



Développement d'une méthode d'extraction et de séparation pour le dosage de la 3-Methoxy-4-hydroxyphénylglcol (MHPG) dans le fluide oral.

G. Romoaldo, F. Reitel, S. Hambye, B. Blankert

Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique, Faculté de Médecine et Pharmacie, Institut de recherche en Sciences et Technologies de la Santé - Université de Mons Place du Parc, 20 B 7000.

INTRODUCTION

La salive constitue un candidat idéal pour objectiver la surcharge cognitive et la fatigue mentale de manière non invasive.

La **3-Methoxy-4-hydroxyphénylglcol (MHPG)** est un métabolite de la noradrénaline dont la concentration salivaire est directement corrélée à la concentration plasmatique et à différents états émotionnels (1).

Extractions*

- Solid phase extraction (SPE)
- Supported liquid extraction (SLE)

Analyses UPLC

- Détection fluorimétrique
- Détection électro-chimiques

Comparaison de colonnes chromatographiques

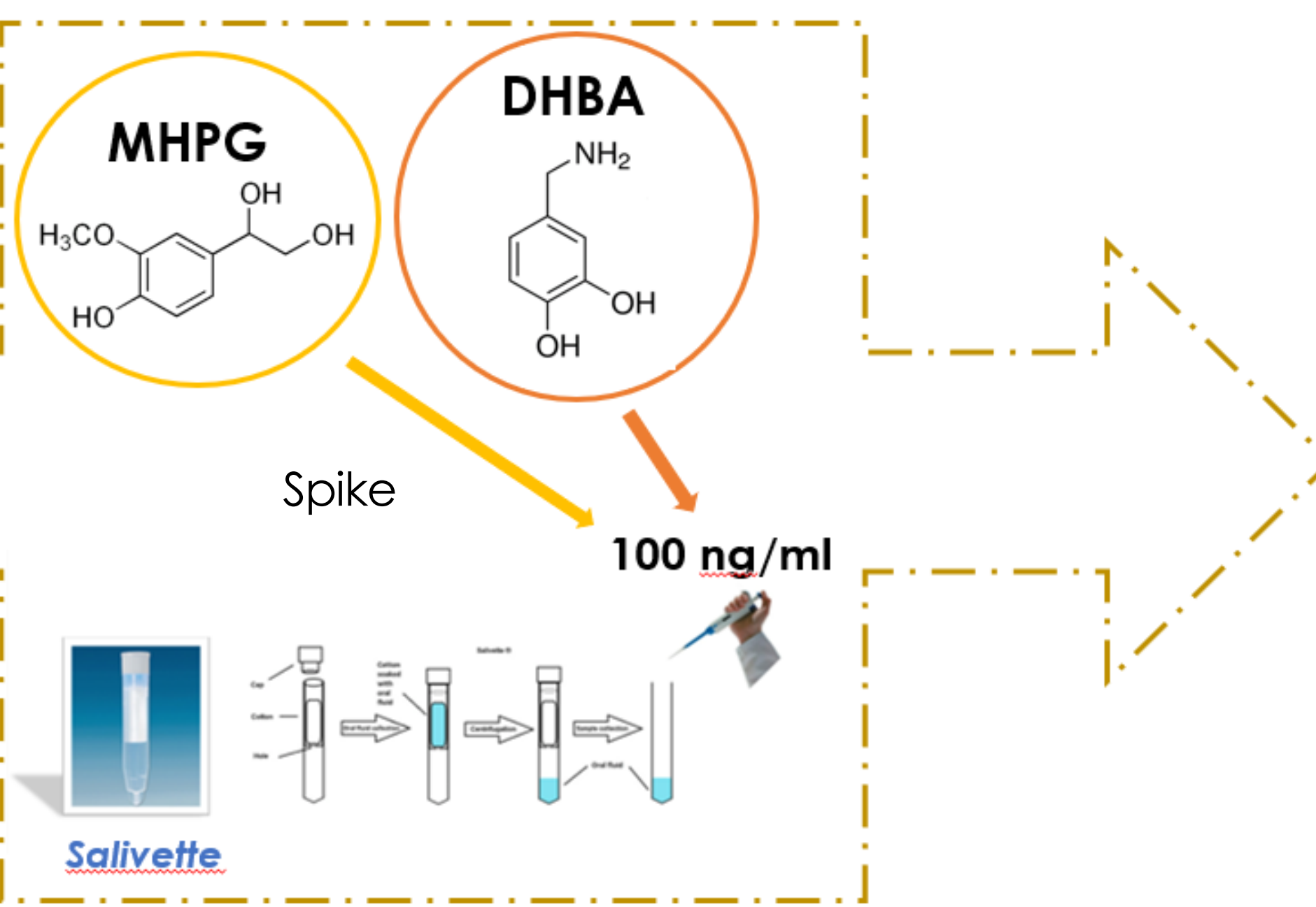
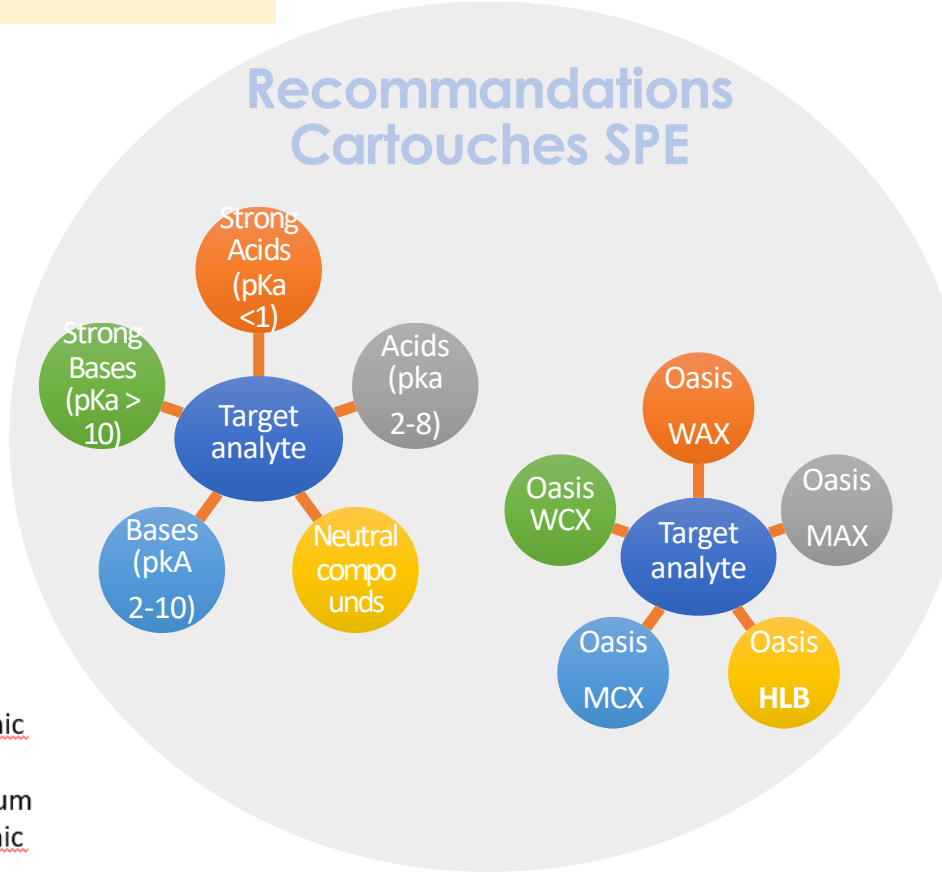
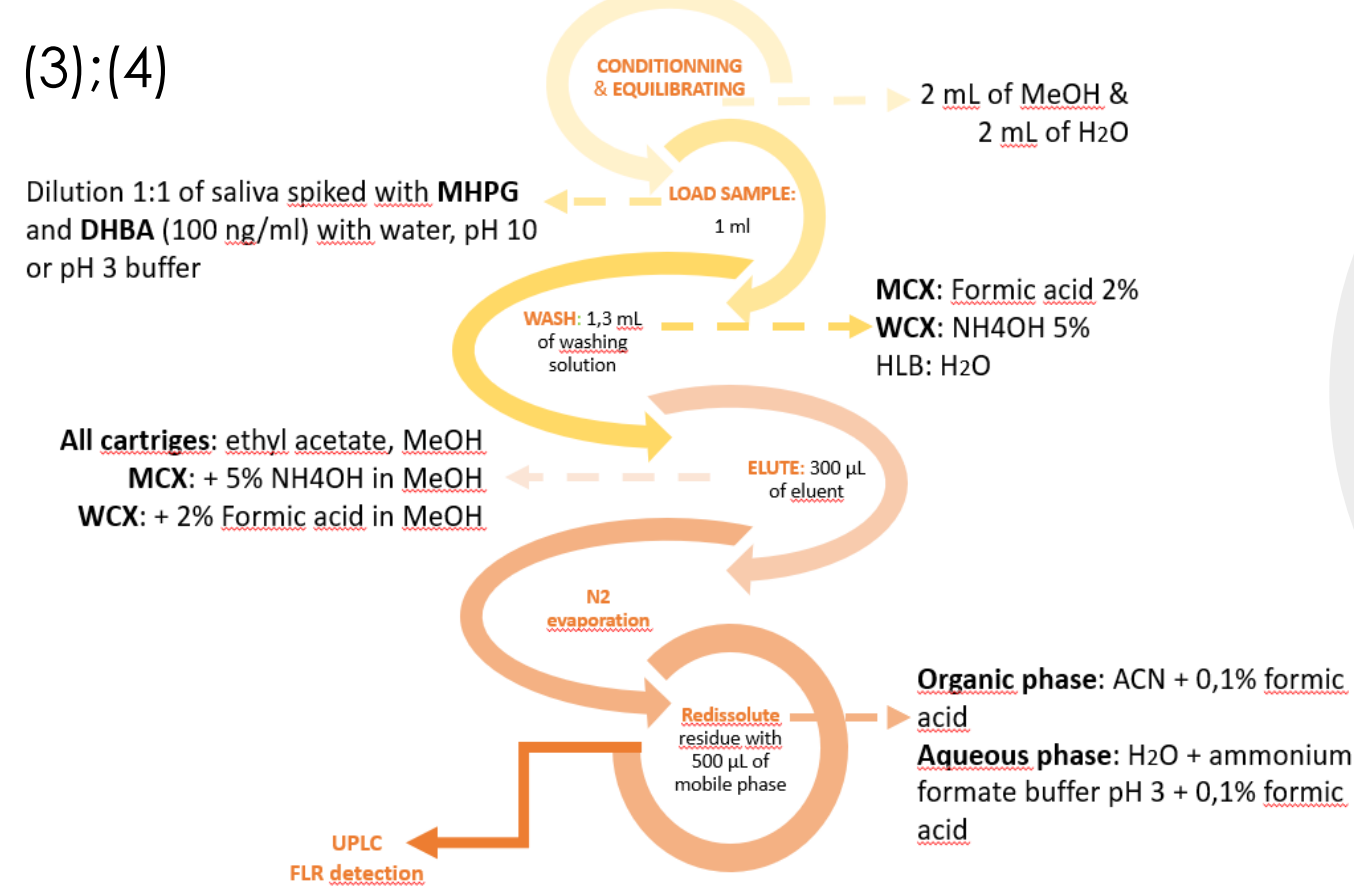
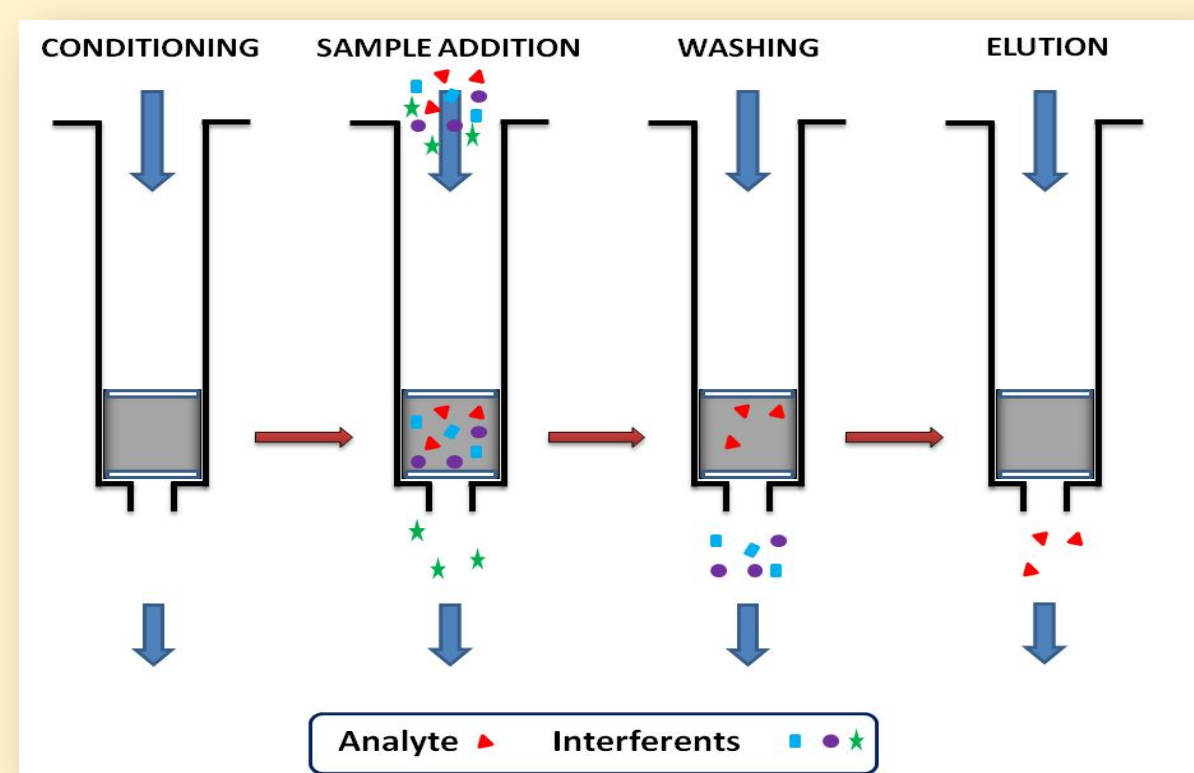
- RPLC
- HILIC
- FLR & ECD detection

