



HAL
open science

Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés

Amélie Dechenaux d'Attoma

► **To cite this version:**

Amélie Dechenaux d'Attoma. Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10214 . tel-01056279

HAL Id: tel-01056279

<https://theses.hal.science/tel-01056279>

Submitted on 18 Aug 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 214 - 2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité chimie analytique

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 19 novembre 2013

par

Amélie D'ATTOMA (DECHENAUX)

TITRE :

Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne

LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés

Directrice de thèse : Mme Sabine HEINISCH

JURY :	M. Pierre GAREIL	Rapporteur
	M. Pascal CARDINAEL	Rapporteur
	M. Dominique SOTTY	Examineur
	M. Alain BERTHOD	Examineur
	M. Jérôme RANDON	Président du jury
	Mme Sabine HEINISCH	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse ne s'effectue pas tout seul, c'est pourquoi je souhaiterais remercier toutes les personnes suivantes.

J'aimerais remercier en premier lieu Madame Sabine Heinisch pour m'avoir encadré pendant ces trois ans de thèse, m'avoir prodigué de précieux conseils et m'avoir transmis la passion de la chromatographie et de la recherche. Merci aussi pour m'avoir convaincue de faire une thèse.

Je souhaiterais remercier Messieurs Pierre Gareil et Pascal Cardinael pour avoir consenti à rapporter ce travail. Je voudrais également remercier Messieurs Dominique Sotty et Alain Berthod pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit. Merci à Monsieur Jérôme Randon qui a accepté de faire parti de ce jury et de le présider.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe Techsep pour leur accueil et pour m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. Merci notamment à Gérard Crétier pour les bricolages de vanne et le montage du split traversant le té.

Merci aussi à tous mes collègues doctorants/post-doctorants/alternants que j'ai eu à mes côtés et en particulier : Racha, Yoann, Nazim et Thuy. Merci aussi à Amélie L., Laure, Elodie, Josiane, Audrey, Pauline, Anthony, Laurent, Joseph C., Florian.

Merci aux stagiaires Master 2 / CPE avec qui j'ai eu l'occasion de travailler sur le sujet de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail : David, Esther et Marion.

Je souhaiterais aussi remercier tous nos collaborateurs : Philippe Boniteau (Perkin Elmer), Alexandre Paccou et Marleen Van Wingerden (Waters), Tivadar Farkas (Phenomenex), Agneta Kiss (ISA), Martine Lejus (Technologie Servier).

Et pour finir, je n'oublie pas mes parents et mon conjoint Joseph qui partage le même intérêt pour la chimie que moi et qui a suivi l'avancé de mes travaux de thèse avec un œil de chimiste organicien.

TITRE en français : Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés

RESUME en français :

Ce manuscrit expose le développement de méthodes bidimensionnelles en ligne pour l'analyse de composés chargés en couplage avec la spectrométrie de masse. Le contexte de l'étude et les principes théoriques de la chromatographie en phase liquide unidimensionnelle et bidimensionnelle sont tout d'abord présentés. Les conditions expérimentales telles que l'instrumentation, les colonnes, les composés étudiés sont détaillés. Des études unidimensionnelles ont été effectuées afin de connaître le comportement cinétique des petites molécules ionisables et des peptides selon la phase mobile et la température. L'orthogonalité de systèmes chromatographiques et les capacités de pics générées ont ensuite été étudiées afin de connaître les conditions expérimentales les plus intéressantes pour l'analyse des composés chargés. Les comparaisons de systèmes ont été effectuées avec de nouveaux descripteurs d'orthogonalité et de capacité de pic effective qui ont été établis. Les systèmes bidimensionnels LCxLC ont ensuite été mis en place. L'utilité d'un split pour réduire le volume injecté en seconde dimension est envisagée. Des limites en termes de volume injecté dans la seconde dimension ont été définies en RPLC et en HILIC. Des mélanges de peptides ont été séparés par RPLCxRPLC(-MS), RPLCxHILIC(-MS) et HILICxRPLC. Le couplage avec la spectrométrie de masse est optimisé. L'intérêt des séparations bidimensionnelles est mis en évidence par rapport à des séparations LC-MS classiques.

TITRE en anglais : Development of two-dimensional liquid chromatography LCxLC-MS methods for the analysis of charged compounds

RESUME en anglais :

This manuscript is dedicated to the development of on-line two-dimensional liquid chromatography for the analysis of charged compounds with mass spectrometry coupling. The context of the study and the theoretical principles of liquid chromatography in one or two dimensions are presented. Experimental conditions such as instrumentation, columns, studied compounds are detailed. Some one-dimensional studies have been experimented to know the kinetic behaviour of small ionisable molecules and peptides depending on conditions. The orthogonality of chromatographic system and generated peak capacity have then been studied in order to know which experimental conditions are the most interesting for the analysis of charged compounds. The comparisons of systems have been done with new descriptor for orthogonality and effective peak capacity. Two-dimensional systems were then set up. Some limits in term of injected volume in the second dimension have been established in RPLC and in HILIC. The usefulness of a split to reduce the injected volume in second dimension has been studied. Some peptides mixtures have been separated by RPLCxRPLC(-MS), RPLCxHILIC(-MS) and HILICxRPLC. The MS coupling has been optimized. The interest of two dimensional separations is underlined compared to classical LC-MS separations.

DISCIPLINE : Chimie analytique

MOTS-CLES : Peptides, composés pharmaceutiques, chromatographie, RPLC, HILIC, spectrométrie de masse, séparations bidimensionnelles.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : Institut des sciences analytiques (ISA). 5 rue de la doua. 69100 Villeurbanne (France)

GLOSSAIRE

AA	Acétate d'ammonium
AF	Formate d'ammonium
AMO	Ammoniac
As	Asymétrie du pic
b	Pente de gradient dans la relation de Snyder « gradient steepness »
C _e	Composition en solvant organique du gradient à l'élution
C _i	Composition initiale en solvant organique du gradient
C _f	Composition finale en solvant organique du gradient
D1	Première dimension
D2	Seconde dimension
d _i	Diamètre interne de la colonne
D _m	Coefficient de diffusion
dp	Diamètre des particules
ε _t	Porosité totale de la colonne
η	Viscosité de la phase mobile
F	Débit
f	Facteur de dilution
FA	Acide formique
G	Facteur de compression en gradient
γ	Facteur d'occupation de l'espace 2D
h	Hauteur réduite équivalente à un plateau théorique de colonne
h _{opt}	Hauteur réduite optimale équivalente à un plateau théorique de colonne
HILIC	Chromatographie en phase liquide à interaction hydrophile
HTLC	Système chromatographique atteignant de très hautes températures
k	Facteur de rétention
k ₀	Facteur de rétention dans le solvant le plus faible
K ₀	Perméabilité de la colonne
k _e	Facteur de rétention à l'élution
λ	Volume injecté en pourcentage du volume mort de la colonne
L	Longueur de la colonne
log P	Coefficient de partage octanol/eau
M	Masse moléculaire
MS	Spectrométrie de masse
MW	Masse molaire
N	Nombre de plateaux
n _{2D} [*]	Capacité de pic effective en 2D
n _c	Capacité de pic
v	Vitesse linéaire réduite
O _d	Degré d'orthogonalité
ΔC _{e2} [*]	Gamme de composition pratique en seconde dimension
ΔP	Perte de charge
ΔP _{ext}	Perte de charge extra colonne
pct	Temps de comptage pour un ion « pulse counting time »
pI	Point isoélectrique
pKa	Constante d'acidité
R ²	Coefficient de détermination
RPLC	Chromatographie en phase liquide à polarité des phases inversées

σ^2	Dispersion totale
σ_{col}^2	Dispersion colonne
σ_{ext}^2	Dispersion extra-colonne
σ_{split}^2	Dispersion liée au split
σ_t	Ecart type du pic en temps
σ_v	Ecart type du pic en volume
s	Pente normalisée de gradient
S	Pente pour la relation LSS
s^2	Différence de sélectivité
SIM	Acquisition du suivi d'un ion « single ion monitoring »
spm	Nombre de mesures autour d'une masse unitaire « sample per mass »
T	Température
τ	Taux d'échantillonnage en D1
t_0	Temps mort de la colonne
t_1	Temps de rétention du composé le moins retenu
t_2	Temps de cycle de seconde dimension
t_D	Temps de délai
TFA	Acide trifluoroacétique
t_G	Temps de gradient
t_n	Temps de rétention du composé le plus retenu
TOF	Spectromètre de masse à temps de vol « time of flight »
t_R	Temps de rétention
u	Vitesse linéaire de la phase mobile
UHPLC	Système chromatographique atteignant de très hautes pressions
V_0	Volume mort de la colonne
V_i	Volume injecté
$w_{10\%}$	Largeur à 10% de la hauteur du pic
w	Largeur du pic à 4σ
z	Rapport de split

Les indices 1 et 2 sont utilisés pour préciser s'il s'agit d'une grandeur de première ou seconde dimension.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : CONTEXTE ET PRINCIPES THEORIQUES.....	3
INTRODUCTION	5
A- VERS LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE	6
I- Les composés ionisables	6
1. Interactions secondaires	6
2. Effet de surcharge.....	6
II- Limites de la chromatographie unidimensionnelle	7
1. Capacité de pic	7
2. Répartition statistique des pics	9
III- Les possibilités en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle	10
1. Mode hors ligne.....	10
2. Mode en ligne.....	11
3. Mode à débit stoppé	11
4. Comparaison des modes.....	11
B- LE PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE EN LIGNE TOTALE (LCxLC).....	13
I- Fonctionnement et instrumentation	13
II- Les critères à considérer en LCxLC.....	14
III- Exemples d'analyses LCxLC de composés chargés.....	15
C- ORTHOGONALITE ET CAPACITE DE PIC.....	17
I- Orthogonalité des systèmes	18
1. Méthode statistique	18
2. Méthodes géométriques.....	19
II- Capacité de pics en 2D.....	20
1. Capacité de pic théorique	20
2. Capacité de pic pratique	21
3. Capacité de pic effective	21
D- CHOIX STRATEGIQUES	22
I- Chromatographie ultra-rapide	22
1. UHPLC et petites particules	25
2. Particules de type core-shell.....	25
3. HTLC (High temperature Liquid chromatography).....	27
II- Mode RPLC	28
III- Mode HILIC.....	29
E- DIFFICULTES DE LA MISE EN PLACE D'ANALYSES BIDIMENSIONNELLES	30

<i>I- Les effets à l'injection</i>	31
1. Effets liés à une différence de viscosité	31
2. Effets liés à une différence de force éluante	31
<i>II- Dimensionnement des analyses bidimensionnelles</i>	34
<i>III- Couplage à la spectrométrie de masse</i>	35
1. Systèmes LC-MS traditionnels.....	36
2. Compatibilité de débit de phase mobile	36
3. Contribution de la MS à la dispersion externe	36
4. Fréquence d'acquisition en spectrométrie de masse	37
<i>IV- Traitement des données</i>	38
1. Alignement des pics	39
2. Affectation des pics de seconde dimension.....	39
3. Correction du bruit de fond	39
4. Représentation des données	40
CONCLUSIONS.....	41
REFERENCES	42

CHAPITRE 2 : CONDITIONS EXPERIMENTALES..... 49

INTRODUCTION	51
A- APPAREILLAGE	52
<i>I- Appareillage en LC-1D</i>	52
1. Acquity UPLC (Waters).....	52
2. Alliance (Waters)	52
3. Four Polaratherm Series 9000 (Selerity)	53
4. LC Packings ultimate (Dionex).....	53
5. Flexar FX-10 (PerkinElmer)	53
6. I-Class (Waters).....	53
<i>II- Systèmes bidimensionnels</i>	54
1. Système 1	54
2. Système 2	55
3. Système 3	55
<i>III- Comparaison des interfaces utilisées</i>	56
1. Les montages	56
2. Le système de pilotage	57
3. Le traitement des données	58
<i>IV- Spectromètres de masse</i>	59
1. SQ 300 MS	59
2. Micro Q-TOF	60
<i>V- Caractérisation des systèmes</i>	60
1. Volume de délai et limites en débit des systèmes de pompes	60
2. Effets extra colonne des systèmes : valeurs, variances, pression.....	61
3. Test des interfaces	63

B- PHASES STATIONNAIRES	64
I- Phases HILIC	65
II- Phases RPLC.....	65
C- PHASES MOBILES.....	66
D- COMPOSES D'INTERET	67
I- Composés tests des systèmes chromatographiques	67
II- Petites molécules ionisables.....	67
1. Mélange pour l'étude d'orthogonalité.....	67
2. Composés pharmaceutiques pour une analyse LCxLC-MS.....	68
3. Autres mélanges	68
III- Peptides.....	68
1. Composés standards	68
2. Peptides issus de digestion tryptique de protéines	69
IV- Mélanges de composés pharmaceutiques	70
1. Premier projet.....	70
2. Deuxième projet	70
E- PARAMETRES CHROMATOGRAPHIQUES.....	70
I- Conditions gradient	70
II- Informations issues des chromatogrammes	71
REFERENCES	72

CHAPITRE 3 : ETUDE DES EFFETS CINETIQUES EN RPLC ET EN HILIC 73

INTRODUCTION	75
A- COMPARAISON DE COURBES DE VAN DEEMTER POUR LES COMPOSES NEUTRES .	76
I- En RPLC.....	76
II- En HILIC.....	77
III- Comparaison des modes RPLC et HILIC.....	78
B- COMPARAISON DE COURBES DE VAN DEEMTER EN RPLC POUR LES COMPOSES CHARGES	78
Article 1 : “Effect of pH additive and column temperature on kinetic performance of two different sub-2 μ m stationary phases for ultrafast separation of charged analytes”	79
C- COMPARAISON DE COURBES DE VAN DEEMTER EN HILIC POUR LES COMPOSES CHARGES.....	92
I- Effet de la température	92
II- Comparaison avec la RPLC.....	95
D- TEMPS D'EQUILIBRAGE EN GRADIENT EN HILIC.....	96
CONCLUSIONS.....	101
REFERENCES	102

CHAPITRE 4 : ORTHOGONALITE ET CAPACITE DE PICS..... 103

INTRODUCTION	105
<i>Article 2 : “On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations”</i>	<i>106</i>
CONCLUSIONS.....	118
RÉFÉRENCES	119

CHAPITRE 5 : DEVELOPPEMENT D'ANALYSES BIDIMENSIONNELLES ET APPLICATION A LA SEPARATION DE PEPTIDES 121

INTRODUCTION	123
A- DIMENSIONNEMENT DES ANALYSES LCXLC ET TRAITEMENT DES DONNEES	124
<i>I- Equations fondamentales.....</i>	<i>124</i>
<i>II- Etude de l'impact de différents paramètres sur la qualité d'un split.....</i>	<i>127</i>
1. Comparaison des tés commerciaux	128
2. Optimisation des paramètres du split	131
<i>III- Performances obtenues avec l'utilisation d'un split entre D1 et D2 pour la séparation de peptides.....</i>	<i>133</i>
1. Conditions opératoires.....	134
2. Effet du volume injecté sur la capacité de pics	134
3. Effet du split sur la capacité de pics	135
B- SEPARATIONS BIDIMENSIONNELLES LCXLC DE MELANGES PEPTIDIQUES	139
<i>I- RPLCxRPLC et RPLCxHILIC.....</i>	<i>139</i>
<i>Article 3 : “On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part II : Application to the separation of peptides”</i>	<i>140</i>
<i>II- HILICxRPLC.....</i>	<i>150</i>
CONCLUSIONS.....	154
REFERENCES	155

CHAPITRE 6 : APPLICATION AU COUPLAGE DE LA LCXLC A LA SPECTROMETRIE DE MASSE 157

INTRODUCTION	159
A- ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DE COMPOSES D'INTERET PHARMACEUTIQUE EN VUE DU COUPLAGE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE	160
<i>I- Premier projet.....</i>	<i>160</i>
<i>II- Deuxième projet</i>	<i>163</i>

B- MISE AU POINT ET TRAITEMENT DES DONNEES	165
I- <i>Optimisation du rapport signal/bruit</i>	165
1. Configuration n°1	165
2. Configuration n°2	167
II- <i>Traitement des données</i>	169
C- SEPARATIONS LCxLC-MS DE COMPOSES CHARGES	170
I- <i>Analyse LCxLC-MS de composés pharmaceutiques</i>	170
II- <i>Mise en place d'analyses LCxLC-MS adaptées à la séparation de peptides</i>	173
1. Analyse LCxLC-MS de 10 peptides en scan	173
2. Etude du nombre de SIM à suivre	174
III- <i>Intérêt de la LCxLC-MS par rapport à la LC-MS</i>	175
IV- <i>Analyse RPLCxHILIC-MS de peptides</i>	177
V- <i>Analyses LCxLC-(TOF)-MS de peptides dans l'urine</i>	180
D- ANALYSES LCxLC-MS RAPIDES DE PEPTIDES	182
I- <i>Recherche des meilleures conditions par simulation</i>	182
II- <i>Analyses LCxLC-UV-MS</i>	185
CONCLUSIONS.....	191
REFERENCES	192

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....193

ANNEXES.....197

INTRODUCTION GENERALE

La chromatographie en phase liquide (HPLC) est largement employée pour l'analyse de molécules pharmaceutiques ou biologiques. Néanmoins, dans le cas de l'analyse d'échantillons complexes comportant un grand nombre de constituants, la chromatographie en phase liquide unidimensionnelle ne permet pas de séparer tous les composés du mélange. Le couplage du système chromatographique avec la spectrométrie de masse peut être une alternative intéressante. Néanmoins, les séparations chromatographiques développées ne sont pas toujours compatibles avec la spectrométrie de masse notamment dans le cas d'additifs non volatils ou très corrosifs ajoutés dans la phase mobile. Il faut alors envisager de changer les conditions de séparation ce qui n'est pas toujours possible. De plus, des suppressions d'ionisation peuvent être observées lorsque plusieurs ions entrent en même temps dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle en ligne et totale (LCxLC) est une solution de choix qui permet de surmonter ces contraintes.

Ces travaux de thèse visent à compléter les connaissances déjà acquises à l'institut des sciences analytiques concernant l'analyse de composés chargés tels que les peptides et les petites molécules ionisables (principalement rencontrées dans le domaine pharmaceutique). Ces travaux ont permis de mettre en place le développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés (composés pharmaceutiques et peptides). Les composés étudiés étant de polarité variée, les modes RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) et HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) ont été choisis pour cette étude. La majorité des analyses a été effectuée en gradient d'élution. Un grand nombre d'analyses a été effectué à ultra haute pression (UHPLC) et haute température (HTLC) pour privilégier les analyses rapides. La mise en place d'analyses bidimensionnelles est un processus relativement long qui impose de bien connaître les systèmes unidimensionnels, de trouver des systèmes orthogonaux qui génèrent des capacités de pics importantes, de maîtriser le transfert d'une dimension à l'autre par le biais de l'interface et donc de choisir des dimensionnements d'analyse LCxLC adaptés. Le couplage d'un système LCxLC avec un spectromètre de masse est une étape supplémentaire générant beaucoup de données qu'il faut ensuite exploiter.

Le premier chapitre détaille le contexte et les principes théoriques de cette étude dans un cadre unidimensionnel puis bidimensionnel. Le chapitre 2 détaille les conditions expérimentales des différentes études menées (appareils, colonnes, composés, phases mobiles). Les chapitres 3 à 7 présentent les résultats obtenus qui ont permis d'aboutir au développement de méthodes en LCxLC-MS. Le chapitre 3 rassemble les études menées pour caractériser le comportement des petites molécules ionisables et peptides sur les colonnes RPLC et HILIC employées. Pour cela, différentes conditions expérimentales sont comparées. Cette étude est novatrice puisque les courbes de Van Deemter tracées ont été obtenues à partir d'analyses gradients. Une méthode de tracé des courbes de Van Deemter est proposée dans ce chapitre et est comparée avec la méthode classique utilisant des données issues d'analyses isocratiques. Le chapitre 4 présente la recherche de systèmes orthogonaux effectuée pour les

composés chargés. Les résultats présentés dans ce chapitre permettent de connaître les paramètres ayant le plus d'influence sur le changement de sélectivité parmi les conditions d'analyse : mode chromatographique / phase stationnaire / température / pH / modificateur organique pour les peptides et les petites molécules ionisables. Un nouveau descripteur d'orthogonalité et une méthode de calcul de la capacité de pics effective sont proposés pour mieux comparer les systèmes. L'étude détaillée en chapitre 5 permet de mettre en place les analyses bidimensionnelles. Les équations permettant de dimensionner l'analyse LCxLC sont données. L'utilité d'un split entre la première et seconde dimension est envisagée afin de réduire le volume injecté en seconde dimension. Les limites en termes de volume injecté en seconde dimension sont établies pour les séparations RPLCxRPLC et RPLCxHILIC. 3 séparations LCxLC ont été réalisées pour l'analyse d'une digestion de 3 protéines : RPLCxRPLC, RPLCxHILIC et HILICxRPLC. Les analyses bidimensionnelles LCxLC-UV-MS d'échantillons peptidiques et d'échantillons pharmaceutiques sont ensuite présentées dans le chapitre 6. Le couplage avec un simple quadripôle et un système à temps de vol est effectué. Des séparations RPLCxRPLC-MS de digestion de HSA dans l'eau et dans l'urine sont présentées. Des séparations LCxLC rapides sont présentées avec une colonne en 1.3µm.

3 études sont présentées sous forme d'articles :

- Article 1 (chapitre 3) : Effect of pH additive and column temperature on kinetic performance of two different sub-2 µm stationary phases for ultrafast separation of charged analytes.

S. Heinisch, A. D'Attoma, C. Grivel, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 135

- Article 2 (chapitre 4) : On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations.

A. D'Attoma, C. Grivel, S. Heinisch, J. Chromatogr.A, 1262 (2012) 148

- Article 3 (chapitre 5) : On-line comprehensive two dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part II: Application to the separation of peptides.

A. D'Attoma, S. Heinisch, J. Chromatogr.A, 1306 (2013) 27

Chapitre 1 : Contexte et principes théoriques

De la chromatographie en phase liquide unidimensionnelle vers la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle

INTRODUCTION

Les composés chargés sont largement répandus dans le secteur pharmaceutique et le domaine biologique. En effet, la plupart des molécules pharmaceutiques sont des composés basiques. Les peptides, composés multichargés, comptent parmi les molécules d'intérêt biologique. Ils peuvent être recherchés comme biomarqueurs ou peuvent être utilisés pour le traitement de certaines maladies. Les protéines sont souvent digérées par une enzyme avant d'être analysées car il est plus facile d'analyser des peptides plutôt que des protéines.

Les échantillons contenant ce type de composés posent souvent problème et sont souvent dits « complexes ». En effet, les échantillons pharmaceutiques et biologiques comportent généralement un grand nombre de constituants à séparer et ces composés ont parfois des structures chimiques proches. C'est le cas notamment de mélanges pharmaceutiques comportant un principe actif d'intérêt et ses produits de dégradation ou impuretés. Des composés proches ou des composés en grand nombre rendent la mise au point de conditions chromatographiques performantes plus difficile. Dans le cas de digestion de protéines, des milliers de peptides peuvent être présents dans l'échantillon. Des séparations très performantes sont alors nécessaires avec des colonnes particulièrement efficaces et des temps de gradients très longs (parfois plusieurs jours). Néanmoins, la séparation reste incomplète pour ce type d'échantillon. La spectrométrie de masse apporte un pouvoir de séparation supplémentaire puisqu'elle permet d'identifier des composés même en cas de coélution. Malgré tout, l'ionisation de certains composés d'intérêt dans le spectromètre de masse peut être supprimée lorsque différentes molécules sont ionisées en même temps.

L'utilisation de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle totale permet d'augmenter le pouvoir de séparation de l'analyse tout en conservant un temps d'analyse relativement restreint. Les composés sont ainsi séparés selon deux processus chromatographiques et peuvent être identifiés à l'aide d'un détecteur à spectromètre de masse. C'est donc une méthode de choix pour la problématique de l'analyse de mélange complexes.

Une étude du contexte et des principes théoriques a été menée dans cette première partie. Ainsi, les limites de la chromatographie en phase liquide unidimensionnelle seront rappelées. Les différentes possibilités en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle seront présentées avant de développer la particularité de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle totale qui sera étudié par la suite. Les méthodes de calcul d'orthogonalité et de la capacité de pics en 2D existantes seront ensuite détaillées. Pour finir, les choix stratégiques effectués seront justifiés.

A- VERS LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE

I- Les composés ionisables

Les composés chargés tels que les peptides et les petites molécules ionisables subissent des interactions supplémentaires par rapports aux composés neutres qui induisent de mauvaises formes de pics et de faibles efficacités.

1. Interactions secondaires

Deux types d'interactions peuvent intervenir entre les silanols résiduels et les solutés chargés [1]: (1) Des interactions hydrogènes (donneur/accepteur) entre les solutés acides ou basiques et les groupes silanols neutres. (2) Des interactions ioniques de type échange de cations entre les bases chargées et les groupes silanols ionisés.

Les cinétiques d'échange des solutés entre les sites d'interaction (SiOH ou chaîne C₁₈) sont différentes suivant les énergies d'interaction de ces sites conduisant à des trainées de pics pour les solutés basiques et donc à une perte d'efficacité.

De nouvelles phases stationnaires sont apparues pour limiter les problèmes d'analyse de composés basiques : phases stériquement protégées, phases à groupe polaire intégré dans la chaîne alkyle, phases à liaisons polydentates. Le masquage des silanols peut aussi être effectué en faisant réagir des petits organosilanes sur les silanols restant [2] même s'ils ne les suppriment pas tous. Une alternative est l'utilisation de silice hybride qui comporte un faible nombre de silanols libres.

2. Effet de surcharge

L'utilisation d'acide formique, fréquemment utilisé pour les couplages avec un détecteur à spectrométrie de masse (MS), conduit à un effet de surcharge qui impacte directement l'efficacité et le temps de rétention des pics. Ce phénomène intervient même pour des concentrations faibles de composés tel que présenté sur la Fig. I- 1. Cet effet est continu et n'intervient pas à partir d'un seuil.

La cause de cet effet de surcharge n'est pas claire. Plusieurs hypothèses sont avancées et plusieurs phénomènes pourraient être combinés. Il est possible que la répulsion mutuelle de molécules de solutés ionisés à la surface de la colonne contribue au processus de surcharge [3]. Snyder et coll. [4,5] avaient proposé l'hypothèse et Buckenmaier et coll. l'ont démontré expérimentalement [3]. Une explication différente, proposée par Gritti et Guiochon, est qu'une petite population de sites à haute énergie peut être surchargée par une gamme de solutés suivant leur taille sans être affectée par d'autres composés [6]. Des effets de surcharge interviennent aussi dans le cas d'espèces chargées négativement et aussi lors de l'utilisation de phases stationnaires polymériques ce qui contredit l'idée que les effets de surcharge

puissent provenir des silanols résiduels [3]. Les effets de surcharge dépendent fortement de la force ionique de la phase mobile [7,8] et augmentent lorsque la force ionique diminue.

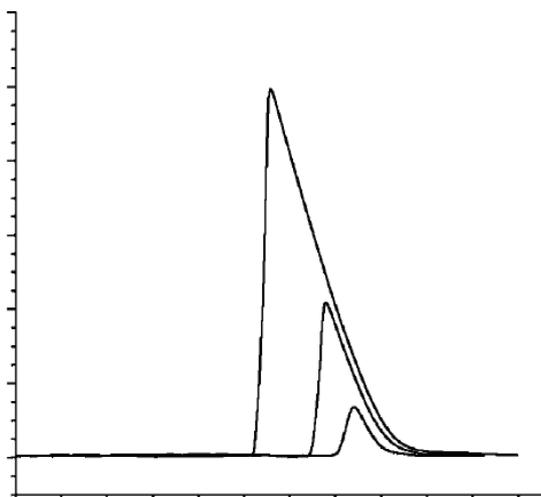


Fig. I- 1 : Effet de surcharge. Chromatogrammes superposés pour 1.25, 0.25 et 0.05 µg de nortriptyline. Xterra MS C18 150x4.6mm, 3.5 µm). Isocratique 44/56 A/B où A : 0.02M d'acide formique dans l'eau (pH=2.75) et B : 50/50 Acétonitrile/0.04 M d'acide formique dans l'eau. 1mL/min. UV 215 nm. 30 °C. Adapté de [9]

L'utilisation d'acide trifluoroacétique (TFA) réduit les effets de surcharge [10]. Le TFA est un acide bien plus fort que l'acide formique et permet de faire de l'appariement d'ion ce qui permet de réduire les effets de surcharge [11,12]. Néanmoins, l'utilisation de TFA n'est pas toujours favorisé car des effets de suppression d'ionisation peuvent intervenir lors d'analyses LC-MS.

II- Limites de la chromatographie unidimensionnelle

1. Capacité de pics

La qualité d'une séparation est généralement appréciée à l'aide du calcul de la résolution entre deux pics. Malgré tout, l'utilisation de cette grandeur est limitée puisqu'elle est basée sur une seule paire de pics et ne prend donc pas en compte l'ensemble du chromatogramme. La capacité de pics a été définie par Giddings [13] et a été reprise par Horvath pour l'analyse gradient [14]. Cette grandeur chromatographique permettant la mesure du pouvoir de séparation prend en compte l'ensemble du domaine de séparation.

La capacité de pics est la mesure du nombre de pics qui peuvent être contenus dans une fenêtre de temps d'éluion t_1 à t_2 avec une résolution fixée. Cette résolution est généralement fixée à 1 ce qui correspond à un écart de 4σ entre les temps de rétention pour deux pics gaussiens côte à côte. La capacité de pics est généralement notée n_c et est définie par [15]:

$$n_c = 1 + \int_{t_1}^{t_2} \frac{1}{4 \cdot \sigma} dt \quad \text{Eq. I- 1}$$

Dans le cas de séparation en mode isocratique, σ n'est pas constant et varie selon l'équation suivante [13]:

$$\sigma = \frac{t}{\sqrt{N}} \quad \text{Eq. I- 2}$$

En supposant le nombre de plateaux, N , constant tout au long du chromatogramme. En combinant les Eq. I- 1 et 2 ensemble, en intégrant de t_0 (temps mort de la colonne) à t_R (temps de rétention du dernier pic), on obtient l'équation suivante [13]:

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \int_{t_0}^{t_R} \frac{dt}{t} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(k+1) \quad \text{Eq. I- 3}$$

En choisissant $k=15$ (limite acceptable) et $N=10000$ plateaux, on obtient $n_c=70$ avec l'Eq. I- 3. La capacité de pics obtenue en mode isocratique est relativement limitée lorsque l'on souhaite des temps d'analyses raisonnables.

Dans le cas du mode gradient, si l'on suppose que la largeur des pics est constante (ω_{moy}) tout au long du chromatogramme, on peut intégrer et simplifier l'Eq. I- 1 par [16]:

$$n_c = 1 + \frac{t_2 - t_1}{\omega_{moy}} \quad \text{Eq. I- 4}$$

On peut aussi exprimer la capacité de pics selon l'Eq. I-5 pour des gradients LSS [17] :

$$n_c = 2.3S\Delta C \times \frac{k_e}{1+k_e} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \quad \text{Eq. I- 5}$$

L'Eq. I- 5 tend vers $2.3S\Delta C \frac{\sqrt{N}}{4}$ et l'Eq. I- 3 tend vers $\frac{\sqrt{N}}{4} \times 2$ pour des facteurs de rétention raisonnables. On constate que la capacité de pics obtenue en gradient est largement plus élevée que celle obtenue en mode isocratique puisque les largeurs de pics restent constantes en gradient. Tout de même, cette capacité de pics reste limitée puisque différentes contraintes entrent en jeu. En effet, la capacité de pics peut être améliorée avec des colonnes plus efficaces (utilisation de colonnes plus longues ou avec des particules de diamètre plus faible) ou des gradients plus lents. Mais, ces améliorations conduisent à une augmentation du temps d'analyse et/ou de la pression. Ainsi, les analyses unidimensionnelles ayant une capacité de pics supérieur à 500 sont rares et prennent beaucoup de temps à optimiser [18].

Les analyses protéomiques peuvent s'effectuer de deux manières distinctes qui sont les stratégies ascendantes (bottom-up) et descendantes (top-down). Pour la méthode ascendante, les protéines sont digérées par une enzyme et les peptides obtenus sont ensuite analysés. Pour la stratégie descendante, bien moins utilisée, les protéines sont analysées directement. L'analyse des peptides est en effet plus simple puisqu'ils sont plus petits, ils ne risquent pas de dénaturer, ils sont plus faciles à analyser d'un point de vue de la spectrométrie de masse et leur solubilité est meilleure [19]. En revanche, l'augmentation de la complexité de l'échantillon nécessite des méthodes séparatives à très haut pouvoir de résolution puisque ce

type d'échantillon peut contenir plusieurs milliers de peptides. Malgré les progrès effectués en chromatographie en phase liquide, il reste impossible de séparer tous les composés d'un échantillon très complexe tel que la digestion d'un extrait protéique de cellule avec une seule dimension analytique [20,21].

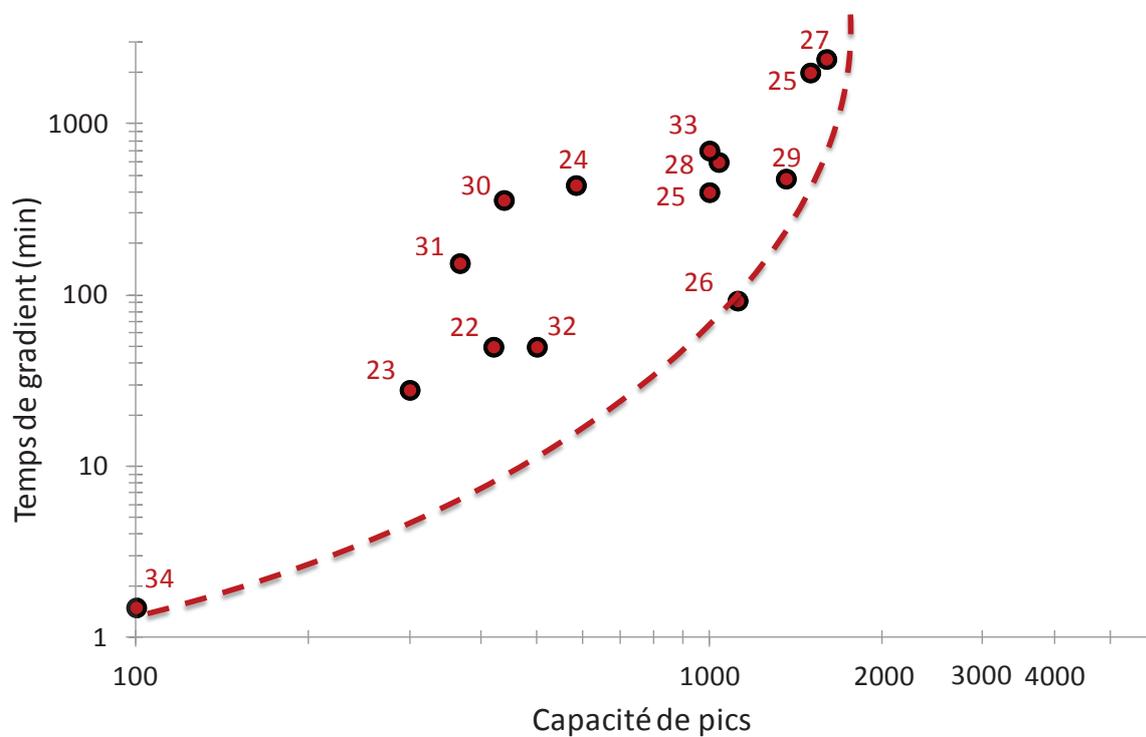


Fig. I- 2 : Tracé des capacités de pics obtenues en fonction des temps de gradient utilisés pour des séparations très performante de peptides publiées entre 1999 à 2012. Les numéros indiqués sur le graphique correspondent aux références [22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34].

La Fig. I- 2 indique les capacités de pics publiées pour des séparations de peptides pour lesquelles les auteurs ont cherché à atteindre la meilleure capacité de pics possible. Sur cette figure, on constate que la capacité de pics maximale atteinte pour une séparation unidimensionnelle de peptides est de 1600 pour un temps d'analyse de plus de 40 heures.

En reportant des valeurs classiques (Pour les petites molécules : $S=0.03$ $\Delta C=100$, Pour les peptides $S=0.2$ $\Delta C=40$) dans l'Eq. I- 5, on obtient des valeurs de capacité de pics de l'ordre de $nc = 2\sqrt{N}$ pour les petites molécules et $nc = 5\sqrt{N}$ pour les peptides soit 200 et 500 respectivement pour des efficacités de 10000 plateaux. La limite en termes de capacité de pics atteignable en chromatographie en phase liquide unidimensionnelle a été estimée comme n'excédant pas beaucoup 1000 [35] et ayant pour limite 1400-1600 [36] même en prenant les meilleures conditions et avec des temps d'analyse de l'ordre d'un jour.

2. Répartition statistique des pics

La capacité de pics est une grandeur très utile pour mesurer le pouvoir de séparation d'une séparation gradient. Cependant, les chromatogrammes obtenus comportent des pics placés de manière aléatoire conduisant souvent à des superpositions de pics et des espaces

vacants. Ainsi, la capacité de pics est un nombre idéal et symbolise le nombre maximal de composés qui pourraient être placés sur le chromatogramme de manière résolus [37].

Davis et Giddings ont étudié ce sujet pour établir une formule, à partir des statistiques de Poisson, permettant de connaître le nombre de pics distincts que l'on peut attendre pour un mélange donné avec une capacité de pics donnée. Pour cela, il faut (1) connaître le nombre de composés présents dans le mélange, (2) que les composés occupent entièrement l'espace chromatographique, (3) que la largeur des pics soit uniforme tout au long du chromatogramme et (4) que les hauteurs de pics soient identiques [37,38]:

$$p = m \cdot e^{-\frac{m}{n_c}} \quad \text{Eq. I- 6}$$

Avec p le nombre de pics résolus, m le nombre de composés et n_c la capacité de pics. Davis et Giddings ont ainsi montré que pour avoir 90% de chance qu'un composé d'intérêt soit un pic isolé, il faut avoir 95% de place vide sur l'espace de séparation [37].

La capacité de pics limite pouvant être atteinte en chromatographie en phase liquide unidimensionnelle est variable selon le type de composés analysés car elle est directement liée au paramètre S [39]. Cette limite a été estimée comme étant proche de 1600 pour les peptides [36]. Même sous les meilleures conditions, le nombre de pics contenant un seul constituant ne peut pas excéder 18% de la capacité de pics [37]. Ainsi, seulement 288 composés peuvent être séparés, dans le meilleur des cas, avec une capacité de pics de 1600. Pour séparer plus de constituants, il faut alors envisager d'effectuer la séparation en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle afin d'augmenter la capacité de pics. Ce type de séparation est donc particulièrement intéressant pour les mélanges complexes.

III- Les possibilités en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle

Différentes techniques sont regroupées sous le nom de chromatographie en phase liquide bidimensionnelle. En effet, les analyses bidimensionnelles peuvent s'effectuer en ligne ou hors ligne. Un mode intermédiaire qui est le mode à débit stoppé est aussi parfois utilisé. Chacun de ces modes a des avantages et des inconvénients. Ils sont donc utilisés selon les problématiques, les échantillons et les appareils disponibles pour faire ce type d'analyses.

1. Mode hors ligne

Pour les systèmes bidimensionnels hors ligne, des fractions sont collectées à partir d'une première séparation appelée première dimension. Après collection, ces fractions sont séparées du solvant par évaporation et re-dissoutes avant l'injection dans la seconde colonne. Ce type de fonctionnement permet de n'avoir aucune limitation pour le temps de séparation dans la seconde dimension et d'utiliser un seul système HPLC ou UHPLC pour réaliser la séparation bidimensionnelle. Néanmoins, ce type d'analyse est généralement long puisque le temps total d'analyse comprend le temps de séparation dans la première dimension ajouté au temps de séparation dans la seconde dimension multiplié par le nombre de fractions

collectées. Quelques exemples permettent de se rendre compte du temps d'analyse employé habituellement : certaines analyses 2D hors-lignes peuvent durer plus de 13 heures pour 16 fractions [40] ou même plus de 80 heures [41]. Il faut noter que le risque de contamination ou de perte d'échantillon existe puisque l'utilisateur intervient entre les deux dimensions.

2. Mode en ligne

Au contraire du mode hors-ligne où les deux séparations sont faites de manières séparées, le mode en ligne implique d'utiliser deux systèmes chromatographiques en même temps pour réaliser l'analyse bidimensionnelle en continu. La configuration peut être appelée coupe à cœur (« heart-cutting ») dans le cas où une ou quelques fractions non successives sont directement réinjectées dans la seconde dimension. Ce type de séparations bidimensionnelles est utilisé lorsque l'échantillon contient seulement quelques composés d'intérêt qui doivent être isolés [42,43]. Deux systèmes chromatographiques sont nécessaires avec une vanne faisant l'interface entre les deux systèmes. Cette configuration est abrégée LC-LC [44].

L'approche « comprehensive » ou totale est dédiée à l'analyse bidimensionnelle en ligne complète de l'échantillon. Dans ce cas, les fractions successives sont stockées et analysées tour à tour pendant l'analyse de la première dimension. Le temps d'analyse de la séparation bidimensionnelle est égal au temps d'analyse dans la première dimension. Cette configuration est notée LCxLC [44]. Différents types d'échantillons ont été analysés en LCxLC. On peut citer notamment des séparations de produits naturels [45,46,47], de produits pharmaceutiques [46] et de digestion de protéines [48,49,50].

Une approche intermédiaire en ligne entre la coupe à cœur et l'approche totale est la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle sélective. Pour cette variante, des fractions successives sont analysées dans une seconde dimension seulement sur certaines zones du chromatogramme de première dimension [51,52]. Cette approche a le mérite de limiter les injections dans la colonne de seconde dimension prévenant ainsi le vieillissement de cette colonne.

3. Mode à débit stoppé

Dans cette dernière approche à l'interface entre les modes en ligne et hors ligne, une fraction sélectionnée de la première dimension est transférée en ligne à la seconde dimension pour subir une seconde séparation. L'élution de la première colonne est alors stoppée durant le temps d'analyse en seconde dimension. A la fin de l'analyse en seconde dimension, la séparation en première dimension reprend. Le temps de séparation total peut être calculé de la même manière que pour le mode hors ligne. Une séparation de ce type a été effectuée pour un échantillon de digestion tryptique en 17 heures [53].

4. Comparaison des modes

Ces modes ont été comparés par Fairchild et coll. [54]. Ils ont montré que dans le cadre de la recherche d'une capacité de pics donnée relativement faible, le mode total permettait d'avoir une séparation plus rapide que le mode à débit stoppé ou hors ligne. En

revanche, de plus grandes capacités de pics peuvent être atteintes avec le mode hors ligne mais avec cependant des temps d'analyse nettement plus longs. Le mode à débit stoppé est un compromis entre les deux modes et permet d'atteindre des capacités de pics intermédiaires. Néanmoins, l'approche à débit stoppée reste peu développée étant donnée sa complexité et la dispersion additionnelle générée en première dimension pendant les périodes d'arrêt de débit. De même, les modes hors ligne et en ligne ont été comparés [55] pour des systèmes combinant les modes HILIC et RPLC.

	Hors ligne	En ligne
$n_{c,1}$ HILIC	27	23
$n_{c,2}$ RPLC	96	36
Capacité de pics pratique	2096	556
Temps d'analyse total (min)	2095	132
Taux de production de capacité de pics (par min)	1.00	4.21

Tab. I- 1 : Comparaison des capacités de pics obtenues en ligne et hors ligne en HILIC x RPLC pour la séparation de composés phénoliques [55]

Le Tab. I- 1 permet de comparer les capacités de pics obtenues dans les deux modes. Une plus grande capacité de pics pratique a été obtenue hors ligne (4 fois supérieur) mais pour un temps 16 fois supérieur au temps d'analyse en ligne (35 heures hors ligne / 2.2 heures en ligne). Le mode hors ligne permet de générer de grandes capacités de pics mais est très consommateur de temps. Les avantages et inconvénients des modes hors ligne, en ligne et à débit stoppé observés à travers diverses publications sont résumés dans le Tab. I- 2.

	Hors ligne	En ligne	Débit stoppé
Capacité de pics	++	+	++
Temps d'analyse	-	++	-
Automatisable	-	++	+
Problème de pollution	-	+	+
Perte d'échantillon	-	+	+
Complexité d'appareillage	++	-	+
Compatibilité entre D1 et D2	+	+/-	+/-

Tab. I- 2 : Avantages et inconvénients des modes hors-ligne, en ligne et à débit stoppé en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle. ++ Très positif, + Positif, - Négatif, +/- Négatif dans certains cas

Devant les avantages du mode en ligne total (Tab. I- 2), ce mode a été choisi pour toute l'étude. Le fonctionnement et le principe de ce mode est détaillé dans la partie suivante.

B- LE PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE BIDIMENSIONNELLE EN LIGNE TOTALE (LCxLC)

La première séparation LCxLC a été réalisée par Erni et Frei en 1978 [56]. Depuis, cette méthode d'analyse s'est peu à peu développée. La nomenclature et les différents termes ont été définis en 2003 [44] et mis à jour en 2012 [57]. Différentes études ont été réalisées et un grand nombre de montages ont été considérés.

I- Fonctionnement et instrumentation

Un système bidimensionnel LCxLC est généralement constitué en première dimension d'un système de pompage, d'un système d'injection (passeur d'échantillon), d'un four à colonne thermostaté et parfois d'un détecteur. La seconde dimension est constituée habituellement d'un système de pompage, d'un four à colonne thermostaté et d'un détecteur. Les deux systèmes sont reliés par une interface. Cette interface est constituée d'une ou plusieurs vannes comportant deux boucles de volume identique. Les systèmes les plus utilisés sont les systèmes à vanne 8 voies [56], vanne 10 voies [48,50] et à deux vannes 6 voies [58]. Le système le plus courant est le système comportant une vanne 10 voies tel que présenté en Fig. I- 3.

Lors de la mise en place de la vanne, deux configurations différentes peuvent être choisies. La configuration est dite symétrique lorsque les boucles de la vanne se remplissent et se vident toutes deux dans le même sens ou asymétrique si les boucles sont remplies ou vidées en sens contraire l'une par rapport à l'autre [59]. Lorsque la configuration asymétrique est choisie, les pics obtenus en fraction paires et impaires sont différents (forme de pic, temps de rétention). La configuration symétrique est donc préférable. Malgré tout, une correction des temps de rétention doit être effectuée dans certains cas (vanne 10 voies en configuration symétrique par exemple) lorsque le chemin parcouru par les solutés n'est pas identique sur les deux positions. Ce chemin supplémentaire peut être visualisé sur la Fig. I- 3 dans le trajet représenté en noir.

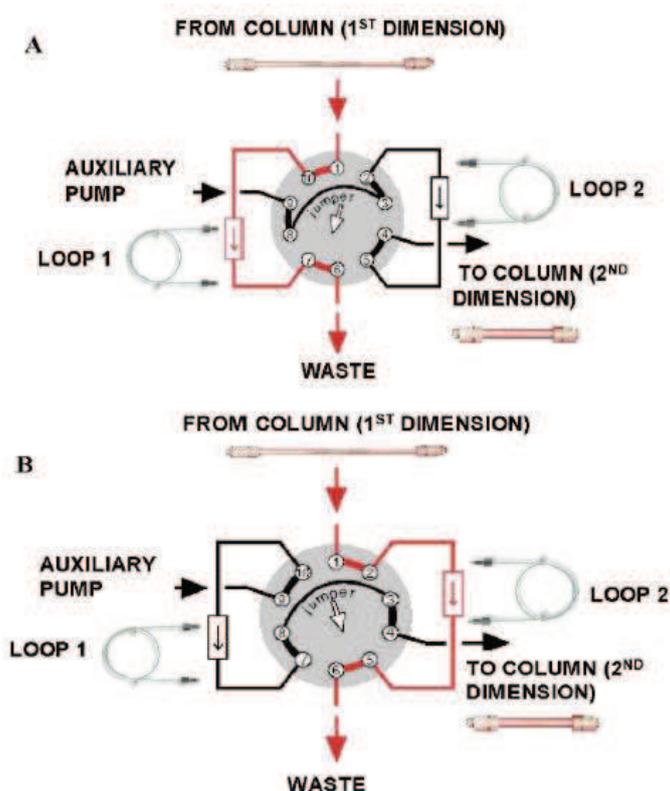


Fig. I- 3 : Configuration standard d'un système LCxLC avec une vanne 10 voies et deux boucles de collecte en alternance de cycle A et B [60]

II- Les critères à considérer en LCxLC

Pour qu'une séparation bidimensionnelle puisse être considérée comme totale, il faut que trois critères soient respectés [61,44]:

- (1) Chaque partie de l'échantillon subit deux séparations différentes.
- (2) Des pourcentages égaux (100% ou moins) de tous les composés passent par les deux colonnes.
- (3) La séparation (résolution) obtenue dans la première dimension est maintenue dans la seconde dimension.

La condition (1) est la condition d'orthogonalité. Deux séparations sont dites orthogonales en LCxLC si les deux séparations sont différentes.

La condition (2) est respectée si l'ensemble de la phase mobile de première dimension est envoyé vers la colonne de seconde dimension. Dans ce cas, il faut que le volume injecté en seconde dimension ne dépasse pas le volume des boucles et que le temps de cycle en seconde dimension soit inférieur ou égal au temps de remplissage d'une boucle. Cette condition est aussi respectée si le débit sortant de la première dimension est divisé par une jonction en T. Il faut néanmoins que ce partage de débit soit constant au cours du temps.

La condition (3) est la plus difficile à satisfaire. Il est généralement admis qu'une perte de résolution jusqu'à 10% est acceptable [44]. Pour garder une résolution satisfaisante entre

chaque paire de pics, il est important de fractionner le chromatogramme de première dimension plusieurs fois dans la largeur d'un pic. Murphy et coll. [62] ont étudié l'effet du nombre de fractions par pic sur la résolution en LCxLC. Ils ont montré qu'avec trois à quatre fractions sur la largeur d'un pic de première dimension, la résolution obtenue en première dimension était maintenue. Horie et coll. [63] et Vivo truyols et coll. [64] ont montré qu'environ deux fractions par pic de première dimension était optimal pour développer des séparations LCxLC efficaces.

III- Exemples d'analyses LCxLC de composés chargés

Une séparation bidimensionnelle de composés pharmaceutiques a été effectuée en NPLCxRPLC [46]. L'interface utilisée est une vanne 10 voies. La séparation est présentée en Fig. I- 4.

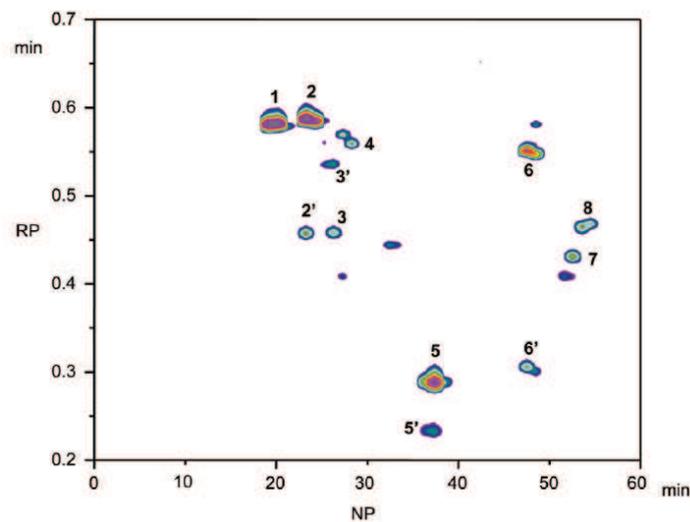


Fig. I- 4 : Séparation NPLCxRPLC de composés pharmaceutiques. D1 : Isocratique, Betasil diol (250x1mm, 5 μ m) n-hexane/1-butanol 92/8 +0.2% ethanolamine. 40 μ L/min. 30°C. D2 : Chromolith RP-C18 (100x4.6 mm). Gradient 35% à 100% d'ACN en 0.35 min. Eau/ACN. 5 mL/min. 30°C. [46]

Une digestion tryptique de sérum humain a été séparée en RPLCxRPLC [49]. Deux systèmes de seconde dimension sont utilisés en parallèle dans la seconde dimension. La première dimension de cette analyse a été effectuée avec 4 colonnes C18 couplées et des conditions acides à 45°C. En seconde dimension, deux phases stationnaires C18 ont été utilisées en parallèle en condition basique. 2 vannes 10 voies constituent l'interface qui est particulièrement complexe. La Fig. I- 5 montre la séparation bidimensionnelle.

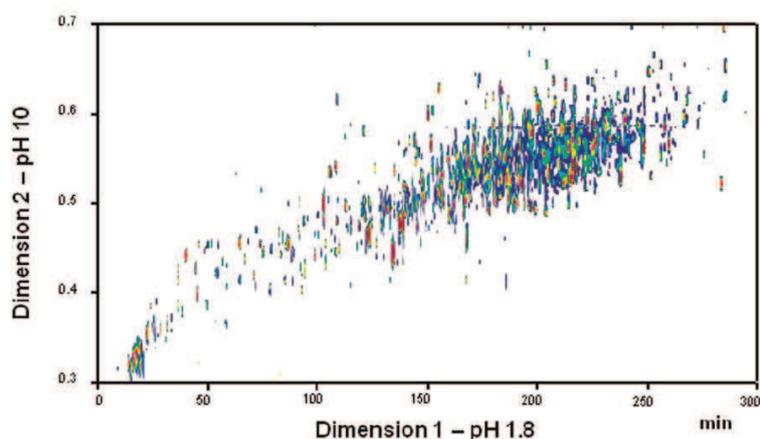


Fig. I- 5 : Séparation RPLCxRPLC d'une digestion tryptique de sérum humain. D1 : 4 colonnes Halo C18 couplées (600x2.1 mm, 2.7 μ m). Eau/ACN avec 0.1 % de TFA. 45°C. D2 : 2 phases Zorbax 300 Extend C18 ont été utilisées en parallèle (50x4.6 mm, 3.5 μ m). Gradient en 0.55 min. 10 mM formate d'ammonium pH 10 Eau/ACN. Température ambiante. [49].

La première séparation RPLCxRPLC-MS d'une digestion de protéine a été publiée en 2011 [50]. Cette séparation est montrée en Fig. I- 6. Le chromatogramme bidimensionnel n'est présenté qu'en UV. Le spectromètre de masse a servi à identifier les peptides, fraction par fraction. La première dimension de cette analyse a été effectuée avec 4 colonnes C18 couplées dans la première dimension et des conditions basiques à 35°C. En seconde dimension, la même phase stationnaire a été utilisée en condition acide à 35 °C. L'interface entre les deux dimensions est une vanne 10 voies.

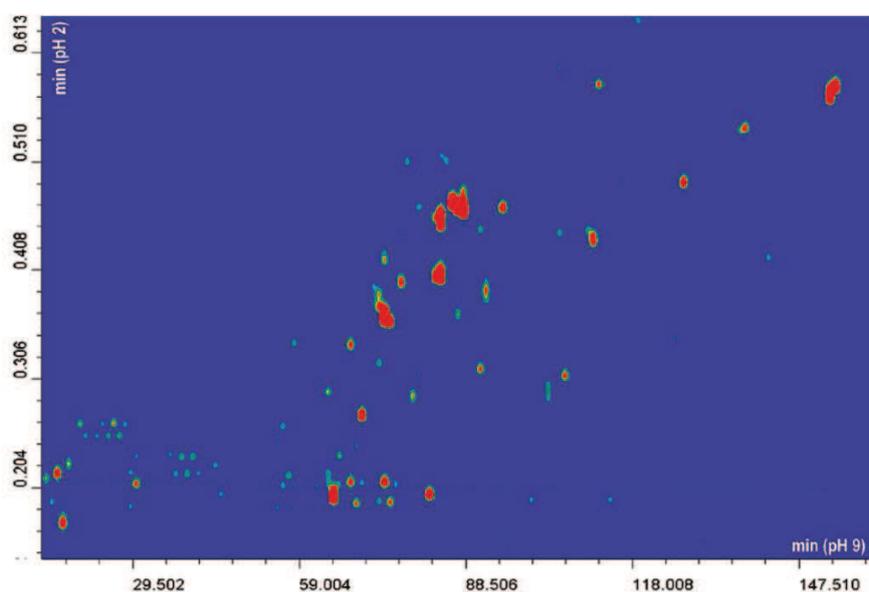


Fig. I- 6 : Séparation RPLCxRPLC d'une digestion tryptique de β -caséine observée en UV à 215 nm. D1 : 4 colonnes Ascentis Express C18 couplées (au total 600x2.1 mm, 2.7 μ m). Eau 10 mM formate d'ammonium pH 9/ACN. 35°C. 100 μ L/min. D2 : Ascentis Express (30x4.6 mm, 2.7 μ m) 0.1 % TFA Eau/ACN. Gradient en 0.69 min. 35 °C. 4 mL/min. [50].

Un mélange de composés anioniques, neutres et amphotères a été analysé par HILICxRPLC [65]. La séparation bidimensionnelle est présentée en Fig. I- 7. L'interface utilisée est une vanne 10 voies

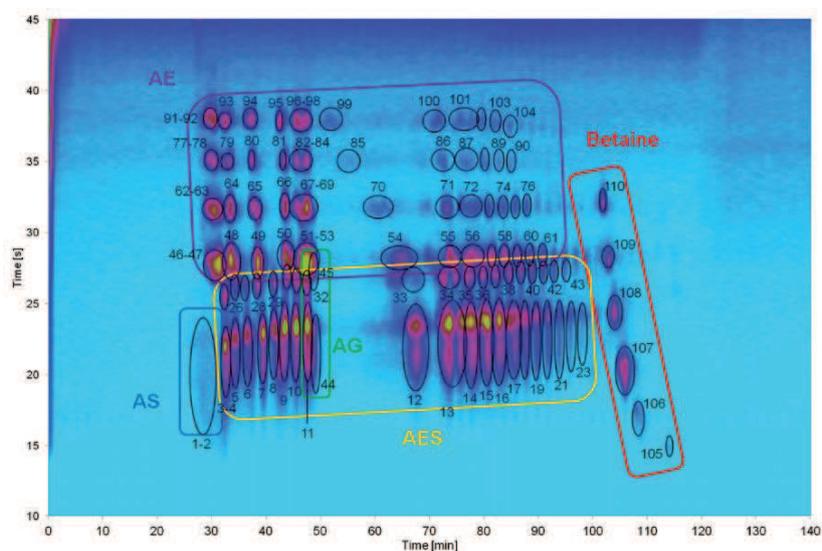


Fig. I- 7 : Séparation HILICxRPLC d'un mélange de surfactants. D1 : ZIC-HILIC (250x2.1mm, 5µm) 25 µL/min. Eau 10 mM acetate d'ammonium/ACN. Gradient. 30 °C. D2 : Reprosphere 100 C8-Acqua (50x4.6mm, 5 µm). Gradient. 3 mL/min. Eau acetate d'ammonium/Méthanol. 50°C. [65]

C- ORTHOGONALITE ET CAPACITE DE PICS

Différents outils de calculs ont été établis pour prévoir le pouvoir séparatif de systèmes bidimensionnels. Toutes les méthodes proposées nécessitent le choix d'un nombre limité de solutés représentatifs. La recherche de systèmes compatibles nécessite l'accumulation de données chromatographiques à partir de séparations unidimensionnelles. Les données collectées sont traitées et combinées pour comparer le pouvoir de séparation de différentes paires de systèmes chromatographiques. Le choix d'un échantillon tient à plusieurs critères. Il ne doit pas être trop complexe afin de pouvoir identifier facilement les différents pics. Il doit être représentatif d'échantillons réels aléatoires et les solutés doivent être facilement détectables dans les conditions opératoires. Dans le domaine pharmaceutique, les composés représentatifs sont sélectionnés selon leurs structures (groupes fonctionnels, cycles), type pharmaceutique, masse moléculaire, log P et pKa [66]. Les composés représentatifs doivent être basiques comme la plupart des médicaments, acides ou neutres. Dans le domaine biologique, les peptides sélectionnés proviennent de digestions tryptiques de protéines modèles [67]. Ils peuvent aussi être choisis parmi un nombre limité de composés représentatifs. Le pouvoir de séparation d'un système bidimensionnel est spécifique aux conditions opératoires aussi bien qu'à l'échantillon choisi et ainsi toutes les paires prometteuses de systèmes chromatographiques présentant un grand pouvoir de séparation doit être confirmé par des analyses avec des échantillons réels [68].

I- Orthogonalité des systèmes

L'orthogonalité est le premier critère permettant de savoir si deux systèmes chromatographiques ont un intérêt à être combinés en séparation 2D. L'orthogonalité de deux systèmes chromatographiques a été définie comme l'absence de corrélation statistique entre les données de rétention de chaque dimension [44]. L'orthogonalité est souvent associée à l'idée d'avoir deux mécanismes de rétention différents bien que des conditions orthogonales peuvent être trouvées avec des mécanismes de rétention similaires dans chacune des dimensions [69]. Il y a d'ailleurs toujours des éléments de corrélation tels que des interactions commune pour certains analytes dans les deux dimensions. Comme montré par Guiochon et coll. [70], il est impossible de trouver deux systèmes strictement orthogonaux. Le terme orthogonalité est donc souvent remplacé par le degré d'orthogonalité. Un certain degré d'orthogonalité est ainsi obtenu dès qu'il y a des différences de sélectivité. Le problème est de définir un outil adapté pour quantifier la différence en sélectivité pour deux systèmes. Bien qu'il n'y ait pas de controverse sur le concept d'orthogonalité totale, de nombreuses méthodes ont été proposées pour évaluer le degré d'orthogonalité ce qui abouti à des manières différentes de considérer l'orthogonalité. Ces méthodes peuvent être divisées en deux catégories différentes : celles qui considèrent uniquement les données de rétention (approche thermodynamique) obtenues typiquement en conditions gradient et celles qui prennent aussi en compte la largeur des pics (méthode thermodynamique et cinétique).

1. Méthode statistique

La première catégorie inclut les régressions linéaires des données de rétention aussi bien que des méthodes chimiométriques bien plus complexes [66,71,72,73,74,75] ce qui revient à sélectionner le système le plus orthogonal parmi un large choix de systèmes possibles. La régression linéaire est largement utilisée puisque cette approche est assez simple et ne nécessite pas de traitement de données mis à part parfois des normalisations de données [76] ce qui facilite les comparaisons quelles que soit les conditions. Le degré d'orthogonalité peut être exprimé comme le coefficient de corrélation de Pearson R. Une faible valeur de R^2 indique un grand degré d'orthogonalité [77]. Une limite maximale de 0.6 a été suggérée comme valeur seuil de disimilarité entre les séparations [78].

Neue et coll. [79] ont défini un critère plus adapté, la différence de sélectivité, s^2 égal à $1-R^2$. De hautes valeurs de s^2 représentent ainsi de hauts degrés d'orthogonalités. La limite de R^2 (ou de s^2) pour la description de systèmes orthogonaux a souvent été mise en cause [18,80,81,82,83]. L'information visuelle des données de rétention reste nécessaire pour éviter des interprétations ambiguës par exemple pour des données alignées selon l'axe des abscisses comme indiqué avec la Fig. I- 8. Sur cette figure, on constate que R^2 est identique pour les deux diagrammes alors que la distribution des pics est totalement différente. La distribution des points ne peut pas être acceptable lorsque les données s'accumulent sur certaines zones laissant supposer que la distribution n'est pas aléatoire ou quand les données sont alignées diagonalement ou parallèlement à l'axe des abscisses (une des deux dimensions est inutile dans ce cas). Au contraire, des données distribuées de façon aléatoire dans l'espace de

séparation correspondent à une orthogonalité idéale où l'information croisée est minimisée pour avoir une quantité d'information maximisée [84].

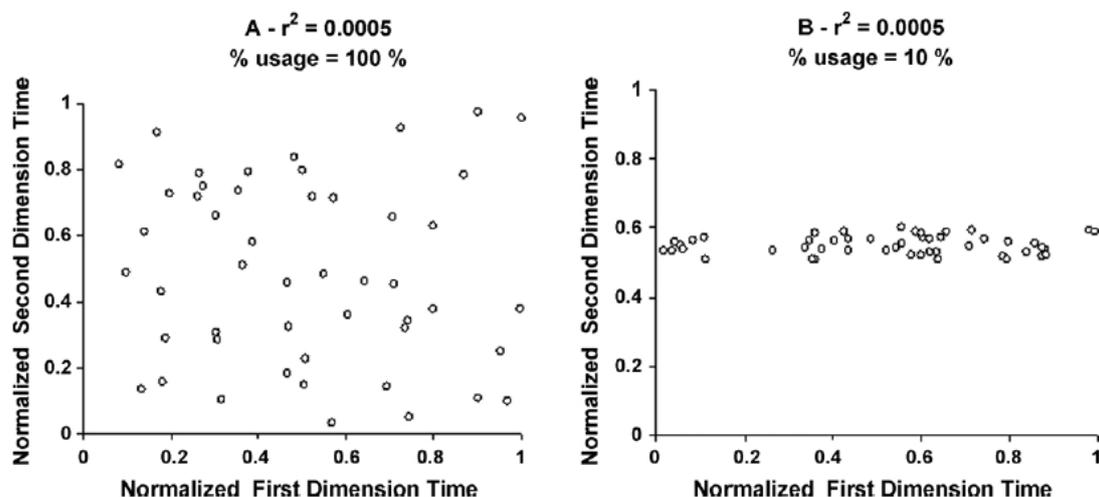


Fig. I- 8 : Démonstration de la faiblesse du coefficient de corrélation comme mesure de l'utilisation de l'espace de séparation pour les systèmes LCxLC[18].

