



HAL
open science

Mise en place et évaluation des performances d'une nouvelle gamme de système de chromatographie liquide ultra-performance (UPLC)

David Escudeiro

► **To cite this version:**

David Escudeiro. Mise en place et évaluation des performances d'une nouvelle gamme de système de chromatographie liquide ultra-performance (UPLC). Chimie analytique. 2012. dumas-01112743

HAL Id: dumas-01112743

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01112743>

Submitted on 3 Feb 2015

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.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS

PARIS

MEMOIRE

présenté en vue d'obtenir

le DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

SPECIALITE : MESURE ANALYSE

OPTION : SCIENCES ET TECHNIQUES ANALYTIQUES APPLIQUEES A LA

CHIMIE ET AU VIVANT

par

ESCUDEIRO David

**Mise en place et évaluation des performances d'une nouvelle gamme de système de
Chromatographie Liquide UltraPerformance® (UPLC®).**

Soutenu en juillet 2012

JURY

PRESIDENT : M. MOULIN Christophe

**MEMBRES : M. EVERS Michel, Mme HAUQUIER Fanny, M. PACCOU Alexandre, Mme
STEINER Valérie, Mme BARNOUD Aurélie et M. LAMBOLEY Jean-Claude**

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont accompagné tout au long de ce projet.

En premier lieu, je tiens à remercier Alexandre Paccou, responsable des laboratoires d'application et de démonstration de l'Europe du Sud, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire français mais également pour sa disponibilité et son accompagnement en tant que maître de stage.

Je remercie Fanny Hauquier, ma tutrice au CNAM, qui a été à mon écoute pendant ces 9 mois et dont les conseils ont été précieux.

Je remercie également Aurélie Barnoud, Jean-Claude Lamboley et Valérie Steiner, ingénieurs d'applications du laboratoire d'application et de démonstration France. Je leur adresse mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et pour m'avoir transmis leurs connaissances, me permettant de réaliser ce projet dans un cadre agréable et dans des conditions optimales.

Ensuite je tiens à remercier Paula Pestana, ingénieur de service car, sans son aide, ce stage n'aurait pu être réalisé dans cette entreprise.

Enfin je tiens à remercier tous les ingénieurs de services, de formations, les ingénieurs commerciaux, l'équipe de SFC/SFE & Purification et l'équipe des consommables pour leur accueil et leur intérêt à mon projet tout au long de ma présence à leurs côtés.

Merci à toutes et à tous.

Liste des abréviations

Notation et abréviation	Signification
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation <i>(Ionisation chimique à pression atmosphérique)</i>
APPI	Atmospheric Pressure Photo-Ionisation <i>(Ionisation à Pression Atmosphérique par des Photons)</i>
CC	Collision Cell <i>(Cellule de Collision)</i>
CI	Chemical Ionisation <i>(Ionisation Chimique)</i>
CID	Collision Induced Dissociation <i>(Dissociation d'ion Induite par des Collisions)</i>
EI	Electron Impact <i>(Impact Electronique)</i>
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector <i>(DéTECTEUR Evaporatif à Diffusion de Lumière)</i>
ESI	Electrospray Ionisation <i>(Ionisation par Electrospray)</i>
FLR	Fluorescence <i>(DéTECTEUR Waters de Fluorescence pour la Chromatographie Liquide)</i>
GC	Gaz Chromatography <i>(Chromatographie en phase Gazeuse)</i>
GPC	Gel Permeation Chromatography <i>(Chromatographie par Perméation de Gel)</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography <i>(Chromatographie Liquide Haute Performance)</i>
IR	Infrared <i>(Infrarouge)</i>
LC	Liquid Chromatography <i>(Chromatographie Liquide)</i>
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry <i>(Couplage Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse)</i>
LOQ	Limit Of Quantification <i>(Limite De Quantification)</i>
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization <i>(Spectrométrie de masse à Ionisation par Désorption Laser à partir d'une Matrice)</i>
MRM	Multiple Reaction Monitoring <i>(suivi simultané de plusieurs transitions)</i>
MS	Mass Spectrometry <i>(Spectrométrie de Masse)</i>
PDA	Photo Diode Array <i>(DéTECTEUR Waters Ultraviolet à barrette de diode)</i>

TOF	Time Of Flight <i>(Spectromètre de masse à Temps de Vol)</i>
UPC ² ™	UltraPerformance Convergence Chromatography™ <i>(Chromatographie de Convergence Ultra Performance)</i>
UPLC®	UltraPerformance LC® <i>(Chromatographie Liquide Ultra Performance)</i>
TUV	Tunable Ultraviolet <i>(Décteur Waters Ultraviolet monochromatique)</i>
TQ	Triple Quadrupole <i>(Spectromètre de masse Triple Quadripôle)</i>
RI	Refractive Index detector <i>(Détection d'Indice de Réfraction)</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SFC	Supercritical Fluid Chromatography <i>(Chromatographie en Phase Supercritique)</i>
SIR	Selective Ion Recording <i>(Suivi sélectif d'Ion)</i>
S/N	Signal/Noise <i>(Signal/Bruit)</i>
TIC	Total Ion Current <i>(Courant Ionique Total)</i>

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION SUR UN CHROMATOGRAMME DES NOTIONS DE TEMPS MORT T_M , TEMPS DE RETENTION T_R ET TEMPS DE RETENTION RELATIF T'_R D'UN PIC.	17
FIGURE 2 : ASYMETRIE DES PICS EN FONCTION DE LA VALEUR DU COEFFICIENT DE PARTAGE K [5].....	18
FIGURE 3 : DIFFUSION D'EDDY INFLUANT SUR L'ELARGISSEMENT DES PICS CHROMATOGRAPHIQUES.....	19
FIGURE 4 : ALLURE DES PICS CHROMATOGRAPHIQUES SUIVANT LA VALEUR DE LA RESOLUTION ENTRE CES DERNIERS.....	21
FIGURE 5 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA COURBE DE VAN DEEMTER ET DE LA DETERMINATION GRAPHIQUE DES DIFFERENTS COMPOSANTS DE L'EQUATION [9].	23
FIGURE 6 : PHOTO AU MICROSCOPE DE PARTICULES D'UNE PHASE STATIONNAIRE D'UN DIAMETRE DE 5 μM (A) ET 1,7 μM (B) AVEC UN AGRANDISSEMENT X1000. CHIMIE DES PARTICULES D'UNE COLONNE ACQUITY UPLC BEH (C) MONTRANT LE PONT ETHANE PERMETTANT DES COLONNES CAPABLES DE SUPPORTER DES TRES HAUTES PRESSIONS.....	25
FIGURE 7 : COURBE DE VAN DEEMTER OBTENUE POUR DE L'ACETOPHENONE AVEC UNE COLONNE XBRIDGE™ C18 250 X4,6X5 μM , XBRIDGE C18 150X4,6X3,5 μM ET ACQUITY BEH C18 100X2,1X1,7 μM	26
FIGURE 8 : SEPARATION D'UN MELANGE DE 7 ANALGESIQUES AVEC UNE COLONNE XTERRA MS C18 100 X 4,6 X 5 μM EN HPLC ET ACQUITY BEH C18 50 X 2,1 X 1,7 μM EN UPLC.	28
FIGURE 9 : SCHEMA D'UNE CELLULE SOUMISE A UN RAYONNEMENT D'UNE LONGUEUR D'ONDE λ . REPRESENTATION DE LA LOI DE BEER-LAMBERT.	31
FIGURE 10 : IONISATION PAR ELECTROSPRAY : NEBULISATION PERMETTANT LA FORMATION DE GOUTTELETTE.	35
FIGURE 11 : SCHEMA DE LA SOURCE EN « Z » DES DETECTEURS DE MASSE WATERS.	36
FIGURE 12 : SCHEMA D'UN ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE.	37
FIGURE 13 : DIAGRAMME DE STABILITE DES IONS DANS UN ANALYSEUR DE MASSE QUADRIPOLAIRE.....	39
FIGURE 14 : VISUALISATION ECLATEE DU SPECTROMETRE DE MASSE WATERS XEVO TQ MS.....	40
FIGURE 15 : MODE D'ACQUISITION EN LC-MS ET LS-MS/MS.	42
FIGURE 16 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DU STEPWAVE. VU ECLATEE DE L'OPTIQUE DE TRANSFERT DU XEVO TQ-S [35].	55
FIGURE 17 : VUES ECLATEES DE LA CELLULE DE COLLISION T-WAVE DU XEVO TQD.....	56
FIGURE 18 : FACTEURS PHYSIQUE ET CHIMIQUE INFLUANT SUR LA RESOLUTION.	57
FIGURE 19 : SEPARATION OBTENUE SUR LES SYSTEMES UPLC (A), HCLASS (B) ET ICLASS (C) D'UN MELANGE DE 24 ACIDES AMINES A 1.0 NMOL/ML.	59
FIGURE 20 : SEPARATION OBTENUE SUR LES SYSTEMES UPLC (A), HCLASS (B) ET ICLASS (C) D'UN MELANGE DE 4 FILTRES UV ET 4 CONSERVATEURS A 10.0 $\mu\text{G}/\text{ML}$	61
FIGURE 21 : SEPARATION OBTENUE SUR LES SYSTEMES UPLC (A), HCLASS (B) ET ICLASS (C) D'UN MELANGE DE 6 ESTERS D'ALKYL D'ACIDE SULFONIQUE A 1.0 PPM.	63

FIGURE 22 : EVOLUTION DE LA SEPARATION DES ACIDES AMINES EN FONCTION DES 3 MODES D'UTILISATION DU PREHEATER SUR HCLASS.	66
FIGURE 23 : EVOLUTION DE LA SEPARATION DES ACIDES AMINES EN FONCTION DES 3 MODES D'UTILISATION DU PREHEATER SUR ICLASS.....	67
FIGURE 24 : EVOLUTION DE LA SEPARATION DES FILTRES UV ET DES CONSERVATEURS EN FONCTION DES 3 MODES D'UTILISATION DU PREHEATER SUR ICLASS.....	69
FIGURE 25 : EVOLUTION DE LA SEPARATION DES ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE EN FONCTION DES 3 MODES D'UTILISATION DU PREHEATER SUR HCLASS.	70
FIGURE 26 : EVOLUTION DE LA SEPARATION DES ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE EN FONCTION DES 3 MODES D'UTILISATION DU PREHEATER SUR ICLASS.....	71
FIGURE 27 : OPTIMISATION DU GRADIENT SUR LE SYSTEME ICLASS DE L'ETUDE DES ACIDES AMINES.	73
FIGURE 28 : SEPARATION SUR LES SYSTEMES HCLASS ET UPLC SUITE AU TRANSFERT DE LA METHODE OPTIMISEE SUR L'ICLASS SUR CES DERNIERS SYSTEMES. INJECTION D'UNE SOLUTION A 1.0 NMOL/ML.....	73
FIGURE 29 : OPTIMISATION DU GRADIENT SUR LE SYSTEME ICLASS DE L'ETUDE DES FILTRES UV ET CONSERVATEURS.....	74
FIGURE 30 : SEPARATION SUR LES SYSTEMES HCLASS ET UPLC SUITE AU TRANSFERT DE LA METHODE OPTIMISEE SUR L'ICLASS SUR CES DERNIERS SYSTEMES. INJECTION D'UNE SOLUTION A 10.0 µG/ML.	75
FIGURE 31 : DROITE DE HENRY DES SERIES S1, S2 ET S3.	77
FIGURE 32 : CONCLUSION SUR LA PERFORMANCE INSTRUMENTALE ENTRE LES SYSTEMES UPLC, HCLASS ET ICLASS.....	79
FIGURE 33 : DROITE DE HENRY DES SERIES S4, S5 ET S6.	80
FIGURE 34 : CONCLUSION SUR LA DIFFERENCE DE SENSIBILITE DES DETECTEURS UV QUE SONT LE PDA EA, LE PDA ET LE TUV.	82
FIGURE 35 : DROITE DE HENRY DES SERIES S7 ET S8.....	84
FIGURE 36 : RAPPORT MOYEN DE PERTE DE SENSIBILITE INTER-INSTRUMENT ENTRE LE SQD 2 ET LE XEVO TQD EN MODE FS ET SIR SUR L'ANALYSE DES PESTICIDES.	85
FIGURE 37 : DROITE DE HENRY DES SERIES S9 ET S10.....	86
FIGURE 38 : RAPPORT MOYEN DE GAIN DE SENSIBILITE POUR LE SQD 2 ET LE XEVO TQD ENTRE LE MODE FS ET SIR SUR L'ANALYSE DES PESTICIDES.	87
FIGURE 39 : SIGNAUX DU CHLORPYRIFOS (CHLOR) EN MODE FS ET SIR AVEC LE SQD 2 ET LE XEVO TQD.	88
FIGURE 40 : RECAPITULATIF DES RAPPORTS MOYENS DE GAIN/PERTE ENTRE LE SQD 2 ET LE XEVO TQD SUIVANT LE MODE D'ACQUISITION SUR L'ANALYSE DES PESTICIDES.	88
FIGURE 41 : DROITE DE HENRY DE LA SERIE S11.....	89
FIGURE 42 : RAPPORT MOYEN DE GAIN DE SENSIBILITE AVEC UN XEVO TQ-S VIS A VIS D'UN XEVO TQD EN MODE MRM SUR L'ANALYSE DES PESTICIDES.	90
FIGURE 43 : SIGNAUX DU 2.4 D EN MODE MRM AVEC LE XEVO TQD ET LE XEVO TQ-S.....	91
FIGURE 44 : SCHEMA DE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE POMPE QUATERNAIRE. IL S'AGIT D'UNE CAPTURE D'IMAGE PROVENANT DE LA CONSOLE DE PILOTAGE ACQUITY UPLC UPLC DE LA POMPE QSM DE L'HCLASS.....	96

FIGURE 45 : SCHEMA DE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE POMPE BINAIRE. IL S'AGIT D'UNE CAPTURE D'IMAGE PROVENANT DE LA CONSOLE DE PILOTAGE ACQUITY UPLC DE LA POMPE BSM DE L'UPLC.	96
FIGURE 46 : SCHEMA DE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN INJECTEUR EN LIGNE. IL S'AGIT D'UNE CAPTURE D'IMAGE PROVENANT DE LA CONSOLE DE PILOTAGE ACQUITY UPLC DE L'INJECTEUR FTN DE L'HCLASS.	97
FIGURE 47 : SCHEMA DE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN INJECTEUR HORS LIGNE. IL S'AGIT D'UNE CAPTURE D'IMAGE PROVENANT DE LA CONSOLE DE PILOTAGE ACQUITY UPLC DE L'INJECTEUR SM DE L'UPLC.	97
FIGURE 48 : SCHEMA DE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN DETECTEUR UV MONO LONGUEUR D'ONDE. IL S'AGIT D'UNE CAPTURE D'IMAGE PROVENANT DE LA CONSOLE DE PILOTAGE ACQUITY UPLC DU DETECTEUR ACQUITY UPLC TUV.	103
FIGURE 49 : SCHEMA DE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN DETECTEUR UV A BARRETTE DE DIODE. IL S'AGIT D'UNE CAPTURE D'IMAGE PROVENANT DE LA CONSOLE DE PILOTAGE ACQUITY UPLC DU DETECTEUR ACQUITY UPLC PDA.	103
FIGURE 50 : DETERMINATION DU VOLUME MORT D'UN SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE.	105
FIGURE 51 : PREMIERE ETAPE DE TRANSFERT DE GRADIENT AVEC L'ACQUITY UPLC COLUMN CALCULATOR.	107
FIGURE 52 : RESULTATS OBTENUS AVEC LE CALCULATEUR POUR REALISER L'ANALYSE SUR LE NOUVEAU SYSTEME UPLC.	108
FIGURE 53 : DISPOSITION DES SERIES DE RESULTATS SOUMISES A UNE ANALYSE DE LA VARIANCE.	122

Liste des tableaux

TABLEAU I : GRADIENT DE PHASE MOBILE EN HPLC ET UPLC POUR LA SEPARATION DE 7 ANALGESIQUES A UN DEBIT RESPECTIF DE 1,0 ET 0,6 ML.MIN ⁻¹ . LA VOIE A EST COMPOSEE D'EAU A 1% EN ACIDE FORMIQUE ET LA VOIE B EN ACETONITRILE A 1% EN ACIDE FORMIQUE.	27
TABLEAU II : COMPARAISON DES RESULTATS DE LA SEPARATION OBTENUE PAR HPLC ET UPLC.	29
TABLEAU III : UTILISATION DE DIVERSES METHODES D'IONISATION.	34
TABLEAU IV : GRADIENT DE LA PHASE DE MOBILE DES SYSTEMES UPLC, HCLASS ET ICLASS POUR L'ETUDE DES ACIDES AMINES.	46
TABLEAU V : GRADIENT DE LA PHASE MOBILE DES SYSTEMES UPLC, HCLASS ET ICLASS POUR L'ETUDE DES FILTRES UV ET CONSERVATEURS.	47
TABLEAU VI : GRADIENT DE LA PHASE MOBILE DES SYSTEMES UPLC, HCLASS ET ICLASS POUR L'ETUDE DES ESTERS D'ALKYL D'ACIDE SULFONIQUE.	48
TABLEAU VII : COMPARAISON DES SYSTEMES ACQUITY UPLC DE WATERS HORS DETECTION.	51
TABLEAU VIII : COMPARAISON DES DETECTEURS ACQUITY UPLC UV DE WATERS.	53
TABLEAU IX : COMPARAISON DES SPECTROMETRES DE MASSE DE LA FAMILLE XEVO DE WATERS.	54
TABLEAU X : PERMUTATION DES LONGUEURS D'ONDES POUR CHAQUE SYSTEME AU COURS DE L'ACQUISITION AFIN DE DETECTER L'ENSEMBLE DES MOLECULES SUR UN MEME CHROMATOGRAMME.	61
TABLEAU XI : CONDITIONS OPTIMISEES D'ACQUISITION MS/MS DES DIFFERENTS PESTICIDES.	104
TABLEAU XII : RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS SUR UPLC ET HCLASS DES RESOLUTIONS ET DES PLATEAUX THEORIQUES POUR LES 24 ACIDES AMINES.	109
TABLEAU XIII : RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS SUR UPLC ET ICLASS DES RESOLUTIONS ET DES PLATEAUX THEORIQUES POUR LES 24 ACIDES AMINES.	110
TABLEAU XIV : COEFFICIENT DE CORRELATION LINEAIRE DE LA GAMME D'ETALONNAGE ET COEFFICIENT DE VARIATION DU TEMPS DE RETENTION, DE L'AIRE ET DE LA HAUTEUR SUR UNE REPETABILITE DE 6 INJECTIONS D'UNE SOLUTION A 1 NMOL/ML POUR L'ENSEMBLE DES ACIDES AMINES.	111
TABLEAU XV : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR SER, ARG, LYS ET TYR FORMANT DES COELUTION SUR LES SYSTEMES HCLASS ET ICLASS.	112
TABLEAU XVI : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR SER, ARG, LYS ET TYR SUR LE SYSTEME HCLASS SUIVANT LE MODE D'UTILISATION DU PREHEATER.	112
TABLEAU XVII : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR SER, ARG, LYS ET TYR SUR LE SYSTEME ICLASS SUIVANT LE MODE D'UTILISATION DU PREHEATER.	112
TABLEAU XVIII : RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS SUR UPLC, HCLASS ET ICLASS DES RESOLUTIONS ET DES PLATEAUX THEORIQUES POUR LES FILTRES UV ET CONSERVATEURS.	113
TABLEAU XIX : COEFFICIENT DE CORRELATION LINEAIRE DE LA GAMME D'ETALONNAGE ET COEFFICIENT DE VARIATION DU TEMPS DE RETENTION, DE L'AIRE ET DE LA HAUTEUR SUR UNE REPETABILITE DE 6 INJECTIONS D'UNE SOLUTION A 10.0 µG/ML POUR L'ENSEMBLE DES FILTRES UV ET CONSERVATEURS.	113

TABLEAU XX : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR LES FILTRES UV ET LES CONSERVATEURS SUR LES SYSTEMES HCLASS ET ICLASS.....	114
TABLEAU XXI : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR LES FILTRES UV ET LES CONSERVATEURS SUR LE SYSTEME ICLASS SUIVANT LE MODE D'UTILISATION DU PREHEATER.	114
TABLEAU XXII : RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS SUR UPLC, HCLASS ET ICLASS DES RESOLUTIONS ET DES PLATEAUX THEORIQUES POUR LES ESTERS D'ALKYL D'ACIDE SULFONIQUE.	115
TABLEAU XXIII : COEFFICIENT DE CORRELATION LINEAIRE DE LA GAMME D'ETALONNAGE ET COEFFICIENT DE VARIATION DU TEMPS DE RETENTION, DE L'AIRE ET DE LA HAUTEUR SUR UNE REPETABILITE DE 6 INJECTIONS D'UNE SOLUTION A 1 PPM POUR L'ENSEMBLE DES ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE. ..	115
TABLEAU XXIV : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR LES ESTERS D'ALKYLES D'ACIDE SULFONIQUE SUR LES SYSTEMES HCLASS ET ICLASS.	116
TABLEAU XXV : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR LES ESTERS D'ALKYLES D'ACIDE SULFONIQUE SUR LE SYSTEME HCLASS SUIVANT LE MODE D'UTILISATION DU PREHEATER.....	116
TABLEAU XXVI : ETUDE DE LA VARIATION DU NOMBRE DE PLATEAUX THEORIQUES POUR LES ESTERS D'ALKYLES D'ACIDE SULFONIQUE SUR LE SYSTEME ICLASS SUIVANT LE MODE D'UTILISATION DU PREHEATER.....	116
TABLEAU XXVII : FORMULES DE CALCUL DES ECARTS QUADRATIQUES ET DES VARIANCES CORRESPONDANTES.	122
TABLEAU XXVIII : RESULTATS OBTENUS LORS DE LA COMPARAISON DE SENSIBILITE DES DETECTEURS UV AVEC LES ACIDES AMINES, LES FILTRES UV ET CONSERVATEURS ET LES ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE.....	125
TABLEAU XXIX : RESULTATS OBTENUS LORS DE L'ETUDE DE COMPARAISON DU SQD 2 ET DU XEVO TQD AVEC UNE SOLUTION STANDARD A 100 PPB.....	128
TABLEAU XXX : RESULTATS OBTENUS LORS DE L'ETUDE DE COMPARAISON DU XEVO TQD ET DU XEVO TQ-S AVEC UNE SOLUTION STANDARD A 1000 PPT	129

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	7
SOMMAIRE	9
INTRODUCTION	11
APPROCHE THEORIQUE DES TECHNIQUES ANALYTIQUES	14
I. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	14
A) L'INSTRUMENTATION	14
1. <i>La pompe</i>	14
2. <i>L'injecteur</i>	15
3. <i>La séparation au niveau de la colonne</i>	15
4. <i>La détection</i>	16
B) NOTIONS FONDAMENTALES	17
1. <i>Le temps</i>	17
2. <i>Coefficient de partage et facteur de capacité</i>	18
3. <i>Mesure de l'efficacité de séparation</i>	19
C) THEORIE DYNAMIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE.....	21
II. DE L'HPLC VERS L'UPLC	24
A) LIMITATIONS DE L'HPLC.....	24
B) OPTIMISATION DES COLONNES	25
C) OPTIMISATION DE L'INSTRUMENTATION	26
D) LES BENEFICES DE LA TECHNOLOGIE UPLC VIS A VIS DE L'HPLC.....	27
III. DETECTION DANS L'ULTRA VIOLET (UV)	30
A) RAPPEL DES PRINCIPES DE L'ABSORPTION UV	30
B) INSTRUMENTATION EN LC	31
IV. LA SPECTROMETRIE DE MASSE	32
A) GENERALITES	32
B) PRINCIPE ET INSTRUMENT WATERS	34
1. <i>La source : ionisation par électrospray (ESI)</i>	34
2. <i>L'analyseur : le quadripôle</i>	37
3. <i>Couplage d'analyseur de masse : le Triple Quadripôle</i>	40
4. <i>La détection</i>	41
C) LES MODES D'ACQUISITIONS EN LC-MS ET LC-MS/MS.....	42
MATERIELS ET METHODES	44
I. CHOIX DES ETUDES REALISEES	44
A) ÉTUDE DES ACIDES AMINES	44

B)	ETUDE DES FILTRES UV ET CONSERVATEURS	46
C)	ETUDE D'ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE	48
D)	ETUDE DES PESTICIDES	49
II.	CARACTERISTIQUES DES INSTRUMENTS WATERS	50
A)	COMPARAISON DES SYSTEMES ACQUITY UPLC	50
B)	COMPARAISON DES DETECTEURS UV DE LA GAMME ACQUITY DE WATERS	53
C)	COMPARAISON DES DETECTEURS MS QUADRIPOLE DE WATERS	54
	RESULTATS ET DISCUSSIONS	57
I.	DETERMINATION DE LA PERFORMANCE INSTRUMENTALE SUR UNE ANALYSE	57
A)	CHOIX DES CRITERES DE PERFORMANCES SUIVIS	57
B)	ETUDE DES ACIDES AMINES	58
C)	ETUDE DES FILTRES UV ET CONSERVATEURS	60
D)	ETUDE D'ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE	62
E)	CONCLUSIONS PRELIMINAIRES	64
II.	DETERMINATION DE L'INFLUENCE DU SYSTEME DE PRECHAUFFAGE	64
A)	VARIATION DU MODE D'UTILISATION DU PREHEATER	65
1.	<i>Etude des acides aminés</i>	<i>65</i>
2.	<i>Etude des filtres UV et conservateurs.....</i>	<i>68</i>
3.	<i>Etude des esters d'alkyle d'acide sulfonique</i>	<i>70</i>
B)	TRANSFERT DE METHODE DE L'ICLASS VERS HCLASS ET UPLC	72
1.	<i>Etude des acides aminés</i>	<i>72</i>
2.	<i>Etude des filtres UV et conservateurs.....</i>	<i>74</i>
C)	CONCLUSIONS DE LA PERFORMANCE DES INSTRUMENTS	76
III.	DETERMINATION DE LA PERFORMANCE DE SENSIBILITE DES DETECTEURS UV	79
IV.	DETERMINATION DE LA PERFORMANCE DE SENSIBILITE DES DETECTEURS MS	83
A)	COMPARAISON ENTRE LE SQD 2 ET LE XEVO TQD	83
1.	<i>Comparaison de sensibilité en mode FS et SIR inter-instrument.....</i>	<i>84</i>
2.	<i>Comparaison de sensibilité en mode FS et SIR intra-instrument.....</i>	<i>85</i>
3.	<i>Conclusion sur la différence de sensibilité du SQD 2 et du Xevo TQD.....</i>	<i>87</i>
B)	COMPARAISON ENTRE LE XEVO TQD ET LE XEVO TQ-S	89
	CONCLUSION	92
	ANNEXES	95
	BIBLIOGRAPHIE	131

Introduction

En 1901, Mikhaïl Semenovitch Tswett sépara des pigments végétaux colorés, qui étaient entraînés par une phase liquide d'éther de pétrole, par adsorption sur une colonne remplie de carbonate de calcium. Cette expérience lui permit de séparer la chlorophylle des caroténoïdes. Le terme chromatographie (venant du grec ancien *Khrôma* signifiant couleur, et *Graphêin* signifiant écrire) pour désigner cette méthode ne fut utilisé pour la première fois qu'en 1906.

Cette technique fut oubliée pendant plus de 20 ans, et il a fallu attendre 1930 pour qu'elle soit mise en avant par le biologiste français Edgar Lederer pour purifier la lutéine du jaune d'œuf. En 1940, Archer John Porter Martin et Richard Laurence Millington Syngé développèrent la pratique et la théorie de la chromatographie ce qui leur permit d'obtenir le prix Nobel de Chimie en 1952. La même année la chromatographie en phase gazeuse (GC) a été mise au point. Elle se présentait comme la technique analytique suprême. Pourtant seulement 15% des composés organiques sont volatiles et sont analysables en GC. Il restait encore 85% des composés organiques non volatiles comme les protéines, les polymères ou encore les acides aminés à analyser [1-2]

Jim Waters exerça les professions de professeur de mathématique à l'université, officier dans la Navy, puis ingénieur de projet. Il fonda en 1958 la société Waters Associates. Son but était de construire des instruments dans plusieurs domaines d'applications. Il mit au point des photomètres, un ballon hydromètre ou encore des réfractomètres (RI : Refractive Index) par exemple.

Au début des années 60, Waters Associates négocia l'exclusivité de l'exploitation du brevet de Terry Moore qui avait inventé une méthode instrumentale pour analyser les polymères par perméation de gel. Ainsi en 1963, la première Chromatographie par Perméation de Gel (GPC) de Waters Associates fut commercialisée. Ce fut un succès considérable marquant le début de la croissance de la société.

L'apparition de la Chromatographie Liquide (LC) en 1965 a permis l'analyse des 85% des composés organiques volatiles restants. Cette même année, Waters Associates décida d'investir dans cette technologie. Jim Waters déclara lui-même dans une note interne « *Nous croyons en la LC qui peut devenir un marché de masse, qui s'étendra bien au-delà du*

laboratoire de recherche en production, du contrôle qualité et des essais cliniques ». En 1967, le premier système LC de Waters Associates, l'ALC 100, a vu le jour avec une détection UV. En 1970, la société comptait 1 100 employés, plus de 10 000 clients et plus de 12 000 instruments installés. En 1972, Jim Waters et le Dr. Helmut Hamberger, superviseur du post-doc du Dr. Robert Woodward (lauréat du prix Nobel de Chimie en 1965 pour la synthèse de la chlorophylle) ont collaboré pour isoler et purifier la vitamine B₁₂. Cette collaboration fut un succès à la fois sur les plans technique et scientifique car en à peine 10 jours, ils réussirent à isoler 200 mg de ce composé, mais aussi pour la société Waters Associates. Avec cette prouesse, ils réussirent à convaincre les plus sceptiques de l'intérêt de la LC.

