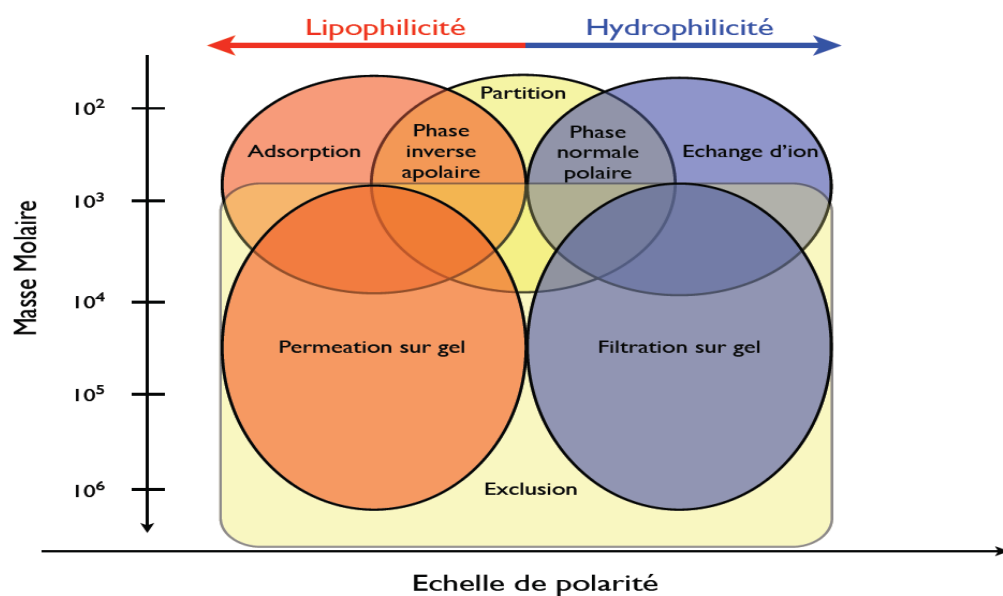


Le couplage chromatographique

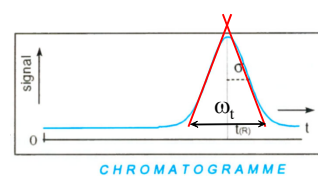
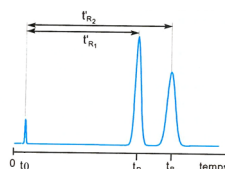
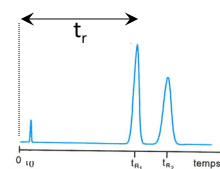
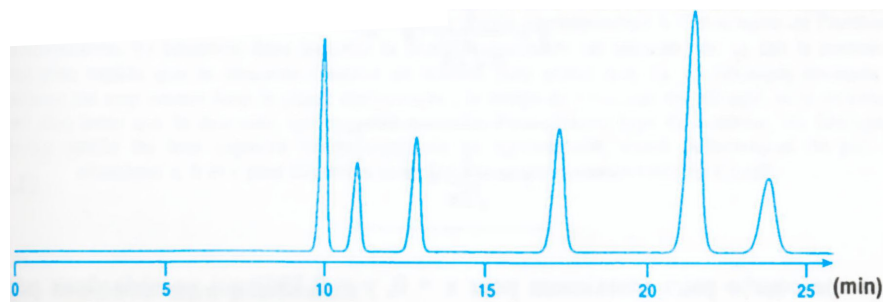
UV, DAD, MS, MSⁿ

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



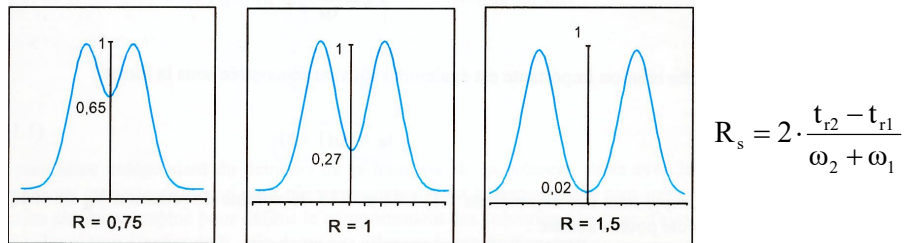
La séparation chromatographique

- Affinité
- Résolution
- Détection



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

Résolution chromatographique



Si on considère deux pics homologues proches

$$\frac{\omega_2 + \omega_1}{2} \approx \omega_1 \quad R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1 + k'_1}$$

