

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE HPLC

TECHNIQUE DE SEPARATION DES COMPOSES EN SOLUTION.

### INTERET

- TECHNIQUE NON DESTRUCTIVE  
/ PERMET D'ISOLER, DE PURIFIER DES PRODUITS.
- / ANALYSE DE COMPOSES:
  - FORTEMENT POLAIRES
  - P.M. ELEVE
- SYSTEME SOUVENT FACILEMENT AUTOMATISABLE

### LIMITE

- SENSIBILITE DES DETECTEURS SAUF SI COUPLAGE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE.

## GENERALITES

LES COMPOSES A SEPARER SONT REPARTIS ENTRE 2 PHASES.

- UNE PHASE DITE STATIONNAIRE CONSTITUEE PAR UN "LIT" DE MATERIAUX.
- UNE PHASE DITE "MOBILE" QUI S'INFILTRE AU TRAVERS DE LA PREMIERE.

### LE PROCESSUS CHROMATOGRAPHIQUE



PHENOMENES D'ADSORPTIONS ET DE DESORPTIONS REPETES.

CERTAINEMENT LA PLUS ANCIENNE DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.

- **COLONNE** : SIMPLE TUBE (L: 15 A 30 cm, D.I. : 1 A 4 cm).  
NON REUTILISABLE
- **PHASE STATIONNAIRE** : PARTICULES IRREGULIERES DE SILICE (50 A 300  $\mu\text{m}$ ).
- **DEBIT** : PAR SIMPLE GRAVITE.
- **RECUEIL DES COMPOSANTS** D'UN ECHANTILLON PAR FRACTIONS SUCCESSIVES.



A PERMIS LA SEPARATION ET/OU LA PURIFICATION DE NOMBREUSES SUBSTANCES NATURELLES.

## CLHP

- **COLONNE** : FAIBLE D.I. : 1 A 5 mm  
REUTILISABLE
- **PHASE STATIONNAIRE** : SPECIALEMENT MISE AU POINT; PARTICULES (3 A 10  $\mu\text{m}$ )
- **PRESSION EN TETE DE COLONNE** : 100 A 400 bar
- **DEBIT** : PARFAITEMENT REGULE
- **INTRODUCTION DE L'ECHANTILLON** : VANNE TRES PRECISE.
- **DETECTEURS SPECIAUX**



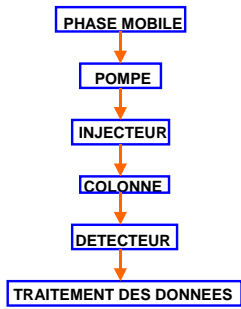
RESOLUTION ELEVEE

RAPIDITE DES ANALYSES

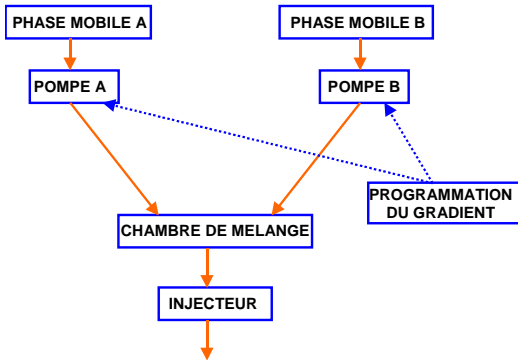
APPAREILS AUTOMATISABLES

## APPAREILLAGE

### SYSTEME ISOCRATIQUE

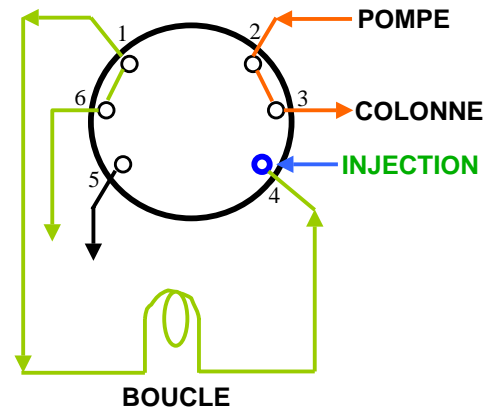


### SYSTEME A GRADIENT D'ELUTION



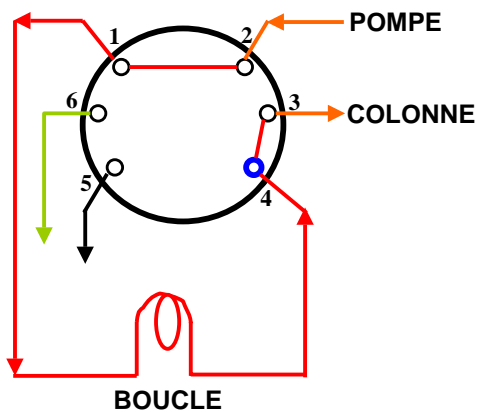
## SYSTEME D'INJECTION

### ETAPE 1



## SYSTEME D'INJECTION

### ETAPE 2



## PHASE MOBILE

### RÔLE ACTIF DANS LE MECANISME DE SEPARATION

*SON CHOIX DEPEND :*

- DU TYPE DE CHROMATOGRAPHIE
- DE LA POLARITE DES COMPOSES ETUDIES
- DU TYPE DE DETECTEUR UTILISE
- CONSTITUEE PAR UN OU PLUSIEURS ELEMENTS
- COMPOSITION :

/FIXE : SYSTEME ISOCRATIQUE

/MODIFIEE EN FONCTION DU TEMPS :  
SYSTEME A GRADIENT D'ELUTION.

