

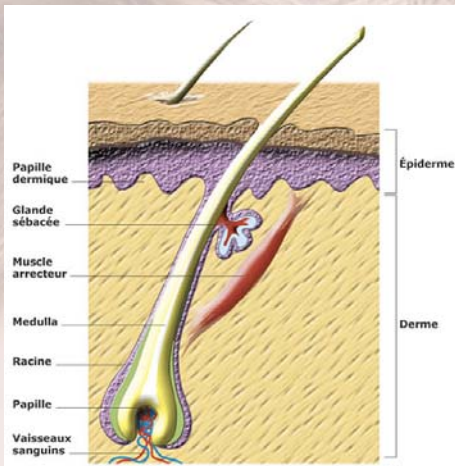
L'OREAL

Mise en place du céramidogramme du cheveu par UPLC-MS/MS

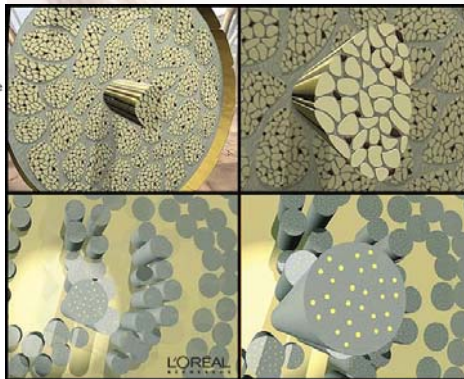
Laboratoire d'Analyse – L'OREAL Clichy

Séverine Compain

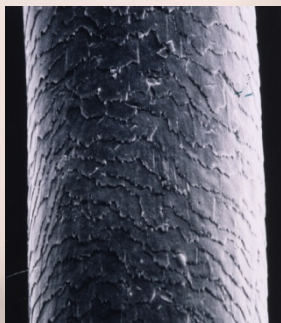
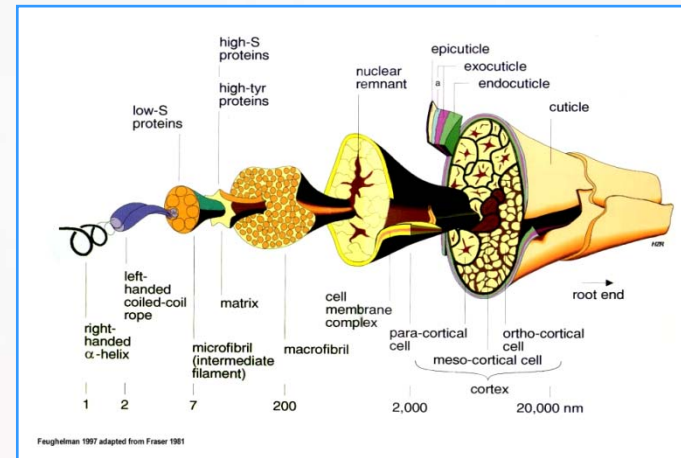
RAPPELS SUR LE CHEVEU



Follicule pilo-sébacé



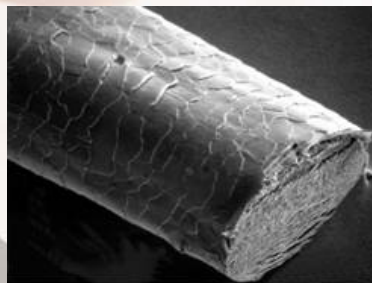
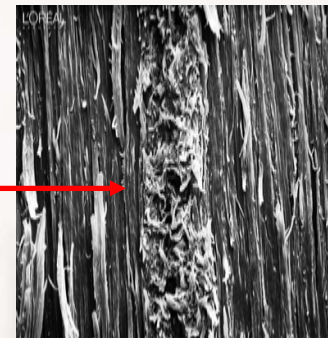
Cellules corticales et fibrilles du cheveu



Coupes de cheveux



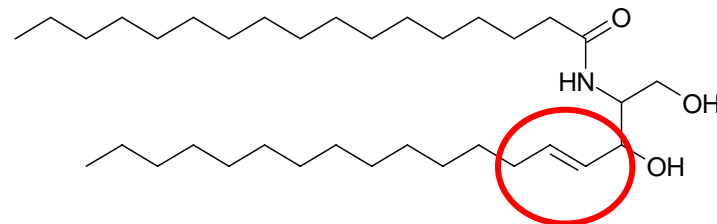
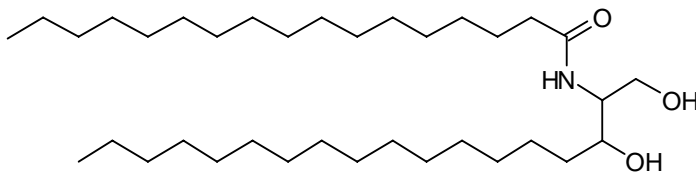
Coupe du cortex, avec au centre la moelle



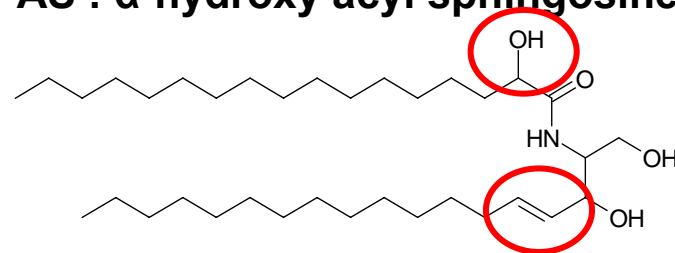
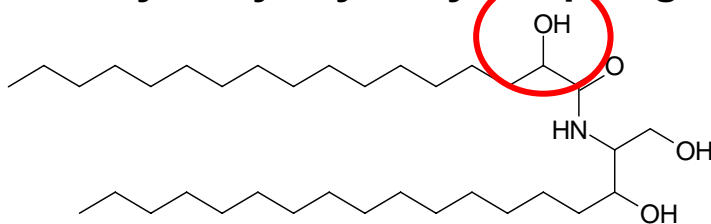
Protéines	80 %
Eau	9-10 %
Lipides	5 %
Sucres	0-5 %
Pigments, métaux	0,1 %

