

# Vos préparations d'échantillons « satisfaisantes » sont-elles vraiment satisfaisantes ?

Les lipides et les problèmes sous-jacents d'une  
élimination inadéquate de la matrice

## Introduction

Au cours des années, vous avez affiné les procédures de travail de votre laboratoire afin de les maîtriser au mieux et de les rendre les plus efficaces possible. Les techniques éprouvées de la précipitation de protéines (PPT) pour la préparation d'échantillons biologiques et du kit QuEChERS Agilent pour les échantillons agroalimentaires sont de parfaits exemples de la manière dont une préparation d'échantillons compliquée peut être réalisée par une approche simplifiée. Si l'on vous demandait aujourd'hui de décrire votre procédure de travail, il est plus que probable que vous répondriez que votre procédure est satisfaisante et remplit son office. Mais ces pratiques de préparation d'échantillons « satisfaisantes » sont-elles vraiment satisfaisantes ?

Les procédures de travail de votre laboratoire doivent répondre à de nombreux défis, et l'on vous demande constamment d'en améliorer l'efficacité ou la cadence. Une procédure de travail typique comprend la collecte des échantillons, leur préparation, leur introduction dans l'instrument, leur analyse, l'examen des données et, finalement, la génération de rapports sur ces données, la préparation des échantillons ayant toujours été considérée comme le goulet d'étranglement et l'étape limitante. Les progrès technologiques dans le domaine des instruments permettent d'augmenter considérablement votre capacité à analyser des échantillons très divers, avec la sensibilité, la sélectivité, la fiabilité et la faisabilité requises pour l'analyse d'échantillons complexes. L'étape de la préparation des échantillons a donc été minimisée pour gagner du temps, faire baisser les coûts, simplifier la complexité et faciliter sa généralisation, pour finir par n'être seulement que satisfaisante.

Votre procédure de travail est toujours la plus importante qui soit. Plusieurs problèmes sous-jacents peuvent découler d'une préparation d'échantillons inadéquate et affecter la bonne marche de votre laboratoire, comme des pertes de temps, des problèmes de maintenance ou de panne des instruments et des données inexactes. Ces problèmes sous-jacents peuvent être éliminés ou considérablement réduits par l'adoption de stratégies adéquates pour les procédures de préparation d'échantillons. Ces améliorations peuvent être mises en place sans avoir à former à nouveau votre personnel, engager des investissements coûteux ou réécrire vos procédures opérationnelles normalisées (SOP).

Ce livre blanc met l'accent sur quelques-unes des interférences connues dans les échantillons que vous préparez au quotidien et sur certains obstacles cachés moins connus que vous pouvez rencontrer si vous n'optimisez pas l'élimination de la matrice dans votre procédure de préparation d'échantillons. Outre les conséquences connues et moins connues, nous allons vous présenter une nouvelle solution pour améliorer votre productivité, renforcer l'efficacité de vos techniciens et réduire les risques de contamination de votre instrumentation d'analyse. Cette solution peut améliorer le rendement et la reproductibilité de vos analyses sans modifier radicalement vos SOP, sans réduire les cadences ou ajouter de la complexité à vos procédures de travail. Alors, soyez prêt à revoir ce que vous considérez comme une préparation d'échantillons satisfaisante !

## Pourquoi doit-on purifier les échantillons ?

Les deux principaux objectifs d'une préparation d'échantillons sont :

- l'élimination de la matrice indésirable ;
- la concentration des composés d'intérêt.

Ce livre blanc se penche sur les difficultés évidentes et moins évidentes découlant du manque d'efficacité des procédures d'élimination de la matrice.

Les composants indésirables de la matrice, s'ils ne sont pas éliminés ou pas suffisamment éliminés, peuvent contaminer votre circuit. Pour les analyses par GC, GC/MS et GC/MS/MS, les interférences non-volatiles co-extraites de la matrice peuvent avoir un impact négatif sur les différents éléments du