## PHASE STATIONNAIRE

*SON CHOIX DEPEND DE LA TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE UTILISEE.*

- LE PLUS SOUVENT PARTICULES  
/ DE SILICE SEULES  
/ DE SILICE "GREFFEES"
- IMPORTANCE DE LA GRANULOMETRIE ("FINESSE") DES PARTICULES.



A DEBIT IDENTIQUE DES PARTICULES PLUS "FINES" ↑ LA RESOLUTION ET LE SEUIL DE DETECTION.

## B - FACTEUR DE CAPACITE

° PERMET D'EXPRIMER LE TEMPS DE "FIXATION" "D'ADSORPTION", SUR LA PHASE STATIONNAIRE, DES DIFFERENTS COMPOSES D'UN MELANGE.

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

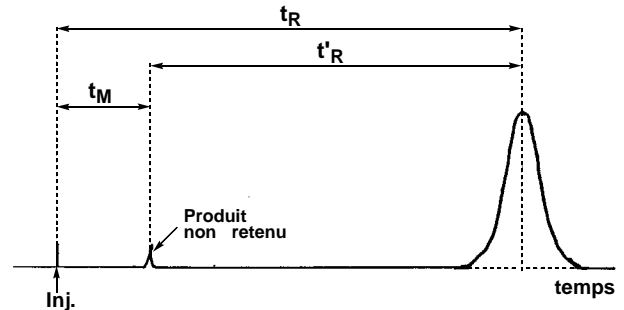
EN PRATIQUE :

$$1 < k' < 10$$

## NOTIONS THEORIQUES

### A-) TEMPS DE RETENTION (T.R.)

- SEPARATION DES COMPOSES EN FONCTION DU TEMPS



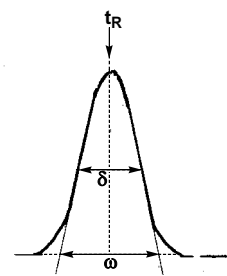
LE T.R. PEUT-ÊTRE DIVISE EN DEUX TERMES  $t_M$  ET  $t'_R$ .

$$t'_R = t_R - t_M$$

$t'_R$  = T.R. REDUIT = TEMPS DE SEJOUR D'UN COMPOSE DANS LA PHASE STATIONNAIRE.

$t_M$  = TEMPS DE SEJOUR DANS LA PHASE MOBILE

### C - CARACTERISTIQUES D'UN PIC - NOTION DE PLATEAUX THEORIQUES -



$\omega$  : LARGEUR DU PIC A LA BASE

$\delta$  : LARGEUR DU PIC A MI-HAUTEUR

° NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES :

$$n = 16 \left( \frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad \text{OU} \quad n = 5,545 \left( \frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

° UN PIC PEUT - ÊTRE CARACTERISE

/ PAR SON T.R.

/ PAR SA SURFACE

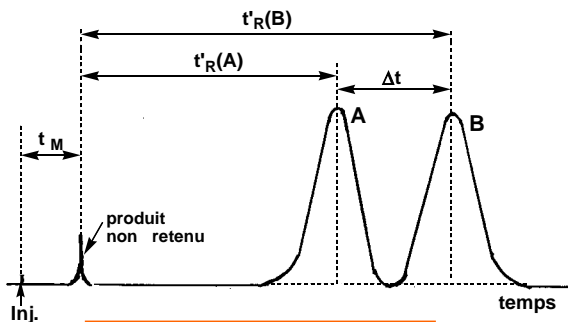
/ PAR SA HAUTEUR

## D -SEPARATION

° LA SEPARATION DE DEUX PICS ADJACENTS PEUT-ÊTRE CARACTERISEE PAR DEUX PARAMETRES :

- FACTEUR DE SELECTIVITE ( $\alpha$ )
- RESOLUTION (R)

### 1)- FACTEUR DE SELECTIVITE

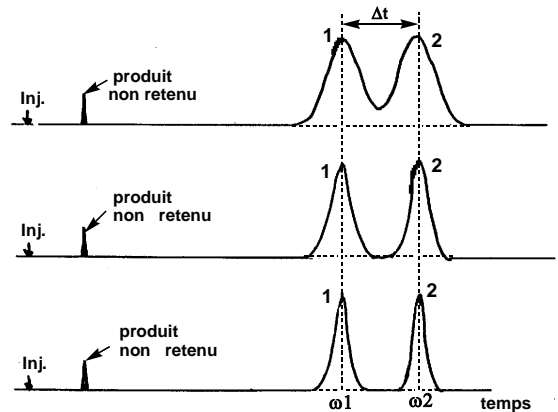


$$\alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

## 2-) RESOLUTION

- SEPARATION *REELLE* DES PICS.
- NOTION DE "*FINESSE*" DES PICS ET D'*EFFICACITE* DE LA COLONNE.

POUR UN FACTEUR DE SELECTIVITE IDENTIQUE LA RESOLUTION PEUT - ÊTRE DIFFERENTE :



$$R = \frac{\Delta t}{(\omega_1 + \omega_2)/2} = \frac{2\Delta t}{\omega_1 + \omega_2}$$

**TECHNIQUES C.L.H.P.  
LES PLUS UTILISEES  
EN PHARMACOCINETIQUE**

- CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION.
- CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE.
- CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS.
- CHROMATOGRAPHIE PAR APPARIEMENT D'IONS.

**CHROMATOGRAPHIE  
D'ADSORPTION**

PHASES STATIONNAIRES AYANT DES PROPRIETES ADSORBANTES :

- GELS DE SILICE
- " D'ALUMINE

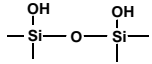
SEPARATION DE COMPOSES DE POLARITE FAIBLE OU MOYENNE.