* Utilisation du DHBA (dihydrobenzylamine) comme standard interne (2).

EXTRACTIONS

SPE

= extraction basée sur l'adsorption sélective de l'analyte sur un **sorbant** en fonction de ses propriétés physico-chimiques.



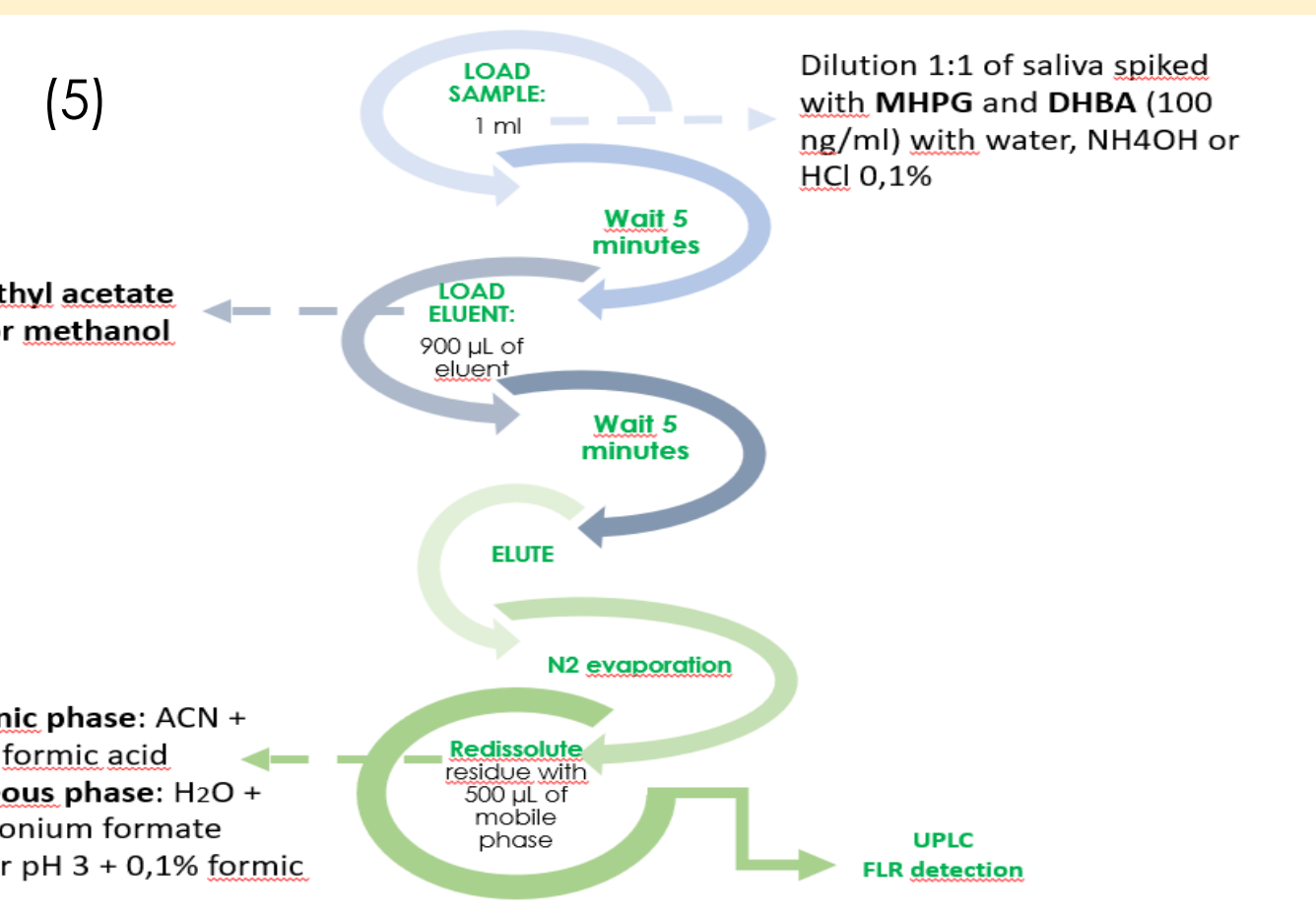
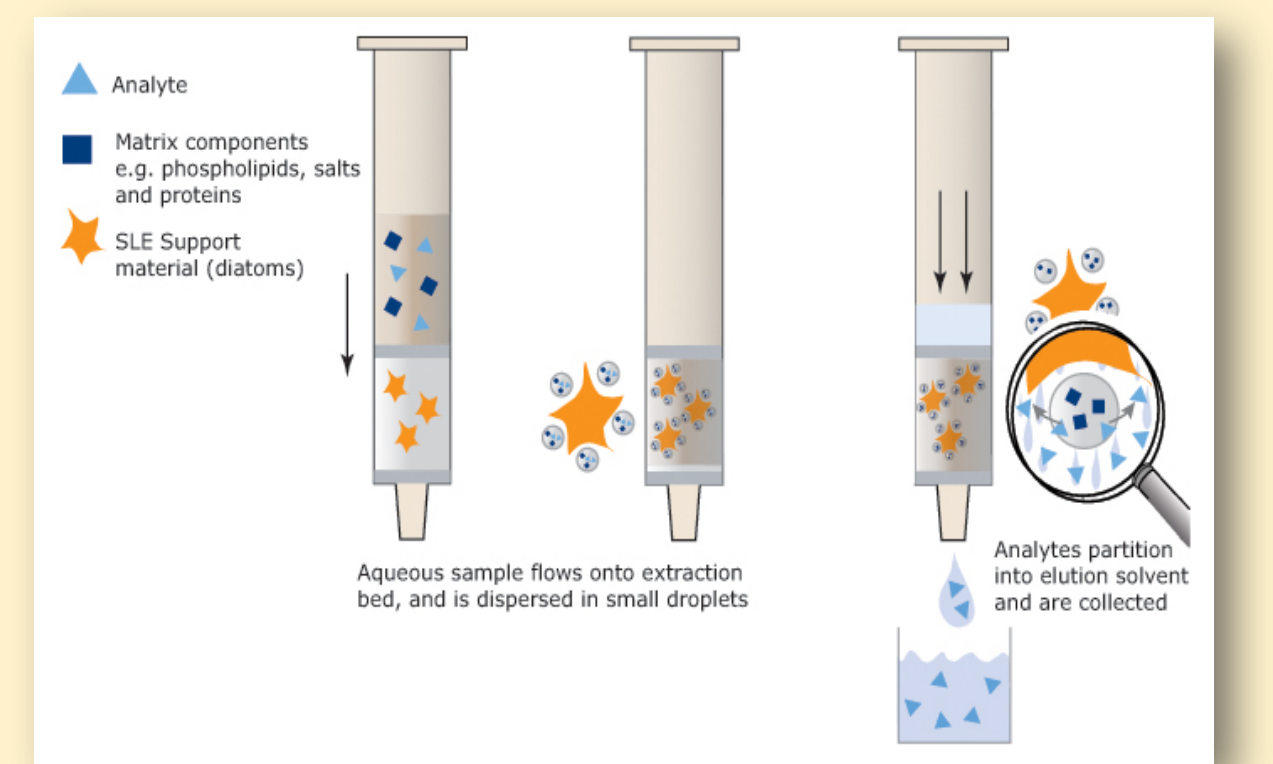
Séparation	UPLC Acquity Waters
Détection	Electro-chimique: Roxy reactor cell-Antec®
Colonne	HSS T3 100Å, 1,8 µm, 2,1 mm X 100 mm
Phase mobile	Iso, 8:92 (v/v) ACN + 0,1% AF: H ₂ O 10 mM Am. formate
Conditions électro-chimique	Potentiel de travail: +0,7 V Electrode de travail: Magic Diamond Electrode de référence: Pd/H ₂
Conditions fluorimétrique	Excitation 280 nm / Détection 320 nm
Temps d'analyse	8 minutes
Flux	0,400 mL/min et 0,200 mL/min pour l'ISM

Extraction recovery (%)

$$= \frac{AUC \text{ MHPG extracted}}{AUC \text{ MHPG non extracted}} \times 100$$

