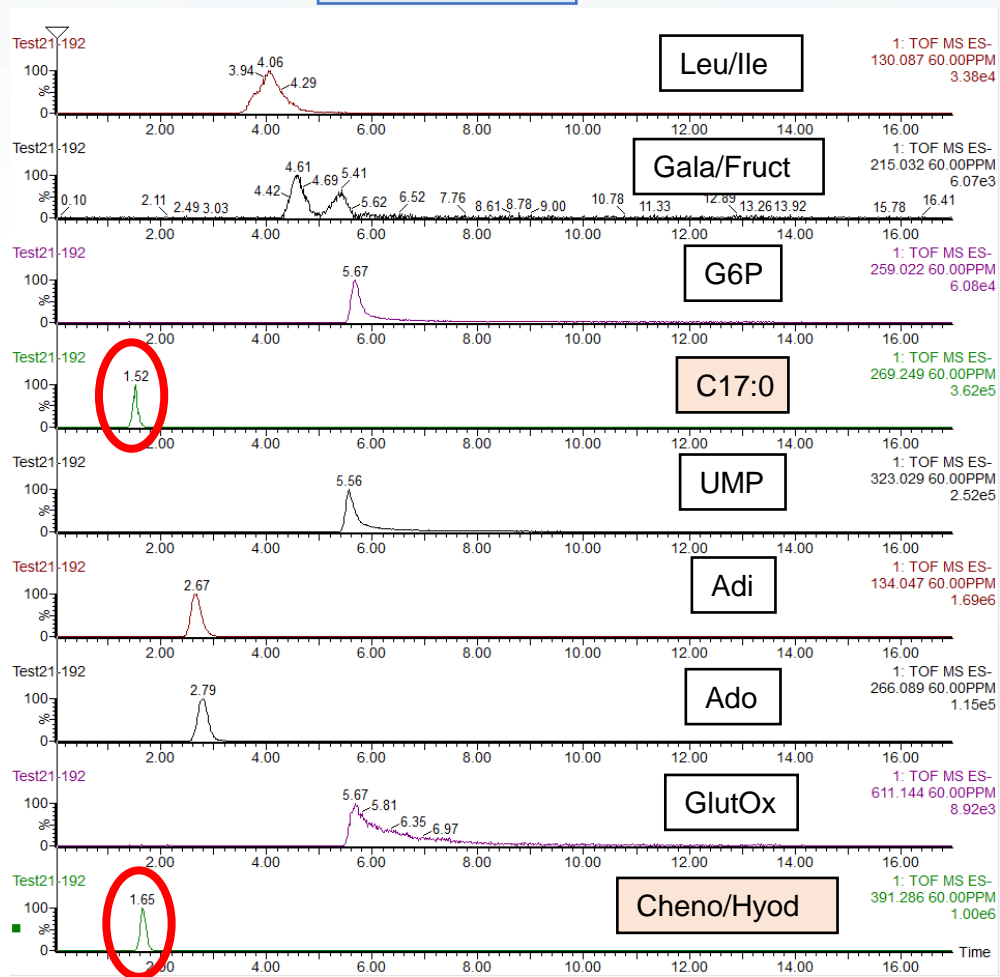
Waters Acquity UPLC I Class – QToF Synapt G2Si