En mai 1980, Waters Associates fut racheté par Millipore Corporation et fut renommé Waters Chromatography Division. Mais en 1993, Millipore décida de se séparer de cette filiale. En 1994, cette division fut rachetée pour 360 millions de dollars par un groupe d'investisseurs composé de l'équipe d'encadrement déjà présente chez Waters Chromatography Division. En 1996, avec l'acquisition de Micromass, le groupe devint Waters Corporation et investit le monde de la Spectrométrie de Masse (MS) ainsi que celui des couplages entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (LC-MS). Depuis Waters Corporation entretient une solide réputation dans le monde de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse, et se présente également comme une société d'innovation technologique avec récemment le développement de la Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC®) en 2004 [3].

J'ai réalisé mon stage d'ingénieur dans la société Waters® sur le site de Saint-Quentin-en-Yvelines. Il s'agit du siège français et européen du groupe. Plus précisément, ce travail a été effectué au sein du laboratoire d'application et de démonstration pour la France. L'activité du laboratoire se décline en trois axes principaux : la mise au point, le développement de méthodes ou le transfert de technologie en UPLC par détection UV, fluorescence ou MS ; la réalisation de démonstrations en collaboration avec un ingénieur commercial au laboratoire ou chez le client ; la formation du client à l'utilisation des logiciels et instruments.

Les besoins des clients et des laboratoires sont au centre des innovations technologiques actuelles. Les laboratoires, les industries et la législation des Etats souhaitent de plus en plus un gain de performance et de sensibilité de l'instrumentation afin d'augmenter leur capacité de production de leur produit, de détecter des composés à l'état de traces, avec une rentabilité maximale.

De ce fait, les constructeurs d'instruments analytiques, comme le groupe Waters, mettent au point des solutions capables de répondre à ces besoins. Ces solutions globales comprennent l'instrument, le logiciel, les consommables utiles autour de la technique d'analyse et le support technique permettant au client de choisir aisément la solution correspondant le mieux à son besoin spécifique.

Mon étude consiste en l'évaluation des performances de la gamme UPLC proposée par Waters. Cette évaluation a pour but de déterminer de façon quantitative les gains ou pertes obtenus lors d'un transfert d'une méthode d'analyse vers différents systèmes UPLC. Les performances seront évaluées par la réalisation et le développement de différents protocoles d'analyses. Après avoir réalisé ces différents développements sur un système Acquity UPLC®, ces méthodes seront transférées sur les systèmes HClass et IClass, plus récents, avec le même détecteur, ceci afin d'évaluer l'impact de l'instrumentation hors détection sur l'analyse. Puis pour mesurer l'impact de la détection sur une analyse, celle-ci sera réalisée sur l'ensemble des détecteurs possibles avec le même instrument. Dans le cadre de cette étude, les détecteurs des gammes UV et MS seront évalués.

Dans une première partie, nous verrons brièvement le fonctionnement de l'HPLC et des notions fondamentales liées à la chromatographie liquide. Puis nous verrons l'apport de la technologie UPLC vis-à-vis de l'HPLC avant de faire un bref rappel du fonctionnement d'un détecteur UV et MS avec un analyseur quadripolaire.

Ensuite dans une seconde partie, nous présenterons les protocoles utilisés au cours de ce stage afin de réaliser les quatre études utilisées. Puis nous évaluerons les différences et les similitudes entre les instruments proposés par Waters.

Enfin dans une dernière partie, après avoir réalisé un traitement statistique des résultats, nous déterminerons la performance des instruments UPLC de gamme Acquity®, des détecteurs UV de la gamme Acquity et les spectromètres de masse de la gamme quadripolaire.

Approche théorique des techniques analytiques

La chromatographie permet de séparer différents composés d'un mélange grâce à leurs différences d'affinités avec deux phases non miscibles. Ainsi un soluté A est réparti entre ces deux phases, dont l'une est dite stationnaire (S) et l'autre dite mobile (M).

Il existe différentes techniques de chromatographie. Nous pouvons citer par exemple la Chromatographie en Phase Gazeuse (GC), la Chromatographie en Phase Super Critique (SFC), ou encore la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement à cette dernière.

I. La Chromatographie Liquide Haute Performance

L'HPLC est une technique de chromatographie permettant de séparer les composés d'un mélange à haute pression. L'instrument chromatographique comporte quatre principaux composants : la pompe, l'injecteur, la colonne et le détecteur. L'échantillon est injecté dans le système chromatographique et est entraîné par un liquide (phase mobile), d'une certaine polarité, vers une colonne remplie (phase stationnaire) d'une polarité différente. Par différence d'affinité entre les phases, les composés sont séparés avec des temps d'élution, dit temps de rétention, différents.

a) L'instrumentation

1. La pompe

Il existe couramment deux systèmes de pompage en HPLC. On nomme pompe quaternaire, un système composé physiquement d'une seule pompe permettant de mélanger jusqu'à 4 solvants provenant de 4 voies distinctes. Le mélange de solvants s'effectuant avant la pompe, on parle de mélangeur basse pression. Le second système est nommé pompe binaire et est composé physiquement de deux pompes permettant de mélanger uniquement 2 solvants provenant de deux voies différentes. Le mélange de solvants s'effectuant après la pompe, on parle de mélangeur haute pression [4]. Le schéma de principe de pompes quaternaire et binaire est détaillé en Annexe 1 (page 96).

Deux éluions distinctes sont réalisables :

- l'une appelée isocratique (la composition de la phase mobile ne varie pas au cours du temps),
- l'autre appelée gradient (la composition de la phase mobile varie au cours du temps).

2. L'injecteur

L'injecteur permet de prélever un volume précis de l'échantillon afin de l'introduire dans le système chromatographique. Le système d'injection peut être intégré ou non au circuit de la phase mobile. L'intérêt d'un système d'injection hors ligne est la possibilité de rincer l'aiguille en dehors du circuit d'éluion et durant l'acquisition. De même avant la fin de l'acquisition, le système peut commencer le prélèvement de l'échantillon afin de diminuer le temps d'injection d'une acquisition à une autre. L'intérêt d'un système en ligne est que l'injecteur et l'intérieur de l'aiguille sont rincés en continu par l'éluant, diminuant les risques d'effet mémoire. Un système de vanne permet de faire le basculement entre la position prélèvement d'échantillon et injection, évitant toute perturbation du système. Les schémas de principe d'un injecteur en ligne et hors ligne sont représentés en Annexe 2 (page 97).

3. La séparation au niveau de la colonne

Les molécules peuvent être dissymétriques, ce qui implique que le nuage électronique n'est pas réparti de façon uniforme autour de la molécule [5]. Cette inhomogénéité crée un moment dipolaire permanent pour la molécule et donc un champ électrique local. La variation de ce moment dipolaire permet de caractériser la molécule suivant sa polarité et de créer des échelles. On compare ainsi une molécule à une autre en comparant leur polarité.

D'autres molécules sont dites polarisables, c'est à dire que ces molécules ne possèdent pas de moment dipolaire permanent mais sous l'effet d'un champ électrique, un moment dipolaire induit peut être créé correspondant à une déformation des orbitales électroniques.

Pour qu'il y ait séparation dans la colonne, il faut que les molécules interagissent de manière différente avec la phase stationnaire et mobile. Ceci implique que ces dernières soient de polarités différentes. Ainsi si la phase stationnaire est polaire, les molécules polaires

seront plus retenues que les composés apolaires, et inversement si la phase stationnaire est apolaire.

Lorsque la phase stationnaire est polaire, on parle de chromatographie liquide en phase normale. Classiquement la phase stationnaire est composée de groupements silanols Si-OH. La phase mobile est composée de molécule très apolaire comme les alcanes (l'heptane ou de l'hexane par exemple). Lorsque les polarités sont inversées par rapport au mode précédent, on parle de chromatographie liquide en phase inverse. La phase mobile est composée de molécules polaires comme l'eau, le méthanol ou l'acétonitrile par exemple. Les particules de silice remplissant la colonne sont enrobées par de la paraffine en C18 par exemple (une chaîne alcane de 18 atomes de carbone). Différents groupements fonctionnels peuvent aussi être greffés pour faire varier la polarité de la phase stationnaire. Cela permet d'exploiter au mieux les affinités des molécules avec les phases, et ainsi d'obtenir des sélectivités différentes suivant les colonnes utilisées. Les groupements fonctionnels disponibles chez Waters pour les colonnes HPLC sont répertoriés en Annexe 3 (page 98) [6].

4. La détection

En chromatographie liquide, différentes détections sont possibles. Le détecteur est choisi en fonction des propriétés des molécules d'intérêts. On choisira également un détecteur afin d'avoir une sensibilité et une spécificité de réponse en adéquation avec les besoins de l'analyse. Voici une liste des détecteurs disponibles en LC :

- détection UV en mono longueur d'onde (TUV) ou par acquisition de spectre UV (PDA),
- détection par fluorescence (FLR),
- détection par indice de réfraction (RI),
- détection par spectrométrie de masse (MS),
- détection évaporatif par diffusion de lumière (ELSD),
- détection infrarouge (IR),
- détection par résonance magnétique nucléaire (RMN).

Il existe également des possibilités de couplage entre ces différents détecteurs comme un couplage LC-TUV/FLR, ou encore LC-MS/RMN par exemple.

b) Notions fondamentales

Il existe différentes notions dites fondamentales permettant la compréhension des mécanismes de la chromatographie liquide.

1. Le temps

La notion de temps en chromatographie se mesure en minute et se caractérise par quatre grandeurs qui sont les suivantes [5] :

- le temps qui marque le début de l'injection soit t_0 ,
- le temps mort t_m correspond au temps que met un composé non retenu à traverser la colonne. Il correspond au volume mort de la colonne,
- le temps de rétention t_R est le temps d'élution d'un composé entre l'entrée de la colonne et le détecteur. Il dépend des interactions de la molécule avec les phases mobile et stationnaire ainsi que des conditions d'analyses (la température, le débit de la phase mobile, etc.),
- le temps de rétention réduit t'_R correspond au temps passé par le composé dans la phase stationnaire de la colonne. Il s'obtient par l'équation suivante :

$$t'_R = t_R - t_m \quad (1)$$

La Figure 1, ci-dessous, montre comment repérer ces grandeurs sur un chromatogramme [4].

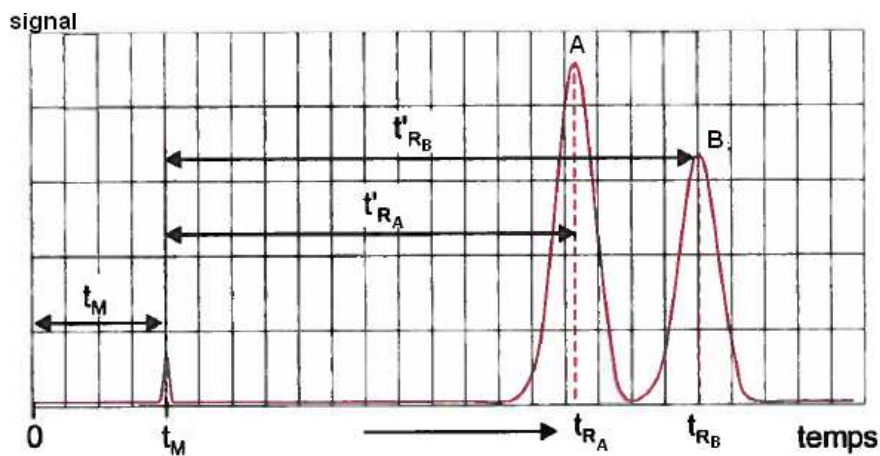


Figure 1 : Représentation sur un chromatogramme des notions de temps mort t_m , temps de rétention t_R et temps de rétention relatif t'_R d'un pic.

2. Coefficient de partage et facteur de capacité

Afin de déterminer le coefficient de partage k représentant l'équilibre de la répartition du soluté A dans la phase mobile M et la phase stationnaire S, on établit l'équation suivant :

$$k = \frac{[A_S]}{[A_M]} \quad (2)$$

où $[A_M]$ représente la concentration du soluté A dans la phase mobile, $[A_S]$ représente la concentration du soluté A dans la phase stationnaire.

k varie en fonction de l'affinité entre A et M, entre A et S mais également entre S et M. Suivant la valeur de k , le soluté A sera plus ou moins retenu par la phase stationnaire. Différents solutés d'un mélange ayant des valeurs de k distinctes pourront alors être séparés.

Le coefficient de partage influe également sur la forme du pic. La Figure 2 représente l'allure du pic en fonction de la valeur de k . Un pic « parfait » en chromatographie à une forme symétrique avec une distribution gaussienne. Dans ce cas, k est constant. Lorsque l'on remarque une trainée en fin de pic, cela signifie que la phase stationnaire se sature. Dans ce cas $[A_S] < [A_M]$ et ce phénomène s'appelle le « tailing ». Le cas contraire, où $[A_S] > [A_M]$, se nomme « fronting ». Ce phénomène est le résultat d'un problème physique avec la colonne comme la présence de volume mort par exemple. Dans ce cas, une petite partie du soluté A se déplace vers le bas de la colonne où se situe ce volume mort afin d'être éluée plus rapidement que la majeure partie du composé.

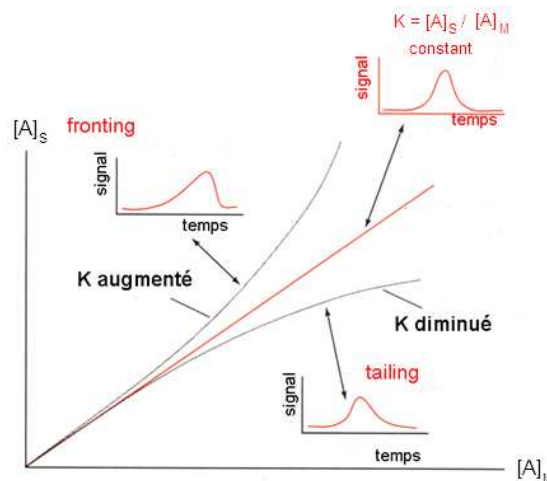


Figure 2 : Asymétrie des pics en fonction de la valeur du coefficient de partage k [5].

Le facteur de capacité k' correspond au rapport du temps passé par le soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé dans la phase mobile. Ce paramètre expérimental permet de déterminer la vitesse de progression des solutés dans la colonne indépendamment

du débit ou de la longueur de la colonne. Il s'agit d'une grandeur sans dimension qui se détermine de la façon suivante [5] :

$$k' = k \times \frac{V_S}{V_M} = \frac{t'_R}{t_m} \quad (3)$$

3. Mesure de l'efficacité de séparation

Différents facteurs influent sur l'élargissement des pics. Le premier est la diffusion turbulente (ou diffusion d'eddy). Comme le montre la Figure 3, il correspond au chemin parcouru par les molécules dans la colonne qui peut être différent, suivant la taille des particules, la porosité de la phase stationnaire et la qualité de remplissage de la colonne. Le second facteur est la résistance au transfert de masse. La phase mobile peut s'accumuler dans les infractuosités du support, ce qui implique que les molécules qui s'y diffusent traversent la colonne moins vite que les autres, entraînant un élargissement du pic. Le troisième et dernier facteur est la diffusion longitudinale qui diminue avec l'augmentation du débit de la phase mobile, ce qui la rend négligeable en HPLC [5].

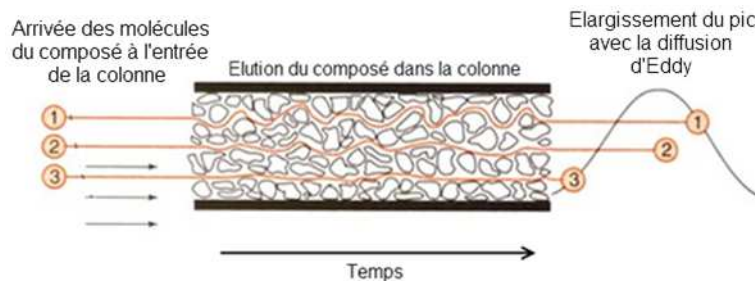


Figure 3 : Diffusion d'eddy influant sur l'élargissement des pics chromatographiques.

Différents paramètres renseignent sur l'efficacité d'une colonne et la qualité de séparation d'un système chromatographique.

Si on admet qu'une colonne se comporte comme une colonne à distiller, une colonne ayant un nombre de plateaux théoriques N_{th} est une colonne fractionnée en N petits disques cylindriques successifs. La phase mobile progresse par sauts successifs d'un plateau à un autre. Le nombre de plateaux théoriques peut être obtenu d'après la relation suivante [5] :

$$N_{th} = 5,54 \left(\frac{t_R}{\omega_{1/2}} \right)^2 \quad (4)$$

où $\omega_{1/2}$ représente la largeur à mi-hauteur du pic, t_R le temps de rétention, tous les deux exprimés en minutes.

Le nombre de plateaux théoriques effectifs N_{eff} dépend du temps réellement passé dans la colonne. On remplace dans la formule précédente t_R par le temps de rétention réduit t'_R pour calculer N_{eff} [5].

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne, on détermine la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H suivant les publications). Elle se calcule par le rapport entre la longueur de la colonne L en millimètre et le nombre de plateaux théoriques N_{th} et s'exprime par la relation suivante [5] :

$$\text{HEPT} = H = \frac{L}{N_{\text{th}}} \quad (5)$$

Les paramètres qui permettent de déterminer la qualité d'une séparation entre deux molécules d'intérêts sont la sélectivité α et la résolution R.

La sélectivité α est une grandeur sans dimension et se définit comme la capacité de la colonne à séparer deux molécules. Elle se calcule par le rapport des temps de rétention réduit t'_R des molécules A et B [5] :

$$\alpha = \frac{t'_{R \text{ de B}}}{t'_{R \text{ de A}}} \quad (6)$$

La résolution R rend compte de la qualité de la séparation et est une grandeur sans dimension. Elle indique s'il y a une coélution entre les deux molécules et se calcule de la manière suivante [5] :

$$R = \frac{2(t_{R \text{ de B}} - t_{R \text{ de A}})}{\omega_B + \omega_A} \quad (7)$$

En utilisant l'équation (6), la résolution R peut s'exprimer de la manière suivante :

$$R = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'}{1 + k'} \times \frac{\sqrt{N_{\text{th}}}}{4} = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{\sqrt{N_{\text{eff}}}}{4} \quad (8)$$

La Figure 4 [4] représente l'allure chromatographique de deux pics suivants différentes valeurs de R.

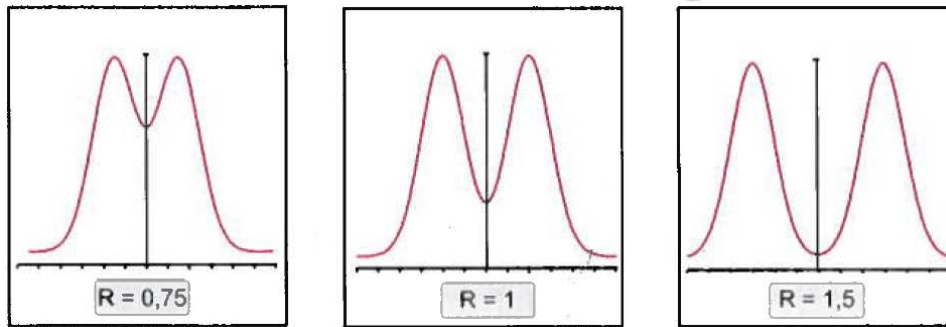


Figure 4 : Allure des pics chromatographiques suivant la valeur de la résolution entre ces derniers.

Si $R < 1$, il y a coélution des pics. Si R est compris entre 1 et 1,4, la résolution est acceptable mais le phénomène de chevauchement des pics est toujours présent. Lorsque la résolution atteint la valeur de 1,5, il y a un retour à la ligne de base, les molécules A et B sont parfaitement séparées.

c) Théorie dynamique de la chromatographie

En 1956, le physicien J.J. Van Deemter relie la notion de hauteur équivalente à un plateau théorique aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile dans une équation qui porte son nom [7]. De Villiers *et al.* [8] nous rappellent que l'équation de Van Deemter relie l'efficacité de la colonne H à la vitesse linéaire de la phase mobile \bar{u} et de la taille des particules d_p de la phase stationnaire. En général, l'équation est simplifiée de la façon suivante :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \times \bar{u} \quad (9)$$

Le terme A (cm) est constant dans l'équation et correspond à la diffusion turbulente ou diffusion d'eddy. Il se détermine de la façon suivante :

$$A = 2 \times l \times d_p \quad (10)$$

où l correspond à la répartition dimensionnelle ainsi que de la régularité du remplissage et d_p au diamètre des particules.

Le terme B ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) est constant dans l'équation et correspond à la diffusion longitudinale. Il est de la forme :

$$B = 2 \times \gamma \times D_m \quad (11)$$

où γ est une constante, correspondant au facteur de tortuosité et D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

Le terme C (s) est constant dans l'équation et correspond à la résistance au transfert de masse et s'exprime en fonction de d_p et D_m selon la relation suivante :

$$C = f(k') \times \frac{d_p^2}{D_m} \quad (12)$$

où $f(k')$ est une fonction du facteur de rétention.

La Figure 5 est une représentation graphique de cette équation et montre la possibilité de déterminer à partir de la courbe les termes A , B et C . On peut voir l'évolution de H en fonction de la vitesse linéaire \bar{u} de la phase mobile.

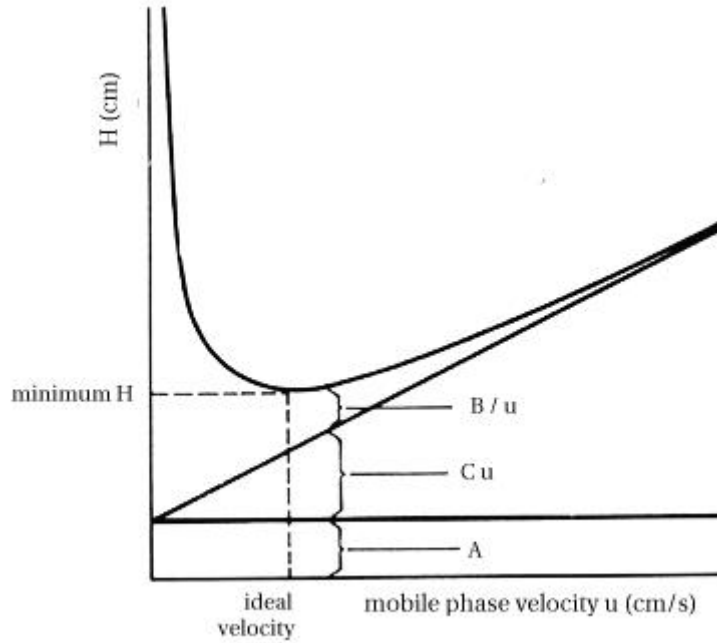


Figure 5 : Représentation graphique de la courbe de Van Deemter et de la détermination graphique des différents composants de l'équation [9].

Le minimum de la courbe de Van Deemter permet de déterminer la vitesse linéaire optimale de la phase mobile pour la colonne utilisée. Il s'agit d'un compromis entre les termes B et C. D'après les équations (10) et (12), les termes A et C dépendent de la taille des particules d_p . En diminuant d_p , H diminue suivant les formules précédentes. En reprenant l'équation (5), pour une colonne de longueur L constante, le nombre de plateaux théoriques par unité de longueur augmente synonyme d'une augmentation d'efficacité. La pression au sein de la colonne est proportionnelle à la vitesse linéaire \bar{u} de la phase mobile, mais elle est surtout inversement proportionnelle au carré de la taille des particules d_p . Ainsi on relie ces trois facteurs de la manière suivante :

$$\Delta P = \frac{\bar{u} \times \eta \times L \times \phi}{d_p^2} \quad (13)$$

où ΔP est la pression au niveau de la colonne (Pa), ϕ est un facteur de résistance à l'écoulement de la phase mobile déterminée de façon expérimentale et est une grandeur sans dimension, η la viscosité de la phase mobile (Pa.s), L la longueur de la colonne (m), d_p le diamètre des particules (m) et \bar{u} la vitesse linéaire de la phase mobile ($m.s^{-1}$) [8,10].

Pour gagner en efficacité, on peut diminuer la taille des particules, sachant qu'une diminution d'un facteur 2 entraîne une augmentation d'un facteur 4 sur la pression à débit constant. Pour diminuer la pression, on peut diminuer la longueur de la colonne, mais cela implique une diminution du nombre de plateaux théoriques et donc potentiellement de l'efficacité de séparation de la colonne. Face à cette problématique, Waters développe en 2004 une nouvelle gamme de colonne avec un diamètre de particule de 1,7 μm , puis la Chromatographie Liquide UltraPerformance (UPLC). Ce système permet de supporter les hautes pressions générées par ces colonnes, mais également de gagner en résolution, sensibilité et en temps d'analyse.

II. De l'HPLC vers l'UPLC

L'HPLC est une technique très utilisée et permet d'analyser une très large gamme de composés. Toutefois son manque d'efficacité en plateaux théoriques par rapport à la GC est son principal désavantage.

a) Limitations de l'HPLC

En GC il n'est pas rare d'obtenir des pics chromatographiques avec un nombre de plateaux théoriques dépassant le million, alors qu'en HPLC on dépasse rarement les vingt milles plateaux théoriques. Or pour gagner en efficacité, il faut que H soit petit d'où un N_{th} grand (voir équation 5). De même, plus N_{th} est grand, plus la résolution est importante (voir équation 8). On observe également avec cette formule que l'on pourrait augmenter la résolution en améliorant les facteurs α et k' , mais mathématiquement, ces facteurs arrivent rapidement à un palier dans cette équation, limitant ainsi leur impact. Un dernier facteur pouvant influencer N_{th} , est la largeur à mi-hauteur des pics chromatographiques. Lorsque leurs largeurs diminuent, N_{th} augmente. Pour obtenir des pics plus fins, on peut augmenter le débit, par exemple, afin d'avoir des temps de rétention plus faibles. Toutefois d'après la relation de Van Deemter (voir équation 9 et Figure 5), en augmentant le débit on risque de s'éloigner du débit optimal d'utilisation de la colonne, ce qui entraînera une perte d'efficacité. De plus en augmentant la vitesse de la phase mobile, on augmente la pression du système (voir équation 13). On sait également qu'en diminuant la taille des particules de la phase stationnaire, on augmente la surface disponible pour les interactions entre le soluté et la

phase stationnaire, ce qui permet un gain d'efficacité de la séparation, générant une forte augmentation de la pression.

Les limites de la techniques HPLC sont liées principalement à l'instrumentation. La variation de certains paramètres critiques comme le débit de la phase mobile ou la taille des particules, peut entraîner soit une perte d'efficacité de la colonne, soit une hausse de pression trop importante qui n'est pas supportée par les systèmes classiques, dont la plupart sont limités à une pression maximale de 5000 psi (343 bars).

b) Optimisation des colonnes

La diminution de la taille de particule jusqu'à 1,7 µm entraîne une augmentation de la pression, ce qui entraîne une nécessité d'optimisation des colonnes.

La Figure 6 représente les particules d'une phase stationnaire à 5.0 et 1.7 µm à la même échelle au microscope ainsi que la structure des particules d'une colonne Acquity UPLC BEH™, présentant un pont éthane donnant plus de résistance à la phase stationnaire pour supporter les très hautes pressions [11].

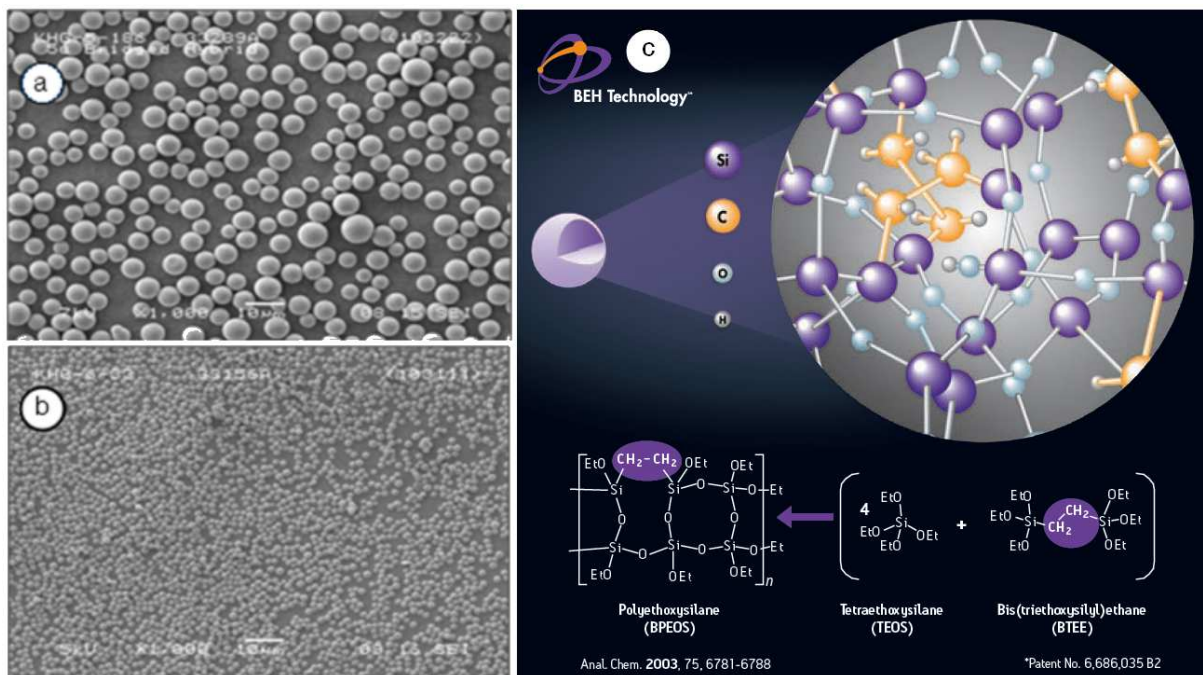


Figure 6 : Photo au microscope de particules d'une phase stationnaire d'un diamètre de 5 µm (a) et 1,7 µm (b) avec un agrandissement x1000. Chimie des particules d'une colonne Acquity UPLC BEH (c) montrant le pont éthane permettant des colonnes capables de supporter des très hautes pressions.

Les groupements fonctionnels disponibles chez Waters pour les colonnes UPLC sont répertoriés en Annexe 4 (page 101) [6].

