

Détermination de l'hémoglobine totale par dilution isotopique ICP-MS afin d'assurer la traçabilité métrologique en biochimie clinique.

Marie Palos^{1,2}, Maria Estela Del Castillo Busto¹, Florence Pannier², Claudia Swart³, Christine Brauckman³ et Paola Fiscaro¹

¹ Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), 1 rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, France, marie.palos@lne.fr, Paola.Fiscaro@lne.fr.

² Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour CNRS/UMR 5254, Hélioparc, 2 avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 09, France.

³ Physikalisch technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig, 38116, Allemagne.

Abstract. The main objective of this study is the development of reference measurement procedures for the determination of total haemoglobin (Hb) in blood based by ID-ICPMS. First of all, a characterization of a Hb standard is carried out via total iron analysis by double ID-ICPMS. This standard will be used as a primary calibration solution in order to ensure the traceability of the measurement results. The validation of this method was conducted by the analysis of the CRM JCCRM 912-1 (ReCCS) certified in total Hb and taking into account the stoichiometry of the molecule (4Fe(Hb)). Furthermore, elemental speciation strategies are carried out through the use of hybrid techniques (e.g. HPLC-ICPMS). The separation of Hb is performed by liquid chromatography using cation or anion exchange columns. The detection is conducted by measuring the iron contained in the haeme-group of the protein, using a sector field ICPMS at medium resolution. In order to develop a primary reference method, isotope dilution analysis is carried out for the determination of total Hb by species-specific mode. For that purpose, the synthesis of an isotopically labelled standard Hb (Hb-⁵⁷Fe) is performed. This ID strategy is compared with the species-unspecific mode in terms of accuracy and precision.

1. Contexte de l'étude

L'hémoglobine (Hb) est une protéine contenant du fer présente dans les globules rouges chez les mammifères et d'autres animaux. Elle est responsable du transport et du stockage de l'oxygène. Sa structure est composée de deux chaînes α et de deux chaînes β ainsi que de quatre groupements hème. Sa masse moléculaire est de 64 458 Da (anhydre), avec une fraction massique d'Hb-Fe de 0.00347 [1]. Il existe plusieurs types d'hémoglobine chez l'adulte : HbA (environ 97%, $\alpha_2\beta_2$), HbA₂ (2,2% à 3,2%, $\alpha_2\delta_2$) et une proportion d'HbF (<1%, $\alpha_2\gamma_2$) [2]. L'hémoglobine est impliquée dans de nombreuses maladies cliniques, comme la leucémie, l'anémie et les maladies cardiaques. L'hémoglobine totale représente le principal biomarqueur pour le diagnostic de l'anémie [3]. A l'heure actuelle, aucune méthode de référence primaire n'existe pour la détermination de l'Hb. Pour compenser ce manque, l'ICSH (International Council for Standardization in Haematology) a établi la méthode HiCN (cyanohémiglobine) comme méthode de référence internationale consensuelle [4]. D'autres méthodes de référence peuvent néanmoins être proposées si elles ont préalablement été comparées aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

La méthode HiCN est basée sur une détermination par spectrophotométrie de la cyanohémiglobine. Les dérivés de l'Hb sont convertis en HiCN après l'ajout de cyanure de potassium (KCN). Une gamme d'étalonnage en HiCN comprise entre 550 et 850 mg.L⁻¹ est utilisée. La mesure spectrophotométrique est effectuée à une longueur d'onde

de 540 nm. La détermination de la concentration de l'Hb se fait à partir de l'absorbance moléculaire. D'un point de vue métrologique, la méthode HiCN présente l'inconvénient d'utiliser un étalon international consensuel [5] qui ne respecte pas les exigences d'un étalon primaire. Cet étalon ICSH HiCN est préparé à partir de sang bovin lysé converti en HiCN, purifié, et certifié via une valeur consensuelle par des laboratoires de référence internationaux par spectrophotométrie d'absorption, qui n'est pas une méthode primaire. Ensuite, aucune information n'est disponible concernant les étalons utilisés et selon toute vraisemblance, les valeurs associées à ces étalons ne sont pas traçable aux unités SI. Par ailleurs, cette méthode présente l'inconvénient d'utiliser comme réactif de conversion le KCN, qui est interdit dans plusieurs pays due à sa toxicité. Enfin, il a été reporté une conversion incomplète des dérivés de l'Hb, ce qui est susceptible d'entraîner un biais négatif.