Résolution chromatographique

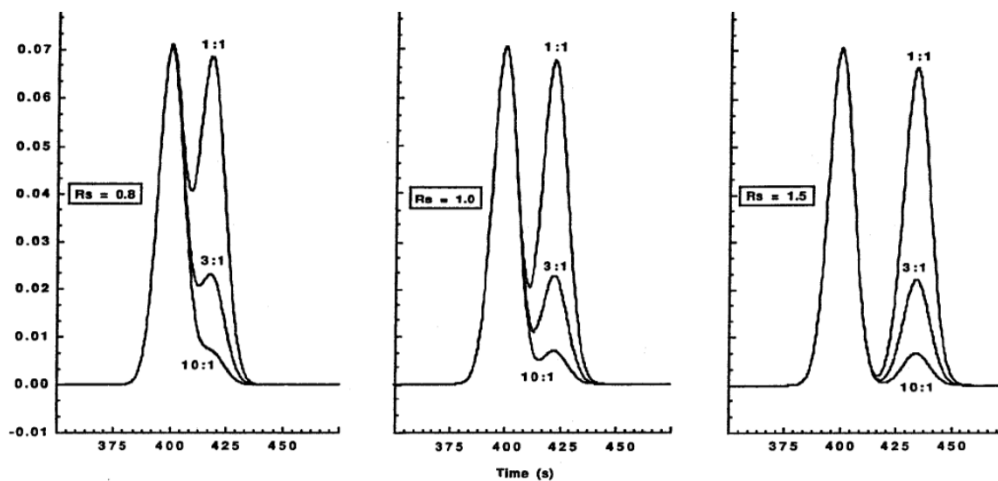


Figure 2.5 Effect of relative concentration on the separation of two components at three values of resolution (R_s). The curves were simulated using equations (2.4), (2.24) and (2.22) and the following parameters: (a) $R_s = 0.8$; $N = 5000$; $k'_1 = 3$; $t_0 = 100$ s; $t_{r,2} = t_{r,1} + 3.2\sigma_1$;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

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot Vitesse \cdot \phi}{d_p^2}$$

η : Viscosité de la phase mobile
 L : Longueur de la colonne
 d_p : Diamètre du grain
 $Vitesse$: Vitesse de la phase mobile
 ϕ : Forme des grains, Répartition granulométrique, Texture, Qualité du remplissage

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

Loi de Darcy

9

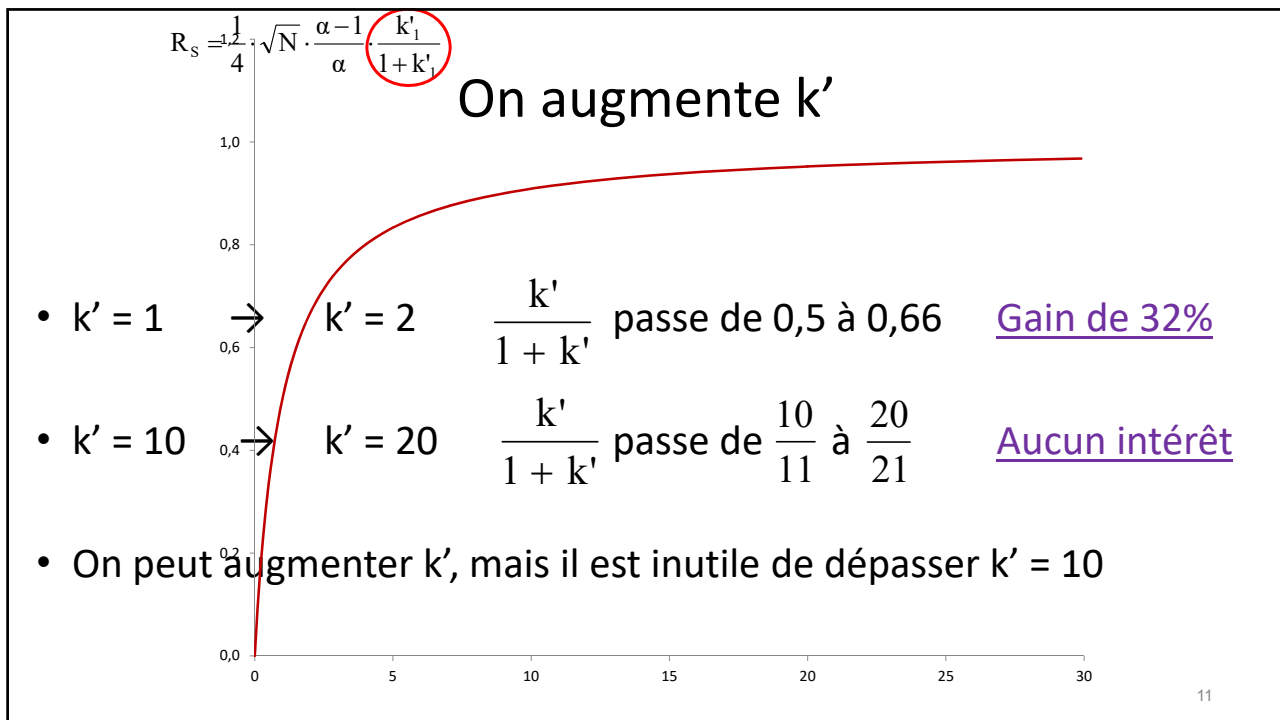
$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1+k'_1}$$