La diminution de la taille des particules a permis d'obtenir des colonnes ayant une

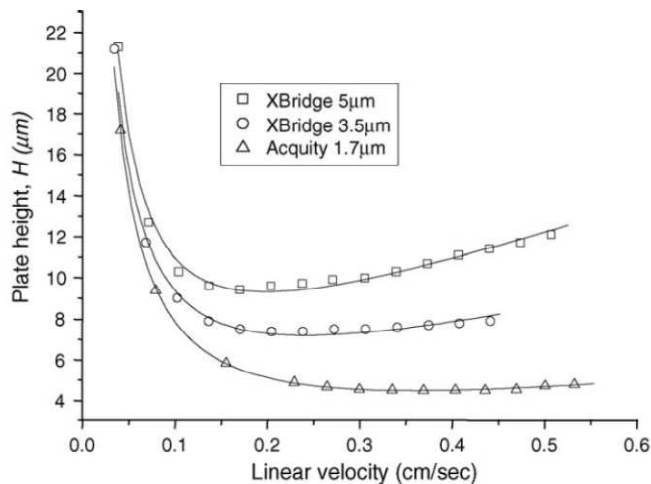


Figure 7 : Courbe de Van Deemter obtenue pour de l'acétophénone avec une colonne XBridge™ C18 250 x4,6x5μm, XBridge C18 150x4,6x3,5μm et Acquity BEH C18 100x2,1x1,7μm.

efficacité plus importante car H diminue dans la courbe de Van Deemter. La Figure 7 montre l'évolution de cette courbe en fonction de la taille des particules. On remarque ainsi que l'on gagne en efficacité puisque H diminue avec le diamètre, mais également que la zone d'inflexion de la courbe est plus douce. Il est donc possible de faire varier la vitesse de la phase mobile tout en préservant l'efficacité de la colonne à un débit plus élevé [8].

c) Optimisation de l'instrumentation

L'UPLC n'aurait pas pu exister sans les avancées majeures au niveau des colonnes. Afin de supporter les très hautes pressions générées par celles-ci, la société Waters développa le système chromatographique Acquity UPLC supportant des pressions allant jusqu'à 15 000 psi (1027 bars) puis le système Acquity HClass (pompe quaternaire) et le système Acquity IClass allant jusqu'à 18 000 psi (1200 bars).

Les matériaux utilisés ont été sélectionnés, afin de supporter les hautes pressions et garantir une meilleure étanchéité. Pour diminuer le phénomène de diffusion dans le système et pour améliorer l'élution d'un composé (temps d'arrivée du gradient en tête de colonne), le volume mort du système et les tubulures ont été optimisés. Par comparaison entre deux systèmes quaternaires, le système Waters HPLC Alliance® a un volume mort d'environ 650 μL alors que le système Acquity HClass a un volume mort d'environ 400 μL. On distinguera les systèmes binaires comme l'Acquity UPLC avec un volume mort d'environ 125 μL, et dernièrement l'Acquity IClass avec un volume mort d'environ 90 μL. Les pics chromatographiques devenant particulièrement fins, il a fallu optimiser les cellules des détecteurs afin d'éviter un phénomène de diffusion dans le détecteur, entraînant une perte de sensibilité et de résolution. A titre d'exemple, on peut comparer les cellules d'un PDA (Photo Diode Array : détecteur à barrette de diode) en HPLC et en UPLC. Classiquement, les cellules UV en HPLC ont un volume de 10 μL. Le volume de la cellule UV standard en

UPLC chez Waters est de 500 nL. Les cartes électroniques ont été améliorées afin d'avoir une vitesse d'acquisition plus élevée permettant d'obtenir suffisamment d'informations pour caractériser les pics.

d) Les bénéfices de la technologie UPLC vis à vis de l'HPLC

Au sein du laboratoire d'application de Waters, lors d'études réalisées pour les démonstrations, une comparaison entre les systèmes HPLC et UPLC est réalisée afin de montrer le gain de cette dernière. Un mélange de 7 analgésiques (l'acétaminophène, le 3-acétamidophénol, la caféine, l'acétanilide, l'acide acétylsalicylique, l'acide salicylique et la phénacétine) est séparé en HPLC avec un système Alliance 2695 et une colonne XTerra® MS C18 100 x 4,6 x 5 µm. Puis cette séparation est effectuée sur un système Acquity UPLC HClass et une colonne Acquity BEH C18 50 x 2,1 x 1,7 µm. La détection s'effectue à 280 nm, les colonnes sont thermostatées à 35 °C et l'on injecte 10 et 2 µL du mélange en HPLC et UPLC respectivement. Les débits de la phase mobile sont ajustés pour chaque système, en HPLC le débit est de 1,0 mL.min⁻¹ et en UPLC de 0,6 mL.min⁻¹. Les gradients d'élution sont présentés dans le Tableau I. La Figure 8 montre les séparations obtenues sur les deux systèmes.

Tableau I : Gradient de phase mobile en HPLC et UPLC pour la séparation de 7 analgésiques à un débit respectif de 1,0 et 0,6 mL.min⁻¹. La voie A est composée d'eau à 1% en acide formique et la voie B en Acétonitrile à 1% en acide formique.

HPLC			UPLC		
Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B
0,00	98,0	2,0	0,00	98,0	2,0
10,00	90,0	10,0	1,70	90,0	10,0
25,00	65,0	35,0	4,25	65,0	35,0
25,01	98,0	2,0	4,26	98,0	2,0
35,00	98,0	2,0	5,95	98,0	2,0

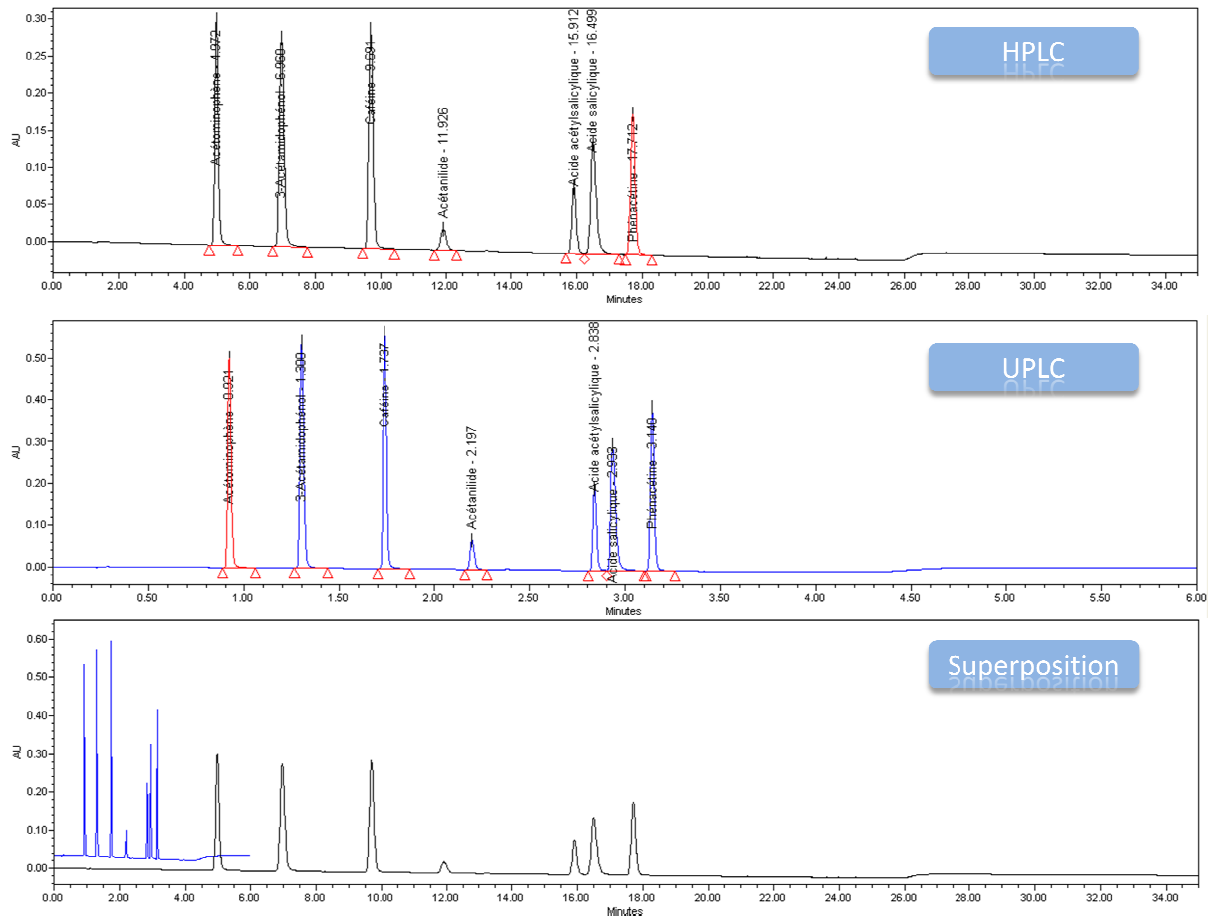


Figure 8 : Séparation d'un mélange de 7 analgésiques avec une colonne XTerra MS C18 100 x 4,6 x 5 μm en HPLC et Acquity BEH C18 50 x 2,1 x 1,7 μm en UPLC.

En comparant les chromatogrammes, nous pouvons observer une séparation identique des composés. De plus nous avons un gain de temps d'analyse d'une technologie à une autre puisqu'une séparation effectuée en 20 minutes en HPLC se réalise en 4 minutes en UPLC. Le Tableau II regroupe les résultats et les critères d'efficacité de la séparation comme la résolution et le nombre de plateaux pour chaque composé.

Tableau II : Comparaison des résultats de la séparation obtenue par HPLC et UPLC.

Nom	HPLC			UPLC		
	Temps (min)	Résolution	Plateaux théorique	Temps (min)	Résolution	Plateaux théorique
Acétaminophène	4.934		10173	0.914		11956
3-Acétamidophenol	6.983	9.1	12074	1.293	10.7	18698
Caféine	9.705	11.1	27091	1.732	12.1	39683
Acétanilide	11.902	8.1	23862	2.192	12.3	47184
Acide acétylsalicylique	15.900	14.4	65570	2.833	17.0	104437
Acide salicylique	16.539	2.3	46272	2.924	2.3	63784
Phénacétine	17.703	4.2	77695	3.137	5.1	118274

Au regard des résultats, nous pouvons voir que suite à une analyse en UPLC, le temps de séparation est 5 fois plus rapide, avec des résolutions équivalentes voire supérieures entre chaque pic. De plus le nombre de plateaux théoriques est plus important, montrant une hausse d'efficacité du système chromatographique.

Après un transfert de méthode de l'HPLC vers l'UPLC, on peut aisément voir que le système UPLC permet un gain de temps d'analyse très important avec une résolution constante, ce qui permet aux laboratoires de réaliser des tests et des analyses beaucoup plus rapidement en consommant moins de solvant, donc un gain de productivité et économique. Du point de vue analytique, on peut voir avec cet exemple que cette technologie apporte également un gain de sélectivité, puisque les composés sont mieux séparés (hausse de la résolution), mais également de sensibilité. Les pics chromatographiques sont plus fins, plus intenses permettant d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit. Un nombre de plateaux théoriques plus importants indique une hausse d'efficacité de la colonne. Ainsi pour des analyses de substances apparentées, par exemple, plus d'impuretés seront détectées en UPLC qu'en HPLC. Les pics étant plus intenses et plus fins et avec un bruit de fond plus faible, les limites de quantification (LOQ) et de détection (LOD) seront plus basses.

Par la suite, d'autres travaux ont montré et confirmé que la technologie UPLC apportait de nombreux avantages vis-à-vis de l'HPLC comme ceux de L. Nováková *et al* [12] ou V.G. Dongre *et al* [13] par exemple. Ils ont démontré que les mécanismes de séparation et

les principes de la chromatographie étaient maintenus, avec un temps d'analyse, une sensibilité et une résolution accrues.

Dans le cadre du sujet de ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement à l'UV et à la spectrométrie de masse (MS) comme mode de détection. Nous allons à présent rappeler le fonctionnement de ces modes de détections.

III. Détection dans l'Ultra Violet (UV)

L'ultraviolet (UV) désigne un domaine de longueur d'onde allant de 190 à 400 nm, et le domaine du visible (VIS) un domaine de longueur d'onde allant de 400 à 800 nm. Le principe de ce détecteur réside dans l'absorption d'un rayonnement par une molécule dans un domaine allant de 190 à 800 nm [14].

a) Rappel des principes de l'absorption UV

On considère le rayonnement UV-vis comme une onde électromagnétique d'une énergie E (J) et d'une fréquence ν (s^{-1}). On relie alors ces grandeurs par la relation suivante :

$$E = h \times \nu = h \times c/\lambda \quad (14)$$

où h est la constante de Planck ($h = 6,63.10^{-34}$ J.s), c la célérité de la lumière dans le milieu où se propage l'onde ($c = 3.10^8$ m.s $^{-1}$ dans le vide) et λ la longueur d'onde du rayonnement (m).

A température ambiante, la plupart des molécules sont à leur état fondamental. Soumises à un rayonnement UV-vis, elles vont pouvoir absorber des photons, et ainsi changer leur état énergétique. Un certain nombre de photons étant absorbés, l'intensité du rayonnement transmis diminue. Cette diminution dépend de la concentration des molécules dans le milieu, ce phénomène est régi par la loi de Beer-Lambert. Cette loi permet de relier l'absorption, la longueur d'onde et la concentration de la molécule. Ainsi on a établi la relation suivante [14] :

$$I_{\lambda} = I_{\lambda}^{\circ} \exp(-\epsilon_{\lambda} \times l \times C) \quad (15)$$

où I_λ représente l'intensité du rayonnement transmis, I_λ^0 l'intensité du rayonnement émis, ε_λ le coefficient d'absorption molaire ou massique de la molécule à la longueur d'onde λ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l la longueur du trajet optique (cm) et C la concentration de la molécule absorbante dans le milieu ($mol \cdot L^{-1}$).

On peut exprimer directement l'absorbance A_λ avec cette relation de la façon suivante [14] :

$$A_\lambda = \log \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda} = \varepsilon_\lambda \times l \times C \quad (16)$$

La Figure 9 [14] permet de voir la signification des termes énoncés précédemment.

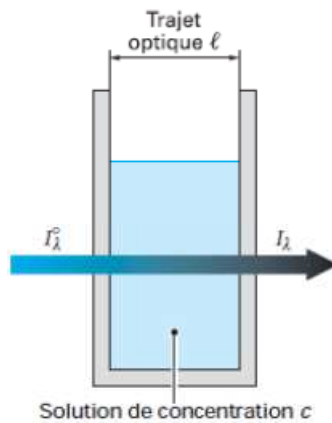


Figure 9 : Schéma d'une cellule soumise à un rayonnement d'une longueur d'onde λ . Représentation de la loi de Beer-Lambert.

b) Instrumentation en LC

Au niveau de l'instrumentation, nous pouvons rencontrer deux systèmes pour les détecteurs UV dont les schémas de principes sont reproduits en Annexe 5 (page 103).

Le premier est appelé détecteur mono longueur d'onde. Avec ce type de détecteur, on réalise une détection à une longueur d'onde. On peut rencontrer des détecteurs pouvant acquérir simultanément plusieurs chromatogrammes à différentes longueurs d'ondes. Chez Waters, dans la gamme Acquity, ce détecteur s'appelle le Tunable UV (TUV).

Pour le détecteur Acquity UPLC TUV [15], le miroir ellipsoïdal recueille la lumière provenant de la lampe au deutérium et la concentre sur la fente d'entrée. De l'autre côté de la fente est placé un miroir sphérique qui dévie la lumière vers le réseau. Une partie de cette lumière est ensuite redirigée par le réseau vers une autre partie du miroir sphérique. Cette

lumière dispersée correspond à une longueur d'onde précise, déterminée par l'angle du réseau suite à son positionnement. Elle traverse ensuite la cellule de référence et la cellule échantillon pour atteindre la photodiode qui récupère le signal, qui une fois amplifié, sera traité électroniquement par le logiciel.

Le second détecteur au contraire du précédent, ne fait plus une acquisition à une longueur d'onde spécifique mais une acquisition de spectre UV. Ce type de détecteur est couramment appelé Photo Diode Array (PDA). Chez Waters il existe deux détecteurs de ce type, dont la simple différence réside dans les capacités de bande spectrale du réseau. Ainsi le détecteur Waters Acquity PDA permet d'acquérir des spectres de 190 à 500 nm alors que le PDA eλ permet l'acquisition de spectre de 190 à 800 nm.

Pour les détecteurs PDA de Waters [16], un premier miroir dévie et concentre la lumière provenant de la lampe au deutérium vers un filtre avant de traverser la cellule échantillon. La lumière issue de la cellule rencontre un second miroir qui la dévie à son tour vers le réseau de diffraction. Le réseau disperse ensuite la lumière suivant la plage de longueurs d'ondes sélectionnée et la concentre en direction d'un plan de photodiodes qui multipliera le signal. Ce plan est composé de 512 photodiodes disposées linéairement, qui ont chacune une largeur de 50 μm . La résolution de ce plan est de 1,2 nm.

IV. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique pouvant servir de détecteur en chromatographie liquide. C'est une technique analytique à part entière qui permet d'identifier et de doser des composés, mais elle permet également d'obtenir des informations sur la structure de la molécule et sa masse moléculaire. En spectrométrie de masse, on forme, sélectionne puis détecte des ions suivant trois étapes. Ces ions sont formés dans un premier compartiment appelé source, ils sont ensuite sélectionnés dans un second compartiment appelé analyseur avant d'être détecté dans un dernier compartiment.

a) Généralités

On peut relier les débuts de la spectrométrie de masse à la découverte des ions positifs par le physicien allemand Eugen Goldstein en 1886. Mais c'est en 1912 que le physicien anglais Sir Joseph John Thomson obtient les premiers spectres de masse d' O_2 , N_2 , CO , CO_2 et COCl_2 et observe également pour la première fois des ions négatifs, multichargés et

métastables. En 1918, Arthur Jeffrey Dempster construit le premier spectromètre de masse à secteur magnétique qui sera commercialisé en 1942. Puis en 1919, la source à Impact Electronique (EI) est mise au point. Suite à ces expériences, le chimiste et physicien anglais Francis William Aston découvre les isotopes d'un grand nombre d'éléments non radioactifs, ce qui lui value le Prix Nobel de Chimie en 1922. Très vite, la spectrométrie de masse se développe avec la mise au point de nouvelles sources et analyseurs afin de s'adapter aux exigences des chimistes et biologistes :

- 1948 : analyseur à Temps de Vol (TOF),
- 1953 : W. Paul et H.S. Steinweger décrivent l'analyseur Quadripolaire (Q) et la trappe d'ions,
- 1956 : premier couplage avec la GC par F.W. McLafferty et R.S. Gohlke,
- 1967 : mise au point de la source d'Ionisation Chimique (CI) par M.S. Munson et F.H. Field,
- 1974 : premier couplage avec la LC par P.J. Arpino, M.A. Baldwin et F.W. McLafferty,
- 1978 : R.A. Yost et C.G. Enke construisent le premier spectromètre de masse à triple quadripôle,
- 1984 : J.B. Fenn décrit pour la première fois la source d'ionisation par Electrospray (ESI),
- 1985 : F.H. Hillenkamp met au point la technique d'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI),
- 1987 : M. Guilhaes et A.F. Dodonov décrivent le spectromètre de masse à temps de vol (TOF), dont le concept a été proposé en 1964 par G.J. O'Halloran,
- 1988 : premiers spectres de protéines dépassant les 20 000 Da obtenus par J.B. Fenn (Prix Nobel de Chimie en 2002),
- 1990 : mise au point de la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).
- 1999 : A.A. Makarov décrit le spectromètre de masse orbitrap.

Depuis, des couplages ont vu le jour tel que le Q-ToF™ afin d'obtenir des instruments plus polyvalents dans le but de répondre à la recherche continue d'une meilleure sensibilité.

G. Bouchoux et M. Sablier [17] nous propose le Tableau III qui est un tableau récapitulatif des principales applications de quelques méthodes d'ionisation citées précédemment.

Tableau III : Utilisation de diverses méthodes d'ionisation.

Méthode	Echantillon			Analyse			
	Volatil	Solide	Thermolabile	Organique	Bio-organique	Isotopique	Elémentaire
EI	X			X		X	X
CI	X			X			
Ionisation-désorption							
MALDI		X	X		X		
Ionisation-nébulisation							
ESI	X		X	X	X		
APCI	X		X	X			
APPI	X		X	X	X		

b) Principe et instrument Waters

A partir d'un échantillon, on forme des ions à l'état gazeux dans une source d'ionisation. Ces ions chargés sont ensuite soumis à un champ électrique permettant de les transférer dans un analyseur afin qu'ils soient séparés suivant leurs rapport m/z. Les ions arrivent ensuite au détecteur qui mesure et amplifie les signaux afin de produire le spectre de masse.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous limiterons uniquement au mode de détection utilisé, soit une source Electrospray (ESI) couplée à deux analyseurs quadripolaires faisant partie de la famille des Triple Quadripôle (TQ). Nous étudierons les principes de ces techniques en nous appuyant sur les particularités des détecteurs Waters [18-19]. Nous découvrirons les principes communs entre le SQD 2, le Xevo[®] TQD, Xevo TQ MS et le Xevo TQ-S dont les spécificités influent directement sur la qualité des résultats et qui seront détaillés ultérieurement.

1. La source : ionisation par électrospray (ESI)

L'ionisation par électrospray (ESI) est une ionisation douce à pression atmosphérique. Elle permet le passage d'un mélange liquide (solutés élués par un solvant) à la formation d'ions chargés en solution suivant trois étapes.

On applique à un capillaire en acier inoxydable une tension de plusieurs kV (tension que l'on peut optimiser). Sous l'effet du champ électrique créé par la différence de potentiel entre le capillaire et le cône d'entrée, le liquide est nébulisé à la sortie du capillaire à pression atmosphérique. Plus précisément, comme le montre la Figure 10, lorsque le champ électrique atteint une valeur suffisante, l'ensemble des forces exercées à la surface du liquide entraîne la formation d'un cône dit de « Taylor » qui émet des gouttelettes chargées de façon continue à la sortie du capillaire.

Ces gouttelettes chargées sont accélérées par le champ électrique en direction du cône d'entrée. Un courant de gaz chaud permet la désolvatation de ces gouttelettes. A l'intérieur de ces gouttelettes, les ions se placent afin de diminuer les répulsions



Figure 10 : Ionisation par Electro spray : nébulisation permettant la formation de gouttelette.

L'évaporation du solvant entraîne la diminution de la taille des gouttelettes qui conduit à une augmentation des interactions coulombiennes suite au rapprochement des charges. Ces interactions augmentent jusqu'à ce que les répulsions coulombiennes entraînent une tension de surface trop importante. A ce moment là, elles « explosent » afin de donner d'autres gouttelettes de rayon plus faible et contenant moins d'ions chargés. Celles-ci subiront le même processus jusqu'à l'obtention de très fines gouttelettes chargées ne contenant qu'un seul ion qui se libèrera à l'état gazeux.

Les spectromètres de masse de Waters ont une source dit en « ZSpray™ ». Celle-ci fait référence à la double déviation orthogonale du flux des ions dans la source. La Figure 11 représente cette double déviation caractéristique des détecteurs MS de Waters. Les ions désolvatés sont déviés vers le cône d'entrée du spectromètre de masse et correspondent à la première déviation. Ce cône est soumis à un champ électrique de quelques volts appelé tension de cône que l'on peut faire varier en fonction des molécules étudiées afin d'obtenir une meilleure ionisation et sensibilité.

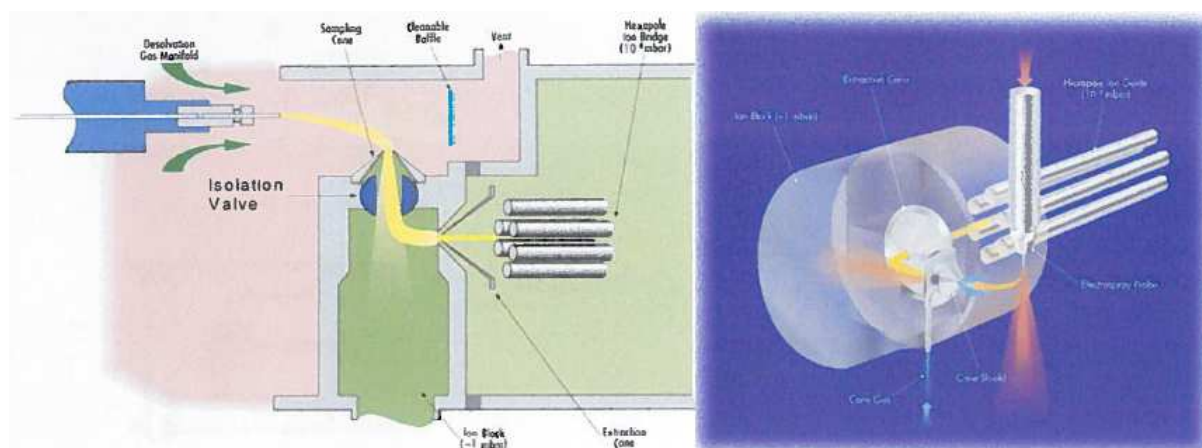


Figure 11 : Schéma de la source en « Z » des détecteurs de masse Waters.

Un pompage primaire permet d'éliminer les molécules restantes non ionisées dans la chambre d'ionisation (la pression réduite dans cette chambre est aux alentours de 1 mbar). On applique une tension à un second cône appelé cône d'extraction permettant de réaliser la seconde déviation.

Après le cône d'extraction, le faisceau d'ions pénètre dans une chambre placée à une pression réduite (10^{-4} mbar). Un optique de transfert permet de focaliser les ions afin de les transférer vers l'analyseur.

La technique d'électrospray permet la formation de plusieurs types d'ions selon la molécule étudiée. Les composés basiques formeront des ions protonés $(MH)^+$, les composés acides formeront à l'inverse des ions déprotonés $(M-H)^-$. Pour les petites molécules (ayant un poids moléculaire $< 1\ 000$ Da), on observera la formation d'ions mono chargés. Pour les molécules ayant un poids moléculaire supérieur, on pourra observer la formation d'ions multichargés provenant des différents sites basiques (peptides, protéines, etc.) ou acides (acides nucléiques, polysaccharides, etc. ...). On pourra également observer la formation d'adduits correspondants à la combinaison d'une molécule neutre et de l'ion moléculaire. En mode positif, l'adduit sodium MNa^+ est le plus couramment observé à cause de l'utilisation de verrerie pour la préparation d'échantillon par exemple. En mode négatif, on peut observer l'adduit acétate MCH_3COO^- si l'on est en milieu basique avec de l'acétate de sodium.

2. L'analyseur : le quadripôle

En 1953, W. Paul et H.S. Steinweger décrivent le principe du quadripôle (Q). L'analyseur quadripolaire utilise la stabilité de la trajectoire des ions suivant un mouvement oscillatoire afin de transférer et séparer les ions de masse m/z . Ce mouvement oscillatoire dépend de la fréquence du champ appliqué et du rapport m/z des ions. Comme le montre la Figure 12, un analyseur quadripolaire est constitué de quatre barres sur lesquelles on applique une combinaison de tension continue et alternative. Le potentiel est de signe opposé entre deux barres adjacentes et de même signe entre deux barres opposées.

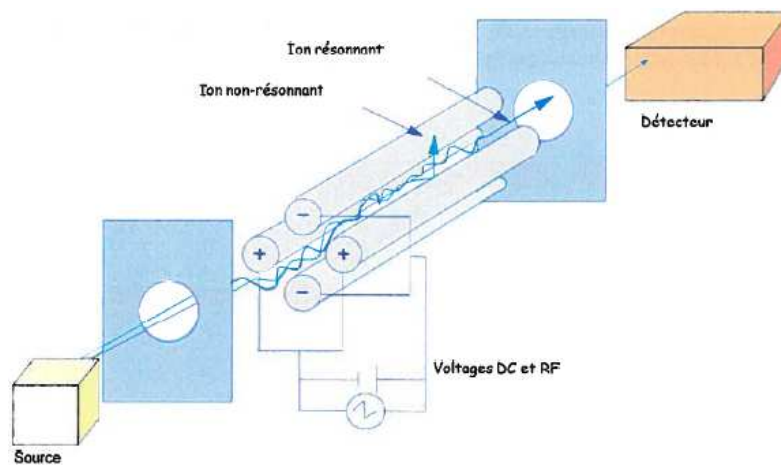


Figure 12 : Schéma d'un analyseur quadripolaire.

Les ions cheminant suivant l'axe z sont soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les barres des potentiels :

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \text{ et } -\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t) \quad (17)$$

avec Φ_0 la tension appliquée aux barres (V), ω la fréquence angulaire (s^{-1}), U la tension continue (V), V l'amplitude du voltage alternative (V) et t le temps (s). En pratique, ω est fixe, U et V variables.

Il est possible de déterminer le potentiel électrique Φ en un point du plan x,y , où Φ est une fonction de Φ_0 et r_0 la distance séparant les barres de l'axe Oz :

$$\phi = \Phi_0 (x^2 - y^2)/r_0^2 = (U - V \cos \omega t) (x^2 - y^2)/r_0^2 \quad (18)$$

A partir de ces expressions, il est possible de déterminer le mouvement d'un ion de masse m/z dans le quadripôle à une vitesse constante, dans la direction z , par les équations de Paul :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2}(U - V \cos \omega t)x = 0 \quad (19)$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2ze}{mr_0^2}(U - V \cos \omega t)y = 0 \quad (20)$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} = 0 \quad (21)$$

La trajectoire d'un ion est stable tant que les valeurs de x et de y sont inférieures à r_0 . Afin d'obtenir les valeurs de x et y au cours du temps, ces équations doivent être intégrées. En prenant en compte l'équation établit en 1866 par le physicien Mathieu qui décrit la propagation d'une onde dans une membrane :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (22)$$

Sachant que u s'apparente à x et y , que le potentiel sur l'axe y est de signe opposé au potentiel sur l'axe x , ainsi que la relation suivante :

$$\xi = \frac{\omega t}{2} \quad (23)$$

On peut remplacer le terme t^2 par ξ^2 dans l'équation de Paul et faire une analogie avec l'équation de Mathieu permettant de déterminer les coordonnées selon les équations :

$$a_u = a_x = -a_x = \frac{8zeU}{m\omega^2 r_0^2} \quad \text{et} \quad q_u = q_x = -q_x = \frac{4zeV}{m\omega^2 r_0^2} \quad (24)$$

Ainsi le terme « a » varie en fonction de la tension U et q en fonction de l'amplitude V . On appelle zone de stabilité d'un ion, un ensemble de combinaisons U et V pour lesquelles

l'ion est stable, et est transmis par le quadripôle jusqu'au détecteur. L'ensemble des zones de stabilité des ions permettent de définir un diagramme de stabilité (Figure 13).