Notre objectif est donc de développer une méthode primaire pour la détermination de l'hémoglobine totale. En vue d'assurer la traçabilité métrologique, la dilution isotopique associée à la spectrométrie de masse à plasma induit (DI-ICP-MS) est idéale car elle est reconnue par le CCQM (Consultative committee for the metrology in chemistry) comme méthode potentiellement primaire. La majorité des études sur la détermination des métalloprotéines par ICP-MS ont employé des stratégies d'analyse de spéciation élémentaire [6]. Heumann et ses collaborateurs [7] ont établi les bases pour réaliser la dilution isotopique (DI) pour l'analyse de spéciation par

des techniques chromatographiques couplées à l'ICP-MS. Dans ce cas, l'ajout de l'étalon marqué peut être réalisé de deux manières: (a) avant les processus de séparation (mode *spécifique*) ou (b) à la sortie de la séparation d'intérêt doivent être parfaitement connues afin de choisir l'étalon marqué approprié. Une fois que l'équilibre entre l'étalon marqué et l'échantillon est atteint, les pertes ou les extractions non quantitatives seront corrigées. Ainsi, l'étalon marqué utilisé doit être analysé parallèlement aux échantillons afin de déterminer sa concentration exacte ainsi que son abondance isotopique. Dans ce cas, le mode *spécifique* fournit tous les avantages de la DI classique. Par contre, à l'heure actuelle il n'y a pas d'étalons marqués de métalloprotéines disponibles commercialement et il est donc nécessaire de les synthétiser. Ceci implique: (i) une connaissance de la stœchiométrie entre le métal et la protéine, (ii) une haute résolution dans la séparation des métalloprotéines, (iii) l'absence d'échange au niveau de la composition isotopique entre les espèces et (iv) d'absence de pertes ou de contaminations du métal d'intérêt avant d'ajouter l'étalon marqué [8]. En revanche, il existe un grand nombre d'applications relatives au dosage de métalloprotéines qui reposent sur le mode *non spécifique* en raison de sa mise en place plus simple. Dans le mode *non spécifique* ou *post-colonne*, l'ajout de l'étalon marqué est réalisé après la séparation complète des espèces de l'échantillon. Dans ce cas, l'étalon marqué est ajouté dans une forme chimique inorganique qui peut être différente des formes chimiques présentes dans l'échantillon. Ce mode est spécialement utile quand la structure et la composition de la molécule à analyser ne sont pas connues exactement et aussi quand l'étalon marqué n'est pas disponible ou difficile à synthétiser. Par contre, des pertes possibles ou des extractions non quantitatives avant l'ajout de l'étalon marqué (avant la séparation) ne seront pas corrigées.

L'objectif principal de cette étude est le développement d'une méthode de référence pour la détermination de l'Hb totale. Dans un premier temps, le développement d'une méthode basée sur la détermination de l'Hb à partir de sa teneur en Fe par simple minéralisation de l'échantillon à travers la DI-ICP-MS est effectuée. Puis, une méthode d'analyse de spéciation élémentaire par HPLC-ICP-MS est mise en place selon deux modes de dilution isotopique. Enfin, une caractérisation d'un étalon d'Hb totale est effectuée afin de l'utiliser comme étalon primaire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs et matériels