Céramides : nomenclature

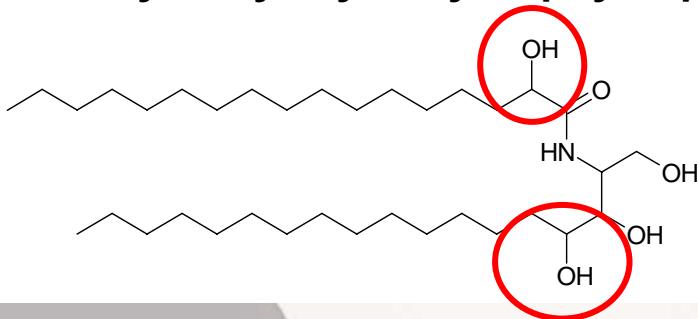
NDS : Non hydroxy acyl dihydrosphingosine **NS : Non hydroxy acyl sphingosine**



ADS : α-hydroxy acyl dihydrosphingosine **AS : α-hydroxy acyl sphingosine**



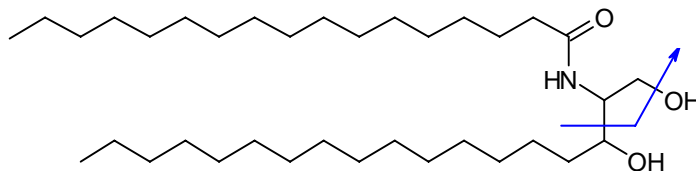
PS : α-hydroxy acyl dihydrophytosphingosine



Céramides : fragmentation ESI-

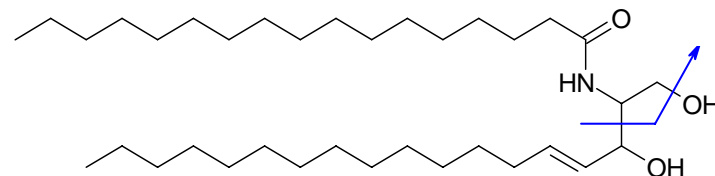
Ion parent = [M-H]-

NDS : Non hydroxy acyl dihydrosphingosine

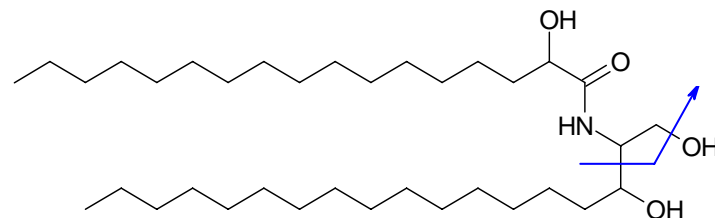


Ion parent = [M-H]-

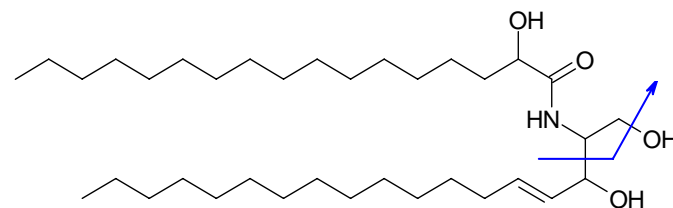
NS : Non hydroxy acyl sphingosine



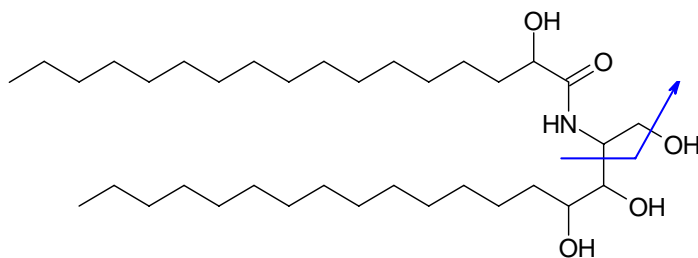
ADS : α-hydroxy acyl dihydrosphingosine



AS : α-hydroxy acyl sphingosine



PS : α-hydroxy acyl dihydrophytosphingosine

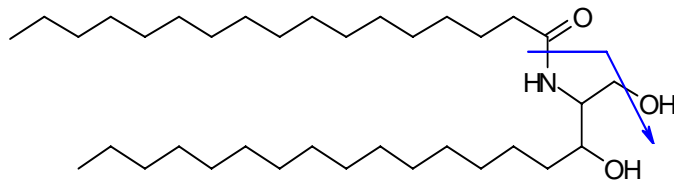


**Fragmentation en ESI- →
caractéristique de la partie
« acide » de la molécule**

Céramides : fragmentation ESI+

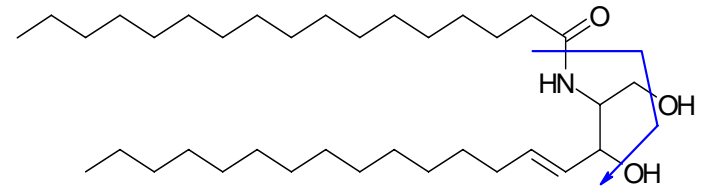
Ion parent = $[M+H]^+$

- **NDS : Non hydroxy acyl dihydrosphingosine**

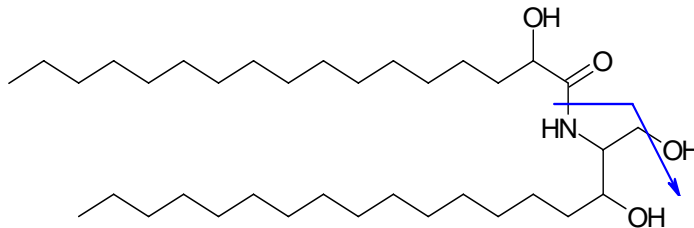


Ion parent = $[M+H-H_2O]^+$

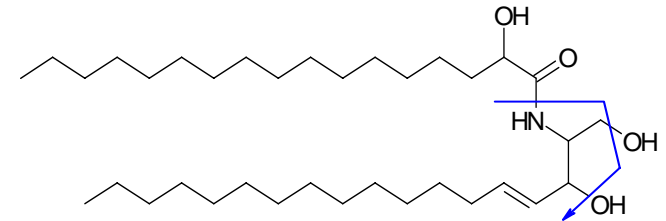
- **NS : Non hydroxy acyl sphingosine**



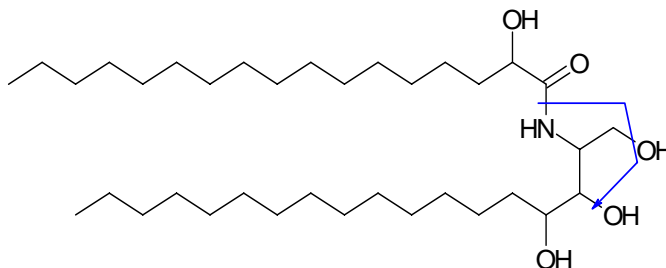
- **ADS : α -hydroxy acyl dihydrosphingosine**