Application: premiers résultats sur mélange de standards

2D μ HILIC- μ RP

1D μ HILIC



Leu/Ile

Gala/Fruct

G6P

C17:0

UMP

Adi

Ado

GlutOx

Cheno/Hyod

1D μ HILIC

2D μ RP

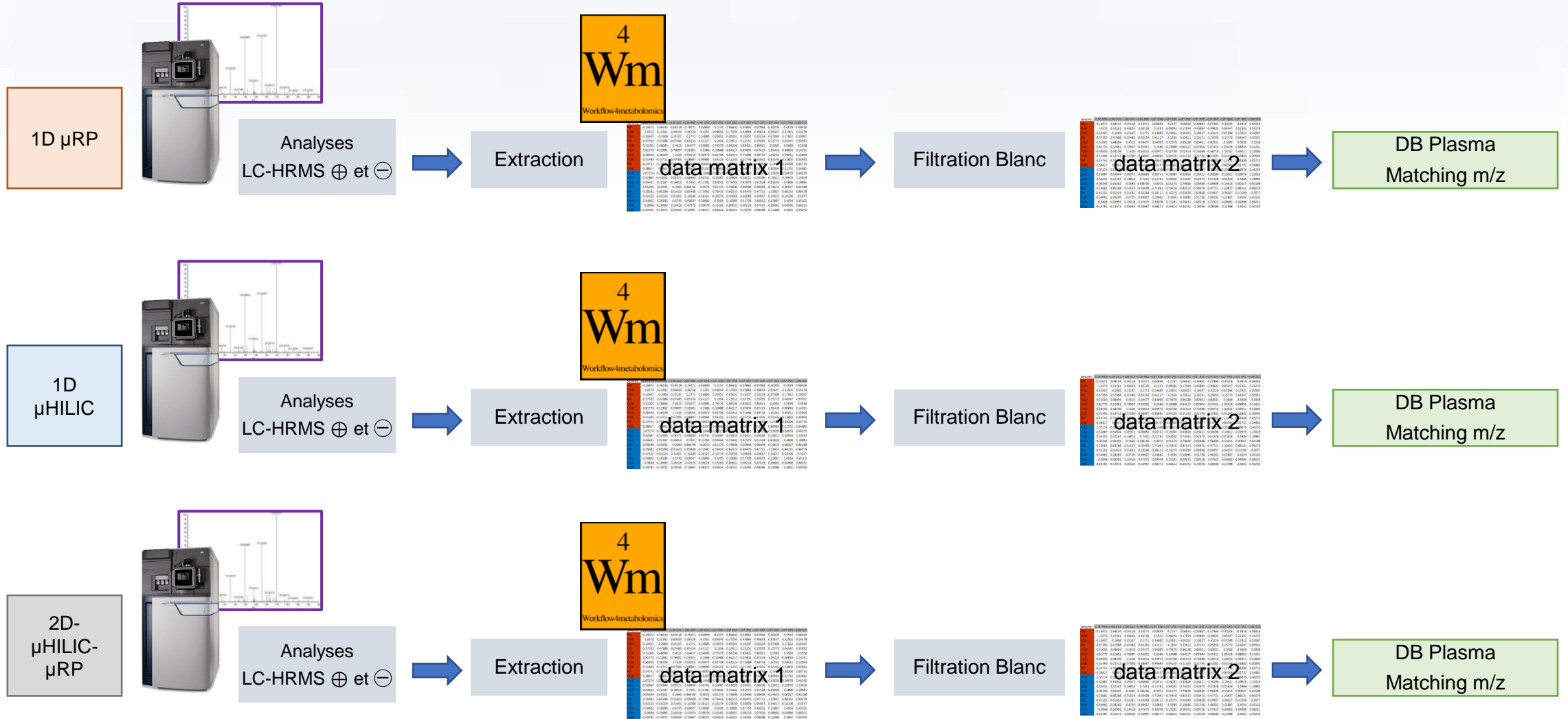


Annotation Plasma NIST avec méthode de référence

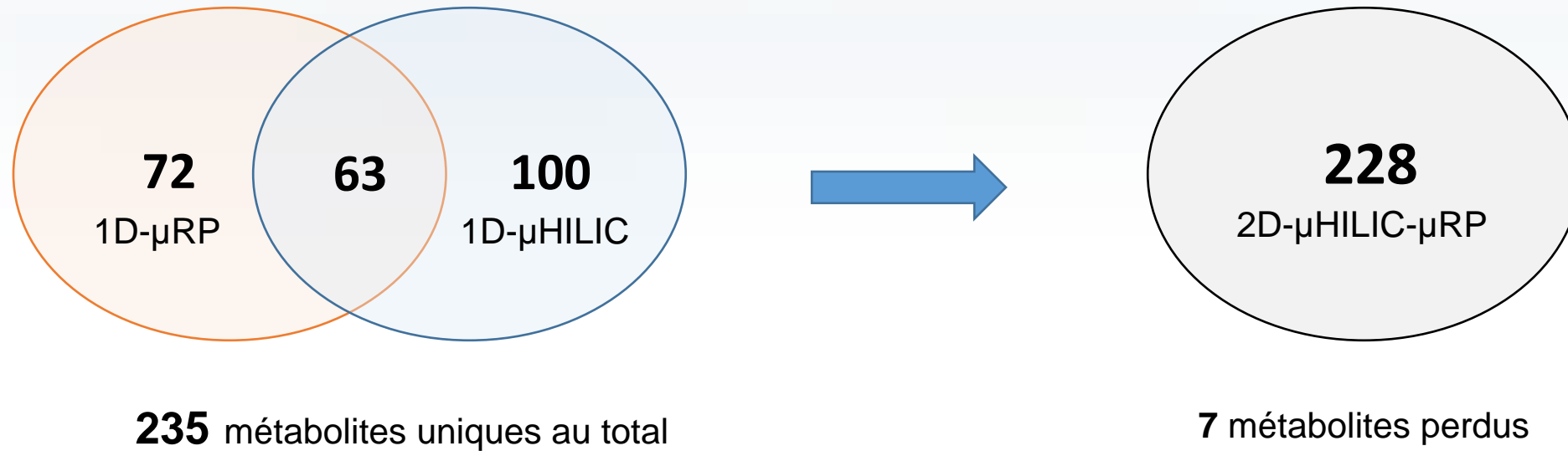


<https://workflow4metabolomics.usegalaxy.fr>

Application méthodes 1D et 2D



Comparaison des méthodes



Comportement des analytes durant le piégeage ?

Cas 1°: métabolites détectés en 1D μ RP mais pas en 2D

Composé	NEG	m/z	Attribution	μ HILIC	μ RP	2D
Capric acid (decanoic acid)	NEG	171.1388	[M-H]-	1.55	11.43	nd
C16:3	NEG	249.1860	[M-H]-	1.56	14.23	24.88
Tridecanoic acid	NEG	213.1864	[M-H]-	1.56	14.68	nd
Aldosterone	NEG	359.1861	[M-H]-	1.58	8.7	19.46
Phytanic acid	NEG	311.2953	[M-H]-	1.58	12.52	23.09
Nonanoic acid	NEG	157.1236	[M-H]-	1.59	10.25	20.37
Hexanoylcarnitine	NEG	258.1710	[M-H]-	1.6	9.97	20.63
Decanoylcarnitine	NEG	314.2338	[M-H]-	1.61	10.82	21.42