Il faut noter que pour certaines combinaisons HILICxRPLC, le diagramme de rétention conduit à une diagonale « décroissante de la gauche vers la droite ». Jandera et al. [85,86] ont tracé des diagrammes de rétentions et utilisé la pente du diagramme de rétention comme descripteur d'orthogonalité. Cette dernière approche a été effectuée sur des séparations de différents types de composés à motifs structuraux répétitifs (polymères, isomères, homologues...)

2. Méthodes géométriques

La seconde catégorie de méthode de description de l'orthogonalité est basée sur une approche géométrique. Cette approche consiste à évaluer l'espace bidimensionnel qui est occupé par les pics sur le diagramme de rétention. Suivant les auteurs, différents descripteurs de caractérisation mathématique de l'orthogonalité sont utilisés : similarité informationnelle [81], angle de répartition des pics [87] et la projection d'une grille sur le diagramme de rétention, fait d'autant de cases que de points de données avec l'orthogonalité correspondant à la fraction de l'espace occupé par les cases [67,88].

Comme mentionné précédemment, ces descripteurs d'orthogonalité incluent les largeurs de pics dans le calcul et donc la distinction entre l'orthogonalité et la capacité de pics pratique n'est pas claire. Cette dernière était en effet définie comme la capacité de pics qui peut être obtenue pour une séparation particulière [87] et ainsi peut être calculée en multipliant les valeurs théoriques de capacité de pics par l'aire effective de l'espace de séparation bidimensionnel. Les inconvénients additionnels de cette approche est qu'un grand nombre de composés représentatifs est nécessaire et que son exécution n'est pas simple.

II- Capacité de pics en 2D

Le calcul de l'orthogonalité permet de repérer les paires de systèmes chromatographiques qui sont potentiellement intéressantes. Mais, ce calcul ne permet pas de connaître le nombre de composés pouvant potentiellement être séparés. Un bon système 2D est ainsi composé de deux séparations orthogonales mais aussi surtout de systèmes permettant d'atteindre de grandes capacités de pics.

1. Capacité de pics théorique

Karger et coll. [89], Giddings [90] et Guiochon et coll. [91] ont montré que la capacité de pics d'un système LCxLC dans le cas idéal pouvait atteindre le produit des capacités de pics des deux dimensions :

$$nc_{2D} = nc_1 \times nc_2 \quad \text{Eq. I- 7}$$

Où nc_1 et nc_2 sont respectivement les capacités de pics des dimensions 1 et 2. Cette équation est illustrée par la Fig. I- 9.

Cette équation permet de calculer la capacité de pics disponible pour l'analyse LCxLC. Mais, sa validité est très limitée. Pour être valable, il faut que les deux mécanismes de rétention soient indépendants pour que l'espace de séparation 2D soit totalement accessible aux composés de l'échantillon analysé et que la séparation ne soit pas perdue pendant le transfert des fractions. Ces conditions ne sont jamais totalement respectées.

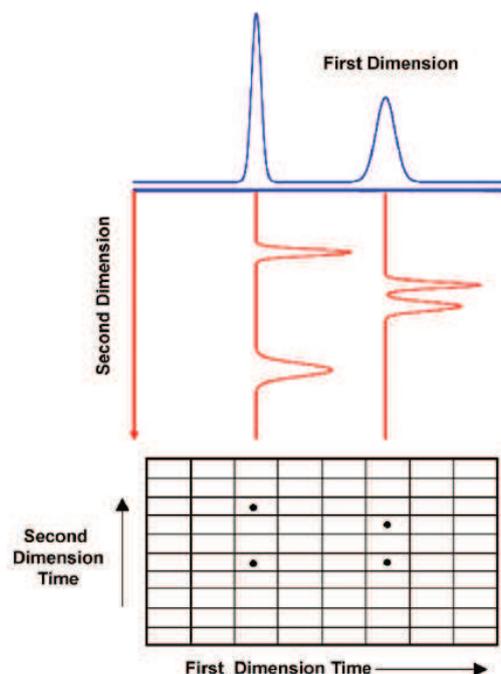


Fig. I- 9 : Illustration de la relation multiplicative entre les capacités de pics pour deux dimensions indépendantes en LCxLC. [92]

2. Capacité de pics pratique

Le calcul de la capacité de pics ne peut pas être effectué avec la formule théorique (Eq. I -7). En effet, les conditions d'orthogonalité et d'échantillonnage ne sont jamais totalement remplies. La qualité de la séparation bidimensionnelle est ainsi décrite avec un calcul de capacité de pics pratique qui prend en compte l'occupation de l'espace. L'orthogonalité est un critère nécessaire pour les séparations bidimensionnelles mais n'est pas un descripteur du pouvoir de séparation. Comme précédemment mentionné, l'orthogonalité et la capacité de pics sont souvent confondus dans un seul descripteur. Néanmoins, une correction liée à l'occupation de l'espace doit être appliquée dans le calcul de la capacité de pics pratique afin de prendre en compte l'espace inoccupé.

La notion de capacité de pics pratique a été étudiée par Gilar et coll. [67]. Les auteurs ont proposé une approche géométrique pour laquelle l'espace de séparation est partagé en petits carrés de surface identiques. Le nombre de carrés occupé par un pic, au minimum, est comptabilisé et la capacité de pics pratique est calculée à partir de l'équation suivante :

$$n_{c,pratique} = n_{c,1} \times n_{c,2} \times \frac{C_{occupés}}{C_{max}} \quad \text{Eq. I- 8}$$

Avec $C_{occupés}$ et C_{max} le nombre de carrés occupés et total respectivement.

3. Capacité de pics effective

Li et coll. [93] ont proposé une équation permettant de calculer la capacité de pics en prenant en compte la perte de séparation entre les deux dimensions du au sous échantillonnage :

$$n_{c,2D} = \frac{n_{c,1} \times n_{c,2}}{\sqrt{1 + 3.35 \left(\frac{t_{c,2} \times n_{c,1}}{t_{G,1}} \right)^2}} \quad \text{Eq. I- 9}$$

Où $t_{c,2}$ est le temps de cycle de séparation de seconde dimension, $t_{G,1}$ le temps de gradient de la première dimension. Une autre équation a été proposée pour calculer la capacité de pics effective [94]:

$$n_{c,2D} = n_{c,1} \times n_{c,2} \times \alpha \times \gamma \times f \quad \text{Eq. I- 10}$$

Où α est un facteur de correction de la capacité de pics de la première dimension prenant en compte le sous-échantillonnage des pics, γ est un facteur de correction de la capacité de pics de la seconde dimension prenant en compte l'élargissement des pics lors du transfert de première à seconde dimension, f est un facteur de couverture de l'espace de séparation. Les trois facteurs α , γ et f sont compris entre 0 et 1.

D- CHOIX STRATEGIQUES

Pour le développement et l'optimisation de méthodes LCxLC, différents choix stratégiques ont du être fait. Tout d'abord, les séparations de seconde dimension doivent être très rapides. En effet, le dimensionnement de première dimension est lié à celui de la seconde dimension et la diminution du temps d'analyse en seconde dimension permet de réduire le volume injecté et donc de maximiser la capacité de pics en évitant les élargissements de pics liés aux effets d'injection. Pour avoir des séparations très rapides dans la seconde dimension, l'UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) et l'HTLC (High Temperature Liquid Chromatography) ont été choisis. L'HTLC permet de réduire la viscosité de la phase mobile et l'UHPLC permet d'atteindre des pressions plus importantes. Ces deux techniques permettent donc d'obtenir des séparations plus rapides. L'objectif en LCxLC étant d'atteindre de grandes capacités de pics, le gradient d'élution est le mode d'élution de choix. Les modes RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) et HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) ont été choisis pour la réalisation des analyses bidimensionnelles.

I- Chromatographie ultra-rapide

L'augmentation du débit permet la réduction du temps d'analyse. Mais, le débit maximal d'utilisation d'une colonne est limité soit par la pression maximale supportée par la colonne soit par la pression maximale délivrée par le système. Celle-ci atteint 1000 à 1300 bar avec les appareillages UHPLC au lieu de 400 bar avec les appareillages classiques HPLC. La diminution de la viscosité de la phase mobile en utilisant l'HTLC permet d'atteindre des débits de phase mobile plus élevés pour une pression dans la colonne comparable. L'utilisation de particules core-shell permettrait aussi d'obtenir des séparations plus rapides puisque des efficacités comparables peuvent être obtenues avec des diamètres de particules plus importants et donc le débit de la phase mobile peut être augmenté pour une pression comparable.

Les différentes possibilités existantes pour réduire le temps d'analyse sont présentées dans le Tab. I- 3 [95]. Une technique n'a pas été choisie : l'utilisation de particules non poreuses. Les inconvénients majeurs de cette approche sont difficilement surmontables pour l'utilisation en LCxLC.

characteristics	small particles	high pressure	nonporous particles	core-shell particles	high temperature
overall impact on speed	++	++	+	++	+++
primary effect on speed	lower plate heights, shorter column lengths, and higher optimum eluent velocities	drives fluid faster. used in conjunction with smaller particles and narrower columns (≤ 2.1 mm i.d.)	improved interphase mass transfer and possibly improved eddy dispersion	lower reduced plate height through improved eddy dispersion, improved interphase mass transfer	reduces viscosity and thus pressure; allows fluid to move faster at same pressure; improves interphase mass transfer; can be combined with use of smaller particles
requirements	needs high pressure instrument; requires dramatic decrease in extra-column broadening	needs high pressure instrument; requires dramatic decrease in extra-column broadening when used with small particles	generally needs high pressure to drive liquid through particles around $1 \mu\text{m}$; ultralow dispersion equipment	requires low extra-column dispersion; almost as important as with sub- $2 \mu\text{m}$ porous particles	does not require high pressure instruments but does require specialized solvent preheater and column temperature controller; generally requires narrow column (≤ 2.1 mm) to minimize thermal mismatch; no PEEK in columns when used above 100°C
equipment cost	high	high	high	medium	low
primary advantages	can improve speed significantly; has minimal effect on selectivity and thus simplifies method transfer from bigger particles of same manufacture	can improve speed significantly; the use of narrower columns can lower solvent consumption	high efficiency for separations of large molecules, especially proteins	can be done with conventional HPLC equipment	can be done with conventional HPLC equipment

characteristics	small particles	high pressure	nonporous particles	core-shell particles	high temperature
primary disadvantages	requires mechanically very stable particles; frictional heating	generally requires narrow column (≤ 2.1 mm i.d.) to minimize frictional heating	very low sample load capacity and much less retention; very small particles are hard to pack	slightly decreased sample load capacity and retention	requires thermally stable stationary phase and stable analytes
effect on relative retention	none provided the substrate and stationary phase chemistry are the same as for larger particles (excluding pressure effects, see right)	small but real, and analyte dependent	minimal	minimal under isocratic elution, larger under gradient elution	considerable
sample capacity	good	good	much less	somewhat less	good
available phases	quite a few and growing	quite a few and growing	very limited	few but growing	quite a few

Tab. I- 3 : Comparaison des différentes approches possibles pour obtenir des analyses très rapides. Adapté de [95]

1. UHPLC et petites particules

Jusqu'en 2000, les colonnes à particules de 5µm de diamètre étaient majoritairement utilisées [96]. Des progrès ont été faits pour obtenir des particules sub 2µm. Etant donné la plus faible perméabilité, K_0 , des colonnes de plus fines particules (Eq. I- 11), les fabricants d'appareils ont dû développer des systèmes permettant de fonctionner sous des pressions plus élevées (>1000 bar).

$$K_0 = \frac{d_p^2}{\Phi} \quad \text{Eq. I- 11}$$

Avec d_p le diamètre des particules et Φ la résistance à l'écoulement de la colonne. La perméabilité intervient directement dans le calcul de la perte de charge selon l'Eq. I- 12.

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot u}{K_0} \quad \text{Eq. I- 12}$$

ΔP est la perte de charge entre l'entrée et la sortie de la colonne, η est la viscosité de la phase mobile, L est la longueur de la colonne, u la vitesse linéaire.

Comparé à la chromatographie en phase liquide classique, la technique d'UHPLC a permis de diviser par presque 10 avec une efficacité similaire le temps d'analyse pour des séparations à la vitesse optimale [97,98]. Il faut cependant préciser que ce gain est réduit lorsque l'on prend en compte les contraintes expérimentales [99] tel que le débit maximal de phase mobile, les longueurs de colonnes existantes et la dispersion générée par le système.

2. Particules de type core-shell

Les particules core-shell sont des particules contenant un noyau non poreux et sont recouvertes d'une couche poreuse comme représenté en Fig. I- 10.

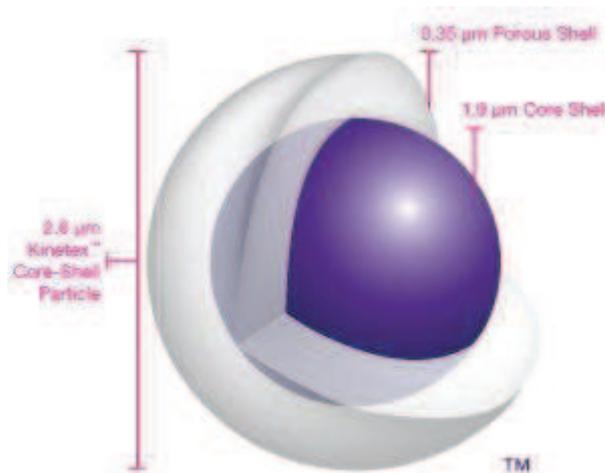


Fig. I- 10 : Schéma représentatif d'une particule de type core-shell (Kinetex 2.6 µm) [100]

L'idée d'utiliser des particules core-shell provient de Horvath, Lipsky et Kirkland [101,102]. Ce type de particules a récemment connu un essor important. Les particules core-shell sub-3 μm permettent d'obtenir, avec des composés neutres, une performance similaire aux particules sub-2 μm totalement poreuses tout en conservant une pression adaptée aux systèmes HPLC classiques [103,104,105].

La Fig. I- 11 compare des colonnes à particules core-shell et à particules totalement poreuses sub-2 μm pour l'analyse d'un mélange de peptides avec le TFA comme additif. Pour le même débit, des capacités de pics similaires de l'ordre de 145 ont été obtenues entre les deux types de particules. Cependant, la capacité de pics est mesurée à la moitié de la hauteur, ce qui ne tient pas compte d'éventuelles trainées de pics. La pression a été multipliée par deux lors de l'usage de particules totalement poreuses de 1.7 μm par rapport aux particules core-shell de 2.6 ou 2.7 μm .

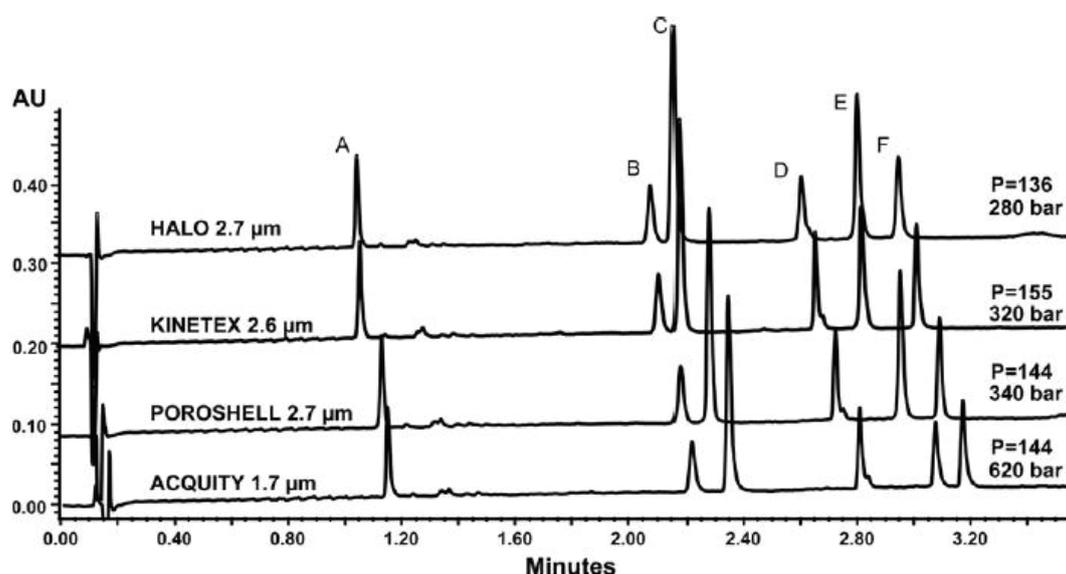


Fig. I- 11 : Chromatogrammes de (A) Arg-vasopressine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (B) peptide 1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (C) peptide 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (D) insuline (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (E) peptide 3 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (F) peptide 4 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) séparés avec trois colonnes de type core-shell : Halo C18 (50x2.1 mm d.i., 2.7 μm), Poroshell 120 EC-C18 (50x2.1 mm d.i., 2.7 μm), Kinetex C18 (50x2.1 mm d.i., 2.7 μm) et une colonne pour UHPLC : Acquity C18 BEH 120 (50x2.1 mm d.i., 1.7 μm). Conditions: Phase mobile A: 0.1% TFA (v/v) dans l'eau, phase mobile B: 0.1%TFA (v/v) dans ACN, de 5 à 50% ACN en 4 min, débit de 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$, UV 214 nm, 2 μL injecté, T = 50 °C [106]

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la grande performance de particules sub-3 μm de type core-shell [95]. (1) La distribution de la taille des particules est bien plus faible que pour les particules totalement poreuses. Cette distribution réduite pourrait réduire l'hétérogénéité axiale et radiale et ainsi réduire le terme A dans l'équation de Van Deemter (2) La porosité interne plus faible et la géométrie des particules core-shell permet de diminuer la diffusion longitudinale des analytes dans la phase stationnaire et ainsi de réduire le terme B dans l'équation de Van Deemter. (3) Ce qui encouragea le développement des particules core-shell est la longueur de diffusion réduite pour les analytes dans les particules core-shell par rapport aux particules totalement poreuses. Ceci pourrait accélérer le processus de transfert de

masse et ainsi réduire le terme de C de l'équation de Van Deemter. (4) La conductivité thermique des particules core-shell est meilleure que celle pour les particules totalement poreuses. (5) Les molécules de grand poids moléculaire et ainsi de faible coefficient de diffusion tels que les peptides, protéines et acides nucléiques peuvent bénéficier des cinétiques internes améliorées des particules core-shell.

3. HTLC (High temperature Liquid chromatography)

En 1965, Giddings [13] a comparé la vitesse en HPLC et en GC. Il a montré que la raison principale pour laquelle la GC est généralement plus rapide que l'HPLC est que la diffusion des analytes est plus rapide dans un gaz que dans un liquide. L'utilisation des conditions de haute température en HPLC conduit à la diminution de la viscosité de l'éluant et par conséquent à l'augmentation des coefficients de diffusion des composés dans l'éluant. Par ailleurs la perte de charge dans la colonne diminue (Eq. I- 12). L'effet de la température sur la viscosité d'éluants est présenté en Fig. I- 12.

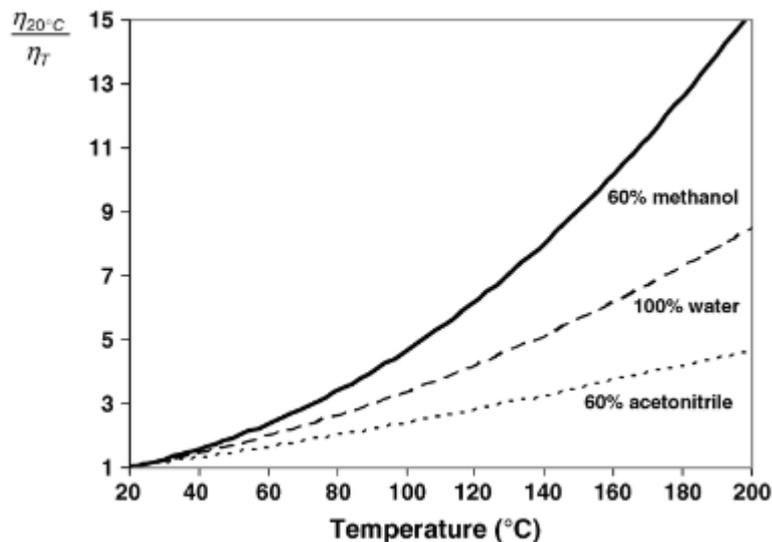


Fig. I- 12 : Effet de la température sur la réduction de la viscosité de trois différents éluants [107]

D'autres effets de l'augmentation de la température sont à noter tels que : le changement de force éluante et le changement de sélectivité [107].

L'augmentation de la température est néanmoins soumise à trois conditions pour conserver des formes de pics correctes : (1) La phase stationnaire doit être stable à la température d'analyse. (2) La phase mobile doit être préchauffée afin de supprimer l'écart thermique entre la phase mobile entrant dans la colonne et la phase mobile qui est dans la colonne. (3) Les analytes doivent être stables thermiquement durant le temps de l'analyse. Les phases stationnaires à base de silice ne supportent généralement pas des températures très élevées (souvent limitées à 60°C) mais des phases stationnaires à base d'oxyde métallique [108,109,110,111], carbone graphite poreux ou polymère organique permettent d'atteindre des températures supérieures à 150°C. Les écarts thermiques entre la phase mobile entrante et la phase mobile dans la colonne sont minimisés par l'ajout d'un préchauffage de la phase

mobile avant l'entrée dans la colonne afin de garder un écart de moins de 5% entre les températures. Pour certains analytes thermolabiles, la diminution du temps de séjour du composé permet de réduire ces problèmes de stabilité [112]. Le temps de séjour des composés dans la seconde dimension d'une analyse LCxLC étant très faible, est à priori moins critique qu'en analyse unidimensionnelle où le temps de séjour des composés est plus long.

L'augmentation de la température est un moyen efficace pour réduire le temps d'analyse comme on peut le constater sur la Fig. I- 13 (c et d). En effet, la diminution de la viscosité de la phase mobile permet de réduire la pression dans la colonne et donc d'augmenter le débit pour retrouver la même pression. L'utilisation de particules sub-2 μm associée à un appareillage UHPLC est aussi un moyen de réduire le temps d'analyse comme montré sur la Fig. I- 13 (b et d). La combinaison haute température et haute pression (HT-UHPLC) permet donc de réduire encore le temps d'analyse (Fig. I- 13 (a et d)).

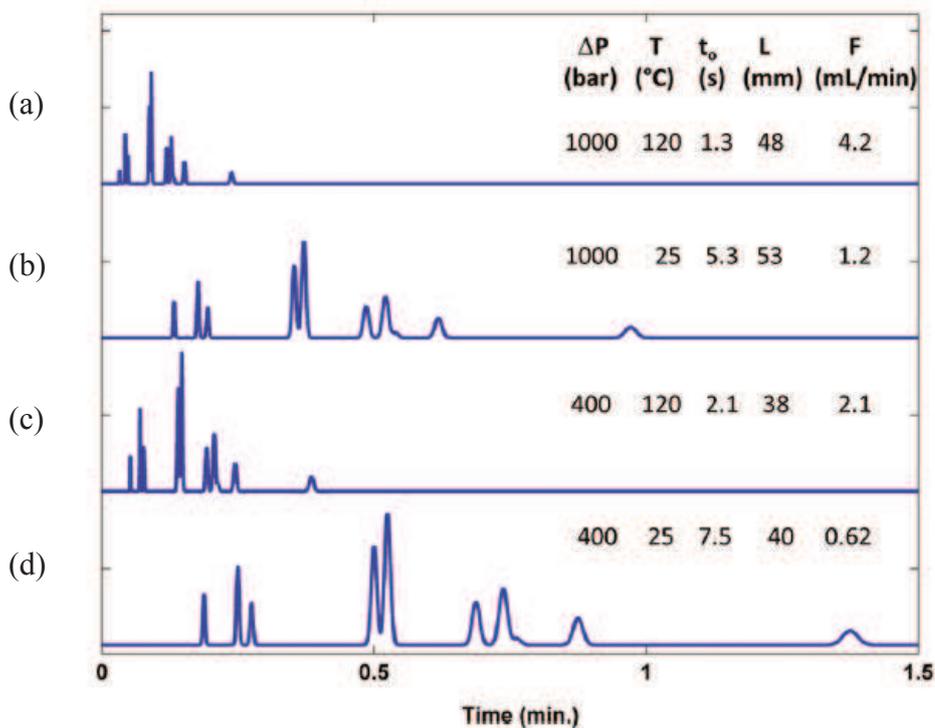


Fig. I- 13 : Analyses isocratiques rapides simulées pour un mélange de 10 constituants à nombre de plateaux, rétention et sélectivité constants. Les longueurs de colonne optimale et les débits ont été calculés pour des colonnes de 2.1 d.i. pour différentes combinaisons de température de colonne et de pression maximale en utilisant des particules totalement poreuses 1.8 μm pour obtenir la séparation la plus rapide générant 10 000 plateaux. Les effets de la température et de la pression sur la sélectivité sont négligés dans cette simulation. [95]

II- Mode RPLC

En RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography), la phase stationnaire utilisée est de type apolaire, généralement une phase à base de silice greffée avec des groupements apolaires. Les phases mobiles employées sont généralement des mélanges eau-acétonitrile ou eau-méthanol avec un ajout éventuel d'additif de pH si les composés d'intérêt sont ionisables.

Le mode RPLC est le mode de séparation en chromatographie en phase liquide le plus employé étant donné ses nombreux avantages [18]: (1) efficacités importantes, (2) sélectivité chimique (3) bonne reproductibilité (4) possibilités d'applications à de nombreuses classes de composés [113,114].

Différentes raisons permettent de choisir le mode RPLC pour une première ou seconde dimension d'une analyse bidimensionnelle LCxLC. 85% des séparations chromatographiques sont réalisées en RPLC car ce mode permet d'obtenir des séparations de grandes capacités de pics de mélanges variés pour des composés moyennement polaires à apolaires. De nombreuses phases stationnaires commerciales sont disponibles pour la RPLC. La chromatographie à polarité des phases inversées peut être directement couplée à un détecteur spectromètre de masse. Même si des décalages en rétention peuvent être constatés, le mode RPLC est largement plus reproductible que d'autres modes tels que le mode NPLC (Normal Phase Liquid Chromatography) [18].

Le mode RPLC est la méthode de choix pour le couplage avec la spectrométrie de masse pour l'analyse de digestions tryptiques [115]. Néanmoins, le mode RPLC ne permet pas de retenir des composés très polaires puisque les interactions sont majoritairement de type hydrophobe. Pour ce type de composés, le mode HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) peut être envisagé.

III- Mode HILIC

En HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), la phase stationnaire est de type polaire, à base de silice non greffée ou greffée avec des groupements polaires. Le mode HILIC est proche du mode NPLC. Mais contrairement au mode NPLC où les phases mobiles sont constituées exclusivement de solvants organiques, les phases mobiles en HILIC sont généralement des mélanges eau-acétonitrile auxquels on peut ajouter des additifs permettant de fixer la force ionique. Li et Huang ont comparé différents solvants tels que l'acétonitrile, le THF, le méthanol et l'isopropanol et ont rapporté que l'acétonitrile conduisait à une meilleure résolution et rétention de l'épirubicine et de ses analogues [116].

Bien que le mode HILIC soit apparu depuis quelques dizaines d'années [117], le mécanisme serait basé sur un phénomène de partage [117,118] mais est toujours discuté [119,120]. Il est ainsi difficile de prédire la rétention des solutés. De plus, le champ d'application du mode HILIC est plus restreint qu'en RPLC puisque les composés neutres et non-polaires sont très peu retenus en HILIC. Les composés chargés négativement peuvent quand à eux subir une répulsion électrostatique avec les silanols chargés de la silice. Par ailleurs, le mode HILIC est potentiellement moins bon pour l'environnement puisque les phases mobiles sont plus riches en solvant organique qu'en RPLC.

Malgré ces inconvénients, il existe de nombreux avantages à utiliser le mode HILIC lorsque les composés le permettent [121]. En effet, les pics des composés basiques sont assez symétriques et la sensibilité en spectrométrie de masse est meilleure étant donné la haute teneur en solvant organique qui favorise l'ionisation des composés. L'ordre d'éluion des

solutés est généralement très différent de celui obtenu en RPLC permettant d'avoir une sélectivité alternative. Les composés très polaires sont retenus en HILIC alors qu'ils sont souvent très peu retenus en RPLC. Pour finir, les débits atteints en HILIC sont plus élevés qu'en RPLC, la viscosité étant plus faible.

Dans une étude de Gilar et coll. [122] concernant les digestions tryptiques de protéines, il a été montré que l'HILIC pouvait produire une meilleure capacité de pics par rapport à l'échange de cation (SCX) et à l'exclusion stérique (SEC) ; la capacité de pics générée en HILIC est ainsi inférieure uniquement à celle obtenue en RPLC comme indiqué dans le Tab. I- 4.

	RP-C18 pH 2.6	RP-C18 pH 10	SCX pH 3.3	HILIC pH 4.5	SEC pH 4.5
Peak width (4 σ)	0.35	0.35	0.6	0.4	1.0
Analysis time (min)	40	40	30	31	13
PC	115	115	51	79	14

Tab. I- 4 : Capacité de pics pratique des différents modes chromatographiques pour l'analyse de digestions tryptiques de protéines (PC signifie capacité de pics) [115]

Lorsque les méthodes RPLC-MS sont insuffisantes pour séparer des échantillons complexes, les méthodes multidimensionnelles deviennent nécessaires, en particulier dans le domaine de la recherche protéomique. Dans ce domaine, le mode HILIC peut être une alternative prometteuse aux méthodes traditionnelles utilisant l'échange de cations. Ainsi le couplage des modes HILIC et RPLC sera étudié et comparé avec le couplage RPLCxRPLC.

E- DIFFICULTES DE LA MISE EN PLACE D'ANALYSES BIDIMENSIONNELLES

Différentes difficultés sont rencontrées à la mise en place d'analyses bidimensionnelles: (1) Suivant la combinaison des modes utilisés en première et seconde dimension, des effets à l'injection conduisant à des déformations de pics peuvent être observés; (2) L'optimisation des conditions ou dimensionnement du système bidimensionnel est indispensable afin d'obtenir les meilleures performances; (3) Un problème majeur en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle est le traitement des données. Ce traitement est bien plus compliqué qu'en analyse unidimensionnelle car les analyses bidimensionnelles génèrent des données en trois dimensions (détecteur UV) ou parfois en quatre dimensions (détecteur à barrette de diode ou détecteur à spectromètre de masse). De plus, le couplage d'un système bidimensionnel et d'un spectromètre de masse pose problème pour de nombreuses raisons telles que l'utilisation de débits de phase mobile très élevés en LCxLC et la nécessité d'avoir des fréquences d'acquisition importantes. Tout ces points sont détaillés dans cette partie afin de connaître les problèmes rencontrés lors de la mise en place d'analyses LCxLC.

I- Les effets à l'injection

Etant donné les contraintes liées au dimensionnement du système bidimensionnel, des volumes importants sont souvent injectés en seconde dimension, bien supérieurs aux volumes habituellement employés lors d'analyse unidimensionnelle (de l'ordre de 1% du volume mort de la colonne).

Différents effets à l'injection peuvent être observés selon les conditions de phases mobiles utilisées: (1) problème de miscibilité entre les deux phases mobiles [123]. Ce cas peut être rencontré lors de couplages entre les modes NPLC et RPLC par exemple. Par contre, en RPLC et en HILIC, les mêmes solvants sont utilisés dans les deux modes (2) problème lié à une différence de viscosité; (3) problème liés à une différence de force éluante.

1. Effets liés à une différence de viscosité

Un phénomène appelé « viscous fingering » (digitation visqueuse) intervient lorsque deux fluides de viscosité différente se rencontrent. Collins a constaté que dans une colonne chromatographique, l'interface entre deux fluides peut devenir instable si le fluide le moins visqueux pousse le plus visqueux [124]. Guiochon et Shalliker ont montré que cet effet d'instabilité intervenait aussi dans le cas inverse [125]. Néanmoins, il est encore difficile de montrer l'influence directe de la viscosité sur la déformation des pics et surtout de la quantifier. Plusieurs facteurs semblent contribuer à cet effet de « viscous fingering » tels que la viscosité de chacun des fluides, le volume injecté du soluté, le débit d'injection et le facteur de rétention [126].

2. Effets liés à une différence de force éluante

Layne et coll. ont cherché à montrer que c'est la différence de force éluante entre le solvant d'injection et la phase mobile et non pas la différence de viscosité entre le solvant d'injection et la phase mobile qui conduit à des déformations de pics [127]. En effet, comme le montre la Fig. I- 14, l'ajout de PEG qui modifie la viscosité pour le chromatogramme C n'apporte pas de modifications de la forme des pics par rapport au chromatogramme B. La détérioration de la forme des pics entre les chromatogrammes A et B est donc uniquement dû à un effet de force éluante entre le solvant d'injection et la phase mobile. Il semble donc que ce soit la principale cause de déformation des pics en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle.

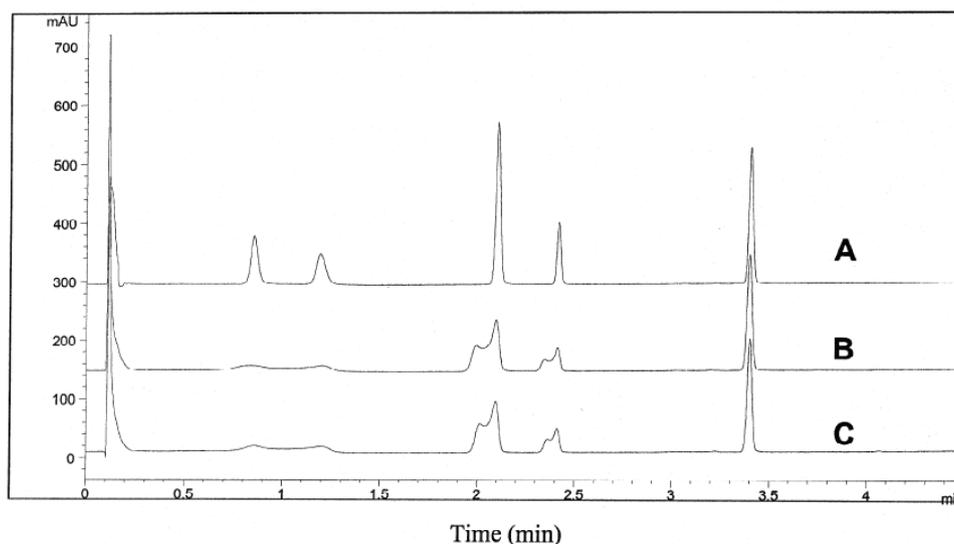


Fig. I- 14 : Effet de l'ajout de PEG-600 pour compenser la diminution de viscosité du solvant d'injection. (A) Echantillon dilué dans l'eau, (B) Echantillon dilué dans 66% acétonitrile, (C) Echantillon dilué dans eau-acétonitrile-PEG600 (1:2:2). Luna C18 30x2.0 mm 3µm. Gradient de 5 à 95 % acétonitrile (0.1% acide formique) en 4.5min à 1mL/min. volume injecté : 20 µL [127]

Une étude qualitative a été menée en HILIC pour de faibles volumes injectés [128]. Il apparaît sur la Fig. I- 15 que les pics peuvent être plus ou moins déformés selon le solvant d'injection. Ainsi, l'utilisation d'un solvant d'injection 50/50 ACN/eau (cas C) par rapport à 95/5 ACN/eau (cas A) conduit à des déformations très importantes. Ce type de conditions d'injection est typique dans le cas de systèmes RPLCxHILIC. De même, l'utilisation d'un solvant d'injection méthanol/eau dans la première dimension d'une analyse RPLCxHILIC ne serait sans doute pas satisfaisante (cas B) avec une phase mobile acétonitrile/eau en HILIC.

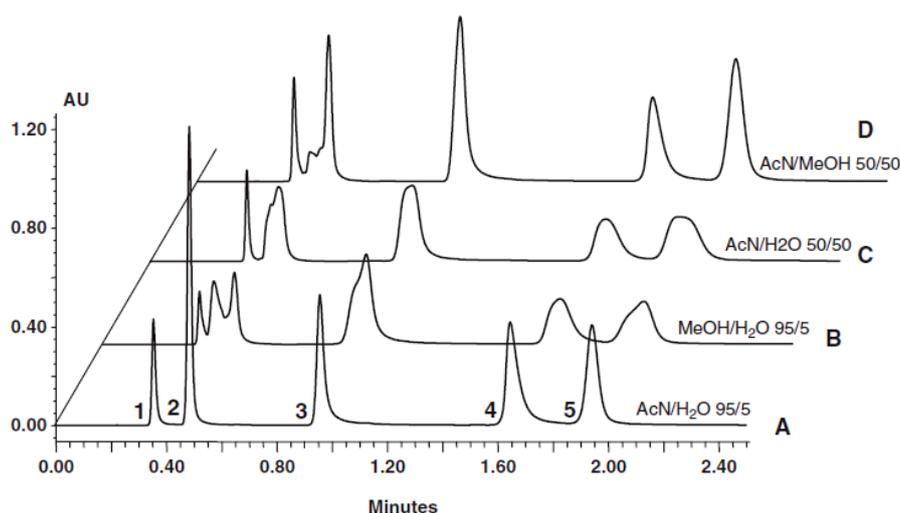


Fig. I- 15 : Effet du type et de la proportion d'éluant organique dans le solvant d'injection pour un mélange à 50µg/mL d'acénaphthène (1), uracile (2), hypoxanthine (3), adénine (4), cytosine (5), La composition est indiquée à droite. Conditions : Acquity BEH HILIC 50x2.1 mm 1.7 µm, 5% Formate d'ammonium 5mM pH3.0 / 95% acétonitrile [128]

Il a été établi théoriquement et montré expérimentalement en RPLC que la largeur additionnelle d'un pic d'un soluté donné (sans prendre en compte les phénomènes de dispersion dans la colonne) était donnée par l'équation suivante [129,130]:

$$\Delta t = t_{inj} \times \frac{k_e}{k_s}$$

Équation 1

Où t_{inj} est la durée du créneau d'injection, k_e et k_s les facteurs de rétention du soluté à l'élution et dans le solvant d'injection respectivement. Les chromatogrammes obtenus en isocratique et en gradient sont présentés en Fig. I- 16 et Fig. I- 17 respectivement. On constate effectivement sur la figure, que plus le volume injecté et/ou le rapport k_e/k_s est important, plus l'effet d'élargissement est accentué.

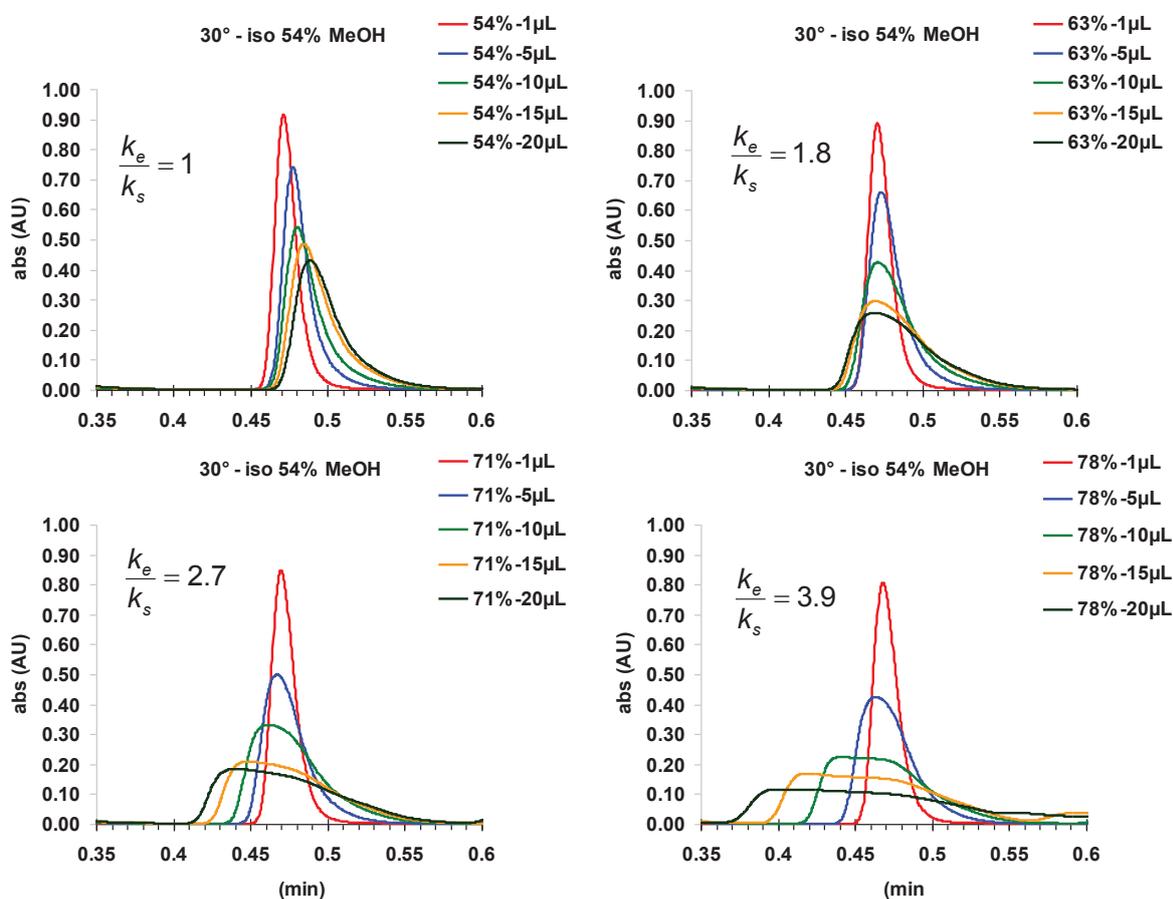


Fig. I- 16 : Mise en évidence de l'élargissement de pic de méthylparabène du à une augmentation du rapport k_e/k_s . Colonne Acquity BEH C18 50x2.1mm 1.7 μm. Phase mobile Eau/méthanol en isocratique à 54% de méthanol avec différents teneurs dans le solvant d'injection (54% 63% 71% et 78 % de MeOH) pour des volumes injectés de 1 à 20 % du volume mort de la colonne. F=0.5 mL/min.

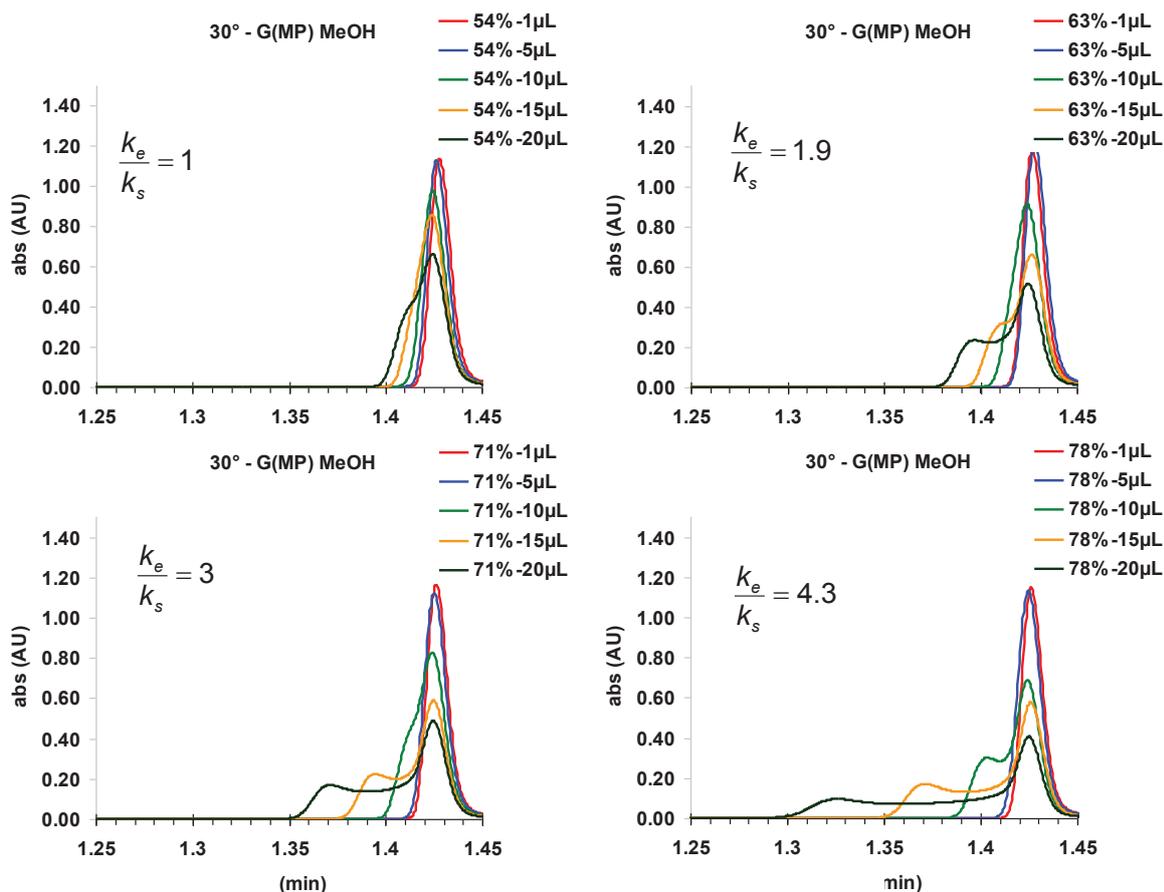


Fig. I- 17 : Mise en évidence de l'élargissement de pic de méthylparabène du à une augmentation du rapport k_e/k_s . Colonne Acquity BEH C18 50x2.1mm 1.7 μ m. Phase mobile Eau/méthanol en gradient de 5 à 85% de méthanol en 1.65 min avec différentes teneurs dans le solvant d'injection (54% 63% 71% et 78 % de MeOH) pour des volumes injectés de 1 à 20 % du volume mort de la colonne. $F=0.5$ mL/min.

Dans certains cas, le pic chromatographique se sépare en deux pics distincts : un pic étant proche du temps mort et le second correspondant à la rétention normale du composé. Ce phénomène est nommé « breakthrough » et a surtout été rencontré en chromatographie d'exclusion stérique avec les polymères [131,132,133]. Ce phénomène a aussi été rencontré avec le mode HILIC et provient selon Jandera et coll. de la division des molécules de solutés après injection dans la colonne qui migreraient soit avec la phase mobile, soit seraient retenus sur la phase stationnaire [134]. Ce phénomène de breakthrough a été récemment rencontré lors d'une analyse HILICxRPLC et a été résolu par l'utilisation de colonnes de trapping à la place des boucles habituellement utilisées sur les vannes d'interface entre la 1^{ère} et la 2^{nde} dimension [135].

II- Dimensionnement des analyses bidimensionnelles

Le nombre de paramètres intervenant dans une analyse bidimensionnelle étant bien plus élevé que dans une analyse unidimensionnelle, le développement de méthode est plus complexe. De plus, les paramètres sont souvent liés et une modification sur l'un conduit souvent à des modifications sur d'autres [136]. Ainsi, une optimisation globale permettant de

choisir judicieusement les valeurs de ces paramètres semble impérative pour obtenir le dimensionnement correct d'une analyse bidimensionnelle.

Selon Bedani, Schoenmakers et Janssen [137], les descripteurs d'une séparation bidimensionnelles sont le pouvoir de résolution, le temps d'analyse et la limite de détection. Ainsi, la recherche de conditions chromatographiques doit se faire de manière à trouver un optimum pour ces trois paramètres. Pour conserver la capacité de pics obtenue en première dimension, le fractionnement des pics doit être assez rapide pour collecter suffisamment de fractions par pic (un minimum de 2 à 3 comme il a été dit précédemment). Cependant, ce temps d'échantillonnage est directement lié au temps de gradient de la seconde dimension et doit donc être suffisant pour que la capacité de pics en seconde dimension soit conséquente. Ainsi, un compromis doit être trouvé en LCxLC entre des pertes de capacités de pics causées par un sous-échantillonnage et des séparations de seconde dimension très courtes. De plus, le volume transféré dans la seconde dimension doit aussi être optimisé sous peine de réduire la capacité de pics en seconde dimension ou de réduire la sensibilité. En effet, des injections de volume important peuvent conduire à des élargissements et à des déformations de pics. Au contraire, des injections de faible volume peuvent conduire à une dilution importante et donc une perte de sensibilité. Le volume injecté peut être optimisé indépendamment du temps d'analyse en modifiant le débit de première dimension.

Différentes approches de dimensionnement d'analyses 2D permettant de trouver des compromis ont été publiées. Le dimensionnement peut se baser sur les courbes de Poppe [138] ou sur une méthode optimale de Pareto [139]. La méthode Pareto semble être meilleure que la méthode basée sur les courbes de Poppe puisqu'elle s'adapte mieux à des optimisations simultanées de différents paramètres et est plus générale [137].

Au contraire, les deux dimensions peuvent être optimisées quasiment indépendamment si un split est utilisé entre la première et la seconde dimension [140]. Ainsi, en utilisant un débit plus élevé en première dimension, le temps d'analyse peut être réduit et la capacité de pics augmentée en faisant ensuite un split entre les deux dimensions. En contrepartie, la sensibilité est diminuée mais de plus gros volumes peuvent être injectés en compensation. Le volume injecté en seconde dimension est ainsi choisi de manière indépendante.

III- Couplage à la spectrométrie de masse

L'utilisation d'un détecteur UV (ou à barrette de diode) lors d'une analyse bidimensionnelle permet de visualiser la séparation si les composés comportent des groupements chromophores. Lorsque ce n'est pas le cas, ou si l'on souhaite identifier des composés, la spectrométrie de masse est nécessaire. Le couplage d'un spectromètre de masse à un système bidimensionnel ne se fait pas aussi facilement qu'avec un système de type HPLC puisque le couplage UHPLC-MS est plus compliqué. En effet, l'utilisation de colonnes à volume plus restreint va augmenter l'impact des dispersions et de grandes fréquences d'acquisitions vont devoir être utilisées étant donné la finesse des pics en UHPLC.

1. Systèmes LC-MS traditionnels

La source d'ionisation la plus utilisée pour le couplage LC-MS est l'électrospray (ESI). Le débit de phase mobile provenant du système chromatographique doit être généralement compris entre 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Malgré tout des débits plus élevés peuvent être envoyés vers le spectromètre de masse en augmentant le débit d'azote séchant. Des analyses LC-MS à haut débit ont été rapportées [141]. Néanmoins, l'utilisation de débits élevés de phase mobile se fait souvent au détriment de la sensibilité. Les conditions de type UHPLC (colonnes à particules de 1.7 μm avec des colonnes de 2.1 mm di.) sont donc plus difficilement compatibles qu'avec des colonnes de type HPLC (particules de 5 μm), avec des débits généralement au-delà de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2. Compatibilité de débit de phase mobile

Des solutions existent pour permettre de résoudre cette incompatibilité de débit. En effet, il est possible d'ajouter une jonction-T en sortie de colonne UHPLC pour laisser passer vers le spectromètre de masse un débit réduit [142]. De plus, devant l'essor de l'UHPLC depuis 2004, les fabricants de spectromètres de masse ont cherché des solutions techniques. Ainsi, certaines sources d'ionisation ont évolué pour mieux permettre la nébulisation de la phase mobile. Une revue de 2012 [143] a fait le point sur le matériel récent existant. Des systèmes permettent ainsi de nébuliser la phase mobile avec des températures jusqu'à 750 °C ou des débits de gaz jusqu'à 1200 L/h. Certaines sources d'ionisation seraient compatibles avec des débits jusqu'à 3 mL/min et permettraient la vaporisation de mélanges hydro organiques de solvants de 100% aqueux à 100% organique. Ces spécifications particulièrement intéressantes n'existent que sur la dernière génération d'instrument de spectrométrie de masse. Pour les systèmes plus anciens, l'utilisation de split peut permettre de coupler un système UHPLC à un système MS. Néanmoins, la perte de performance chromatographique générée par le split doit être étudiée [143]. Une autre solution pourrait être d'utiliser des colonnes de 1 mm de diamètre interne pour avoir des débits de l'ordre de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ en UHPLC. Mais la contribution de la spectrométrie de masse à l'élargissement de pic pour les colonnes de 1 mm de diamètre interne n'est pas négligeable comme expliqué ci-dessous.

3. Contribution de la MS à la dispersion externe

Puisque les volumes de colonnes utilisées en UHPLC sont largement plus faibles que ceux utilisés généralement en HPLC, la dispersion extra-colonne devient vite considérable par rapport à la dispersion créée dans la colonne. Ainsi les constructeurs d'appareils UHPLC ont cherché à minimiser cette dispersion. Malgré tout, il a été montré que la dispersion due au système MS est non négligeable et bien plus conséquente que la dispersion créée dans un détecteur UV. Par exemple, dans une étude de 2009 [144], la dispersion UHPLC-UV a été estimée à 10 μL^2 alors que la variance de dispersion UHPLC-MS a été estimée à 70 μL^2 .

Le pourcentage de plateaux restants pour des colonnes de 2.1 mm d.i. et 1.7 μm pour des analyses UHPLC-MS est présenté en Fig. I- 18. Des pertes significatives d'efficacité sont

observées pour les facteurs de rétention les plus faibles avec les colonnes les plus petites. L'appareil le plus récent (variance de dispersion additionnelle de 5-10 μL^2) permet de mieux maintenir l'efficacité par rapport à l'appareil le plus ancien (variance de dispersion additionnelle 30-65 μL^2).

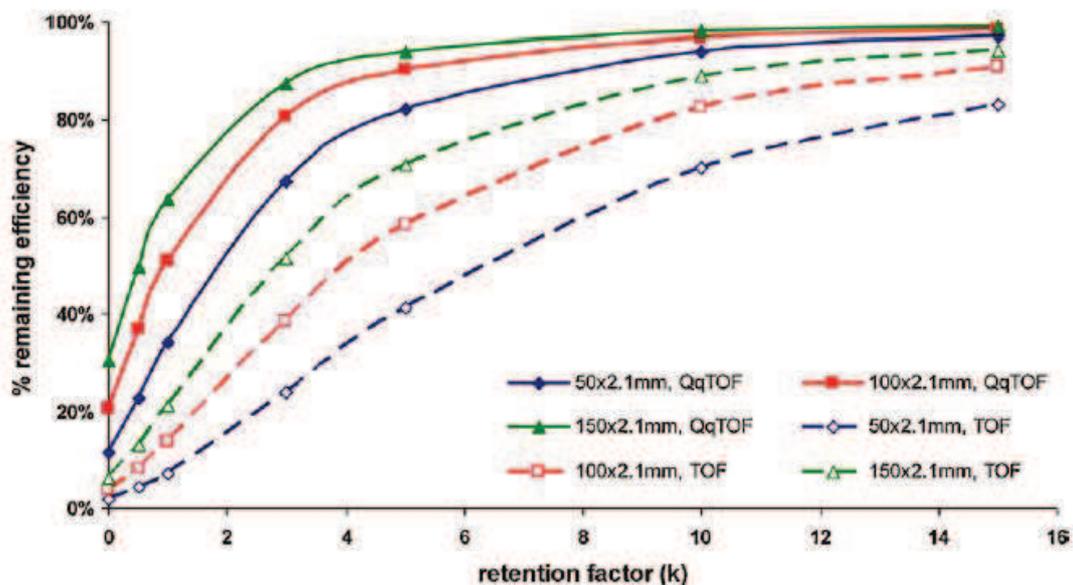


Fig. I- 18 : Pourcentage d'efficacité restante en UHPLC-MS pour des facteurs de rétention compris entre 0.5 et 15. Deux systèmes MS ont été considérés (TOF/MS ancienne génération et QqTOF/MS nouvelle génération) avec trois colonnes de longueurs différentes (50, 100, 150 mmx2.1 mm, 1.7 μm) [143]

4. Fréquence d'acquisition en spectrométrie de masse

Pour qu'un pic soit correctement défini et puisse être quantifiable, il est admis usuellement qu'un minimum de 10 à 15 points par pics est nécessaire. Alors que les pics chromatographiques obtenus en HPLC ont des largeurs de l'ordre de 10 secondes ou plus, les largeurs de pics observées en UHPLC peuvent être réduites à 1 seconde ou moins [145]. Il peut être difficile d'avoir suffisamment de points par pic chromatographique en UHPLC-MS suivant le spectromètre de masse employé et les réglages choisis.

Les spectromètres de masse peuvent opérer sous différents modes. Les plus simples spectromètres de masse (simple quadripôle) peuvent être utilisés en SIM (Single Ion Monitoring) ou en Scan. En SIM, les ions choisis au préalable sont filtrés lors de l'analyse et le nombre d'ion est compté pendant un temps donné (dwell time). La mesure se fait de manière séquentielle, de la masse la plus petite à la plus grande. Ainsi un temps additionnel est nécessaire entre chaque mesure. En scan, les ions de toutes les masses sont comptés en même temps sur la gamme de masse choisie. Un troisième mode qui est le SRM (Selected Reaction Monitoring) peut être utilisé avec d'autres types de spectromètres de masse tels que le triple quadripôle. Dans ce cas là, les ions sont filtrés deux fois : l'ion précurseur est sélectionné dans le premier quadripôle puis il est fragmenté dans la cellule de collision et les fragments spécifiques sont ensuite suivis dans le troisième quadripôle. Le type d'analyseur le

plus rapide est le système à temps de vol (TOF) qui permet d'atteindre les fréquences d'acquisition les plus élevées en scan (jusqu'à 200 spectres par seconde).

Les appareils de spectrométrie de masse de dernière génération permettent d'atteindre de grandes fréquences d'acquisition. Le couplage avec l'UHPLC et donc la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle est donc possible. En particulier, les simples quadripôles peuvent être utilisés pour les analyses ciblées et les analyses quantitatives. Les systèmes à temps de vol et triple quadripôle doivent être privilégiés dans le cas d'analyses non ciblées.

Finalement, le couplage UHPLC-MS est tout à fait possible et donc à fortiori le couplage LCxLC-MS aussi. Les systèmes MS les plus récents doivent être privilégiés afin d'atteindre de grandes fréquences d'acquisition, de minimiser la dispersion et de favoriser la nébulisation de la phase mobile à haut débit. Il faut noter que l'intérêt d'analyser un échantillon en LCxLC-MS par rapport à la LC-MS est de réduire les effets de suppression d'ionisation qui peuvent intervenir dans la source MS lorsque plusieurs composés s'ionisent en même temps.

IV- Traitement des données

Un des problèmes majeur en chromatographie en phase liquide bidimensionnelle est l'augmentation de la complexité du traitement des données par rapport à des analyses unidimensionnelles. En effet, les données obtenues sont sous forme de matrice (3 dimensions) ou même en 4 dimensions dans le cas de l'utilisation d'un détecteur multi canal (spectromètre de masse ou détecteur à barrette de diode). De plus, une quantité importante d'information est obtenue pendant un temps d'analyse relativement court. Devant la complexité et la quantité des données, il est impératif d'utiliser des outils informatiques pour traiter les chromatogrammes [146].

Suivant les systèmes chromatographiques, l'acquisition des données peut se faire en continu ou de manière discontinue. Dans ce dernier cas, le système démarre une nouvelle acquisition à chaque rotation de vanne. De nombreuses étapes de traitement des données sont nécessaires avant d'obtenir le chromatogramme final. Cependant, le traitement peut différer selon le but recherché de l'expérience et doit être adapté [147].

Trois approches peuvent être utilisées pour traiter les données chromatographiques 2D [146]. La première approche qui est la plus répandue, consiste à traiter les données fraction par fraction. La seconde prend en compte la globalité des données et est basée sur les vecteurs et des tenseurs du second ou troisième ordre. La troisième approche est la transformation des données en fichier image. Le traitement se fait alors par traitement d'image. L'avantage de la première méthode est qu'elle permet d'utiliser les outils classiques employés en LC-1D. Néanmoins, cette approche devient vite compliquée et nécessite l'utilisation d'algorithmes chimiométriques complexes dans le cas de traitement de données à 4 dimensions. Bien que nécessitant des méthodes de traitement d'image, la dernière approche donne de bons résultats et est actuellement disponible sous forme de logiciel commercial.

1. Alignement des pics

Les pics obtenus en seconde dimension doivent être alignés pour que les pics correspondant au même composé aient le même temps de rétention. Les décalages observés peuvent provenir d'un chemin supplémentaire sur la vanne selon le choix de configuration de la vanne mais aussi d'une variation de pression ou de température, d'une dégradation de la phase stationnaire ou d'effets de matrice [146]. De nombreuses méthodes d'alignement [148,149,150,151,152,153,154] sont utilisées mais aucune méthode n'est reconnue comme étant la plus efficace. D'ailleurs, aucune de ces méthodes ne permet de traiter des données obtenues avec des détecteurs multicanaux (MS et DAD). Récemment, Allen et coll. ont développé un algorithme adapté à la détection UV multi-longueur d'onde qui permet de traiter des données à 4 dimensions de manière satisfaisante [155].

2. Affectation des pics de seconde dimension

Pour la deuxième étape du traitement des données, les pics de première dimension doivent être reliés au chromatogramme de seconde dimension afin de trouver les correspondances entre les pics et d'affecter les identifications. Une méthode [156] est basée sur la détection de pic en deux temps : chaque pic de première dimension est détecté avec les outils classiques de traitement unidimensionnel et les pics correspondant en seconde dimension sont ensuite recherchés.

Dans le cas de traitement des données à partir d'une image, Reichenbach et coll. [157] utilisent un algorithme nommé ligne de partage des eaux qui permet de détecter à partir des pixels le sommet du pic puis l'algorithme continue sa progression autour du pic jusqu'à atteindre la ligne de base avec le bruit de fond.

Ces deux possibilités de traitement ont été comparées. Selon les conditions opératoires, l'une ou l'autre des méthodes a été montrée comme plus efficace [158,159]. Néanmoins, dans les deux cas ces algorithmes fonctionnent mieux lorsqu'à la fois le bruit de fond et la largeur des pics sont assez faibles.

Des méthodes à base d'outils chimiométriques ont aussi été développées mais leur application n'est pas directe car elles sont basées sur des concepts mathématiques avancés et que beaucoup de précautions doivent être prises avant d'appliquer de tels outils [146].

3. Correction du bruit de fond

Comme expliqué ci-dessus, la correction du bruit de fond peut être déterminante pour l'utilisation de certains outils de traitement. Une dérive de la ligne de base plus ou moins importante peut être observée en gradient et doit être corrigée afin de pouvoir visualiser les pics sur toute la plage de gradient lors de la représentation des données. En effet, un seuil est par la suite défini pour différencier les pics du bruit de fond. Si la dérive de ligne de base n'est pas corrigée, le signal ne sera pas au même niveau tout au long du chromatogramme. Cette dérive peut être corrigée par simple soustraction du blanc mais peut aussi être corrigée plus précisément par d'autres méthodes telles que la méthode OBGC de correction du bruit de

fond orthogonale [160]. Cette méthode est appliquée en deux étapes : Premièrement, une méthode spécifique est appliquée à tous les points de seconde dimension pour recréer le bruit de fond de l'analyse bidimensionnelle. Deuxièmement, ce bruit de fond généré est soustrait du chromatogramme LCxLC et permet d'obtenir un chromatogramme LCxLC avec pas ou peu de bruit de fond.

Une autre méthode plus commune est d'effectuer un blanc d'analyse LCxLC, puis de faire l'analyse LCxLC avec l'échantillon et de soustraire le signal de la première analyse à la seconde [160]. Cette méthode est plus facile d'un point de vue du traitement des données mais nécessite une analyse LCxLC supplémentaire et ne peut être utilisée que si le signal du bruit de fond est répétable.

4. Représentation des données

La représentation des données peut se faire soit en 3 dimensions soit en 2 dimensions. La représentation en 3 dimensions se rapproche plus de la visualisation habituelle que l'on peut avoir en chromatographie unidimensionnelle puisqu'on observe des pics chromatographiques avec des hauteurs et des largeurs. La représentation en 2 dimensions est la vue de dessus du chromatogramme en 3 dimensions. Les intensités des pics (hauteur) sont représentées sous forme de couleur et on obtient ainsi une cartographie des rétentions des composés selon les deux dimensions. Un exemple de représentation 2D et 3D est présenté en Fig. I- 19.

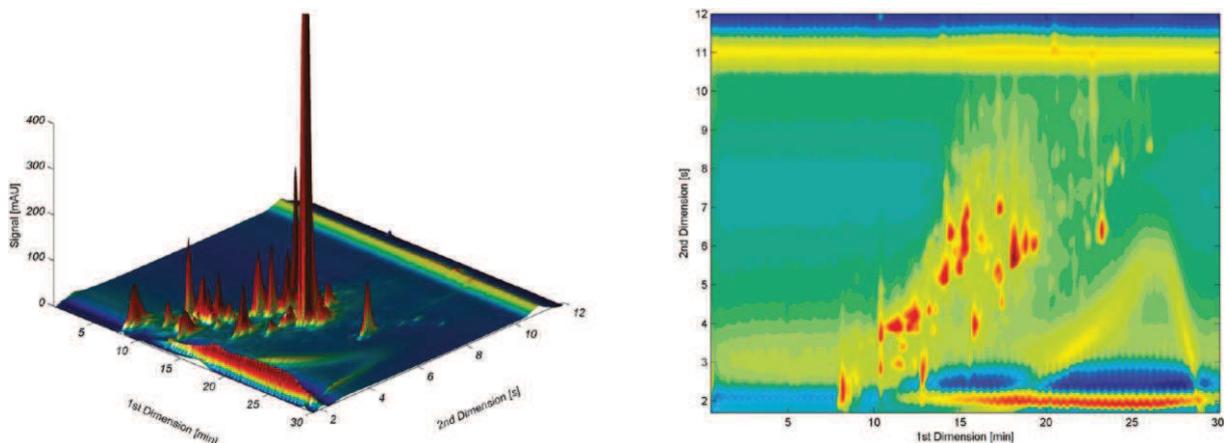


Fig. I- 19 : Représentation 3D et 2D d'un extrait de maïs [161]

CONCLUSIONS

La capacité de pics est limitée en chromatographie en phase liquide unidimensionnelle à environ 1500 pour l'analyse de peptides. La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle est une technique adaptée pour l'analyse d'échantillons complexes et permet de dépasser cette limite en termes de capacité de pics. Différents modes existent : le mode hors ligne, en ligne et à débit stoppé. De meilleures capacités de pics peuvent être atteintes en mode hors ligne mais le mode en-ligne est automatisable et moins consommateur de temps. Le mode LCxLC (total et en ligne) a donc été choisi devant les avantages que ce mode procure.

