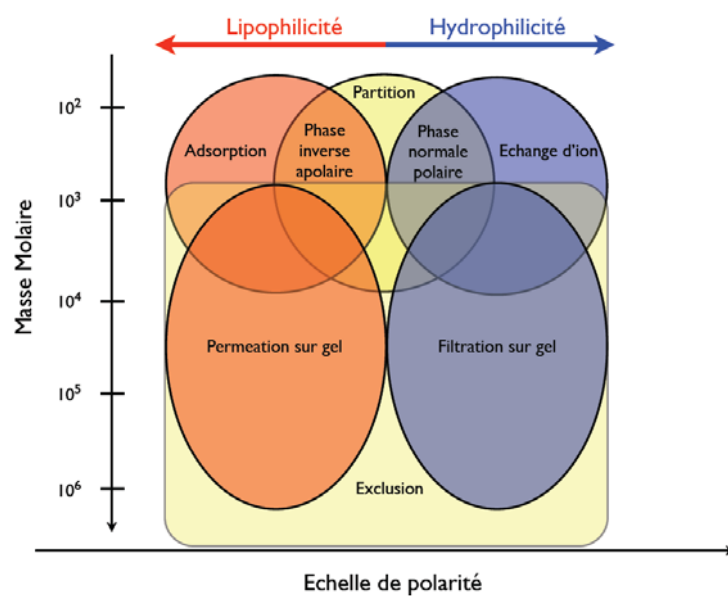


# Le couplage chromatographique

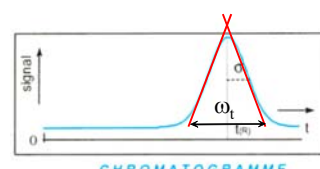
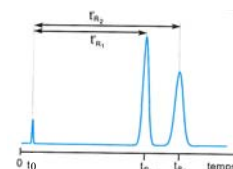
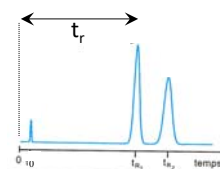
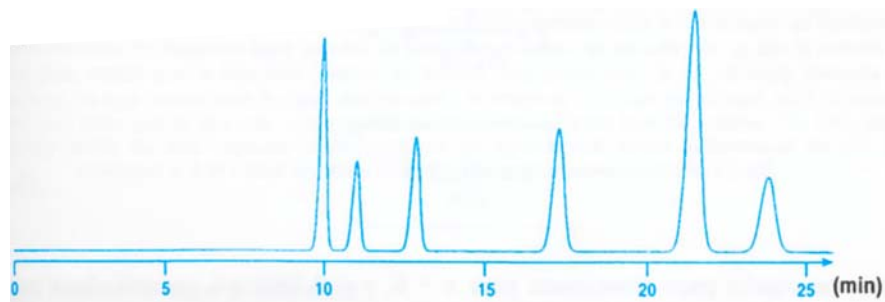
UV, DAD, MS, MS<sup>n</sup>

Professeur Eric MARCHIONI  
 Laboratoire de Chimie Analytique des Molécules BioActives et Pharmacognosie  
 LC4 – UMR 7178 Faculté de Pharmacie  
 74, route du Rhin  
 eric.marchioni@unistra.fr  
 Tél : 03.68.85.43.26 Fax : 03.68.85.43.25



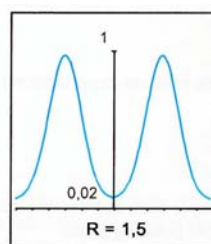
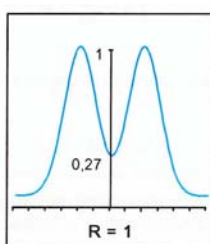
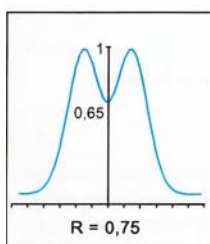
## La séparation chromatographique

- Affinité
- Résolution
- Détection



$$\omega_t = 4 \cdot \sigma \quad N = 16 \cdot \left( \frac{t_r}{\omega_t} \right)^2 \quad N = \frac{L}{h} \quad t_r = t_0 \cdot (1 + k')$$