On augmente N

En améliorant la qualité de la phase stationnaire

- Si on réduit le rayon du grain d'un facteur **10**
- $V = \frac{4}{3} \pi R^3$ 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.
- $S = 4 \pi R^2$ 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**

10



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

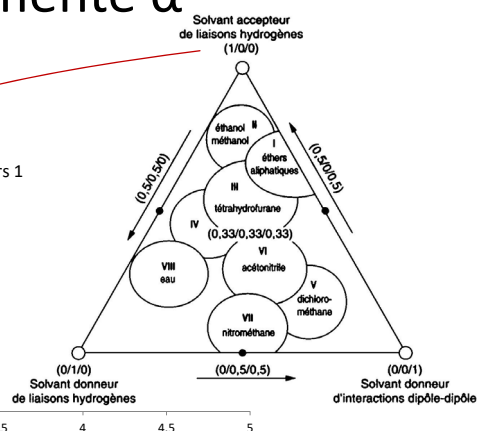
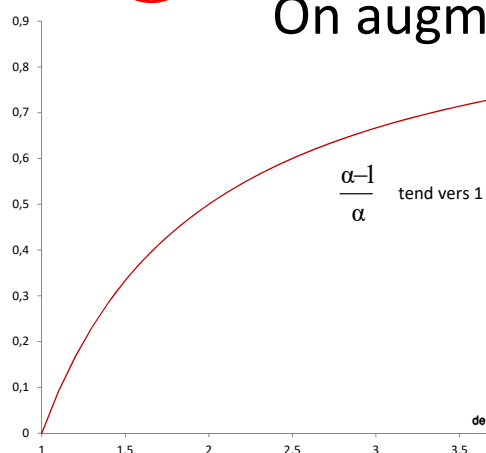
On augmente k'

- 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

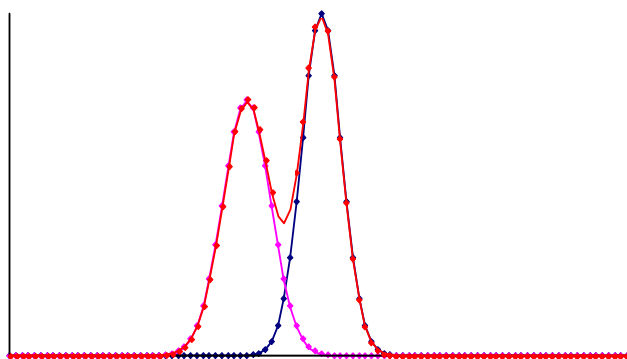
$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k'_1}{1+k'_1}$$

On augmente α



Group	Members
I	Aliphatic ethers
II	Aliphatic alcohols
III	Pyridine derivatives, THF, sulfoxides
IV	Glycols, acetic acid
V	Dichloromethane
VI	Aliphatic esters and ketones, nitriles, dioxane
VII	Aromatic hydrocarbons, halogenated aromatics, aromatic ethers, nitro compounds
VIII	Water

Méthode « informatique »