L'étalon d'hémoglobine totale (H7379) utilisé se présente sous forme lyophilisée et provient de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Etats Unis). Le matériau de référence certifié en Hb total, servant pour la validation de la méthode, est fourni par ReCCS dans trois niveaux de concentrations (JCCRM 912-1 L,M,H; Japon). La préparation des étalons se fait à partir d'un matériau de référence certifié de haute pureté pour le fer, BNM-001 (LNE, (99,995 ± 0,004) % (k=2)). La préparation de la solution en étalon marqué ^{57}Fe se fait à partir d'un métal enrichi provenant

chromatographique (mode *non spécifique* ou *post-colonne*). Dans le mode *spécifique*, l'étalon marqué est sous forme chimique équivalente à l'espèce à analyser. Par conséquent, la composition et la structure de l'espèce de chez Eurisotop (France). Les réactifs utilisés pour réaliser les phases mobiles sont: Tris(hydroxyméthyl)aminométhane, 99,9%; acétate d'ammonium pour la biologie moléculaire (≥ 98%); azoture de sodium, NaN_3 (ReagentPlus[®], ≥ 99,5%) de Sigma et l'acide acétique glacial, HAc (100%, Merck, Allemagne). Pour effectuer un tampon citrate à pH 4,0, est utilisé: citrate de sodium (Biology grade, Calbiochem, France) et acide citrique anhydre (ultra ≥ 99,5%, Sigma). L'acide nitrique (HNO_3) est de haute qualité (67-69%, Fisher chemical, Canada). L'eau ultrapure de 18,2 MΩ.cm est obtenue en utilisant le système Milli-QTM (Millipore SAS, France). L'ultrafiltration est réalisée dans des tubes: Amicon Ultra-0,5mL 3K, Ultracel – 3K Membrane, regenerated cellulose 3,000 MWCO (Sigma). Les différents réactifs utilisés pour la digestion sont: trypsine (Trypsin sequence grade modified, Roche, France); dithiothreitol (DTT) et iodoacétamide de Sigma.

2.2. Instrumentation

Le système micro-ondes utilisé est le Discover SP-D (CEM, France). Le système Karl Fisher employé est le modèle 831 Karl Fisher Coulometer (Metrohm, France). L'ICP-MS utilisé pour effectuer les analyses est un ICP-MS haute résolution ELEMENT XRTM (Thermo Fisher Scientific, Allemagne). La séparation chromatographique se fait à l'aide de l'HPLC PDA Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). La colonne utilisée est une colonne échangeuse d'anions SourceTM 15Q 4,6/100 PE (4,6×100 mm, 15µm, GE Healthcare, Suède).

2.3. Procédures

2.3.1. Détermination de l'Hb par double (Fe)-DI-ICP-MS

Une quantité en échantillon et en étalon marqué (^{57}Fe), d'environ 0,15 g à 0,30 g afin d'obtenir un rapport isotopique égal à 1 ($^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$) est mise en présence de 2 mL d' HNO_3 pour subir une digestion acide assistée d'un système de micro-ondes. Les résidus de minéralisation sont ensuite repris dans 50 mL d'eau Milli-QTM afin d'obtenir une concentration finale en fer comprise entre 5 ng.g⁻¹ et 15 ng.g⁻¹. Les échantillons obtenus sont analysés par ICP-MS. Le tableau 1 présente les conditions opératoires utilisées.

Tableau 1. Conditions opératoires de l'ICP-MS

ICP-MS	ELEMENT XR TM HR ICP-MS
Puissance	1 550 W
Débit gaz auxiliaire	0,8 L.min ⁻¹
Débit gaz vecteur	1,06 L.min ⁻¹
Résolution	Haute résolution ($\Delta m/m = 10000$)
Mode d'acquisition	Intensités
Isotopes mesurés	^{56}Fe , ^{57}Fe
Temps d'intégration/point	0,05 s
Nombre de points/pic	20
Nombre de balayage	15
Répétition	5

Afin de mettre en place une double DI pour assurer le caractère primaire de la méthode, il est nécessaire de faire simultanément une caractérisation de l'étalon marqué en ⁵⁷Fe par dilution isotopique inverse. Pour cela, une quantité identique d'étalon marqué ainsi que d'un étalon de haute pureté en Fe est mise en solution acidifiée.