Le calcul d'orthogonalité permet de sélectionner des systèmes potentiellement intéressants d'un point de vue sélectivité. Néanmoins, le descripteur de qualité d'une analyse LCxLC est la capacité de pics bidimensionnelle qui donne une estimation du pouvoir de séparation de l'analyse 2D. L'usage de R^2 ou s^2 pour les comparaisons d'orthogonalité entre systèmes est dangereux puisque les valeurs obtenues ne reflètent pas l'occupation de l'espace. Il sera donc nécessaire de définir un nouveau descripteur permettant de comparer les systèmes de manière fiable. Il est important de bien distinguer les capacités de pics théoriques et pratiques puisque les conditions d'application de la formule permettant de calculer la capacité de pics théorique ne sont jamais remplies.

Différents choix stratégiques ont été effectués. Les méthodes ultra-rapides doivent être privilégiées en seconde dimension. Pour cela, l'utilisation d'un système chromatographique pouvant analyser des échantillons à haute pression et haute température est primordiale (UHPLC et HTLC). Des colonnes à particules totalement poreuses de type sub-2 μ m et core-shell de type sub-3 μ m pourraient permettre d'obtenir des séparations rapides et efficaces. Le gradient d'éluion doit être utilisé dans les deux dimensions puisque les capacités de pics obtenues en gradient sont bien plus importantes qu'en isocratique. Les modes RPLC et HILIC sont intéressants à coupler lors d'une analyse bidimensionnelle puisqu'ils permettent de retenir différents types de composés et que le mode de séparation est différent. Les expériences seront mises en place en considérant toutes ces conditions choisies.

Cette étude du contexte a permis de mettre en évidence de nombreuses difficultés à la mise en place d'analyses bidimensionnelles. Des effets à l'injection plus ou moins importants peuvent intervenir suivant les conditions employées dans les deux dimensions. Les limites en termes de volume injecté en seconde dimension devront donc être établies afin de limiter les élargissements de pics liés à l'injection. L'utilisation d'un split entre les deux dimensions est une alternative qu'il faudra étudier. Le couplage du système bidimensionnel avec la spectrométrie de masse peut être problématique suivant le type de spectromètre. Il faudra prendre garde à obtenir une fréquence d'acquisition suffisante et une dispersion additionnelle dans le spectromètre de masse limitée. Le traitement des données LCxLC-UV et LCxLC-MS est compliqué et peu de logiciels sont développés. Il sera nécessaire de développer un traitement automatisable des données.

REFERENCES

- ¹ E. Lesellier, C. West, J. Chromatogr. A, 1158 (2007) 329–360
- ² D. B. Marshall, C.H. Lochmuller, Anal. Chim. Acta 142 (1982) 63.
- ³ S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M. Euerby, Anal. Chem. 74 (2002) 4672
- ⁴ G.B. Cox, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 493 (1989) 95
- ⁵ J.E. Eble, R.L. Grob, P.E. Antle, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 384 (1987) 45
- ⁶ F. Gritti, G. Guiochon, Anal. Chem. 77 (2005) 1020
- ⁷ F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5584
- ⁸ D.V. McCalley, Anal. Chem. 75 (2003) 3404
- ⁹ D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1075 (2005) 57
- ¹⁰ D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1038 (2004) 77
- ¹¹ J. Dai, S.D. Mendousa, M.T. Bowser, C.A. Lucy, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1069 (2005) 225
- ¹² J. Dai, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1072 (2005) 169
- ¹³ J.C. Giddings, Anal. Chem. 39 (1967) 1027
- ¹⁴ C.G. Horvath, S.R. Lipsky, Anal. Chem. 39 (1967) 1863
- ¹⁵ U.D. Neue, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 107
- ¹⁶ J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, T.J. Waeghe, J. Chromatogr. A 857 (1999) 1
- ¹⁷ L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, J. Chromatogr. 165 (1979) 3
- ¹⁸ D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, J. Chromatogr. A 1168 (2007) 3
- ¹⁹ S. Di Palma, M.L. Hennrich, A.J.R. Heck, S. Mohammed, J. Proteomics 75 (2012) 3791
- ²⁰ T. Köcher, R. Swart, K. Mechtler, Anal. Chem 83 (2011) 2699
- ²¹ N. Nagaraj, N.A. Kulak, J. Cox, N. Neuhaus, K. Mayr, O. Hoerning, O. Vorm, M. Mann, Mol. Cell. Proteomics 11 (2012) 3
- ²² Y. Shen, R.D. Smith, K.K. Unger, D. Kumar, D. Lubda, Anal. Chem. 77 (2005) 6692
- ²³ J.E. MacNair, K.D. Patel, J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 71 (1999) 700
- ²⁴ H. Liu, J.W. Finch, M.J. Lavalley, R.A. Collamati, C.C. Benevides, J.C. Gebler, J. Chromatogr. A 1147 (2007) 30
- ²⁵ Y. Shen, R. Zhang, R.J. Moore, J. Kim, T.O. Metz, K.K. Hixson, R. Zhao, E.A. Livesay, H.R. Udseth, R.D. Smith, Anal. Chem. 77 (2005) 3090
- ²⁶ P.J. Eugster, D. Biass, D. Guillarme, P. Favreau, R. Stöcklin, J.L. Wolfender, J. Chromatogr. A 1259 (2012) 187
- ²⁷ K. Horie, Y. Sato, T. Kimura, T. Nakamura, Y. Ishihama, Y. Oda, T. Ikegami, N. Tanaka, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 283
- ²⁸ S. Eeltink, S. Dolman, F. Detobel, R. Swart, M. Ursem, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6610

-
- ²⁹ J. de Vos, C. Stassen, A. Vaast, G. Desmet, S. Eeltink, *J. Chromatogr. A* 1264 (2012) 57
- ³⁰ N. Marchetti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007) 206
- ³¹ P. Donato, P. Dugo, F. Cacciola, G. Dugo, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1129
- ³² J. Ruta, D. Guillarme, S. Rudaz, J-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2465
- ³³ H. Eghbali, K. Sandra, F. detobel, F. Lynen, K. Nakanishi, P. Sandra, G. Desmet, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3360
- ³⁴ S. Heinisch, A. D'Attoma, C. Grivel, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 135
- ³⁵ G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 6
- ³⁶ M. Gilar, A.E. Daly, M. Kele, U.D. Neue, J.C. Gebler, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 183
- ³⁷ J.M. Davis, J.C. Giddings, *Anal. Chem.* 55 (1983) 418
- ³⁸ J.M. Davis, J.C. Giddings, *J. Chromatogr. A* 289 (1984) 277
- ³⁹ S. Heinisch, Using elevated temperature in UHPLC: interest and limitations, in *UHPLC in life sciences*, Royal Society of Chemistry (2012) 102
- ⁴⁰ Q. Xing, T. Liang, G. Shen, X. Wang, Y. Jin, X. Liang, *Analyst*, 137 (2012) 2239
- ⁴¹ S. Di Palma, D. Stange, M. van de Wetering, H. Clevers, A.J.R. Heck, S. Mohammed, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 3814
- ⁴² P.I. Dobrev, L. Havlíček, M. Vágner, J. Malbeck, M. Kamínek *J. Chromatogr. A*, 1075 (2005) 159
- ⁴³ A. Liu, J. Tweed, C.E. Wujcik, *J. Chromatogr. V*, 877 (2009) 1873
- ⁴⁴ P. Schoenmakers, P.J. Marriott, J. Beenes, *LC-GC Europe*, 16 (2003) 335
- ⁴⁵ P. Dugo, M. Herrero, T. Kumm, D. Giuffrida, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 196
- ⁴⁶ I. François, A. De Villiers, P. Sandra, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 492
- ⁴⁷ F. Cacciola, P. Donato, D. Giuffrida, G. Torre, P. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* 1255 (2012) 244
- ⁴⁸ L. Mondello, P. Donato, F. Cacciola, C. Fanali, P. Dugo, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1454
- ⁴⁹ I. François, D. Cabooter, K. Sandra, F. Lynen, G. Desmet, P. Sandra, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1137
- ⁵⁰ P. Donato, F. Cacciola, E. Sommella, C. Fanali, L. Dugo, M. Dacha, P. Campiglia, E. Novellino, P. Dugo, L. Mondello, *Anal. Chem. Chem.* 83 (2011) 2485
- ⁵¹ S.R. Groskreutz, M. M. Swenson, L.B. Secor, D.R. Stoll, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 31
- ⁵² S.R. Groskreutz, M. M. Swenson, L.B. Secor, D.R. Stoll, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 41
- ⁵³ E. Sommella, F. Cacciola, P. Donato, P. Dugo, P. Campiglia, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 530
- ⁵⁴ J.N. Fairchild, K. Horvath, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1363
- ⁵⁵ T. Beelders, K.M. Kalili, E. Joubert, D. De Beer, A. De Villiers, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1808
- ⁵⁶ F. Erni, R.W. Frei, *J. Chromatogr. A* 149 (1978) 561
- ⁵⁷ P.J. Marriott, P. Schoenmakers, Z. Wu, *LC-GC Europe*, 25 (2012) 266.

-
- ⁵⁸ F. Cacciola, P. Delmonte, K. Jaworska, P. Dugo, L. Mondello, J.I. Rader, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2012
- ⁵⁹ A. Van der Horst, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 693
- ⁶⁰ P. Jandera, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 844
- ⁶¹ J.C. Giddings, *J. High Resolut. Chromatogr.* 10 (1987) 319
- ⁶² R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1585
- ⁶³ K. Horie, H. Kimura, T. Ikegami, A. Iwatsuka, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3764
- ⁶⁴ G. Vivo-Truyols, S. Van der Wal, P.J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8525
- ⁶⁵ V. Elsner, S. Laun, D. Melchior, M. Köhler, O.J. Schmitz, *J. Chromatogr. A*, 1268 (2012) 22
- ⁶⁶ E. Van Gyseghem, S. Van Hemelryck, M. Daszykowski, F. Questier, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 77
- ⁶⁷ M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6426
- ⁶⁸ A. Eskes, F. Dupuis, A. Dijkstra, H. De Clercq, D.L. Massart, *Anal. Chem.* 47 (1975) 2168
- ⁶⁹ M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1694
- ⁷⁰ G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 109
- ⁷¹ M. Dumarey, R. Put, E. Van Gyseghem, Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 223
- ⁷² E. Van Gyseghem, M. Jimidar, R. Sneyers, D. Redlich, E. Verhoeven, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 117
- ⁷³ E. Van Gyseghem, M. Jimidar, R. Sneyers, M. De Smet, E. Verhoeven, Y. Vander Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 751
- ⁷⁴ R. Put, E. Van Gyseghem, D. Coomans, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1096(2005) 187
- ⁷⁵ P. Forlay-Frick, E. Van Gyseghem, K. Héberger, Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 1
- ⁷⁶ W. Steuer, I. Grant, F. Erni, *J. Chromatogr.* 507 (1990) 125
- ⁷⁷ J. Pellett, P. Lukulay, Y. Mao, W. Bowen, R. Reed, M. Ma, R.C. Munger, J.W. Dolan, L. Wrisley, K. Medwid, N.P. Toltl, C.C. Chan, M. Skibic, K. Biswas, K.A. Wells, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 122
- ⁷⁸ E. Van Gyseghem, I. Crosiers, S. Gourvénec, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 117
- ⁷⁹ U.D. Neue, J.E. O’Gara, A. Méndez, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 161
- ⁸⁰ E. Van Gyseghem, S. Van Hemelryck, M. Daszykowski, F. Questier, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 77
- ⁸¹ P.J. Slonecker, X. Li, T.H. Ridgway, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 68 (1996) 682
- ⁸² R. Al Bakain, I. Rivals, P. Sassi, D. Thiébaud, M.-C. Hennion, G. Euvrard, J. Vial, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2963

-
- ⁸³ J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3467
- ⁸⁴ C.J. Venkatramani, Y. Zelechonok, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3484
- ⁸⁵ P. Jandera, K. Novotna, L. Kolarova, J. Fischer, *Chromatographia* 60 (2004) S27
- ⁸⁶ P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1763
- ⁸⁷ Z. Liu, D.G. Patterson, M.L. Lee, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3840
- ⁸⁸ M. Gilar, A.E. Daly, M. Kele, U.D. Neue, J.C. Gebler, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 183
- ⁸⁹ B.L. Karger, L.R. Snyder, C. Horvath, *An introduction to separation science*, John Wiley and Sons, New York, 1973
- ⁹⁰ J.C. Giddings, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1258A
- ⁹¹ G. Guiochon, L.A. Beaver, M.F. Gonnord, A.M. Siouffi, M. Zakaria, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 415
- ⁹² D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, *J. Chromatogr. A*, 1168 (2007) 3
- ⁹³ X. Li, D.R. Stoll, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 81 (2009) 845
- ⁹⁴ F. Bedani, P.J. Schoenmakers, H.G. Janssen, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1697
- ⁹⁵ P.W. Carr, D.R. Stoll, X. Wang, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1890
- ⁹⁶ F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 2
- ⁹⁷ L. Novakova, L. Matysova, P. Solich, *Talanta* 68 (2006) 908
- ⁹⁸ D. Guilleme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 430
- ⁹⁹ S. Heinisch, G. Desmet, D. Clicq, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 1203 (2008) 124
- ¹⁰⁰ <http://www.phenomenex.com/>
- ¹⁰¹ C.G. Horvath, S.R. Lipsky, *Anal. Chem.* 41 (1969) 1227
- ¹⁰² J.J. Kirkland, *Anal. Chem.* 41 (1969) 218
- ¹⁰³ D. Cabooter, F. Lestremau, F. Lynen, P. Sandra, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 23
- ¹⁰⁴ J.M. Cunliffe, T.D. Maloney, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3104
- ¹⁰⁵ X. Wang, P.W. Carr, D.R. Stoll, *LC-GC North America* 28 (2010) 932
- ¹⁰⁶ A. Staub, D. Zurlino, S. Rudaz, J-L. Veuthey, D. Guilleme, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 8903
- ¹⁰⁷ S. Heinisch, J-L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 642
- ¹⁰⁸ J.W. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 837
- ¹⁰⁹ J.W. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2193
- ¹¹⁰ J. Shao, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 71 (1998) 5217
- ¹¹¹ T.P. Weber, P.T. Jackson, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3042
- ¹¹² J.D. Thompson, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1017
- ¹¹³ R.E. Majors, *LC-GC North Am.* 15 (1997) 1008
- ¹¹⁴ R.E. Majors, *LC-GC North Am.* 25 (2007) 532
- ¹¹⁵ M.H.M. Van de Meent, G.J. de Jong, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1809
- ¹¹⁶ R. Li, J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 163
- ¹¹⁷ A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177

-
- ¹¹⁸ P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784
- ¹¹⁹ A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 2871
- ¹²⁰ J. Bernal, A. M. Ares, J. Pól, S. K. Wiedmer, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 7438
- ¹²¹ D.V. McCalley, *J. chromatogr. A* 1171 (2007) 46
- ¹²² M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6426
- ¹²³ A. Medvedodovici, V. David, V. David, C. Georgita, *J. Liquid Chrom. & Related Tech.* 30 (2007) 199
- ¹²⁴ R.E. Collins, *Flow of fluids through porous materials*, Rheinhold, New York (1961) 196
- ¹²⁵ R.A. Shalliker, G. Guiochon, *Analyst*, 135 (2010) 222
- ¹²⁶ M. Mishra, A. de Wit, C. Grivel, S. Heinisch, M. Martin, ISSS Rome 2010
- ¹²⁷ J. Layne, T. Farcas, I. Rustanov, F. Ahmed, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 233
- ¹²⁸ B. Chauve, D. Guillaume, P. Cléon, J.L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 752
- ¹²⁹ M. Martin, M. Mishra, A. De Wit, C. Grivel, S. Heinisch, *Sample solvent strength effects in two-dimensional liquid chromatography*, ISC, Valencia (2010)
- ¹³⁰ C. Grivel Thèse, Université de Lyon, (2010)
- ¹³¹ E. Reingruber, J.J. Jansen, W. Buchberger, P. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1147
- ¹³² X. Jiang, A. Van der Horst, P. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 55
- ¹³³ H.J.A. Philipsen, B. Klumperman, A.M. van Herk, A.L. German, *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 13
- ¹³⁴ P. Jandera, T. Hajek, P. Cesla, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1995
- ¹³⁵ Q. Li, F. Lynen, J. Wang, H. Li, G. Xu, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1255 (2012) 237
- ¹³⁶ D.R. Stoll, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 979
- ¹³⁷ F. Bedani, P.J. Schoenmakers, H.G. Janssen, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1697
- ¹³⁸ P. Schoenmakers, G. Vivo-Truyols, W. Decrop, *J. Chromatogr. A*, 1120 (2006) 282
- ¹³⁹ G. Vivo-Truyols, S. Van der Wal, P. Schoenmakers, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8525
- ¹⁴⁰ M. R. Filgueira, Y. Huang, K. Witt, C.B. Castells, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 9531
- ¹⁴¹ N.B. Cech, C.G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362
- ¹⁴² C. Herbert, R.A.W. Johnstone, *Mass Spectrometry Basics*, CRC press, Boca Raton, 2003
- ¹⁴³ M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J.L. Veuthey, D. Guillaume, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 2
- ¹⁴⁴ E. Grata, D. Guillaume, G. Glauser, J. Boccard, P.A. Carrupt, J.L. Veuthey, S. Rudaz, J.L. Wolfender, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5660
- ¹⁴⁵ D.T.T. Nguyen, D. Guillaume, S. Heinisch, M.P. Barrioulet, J.L. Rocca, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. A*, 1167 (2007) 76
- ¹⁴⁶ J.T.V. Matos, R.M.B.O. Duarte, A.C. Duarte, *J. Chromatogr. B* 31 (2012) 910
- ¹⁴⁷ G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 109
- ¹⁴⁸ C.G. Fraga, B.J. Prazen, R.E. Synovec, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5833
- ¹⁴⁹ B.J. Prazen, R.E. Synovec, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 70 (1998) 218

-
- ¹⁵⁰ V.G. van Mispelaar, A.C. Tas, A.K. Smilde, P.J. Schoenmakers, A.C. van Asten, J. Chromatogr. A 1019 (2003) 15
- ¹⁵¹ K.J. Johnson, B.J. Prazen, D.C. Young, R.E. Synovec, J. Sep. Sci. 27 (2004) 410
- ¹⁵² K.M. Pierce, L.F. Wood, B.W. Wright, R.E. Synovec, Anal. Chem. 77 (2005) 7735
- ¹⁵³ D. Zhang, X. Huang, F.E. Regnier, M. Zhang, Anal. Chem. 80 (2008) 2664
- ¹⁵⁴ B.V. Hollingsworth, S.E. Reichenbach, Q. Tao, A. Visvanathan, J. Chromatogr. A 1105 (2006) 51
- ¹⁵⁵ R.C. Allen, S.C. Rutan, Anal. Chim. Acta 705 (2011) 253
- ¹⁵⁶ S. Peters, G. Vivó-Truyols, P.J. Marriott, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 14
- ¹⁵⁷ S.E. Reichenbach, M. Ni, V. Kottapalli, A. Visvanathan, Chemom. Intell. Lab. Syst. 71 (2004) 107
- ¹⁵⁸ G. Vivó-Truyols, H.-G. Janssen, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1375
- ¹⁵⁹ I. Latha, S.E. Reichenbach, Q. Tao, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6792
- ¹⁶⁰ M.R. Filgueira, C.B. Castells, P.W. Carr, Anal. Chem. 84 (2012) 6747
- ¹⁶¹ M.R. Filgueira, Y. Huang, K. Witt, C. Castells, P. W. Carr Anal. Chem. 83 (2011) 9531

Chapitre 2 : Conditions expérimentales

Appareillage, phases stationnaires, phases mobiles, composés d'intérêt, calculs

INTRODUCTION

Les différentes études ont été réalisées avec plusieurs systèmes chromatographiques et plusieurs spectromètres de masse. Ces appareils sont décrits dans cette partie. Des appareils unidimensionnels ont été combinés pour composer des systèmes bidimensionnels. Au total, trois systèmes bidimensionnels ont été utilisés avec trois systèmes d'interfaces différentes. Les analyseurs des spectromètres de masse utilisés sont un simple quadripôle et un quadripôle associé à un temps de vol. Ces deux systèmes emploient des sources à electrospray (ESI). L'appareillage est détaillé en section A.

Les phases stationnaires utilisées sont de type RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) et HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). Les deux modes ont été considérés pour multiplier les combinaisons possibles en termes d'orthogonalité. En RPLC, des phases stationnaires à base de silice greffée ont été utilisées aussi bien que des systèmes à base d'autres matériaux (polymères, zircone, carbone graphite poreux). En HILIC, des phases zwitterionique, amide et silice nue ont été étudiées. Les colonnes sont présentées en section B.

Des additifs de pH ont été ajoutés aux phases mobiles afin de faire varier le pH et la force ionique. Ces additifs ont été choisis de manière à être compatibles avec la spectrométrie de masse (tampons volatils). Les acides formique et trifluoroacétique ainsi que l'ammoniac, l'acétate d'ammonium et le formate d'ammonium ont été utilisés. La préparation des phases mobiles est détaillée en section C.

Divers types d'échantillons ont été analysés. Un mélange de petites molécules ionisables et un mélange de peptides ont été utilisés pour l'étude d'orthogonalité. Plusieurs digestions tryptiques ont été préparées afin d'obtenir des mélanges de peptides complexes. Deux échantillons de mélange de produits pharmaceutiques ont été fournis par le laboratoire pharmaceutique Servier. Les caractéristiques de ces produits et leurs mises en solution est présentée en section D.

Les paramètres d'intérêt et les formules utilisées pour réaliser les calculs de ces diverses études sont détaillés en section E.

Nous remercions PerkinElmer pour le prêt du simple quadripôle SQ300MS associé à la chaîne chromatographique Flexar-FX10. Nous remercions Waters pour le prêt du système bidimensionnel I-Class. Nous remercions également Waters pour le don de la vanne 10 voies 2 positions qui nous permet de combiner deux systèmes unidimensionnels entre eux. Nous remercions pour le don de colonnes : Marcherey Nagel (Nucléodur et Nucléoshell), Phenomenex (Kinetex), ThermoScientific (Gold), Sigma Aldrich (Ascentis Express) Waters (Acquity CSH, colonnes de trapping, Acquity HILIC ...).

A- APPAREILLAGE

I- Appareillage en LC-1D

1. Acquity UPLC (Waters)

Le système comporte 4 modules : un système de pompage, un passeur d'échantillon, un four à colonnes et un détecteur UV à barrette de diodes. Le système de pompage à haute pression peut délivrer un débit maximal de 2 mL/min. Le passeur automatique est thermostaté de 4 à 40°C. Le volume de la boucle d'injection est compris entre 2 et 20 µL selon les cas étudiés. L'injection nécessite 45 secondes. L'aiguille est lavée avec un mélange 80/20 acétonitrile/eau v/v et 20/80 acétonitrile/eau v/v. Le four à système Peltier sans circulation d'air permet de thermostatier la colonne sur une plage de 10 à 90 °C. La phase mobile est préchauffée avec un tube métallique enroulé de 50cm x 127 µm. La cellule du détecteur est de 500 nL. Les valeurs de fréquence d'acquisition et de constante de temps sont fixées selon l'expérience entre 1 à 40 Hz et 25 à 100 ms respectivement. La colonne est reliée au détecteur par un tube en polyether ether ketone (PEEK) de 15cmx100µm. La pression limite est de 1000 bar pour des débits allant jusqu'à 1 mL/min, 800 bar jusqu'à 1.5 mL/min et 630 bar jusqu'à la limite de 2 mL/min. Le logiciel Empower permet de réaliser l'acquisition des données. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Azur (Datalys) après export des données provenant d'Empower (format AIA).

2. Alliance (Waters)

Le système comporte deux modules : un système de séparation 2690 et un détecteur UV à barrette de diodes 996. Le système de séparation comporte le système de pompage à basse pression, le passeur d'échantillon non thermostaté et un four à colonnes à circulation d'air. La pompe quaternaire permet de délivrer un débit pouvant aller jusqu'à 10 mL/min. La vanne d'injection comporte une boucle de 100 µL. L'injection nécessite 45 secondes. L'aiguille est lavée avec un mélange 50/50 acétonitrile/eau v/v. Le four permet de chauffer les colonnes jusqu'à 65 °C. La colonne est reliée à l'injecteur et au détecteur par des tubes PEEK de 20 cm x 127 µm. Le détecteur comporte une cellule de 8 µL. Le logiciel Empower permet de réaliser l'acquisition des données. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Azur (Datalys) après export des données provenant d'Empower (format AIA).

Ce système a été utilisé pour toutes les analyses effectuées avec des colonnes de diamètre interne supérieur à 2.1mm dans le cas des études de systèmes orthogonaux.

3. Four Polaratherm Series 9000 (Selerity)

Le four de l'Alliance étant limité à 65 °C et celui de l'Acquity à 90°C, un four externe a été utilisé pour chauffer les colonnes à des températures supérieures. Ce four permet de chauffer de 30 à 200 °C. La phase mobile est préchauffée avant l'entrée dans la colonne et est refroidie avant l'entrée dans le détecteur avec des tubes 50 cm x 127 µm pour des débits jusqu'à 5 mL/min.

4. LC Packings ultimate (Dionex)

Le système LC Packings ultimate comporte quatre modules : un système de pompage, un passeur d'échantillon, un four à colonnes et un détecteur UV. Le système de pompage basse pression peut pomper jusqu'à 0.5 mL/min sous une pression limite de 400 bar. Ce système permet d'obtenir des micro-débits après un split généré par le système. Les bouteilles de phases mobiles sont dégazées par un flux d'hélium. Le passeur d'échantillon non thermostaté comporte une boucle de 5 µL sur la vanne d'injection. Le four à colonne permet de chauffer la colonne jusqu'à la température limite de 70 °C. Le détecteur UV comporte une cellule de détection de 160 nL. Le logiciel Chromeleon permet de réaliser l'acquisition des données. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Azur (Datalys) après export des données provenant de Chromeleon (format AIA).

5. Flexar FX-10 (PerkinElmer)

Le système Flexar FX-10 comporte deux pompes, un passeur d'échantillon, un four à colonnes et un détecteur UV. Le système de pompage permet de pomper jusqu'à 3 mL/min. Le mélangeur a un volume de 75 µL. La pression limite supportée par le système de pompage est 700 bar. Le passeur d'échantillon est thermostaté et permet de refroidir à 4°C les échantillons. Le four à colonne permet de thermostatier la colonne à 30°C. Le système comporte un détecteur UV comportant une cellule de détection de 2.4 µL. Ce système est piloté par le logiciel Chromera.

6. I-Class (Waters)

Le système comporte 4 modules : un système de pompage, un passeur d'échantillon, un four à colonnes et un détecteur UV à barrette de diodes. Le système de pompage à haute pression peut délivrer un débit maximal de 2 mL/min. Le passeur automatique est thermostaté de 4 à 40°C. Le système d'injection ne comporte pas de boucle. Le volume injectable est de 10 µL et peut être étendu à 50 ou 100 µL avec des tubes d'extensions. L'aiguille est lavée avec un mélange 80/20 acétonitrile/eau v/v et 10/90 acétonitrile/eau v/v. Le four à système Peltier sans circulation d'air permet de thermostatier la colonne sur une plage de 10 à 90 °C. La phase mobile est préchauffée avant d'entrer dans la colonne. La cellule du détecteur est de 500 nL. Les valeurs de fréquence d'acquisition et de constante de temps sont fixées selon l'expérience entre 1 à 40 Hz et 25 à 100 ms. La colonne est reliée au détecteur par un tube en polyether ether ketone (PEEK) de 60cmx100µm. La pression limite est de 1200 bar. Le logiciel Masslynx permet de réaliser l'acquisition des données. Les données sont ensuite traitées avec le logiciel Azur (Datalys) après export des données provenant de Masslynx (format Ascii).

Une pompe et un détecteur UV supplémentaire complètent le système pour l'utiliser en système bidimensionnel. La pompe est identique à la précédente. Le détecteur UV comporte une cellule de détection de 500 nL.

II- Systèmes bidimensionnels

1. Système 1

En première dimension, les systèmes LC Packings, Flexar FX-10 ou I-Class ont été utilisés. L'Acquity UPLC constitue la seconde dimension et une vanne 10 ports 2 positions servait d'interface (Fig. II- 1). C'est une vanne Valco Cheminert UHPLC pouvant résister jusqu'à 1000 bar. Cette vanne est équipée de deux boucles identiques de 20 μ L (127 μ m de diamètre interne).

La configuration choisie lors du montage implique que les boucles de la vanne se remplissent et se vident toutes deux dans le même sens. Cette configuration a été choisie de manière à utiliser la vanne de manière symétrique. En effet, il est important que le trajet des solutés soit le même dans les deux boucles pour éviter les décalages d'une fraction à l'autre [1]. La configuration est dite asymétrique si les boucles sont remplies ou vidées en sens contraire l'une par rapport à l'autre.

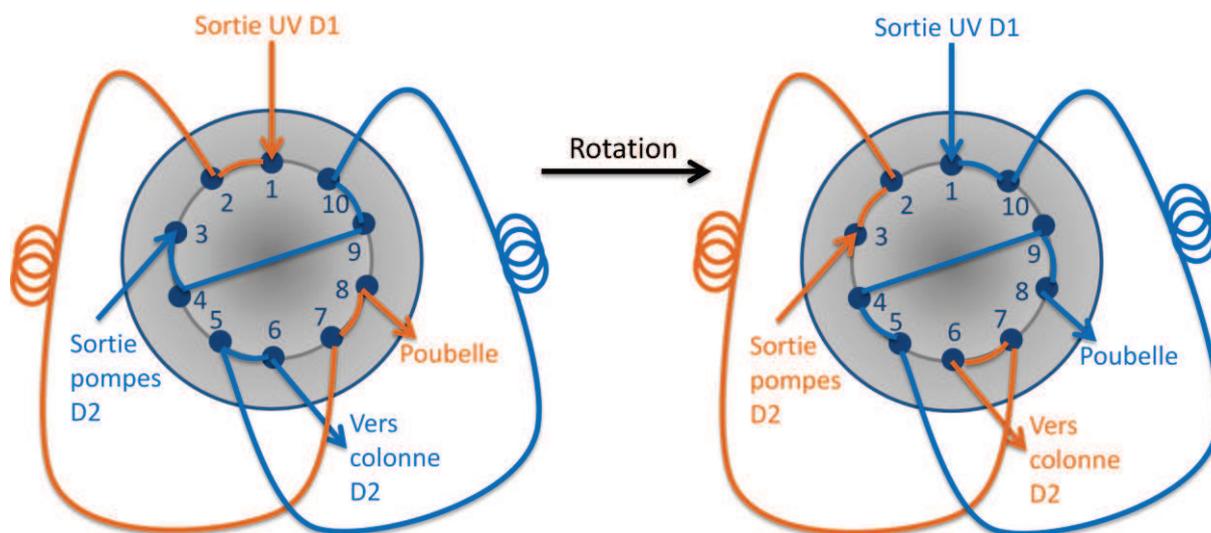


Fig. II- 1 : Vanne 10 ports 2 positions

L'acquisition des données est réalisée avec Empower. Les analyses successives de seconde dimension s'effectuent en séquence avec une alternance de deux méthodes. Ces méthodes diffèrent par la programmation de la vanne. La vanne se met en position A au temps 0 dans la méthode 1 et en position B dans la méthode 2. L'alternance des positions de vanne se fait à chaque ligne de programmation de séquence. Ainsi la vanne pivote de manière synchronisée avec la programmation du gradient.

2. Système 2

Ce système est composé de deux systèmes I-Class reliés par une interface à deux vannes 6 ports 2 positions (Fig. II- 2). Ces vannes peuvent résister jusqu'à 1000 bar. Elles sont équipées de deux boucles identiques de 37 μ L. La configuration choisie lors du montage est une configuration symétrique pour les raisons évoquées précédemment.

L'acquisition des données est réalisée avec le logiciel Masslynx. Les analyses successives de seconde dimension s'effectuent à partir d'une seule méthode comprenant les valeurs des temps de rotation et des temps de gradients successifs.

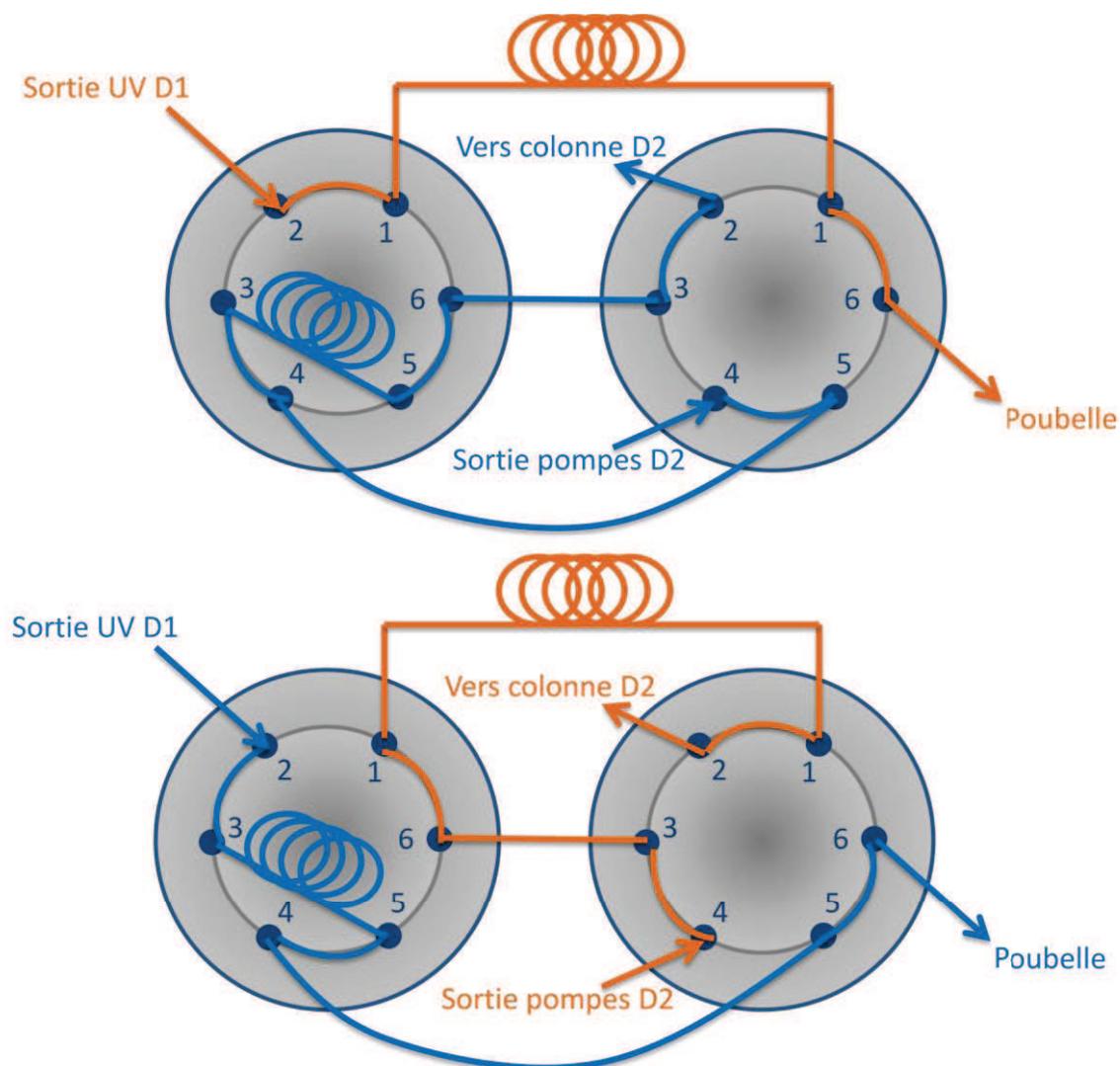


Fig. II- 2 : 2 Vannes 6 ports 2 positions

3. Système 3

Ce système est composé de deux systèmes Agilent 1290 reliés par une vanne double 4 ports 2 positions (Fig. II- 3). Cette vanne peut résister jusqu'à 1000 bar. Elle est équipée de deux boucles identiques de 14 μ L (diamètre interne 170 μ m).

La configuration du montage de la vanne est symétrique. Contrairement aux montages précédents, le remplissage des deux boucles se fait dans le sens contraire par rapport au sens d'injection des composés en seconde dimension pour minimiser la dispersion.

L'acquisition des données est réalisée avec le logiciel Chemstation. Les analyses successives de seconde dimension s'effectuent à partir d'une seule méthode qui comprend la

programmation du gradient et la valeur de temps de cycle. Le logiciel construit alors une méthode incrémentée à partir de ces valeurs sur la plage de temps souhaitée.

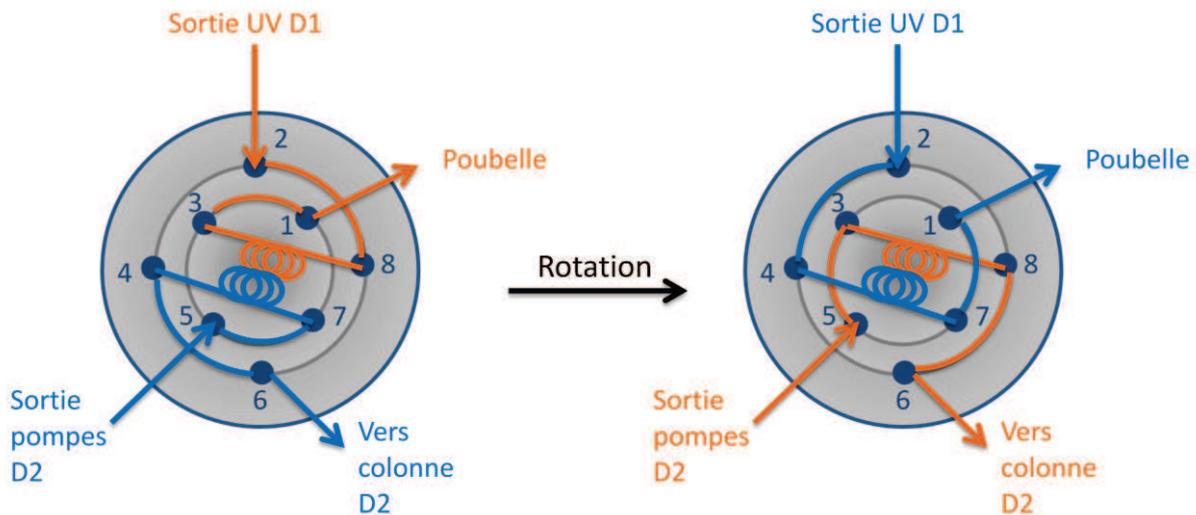


Fig. II- 3 : Vanne double à 4 ports 2 positions

III- Comparaison des interfaces utilisées

Les analyses bidimensionnelles ont été réalisées avec trois systèmes différents. Il est ainsi intéressant de comparer les caractéristiques des trois interfaces qui sont très différentes.

1. Les montages

Les caractéristiques des trois interfaces sont données dans le Tab. II- 1.

Systèmes	1	2	3
Type d'interface	Vanne 10 voies	2 vannes 6 voies	Vanne double 4 voies
Chemin supplémentaire	oui	oui	non
Configuration	symétrique	symétrique	symétrique
Sens remplissage / injection	même sens	même sens	sens inverse

Tab. II- 1 : Caractéristiques des trois interfaces utilisées

Pour les interfaces des systèmes 1 et 2, un tube reliant deux des ports de la vanne ajoute un chemin supplémentaire sur une des deux positions. L'interface 2 nécessite des tubulures plus longues puisque les deux vannes doivent être connectées l'une avec l'autre. Dans le cas de l'interface 3, le chemin parcouru par les phases mobiles de première et seconde dimension est identique, ce qui est avantageux puisque les temps ne nécessitent théoriquement aucune correction d'une fraction à l'autre.

Il est intéressant de noter que pour le système 3 (Tab. II- 1), le remplissage des boucles se fait dans le sens inverse de l'injection des composés en seconde dimension. C'est un atout indéniable puisque les dispersions induites lors du remplissage et de l'injection peuvent se compenser partiellement dans ce cas. Par contre pour les deux autres interfaces, le remplissage et l'injection s'effectuent dans le même sens ce qui induit plus de dispersion.

2. Le système de pilotage

Les rotations de vanne doivent être synchronisées avec le démarrage du gradient de seconde dimension pour chaque fraction à analyser. Cette synchronisation n'est possible que si le système de seconde dimension pilote la vanne.

Pour le système n°1, chaque analyse de seconde dimension est programmée dans une séquence (logiciel Empower) contenant autant de lignes que de fractions à analyser. Deux méthodes chromatographiques sont utilisées en alternance dans cette séquence afin de faire pivoter la vanne dans un sens (ligne 1) puis dans l'autre (ligne 2). Ces méthodes sont totalement identiques d'un point de vue programmation du gradient d'élution, de la température de la colonne et des paramètres de détection. La vanne est pilotée depuis le détecteur. Ce système de pilotage permet d'obtenir autant d'acquisitions de chromatogrammes que de fractions analysées. Cependant, quelques secondes de traitement informatique sont nécessaires entre deux acquisitions. Ce temps additionnel est spécifique à l'appareillage et au logiciel. Il est de 0.13 min avec un détecteur UV et de 0.23 min pour un détecteur à barrette de diodes. Il est récemment passé à 0.165 min depuis la dernière installation du logiciel Empower. L'utilisateur ne peut pas agir sur ce temps additionnel qui est propre à l'appareillage et au logiciel. Dans le cas du système n°1, le gradient de D1 démarre indépendamment de la séquence de D2, ce qui conduit à créer deux méthodes.

Pour le système n°2, les deux dimensions ainsi que les rotations de vanne sont pilotés par un seul logiciel (Masslynx) qui synchronise l'ensemble. Les acquisitions en D2 correspondent à un seul chromatogramme comprenant l'ensemble des fractions qu'il faut ensuite découper et aligner. Il n'y a donc pas de temps additionnel entre chaque fraction. Jusqu'à présent, le logiciel ne permet que 12 rotations de vannes. Pour ces 12 rotations de vannes, 24 lignes pour les rotations et 36 lignes pour le gradient d'élution doivent être écrites, ce qui peut entraîner des fautes de frappe. Une nouvelle version de Masslynx devrait prochainement nous permettre d'augmenter considérablement le nombre de lignes de programme.

Pour le système n°3, les deux dimensions ainsi que les rotations de vanne sont pilotées par le logiciel Chemstation, permettant ainsi une synchronisation parfaite entre les diverses opérations. De même que pour le système n°2, un seul long chromatogramme de D2 est enregistré. Les fractions doivent ensuite être découpées. L'alignement est moins utile puisque le chemin parcouru par les solutés dans la vanne est le même pour les deux positions. La programmation d'une analyse bidimensionnelle est très facile puisqu'il suffit de définir la fenêtre de temps pour les rotations de vannes et le gradient associé à chaque rotation de vanne. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'incrémenter les temps de gradients et de rotation de vanne, limitant ainsi les erreurs de programmation.

Il est important de noter que pour les deux systèmes bidimensionnels commerciaux (système 2 et 3), aucun logiciel de traitement des données n'est fourni par le fabricant. Pour les trois systèmes, le même processus de traitement des données a été suivi. Il est détaillé dans le chapitre 6 (analyses LCxLC).

3. Le traitement des données

Le traitement des données est un point clé dans la mise en place d'analyse bidimensionnelle. Le processus de traitement des données LCxLC est différent selon les systèmes chromatographiques utilisés. Il est effectué à l'aide de programmes qui ont été développés au laboratoire, sous Excel et sous Matlab.

Pour les systèmes n°2 et n°3, les acquisitions des chromatogrammes de D2 correspondant à l'injection des fractions successives de D1 se font les unes à la suite des autres sur un chromatogramme unique. Il faut donc découper ce chromatogramme en autant de parties que de fractions injectées en D2. Le système n°1, ne nécessite pas de découpage car les chromatogrammes de seconde dimension sont enregistrés les uns après les autres. Le reste du processus de traitement des données est commun aux trois systèmes LCxLC utilisés. La Fig. II- 4 montre les différentes étapes du traitement des données pour une analyse bidimensionnelle simple réalisée sur le système n°2.

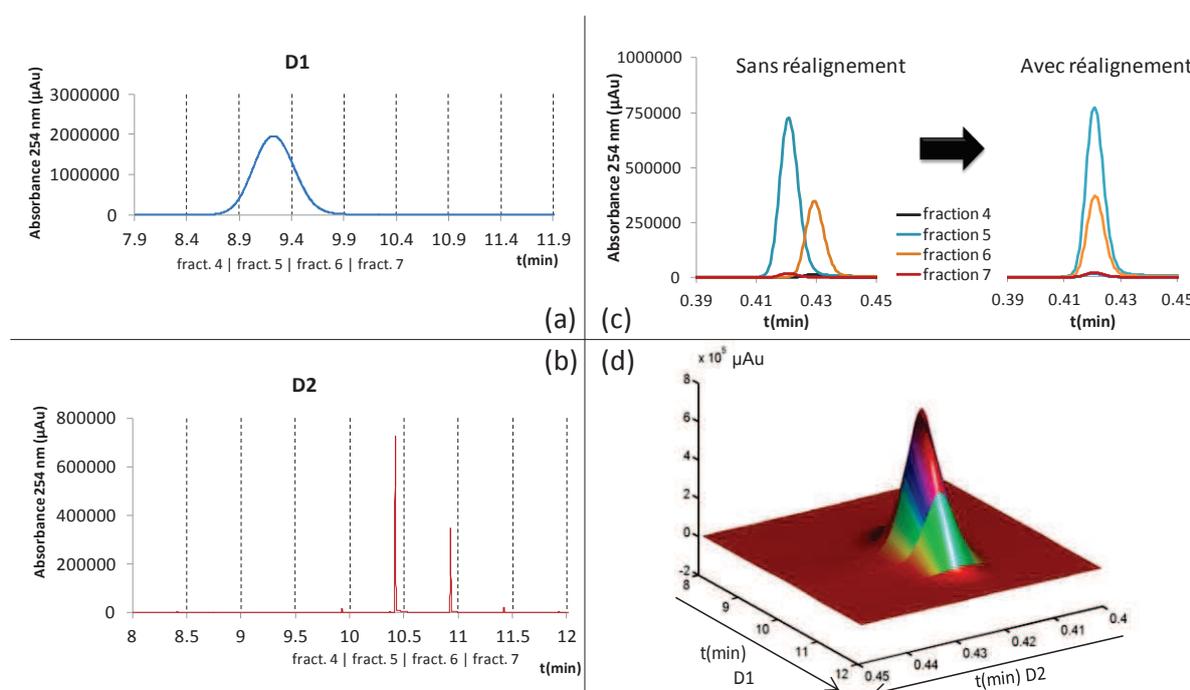


Fig. II- 4 : Analyse RPLCxRPLC du butylparabène avec le système n°2. D1 : colonne Gold 50x1mm, 3 μ m isocratique 70/30 Eau/ACN. F=10 μ L/min Vinj=1 μ L. D2 : colonne Acquity BEH C18 50x2.1mm, 1.7 μ m, gradient 20 à 80 % ACN en 0.3 min ($t_{\text{cycle}} = 0.5$ min) F=0.7mL/min. Rotation de vanne toutes les 0.5 min. (a) première dimension, (b) seconde dimension, (c) superposition des fractions, (d) chromatogramme final en 3D.

Le chromatogramme obtenu en D1 ainsi que les différentes fractions sont représentées sur la Fig. II- 4a. Le chromatogramme obtenu en D2 avant découpage est présenté sur la Fig. II- 4b. Les données sont importées dans Excel et le découpage est réalisé à partir d'une macro qui prend en compte le temps de cycle, la fréquence d'acquisition de D2, le temps de la première rotation de vanne et le décalage qu'il est nécessaire d'appliquer pour réaligner les pics. On obtient ainsi une matrice comportant, sur la première colonne, les temps de D2 (40 points par seconde), et sur la première ligne, les temps de D1 (2 points par min, le temps de

cycle étant 0.5min). Le reste de la matrice contient les absorbances mesurées à chaque point. La Fig. II- 4c illustre la nécessité de réaligner les pics. Ce réalignement est rendu nécessaire par la présence d'un chemin supplémentaire sur une des deux positions de vanne qui impose un délai supplémentaire pour l'arrivée du gradient en tête de colonne de D2.

Il est parfois aussi nécessaire de faire un décalage en ordonnée afin de corriger des dérives du détecteur UV dans le cas des systèmes 2 et 3 qui ne peuvent remettre à zéro le signal en début d'analyse de chaque fraction. De plus, la dérive du signal en gradient d'élution impose de soustraire un chromatogramme d'une fraction sans pic. Cela permet d'avoir une ligne de base horizontale et ainsi de mieux visualiser le signal sur les chromatogrammes 2D, surtout lorsque des pics peu intenses sont présents.

Pour finir, la matrice de donnée est importée dans Matlab. Les fonctions Contourf et Mesh permettent d'obtenir la représentation du chromatogramme en 3D ou en vue de dessus avec des contours de couleur. La Fig. II- 4d montre la représentation en 3D finale. Ce processus de traitement est relativement long et n'est pas directement utilisable en routine. Une collaboration est en cours entre Technologie Servier et le laboratoire pour développer un outil de traitement des données intégralement sous Matlab.

IV- Spectromètres de masse

Deux types de spectromètres de masse ont été utilisés en couplage avec les systèmes unidimensionnels ou bidimensionnels.

1. SQ 300 MS

Ce système est un simple quadripôle. La source d'ionisation est l'electrospray (ESI) en mode positif ou négatif. Le gaz nébuliseur utilisé est l'azote. Les paramètres de source sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tab. II- 2).

Lentille cylindrique (V)	-4000
Cône d'entrée (V)	-5000
Entrée du capillaire (V)	-6000
Température de cône d'entrée	Haute
Température de gaz séchant (°C)	300 ou 350
Débit de gaz séchant (L/min)	15
Pression de gaz nébulisant (psi)	80

Tab. II- 2 : Paramètres de source réglés

Les acquisitions ont été effectuées en balayage (scan) sur une gamme de masse choisie ou en mode d'acquisition d'un ou plusieurs ions sélectionnés (SIM). Le contrôle du système et les acquisitions se font par le logiciel Aviator. Il permet d'obtenir les spectres de masses, les chromatogrammes des sommes d'ion (TIC) et des chromatogrammes d'ion extraits (EIC). Ce détecteur a été couplé à différents appareils : Acquity UPLC, système 2D n°1, Flexar FX-10 et au système 2D I-Class (système n°2). Dans le cas du couplage avec le Flexar FX-10, le logiciel pour piloter l'association FX-10 et SQ-300MS est Chromera.

2. Micro Q-TOF

Ce système comporte un simple quadripôle associé à un système d'analyseur à temps de vol. La source d'ionisation est l'électrospray (ESI) en mode positif ou négatif. Le gaz nébuliseur utilisé est l'azote. Les paramètres de source ont été optimisés et sont reportés dans le tableau ci-dessous (Tab. II- 3). Seule la partie temps de vol de l'analyseur a été utilisée. Les acquisitions ont été effectuées en balayage (scan) sur une gamme de masse choisie. Le contrôle du système et les acquisitions se font par le logiciel MicroToF control. Les spectres de masses, chromatogrammes des sommes d'ion (TIC) et les chromatogrammes d'ion extraits (EIC) sont visualisés avec le logiciel DataAnalysis. Ce spectromètre de masse est couplé au système 2D 1290 (système n°3)

Cône d'entrée (V)	- 500
Entrée du capillaire (V)	4500
Température de gaz séchant (°C)	200
Débit de gaz séchant (L/min)	12
Pression de gaz nébulisant (psi)	44

Tab. II- 3 : Paramètres de source réglés

V- Caractérisation des systèmes

1. Volume de délai et limites en débit des systèmes de pompes

Le volume de délai est caractéristique de l'appareillage et est nécessaire à la description d'une méthode en gradient. Le volume de délai est mesuré en appliquant une montée linéaire d'un solvant A à un solvant B. A contient du méthanol et B du méthanol avec 0.1% acétone en volume. La colonne est remplacée par un raccord union à zéro volume mort. Les valeurs mesurées pour les systèmes utilisés sont décrites ci-dessous (Tab. II- 4).

Systemes	Volume (µL)	Débit min (µL/min)	Débit max (µL/min)
Acquity UPLC	120	50	2000
Alliance	800	50	2000
LC Packings	110	10	500
FX-10	180	10	nd
I-Class	100	10	2000
1290 1 ^{ère} dimension	450	20	nd
1290 2 ^{ème} dimension	60	nd	2000

Tab. II- 4 : Volumes de délai mesurés, débits minimaux et maximaux utilisables.

Plusieurs enchaînements de montée linéaire - palier isocratique - descente linéaire rapide permettent d'évaluer la linéarité du profil de gradient et ainsi de connaître les débits minimal et maximal (Tab. II- 4) que peuvent délivrer les systèmes de pompe utilisés.

2. Effets extra colonne des systèmes : valeurs, variances, pression

Le volume externe comprend la somme des volumes situés entre l'injecteur et la colonne d'une part et entre la colonne et le détecteur d'autre part. L'ethylparabène a été injecté à différents débits afin de déterminer le volume externe des systèmes

chromatographiques. Le tracé de la Fig. II- 5 représente le temps mesuré par le moment statistique centré d'ordre un (calculé avec le programme mentionné ci-dessus) en fonction de l'inverse du débit de phase mobile pour le système I-Class. Le volume externe est donné par la pente de la droite et le temps de retard est l'ordonnée à l'origine de la droite.

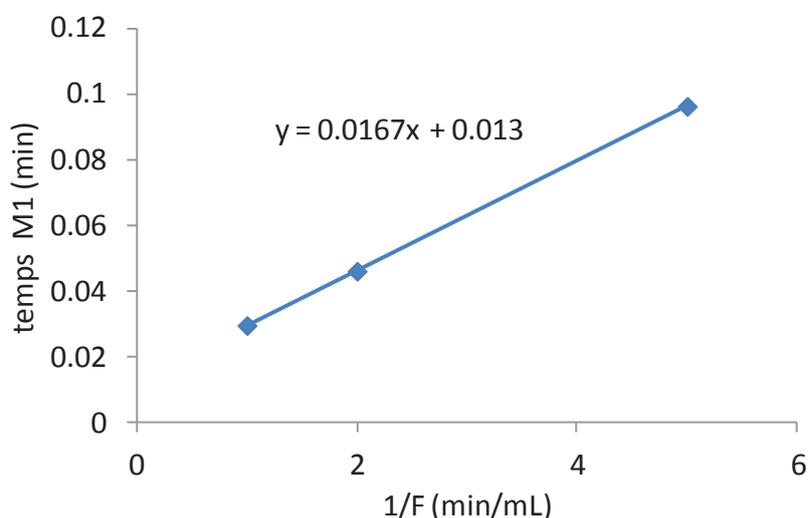


Fig. II- 5 : Evolution du temps déterminé avec le moment statistique centré d'ordre 1 en fonction de l'inverse du débit pour le système I-Class. Injection de 1 μ L d'éthylparabène dans 10/90 eau/acétonitrile.

Le temps de retard est dû au petit décalage existant entre l'injection et le début effectif de l'acquisition. Cette valeur n'est pas négligeable malgré sa valeur faible surtout lorsque les temps de rétention sont très faibles comme dans le cas des analyses très rapides. Pour l'Acquity UPLC, le volume externe est 15 μ L et le temps de retard de 0.013min. Pour le système IClass, le volume externe est 17 μ L et le temps de retard est de 0.013 min. Pour l'Alliance, le volume externe est de 65 μ L ; le temps de retard est négligeable.

La variance de dispersion dans la colonne est déterminée par la relation suivante qui fait intervenir la variance mesurée et la variance extra colonne :

$$\sigma_{colonne}^2 = \sigma_{mesurée}^2 - \sigma_{ext}^2 \quad \text{Eq. II- 1}$$

La dispersion extra-colonne comprend les dispersions provenant de l'injection, des tubes et de la détection. La variance extra-colonne a été mesurée en remplaçant la colonne par un raccord union en injectant l'éthylparabène à différents débits.

La variance a été calculée à partir du moment statistique centré d'ordre 2 avec un programme développé au laboratoire écrit à l'aide de Microsoft Visual Basic 6.0. Les moments statistiques représentent le seul moyen pour déterminer de manière exacte le temps de rétention et la variance dans le cas de pics non gaussiens. La courbe de la Fig. II- 6 représente la variance extra-colonne en fonction du débit de phase mobile pour le système I-Class. La variance extra-colonne a été retranchée à la variance mesurée afin de ne prendre en compte que les dispersions dans la colonne lors des études cinétiques.

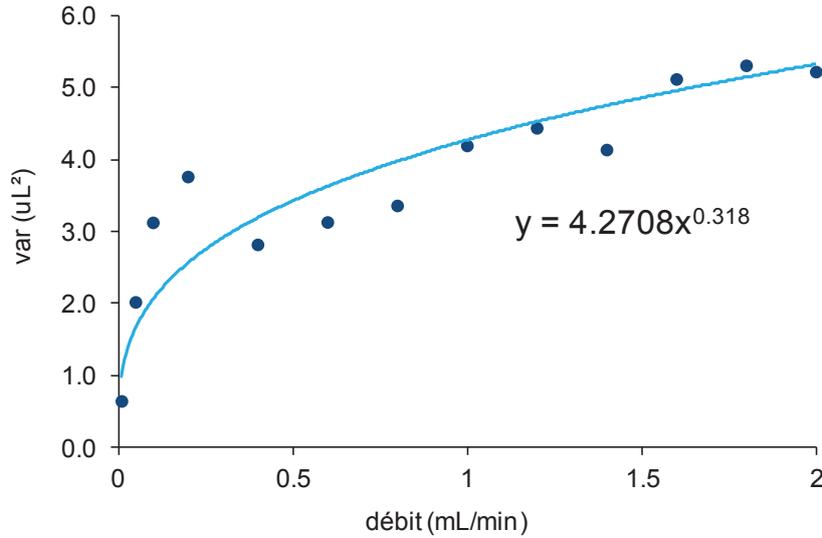


Fig. II- 6 : Evolution de la variance extra-colonne en fonction du débit pour le système I-Class. Injection de 1 µL d'éthylparabène dans 50/50 eau/acétonitrile.

La contribution à la dispersion de la vanne 10 voies et des deux vannes 6 voies a été mesurée avec une phase mobile de première dimension contenant du méthylparabène. Les colonnes ont été remplacées par des raccords union dans les deux dimensions. Des permutations de vannes ont été programmées de manière à injecter en seconde dimensions des volumes de 10 µL. Des valeurs de dispersion de l'ordre de 35 µL² ont été mesurées en utilisant le système n°1 (I-Class en 1^{ère} dimension-vanne 10 voies-Acquity UPLC).

Les tubulures externes créent une perte de charge supplémentaire ΔP_{ext}, qui doit être soustraites de la pression observée ΔP_{obs} pour avoir accès à la pression propre à la colonne ΔP_{col} :

$$\Delta P_{col} = \Delta P_{obs} - \Delta P_{ext} \quad \text{Eq. II- 2}$$

La pression ΔP_{col} permet de déterminer la perméabilité de la colonne. Les variations de la pression de la colonne en fonction de la vitesse linéaire u sont données en Fig. II- 7. Comme indiqué par les très faibles différences entre les tracés des deux droites, la perméabilité de la colonne basée sur u est pratiquement la même pour ces deux colonnes. La vitesse linéaire de phase mobile, u représenté en abscisse sur la Fig. II- 7 est déterminée par l'équation suivante :

$$u = \frac{4F}{\pi d_i^2 \epsilon_t} \quad \text{Eq. II- 3}$$

où d_i, le diamètre interne de la colonne et ε_t, la porosité totale de la colonne.

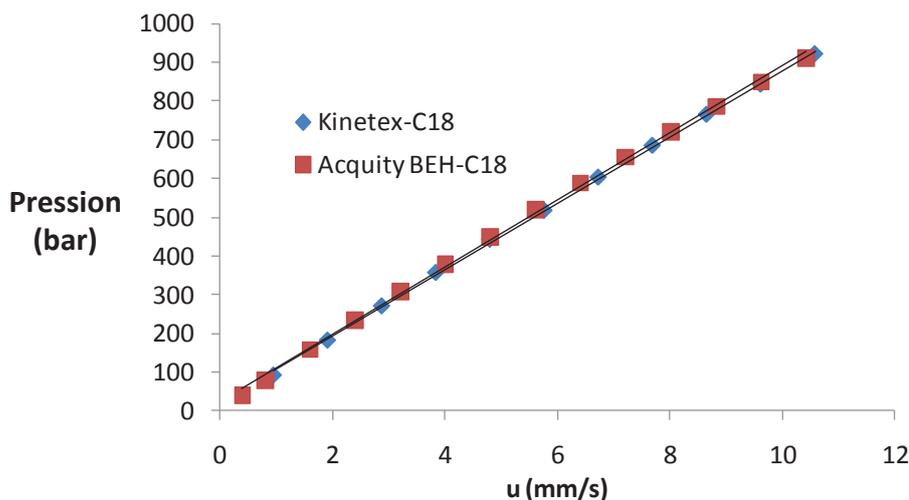


Fig. II- 7 : Pression de la colonne en fonction de la vitesse linéaire à 30°C avec une colonne à particules totalement poreuses de 1.7 μ m de diamètre (Acquity BEH-C18, 5cmx2.1mm) et une colonne à particules core-shell de 1.7 μ m de diamètre (Kinetex-C18, 5cmx2.1mm). Phase mobile : Eau/ACN 70/30 v/v (figure provenant de l'article 1)

3. Test des interfaces

Afin de vérifier que les interfaces fonctionnent bien, quelques tests préliminaires ont été menés. Du méthylparabène a été ajouté à la phase mobile de D1 afin de servir de marqueur UV. Le débit a été fixé à 10 ou 20 μ L/min selon les expériences et plusieurs rotations de vannes ont été programmées à des temps identiques (30s ou 60s). La répétabilité des rotations de vanne a été vérifiée en superposant les chromatogrammes d'une séquence à l'autre et en comparant l'aire des pics d'une fraction à l'autre comme le montre la Fig. II- 8.

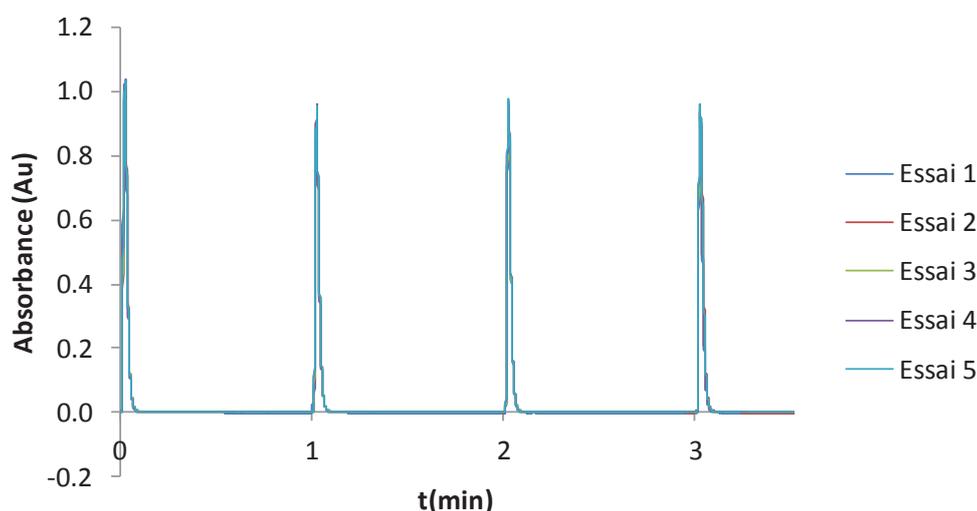


Fig. II- 8 : Superposition de 5 analyses identiques pour tester la répétabilité des fractions. Conditions : Système n°1. 1^{ère} dimension : 10 μ L/min. 2^{nde} dimension : 1mL/min. Isocratique Eau/ACN 50/50 UV 254 nm

Une séparation bidimensionnelle de 4 parabènes (Fig. II- 9) a permis également de vérifier le bon fonctionnement du système bidimensionnel. On constate sur la superposition

des fractions, que l'on obtient bien 4 pics distincts qui ont été fractionnés 3 fois et que les différentes fractions du même pic sont superposées.