- **AS : α -hydroxy acyl sphingosine**



- **PS : α -hydroxy acyl dihydrosphingosine**



**Fragmentation en ESI+ →
caractéristique de la partie
« base » de la molécule**

But du développement

- **A partir d'une même préparation d'échantillon de cheveux**
 - **Quantifier au moins 70 céramides extractibles du cheveu en une analyse**
 - **Quantifier d'autres lipides extractibles du cheveu (méthodes analytiques différentes)**

Méthode de référence

Mazukawa Y., Lipids., 2007 Apr ; 42(3) : 275-90. Epub 2007 Jan 19.

- Environ 70 céramides en une analyse LC/MS (ESI- et/ou APCI+) (céramides du type A_xS_y , A_xDS_y , N_xS_y , N_xDS_y)
- Rincage / Extraction :
 - lavage du cheveu puis extraction 4 x 24h dans différents mélanges (chloroform / MeOH / H₂O)
- Conditions analytiques :
 - LC/MS en ESI- (L-separation colonne ODS, 150x2.1mm)
 - Isocratique MeOH / tampon acétate d'ammonium 10 mM
 - Débit 0.2 mL/min, 5µL injectés, LLOQ = 1 fmol, Temps run = 45min

Développement analytique

Préparation échantillon :

Extraction du cheveu par mélange ternaire

(Dichlorométhane/MeOH/H₂O 54v/37v/9v) 4 heures aux ultrasons.

Re-concentration de l'échantillon par évaporation à sec + reprise par solvant MeOH

Conditions analytiques testées :

- Chaîne UPLC Acquity (Waters) couplée à Quattro Micro (Waters) en **LC/MS et LC/MS/MS**

- Electrospray (ESI) modes **négatif et positif**

- UPLC Acquity HSS T3 100 x 2.1 mm, 1.8µm (Waters)

- Phase mobile : MeOH / tampon acétate d'ammonium 10 mM (**pH=5.5 et pH8.5 testés**)

Isocratique et gradient d'éluion.

- Débit de **0.2 à 0.4 mL/min, 2µL injectés,**

- **T°colonne testées = 40°C à 60°C**

Bilan Méthode finale

Séparation analytique :

Colonne Acquity HSS T3

100 x 2.1 mm, 1.8 μ m

Débit : 0.250 mL/min

Phases mobiles :

A = acétate d'ammonium 10mM pH 8.5

B = MeOH

Gradient d'élution :

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	3	97
20	3	97
25	1	99
33	1	99
37	3	97
45	3	97

T° colonne : 60°C

Volume injecté : 2 μ L

Détection : MRM (MS/MS), ESI-

Ion parent \rightarrow ion fils

$[M-H]^- \rightarrow [CH_2=CH-NH-CO=CH-R]^-$

Cinq périodes de détection ont été déterminées :

La période 1 s'étend de 0 à 3 min.

La période 2 s'étend de 2.5 à 8 min.

La période 3 s'étend de 7 à 15 min.

La période 4 s'étend de 14 à 21 min.

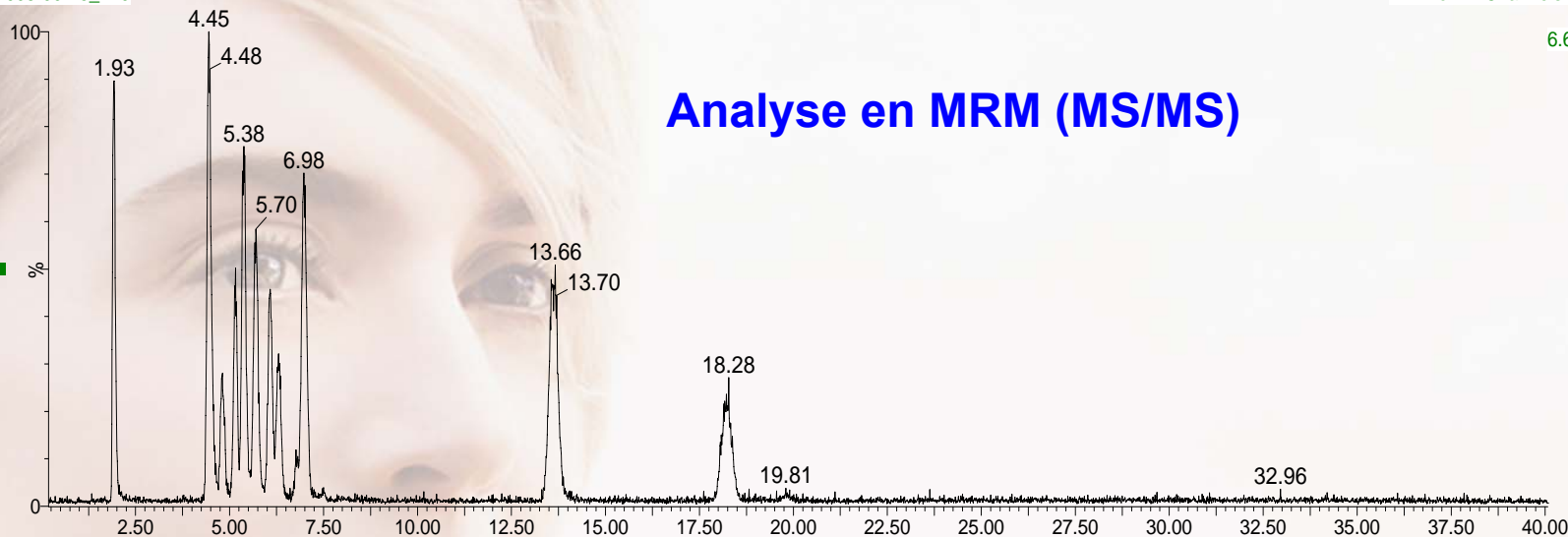
La période 5 s'étend de 19 à 45 min.