AVEC LES COMPOSES POLAIRES OU TRES POLAIRES L'ADSORPTION EST SOUVENT IRREVERSIBLE.

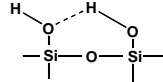
## STRUCTURE DES GELS DE SILICE

**SILICE** = DIOXYDE DE SILICIUM QUI SE

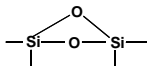
PRESENTE SOUS DIFFERENTES FORMES :



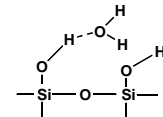
SILANOLS LIBRES



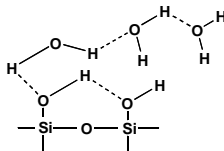
SILANOLS LIES



PONT SILOXANE



SILANOLS LIBRES HYDRATES



SILANOLS FORTEMENT HYDRATES

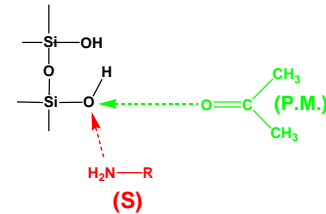
## MECANISME

° SUITE DE PROCESSUS D'ADSORPTION-DESORPTION



S = SOLUTE , M = PHASE MOBILE

EXEMPLE :



- L'ECHANTILLON (S) ADSORBE SUR UN Si-OH EST HEURTE EN CONTINU PAR LES MOLECULES DE PHASE MOBILE (P.M.) .

L'ENERGIE A FOURNIR DOIT-ÊTRE SUFFISANTE POUR DELOGER L'ECHANTILLON ADSORBE ET L'ENTRAINER JUSQU'A UN GROUPEMENT Si-OH VOISIN.....

- (S) DOIT AVOIR UNE POLARITE VOISINE DE CELLE DE (P.M.) .

## PHASE MOBILE

### -SOLVANTS APOLAIRES

/ HEXANE  
/ ISO-OCTANE  
/ CYCLOHEXANE.....EN MELANGE  
AVEC DES SOLVANTS:

### - ACCEPTEURS DE PROTONS

/ ETHER n-BUTYLIQUE  
/ " ISOPROPYLIQUE

### - DONNEURS DE PROTONS

/ CHLOROFORME  
/ FLUOROALCOOLS

### - DONNANT DES INTERACTIONS DIPOLAIRES

/ DICHLOROMETHANE  
/ DICHLORO-1,2 ETHANE

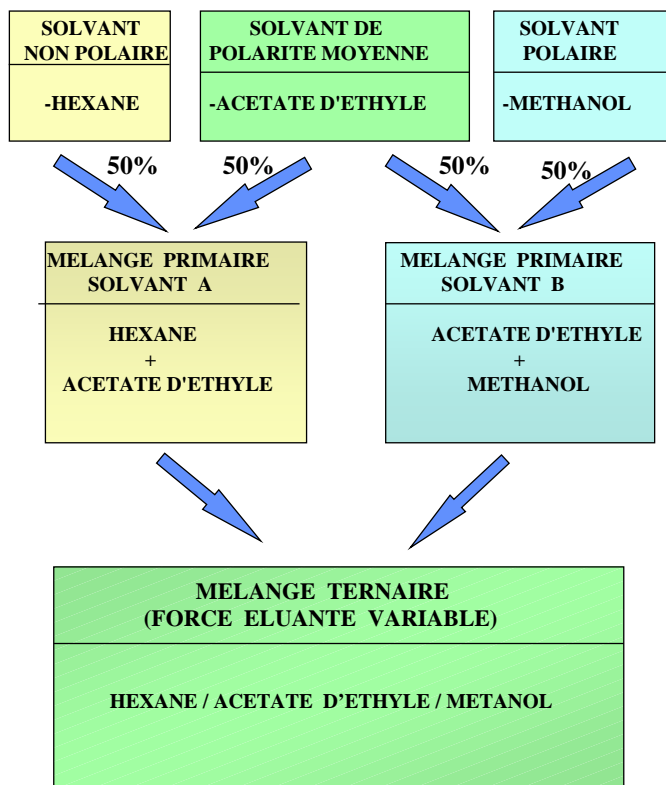
SOLVANTS UTILISES EN MELANGES BINAIRES  
OU TERNAIRES AVEC **UNE FAIBLE PROPORTION**  
DE **SOLVANTS POLAIRES** : METHANOL ,  
ACETONITRILE

## POLARITE DES SOLVANTS SELON ROHRSCHEIDER

SOLVANT	POLARITE
n-HEXANE	0,1
ISO-OCTANE	0,1
CYCLOHEXANE	0,2
TRIETHYLAMINE	1,9
ETHER n-BUTYLIQUE	2,1
ETHER ISOPROPYLIQUE	2,4
TOLUENE	2,4
BENZENE	2,7
ETHER ETHYLIQUE	2,8
CHLORURE DE METHYLENE	3,1
n-OCTANOL	3,4
n-BUTANOL	3,9
n-PROPANOL	3,9
ISOPROPANOL	3,9
TETRAHYDROFURANNE	4
CHLOROFORME	4,1
ETHANOL	4,3
ACETATE D'ETHYLE	4,4
METHYLETHYLKETONE	4,7
DIOXANNE	4,8
ACETONE	5,1
METHANOL	5,1
PYRIDINE	5,3
ACETONITRILE	5,8
N,N-DIMETHYLACETAMIDE	6,5
ETHYLENEGLYCOL	6,9
FORMAMIDE	9,6
EAU	10,2

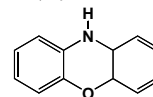
## CHOIX D'UNE PHASE MOBILE

EXEMPLE :



## EXEMPLE :

° SEPARATION DE 7 DERIVES DE LA PHENOTHIAZINE.