De plus, pour vérifier la présence ou l'absence de fer libre dans notre échantillon, une étape d'ultrafiltration avec un filtre à 3 kDa est réalisée. L'échantillon est pesé avec précision dans les tubes d'ultrafiltration et centrifugé à 14000 g, 4°C pendant 30 min. Après la centrifugation, chaque partie du filtre (fraction <3kDa et fraction >3kDa) est pesée avec précision. Les cycles de centrifugation sont répétés jusqu'à ce que les pesées soient constantes pour chaque fraction. Les différentes fractions sont ensuite analysées par double DI-ICP-MS selon le protocole décrit préalablement.

2.3.2. Détermination de l'Hb par HPLC-ICP-MS

Cette approche repose sur le couplage de l'HPLC avec l'ICP-MS. La quantification de l'Hb est réalisée par une chromatographie à échange d'anions utilisant la colonne Source™ 15Q associé à un gradient d'ammonium acétate de 0-500 mM sur 21 min (voir tableau 2) couplée à l'ICP-MS. Les conditions instrumentales et opératoires de l'HPLC sont répertoriées dans le tableau 2. Les conditions instrumentales de l'ICP-MS sont identiques à celles présentées dans le tableau 1, mis à part le mode d'acquisition (analyse chromatographique).

Tableau 2. Conditions opératoires de l'HPLC

Colonne	Source™ 15Q 4.6/100 PE
Phase A	10 mM Tris-Hac, pH 8,0
Phase B	A + 500 mM Acétate d'ammonium, pH 8,0
Débit	1,0 L.min ⁻¹
Volume injection	50 µL
Gradient	0-2 min, 100% A 2-9 min, 100% A à 100% B 9-16 min, 100% B 16-21 min, 100% A

2.3.3. Post-colonne DI-HPLC-ICP-MS

Pour l'analyse par post-colonne dilution isotopique, une solution d'étalon marqué en ⁵⁷Fe (50-100 ng.g⁻¹ Fe dans 25 mM citrate de sodium/acide citrique, pH 4,0) est ajouté en continu (flux 0,1 mL.min⁻¹) avec une pompe péristaltique après la séparation chromatographique, afin d'obtenir un signal stable. Les paramètres instrumentaux sont présentés dans les tableaux 1 et 2. Pour la quantification de la solution d'étalon marqué en ⁵⁷Fe, une dilution isotopique inverse est effectuée en utilisant un étalon de haute pureté en Fe naturel.

2.3.4. Identification de l'Hb par nanoLC-MS/MS

Une digestion en solution par la trypsine est effectuée pour la caractérisation protéique d'étalon de l'Hb. Une solution de NH₄CO₃ à 25 mmol.L⁻¹, CaCl₂ à 5 mmol.L⁻¹ et trypsine (à 6,25 ng.µl⁻¹ est ajoutée à l'échantillon, après réduction au DTT à 10 mmol.L⁻¹ et alkylation par iodoacétamide à 55 mmol.L⁻¹. La digestion s'effectue à 37°C pendant 16h. Le mélange peptidique est ensuite analysé directement en solution. La séparation est réalisée

sur une colonne C18 (15cm×75µm id) avec une chaîne nano-chromatographique Ultimate 3000 (Thermo scientific / Dionex). La détection est effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). L'acquisition se fait sur une gamme m/z de 400 à 2000. Les recherches de protéines ont été réalisées comme suit:

-significance threshold: 0.01%

-ion score: 10

-filtres PD: rank 1, high confidence peptides; 2 peptides par protéines

-area: calculée par PD avec les 3 pics maximums

-emPAI: calculé par Mascot

Le mode d'identification a été réalisé avec des critères de stringence élevé. Deux modes de quantification relative ont été réalisés afin de donner une idée grossière de l'abondance des protéines contaminants dans l'échantillon.