Bilan Méthode finale : standards en solution

CERs 1.0 ug-mL - pH8.5

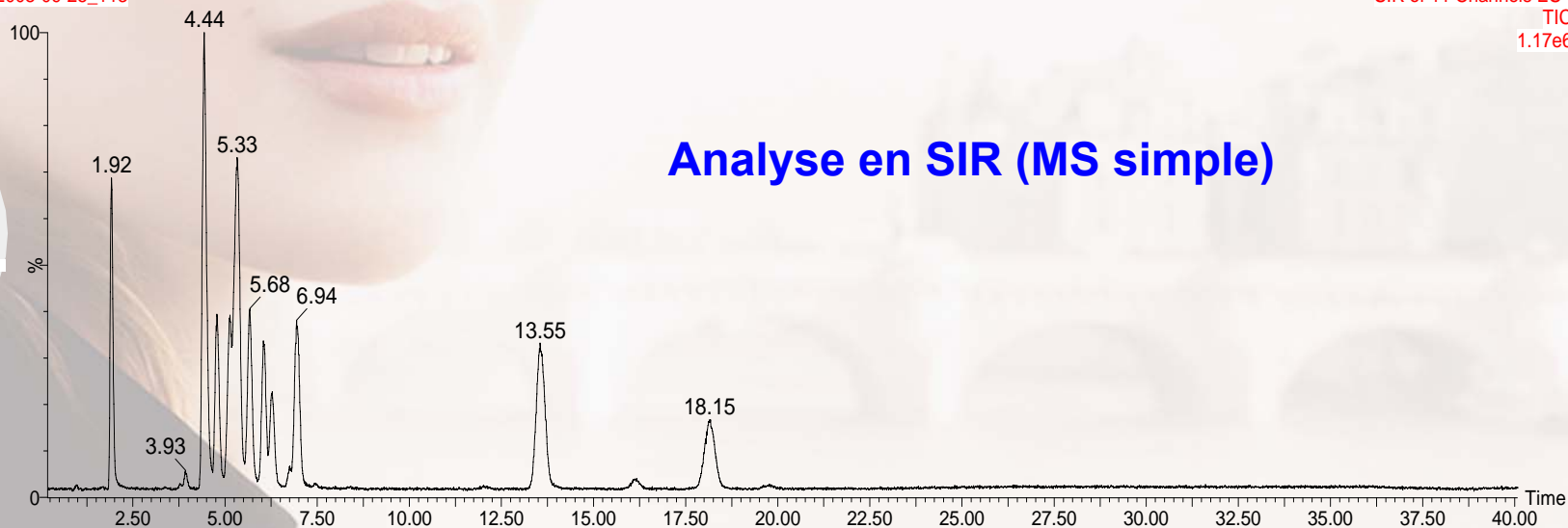
2008-09-25_129

MRM of 11 Channels ES-TIC
6.64e4



2008-09-25_113

SIR of 11 Channels ES-TIC
1.17e6



Bilan Méthode finale : cheveux extraits

Chromatogramme de cheveux extraits (20 mg)

Extrait de cheveux Isabelle cone 60V

2008-08-07_007

1: SIR of 32 Channels ES-TIC
1.93e6



Chromatogramme de cheveux extraits (20 mg)

Chv IG - Prelevmt tete - tube A

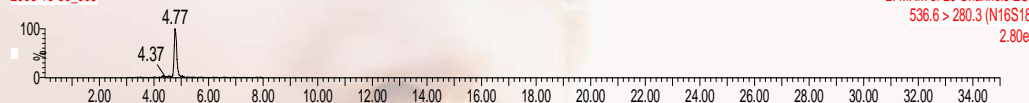
2008-10-30_005



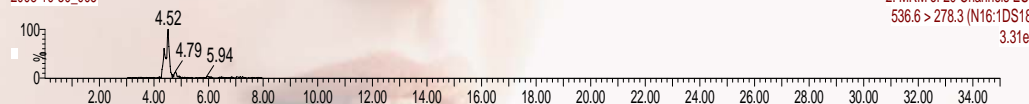
2008-10-30_005



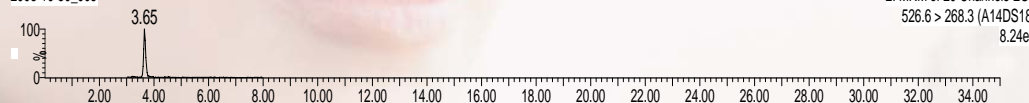
2008-10-30_005



2008-10-30_005



2008-10-30_005



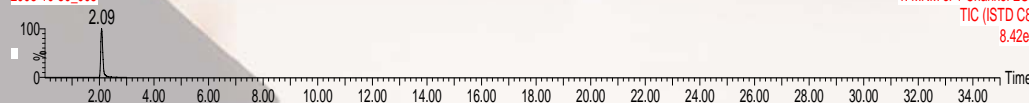
2008-10-30_005



2008-10-30_005



2008-10-30_005

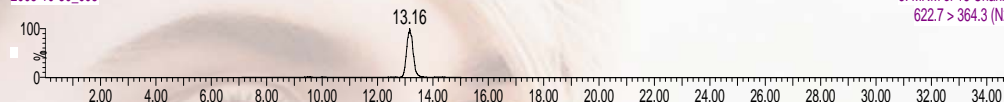


Bilan Méthode finale : cheveux extraits

Chromatogramme de cheveux extraits (20 mg)

Chv IG - Prelevmt tete - tube A

2008-10-30_005



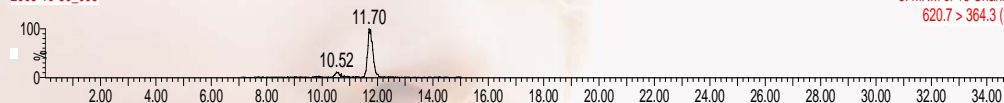
3: MRM of 15 Channels ES-622.7 > 364.3 (N22DS18)
1.29e5