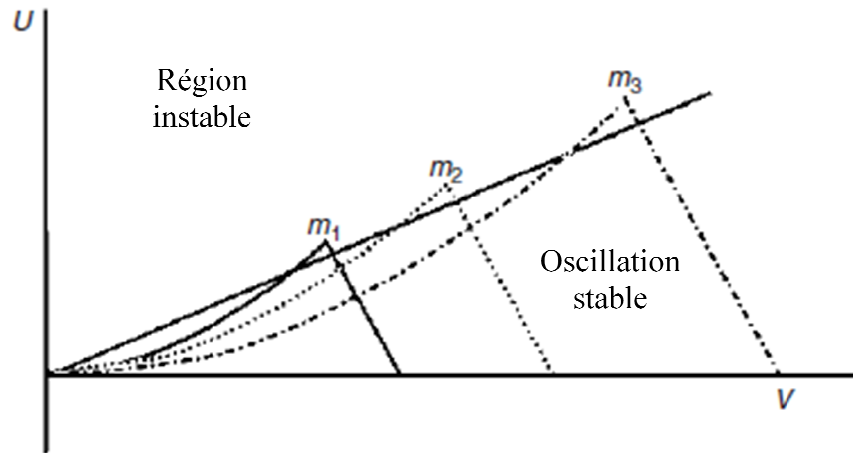
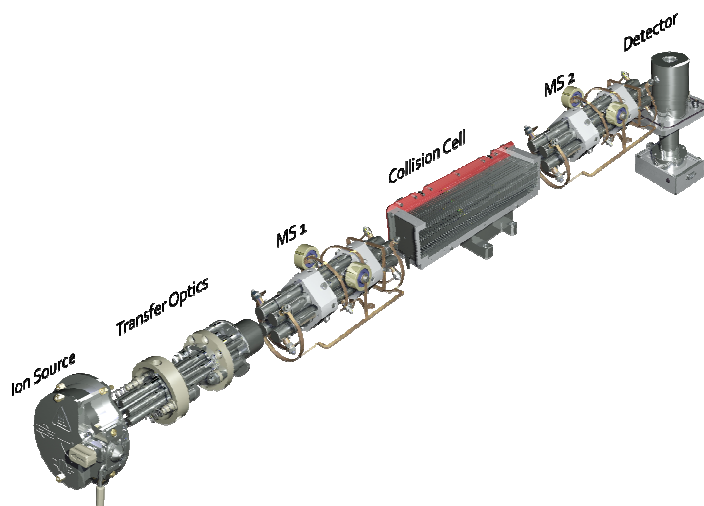


Figure 13 : Diagramme de stabilité des ions dans un analyseur de masse quadripolaire.

En changeant linéairement U en fonction de V , on obtient une droite qui permet d'observer séparément des ions de masse m/z différents. Plus la pente de la droite est élevée, meilleure est la résolution (séparation deux pics de masses différentes et proches, exemple séparation du C_{12} et C_{13}) à condition que cette droite coupe les zones de stabilité des ions. On peut ainsi faire varier ces valeurs pour « couper » les sommets de ces zones afin d'obtenir des pics plus fins et donc avoir une meilleure résolution au détriment de la sensibilité. A l'inverse, en « coupant » ces zones à leurs bases, on gagne en sensibilité mais cette fois-ci au détriment de la résolution.

3. Couplage d'analyseur de masse : le Triple Quadripôle

Un couplage d'analyseur en spectrométrie de masse permet d'obtenir des informations structurales des molécules étudiées. A l'origine, le Triple Quadripôle (TQ) possédait réellement 3 analyseurs quadripôles en série, celui du centre servant à la fragmentation des ions issus du premier quadripôle MS1. Très vite, cette configuration montra ses limites d'efficacité pour la fragmentation des molécules. Ce quadripôle a été remplacé par une cellule de collision (CC) améliorant nettement les performances de fragmentation et de transmission des ions.



e de masse Waters Xevo

Dorénavant il n'y a que 2 quadripôles présents physiquement avec une cellule de collision entre les deux. On obtient donc une configuration du type MS1 – CC – MS2 comme le montre la Figure 14.

La fragmentation d'un ion précurseur issu de MS1 suite à une collision avec un gaz inerte comme l'Argon (Ar) permet d'obtenir des informations structurales de la molécule dont il est issu. Le processus de décomposition induite par une collision (CID) se déroule en trois étapes.

La collision de l'ion sélectionné par MS1 avec un gaz inerte (Ar pour les détecteurs Waters) permet de convertir une fraction de l'énergie cinétique de celui-ci en énergie interne, lui permettant de se retrouver dans un état excité. Ce transfert d'énergie est basé sur les lois de collision d'un mobile avec une cible statique. Ces lois permettent d'établir la relation suivante :

$$E_{\text{com}} = E_C \times \left(\frac{m_g}{m_i + m_g} \right) \quad (25)$$

où m_g représente la masse du gaz inerte/cible (g), m_i la masse de l'ion précurseur (g), E_C l'énergie cinétique de l'ion fixé par l'opérateur (J) et E_{com} l'énergie interne maximale communicable (J).

Suite à cette collision, l'ion précurseur se fragmente afin de se retrouver dans un état fondamental stable. Les ions fragments sont caractéristiques de l'ion précurseur dont ils sont issus.

A la sortie de la cellule de collision, les ions fragments sont focalisés afin de pénétrer dans MS2 pour être séparés selon le même principe que dans MS1 et transmis au détecteur.

4. La détection

En spectrométrie de masse la quantité d'ions arrivant au détecteur est faible. Un détecteur doit être capable de transformer un courant ionique en un signal significatif et mesurable. On distingue deux détecteurs :

Le premier est un multiplicateur d'électron. Il est constitué de dynodes séparées : les ions positifs/négatifs frappent une cathode/anode de conversion qui libère des électrons, qui sont multipliés grâce à plusieurs dynodes placées en cascade. Le montage est désaxé par rapport à la trajectoire incidente des ions pour préserver le détecteur de l'impact des espèces neutres. La valeur du gain de conversion peut atteindre 10^6 avec ce mode détection.

Le second est un photomultiplicateur et est utilisé sur les instruments MS de Waters. Ce multiplicateur de photons est associé à une ou deux dynodes de conversion et à un écran phosphorescent. Ce dispositif permet la détection des ions positifs et négatifs. Les ions positifs et négatifs sont accélérés vers les dynodes. Les électrons secondaires émis sont à leurs tours accélérés vers l'écran phosphorescent où ils sont convertis en photons. Ces photons sont ensuite amplifiés par le photomultiplicateur. La valeur du gain de conversion peut atteindre 10^5 . L'avantage de ce détecteur est l'absence d'entretien puisque les photons ne sont pas salissants. Sa durée de vie est plus importante grâce à l'absence d'intervention pour l'entretien. Le gain est inférieur à celui du multiplicateur d'électron mais est constant dans le temps contrairement à celui-ci.

c) Les modes d'acquisitions en LC-MS et LC-MS/MS

Les deux premiers modes présentés sont réalisables avec un Simple Quadripôle ou un Triple Quadripôle. Les suivants ne sont possibles qu'avec ce dernier. La Figure 15 qui suit est un résumé schématique de ces modes d'acquisitions.

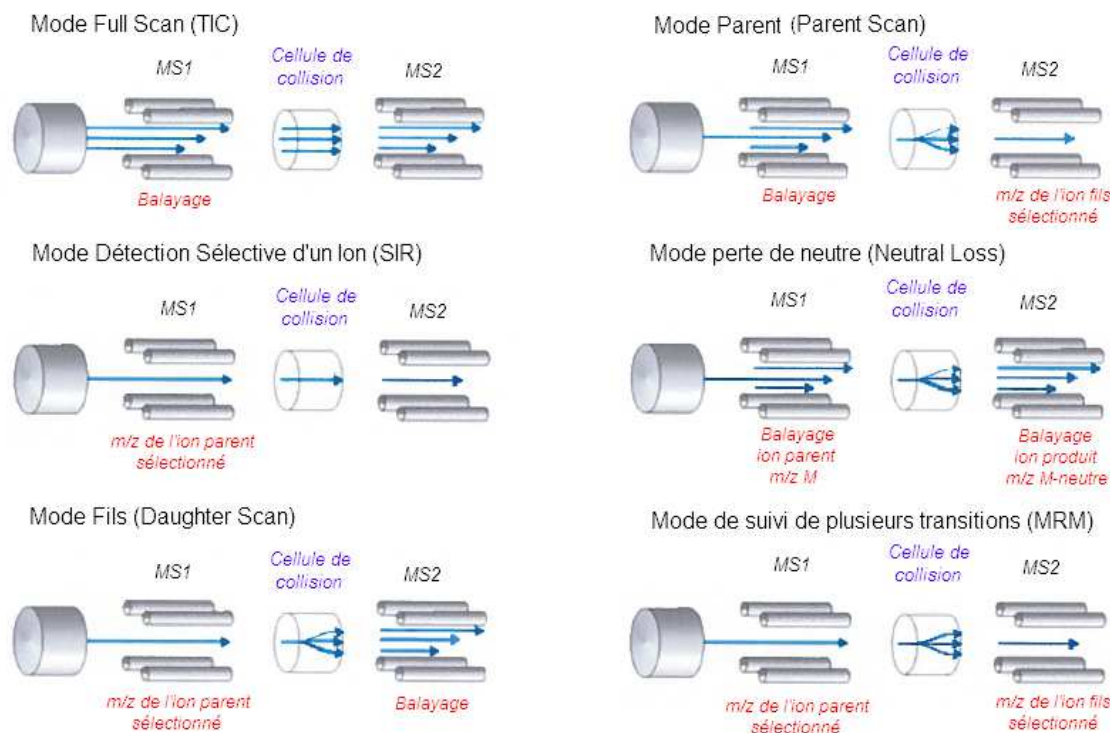


Figure 15 : Mode d'acquisition en LC-MS et LS-MS/MS.

Tout d'abord il y a le mode « Full Scan ». Comme son nom l'indique, il s'agit d'un balayage total des ions arrivant au détecteur. Le spectre obtenu représente la somme du courant ionique détecté à un temps donné (TIC). Ce mode permet de détecter les différents composés d'un mélange.

Le mode de détection sélective d'un ion (SIR) est un outil permettant la quantification. Il nécessite de connaître une masse m/z caractéristique de la molécule étudiée afin d'éviter au maximum des interférences avec la matrice ou la phase mobile. L'ion choisi correspond en général au précurseur ou au fragment le plus intense du spectre de masse afin d'éviter une interférence avec un signal provenant d'un ion fils d'un autre ion précurseur.

Le mode recherche d'ion fils (Daughter Scan) est le mode MS/MS et permet la fragmentation. En sélectionnant un ion spécifique de masse m/z avec MS1, et sa fragmentation dans la cellule de collision, on obtient son spectre de masse. Il est possible de faire de la MS³ (MS/MS/MS), suite à une première fragmentation dans la source.

Le mode parent (Parent Scan) permet de déterminer les différents ions précurseur dont est issu un ion fils de masse m/z définie. Ce mode donne des informations sur la présence ou non de structures communes entre différentes molécules d'un mélange et permet la détection de famille de composés.

Le mode perte de neutre (Neutral Loss) s'apparente à un filtre. Avec ce mode, nous allons détecter toutes les molécules perdant le même fragment neutre lors de la fragmentation dans la cellule de collision, comme H_2O par exemple pour une fonction alcool.

Le mode de suivi de plusieurs transitions simultanées (MRM : Multiple Reaction Monitoring) est le mode de choix pour le dosage en LC-MS/MS. Il permet de suivre simultanément plusieurs ions fils caractéristiques issus d'un même ion précurseur sélectionné. Avec ce mode il est possible d'obtenir des LOQ très faibles lors de dosage de composés cibles. Ce mode est beaucoup plus spécifique que le mode SIR.

Les détecteurs MS de la gamme Xevo de Waters donnent l'accès à trois combinaisons de plusieurs modes.

Le premier est le mode PICs™ (Product Ion Confirmation). Ce mode donne accès à des informations qualitatives et quantitatives en une seule injection. Lors d'une acquisition en mode MRM, sur la phase descendante du pic le détecteur bascule en mode MS/MS. Cela donne la possibilité d'obtenir des spectres de masse des ions cibles contenus dans un échantillon lors d'acquisition en mode MRM.

Le second est le mode Survey Scan™. Ce mode permet d'obtenir en une seule injection des données MS et MS/MS. L'acquisition démarre en mode Full Scan, puis au moment où un pic d'intérêt d'une intensité suffisante est détecté, le détecteur bascule en mode MS/MS (Daughter Scan). Après un certain délai ou une baisse d'intensité, l'acquisition rebascule en mode MS jusqu'à ce qu'un autre ion soit détecté.

Le troisième est le mode RADAR™. Ce mode consiste en l'acquisition simultanée de différentes transitions MRM et d'un Full Scan. Avec ce mode, on a accès à la fois à des informations quantifiables et à des informations qualitatives (TIC), permettant par exemple de contrôler la présence d'interférence ou l'efficacité d'un protocole de préparation d'échantillon.

Matériels et méthodes

Les spécifications des instruments et l'utilisation faite par les ingénieurs d'application de chez Waters permettent de distinguer un instrument ou un détecteur vis-à-vis d'un autre. Au sein de la société il n'existe pas d'étude comparative entre les instruments d'une même gamme, évaluant le gain ou la perte générée par un appareil vis-à-vis d'un autre sur une analyse. L'objectif de mon projet est l'évaluation des performances de la nouvelle gamme de système Waters, en réalisant diverses études comparatives sur l'ensemble des instruments proposés par Waters et présents au laboratoire. Des informations plus précises quant aux performances des différents systèmes UPLC, détecteurs UV et MS seront ainsi disponibles pour l'accompagnement du client dans son choix d'instruments.

I. Choix des études réalisées

Les trois premières études permettent d'évaluer les performances des instruments UPLC et des détecteurs UV. L'évaluation de la performance des détecteurs MS se réalisera uniquement avec la dernière étude.

a) Etude des acides aminés

Pour cette première étude, nous nous sommes intéressés à la publication réalisée par W. Liming *et al* [20] concernant l'analyse par UPLC de 26 acides aminés contenus dans la gelée royale. Vingt quatre acides aminés sont utilisés dans cette étude. L'histidine (His), la sérine (Ser), l'arginine (Arg), la glycine (Gly), l'acide aspartique (Asp), l'acide glutamique (Glu), la thréonine (Thr), l'alanine (Ala), la proline (Pro), la cystéine (Cys), la lysine (Lys), la tyrosine (Tyr), la méthionine (Met), la valine (Val), l'isoleucine (Ile), la leucine (Leu) et la phénylalanine (Phe) sont rassemblés dans la solution H (fournisseur : Waters ; référence WAT088122) à une concentration de 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ chacune dans HCl 0,1 N à l'exception de la cystine qui est à 1,25 $\mu\text{mol/mL}$. L'asparagine (Asn, CAS : 3130-87-8), la taurine (Tau, CAS : 107-35-7), la glutamine (Gln, CAS : 56-85-9), le γ -aminobutyrique (GABA, CAS : 56-12-2), l' α -aminobutyrique (AABA, CAS : 2835-81-6), l'ornithine (Orn, CAS : 1069-31-4) et le tryptophane (Trp, CAS : 54-12-6) sont fournis par Sigma-Aldrich. Une solution à 2,5

$\mu\text{mol/mL}$ contenant ces derniers acides aminés est préparée dans de l'HCl à 0,1 N (Sigma-Aldrich, CAS : 7647-01-0). Ces deux solutions serviront de solutions mères afin de réaliser les différentes solutions standards pour l'étude. L'hydroxylysine (Hyllys) et l'hydroxyproline (Hypro) présentes initialement dans la publication n'étaient pas disponibles au moment de l'étude.

La méthode de dosage des acides aminés AccQ•Tag™ Ultra proposée par Waters a été utilisée dans notre étude et dans la publication. Il s'agit d'une solution complète comprenant la solution H, le kit de dérivation (référence : 186003836), les phases mobiles Eluant A (composé d'acétonitrile et d'acide formique, référence : 186003838) et Eluant B (composé d'acétonitrile, référence : 186003839), et la colonne AccQ•Tag Ultra C18 100 x 2,1 x 1,7 μm (référence 186003837).

Pour détecter l'ensemble des acides aminés en détection UV, il est nécessaire de réaliser une étape de dérivation au préalable. On ajoute 10 μL de la solution standard à 70 μL du tampon borate AccQ•Tag Ultra, puis 20 μL du réactif de dérivation AccQ•Tag Ultra. La solution est mélangée immédiatement au vortex pendant 5 secondes et mise au repos pendant 1 minute afin de laisser la réaction se réaliser. La solution est ensuite placée dans un bloc chauffant à 55 °C pendant 10 minutes. Le chauffage permet de dériver plus rapidement la tyrosine [21]. Le bloc chauffant utilisé est un Dri-block DB-3D fourni par TECHNE offrant la possibilité de mettre directement des vials, facilitant ainsi la préparation.

L'étude a été réalisée avec le détecteur TUV à 260 nm avec une injection de 1,0 μL . La colonne est placée à 55 °C et le passeur échantillon à 4 °C. Les UPLC sont pilotés avec le logiciel de Waters Empower™ 2. On utilise en voie A l'Eluant A dilué à 5 % dans de l'eau Milli Q, et en voie B l'Eluant B. Le débit est de 0,7 mL/min. Le Tableau IV suivant indique les gradients utilisés pour chaque système en prenant en compte les volumes morts des UPLC.

Tableau IV : Gradient de la phase de mobile des systèmes UPLC, HClass et IClass pour l'étude des acides aminés.

UPLC			HClass			IClass		
Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B
Initial	99.9	0.1	Début gradient avant injection : 448 µL			Initial	99.9	0.1
0.54	99.9	0.1	Initial	99.9	0.1	0.55	99.9	0.1
5.54	90.9	9.1	5.20	90.9	9.1	5.55	90.9	9.1
7.74	78.8	21.2	7.20	78.8	21.2	7.75	78.8	21.2
8.64	40.4	59.6	8.10	40.4	59.6	8.64	40.4	59.6
9.50	99.9	0.1	8.96	99.9	0.1	9.51	99.9	0.1

Les solvants de rinçage sont constitués d'un mélange acétonitrile/eau 95/5 (Strong solvent) et acétonitrile/eau 5/95 (Weak solvent).

b) Etude des filtres UV et conservateurs

Pour cette seconde étude, nous nous sommes intéressés à une note d'application de Waters réalisée par P.J. Lee *et al* [22] concernant l'analyse par UPLC de filtres UV et de conservateurs dans les produits cosmétiques. Dans cette étude quatre filtres UV sont présents ainsi que quatre conservateurs. Le 2-phénoxyéthanol (CAS : 122-99-6), l'acide benzoïque (CAS : 65-85-0), le méthylparabène (CAS : 99-76-3), le propylparabène (CAS : 94-13-3), l'oxybenzone (CAS : 131-57-7), l'avobenzone (CAS : 70356-09-01), l'octinoxate (CAS : 5466-77-3) et l'octisalate (CAS : 118-60-5) sont fournis par Sigma-Aldrich. Un mélange de ces composés à 100 µg/mL dans de l'acétonitrile (fournisseur : Biosolve, CAS : 75-05-8) est utilisé comme solution mère standard et servira à préparer les différentes solutions standard de l'étude. L'homosalate présent initialement dans la note d'application était indisponible au moment de la réalisation de l'étude.

Dans le cadre de notre étude et pour des raisons d'utilisation au sein du laboratoire, certains aspects de la méthode décrite dans la note d'application ont été modifiés.

Dans la méthode d'origine, l'acide trifluoroacétique (TFA) est utilisé pour acidifier les phases mobiles à la hauteur de 0,05 %. Certaines UPLC utilisées sont couplées à un spectromètre de masse dans leurs utilisations courantes au laboratoire. Le TFA étant un

suppresseur ionique en spectrométrie de masse, celui-ci a été remplacé par de l'acide formique afin d'éviter tout problème de pollution du système UPLC. Le TFA à 0,05 % (pH de 3.0 environ) a donc été remplacé par de l'acide formique à 0,1 % (pH de 3.4 environ).

Initialement la détection des composés s'effectuait à 4 longueurs d'ondes différentes à l'aide de permutation de longueurs d'ondes au cours de l'acquisition. Une des permutations se réalisait lors de la détection de l'avobenzone, l'octinoxate et l'octisalate. Le premier était détecté à 360 nm, les deux autres à 300 nm. La permutation se faisant entre deux pics très proches, le changement de longueur d'onde sur le même chromatogramme pouvait poser un problème de détection. Nous avons décidé de détecter ces trois molécules à 315 nm dans le cadre de notre étude, nous permettant d'obtenir un signal suffisamment exploitable.

L'étude a été réalisée avec le détecteur PDA eλ à 220 nm pour le 2-phénoxyéthanol et l'acide benzoïque, à 250 nm pour le méthylparabène, le propylparabène et l'oxybenzone, puis à 315 nm pour l'avobenzone, l'octinoxate et l'octisalate. Le volume d'injection est de 3.0 μL. L'analyse s'effectue avec une colonne Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1 x 1,7 μm. La colonne est placée à 50 °C et le passeur échantillon à 10 °C. Les UPLC sont pilotés avec le logiciel de Waters Empower 2. On utilise en voie A de l'eau à 0,1 % d'acide formique (fournisseur : Sigma-Aldrich, CAS : 64-18.6) et en voie B de l'acétonitrile à 0,1 % en acide formique. Le débit est de 0,8 mL/min. Le Tableau V suivant indique les gradients utilisés pour chaque système en prenant en compte les volumes morts des UPLC.

Tableau V : Gradient de la phase mobile des systèmes UPLC, HClass et IClass pour l'étude des filtres UV et conservateurs.

UPLC			HClass			IClass		
Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B
Initial	95.0	5.0	Début gradient avant injection : 429 μL			Initial	95.0	5.0
			Initial	95.0	5.0			
7.00	0.0	100.0	7.00	0.0	100.0	7.00	0.0	100.0
10.00	95.0	5.0	10.00	95.0	5.0	10.00	95.0	5.0

Les solvants de rinçage sont constitués d'un mélange eau/acétonitrile 95/5 (Weak solvent) et d'acétonitrile (Strong solvent).

c) Etude d'esters d'alkyle d'acide sulfonique

Pour cette troisième étude, nous nous sommes intéressés à une note d'application de Waters réalisée par P. Aden et M. Jones [23] concernant l'analyse par UPLC d'esters d'alkyle d'acide sulfonique dans les matières premières pharmaceutiques. Cette étude est composée de six composés. L'acide benzènesulfonique (BA, CAS : 98-11-3), l'acide p-toluènesulfonique (TA, CAS : 6192-52-5), le benzènesulfonate de méthyle (MBS, CAS : 80-18-2), le p-toluènesulfonate de méthyle (MTS, CAS : 80-48-8) et le p-toluènesulfonate d'éthyle (ETS, CAS : 80-40-0) sont fournis par Sigma-Aldrich. Le benzènesulfonate d'éthyle (EBS, CAS : 515-46-8) est fourni par TCI. Un mélange de ces composés à 1000 ppm dans le méthanol (fournisseur : Biosolve, CAS : 67-56-1) est utilisé comme solution mère standard. Les solutions standards préparées dans l'étude seront ensuite diluées dans de l'eau Milli Q.

L'étude a été réalisée avec le détecteur PDA λ à 220 nm. Le volume d'injection est de 10.0 μ L. L'analyse s'effectue avec une colonne Acquity UPLC BEH Phényl 50 x 2,1 x 1,7 μ m. La colonne est placée à 50 °C et le passeur échantillon à 10 °C. Les UPLC sont pilotés avec le logiciel de Waters Empower 2. On utilise en voie A du formiate d'ammonium à 5 mM dans l'eau (fournisseur : Fluka, CAS : 540-69-2) et en voie B du méthanol. Le débit est de 0,6 mL/min. Le Tableau VI suivant indique les gradients utilisés pour chaque système en prenant en compte les volumes morts des UPLC respectives.

Tableau VI : Gradient de la phase mobile des systèmes UPLC, HClass et IClass pour l'étude des esters d'alkyl d'acide sulfonique.

UPLC			HClass			IClass		
Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B	Temps (min)	%A	%B
Initial	90.0	10.0	Début gradient avant injection : 469 μ L			Initial	90.0	10.0
			Initial	90.0	10.0			
5.00	2.0	98.0	5.00	2.0	98.0	5.00	2.0	98.0
6.00	2.0	98.0	6.00	2.0	98.0	6.00	2.0	98.0
8.00	90.0	10.0	8.00	90.0	10.0	8.00	90.0	10.0

Les solvants de rinçage sont constitués d'un mélange eau/méthanol 90/10 (Weak solvent) et de méthanol (Strong solvent).

d) Etude des pesticides

Pour la comparaison des spectromètres de masse, nous nous sommes intéressés à la publication réalisée par A.M. Botero-Coy *et al* [24] concernant l'analyse par LC-MS/MS de pesticides contenus dans les fruits tropicaux. Vingt pesticides sont séparés dans cette étude. Le méthamidiphose (MET, CAS : 10265-92-6), le piclorame (PIC, CAS : 1918-02-1), le méthomyle (MTL, CAS : 16752-77-5), l'imidaclopride (IMI, CAS : 138261-41-3), le diméthoate (DIM, CAS : 60-51-5), le carbendazime (CAR, CAS : 10605-21-7), le carbofurane (CRB, CAS : 1563-66-2), le 2,4 D (2,4 D, CAS : 94-75-7), l'atrazine (ATR, CAS : 1912-24-9), le diuron (DIU, CAS : 330-54-1), l'ametryne (AME, CAS : 834-12-8), le parathion-méthyle (PAR, CAS : 298-00-0), le malathion (MAL, CAS : 121-75-5), le propanile (PROPA, CAS : 709-98-8), le terbutryne (TER, CAS : 886-50-0), le propiconazole (PROPIL, CAS : 60207-90-1), le pirimiphos-méthyle (PIR, CAS : 29232-93-7), le butaclore (BUT, CAS : 23184-66-9), le chlorpyrifose (CHLOR, CAS : 2921-88-2) et le pendiméthaline (PEN, CAS : 40487-42-1) sont fournis par Sigma-Aldrich, qualité Pestanal. Un mélange de ces composés à 1000 ppm dans le méthanol (fournisseur : Biosolve, CAS : 67-56-1) est utilisé comme solution mère standard. Les solutions standards préparées dans l'étude seront ensuite diluées dans de l'eau Milli Q.

L'étude a été réalisée avec le SQD 2, le Xevo TQD et le Xevo TQ-S. En mode positif ESI+, la tension du capillaire est à + 3.0 kV. En mode négatif ESI-, la tension du capillaire est de - 2.8 kV. La source est à une température de 150 °C. Les tensions de cônes, énergies de collisions et les transitions sont reportées en Annexe 6 (page 104). Le volume d'injection est de 10.0 µL. L'analyse s'effectue avec une colonne Acquity UPLC HSS T3 50 x 2,1 x 1,8 µm. La colonne est placée à 35 °C et le passeur échantillon à 10 °C. Les systèmes sont pilotés avec le logiciel de MassLynx™ 4.1. On utilise en voie A de l'eau à 1 mM d'acétate d'ammonium (fournisseur : Sigma-Aldrich, CAS : 631-61-8) et en voie B du méthanol à 0.1 mM d'acétate d'ammonium et 0.01% d'acide formique (fournisseur : Sigma-Aldrich, CAS : 64-18.6). Le débit est de 0,6 mL/min. Le gradient de solvant est : 0 min, 30 % B ; 6 min, 90 % B ; 6.01 min, 30 % B ; 8 min, 30 % B.

Les solvants de rinçage sont constitués d'un mélange eau/méthanol 70/30 (Weak solvent) et de méthanol (Strong solvent).

II. Caractéristiques des instruments Waters

Nous allons déterminer les spécifications techniques entre les instruments d'une même gamme. Ces différences sont à l'origine des écarts pouvant être observés lors de transfert d'une analyse d'un système à un autre.

a) Comparaison des systèmes Acquity UPLC

Waters propose dans sa gamme UPLC trois systèmes. Le premier système, l'Acquity UPLC introduit en 2004, est binaire. Le second est un système quaternaire introduit en 2010, l'HClass. Elle a été mise au point dans le but de proposer une solution intermédiaire permettant au client un passage plus progressif de l'HPLC à l'UPLC. On peut réaliser des analyses en HPLC sur cet appareil et du développement en UPLC. Le dernier système sorti en 2011, l'IClass, est binaire et supporte des pressions plus importantes que les précédents systèmes. Ce dernier est une combinaison des améliorations et des expériences acquises suite à l'utilisation des systèmes précédents. Le Tableau VII est une comparaison de ces systèmes basée sur les spécifications instrumentales fournis par Waters [25-27], nous permettant de connaître leurs différences mais également leurs points communs. Ces configurations correspondent aux systèmes présents au laboratoire.

Tableau VII : Comparaison des systèmes Acquity UPLC de Waters hors détection.