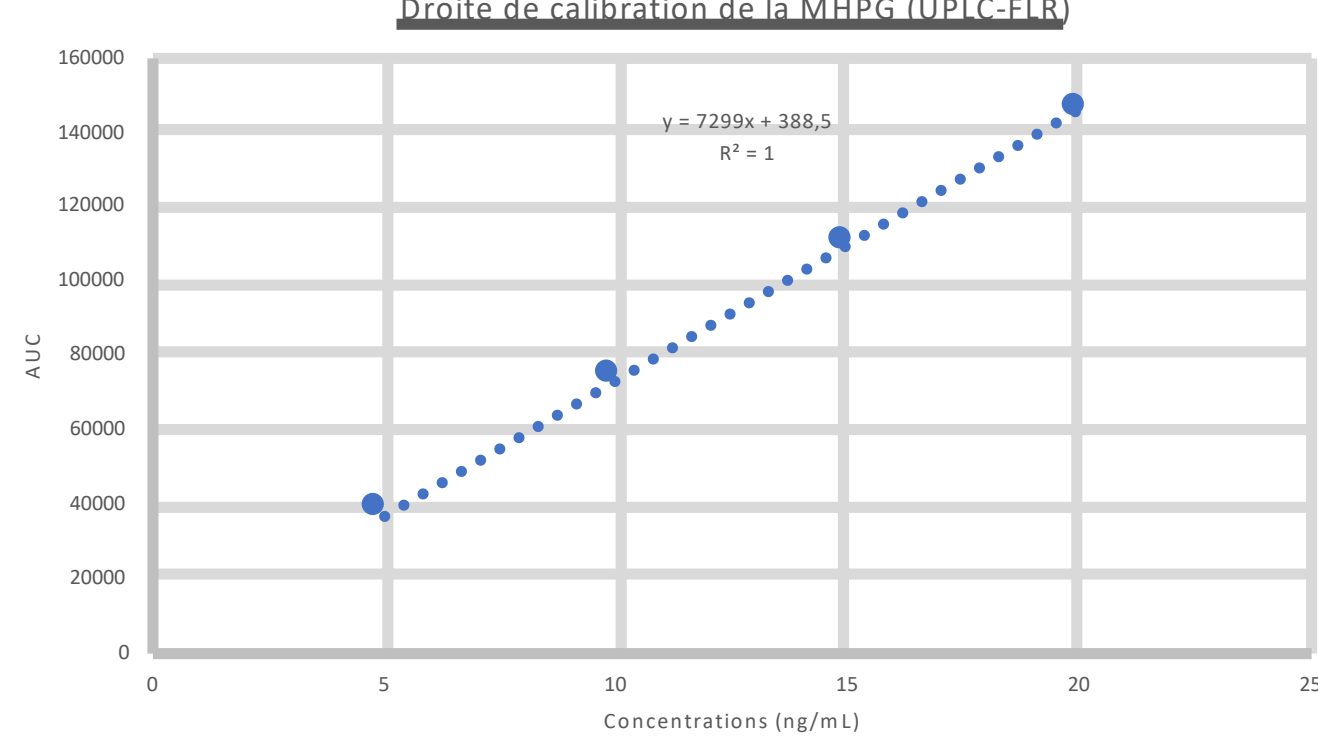
SLE

= extraction basée sur l'affinité de l'analyte pour un solvant par rapport à un autre. Il y a la présence d'un « support » (= terre de diatomée ou sorbent synthétique) qui permet la dispersion de l'échantillon en multiples petites gouttelettes ce qui augmente considérablement la surface d'échange entre les deux solvants.