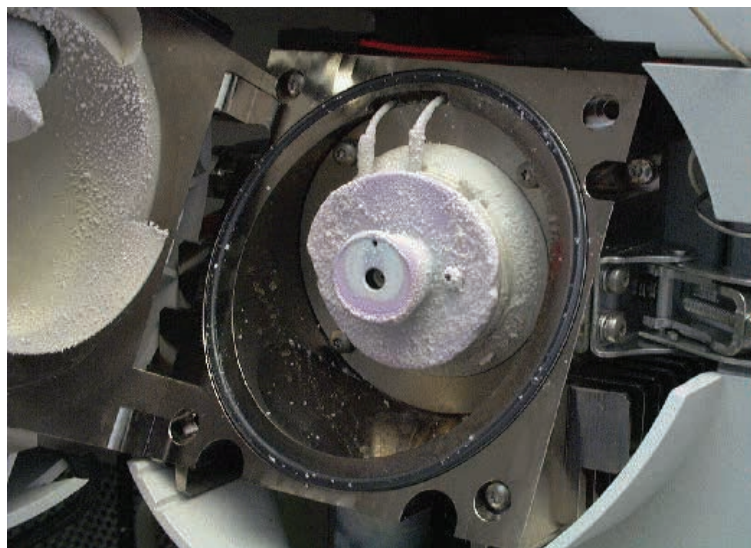
**Figure 1 :** Contamination des composants d'un système de GC par un échantillon préparé selon une méthode « satisfaisante ».

circuit du GC, tels que l'injecteur, le joint en or et la colonne (Figure 1). Pour les analyses par LC, LC/MS et LC/MS/MS, les particules et les sels de la matrice peuvent endommager la vanne, le filtre en ligne et la colonne de LC. Les interférences co-extraites de la matrice peuvent entraîner une suppression d'ions importante au niveau de la source MS (Figure 2) et, consécutivement, affecter la fiabilité de la méthode. Bien que la plupart des chimistes analytiques filtrent leurs échantillons avant de les injecter dans le circuit pour éviter ces problèmes, et que la filtration est un bon moyen d'éliminer les effets dus aux particules de la matrice, celle-ci n'a aucun effet sur les interférences dissoutes. Où cela mène-t-il si vous ne vous contentez que de la filtration des échantillons ?

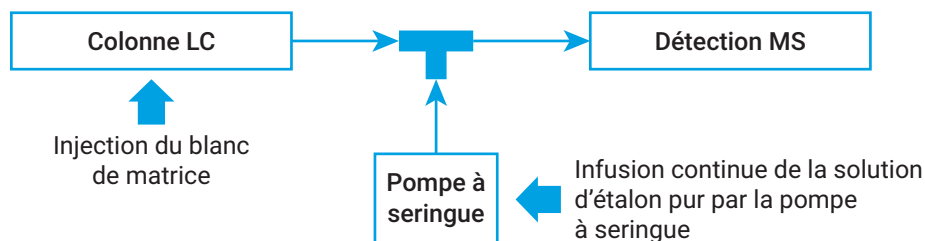
La Figure 2 illustre les effets négatifs sur le matériel analytique de l'absence d'élimination des interférences co-extraites dissoutes de la matrice, tels que les sels, les pigments, les protéines ou les lipides dissous.

En raison de sa haute sensibilité et de sa grande sélectivité, la spectrométrie de masse est la méthode analytique préférée pour une large gamme d'applications. Toutefois, la suppression ou l'amplification d'ions causée par des composants de la matrice a un impact négatif sur l'exactitude, la précision et la robustesse (tel qu'indiqué par une déviation standard relative [RSD] élevée). L'infusion post-colonne est une technique permettant d'identifier la suppression ou l'amplification d'ions causée par la matrice, et la Figure 3 représente une configuration typique d'une telle expérience (reportez-vous à la note d'application 5991-8007EN<sup>3</sup>).

Si vous deviez réaliser cette étude comparative, vous pourriez vous apercevoir que votre préparation d'échantillons « satisfaisante » n'est peut-être pas aussi efficace qu'il le faudrait. La solution proposée par Agilent permet de rendre votre préparation d'échantillons « satisfaisante » plus efficace et plus fiable.



**Figure 2 :** Accumulation de sels dans une source d'ions pour LC/MS provenant d'un échantillon préparé selon une méthode « satisfaisante » sans élimination des sels.



**Figure 3 :** Schéma de la configuration d'une infusion post-colonne d'étalon pour l'évaluation de la suppression d'ions due à la matrice et une étude comparative.