Hexadecanedioic acid	NEG	285.2070	[M-H]-	1.61	11.73	23.32
Octanoylcarnitine	NEG	286.2024	[M-H]-	1.61	10.82	22.28
12-Hydroxydodecanoic acid	NEG	215.1654	[M-H]-	1.62	11.35	21.97
DL-beta-Hydroxylauric acid	NEG	215.1656	[M-H]-	1.62	11.35	21.97
Taurochenodeoxycholic acid and Taurodeoxycholic acid	NEG	498.2900	[M-H]-	1.62	7.2	17.3
Octanoic acid	NEG	143.1077	[M-H]-	1.65	8.43	nd
Prostaglandin E1	NEG	353.2333	[M-H]-	1.65	9.54	18.69
undecanedioic acid	NEG	215.1282	[M-H]-	1.65	7.15	17.97
Ferulic acid	NEG	193.0507	[M-H]-	1.66	4.85	nd
Hydrocinnamic acid (Tr Variable)	NEG	149.0609	[M-H]-	1.66	10.61	21.23
2-hydroxycaproic acid	NEG	131.0714	[M-H]-	1.67	3.46	nd
Tetradecanedioic acid	NEG	257.1758	[M-H]-	1.7	9.97	21.57
Deoxycholic acid	NEG	391.2854	[M-H]-	1.72	9.84	20.47
Ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid	NEG	391.2854	[M-H]-	1.72	9.84	20.47
4-Hydroxybenzaldehyde	NEG	121.0298	[M-H]-	1.75	3.33	nd
Phenylacetyl glycine and 2-Methylhippuric acid	NEG	192.0668	[M-H]-	1.79	3.47	nd