2008-10-30_005



3: MRM of 15 Channels ES-622.7 > 336.3 (N20DS20)
6.09e3

2008-10-30_005



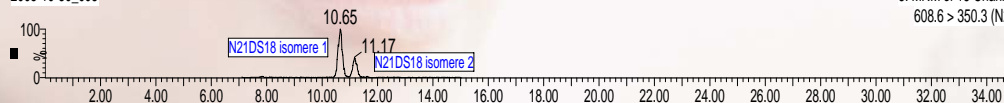
3: MRM of 15 Channels ES-620.7 > 364.3 (N22S18)
1.18e4

2008-10-30_005



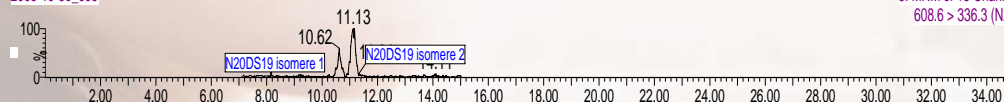
3: MRM of 15 Channels ES-620.7 > 362.3 (N22:1DS18)
1.90e4

2008-10-30_005



3: MRM of 15 Channels ES-608.6 > 350.3 (N21DS18)
1.17e4

2008-10-30_005



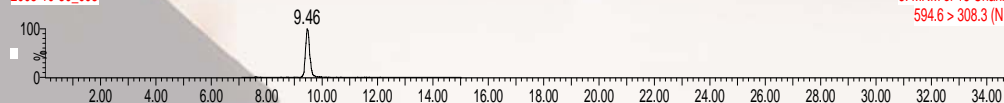
3: MRM of 15 Channels ES-608.6 > 336.3 (N20DS19)
1.95e3

2008-10-30_005



3: MRM of 15 Channels ES-594.6 > 336.3 (N20DS18)
1.00e5

2008-10-30_005



3: MRM of 15 Channels ES-594.6 > 308.3 (N18DS20)
4.40e4

Bilan Méthode finale : cheveux extraits

Chromatogramme de cheveux extraits (20 mg)

Chv IG - Prelevmt tete - tube A

2008-10-30_005 Sm (Mn, 1x1)



2008-10-30_005 Sm (Mn, 1x1)



2008-10-30_005



2008-10-30_005



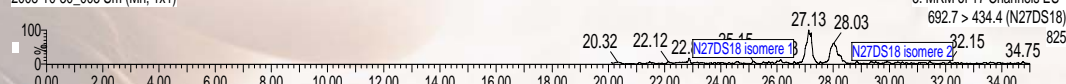
2008-10-30_005



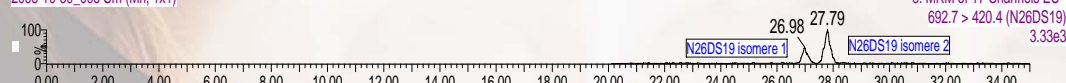
2008-10-30_005



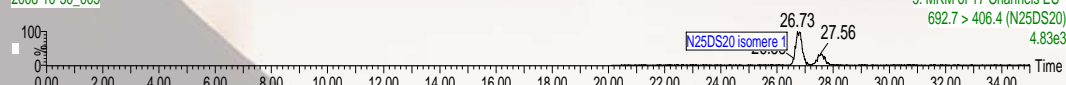
2008-10-30_005 Sm (Mn, 1x1)



2008-10-30_005 Sm (Mn, 1x1)

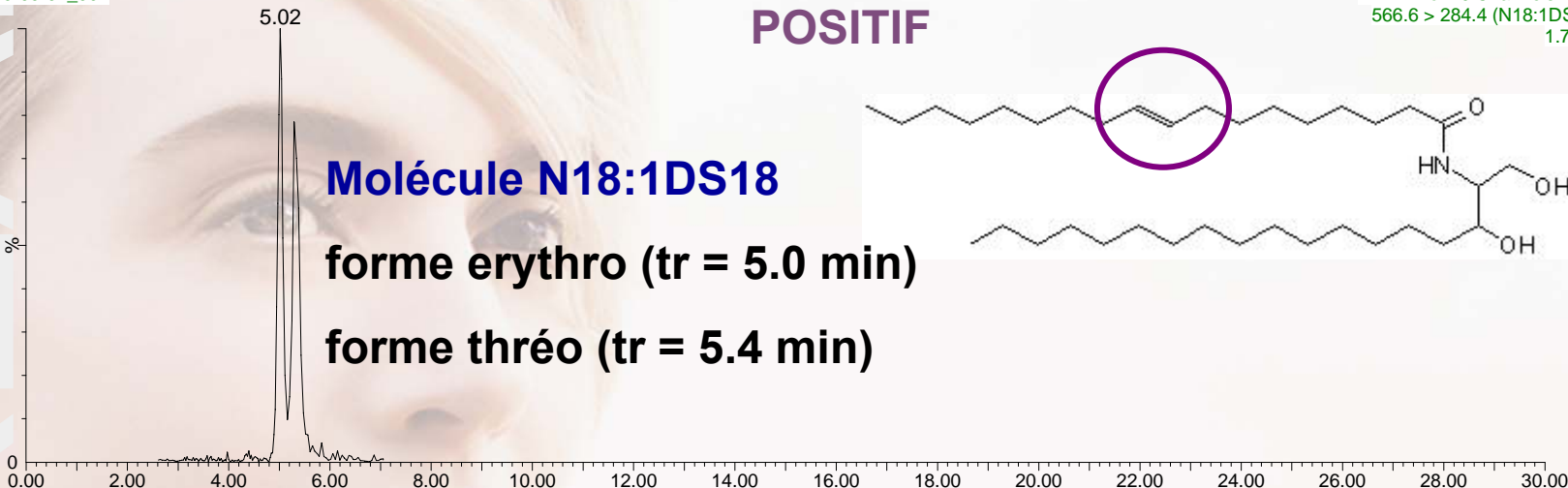


2008-10-30_005



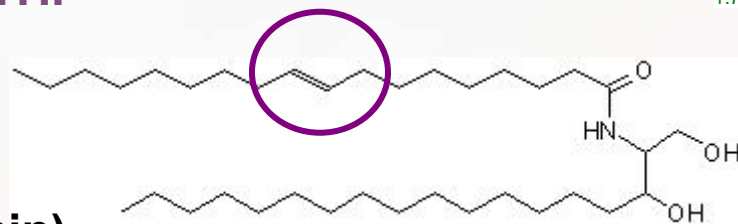
Exemples d'ions suivis dans une analyse (1/3)