3. Résultats

3.1. Quantification de l'Hb par (Fe)-DI-ICP-MS

La validation de la méthode développée est réalisée par l'utilisation du matériau de référence certifié JCCRM 912-1 (ReCCS) certifié en Hb totale par la méthode de référence (trois niveaux de concentrations). La concentration d'Hb à travers sa teneur en fer est déterminée par double DI-ICP-MS en tenant compte de la stoechiométrie de la molécule (Hb(4Fe)). La préparation des échantillons doit tenir compte de la mise en œuvre de la dilution isotopique. L'étalon marqué doit être ajouté à l'échantillon le plus tôt possible lors du traitement. Toutes les étapes de préparation sont réalisées par gravimétrie jusqu'à l'ajout de l'étalon marqué (⁵⁷Fe). De plus, la solution d'étalon marqué en ⁵⁷Fe est caractérisée en Fe en réalisant une dilution isotopique inverse et caractérisée en abondance isotopique : abondance ⁵⁶Fe = (1,39 ± 0,36 %) et abondance ⁵⁷Fe = (96,63 ± 0,40 %) avec k=2, sur une période de six mois. Les valeurs obtenues sont en accord avec les valeurs certifiées (voir le tableau 3).

Tableau 3. Détermination de l'Hb dans le MRC JCCRM 912 par double (Fe)-DI-ICPMS

	Fe mg.L ⁻¹ (k=2)	Hb g.L ⁻¹ (k=2)	Hb (certifiée) g.L ⁻¹ (k=2)	E _N
JCCRM 912-1L	287,2 ± 6,8	82,9 ± 2,0	80,7 ± 1,0	1,97 < 2
JCCRM 912-1M	474,4 ± 13,6	136,9 ± 3,9	136,7 ± 1,6	0,10 < 2
JCCRM 912-1H	628,6 ± 18,9	181,3 ± 5,4	185,7 ± 2,2	1,50 < 2

De plus, afin de vérifier la présence de fer libre (fer non lié à l'Hb) dans le matériau de référence certifié, la solution non traitée ainsi que les deux fractions obtenues après ultrafiltration sont analysées par double DI-ICP-MS. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Détermination de l'Hb dans les différentes fractions du MRC par double DI-ICPMS

JCCRM 912-1L (n=4)	Fe mg.L ⁻¹ (k=2)	Hb g.L ⁻¹ (k=2)	Hb (certifiée) g.L ⁻¹ (k=2)
Non traitée	287,2 ± 6,8	82,9 ± 2,0	80,7 ± 1,0
Fraction >3kDa	297 ± 15	85,7 ± 4,3	
Fraction <3kDa	< 1,0	< 0,2	

La valeur déterminée pour la fraction > 3kDa est en bonne concordance avec la valeur déterminée pour la solution non traitée ainsi que la valeur certifiée. Dans la fraction < 3 kDa, la valeur de Fe mesurée est inférieure à 1,0 mg.L⁻¹. Au regard de ces résultats, il n’y a pas de fer libre dans le matériau de référence certifié soulignant le fait que le fer quantifié provient de l’Hb. En outre, la procédure d’ultrafiltration a permis d’éliminer de manière sélective le fer libre ainsi que de récupérer la totalité de l’échantillon après le traitement.

Cette méthode est une approche prometteuse pour assurer une justesse des résultats avec de faibles incertitudes (inférieures à 4%). Cependant, cette méthode est seulement applicable s’il n’y a pas de présence de fer libre ou de protéines contenant du fer autre que l’Hb dans notre échantillon. C’est pour cette raison qu’il est nécessaire de développer une méthode d’analyse de spéciation.

3.2. Quantification de l’Hb par HPLC-ICP-MS

L’approche développée dans cette partie est le mode *non spécifique* de la dilution isotopique par HPLC-ICP-MS. L’Hb est séparée par chromatographie échangeuse d’anions grâce à la présence de résidus d’acides aminés chargés. La figure 1 représente le chromatogramme d’intensités obtenue après analyse du matériau certifié JCCRM 912-1L à une concentration de 0,051 g.L⁻¹ Hb.