Module	 UPLC	 HClass	 IClass
Année	2004	2010	2011
Pompe	<ul style="list-style-type: none"> -BSM : Binary Sample Manager (pompe binaire à 4 voies). -Mélangeur haute pression. -Pression max : 15 000 psi. 	<ul style="list-style-type: none"> -QSM : Quaternary Sample Manager (pompe quaternaire à 4 voies). -Mélangeur basse pression. -Pression max : 15 000 psi. 	<ul style="list-style-type: none"> -BSM : Binary Sample Manager (pompe binaire à 4 voies). -Mélangeur haute pression. -Pression max : 18 000 psi.
Injecteur	<ul style="list-style-type: none"> -SM : Sample Manager. -Système d'injection hors ligne. -Rinçage de l'aiguille hors ligne par un solvant à majorité organique puis par un second solvant à majorité aqueuse. -Boucle d'injection obligatoire. 	<ul style="list-style-type: none"> -FTN : Flow Through Needle. -Système d'injection en ligne. -Rinçage de l'aiguille en continu par l'éluant. Rinçage post-injection de l'extérieur de l'aiguille ainsi que de la seringue. -Pas de boucle présente en configuration standard, possibilité d'ajouter une boucle d'injection (<i>Extended Loop</i>) pour étendre la plage du volume d'injection. Volume d'injection en configuration standard : 0,1 à 10,0 µL. 	
		-Temps d'injection : < 30 s	- Temps d'injection : < 15 s.
Four colonne	<ul style="list-style-type: none"> -Préchauffage passif de la phase mobile. Echangeur de chaleur avec un serpent. -Plage : 20.0 à 90.0 °C. 	<ul style="list-style-type: none"> -Préchauffage actif de la phase mobile sur le capillaire sur une longueur de 8 mm avec une résistante chauffante. Possibilité de le désactiver ou de le retirer. -Plage : 20.0 à 90.0 °C 	
Volume mort	Aux alentours de 120 µL	Aux alentours de 400 µL	Aux alentours de 90 µL

L'UPLC et l'IClass sont deux systèmes binaires avec un mélangeur haute pression. Ce sont des pompes avec un fonctionnement similaire. La principale différence est la pression maximale supportée par le système qui est de 15 000 et 18 000 psi respectivement. L'ensemble de la pompe BSM de l'IClass a été optimisé afin de diminuer les volumes morts et supporter davantage de pression. Le système historique UPLC présente un volume mort de l'ordre de 120 µL. Le système IClass présente un volume mort de l'ordre de 90 µL, proche du système UPLC puisque les configurations sont similaires. L'optimisation des volumes au niveau de la pompe permet de diminuer davantage les phénomènes de diffusion. Le système HClass est équipé d'une pompe quaternaire supportant une pression maximale de 15 000 psi. Le système quaternaire HClass possède un volume mort de l'ordre de 400 µL. La hausse du volume mort s'explique principalement par le type de pompe, avec un mélangeur basse

pression ayant obligatoirement un volume plus important, puisqu'il peut y avoir jusqu'à 4 solvants mélangés.

Concernant l'injecteur, seul l'UPLC utilise un système d'injection hors ligne. Le rinçage de l'intérieur et extérieur de l'aiguille s'effectue en dehors du circuit de l'éluant. Après l'injection, l'intérieur de l'aiguille est rincée par un premier solvant à majorité organique si le soluté est soluble dans ce solvant (Strong Solvent) afin d'éliminer toute trace du produit injecté. Puis un second rinçage est effectué généralement avec un solvant à majorité aqueuse (Weak Solvent) pour d'une part éliminer le premier solvant de rinçage, et d'autre part être dans des conditions proches du début de gradient afin de préparer l'injection suivante. La composition du Weak Solvent peut être proche ou identique au Strong Solvent dans le cas d'analyse avec des colonnes de type hilic ou amide, car elles permettent de simuler une analyse en phase normale. Les systèmes HClass et IClass ont un système d'injection en ligne, c'est-à-dire un système intégré dans le circuit de l'éluant. Ce système permet un rinçage en continu de l'intérieur de l'aiguille par l'éluant diminuant les possibilités d'effet mémoire. L'extérieur de l'aiguille est rincé en fin d'acquisition avec un solvant similaire au Strong Solvent. La seringue est rincée avec un solvant similaire au Weak Solvent. Ce système s'apparente dans son fonctionnement au système d'injection que l'on retrouve sur les HPLC de chez Waters (de type système Alliance 2695).


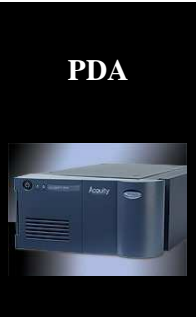
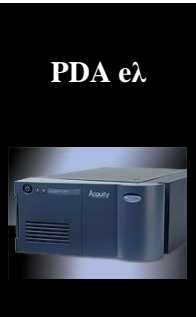
Le préchauffage de l'éluant à l'entrée du four a été modifié entre le système historique et les autres. Sur le système UPLC, le préchauffage de la phase mobile est passif. Avant d'entrer dans la colonne, l'éluant traverse un serpentin placé dans le four colonne, afin qu'il soit réchauffé à la température du four par un phénomène d'échange de chaleur. Sur les systèmes plus récents, le préchauffage de la phase mobile est actif. Le capillaire métallique amenant l'éluant en tête de colonne est chauffé sur une longueur de 8 mm, suite à un contact avec une résistante chauffante, afin d'amener la phase mobile à la température du four. Ce préchauffage peut être désactivé ou retiré.

Nous verrons dans la suite de ce mémoire, l'impact de ces différences de volume mort, d'injecteur ou encore de préchauffage de la phase mobile. Celles-ci sont caractéristiques du système utilisé, et peuvent engendrer des écarts de performances entre les systèmes.

b) Comparaison des détecteurs UV de la gamme Acquity de Waters

La gamme des détecteurs Acquity UPLC UV comporte trois détecteurs. Le détecteur TUV permet l'acquisition simultanée de deux chromatogrammes à deux longueurs d'onde différentes. Ce détecteur offre la possibilité d'acquérir un ou deux chromatogrammes. Les deux autres détecteurs sont des détecteurs à barrettes de diodes (PDA et PDA eλ) permettant l'acquisition de spectres UV. Le chromatogramme est ensuite extrait à la longueur d'onde choisie. Le Tableau VIII est une comparaison de ces détecteurs basée sur les spécifications instrumentales fournies par Waters [28-30].

Tableau VIII : Comparaison des détecteurs Acquity UPLC UV de Waters.

 <p>TUV</p>	<ul style="list-style-type: none">-Volume de cellule standard : 500 nL - 10mm (cellule analytique). Possibilité de mettre une cellule de 1500 nL - 5 mm (cellule inerte) ou une cellule de 2400 nL - 25 mm (cellule de haute sensibilité).-Lampe au deutérium.-Plage : 190 à 700 nm.-Fréquence d'acquisition : 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 Hz.
 <p>PDA</p>	<ul style="list-style-type: none">-Volume de cellule standard : 500 nL - 10mm (cellule analytique). Possibilité de mettre une cellule de 1500 nL - 5 mm (cellule inerte) ou une cellule de 2400 nL - 25 mm (cellule de haute sensibilité).-Lampe au deutérium.-Plage : 190 à 500 nm.-Résolution : 1.2 à 12.0 nm.-Fréquence d'acquisition : 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 Hz.
 <p>PDA eλ</p>	<ul style="list-style-type: none">-Volume de cellule standard : 500 nL - 10mm (cellule analytique). Possibilité de mettre une cellule de 1500 nL - 5 mm (cellule inerte) ou une cellule de 2400 nL - 25 mm (cellule de haute sensibilité).-Lampe au deutérium.-Plage : 190 à 800 nm.-Résolution : 1.2 à 12.0 nm.-Fréquence d'acquisition : 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 Hz.





Chaque détecteur UV a les mêmes fréquences d'acquisitions et la même gamme de cellule. La principale différence entre les détecteurs PDA et le TUV est le système optique. Concernant les détecteurs PDA, ils se distinguent l'un de l'autre uniquement sur l'étendue de la plage de longueur d'onde.

Suite aux différentes études réalisées, nous verrons ultérieurement s'il existe une différence de sensibilité entre ces détecteurs.

c) Comparaison des détecteurs MS quadripôle de Waters

La famille Xevo[®] des détecteurs de masse de Waters concerne les détecteurs Triple Quadripôle. Cette gamme se compose de 3 détecteurs : le Xevo TQD, le Xevo TQ MS et le Xevo TQ-S. Waters propose également dans sa gamme de spectromètre de masse un Simple Quadripôle qui est le SQD 2. Le Tableau IX est une comparaison de ces détecteurs basée sur les spécifications instrumentales fournies par Waters [31-34], afin de nous permettre de connaître leurs différences mais également leurs points communs.

Tableau IX : Comparaison des spectromètres de masse de la famille Xevo de Waters.

Détecteur	 SQD 2	 Xevo TQD	 Xevo TQ MS	 Xevo TQ-S
Année	2011	2011	2008	2010
Source	Ionisation à pression atmosphérique, source Z-spray. Différents mode d'ionisation sont possible avec la sonde adéquate : ESI/APCI/ESCI [®] /APPI/ASAP/APGC. Débit maximal LC : 2.0 mL/min			
Optique de transfert	Stack Ring [™]		Hexapôle	StepWave [™]
Cellule de collision	Non existant	T-Wave [™]	ScanWave [™]	
Gamme de masse	2 – 3072 m/z		2 – 2048 m/z	
Balayage en masse	1 à 15 000 Da/s		1 à 10 000 Da/s	
Switch de polarité	20 ms			
Switch de mode MS à MS/MS	Non applicable	3 ms	5 ms	3 ms
Minimum Dwell time	3 ms		1 ms	1 ms
Délai minimum inter-channel	3 ms	3 ms	3 ms (pour un dwell time 3 ms). 7 ms (pour un dwell time 1 ms).	3 ms

Les principales différences sont l'optique de transfert des ions et la cellule de collision.

Chaque détecteur utilise la même source à l'exception du Xevo TQ-S dont l'orifice du cône est plus large. Le Xevo TQD et le SQD 2 utilise des anneaux de transfert tandis que le Xevo TQ MS est équipé d'un hexapôle comme optique de transfert. Celui du Xevo TQ-S est un système innovant appelé StepWave. La Figure 16 illustre sa composition en deux parties.

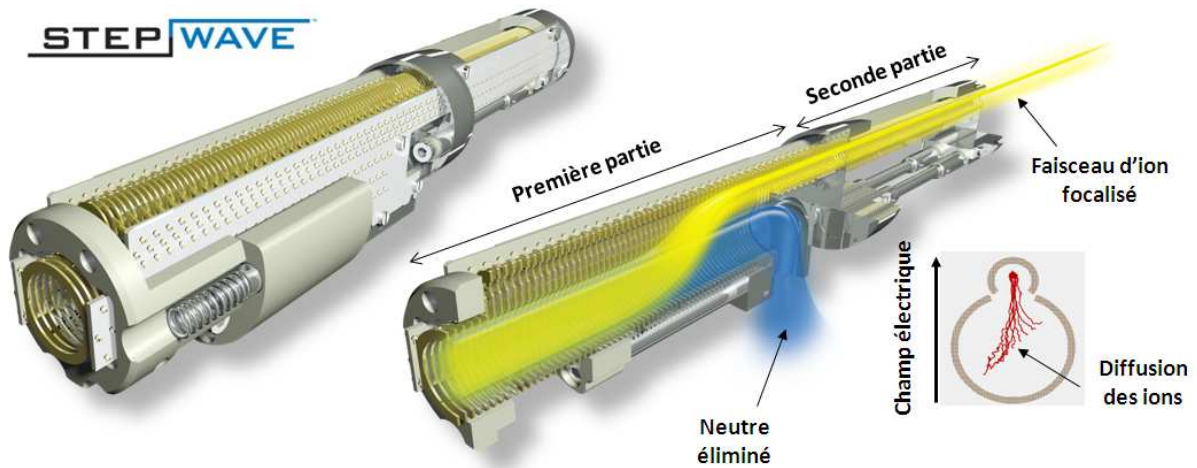


Figure 16 : Principe de fonctionnement du StepWave. Vu éclatée de l'optique de transfert du Xevo TQ-S [35].

La première partie est composée de deux guides d'ions (lentilles en série) empilés de rayon différent auxquels on applique un champ électrique ascendant verticalement. Le cône étant plus large, une quantité plus importante d'ions et de neutres entre dans la source. La différence de potentiel permet de dévier les ions dans la seconde partie et de les séparer des neutres à éliminer par pompage. L'augmentation du nombre d'ions entrant dans la source permet une hausse de sensibilité du détecteur.

La cellule de collision du Xevo TQD est de conception similaire aux autres détecteurs. Elle se nomme T-Wave et est illustrée en Figure 17.

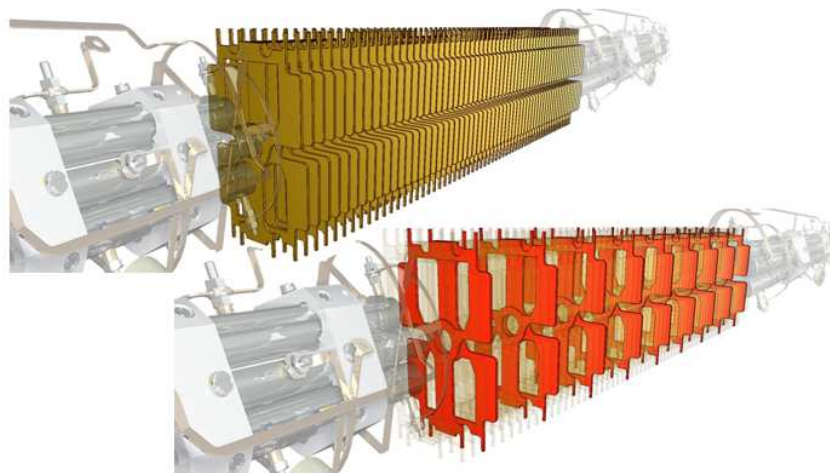


Figure 17 : Vues éclatées de la cellule de collision T-Wave du Xevo TQD.

Les ions sont focalisés dans la région centrale afin d'y subir la fragmentation avec le gaz de collision, qui est de l'argon. La cellule de collision T-Wave est constituée de plusieurs lentilles successives auxquelles on applique, en plus du courant alternatif, une tension continue opposée entre plaques adjacentes, et se déplaçant de lentilles en lentilles à une vitesse prédéfinie pour parcourir la cellule. L'ion est entraîné à travers la cellule avec les variations de courant. Il y a constamment 8 impulsions qui traversent la cellule à différents endroits le long de l'axe central de la cellule. Cette cellule de collision permet de réaliser des acquisitions très rapides, en adéquation avec l'utilisation d'une UPLC[®] sans perte de sensibilité. La vitesse de basculement entre les modes MS et MS/MS en 3 ms et la possibilité de changement de polarité dans une même acquisition en 20 ms en font également un outil très performant, tout en permettant de réduire le temps d'analyse [36].

Le Xevo TQ MS et TQ-S sont équipés du ScanWave comme cellule de collision. En réalité il s'agit d'une cellule de collision T-Wave, ayant la possibilité d'appliquer une barrière de potentiel à un endroit spécifique de la cellule, permettant d'accumuler les ions parents et fils. Ils seront ensuite libérés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) en baissant progressivement cette barrière, de façon synchrone avec le second analyseur quadripolaire. Ce mode permet de libérer de façon intelligente les ions accumulés vers le second analyseur, améliorant la sensibilité de la détection en mode MS/MS en augmentant l'intensité du signal des ions [37].

Nous verrons dans la suite de ce mémoire, les différences de sensibilité entre ces détecteurs mais également les différences de sensibilité entre les différents modes d'acquisition possible (Full Scan, SIR et MRM).

Résultats et discussions

Nous allons nous intéresser dans cette partie à la détermination de l'impact instrumental des UPLC sur une analyse, l'évaluation de la différence de sensibilité des détecteurs UV ainsi que des détecteurs MS suivant les modes d'acquisitions possible.

I. Détermination de la performance instrumentale sur une analyse

Cette partie est consacrée à la comparaison des résultats obtenus suite à l'étude de trois méthodes d'analyses distinctes appliquées sur les trois systèmes UPLC proposés par Waters. Le volume mort de chaque système a été mesuré avant chaque transfert de méthode suivant le protocole décrit en Annexe 7 (page 105). Le transfert de gradient se réalise avec le logiciel Acquity UPLC Column Calculator présenté en Annexe 8 (page 107).

a) Choix des critères de performances suivis

Une méthode d'analyse est dite sélective lorsque le système utilisé permet de distinguer des composés d'un mélange injecté, c'est-à-dire capable de les séparer les uns des autres. La résolution est un paramètre qui permet d'évaluer la performance du système car elle indique la qualité de séparation entre 2 composés. D'après la formule (7) et comme nous le montre la Figure 18, elle dépend de différents paramètres.

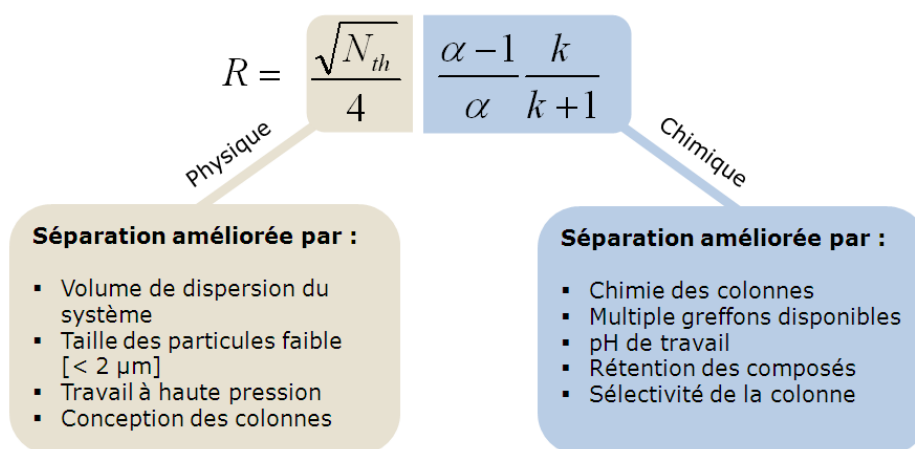


Figure 18 : Facteurs physique et chimique influant sur la résolution.

Dans nos études, la colonne et la phase mobile n'étant pas modifiées d'un système à un autre, les paramètres comme la sélectivité α et le coefficient de partage k auront peu d'impact sur l'évolution de la résolution dans notre démarche. Afin d'expliquer l'évolution de la résolution R , nous analyserons également l'évolution du nombre de plateaux théoriques N_{th} .

Afin de vérifier la performance du système, nous vérifierons la linéarité d'injection en construisant une gamme de standard. Le logiciel Empower 2 utilise la méthode des moindres carrés pour construire la droite de régression linéaire. Nous comparerons les coefficients de corrélation linéaire (R^2) pour déterminer la validité de la droite. Une répétabilité de l'injecteur sur 6 injections consécutives est également réalisée.

Afin de comparer les performances des instruments sur la résolution, nous effectuons un rapport des résolutions pour chaque molécule sur chaque instrument. Ce facteur correspond au rapport de la résolution obtenue sur un instrument sur la résolution obtenue avec un instrument servant de référence pour une molécule donnée. Les facteurs multiplicatifs présents dans les tableaux de résultats correspondent à ce rapport. Ils formeront les séries de résultats pour les études statistiques.

b) Etude des acides aminés

Le protocole d'analyse utilisé par W. Liming *et al* pour effectuer l'analyse d'acides aminés contenus dans la gelée royale a été repris pour cette première étude. La gelée royale est très riche en protéines, acides aminés, lipides, vitamines et sucres. Elle joue un rôle important dans le développement de la reine des abeilles et de ses larves. A l'échelle humaine, elle est principalement utilisée dans les produits commerciaux dans le domaine de la santé, l'alimentation ou encore les cosmétiques. La détermination de la composition en acides aminés est un fort indicateur de la qualité de la gelée royale puisqu'ils ont un rôle fondamental dans la constitution des protéines par exemple (plus particulièrement les acides α -aminés).

La Figure 19 présente les profils chromatographiques des séparations obtenues sur les différents systèmes UPLC, HClass et IClass avec une même solution à 1.0 nmol/mL.

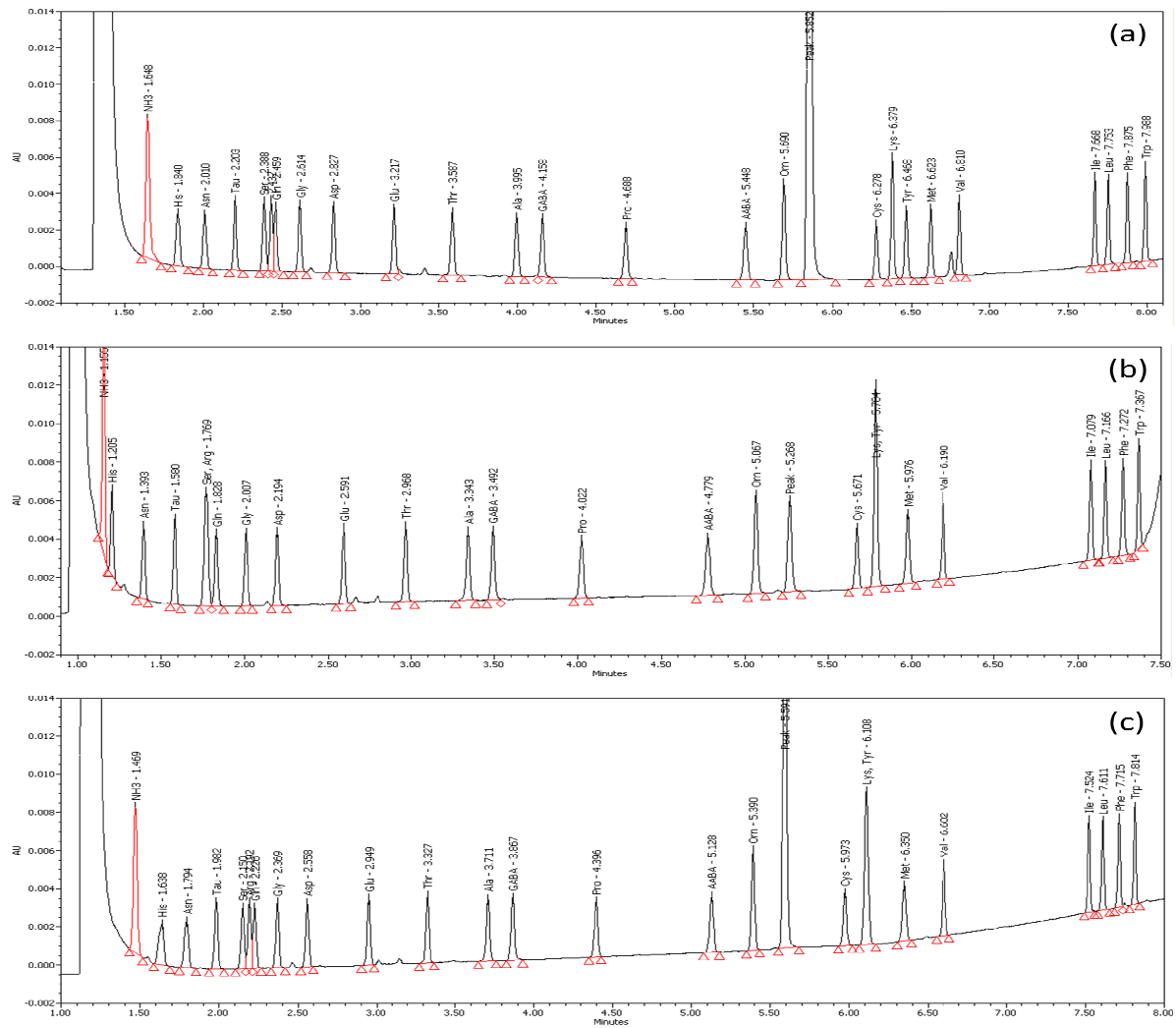


Figure 19 : Séparation obtenue sur les systèmes UPLC (a), HClass (b) et IClass (c) d'un mélange de 24 acides aminés à 1.0 nmol/mL.

L'acquisition de ces chromatogrammes a permis d'obtenir les résultats résumés en Annexe 9 (page 109).

Dans un premier temps, sans comparer les valeurs numériques, on observe une perte de sélectivité de la méthode avec la HClass à cause des deux coélutions entre Ser et Arg puis entre Lys et Tyr. Dans un second temps, en effectuant une comparaison des résultats, on voit que sur le système HClass, l'acide aminé Gln est mieux séparé d'Arg, ceci grâce à la coélution de celui-ci avec Ser. Au niveau de la résolution, sans considérer les coélutions, on observe que le système HClass ne donne pas de meilleurs résultats puisqu'en moyenne elles sont équivalentes vis-à-vis de l'UPLC (rapport moyen de 0.98). Ce manque de performance se confirme lors de la comparaison du nombre de plateaux théoriques pour chaque acide aminé entre les deux systèmes, puisque l'on évalue un rapport moyen de 0.73 lors du passage sur le système HClass.

Comme avec le système HClass, on observe une coélution entre Lys et Tyr sur le système IClass. A contrario, Ser et Arg sont séparés avec une résolution supérieure à celle obtenue en UPLC, d'un facteur 1.12. De plus en comparant les résolutions entre les systèmes UPLC et IClass, on note qu'elles sont sensiblement équivalente, avec une amélioration vis-à-vis des résultats obtenus avec l'HClass (rapport moyen de 1.02). Une diminution du nombre de plateaux théoriques est observable mais uniquement d'un rapport moyen de 0.92 en IClass contrairement au 0.73 avec l'HClass.

Dans le cadre de cette étude, la linéarité a été vérifiée pour l'ensemble des acides aminés. La linéarité s'effectue de 0.1 à 50.0 nmol/mL. La répétabilité a été réalisée sur le standard à 1 nmol/mL. Les résultats sont présentés en Annexe 9 (page 109).

Au vu des résultats, on observe que pour l'ensemble des acides aminés et sur l'ensemble des systèmes, la corrélation est parfaite avec un coefficient de corrélation supérieur à 0.99, ce qui nous permet d'affirmer que les systèmes sont linéaires sur une gamme allant de 0.1 à 50.0 nmol/mL. Le coefficient de variation du temps de rétention et de l'aire de chaque acide aminé, inférieur à 0.3 % et 2.1 % respectivement, montre que l'injection est répétable.

c) Etude des filtres UV et conservateurs

Les conditions opératoires de la note d'application de P.J. Lee *et al* pour analyser les filtres UV et les conservateurs contenus dans les produits cosmétiques ont servi de base à cette seconde étude. Les normes mondiales et les réglementations de nombreux pays à travers le monde imposent le contrôle de la composition des produits cosmétiques ainsi que l'indication des composants sur l'emballage. Aux U.S.A., seul 9 filtres UV-B et 7 filtres UV-A sont autorisés par la FDA dans la formulation des crèmes solaires, alors que 28 filtres UV sont autorisés en Europe. Les conservateurs présents dans ces produits permettent d'éviter le développement bactérien ou la moisissure des produits. Leurs utilisations sont également réglementées par la FDA et les Directives du Conseil de la Communauté Européenne.

La détection s'effectuant à différentes longueurs d'ondes, on décide de réaliser des permutations de longueurs d'ondes au cours de l'acquisition, nous permettant d'obtenir la séparation des composés sur un même chromatogramme.

Les décrochages de la ligne de base visible sur les chromatogrammes correspondent aux permutations des longueurs d'ondes et sont résumés dans le Tableau X.

Tableau X : Permutation des longueurs d'ondes pour chaque système au cours de l'acquisition afin de détecter l'ensemble des molécules sur un même chromatogramme.

UPLC			HClass			IClass		
Temps (min)	Event	λ (nm)	Temps (min)	Event	λ (nm)	Temps (min)	Event	λ (nm)
0.00	Wavelength Auto Zéro	220	0.00	Wavelength Auto Zero	220	0.00	Wavelength Auto Zero	220
1.84	Wavelength Auto Zero	250	1.76	Wavelength Auto Zero	250	1.75	Wavelength Auto Zero	250
4.90	Wavelength Auto Zero	315	4.80	Wavelength Auto Zero	315	4.70	Wavelength Auto Zero	315

La Figure 20 présente les profils chromatographiques des séparations obtenues sur les différents systèmes UPLC, HClass et IClass pour une même solution à 10.0 $\mu\text{g/mL}$.

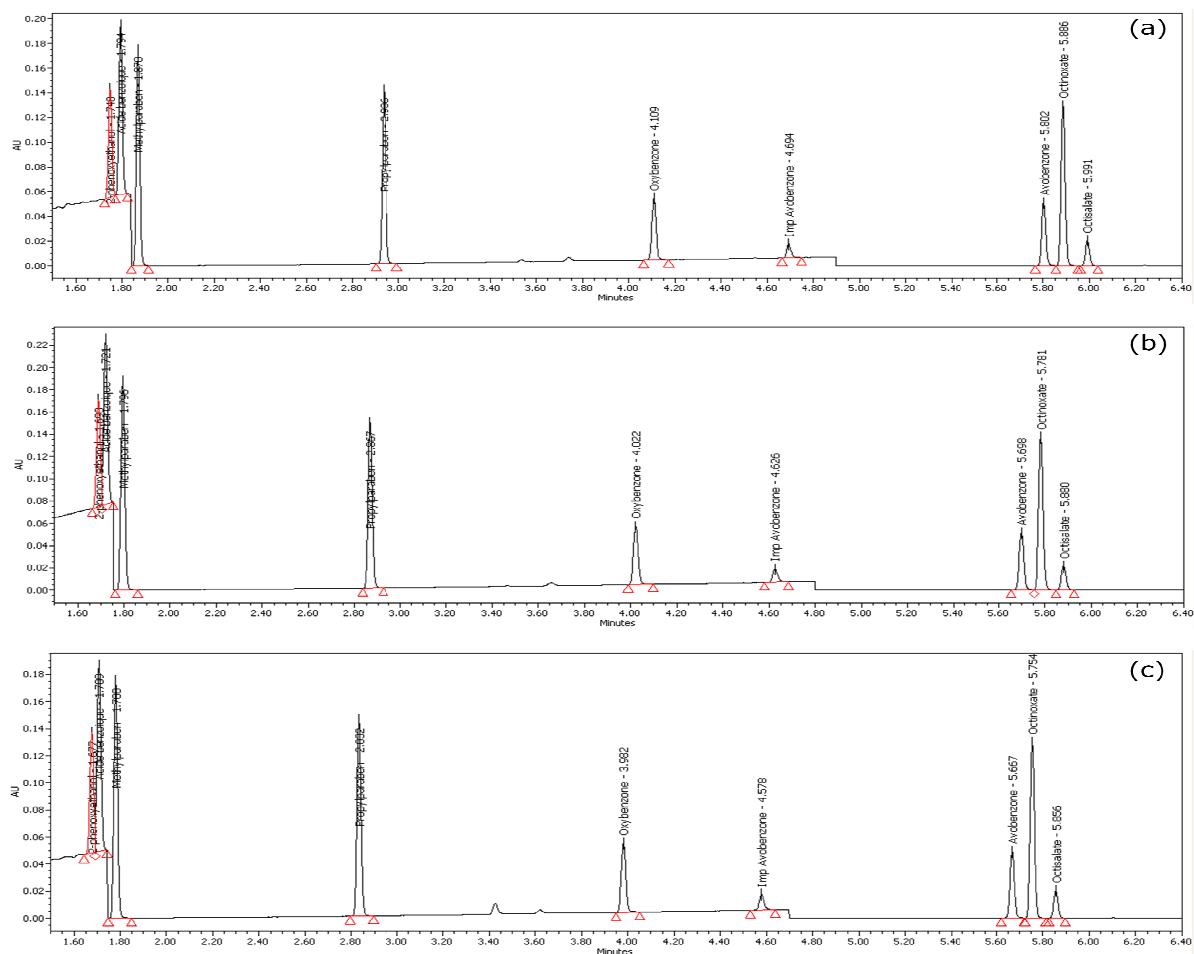


Figure 20 : Séparation obtenue sur les systèmes UPLC (a), HClass (b) et IClass (c) d'un mélange de 4 filtres UV et 4 conservateurs à 10.0 $\mu\text{g/mL}$.