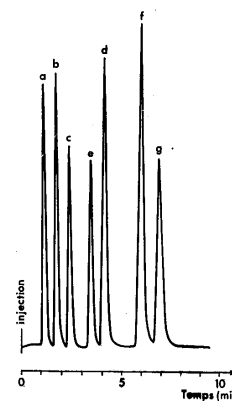


### - PHASE MOBILE:

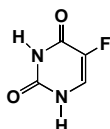
/ SOLVANT A = 65% [ISO-OCTANE (50%) + ETHER ISOPROPYLIQUE (50%) + TRIETHYLAMINE 0,2 %]

/ SOLVANT B = 35% [ETHER ISOPROPYLIQUE (50%) + METHANOL (50%) + TRIETHYLAMINE 0,2%]

-COLONNE : SILICE TYPE SPHEROSIL 6-7  $\mu$ m (L:15 cm x DI:0,6 cm), DEBIT: 1 ml/min.



## ° DOSAGE DU 5-FU.



### - PHASE MOBILE:

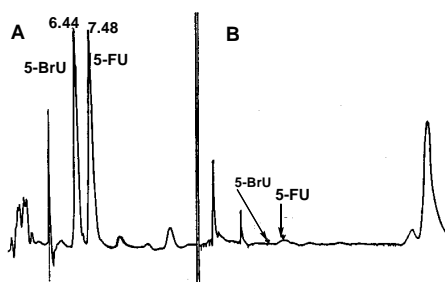
/ SOLVANT A = 75% [HEXANE] + AMMONIAQUE: 1%

/ SOLVANT B = 25% [ETHANOL] + AMMONIAQUE:1%

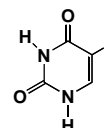
-COLONNE : SILICE TYPE  $\mu$ PORASIL 10  $\mu$ m

(L:30 cm x DI:0,39 cm), DEBIT: 1 ml/min.

INJECTION : 1  $\mu$ g



## DOSAGE DU 5-FU.



### - PHASE MOBILE:

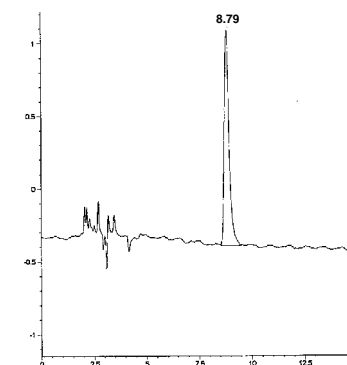
/ SOLVANT A = 21% [HEXANE (50%) + ETHER ISOPROPYLIQUE (50%) + TRIETHYLAMINE 0,05 %]

/ SOLVANT B = 79% [ETHER ISOPROPYLIQUE (50%) + METHANOL (50%) + TRIETHYLAMINE 0,05%]

-COLONNE : SILICE TYPE

LICHROSPHER Si 60 5 $\mu$ m (L:25 cm x DI:0,4 cm), DEBIT: 1 ml/min.

INJECTION : 50 ng

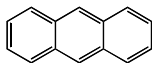




## MECANISME

### EXEMPLE:

- PHASE STATIONNAIRE: C<sub>18</sub>
- PHASE MOBILE: H<sub>2</sub>O/MeOH
- SOLUTE:



/ SOLUTE **PLUTÔT APOLAIRE SURTOUT EN INTERACTION** AVEC LES CHAINES C<sub>18</sub>.

- **↑** DU % EN MeOH DONNE **↑** DE LA SOLUBILITE DANS LA PHASE MOBILE, DONC **↑** DES INTERACTIONS AVEC LE SOLVANT ORGANIQUE CE QUI CONDUIT A UNE **↓** DU T.R.
- INVERSEMENT UNE **↑** DU % EN H<sub>2</sub>O CONDUIT A UNE **↑** DU T.R.

D'OU :

**COMPOSES POLAIRES ELUES AVANT COMPOSES APOLAIRES.**

### - RÔLE DE LA PHASE STATIONNAIRE

- ° LE T.R. ET LE  $k'$  **↑** AVEC LE NOMBRE DE CHAÎNES ALKYLE GREFFEES.
- ° VARIATION LINEAIRE DU T.R. ET DE  $k'$  AVEC LA LONGUEUR DE LA CHAÎNE.

### - RÔLE DE LA PHASE MOBILE

- ° **GENERALEMENT** : MELANGES H<sub>2</sub>O OU TAMPON / MeOH, CH<sub>3</sub>CN, ETHANOL.....
- ° **PARFOIS** : AJOUT, EN FAIBLE PROPORTION, D'UN 3<sup>ème</sup> SOLVANT, LE PLUS SOUVENT, DU T.H.F. :
- ⇒⇒ **FORTE INTERACTION AVEC LES CHAÎNES ALKYLE - MODIFICATION DE LA FORCE D'ELUTION -.**

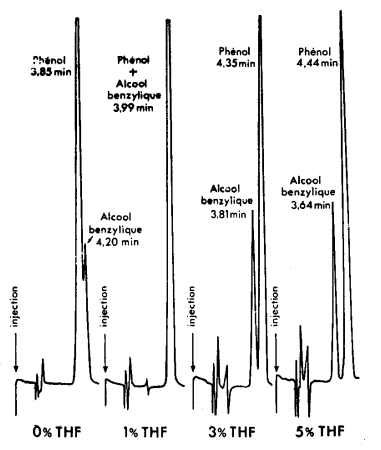
## RÔLE DU THF

### EXEMPLE:

SEPARATION DU PHENOL ET DE L'ALCOOL BENZYLIQUE.