## Résolution chromatographique



$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_2 + \omega_1}$$

Si on considère deux pics homologues proches

$$\frac{\omega_2 + \omega_1}{2} \approx \omega_1$$

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$$

## Résolution chromatographique

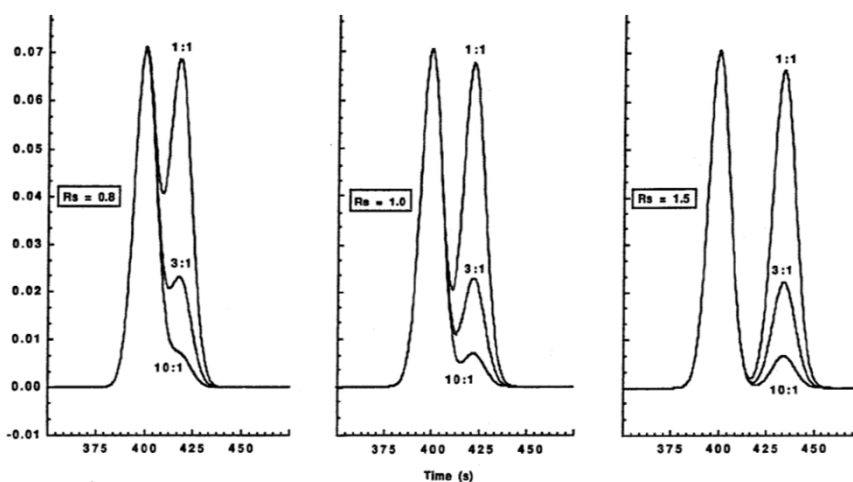


Figure 2.5 Effect of relative concentration on the separation of two components at three values of resolution ( $R_s$ ). The curves were simulated using equations (2.4), (2.24) and (2.22) and the following parameters: (a)  $R_s = 0.8$ ;  $N = 5000$ ;  $k'_1 = 3$ ;  $t_0 = 100$  s;  $t_{r,2} = t_{r,1} + 3.2\sigma_1$ ; (b)  $R_s = 1.0$ ;  $N = 5000$ ;  $k'_1 = 3$ ;  $t_0 = 100$  s;  $t_{r,2} = t_{r,1} + 4.0\sigma_1$ ; (c)  $R_s = 1.5$ ;  $N = 5000$ ;  $k'_1 = 3$ ;  $t_0 = 100$  s;  $t_{r,2} = t_{r,1} + 6.0\sigma_1$ .

## QUE FAIRE QUAND LES PICS SONT MAL RESOLUS ?

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$$

1°) on augmente N (**efficacité**)

2°) on augmente k' (**capacité**)

3°) on augmente  $\alpha$  (**sélectivité**)

7

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$$

## On augmente N

- En allongeant la colonne
  - la perte de charge augmente
  - le temps de rétention augmente
  - Les pics s'élargissent
- Et puis ça coûte cher !!!

8

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$$

## On augmente N

- En réduisant la taille du grain la perte de charge ( $\Delta P$ ) augmente

$$\Delta P = \eta \cdot L \cdot Vitesse \cdot \phi$$

$\eta$ : Viscosité de la phase mobile  
 $L$ : Longueur de la colonne  
 $d_p^2$ : Diamètre du grain  
 $Vitesse$ : Vitesse de la phase mobile  
 $\phi$ : Forme des grains, Répartition granulométrique, Texture, Qualité du remplissage

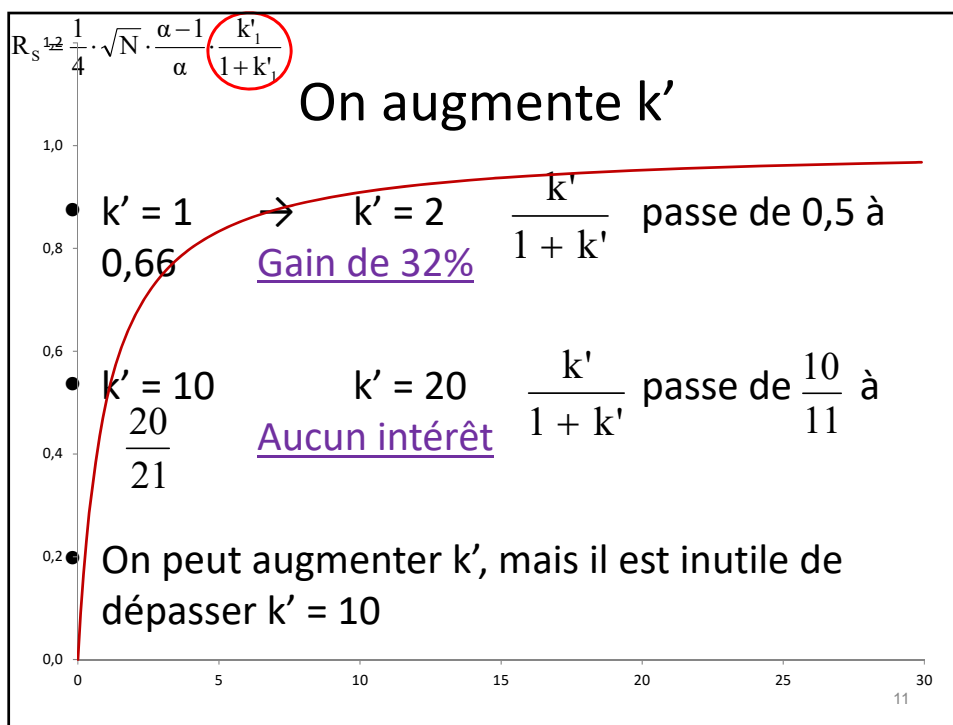
$\phi=500$  particules poreuses sphériques  
 $\phi=1000$  particules poreuses irrégulières