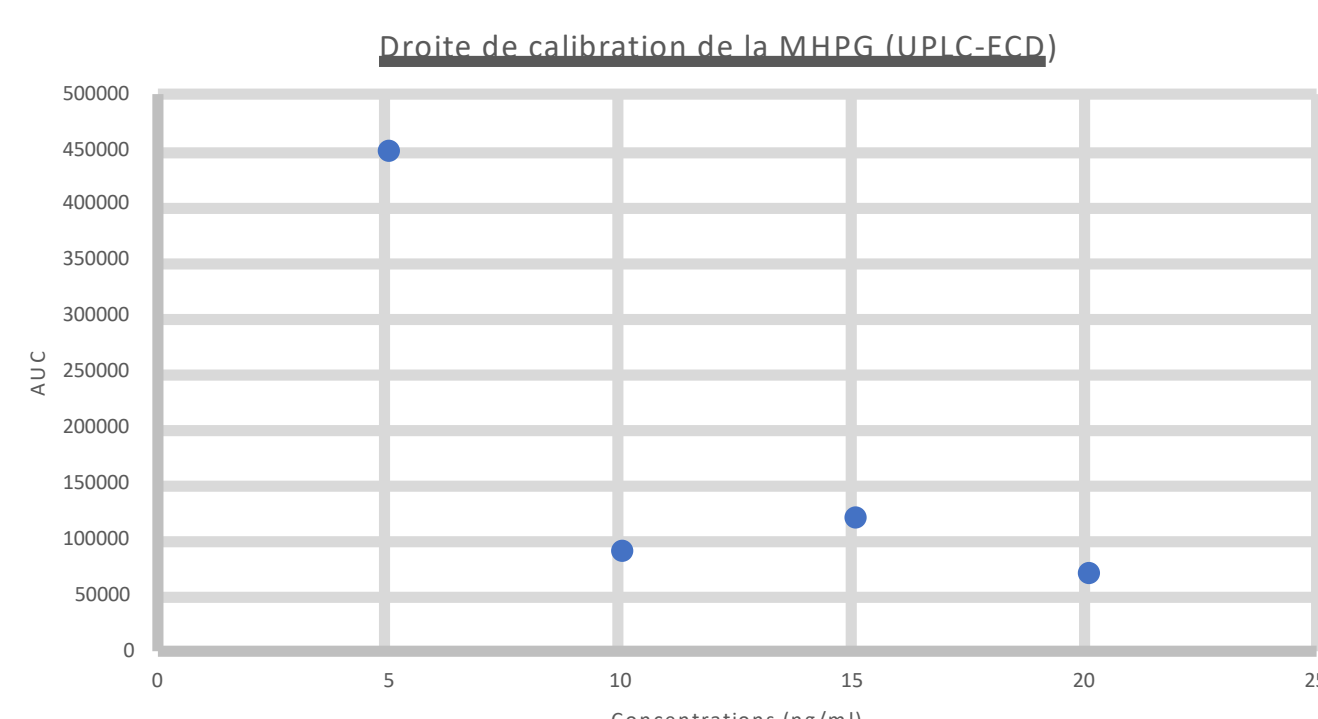


RESULTATS

UPLC-FLR