-COLONNE :C<sub>18</sub> (30 cm x DI 0,4 cm), 10 μm

-PHASE MOBILE : H<sub>2</sub>O/MeOH (60%/40%) + THF EN PROPORTION VARIABLE



- ° **PLUS** LE SOLUTE EST **IONISE PLUS** LE T.R. EST **FAIBLE** (FORTE SOLUBILITE DANS H<sub>2</sub>O).
- ° **NECESSITE DE CONTROLER LE pH DE LA PHASE MOBILE SI LES COMPOSES ETUDIES POSSEDENT DES GROUPEMENTS ACIDES OU BASIQUES .**

/ UN COMPOSE ACIDE SERA ANALYSE A UN **pH = pKa - 2**

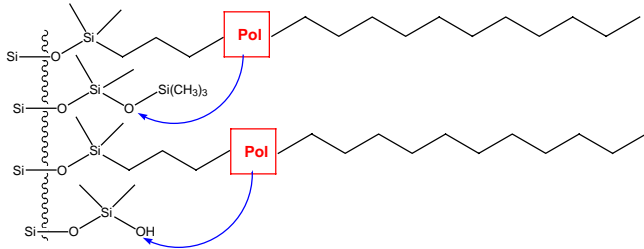
/ UN COMPOSE BASIQUE SERA ANALYSE A UN **pH = pKa + 2**



## NOUVELLES COLONNES PHASE INVERSE

### UTILISABLES:

- AVEC 100 % D'EAU ET/OU UN pH TRES ACIDE OU TRES BASIQUE



### ° CHROMATOGRAPHIE DE COMPOSES BASIQUES

“TRAINEES” EN SORTIE DE PICS, LE PLUS SOUVENT, A CAUSE D’INTERACTIONS AVEC LES SILANOLS RESIDUELS DES PHASES STATIONNAIRES.

POUR REDUIRE LE PHENOMENE :

-AGIR SUR LE pH DE LA PHASE MOBILE (3,5 < pH < 5,5) – (SELS DE POTASSIUM 0,01- 0,1 m).

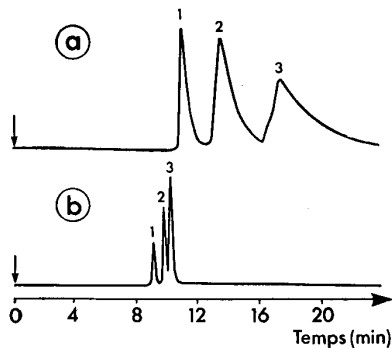
-UTILISER UN MODIFICATEUR TEL QUE LA DIETHYL OU LA TRIETHYLAMINE (0,05-0,1 M).

### ° EXEMPLE :

MELANGE : o-TOLUIDINE (1)  
m-TOLUIDINE (2)  
p-TOLUIDINE (3)

a-PHASE MOBILE: H<sub>2</sub>O/MeOH (40v/60v)

b-PHASE MOBILE : “ “ “ +  
TRIETHYLAMINE 1%

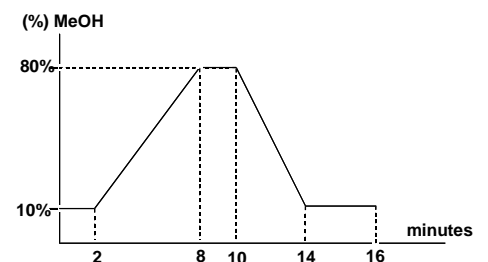
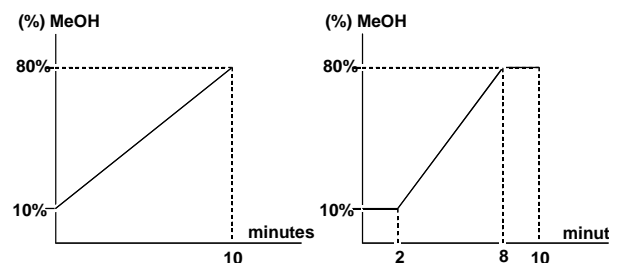


### ° GRADIENT D’ELUTION

- POUR LES MELANGES COMPLEXES (SOLUTES DE POLARITE TRES DIFFERENTE) ON UTILISERA UN GRADIENT EN DIMINUANT PROGRESSIVEMENT LA POLARITE DE LA PHASE MOBILE.

EXEMPLE DE GRADIENTS :

MELANGE H<sub>2</sub>O/MeOH



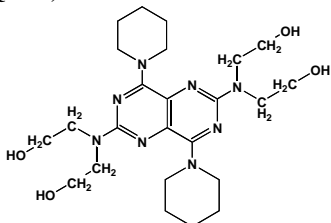
## APPLICATIONS

### TRES NOMBREUSES.

LA SIMPLICITE DES PHASES MOBILE (POLAIRES) UTILISEES ET LA QUALITE DES SEPARATIONS EXPLIQUENT LE SUCCES DE LA CLHP AVEC PHASE STATIONNAIRES INVERSEES C8, C18.

EXEMPLE :

DOSAGE DU DIPYRIDAMOLE (TRAITEMENT DE CERTAINES AFFECTIONS CARDIAQUES).