## Quel est l'impact réel des lipides ?

De toutes les interférences co-extraites de la matrice d'échantillon, les composants les plus problématiques mais aussi souvent négligés sont les lipides, en raison de la difficulté de les éliminer efficacement et de l'invisibilité physique de leur accumulation. Lors d'une expérience d'infusion post-colonne (telle qu'illustrée à la Figure 3), les effets de la matrice, comme du sérum ou du plasma, sur le signal de MS peuvent être évalués par infusion continue de blanc de matrice. Toute variation de l'intensité du signal peut indiquer la présence de substances dans la matrice responsables de la suppression ou de l'amplification d'ions.

Les exemples (zones 2 et 3 de la Figure 4) montrent que l'impact des lipides sur la qualité des données peut être très important. La précipitation des protéines,

efficace pour éliminer les protéines abondantes des matrices biologiques, n'élimine pas les phospholipides qui peuvent causer une suppression d'ions considérable. (Reportez-vous à la note d'application 5991-8007EN<sup>3</sup>).

La conséquence de données de qualité médiocre est une réduction importante de la productivité générale du laboratoire.

Vous trouverez ci-après une liste des effets qu'une mauvaise élimination de la matrice lors des analyses par LC/MS/MS ou GC/MS/MS peut avoir sur votre productivité :

### Fiabilité de la méthode et qualité des données

- Sensibilité et sélectivité de la méthode inacceptables
- Linéarité de l'étalonnage inacceptable
- Exactitude et précision de la méthode médiocres
- Identification et intégration des pics difficiles

### Applicabilité de la méthode

- Développement et optimisation de la méthode plus longs
- Davantage de résolutions d'anomalies liées à la méthode
- Détection variable selon la matrice utilisée
- Plus de répétition des analyses d'échantillons

### Propreté du spectromètre de masse

- Davantage de nettoyage de source MS
- Nettoyage et remplacement des capillaires plus fréquents
- Perte de la capacité à établir ou maintenir le niveau de vide
- Davantage de résolutions d'anomalies