Cheveux IG MRM POS
2009-09-04_004



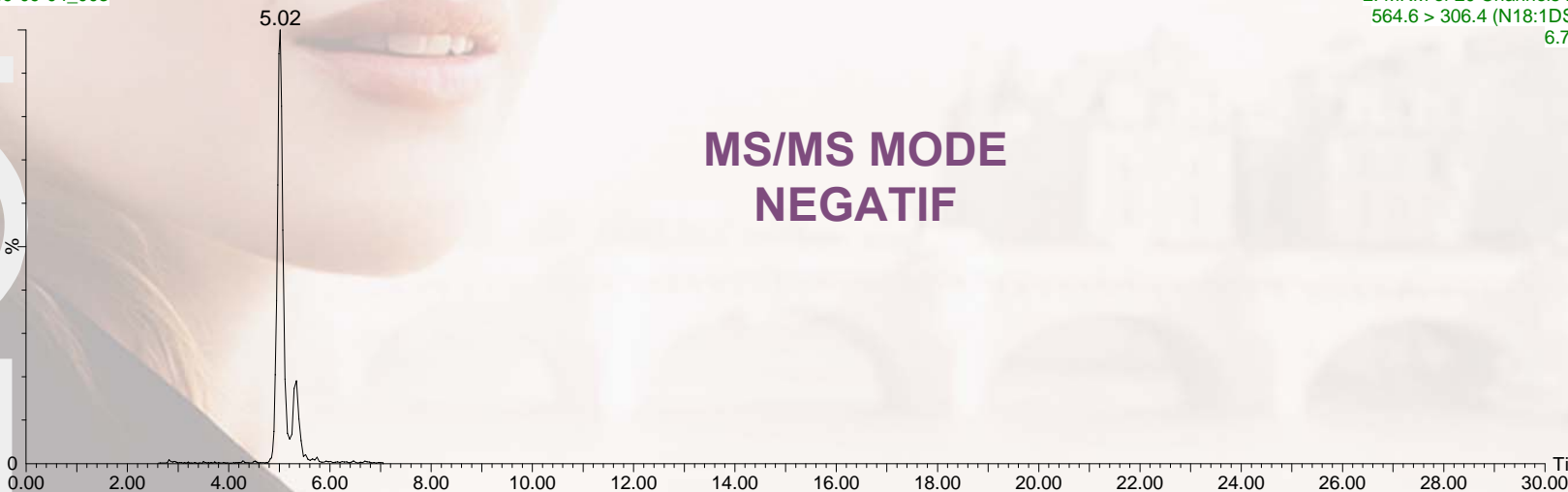
Molécule N18:1DS18
forme erythro (tr = 5.0 min)
forme thréo (tr = 5.4 min)

MS/MS MODE
POSITIF



2: MRM of 20 Channels ES+
566.6 > 284.4 (N18:1DS18)
1.71e4

2009-09-04_003



MS/MS MODE
NEGATIF

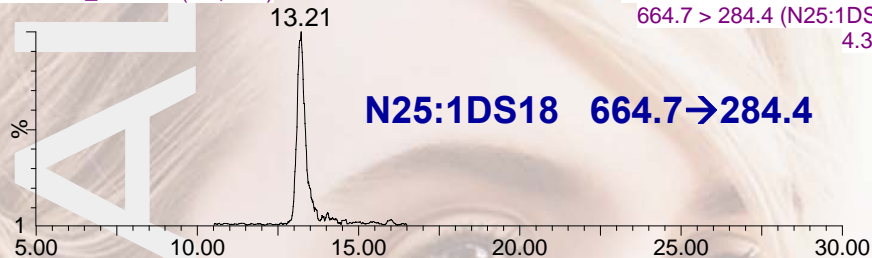
2: MRM of 20 Channels ES-
564.6 > 306.4 (N18:1DS18)
6.77e4

Exemples d'ions suivis dans une analyse (3/3)

Cheveux IG MRM POS

2009-09-04_004 Sm (Mn, 1x2)

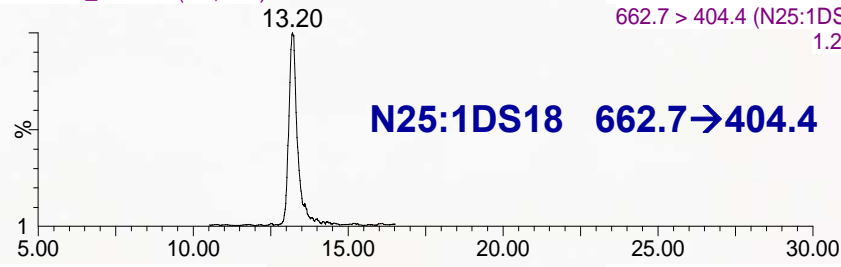
4: MRM of 12 Channels ES+
664.7 > 284.4 (N25:1DS18)
4.39e3



Cheveux IG MRM NEG

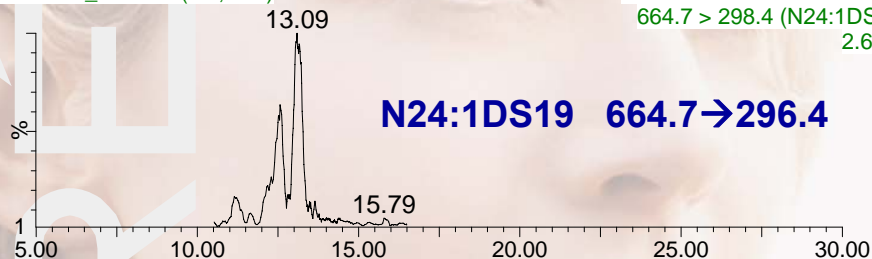
2009-09-04_003 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES-
662.7 > 404.4 (N25:1DS18)
1.21e4