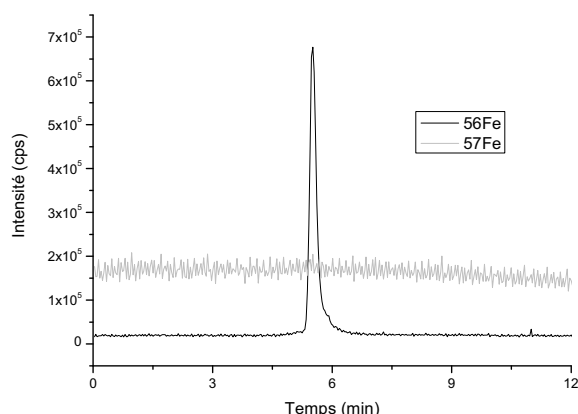


Figure 1. Chromatogramme d’intensités du MRC JCCRM 912-1L à 0,051 g.L⁻¹ Hb utilisant post-colonne DI-HPLC-ICP-MS.

Afin d’obtenir la concentration en Hb, le chromatogramme d’intensités (cps) est transformé en chromatogramme de flux en masse (ng.min⁻¹ vs min) (figure 2) après l’application de l’équation 1 de la dilution isotopique post-colonne.

$$MF_{\text{échantillon}} = w_{sp} \cdot f_{sp} \cdot \frac{M_{\text{éch}}}{M_{sp}} \cdot \frac{(R_{A/B} \cdot k \cdot B_{sp} - A_{sp})}{(A_{\text{éch}} - R_{A/B} \cdot k \cdot B_{\text{éch}})} \quad (1)$$

- MF_{échantillon} (μg Fe): flux en masse de l’élément,
- f_{sp} (g.min⁻¹): flux de la solution d’étalon marqué,
- w_{sp} (μg.g⁻¹ Fe): concentration massique de l’élément dans la solution de l’étalon marqué,
- M_{éch} (g.mol⁻¹): masse atomique de l’élément dans l’échantillon,
- M_{sp} (g.mol⁻¹): masse atomique de l’élément dans l’étalon marqué,
- A_{éch}(%): abondance naturelle de l’isotope A dans l’étalon primaire,
- B_{éch}(%): abondance naturelle de l’isotope B dans l’étalon primaire,
- A_{sp}(%): abondance de l’isotope A dans l’étalon marqué,
- B_{sp}(%): abondance de l’isotope B dans l’étalon marqué,

- R_{A/B} (-): rapport isotopique 56/57 du mélange,
- k (-): facteur de correction de dérive et de biais en masse

Le rapport isotopique R_{A/B} (R_{56/57}) est calculé et corrigé par un biais en masse utilisant un modèle linéaire. Comme le facteur de biais en masse (k) évolue légèrement dans le temps, une méthode de correction entre chaque série est appliquée. Ainsi, une solution de fer naturel (50 ng.g⁻¹ Fe) ou une solution étalon d’Hb est injectée entre chaque échantillon. La moyenne du biais en masse obtenue est de (1,039 ± 0,039) par unité de masse (pour une durée de 8h d’analyse).

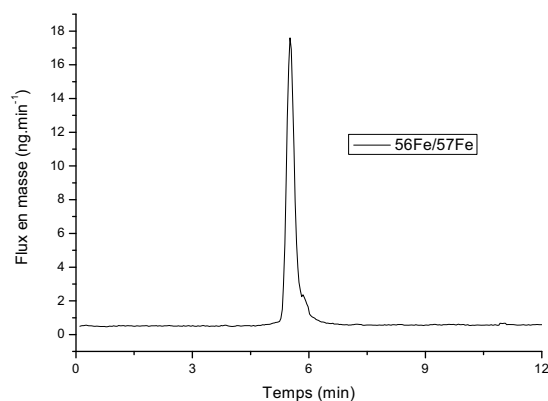


Figure 2. Chromatogramme de flux en masse du MRC JCCRM 912-1L à 0,051 g.L⁻¹ Hb.