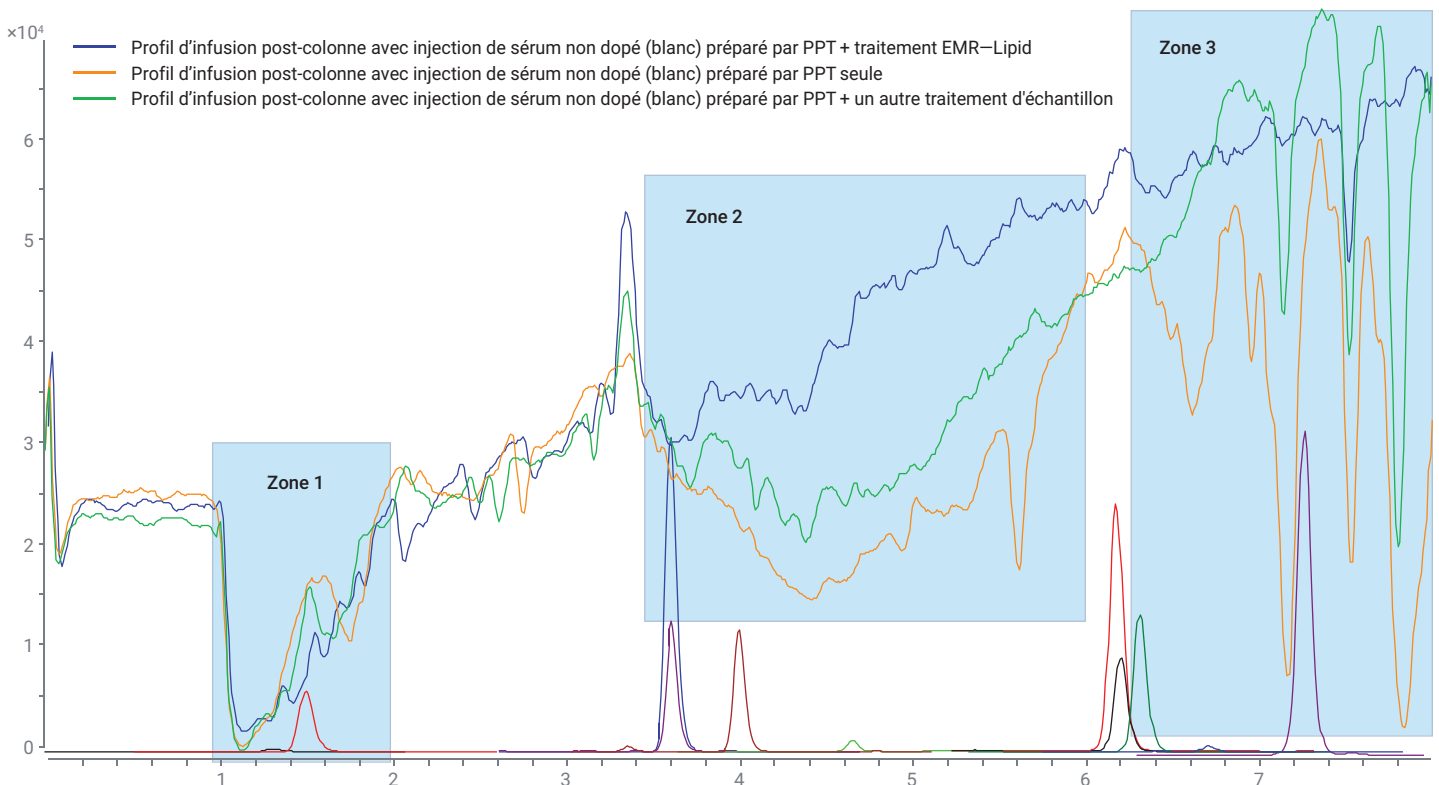


Figure 4 : Comparaison des profils d'infusion post-colonne d'étalon et démonstration de la suppression d'ions due à la matrice sur les composés cibles.

## Accumulation de lipides dans la colonne

- Réduction de la durée de vie des colonnes LC et GC
- Maintenance plus fréquente de l'injecteur GC
- Raccourcissement plus fréquent des colonnes GC
- Contrepression des colonnes LC
- Rinçage ou équilibrage plus fréquent du système
- Temps d'analyse plus longs

Des procédures d'élimination des lipides existent, mais les méthodes actuelles de purification des échantillons sacrifient souvent le rendement analytique en éliminant avec les lipides certains composés cibles. De nombreux analystes ont appris à s'accommoder de cette situation en faisant davantage de maintenance, en changeant les consommables plus fréquemment ou en mettant en œuvre des techniques de préparation d'échantillons plus poussées. Cette dernière approche permet d'améliorer la qualité des données, mais alourdit considérablement les coûts et demande davantage de temps et d'expertise, ce que finit par réduire la productivité.

## Pourquoi se contenter de préparer des échantillons de qualité « satisfaisante » n'est pas une solution viable ?

Pour générer des données de meilleure qualité et améliorer significativement la productivité, il faut une méthode à la fois meilleure et plus simple pour l'élimination des lipides et plus généralement de la matrice. Pour réaliser ces objectifs, Agilent a développé le système Captiva EMR—Lipid, qui permet de préparer efficacement des échantillons propres au moyen d'une procédure de travail simplifiée. L'approche du système Captiva EMR—Lipid est simple et universellement applicable pour la réduction des effets-matrices liés aux lipides avec un bon rendement des composés.