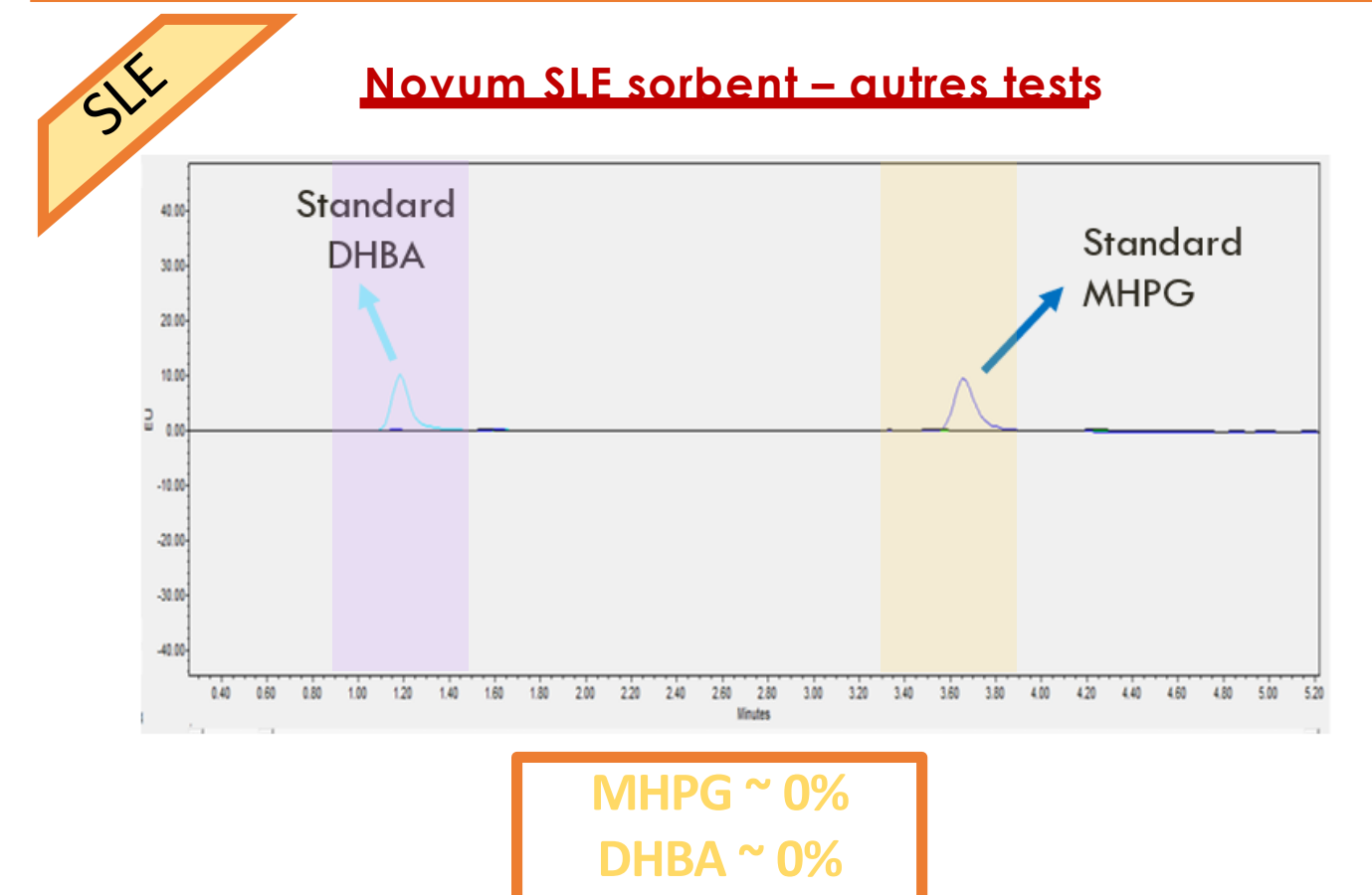
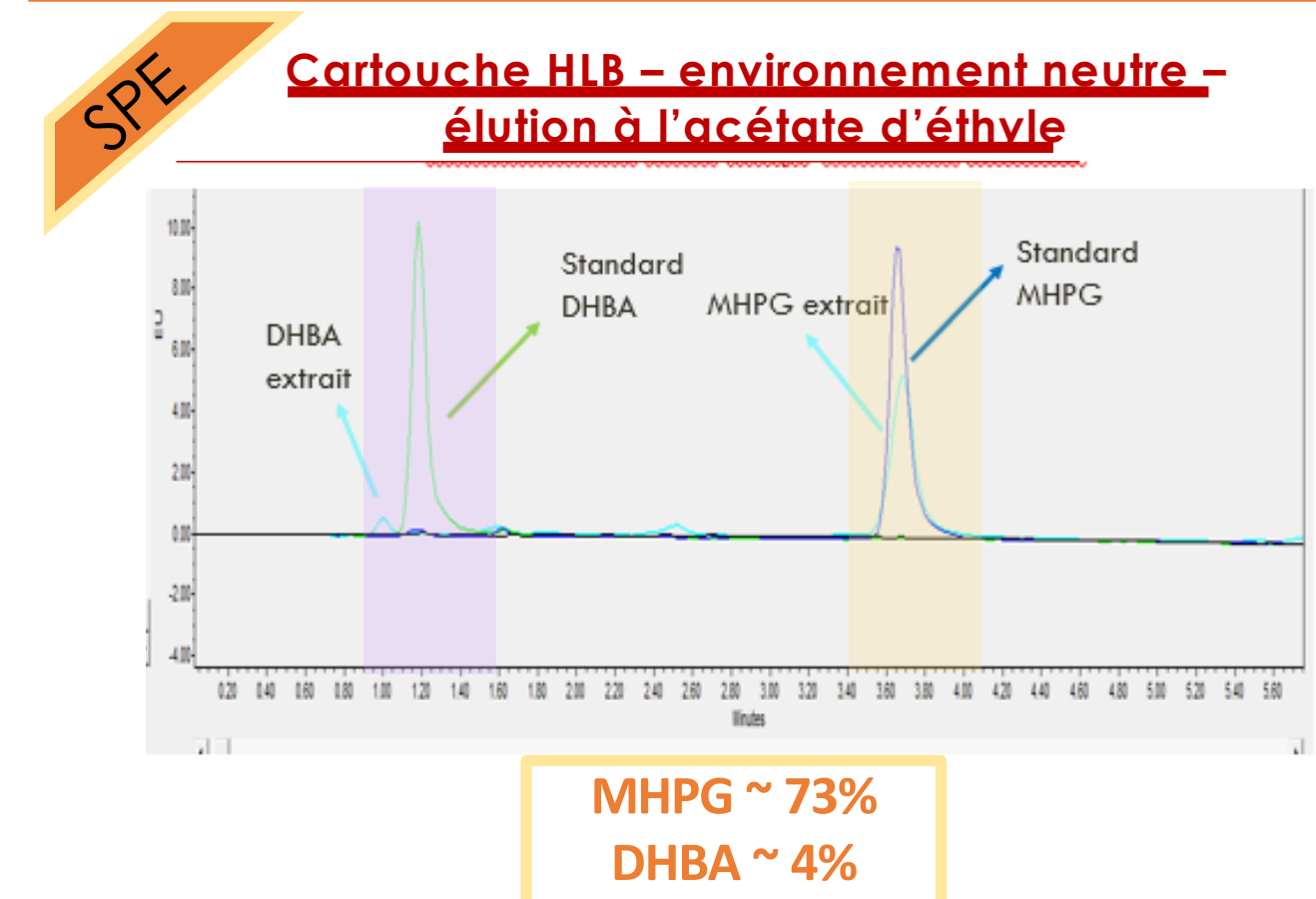