Loi de Darcy

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$$

## On augmente N

- En améliorant la qualité de la phase stationnaire**
  - Si on réduit le rayon du grain d'un facteur **10**
  - $V = 4/3 \cdot \pi \cdot R^3$  avec  $R_1 = 10 \cdot R_2$
  - Donc  $V_1 = 1000 \cdot V_2$  On peut donc mettre **1000** fois plus de grains dans la colonne.
  - $S = 4 \cdot \pi \cdot R^2$  avec  $R_1 = 10 \cdot R_2$
  - Donc  $S_1 = 100 \cdot S_2$  La surface d'un grain est **100** fois plus petite.
  - On met 1000 fois plus de grains de surface 100 fois plus faible.
  - On gagne un facteur 10**
  - Si on réduit le diamètre d'un facteur 2, on gagne un facteur 4**

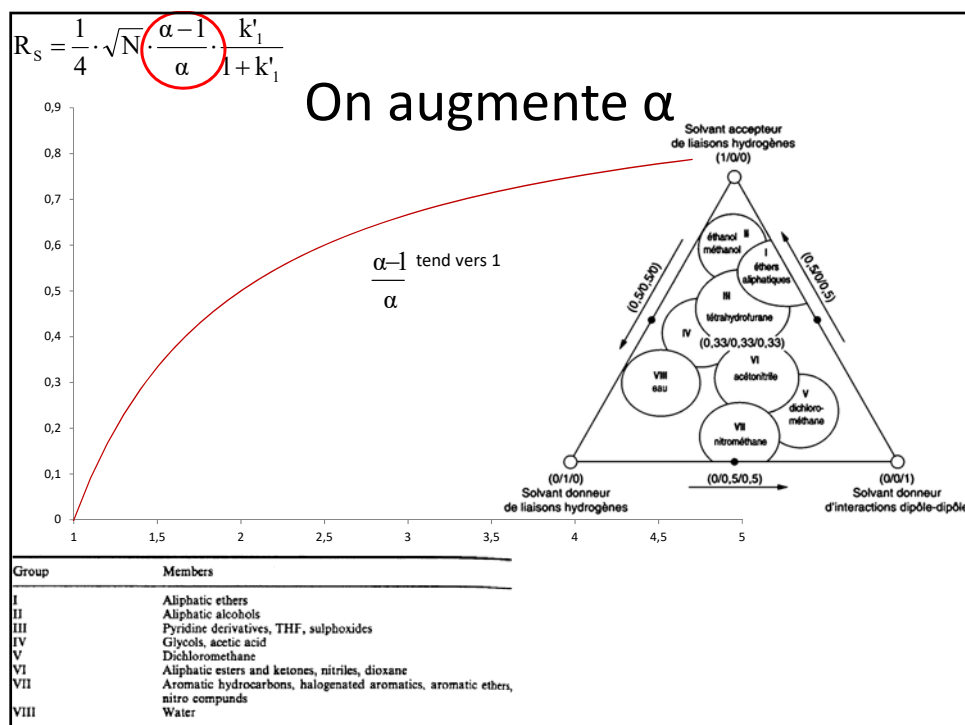


$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$

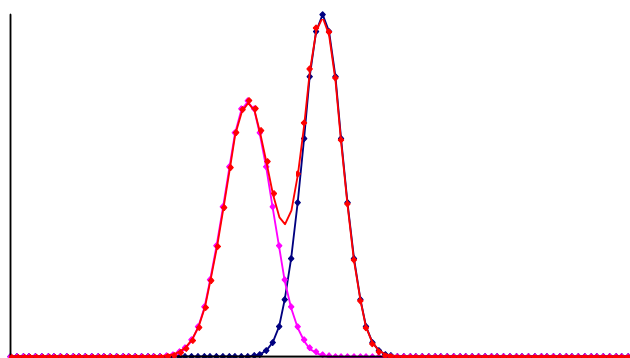
### On augmente $k'$

- Pour augmenter  $k'$  on modifie la polarité de la phase mobile
  - Si la phase stationnaire est apolaire, un composé apolaire voit son affinité pour la phase stationnaire augmenter si la polarité de la phase mobile augmente
  - C'est l'inverse pour les composés polaires
- $k'$  augmente, les pics sont retardés, mieux séparés **mais** il peut subsister un chevauchement car les pics s'élargissent quand ils restent plus longtemps dans la colonne