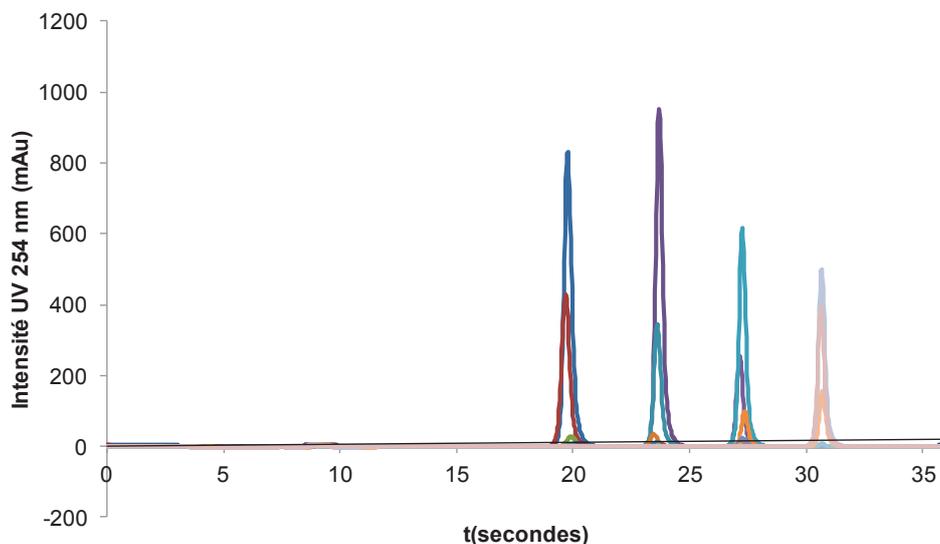


Fig. II- 9 : Superposition des fractions obtenues en 2nde dimension d'une analyse de 4 parabènes en LCxLC pour le système LCxLC n°3. D1 : Gold hypersil 50x1mm, 3µm. Isocratique 70/30 Eau/ACN pendant 20 minutes. 20 µL/min. 2µL injecté. 30°C. D2 : Acquity CSH C18 50x2.1mm, 1.7 µm. Gradient de 20 à 80% en ACN en 0.5min (sans additif). 1.2mL/min. 30°C. $t_{cycle}=0.6min$ donc $Vinj_{D2}=12µL$. UV 254 nm.

B- PHASES STATIONNAIRES

I- Phases HILIC

Différents types de colonnes ont été utilisés pour les études en HILIC (Tab. II- 5). Ces colonnes peuvent être classées en trois catégories selon le greffon de phase stationnaire : amide (Acquity UPLC BEH Amide), zwitterionique (Nucléodur HILIC, Nucleoshell HILIC), silice nue (Accucore HILIC, Acquity UPLC BEH HILIC, Hypersil Gold HILIC, Kinetex HILIC).

	Nom	Type	Fabricant	di(mm)	L(cm)	dp(µm)	Etude	Abb.
HILIC	Accucore HILIC	C	Thermo Scientific	2.1	10	2.6		
	Acquity UPLC BEH Amide	P	Waters	2.1	5	1.7	a	AcqAmi
	Acquity UPLC BEH HILIC	P	Waters	2.1	5	1.7	a, b	AcqH
	Hypersil Gold HILIC	P	Thermo Scientific	2.1	5	1.9		
	Kinetex HILIC	C	Phenomenex	2.1	10	2.6	a	KinH
	Nucleodur HILIC	P	Marcherey Nagel	2	12.5	3	a, b	NH
	Nucleodur HILIC	P	Marcherey Nagel	1	6	3		
Nucleoshell HILIC	C	Marcherey Nagel	2	10	2.7			

Abb. : Abbréviation ; Type C : core-shell ; Type P : particules totalement poreuses

Tab. II- 5 : Colonnes utilisées pour les études en HILIC. Certaines colonnes ont été utilisées pour des études d'orthogonalité avec les échantillons suivants : (a) petites molécules ionisables (b) peptides.

II- Phases RPLC

Différents types de colonnes ont été utilisés pour les études en RPLC (Tab. II- 6). Ces colonnes diffèrent par le type de phase stationnaire (à base de silice ou autre support), les dimensions (diamètre interne et longueur de colonne) et la taille des particules. Certaines colonnes sont à particules totalement poreuses alors que d'autres sont de type core-shell. Les particules core-shell sont constituées d'un noyau dur recouvert d'une couche poreuse.

	Nom	Type	Fabricant	di(mm)	L(cm)	dp(µm)	Etude	Abb.
RPLC	Acquity BEH Shield RP18	P	Waters	2.1	5	1.7	a	AcqSh
	Acquity CSH C18	P	Waters	2.1	3	1.7		
	Acquity CSH C18	P	Waters	2.1	5	1.7		
	Acquity CSH C18	P	Waters	2.1	10	1.7		
	Acquity CSH Phenyl hexyl	P	Waters	2.1	5	1.7	c	CSHph
	Acquity UPLC BEH C18	P	Waters	2.1	5	1.7	a, b, c	Acq
	Acquity UPLC BEH C18	P	Waters	2.1	10	1.7		
	Acquity UPLC BEH300 C18	P	Waters	2.1	5	1.7	a, b	Acq300
	Ascentis Express C18	C	Sigma aldrich	2.1	10	2.7	a, b	
	Ascentis Express C18	C	Sigma aldrich	2.1	10	5		
	Blaze200	P	Selerity	4.6	15	5	a	Blaze
	Gemini C18	P	Phenomenex	2	15	3	a	Gemini
	Hypercarb	P	Thermo Scientific	3	10	5	a	Hyp
	Hypersil BetaBasic 18	P	Thermo Scientific	2.1	15	5	a	
	Hypersil Gold	P	Thermo Scientific	1	5	3		
	Hypersil Gold	P	Thermo Scientific	3	15	5	a	
	Hypersil Gold PFP	P	Thermo Scientific	2.1	5	1.9	a	HPFP
	Kinetex C18	C	Phenomenex	2.1	5	1.7	b	Kin
	Kinetex C18	C	Phenomenex	2.1	3	1.3		
	Kinetex XB-C18	C	Phenomenex	2.1	5	1.7		
	Kinetex XB-C18	C	Phenomenex	2.1	5	2.6		
	Nucleodur C18 Gravity	P	Marcherey Nagel	2	10	1.8	a	
	PLRP-S	P	Agilent Technologies	4.6	15	5	a	PLRP
	Vision HT	P	Grace	2	5	1.5	b	
	Xbridge Shield RP18	P	Waters	2.1	10	3.5	a	
	Xterra RP18	P	Waters	4.6	5	3.5	a	
ZirChrom-PBD	P	ZirChrom	4.6	5	3.5	a	ZPBD	
Zorbax SB-C18	P	Agilent Technologies	2.1	5	1.8	a	SBC18	
ZrCarb	P	ZirChrom	4.6	5	3.5	a	Zcarb	

Abb. : Abréviation ; Type C : core-shell ; Type P : particules totalement poreuses

Tab. II- 6 : Colonnes utilisées pour les études en RPLC. Certaines colonnes ont été utilisées pour des études d'orthogonalité avec les échantillons suivants : (a) petites molécules ionisables (b) peptides (c) composés pharmaceutiques

C- PHASES MOBILES

L'eau utilisée pour la préparation des phases mobiles provient d'un système de purification Elga. La conductivité obtenue est de 18 MΩ.cm. Les bactéries éventuelles se trouvant dans l'eau sont détruites par une lampe UV. Les phases mobiles organiques sont

préparées à partir d'acétonitrile et de méthanol qualité HPLC en provenance de Sigma Aldrich. Les phases mobiles sont préparées quotidiennement.

En RPLC, divers additifs sont ajoutés dans les phases mobiles aqueuses et organiques afin de contrôler le pH (Tab. II- 7). Ces additifs sont l'acide formique (FA), l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acétate d'ammonium (AA), le formate d'ammonium (AF) et l'ammoniac (AMO). Ces additifs sont introduits dans les phases mobiles aqueuses et organiques mis à part les sels d'ammonium qui ne sont pas ajoutés aux phases mobiles organiques étant donnée leur faible solubilité [2]. Les phases mobiles aqueuses préparées à base de sels sont filtrées sur 0.22 µm avec un système de filtration Millipore afin de garantir l'absence de particules dans la préparation. En HILIC, seul l'acétate d'ammonium a été utilisé comme additif.

	Additif	Concentration	$\text{pH}_{25^\circ\text{C}}$
TFA	Acide trifluoroacétique	0.05% v/v	2.4
FA	Acide formique	0.1 % v/v	2.7
AF	Formate d'ammonium	10 mM	3 ajusté (acide formique) ou 10.4 ajusté (ammoniac)
AA	Acétate d'ammonium	10 mM	6.8
AMO	Ammoniac	0.1 % v/v	10.4

Tab. II- 7 : Description des phases mobiles

Les mesures de pH sont réalisées avec un pH-mètre (Radiometer Analytical) constitué d'une électrode de référence (Ag/AgCl dans KCl saturé), d'une électrode de mesure en verre et d'une sonde de température. Le pH-mètre est calibré sur deux points avant chaque utilisation avec des solutions tampon à pH 4.01, 7.01 et 10.01.

D- COMPOSES D'INTERET

I- Composés tests des systèmes chromatographiques

Tous les composés permettant de tester les systèmes chromatographiques ont été détectés en UV à la longueur d'onde 254 nm. Ces composés proviennent tous du fournisseur Sigma Aldrich. L'uracile et le naphthalène ont été utilisés pour mesurer la porosité des colonnes RPLC et HILIC respectivement. Les performances des colonnes RPLC ont été testées avec un mélange contenant : méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène, caféine, ortho-crésol, β-naphtol et uracile. Les colonnes HILIC ont été testées avec un mélange contenant : naphthalène, uracile, caféine, cytosine et théobromine.

L'acétone a été utilisée comme marqueur UV lors des mesures de volume de délai des différents systèmes chromatographiques. Le méthylparabène a été utilisé pour les tests de fonctionnement de vannes des systèmes bidimensionnels et l'éthylparabène pour les mesures de dispersion dans les systèmes HPLC.

Les courbes de Van Deemter pour les composés neutres ont été tracées avec la caféine ou l'éthylparabène en RPLC, la cytosine en HILIC.

II- Petites molécules ionisables

Les composés sont stockés sous forme de solutions à 200 ppm dans un mélange 50/50 eau/acétonitrile v/v dans des flacons en verre. Ces solutions sont conservées au réfrigérateur à 4°C et sont diluées à 50 ppm dans une phase mobile peu éluante (haute teneur en eau en RPLC et haute teneur en acétonitrile en HILIC) dans des flacons HPLC en verre de 2 mL. Tous ces composés ont été détectés en UV à la longueur d'onde 220 nm.

1. Mélange pour l'étude d'orthogonalité

Un mélange de petites molécules ionisables a été constitué pour l'étude d'orthogonalité (Tab. II- 8). Ces composés proviennent de Sigma Aldrich mis à part la procaine qui nous a été fourni gracieusement par le laboratoire de chimie analytique pharmaceutique de Genève. Ces composés ont été choisis lors des travaux de thèse de C. Grivel [3] et couvrent une grande gamme de pKa et d'hydrophobicité (log P).

	Composé	MW (g/mol)	pKa	Type	log P
1	acide acétylsalicylique	180.16	3.5	acide	1.4
2	phénol	94.11	9.9	acide	1.5
3	méthyl parabène	152.15	8.3	acide	1.9
4	acide benzoïque	122.12	4.2	acide	1.6
5	clozapine	326.82	7.3	basique	3.9
6	protriptyline	263.38	10.6	basique	4.4
7	imipramine	280.41	9.5	basique	4.4
8	amitriptyline	277.4	9.2	basique	4.4
9	aténolol	266.34	9.4	basique	0.3
10	nadolol	309.4	9.5	basique	0.6
11	pindolol	248.32	9.5	basique	1.7
12	propranolol	259.34	9.5	basique	2.9
13	procaine	236.31	9.2	basique	2.3
14	diphénhydramine	255.35	8.8	basique	3.0
15	N,N-diméthylaniline	121.18	5.1	basique	2.1

Tab. II- 8 : Caractéristiques des petites molécules étudiées

2. Composés pharmaceutiques pour une analyse LCxLC-MS

Un mélange de 15 composés pharmaceutiques a été constitué pour une analyse bidimensionnelle LCxLC-MS présentée dans le chapitre 6. Ces composés sont issus de différentes familles de médicaments β -bloquants (aténolol, alprénolol, propranolol, céliprolol, nadolol, acébutolol, pindolol, bisoprolol), antipsychotique (clozapine), anesthésiques (procaine et chlorprocaine), antihistaminique (diphénhydramine) et antidépresseurs (amitriptyline, imipramine, protriptyline).

3. Autres mélanges

La diphénhydramine et la protriptyline (Tab. II- 8) ont été utilisées pour tracer des courbes de Van Deemter présentées dans le chapitre 3. Dans le cas de l'étude du temps d'équilibrage en gradient (chapitre 3), le mélange contenait les composés suivants :

méthylparabène, caféine ou diphénhydramine (suivant les coélutions), acide benzoïque, clozapine, protriptyline et aténolol. Tous ces composés ont été détectés en UV à 220 nm.

III- Peptides

1. Composés standards

Un panel de 10 peptides a été sélectionné de manière à être représentatif de peptides issus de digestion tryptiques de protéines. Ils ont été choisis lors des travaux de thèse de C. Grivel [3] de manière à couvrir la gamme la plus large possible en terme de point isoélectrique et de masse moléculaire (jusqu'à 2000 Da). Afin d'être détectables en UV, les peptides choisis contiennent impérativement des acides aminés possédant une chaîne aromatique (tyrosine, phénylalanine, tryptophane). Les peptides ont été détectés à 210 nm pour toutes les études. Ces peptides proviennent de Sigma Aldrich excepté WDDHH qui a été synthétisé par la société Genecust.

Les caractéristiques des peptides sont indiqués ci-dessous (Tab. II- 9). Après solubilisation des peptides dans l'eau, des aliquots sont conservés au congélateur à -20°C dans des tubes coniques en plastiques. Les aliquots sont ensuite décongelés selon le besoin et les solutions de peptides sont préparées dans des flacons HPLC en plastique de 300µL pour éviter les adsorptions sur le verre puis conservées à 4°C dans le passeur d'échantillon.

	Peptide	M (Da)	Point isoélectrique
1	influenza hemagglutinin	1102.15	3.5
2	FLAG	1012.97	3.9
3	WDDHH	708.68	5.2
4	leucine enkephalin	555.62	6
5	bombesin	1619.85	7.6
6	[arg8]-vasopressin	1084.23	8.2
7	[ile]-angiotensin	897.08	9.4
8	bradykinin fragment 1-5	572.66	10.6
9	substance P	1347.63	11.7
10	bradykinin	1060.21	12.5

Tab. II- 9 : Caractéristiques des peptides étudiés [4]

2. Peptides issus de digestion tryptique de protéines

Des mélanges plus complexes de peptides ont été obtenus à partir de digestion tryptiques de différentes protéines. L'albumine de sérum humaine (HSA) et l'albumine de sérum bovin ont été digérées seules ce qui conduit à un mélange de 71 peptides et 79 peptides respectivement [5]. L'albumine de sérum bovin (BSA), le lysozyme et la myoglobine ont été mélangées (noté mélange de 3 protéines) afin d'obtenir après digestion un mélange de 115 peptides [5]. Un mélange de 6 protéines a aussi été digéré et comprend la BSA, l'HSA, le lysozyme, la myoglobine, le cytochrome C et la β-caséine. Cette digestion conduit à un mélange de 196 peptides [5]. Les séquences des peptides issus des digestions tryptiques sont indiquées en Annexes (p 197).

La digestion enzymatique comprend 3 étapes (Fig. II- 10) et nécessite l'emploi de différents réactifs provenant tous de Sigma Aldrich. Le dithiothréitol (DTT) réduit les ponts disulfures et conduit à la dénaturation de la protéine. L'iodoacétamide (IA) alkyle les cystéines ayant perdu leurs ponts disulfures. La trypsine coupe alors les protéines après les lysines et arginines.

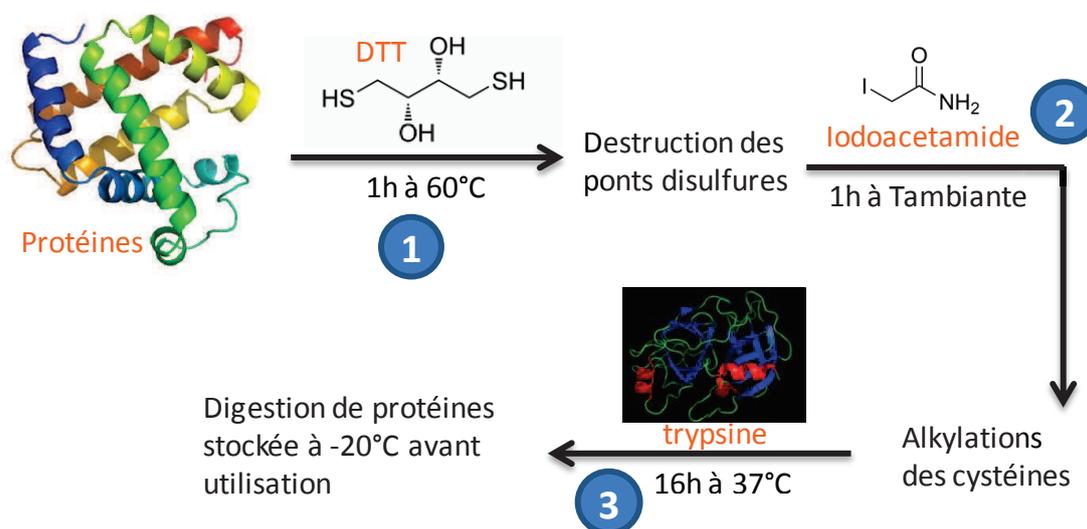


Fig. II- 10 : Schéma réactionnel de la digestion tryptique de protéines

Ce protocole a été adapté pour obtenir des digestions très concentrées à partir du protocole décrit dans la thèse de C. Grivel [3]. Le protocole expérimental suivi est le suivant : 35 mg de protéines sont mis à réagir avec 0.5 mL d'une solution de DTT dans l'eau à 20 mM. Pour la deuxième étape, 0.5 mL d'une solution d'IA à 20 mM est ajouté. La trypsine est solubilisée dans une solution de HCA (hydrogénocarbonate d'ammonium) à 20 mM à la teneur de 1 mg/mL. 0.5 mL de cette solution est ajouté au milieu réactionnel. Un volume total de digestion de 1.5 mL est ainsi obtenu. Le milieu réactionnel est chauffé dans un système thermomixer (Eppendorf) lors des étapes 1 et 3.

Des aliquots sont ensuite conservés au congélateur à -20°C dans des tubes coniques en plastiques. Les aliquots sont ensuite décongelés selon le besoin, filtrés sur 0.22 µm et les solutions diluées sont préparées dans des flacons HPLC en plastiques pour éviter les adsorptions sur le verre. Ces solutions sont ensuite conservées à 4°C dans le passeur du système chromatographique ou au réfrigérateur. Les digestions peptidiques ont toujours été détectés à la longueur d'onde UV 210 nm pour toutes les études.

IV- Mélanges de composés pharmaceutiques

Des échantillons de mélanges pharmaceutiques ont été fournis par le laboratoire pharmaceutique Servier (Orléans). Les composés non solubilisés ainsi que les solutions ont été conservés au réfrigérateur à 4°C. Deux études nous ont été proposées.

1. Premier projet

Le mélange contenant le principe actif et les impuretés a été dissous dans de l'eau acidifiée avec HClO₄ à pH=2.5 à 3 mg/mL. Les solutions des impuretés sont préparées en solubilisant 5 mg dans 1 mL d'acétonitrile puis en ajoutant 9 mL d'eau acidifiée avec HClO₄ à pH=2.5.

2. Deuxième projet

Le mélange contenant le principe actif et les impuretés a été préparé en mélangeant tous les composés fournis individuellement à la concentration de 0.5 mg/mL pour le principe actif et 0.005mg/mL pour les impuretés. La solubilisation a été effectuée dans 25% d'acétonitrile et 75% de solution aqueuse contenant de l'heptane sulfonate monohydraté à 5.61 g/L et 2.27g/L de dihydrogénophosphate de potassium. La solution a été passée au bac à ultrason pour améliorer la solubilisation des composés. Les solutions des impuretés seules ont été préparées de la même manière à une concentration de 0.05 mg/mL.

E- PARAMETRES CHROMATOGRAPHIQUES

I- Conditions gradient

La plupart des expériences ont été effectuées en conditions de gradient linéaire. Seules quelques analyses du chapitre 3 ont été effectuées en mode isocratique. Les gradients ont été programmés avec une montée linéaire durant un temps t_G , une descente pour revenir aux conditions initiales pendant un temps mort t_0 et un équilibrage de colonne correspondant à $5t_0$.

Dans le cas de gradients en RPLC, les compositions initiales en solvant organique (voie B) étaient de 1%. En HILIC, les compositions initiales en solvant organique (voie B) étaient de 98%. Les compositions finales aussi bien en RPLC qu'en HILIC étaient ajustées en fonction de l'élution du dernier composé. La pente normalisée du gradient est donnée par l'équation suivante :

$$s = (C_f - C_i) \frac{t_o}{t_G} \quad \text{Eq. II- 4}$$

Avec C_i et C_f les compositions de phase mobile initiale et finale respectivement. Le temps de gradient a été ajusté de manière à avoir une pente normalisée constante lors d'études comparatives de colonnes.

II- Informations issues des chromatogrammes

La composition à l'élution est donnée par :

$$C_e = C_i + \frac{C_f - C_i}{t_G} \times (t_R - t_D - t_0) \quad \text{Eq. II- 5}$$

Avec t_R le temps de rétention et t_D le temps de délai de l'instrument.

Les mesures de largeurs de pics ont été effectuées à 10% de la hauteur du pic ($w_{10\%}$) et ensuite corrigées pour avoir les largeurs à 4σ selon l'équation suivante :

$$w_{4\sigma} = 0.93 \times w_{10\%} \quad \text{Eq. II- 6}$$

La variance totale de pic a été établie par l'équation de Dorsey-Foley [6] corrélée à la vraie variance pour de petites asymétries de pics (<2.5) [7] :

$$\sigma^2 = \frac{(b/a + 1.25) \times w_{10\%}^2}{41.7} \quad \text{Eq. II- 7}$$

où b/a le ratio de la largeur droite sur la largeur gauche mesurés à 10% de la hauteur du pic (asymétrie). Il faut mentionner que l'équation de Dorsey-Foley pourrait devenir totalement imprécise dans le cas de valeurs de très grandes asymétries (>2.5) et pourrait ainsi sous estimer les valeurs de hauteurs de plateaux. Les valeurs correspondantes doivent donc plutôt être considérées comme les meilleures performances qui pourraient être atteintes dans de telles conditions. Cette formule a donc été utilisée dans le cas de pic gaussiens d'asymétrie inférieure à 2.5. Dans le cas des grandes asymétries, la dispersion a été mesurée à partir des moments statistiques centrés d'ordre 2 comme indiqué ci-dessus dans la section A.

Les viscosités des phases mobiles, η , ont été calculées pour toutes les conditions de phase mobile d'après une méthode décrite précédemment [8]. Les coefficients de diffusion des composés dans l'eau à 25°C ont été estimés à partir de l'équation de Wilke et Chang [9]. Les coefficients de diffusion des composés ont été estimés par l'équation suivante :

$$D_m = \frac{0.9 \cdot T}{298 \cdot \eta} \times D_{m,w,25^\circ C} \quad \text{Eq. II- 8}$$

où η est la viscosité du solvant (cP) à la température T (K) et $D_{m,w,25^\circ C}$, le coefficient de diffusion (m^2/s) dans l'eau à 25°C.

Le coefficient de diffusion dans l'eau à 25°C des petites molécules a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$D_{mA,w,25^\circ C} = D_{mref,w,25^\circ C} \left(\frac{V_{ref}}{V_A} \right)^{0.6} \quad \text{Eq. II- 9}$$

Où $D_{mref,w,25^\circ C}$ est le coefficient de diffusion d'un composé de référence, V_A et V_{ref} sont les volumes molaires des composés d'intérêt et de référence respectivement. Le coefficient de diffusion dans l'eau à 25°C des peptides a été calculé en utilisant la corrélation empirique de Stadius et coll. [10] car le volume molaire des peptides n'est pas connu :

$$D_{m,w,25^\circ C} = 10^{-5} \left(2.2M^{-1/3} + \frac{62}{M} \right) \quad \text{Eq. II- 10}$$

où M est la masse moléculaire du peptide.

REFERENCES

- ¹ A. Van der Horst, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 693
- ² A. P. Schellinger, P.W. Carr, LC GC Noth america, 22 (2004) 544
- ³ C. Grivel, Thèse, Lyon (2010)
- ⁴ <http://www3.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl>
- ⁵ http://web.expasy.org/peptide_cutter
- ⁶ J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 55 (1983) 730
- ⁷ W.W. Yau, S.W. Rementer, J.M. Boyajian, J.J. DeStefano, J.F. Graff, K.B. Lima, J.J. Kirkland, J. Chromatogr 630 (1993) 69
- ⁸ D. Guillarme, S. Heinisch, J.L. Rocca, J. Chromatogr. A 1052 (2004) 39
- ⁹ C.R. Wilke, P. Chang, Polymer 18 (1977) 835
- ¹⁰ M.A. Stadalius, H.S. Gold, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 296 (1984) 31

Chapitre 3 : Etude des effets cinétiques en RPLC et en HILIC

Courbes de Van Deemter, effet de l'additif de pH et de la température

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

“Effect of pH additive and column temperature on kinetic performance of two different sub-2 μm stationary phases for ultrafast separation of charged analytes”

S. Heinisch, A. D'Attoma, C. Grivel, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 135

INTRODUCTION

Le tracé des courbes de Van Deemter permet d'avoir des données cinétiques pour les colonnes étudiées. Ces courbes permettent de déterminer la hauteur minimale équivalente à un plateau théorique et de connaître l'augmentation de cette hauteur selon le débit de phase mobile. Les débits de phase mobile choisis en seconde dimension d'une séparation LCxLC sont généralement très grands afin d'obtenir une séparation de seconde dimension aussi rapide que possible. Ainsi, il est important de connaître les performances de la colonne bien au-delà de l'optimum. De même, en première dimension, des débits très faibles doivent être utilisés pour obtenir une séparation de première dimension relativement lente et avoir suffisamment de fractions par pic. Dans le cas de séparations de première dimension, les conditions de débits choisis sont généralement en deçà de l'optimum. La zone de débit avant le débit optimum n'est généralement pas utilisée en chromatographie en phase liquide unidimensionnelle puisque dans cette zone, l'efficacité est moins bonne qu'à l'optimum et le temps d'analyse particulièrement allongé. Une bonne connaissance des courbes de Van Deemter est ainsi nécessaire pour l'étude de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle.

Dans la section A de ce chapitre, les colonnes utilisées en RPLC et en HILIC seront caractérisées à l'aide de composés neutres afin de connaître leurs performances avec des composés modèles. Dans la section B, la comparaison des courbes de Van Deemter en RPLC pour les composés chargés sera détaillée sous forme de manuscrit publié (article 1). Une méthode de tracé des courbes de Van Deemter à partir de données obtenues en gradient d'élution est proposée. Les différents avantages seront précisés dans cette partie. Cette méthode de tracé des courbes sera ensuite appliquée, dans la section C, au mode HILIC où l'impact de la température sur les courbes de Van Deemter des composés chargés est étudié. Les courbes de Van Deemter tracées en HILIC pour les peptides seront ensuite comparées à celles obtenues en RPLC.

L'utilisation de gradients impose la nécessité d'équilibrer la colonne entre chaque analyse. Or, en seconde dimension d'une analyse LCxLC, le temps de cycle doit être minimal pour injecter des volumes restreints en seconde dimension et donc éviter les élargissements de pics. Pour garder le temps de cycle restreint, le temps d'équilibrage de la colonne doit être aussi faible que possible. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact du temps d'équilibrage de la colonne sur la répétabilité du gradient. Une étude a déjà été effectuée en RPLC [1]. Une étude similaire est donc menée en HILIC pour savoir si le mode HILIC pouvait être utilisé en seconde dimension d'une analyse LCxLC et permettre l'obtention de séparations répétables. Cette étude est détaillée en section D.

A- COMPARAISON DE COURBES DE VAN DEEMTER POUR LES COMPOSES NEUTRES

Cette étude est menée pour connaître les performances des colonnes avec des composés neutres. Ces courbes serviront de base au dimensionnement des analyses LCxLC. Les composés choisis sont l'éthylparabène en RPLC et la cytosine en HILIC. Les courbes sont comparées pour des facteurs de rétention de l'ordre de 3.

I- En RPLC

Les courbes de Van Deemter en coordonnées réduites pour plusieurs phases stationnaires de type RPLC sont superposées sur la Fig. III- 1. Les phases sont de type Core-Shell mise à part la phase Acquity BEH-C18 qui est totalement poreuse.

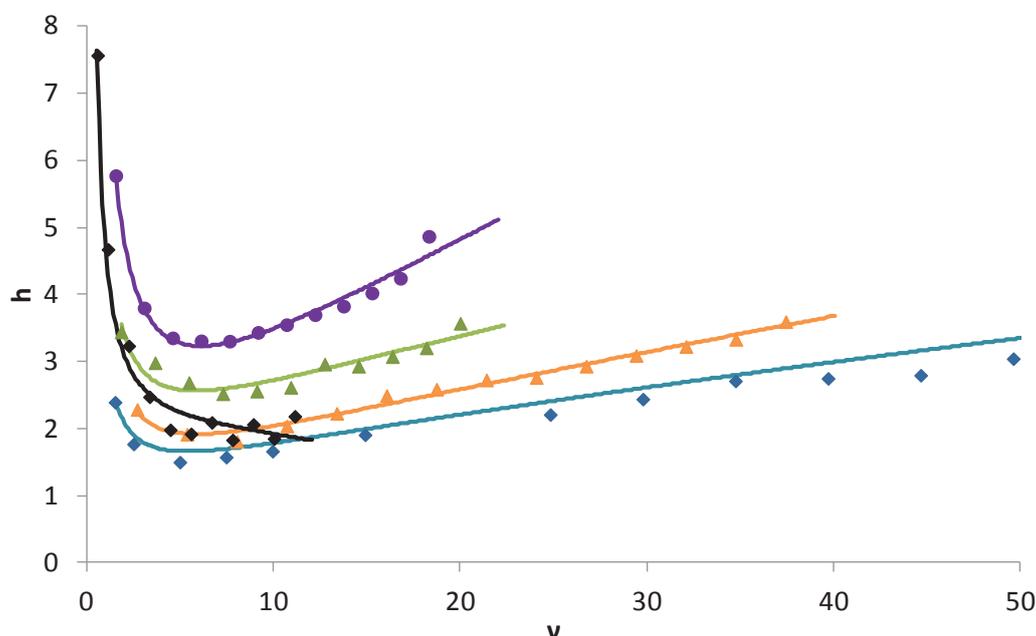


Fig. III- 1 : Courbes de Van Deemter en coordonnées réduites de l'éthylparabène ($k \approx 3$). 70/30 Eau/ACN, 30°C. ◆ Ascentis Express 100x2.1mm, 5 μ m ▲ Kinetex-C18 50x2.1mm, 1.7 μ m ▲ Ascentis Express 100x2.1mm, 2.7 μ m ● Acquity BEH-C18 50x2.1mm, 1.7 μ m ◆ Kinetex-C18 30x2.1mm, 1.3 μ m.

Les meilleures performances sont obtenues pour les colonnes de type core-shell. En effet, les valeurs de h à l'optimum (h_{opt}) sont comprises entre 1.8 et 2.8 pour toutes les colonnes de type Core-Shell. Par contre, pour la colonne Acquity BEH-C18, la valeur est légèrement supérieure à 3. Pour la colonne Kinetex-C18 1.3 μ m (3cm), le débit maximal est de seulement 1mL/min. En effet, la pression générée par la colonne est très importante même pour une colonne de 3 cm de longueur étant donné le diamètre des particules. L'intérêt d'utiliser des colonnes remplies de particules 1.3 μ m dans des applications unidimensionnelles semble donc très limité. Néanmoins, cette colonne semble particulièrement intéressante dans le cadre d'analyses bidimensionnelles puisqu'elle permet

d'obtenir des séparations ultra-rapides en seconde dimension. Les colonnes Ascentis express en 2.7 et 5 μm sont très efficaces et sont intéressantes à placer dans une première dimension d'une analyse bidimensionnelle. Les valeurs de v optimal sont de l'ordre de 5 pour toutes les courbes.

II- En HILIC

Les performances des colonnes Acquity BEH HILIC, Acquity BEH amide et Kinetex HILIC ont été évaluées à l'aide du tracé des courbes de Van Deemter pour la cytosine (Fig. III- 2). La valeur de h_{opt} est plus élevée qu'en RPLC et proche de 5 pour les trois colonnes. La valeur de v optimal est de l'ordre de 2, bien plus faible qu'en RPLC pour un facteur de rétention comparable.

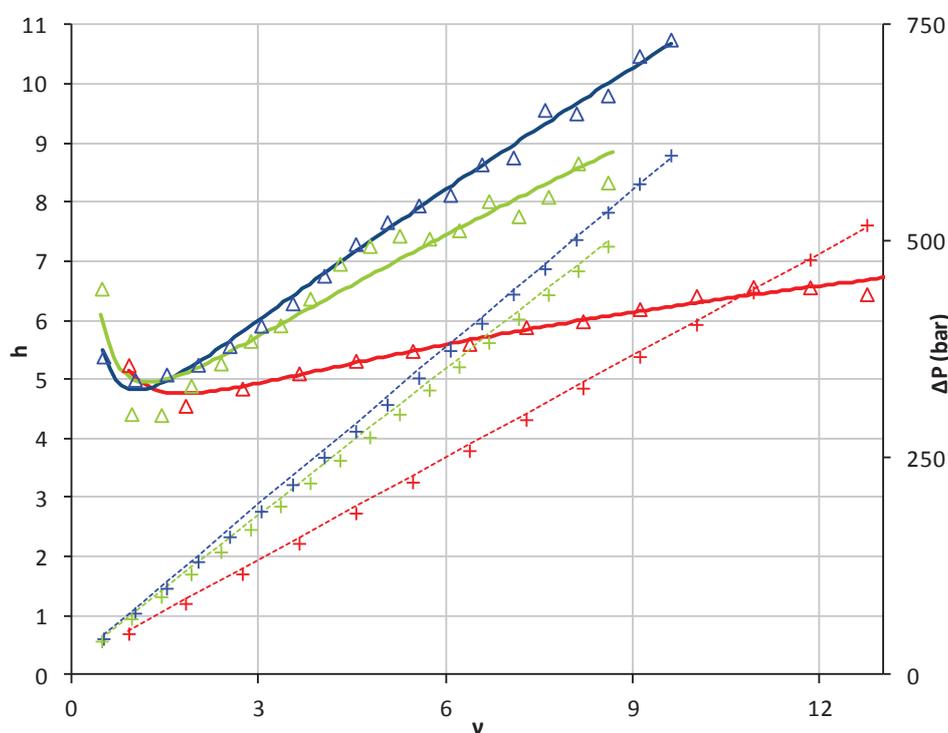


Fig. III- 2 : Courbes de Van Deemter en coordonnées réduites de la cytosine ($k \approx 3.5$). Conditions : Δ Acquity BEH HILIC 5cmx2.1mm 1.7 μm , Δ Acquity BEH amide 5cmx2.1mm 1.7 μm et Δ Kinetex HILIC, 10cmx2.1mm 2.6 μm . Isocratique 8/92 Eau 10 mM acétate d'ammonium/ACN. 1 μL injecté. Les pertes de charges mesurées sont indiqués sur le graphique avec les droites en pointillées et les mêmes codes de couleur.

Le terme C de l'équation de Van Deemter correspondant à la résistance au transfert de masse est nettement plus faible pour la colonne Kinetex que pour les deux autres colonnes, sans doute du fait de sa structure de type Core-Shell qui permet d'améliorer le processus de résistance au transfert de masse et donc de réduire le terme C (voir chapitre 1 et ref [2]). La colonne Kinetex HILIC est donc potentiellement intéressante en D2 car elle devrait permettre de garder des hauteurs de plateaux faibles sur une large gamme de vitesse au delà de l'optimum.

De plus, la perte de charge mesurée pour cette colonne est bien plus faible que pour les deux autres colonnes étant donné les diamètres de particules (particules 2.6 et 1.7 μ m). La viscosité des phases mobiles en HILIC est généralement plus faible qu'en RPLC du fait des hautes teneurs en acétonitrile. La limite en pression est généralement moins problématique en HILIC et c'est souvent la limite en débit de l'appareillage qui est plus contraignante. Par exemple, avec la colonne Acquity BEH 50x2.1mm 1.7 μ m, la pression est de 500 bar à 1.8mL/min avec 92% ACN (Fig. III- 2).

III- Comparaison des modes RPLC et HILIC

D'après les courbes de Van Deemter obtenues pour des valeurs de k similaires (de l'ordre de 3), il semble que les performances des colonnes HILIC soient moins bonnes que celles des colonnes RPLC. Il faut noter cependant que ces performances peuvent dépendre du composé choisi pour l'étude (ici l'ethylparabène en RPLC et la cytosine en HILIC). En RPLC, les valeurs de h_{opt} atteignent 3 à 1.8 alors qu'en HILIC, h_{opt} reste supérieur à 5 pour les trois colonnes étudiées. Il a également été reporté que la comparaison des performances RPLC / HILIC était souvent défavorable à l'HILIC [3].

B- COMPARAISON DE COURBES DE VAN DEEMTER EN RPLC POUR LES COMPOSES CHARGES

Article 1 : *“Effect of pH additive and column temperature on kinetic performance of two different sub-2 μ m stationary phases for ultrafast separation of charged analytes”*

Cette section est présentée sous forme d'une publication qui décrit les effets de la température et de l'additif de pH sur le tracé des courbes de Van Deemter pour deux phases stationnaires à particules de 1.7 μ m pour l'analyse des composés chargés. Après une introduction situant le contexte de l'étude, la partie expérimentale détaille les conditions des expériences effectuées et présente la méthode développée permettant de tracer les courbes de Van Deemter à partir de données issues de gradients. Afin de vérifier la validité de cette méthode, des courbes tracées à partir de données isocratiques et gradients sont superposées. Les effets de la température et de différents additifs de pH sont ensuite comparés pour l'analyse de composés basiques et pour les peptides : acide formique (FA), acide trifluoroacétique (TFA), acétate d'ammonium (AA), formate d'ammonium (AF) et ammoniac (AMO). Les capacités de pics obtenues dans les différents cas pour le mélange de 10 peptides sont comparées. Une analyse ultra-rapide d'une digestion tryptique de 3 protéines réalisée dans les conditions générant la plus grande capacité de pics est présentée.

C- COMPARAISON DE COURBES DE VAN DEEMTER EN HILIC POUR LES COMPOSES CHARGES

I- Effet de la température

Dans l'optique d'utiliser le mode HILIC en seconde dimension d'une analyse LCxLC, il est important d'étudier l'impact de la température sur les performances de la colonne. L'augmentation de la température peut être bénéfique sur la forme des pics comme le montre la Fig. III- 3. Le peptide 1-influenza hemagglutinin, indiqué par une flèche, est déformé à 30 °C (Fig. III- 3b) et symétrique à 80°C (Fig. III- 3a).

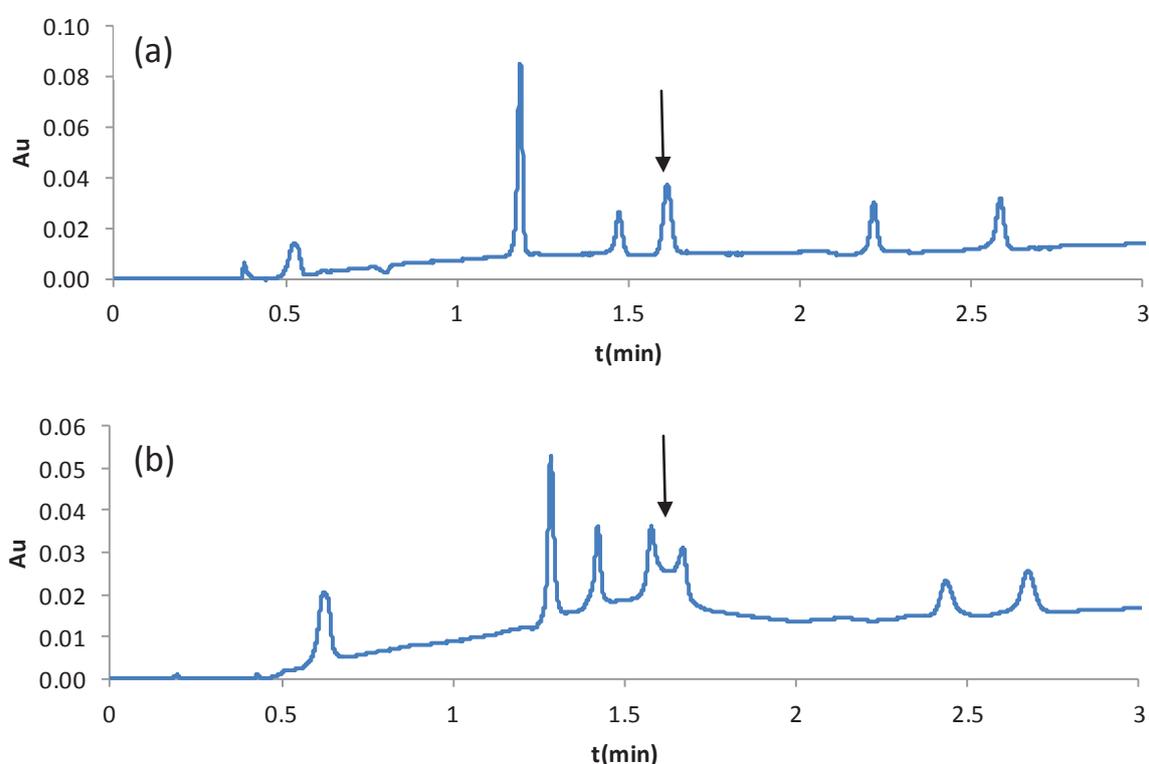


Fig. III- 3 : Comparaison de chromatogrammes à 30 et 80°C. Conditions : colonne Nucléodur HILIC zwitterionique 125x2mm, 3µm. Solutés : uracile, 4-leucine enkephalin, diphénhydramine, 1-influenza hemagglutinin, 7-[ile]-angiotensin, 5-bombesin (dans l'ordre). Gradient eau acétate d'ammonium 10mM /ACN ; s=5%. F=1,0mL/min. Vinj=1µL. (a) 80°C (b) 30°C.

Les courbes de Van Deemter de la colonne Nucléodur ont été tracées pour plusieurs peptides, l'uracile et la diphénhydramine à 30°C et 80°C (Fig. III- 4) avec la méthode de calcul développée dans la section B de ce chapitre (article 1).

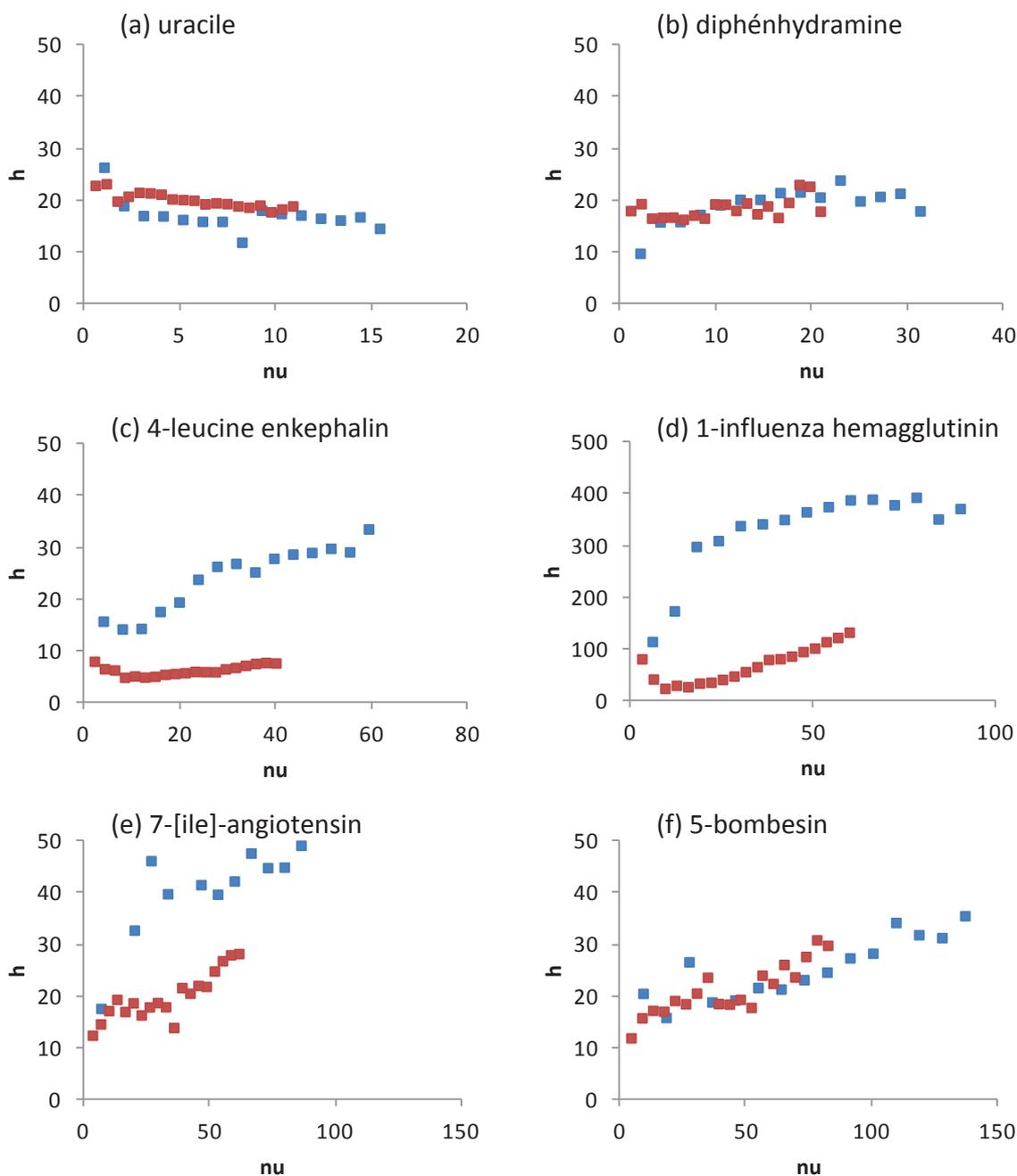


Fig. III- 4 : Tracé h-v des courbes de Van Deemter. Conditions : Nucléodur HILIC 125x2mm, 3 μ m. Phase mobile: Eau 10 mM acétate d'ammonium/ACN. 1 μ L injecté. Solutés : (a) uracile, (b) diphénhydramine, (c) 4-leucine enkephalin, (d) 1-influenza hemagglutinin, (e) 7-[ile]-angiotensin, (f) 5-bombesin. Les données sont issues d'analyses réalisées en gradient. Le calcul de h a été effectué avec la méthode présentée en section B (article 1)

Les valeurs de hauteurs équivalentes à un plateau théorique optimales sont bien plus importantes que celles obtenues pour la cytosine avec les colonnes Acquity BEH HILIC, Acquity BEH amide et Kinetex HILIC. Pour l'uracile, la diphénhydramine et le peptide 5-bombesin les courbes à 30°C et 80 °C se superposent (Fig. III- 4a, b, f). Il n'y a donc pas d'effet bénéfique de la température pour ces trois composés. Par contre, pour les peptides 4-leucine enkephalin, 1-influenza hemagglutinin et 5-bombesin., l'élévation de la température

permet de réduire la hauteur équivalente à un plateau théorique de manière significative (Fig. III- 4c, d, e). La courbe obtenue pour le peptide 1-influenza hemagglutinin à 30°C est particulièrement mauvaise étant donné la déformation du pic (Fig. III- 3). L'augmentation de la température en HILIC, comme en RPLC, peut permettre dans certains cas d'améliorer significativement l'efficacité. Ces résultats sont conformes à des études précédemment publiées [4].

Il faut noter que pour l'uracile, la diphénhydramine et le peptide 4-leucine enkephalin (uniquement à 80°C), les courbes de Van Deemter sont quasiment plates et qu'aucune diminution d'efficacité n'est observée en augmentant le débit (Fig. III- 4a,b,c). Néanmoins, contrairement à ce qui a été observé en RPLC (Article 1 Fig. 4, 5 et 9) cela n'est pas du à une diminution de l'asymétrie. En effet, le tracé de l'asymétrie en fonction du débit (Fig. III- 5) indique que l'asymétrie est constante pour les 3 peptides, l'uracile et la diphénhydramine, avec des valeurs proches de 1.

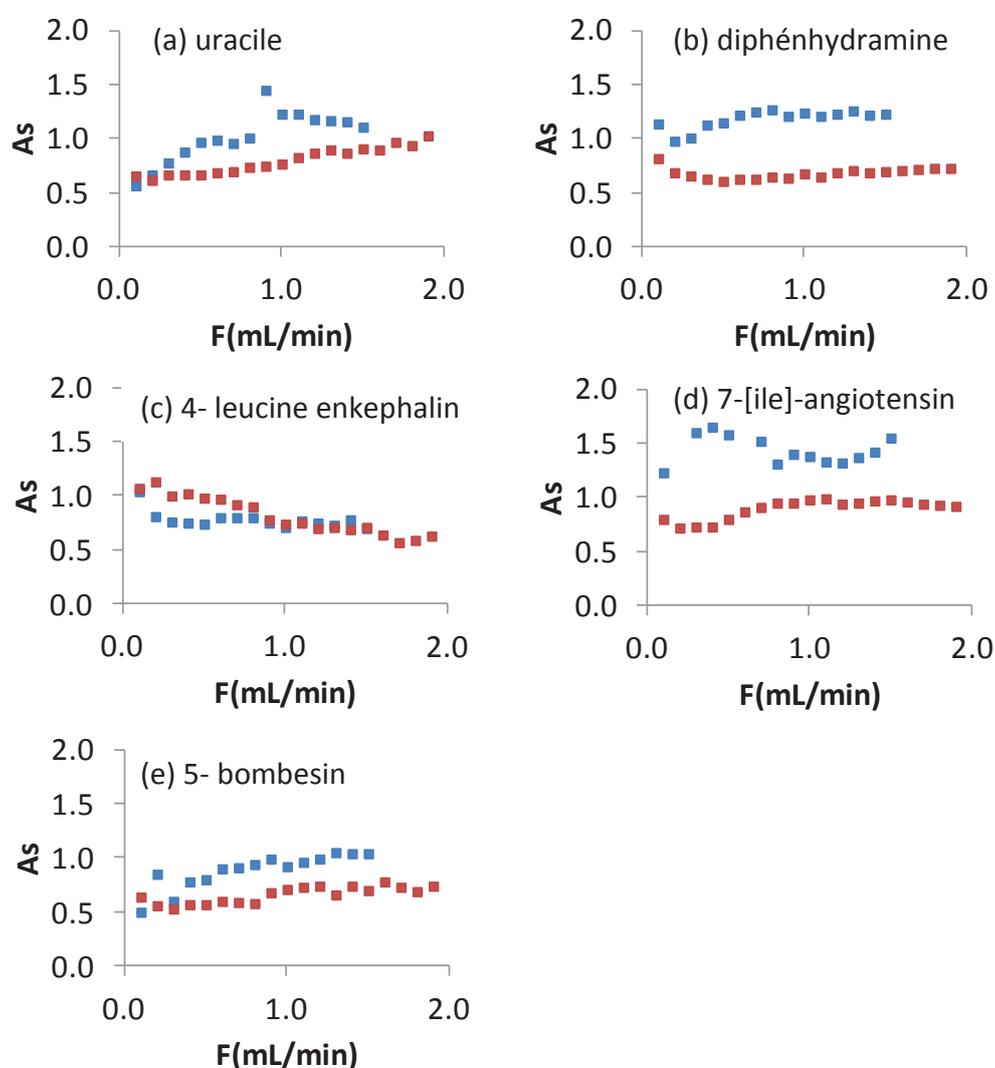


Fig. III- 5 : Variation de l'asymétrie en fonction du débit. En rouge 80°C et en bleu 30°C. Mêmes conditions que pour la Fig. III- 4. Solutés : (a) uracile, (b) diphénhydramine, (c) 4-leucine enkephalin, (d) 7-[ile]-angiotensin, (e) 5-bombesin.

II- Comparaison avec la RPLC

De même que pour les molécules neutres (section A), les hauteurs équivalentes à un plateau théorique sont en général plus importantes en HILIC qu'en RPLC comme le montre la comparaison des courbes de Van Deemter (Fig. III- 6), en HILIC et en RPLC, pour le même peptide 7-[ile]-angiotensin (données obtenues en gradient). Néanmoins, dans les deux cas, de meilleures performances sont obtenues à haute température.

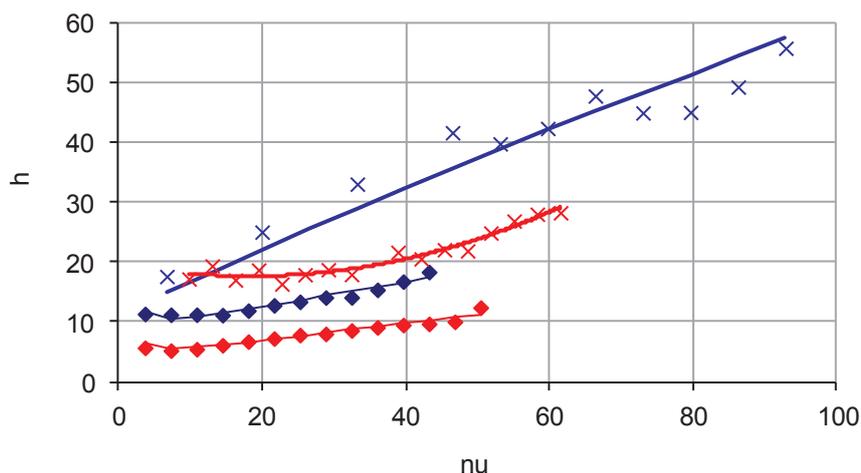


Fig. III- 6 : Comparaison des tracés h-v des courbes de Van Deemter pour le peptide 7-[ile]-angiotensin en RPLC et en HILIC. Conditions : (×) Nucléodur HILIC 125x2mm, 3 μ m ; (♦)Acquity BEH C18 50x2.1mm, 1.7 μ m. En bleu à 30°C et en rouge à 60°C pour l'Acquity et 80°C pour la Nucléodur. Eau 10 mM acétate d'ammonium/ACN. 1 μ L injecté. Les données sont issues d'analyses réalisées en gradient. Le calcul de h a été effectué avec la méthode donnée en section B (article 1).

Les capacités de pics obtenues à 30°C en HILIC pour le mélange des 10 peptides sont indiquées dans le Tab. III- 1. Les longueurs des colonnes étant différentes, les capacités de pics sont comparées avec nc/t_0 . La production de capacité de pics (nc/t_0) la plus élevée est obtenue avec l'Acquity BEH HILIC. Ces valeurs de production ont été évaluées pour le même débit de phase mobile (1mL/min) et sont données à titre indicatif.

	Nucléodur 30°C	Acquity BEH Amide 30°C	Acquity BEH HILIC 30°C
F(mL/min)	1	1	1
t_0 (s)	28.3	6.2	6.2
$t_{10}-t_1$ (s)	311.2	25.0	49.2
nc	32	16	19
nc/t_0	1.1	2.5	3.1

Tab. III- 1 : Comparaison des capacités de pics de l'échantillon obtenu en HILIC pour les colonnes Nucléodur, Acquity BEH amide et Acquity BEH HILIC pour l'échantillon de 10 peptides. Les données expérimentales ont été obtenues en gradient eau acétate d'ammonium 10 mM/ACN avec $s=5\%$.

D- TEMPS D'ÉQUILIBRAGE EN GRADIENT EN HILIC

Le temps de cycle en D2 comprend le temps de gradient, le temps mort de la colonne, le temps de délai du système et le temps d'équilibrage de la colonne. Pour un temps de cycle fixé, le temps de gradient (et donc la capacité de pics) sera d'autant plus grand que le temps d'équilibrage sera réduit. Le temps nécessaire pour équilibrer la colonne est donc étudié. Une étude visant à minimiser le temps d'équilibrage a déjà été effectuée en RPLC [1]. L'étude menée dans cette section vise à apporter des informations pour le mode HILIC avec la même démarche.

Pour différentes conditions opératoires (phase stationnaire, débit, température), une même séquence d'analyses, faisant varier le temps d'équilibrage de la colonne, a été appliquée. Cette séquence reproduit les mêmes conditions de gradient avec des temps d'équilibrage différents, tous multiples de t_0 , selon l'enchaînement: 5 t_0 , 0 t_0 , 1 t_0 , 2 t_0 , 5 t_0 , 10 t_0 , 15 t_0 , 30 t_0 , 5 t_0 , 40 t_0 , 50 t_0 , 60 t_0 , 5 t_0 . Pour chaque temps d'équilibrage, la séparation en gradient d'éluion est répétée trois fois. A chaque changement de temps d'équilibrage, un gradient à blanc est réalisé, permettant ainsi que les trois séparations se déroulent rigoureusement dans les mêmes conditions. Cette étude a été effectuée avec les colonnes Kinetex (silice), Nucléodur (zwitterionique), Acquity BEH HILIC (silice), une phase mobile eau acétate d'ammonium 10mM/ACN en gradient $s=5\%$. Deux débits différents ainsi que deux températures différentes ont été étudiées afin de mettre en évidence un éventuel effet de la température et/ou de la pression (via le débit).

La répétabilité des analyses en gradient d'éluion ont été étudiées ainsi que la variabilité des temps de rétention par rapport à un temps d'équilibrage considéré comme infini (reproductibilité). La répétabilité est évaluée à partir du rapport entre l'écart type des temps de rétention et le temps mort de la colonne comme réalisé pour l'étude RPLC [1]. Elle représente la variabilité des temps de rétention pour un temps d'équilibrage donné. La limite acceptable est de 1%. Pour l'évaluation de la reproductibilité, les temps de rétention des composés sont comparés à un temps de référence qui est le temps de rétention du même composé pour un équilibrage de 60 t_0 . L'analyse est considéré comme reproductible si $(t_r - t_{r, REF})/t_0$ est inférieur à la limite de répétabilité (1%).

Les chromatogrammes de la Fig. III- 7 représentent des analyses identiques, obtenues avec deux temps d'équilibrage différents (5 et 40 temps morts). Ces chromatogrammes montrent que les temps de rétention varient et que, par conséquent, l'état de surface de la phase stationnaire au départ du gradient est différent selon le temps d'équilibrage de la colonne. Cependant, une meilleure correspondance des temps de rétention est obtenue avec la colonne Acquity BEH (Fig. III- 7a).

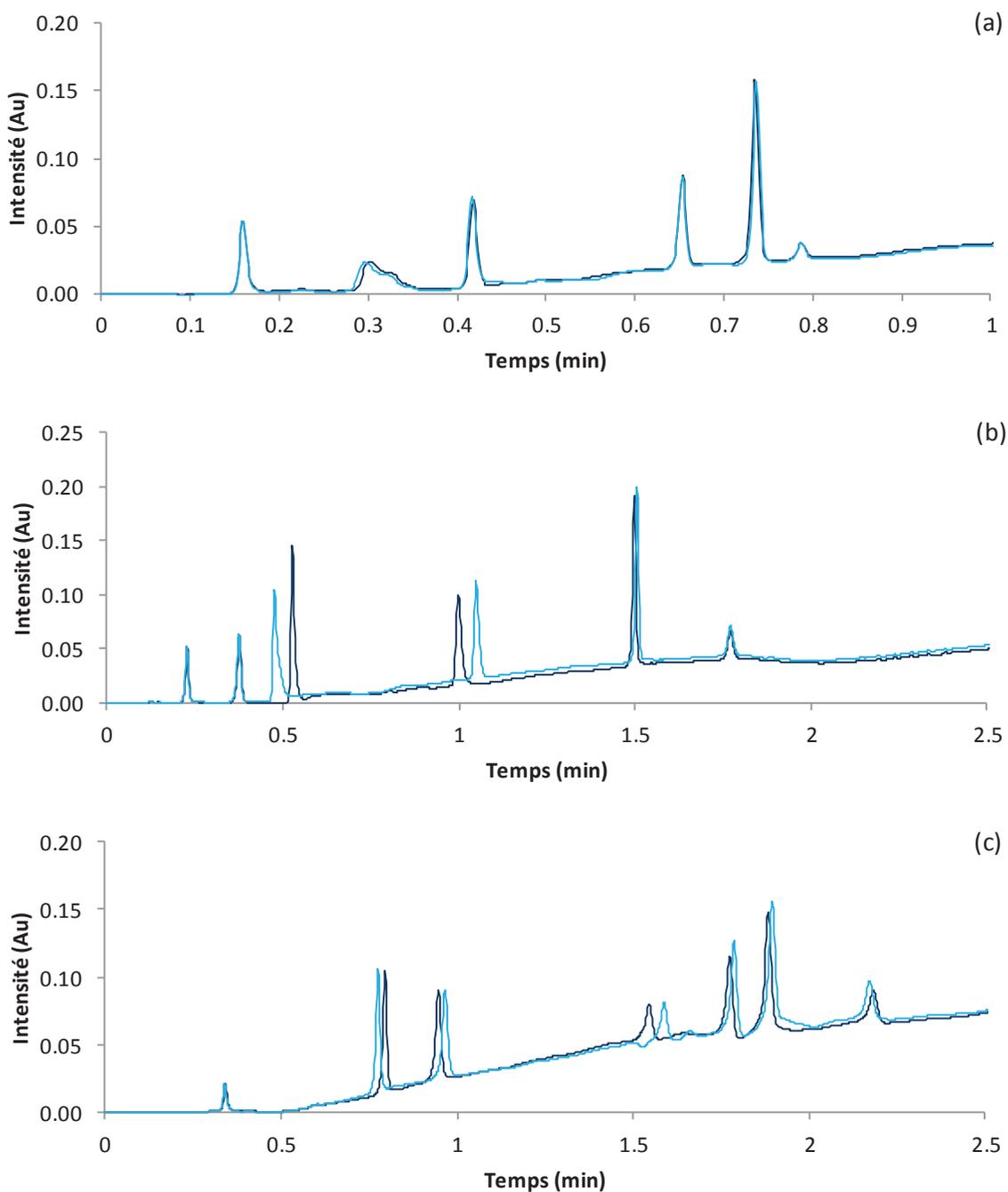


Fig. III- 7 : Comparaison de différents temps d'équilibrage pour les colonnes HILIC. Temps d'équilibrage de – 5 temps mort et – 40 temps mort. 1mL/min. gradient de 98 à 40% en ACN, $s=5\%$. Eau acétate d'ammonium 10mM pH6,8/ACN. (a) Acquity BEH HILIC silice, 70°C, (b) Kinetex HILIC silice, 60°C, (c) Nucléodur HILIC, 70°C. Solutés : méthylparabène, caféine (seulement en b), acide benzoïque, clozapine, diphénhydramine (sauf en b), protriptyline, aténolol.

Les temps de rétention ont été mesurés sur trois séparations consécutives identiques (mêmes conditions de gradient y compris le temps d'équilibration) afin d'évaluer la répétabilité. Les résultats obtenus sur un mélange de composés neutres et ionisables à 30°C sont présentés sur la Fig. III- 8 pour la colonne Kinetex HILIC.

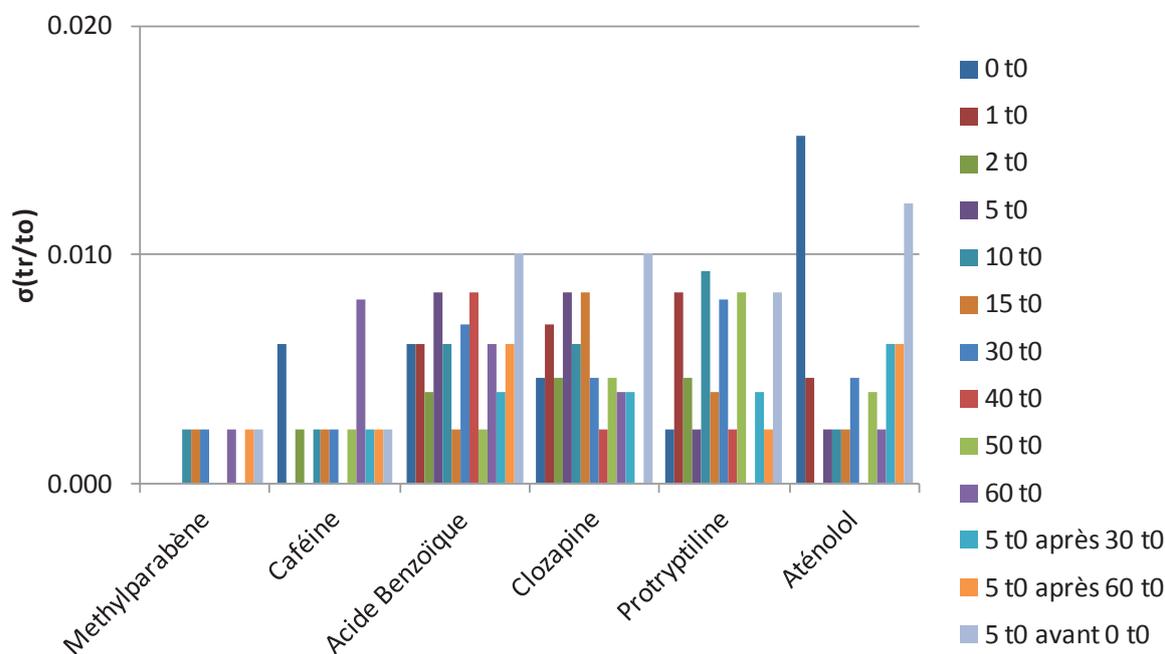


Fig. III- 8 : Répétabilité obtenue pour 3 répétitions identiques. Temps d'équilibration de 0 à 60 temps mort. Conditions : F=0.5mL/min. Gradient de 98% à 40 % ACN, s=5%, eau acétate d'ammonium 10mM pH6,8/ACN. Kinetex HILIC silice à 30°C. Solutés : méthylparabène, caféine, acide benzoïque, clozapine, diphénhydramine, protriptyline, aténolol.