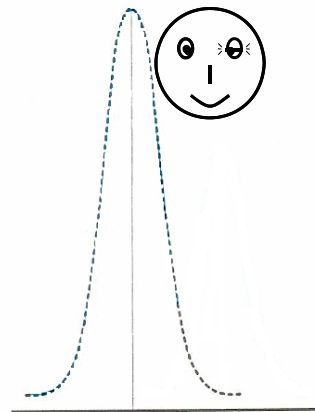


Travail sur la détection

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

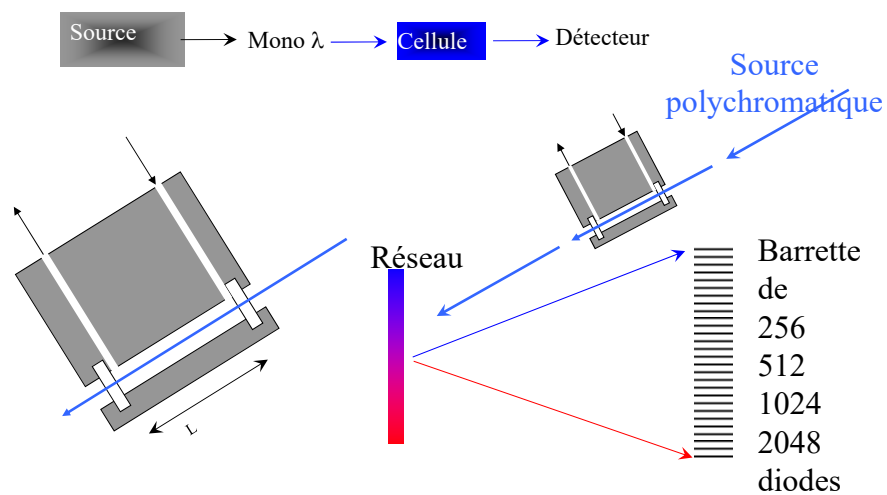
– Détecteurs sélectifs

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



15

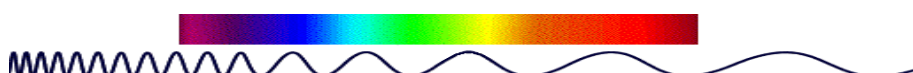
Détection UV-visible



16

Identification spectrale des composés

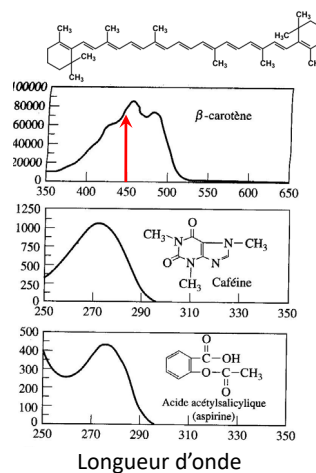
Détection UV-visible



- Spectres de bande, très larges

Une détection à 450 nm permet

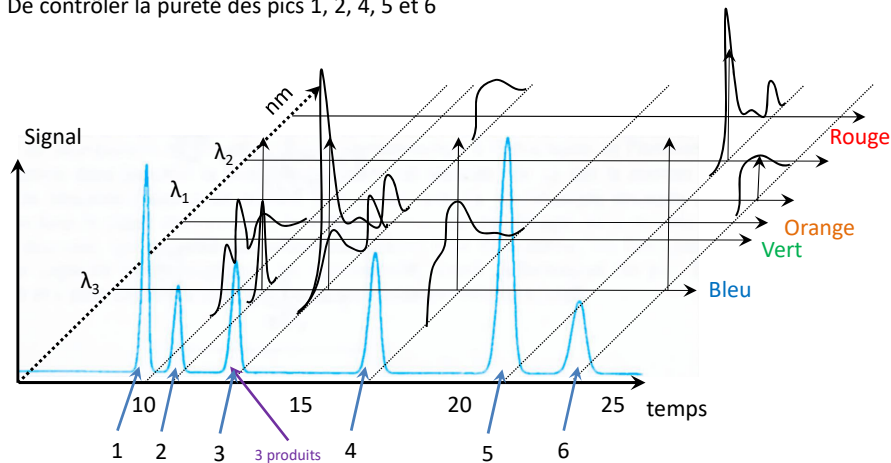
1. de voir le β -carotène
2. de ne pas subir d'interférence avec
 - La caféine
 - l'acide acétylsalicylique



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

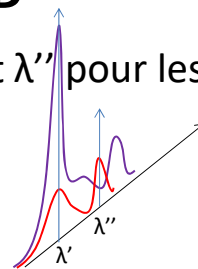
Le couplage CL-DAD

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

On mesure l'absorbance à λ' et λ'' pour lesquelles les ϵ sont différents

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

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



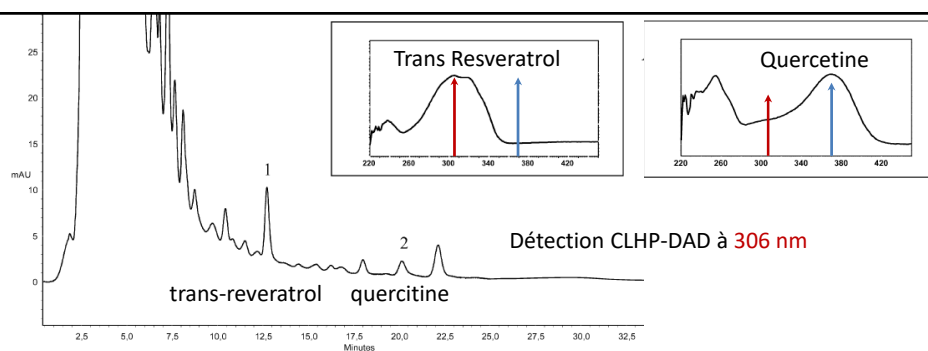
$[X]$ et $[Y]$ peuvent être calculées par les déterminants de la matrice