L'acquisition de ces chromatogrammes a permis d'obtenir les résultats résumés en Annexe 10 (page 113).

Le tableau comparatif montre que les systèmes HClass et IClass ne sont pas plus performants que l'UPLC. En HClass, nous avons un rapport moyen de 0.80 en résolution et de 0.83 en IClass. La baisse est également visible au niveau des plateaux théoriques où l'on a en moyenne un rapport de 0.71 avec les deux systèmes.

Cette analyse montre de nouveau la baisse de performance lors d'un transfert de l'UPLC vers l'HClass. La baisse de performance observable avec le système IClass est beaucoup plus prononcée que lors de l'étude précédente. De plus on remarque que les résultats obtenus sur les systèmes HClass et IClass sont équivalents.

Une vérification de la linéarité a été réalisée pour l'ensemble des filtres UV et des conservateurs de 1.0 à 50.0 µg/mL. La répétabilité sur six injections a été réalisée sur le standard à 10.0 µg/mL. Les résultats sont présentés en Annexe 10 (page 113).

Pour l'ensemble des composés et sur l'ensemble des systèmes, la corrélation est parfaite. Nous obtenons un coefficient de corrélation supérieur à 0.99. Le coefficient de variation du temps de rétention et de l'aire de chaque composé, inférieur à 0.1% et 0.6 % respectivement, nous montre que l'injection est répétable.

d) Etude d'esters d'alkyle d'acide sulfonique

La note d'application de P. Aden et M. Jones pour l'analyse des esters d'alkyle d'acide sulfonique dans les matières premières pharmaceutiques est appliquée pour cette troisième étude. Les méthanesulfoniques, benzènesulfoniques et p-toluènesulfonique sont des réactifs couramment utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Plusieurs de ces mésylates (méthanesulfonate), bésylates (benzènesulfonate) et tosylates (p-toluènesulfonate) sont connus pour être génotoxiques. Les Pharmacopées Européenne et Américaine imposent que chaque impureté génotoxique ne pouvant être éliminée des produits médicamenteux, soit contrôlée et surveillée. Leur présence doit être en dessous du seuil toxicologique de 1.5 µg/jours basé sur la dose maximale journalière du composé pharmaceutique.

La Figure 21 présente les profils chromatographiques des séparations obtenues sur les différents systèmes UPLC, HClass et IClass pour une même solution à 1.0 ppm.

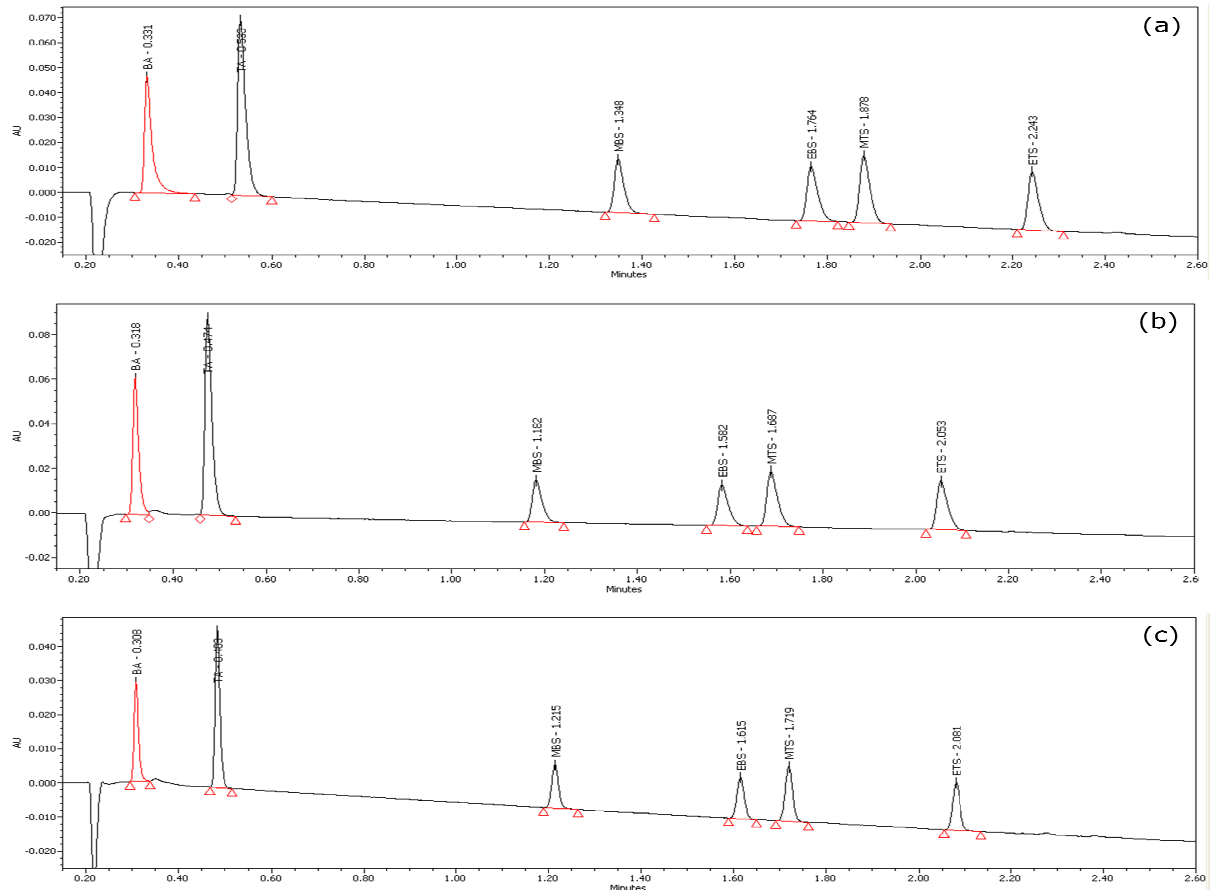


Figure 21 : Séparation obtenue sur les systèmes UPLC (a), HClass (b) et IClass (c) d'un mélange de 6 esters d'alkyl d'acide sulfonique à 1.0 ppm.

L'acquisition de ces chromatogrammes a permis d'obtenir les résultats résumés en Annexe 11 (page 115).

Les résultats montrent une légère diminution des résolutions lors du transfert d'analyse vers le système HClass (rapport moyen de 0.94). De même cette diminution est présente au niveau des plateaux théoriques (rapport moyen de 0.91). A contrario, nous avons une amélioration lors du transfert sur le système IClass. Nous obtenons un gain d'un rapport 1.32 en moyenne, ce qui n'est pas négligeable. De même, ce gain est observable lors de la comparaison du nombre des plateaux théoriques (rapport moyen de 1.73).

La linéarité a également été vérifiée pour l'ensemble des composés, sur une plage de 0.1 à 10.0 ppm. La répétabilité a été réalisée sur le standard à 1.0 ppm. Les résultats sont présentés en Annexe 11 (page 115).

Avec un coefficient de corrélation supérieur ou égal à 0.99 pour l'ensemble des composés et sur l'ensemble des systèmes, la corrélation est parfaite sur une gamme allant de

1.0 à 10.0 ppm. Le coefficient de variation du temps de rétention et de l'aire de chaque composé, inférieur à 0.2 % et 0.9 % respectivement, montre que l'injection est répétable.

e) Conclusions préliminaires

Initialement la perte de performance lors d'un transfert de l'UPLC vers l'HClass était prévisible puisque l'on transfère une méthode d'un système binaire à un système quaternaire. A l'inverse, le passage du système UPLC vers l'IClass devait apporter un gain de performance, or les résultats montrent que ce n'est pas forcément le cas.

Concernant l'étude des acides aminés, on a principalement une perte à cause de phénomènes de coélution : 2 en HClass et 1 en IClass.

Concernant l'étude des filtres UV et des conservateurs, on a une équivalence des performances entre l'HClass et l'IClass, ce qui est très surprenant compte tenu de la différence de configuration entre ces systèmes. De plus ces instruments sont moins performants que l'UPLC lorsque l'on compare les résultats.

Concernant l'étude des esters d'alkyles d'acide sulfonique, on observe au contraire des autres études, une légère perte lors du transfert vers l'HClass et un gain non négligeable lors du transfert vers l'IClass.

Ces résultats montrent qu'un autre facteur que le volume mort des instruments impacte la qualité de séparation et donc les critères de performances. Les résultats montrent également que ce paramètre est spécifique puisqu'il influe sur une certaine partie de la séparation ou certaines molécules. On émet alors comme hypothèse que le système de préchauffage de la phase mobile puisse être une cause de ces variations et de la baisse de performance entre les systèmes. En effet, le système de préchauffage est une autre des principales différences entre les systèmes HClass et IClass et le système UPLC.

II. Détermination de l'influence du système de préchauffage

Les principales différences entre les systèmes sont les variations de volume mort mais également l'innovation du préchauffage actif de la phase mobile (preheater). Sur le système UPLC, il s'agit d'un échangeur de chaleur avec un serpentín avant la colonne. Dans les nouveaux systèmes, il s'agit d'un chauffage actif sur le capillaire sur une longueur de 8 mm avec une résistante chauffante. Ce paramètre souvent oublié peut être à l'origine des résultats inattendus obtenus précédemment.

Pour mettre en évidence l'influence de ce paramètre, nous avons refait ces études sur le système HClass et IClass, avec les mêmes gradients, dans les mêmes conditions opératoires mais en désactivant d'une part le preheater (preheater éteint), et d'autre part en le remplaçant par l'échangeur de chaleur en forme de serpentín du système UPLC (preheater passif). Afin de confirmer les résultats, nous avons optimisé le gradient de la phase mobile en IClass afin d'optimiser la séparation. L'analyse avec le gradient optimisé a ensuite été transférée sur les systèmes HClass et UPLC. De l'IClass vers l'HClass, seul le volume mort impactera les résultats puisque le système de préchauffage est identique. Alors que de l'IClass vers l'UPLC, le préchauffage impactera majoritairement la séparation puisque les volumes morts sont proches.

a) **Variation du mode d'utilisation du preheater**

1. Etude des acides aminés

Dans un premier temps, nous avons regardé l'effet du preheater sur la séparation des acides aminés. Les valeurs nécessaires au calcul du nombre de plateaux théoriques pour les molécules subissant la coélution et celles aux alentours sont regroupées dans un tableau en Annexe 9 (page 109).

En comparant l'HClass et l'IClass avec le système UPLC, les composés encadrant la coélution ont une largeur à mi-hauteur supérieure ou égale à celle en UPLC. Au contraire lorsqu'il n'y a plus de coélution, ces composés ont une largeur à mi-hauteur plus faible. Un facteur commun existe bien entre l'HClass et à l'IClass et qui influe sur les performances des systèmes.

La Figure 22 est une superposition des séparations obtenues sur HClass avec les différents modes d'utilisation du preheater (les valeurs numériques en Annexe 9, page 109).

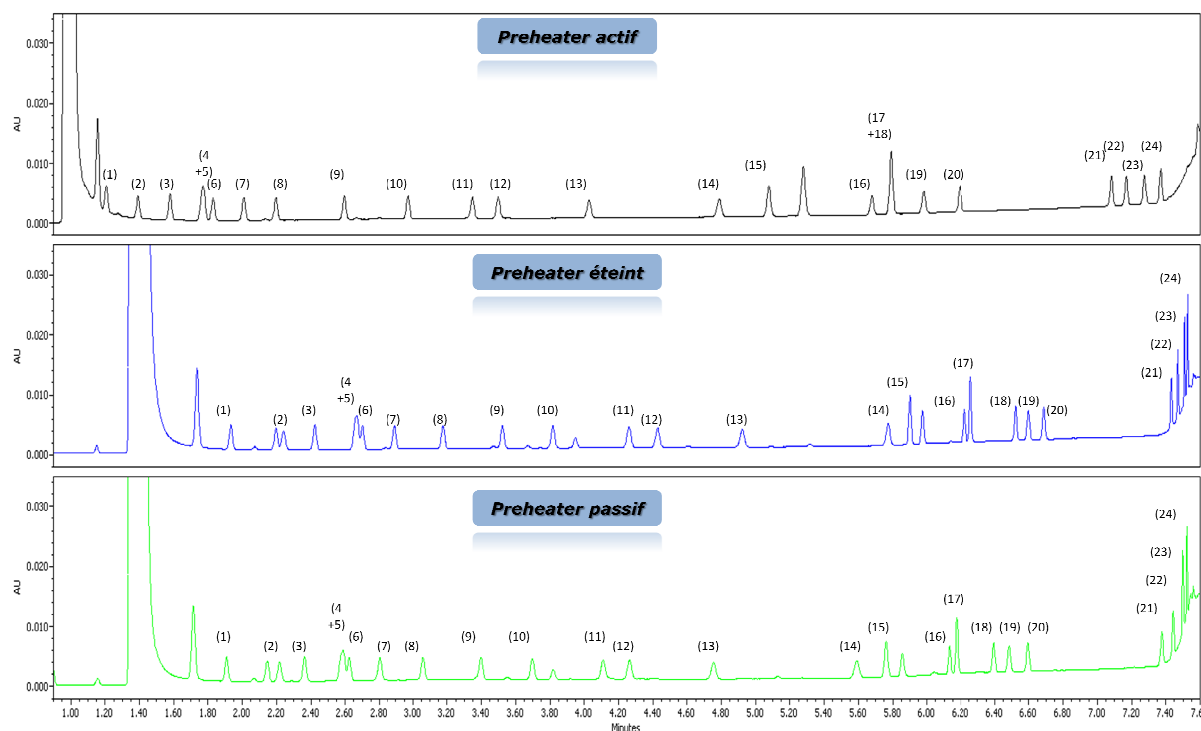


Figure 22 : Evolution de la séparation des acides aminés en fonction des 3 modes d'utilisation du preheater sur HClass.

Avant toute comparaison de valeurs, on voit nettement que la simple modification du mode d'utilisation du preheater change la séparation, puisque nous n'avons plus qu'une seule coélution au lieu de deux initialement. Au niveau des molécules encadrant la coélution, on observe le même phénomène précédemment décrit.

Sans tenir compte des coélutions, on observe que les résolutions sont très différentes en HClass avec les 2 nouveaux modes d'utilisation du preheater en comparaison de l'UPLC. Sur l'ensemble de la séparation, le rapport moyen en HClass avec le preheater éteint est de 1.08 et de 0.96 avec le preheater passif. Lorsque l'on considère le rapport médian sur l'ensemble de la séparation pour la résolution, il est de 0.88 avec le preheater éteint et de 0.81 avec le preheater passif. Ceci indique que certaines valeurs biaisent ce rapport moyen et se confirme lorsque l'on regarde les chromatogrammes. Nous avons d'une part les quatre derniers acides aminés qui sont élués dans le gradient de rinçage, et d'autre part l'augmentation de la résolution entre Lys et Tyr. Pourtant lorsque l'on regarde le nombre de plateaux théoriques, le rapport médian est de 1.21 avec le preheater éteint et de 0.98 avec le preheater passif, le rapport moyen est quant à lui de 1.43 et 1.07 respectivement.

Bien qu'il y ait une amélioration au niveau de la séparation entre Lys et Tyr, quelque soit le mode d'utilisation du preheater, le système HClass reste moins performant que le

système UPLC. On note tout de même que l'utilisation du preheater influe sur la séparation de Lys et Tyr mais pas de Ser et Arg.

La Figure 23 est une superposition des séparations obtenues sur IClass avec les différents modes d'utilisation du preheater (valeurs numériques en Annexe 9, page 109).

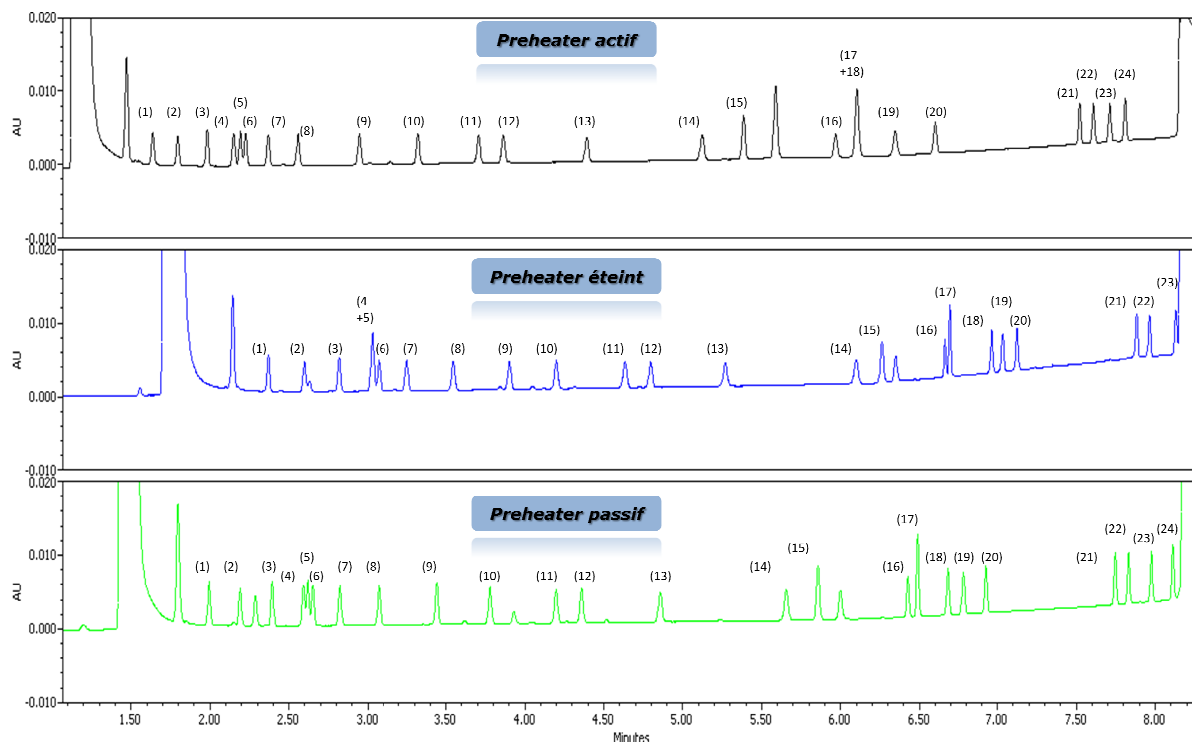


Figure 23 : Evolution de la séparation des acides aminés en fonction des 3 modes d'utilisation du preheater sur IClass.

Avec le système IClass, suivant le mode d'utilisation du preheater, nous avons trois profils chromatographiques différents. Avec le preheater éteint, la coélution entre Lys et Tyr n'est plus présente mais celle entre Ser et Arg l'est de nouveau. Avec le preheater passif, plus aucune coélution n'est présente, avec des largeurs à mi-hauteur plus faibles qu'en UPLC.

Le système IClass donne de meilleurs résultats que le système HClass. On observe une amélioration des performances du système IClass en fonction du mode d'utilisation du preheater sur ces acides aminés. Sur l'ensemble de la séparation, le rapport moyen est de 1.17 avec le preheater éteint et de 1.12 avec le preheater passif. Pour la même raison qu'en HClass, ces valeurs sont à prendre avec précaution puisque le rapport médian est de 0.98 et 1.04 respectivement, ce qui permet d'en conclure à une équivalence au système UPLC. Concernant le nombre de plateaux théoriques, le rapport moyen est de 1.63 et 1.35 respectivement, avec un rapport médian de 1.42 et 1.23 respectivement. Cela indique que

malgré une équivalence sur la séparation avec l'UPLC, l'IClass offre une possibilité d'augmenter la sensibilité de la détection avec une amélioration du nombre de plateaux théoriques.

2. Etude des filtres UV et conservateurs

Dans un second temps, la même démarche de comparaison d'utilisation du preheater a été appliquée à l'étude des filtres UV et des conservateurs. Les valeurs nécessaires au calcul du nombre de plateaux théoriques pour les molécules subissant la coélution et celles aux alentours sont regroupées dans un tableau en Annexe 10 (page 113).

Avec l'appui de ce tableau, on remarque que les temps de rétention entre HClass et IClass sont sensiblement identiques ainsi que les largeurs à mi-hauteur. Or en comparaison avec le système UPLC, les temps de rétention sont supérieurs et les largeurs à mi-hauteur inférieures aux autres systèmes. Ceci explique la différence observée sur le nombre de plateaux théoriques, et donc les écarts de résolution. Comme pour l'étude précédente, il y a un facteur commun à l'HClass et à l'IClass qui influe sur les performances des systèmes.

La comparaison réalisée dans cette partie n'a pu être réalisée que sur le système IClass car on atteignait les limites de pression sur le système HClass.

La Figure 24 est une superposition des séparations obtenues sur IClass avec les différents modes d'utilisation du preheater (les valeurs numériques 10).

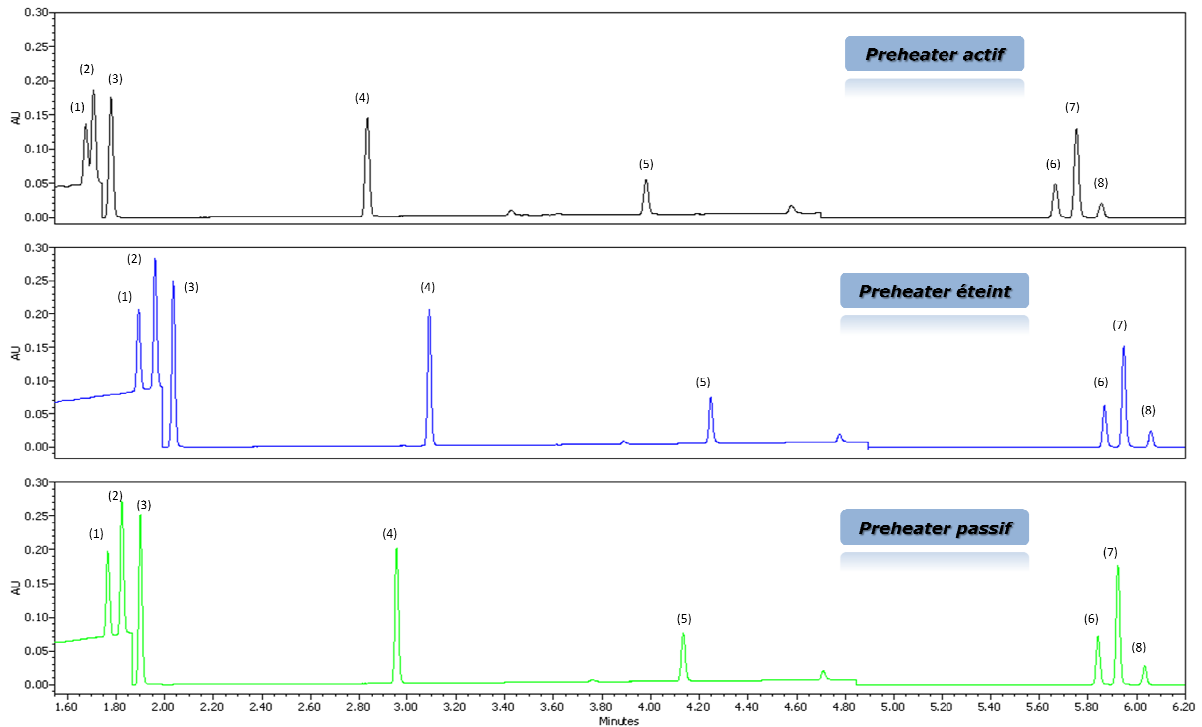


Figure 24 : Evolution de la séparation des filtres UV et des conservateurs en fonction des 3 modes d'utilisation du preheater sur IClass.

Avec le système IClass, les temps de rétention sont plus courts que sur le système UPLC, mais les largeurs à mi-hauteurs sont plus importantes entraînant une baisse du nombre de plateaux théoriques. A l'inverse, lorsque que le preheater est désactivé ou remplacé par le serpentín du système UPLC, les temps de rétention sont légèrement plus importants ou sensiblement identiques. Mais la différence est surtout au niveau de la largeur à mi-hauteur, où la faible variation permet une augmentation significative du nombre de plateaux théoriques.

La hausse du nombre de plateaux théoriques indique une amélioration des performances du système. Le rapport moyen est de 1.33 avec le preheater éteint et de 1.29 avec le preheater passif. Cette hausse permet une amélioration de la résolution, où l'on observe un rapport moyen de 1.16 en utilisant le preheater éteint et de 1.17 avec le preheater passif. Cette amélioration est confirmée lorsque l'on compare ces valeurs au rapport médian puisqu'il est de 1.11 et de 1.14 respectivement.

Ces valeurs montrent l'impact de l'utilisation du preheater puisque nous avons une amélioration des performances et de l'équivalence entre l'utilisation du preheater éteint et son remplacement par le système présent sur le système UPLC. L'utilisation d'un système IClass offre des possibilités d'amélioration de séparation plus performante que le système UPLC historique dans cette étude.

3. Etude des esters d'alkyle d'acide sulfonique

En appliquant la même approche, nous avons également réalisé la comparaison d'utilisation du preheater sur l'étude des esters d'alkyle d'acide sulfonique. Les valeurs nécessaires au calcul du nombre de plateaux théoriques pour les molécules subissant la coélution et celles aux alentours sont regroupées dans un tableau en Annexe 11 (page 115).

On remarque que les largeurs à mi-hauteur entre UPLC et HClass sont équivalentes avec des temps de rétention légèrement plus faibles en HClass. Ceci entraîne une faible diminution du nombre de plateaux théoriques et donc une légère baisse de la résolution entre les deux systèmes. En revanche avec le système IClass, les pics sont plus fins ce qui permet une meilleure séparation, même avec un temps de rétention réduit.

La Figure 25 est une superposition des séparations obtenues sur HClass avec les différents modes d'utilisation du preheater (les valeurs numériques en Annexe 11, page 115).

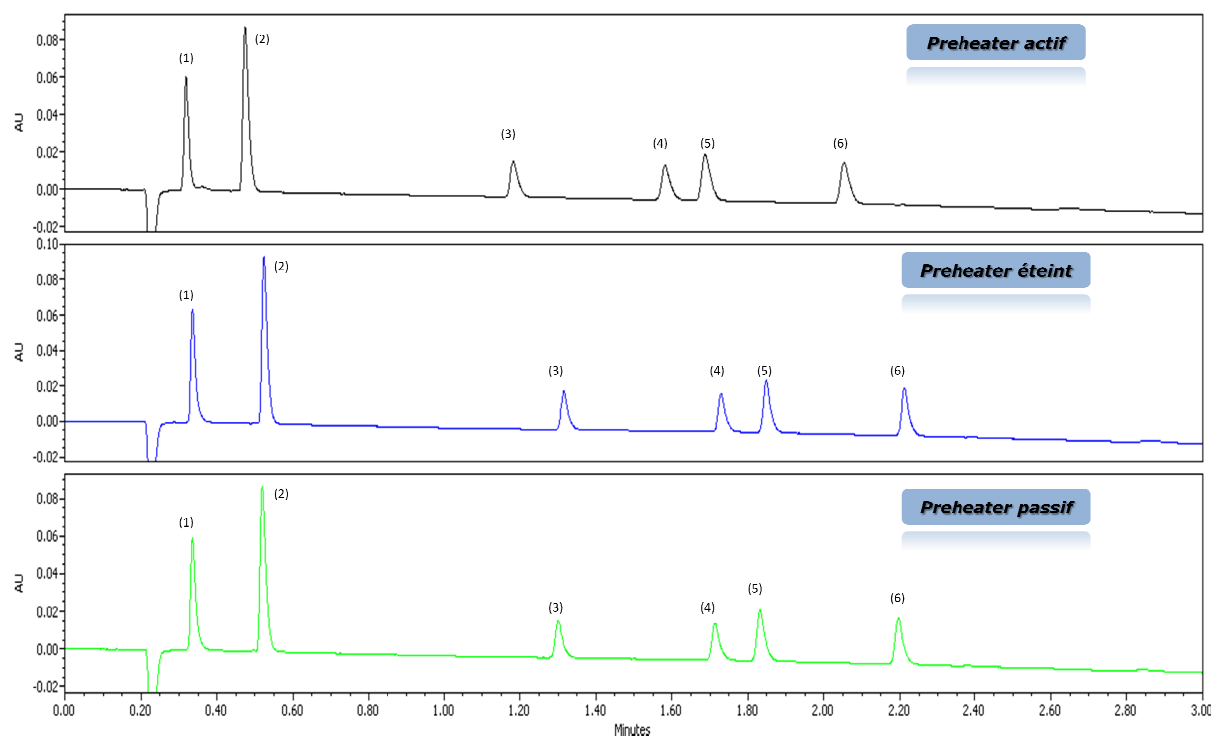


Figure 25 : Evolution de la séparation des esters d'alkyle d'acide sulfonique en fonction des 3 modes d'utilisation du preheater sur HClass.