Quel que soit le temps d'équilibration, la répétabilité est de l'ordre de 1% pour tous les composés, y compris les composés ionisables. Des résultats similaires ont été obtenus pour les 3 colonnes dans toutes les conditions étudiées (30°C à 0.5 mL/min 30°C et 70°C à 1 mL/min 70°C). Ces résultats sont également comparables à ceux qui avaient été obtenus en RPLC [1] et donc aussi intéressants pour la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle. Ils permettent d'envisager aussi bien le mode HILIC que le mode RPLC en seconde dimension d'une analyse 2D.

La Fig. III- 9 permet de comparer les niveaux de reproductibilités obtenues à 30°C et 70°C (ou 60°C pour la Kinetex). Le débit a été ajusté pour conserver une pression identique dans la colonne. Les lignes pointillées représentent la répétabilité de 1% qui indique si les analyses deviennent reproductibles, c'est à dire si l'équilibration complète de la colonne est atteinte.

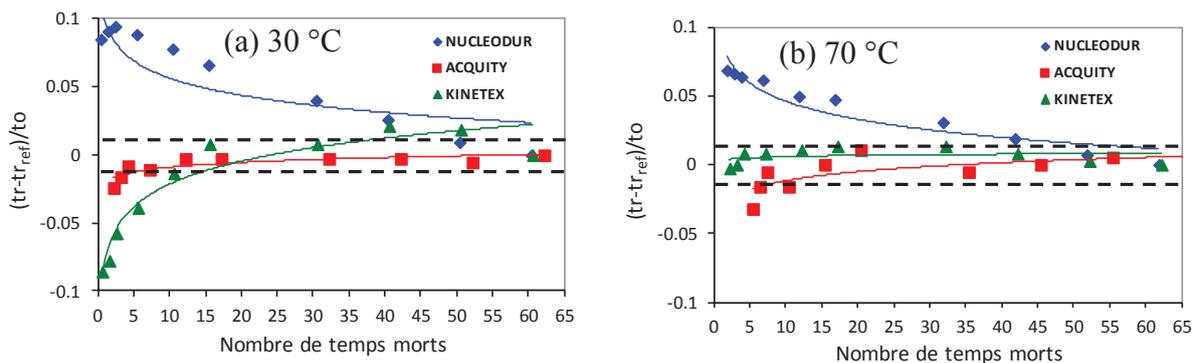


Fig. III- 9 : Comparaison des temps d'équilibrages nécessaires pour 3 phases stationnaires HILIC avant atteindre l'équilibre complet de la colonne; Soluté : aténolol. Conditions : $s=5\%$. 98 à 40% d'ACN. Phase mobile : Acétate d'ammonium 10mM pH6,8/ACN. (a) 30°C, 0,5mL/min, (b) 70°C, 1mL/min.

Les colonnes Acquity BEH HILIC et Kinetex HILIC sont les colonnes pour lesquelles l'équilibre total est le plus vite atteint à 30 et 70°C respectivement. La colonne Nucléodur HILIC n'atteint l'équilibre complet qu'à partir de 60 t_0 . Cette différence provient probablement de la chimie de surface de ces phases, la Nucléodur étant zwitterionique contrairement aux deux autres qui sont en silice non greffée. Dans tous les cas, il apparaît que l'équilibre total est plus vite atteint à 70°C qu'à 30°C ce qui est aussi le cas en RPLC [1]. Un temps d'équilibre de 5 t_0 permet d'être dans la zone de répétabilité de 1% mises à part certaines conditions (Kinetex à 30°C et Nucléodur). L'équilibre total des colonnes en RPLC est atteint parfois dès 2 t_0 [1]. Néanmoins, il faut souligner que ce qui est important pour une seconde dimension LCxLC, ce n'est pas d'atteindre l'équilibre complet de la colonne, mais seulement d'atteindre un équilibre répétable.

La différence entre les temps de rétention moyens rapportés au temps mort pour deux séries de temps d'équilibre identiques (5 t_0) mais précédées de séries de temps d'équilibre différents (2 t_0 et 30 t_0) permet de mettre en évidence une influence éventuelle du vécu de la colonne. Comme le montre la Fig. III- 10, à 30°C, cette différence est en dessous du seuil de répétabilité pour tous les composés sauf pour l'acide benzoïque et l'aténolol (le plus retenu).

Par contre, l'élévation de la température permet d'obtenir des résultats proches du niveau de la répétabilité pour tous les composés et ainsi de s'affranchir de l'historique de la colonne même pour l'aténolol. Nous avons réalisé des expériences à un débit plus élevé (1 mL/min) à 30°C pour voir si l'effet observé à 70°C (1 mL/min) provient de l'augmentation de la température ou de l'augmentation du débit. Comme détaillé dans l'étude en RPLC [1], on peut se demander si c'est l'effet de la température seule qui a un effet positif sur le processus d'équilibre ou si c'est un effet combiné entre la température et le débit. On peut constater sur la Fig. III- 10 que le bénéfice obtenu à 70°C, 1mL/min (rouge) n'est pas lié au débit et provient uniquement de l'effet de la température puisque les valeurs obtenues à 30°C, 1mL/min (vert) sont bien plus grandes.

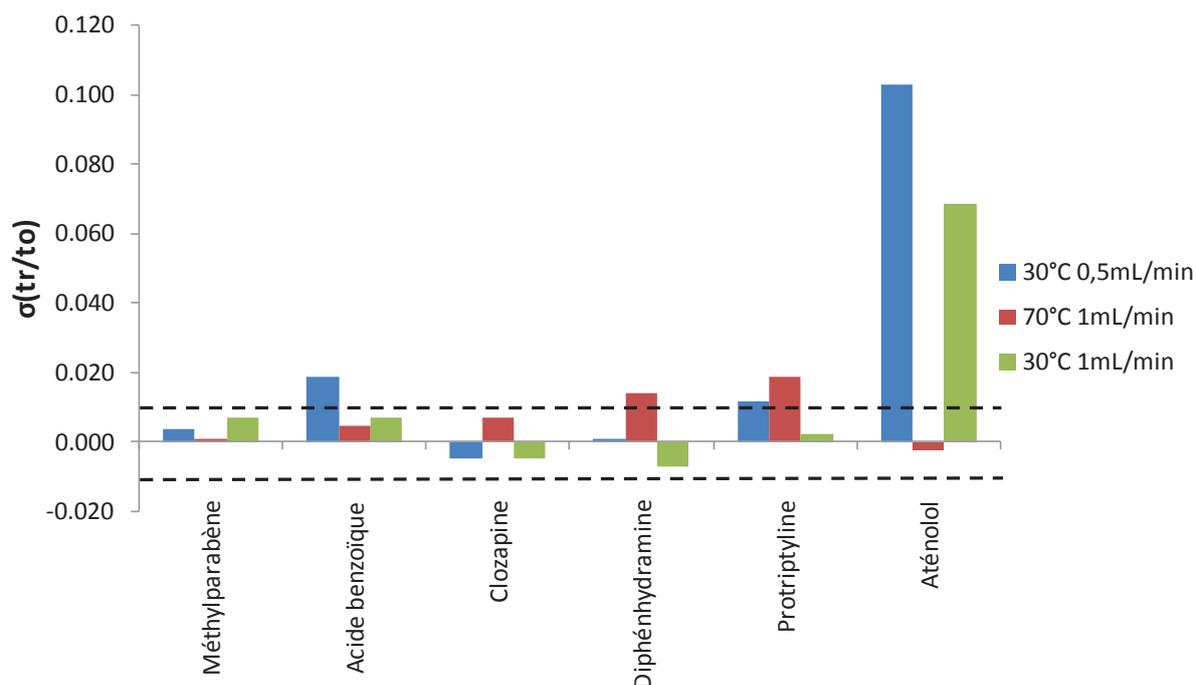


Fig. III- 10 : Comparaison de la répétabilité des analyses en HILIC pour la colonne Nucléodur. Conditions : Gradient de 98% à 40% en ACN, s=5%, eau acétate d'ammonium 10mM pH6,8/ACN. Temps d'équilibration 5 temps morts.

Cette étude a montré qu'une excellente répétabilité, avec des temps d'équilibration relativement faibles (parfois moins de $5 t_0$), pouvait être atteinte en HILIC. De plus, l'augmentation de la température permet d'atteindre plus rapidement l'équilibration complète de la colonne.

En HILIC, les temps d'équilibration sont plus longs qu'en RPLC pour atteindre l'équilibration complète de la colonne ($5 t_0$ au lieu de $2 t_0$) pour les composés ionisés ce qui est confirmé par McCalley [5]. Néanmoins, la répétabilité, est de l'ordre de 1% comme en RPLC. L'utilisation du mode HILIC en deuxième dimension d'une analyse LCxLC est donc envisageable. Il faut souligner que l'équilibration totale de la colonne n'est pas nécessaire pour avoir des analyses successives superposables (cf résultats de répétabilité avec 1 ou 2 temps morts d'équilibration). L'essentiel en deuxième dimension est d'avoir un état de surface de la phase stationnaire répétable au démarrage du gradient pour pouvoir superposer les chromatogrammes issus des différentes fractions.

CONCLUSIONS

Une méthode de détermination des valeurs de hauteurs de plateaux réduite à partir de données obtenues en gradient d'élution a été développée. Cette méthode permet d'obtenir des courbes de Van Deemter pour plusieurs analytes avec un même facteur de rétention et un nombre restreint d'injections ce qui est très avantageux puisque cela permet de prévenir le vieillissement prématuré de la colonne et de gagner du temps. Il a été démontré pour deux colonnes distinctes que cette méthode permettait de retrouver une courbe identique à celle obtenue en isocratique. Cette méthode a été utilisée en RPLC et en HILIC pour tracer notamment les courbes de Van Deemter de la diphényldramine et de plusieurs peptides.

Les courbes de Van Deemter obtenues pour des composés de référence (cytosine en HILIC et éthylparabène en RPLC) présentent des hauteurs réduites minimales bien plus élevées en HILIC qu'en RPLC.

En RPLC, l'effet de l'additif et de la température ont été étudiés aussi bien pour la diphényldramine que pour les peptides. Les courbes de Van Deemter obtenues pour ces deux types de composés sont très variables selon le pH de la phase mobile. Les meilleurs résultats ont été obtenus en acétate d'ammonium à pH 6.8. Néanmoins, les hauteurs réduites obtenues pour la diphényldramine et pour les peptides sont bien plus élevées que celles du composé neutre de référence (caféine). Cependant, les valeurs de h diminuent de façon significative en élevant la température (30°C à 70°C). Un effet bénéfique de l'élévation de la température a aussi été mis en évidence en HILIC pour les composés chargés (diphényldramine et peptides).

Pour finir, une étude du temps d'équilibrage nécessaire pour des colonnes HILIC a montré que le temps nécessaire pour obtenir l'équilibrage total de la colonne est bien plus long en HILIC qu'en RPLC. Malgré tout, la répétabilité est de l'ordre de 1% comme en RPLC. Ainsi, le mode HILIC peut être utilisé en seconde dimension d'une séparation LCxLC puisqu'il n'est pas nécessaire d'atteindre l'équilibrage complet de la colonne. Ce qui compte c'est que cet équilibrage soit le même d'analyse en analyse pour éviter les dérives de temps de rétention de seconde dimension au cours de l'analyse LCxLC.

Malgré le manque de performance obtenu en mode HILIC, ce mode reste intéressant puisqu'il est particulièrement avantageux de coupler les modes RPLC et HILIC en LCxLC pour obtenir des sélectivités totalement différentes entre les deux modes chromatographiques et séparer les composés de tout type de polarité. Le Chapitre suivant (Chapitre 4) présente notamment l'orthogonalité que l'on peut obtenir avec ce type de systèmes.

REFERENCES

- ¹ C. Grivel, J.-L. Rocca, D. Guillarme, J.-L. Veuthey, S. Heinisch, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 459
- ² P.W. Carr, D.R. Stoll, X. Wang, Anal. Chem. 83 (2011) 1890
- ³ T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 474
- ⁴ S. Louw, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 514
- ⁵ D. V. McCalley, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 858

Chapitre 4 : Orthogonalité et capacité de pics

Méthode de calcul, modèles de rétention, comparaison de systèmes

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

“On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations”

A. D'Attoma, C. Grivel, S. Heinisch, J. Chromatogr.A, 1262 (2012) 148

INTRODUCTION

Il semble particulièrement intéressant de coupler les modes RPLC et HILIC pour des séparations bidimensionnelles puisque la combinaison des deux modes permet de séparer à la fois les composés polaires et les composés apolaires. A notre connaissance, aucune séparation de peptides et de produits pharmaceutiques en RPLCxHILIC aussi bien qu'en HILICxRPLC n'a été reportée jusqu'à présent. Il a été faussement prétendu en 2006 que les modes HILIC et RPLC ne pouvaient pas être directement couplés [1]. Des systèmes RPLC-HILIC [2,3] aussi bien que des systèmes HILIC-RPLC [4,5,6,7] ont ensuite été étudiés. Un nombre limité de séparations bidimensionnelles en ligne et totale (« comprehensive ») combinant les modes HILIC et RPLC ont été effectuées pour l'analyse de polymères amphiphiles [8], d'alkylphénol polyéthoxylates [9] et d'oligonucléotides [10].

De multiples descripteurs d'orthogonalité ont été proposés mais aucun d'entre eux n'est universel. L'orthogonalité est le plus souvent calculée avec R^2 ou la différence de sélectivité s^2 , s^2 étant directement calculé à partir de R^2 ($s^2=1-R^2$). La combinaison des modes HILIC et RPLC conduit à des systèmes où les données de rétention sont souvent réparties de manière horizontale. C'est dans ce cas particulier que l'utilisation du coefficient de détermination ou de la différence de sélectivité ne signifie plus rien. Des outils de calcul adaptés et basés sur la théorie du gradient sont ainsi développés dans ce chapitre. Ces outils permettent de comparer les degrés d'orthogonalité et les capacités de pics pratiques de différents systèmes. Ces calculs sont basés sur les modèles de rétentions des composés. Les modèles de rétentions obtenus pour les peptides et les petites molécules ionisables en HILIC ou en RPLC sont assez différents et doivent donc être étudiés afin de déterminer des valeurs moyennes de S selon les composés et les conditions.

Différents types de composés ont été étudiés : un mélange de petites molécules ionisables (à majorité pharmaceutique) et un mélange de peptides. Différentes conditions ont été étudiées telles que le mode chromatographique, la phase stationnaire (à base de silice ou pas), la phase mobile (modificateur organique, pH) et la température. Les additifs de pH considérés sont tous volatils pour permettre une compatibilité directe avec la détection en spectrométrie de masse. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux conditions de haute température en seconde dimension pour permettre de réduire les trainées de pics des composés chargés [11] et de plus pour réduire le temps de cycle de gradient qui est un paramètre critique en LCxLC. Ce chapitre est présenté sous forme d'un manuscrit publié (article 2)

Article 2 : *“On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part I: Orthogonality and practical peak capacity considerations”*

CONCLUSIONS

Un nouveau descripteur d'orthogonalité permettant de comparer les différences de sélectivité entre les systèmes a été proposé. Ce descripteur est basé sur les pentes S des modèles de rétention des composés et sur les gammes de composition de phase mobile à l'élution. Les pentes S ont été calculées pour des peptides et des petites molécules ionisables en RPLC et en HILIC, et des valeurs moyennes ont été déterminées. S dépend peu de la masse moléculaire du soluté, des conditions de phase mobile, du type de phase stationnaire à la fois en HILIC et en RPLC. Des valeurs moyennes de l'ordre de 0.05 ont été obtenues pour les petits composés pour les deux modes. Par contre, pour les peptides, une valeur de l'ordre de 0.25 a été obtenue en RPLC contre 0,06 en HILIC.

La capacité de pic pratique peut être calculée à l'aide d'un diagramme faisant intervenir les compositions à l'élution dans les deux dimensions. La gamme de composition pratique occupée par les pics dans la seconde dimension (ΔC_{e2}^*) est alors calculée pour prendre en compte uniquement l'espace de séparation accessible. Ainsi, la capacité de pics pratique en seconde dimension et donc la capacité de pics pratique en 2D peuvent être calculées. Le degré d'orthogonalité est le terme reflétant la sélectivité dans le calcul de la capacité de pics pratique. La combinaison de deux systèmes est intéressante lorsque la capacité de pics générée est importante.

Un mélange de petites molécules ionisables a été analysé dans différentes conditions afin de trouver des systèmes bidimensionnels permettant d'atteindre de grandes valeurs de capacité de pics pratique. L'importance de l'élévation de la température en seconde dimension a été montrée. Le changement de pH de phase mobile entre les deux dimensions a un impact très important sur l'orthogonalité et la capacité de pics pour ces composés. L'utilisation de colonnes qui ne sont pas à base de silice permet d'améliorer le degré d'orthogonalité mais les capacités de pics restent faibles à cause du peu d'efficacité obtenue avec ces colonnes pour les composés chargés. La combinaison des modes RPLC et HILIC est intéressante et permet d'obtenir des capacités de pics pratique du même ordre qu'en RPLCxRPLC.

De même, un mélange de peptides a été analysé dans différentes conditions afin de trouver des systèmes bidimensionnels permettant d'atteindre de grandes valeurs de capacité de pics pratique. Comme pour les petites molécules, l'augmentation de la température en seconde dimension et le changement de pH entre les deux dimensions permet d'améliorer les capacités de pics. Pour l'analyse de peptides, la combinaison des modes RPLC et HILIC semble moins intéressante que la combinaison de deux modes RPLC.

REFERENCES

- ¹ P.J. Boersema, N. Divecha, A.J.R. Heck, S. Mohammed, J. Proteome Res. 6 (2007) 937
- ² S. Louw, A.S. Pereira, F. Lynen, M. Hanna-Brown, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1208 (2008) 90
- ³ A. Liu, J. Tweed, C.E. Wujcik, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1873
- ⁴ Y. Wang, X. Lu, G. Xu, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1564
- ⁵ Y. Wang, R. Lehmann, X. Lu, X. Zhao, G. Xu, J. Chromatogr. A 1204 (2008) 28.
- ⁶ Y. Wang, X. Lu, G. Xu, J. Sep. Sci. 33 (2010) 1495
- ⁷ A. Mihailova, H. Malerod, S.R. Wilson, J. Sep. Sci. 31 (2008) 459
- ⁸ S. Abrar, B. Trathnigg, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8222
- ⁹ Z. Wu, P.J. Marriott, J. Sep. Sci. 34 (2011) 3322
- ¹⁰ Q. Li, F. Lynen, J. Wang, H. Li, G. Xu, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1255 (2012) 237
- ¹¹ S. Heinisch, A. D'Attoma, C. Grivel, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 135.

Chapitre 5 : Développement d'analyses bidimensionnelles et application à la séparation de peptides

Dimensionnement des analyses bidimensionnelles, utilisation de split, étude des effets liés à l'injection, obtention de séparations bidimensionnelles de peptides.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

“On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part II : Application to the separation of peptides”

A. D'Attoma, S. Heinisch, J. Chromatogr.A, 1306 (2013) 27

INTRODUCTION

Pour mettre en place des analyses bidimensionnelles, la recherche de systèmes orthogonaux et procurant de grandes capacités de pics est nécessaire mais ne suffit pas. En effet, l'analyse bidimensionnelle doit être dimensionnée et les éventuels effets à l'injection doivent être étudiés.

Le dimensionnement d'une analyse bidimensionnelle consiste à optimiser les paramètres qui vont avoir un effet significatif sur les performances de cette analyse. Ces paramètres comprennent la géométrie des colonnes, les conditions de gradient, la fréquence d'échantillonnage, le rapport de split, les volumes injectés et les temps d'équilibrage de colonne. La section A de ce chapitre établit les équations qui relient les critères de performance aux paramètres disponibles dans une analyse bidimensionnelle permettant ainsi le choix des paramètres compte tenu des contraintes de l'appareillage et des colonnes. L'utilisation d'un split entre les deux dimensions et avant le spectromètre de masse est envisagé. Différents paramètres sont étudiés : rapport de split, longueur de tubes, diamètres de tubes. La dispersion due au split entre D1 et D2 est discutée pour des séparations de peptides.

La section B est consacrée, à travers une publication récente (article 3), à la séparation bidimensionnelle de peptides. Les deux modes RPLCxRPLC et RPLCxHILIC sont proposés. Une étude préalable des effets à l'injection, présentée dans cette section, nous a permis d'optimiser la capacité de pics pour les deux séparations. Cette section est complétée par l'étude des problèmes de "breakthrough" engendrés par la séparation de peptides en HILICxRPLC. Les effets à l'injection sont analysés en fonction de différents paramètres tels que la force éluante du solvant d'injection, le volume injecté et la concentration du composé. Une explication au phénomène de "breakthrough" est proposée.

A- DIMENSIONNEMENT DES ANALYSES LCxLC ET TRAITEMENT DES DONNEES

I- Equations fondamentales

Le dimensionnement d'une analyse bidimensionnelle est complexe puisqu'il fait intervenir un grand nombre de paramètres et que plusieurs contraintes doivent être respectées pour que la séparation soit satisfaisante. Les paramètres principaux lors du développement d'une analyse bidimensionnelle sont la géométrie des colonnes dans les deux dimensions (longueur et diamètre interne : L_2, L_1, di_2, di_1), les vitesses (u_2 et u_1), les temps de gradients (t_{G1}, t_{G2}) et différences de composition à l'éluion ($\Delta C_{e2}, \Delta C_{e1}$), le taux d'échantillonnage qui est défini selon l'Eq. V- 1, et le rapport de split z qui est défini selon l'Eq. V- 2.

$$\tau = \frac{6\sigma_{t,1}}{t_2} \quad \text{Eq. V- 1}$$

Où $6\sigma_{t,1}$ est la largeur du pic à la base en unité de temps et t_2 est le temps de cycle de D2.

$$z = \frac{F_{vanne}}{F_1} \quad \text{où } 0 < z < 1 \quad \text{Eq. V- 2}$$

Où F_{vanne} est le débit entrant dans la vanne après le split et F_1 le débit de D1. $\sigma_{t,1}$ et $\sigma_{v,2}$ sont définis par les Eq. V- 3 et 4 respectivement. $\sigma_{t,2}$ et $\sigma_{v,1}$ peuvent être défini de la même manière.

$$\sigma_{t,1} = \frac{t_{0,1}(1 + k_{e,1})}{\sqrt{N_1}} \quad \text{Eq. V- 3}$$

$$\sigma_{v,2} = \frac{V_{0,2}(1 + k_{e,2})}{\sqrt{N_2}} \quad \text{Eq. V- 4}$$

Les critères de satisfaction sont : (1) la capacité de pics, n_c , qui doit être la plus grande possible pour obtenir la séparation d'un maximum de pics, (2) le facteur de dilution, f , qui doit être le plus petit possible pour que les pics restent intenses. f est calculé à partir de l'Eq. V- 5 où f_1 et f_2 sont les facteurs de dilution dans chacune des dimensions. Cette équation n'est valable que si l'on suppose que les fractions sont infiniment faibles. (3) Le volume injecté dans D2, exprimé comme le rapport, λ_2 , du volume injecté $V_{i,2}$ sur le volume mort de la colonne $V_{0,2}$ (Eq. V- 6). Celui-ci doit rester inférieur à une limite à définir qui sera définie dans la section B.

$$f = f_1 \times f_2 \quad \text{Eq. V- 5}$$

$$\lambda_2 = \frac{V_{i,2}}{V_{0,2}} \quad \text{Eq. V- 6}$$

Le volume injecté en D2 étant égal au volume de fraction collecté en D1, $V_{i,2}$ est égal au produit du débit de D1 avec le temps de cycle de D2. Un split de rapport z peut être introduit entre les deux dimensions afin de maîtriser le débit entrant dans la vanne. L'Eq. V- 6 peut être alors modifiée pour donner l'Eq. V- 7 :

$$\lambda_2 = \frac{F_1 \times z \times t_2}{V_{0,2}} \quad \text{Eq. V- 7}$$

Les contraintes à respecter pour obtenir des performances chromatographiques satisfaisantes sont : (1) τ doit être au moins égal à 2-3 pour que la résolution acquise dans la première dimension soit conservée en seconde dimension, (2) z doit être supérieur à une valeur à définir (Défini dans cette section). Des contraintes supplémentaires sont à considérer telles que la pression maximale en D2 ($P_{\max,2}$), les débits minimum et maximaux en D1 et D2 respectivement ($F_{1,\min}$ et $F_{2,\max}$), les longueurs minimales et maximales des colonnes en D1 et D2 respectivement ($L_{2,\min}$ et $L_{1,\max}$).

La capacité de pics pour des gradients LSS peut être écrite selon l'équation suivante qui a été précédemment donnée dans l'article 2 :

$$n_c = 2.3S\Delta C \times \frac{1}{1+2.3b} \frac{\sqrt{N}}{4} \quad \text{Eq. V- 8}$$

$$\text{Où } b = \frac{S\Delta C}{x_2} \quad \text{Eq. V- 9}$$

$$\text{et où } x_2 = \frac{t_{G,2}}{t_{0,2}} \quad \text{Eq. V- 10}$$

Pour que la capacité de pics soit maximisée, il faut que x_2 soit le plus grand possible. Le temps de cycle en D2 comprend le temps de gradient $t_{G,2}$, le temps mort $t_{0,2}$, le temps de délai $t_{D,2}$ et le temps d'équilibrage $t_{eq,2}$:

$$t_2 = t_{G,2} + t_{0,2} + t_{D,2} + t_{eq,2} \quad \text{Eq. V- 11}$$

En combinant les Eq. V- 10 et 11, on obtient $x_2 = \frac{t_2}{t_{0,2}} - \left(\frac{t_{0,2}}{t_{0,2}} + \frac{t_{D,2}}{t_{0,2}} + \frac{t_{eq,2}}{t_{0,2}} \right)$

Avec l'Eq. V- 1 : $x_2 = \frac{6\sigma_{t,1}}{\tau} \frac{1}{t_{0,2}} - \left(1 + \frac{t_{D,2}}{t_{0,2}} + \frac{t_{eq,2}}{t_{0,2}} \right)$

En combinant avec l'Eq. V- 3, on a : $x_2 = \frac{6}{\tau} \frac{t_{0,1}}{t_{0,2}} \frac{(1+k_{e,1})}{\sqrt{N_1}} - \left(1 + \frac{t_{D,2}}{t_{0,2}} + \frac{t_{eq,2}}{t_{0,2}} \right)$

En considérant des porosités de colonnes en D1 et D2 égales, x_2 peut être exprimé sous la forme :

$$x_2 = \frac{6}{\tau} \times \frac{L_1}{L_2} \times \frac{u_2}{u_1} \times \frac{1+k_{e,1}}{\sqrt{N_1}} - \left(1 + \frac{t_{D,2}}{t_{0,2}} + \frac{t_{eq,2}}{t_{0,2}} \right) \quad \text{Eq. V- 12}$$

Il faut donc maximiser le premier terme et réduire le second. Ainsi, τ doit être faible, L_1/L_2 et u_2/u_1 doivent être élevés. Dans le deuxième terme, le volume de délai et le temps d'équilibrage en seconde dimension doivent être faibles.

Le deuxième critère de satisfaction est f . Le facteur de dilution dans une dimension étant $f = \frac{\sigma_v \sqrt{2\pi}}{V_i}$, on obtient avec l'Eq. V- 5 :

$$f = \frac{\sigma_{v,1} \sqrt{2\pi}}{V_{i,1}} \times \frac{\sigma_{v,2} \sqrt{2\pi}}{V_{i,2}} \text{ et avec l'Eq. V- 4, on a } f = \frac{\sigma_{t,1} \times F_1}{V_{i,1}} \frac{V_{0,2} (1+k_{e,2})}{\sqrt{N_2}} \frac{2\pi}{V_{i,2}}$$

Comme $k_e = \frac{1}{2.3b}$ et en combinant l'équation précédente avec l'Eq. V- 1 et 9 :

$$f = \frac{\tau \times t_2}{6} \frac{F_1}{V_{i,1}} \frac{V_{0,2}}{V_{i,2}} \left(1 + \frac{x_2}{2.3S\Delta C} \right) \frac{2\pi}{\sqrt{N_2}} \quad \text{Eq. V- 13}$$

De plus, lorsque les porosités des colonnes en D1 et D2 sont égales :

$$\frac{V_{0,2}}{V_{0,1}} = \frac{L_2}{L_1} \left(\frac{d_{i,2}}{d_{i,1}} \right)^2 \quad \text{Eq. V- 14}$$

En combinant les Eq. V- 6, 7, 13 et 14, on obtient :

$$f = \frac{\tau}{6z\lambda_1} \frac{L_2}{L_1} \left(\frac{d_{i,2}}{d_{i,1}} \right)^2 \times \left(1 + \frac{x_2}{2.3S\Delta C} \right) \frac{2\pi}{\sqrt{N_2}} \quad \text{Eq. V- 15}$$

Avec λ_1 est le volume injecté dans D1, exprimé comme le rapport du volume injecté $V_{i,1}$ sur le volume mort de la colonne $V_{0,1}$, il est défini par analogie à λ_2 (Eq. V- 6).

Cette équation peut également s'écrire $f = \frac{A}{\lambda_1} \times \left(1 + \frac{x_2}{2.3S\Delta C} \right) \frac{2\pi}{\sqrt{N_2}}$ avec $A = \frac{\tau}{6z} \frac{L_2}{L_1} \left(\frac{d_{i,2}}{d_{i,1}} \right)^2$

Pour que f reste faible, il faut que λ_1 soit élevé, et que A soit faible donc que : τ et $d_{i,2}/d_{i,1}$ soient faibles et que z et L_1/L_2 soient élevés. Il est important de noter que f augmente avec x_2 donc avec la capacité de pics.

Le dernier critère est λ_2 . En combinant les Eq. V- 1 et 7, on a $\lambda_2 = \frac{F_1 z}{V_{0,2}} \times \frac{6\sigma_{t,1}}{\tau}$

En combinant cette équation avec l'Eq. V- 3, on obtient $\lambda_2 = \frac{6z}{\tau} \frac{V_{0,1}}{V_{0,2}} \frac{(1+k_{e,1})}{\sqrt{N_1}}$

Et en remplaçant $V_{0,1}/V_{0,2}$ par analogie avec l' Eq. V- 14 :

$$\lambda_2 = \frac{6z}{\tau} \frac{L_1}{L_2} \left(\frac{d_{i,1}}{d_{i,2}} \right)^2 \frac{(1+k_{e,1})}{\sqrt{N_1}} = \frac{1}{A} \frac{(1+k_{e,1})}{\sqrt{N_1}} \quad \text{Eq. V- 16}$$

Pour que λ_2 reste faible, il faut que A soit élevé ce qui implique que : τ et $d_{i,2}/d_{i,1}$ soient élevés et que z et L_1/L_2 soient faibles.

Une contradiction apparaît puisque A doit être à la fois faible pour un facteur de dilution faible et élevé pour un volume injecté faible d'après les Eq. V- 15 et 16. Il faut alors trouver un compromis. D'un point de vue stratégique, nous avons choisi d'utiliser un système UHPLC et HTLC à pression et température maximales pour augmenter le rapport des vitesses en augmentant u_2 . u_1 est réduit de manière raisonnable en connaissance des courbes de Van Deemter. L'utilisation d'un système UHPLC induit une contrainte supplémentaire qui est $F_{\max,2}=2\text{mL/min}$. Le choix de colonnes de $d_{i,2}=2.1\text{mm}$ est alors indiqué. Le paramètre τ est fixé à 2-3 pour que la résolution acquise dans la première dimension soit maintenue [1]. λ_1 est choisi comme étant le plus élevé possible puisqu'il n'intervient que dans le calcul de f. Le diamètre interne $d_{i,1}$ est fixé à 1mm ou 2.1 mm pour que $1 < \frac{d_{i,2}}{d_{i,1}} < 2$, ce qui est un compromis dans le calcul de A. L_1 est fixé pour trouver un compromis entre $n_{c,1}$ et le temps d'analyse. ΔC est fixé dans les deux dimensions sur des gammes les plus faibles possibles. Pour finir, on modifie $t_{G,1}$ et z pour obtenir un compromis entre f et λ_2 . Pour que le choix des conditions soit plus aisé, nous utilisons un outil Excel interactif, développé au laboratoire, qui utilise toutes les formules, paramètres et critères détaillés dans cette partie.

II- Etude de l'impact de différents paramètres sur la qualité d'un split

Comme il a été montré dans le paragraphe précédent, il est parfois intéressant d'utiliser des colonnes de 2.1mm de diamètre interne en première dimension et de splitter le débit avant d'entrer dans la vanne pour réduire le volume injecté en seconde dimension.

De même, dans un souhait de coupler la seconde dimension à la spectrométrie de masse (LCxLC-MS), il peut être nécessaire de splitter le débit en provenance de D2 pour réduire le débit qui entre dans la source et ainsi favoriser l'ionisation des composés. Des couplages LCxLC-MS ont souvent été réalisés avec des splits entre la seconde dimension et la spectrométrie de masse [2,3,4]. Cependant, aucune étude n'a été publiée sur l'impact qu'a le split sur la dispersion additionnelle du pic. Cette étude a donc pour objectif d'étudier l'effet des différents paramètres du split sur les élargissements de pics. Les paramètres étudiés sont le type de té, le rapport de split, z et la géométrie des tubes (longueur et diamètre interne du tube de split).

1. Comparaison des tés commerciaux

Des tubes de différents diamètres internes ont été utilisés pour les splits :

- en peek : 1/16" externe (diamètres internes: 250 μ m, 127 μ m, 100 μ m, 65 μ m, 25 μ m).
- en silice fondue entouré de polyimide : 360 μ m externe (diamètres internes: 75 μ m, 50 μ m, 20 μ m).

Cinq types de té (référencés chez Upchurch) ont été testés afin de trouver la configuration qui procure le moins de dispersion et donc le moins de perte d'efficacité et de sensibilité. Ces tés sont présentés sur la Fig. V- 1.

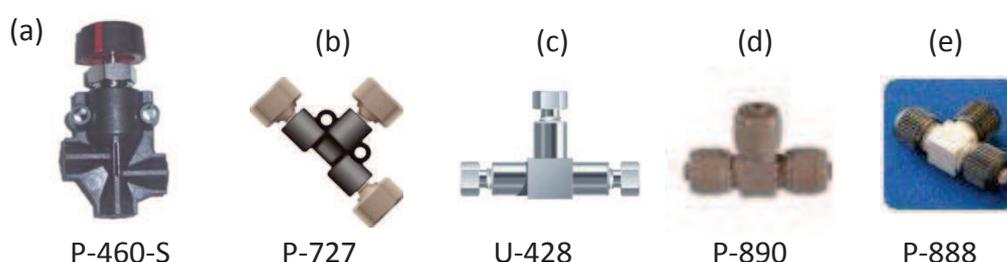


Fig. V- 1 : (a) té réglable de volume interne 1.2 à 2.8 μ L, (b) té en peek de volume interne 0.57 μ L, (c) té en acier inox de volume interne 0.57 μ L, (d) té en peek de volume interne 58nL pour tubes peek en 1/16", (e) té en peek de volume interne 29nL pour tubes de 360 μ m.

Pour la suite de l'étude, les tubes de splits seront notés ❶ et ❷ suivant leur place par rapport au té tel qu'indiqué sur la Fig. V- 2. L'étude a porté sur l'étude des tubes placés en ❶ (tube de split).

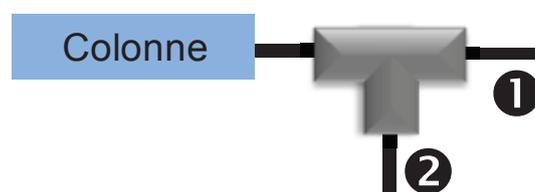


Fig. V- 2 : Schéma du split avec numérotation des tubes utilisés après le té. Le tube ❶ part vers le détecteur UV alors que le tube ❷ part vers la poubelle.

L'influence du té réglable P-460-S et du té P-727 est comparé sur la Fig. V- 3. Ces tés ont été bouchés sur une des 3 voies pour être utilisés comme raccords unions et être facilement comparés à un raccord union de type « zéro volume mort ». On observe sur cette figure que le chromatogramme rouge (utilisation du té P-757) est totalement superposable au chromatogramme bleu (utilisation d'un raccord union à zéro volume mort), ce té ne générant pas plus de dispersion qu'un raccord union. Par contre, lorsque que l'on compare le chromatogramme violet (utilisation du T P-460-S) avec le chromatogramme vert (utilisation d'un raccord union à zéro volume mort), on constate que la dispersion générée par ce té réglable est très importante. Le té P-460-S n'est donc pas du tout intéressant. Aucune dispersion additionnelle n'est à noter avec les 4 autres tés comme le montre à titre d'exemple la Fig. V- 3 pour le té P-727.

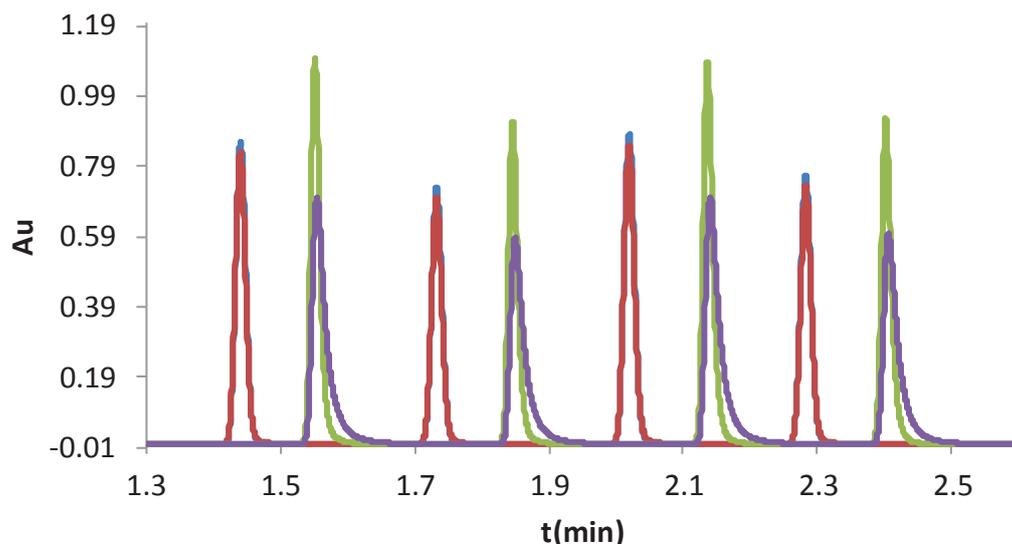


Fig. V- 3 : Comparaison des té P-460-S et P-727. Superposition de chromatogrammes obtenus avant et après les tés. Chromatogrammes bleu (union), rouge (té P-757), vert (union) et violet (P-460-S). Les tés sont bouchés et sont utilisés comme raccord union. Mélange des 4 parabènes. Acquity BEH 50x2.1 mm, 1.7 μ m. Gradient de 5 à 85% d'ACN en 3,2 min (s=5%). 0,5 mL/min. 1 μ L injecté. UV 254 nm.

Les tés P-727 et U-428 se sont révélés équivalents en termes de dispersion. Ceci n'est pas surprenant puisque le volume interne de ces tés est identique (0.57 μ L). L'un ou l'autre de ces deux tés peut donc être utilisé indifféremment dans cette étude.

Le passage de la phase mobile dans le té peut se faire de manière « linéaire » ou « coudée » suivant l'endroit où l'on connecte le tube faisant la liaison depuis la colonne. Aucune différence n'a été constatée pour ces deux configurations avec le té P-727.

Les tés P-888 et P-890 sont de volumes beaucoup plus faibles que le té P-727 et sont potentiellement intéressants pour réduire la dispersion. Cependant, les connectiques à utiliser avec ces tés ne sont pas classiques (Fig. V- 4). Le té P-888 est prévu pour des tubes de 360 μ m de diamètre externe au lieu du diamètre 1/16" habituel. Lorsque l'on souhaite connecter un tube en 1/16" à ce té, notamment en sortie de colonne, il faut alors utiliser les connectiques du té P-890. Des volumes additionnels au té sont créés qui engendrent des dispersions lorsque deux tubes différents (1/16" et 360 μ m de diamètre externe) sont connectés sur un té de type P-888 ou P-890.



Fig. V- 4 : De gauche à droite, connectiques pour : P-888, P-890 et P-727.

La comparaison de ces deux tés a été effectuée à un débit entrant dans le té de 500 μ L/min et pour un rapport $z=1/60$. Dans ces conditions, le té P-890 génère moins de dispersion que le té P-888. La raison probable est que l'utilisation de 2 connectiques 1/16" dans le té P-888 (prévu

pour connecter uniquement des tubes en 360 μ m) gène un volume mort conséquent. Le té P-890 est donc privilégié par rapport au té P-888.

Une solution alternative au montage classique a été envisagée afin d'éviter de générer de la dispersion dans le té (Fig. V- 5). Dans cette configuration, le split se fait avant le té. Pour des rapports de splits faibles ($z=1/6$ ou $1/10$), le montage traversant est plus avantageux en termes de dispersion. Par contre, aucun bénéfice n'est apporté par cette configuration pour des rapports de splits plus importants ($z=1/22$). De plus, cette configuration est très contraignante car le montage est particulièrement fragile et le positionnement du tube de 50 μ m dans le tube de 400 μ m est délicat. Des déformations de pics sont fréquemment observées.

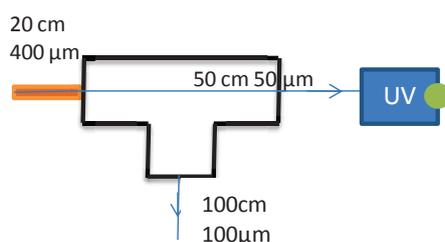


Fig. V- 5 : Montage traversant le té. Tube ❶ 50cmx50 μ m ❷ 1mx100 μ m. $z=1/22$. 500 μ L/min avant le split. Le split se fait au niveau du frité de sortie de colonne. Le tube ❶ passe à travers le té P-757 et un tube 20cmx400 μ m.

Les tés P-727 et P-890 semblent être les tés les plus intéressants et sont comparés sur la Fig. V- 6. Le té P-890 est celui qui procure le moins de dispersion lorsque le tube de split (tube ❶) est un tube de 360 μ m. Par contre, le té P-727 est à privilégier lorsque le tube ❶ est un tube en 1/16".

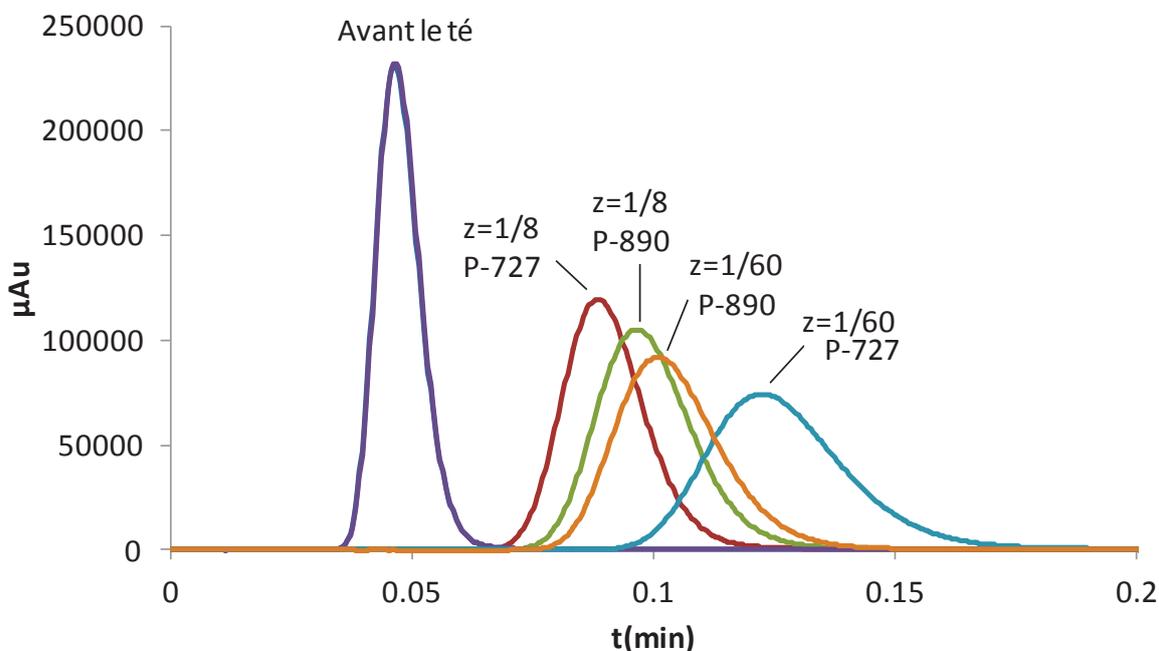


Fig. V- 6 : Pic de méthylparabène avec le té P-890 et P-727 pour $z=1/8$ et $1/60$. Tube ❶ 25cmx50 μ m ❷ 22cmx100 μ m pour $z=1/60$. ❸ 25cmx65 μ m ❹ 5cmx100 μ m pour $z=1/8$. Sans colonne. Isocratique 50/50 Eau/ACN. 0,5 mL/min. 1 μ L injecté. UV 254 nm.

Lors de la répétition de ces expériences, nous avons constaté que la position du tube de 360µm dans le té n'est pas toujours la même et conduit parfois à des dispersions additionnelles. On constate que la dispersion générée par le split est importante si l'on compare le pic obtenu avant le té avec ceux obtenus après le té (Fig. V- 6). L'étude détaillée dans la partie suivante précise l'impact de la géométrie du split (longueurs et diamètres de tube) et du rapport de split.

2. Optimisation des paramètres du split

Il est nécessaire de quantifier la dispersion générée par le split afin de fixer des limites de conditions acceptables. La dispersion mesurée dans un système de ce type est :

$$\sigma_{mesuré}^2 = \sigma_{colonne}^2 + \sigma_{split}^2 + \sigma_{appareillage}^2 \quad \text{Eq. V- 17}$$

La dispersion générée par le système étant particulièrement faible (3µL² à 500µL/min pour le système I-Class, Chapitre 2), le split a un impact d'autant plus grand que la dispersion générée par la colonne est faible. La variance due au split peut être déterminée en faisant la différence entre la variance mesurée sans split (z=1) et la variance mesurée avec split (z<1).

Les variances (moments statistiques centrés d'ordre 2) mesurées pour des pics issus d'analyses à géométrie de split différente sont indiquées dans le Tab. V- 1. Le changement de rapport de split, longueur de tube et diamètre de tube de split conduit à des variations importantes de split. Cette étude ne nous permettant pas de connaître la contribution de chaque paramètre sur la dispersion dans le split, des expériences supplémentaires ont été effectuées.

z	L _{tube ①}	d _{i,tube ①}	L _{tube ②}	d _{i,tube ②}	σ ² (s ²)
1	-	-	-	-	0.08
1/8	25 cm	65 µm	5 cm	100 µm	0.32
1/12	40 cm				0.62
1/13	60 cm				0.77
1/19	75 cm				0.98
1/21	100 cm				1.09
1/29	150 cm				2.37
1/60	25 cm				50 µm

Tab. V- 1 : Variances mesurées pour différents rapports de splits, longueurs de tube de split et diamètre de tube de split. Sans colonne. Isocratique 50/50 Eau/ACN. 0,5 mL/min. Méthylparabène. 1µL injecté. UV 254 nm.

L'effet de la longueur du tube ① est étudié et les valeurs de variances obtenues sont reportées dans le Tab. V- 2. Il apparaît que les variances sont particulièrement importantes (de l'ordre de 2 s²) par rapport à la variance du pic avant le split (0.2s²). Les valeurs obtenues ne permettent pas de constater d'impact significatif de la longueur sur la dispersion. L'impact du rapport de split et du diamètre de tube est probablement plus important. Curieusement, la valeur la plus importante est obtenue pour la longueur de tube la plus courte (25 cm contre

100 cm). L'allure du pic obtenu laisse penser que le tube de polyimide était abimé aux extrémités ou mal positionné.

z	L _{tube ①}	d _{i,tube ①}	L _{tube ②}	d _{i,tube ②}	σ ² (s ²)
1	-	-	-	-	0.20
1/21	25 cm	50 μm	37 cm	100 μm	2.43
1/21	100 cm		100 cm		1.96

Tab. V- 2 : Variances mesurées selon le rapport de split. Acquity BEH 50x2.1 mm, 1.7 μm. Gradient de 5 à 85% d'ACN en 3,2 min (s=5%). 0,5 mL/min. Méthylparabène. 1μL injecté. UV 254 nm.

L'étude de l'effet du diamètre du tube ① est reportée dans le Tab. V- 3 pour un rapport de split de 1/10 (longueurs de tube variables). On constate que la dispersion augmente avec le diamètre du tube de split. Il faut noter cependant que la variance mesurée pour le split réalisé avec le tube de 50 μm est plus importante que celle mesurée pour le tube de 65μm. Encore une fois, cette constatation met en évidence les limites de l'utilisation des tubes de polyimide pour la mise en place de splits.

z	L _{tube ①}	d _{i,tube ①}	L _{tube ②}	d _{i,tube ②}	σ ² (s ²)
1	-	-	-	-	0.27
1/10	29 cm	25 μm	100 cm	65 μm	0.57
1/10	50 cm	50 μm		100 μm	1.05
1/10	100 cm	65 μm	50 cm		0.84

Tab. V- 3 : Variances mesurées selon le diamètre du tube de split. Acquity CSH 50x2.1 mm, 1.7 μm. Gradient de 5 à 85% d'ACN en 3,2 min (s=5%). 0,5 mL/min. Méthylparabène. 1μL injecté. UV 254 nm. z=1/10.

D'autres expériences ont été effectuées pour des rapports de split différents variant entre 1/4 et 1/40 (Tab. V- 4) et un tube ① de 25μm d.i. On observe que la variance augmente significativement lorsque 1/z augmente.

z	L _{tube ①}	d _{i,tube ①}	L _{tube ②}	d _{i,tube ②}	σ ² (s ²)	σ ² _{split} (μL ²)
1	-	-	-	-	0.27	-
1/4	6 cm	25 μm	100 cm	65 μm	0.25	0.0
1/7	14 cm				0.37	6.9
1/10	29 cm				0.57	21.2
1/40	29 cm		50 cm		0.99	50.2

Tab. V- 4 : Variances mesurées selon le rapport de split. Acquity CSH 50x2.1 mm, 1.7 μm. Gradient de 5 à 85% d'ACN en 3,2 min (s=5%). 0,5 mL/min. Méthylparabène. 1μL injecté. UV 254 nm.

La contribution de l'appareillage est considérée comme négligeable dans cette étude devant les dispersions colonne et de split. Si l'on souhaite conserver au minimum 75 % des plateaux de la colonne, il faut que la dispersion liée au split soit limité selon l'Eq. V- 18.

$$\sigma_{split}^2 \leq \frac{\sigma_{colonne}^2}{3}$$

Eq. V- 18

Les variances colonnes attendues en D1 sont de l'ordre de 70 à 150 μL^2 ($k_e=7$ à 10 pour une colonne de 5-10 cm en 2.1 mm di) et de l'ordre de 10 à 20 μL^2 ($k_e=0.5$ à 2 pour une colonne de 3-5cm en 2.1 mm di). Ces plages de variances sont représentées en vert (D1) et en violet (D2) sur la Fig. V- 7. La variance due au split est tracée en bleu en fonction de $1/z$ alors que la limite de variance due à la colonne (3 fois la variance liée au split, Eq. V- 18) est tracé en rouge sur la figure.

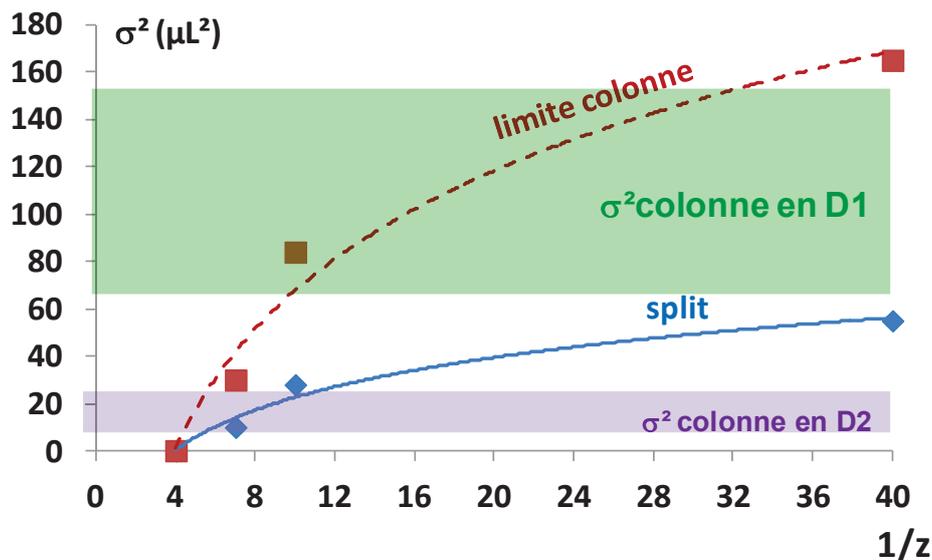


Fig. V- 7 : Evolution de la dispersion liée au split en fonction de l'inverse du rapport de split. Té P-727. Tube ● 25 μm . Sans colonne. Isocratique 50/50 Eau/ACN. 0,5 mL/min. 1 μL injecté. UV 254 nm.

On constate que les rapports de splits qui permettent de conserver 75% des plateaux d'une colonne sont différents dans les conditions de D1 et de D2 avec un tube de 25 μm d.i. Il ne faut pas envisager d'utiliser un rapport de split plus grand que $z=1/4-1/6$ entre la colonne de seconde dimension et le spectromètre de masse. Au contraire, des rapports de splits plus importants peuvent être envisagés en D1 et jusqu'à $z=1/10-1/30$ selon les conditions de D1. Cette étude a permis de mettre en évidence que le diamètre interne des tubes de splits et surtout le rapport de split avait un impact très important sur la dispersion liée au split.

III- Performances obtenues avec l'utilisation d'un split entre D1 et D2 pour la séparation de peptides

L'étude qui suit a pour objectif d'évaluer en termes de capacité de pics les performances d'une séparation de peptides dans des conditions de D1 avec une colonne de 2.1mm de diamètre interne. Le débit appliqué est splitté afin de réduire le volume injecté en seconde dimension. La capacité de pics est évaluée avant ($z=1$) et après le split (z variable) pour différents volumes injectés.

1. Conditions opératoires

Les études présentées dans cette partie sont effectuées avec la colonne Ascentis Express (10cmx2.1mm, 5 μ m) et le système I-Class avec une boucle d'extension de 50 μ L. Les chromatogrammes avant le split sont obtenus avec le détecteur UV. Le détecteur PDA est utilisé pour détecter les composés après le split. L'échantillon analysé est une digestion tryptique de BSA (albumine de sérum bovin). Le flacon est préparé avec 25 μ L de digestion et 275 μ L d'eau. Le volume injecté est variable (2 μ L à 50 μ L). Avant le té, un tube de 100 μ m est utilisé. Un tube de 22cmx100 μ m permet d'éliminer vers la poubelle la phase mobile. Le débit après le split est ajusté à 10 μ L/min en modifiant la longueur du tube de split. Le té P-727 est utilisé pour toutes les expériences avec les tubes de 65 μ m. Le té P-890 est utilisé dans le cas de l'utilisation de tubes de silice fondue de 50 μ m de diamètre interne. Les conditions propres à chaque expérience sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tab. V- 5).

	s=1%	s=0.3%	s=0.15%	
F	0.2 mL/min	0.2 mL/min	0.2 mL/min	0.1 mL/min
tg (min)	23.4	77.9	155.8	311.7
Δ C	1 à 28 % ACN	1 à 28 % ACN	1 à 28 % ACN	1 à 28 % ACN
Géométrie de split	75cmx65 μ m ou 25cmx50 μ m	75cmx65 μ m ou 25cmx50 μ m	75cmx65 μ m	25cmx65 μ m
z	1/20	1/20	1/20	1/10

Tab. V- 5 : Conditions de l'étude. Ascentis Express C18 (100x2.1mm, 5 μ m). Gradients 10 mM acétate d'ammonium Eau / ACN. 30°C. 2 à 50 μ L injecté.

2. Effet du volume injecté sur la capacité de pics

Les peptides étant dissous dans un solvant aqueux, des volumes importants (jusqu'à 25% du volume mort de la colonne) ont été injectés. La Fig. V- 8 présente l'impact du volume injecté sur la capacité de pics mesurée pour deux valeurs de pentes normalisées différentes (1% et 0.3%). Les capacités de pics sont bien sûr plus faibles avec une pente normalisée de 1% (en vert) qu'avec 0.3% (en violet) mais il est intéressant de noter qu'avec s=1%, la capacité de pics reste à peu près constante lorsque le volume injecté augmente alors que la diminution est plus importante avec 0.3%. Il est donc possible d'injecter des volumes d'autant plus grands que la pente normalisée est plus élevée (k_e plus faible).

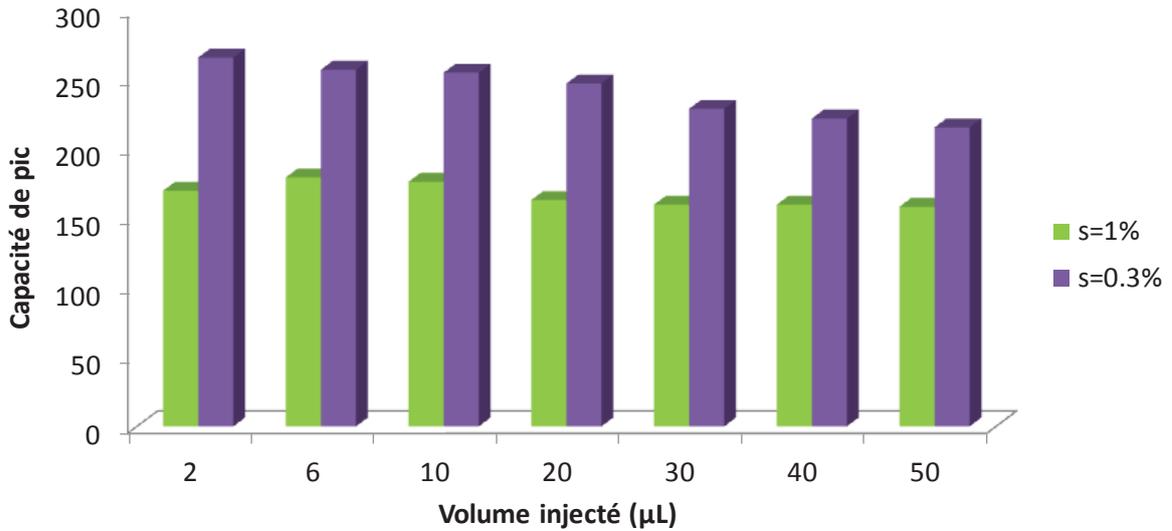


Fig. V- 8 : Effet du volume injecté sur la capacité de pics pour des pentes normalisées de gradients de 1% et 0.3 %. Ascentis Express C18 (100x2.1mm, 5µm). Gradient 10 mM acétate d'ammonium Eau/ACN de 1 à 28 % d'ACN en 23.4min (s=1%) ou 77.9min (s=0.3%). 0.2 mL/min. 30°C. 2 à 50 µL de digestion de BSA injecté. UV 210 nm.

3. Effet du split sur la capacité de pics

Les pentes normalisées de gradient utilisées en première dimension d'une analyse LCxLC sont généralement de l'ordre de 0.15% à 1%. La Fig. V- 9 montre les capacités de pics obtenues avant et après le split pour une injection de 50µL de digestion tryptique avec 3 pentes normalisées différentes (1%, 0.3% et 0.15%).

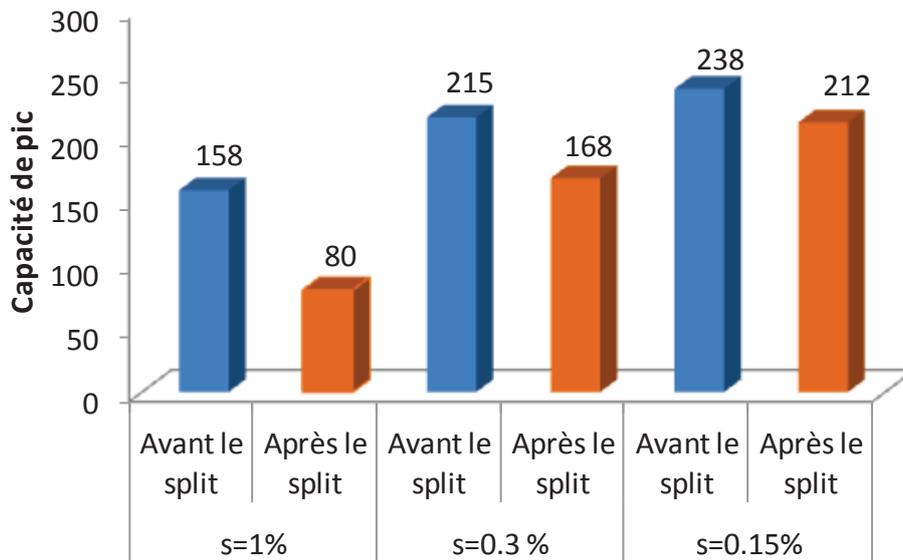


Fig. V- 9 : Capacité de pics mesurée pour trois pentes de gradient différentes avant et après le split ($z = 1/20$). Té P-727 et tube de split \odot de 65 µm di. Ascentis Express C18 (100x2.1mm, 5µm). Gradient 10 mM acétate d'ammonium Eau/ACN de 1 à 28 % d'ACN en 23.4min (s=1%) ou 77.9min (s=0.3%) 155.8min (s=0.15%). 0.2 mL/min. 30°C. 50 µL de digestion de BSA injecté. UV 210 nm.

Il semble d'après la Fig. V- 9 que l'utilisation d'un split ($z=1/20$) avec un tube de $65\mu\text{m}$ d.i. génère moins de capacité de pics lorsque la pente normalisée est suffisamment faible : on a, en effet, 11% de perte de capacité de pics pour $s=0.15\%$ contre 22% et 49% de perte pour $s=0.3\%$ et 1% respectivement. La Fig. V- 10 présente les chromatogrammes obtenus avant et après le split, dans ces conditions, pour une pente normalisée de 0.3%.

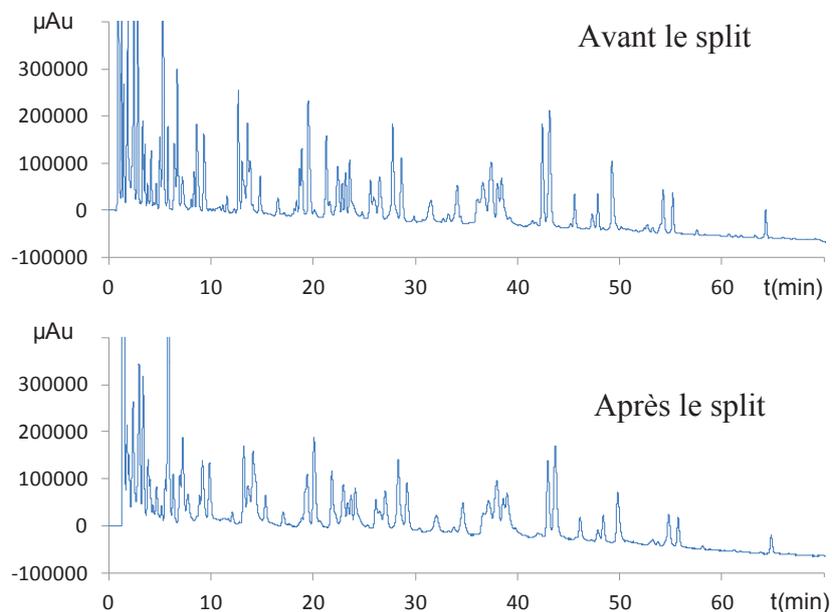


Fig. V- 10 : Chromatogramme de l'analyse de la digestion de BSA. Ascentis Express (100x2.1mm, $5\mu\text{m}$). Gradient de 1 à 28 % ACN en 77.9 min. 0.2 mL/min. $s=0.3\%$. 50 μL injecté. 30°C. UV 210 nm. $z=1/20$. Tube \bullet 65 μm d.i.

D'après la partie précédente portant sur les splits de manière générale, il vaut mieux utiliser des tubes de diamètre aussi faible que possible pour le split. Les capacités de pics obtenues avec des tubes de $65\mu\text{m}$ et de $50\mu\text{m}$ de diamètre interne sont comparées sur la Fig. V- 11 pour deux pentes normalisées différentes (1% et 0.3%). Les tubes de $25\mu\text{m}$ d.i. n'étaient pas encore proposés par notre fournisseur.

Fig. V- 11 pour deux pentes normalisées différentes (1% et 0.3%). Les tubes de 25 μm d.i. n'étaient pas encore proposés par notre fournisseur.