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

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

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

Augmentation de la sensibilité de détection



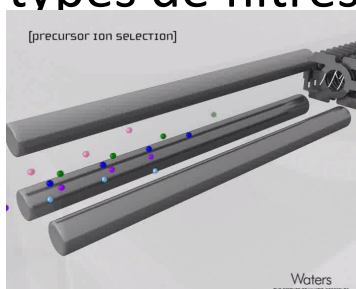
Séparation du trans-reveratrol (1) et de la quercetine (2) dans du vin rouge

Augmentation de la sélectivité de détection

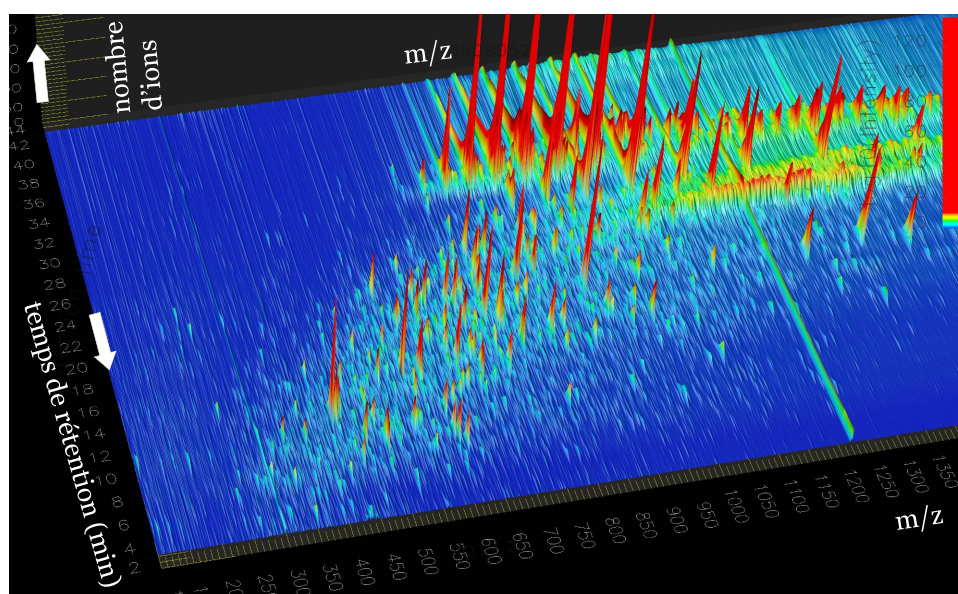
Le couplage à une détection par spectrométrie de masse

Différents types de filtres de masse

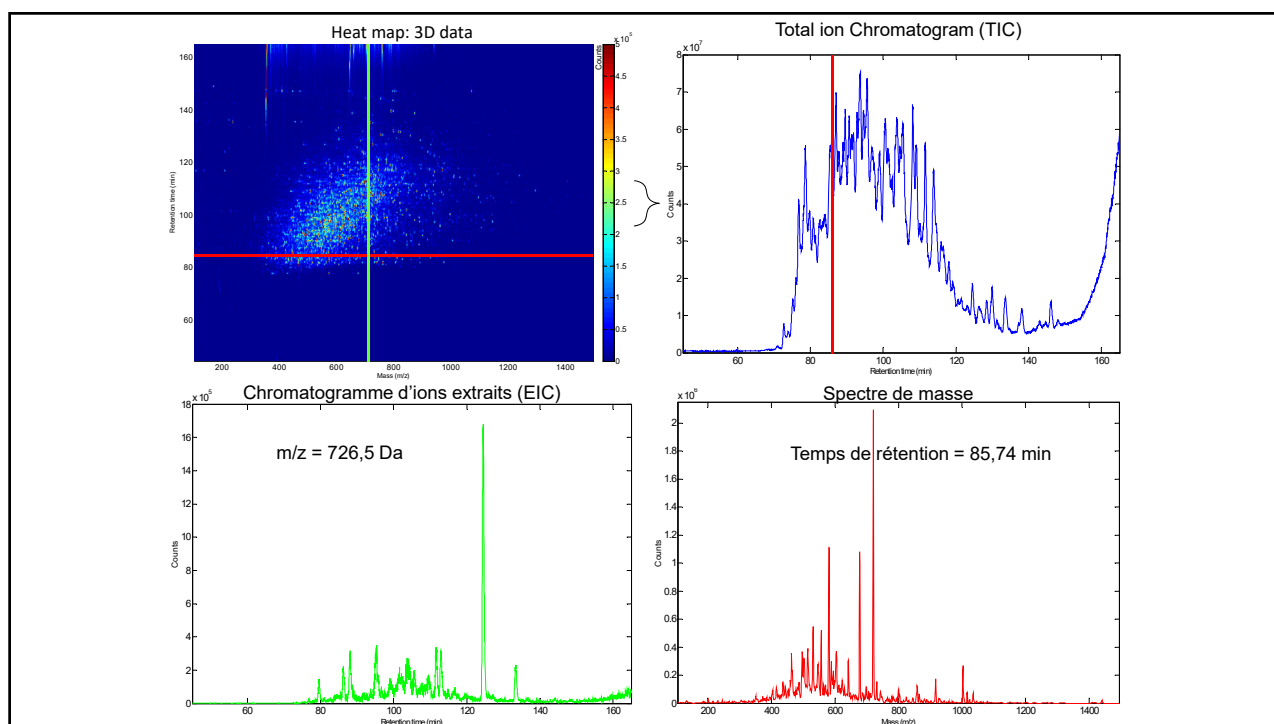
- Magnétique
- Quadripôle
- Piège à ions
- Temps de vol
- Résonance cyclotronique
-