Sur le système HClass, les temps de rétention sont plus courts que sur le système UPLC, et les largeurs à mi-hauteur sont légèrement plus faibles. Ceci entraîne une légère variation du nombre de plateaux théoriques mais pas suffisamment pour modifier

significativement la résolution. Avec le preheater éteint, on obtient une meilleure séparation avec des pics plus fins malgré des temps de rétention plus grands. Avec le preheater passif, les pics sont plus larges qu'avec le preheater éteint, mais les temps de rétention sont sensiblement identiques. Ceci entraîne une diminution du nombre de plateaux théoriques en comparaison au système avec preheater éteint, mais ce système reste plus performant que l'HClass et l'UPLC.

En désactivant le preheater ou en le remplaçant, la performance du système HClass change, puisque au niveau des plateaux théoriques, nous avons en moyenne un rapport de 1.52 et 1.25 respectivement, correspondant à une amélioration. Ceci permet d'obtenir une hausse de la résolution vis-à-vis de celle obtenue en UPLC d'un rapport moyen de 1.23 et 1.12 respectivement. De plus on note que ces modes d'utilisation du preheater sont équivalents, avec un léger avantage pour une utilisation désactivée de celui-ci.

La Figure 26 est une superposition des séparations obtenues sur IClass avec les différents modes d'utilisation du preheater (les valeurs numériques en Annexe 11, page 115).

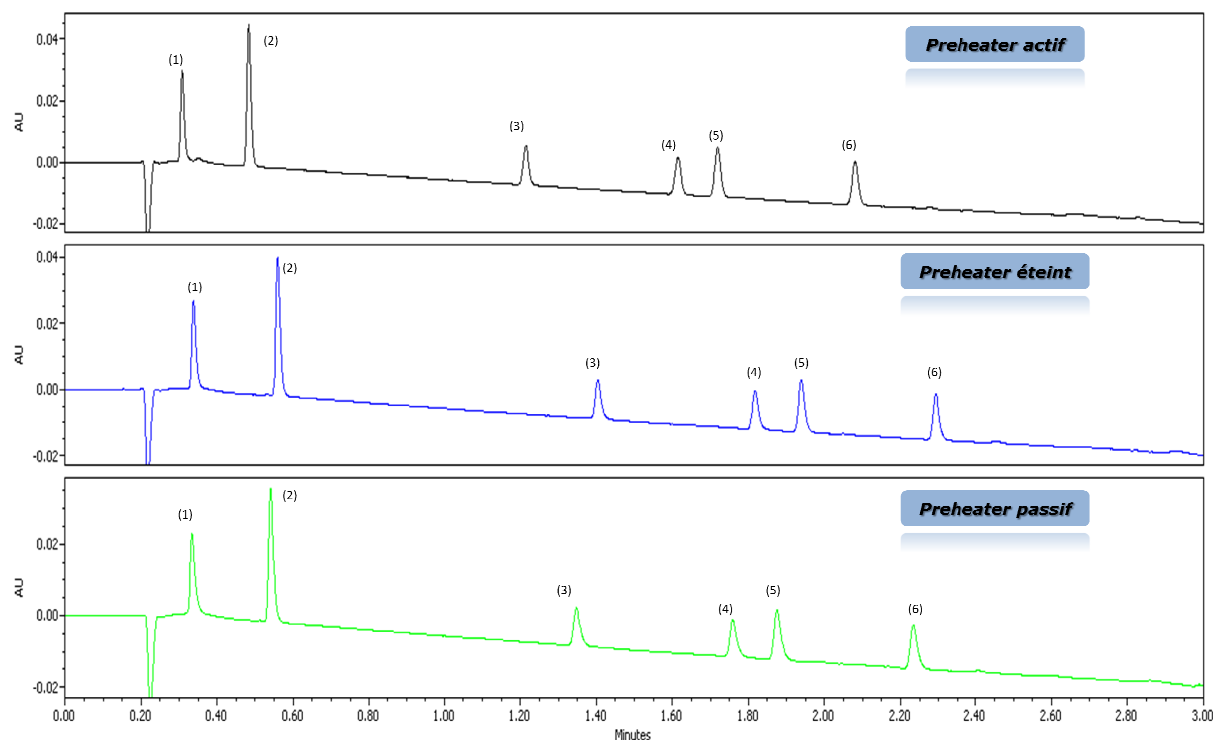


Figure 26 : Evolution de la séparation des esters d'alkyle d'acide sulfonique en fonction des 3 modes d'utilisation du preheater sur IClass.

Sur le système IClass, les temps de rétention sont plus courts que sur le système UPLC, les largeurs à mi-hauteur sont plus faibles ce qui entraîne une hausse du nombre de plateaux théoriques. A l'inverse, lorsque que le preheater est désactivé ou remplacé par le serpentin du système UPLC, les temps de rétention sont sensiblement identiques que l'UPLC. Mais la différence est surtout au niveau de la largeur à mi-hauteur, où la variation permet une équivalence entre le système IClass et les deux autres configurations du preheater.

Quelque soit la configuration du système IClass, celui-ci est plus performant que le système UPLC. Avec le système IClass, nous avons un rapport moyen de 1.32 en résolution, ce rapport est de 1.45 et de 1.24 pour les configurations avec le preheater éteint et passif respectivement. Cette hausse de performance est d'autant plus visible lorsque l'on compare le nombre de plateaux théoriques, puisque le rapport moyen est de 2.09 et de 1.53 avec le preheater éteint ou passif. Comme avec le système HClass, on note que ces modes d'utilisation du preheater sont équivalents, avec un léger avantage pour une utilisation désactivée de celui-ci.


b) Transfert de méthode de l'IClass vers HClass et UPLC

Cette étape ne se réalisera que sur les deux premières études. L'étude des esters d'alkyles d'acide sulfonique ne présente pas de coélution avec aucun système. Il n'est donc pas nécessaire d'optimiser le gradient pour améliorer la séparation.

1. Etude des acides aminés

Dans un premier temps, le gradient utilisé jusqu'à présent en IClass a été optimisé afin d'avoir une séparation de tous les composés avec le preheater actif. L'évolution du gradient est présentée dans la Figure 27.

Temps (min)	Débit (mL/min)	%A	%B
Initial	0.700	99.9	0.1
0.55	0.700	99.9	0.1
5.55	0.700	90.9	9.1
7.75	0.700	78.8	21.2
8.64	0.700	40.4	59.6
9.51	0.700	99.9	0.1



Temps (min)	Débit (mL/min)	%A	%B
Initial	0.700	99.9	0.1
0.55	0.700	99.9	0.1
3.50	0.700	93.9	6.1
7.35	0.700	78.8	21.2
8.14	0.700	40.4	59.6
9.50	0.700	99.9	0.1

Figure 27 : Optimisation du gradient sur le système IClass de l'étude des acides aminés.

Ce gradient a ensuite été appliqué aux trois systèmes, en prenant en compte le volume mort de chaque système. Ces transferts ont permis d'obtenir les séparations présentées sur la Figure 28.

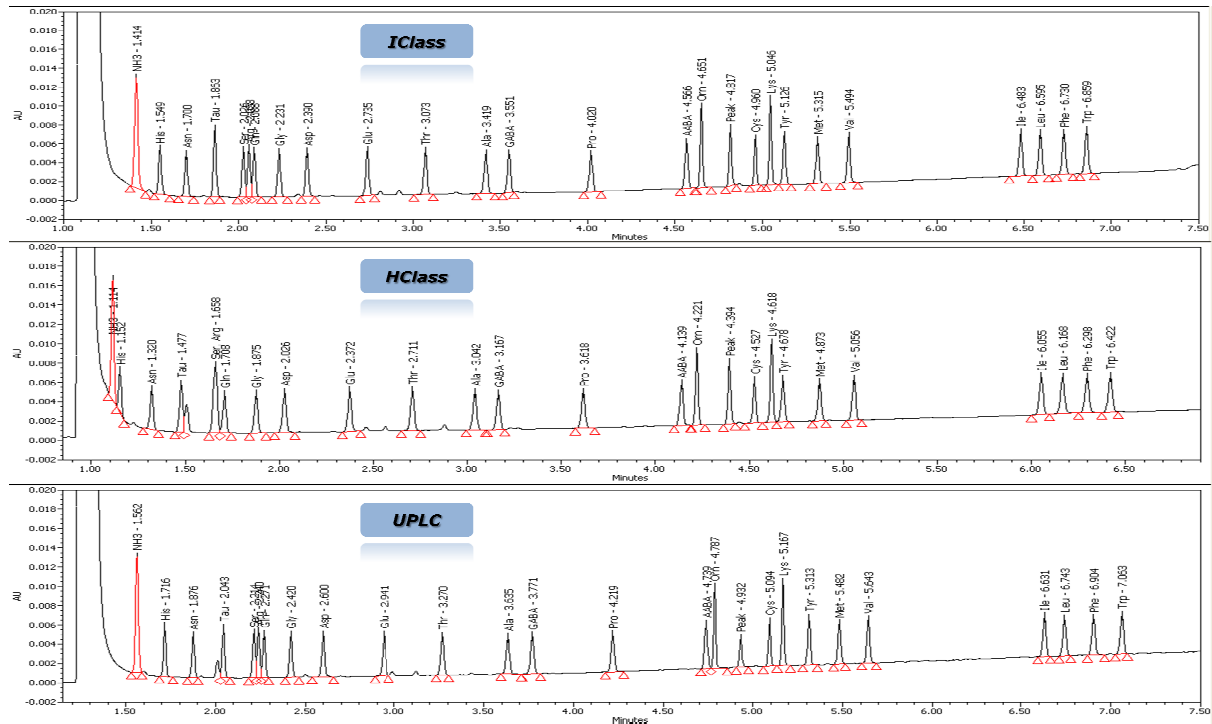


Figure 28 : Séparation sur les systèmes HClass et UPLC suite au transfert de la méthode optimisée sur l'IClass sur ces derniers systèmes. Injection d'une solution à 1.0 nmol/mL.


Concernant la séparation des composés, on observe qu'en HClass la coélution entre Ser et Arg est toujours présente alors que Lys et Tyr sont parfaitement séparés. En ce qui concerne la séparation en UPLC, on peut voir qu'elle est comparable à celle obtenue avec l'IClass. Ceci montre que la séparation entre Ser et Arg est fortement impactée par le système utilisé, principalement par le volume mort du système. La séparation entre Lys et Tyr est principalement impactée par le mode préchauffage de la phase mobile.

Concernant l'évolution de la résolution du système IClass vers HClass, on observe un rapport moyen de 0.91 (0.68 en moyenne pour le nombre de plateaux théoriques) indiquant une baisse de performance d'un système HClass en comparaison à un système IClass. Concernant l'évolution de la résolution du système IClass vers l'UPLC, on observe un rapport moyen de 1.07 (1.19 en moyenne pour le nombre de plateaux théoriques), indiquant une amélioration de la performance d'un système UPLC en comparaison à un système IClass.

Ceci démontre que le volume mort d'un système impacte sur la qualité de séparation d'une analyse, mais également que le mode de préchauffage de la phase mobile a un impact non négligeable sur cette séparation.

2. Etude des filtres UV et conservateurs

Comme précédemment, le gradient utilisé jusqu'à présent en IClass a été optimisé afin d'avoir une meilleure séparation de tous les composés avec le preheater actif. L'évolution du gradient est présentée dans la Figure 29.



Temps (min)	Débit (mL/min)	%A	%B
Initial	0.800	95.0	5.0
7.00	0.800	0.0	100.0
10.00	0.800	95.0	5.0

Temps (min)	Débit (mL/min)	%A	%B
Initial	0.800	85.0	15.0
1.90	0.800	85.0	15.0
8.00	0.800	0.0	100.0
10.00	0.800	85.0	15.0

Figure 29 : Optimisation du gradient sur le système IClass de l'étude des filtres UV et conservateurs.

Ce gradient a ensuite été appliqué aux trois systèmes, en prenant en compte le volume mort de chaque système. Ces transferts ont permis d'obtenir les séparations présentées sur la Figure 30.

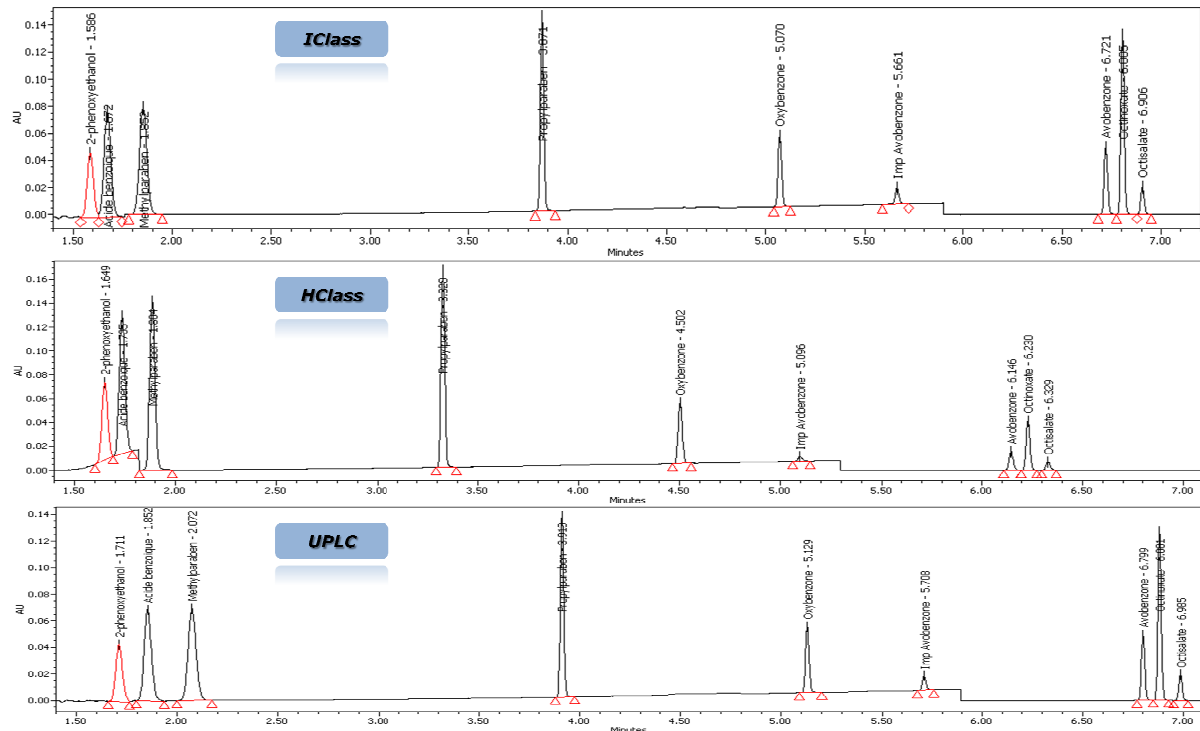


Figure 30 : Séparation sur les systèmes HClass et UPLC suite au transfert de la méthode optimisée sur l'IClass sur ces derniers systèmes. Injection d'une solution à 10.0 µg/mL.

Concernant le transfert vers l'HClass, on remarque que l'on a une perte de résolution sur la séparation globale d'un rapport moyen de 0.92 en comparaison à l'IClass. Cependant cette perte n'est pas réelle sur l'ensemble de la séparation car les résolutions entre le 2-phénoxyéthanol, l'acide benzoïque et le méthylparabène sont meilleures ou identiques qu'en IClass. Cette tendance se retrouve avec le nombre de plateaux théoriques où l'on observe une diminution sauf pour les trois premiers composés.

Concernant le transfert vers l'UPLC, on remarque également que les résolutions sont meilleures entre le 2-phénoxyéthanol, l'acide benzoïque et le méthylparabène. Elles sont équivalentes pour les autres composés. Le système IClass est moins performant que le système UPLC puisque nous avons un rapport moyen de 1.14 en résolution et en nombre de plateaux théoriques.

Ces résultats permettent de confirmer la précédente conclusion, à savoir que le volume mort impacte sur la séparation, puisque nous avons une baisse de performance avec un système quaternaire vis-à-vis d'un système binaire. Mais également sur l'impact de la température, puisque nous avons une évolution des performances entre deux systèmes avec des volumes morts équivalents mais un mode de préchauffage différent.

c) Conclusions de la performance des instruments

Afin d'évaluer la performance instrumentale d'un système par rapport à un autre, nous avons procédé à une analyse statistique des résultats. Le but est de déterminer un facteur de gain ou de perte de performance inter-système, pour une analyse, avec une configuration optimale pour chaque instrument. Chaque rapport de performance de la résolution entre UPLC – HClass (série S1), UPLC – IClass (série S2) et HClass – IClass (série S3) des trois études décrites est regroupé, donnant ainsi trois séries de résultats. L'ensemble des calculs statistiques ont été réalisés avec les logiciels Microsoft Office Excel[®] 2007 de Microsoft[®] software, Minitab[®] 15 de Minitab[®] Statistical Software, et XLSTAT[®] 12 d'Addinsoft[®].

Avant toute analyse statistique, on détermine dans chaque série de résultats, la présence de valeurs aberrantes. Un test de Grubbs (Annexe 12, page 117) est appliqué à chaque série. On teste la valeur minimale et maximale de chaque série. En cas de mise en évidence d'une valeur aberrante, on recommence le test avec la nouvelle série excluant la valeur aberrante.

Pour déterminer si les données de chaque série sont distribuées suivant la loi normale, on applique un test de normalité de Shapiro-Wilk (Annexe 13, page 118). On émet l'hypothèse H_0 que les données sont normalement distribuées avec un risque α , et l'hypothèse H_1 que les données ne sont pas normalement distribuées avec un risque α . Le test est réalisé avec un risque α de 5 et 10 % afin de se rendre compte de la qualité de la distribution des données des séries. Suite à l'utilisation de ce test, l'hypothèse H_0 est acceptée pour les trois séries de données avec un risque α de 5 %, ce qui signifie que les données des séries S1, S2 et S3 sont distribuées normalement. L'hypothèse H_0 est acceptée pour un risque α de 10 % pour les séries S1 et S2. La droite de Henry est une méthode graphique permettant de visualiser si une distribution est normalement distribuée ou non. Si c'est le cas, les points sont bien alignés. Elle permet également de visualiser où se situent les écarts. Les droites correspondantes à chaque distribution sont observables en Figure 31.

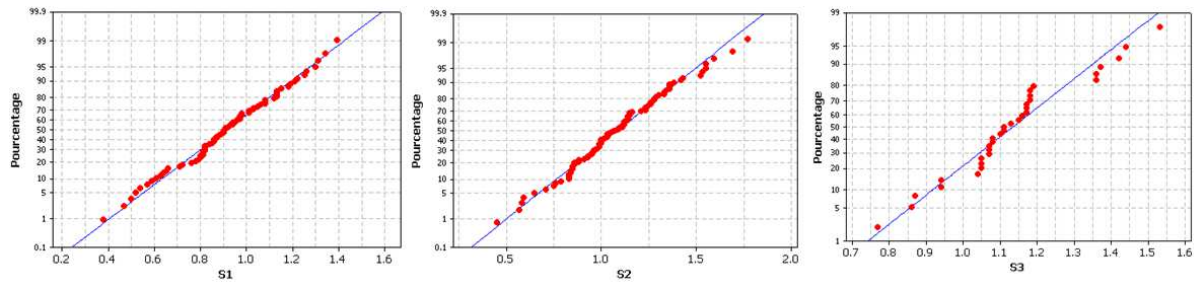


Figure 31 : Droite de Henry des séries S1, S2 et S3.

Les droites de Henry nous montrent que les résultats des séries S1 et S2 sont parfaitement distribués, ce qui permet d'accepter H_0 avec un risque α de 10 %. On note qu'il existe des écarts plus importants pour la série S3, ce qui nous montre graphiquement le refus de H_0 pour un risque α 10 %.

Le caractère symétrique des courbes de ces distributions a été déterminé (Annexe 14, page 119). Une distribution à symétrie négative indique un étalement à gauche, inversement une distribution à symétrie positive indique un étalement à droite. Les courbes de S2 et S3 présentent une distribution à symétrie positive (0.199 et 0.303 respectivement), alors que la courbe S1 présente une symétrie négative (-0.104).

Le caractère aplati des courbes de ces distributions a été déterminé (Annexe 15, page 120). La distribution est aplatie lorsque le coefficient d'aplatissement est inférieur à 3. Inversement lorsque qu'il est supérieur à 3, la distribution est pointue. La distribution du transfert UPLC – HClass présente un coefficient de 2.736. Les distributions des transferts UPLC – IClass et HClass – IClass sont pointues (3.235 et 3.190 respectivement).

La distribution des données relatives au transfert de l'UPLC vers l'HClass présente un léger étalement à gauche et une forme aplatie par rapport à la distribution de la loi normale. Les distributions des transferts UPLC – IClass et HClass – IClass ont sensiblement la même forme. Toutefois la seconde présente un étalement à droite plus prononcé.

Afin de déterminer si la dispersion des données au sein de chaque série est identique, on effectue une comparaison des variances deux à deux. Pour cela un test de Fischer est appliqué (Annexe 16, page 121). Les variances des séries S1 et S2 sont significativement égales au risque α de 5 % et 10 %. Lors d'un transfert d'analyse de l'UPLC vers l'HClass ou vers l'IClass, la dispersion de l'effet de l'instrument sur la résolution est significativement identique. Les variances des séries S1 et S3 sont significativement égales au risque α de 5 %

et 10 % ce qui indique que lors d'un transfert d'analyse d'une UPLC vers l'HClass ou de l'HClass vers l'IClass, on obtiendra une dispersion de l'effet instrumental similaire sur les deux séparations. A l'inverse, on démontre que les variances des séries S2 et S3 ne sont pas significativement égales au risque α de 5 %. Ceci montre que la dispersion de l'effet de l'instrument entre une UPLC vers une IClass et d'une HClass vers une IClass n'est pas identique.

Pour chaque système, nous obtenons des rapports de performance sur la résolution. Afin de déterminer si les systèmes sont équivalents ou non, nous réalisons une analyse des variances (ANOVA) à un facteur (Annexe 17, page 122), nous permettant d'effectuer par la suite un test de Bonferroni (Annexe 18, page 124). Nous avons démontré que toutes les variances n'étaient pas significativement égales, donc la réalisation d'une ANOVA n'est pas applicable. Mais le test de Bonferroni permet de comparer les moyennes deux à deux de manière plus robuste qu'un test de Student car nous avons plus de deux séries à étudier. On en conclut que le transfert d'analyse d'un système UPLC vers une HClass (S1) et d'une UPLC vers une IClass (S2) ne donne pas de résultats similaires au risque α de 5 %. De même, ceci est observable pour un transfert d'analyse d'une UPLC vers une HClass (S1) et d'une HClass vers une IClass (S3). Toutefois, on observera un gain moyen significativement identique lors d'un transfert d'une méthode UPLC vers une IClass ou d'une HClass vers une IClass au risque α de 5 % et 10%.

Sachant que chaque série de donnée est distribuée selon une loi normale, nous pouvons déterminer un intervalle de confiance de chaque moyenne. Ceci nous permet d'établir en moyenne, l'impact instrumental sur la résolution lors d'un transfert d'un système à un autre, dans les meilleures conditions d'utilisation de celui-ci. Cet intervalle, visible sur la Figure 32, est déterminé avec un niveau de confiance de 95 % représentant le gain ou la perte de résolution sur une analyse.

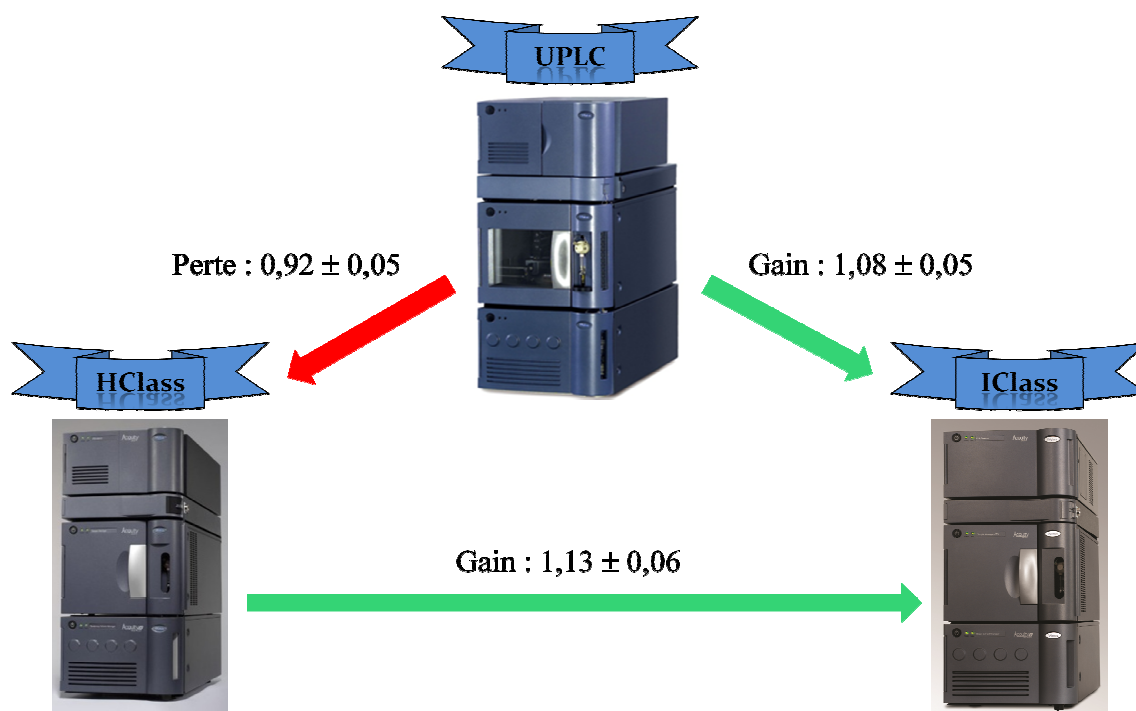


Figure 32 : Conclusion sur la performance instrumentale entre les systèmes UPLC, HClass et IClass.

Ainsi nous pouvons en conclure qu'il y a une différence entre chaque système UPLC. Nous avons une perte de performance lorsque l'on passe d'un système binaire à un système quaternaire. Ce qui est compréhensible puisque nous augmentons le volume mort et donc le phénomène de dispersion dans le système. On note que cette perte est d'environ 8 % mais elle ne tient pas compte d'éventuelle coélution. A contrario, nous observons une amélioration des performances lors de l'utilisation de l'IClass. Cette amélioration de l'ordre de 8 % entre les deux systèmes binaire indique que nous sommes sur des systèmes proches

III. Détermination de la performance de sensibilité des détecteurs UV

Nous allons déterminer dans cette partie s'il existe une différence de sensibilité entre les détecteurs Acquity UV. En parallèle à l'étude réalisée précédemment, nous avons fait des mesures de signal sur bruit (S/N) pour différentes molécules présentes dans ces mêmes analyses.

Pour l'analyse des acides aminés, les S/N de l'asparagine, la sérine, la glutamine, l'acide aspartique, la thréonine, le γ -aminobutyrique, l' α -aminobutyrique, la cystéine, le tyrosine, la valine, la leucine et le tryptophane sont suivis. Pour l'analyse des filtres UV et des conservateurs, les S/N du 2-phénoxyéthanol, le propylparabène, l'oxybenzone et l'octinoxate

sont suivis. Pour l'analyse des esters d'alkyle d'acide sulfonique, les S/N de l'acide p-toluènesulfonique, l'éthyle benzènesulfonate et de l'éthyle p-toluènesulfonate sont suivis.

Afin d'observer uniquement la performance du détecteur, pour chaque analyse, une même solution est injectée à une concentration proche de la limite de quantification (LOQ) avec un détecteur utilisé dans l'étude. Cette solution a ensuite été injectée avec la même chaîne UPLC mais avec les deux autres détecteurs UV.

Nous établissons des rapports de S/N entre chaque détecteur pour chaque molécule suivie. Cela correspond au rapport du S/N obtenu avec un détecteur sur le S/N obtenu avec un détecteur servant de référence pour une molécule donnée. Les facteurs multiplicatifs présents dans les tableaux de résultats correspondent à ce rapport (Annexe 19, page 125). Ils formeront les séries de résultats pour les études statistiques. Nous obtenons trois séries de données de comparaison : PDA en comparaison du PDA e λ (S4), le TUV en comparaison du PDA e λ (S5) et le TUV en comparaison du PDA (S6).

Dans cette partie nous avons des séries contenant un nombre de donnée inférieur à 25. Dans ce cas l'élimination des valeurs aberrantes est effectuée avec un test de Dixon (Annexe 20, page 126).

Dans le cadre de cette évaluation des performances des détecteurs UV, le test de Shapiro-Wilk est également utilisé pour déterminer si les valeurs sont normalement distribuées dans chaque série. On démontre que l'hypothèse H_0 est acceptée pour chaque série au risque α de 5 %, les distributions sont normalement distribuées. Avec un risque α de 10 %, l'hypothèse H_0 est acceptée pour les séries S4 et S5 au contraire de la série S6, ce qui signifie qu'elle présente des écarts plus importants à la normalité. Les droites de Henry de la Figure 33 nous confirment ces observations.

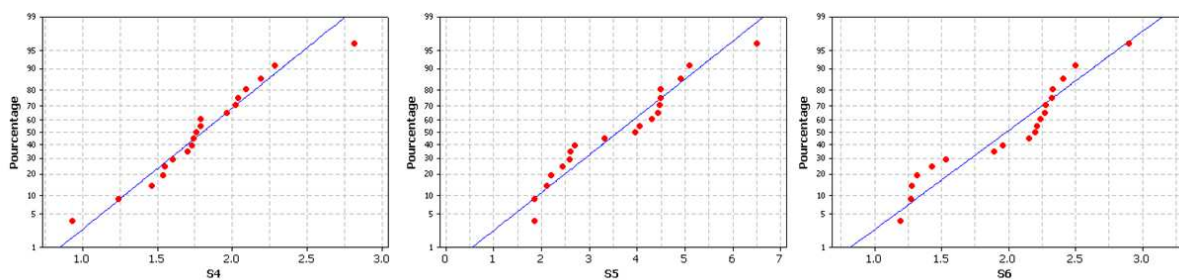


Figure 33 : Droite de Henry des séries S4, S5 et S6.