12



## Méthode « informatique »



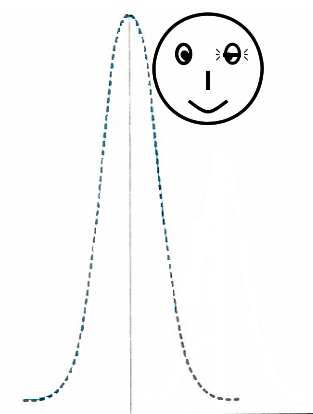
14

## Travail sur la détection

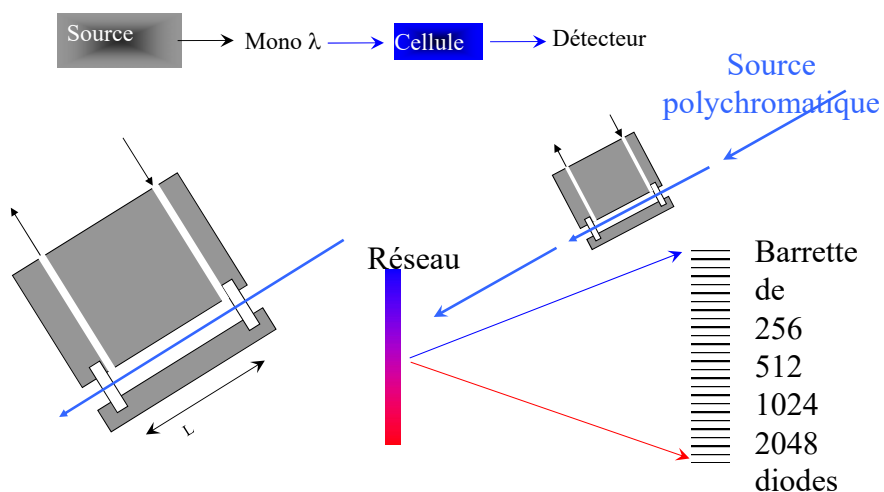
Amélioration de la sélectivité de détection (pour supprimer des pics interférents)

– Détecteurs sélectifs

- MS et MS/MS
- Fluorescence
- NPD, ECD, etc...



## Détection UV-visible

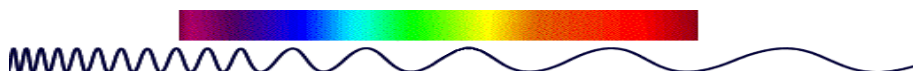


16



## Identification spectrale des composés

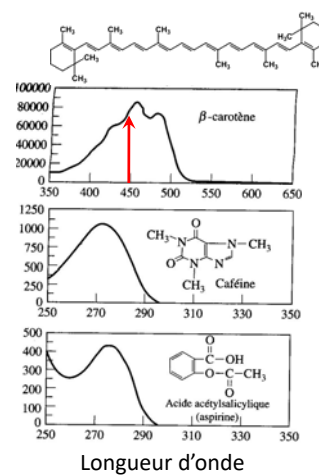
### Détection UV-visible



- Spectres de bande, très larges

Une détection à 450 nm permet

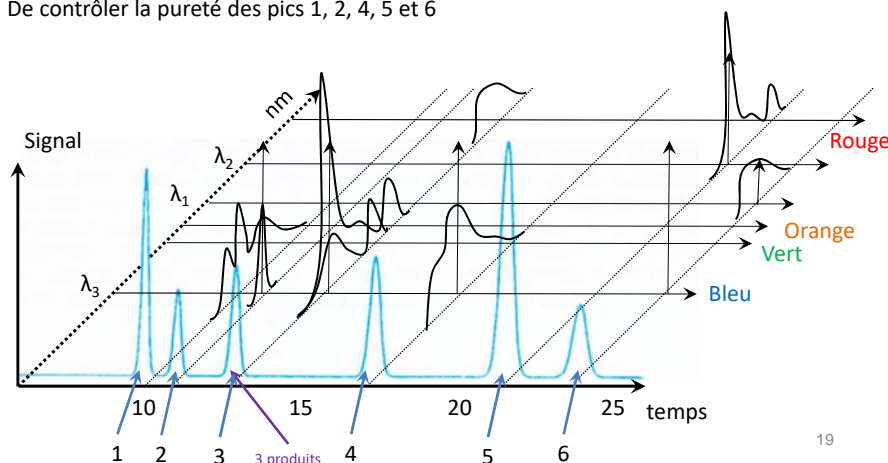
1. de voir le  $\beta$ -carotène
2. de ne pas subir d'interférence avec
  - La caféine
  - l'acide acétylsalicylique



## Le couplage CL-DAD

Le détecteur DAD permet :

1. De voir que le pic 3 est impur
2. De doser indépendamment les trois composés contenus dans le pic 3
3. De contrôler la pureté des pics 1, 2, 4, 5 et 6



19

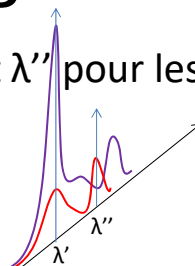
## Le couplage CL-DAD

Mélange de deux produits **X** et **Y**

On mesure l'absorbance à  $\lambda'$  et  $\lambda''$  pour lesquelles les  $\epsilon$  sont différents