- DETERMINATION DIRECTE A PARTIR DU PLASMA.

-TEMPS D'ANALYSE COURT: COLONNE C<sub>8</sub>

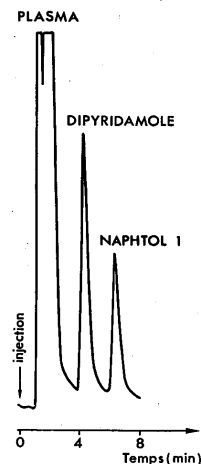
-ETALON INTERNE : NAPHTOL

-DETECTION : FLUORIMETRIE

-PHASE MOBILE:

H<sub>2</sub>O [TAMPON pH 7,4 (0,01M)]/CH<sub>3</sub>CN (60v/40v)

-COLONNE : C<sub>8</sub> TYPE LICHROSORB RP8 10µm (L: 15 cm x ID : 0,48 cm)



## CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

### PRINCIPE

- LA PHASE STATIONNAIRE EST UN ECHANGEUR D'IONS CONSTITUE PAR DES ELEMENTS PORTANT DES CHARGES EXCEDENTAIRES POSITIVES OU NEGATIVES.

° CES CHARGES SONT COMPENSEES PAR DES IONS DE POLARITE OPPOSEE:

➡ IONS - COMPENSATEURS (APPORTES PAR LA PHASE MOBILE).

° CES IONS PEUVENT ÊTRE REMPLACES PAR DES MOLECULES DE SOLUTE DE **MÊME** CHARGE.

- PHASE STATIONNAIRE :

POLYMERES DE HAUTE MASSE MOLAIRES OU GEL DE SILICE SUR LESQUELS SONT GREFFES DES GROUPEMENTS IONIQUES.

° ECHANGEURS DE CATIONS

/ GROUPEMENTS ACIDE SULFONIQUE (ECHANGEUR FORT)

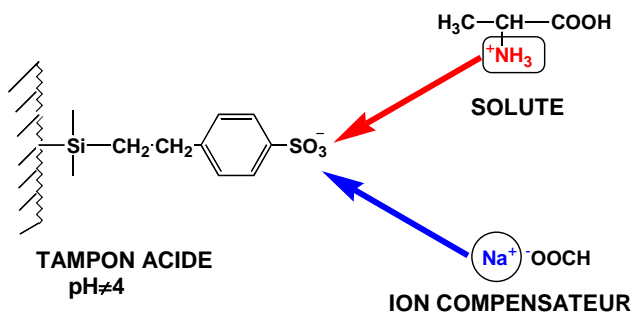
/ GROUPEMENTS ACIDE CARBOXYLIQUE (ECHANGEUR FAIBLE)

° ECHANGEURS D'ANIONS

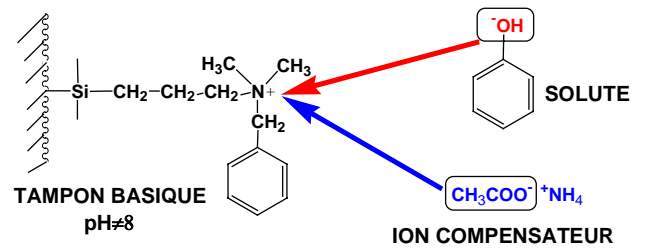
/ GROUPEMENTS AMMONIUM QUATERNAIRE

# MECANISME

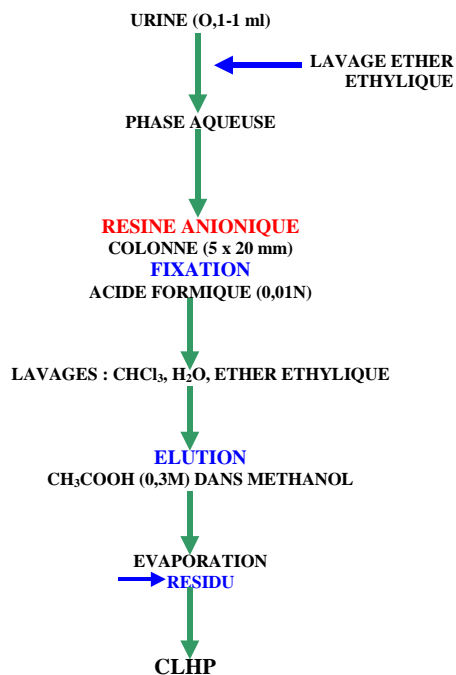
## ECHANGEUR DE CATIONS



## ECHANGEUR D'ANIONS



**EXEMPLE :**  
EXTRATION DE GLUCURONOCONJUGUES  
(FONCTION COOH)



## CHROMATOGRAPHIE DE PAIRES IONS (OU D'INTERACTIONS D'IONS)

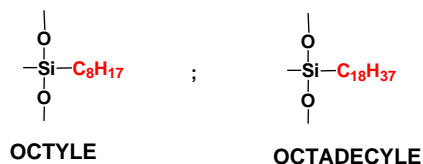
ASSOCIATION DE DEUX IONS DE CHARGE OPPOSEE DUE :

- A DES **INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES** .
- A DES **EFFETS HYDROPHOBES**  
DES IONS ORGANIQUES DE GRANDE TAILLE COMPORTANT UNE PARTIE APOLAIRE ET UN GROUPEMENT IONIQUE S'ASSOCIENT EN "PAIRES D'IONS" EN SOLUTION AQUEUSE

° UTILISEE POUR CHROMATOGRAPHIER DES SUBSTANCES IONISEES OU IONISABLES.