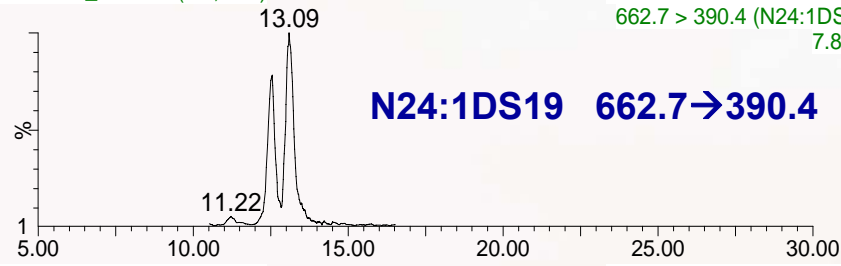
2009-09-04_004 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES+
664.7 > 298.4 (N24:1DS19)
2.62e3



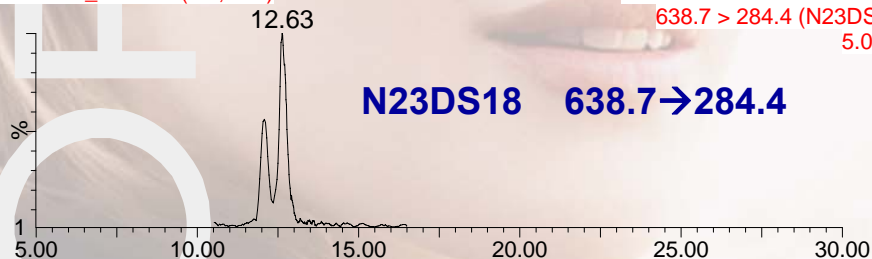
2009-09-04_003 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES-
662.7 > 390.4 (N24:1DS19)
7.81e3



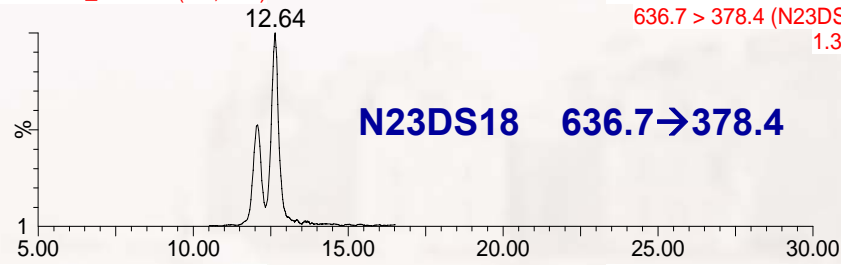
2009-09-04_004 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES+
638.7 > 284.4 (N23DS18)
5.00e3



2009-09-04_003 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES-
636.7 > 378.4 (N23DS18)
1.35e4



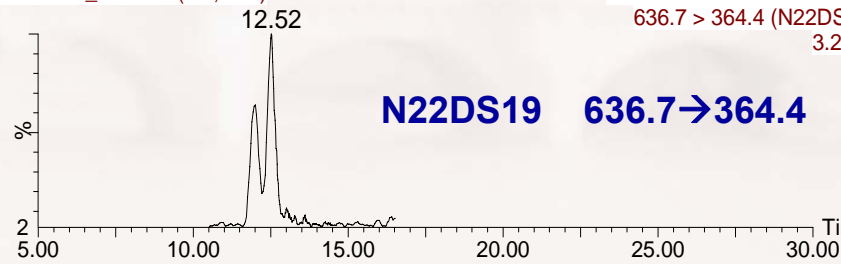
2009-09-04_004 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES+
638.7 > 298.4 (N22DS19)
1.24e3



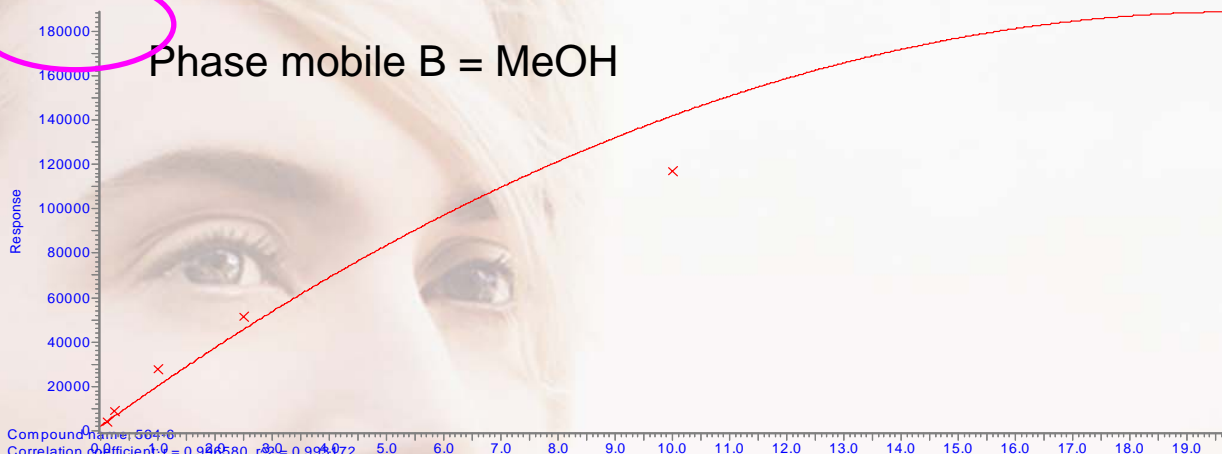
2009-09-04_003 Sm (Mn, 1x2)