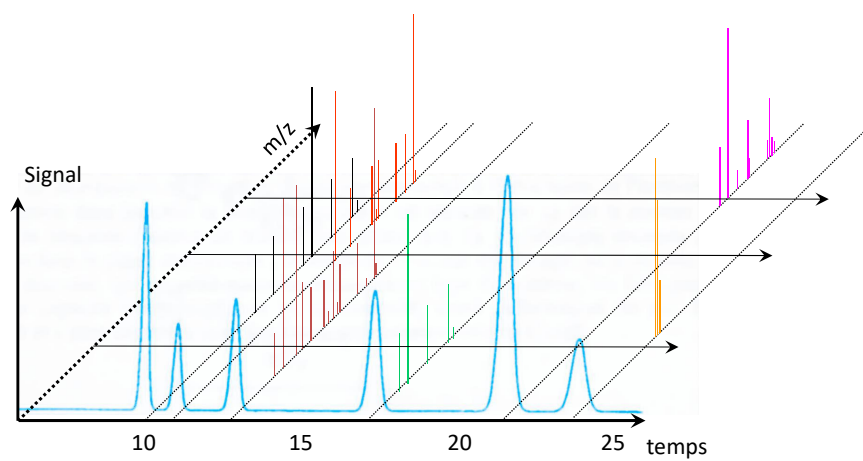
Données LC-MS brutes



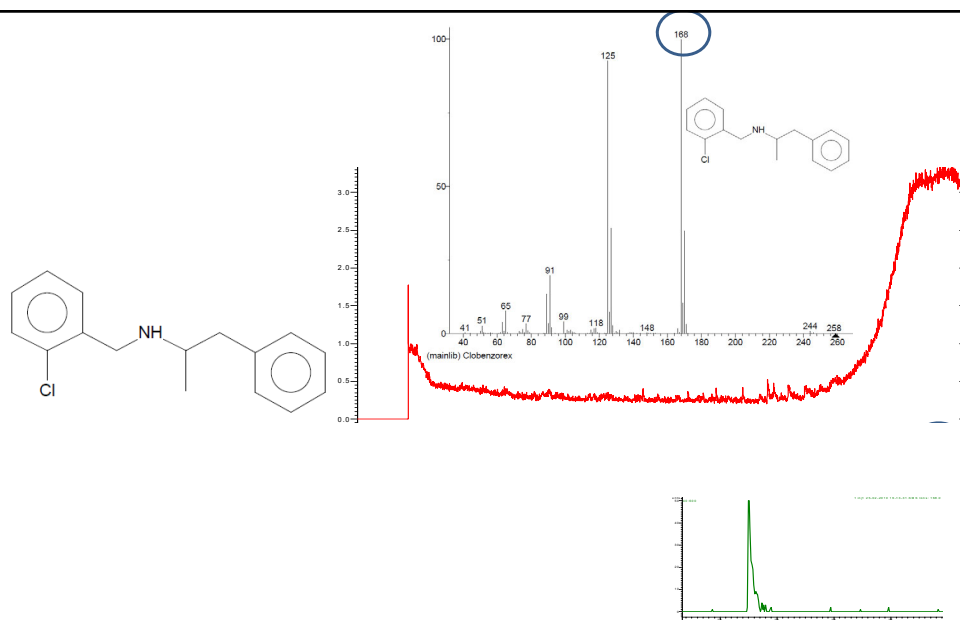