$$A' = \epsilon'_X \cdot L \cdot [X] + \epsilon'_Y \cdot L \cdot [Y]$$

$$A'' = \epsilon''_X \cdot L \cdot [X] + \epsilon''_Y \cdot L \cdot [Y]$$



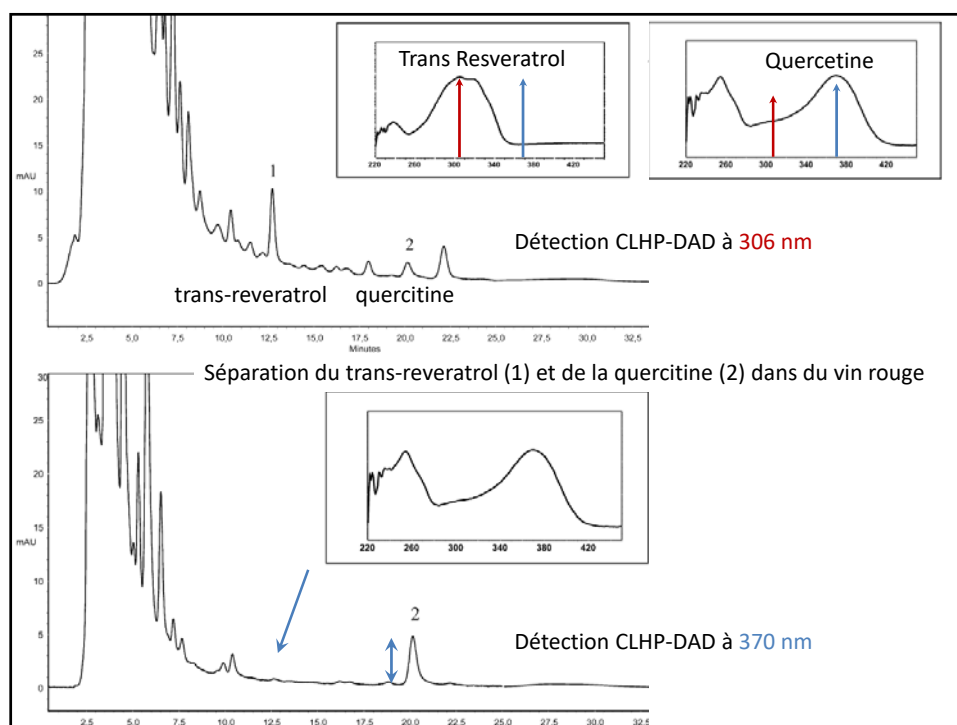
**[X]** et **[Y]** peuvent être calculées par les déterminants de la matrice

$$[X] = \frac{A' \cdot \epsilon''_Y - A'' \cdot \epsilon'_Y}{(\epsilon''_Y \cdot \epsilon'_X - \epsilon'_Y \cdot \epsilon''_X) \cdot L}$$

$$[Y] = \frac{A'' \cdot \epsilon'_X - A' \cdot \epsilon''_X}{(\epsilon''_Y \cdot \epsilon'_X - \epsilon'_Y \cdot \epsilon''_X) \cdot L}$$

*Si le mélange contient  $n$  constituants, on obtient un système à  $n$  équations et  $n$  inconnues*

## Augmentation de la sensibilité de détection

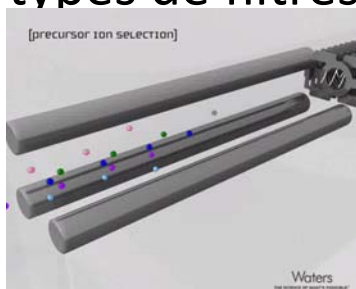


## Augmentation de la sélectivité de détection

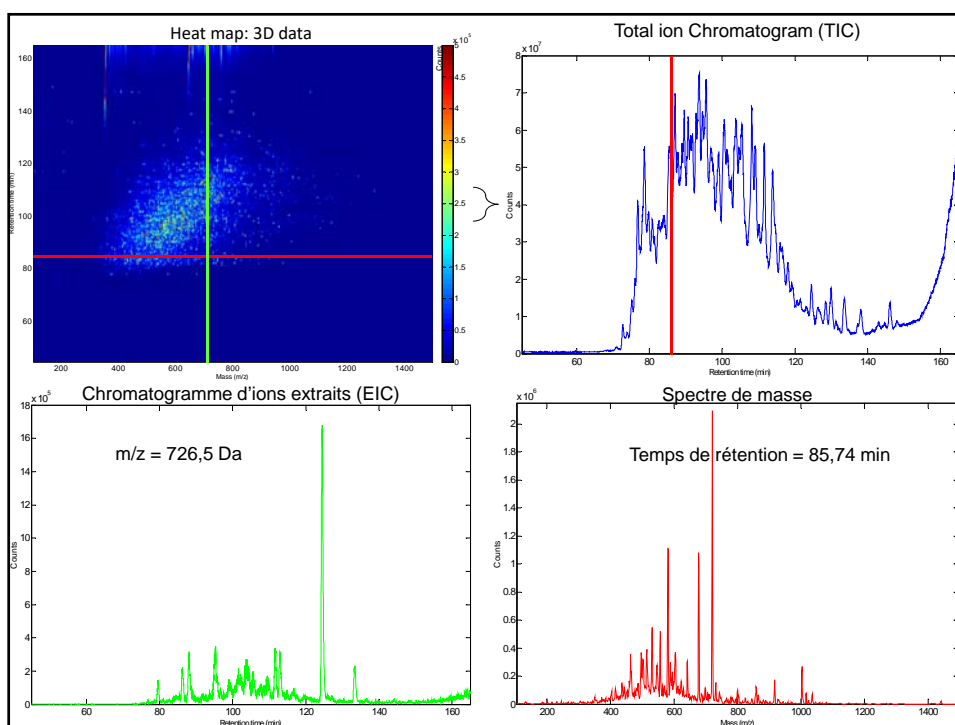
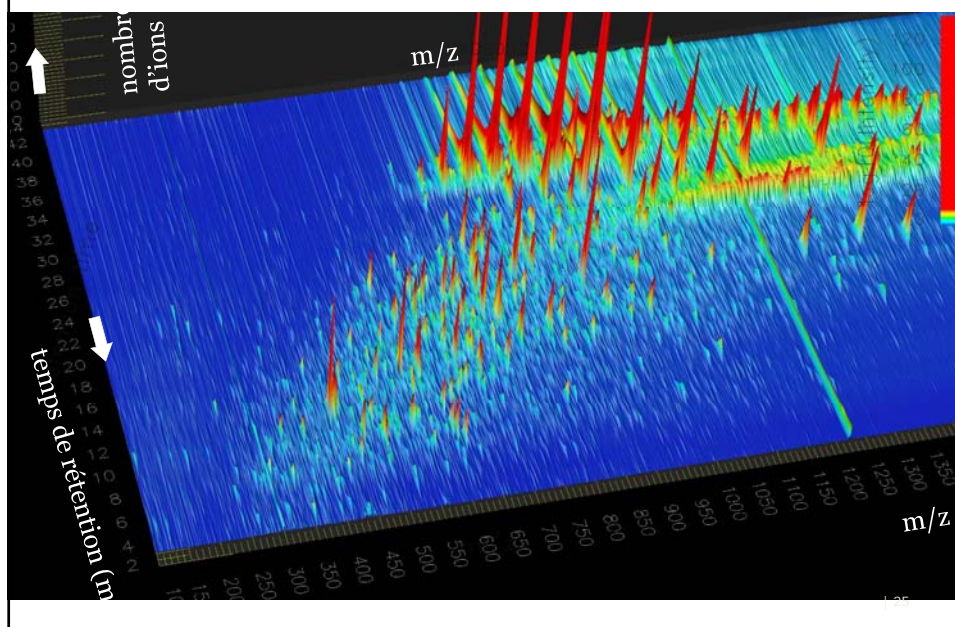
Le couplage à une détection par spectrométrie de masse