## PRINCIPE

### -PHASE STATIONNAIRE :



### - PHASE MOBILE :

#### MELANGE :

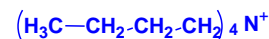
/ TAMPON (pH APPROPRIE) / MeOH,  
ACETONITRILE.....

+

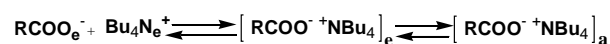
CONTRE - IONS = ION ORGANIQUE  
COMPORTANT UNE OU PLUSIEURS  
CHAÎNES HYDROPHOBES.

## EXEMPLE :

A pH 6 - 7 L'ANION D'UN ACIDE CARBOXYLIQUE  
RCOO<sup>-</sup> EN PRESENCE D'UN CATION AMMONIUM  
QUATERNAIRE, TETRABUTYL AMMONIUM PAR  
EXEMPLE



CONDUIT A LA FORMATION DE "PAIRES D'IONS"  
EN PHASE AQUEUSE EN RAISON DU CARACTERE  
HYDROPHOBE DU CATION AMMONIUM.

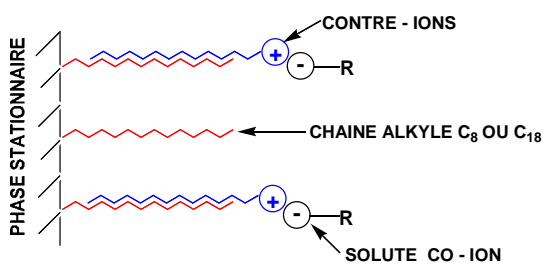


e = PHASE AQUEUSE

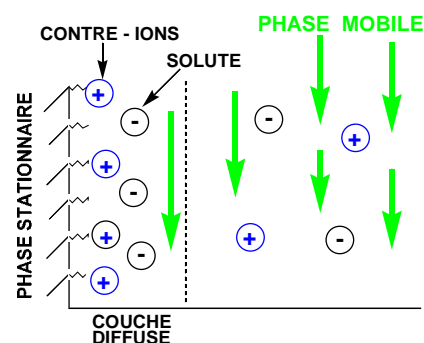
a = PHASE ORGANIQUE

## MECANISME

ON A D'ABORD PENSE QUE LE SOLUTE ET LE  
CONTRE - IONS FORMAIENT UNE "PAIRE D'IONS"  
ADSORBEE A LA SURFACE DE LA PHASE STATIONNAIRE  
APOLAIRE.



ACTUELLEMENT ON S'ACCORDE POUR DIRE QU'IL Y  
AURAIT FORMATION D'UNE **DOUBLE COUCHE**  
**ELECTRIQUE** A L'INTERFACE **PHASE STATIONNAIRE -**  
**PHASE MOBILE**.



° PHENOMENE **D'INTERACTION D'IONS** PLUTOT QUE DE  
PAIRE D'IONS.

- INTERACTION D'AUTANT **PLUS IMPORTANTE** QUE  
LE CONTRE - ION ET LE SOLUTE SONT **PLUS**  
**HYDROPHOBE** ET LA PHASE MOBILE **PLUS**  
**HYDROPHILE**.

## RÔLE :

### DE LA PHASE MOBILE, DU CONTRE-IONS, DE LA PHASE STATIONNAIRE

° LE T.R. DONC LE FACTEUR DE CAPACITE ( $k'$ ) :

- **AUGMENTE**,

/ AVEC LA CONCENTRATION DU CONTRE -IONS .

/ AVEC LA LONGUEUR DE LA CHAÎNE ALKYLE  
DU CONTRE - IONS.

/ AVEC LA LONGUEUR DE LA CHAÎNE ALKYLE  
DE LA PHASE STATIONNAIRE.

- **EST D'AUTANT PLUS ELEVE** QUE LE SOLUTE EST  
PLUS HYDROPHOBE.

- **DIMINUE** AVEC UNE AUGMENTATION DU % EN  
SOLVANT ORGANIQUE.

## RÔLE DU pH

° POUR UN **COMPOSE ACIDE** ON OBTIENDRA LE T.R.  
MAXIMUM EN TRAVAILLANT A UN :

$$\text{pH} \geq \text{pKa} + 2$$

° POUR UN **COMPOSE BASIQUE** ON OBTIENDRA LE T.R.  
MAXIMUM EN TRAVAILLANT A UN :

$$\text{pH} \leq \text{pKa} - 2$$

## IONS COMPENSATEURS LES PLUS UTILISES

- **COMPOSES BASIQUES** ANALYSES A L'AIDE DE  
SELS SODIQUES D'ALCOYLSULFONATE.

EXEMPLE :

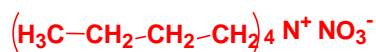
° **HEPTANE SULFONATE DE SODIUM**



- **COMPOSES ACIDES** ETUDIES AVEC DES  
PHOSPHATES OU DES NITRATES D'AMMONIUM  
TETRABUTYLE.

EXEMPLE :

° **TETRABUTYLAMMONIUM NITRATE**

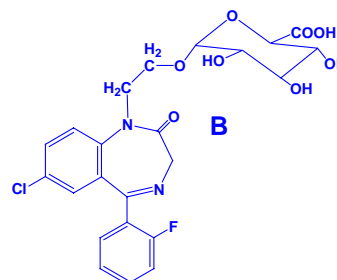
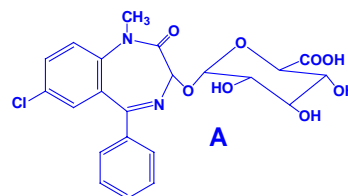


° CONCENTRATION EN IONS COMPENSATEURS DE  
**0,003 M A 0,05 M.**

## EXEMPLE :

DOSAGE DE GLUCURONOCONJUGUES DE  
BENZODIAZEPINES (METABOLITES DE PHASE II).