| 25

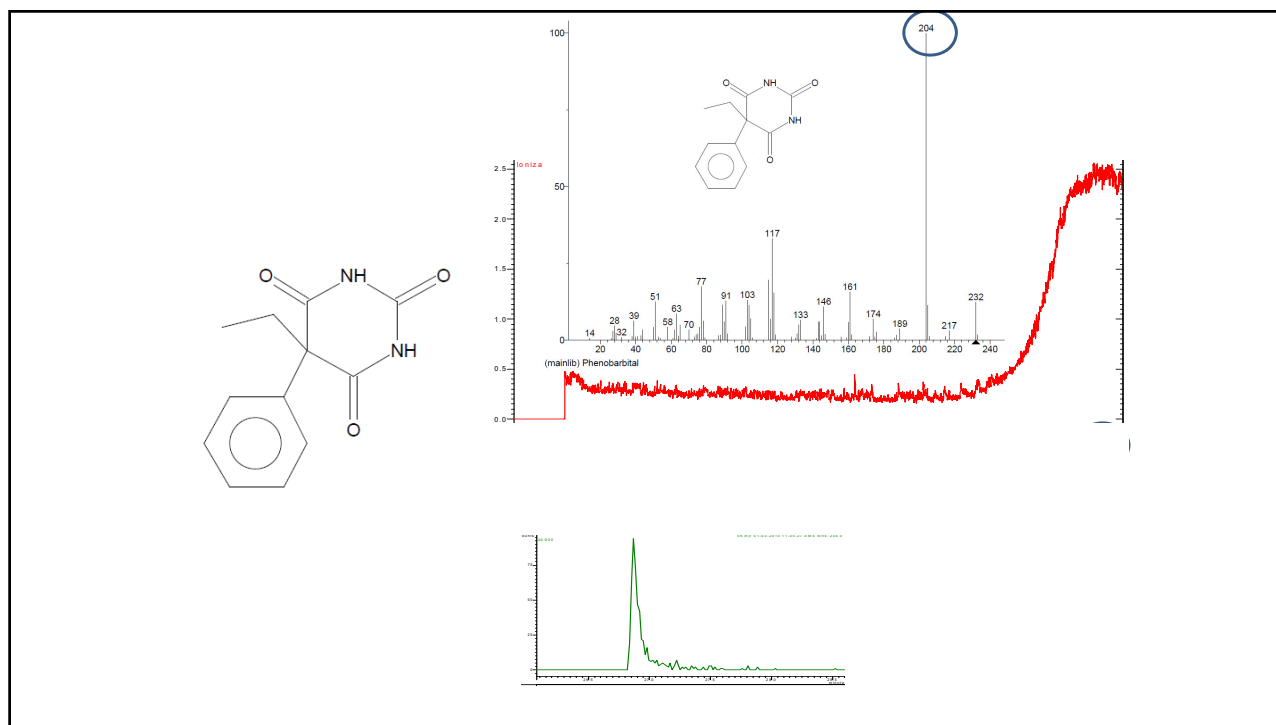
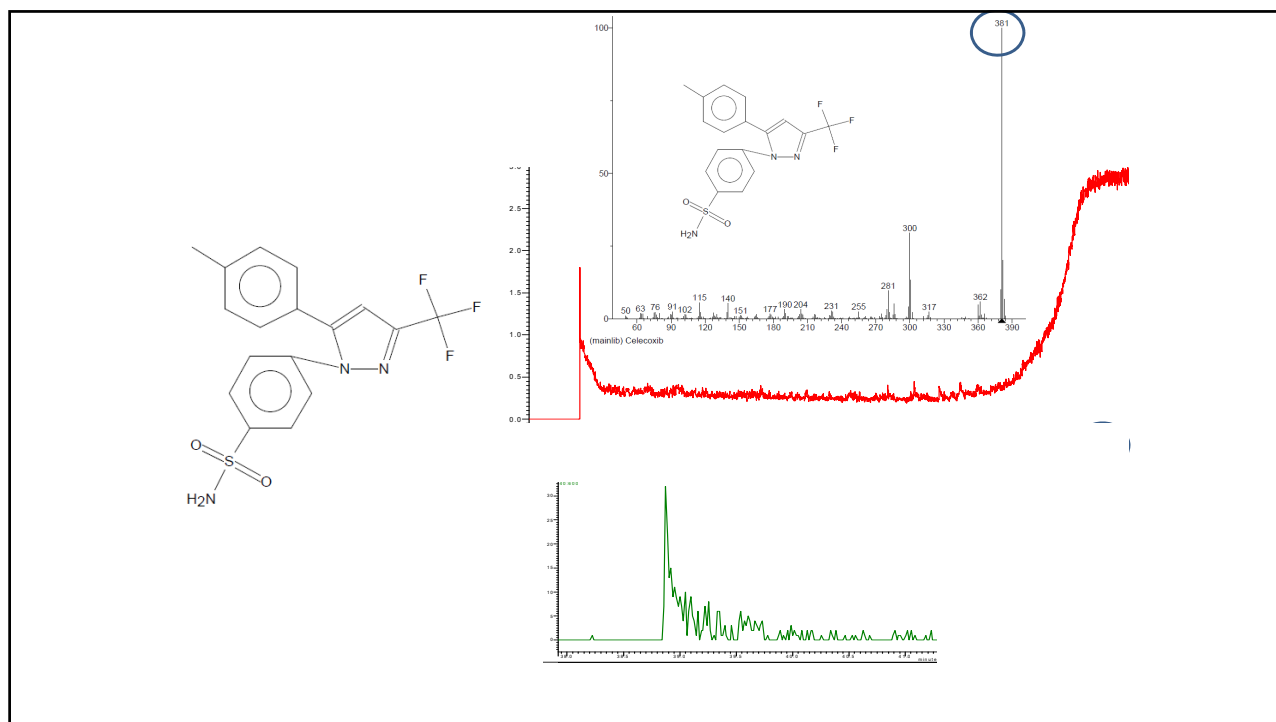