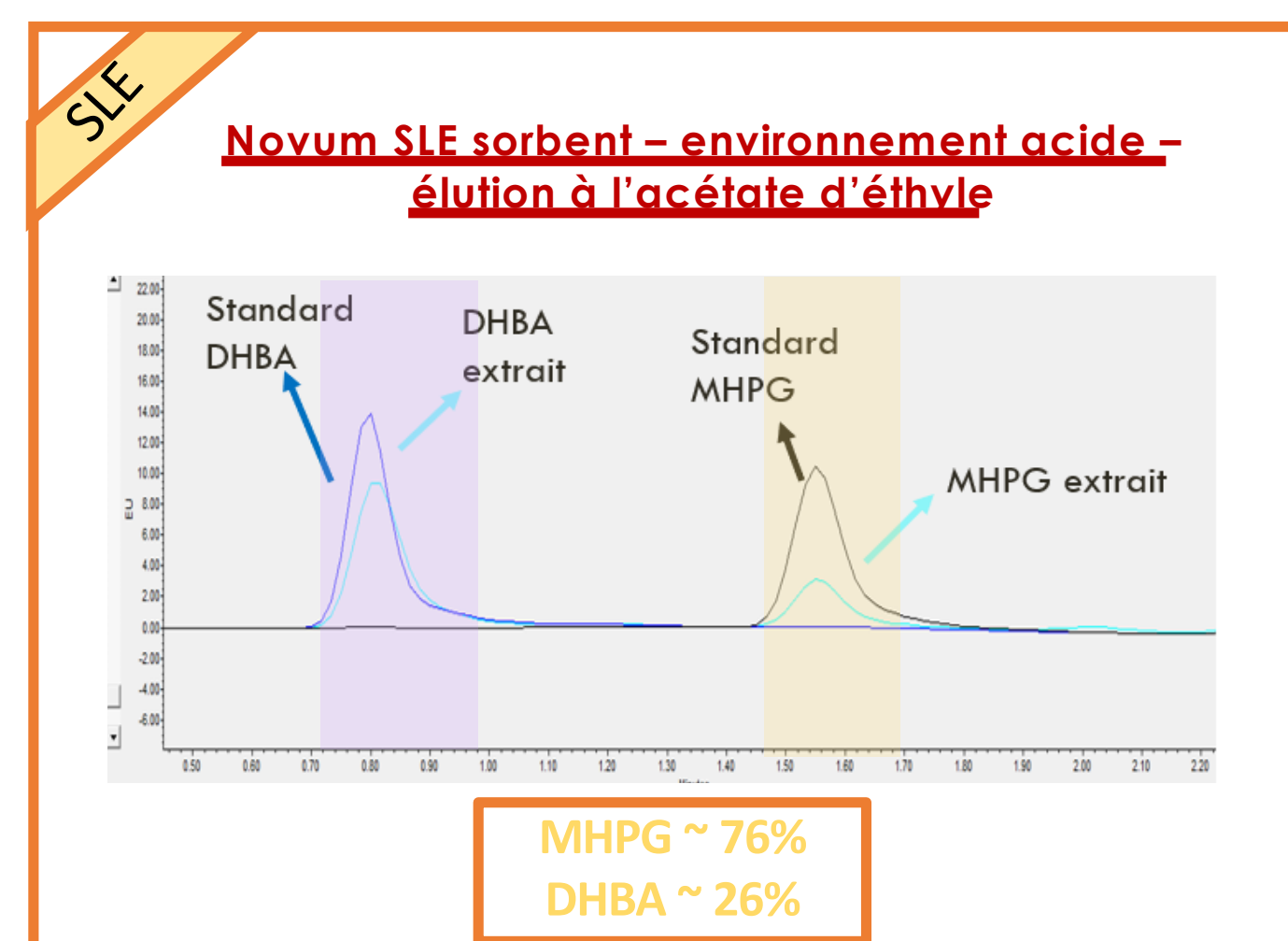
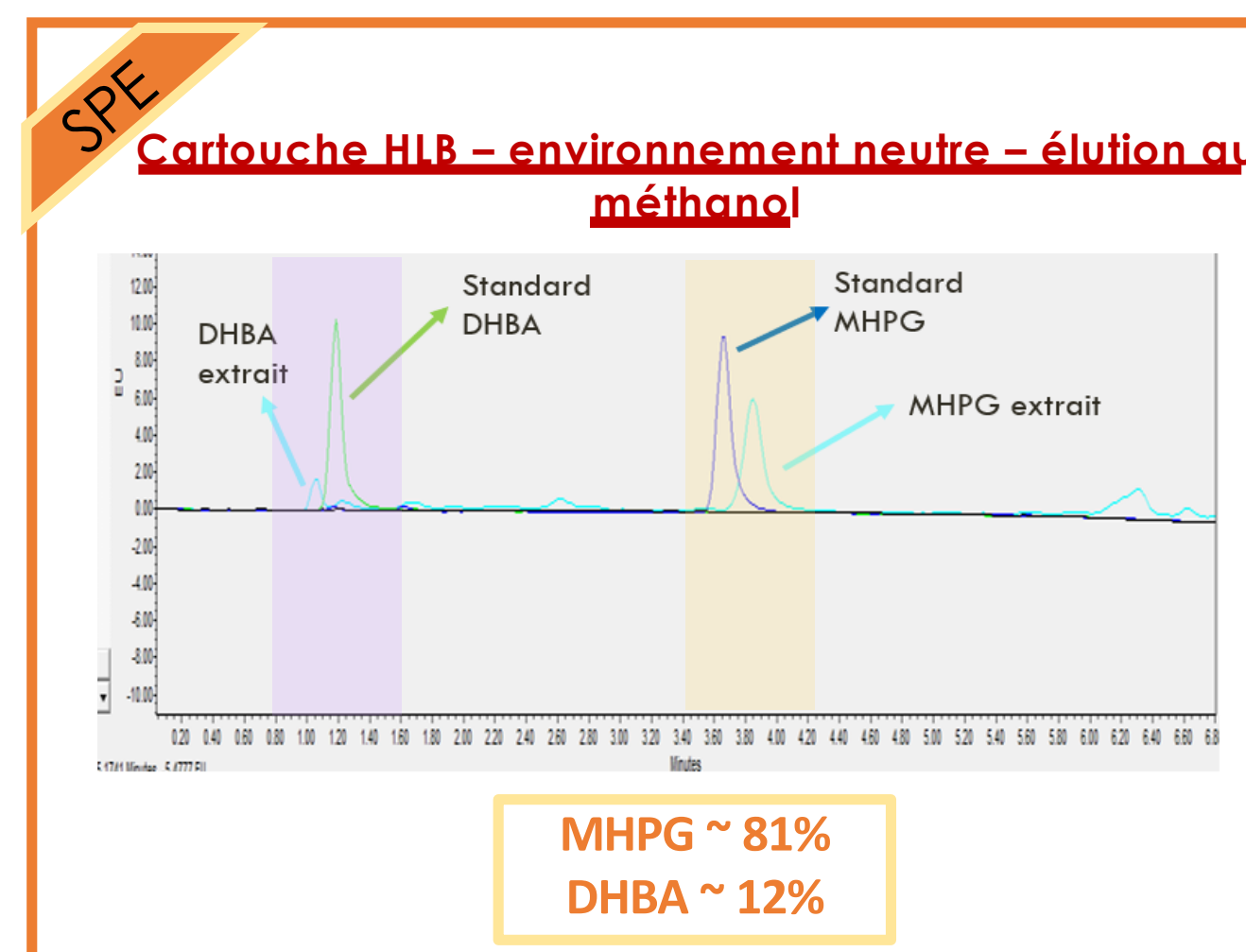