4: MRM of 12 Channels ES-
636.7 > 364.4 (N22DS19)
3.29e3

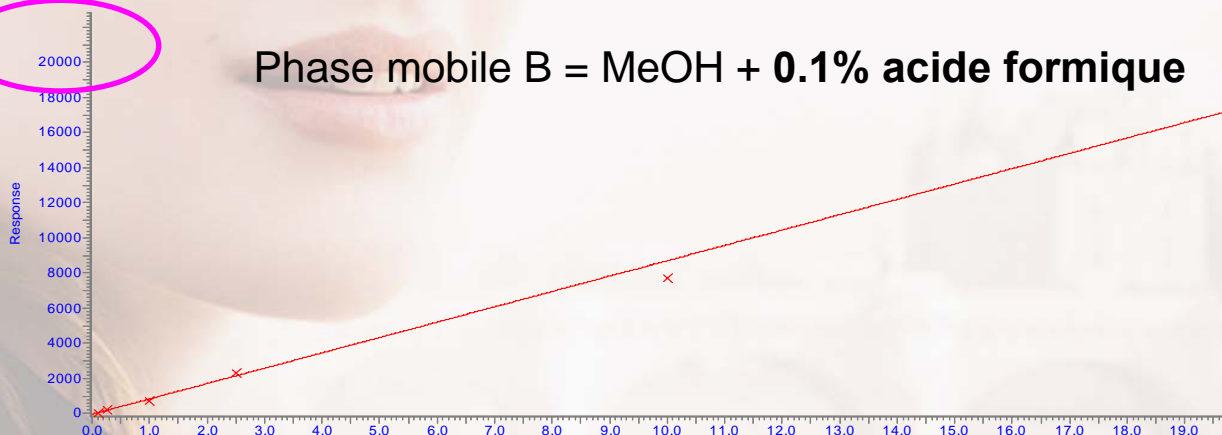


Linéarité de la méthode (1/2)

Compound name: 564-6
 Coefficient of Determination: $R^2 = 0.953475$
 Calibration curve: $-464.41 * x^2 + 18620.2 * x + 2034.52$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: 2nd Order, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: 504-0
 Correlation coefficient: $r = 0.998580$, $R^2 = 0.997072$
 Calibration curve: $874.029 * x + -40.7337$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

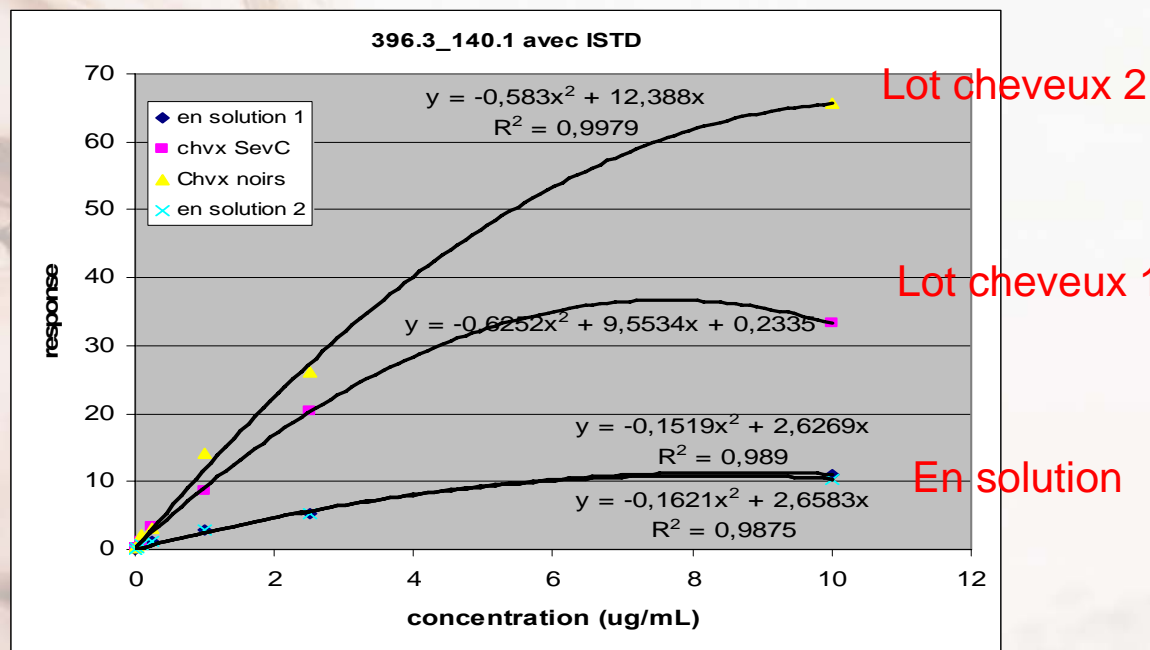


- Linéarité avec acide = OK

MAIS - Perte de sensibilité d'un facteur 10 au moins

Linéarité de la méthode (2/2)

Dans des extraits de cheveux (surcharge de standard de céramides avant extraction cheveux)



BILAN : Calibrations en solution et/ou en matrice cheveux => non linéarité de la réponse

- Sensibilité MS/MS = OK
- Linéarité = NON !
- Effet matrice important

Bilan

Quantification compromise dans notre cas :

Solutions envisageables:

- 1- Retravailler l'extraction des céramides afin de réduire l'effet matrice**
- 2- Retravailler les conditions analytiques afin d'obtenir une linéarité de réponse + sensibilité de réponse satisfaisantes**
- 3- quantification relative**

→ Solution choisie = QUANTIFICATION RELATIVE (%)

Données de validation de la méthode

Détermination du % relatif moyen des 86 céramides pour chaque échantillon :

Répétabilité (n=7) : 7 prélèvements différents d'un même lot de cheveux (trois lots testés, deux présentés ci-dessous)

Prélèvement sur tête : IG		Lot cheveux : chat 212	
Min CV (%)	1,3	Min CV (%)	1,4
Max CV (%)	23	Max CV (%)	19,8
n=4 dont CV > 15%		n=6 dont CV > 15%	

Pour « molécules » dont CV > 15%, le % relatif de ces céramides \leq 0.5 %

CONCLUSION et Perspectives

■ Conclusion :

Développement d'une Méthode analytique LC/MS/MS qui permet de :

- suivre 86 « céramides » en une seule analyse
- Etude des céramidogrammes du cheveu selon traitements cosmétiques, selon ethnies...
- De rechercher d'autres familles telles que phytosphingosines, α -cis hydroxysphingosine

■ Perspectives.

- Confirmation et détermination des « structures isomériques ».
Spectres de fragmentation à étudier, purification des pics

Remerciements

- À l'équipe Analyse Cheveu de Clichy :
 - **Philippe Angevin et Joël Bover** : expérience sur l'analyse du céramide R.
 - **Christian Mazilier**: extraction des lipides/céramides du cheveux
 - **Marine Peron et Gérard Provot**: brainstorming
- À toute l'équipe Chimie Réactive de Clichy :

Pour le soutien moral durant la longue période « c'est pas linéaire, il est où le problème ? Le spectro doit avoir un problème.... »

Merci de votre attention