La fraction massique en fer dans l’échantillon est obtenue par intégration de l’aire du pic (à l’aide du logiciel Origin) divisée par la masse injectée (m_{injectée}, g). Finalement, la concentration en Hb (C_{échantillon}, g.L⁻¹) dans l’échantillon est calculé à partir de l’équation 2 qui prend en compte les dilutions initiales de l’échantillon, la masse volumique de l’échantillon et la stœchiométrie de la molécule (Hb(4Fe)).

$$C_{\text{échantillon}} = \frac{\text{Aire}}{m_{\text{injectée}}} \cdot F_{\text{dilution}} \cdot \rho_{\text{échantillon}} \cdot \frac{M_{\text{Hb}}}{M_{\text{Fe}}} \cdot \frac{1}{4} \quad (2)$$

- C_{échantillon} (g.L⁻¹ Hb): concentration en Hb de l’échantillon,
- m_{injectée} (g): masse injectée,
- F_{dilution}: facteur de dilution de l’échantillon,
- ρ_{échantillon} (g.mL⁻¹): masse volumique de l’échantillon,
- M_{Hb} (Da): poids moléculaire de l’Hb = 64 458
- M_{Fe} (amu): masse atomique du Fe = 55,8

De plus, différents paramètres sont évalués et déterminés:

- le flux de l’étalon marqué est étalonné par pesée (avant et après chaque analyse): (0,1069 ± 0,0015) g.min⁻¹;
- la masse injectée est étalonnée par pesée: (0,04946 ± 0,00064) g;
- la détermination du fer dans la solution d’étalon marqué est quantifiée par DI inverse-ICP-MS: (0,0441 ± 0,0026) μg.g⁻¹ Fe.

Les analyses ont été effectuées sur deux niveaux de concentration du matériau certifié. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 5.

Tableau 5. Détermination de l’Hb dans le MRC par post-colonne HPLC-DI-ICPMS

	Fe mg.L ⁻¹ (k=2)	Hb g.L ⁻¹ (k=2)	Hb (certifiée) g.L ⁻¹ (k=2)	Biais

JCCRM 912-1L (n=9)	0,191 ± 0,014	55,2 ± 4,1	80,7 ± 1,0	-32%
JCCRM 912-1M (n=3)	0,431 ± 0,013	124,4 ± 3,6	136,7 ± 1,6	-8%

Un biais de 32% est obtenu pour le premier niveau alors qu'une erreur de 8% est déterminée pour le deuxième niveau de concentration du MRC. Cela s'explique par un recouvrement incomplet du complexe (Hb(4Fe)).

Ces résultats mettent en avant la nécessité de développer une méthode de dilution isotopique *spécifique* HPLC-ICP-MS permettant de compenser et de corriger les pertes ou transformations durant la méthode analytique. Cette méthode consiste à quantifier l'Hb en utilisant un étalon marqué en ⁵⁷Fe d'Hb. Or, il n'existe pas d'étalon marqué en ⁵⁷Fe d'Hb. Il est donc nécessaire de synthétiser cet étalon marqué. Pour cela, il nous faut un étalon d'Hb totale dont on a connaissance de sa fraction massique afin d'assurer la traçabilité. Une étape de caractérisation de l'étalon d'Hb a donc été effectuée.

3.3. Caractérisation d'un étalon d'Hb totale

Une solution d'environ 1 g.L⁻¹ Hb est préparée dans 10 mM Tris-HAc à pH 8,0. Dans un premier temps, l'étalon d'Hb a été caractérisé en Fe par double DI-ICP-MS. Dans le tableau 6 est résumé les concentrations massiques de fer obtenues pour la solution d'Hb non traitée et pour les différentes fractions.