### Différents types de filtres de masse

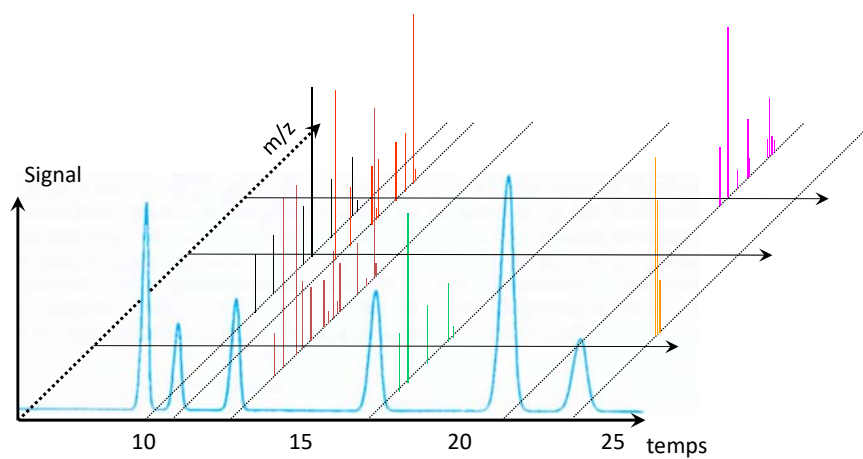
- Magnétique
- Quadripôle
- Piège à ions
- Temps de vol
- Résonnance cyclotronique
- ....