Le couplage CL/GC-SM

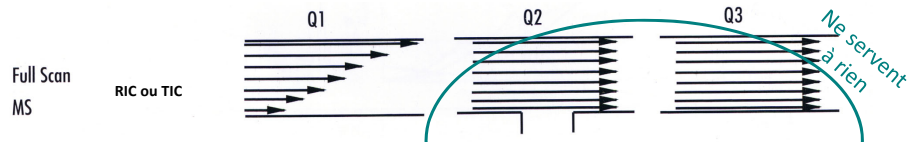


27





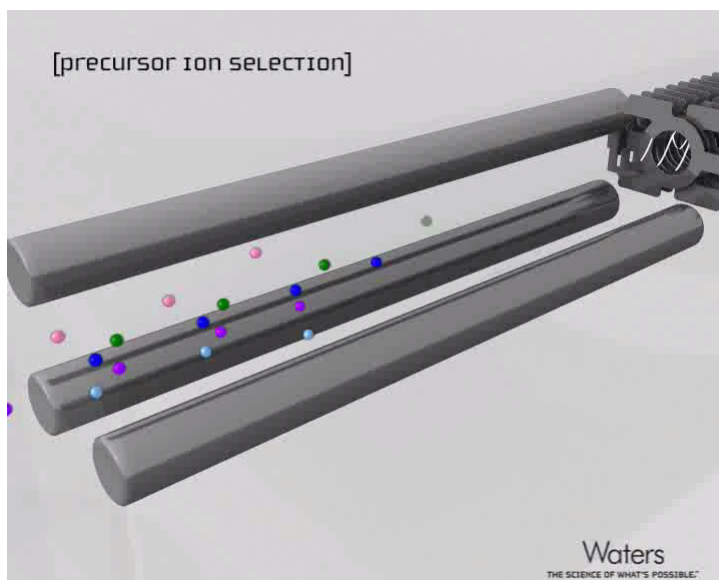
Spectrometrie tandem



31

Animation trappe

- [animation trappe.exe](#)



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Analytica Chimica Acta 492 (2003) 253–260

**ANALYTICA
CHIMICA
ACTA**

www.elsevier.com/locate/aca

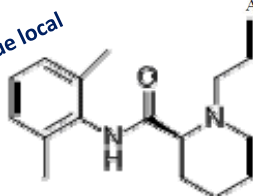
Determination of ropivacaine and its metabolites in patient urine: Advantage of liquid chromatography–tandem mass spectrometry over liquid chromatography–UV detection and liquid chromatography–mass spectrometry

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 ₁	R ₂
Ropivacaine	C ₃ H ₇	H
3-OH-ropivacaine	C ₃ H ₇	OH
PPX	H	H
Isopropyl-PPX(IS)	CH(CH ₃) ₂	H
[² H ₇]-ropivacaine	C ₃ ² H ₇	H

Abstract

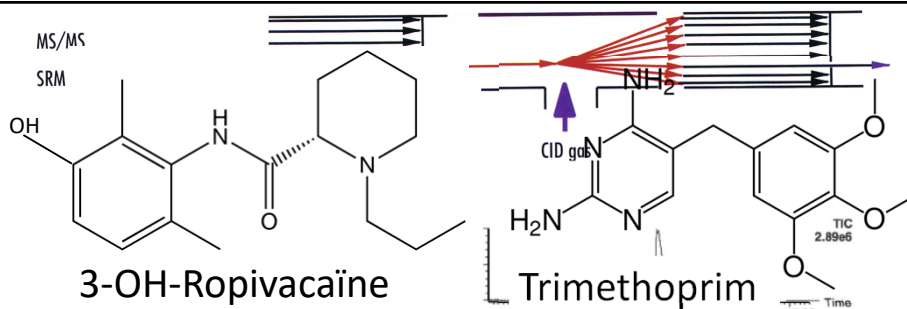
Analysis of urine samples from a clinical study of ropivacaine and its metabolites, 3-hydroxyropivacaine (3-OH-ropivacaine) and PPX, by an LC-UV method showed high concentrations of 3-hydroxyropivacaine, 2–50 times higher than expected. In

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 !!



Mass chromatogram of patient urine sample shows 3-OH-ropivacaine and trimethoprim by LC-MS-MS.