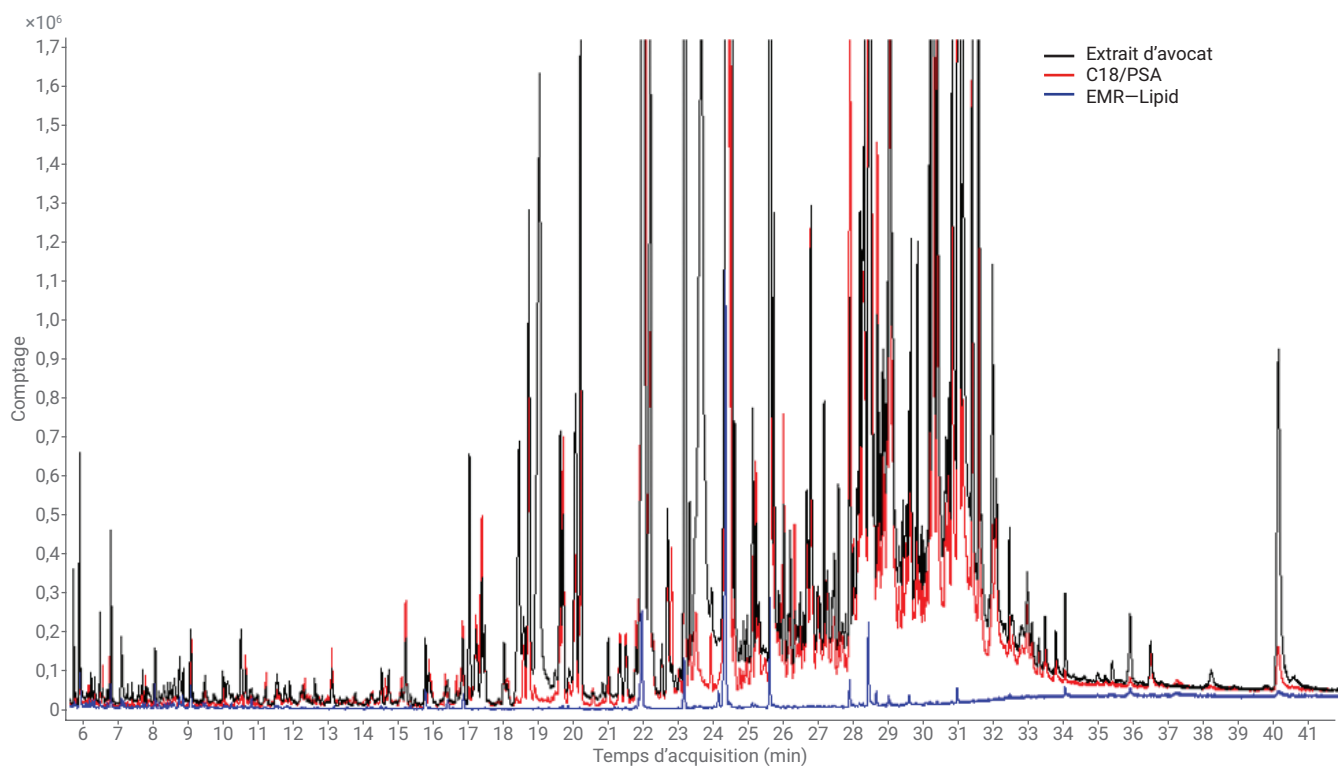
Lorsque vous devez travailler avec des échantillons complexes tels que des matrices biologiques ou alimentaires, vous devez déterminer quelles techniques de préparation d'échantillons seront les plus efficaces pour vos composés cibles. De nombreuses techniques bien que difficiles, laborieuses ou chronophages ne permettent pas de toujours éliminer les problèmes quant au recouvrement des composés et aux interférences dues à la matrice. Un besoin répandu en matière de préparation d'échantillons est la disponibilité de protocoles plus simples avec moins d'étapes. La purification des échantillons doit permettre d'éliminer efficacement les interférences dues à la matrice tout en minimisant l'impact sur le recouvrement d'une grande diversité de composés.

**Tableau 1** : Comparaison de la méthode classique de précipitation des protéines (PPT) avec centrifugation en plaque à 96 puits et du traitement par Agilent Captiva EMR—Lipid avec filtration en plaque à 96 puits.

PPT classique (plaque à 96 puits) (Centrifugation)			PPT + traitement Captiva EMR—Lipid (plaque à 96 puits) (Filtration)		
Étape	Temps nécessaire (min)	Consommables nécessaires	Étape	Temps nécessaire (min)	Consommables nécessaires
Étiquetage de la plaque et aliquotage des échantillons	30	96 pointes (petite taille) 1 plaque de collecte	Étiquetage de la plaque et aliquotage des échantillons	30	96 pointes (petite taille) 1 plaque de collecte 1 plaque EMR—Lipid
Ajout de l'étalon interne	5	1 embout de pipette de distribution	Ajout de l'étalon interne	5	1 embout de pipette de distribution
Mélange des échantillons	2	Couvercle de plaque	Mélange des échantillons	2	Couvercle de plaque
Ajout du solvant de précipitation	5	1 embout de pipette de distribution	Ajout du solvant de précipitation	5	1 embout de pipette de distribution
Mélange des échantillons	5	Couvercle de plaque	Mélange des échantillons	5	Couvercle de plaque uniquement nécessaire pour le mélange actif
Centrifugation	10		Filtration	10	
Transfert du surnageant, étiquetage de la plaque de collecte	30	96 pointes (taille moyenne) 1 plaque de collecte		Variable	1 tapis de fermeture de plaque
Post-traitement des échantillons	Variable	1 tapis de fermeture de plaque	Post-traitement des échantillons		
Temps total nécessaire pour la préparation d'échantillons	87 minutes avec post-traitement		Temps total nécessaire pour la préparation d'échantillons	57 minutes avec post-traitement (~30 % de gain de temps)	
Durée d'utilisation des instruments et consommation de solvant	100 %		Durée d'utilisation des instruments et consommation de solvant	< 90 % (gain de temps et en consommation de solvant d'au moins 10 %)	
Élimination de la matrice	Protéines uniquement		Élimination de la matrice	Protéines et lipides	