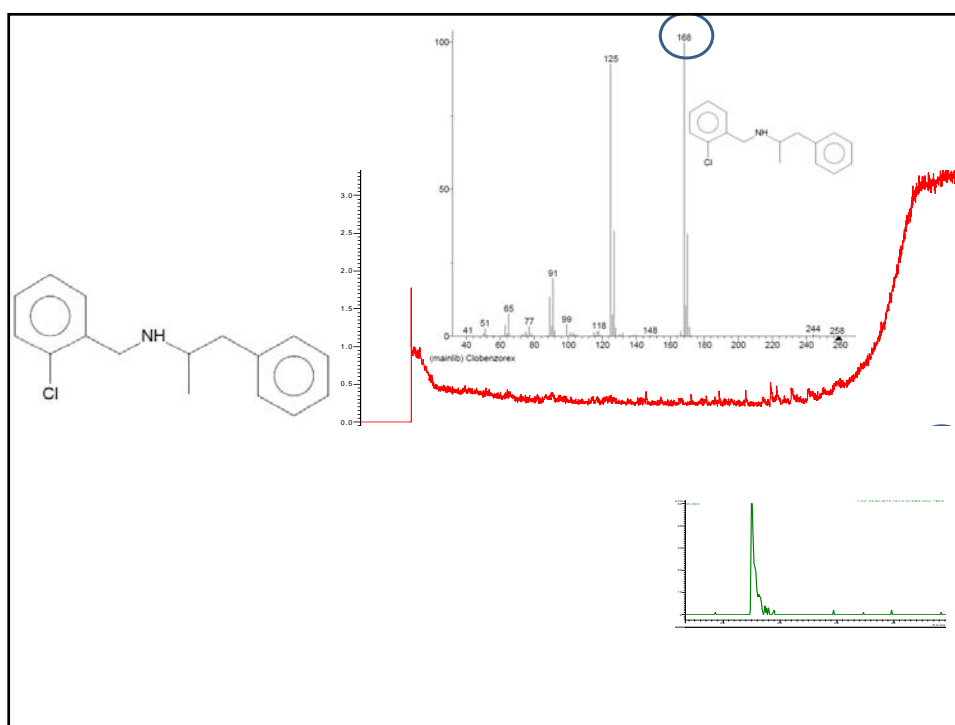
## Données LC-MS brutes

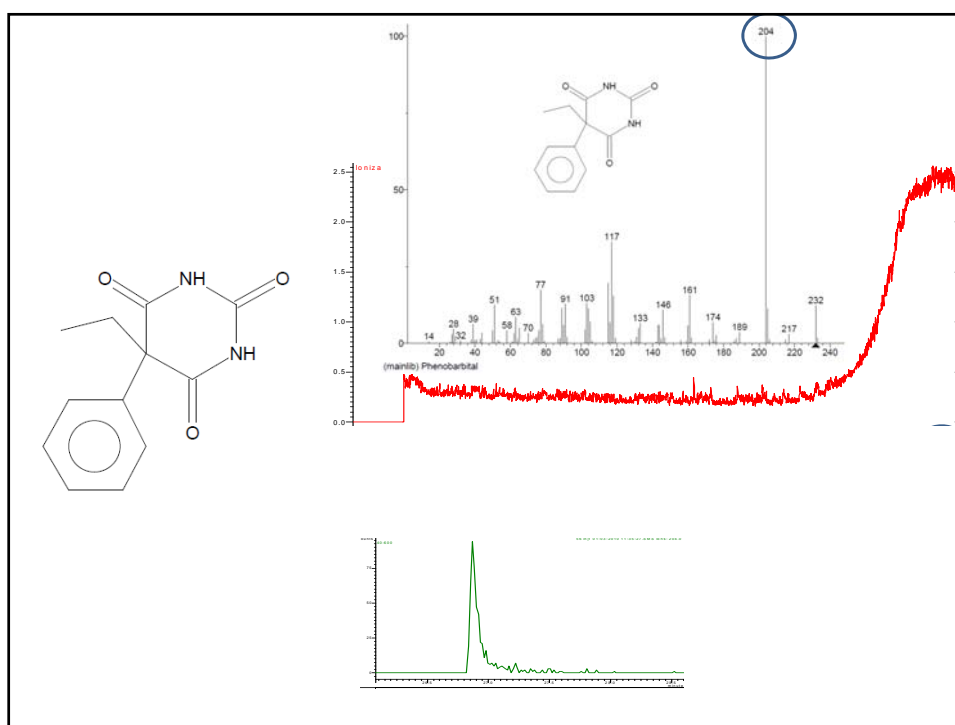
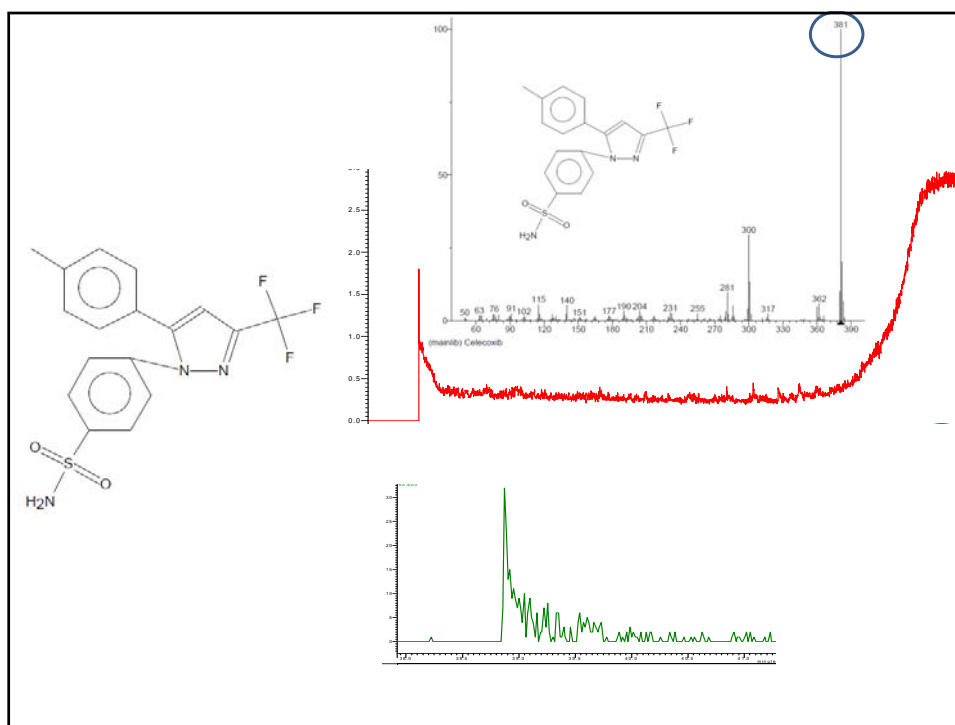