Tableau 6. Détermination du fer dans l'étalon d'Hb par double DI-ICPMS

Etalon Hb H7379	µg Fe/ g Hb (k=2)
Non traitée	3009 ± 109
Fraction >3kDa	3032 ± 89
Fraction <3kDa	75

La concentration en fer déterminée dans la solution d'étalon non traitée (3009 ± 109 µg Fe/ g Hb) est comparable à la valeur obtenue pour la fraction >3kDa (3032 ± 89 µg Fe/g Hb). Au regard de ces résultats, l'absence de fer libre dans la solution étalon d'Hb est prouvée.

En parallèle, une étude est réalisée pour s'assurer de la stabilité de la teneur en fer dans la solution étalon à -20°C. Comme on peut le remarquer sur la figure 3, on n'observe pas de différence significative de la concentration en fer sur une durée de 2 mois à -20°C. Cependant, il reste préférable de caractériser la solution étalon d'Hb en fer avant utilisation pour assurer la traçabilité.

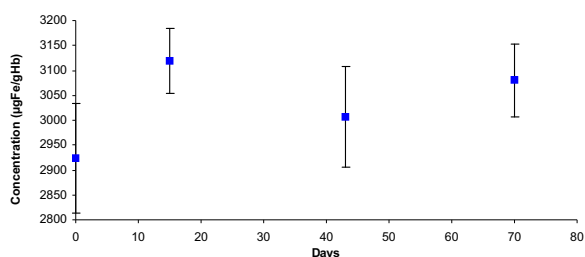


Figure 3. Stabilité de la fraction >3kDa de la solution étalon d'Hb durant 2 mois.

Puis, la pureté de cette solution étalon a tout d'abord été déterminée en prenant en compte la quantité d'eau obtenue par les méthodes de Karl-Fisher et de sulfate de sodium comme agent de séchage. La pureté déterminée expérimentalement est de (92,00 ± 0,20) % (k=2, n=4). Enfin, l'analyse de la solution étalon après digestion trypsine par nanoLC-MS/MS a permis de faire une caractérisation protéique où l'anhydrase carbonique est présente à 1 %, ce qui est l'impureté majoritaire. Ces différentes impuretés représentent environ 2% de l'échantillon donc l'Hb reste largement majoritaire.

4. Conclusion

Le développement d'une méthode associant la double dilution isotopique à l'ICP-MS pour la détermination de l'Hb à partir de sa teneur en Fe a été validée par l'analyse d'un matériau de référence certifié en Hb (JCCRM 912-1) avec une incertitude inférieure à 4%.

Puis, la détermination de l'Hb par post-colonne-DI-HPLC-ICP-MS a montré des résultats prometteurs. Cependant, les écarts observés montrent la nécessité de développer le mode *spécifique* par DI-HPLC-ICP-MS. La mise en œuvre du mode *spécifique* nécessite la synthèse du spike d'Hb marqué en ⁵⁷Fe qui est en cours de réalisation. La première étape a été de caractériser l'étalon d'Hb qui est utilisé pour la synthèse. Une évaluation de sa pureté, en tenant compte de la teneur en eau ainsi que de la présence d'autres protéines, amène à une pureté d'environ 90%. De plus, une caractérisation en fer de l'étalon est réalisée en ayant au préalable vérifié l'absence de fer libre dans l'étalon d'Hb qui sera utilisé comme étalon primaire afin d'assurer la traçabilité.

Références

- International committee for standardization in haematology, J. Clin. Pathol., **31**, 139-143 (1978).
- M.E. Del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Analytica Chimica Acta, **634**, 1-14 (2009).
- J.T. Cao, H. Wang, Y.H. Chen, Y.M. Liu, Spectroscopy and spectral analysis, **34**, 241-245 (2014).
- International committee for standardization in haematology, J. Clin. Pathol., **49**, 271-274 (1996).
- B.H. Davis, B. Jungerius, Int. J. Lab. Hematol. **32**, 139-141 (2010).
- A. Sanz-Medel, Anal. Bioanal. Chem. **391**, 885-894 (2008).
- K.G. Heumann, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process., **118/119**, 575-592 (1992).
- C. Swart, Anal Bioanal Chem **405**, 5697-5723 (2013).