Imaginez-vous en train d'essayer d'identifier vos composés d'intérêt parmi les innombrables composés de la matrice, comme illustré dans la Figure 5 représentant les chromatogrammes

de GC sur le spectre complet d'un extrait d'avocat sans post-traitement (médiocre), avec traitement par C18 (pas satisfaisant) et avec traitement par EMR-Lipid (optimal).



**Figure 5 :** Superposition pour comparaison des chromatogrammes de GC/MS sur le spectre complet d'un extrait d'avocat QuEChERS non traité (noir), du même extrait traité par la méthode classique C18/PSA (rouge) et du même extrait traité par Agilent EMR-Lipid (bleu).

Les lipides peuvent causer une importante suppression d'ions due à la matrice et entraîner une réduction de la sensibilité de la détection et une mauvaise reproductibilité des méthodes. Les phospholipides dans les matrices biologiques sont toujours une source de problèmes à cause du très fort effet-matrice qu'ils engendrent. La Figure 6 montre qu'un échantillon traité par Captiva EMR—Lipid présente une réponse des composés significativement supérieure et de meilleurs RSD qu'un échantillon traité uniquement par précipitation des protéines lors d'une analyse des métabolites de la vitamine D.

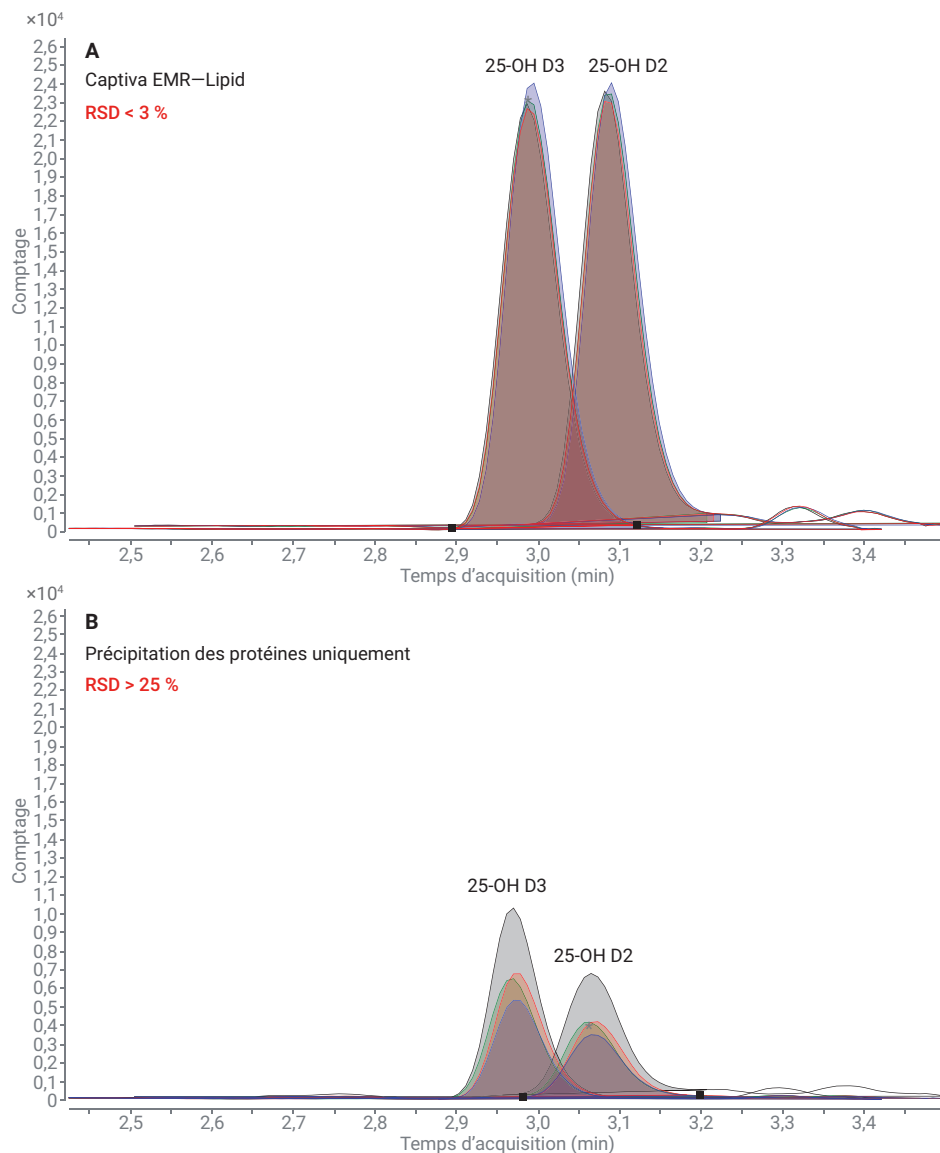


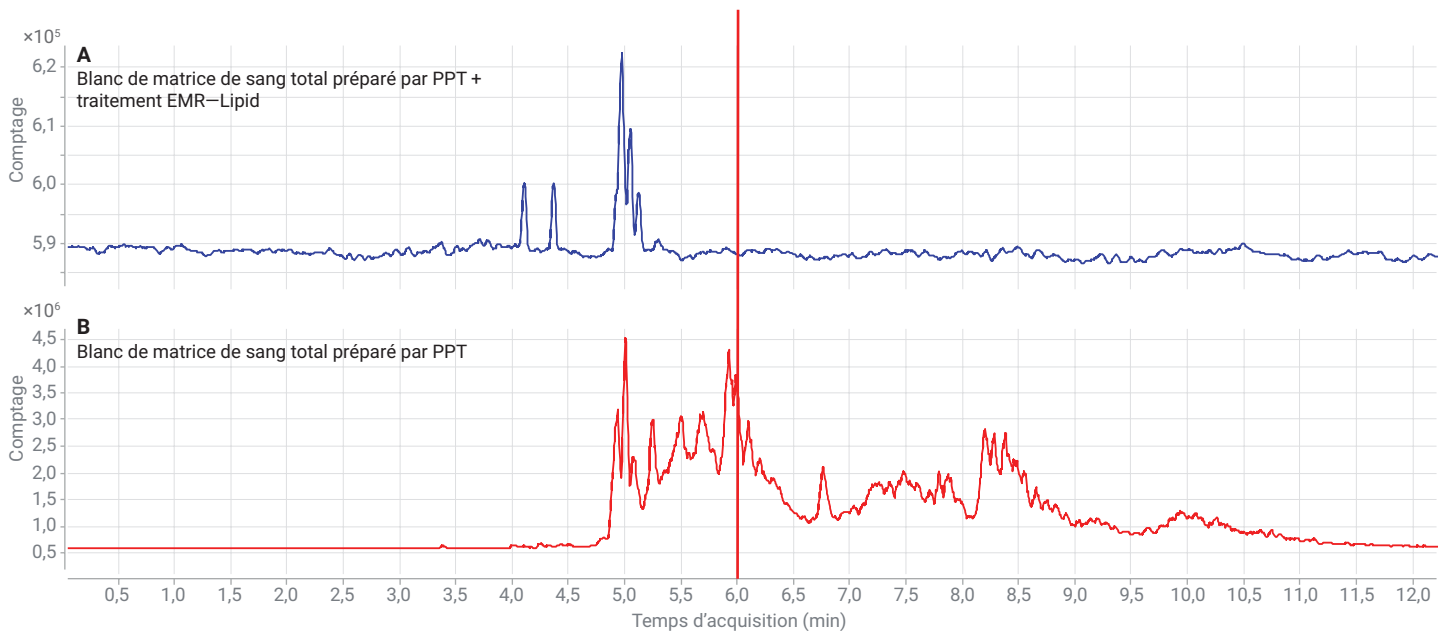
Figure 6 : Comparaison des réponses des composés et des RSD de la PPT seule et d'EMR—Lipid avec PPT.