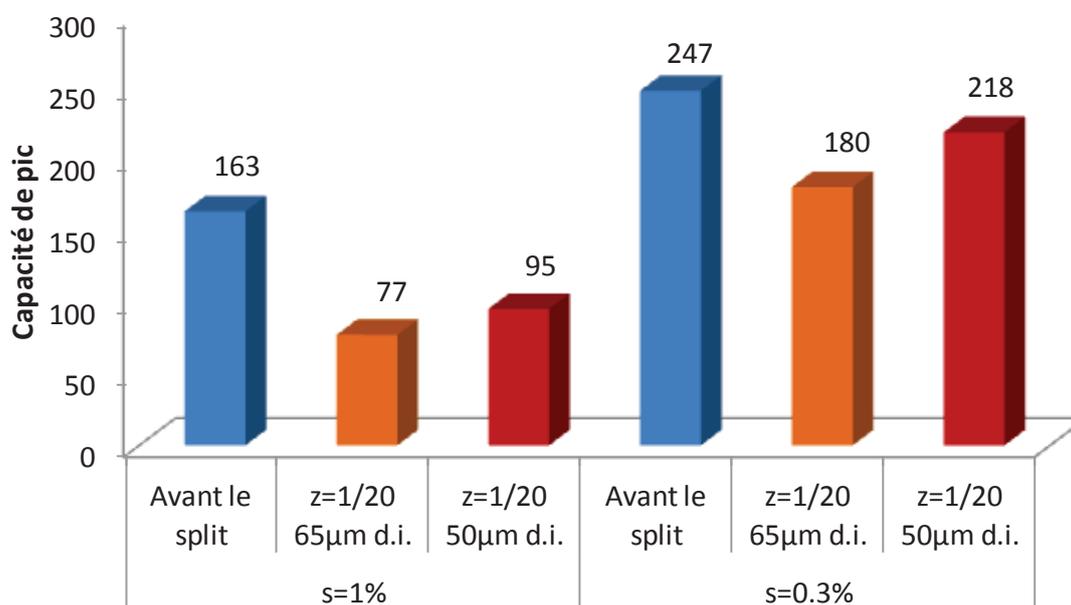


Fig. V- 11 : Capacités de pics mesurées avant et après split ($z=1/20$). Ascentis Express C18 (100x2.1mm, 5 μm). Gradient 10 mM acétate d'ammonium Eau/ACN de 1 à 28 % d'ACN en 23.4min ($s=1\%$) ou 77.9min ($s=0.3\%$). 0.2 mL/min. 30°C. Té P-727 et diamètre du tube \bullet 50 μm et 65 μm . 20 μL de digestion de BSA injecté. UV 210 nm.

La dispersion dans le split est moins importante lors de l'utilisation d'un tube de 50 μm d.i. (rouge sur la figure) plutôt que de 65 μm d.i. (orange sur la figure) mais le gain en capacité de est de seulement 11% et 15% (avec $s=1\%$ et 0.3% respectivement) ce qui reste faible. De plus, comme expliqué précédemment, les tubes de silice de 50 μm sont moins faciles à utiliser que les tubes en peek. Nous avons donc opté pour des tubes en peek de 65 μm , les tubes de 25 μm n'étant pas disponible à ce moment là.

L'effet du rapport de split sur la capacité de pics a également été étudié pour deux valeurs différentes de z avec une pente normalisée de 0.15%. Comme l'indique la Fig. V- 12 et comme cela a été montré lors de l'étude générale des splits, l'augmentation du rapport de split conduit à une diminution de la capacité de pics. Cependant, cette diminution est très faible lorsque la pente normalisée est faible.

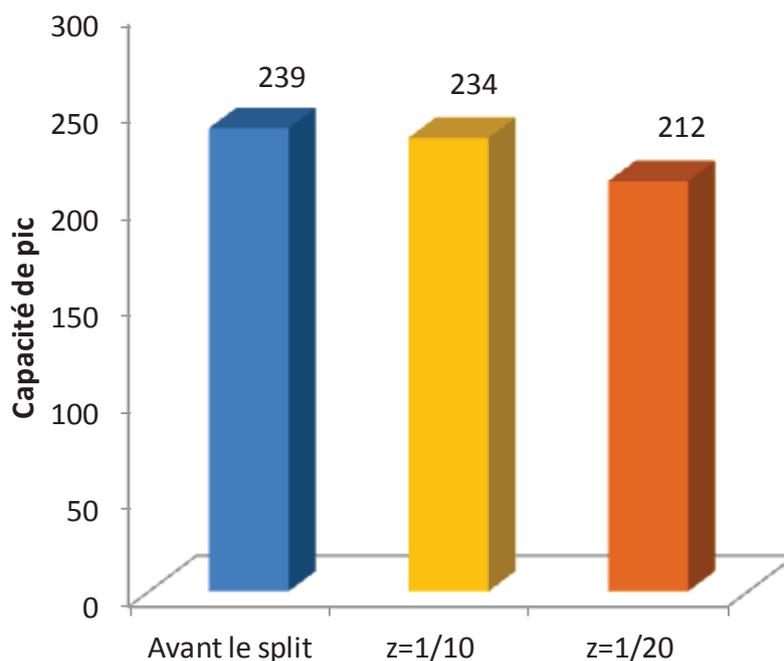


Fig. V- 12 : Comparaison des capacités de pics obtenues pour des splits $z= 1/10$ et $z=1/20$. Ascentis Express C18 (100x2.1mm, 5 μ m). Gradient 10 mM acétate d’ammonium Eau/ACN de 1 à 28 % d’ACN en 155.8min ($z=1/20$ et $F=0.2\text{mL}/\text{min}$) et en 311.7min ($z=1/10$ et $F=0.1\text{mL}/\text{min}$). 30°C. Té P-727 et tube ● de 65 μ m. 50 μ L de digestion de BSA injecté. UV 210 nm.

La perte de capacité de pics pour une pente normalisée de 0.15% est de seulement 2% pour $z=1/10$ et 11% pour $z=1/20$ ce qui autorise l’utilisation de rapports de split aussi élevés même avec des tubes de 65 μ m d.i. à condition que la pente normalisée soit suffisamment faible. Un rapport de split de $z=1/20$ permet d’utiliser un débit conséquent en première dimension (200 μ L/min par exemple) tout en ayant un débit très faible vers la vanne d’interface (10 μ L/min).

B- SEPARATIONS BIDIMENSIONNELLES LCxLC DE MELANGES PEPTIDIQUES

I- RPLCxRPLC et RPLCxHILIC

Article 3 : On-line comprehensive two-dimensional separations of charged compounds using reversed-phase high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography. Part II : Application to the separation of peptides

Cette section est présentée sous forme d'une publication qui présente la mise en place de séparations RPLCxRPLC et RPLCxHILIC d'une digestion de protéines. Après une introduction situant le contexte de l'étude, la partie expérimentale détaille les conditions des expériences effectuées. Les effets à l'injection sont étudiés afin de déterminer des limites en termes de volume injecté en RPLCxRPLC et en RPLCxHILIC. Les analyses bidimensionnelles sont ensuite présentées et les résultats sont comparés (occupation de l'espace, capacité de pics).

II- HILICxRPLC

La séparation RPLCxHILIC développée dans la partie précédente (article 3) est particulièrement intéressante du point de vue de l'occupation de l'espace par rapport à la séparation RPLCxRPLC. Il semble donc intéressant de mettre en place une séparation HILICxRPLC pour le même échantillon. Une étude des effets à l'injection dans des conditions HILICxRPLC a été effectuée de façon similaire à celle décrite précédemment en RPLCxRPLC et RPLCxHILIC. Le peptide [ile]-angiotensin a été solubilisé dans une composition proche de sa composition à l'élution en HILIC (70%ACN) et injecté en gradient d'élution dans des conditions RPLC avec des volumes correspondants à des temps de cycle classiques en chromatographie bidimensionnelle. Des résultats atypiques en termes de sensibilité nous ont conduits à approfondir cette étude pour expliquer ce phénomène. Quatre solutions différentes de [ile]-angiotensin ont été préparées, dans 100%eau (42ppm et 4.2ppm) et dans 70%ACN (42ppm et 4.2ppm). Quatre volumes (0.5 μ L, 1 μ L, 2 μ L et 5 μ L) de peptide dans les deux solvants ont été injectés dans les conditions de gradient RPLC.

Les chromatogrammes obtenus sont montrés sur la Fig. V- 13 et les surfaces de pics sont rassemblées dans le Tab. V- 6.

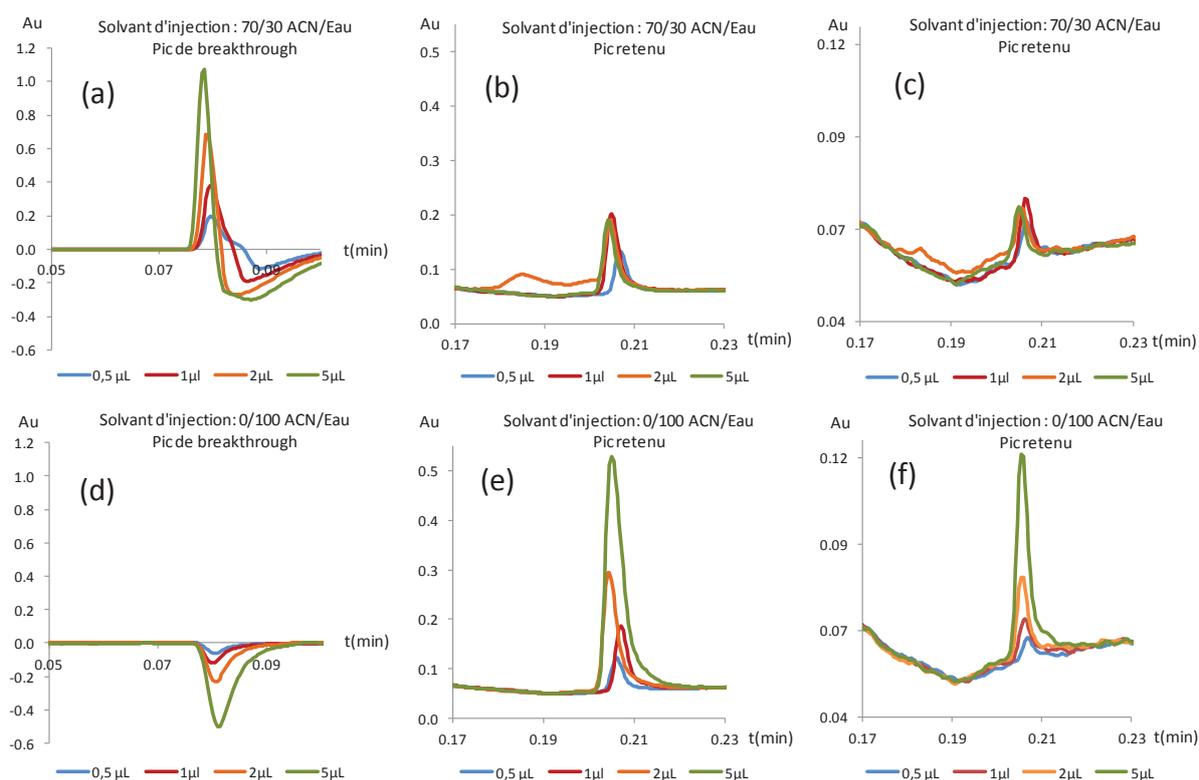


Fig. V- 13 : Chromatogrammes de [ile]-angiotensin obtenus en RPLC avec des volumes injectés différent. Conditions : Kinetex Xb-C18 (50x2.1mm 2.6 μ m), 60°C, 1.8mL/min, 0.1 % d'acide formique dans la phase mobile. Gradient de 1% à 41% ACN en 0.29 min (6to). Volume injecté variable de 0.5 μ L à 5 μ L. Détection UV à 210 nm. En (a), (b) et (c) le solvant d'injection est 70/30 ACN/Eau. En (d), (e) et (f), le solvant d'injection est 100% d'eau. En (a) et (d), les chromatogrammes représentent la zone du pic de breakthrough de (b) et (e) respectivement. En (c) et (f), la solution injectée est diluée 10 fois par rapport à (b) et (e) respectivement.

	Solution analysée	0.5 μ L	1 μ L	2 μ L	5 μ L
b)	42 ppm dans 30/70 Eau/ACN	0.0174	0.0340	0.0500	0.0289
c)	4.2 ppm dans 30/70 Eau/ACN	0.0012	0.0030	0.0031	0.0025
e)	42 ppm dans 100/0 Eau/ACN	0.0142	0.0295	0.0587	0.1387
f)	4.2 ppm dans 100/0 Eau/ACN	0.0009	0.0022	0.0040	0.0125

Tab. V- 6 : Surface mesurées des pics de la Fig. V- 13.

La surface des pics obtenus avec un solvant d'injection faible (100% eau) suivent une évolution classique en fonction de la quantité injectée, c'est à dire une augmentation linéaire de la surface, d'une part en fonction du volume injecté (Fig. V- 13e) pour concentration donnée et d'autre part en fonction de la concentration pour un volume injecté donné (Fig. V- 13e et f). Le temps de rétention du pic de [ile]-angiotensin est, dans ces conditions de 0.2min. Par contre, il semble qu'avec un solvant d'injection de force éluante beaucoup plus importante (70%ACN, dans ces conditions le facteur de rétention du peptide en RPLC est proche de 0), la surface du pic à 0.2min soit bien plus faible et de plus, indépendante du volume injectée à une concentration donnée (Fig. V- 13). La surface du pic suit cependant une variation normale lorsque le composé est dilué 10 fois (Fig. V- 13c et f).

Nous pouvons observer également un phénomène de "breakthrough" caractérisé par une fraction importante du composé élué au niveau du temps mort dans le cas du solvant d'injection 70% ACN (Fig. V- 13a). Par contre, l'aire du pic correspondant varie linéairement en fonction du volume injecté pour une concentration donnée. Il semble ainsi que la plus grande partie du composé ne soit pas retenue sur la colonne et que seule une faible quantité, indépendante du volume injecté, puisse être retenue. Des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer complètement ces résultats. Nous pensons cependant que les molécules de soluté situées dans la partie avant et arrière du créneau d'injection peuvent diffuser dans la phase mobile et ainsi se retrouver dans un solvant plus faible, permettant ainsi une rétention "normale" de ces molécules.

Ce phénomène de "breakthrough" a déjà reporté dans la littérature pour des séparations HILICxRPLC [2], en RPLC avec un solvant d'injection particulièrement éluant [5] et pour des séparations de polymères [6,7]. Ce phénomène de breakthrough intervient lorsque des volumes importants de solvant fort sont injectés. Les solutions permettant de résoudre ce problème seraient de (1) réduire le débit de phase mobile provenant de première dimension, (2) diminuer la force éluante de la phase mobile entrant dans la colonne de seconde dimension [2]. Un tel phénomène conduit à l'augmentation du facteur de dilution pour le pic retenu et donc à une diminution de la sensibilité. Dans ces conditions, les analyses qualitatives deviennent beaucoup plus difficiles et des analyses quantitatives fortement compromises.

Une séparation HILICxRPLC de la digestion tryptique des 3 protéines a été réalisée. Les conditions opératoires sont indiquées dans le Tab. V- 7 et la séparation LCxLC est représentée sur la Fig. V- 14.

	Première dimension	Deuxième dimension
Phase stationnaire	Nucléodur HILIC	Kinetex Xb-C18
Dimensions de colonne	60mm x 1mm; 3 μ m	50mm x 2.1mm; 2.6 μ m
Phase mobile	A : ACN	A : Eau + 0.1% acide formique
	B: H ₂ O+10mM acétate d'ammonium	B: ACN + 0.1% acide formique
Conditions de gradient	2% à 30%B en 250min	1% à 41%B en 0.69min
Pente normalisée de gradient	0.32	3.34
Température	30°C	60°C
Débit	10 μ L/min	1500 μ L/min
Vinj/V ₀ x100	18%	12.2%
Nombre d'analyses	1	350
Temps d'échantillonnage / Taux d'échantillonnage	1.06min / 3	
Facteur de dilution prédit	2.6	1.0
Capacité de pics prédite/expérimentale	87/72	62/60
Capacité de pics pratique effective (γ)	4300 (1)	

Tab. V- 7 : Conditions expérimentales pour la séparation HILICxRPLC montrée en Fig. V- 14.

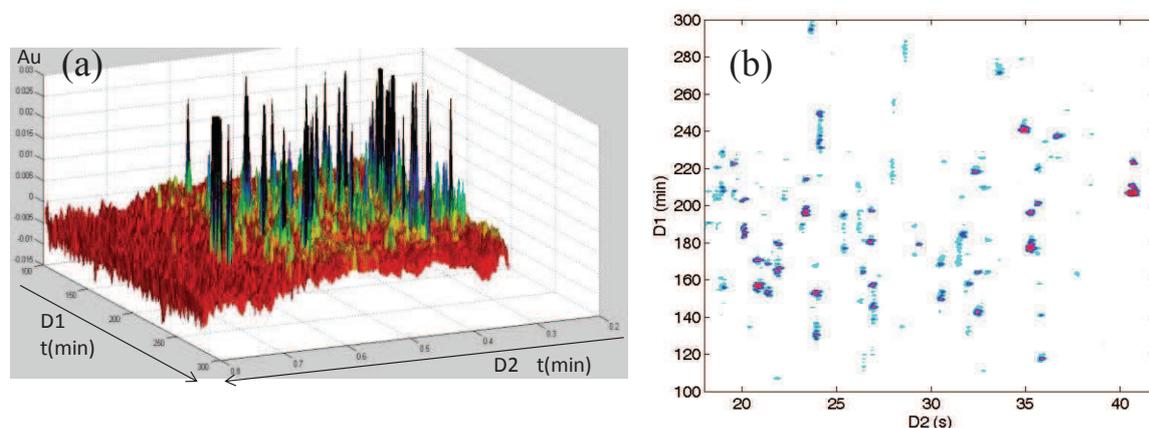


Fig. V- 14 : Séparation HILICxRPLC d'une digestion tryptique de 3 protéines : BSA, lysozyme, myoglobine. Les conditions sont indiquées dans le Tab. V- 7. (a) en 3D, (b) en color plot.

Le rapport signal/bruit observé sur le chromatogramme bidimensionnel et sur les fractions superposées (Fig. V- 15) est très faible. Néanmoins on peut constater une bonne couverture de l'espace de séparation avec des pics de très faibles largeurs (0.15s à 4 σ), ce qui conduit à une capacité de pics effective de 4300. Cette valeur est plus importante que celle qui a été obtenue dans la configuration RPLCxHILIC et même dans la configuration RPLCxRPLC mais les

problèmes de breakthrough évoqués ci-dessus nécessiteront une étude plus approfondie afin de les réduire et de rendre ainsi cette méthode bidimensionnelle vraiment intéressante. Les procédés envisagés pour supprimer le breakthrough pourraient consister à ajouter un solvant (de préférence de l'eau) pour réduire la force éluante à l'injection ou à utiliser des boucles remplies afin de mieux disperser et mélanger la phase mobile entrante (phase mobile de D1) avec la phase mobile comprise dans la boucle (phase mobile initiale de D2).

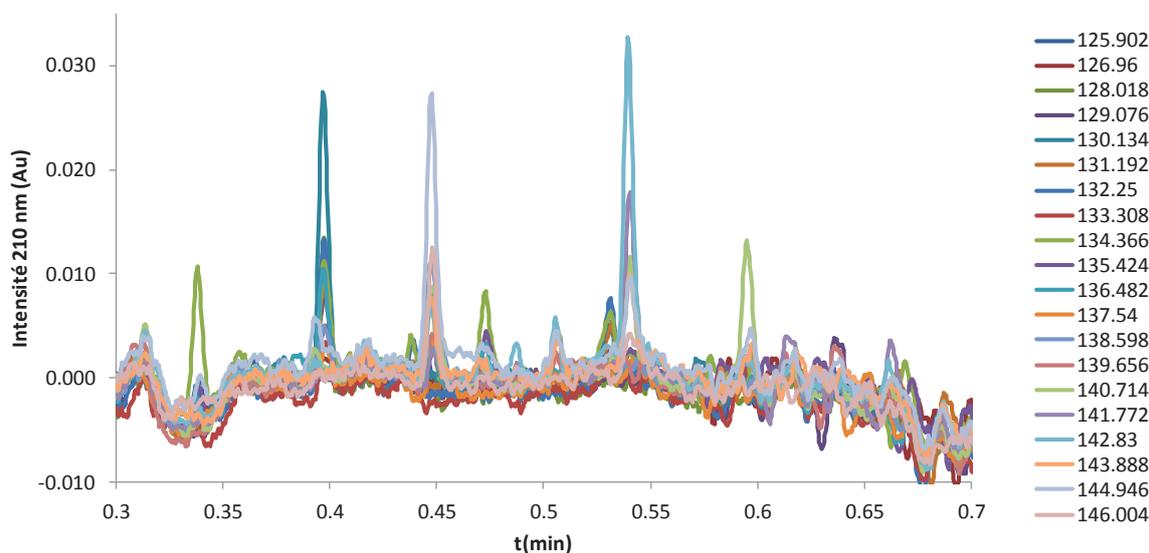


Fig. V- 15 : Superposition de 20 fractions issues de la première dimension pour la séparation HILICxRPLC entre 125 min à 146 min (autres conditions Fig. V- 14 et Tab. V- 7).

CONCLUSIONS

La mise en place d'analyses bidimensionnelles doit être précédée du dimensionnement de l'analyse. Pour cela, différents choix doivent être effectués de manière à maximiser la capacité de pics de la séparation. Ainsi, le diamètre des colonnes des deux dimensions, les débits dans les deux dimensions, la longueur de colonne de seconde dimension et le volume injecté en seconde dimension sont des paramètres clés. Un outil de calcul qui s'appuie sur les équations présentées dans ce chapitre, a été développé au laboratoire avec Excel. Il permet de définir le meilleur compromis entre capacité de pics, facteur de dilution et volume injecté selon les contraintes imposées par l'instrumentation.

Concernant l'étude de split, plusieurs types de tés commerciaux ont été testés afin de privilégier celui qui procure le moins de dispersion. Différents paramètres ont été étudiés (rapport de split, longueur du tube de split, diamètre du tube de split) pour comprendre leur impact sur la dispersion additionnelle observée lors de l'utilisation d'un split. Le diamètre interne des tubes, et notamment le rapport de split, ont une influence particulièrement importante pour un débit donné. Pour ne pas perdre plus de 25% des plateaux de la colonne, il faut se limiter à $z=1/4-1/6$ en deuxième dimension et $z=1/10-1/30$ en première dimension lorsque le diamètre du tube est $25\mu\text{m}$.

Les performances obtenues dans des conditions de première dimension ont été étudiées. L'augmentation du volume injecté dans la première dimension a un impact direct sur la capacité de pics. Cet effet est d'autant plus important que la pente de gradient est faible. Au contraire, la perte de capacité de pics engendrée par l'utilisation d'un split est plus importante pour les pentes de gradient les plus importantes. Cette perte peut être restreinte en utilisant des tubes de plus faibles diamètres internes ou des rapports de split plus faibles. Néanmoins, l'utilisation d'un split de $1/20$ avec un tube de $65\mu\text{m}$ pour une pente de gradient de $0,15\%$ conduit à une perte de 11% de la capacité de pics de première dimension ce qui est acceptable.

Les systèmes RPLCxRPLC et RPLCxHILIC sont très intéressants en termes de capacités de pics effectives. Cependant, pour ces deux systèmes, des précautions doivent être prises. En RPLCxRPLC avec l'acide formique en seconde dimension, des gradients de fortes pentes (temps de gradient faibles) doivent être favorisés pour éviter les effets de surcharge et ainsi pour permettre la reconstruction des chromatogrammes en 3D. En RPLCxHILIC, le volume injecté dans la seconde dimension ne doit pas excéder une faible fraction du volume mort de la colonne ($<8\%$) rendant ainsi nécessaire l'utilisation de temps de cycles court. En HILICxRPLC, un phénomène de breakthrough a été observé. Il augmente de façon importante le facteur de dilution puisqu'une fraction importante du composé n'est pas retenue et, par conséquent, réduit considérablement le rapport signal/bruit. Néanmoins, le système HILICxRPLC développé est particulièrement intéressant puisqu'une très grande capacité de pics a été obtenue en HILICxRPLC (4300). Celle-ci est bien supérieure à celles obtenues en RPLCxRPLC (3300) et RPLCxHILIC (2600).

REFERENCES

- ¹ R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1585
- ² Q. Li, F. Lynen, J. Wang, H. Li, G. Xu, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1255 (2012) 237
- ³ P. Donato, F. Cacciola, E. Sommella, C. Fanali, L. Dugo, M. Dachà, P. Campiglia, E. Novellino, P. Dugo, L. Mondello, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2485
- ⁴ L. Montero, M. Herrero, M. Prodanov, E. Ibanez, A. Cifuentes, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4627
- ⁵ P. Jandera, T. Hajek, P. Cesla., *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1995
- ⁶ X. Jiang, A. van der Horst, P. J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 55
- ⁷ H.J.A. Philipsen, B. Klumperman, A.M. van Herk, A.L. German, *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 13

Chapitre 6 : Application au couplage de la LCxLC à la spectrométrie de masse

Séparations de mélanges pharmaceutiques, optimisation du rapport signal/bruit, traitement des données MS, mise en évidence de l'intérêt de la LCxLC-MS, analyses rapides LCxLC-MS.

INTRODUCTION

L'augmentation de la capacité de pics n'est pas toujours la principale raison d'utiliser la LCxLC. Parfois, une seconde dimension (D2) peut être adjointe à une première séparation (D1), lorsque la méthode de séparation utilisée n'est pas compatible avec la spectrométrie de masse et ne peut cependant être modifiée pour des raisons pratiques ou parce qu'elle a déjà été validée ainsi. Une seconde dimension en ligne, compatible avec la spectrométrie de masse peut permettre une identification des pics obtenus en D1. Dans cette optique, deux projets, soumis par l'entreprise Technologie Servier, ont été étudiés au laboratoire. Les analyses bidimensionnelles obtenues en vue du couplage avec la spectrométrie de masse (MS) sont présentées dans la section A.

La LCxLC permet de séparer un grand nombre de constituants grâce à la capacité de pics qu'elle génère. Le couplage avec un détecteur UV ne permet pas toujours l'identification de tous les composés. Il est donc intéressant de pouvoir coupler les systèmes LCxLC à un spectromètre de masse. Néanmoins, le couplage LCxLC-MS n'est pas facile à mettre en œuvre et un certain nombre de contraintes sont à considérer [1]. Nous avons mis en place le couplage LCxLC-MS avec un système de type simple quadripôle. Deux configurations différentes de la source d'ionisation sont présentées en section B ainsi que, pour les deux configurations, l'étude des conditions permettant d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit. Par ailleurs, le traitement des données, compliqué en LCxLC-UV, est encore plus complexe en LCxLC-MS avec une dimension supplémentaire correspondant au spectre de masse. Le processus de traitement des données que nous avons utilisé est également détaillé dans cette section B.

Des analyses de différents échantillons de composés chargés sont présentées en section C. Un spectromètre de masse à temps de vol a été utilisé pour la séparation bidimensionnelle d'une digestion tryptique de HSA dans l'urine. L'intérêt de la LCxLC-MS par rapport à la LC-MS est montrée à travers la séparation d'une digestion tryptique de 3 protéines en mettant en évidence la réduction de suppression d'ionisation qu'offre la très grande capacité de pics obtenue en bidimensionnelle.

Enfin, des analyses RPLCxRPLC-MS ultra rapides d'une digestion tryptique de 5 protéines ont été réalisées avec une colonne prototype Core-Shell avec des particules de 1.3µm afin d'évaluer le potentiel ultime de la bidimensionnelle. Les résultats obtenus sont présentés dans la section D.

A- ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DE COMPOSES D'INTERET PHARMACEUTIQUE EN VUE DU COUPLAGE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle en ligne et totale (« comprehensive ») permet d'atteindre de très grandes capacités de pics. C'est donc une méthode de choix pour l'analyse des échantillons complexes étant donné son grand pouvoir de séparation. Cependant, la LCxLC peut être utilisée pour l'analyse d'échantillons moins complexes pour d'autres raisons : (1) Rendre compatible avec la détection en spectrométrie de masse une séparation utilisant des phases mobiles contenant des sels non volatils ou corrosifs pour le détecteur. (2) Améliorer la sélectivité entre quelques composés sur certaines zones du chromatogramme unidimensionnel. Ces deux points sont abordés dans cette partie avec deux problématiques différentes provenant du laboratoire pharmaceutique Technologie Servier. Les séparations réalisées avec des phases mobiles à base de sels non volatils sont en première dimension. Des conditions de seconde dimension intéressantes d'un point de vue sélectivité ont été recherchées parmi des phases mobiles compatibles avec la spectrométrie de masse.

Pour les deux projets, différentes conditions ont été étudiées. Le mode HILIC a été testé sans succès avec très peu de pics séparés à chaque fois. Pour le mode RPLC, deux types de phases stationnaires à base de silice ont été utilisées : Acquity BEH C18 et Acquity CSH phenyl-hexyl. 3 pentes normalisées ont été testées, 1%, 5% et 10%, cette dernière répondant en général mieux aux contraintes de D2 (temps de cycle très court).

I- Premier projet

La phase mobile utilisée dans la méthode validée par le laboratoire Technologie Servier contient de l'acide perchlorique. La séparation est présentée sur la Fig. VI- 1. Cet acide est volatil mais très corrosif pour les détecteurs de spectrométrie de masse.

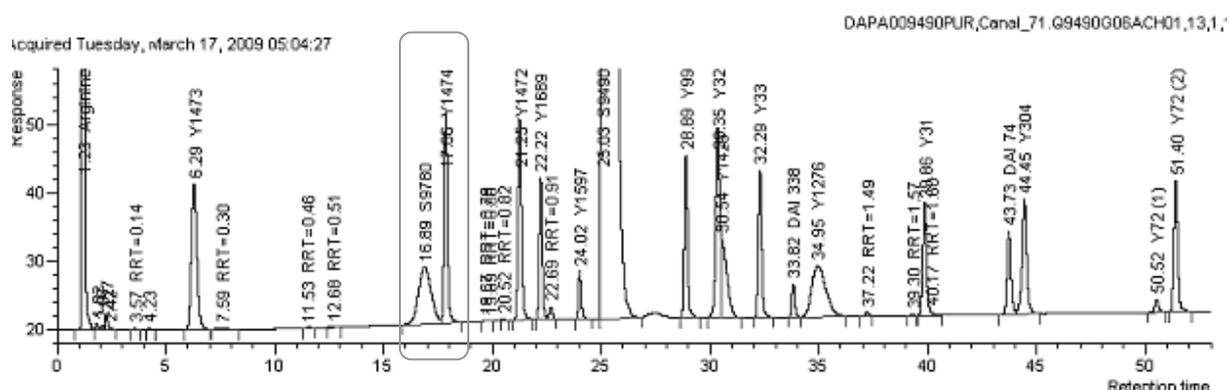


Fig. VI- 1 : Séparation selon les conditions de Technologie Servier. Inertsil C8 150x4 mm 5 µm, Eau (ajustée à pH 2.5 avec l'acide perchlorique)/ ACN, Gradient de 5 à 60% en ACN en 60 min, 1 mL/min, 60°C, 20µL injectés, Détection UV 215 nm.

De plus, deux impuretés présentes dans le mélange (S9780 et Y1474) sont mal séparées et des conditions différentes dans une seconde dimension pourraient permettre de les séparer complètement. Les pics de ces deux impuretés sont encadrés sur la Fig. VI- 1.

Des conditions permettant de séparer les deux composés d'intérêt ont été recherchées. Nous avons en particulier testé différents additif de pH (acide formique pH 2.7, acétate d'ammonium pH 6.8, ammoniac pH 10.4). Les composés ont été séparés à pH 6.8 (80°C) et pH 10.4 (30°C) avec un gradient de pente $s=10\%$. Les deux colonnes peuvent être utilisées indifféremment (Acquity BEH C18 et Acquity CSH phenyl-hexyl).

Le système bidimensionnel qui a été utilisé pour toutes les analyses LCxLC de ces deux projets est le système n°2. Etant donné la limitation de ce système à 12 rotations de vanne, l'analyse LCxLC a été effectuée en 4 fois de manière à obtenir des fractions sur la partie du chromatogramme de première dimension la plus intéressante. Pour limiter les rotations de vanne, les expériences bidimensionnelles n'ont pas été réalisées en conditions « comprehensive » : le nombre de fraction par pic est faible et proche de 1 pour les analyses des deux projets suivants. Les conditions de D1 peuvent être modifiées mais il est important de conserver le même ordre d'élution en D1. De ce fait, une analyse bidimensionnelle a été effectuée avec les conditions d'origine et un split en sortie de D1. Une seconde analyse a été mise en place avec une colonne de phase stationnaire identique mais de 1mm d.i. (sans split) à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui est le débit minimal utilisable sur le système n°2.

La Fig. VI- 2 présente les séparations de D1 réalisées avec la colonne de 4mm d.i. (Fig. VI- 2a) et de 1mm d.i (Fig. VI- 2b). Les analyses bidimensionnelles ont été effectuées pour les portions de chromatogrammes encadrées en rouge. Pour la première séparation (Fig. VI- 2a), les conditions d'analyse sont identiques à celles de Technologie Servier mis à part le débit qui a été réduit de 1 à 0.74 mL/min. On constate qu'il y a décalage de temps entre les chromatogrammes qui est du au temps de délai différent pour les deux analyses.

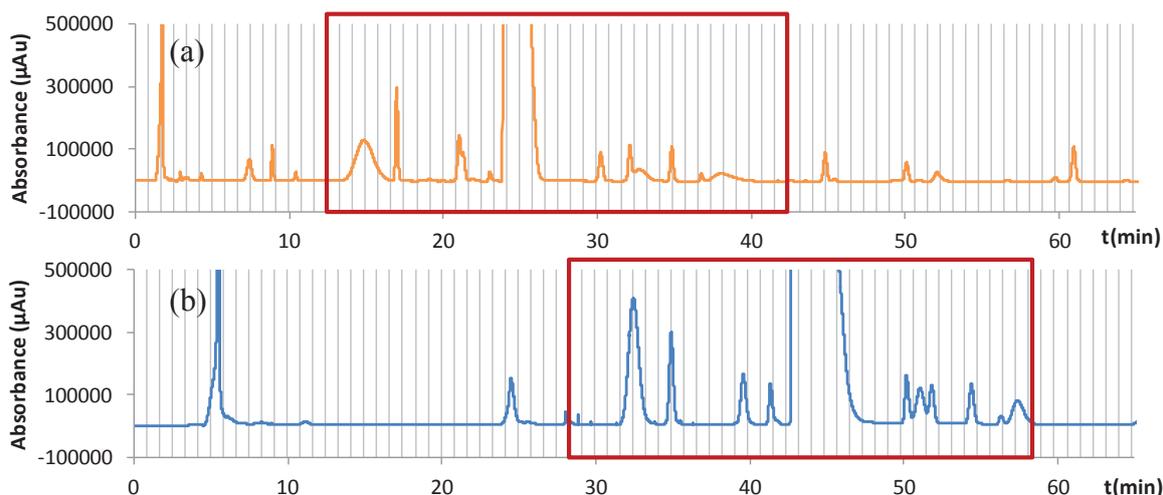


Fig. VI- 2 : Séparations de première dimension. A : Eau acide perchlorique (pH2.5). B :ACN. 60°C. $t_{\text{cycle}}=0.83$ min. Chaque fraction est indiquée par un trait vertical et seule la zone en rouge a été envoyée en D2. (a) Inertsil C8 (150x4mm, 5 μm). 5 à 60% en ACN en 74.3 min. 740 $\mu\text{L}/\text{min}$. 100 μL injecté. (b) Inertsil C8 (150x1mm, 5 μm). 5 à 70% en ACN en 87.8min. 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. 5 μL injecté.

La Fig. VI- 3 montre les séparations bidimensionnelles obtenues pour les colonnes de 4 et 1 mm d.i en D1 et en utilisant de l'acétate d'ammonium en D2 (pH 6.8). Pour les deux séparations 2D, l'objectif de séparer Y1474 et S9780 est atteint. Si l'on compare les résultats obtenus, on constate que les sélectivités sont semblables. On peut noter qu'on retrouve le retard observé sur la Fig. VI- 2 pour la D1 avec la colonne de 1mm d.i. La répétabilité du gradient obtenue à 20 μ L/min avec la colonne de 1mm d.i. est bien moins bonne que celle obtenue à 740 μ L/min avec la colonne de 4mm d.i. La dispersion additionnelle générée par le split n'étant pas visible sur les chromatogrammes, il paraît plus raisonnable d'utiliser la colonne de 4 mm d.i. et de faire un split entre les deux dimensions.

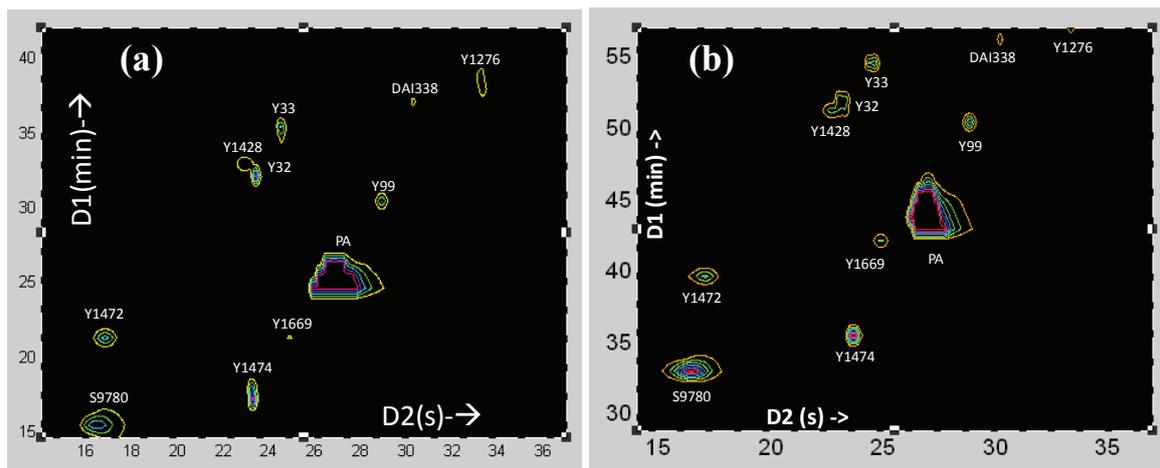


Fig. VI- 3 : Séparations LCxLC avec pH6.8 en D2. D2 : Acquity CSH phenyl-hexyl (50x2.1 mm, 1.7 μ m). 80°C. 1.3 mL/min. Eau acétate d'ammonium pH6.8/ACN. Gradient de 1 à 61% d'ACN en 0.58 min. t_{cycle} =0.83 min. (a) Colonne de 4mm d.i. en D1, $z=1/30$ entre D1 et D2. (b) Colonne de 1 mm de d.i. en D1. Les conditions de D1 sont données en Fig. VI- 2.

L'ammoniac a aussi été utilisé en D2 puisque des sélectivités différentes avaient été trouvées lors de la recherche de conditions orthogonales. La séparation bidimensionnelle obtenue est montrée en Fig. VI- 4. On constate que S9780 et Y1474 sont séparés mais S9780 n'est pas retenu dans ces conditions.

Le degré d'orthogonalité obtenu pour le système de séparation acide perchlorique/ammoniac est meilleur qu'avec le système acide perchlorique/acétate d'ammonium, l'écart de pH étant plus important avec l'ammoniac. On peut en effet remarquer que l'espace de séparation est occupé de manière diagonale pour la séparation en acétate d'ammonium (Fig. VI- 3) et que les pics sont mieux répartis pour la séparation en ammoniac (Fig. VI- 4). Néanmoins, l'utilisation de l'acétate d'ammonium est plus intéressante car S9780 n'est pas retenu en ammoniac ce qui est toujours problématique : les composés non retenus posent problème pour la quantification du fait des perturbations au temps mort et de la présence éventuelle d'autres composés.

Un split de rapport $z=1/60$ a été utilisé pour l'analyse bidimensionnelle avec l'ammoniac afin de limiter le volume injecté à 10% du volume mort de la colonne de D2 (au lieu de 20% pour le split de 1/30). Un split aussi important est possible dans ces conditions car la dispersion générée est très faible devant la dispersion colonne.

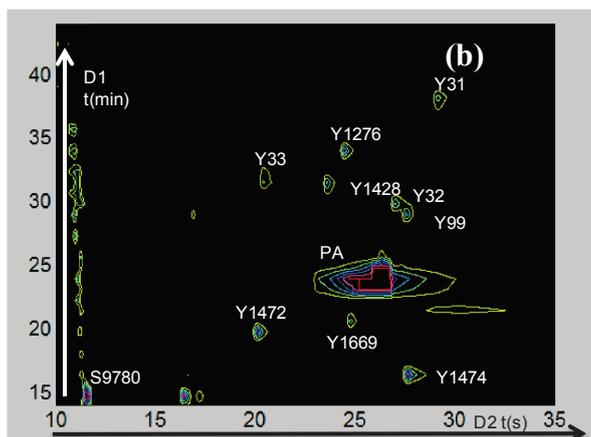


Fig. VI- 4 : Séparations LCxLC avec pH10.4 en D2. D2 : Acquity BEH C18 (50x2.1 mm, 1.7 μ m). 30°C. 1 mL/min. 0.1 % d'ammoniac (pH 10.4) dans Eau/ACN. Gradient de 1 à 51% d'ACN en 0.51 min. tcycle=0.83 min. Colonne de 4mm d.i. en D1, z=1/60 entre D1 et D2. Les conditions de D1 sont données en Fig. VI- 2.

II- Deuxième projet

Concernant le deuxième projet, la phase mobile utilisée pour la séparation développée par le laboratoire Technologie Servier (Fig. VI- 5) contient un contre-ion (heptane sulfonate) et un tampon à base de phosphate non volatil dihydrogénophosphate de potassium) donc incompatible avec la spectrométrie de masse. De plus, deux impuretés (S21517 et Y579) ne sont pas séparées. Le pic correspondant à ces composés est signalé par une flèche sur la figure.

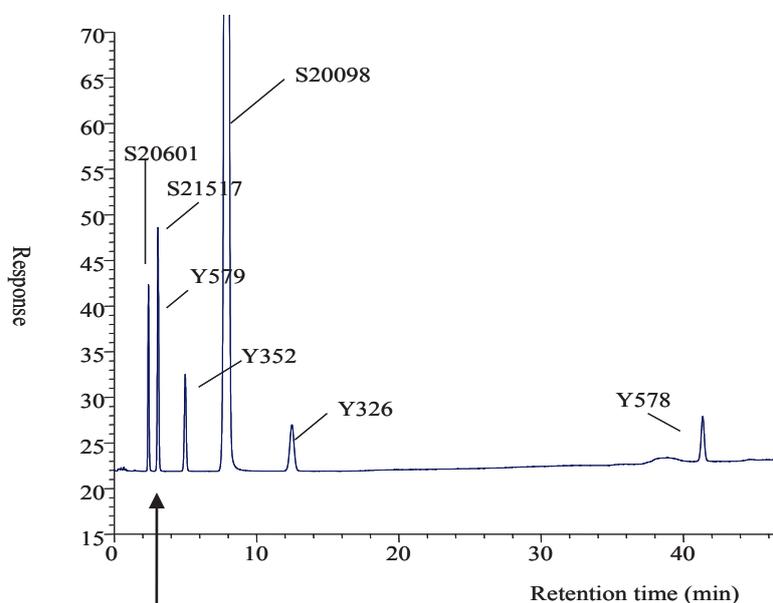


Fig. VI- 5 : Séparation selon les conditions de Technologie Servier. Lichrospher 60 RP select B 125x4 mm 5 μ m, phase aqueuse à pH 2,5 (4.59 g/L heptane sulfonate anhydre + 2.27 g/L dihydrogénophosphate de potassium ajusté à pH 2.5 avec l'acide orthophosphorique) A :75% phase aqueuse et 25% ACN, B : 50% phase aqueuse et 50% ACN, isocratique 100% A pendant 15 minutes puis gradient de 0 à 100% de B en 30 min, 1.9mL/min, 20 μ L injectés, 50°C, détection UV 230 nm.

De la même manière que pour le projet précédent, des conditions permettant de séparer les deux composés d'intérêt ont été recherchées. Les composés ont pu être séparés avec un gradient de pente $s=10\%$ à 80°C dans deux conditions différentes : pH 6.8 sur la colonne Acquity BEH C18 et à pH 10.4 sur la colonne Acquity CSH phenyl-hexyl).

La séparation développée par Technologie Servier est réalisée en isocratique. Pour que cette séparation puisse être utilisée en première dimension d'une analyse LCxLC, il est souhaitable de la modifier en analyse gradient afin d'obtenir des pics de largeur constante au cours de l'analyse. La Fig. VI- 6 présente la séparation isocratique initiale et la séparation développée en gradient. L'ordre d'élution est le même et en outre, les sélectivités sont tout à fait comparables. La séparation en gradient présente également l'avantage de réduire considérablement le temps d'analyse.

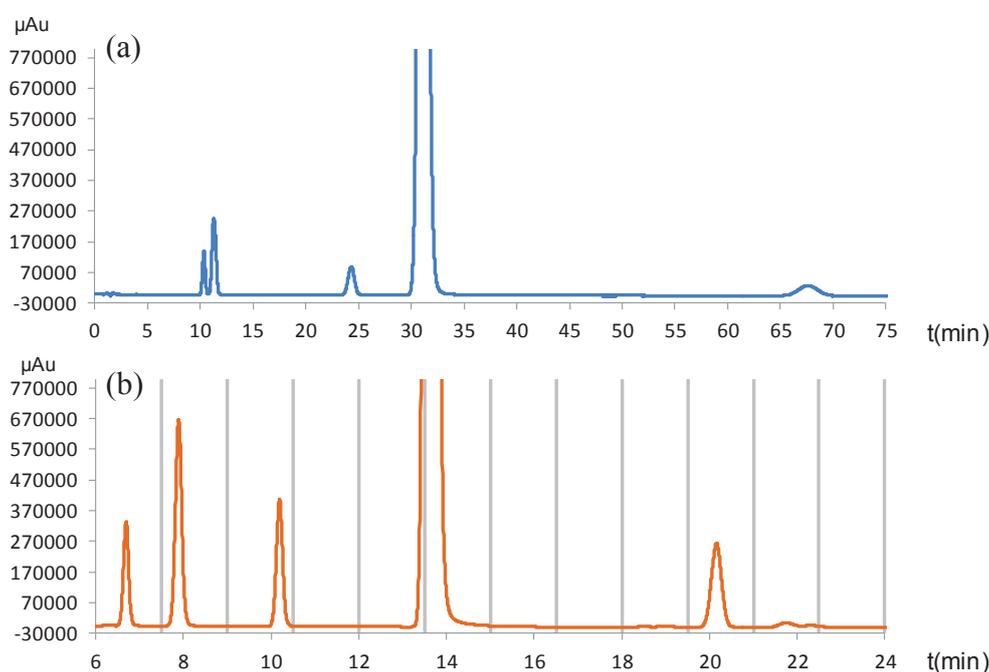


Fig. VI- 6 : Séparations du mélange en isocratique et gradient. Conditions : colonne Lichrospher RP Merck (125x4mm, 5 μm) Solvant A : eau/ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2,5 ; solvant B : ACN ; 0.7 mL/min ; 20 μL injectés; 50°C ; 230 nm (a) Conditions Servier : Isocratique 25% ACN. (b) Nouvelles conditions : gradient de 25% à 50% ACN en 25 min. Chaque fraction est indiquée en (b) par un trait vertical.

Deux séparations bidimensionnelles ont été effectuées à partir de la D1 présentée en Fig. VI- 6b. Etant donné le diamètre de la colonne de première dimension (4 mm), il est nécessaire de splitter l'éluant en sortie de colonne de première dimension.

L'objectif de séparer les composés Y21517 et Y579, coélus en D1, est atteint pour deux méthodes de D2 différentes comme le montre la Fig. VI- 7. Comme pour le premier projet, l'utilisation d'ammoniac comme additif en seconde dimension conduit à un système plus orthogonal. En effet, l'acétate d'ammonium conduit à un espace de séparation plus diagonalisé (Fig. VI- 7a).

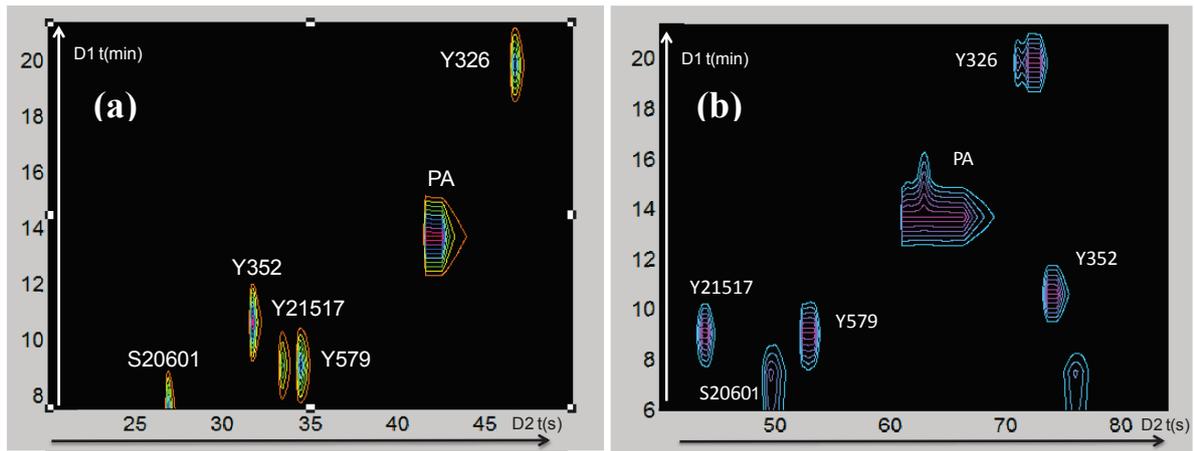


Fig. VI- 7 : Séparations bidimensionnelles du mélange. D1 : Conditions de la Fig. VI- 6b. $z=1/60$ entre D1 et D2. D2 : (a) Acquity BEH C18 (50x2.1 mm, 1.7 μm) 1.3 mL/min. 80°C Eau AA pH 6.8/ACN. 1 à 91% d'ACN en 1.28 min. $t_{\text{cycle}}=1.53\text{min}$. (b) Acquity CSH phenyl-hexyl (50x2.1 mm, 1.7 μm) 1 mL/min. 30°C eau + ammoniac pH10.4/ACN + ammoniac pH10.4. 1 à 61% d'ACN en 1.23 min. $t_{\text{cycle}}=1.53\text{min}$.

Les objectifs fixés pour ces deux projets ont été atteints puisque les deux systèmes sont compatibles avec un détecteur MS et que les composés non séparés en D1 sont séparés en D2.

B- MISE AU POINT ET TRAITEMENT DES DONNEES

I- Optimisation du rapport signal/bruit

Afin de mettre en place le couplage système bidimensionnel / spectromètre de masse, des expériences préalables ont été effectuées avec le spectromètre de masse SQ300MS. Deux configurations du système d'ionisation ont été testées. Pour la première configuration, la probe (système à l'interface liquide/gaz) est peu inclinée par rapport au quadripôle. Pour la deuxième configuration, la probe est très éloignée et inclinée par rapport au quadripôle.

1. Configuration n°1

Les meilleures conditions d'ionisation (débit, utilité d'un split, teneur en ACN, additif de pH) ont été recherchées afin de favoriser la sensibilité en mode RPLC et en HILIC.

Le rapport signal sur bruit obtenu pour des analyses de peptides est donné en Fig. VI- 8 pour une phase mobile contenant de l'acide formique ou de l'acétate d'ammonium et différentes proportions d'acétonitrile. Ce graphique permet de constater que dans cette configuration, la sensibilité augmente lorsque la teneur en acétonitrile augmente, qu'elle est meilleure avec l'acide formique qu'avec l'acétate d'ammonium et qu'elle diminue lorsque le débit augmente de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 1200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Cette diminution est d'autant plus forte que la teneur en acétonitrile est moins importante.

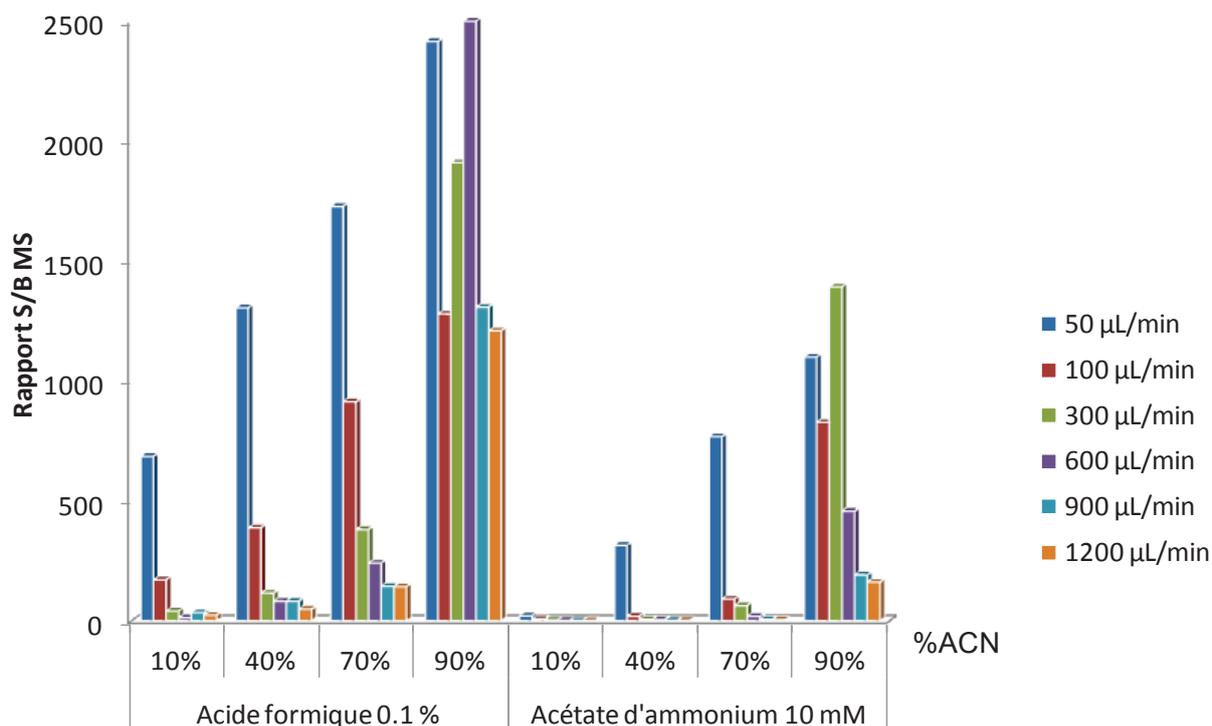


Fig. VI- 8 : Rapport signal sur bruit obtenu dans différentes conditions de phase mobile. Peptide 4 (Tab. II- 9), 5 ppm, sans colonne, isocratique, pulse counting time adapté au débit. SIM positif 556 m/z. Sample per mass=4. Scan per spectrum=1. Fgaz=15L/min.

Dans cette configuration, étant donné les débits importants en D2, il sera impératif d'utiliser un split pour maintenir une bonne sensibilité du signal dans le spectromètre de masse. La Fig. VI- 9 montre les rapports signal sur bruit obtenus avec et sans split pour un même débit entrant dans le spectromètre de masse. Les splits utilisés entre la seconde dimension et le spectromètre de masse ont été choisis de manière à minimiser la dispersion selon l'étude développée dans le chapitre 5-optimisation des systèmes bidimensionnels.

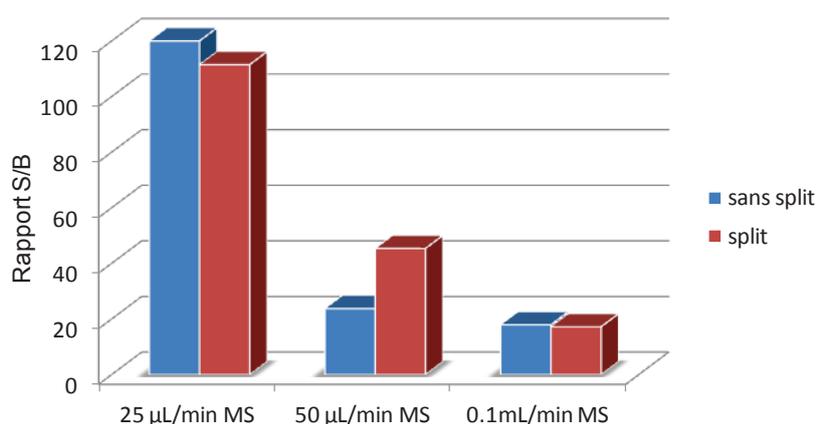


Fig. VI- 9 : Evolution du rapport signal/bruit en fonction du débit entrant dans le spectromètre de masse. Sans colonne. $z=1/4$. Débits entrant dans le spectromètre de masse : 25, 50 et 100 µL/min. Isocratique 30/70 Eau +0.1% acide formique / ACN+0.1% acide formique. Peptide 4 (Tab. II- 9), Paramètres MS : Pulse counting time =200 000 µs. SIM positif 556 m/z. Sample per mass=4. Split réalisé avec le montage traversant le té P-727 (chapitre 5).

Il semble que les résultats soient similaires avec et sans split. De plus, l'utilisation de ce montage avec un rapport de split $z=1/4$ ne génère pas de dispersion additionnelle notable, avec des rapports signal/bruit avec et sans split comparables.

2. Configuration n°2

La deuxième configuration du système d'ionisation du spectromètre de masse SQ300 MS correspond à la probe très inclinée et éloignée de l'entrée dans le spectromètre.

Dans des conditions RPLC (faible teneur en acétonitrile), les meilleurs rapports signaux/bruit sont obtenus à haut débits (Fig. VI- 10). Les mesures obtenues avec un split (en rouge sur la Fig. VI- 10) conduisent à de mauvaises sensibilités par rapport aux mesures obtenues sans split (en bleu sur la Fig. VI- 10). Ceci n'est pas lié à la dispersion générée par le té puisque le rapport signal/bruit obtenu sans split à 0.3 mL/min et avec split à 1 mL/min (conduisant à un débit splitté de 0.3 mL/min) est similaire. Cette configuration du système d'ionisation favorise la sensibilité pour les débits élevés. Ceci est en contradiction totale avec la première configuration. Le positionnement de la probe a donc un impact très important sur l'ionisation des composés. En RPLC, l'intégralité de la phase mobile sortant de la colonne de seconde dimension peut donc être introduite dans le spectromètre de masse.

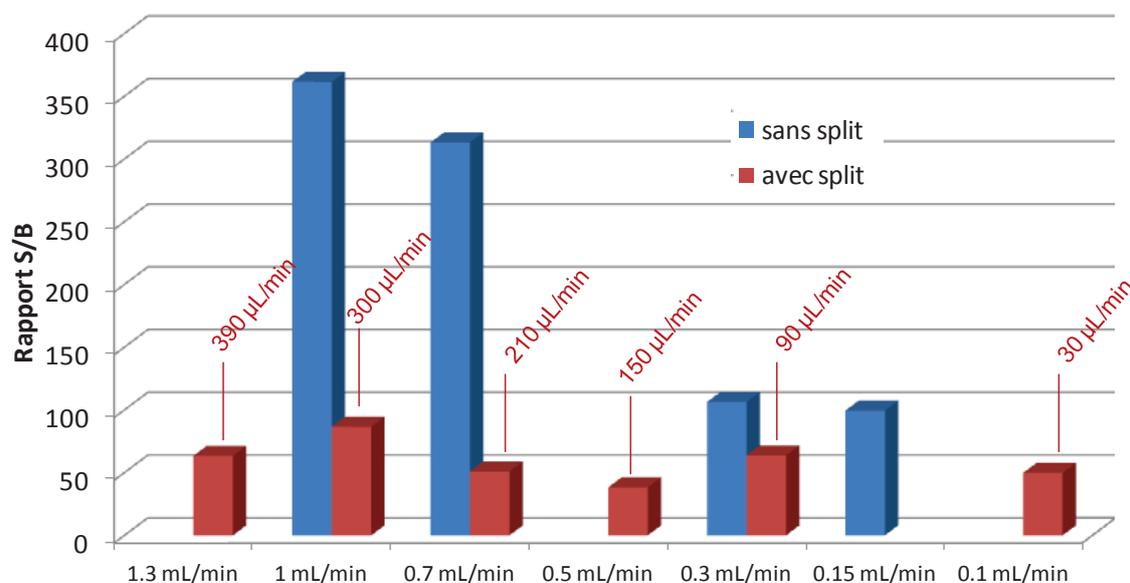


Fig. VI- 10 : Evolution du rapport signal sur bruit en fonction du débit. Peptide 8 (Tab. II- 9). Colonne Acquity CSH C18 50x2.1, 1.7µm. 30°C. Eau +0.1 % acide formique /ACN + 0.1 % acide formique. Gradient de 1 à 65% ACN de pente normalisée 5%. $V_{inj}=1\mu L$. Conditions MS : Scan de 350 à 1750 m/z ESI +. Pulse counting time 50 µs. Sample per mass=4. Drying gas 300°C. 15 L/min. En rouge : $z=1/3.3$ (25 cm 50 µm tube ❶ vers MS et 1m 100 µm tube ❷ poubelle).

En conditions HILIC (haute teneur en acétonitrile), des injections successives de peptide ont été réalisées en augmentant le débit. D'après la Fig. VI- 11 correspondante, l'intensité du signal atteint un maximum pour le débit de 1.3mL/min et diminue légèrement pour des débits plus élevés (bruit constant). De bien meilleures sensibilités étant obtenues pour des débits supérieurs à 1mL/min en HILIC, il n'est donc pas utile de splitter le débit de seconde dimension en HILIC.

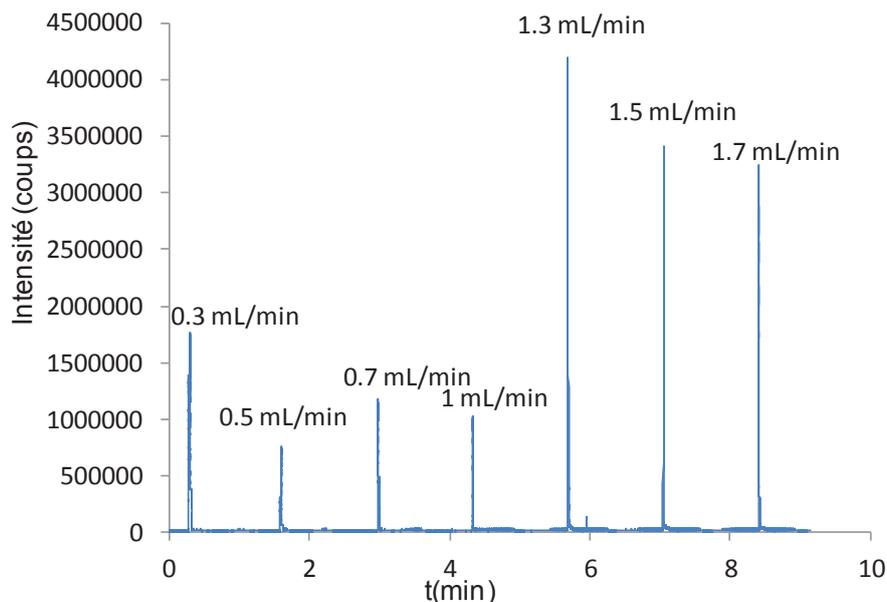


Fig. VI- 11 : Analyses LC-MS successives de peptide 4 (Tab. II- 9), en changeant le débit. Sans colonne. 30°C. Conditions type HILIC. Eau AA 10 mM/ACN. Gradient de 85 à 50% ACN en 0.525 min. Vinj=1µL. Conditions MS : 1 SIM avec pct=10000 µs, spm=4 15 L/min 300 °C.

Ainsi, il semble possible de coupler directement les systèmes LCxLC et MS avec une seconde dimension HILIC ou RPLC. Pour vérifier que la sensibilité ne chute pas au cours d'une même analyse bidimensionnelle, une séquence d'analyses identiques a été programmée dans des conditions de D2. On peut remarquer sur la Fig. VI- 12 que les chromatogrammes correspondants sont parfaitement superposables du début à la fin de la séquence ce qui montre que, malgré le débit élevé, il n'y a pas de perte de sensibilité pouvant provenir d'une accumulation de solvant dans la source.

Cette configuration est donc particulièrement intéressante puisque la sensibilité est maintenue même avec des débits importants. Le montage est simplifié puisqu'il n'est pas nécessaire d'ajouter un split entre la seconde dimension LCxLC et le spectromètre de masse.

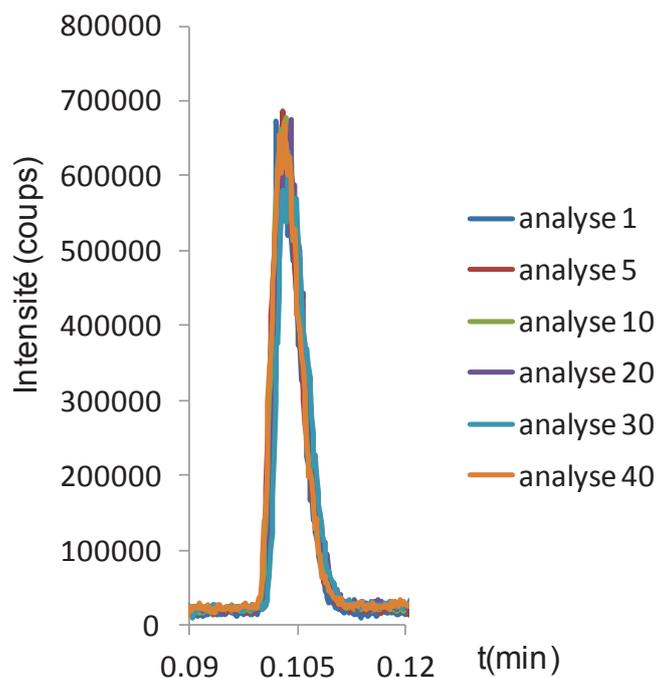


Fig. VI- 12: Superposition d’analyses LC-MS du peptide 4 (Tab. II- 9). Mêmes conditions que la Fig. VI- 11. F=1.7mL/min.