Hypothèse: composés perdus lors du piégeage

→ Rinçage avec 10mM formate d'ammonium pH10.5 au lieu de H₂O

Essais à venir :

- autres cartouches de piégeage
- diminuer le temps de rinçage

Cas 2°: métabolites détectés en C18 de référence mais pas en μ RP

Hypothèse: acétonitrile diminue l'ionisation par rapport au méthanol en fin de gradient

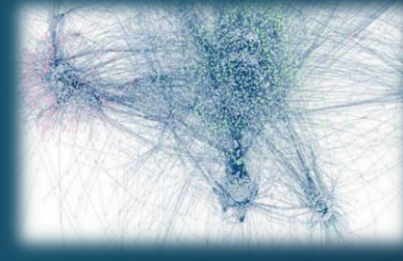
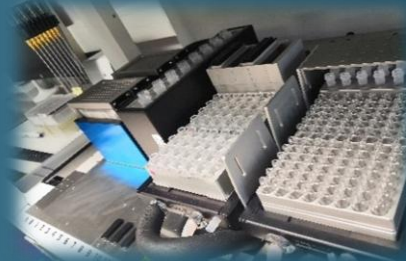
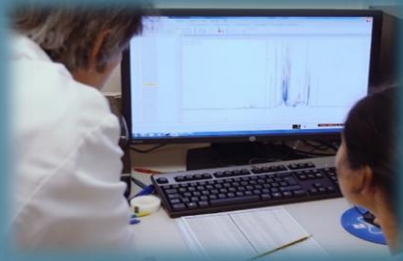
→ méthanol en phases mobiles μ RP

Composé	NEG	m/z	Attribution	Ref C18	μ HILIC	μ RP	2D
C14:1	NEG	225.1860	[M-H]-	25,43	nd	nd	nd
C14:2	NEG	223.1703	[M-H]-	24,45	1.62	nd	nd
C15:1	NEG	239.2016	[M-H]-	26,30	1.48	nd	nd
C19:1	NEG	295.2642	[M-H]-	28,60	1.51	nd	nd
C19:2	NEG	293.2485	[M-H]-	27,96	1.54	nd	nd
C20:0	NEG	311,2928	[M-H]-	29,68	1,49	nd	nd
C22:0	NEG	339.3268	[M-H]-	30,19	1.45	nd	nd
C23:0	NEG	353.3419	[M-H]-	30,39	1.44	nd	nd
C24:0	NEG	367.3651	[M-H]-	30,58	1.44	nd	nd
C24:1	NEG	365.3427	[M-H]-	30,32	1.48	nd	nd
C24:5	NEG	357.2795	[M-H]-	28,56	1.52	nd	nd

Essai à venir : nouvelle optimisation des paramètres ESI

Conclusion

- 🔗 Méthodes 1D et 2D développées, répétables, sans carry-over:
 - Applicables à la métabolomique
- 🔗 Preuve de concept plasma NIST: détection de 235 métabolites avec injections consécutives μ HILIC puis μ RP:
 - Métabolites annotés sur la base d'une analyse C18 de référence
 - > probablement plus avec une analyse HILIC de référence
- 🔗 Passage de 2 méthodes 1D à 1 méthode 2D heart-cutting:
 - Diminution jusqu'à 35% du temps d'analyse total → pour 100 échantillons ~ 33h en moins
 - Volume d'injection divisé /2
- 🔗 Perte de 3% de métabolites :
 - Raisonnablement acceptable compte tenu du gain en temps d'analyse et en volume d'échantillon
 - En cours d'amélioration




Pierre Fabre
Dermo-Cosmétique

Carine JACQUES
Hélène DUPLAN

Merci de votre
attention



Genotoul
Metatoul
AXIOM



Emilien JAMIN
Laurent DEBRAUWER