## Maintenant que nous pouvons éliminer efficacement les lipides, que pouvons-nous faire pour accélérer les analyses ?

Avec Captiva EMR—Lipid, vous n'êtes pas seulement en mesure d'améliorer la fiabilité des méthodes analytiques

et la qualité des données, vous pouvez également réduire le temps d'analyse et renforcer la productivité de votre laboratoire. Le graphique de la Figure 7 montre que comme les phospholipides ont été suffisamment éliminés avant l'introduction de l'échantillon, vous n'avez pas besoin d'attendre l'élu­tion de ces composés hydrophobes de la chromatographie en phase inverse, ce qui vous fait économiser un temps précieux d'utilisation de l'instrument.

Grâce à un échantillon plus propre, votre analyse peut être exécutée plus rapidement, et vous n'avez pas à rincer le système aussi souvent. Un échantillon plus propre signifie également que vous pouvez analyser davantage d'échantillons entre deux opérations de maintenance régulière. Cela implique des cadences d'analyse plus élevées dans les capacités actuelles de votre laboratoire, et donc une meilleure rentabilité.



**Figure 7 :** Comparaison des profils de phospholipides dans des blancs de matrices préparés selon deux méthodes différentes pour démontrer la faisabilité d'un temps de cycle plus court.

## Conclusions

Pourquoi la purification des échantillons est-elle tellement importante ? Parce que les matrices des échantillons complexes contiennent de nombreux composés problématiques, notamment des lipides, des protéines, des sels et des pigments. Les lipides sont un des composants de la matrice les plus problématiques pour plusieurs raisons.

Les avantages de l'utilisation d'une procédure optimale de préparation d'échantillons sur une procédure de préparation d'échantillons seulement « satisfaisante » résident dans l'augmentation des heures de disponibilité des instruments, la diminution du temps de paillasse des analystes et la réduction potentielle du temps d'analyse chromatographique permettant de traiter davantage d'échantillons par jour. La principale cause des opérations de maintenance imprévues est la contamination par les matrices. Si vous éliminez davantage de matrice, vous rallongez la période entre

chaque opération de maintenance. Cela peut être réalisé sans modifier votre procédure opérationnelle normalisée ou allouer plus de temps à votre procédure de travail. Sans une préparation adéquate de vos échantillons, vous risquez de ne pas voir clairement les pics d'intérêt et les quantifier précisément. Vous risquez même de ne pas les voir du tout. Tous ces effets peuvent accroître le temps nécessaire au traitement des données et peuvent conduire à une augmentation du nombre de ré-analyses d'échantillons et de lots à cause de la mauvaise qualité des données.

## En savoir plus sur Agilent Captiva EMR-Lipid

[www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid](http://www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid)



Traitement Agilent Captiva EMR-Lipid

## En savoir plus sur les gains de productivité avec la préparation d'échantillons d'Agilent

[www.agilent.com/chem/did-you-know](http://www.agilent.com/chem/did-you-know)

## Notes d'application recommandées

1. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Whole Blood by LC/MS/MS, *note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-9251EN.
2. Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Captiva EMR—Lipid 96-Well Plates, *note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-9222EN.
3. Quantitative LC/MS/MS Analysis of Drugs in Human Serum with Captiva EMR—Lipid Cleanup, *note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-8007EN.
4. Vitamin D Metabolite Analysis in Biological Samples Using Agilent Captiva EMR—Lipid, *note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-7956EN.
5. Multiclass Multiresidue Veterinary Drug Analysis in Beef, *note d'application d'Agilent Technologies*, numéro de publication 5991-8598EN.

## L'analyse de médicaments vétérinaires vous intéresse ? Vous pouvez également consulter l'article paru dans *Journal of Chromatography A*.

Multiclass multiresidue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1549, 14-24.

[www.agilent.com/chem/sampleprep](http://www.agilent.com/chem/sampleprep)

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins diagnostiques.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2018  
Imprimé aux USA, le 6 août 2018  
5994-0110FR