UPLC-ECD



La détection fluorimétrique donne de bons résultats. En revanche, la détection électro-chimique ne semble pas être une bonne solution pour des analyses de routine. En effet, au fur et à mesure des analyses, la détection devient moins sensible et peu reproductible.

Le temps d'équilibrage de la cellule doit être plus long ce qui allonge le temps d'analyse.



Les essais réalisés en milieu basique n'ont pas été concluants pour les deux types d'extraction. En effet, le signal était peu intense et de mauvaise qualité.

Concernant la SPE, les meilleurs résultats ont été observés avec l'élution au méthanol bien que l'acétate d'éthyle soit le solvant d'extraction le plus couramment retrouvé dans la littérature pour la MHPG (6).

Tout en garantissant une extraction correcte de la MHPG. La SLE en milieu acide avec l'élution à l'acétate d'éthyle permet une meilleure extraction du DHBA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au vu des résultats obtenus, nous avons décidé de nous pencher plus particulièrement sur deux protocoles d'extraction: la SPE en milieu neutre avec une élution au méthanol et la SLE en milieu acide avec une élution à l'acétate d'éthyle. En effet, ces méthodes nous permettent d'avoir un signal propre et intense pour la MHPG. Nous allons également investiguer de manière plus profonde la détection électro-chimique afin de permettre l'analyse de plusieurs échantillons.

Le DHBA ne semble pas s'extraire correctement contrairement aux résultats retrouvés dans la littérature (2). C'est pourquoi nous avons l'intention d'étudier d'autres standards internes, notamment l'acide homovanillique qui a une structure similaire à la MHPG (7).

Un autre aspect à explorer est la comparaison de colonnes chromatographiques. Nous avons l'intention de tester deux colonnes supplémentaires en phase inverse (BEH SHIELD RP 18 et HSS PFP), ainsi qu'une colonne HILIC qui s'apparente plus à une phase normale. Cette dernière est de plus en plus utilisée pour l'analyse de molécules polaires avec un faible poids moléculaire et un temps de rétention court en RPLC, ce qui est le cas de la MHPG. Elle améliorerait la rétention de ce type de composé (8).

Références

(1) Yang, R.-K., Yehuda, R., Holland, D. D. & Knott, P. J. Relationship between 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglcol and Homovanillic Acid in Saliva and Plasma of Healthy Volunteers. *Biol. Psychiatry* **42**, 821–826 (1997); (2) Unceta, N. *et al.* Determination of catecholamines and their metabolites in human plasma using liquid chromatography with coulometric multi-electrode cell-design detection. *Anal. Chim. Acta* **444**, 211–221 (2001); (3) Sabbioni, C. *et al.* Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma: Comparison of amperometric and coulometric detection. *J. Chromatogr. A* **1032**, 65–71 (2004); (4) Oasis SPE: Waters. Available at: http://www.waters.com/waters/fr_BE/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?locale=fr_BE&cid=513209. (Accessed: 6th February 2018); (5) Novum simplified liquid extraction. Available at: <http://az621941.vo.msecnd.net/documents/7a8aa89b-c764-4f0f-ab75-f85459f260e3.pdf>. (Accessed: 6th February 2018); (6) Bicker, J., Fortuna, A., Alves, G. & Falcão, A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples—a review. *Anal. Chim. Acta* **768**, 12–34 (2013); (7) Fang, L., Lv, Y., Sheng, X. & Yao, S. Sensitive, Rapid and Easy Analysis of Three Catecholamine Metabolites in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* **50**, 450–456 (2012); (8) Konieczna L., Roszkowska A., Niedzwiecki M., Baczek T. Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples. *J. Chromatogr. Sci.* **1431**, 111–121 (2016). © Waters