STRUCTURES :



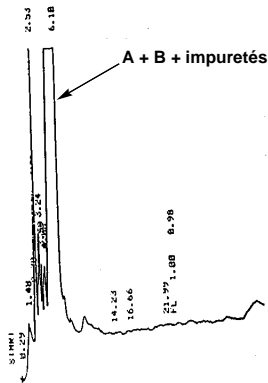
° CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

- PHASE MOBILE:

H<sub>2</sub>O (TAMPON pH 4,6 [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,025 M)]/MeOH (60v/40v).

-COLONNE : C<sub>18</sub> TYPE μBONDAPAK 10 μm (L:25 cm x DI:0,46 cm), DEBIT: 1 ml/min.

EXTRACTION A PARTIR DE 2 ml D'URINE



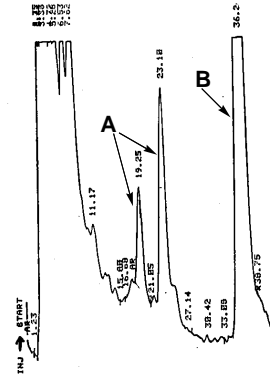
° CHROMATOGRAPHIE D'APPARIEMENT D'IONS

- PHASE MOBILE:

H<sub>2</sub>O (TAMPON pH 4,6 [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,025 M)] + **CONTRE IONS** : TBAN (0,0025M)]/MeOH (60v/40v).

-COLONNE : C<sub>18</sub> TYPE μBONDAPAK 10 μm (L:25 cm x DI:0,46 cm), DEBIT: 1 ml/min.

EXTRACTION A PARTIR DE 2 ml D'URINE



**ANALYSE QUANTITATIVE EN CLHP**

•ESSENTIELLEMENT PAR ETALONNAGE INTERNE

° PRECAUTIONS:

- LE SOLVANT D'INJECTION DOIT ASSURER UNE SOLUBILISATION TOTALE DE L'ECHANTILLON.
- LA SOLUTION INJECTEE
  - / DOIT ÊTRE LIMPIDE
  - / DOIT ÊTRE COMPATIBLE AVEC LA PHASE STATIONNAIRE ET LA PHASE MOBILE.
- IL EST PREFERABLE DE SOLUBILISER L'ECHANTILLON DANS LA PHASE MOBILE AVANT INJECTION.

° RESULTATS PLUS REPRODUCTIBLES :

- SI ELUTION EN REGIME ISOCRATIQUE.
- ELUTION PAR GRADIENT PRESENTE SOUVENT LES INCONVENIENTS SUIVANTS :
  - / DERIVE DE LA LIGNE DE BASE.
  - / APPARITION DE PICS PARASITES DUS AUX SOLVANTS ET/OU A L'EXTRACTIF.
  - / NECESSITE UN REEQUILIBRAGE DE LA COLONNE AVANT CHAQU'ANALYSE.
- IL EST IMPORTANT DE SELECTIONNER DES COLONNES MECANIQUEMENT TRES RESISTANTES ET STABLES DANS LE TEMPS.

STABILITE ET RESISTANCE ↑↑ PAR AJOUT D'UNE PRECOLONNE.

° **UNE BONNE STABILITE DE LA PHASE MOBILE EST INDISPENSABLE .**

- TOUTE VARIATION DU DEBIT OU DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE ENTRAINE UNE MODIFICATION DU T.R. ET DE LA FORME DES PICS.

*/ VARIATION DANS LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE A CAUSE :*

- DE LA VOLATILITE D'UN SOLVANT
- DE LA NON-REPRODUCTIBILITE D'UN GRADIENT D'ELUTION.

**- AMELIORATION DE LA SENSIBILITE**

° **ANALYSE AVEC DE GRANDS VOLUMES:**

INJECTION DE GRANDS VOLUMES SI SOLVANT DE FORCE ELUANTE > A CELLE DE LA PHASE MOBILE

⇒⇒ MINIMISE LA DILUTION APPORTEE PAR LA COLONNE.

° **PRECONCENTRATION DU SOLUTE**

ECHANTILLON EN SOLUTION DANS UN SOLVANT DE TRES FAIBLE FORCE ELUANTE QUI DONNE DES T.R. ELEVES. (H<sub>2</sub>O SI ON TRAVAILLE EN PARTAGE)

**ANALYSE DES TRACES :**

QUANTITE MINIMALE DETECTABLE DE 1 µg/ml A QUELQUE 100 pg/ml.

A CE NIVEAU **PROBLEME** SUSCITES :

- A LA DETECTION
- A LA RESOLUTION DES COMPOSES (ISOMERIE, COELUTION, REACTION)
- AUX INTERFERENCES DES PRODUITS DE BIODEGRADATION...

LA QUANTITE MINIMALE DETECTABLE DEPEND :

- DE LA SENSIBILITE DE LA METHODE DE DETECTION
- DE LA DILUTION APORTEE PAR LA COLONNE

**CONDITIONS IDEALES :**

- T.R. FAIBLE AVEC UNE COLONNE COURTE
- DILUTION FAIBLE DE LA PHASE MOBILE
- TRAVAILLER AVEC UNE COLONNE CAPILLAIRE.