## Le couplage CL/GC-SM

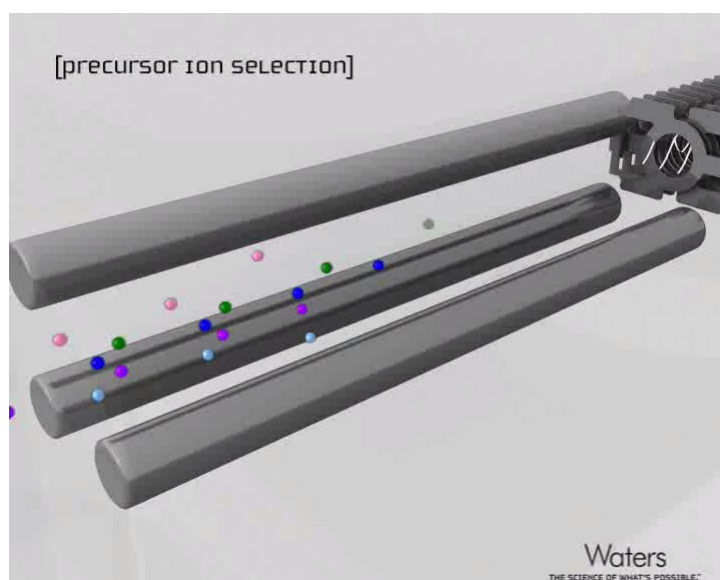
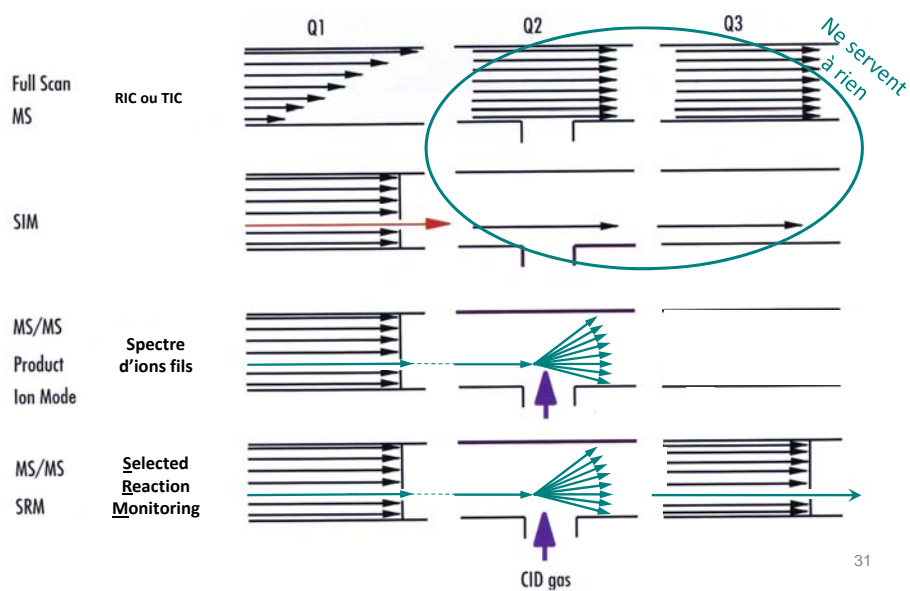


27





## Spectrometrie tandem





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 492 (2003) 253–260

ANALYTICA  
CHIMICA  
ACTA

[www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

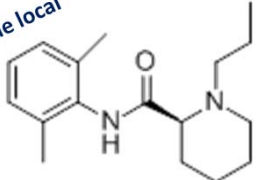
## Determination of ropivacaine and its metabolites in patient urine: Advantage of liquid chromatography–tandem mass spectrometry over liquid chromatography–UV detection and liquid chromatography–mass spectrometry

Mohamed Abdel-Rehim\*, Margareta Bielenstein, Yvonne Askemark

*AstraZeneca R&D Södertälje, DMPK and Bioanalytical Chemistry, SE-151 85 Södertälje, Sweden*

Accepted 13 May 2003

Anesthésique local



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ropivacaine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H
3-OH-ropivacaine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH
PPX	H	H
Isopropyl-PPX(IS)	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-ropivacaine	C <sub>3</sub> <sup>2</sup> H <sub>7</sub>	H

### Abstract

Analysis of urine samples from a clinical study of ropivacaine and its metabolites, 3-hydroxyropivacaine (3-OH-ropivacaine) and PPX, by an LC–UV method showed high concentrations of 3-hydroxyropivacaine, 2–50 times higher than expected. In

Hypothèse: une autre drogue (antibiotique: la Triméthoprime) a été administrée aux patients.  
Elle a :

- le même temps de rétention
- La même absorption UV (220 nm)
- Le même spectre de masse !!!

Que la 3-OH- Ropivacaine !!