Les mêmes niveaux de sensibilité ont été obtenus pour les deux configurations. La configuration n°2 est la configuration avec laquelle toutes les analyses LCxLC-MS (simple quadripôle) ont été effectuées. Les conclusions de la configuration n°1 ont été utilisées pour les analyses LCxLC-(TOF)-MS car ce système TOF n’est utilisable qu’en deçà de 800µL/min.

II- Traitement des données

Le processus de traitement du signal en MS est plus complexe que le traitement du signal en UV dans le contexte de la LCxLC. En effet, l’utilisation d’un détecteur MS conduit à l’identification des composés par le biais de l’utilisation du mode SIM (suivi d’un ion choisi) ou de l’extraction des ions choisis à posteriori d’une analyse scan (balayage en masse). L’utilisation d’un détecteur UV donne lieu à une matrice contenant 3 variables (intensité, temps de première dimension, temps de seconde dimension). L’utilisation d’un détecteur MS donne lieu à une matrice contenant à 4 variables (intensité, m/z de l’ion, temps de première dimension, temps de seconde dimension). Pour exploiter les données obtenues en LCxLC-MS, il est nécessaire de se ramener à 3 variables. Le processus de traitement des données que nous avons suivi avec le simple quadripôle est détaillé sur la Fig. VI- 13.

Avec le simple quadripôle, les données sont traitées par le biais de 3 logiciels : (1) le logiciel d’acquisition du signal (Aviator) permettant d’exporter les données, (2) Excel permettant d’aboutir à une matrice avec 3 variables, (3) Matlab permettant d’obtenir la représentation finale des données.

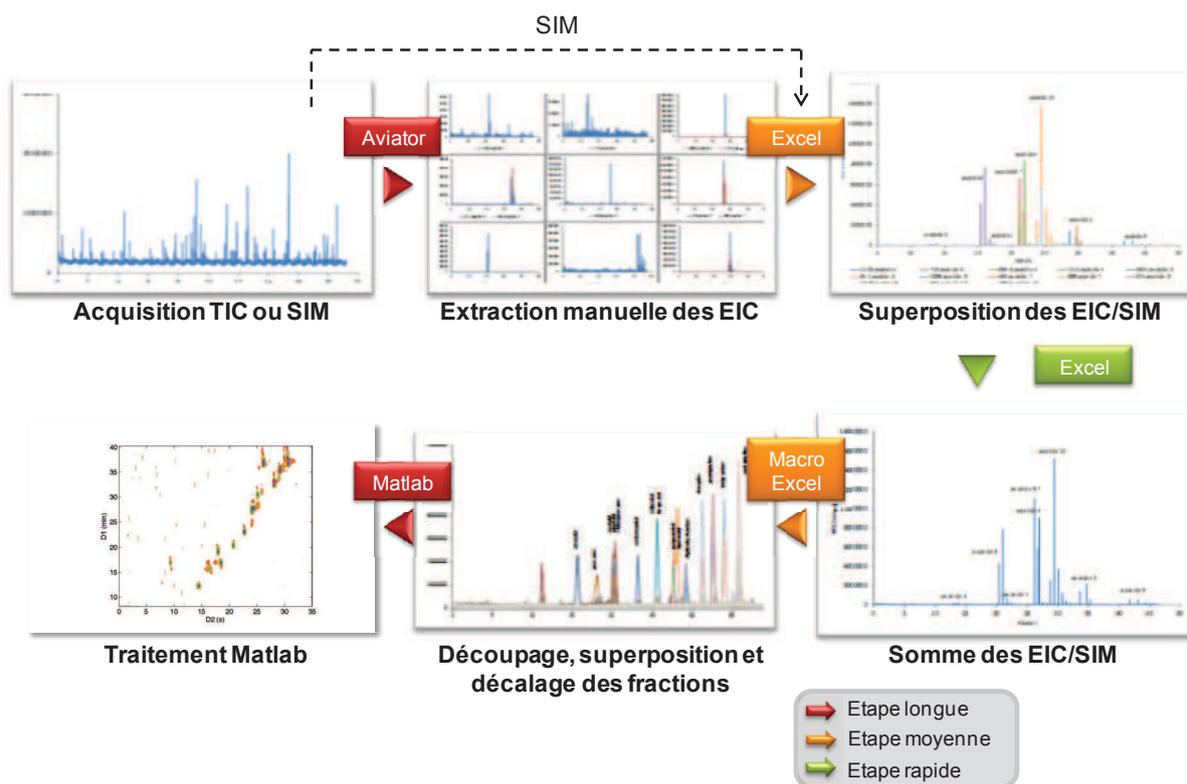


Fig. VI- 13 : Processus de traitement des données d’analyses LCxLC-MS issues du système simple quadripôle SQ300MS

Dans le cas des séparations LCxLC-(TOF)-MS, les données ont été exportées sous forme de matrice à 3 variables (temps de première dimension, m/z, intensité) depuis le logiciel DataAnalysis. Ensuite, les intensités correspondantes aux m/z d’intérêt ont été extraites avant d’être sommées pour retrouver une matrice à 3 variables après coupure des fractions (temps de première dimension, temps de seconde dimension, intensité). Le traitement Matlab reste le même.

C- SEPARATIONS LCxLC-MS DE COMPOSES CHARGES

I- Analyse LCxLC-MS de composés pharmaceutiques

Pour commencer la mise en place d’analyses LCxLC-MS, un mélange simple constitué de 15 principes actifs de médicaments a été constitué (cf chapitre 2). Ces composés sont de petites molécules ionisables. La plage de masse à utiliser en scan pour analyser ce mélange est assez restreinte (225 à 390 m/z) et permet donc d’avoir une fréquence d’acquisition de l’ordre de 20 Hz. La teneur de chaque composé dans le mélange est de 5µg/mL. Le détail des conditions est donné dans le Tab. VI- 1.

	Première dimension	Deuxième dimension
Phase stationnaire	Hypersil Gold	Acquity CSH C18
Dimensions de colonne	50mm x 1mm; 3 μ m	50mm x 2.1mm; 1.7 μ m
Phase mobile	A: H ₂ O+10mM acétate d'ammonium	A : H ₂ O + 0.1 % acide formique
	B : ACN	B : ACN + 0.1 % acide formique
Conditions de gradient	1% to 41%B en 30min	1% to 41%B en 0.32min
Pente normalisée de gradient	1.6	10.9
Température	30°C	80°C
Débit	20 μ L/min	1200 μ L/min
Vinj/V ₀ x100	4%	13%
Nombre d'analyses	1	63
Temps d'échantillonnage / Taux d'échantillonnage	0.67min / 1.1	
Conditions MS	Scan de 225 à 390 m/z. ESI +. Pulse counting time =50 μ s. Sample per mass =4. 15L/min N ₂ . 350 °C.	

Tab. VI- 1 : Conditions d'analyses RPLCxRPLC-MS pour l'analyse des 15 principes actifs.

La séparation RPLCxRPLC obtenue est présentée en Fig. VI- 14 à partir des données obtenues en UV et en spectrométrie de masse. Pour une teneur de 5 μ g/mL de chaque composé, le détecteur UV n'est pas adapté (Fig. VI- 14a). En effet, l'intensité du signal est relativement faible par rapport à la dérive de la ligne de base due au gradient et à l'absorbance de l'acide formique à 220 nm et par rapport au bruit de fond. En spectrométrie de masse, l'utilisation du gradient ne génère pas de dérive du signal et très peu de bruit de fond. Le rapport signal/bruit est excellent pour ces faibles concentrations (Fig. VI- 14b). Par ailleurs, la séparation de ces composés en RPLCxRPLC est assez diagonale mais les paires qui n'étaient pas séparées en D1 sont séparées en D2.

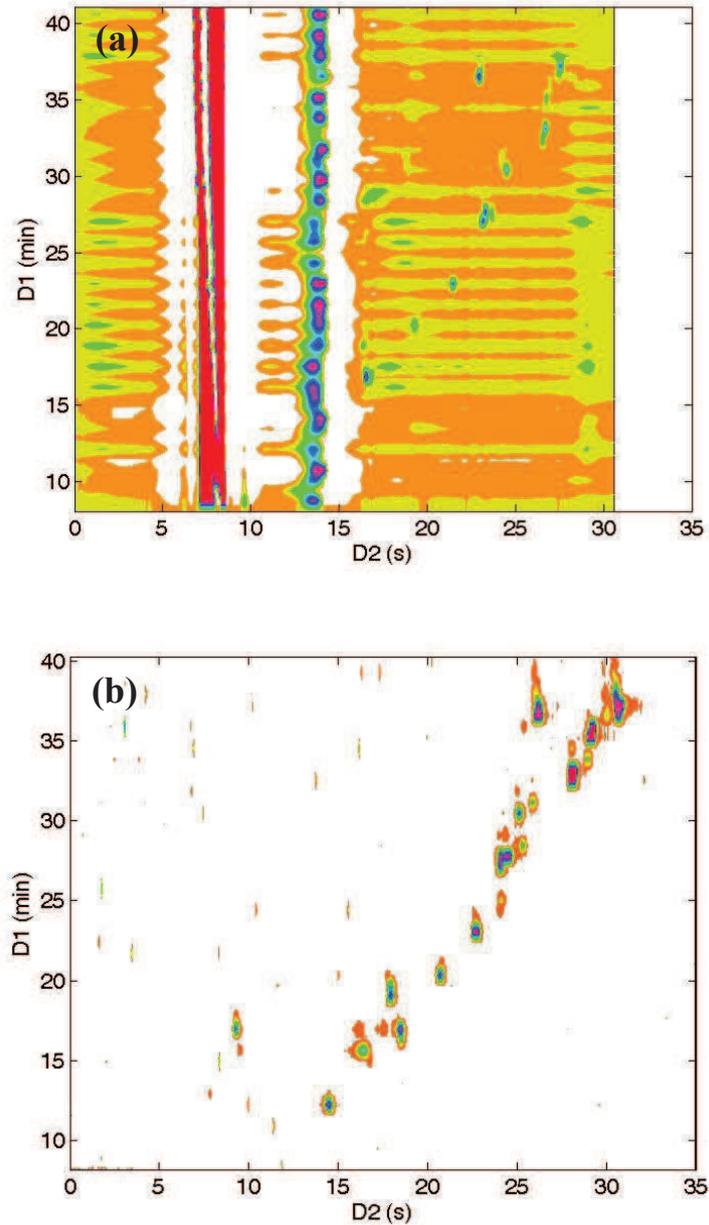


Fig. VI- 14 : Séparation RPLCxRPLC-MS d'un mélange contenant 15 principes actifs de médicaments. Les données représentées sont issues en (a) détection UV 220 nm, (b) détection MS (somme des masses extraites). Voir le Tab. VI- 1 pour les conditions et le chapitre 2 pour les composés.

Cette étude nous a permis de tester la faisabilité du couplage LCxLC-MS sur un mélange simple en mode scan et sur une plage de masse restreinte. Cette analyse LCxLC a aussi démontré l'intérêt du couplage avec la spectrométrie de masse d'un point de vue limite de détection et identification des composés.

II- Mise en place d'analyses LCxLC-MS adaptées à la séparation de peptides

1. Analyse LCxLC-MS de 10 peptides en scan

Le mélange de 10 peptides tests (Tab. II- 9) a été analysé par LCxLC-MS avant d'envisager la séparation de mélanges peptidiques plus complexes (digestion de protéines). Les conditions de la séparation LCxLC-MS sont données dans le Tab. VI- 2.

	Première dimension	Deuxième dimension
Phase stationnaire	Hypersil Gold	Acquity CSH C18
Dimensions de colonne	50mm x 1mm; 3 μ m	50mm x 2.1mm; 1.7 μ m
Phase mobile	A: H ₂ O+10mM acétate d'ammonium	A : H ₂ O + 0.1 % acide formique
	B : ACN	B : ACN + 0.1 % acide formique
Conditions de gradient	1% to 41%B en 47.1min	1% to 41%B en 0.31min
Pente normalisée de gradient	1.0	11.24
Température	30°C	80°C
Débit	20 μ L/min	1200 μ L/min
Vinj/V ₀ x100	4%	14%
Nombre d'analyses	1	84
Temps d'échantillonnage / Taux d'échantillonnage	0.71min / 0.5	
Conditions MS	Scan de 350 à 1700 m/z. ESI+. Pulse counting time 50 μ s. Sample per mass 4. 15L/min N ₂ . 350 °C.	

Tab. VI- 2 : Conditions d'analyses RPLCxRPLC-MS pour l'analyse des 10 peptides (Tab. II- 9)

La superposition des expériences réalisées en D2 de l'analyse RPLCxRPLC-MS (somme des masses extraites) est représentée en Fig. VI- 15. Le zoom sur un des pics montre que 4 points seulement définissent les pics (larges de 1s environ). En effet, contrairement à l'échantillon des 15 principes actifs pour lesquels la gamme de masse était restreinte, il faut balayer une gamme de masse large de 1350 m/z pour l'analyse de ce mélange peptidique. Avec un balayage de 5000 unités de masse par seconde, l'acquisition est de seulement 4 points par seconde. L'utilisation du mode scan avec le système SQ300MS sur une telle plage de masse ne permet donc pas d'obtenir suffisamment de points par pic chromatographique.

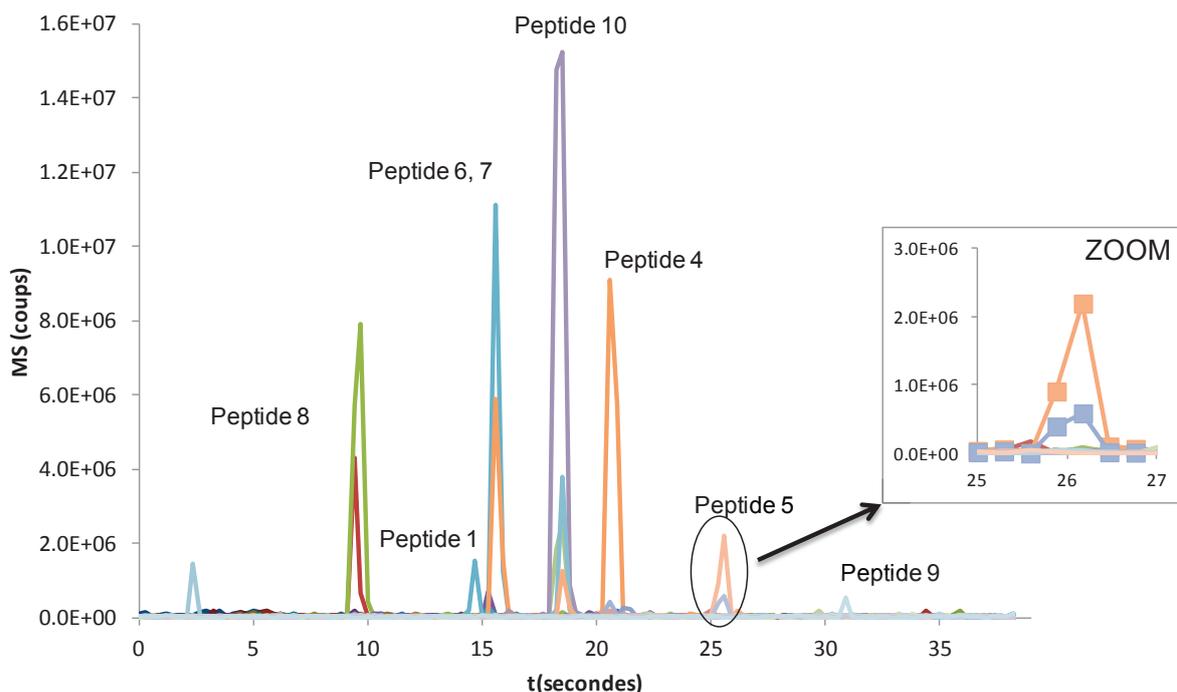


Fig. VI- 15 : Superposition des fractions issues de la somme des masses extraites du scan (EIC) pour la séparation LCxLC-MS du mélange de 10 peptides. Voir Tab. VI- 2 pour les conditions.

Pour obtenir suffisamment de points, il faut réaliser les analyses en mode SIM (suivi d'un ion défini). Néanmoins, le mode SIM nécessite la connaissance préalable des ions à suivre. Un problème se pose alors : Quel est le nombre maximal de SIM qu'il est possible de suivre en continu avec une fréquence d'acquisition suffisante sans que la sensibilité ne soit affectée ?

2. Etude du nombre de SIM à suivre

Une étude a donc été menée pour connaître la limite maximale du nombre de SIM qui peuvent être suivis sans perte de sensibilité et avec une fréquence de l'ordre de 15-20 Hz. L'augmentation de la fréquence est modulée en diminuant le paramètre « pulse counting time : pct » (temps de comptage pour un ion).

La Fig. VI- 16 présente les pics superposés du nadolol obtenus en MS, mode SIM avec des acquisitions comportant un balayage sur 5 à 50 SIM. On constate que pour un « pulse counting time » donné, l'intensité du signal ne diminue pas (ou très peu) lorsque le nombre de SIM augmente et que le bruit reste le même. Ainsi, le rapport signal/bruit est indépendant du nombre de SIM enregistré jusqu'à 50 SIM. Par ailleurs, lorsque le paramètre pct varie, la sensibilité ne semble pas varier.

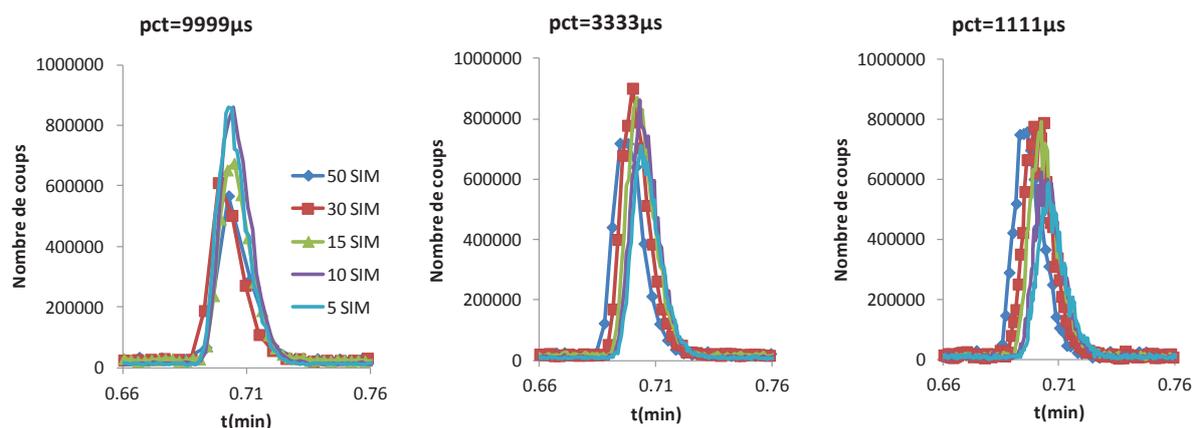


Fig. VI- 16 : Superposition de pics de nadolol lors de la variation du nombre de SIM par acquisition selon le paramètre pulse counting time. Colonne Acquity CSH (50x2.1 mm 1.7 µm). F= 0.5 mL/min. Eau + 0.1 % acide formique / ACN + 0.1 % acide formique. Gradient de 1 à 60 % en ACN. 30 °C. tg=1.23 min. s=10%. Mélange de médicaments à 0.25 ppm. SIM compris entre 200 et 2000. MS : SIM. pct variable, spm=4, 15 L/min, 300°C.

Ainsi, il est possible de diminuer le paramètre « pulse counting time » afin d’augmenter la fréquence d’acquisition sans perte de sensibilité. Des fréquences de l’ordre de 15 à 20 Hz ont été mesurées pour des acquisitions de 5 SIM (pct=9999 µs), 10-15 SIM (pct=3333 µs) et 30 SIM (pct=1111 µs). Ces fréquences sont reportées dans le Tab. VI- 3.

Nombre de SIM	9999 µs	3333 µs	1111 µs
1	98.5	289.4	816.7
2	33.0	59.0	80.0
5	14.6	28.5	41.9
10	8.8	21.1	40.2
15	6.0	15.0	30.4
30	3.1	7.9	17.0
50	1.9	4.9	10.7

Tab. VI- 3 : Fréquence d’acquisition mesurée selon le nombre de SIM et la valeur de « pulse counting time »

Les SIM ne s’enchaînent pas directement les uns après les autres. Le spectromètre passe un temps, que l’on ne peut pas contrôler, entre chaque SIM. Ce temps est réduit lorsque les masses sont classées dans l’ordre croissant.

L’analyse de mélanges peptidiques par LCxLC-MS avec un simple quadripôle est possible en SIM bien qu’impossible en Scan. Ainsi, l’analyse ciblée de peptides peut être envisagée en LCxLC-MS avec 30 SIM et un simple quadripôle du type SQ-300MS.

III- Intérêt de la LCxLC-MS par rapport à la LC-MS

L’utilisation d’un spectromètre de masse permet de détecter et d’identifier des composés coélus. Par contre, un phénomène de suppression d’ionisation peut intervenir lorsque plusieurs composés entrent dans la source du spectromètre de masse en même temps. L’augmentation de la capacité de pic en LCxLC par rapport à la LC-1D permet de mieux

séparer l'échantillon à analyser et peut donc réduire ces effets de suppression d'ionisation. Une étude a été effectuée pour démontrer cet effet. Six analyses différentes ont ainsi été comparées : celles d'un peptide seul dans des conditions de gradient d'élution rapide ($s=11\%$) (1) et lent ($s=1.6\%$) (2) et dans des conditions LCxLC (3) ; celles du même peptide ajouté à une digestion tryptique de 3 protéines et dans ces trois mêmes conditions de séparations (4, 5 et 6). Les 6 chromatogrammes obtenus (Fig. VI- 17) permettent de comparer les effets de suppressions potentiels en LC-1D par rapport à la LCxLC. De bonnes sensibilités sont obtenues en LC-1D rapide et en LCxLC. Par contre, la LC-1D lente conduit à de très faibles sensibilités.

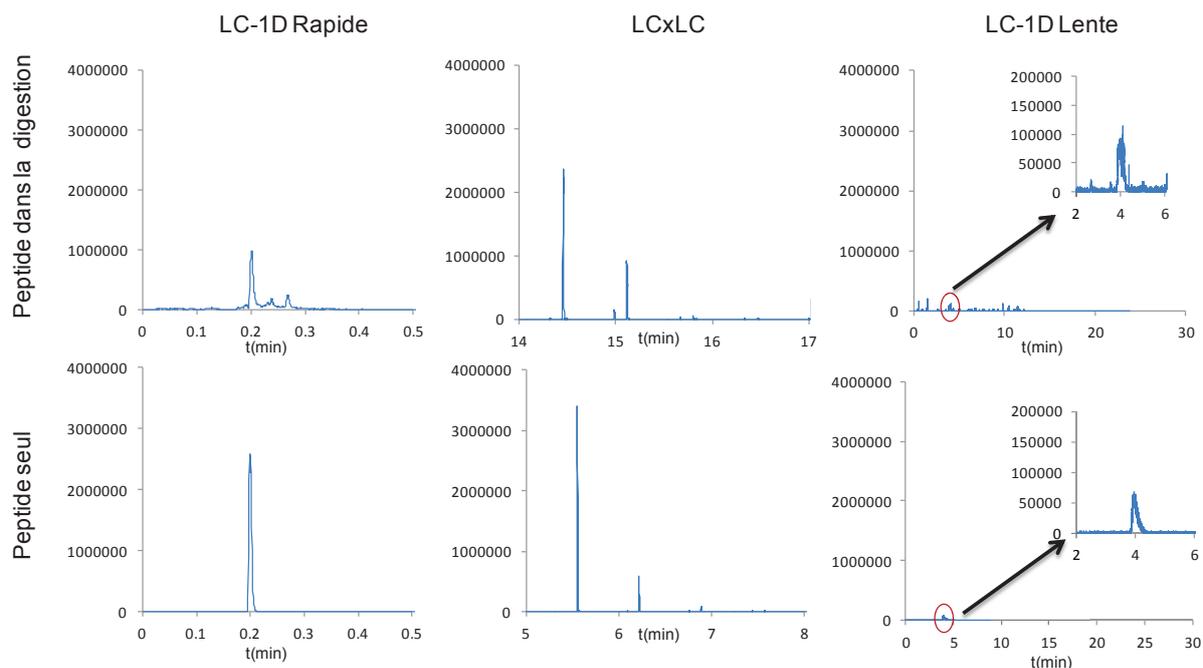


Fig. VI- 17 : Comparaison des signaux MS obtenus dans les 3 conditions d'analyse pour le peptide 8 seul (Tab. II- 9) et le peptide 8 dilué dans la digestion. 1 μ L injecté. Conditions MS : 10 SIM simultanés, $pct=3000\mu s$, $spm=4$, 15 L/min, 300°C. Conditions LC : (1) LC-1D rapide : Colonne Acquity CSH C18 50x2.1 mm, 1.7 μm , $s=11.05\%$, $F=1.2$ mL/min, de 1 à 41% ACN en 0.313 min, 80°C, Eau+0.1% acide formique / ACN +0.1 % acide formique, (2) LC-1D lente : Colonne Acquity CSH C18 100x2.1 mm, 1.7 μm , $s=0.9\%$, $F=0.3$ mL/min, de 1 à 41% d'ACN en 30 min, 30°C, Eau+0.1% acide formique / ACN +0.1 % acide formique. (3) LCxLC : D1 Colonne Hypersil Gold 50x1mm, 3 μm , $s=1.57\%$, $F=20$ μ L/min, de 1 à 41% d'ACN en 30 min, 30°C, Eau 10 mM AA / ACN et D2 identique à LC-1D rapide.

Le rapport signal/bruit du peptide dans la digestion sur le rapport signal/bruit du peptide seul permet de connaître la réponse restante et donc la perte de sensibilité liée à la suppression d'ionisation (Fig. VI- 18). La Fig. VI- 18a montre une perte de signal importante pour la séparation rapide, faible pour la séparation lente et très faible pour la LCxLC qui offre donc le moins de suppression d'ionisation.

Il faut noter que la séparation LC-1D lente conduit à peu de suppression d'ionisation mais ne procure que très peu de sensibilité comme le montre les Fig. VI- 17 et Fig. VI- 18b. Cette constatation est étonnante car les rapports des hauteurs sont sensiblement identiques compte tenu des facteurs de dilution et ne peut être expliquée que par (1) les faibles rapports

S/B obtenus à faible débit dans cette configuration (configuration 2, section B), (2) le volume injecté en 1D-lente est deux fois plus faible que pour les autres analyses étant donné les volumes des colonnes.

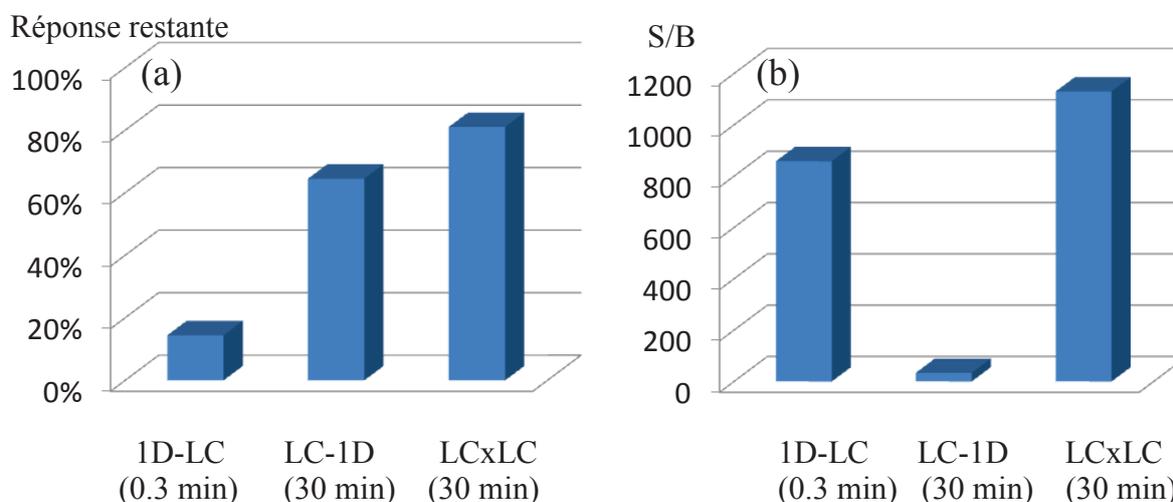


Fig. VI- 18 : (a) Comparaison des rapports Signal/bruit du peptide dans la digestion et Signal/bruit du peptide seul. (b) Rapport signal/bruit du peptide seul dans les trois conditions.

La séparation LCxLC-MS permet à la fois d'obtenir une bonne sensibilité et de réduire les effets de suppression. Cette étude a donc permis de démontrer l'intérêt de la LCxLC-MS par rapport à la LC-MS.

IV- Analyse RPLCxHILIC-MS de peptides

Suite aux études précédentes, une analyse RPLCxHILIC-MS a été réalisée pour la digestion tryptique des 3 protéines. Le chromatogramme obtenu en D1 est présentée en Fig. VI- 19.

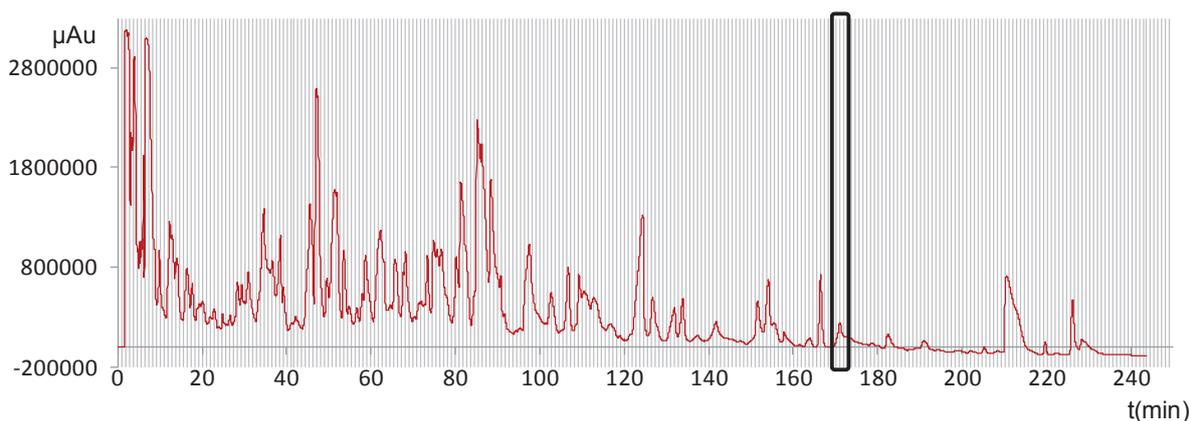


Fig. VI- 19 : Chromatogramme de D1 de la séparation RPLCxHILIC-MS de la digestion du mélange de 3 protéines dont les conditions sont données dans le Tab. VI- 4. Détection UV 210 nm.

Les conditions de l'analyse bidimensionnelles sont précisées dans le Tab. VI- 4.

	Première dimension	Deuxième dimension
Phase stationnaire	Ascentis express C18	Nucléoshell HILIC
Dimensions de colonne	100mm x 2.1mm; 5µm	100mm x 2mm; 2.7µm
Phase mobile	A: H ₂ O+10mM acétate d'ammonium	A : ACN
	B : ACN	B : H ₂ O+10mM acétate d'ammonium
Conditions de gradient	1% to 31%B en 300min	15% to 55%B en 0.503min
Pente normalisée de gradient	0.17	9
Température	30°C	60°C
Débit	100µL/min	1500µL/min
Débit après le split	10 µL/min	Pas de split
Vinj/V ₀ x100	24%	5%
Nombre d'analyses	1	334
Temps d'échantillonnage / Taux d'échantillonnage	0.91min / 2.5	
Conditions MS	Acquisition de 30 SIM simultanés. ESI+. Pulse counting time =1111µs. Sample per mass =4. 15L/min N ₂ . 300 °C.	

Tab. VI- 4 : Conditions d'analyse RPLCxHILIC-MS pour la digestion tryptique de 3 protéines (protocole de digestion décrit dans le chapitre 2)

Sur la Fig. VI- 19, chaque ligne verticale indique une nouvelle fraction envoyée vers la seconde dimension. La superposition des 3 fractions encadrées en noir sur la Fig. VI- 19 est présentée en Fig. VI- 20. On constate que le signal UV obtenu pour ces trois fractions ne permet pas de visualiser le pic alors que le signal obtenu par le spectromètre de masse permet de détecter et d'identifier le peptide. Le signal MS représenté est la somme des signaux enregistré pour 2 ions, le peptide étant à la fois sous la forme simplement et doublement chargé.

Ainsi, cette analyse RPLCxHILIC-MS a permis de montrer l'intérêt du couplage LCxLC-MS et du traitement de données qui l'accompagne. La dérive de la ligne de base observée en UV à 210 nm en D2, ainsi que la faible réponse de l'UV aux peptides empêchent la détection de certains composés. Au contraire, en MS, aucune dérive n'est observée et une bien meilleure sensibilité permet la détection des composés faiblement concentrés. L'analyse ciblée de peptides a pu ainsi être réalisée en RPLCxHILIC-MS avec l'utilisation d'un spectromètre de masse de type simple quadripôle et d'un split entre la première et la seconde dimension.

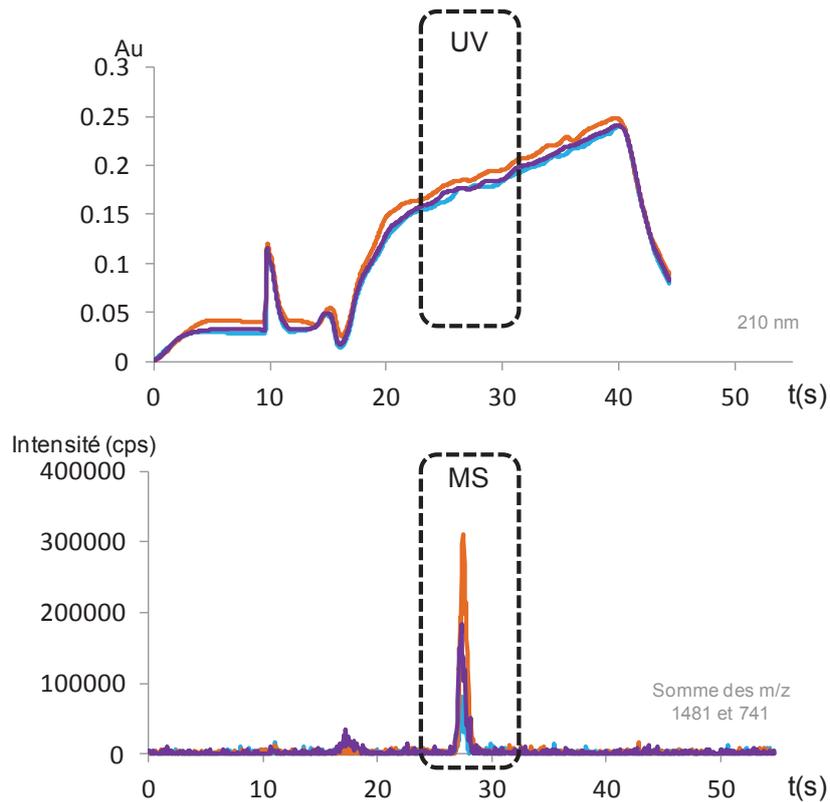


Fig. VI- 20 : Superposition des 3 fractions issues de la portion de première dimension encadrée sur la Fig. VI- 19. Le chromatogramme du haut a été acquis à 210 nm (UV) et celui du bas est la somme des signaux SIM acquis à 1481 et 741 m/z. Peptide de BSA de séquence LGGEYGFQNALIVR.

Le chromatogramme 3D du pic de peptide obtenu lors de l'analyse bidimensionnelle est représenté en Fig. VI- 21.

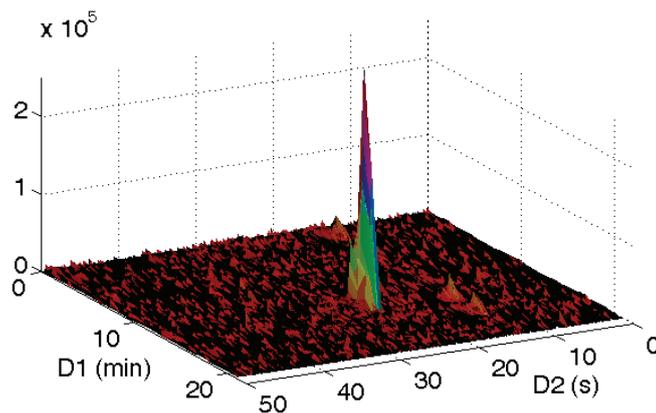


Fig. VI- 21 : Chromatogramme LCxLC-MS obtenu à partir de la somme des signaux SIM acquis à 1481 et 741 m/z. Peptide de BSA de séquence LGGEYGFQNALIVR.

V- Analyses LCxLC-(TOF)-MS de peptides dans l'urine

L'analyse de peptides dans l'urine est nécessaire pour la détection voire la quantification de protéines dans l'urine. Ce type d'analyse se fait généralement par LC-MS, LC-MS/MS ou par ELISA [2,3]. L'utilisation de la LCxLC-MS peut être attractive car l'augmentation de la capacité de pics générée par le système bidimensionnel permet de diminuer le nombre de pics coélus et donc le nombre de peptides entrant en même temps dans la source d'ionisation. Ainsi, comme dans la partie précédente, la LCxLC-MS peut permettre de diminuer les effets de suppression d'ionisation.

Deux analyses RPLCxRPLC-MS ont été mises en place pour séparer les peptides issus d'une digestion de HSA, cette dernière ayant été solubilisée dans l'eau et dans l'urine. Les conditions sont reportées dans le Tab. VI- 5. Les séparations LCxLC-MS ont été effectuées avec le système bidimensionnel Agilent (système n°3) couplé à un spectromètre hybride simple quadripôle-temps de vol. Seule la partie TOF du spectromètre de masse a été utilisée. L'acquisition du signal a été effectuée à 17 Hz pour avoir 15 mesures par pic chromatographique. Étant donné la faible sensibilité du système MS à cette fréquence d'acquisition, l'échantillon analysé était très concentré en protéine (1.5mg/mL).

	Première dimension	Deuxième dimension
Phase stationnaire	Hypersil Gold	Acquity CSH C18
Dimensions de colonne	50mm x 1mm; 3µm	50mm x 2.1mm; 1.7µm
Phase mobile	A: H ₂ O+10mM acétate d'ammonium	A : H ₂ O + 0.1 % acide formique
	B : ACN	B : ACN + 0.1 % acide formique
Conditions de gradient	1% to 41%B en 60min	1% to 41%B en 0.28min
Pente normalisée de gradient	0.31	10.3
Température	30°C	70°C
Débit	50µL/min	1400µL/min
Débit après le split	10 µL/min	700 µL/min
Vinj/V ₀ x100	21%	5%
Nombre d'analyses	1	150
Temps d'échantillonnage / Taux d'échantillonnage	0.48min / 1	

Tab. VI- 5 : Conditions d'analyse RPLCxRPLC-MS avec le système bidimensionnel Agilent couplé à un système MS de type Q-TOF.

Un premier split a été utilisé entre la colonne de D1 et la vanne. Le profil de gradient du système chromatographique de première dimension n'est pas linéaire en dessous de 50µL/min. Pour avoir néanmoins un débit limité en première dimension, un split de rapport 1/5 (passage de 50µL/min à 10 µL/min) a été appliqué. Un second split a été mis en place

entre la colonne de seconde dimension et le spectromètre de masse de manière à envoyer un débit de phase mobile relativement restreint dans le spectromètre de masse pour avoir une bonne sensibilité. Les séparations bidimensionnelles obtenues sont représentées en Fig. VI-22. Etant donné le vieillissement de la colonne de première dimension, un taux d'échantillonnage de 3 a été obtenu à la place de 1 qui avait été initialement prévu (Tab. VI-5).

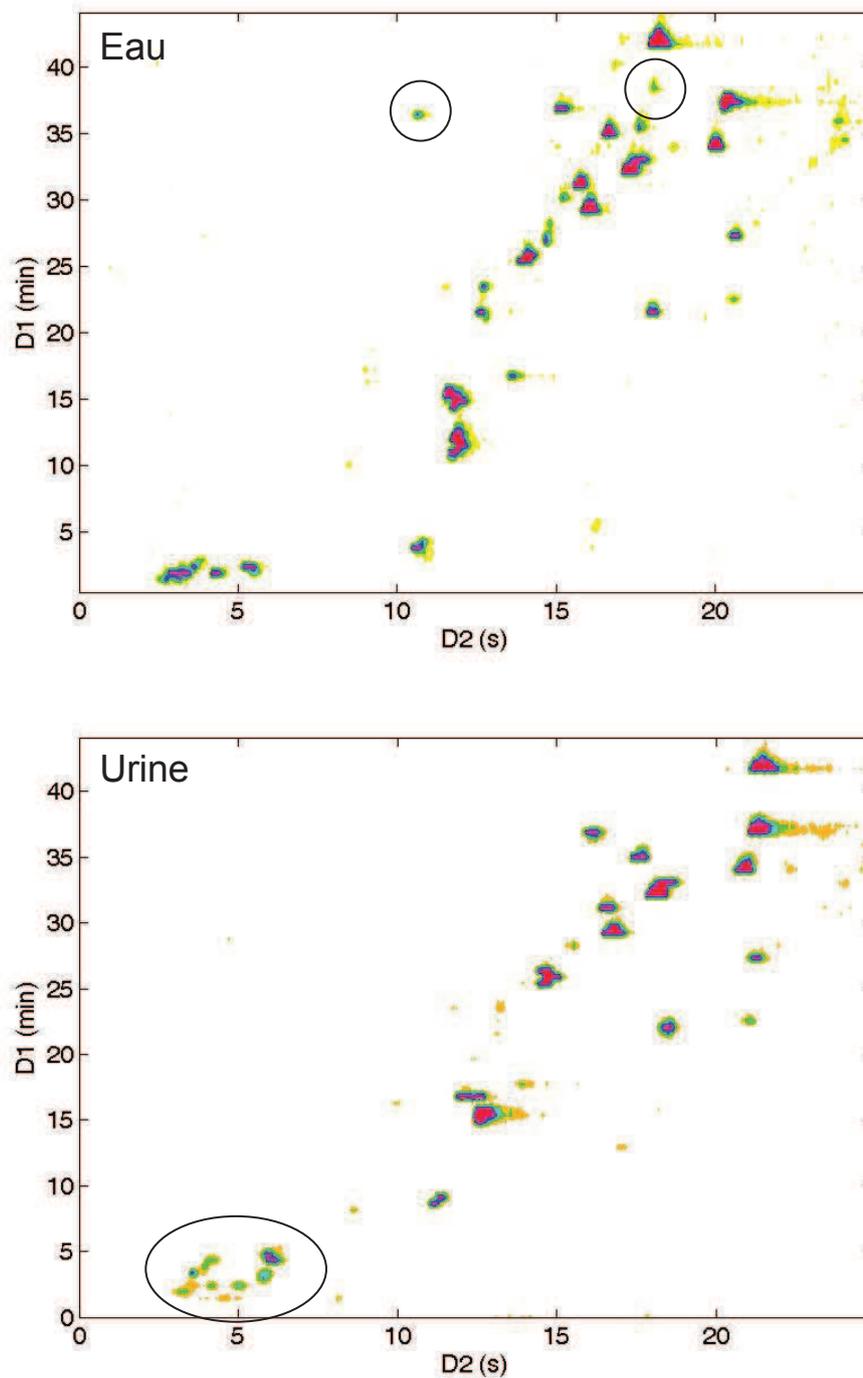


Fig. VI- 22 : Séparation RPLCxRPLC-MS d'une digestion de HSA diluée dans l'eau (haut) et dans l'urine (bas). Les données représentées sont issues de la somme des masses extraites.

Les deux séparations LCxLC-MS (Fig. VI- 22) sont semblables et presque tous les peptides détectés dans la digestion diluée dans l'eau le sont dans celle diluée dans l'urine. Néanmoins, 2 peptides détectés dans l'eau (entourés en noir sur la Fig. VI- 22) ne sont pas détectés dans l'urine et quelques peptides supplémentaires sont observés dans l'urine au début de l'analyse LCxLC. Il est important de préciser que le niveau de concentration de la digestion diluée dans les deux milieux était très élevé pour respecter les niveaux de sensibilité faibles de ce spectromètre de masse à des fréquences élevées. Le couplage du système LCxLC avec MS-TOF de dernière génération devrait permettre d'atteindre de telles fréquences (jusqu'à 100 Hz) tout en conservant une bonne sensibilité.

En bilan de cette section C, le couplage d'un détecteur MS, de type simple quadripôle, à la LCxLC permet d'améliorer la sensibilité par rapport à l'UV. Les mélanges comportant des gammes de masses faibles (molécules pharmaceutiques) peuvent être analysées en scan mais la détection de peptides, sur une gamme plus grande, doit se faire en SIM afin d'obtenir une fréquence d'acquisition suffisante (de l'ordre de 15 Hz). Il a été montré qu'il est possible de suivre 30 SIM et d'obtenir une fréquence de l'ordre de 17 Hz avec notre système. L'intérêt de la LCxLC a été démontré car moins de suppression d'ionisation a été observée par rapport à des systèmes LC-MS unidimensionnels. L'utilisation d'un simple quadripôle a permis la recherche ciblée de peptides alors que l'utilisation d'un TOF a permis la séparation de digestion de HSA dans l'eau et dans l'urine. Les séparations obtenues dans les deux milieux sont similaires.

D- ANALYSES LCxLC-MS RAPIDES DE PEPTIDES

La mise en place de séparations RPLCxRPLC et RPLCxHILIC a démontré dans le chapitre précédent que (1) la LCxLC permet d'augmenter la capacité de pics et donc d'atteindre des capacités de pics non atteignables en LC-1D actuellement, (2) le temps d'analyse en LCxLC est plus faible que le temps d'analyse en LC-1D pour obtenir des capacités de pics similaires. Les séparations présentées dans le chapitre précédent durent approximativement 3 heures et sont donc plutôt longues. Cette étude a pour objectif de connaître la capacité de pics que l'on peut atteindre en LCxLC avec des temps d'analyse courts (de l'ordre de 30 min à 2h).

Des simulations ont été effectuées afin de trouver les meilleures conditions d'analyses bidimensionnelles. Le but est de mettre en place plusieurs séparations LCxLC-MS d'une digestion de 6 protéines (BSA, HSA, cytochrome C, β -caséine, lysozyme et myoglobine) en utilisant en D2 une colonne Kinetex 1.3 μ m qui permet de réaliser des séparations ultra rapides.

I- Recherche des meilleures conditions par simulation

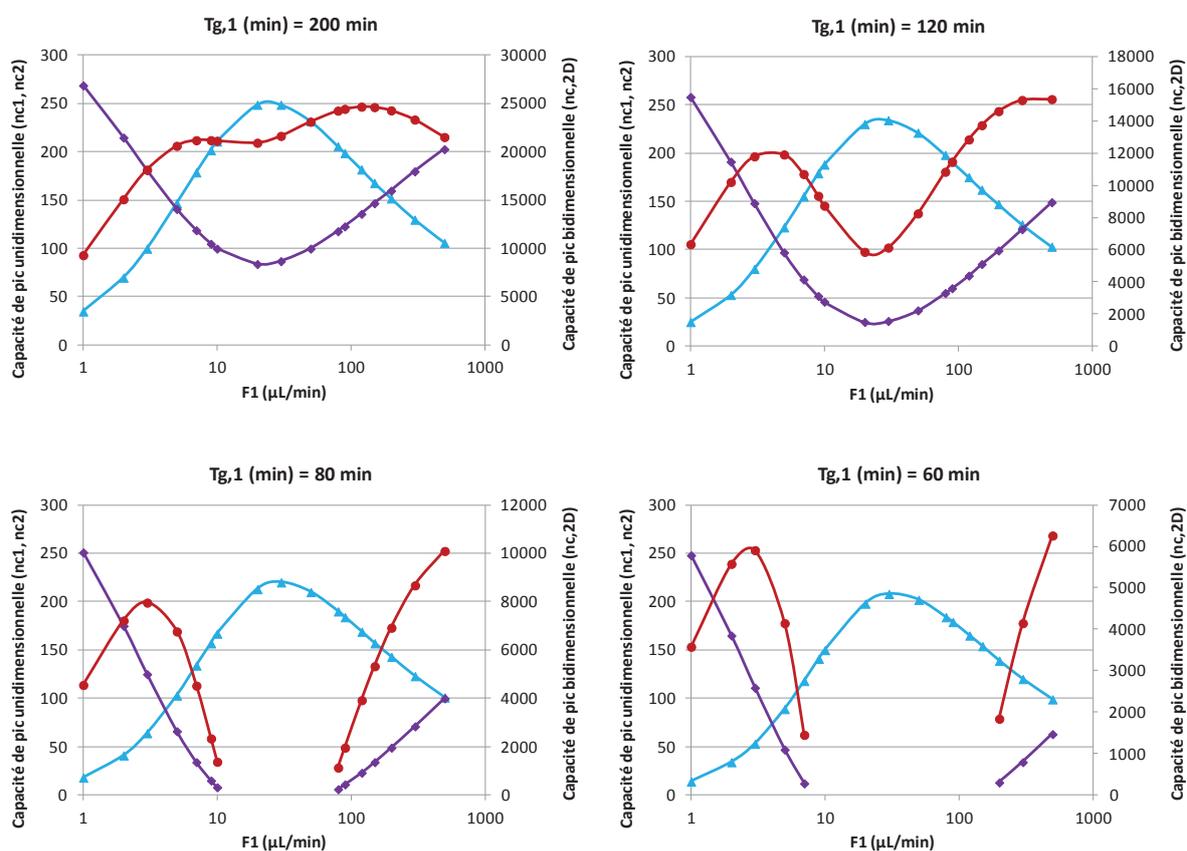
Des simulations ont été faites avec le programme Excel développé au laboratoire pour déterminer les capacités de pics maximum qui peuvent être atteintes dans des temps d'analyse courts. Certaines conditions LCxLC ont été fixées:

(1) En première dimension : un gradient de 1% à 31% d'ACN avec des durées variant de 36 min à 200 min; une colonne C18 de 50x1mm, 3 μ m thermostaté à 30°C et une phase mobile eau acétate d'ammonium 10 mM/ACN.

(2) Un taux d'échantillonnage de 2.5, suffisant pour être dans des conditions de séparation bidimensionnelle totale (« comprehensive »).

(3) En deuxième dimension: une colonne Kinetex C18 30x2.1 mm, 1.3 μ m thermostaté à 90°C; un débit de 1.3 mL/min; un gradient de 1% à 41 % en ACN avec 0.1% d'acide formique dans Eau/ACN. Ces choix de seconde dimension permettent d'avoir des séparations ultra-rapides.

Les capacités de pics de D1 et D2 ont été calculées en fonction du débit de D1 (F_1) pour différents temps de gradient en D1. (Fig. VI- 23). La capacité de pics de D2 (en rouge) est théorique et a été calculée à partir du produit des capacités de pics dans chacune des deux dimensions sans tenir compte de l'occupation réelle de l'espace de séparation.



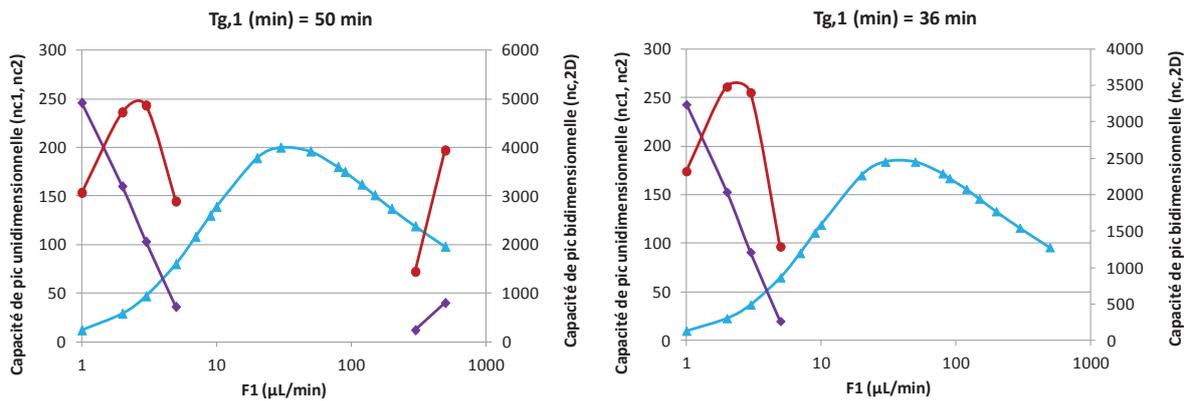


Fig. VI- 23 : Capacité de pics en fonction du débit de première dimension obtenue après simulation d’une analyse LCxLC pour des temps de gradient de première dimension différents. ▲ Capacité de pics obtenue en première dimension (axe des ordonnées à gauche), ◆ Capacité de pics obtenue en seconde dimension (axe des ordonnées à gauche), ● Capacité de pics théorique bidimensionnelle (axe des ordonnées à droite).

L’évolution de la capacité de pic de D1 (en bleu) en fonction du débit de D1 est comparable pour tous les temps de D1. Toute la plage de débit 1 à 500 µL/min pourrait être utilisée en D1 même si les plus grandes capacités de pics de D1 sont obtenues dans la zone proche de l’optimum de la courbe de Van Deemter soit 10-100 µL/min.

Pour la capacité de pics de seconde dimension (courbes violettes sur la Fig. VI- 23), la courbe a une évolution inverse à la précédente (bleu). Les valeurs de capacité de pics en D2 les plus grandes sont obtenues pour les zones de débits 1-5 µL/min et 200-500µL/min pour les temps de gradients de 200 et 120 minutes en D1. Pour des temps de gradients de D1 plus faibles (80, 60 et 50 minutes), la zone de débit de 10-100 µL/min en première dimension est inaccessible ($t_{G,2}$ négatifs) et pour le temps de gradient de D1 de 36 minutes seuls des débits de l’ordre de 1 à 5 µL/min sont envisageables.

Les tracés de la capacité de pics théorique obtenue en bidimensionnelle en fonction du débit de D1 (courbes rouges sur la Fig. VI- 23) passe par deux maximum et un minimum. Deux zones sont d’intérêt (capacité de pics maximale) : 2-5µL/min et au-delà de 100 µL/min (sauf pour $t_{G,1}=36$ min). Néanmoins, l’utilisation de débits très faibles en D1 implique l’utilisation de pentes normalisées très faibles en D2 (0 à 4%) et conduit donc à des conditions à l’injection plutôt défavorables. Pour respecter la contrainte liée au volume injecté dans la D2 et éviter les élargissements de pics, seul le débit de 5µL/min peut être acceptable dans la gamme de faible débit. L’utilisation de débits au-delà de 100 µL/min en D1 n’est intéressante que pour des temps de gradients d’au moins 80 min dans la D1 d’après la Fig. VI- 23. Ces débits plus élevés conduisent à des volumes injectés en D2 très important (50 à 100 µL) mais qui pourraient être acceptables d’après la simulation puisque la limite dans ces conditions est plus favorable. Un exemple est donné dans le Tab. VI- 6 pour des analyses LCxLC de 80 min.

F_1 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	$V_{i,2}$ (μL)	$V_{i,2 \text{ limite}}$ (μL)
120	53	267
150	73	226
200	109	208

Tab. VI- 6 : Exemples de volumes injectés en D2 pour une analyse LCxLC de 80 min.

Les valeurs de capacités de pics théoriques ne sont en aucun cas les capacités de pics attendues pour la séparation bidimensionnelle puisqu'il faut prendre en compte la répartition des pics dans l'espace de séparation. Ceci ne peut pas être prédit avant la séparation bidimensionnelle. Notre objectif étant d'obtenir des séparations bidimensionnelles rapides, nous avons donc choisi d'utiliser les conditions simulées pour $F_1=5\mu\text{L}/\text{min}$ en 50, 60 et 120 minutes.

II- Analyses LCxLC-UV-MS

Trois séparations LCxLC-MS ont été réalisées sur des plages de 50min, 60 min et 120 min. Le système bidimensionnel utilisé était le système n°1 combinant le système HPLC Flexar FX-10, la vanne 10 voies, l'Acquity UPLC et le spectromètre de masse SQ300MS.

Une colonne de 2.1 mm de diamètre interne a été utilisée dans la première dimension et un split a été mis en place avant l'entrée dans la vanne 10 voies. Une colonne de 1 mm de diamètre interne aurait pu être utilisée sans split en première dimension (comme prévu dans la simulation) mais il aurait fallu utiliser des micro-pompes HPLC permettant de pomper de manière fiable $5 \mu\text{L}/\text{min}$. Le débit de D1 a donc été ajusté à $22 \mu\text{L}/\text{min}$ pour cette colonne de 2.1 mm de diamètre interne, ce qui est comparable à un débit de $5 \mu\text{L}/\text{min}$ pour une colonne de 1 mm de diamètre interne.

Dans la simulation précédente, la plage de composition en D1 était de 30% en ACN. Or, après quelques tests de séparations, nous avons dû l'étendre à 50%. En effet, cette digestion de 6 protéines contient beaucoup plus de peptides hydrophobes que la digestion de 3 protéines analysée précédemment. La précédente simulation a pu toutefois être appliquée à l'analyse LCxLC de la digestion sur une plage de 30% ACN seulement (cadres sur la Fig. VI-24). Le pic non retenu contient des composés qui présentent peu d'intérêt : réactifs de la digestion et peptides très hydrophiles qui ne sont pas retenus en RPLC.

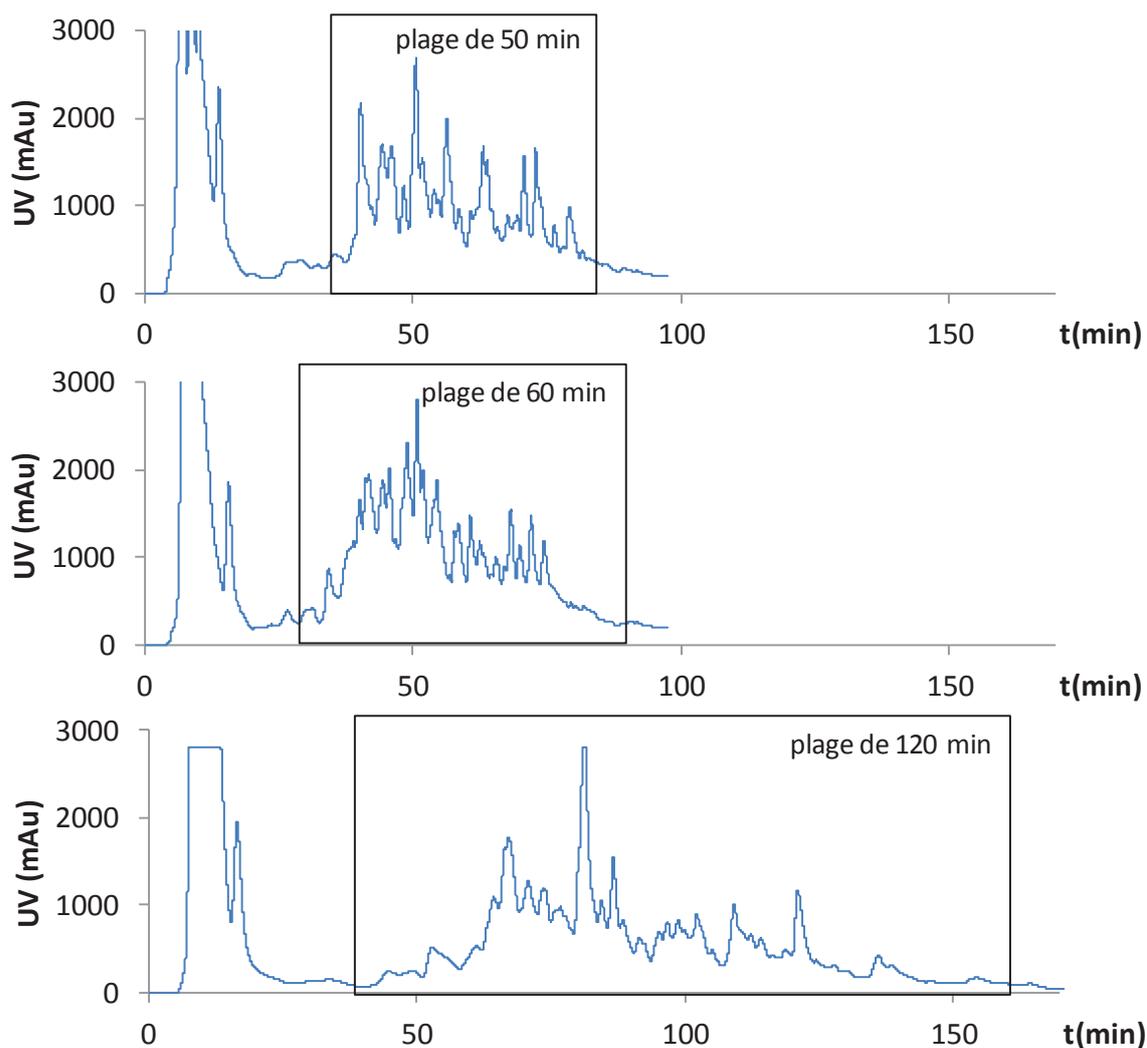
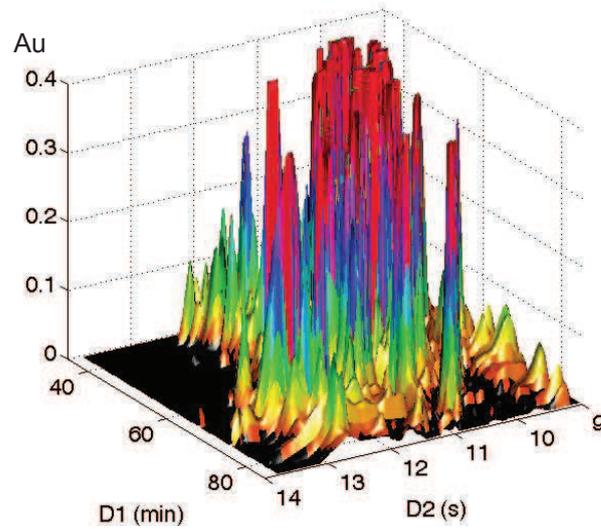


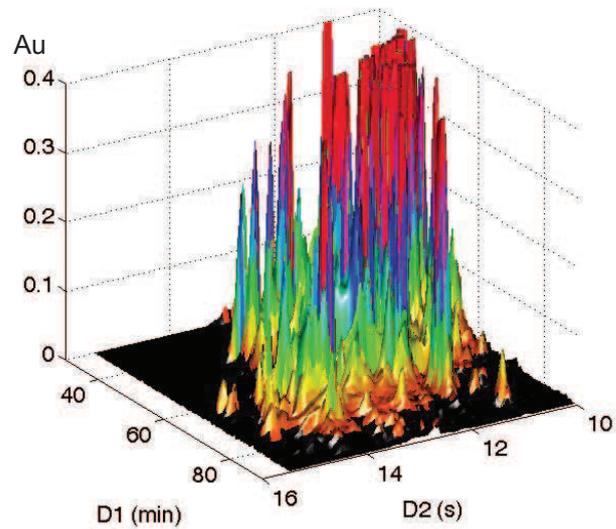
Fig. VI- 24 : Chromatogrammes de D1 des séparations LCxLC-UV-MS de la digestion des 6 protéines. La zone encadrée en noir est la zone qui a été fractionnée et envoyée vers la D2. Eau acétate d’ammonium 10 mM/ACN. 1 à 51% ACN en 83 min (LCxLC de 50 min), 100 min (LCxLC de 60 min) et 200 min (LCxLC de 120 min). 22 μ L/min. 30°C. 10 μ L injecté. UV 210 nm.

Les chromatogrammes 3D des 3 séparations sont montrées sur la Fig. VI- 25 et les conditions correspondantes sont précisées dans le Tab. VI- 7. Pour la séparation LCxLC de 120 minutes, le débit en D2 a été abaissé à 1.1 mL/min car la pression générée par la colonne a augmenté.

(a) Séparation LCxLC
de 50 min



(b) Séparation LCxLC
de 60 min



(c) Séparation LCxLC
de 120 min

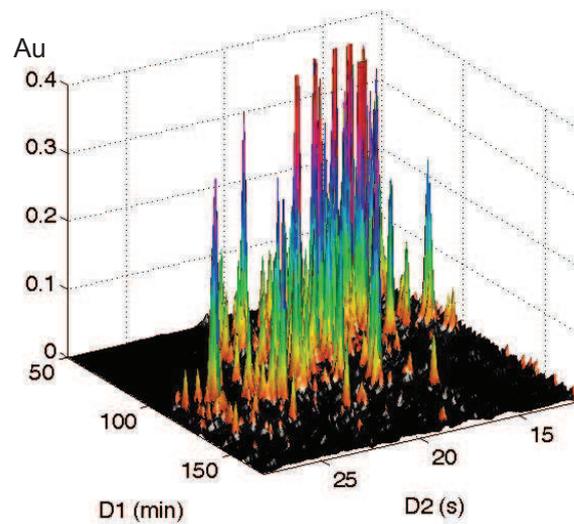


Fig. VI- 25 : Chromatogrammes LCxLC représentant les données UV à 210 nm pour les séparations RPLCxRPLC-UV-MS de la digestion tryptique de 6 protéines en (a) 50 min, (b) 60 min, (c) 120 min.

	D1	D2
Phase stationnaire	Hypurity C18	Kinetex C18
Dimensions de colonne	50mm x 2.1mm; 5 μ m	30mm x 2.1mm; 1.3 μ m
Phase mobile	A: H ₂ O+10mM acétate d'ammonium	A: H ₂ O+0.1 % d'acide formique
	B : ACN	B : ACN+0.1 % d'acide formique
Conditions de gradient	1% à 51%B en 83min (a) 100 min (b) 200 min (c)	1% à 41%B en 0.098min (a) 0.264min (b) 0.338 min (c)
Pente normalisée de gradient (s) en %	2.8 (a), 2.4 (b), 1.2 (c)	16.3 (a), 12 (b), 4.7 (c)
Température	30°C	90°C
Débit	22 μ L/min	1.25mL/min Sauf pour (c) : 1.1mL/min
Débit après le split	5 μ L/min	Pas de split
V _{inj} /V ₀ x100	10%	5% Sauf pour (a) : 6%
Nombre d'analyses	1	161 (a), 172 (b), 211 (c)
Temps d'échantillonnage / Taux d'échantillonnage	0.40min (a), 0.43min (b), 0.64 min (c) / 2.5	
Conditions MS	Acquisition de 30 SIM simultanés. ESI+. Pulse counting time =1111 μ s. Sample per mass =4. 15L/min N ₂ . 300 °C.	

Tab. VI- 7 : Conditions d'analyse des séparations RPLCxRPLC-UV-MS pour la digestion tryptique de 6 protéines (protocole de digestion décrit dans le chapitre 2). (a) : LCxLC en 50 min, (b) : LCxLC en 60 min, (c) : LCxLC en 120 min.

Les capacités de pics obtenues en D1 et D2, la fraction d'espace occupé et la capacité de pics effective en 2D ont été calculées (Tab. VI- 8) selon les équations du chapitre 4 (article 2).

	50 min	60 min	120 min
Capacité de pics D1 prédite/expérimentale	80/73	89/76	123/102
Capacité de pics D2 prédite/expérimentale	24/17	30/21	72/42
Capacité de pics 2D théorique (n _{c,2D simulé})	1900	2650	8850
Capacité de pics 2D expérimentale	1220	1630	4270
Facteur de couverture (γ)	0.77	0.71	0.61
Capacité de pics 2D effective n* _{2D}	950	1200	2600

Tab. VI- 8 : Comparaison des capacités de pics et de l'occupation de l'espace pour les trois analyses LCxLC de la digestion de 6 protéines (Fig. VI- 25 et conditions en Tab. VI- 7)

Les capacités de pics obtenues en D1 (Tab. VI- 8) sont en accord avec les valeurs prédites (9 à 17% d'écart). Par contre, les valeurs obtenues en D2 sont significativement éloignées des valeurs prédites et les écarts observés (29 à 41%) proviennent sûrement de l'utilisation de courbes de Van Deemter génériques, obtenues avec des composés neutres, pour les dimensionnements LCxLC. Ces courbes ne sont probablement pas adaptées à

l'analyse de peptides avec la colonne Kinetex 1.3 μ m à des valeurs de u élevées. Les valeurs de largeurs de pics données par la simulation sont d'ailleurs bien en deçà des valeurs observées (par exemple : $w_{0.5,observée}=0.23s$ au lieu de $w_{0.5,simulée}=0.13s$ pour la LCxLC de 120 min).

L'occupation de l'espace de séparation est plus importante pour les temps de gradient de D1 plus courts. En effet, dans ces conditions, les temps de gradients de D2 sont également très courts (par exemple 0.098 min pour 50 min) et la pente de gradient de seconde dimension extrêmement importante (par exemple 16% pour 50 min). Le facteur de couverture était de seulement 0.39 (article 3) pour la séparation RPLCxRPLC de peptides en 200 min.

Des capacités de pics 2D effectives de 2600, 1200 et 950 sont obtenues pour les analyses de 120, 60 et 50 minutes respectivement. Les capacités de pics les plus importantes sont bien sûr obtenues pour l'analyse en 120 minutes. Afin de visualiser l'intérêt de telles séparations par rapport aux séparations unidimensionnelles, ces données ont été rajoutées au diagramme présenté dans l'article 3 (Fig. VI- 26).

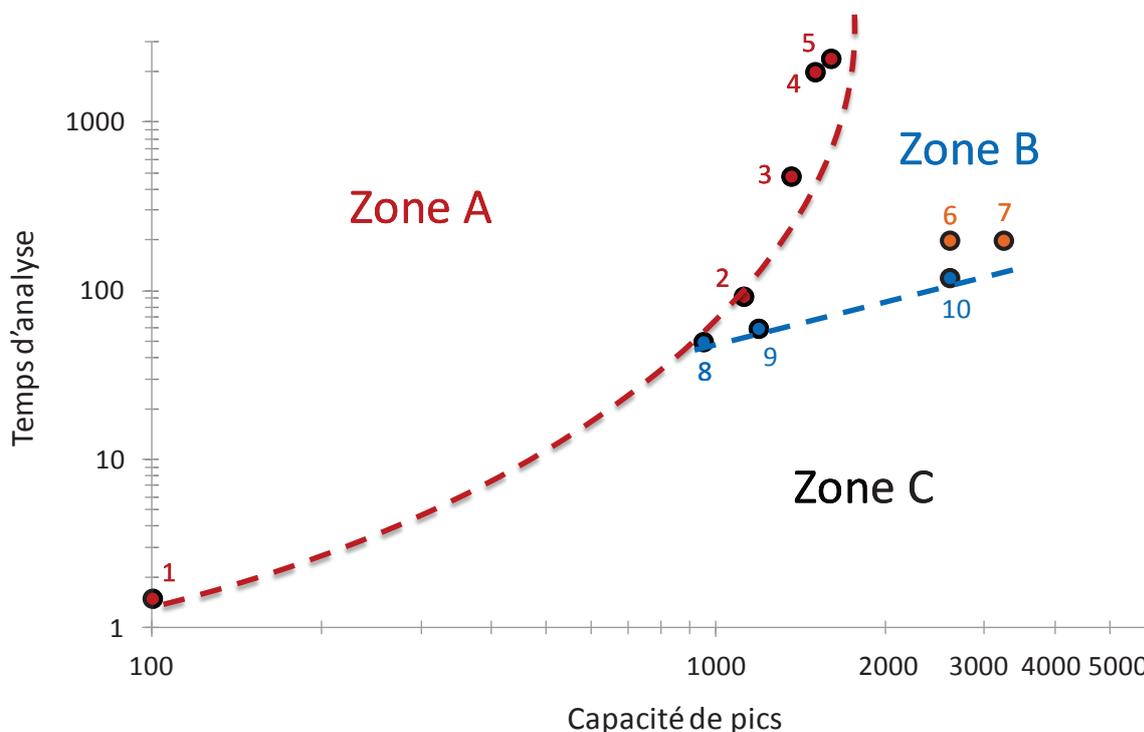


Fig. VI- 26 : Tracé du temps d'analyse en fonction de la capacité de pic pour des séparations de peptides. Les points rouges correspondent aux données récemment reportées dans la littérature. Références des points rouges : 1 [4], 2 [5], 3 [6], 4 [7], 5 [8]. La ligne pointillée rouge représente la limite pour des séparations unidimensionnelles selon les résultats publiés. Les points oranges correspondent aux séparations de la digestion de 3 protéines en RPLCxHILIC (6) et RPLCxRPLC (7) présentées dans le chapitre 5. Les points bleus correspondent aux trois séparations RPLCxRPLC de la digestion de 6 protéines (8 : 50 min, 9 : 60 min, 10 : 120 min). La ligne pointillée bleue représente la limite pour des séparations bidimensionnelles actuellement.

Les meilleures séparations unidimensionnelles publiées pour des séparations de peptides sont représentées en rouge et délimitent la zone A des séparations unidimensionnelles. La zone B est comprise entre la limite de la zone A et la courbe passant

par les trois données obtenues. Les courbes pointillées tracées sur la Fig. VI- 26 sont les courbes Pareto-optimum pour des séparations de peptides en LC-1D (rouge) et en LCxLC (bleu). La zone B contient les séparations obtenues dans le chapitre précédent (article 3) avec des particules de 2.6 μ m (en orange). La zone C représente la zone qui n'est pas accessible en l'état actuel des performances de la chromatographie en phase liquide. Il faudrait disposer de colonnes plus courtes, plus efficaces et pouvant résister à de plus grandes températures et/ou disposer de systèmes chromatographiques permettant d'atteindre des pressions bien supérieures à 1000 bar.

Plusieurs constatations peuvent être données dans le cadre d'analyses RPLCxRPLC et RPLCxHILIC. Pour des capacités de pics inférieures à 1000, la LCxLC n'apporte pas de gain de temps. Par contre, la LCxLC permet de diminuer le temps d'analyse pour des capacités de pics de l'ordre de 1000 à 1500. En regardant la Fig. VI- 26, on constate que l'on peut gagner un facteur 2 en temps d'analyse entre les séparations notées 2 et 9. Le temps d'analyse peut même être divisé par 30 entre le point 5 et la courbe bleue. Au-delà de capacités de pics de 1500, seule la LCxLC permet à l'heure actuelle d'atteindre des capacités de pics supérieures. La zone B est ainsi la zone dans laquelle la LCxLC a de l'intérêt.

A titre de comparaison avec la séparation RPLCxRPLC de 120 min réalisée avec la Kinetex 1.3 μ m, il pourra être intéressant d'effectuer une séparation LCxLC à $F_1=120 \mu\text{L}/\text{min}$ en 120 min. Le volume injecté en D2 sera de 80 μL , en deçà de la limite de 120 μL injecté dans ces conditions.

CONCLUSIONS

La chromatographie en phase liquide bidimensionnelle a été utilisée pour rendre compatible le couplage entre un détecteur MS et une séparation contenant des additifs inappropriés au couplage. 2 différents mélanges pharmaceutiques ont été analysés et les systèmes bidimensionnels développés en détection UV pourraient être directement couplés à un détecteur MS étant donné la volatilité des tampons choisis en seconde dimension.

Plusieurs séparations LCxLC-MS ont été réalisées. Tout d'abord, la séparation RPLCxRPLC-MS d'un mélange de 15 principes actifs a permis de mettre en place un premier système LCxLC-MS. Avec cette séparation, nous avons pu mettre en évidence la bonne sensibilité obtenue en spectrométrie de masse par rapport à l'UV. Par la suite, une analyse RPLCxRPLC-MS du mélange de 10 peptides a été effectuée. Le mode scan ne permet pas d'obtenir suffisamment de points par pic pour les peptides car la plage balayée est trop importante pour un spectromètre de masse de type simple quadripôle. Une étude permettant de connaître le nombre maximal de SIM utilisables suivant le paramètre pulse counting time et la fréquence nécessaire a montré que l'on pouvait suivre jusqu'à 30 SIM (pulse counting time = 1111 μ s) et avoir une fréquence d'acquisition de l'ordre de 17 Hz.

L'intérêt de la LCxLC-MS par rapport à la LC-MS a été démontré pour l'analyse de peptides. En effet, moins de suppression d'ionisation est rencontrée en LCxLC-MS qu'en LC-MS puisque la capacité de pics obtenue est bien supérieure. La séparation RPLCxHILIC-MS d'une digestion de protéines a permis de constater avec que le couplage d'un simple quadripôle au système LCxLC permet d'effectuer la recherche ciblée de peptides dans un mélange complexe.

L'analyse des peptides issus de la digestion de HSA a été effectuée en RPLCxRPLC-MS. La comparaison des analyses de l'échantillon dilué dans l'eau et dans l'urine a montré que des résultats très semblables sont obtenus en termes de nombre de pics observés.

Des analyses RPLCxRPLC-UV-MS très rapides ont été simulées puis mises en places. Les conditions de ces analyses ont été choisies de manière à maximiser la capacité de pic pour un temps d'analyse fixé. Ainsi, 3 séparations bidimensionnelles ont été effectuées pour des digestions de protéines contenant environ 200 peptides. Des capacités de pics de 950, 1200, 2600 ont été obtenues pour des séparations de 50, 60 et 120 minutes respectivement. Un facteur de couverture compris entre 0.6 et 0.8 a été obtenu pour ces trois séparations.

REFERENCES

- ¹ M.rodriquez-Aller, R. Gurny, J.L. Veuthey D. Guillarme, J. Chromatogr. A 1292 (2013) 2
- ² G. Heine, M. Raida , W.-G. Forssmann, J. Chromatogr. A, 776 (1997) 117
- ³ R. Simon, Q. Enjalbert, J. Biarc, J. Lemoine, A. Salvador, J. Chromatogr. A, 1264 (2012) 31
- ⁴ S. Heinisch, A. D'Attoma, C. Grivel, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 135
- ⁵ Y. Shen, R. Zhang, R.J. Moore, J. Kim, T.O. Metz, K.K. Hixson, R. Zhao, E.A. Livesay, H.R. Udseth, R.D. Smith, Anal. Chem. 77 (2005) 3090
- ⁶ P.J. Eugster, D. Biass, D. Guillarme, P. Favreau, R. Stöcklin, J.L. Wolfender, J. Chromatogr. A 1259 (2012) 187
- ⁷ K. Horie, Y. Sato, T. Kimura, T. Nakamura, Y. Ishihama, Y. Oda, T. Ikegami, N.Tanaka, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 283
- ⁸ J. de Vos, C. Stassen, A. Vaast, G. Desmet, S. Eeltink, J. Chromatogr. A 1264 (2012) 57

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont permis de compléter les connaissances déjà acquises à l'institut des sciences analytiques concernant l'analyse de composés chargés tels que les peptides et les petites molécules ionisables. L'ensemble des résultats a servi de base au développement de séparations LCxLC. Ces travaux intitulés « Développement de méthodes bidimensionnelles en ligne LCxLC-MS pour l'analyse de composés chargés » se sont achevés avec la réalisation de séparations bidimensionnelles de composés pharmaceutiques et de digestion tryptiques de protéines. Les séparations obtenues sont satisfaisantes en termes de capacités de pics, répartition dans l'espace de séparation et de forme des pics.

Le tracé des courbes de Van Deemter pour les composés neutres a permis de mieux appréhender à la fois en RPLC et en HILIC le potentiel des phases stationnaires utilisées. Ces courbes sont indispensables pour réaliser un dimensionnement correct des analyses LCxLC. L'effet de la température et des additifs de pH a été étudié pour les petites molécules ionisables et les peptides. Cette étude a été réalisée à partir d'analyses en gradient d'éluion permettant d'obtenir des facteurs de rétention comparables pour tous les composés et de limiter le nombre d'injection. La méthode permettant de tracer les courbes de Van Deemter à partir de données issues de gradient donne les mêmes résultats que la méthode classique utilisant des analyses isocratiques. L'utilisation de phases mobiles contenant de l'acétate d'ammonium permet d'obtenir des capacités de pics bien plus grandes qu'avec de l'acide formique, du TFA ou de l'ammoniac. L'augmentation de la température est avantageux pour la capacité de pics, à la fois en RPLC et en HILIC.

La recherche de systèmes orthogonaux a été effectuée pour les composés chargés (peptides et molécules pharmaceutiques). Les paramètres étudiés étaient la phase stationnaire, la température, le mode chromatographique (HILIC et RPLC), le pH et le modificateur organique. Un nouveau descripteur d'orthogonalité et une méthode de calcul de la capacité de pic effective ont été proposés pour mieux comparer les systèmes. Nous avons montré que le changement de phase stationnaire et de modificateur organique apporte très peu de sélectivité pour les composés chargés. Au contraire, le changement de pH et/ou de mode chromatographique a conduit à des différences de sélectivité notables. Néanmoins, les combinaisons classiques acide formique/ammoniac conduisent, en RPLCxRPLC à des capacités de pics médiocres malgré des degrés d'orthogonalités importants. Par contre, les combinaisons acétate d'ammonium/acide formique sont les plus intéressantes en termes de capacités de pics à la fois pour les peptides et les composés pharmaceutiques. Pour ces derniers, la combinaison RPLC/HILIC semble conduire aux mêmes performances. Par contre, pour les peptides, cette combinaison est moins intéressante. L'augmentation de la température en deuxième dimension apporte peu d'orthogonalité mais permet d'augmenter significativement la capacité de pics.

Les limites en termes de volume injecté en seconde dimension ont été établies pour les séparations RPLCxRPLC et RPLCxHILIC. Nous avons montré qu'il était possible d'injecter des volumes de plus de 20% du volume mort de la colonne de D2 en RPLCxRPLC alors qu'il

fallait se limiter à 8% en RPLCxHILIC pour éviter les déformations de pics. Un phénomène appelé « breakthrough » a été observé en HILICxRPLC et réduit considérablement la sensibilité. L'utilité d'un split a été envisagée afin de réduire le volume injecté en seconde dimension et de limiter le débit entrant dans le spectromètre de masse. Le diamètre du tube de split et le rapport de split ont un impact direct sur la dispersion provenant du split. Nous avons montré qu'avec des tubes de 25µm d.i., les rapports de split ne devaient pas être inférieur à 1/6 avant le détecteur MS, et 1/10 à 1/30 entre D1 et D2. 3 séparations d'une même digestion de 3 protéines ont été réalisées en RPLCxRPLC, RPLCxHILIC et HILICxRPLC. Les capacités de pics obtenues sont largement supérieures à celles atteintes en 1D-LC (de l'ordre de 4300 en HILICxRPLC, 3300 en RPLCxRPLC et 2600 en RPLCxHILIC). L'intégralité de l'espace de séparation est couverte avec les combinaisons RPLC/HILIC alors qu'en RPLCxRPLC, les données de rétention sont diagonalisées et n'occupent qu'une fraction de l'espace.

Des séparations bidimensionnelles ont été réalisées pour les deux projets qui nous ont été confiés par Technologie Servier. Les objectifs de séparer en D2 les composés non séparés en D1 et de rendre compatible le couplage à la MS ont été atteints pour les deux projets. Une séparation RPLCxRPLC-MS d'un mélange de 15 principes actifs a été réalisée pour tester le couplage avec le spectromètre de masse simple quadripôle. Les niveaux de sensibilité atteints étaient largement supérieurs à ceux obtenus en UV. Pour les peptides, la gamme de masse étendue nous a imposé de travailler en mode SIM pour maintenir des fréquences d'acquisition suffisantes. L'analyse ciblée de peptides a été réalisée en RPLCxHILIC-MS pour une digestion de protéines. Il a été montré que les suppressions d'ionisation étaient diminuées en LCxLC-MS par rapport à la LC-MS. Le couplage avec un spectromètre de masse de type TOF (temps de vol) a permis la séparation et l'identification de peptides dans l'urine et dans l'eau, avec des séparations bidimensionnelles semblables dans les deux matrices. Pour finir, nous avons évalué les limites en termes de temps d'analyse et de capacité de pics qu'il était possible d'atteindre, pour les peptides, en chromatographie bidimensionnelle. Plusieurs simulations ont été effectuées afin de réaliser les séparations LCxLC générant ainsi la courbe pareto-optimum de la capacité de pics et du temps d'analyse. Les séparations effectuées ont permis d'atteindre des capacités de pics de 950, 1200, 2600 pour des séparations de 50, 60 et 120 minutes respectivement.

Les études présentées dans ce travail permettent d'envisager plusieurs perspectives :

(1) Le traitement des données LCxLC-UV et LCxLC-MS reste compliqué et long à mettre en œuvre. Il faudrait pouvoir automatiser toutes les étapes du traitement de manière à obtenir un chromatogramme LCxLC directement à partir des données brutes. Un outil informatique est en cours de développement pour le système 2D-Iclass en collaboration avec Technologie Servier. Il serait intéressant de tenter de synchroniser le détecteur SQ300MS à un système de D2 afin de faciliter le retraitement des données masse.

(2) Le potentiel du système HILICxRPLC développé dans ce manuscrit a été démontré (occupation de l'espace et capacité de pics). Il faudra essayer de mieux comprendre le phénomène de breakthrough qui intervient en RPLC dans ces conditions. Cette étude est

nécessaire pour résoudre les problèmes d'injection rencontrés dans ces conditions et pour obtenir une meilleure sensibilité. Des boucles remplies de billes de verre pourraient permettre de mélanger la phase mobile sortant de première dimension avec celle entrant dans la deuxième dimension.

(3) Le principal problème du mode HILIC est la faible efficacité obtenue. L'augmentation de la température ne suffit pas à obtenir des séparations très efficaces. Le mode HILIC étant mieux appréhendé, il serait maintenant intéressant de tester d'autres pH ainsi que d'autres additifs que l'acétate d'ammonium 10 mM.

Ces différents aspects seront développés dans le cadre d'une nouvelle thèse au sein du laboratoire.

ANNEXES

Digestion de la BSA seule (79 peptides) :

Séquence des peptides issus de la digestion	Longueur en acide aminé	Masse de peptide (Da)	Probabilité de coupure
K	1	146.189	75.50%
R	1	174.203	100%
PK	2	243.306	94.10%
LK	2	259.349	100%
EK	2	275.305	95.70%
MK	2	277.382	100%
HK	2	283.33	52.40%
LR	2	287.362	100%
FK	2	293.366	87.90%
QR	2	302.333	100%
LAK	3	330.428	93.10%
ALK	3	330.428	100%
VTK	3	346.427	100%
CCK	3	352.467	44%
VHK	3	382.463	63.90%
QIK	3	387.479	85.50%
FPK	3	390.483	94.10%
SLGK	4	403.479	94.20%
VGTR	4	431.492	100%
YTR	3	438.484	82.30%
CCTK	4	453.572	19.40%
ADEK	4	461.472	87.30%
DVCK	4	463.549	100%
LSQK	4	474.558	100%
GVFR	4	477.564	78.30%
DTHK	4	499.524	100%
FGER	4	507.547	90.70%
ADLAK	5	516.595	100%
FWGK	4	536.631	100%
VASLR	5	544.652	100%
ECCDK	5	596.671	29.30%
PLLEK	5	598.74	100%

AFDEK	5	608.649	94.70%
PESER	5	616.629	100%
IETMR	5	648.775	100%
CASIQK	6	648.775	100%
QEPER	5	657.681	100%
TPVSEK	6	659.737	95.70%
AWSVAR	6	688.784	100%
GACLLPK	7	700.894	100%
VLISSAR	7	702.809	100%
SEIAHR	6	711.776	100%
CCAADDK	7	724.802	83.80%
NYQEAK	6	751.794	90.60%
LVTDLTK	7	788.94	100%
ATEEQLK	7	817.894	100%
LCVLHEK	7	841.036	100%
DDSPDLPK	8	885.926	100%
AEFVEVTK	8	922.046	100%
YLYEIAR	7	927.068	90.40%
DLGEEHFK	8	974.038	100%
NECFLSHK	8	977.103	100%
LVVSTQTALA	10	1002.176	100%
QNCDQFEK	8	1011.074	94.70%
QTALVELLK	9	1014.23	100%
SHCIAEVEK	9	1015.149	83.20%
CCTESLVNR	9	1024.175	79.20%
EACFAVEGPK	10	1050.195	100%
LVNELTEFAK	10	1163.336	93.10%
PDPNTLCDEFK	11	1278.399	86.40%
HPEYAVSVLLR	11	1283.493	100%
HLVDEPQNLIK	11	1305.497	100%
TCVADESHAGCEK	13	1349.453	100%
SLHTLFGDELCK	12	1362.563	100%
ETYGDMADCCEK	12	1364.48	100%
YICENQDSISSK	12	1386.496	100%
EYEATLEECCA	12	1388.527	90.60%
TVMENFVAFVDK	12	1399.625	85.90%
LGEYGFQNALIVR	13	1479.699	100%
DDPHACYSTVFDK	13	1497.599	76.80%
VPQVSTPTLVEVSR	14	1511.739	100%

DAFLGSFLYEYSR	13	1567.718	85.50%
ECCHGDLLECADDR	14	1578.707	100%
YNGVFQECCQAEDK	14	1633.768	89.70%
PCFSALTPDETYVPK	15	1667.894	94.10%
MPCTEDYLSLILNR	14	1667.956	100%
LFTFHADICTLPDTEK	16	1851.104	100%
HPYFYAPELLYYANK	15	1889.14	100%
DAIPENLPPLTADFAEDK	18	1956.136	37.70%
WVTFISLLLLFSSAYSR	17	2003.371	100%
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	21	2435.823	100%

Digestion de l'HSA seule (71 peptides)

Les masses indiquées sont les masses exactes et les modifications liées aux réactions d'alkylation des cystéines sont prises en compte. Trois états de charges des peptides sont considérés (utilisation du TOF) :

M+3H+	Position	Modifications chimiques		Modifications chimiques		Séquence de peptides
157.4168	25-28					DAHK
233.4575	29-34					SEVAHR
98.7319	35-36					FK
317.8188	37-44					DLGEENFK
811.7593	45-65	Cys_CAM: 58	830.7665			ALVLIAFAQYLQQCPFEDHV K
383.8765	66-75					LVNEVTEFAK
462.1833	76-88	Cys_CAM: 77, 86	500.1977	PHOS: 82	488.8388	TCVADESAENCDK
339.8503	89-97					SLHTLFGDK
292.8372	98-105	Cys_CAM: 99	311.8444			LCTVATLR
440.835	106- 117	Cys_CAM: 114, 115	478.8493			ETYGEMADCCAK
220.11	118- 122					QEPER
340.164	123- 130	Cys_CAM: 125	359.1712			NECFLQHK
314.1543	131- 138					DDNPNLPR
865.0857	139- 160	Cys_CAM: 148	884.0928			LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK
49.7091	161- 161					K
309.836	162- 168					YLYEIAR

59.0445	169-169					R
581.6362	170-183					HPYFYAPELLFFAK
59.0445	184-184					R
104.0636	185-186					YK
419.8461	187-198	Cys_CAM: 192, 193	457.8604			AAFTECCQAADK
239.1439	199-205	Cys_CAM: 201	258.151			AACLLPK
215.7904	206-210					LDELK
150.0728	211-214					DEGK
155.0885	215-219					ASSAK
101.7307	220-221					QR
87.4038	222-223					LK
217.1161	224-229	Cys_CAM: 224	236.1233			CASLQK
170.0886	230-233					FGER
122.4109	234-236					AFK
225.1308	237-242					AWAVAR
168.436	243-246					LSQR
131.0828	247-249					FPK
294.1519	250-257					AEFAEVSK
263.8287	258-264					LVTDLTK
639.2625	265-281	Cys_CAM: 269, 270, 277	696.284			VHTECCHGDLLECADDR
173.1042	282-286					ADLAK
462.8784	287-298	Cys_CAM: 289	481.8855	PHOS: 294, 297	516.1893	YICENQDSISSK
87.4038	299-300					LK
397.8631	301-310	Cys_CAM: 302, 303	435.8774			ECCEKPLLEK
973.1125	311-337	Cys_CAM: 313	992.1196			SHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESK
155.4106	338-341	Cys_CAM: 340	174.4178			DVCK
232.4501	342-					NYAEAK

	347				
541.934	348-360				DVFLGMFLYEYAR
59.0445	361-361				R
437.9188	362-372				HPDYSVLLLLR
111.0828	373-375				LAK
328.8343	376-383				TYETTLEK
461.1826	384-396	Cys_CAM: 384, 385, 393	518.2041		CCAAADPHECYAK
682.3699	397-413				VFDEFKPLVEEPQNLIK
534.2486	414-426	Cys_CAM: 416	553.2557		QNCELFEQLGEYK
320.859	427-434				FQNALLVR
137.7461	435-437				YTK
49.7091	438-438				K
504.6191	439-452			PHOS: 443, 444,446	584.5854 VPQVSTPTLVEVSR
144.4253	453-456				NLGK
130.7497	457-460				VGSK
118.3819	461-463	Cys_CAM: 461, 462	156.3962		CCK
194.4396	464-468				HPEAK
59.0445	469-469				R
802.0618	470-490	Cys_CAM: 472, 485	840.0761		MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K
225.4538	491-496				TPVSDR
116.4145	497-499				VTK
342.1565	500-508	Cys_CAM: 500, 501	380.1708		CCTESLVNR
618.6416	509-524	Cys_CAM: 511	637.6487		RPCFSALEVDETYVPK
735.0052	525-543	Cys_CAM: 538	754.0124		EFNAETFTFHADICTLSEK
102.0587	544-545				ER
130.09	546-548				QIK

49.7091	549-549				K
334.2061	550-558				QTALVELVK
170.4447	559-562				HKPK
107.0707	563-565				ATK
173.1042	566-569				EQLK
448.2164	570-581				AVMDDFAAFVEK
118.3819	582-584	Cys_CAM: 582, 583	156.3962		CCK
150.0728	585-588				ADDK
338.4796	589-597	Cys_CAM: 591	357.4868		ETCFAEEGK
49.7091	598-598				K
338.5378	599-609				LVAASQAALGL

M+2H+	Position	Modifications chimiques		Modifications chimiques		Séquence de peptides
235.6215	25-28					DAHK
349.6826	29-34					SEVAHR
147.5942	35-36					FK
476.2245	37-44					DLGEENFK
1217.1354	45-65	Cys_CAM: 58	1245.6461			ALVLIIFAQYLQQCPFEDHV K
575.3111	66-75					LVNEVTEFAK
692.7714	76-88	Cys_CAM: 77, 86	749.7928	PHOS: 82	732.7545	TCVADESAENCDK
509.2718	89-97					SLHTLFGDK
438.7522	98-105	Cys_CAM: 99	467.2629			LCTVATLR
660.7489	106-117	Cys_CAM: 114, 115	717.7703			ETYGEMADCCAK
329.6614	118-122					QEPER
509.7424	123-130	Cys_CAM: 125	538.2531			NECFLQHK
470.7278	131-138					DDNPNLPR
1297.1249	139-160	Cys_CAM: 148	1325.6356			LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK
74.06	161-161					K
464.2503	162-					YLYEIAR

	168					
88.0631	169-169					R
871.9507	170-183					HPYFYAPELLFFAK
88.0631	184-184					R
155.5917	185-186					YK
629.2655	187-198	Cys_CAM: 192, 193	686.287			AAFTECCQAADK
358.2122	199-205	Cys_CAM: 201	386.7229			AACLLPK
323.1819	206-210					LDELRL
224.6055	211-214					DEGK
232.1292	215-219					ASSAK
152.0924	220-221					QR
130.6021	222-223					LK
325.1705	224-229	Cys_CAM: 224	353.6812			CASLQK
254.6293	230-233					FGER
183.1128	234-236					AFK
337.1926	237-242					AWAVAR
252.1504	243-246					LSQR
196.1206	247-249					FPK
440.7242	250-257					AEFAEVSK
395.2394	258-264					LVTDLTK
958.3902	265-281	Cys_CAM: 269, 270, 277	1043.9224			VHTECCHGDLLECADDR
259.1526	282-286					ADLAK
693.8139	287-298	Cys_CAM: 289	722.3246	PHOS: 294, 297	773.7802	YICENQDSISSK
130.6021	299-300					LK
596.291	301-310	Cys_CAM: 302, 303	653.3125			ECCEKPLLEK
1459.1651	311-337	Cys_CAM: 313	1487.6758			SHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESK
232.6123	338-341	Cys_CAM: 340	261.123			DVCK

348.1716	342-347					NYAEAK
812.3974	348-360					DVFLGMFLYEYAR
88.0631	361-361					R
656.3746	362-372					HPDYSVLLLLR
166.1206	373-375					LAK
492.7478	376-383					TYETTLEK
691.2703	384-396	Cys_CAM: 384, 385, 393	776.8025			CCAAADPHECYAK
1023.0513	397-413					VFDEFKPLVEEPQNLIK
800.8692	414-426	Cys_CAM: 416	829.3799			QNCELFEQLGEYK
480.7849	427-434					FQNALLVR
206.1155	435-437					YTK
74.06	438-438					K
756.425	439-452			PHOS: 443, 444,446	876.3745	VPQVSTPTLVEVSR
216.1343	453-456					NLGK
195.621	457-460					VGSK
177.0692	461-463	Cys_CAM: 461, 462	234.0907			CCK
291.1557	464-468					HPEAK
88.0631	469-469					R
1202.5891	470-490	Cys_CAM: 472, 485	1259.6105			MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K
337.677	491-496					TPVSDR
174.1181	497-499					VTK
512.7311	500-508	Cys_CAM: 500, 501	569.7526			CCTESLVNR
927.4587	509-524	Cys_CAM: 511	955.9694			RPCFSALEVDETYVPK
1102.0042	525-543	Cys_CAM: 538	1130.5149			EFNAETFTFHADICTLSEK
152.5844	544-545					ER
194.6313	546-548					QIK

74.06	549-549				K
500.8055	550-558				QTALVELVK
255.1633	559-562				HKPK
160.1024	563-565				ATK
259.1526	566-569				EQLK
671.821	570-581				AVMDDFAAFVEK
177.0692	582-584	Cys_CAM: 582, 583	234.0907		CCK
224.6055	585-588				ADDK
507.2158	589-597	Cys_CAM: 591	535.7266		ETCFAEEGK
74.06	598-598				K
507.3031	599-609				LVAASQAALGL

M+H+	Position	Modifications chimiques		Modifications chimiques		Séquence de peptides
470.2357	25-28					DAHK
698.358	29-34					SEVAHR
294.1812	35-36					FK
951.4418	37-44					DLGEENFK
2433.2635	45-65	Cys_CAM: 58	2490.2849			ALVLIIFAQYLQQCPFEDHV K
1149.615	66-75					LVNEVTEFAK
1384.5355	76-88	Cys_CAM: 77, 86	1498.5784	PHOS: 82	1464.5018	TCVADESAENCDK
1017.5363	89-97					SLHTLFGDK
876.4971	98-105	Cys_CAM: 99	933.5186			LCTVATLR
1320.4905	106-117	Cys_CAM: 114, 115	1434.5334			ETYGEMADCCAK
658.3155	118-122					QEPER
1018.4775	123-130	Cys_CAM: 125	1075.4989			NECFLQHK
940.4483	131-138					DDNPNLPR
2593.2425	139-160	Cys_CAM: 148	2650.2639			LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK
147.1128	161-161					K
927.4934	162-					YLYEIAR

	168					
175.1189	169-169					R
1742.894	170-183					HPYFYAPELLFFAK
175.1189	184-184					R
310.1761	185-186					YK
1257.5238	187-198	Cys_CAM: 192, 193	1371.5667			AAFTECCQAADK
715.4171	199-205	Cys_CAM: 201	772.4385			AACLLPK
645.3566	206-210					LDELRL
448.2038	211-214					DEGK
463.2511	215-219					ASSAK
303.1775	220-221					QR
260.1968	222-223					LK
649.3338	224-229	Cys_CAM: 224	706.3552			CASLQK
508.2514	230-233					FGER
365.2183	234-236					AFK
673.378	237-242					AWAVAR
503.2936	243-246					LSQR
391.234	247-249					FPK
880.441	250-257					AEFAEVSK
789.4716	258-264					LVTDLTK
1915.7731	265-281	Cys_CAM: 269, 270, 277	2086.8375			VHTECCHGDLLECADDR
517.298	282-286					ADLAK
1386.6206	287-298	Cys_CAM: 289	1443.642	PHOS: 294, 297	1546.5532	YICENQDSISSK
260.1968	299-300					LK
1191.5748	301-310	Cys_CAM: 302, 303	1305.6177			ECCEKPLLEK
2917.3229	311-337	Cys_CAM: 313	2974.3444			SHCIAEVENDEMPADLPSLA ADFVESK
464.2173	338-341	Cys_CAM: 340	521.2388			DVCK

695.3359	342-347					NYAEAK
1623.7875	348-360					DVFLGMFLYEYAR
175.1189	361-361					R
1311.7419	362-372					HPDYSVLLLLR
331.234	373-375					LAK
984.4884	376-383					TYETTLEK
1381.5333	384-396	Cys_CAM: 384, 385, 393	1552.5977			CCAAADPHECYAK
2045.0953	397-413					VFDEFKPLVEEPQNLIK
1600.7312	414-426	Cys_CAM: 416	1657.7526			QNCELFEQLGEYK
960.5625	427-434					FQNALLVR
411.2238	435-437					YTK
147.1128	438-438					K
1511.8427	439-452			PHOS: 443, 444,446	1751.7417	VPQVSTPTLVEVSR
431.2612	453-456					NLGK
390.2347	457-460					VGSK
353.1312	461-463	Cys_CAM: 461, 462	467.1741			CCK
581.3042	464-468					HPEAK
175.1189	469-469					R
2404.1709	470-490	Cys_CAM: 472, 485	2518.2138			MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K
674.3468	491-496					TPVSDR
347.2289	497-499					VTK
1024.455	500-508	Cys_CAM: 500, 501	1138.4979			CCTESLVNR
1853.9102	509-524	Cys_CAM: 511	1910.9316			RPCFSALEVDETYVPK
2203.0012	525-543	Cys_CAM: 538	2260.0226			EFNAETFTFHADICTLSEK
304.1615	544-545					ER
388.2554	546-548					QIK

147.1128	549-549				K
1000.6037	550-558				QTALVELVK
509.3194	559-562				HKPK
319.1976	563-565				ATK
517.298	566-569				EQLK
1342.6347	570-581				AVMDDFAAFVEK
353.1312	582-584	Cys_CAM: 582, 583	467.1741		CCK
448.2038	585-588				ADDK
1013.4244	589-597	Cys_CAM: 591	1070.4459		ETCFAEEGK
147.1128	598-598				K
1013.5989	599-609				LVAASQAALGL

Digestion du mélange de 3 protéines BSA/myoglobine/lysozyme (115 peptides différents) :

Provenance du peptide	Séquence des peptides issus de la digestion	Longueur en acide aminé	Masse de peptide (Da)	Probabilité de coupure
Lysozyme	L	1	131.175	100%
BSA, lys, myo	K	1	146.189	75.50%
BSA, lys	R	1	174.203	100%
BSA	PK	2	243.306	94.10%
Lysozyme	CK	2	249.328	82.80%
BSA	LK	2	259.349	100%
BSA	EK	2	275.305	95.70%
BSA	MK	2	277.382	100%
BSA, myo	HK	2	283.33	52.40%
BSA	LR	2	287.362	100%
Lysozyme	NR	2	288.307	100%
BSA, myo	FK	2	293.366	87.90%
BSA	QR	2	302.333	100%
Lysozyme	MR	2	305.395	100%
Myoglobine	YK	2	309.365	100%
BSA	LAK	3	330.428	93.10%
BSA	ALK	3	330.428	100%

Lysozyme	GCR	3	334.393	100%
BSA	VTK	3	346.427	100%
BSA	CCK	3	352.467	44%
BSA	VHK	3	382.463	63.90%
BSA	QIK	3	387.479	85.50%
BSA	FPK	3	390.483	94.10%
Myoglobin	HLK	3	396.49	100%
BSA	SLGK	4	403.479	94.20%
Myoglobin	FDK	3	408.455	64.20%
BSA	VGTR	4	431.492	100%
BSA	YTR	3	438.484	82.30%
BSA	CCTK	4	453.572	19.40%
BSA	ADEK	4	461.472	87.30%
BSA	DVCK	4	463.549	100%
Myoglobin	IPIK	4	469.625	100%
BSA	LSQK	4	474.558	100%
BSA	GVFR	4	477.564	78.30%
Lysozyme	VFGR	4	477.564	100%
BSA	DTHK	4	499.524	100%
BSA	FGER	4	507.547	90.70%
Lysozyme	TPGSR	5	516.555	100%
BSA	ADLAK	5	516.595	100%
BSA	FWGK	4	536.631	100%
BSA	VASLR	5	544.652	100%
BSA	ECCDK	5	596.671	29.30%
BSA	PLLEK	5	598.74	100%
BSA	AFDEK	5	608.649	94.70%
BSA	PESER	5	616.629	100%
Myoglobin	NDIAAK	6	630.699	100%
BSA	IETMR	5	648.775	100%
BSA	CASIQK	6	648.775	100%
Myoglobin	ELGFQG	6	649.701	100%
BSA	QEPER	5	657.681	100%
BSA	TPVSEK	6	659.737	95.70%
Myoglobin	ASEDLK	6	661.71	82.60%
BSA	AWSVAR	6	688.784	100%
BSA	GACLLPK	7	700.894	100%
BSA	VLISSAR	7	702.809	100%
Myoglobin	TEAEMK	6	707.797	91.20%

BSA	SEIAHR	6	711.776	100%
BSA	CCAADDK	7	724.802	83.80%
Myoglobin	ALELFR	6	747.892	100%
BSA	NYQEAK	6	751.794	90.60%
BSA	LVTDLTK	7	788.94	100%
BSA	ATEEQLK	7	817.894	100%
Lysozyme	CELAAMK	8	836.032	100%
BSA	LCVLHEK	7	841.036	100%
Lysozyme	HGLDNYR	7	873.924	100%
BSA	DDSPDLPK	8	885.926	100%
Myoglobin	GHHEAELK	8	919.993	49.70%
BSA	AEFVEVTK	8	922.046	100%
BSA	YLYEIAR	7	927.068	90.40%
Lysozyme	WWCNDGR	7	936.012	100%
Myoglobin	PLAQSHATK	9	952.078	100%
BSA	DLGEEHFK	8	974.038	100%
BSA	NECFLSHK	8	977.103	100%
BSA	LVVSTQATALA	10	1002.176	100%
BSA	QNCDQFEK	8	1011.074	94.70%
BSA	QTALVELLK	9	1014.23	100%
BSA	SHCIAEVEK	9	1015.149	83.20%
BSA	CCTESLVNR	9	1024.175	79.20%
Lysozyme	GTDVQAWIR	9	1045.163	100%
BSA	EACFAVEGPK	10	1050.195	100%
BSA	LVNELTEFAK	10	1163.336	93.10%
Lysozyme	GYSLGNWVCAAK	12	1268.453	100%
Myoglobin	LFTGHPETLEK	11	1271.436	100%
BSA	PDPNTLCDEFK	11	1278.399	86.40%
BSA	HPEYAVSVLLR	11	1283.493	100%
BSA	HLVDEPQNLIK	11	1305.497	100%
BSA	TCVADESHAGCEK	13	1349.453	100%
BSA	SLHTLFGDELCK	12	1362.563	100%
BSA	ETYGDMADCCEK	12	1364.48	100%
Myoglobin	HGTVVLTALGGILK	14	1378.678	82.60%
BSA	YICENQDSISSK	12	1386.496	100%
BSA	EYEATLEECCA	12	1388.527	90.60%
BSA	TVMENFVAFVDK	12	1399.625	85.90%
Lysozyme	FESNFNTQATNR	12	1428.481	100%
BSA	LGEYGFQNALIVR	13	1479.699	100%

BSA	DDPHACYSTVFDK	13	1497.599	76.80%
Myoglobin	HPGDFGADAQGAMTK	15	1502.621	100%
BSA	VPQVSTPTLVEVSR	14	1511.739	100%
BSA	DAFLGSFLYEYSR	13	1567.718	85.50%
BSA	ECCHGDLLECADDR	14	1578.707	100%
Myoglobin	VEADIAGHGQEVLR	15	1606.799	100%
BSA	YNGVFQECCQAEDK	14	1633.768	89.70%
BSA	PCFSALTPDETYVPK	15	1667.894	94.10%
BSA	MPCTEDYLSLILNR	14	1667.956	100%
Lysozyme	IVSDGNGMNAWVAWR	15	1675.882	100%
Lysozyme	NTDGSTDYGILQINSR	16	1753.843	100%
Lysozyme	SLILVLCFLPLAALGK	17	1784.317	94.20%
BSA	LFTFHADICTLPDEK	16	1851.104	100%
Myoglobin	YLEFISDAIHVLHSK	16	1885.193	100%
BSA	HPYFYAPELLYYANK	15	1889.14	100%
Myoglobin	MGLSDGEWQQVLNVWGK	17	1947.196	94.20%
BSA	DAIPENLPPLTADFAEDK	18	1956.136	37.70%
BSA	WVTFISLLLLFSSAYS	17	2003.371	100%
Lysozyme	NLCNIPCSALLSSDITASVNC	23	2337.706	90.50%
BSA	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	21	2435.823	100%

Digestion du mélange de 4 protéines HSA/BSA/myoglobine/lysozyme (167 peptides différents) :

Provenance du peptide	Séquence des peptides issus de la digestion	Longueur en acide aminé	Masse de peptide (Da)	Probabilité de coupure
Lysozyme	L	1	131.175	100%
BSA, HSA, lys, myo	K	1	146.189	75.50%
BSA, HSA, lys	R	1	174.203	100%
BSA et HSA	PK	2	243.306	94.10%
Lysozyme	CK	2	249.328	82.80%
BSA et HSA	LK	2	259.349	100%
BSA	EK	2	275.305	95.70%
BSA et HSA	MK	2	277.382	100%
BSA, HSA, myo	HK	2	283.33	52.40%
BSA	LR	2	287.362	100%
Lysozyme	NR	2	288.307	100%
BSA, HSA, myo	FK	2	293.366	87.90%

BSA et HSA	QR	2	302.333	100%
HSA	ER	2	303.318	100%
Lysozyme	MR	2	305.395	100%
HSA et myo	YK	2	309.365	100%
HSA	ATK	3	318.373	90.90%
BSA et HSA	LAK	3	330.428	93.10%
BSA	ALK	3	330.428	100%
Lysozyme	GCR	3	334.393	100%
BSA et HSA	VTK	3	346.427	100%
BSA et HSA	CCK	3	352.467	44%
HSA	AFK	3	364.445	86.40%
BSA	VHK	3	382.463	63.90%
HSA	LVR	3	386.495	40.30%
BSA et HSA	QIK	3	387.479	85.50%
HSA	VGSK	4	389.452	73.50%
BSA et HSA	FPK	3	390.483	94.10%
Myoglobin	HLK	3	396.49	100%
BSA	SLGK	4	403.479	94.20%
Myoglobin	FDK	3	408.455	64.20%
HSA	YTK	3	410.47	84.40%
HSA	NLGK	4	430.504	94.20%
BSA	VGTR	4	431.492	100%
BSA	YTR	3	438.484	82.30%
HSA	DEGK	4	447.445	100%
HSA	ADDK	4	447.445	83.80%
BSA	CCTK	4	453.572	19.40%
BSA	ADEK	4	461.472	87.30%
HSA	ASSAK	5	462.503	100%
BSA et HSA	DVCK	4	463.549	100%
Myoglobin	IPIK	4	469.625	100%
BSA	LSQK	4	474.558	100%
BSA et HSA	GVFR	4	477.564	78.30%
Lysozyme	VFGR	4	477.564	100%
BSA	DTHK	4	499.524	100%
HSA	LSQR	4	502.571	100%
BSA et HSA	FGER	4	507.547	90.70%
Lysozyme	TPGSR	5	516.555	100%
BSA et HSA	ADLAK	5	516.595	100%
HSA	EQLK	4	516.595	100%

BSA	FWGK	4	536.631	100%
BSA	VASLR	5	544.652	100%
HSA	HPEAK	5	580.641	87.30%
BSA	ECCDK	5	596.671	29.30%
BSA et HSA	PLLEK	5	598.74	100%
BSA	AFDEK	5	608.649	94.70%
HSA	ECCEK	5	610.698	26.40%
BSA	PESER	5	616.629	100%
Myoglobin	NDIAAK	6	630.699	100%
HSA	LDELK	5	644.726	91.80%
HSA	CASLQK	6	648.775	100%
BSA	IETMR	5	648.775	100%
BSA	CASIQK	6	648.775	100%
Myoglobin	ELGFQG	6	649.701	100%
BSA et HSA	QEPER	5	657.681	100%
BSA	TPVSEK	6	659.737	95.70%
Myoglobin	ASEDLK	6	661.71	82.60%
HSA	AWAVAR	6	672.785	100%
HSA	TPVSDR	6	673.724	100%
BSA	AWSVAR	6	688.784	100%
HSA	NYAEAK	6	694.742	90.60%
HSA	SEVAHR	6	697.749	100%
BSA	GACLLPK	7	700.894	100%
BSA	VLISSAR	7	702.809	100%
Myoglobin	TEAEMK	6	707.797	91.20%
BSA	SEIAHR	6	711.776	100%
HSA	AACLLPK	7	714.921	100%
BSA	CCAADDK	7	724.802	83.80%
Myoglobin	ALELFR	6	747.892	100%
BSA	NYQEAK	6	751.794	90.60%
HSA	VFDEFK	6	783.879	40.60%
BSA et HSA	LVTDLTK	7	788.94	100%
BSA	ATEEQLK	7	817.894	100%
Lysozyme	CELAAMK	8	836.032	100%
BSA	LCVLHEK	7	841.036	100%
Lysozyme	HGLDNYR	7	873.924	100%
HSA	LCTVATLR	8	876.082	100%
HSA	AEFAEVSK	8	879.965	100%
BSA	DDSPDLPK	8	885.926	100%

Myoglobin	GHHEAELK	8	919.993	49.70%
BSA	AEFVEVTK	8	922.046	100%
BSA et HSA	LYEYIAR	7	927.068	90.40%
Lysozyme	WWCNDGR	7	936.012	100%
HSA	DDPNLPR	8	939.98	100%
HSA	DLGEENFK	8	951.001	86.40%
Myoglobin	PLAQSHATK	9	952.078	100%
HSA	FQNALLVR	8	960.144	100%
BSA	DLGEEHFK	8	974.038	100%
BSA	NECFLSHK	8	977.103	100%
HSA	TYETLEK	8	984.071	82.90%
HSA	QTALVELVK	9	1000.203	100%
BSA	LVVSTQTALA	10	1002.176	100%
BSA	QNCDQFEK	8	1011.074	94.70%
HSA	ETCFAEEGK	9	1013.087	92.90%
HSA	LVAASQAALGL	11	1013.202	100%
BSA	QTALVELLK	9	1014.23	100%
BSA	SHCIAEVEK	9	1015.149	83.20%
HSA	SLHTLFGDK	9	1017.15	76.80%
HSA	NECFLQHK	8	1018.155	100%
BSA et HSA	CCTESLVNR	9	1024.175	79.20%
Lysozyme	GTDVQAWIR	9	1045.163	100%
BSA	EACFAVEGPK	10	1050.195	100%
HSA	LVNEVTEFAK	10	1149.309	93.10%
BSA	LVNELTEFAK	10	1163.336	93.10%
HSA	AAFTECCQAADK	12	1257.399	92.80%
Lysozyme	GYSLGNWVCAAK	12	1268.453	100%
Myoglobin	LFTGHPETLEK	11	1271.436	100%
BSA	PDPNTLCDEFK	11	1278.399	86.40%
HSA	PLVEEPQNLIK	11	1279.499	100%
BSA	HPEYAVSVLLR	11	1283.493	100%
BSA	HLVDEPQNLIK	11	1305.497	100%
HSA	HPDYSVLLLLR	11	1311.547	100%
HSA	ETYGEMADCCAK	12	1320.47	100%
HSA	AVMDDFAAFVEK	12	1342.529	82.90%
BSA	TCVADESHAGCEK	13	1349.453	100%
BSA	SLHTLFGDELCK	12	1362.563	100%
BSA	ETYGDMADCCEK	12	1364.48	100%
Myoglobin	HGTVVLTALGGILK	14	1378.678	82.60%

HSA	CCAAADPHECYAK	13	1381.559	100%
HSA	TCVADESAENCDK	13	1384.452	100%
BSA et HSA	YICENQDSISSK	12	1386.496	100%
BSA	EYEATLEECCA	12	1388.527	90.60%
BSA	TVMENFVAFVDK	12	1399.625	85.90%
Lysozyme	FESNFNTQATNR	12	1428.481	100%
BSA	LGEYGFQNALIVR	13	1479.699	100%
BSA	DDPHACYSTVFDK	13	1497.599	76.80%
Myoglobin	HPGDFGADAQGAMTK	15	1502.621	100%
BSA et HSA	VPQVSTPTLVEVSR	14	1511.739	100%
BSA	DAFLGSFLYEYSR	13	1567.718	85.50%
BSA	ECCHGDLLECADDR	14	1578.707	100%
HSA	QNCSELFQELGEYK	13	1600.763	100%
Myoglobin	VEADIAGHGQEVLR	15	1606.799	100%
HSA	DVFLGMFLYEYAR	13	1623.887	90.40%
BSA	YNGVFQECCQAEDK	14	1633.768	89.70%
BSA	PCFSALTPDETYVPK	15	1667.894	94.10%
BSA	MPCTEDYLSLILNR	14	1667.956	100%
Lysozyme	IVSDGNMNAWVAVR	15	1675.882	100%
HSA	PCFSALEVDETYVPK	15	1697.92	90.70%
HSA	HPYFYAPELFFAK	14	1743.038	87.30%
Lysozyme	NTDGSTDYGILQINSR	16	1753.843	100%
Lysozyme	SLILVLCFLPLAALGK	17	1784.317	94.20%
BSA	LFTFHADICTLPDTEK	16	1851.104	100%
Myoglobin	YLEFISDAIHLVLSK	16	1885.193	100%
BSA	HPYFYAPELLYANK	15	1889.14	100%
HSA	VHTECCHGDLLECADDR	17	1916.085	100%
Myoglobin	MGLSDGEWQQVLNVWGK	17	1947.196	94.20%
BSA	DAIPENLPPLTADFAEDK	18	1956.136	37.70%
BSA	WVTFISLLLLFSSAYS	17	2003.371	100%
HSA	WVTFISLLFLFSSAYS	17	2037.389	100%
HSA	EFNAETFTFHADICTLSEK	19	2203.408	79.90%
HSA	PEVDVMCTAFHDNEETFLK	19	2225.473	82.60%
Lysozyme	NLCNIPCSALLSSDITASVNSAK	23	2337.706	90.50%
HSA	MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK	21	2404.84	100%
HSA	ALVLIAFAQYLQCCPFEDHVK	21	2433.851	100%
BSA	GLVLIAFSQYLQCCPFDEHVK	21	2435.823	100%
HSA	SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK	27	2918.197	86.70%

Digestion du mélange HSA/BSA/myoglobine/lysozyme/b-caséine/cytochrome C (196 peptides différents) :

Provenance du peptide	Séquence des peptides issus de la digestion	Longueur en acide aminé	Masse de peptide (Da)	Probabilité de coupure
Lysozyme	L	1	131.175	100%
BSA, HSA, lys, myo, cytC, Bcas	K	1	146.189	75.50%
BSA, HSA, lys	R	1	174.203	100%
cytochrome c	GK	2	203.241	92.90%
BSA et HSA	PK	2	243.306	94.10%
B-casein	VK	2	245.322	90.80%
Lysozyme	CK	2	249.328	82.80%
BSA et HSA	LK	2	259.349	100%
cytochrome c	GGK	3	260.293	100%
cytochrome c	NK	2	260.293	100%
BSA	EK	2	275.305	95.70%
BSA, Bcas et HSA	MK	2	277.382	100%
BSA, HSA, myo, cytC, Bcas	HK	2	283.33	52.40%
BSA	LR	2	287.362	100%
Lysozyme	NR	2	288.307	100%
BSA, HSA, myo	FK	2	293.366	87.90%
BSA et HSA	QR	2	302.333	100%
HSA	ER	2	303.318	100%
Lysozyme	MR	2	305.395	100%
HSA et myo	YK	2	309.365	100%
HSA	ATK	3	318.373	90.90%
BSA et HSA	LAK	3	330.428	93.10%
BSA	ALK	3	330.428	100%
Lysozyme	GCR	3	334.393	100%
BSA et HSA	VTK	3	346.427	100%
BSA et HSA	CCK	3	352.467	44%
HSA	AFK	3	364.445	86.40%
B-casein	INK	3	373.453	84.10%

BSA	VHK	3	382.463	63.90%
HSA	LVR	3	386.495	40.30%
BSA et HSA	QIK	3	387.479	85.50%
B-casein	IEK	3	388.464	100%
HSA	VGSK	4	389.452	73.50%
BSA et HSA	FPK	3	390.483	94.10%
Myoglobin	HLK	3	396.49	100%
BSA	SLGK	4	403.479	94.20%
cytochrome c	TER	3	404.423	78.40%
Myoglobin	FDK	3	408.455	64.20%
HSA	YTK	3	410.47	84.40%
HSA	NLGK	4	430.504	94.20%
BSA	VGTR	4	431.492	100%
cytochrome c	ATNE	4	433.418	-
BSA	YTR	3	438.484	82.30%
HSA	DEGK	4	447.445	100%
HSA	ADDK	4	447.445	83.80%
BSA	CCTK	4	453.572	19.40%
BSA	ADEK	4	461.472	87.30%
HSA	ASSAK	5	462.503	100%
BSA et HSA	DVCK	4	463.549	100%
Myoglobin	IPIK	4	469.625	100%
BSA	LSQK	4	474.558	100%
BSA et HSA	GVFR	4	477.564	78.30%
Lysozyme	VFGR	4	477.564	100%
BSA	DTHK	4	499.524	100%
HSA	LSQR	4	502.571	100%
BSA et HSA	FGER	4	507.547	90.70%
Lysozyme	TPGSR	5	516.555	100%
BSA et HSA	ADLAK	5	516.595	100%
HSA	EQLK	4	516.595	100%
BSA	FWGK	4	536.631	100%
BSA	VASLR	5	544.652	100%
HSA	HPEAK	5	580.641	87.30%
BSA	ECCDK	5	596.671	29.30%
BSA et HSA	PLLEK	5	598.74	100%
cytochrome c	GITWK	5	603.719	100%

BSA	AFDEK	5	608.649	94.70%
HSA	ECCEK	5	610.698	26.40%
BSA	PESER	5	616.629	100%
Myoglobin	NDIAAK	6	630.699	100%
cytochrome c	IFVQK	5	633.789	100%
HSA	LDELRL	5	644.726	91.80%
B-casein	EAMAPK	6	645.772	100%
HSA	CASLQK	6	648.775	100%
BSA	IETMR	5	648.775	100%
BSA	CASIQK	6	648.775	100%
Myoglobin	ELGFQG	6	649.701	100%
BSA et HSA	QEPER	5	657.681	100%
BSA	TPVSEK	6	659.737	95.70%
Myoglobin	ASEDLK	6	661.71	82.60%
HSA	AWAVAR	6	672.785	100%
HSA	TPVSDR	6	673.724	100%
cytochrome c	MGDVEK	6	677.771	100%
cytochrome c	YIPGTK	6	677.798	100%
BSA	AWSVAR	6	688.784	100%
HSA	NYAEAK	6	694.742	90.60%
HSA	SEVAHR	6	697.749	100%
BSA	GACLLPK	7	700.894	100%
BSA	VLISSAR	7	702.809	100%
Myoglobin	TEAEMK	6	707.797	91.20%
BSA	SEIAHR	6	711.776	100%
HSA	AACLLPK	7	714.921	100%
BSA	CCAADDK	7	724.802	83.80%
B-casein	GPFPIIV	7	741.929	-
Myoglobin	ALELFR	6	747.892	100%
B-casein	EMPFPK	6	747.907	100%
BSA	NYQEAK	6	751.794	90.60%
cytochrome c	MIFAGIK	7	779.008	85.50%
B-casein	VLPVPQK	7	779.978	100%
HSA	VFDEFK	6	783.879	40.60%
BSA et HSA	LVTDLTK	7	788.94	100%
BSA	ATEEQLK	7	817.894	100%

B-casein	AVPYPQR	7	829.954	100%
Lysozyme	CELAAAMK	8	836.032	100%
BSA	LCVLHEK	7	841.036	100%
Lysozyme	HGLDNYSR	7	873.924	100%
HSA	LCTVATLR	8	876.082	100%
HSA	AEFAEVSK	8	879.965	100%
BSA	DDSPDLPK	8	885.926	100%
Myoglobin	GHHEAELK	8	919.993	49.70%
BSA	AEFVEVTK	8	922.046	100%
BSA et HSA	YLYEIAR	7	927.068	90.40%
Lysozyme	WWCNDGR	7	936.012	100%
HSA	DDPNLPR	8	939.98	100%
HSA	DLGEENFK	8	951.001	86.40%
Myoglobin	PLAQSHATK	9	952.078	100%
HSA	FQNALLVR	8	960.144	100%
cytochrome c	EDLIAYLK	8	964.126	82.60%
BSA	DLGEEHFK	8	974.038	100%
BSA	NECFLSHK	8	977.103	100%
HSA	TYETTLEK	8	984.071	82.90%
HSA	QTALVELVK	9	1000.203	100%
BSA	LVVSTQTALA	10	1002.176	100%
BSA	QNCDQFEK	8	1011.074	94.70%
HSA	ETCFAEEGK	9	1013.087	92.90%
HSA	LVAASQAALGL	11	1013.202	100%
BSA	QTALVELLK	9	1014.23	100%
BSA	SHCIAEVEK	9	1015.149	83.20%
HSA	SLHTLFGDK	9	1017.15	76.80%
HSA	NECFLQHK	8	1018.155	100%
cytochrome c	CAQCHTVEK	9	1018.171	100%
BSA et HSA	CCTESLVNR	9	1024.175	79.20%
Lysozyme	GTDVQAWIR	9	1045.163	100%
BSA	EACFAVEGPK	10	1050.195	100%
HSA	LVNEVTEFAK	10	1149.309	93.10%
BSA	LVNELTEFAK	10	1163.336	93.10%
cytochrome c	TGPNLHGLFGR	11	1168.321	90.90%
HSA	AAFTECCQAADK	12	1257.399	92.80%
Lysozyme	GYSLGNWVCAAK	12	1268.453	100%

Myoglobin	LFTGHPETLEK	11	1271.436	100%
BSA	PDPNTLCDEFK	11	1278.399	86.40%
HSA	PLVEEPQNLIK	11	1279.499	100%
BSA	HPEYAVSVLLR	11	1283.493	100%
BSA	HLVDEPQNLIK	11	1305.497	100%
HSA	HPDYSVVLLLR	11	1311.547	100%
HSA	ETYGEMADCCAK	12	1320.47	100%
HSA	AVMDDFAAFVEK	12	1342.529	82.90%
BSA	TCVADESHAGCEK	13	1349.453	100%
BSA	SLHTLFGDELCK	12	1362.563	100%
BSA	ETYGDMADCCEK	12	1364.48	100%
Myoglobin	HGTVVLTALGGILK	14	1378.678	82.60%
HSA	CCAAADPHECYAK	13	1381.559	100%
HSA	TCVADESAENCDK	13	1384.452	100%
BSA et HSA	YICENQDSISSK	12	1386.496	100%
BSA	EYEATLEECCA	12	1388.527	90.60%
BSA	TVMENFVAFVDK	12	1399.625	85.90%
Lysozyme	FESNFNTQATNR	12	1428.481	100%
B-casein	VLILACLVALALAR	14	1438.878	100%
cytochrome c	TGQAPGFTYTDANK	14	1470.558	80.30%
BSA	LGEYGFQNALIVR	13	1479.699	100%
cytochrome c	EETLMEYLENPK	12	1495.664	86.60%
BSA	DDPHACYSTVFDK	13	1497.599	76.80%
Myoglobin	HPGDFGADAQGAMTK	15	1502.621	100%
BSA et HSA	VPQVSTPTLVEVSR	14	1511.739	100%
BSA	DAFLGSFLYEYSR	13	1567.718	85.50%
BSA	ECCHGDLLECADDR	14	1578.707	100%
HSA	QNCLEFEQLGEYK	13	1600.763	100%
Myoglobin	VEADIAGHGQEVLR	15	1606.799	100%
HSA	DVFLGMFLYEYAR	13	1623.887	90.40%
BSA	YNGVFQECCQAEDK	14	1633.768	89.70%
BSA	PCFSALTPDETYVPK	15	1667.894	94.10%
BSA	MPCTEDYLSLILNR	14	1667.956	100%
Lysozyme	IVSDGNGMNAWVAVR	15	1675.882	100%
HSA	PCFSALEVDETYVPK	15	1697.92	90.70%
HSA	HPYFYAPELLFFAK	14	1743.038	87.30%
Lysozyme	NTDGSTDYGILQINSR	16	1753.843	100%
Lysozyme	SLILVLCFLPLAALGK	17	1784.317	94.20%

BSA	LFTFHADICTLPDTEK	16	1851.104	100%
Myoglobin	YLEFISDAIIHVLHSK	16	1885.193	100%
BSA	HPYFYAPELLYYANK	15	1889.14	100%
HSA	VHTECCHGDLLECADDR	17	1916.085	100%
Myoglobin	MGLSDGEWQQVLNVWGK	17	1947.196	94.20%
BSA	DAIPENLPPLTADFAEDK	18	1956.136	37.70%
B-casein	FQSEEQQQTEDELQDK	16	1982.001	88.20%
BSA	WVTFISLLLLFSSAYS	17	2003.371	100%
HSA	WVTFISLLFLFSSAYS	17	2037.389	100%
B-casein	DMPIQAFLLYQEPVLPVR	19	2186.597	100%
HSA	EFNAETFFHADICTLSEK	19	2203.408	79.90%
HSA	PEVDVMCTAFHDNEETFLK	19	2225.473	82.60%
Lysozyme	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAK	23	2337.706	90.50%
HSA	MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK	21	2404.84	100%
HSA	ALVLIAFAYLQQCPFEDHVK	21	2433.851	100%
BSA	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	21	2435.823	100%
B-casein	ELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	24	2646.842	100%
HSA	SHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESK	27	2918.197	87%
B-casein	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQNIPPLTQ TPVVVPPFLQPEVMGVSK	49	5319.25	100%
B-casein	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSW MHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	56	6362.323	100%