Le caractère symétrique des courbes des distributions a été déterminé. Les courbes des séries S4 et S5 présentent une distribution à symétrie positive (0.275 et 0.316 respectivement) alors que la courbe de la série S6 présente un étalement à droite (-0.278).

Le caractère aplati des courbes de ces distributions a également été déterminé. La distribution des données du passage d'un PDA $e\lambda$ à un PDA (S4) a un caractère pointu (3.863). Les distributions des données du passage d'un PDA $e\lambda$ à un TUV (S5) et d'un PDA vers un TUV (S6) ont un caractère aplati (2.278 et 1.981 respectivement).

Les distributions des données entre l'utilisation d'un PDA $e\lambda$ vis-à-vis d'un PDA et d'un PDA vis-à-vis d'un TUV sont semblables mais symétriquement opposées car leurs coefficients de symétrie sont très proches en valeur absolue. Toutefois la hauteur de la courbe est nettement différente puisque nous avons deux formes de distributions opposées. L'aspect de la courbe de distribution d'un PDA $e\lambda$ vers un TUV se situe entre ces deux dernières formes.

La comparaison des variances avec un test de Fischer montre que les séries S4 et S6 sont significativement égales au risque α de 5 % et 10 %. On démontre également que la variance de la série S5 est significativement différente des séries S4 et S6 au risque α de 5 %. On peut alors en déduire que la dispersion des résultats, et donc de l'évolution de la sensibilité de la détection, est sensiblement différente lors d'un passage d'un détecteur PDA $e\lambda$ vers un TUV ce qui n'est pas le cas lors des deux autres possibilités. Il existe alors une différence significative de sensibilité entre ces deux détecteurs UV.

Pour évaluer la différence de sensibilité de ces détecteurs, nous réalisons une comparaison des moyennes de la même façon que lors de la comparaison des instruments. Les moyennes des séries S4 et S6 sont significativement identiques au risque α de 5 % et 10 %. Le facteur de gain en sensibilité lors d'un passage d'un détecteur PDA $e\lambda$ à un détecteur PDA ou d'un PDA à un TUV est statistiquement égal. A contrario la moyenne de la série S5 est significativement différente des séries S4 et S6 au risque α de 5%. Ceci montre une fois de plus que le passage d'un PDA $e\lambda$ à un TUV permet d'obtenir une différence de sensibilité significativement différente des deux autres comparaisons.

Pour chaque moyenne, nous déterminons un intervalle de confiance comprenant un gain moyen de sensibilité sur l'ensemble de l'analyse lors du passage d'un détecteur UV à un

autre. Cet intervalle, visible sur la Figure 32, est déterminé avec un niveau de confiance de 95 % représentant le gain de sensibilité entre chaque détecteur UV.

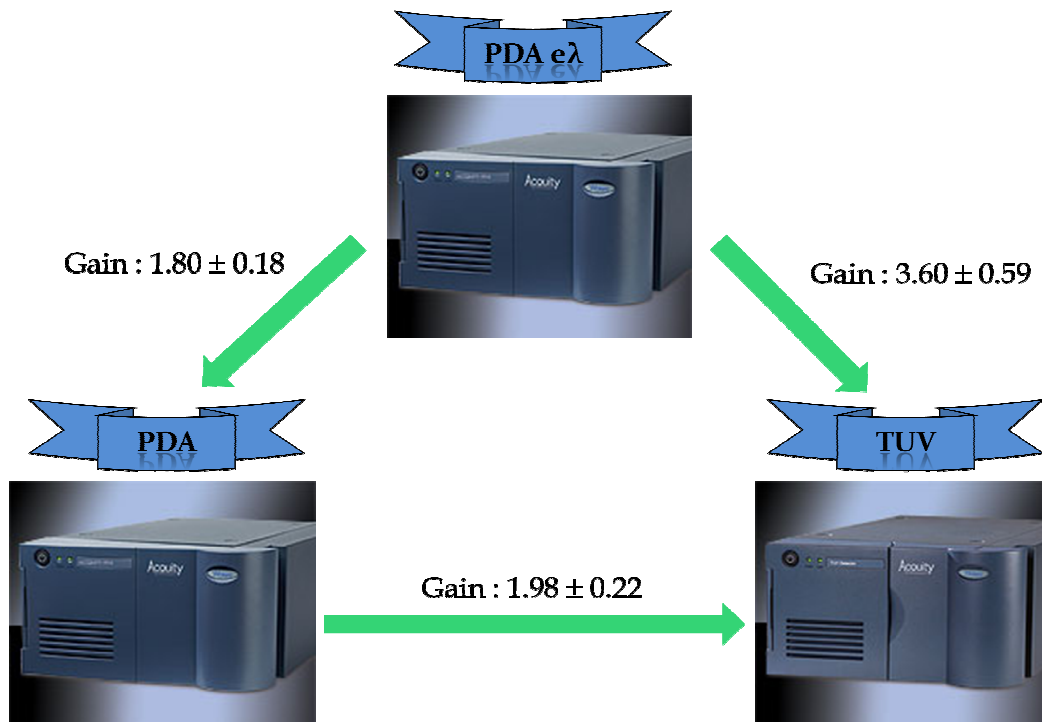


Figure 34 : Conclusion sur la différence de sensibilité des détecteurs UV que sont le PDA eλ, le PDA et le TUV.

Les détecteurs PDA eλ et PDA sont de conception identique. La seule différence est au niveau de leurs réseaux qui leur confèrent leurs possibilités de détection. Ce seul élément est la cause de la différence de sensibilité entre ces deux détecteurs. Ainsi nous avons une amélioration du S/N de près de 80 %. Cet écart est d'autant plus visible lorsque l'on compare cette sensibilité vis-à-vis d'un TUV. Nous montrons ainsi que le TUV est nettement plus sensible que les PDA. Ces variations de sensibilité sont uniquement dues à la variation du bruit de la ligne de base et non pas de la hauteur du pic chromatographique qui est équivalente sur les trois détecteurs. Cette différence au niveau du bruit est la conséquence de la diminution de la taille du réseau pour les PDA. Une barrette de diode est composée de 512 photodiodes. Le PDA eλ a une plage de longueur d'onde de 610 nm. Ce qui signifie que chaque photodiode a une résolution de 1.2 nm. En comparaison le PDA a une plage de longueur d'onde de 310 nm. Ce qui permet à chaque photodiode d'avoir une résolution de 0.6 nm. Ainsi pour une résolution similaire de 1.2 nm, le PDA effectuera une moyenne de signal de deux photodiodes, entraînant une diminution du bruit de fond. Un PDA a une conception optique permettant de privilégier le détail spectral en réalisant un compromis avec la sensibilité. Le TUV, est au contraire un détecteur dont la conception privilégie la sensibilité

au détriment du détail spectrale. Cette différence de conception et d'utilisation est à l'origine des différences de bruit de fond, et donc de la différence de sensibilité des détecteurs.

IV. Détermination de la performance de sensibilité des détecteurs MS

Dans cette dernière partie, nous allons évaluer la différence de sensibilité entre les détecteurs MS. Nous allons comparer dans un premier temps le spectromètre de masse SQD 2 et le Xevo TQD. Ce sont des instruments de conception identique. La seule différence est que le Xevo TQD est un triple quadripôle, augmentant ainsi le trajet des ions par rapport à un simple quadripôle comme le SQD 2. Puis dans un second temps, nous étudierons la différence de sensibilité entre les spectromètres de masse de la gamme triple quadripôle. Cette comparaison a été réalisée sans le Xevo TQ MS, absent au laboratoire.

Pour cette partie, la publication réalisée par A.M. Botero-Coy *et al* sur l'analyse par LC-MS/MS de pesticides contenus dans les fruits tropicaux a été reprise et adaptée à notre système UPLC. Le dosage des pesticides est imposé par la législation de nombreux pays qui demande le contrôle des concentrations des pesticides dans les produits d'alimentations.

Nous établissons des rapports de S/N entre chaque détecteur pour chaque molécule suivie. Cela correspond au rapport du S/N obtenu avec un détecteur sur le S/N obtenu avec un détecteur servant de référence pour une molécule donnée. Les facteurs multiplicatifs présents dans les tableaux de résultats correspondent à ce rapport (Annexe 21, page 128). Ils formeront les séries de résultats pour les études statistiques.

a) Comparaison entre le SQD 2 et le Xevo TQD

Afin de déterminer la différence de sensibilité entre ces deux instruments, nous comparons avec une même solution, les S/N des 20 pesticides présents dans l'étude, à une concentration de 100 ppb, en mode Full Scan (FS) et en mode détection sélective d'un ion (SIR). Nous obtenons ainsi quatre séries de résultats : FS du Xevo TQD en comparaison du FS du SQD 2 (S7), SIR du Xevo TQD en comparaison du SIR du SQD 2 (S8), SIR du SQD 2 en comparaison du FS du SQD 2 (S9) et SIR du Xevo TQD en comparaison du FS du Xevo TQD (S10).

La comparaison des séries S7 et S8 permet d'évaluer la différence de sensibilité inter-instrument avec le même mode d'acquisition. La comparaison des séries S9 et S10 permet

d'évaluer si il y a une différence de gain de sensibilité en détection SIR vis-à-vis d'une détection FS avec chaque instrument.

1. Comparaison de sensibilité en mode FS et SIR inter-instrument

Nous avons établi les séries S7 et S8 dans le but de déterminer la différence de sensibilité entre le Xevo TQD et le SQD 2.

Le test de Dixon est appliqué afin de déterminer la présence de valeur aberrante dans les séries de résultats.

Suivant le test de Shapiro-Wilk, l'hypothèse H_0 est acceptée pour chaque série au risque α de 5 %, les distributions sont donc normalement distribuées. L'hypothèse H_0 est acceptée uniquement pour la série S8 avec un risque α de 10 %. On en conclut que la série S7 présente des écarts plus importants à la normalité. On trace les droites de Henry (Figure 35), afin d'observer la distribution des données de ces séries et les écarts à la normalité de la série S7.

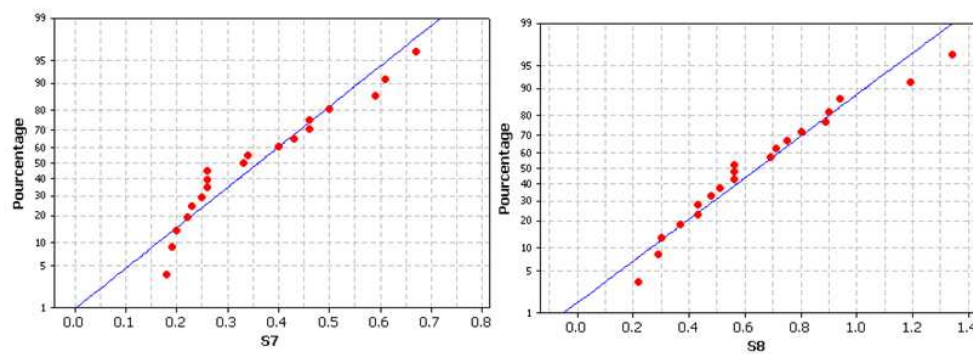


Figure 35 : Droite de Henry des séries S7 et S8.

Les tests de symétrie et d'aplatissement montrent que les courbes des distributions des séries S7 et S8 ont une allure commune. Elles ont un coefficient de symétrie positif (0.608 et 0.695) et un coefficient d'aplatissement inférieur à 3 (2.132 et 2.858). On peut alors en déduire que quelque soit l'instrument utilisé, les distributions ont une courbe de répartition des résultats semblable pour un mode d'acquisition donné.

Le test de Fisher nous montre que les variances sont significativement différentes au risque α de 5 %. Les courbes de distributions ont une allure semblable mais la répartition des

résultats est différente entre les deux séries. On a donc une différence de répartition des résultats entre les deux modes d'acquisitions inter-instruments.

N'ayant que deux séries de données, la comparaison des moyennes se réalise avec un test de Student (Annexe 22, page 130). On montre que les moyennes des séries S7 et S8 sont significativement différentes au risque α de 5 %. Ceci signifie que le gain/perte suite à l'utilisation d'un Xevo TQD vis à vis d'un SQD 2 n'est pas semblable suivant le mode d'acquisition utilisé.

On estime un rapport moyen de sensibilité inter-instruments pour les modes d'acquisitions FS et SIR entre le Xevo TQD et le SQD 2. Ces rapports moyens, avec leurs intervalles à un niveau de confiance de 95 %, sont observables en Figure 36.

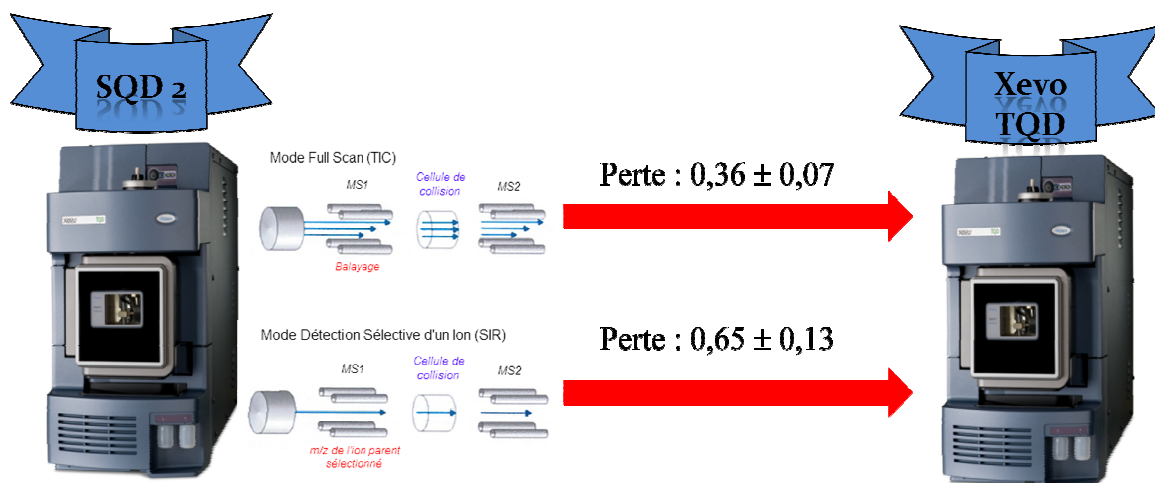


Figure 36 : Rapport moyen de perte de sensibilité inter-instrument entre le SQD 2 et le Xevo TQD en mode FS et SIR sur l'analyse des pesticides.

2. Comparaison de sensibilité en mode FS et SIR intra-instrument

Nous allons à présent évaluer la différence de sensibilité des deux détecteurs en comparant le gain obtenu lors d'une acquisition en mode SIR par rapport au mode FS sur chaque instrument. Nous utilisons ainsi les séries de résultats S9 et S10. La démarche statistique est identique.

Après avoir éliminé les valeurs aberrantes, nous montrons que les séries S9 et S10 sont normalement distribuées au risque α de 5 %. Lorsque l'on effectue le test de Shapiro-Wilk à un seuil de signification de 10 %, l'hypothèse H_0 est rejetée pour les deux séries. La

répartition des données pour les séries S9 et S10 sont observables avec les droites de Henry en Figure 37, mettant en évidence les valeurs présentant un écart à la normalité.

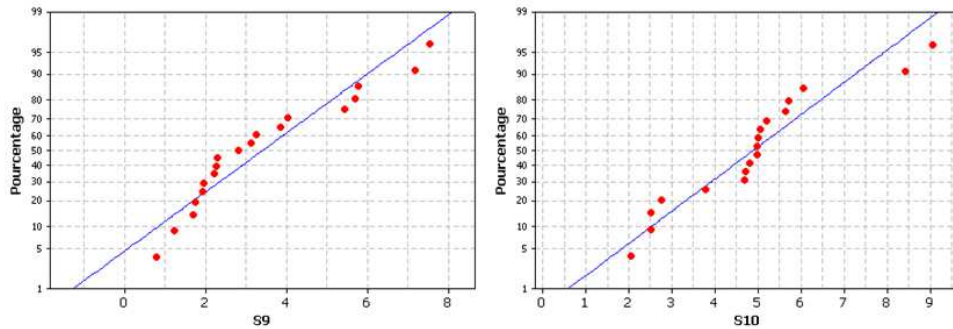


Figure 37 : Droite de Henry des séries S9 et S10.

L'allure des courbes de distribution des deux séries est différente. Concernant la série S9, elle présente un étalement à droite (0.757) et une forme aplatie (2.389). En comparaison, la série S10 présente également un étalement à droite (0.562) mais avec une forme pointue (3.288). Les données sur le Xevo TQD sont centrées autour d'une valeur maximale alors que les données du SQD 2 sont plus dispersées autour de la valeur maximale.

La comparaison des variances avec le test de Fisher montre qu'elles sont significativement égales au risque α de 5 et 10 %. Lorsque l'on compare la différence de sensibilité entre le mode FS et SIR, la répartition des résultats est donc significativement égale entre un Xevo TQD et un SQD 2. Les ions se forment de manière constante dans la source des détecteurs, qui sont de conception identique, et dans les mêmes conditions opératoires.

La comparaison des moyennes avec le test de Student montre qu'elles sont significativement différentes au risque α de 5 %. Il y a une différence significative de sensibilité intra-instruments. Le gain de sensibilité obtenu par une acquisition en mode SIR vis-à-vis du mode FS avec le SQD 2 est significativement différent par rapport à ce que l'on peut obtenir avec le Xevo TQD.

On estime alors un rapport moyen de gain de sensibilité intra-instruments d'une acquisition en SIR en comparaison du mode FS sur les deux instruments. Ces rapports

moyens, avec leurs intervalles de confiance à un niveau de confiance de 95 %, sont observables en Figure 38.

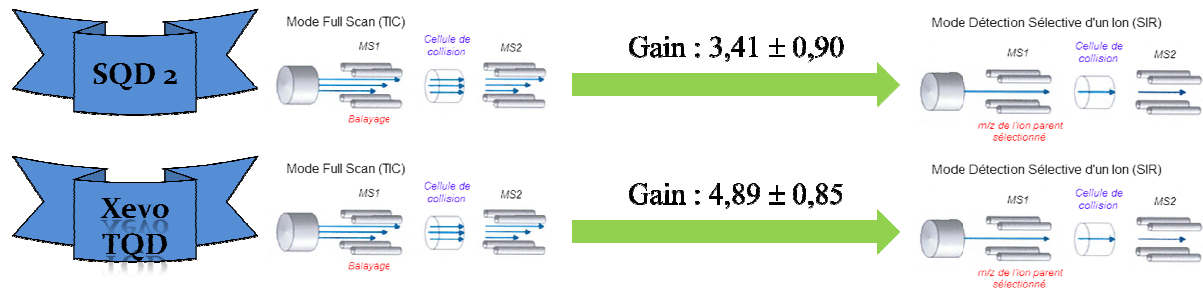


Figure 38 : Rapport moyen de gain de sensibilité pour le SQD 2 et le Xevo TQD entre le mode FS et SIR sur l'analyse des pesticides.

3. Conclusion sur la différence de sensibilité du SQD 2 et du Xevo TQD

Le Xevo TQD et le SQD 2 sont de conception identique. Ils ont la même source d'ionisation et le même optique de transfert. La principale différence, et qui est à l'origine des résultats obtenus, est que le Xevo TQD est un triple quadripôle. Le trajet parcouru par les ions est donc plus long que sur un simple quadripôle comme le SQD 2.

La perte de sensibilité avec un Xevo TQD par rapport à un SQD 2 pour un même mode d'acquisition est donc normale. Nous avons ainsi une perte de 2/3 en sensibilité en mode FS avec un Xevo TQD par rapport à ce que l'on pourrait obtenir avec un SQD 2, et de 1/3 en sensibilité en mode SIR. Pour un même mode d'acquisition, le SQD 2 est plus sensible que le Xevo TQD. Cependant, avec le Xevo TQD nous observerons une augmentation plus importante de la sensibilité en mode SIR vis-à-vis du mode FS qu'avec le SQD 2 (un gain de 3.41 en moyenne pour le SQD 2 contre un gain de 4.89 en moyenne pour le Xevo TQD). La Figure 39 est un exemple des résultats obtenus en mode FS et SIR avec ces deux instruments.

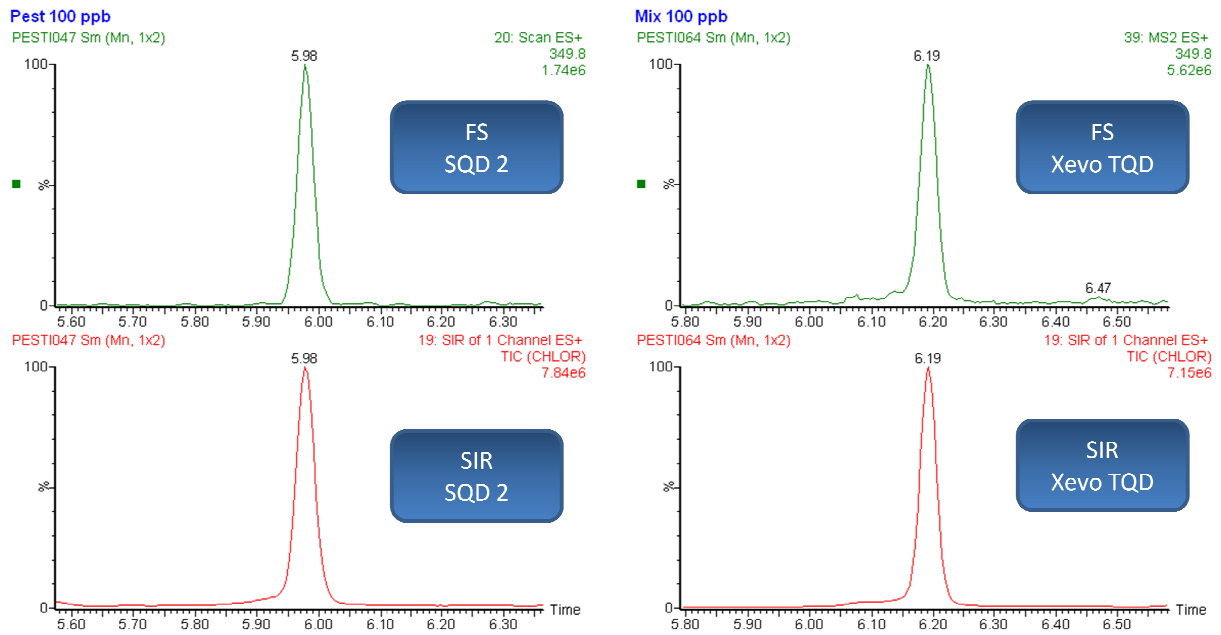


Figure 39 : Signaux du chlorpyrifose (CHLOR) en mode FS et SIR avec le SQR 2 et le Xevo TQD.

On nommera également le mode MRM disponible avec les détecteurs triples quadripôles, qui est le mode de détection permettant d'avoir la meilleure sensibilité. Avec ces mêmes acquisitions, nous avons évalué que le gain moyen entre une acquisition en mode MRM vis-à-vis du mode SIR est de $1,88 \pm 0,65$ avec le Xevo TQD. L'ensemble de ces facteurs est résumé en Figure 40.

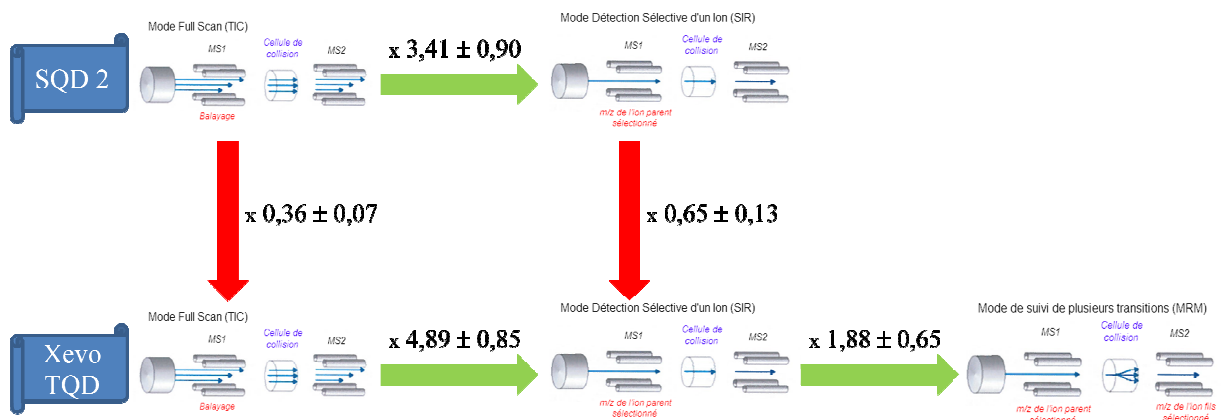


Figure 40 : Récapitulatif des rapports moyens de gain/perte entre le SQR 2 et le Xevo TQD suivant le mode d'acquisition sur l'analyse des pesticides.

On peut en conclure que pour un même mode d'acquisition, le SQR 2 est plus sensible que le Xevo TQD. Toutefois on remarque que pour un ion ayant un S/N de 10 en mode FS avec le SQR 2, on obtiendra un ion avec un S/N de 34 en SIR. Ce même pic aura un S/N d'environ 20 en SIR avec le Xevo TQD. L'avantage de ce dernier est d'avoir le mode

MRM qui permet d'améliorer la sensibilité et la sélectivité. On obtiendra donc pour ce même ion, un S/N d'environ 38 en mode MRM avec le Xevo TQD. Ce cheminement montre que pour un même ion à une même concentration, nous obtiendrons une sensibilité de détection semblable entre ces instruments mais avec une meilleure sélectivité avec le Xevo TQD.

b) Comparaison entre le Xevo TQD et le Xevo TQ-S

La différence de sensibilité entre ces deux triples quadripôles est effectuée sur une solution contenant les 20 pesticides à une concentration de 1000 ppt. Pour réaliser notre comparaison, on utilisera le mode MRM qui est le mode d'acquisition le plus sensible et servant à la quantification en MS/MS. Nous obtenons une série de résultat : MRM du Xevo TQ-S en comparaison de la MRM du Xevo TQD (S11).

Le Xevo TQ MS n'étant pas présent au laboratoire, cette comparaison n'est pas complète. Toutefois elle permet d'observer le gain de sensibilité apporté par le Xevo TQ-S.

Ces deux instruments n'ont pas la même plage de sensibilité. En effet la limite de quantification obtenue avec un Xevo TQD, et potentiellement le premier point d'une gamme d'étalonnage, correspond à l'un des points hauts de la gamme d'étalonnage sur un Xevo TQ-S.

Le test de Dixon permet d'éliminer les valeurs aberrantes dans les séries de résultats. Lorsque l'on effectue le test de Shapiro-Wilk à un seuil de signification de 5 et 10 %, l'hypothèse H_0 est acceptée pour cette série. La répartition des données pour la série S11 est observable avec la droite de Henry en Figure 41.

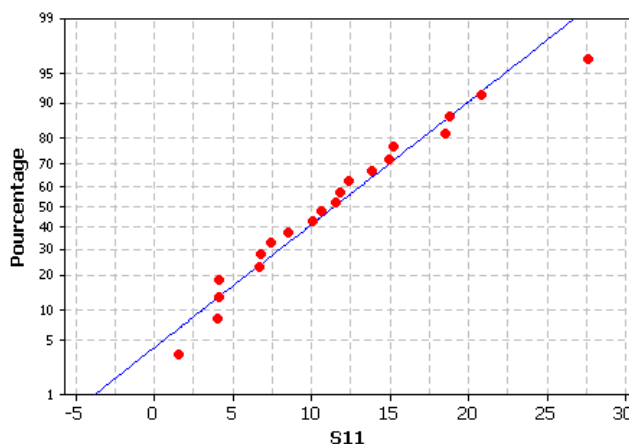


Figure 41 : Droite de Henry de la série S11.

La série S11 présente un étalement à droite (0.698) avec une forme pointue (3.405).

On estime un gain moyen en sensibilité avec un Xevo TQ-S vis-à-vis d'un Xevo TQD en S/N en mode MRM. Ce gain moyen avec son intervalle de confiance avec un niveau de confiance de 95 % est observable en Figure 42.

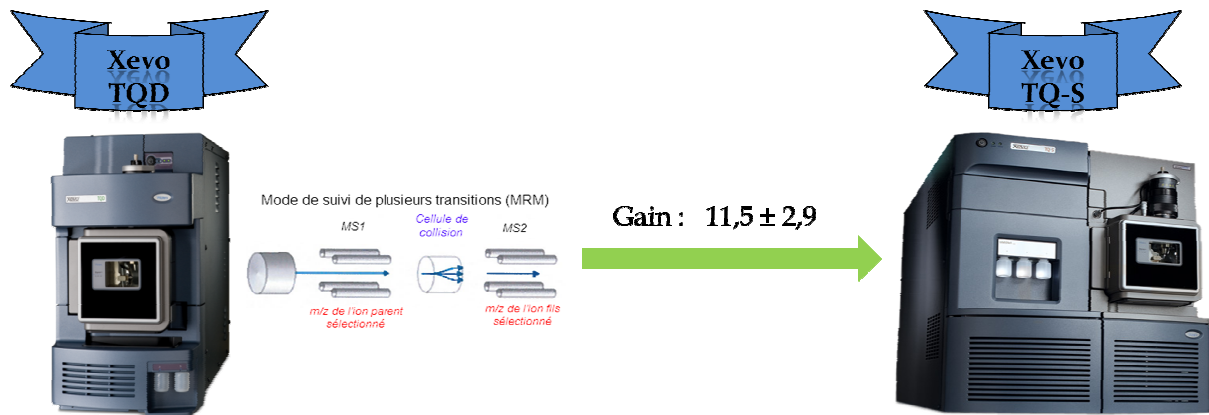


Figure 42 : Rapport moyen de gain de sensibilité avec un Xevo TQ-S vis à vis d'un Xevo TQD en mode MRM sur l'analyse des pesticides.

Cette comparaison montre la hausse de sensibilité apportée par le Xevo TQ-S. Sur cette analyse, on obtient un gain de sensibilité d'un facteur supérieur à 10 en moyenne. La Figure 43 illustre la différence de sensibilité entre ces deux instruments avec le 2.4 D. Nous pouvons observer que pour une même concentration, la sensibilité est nettement supérieure avec le Xevo TQ-S.

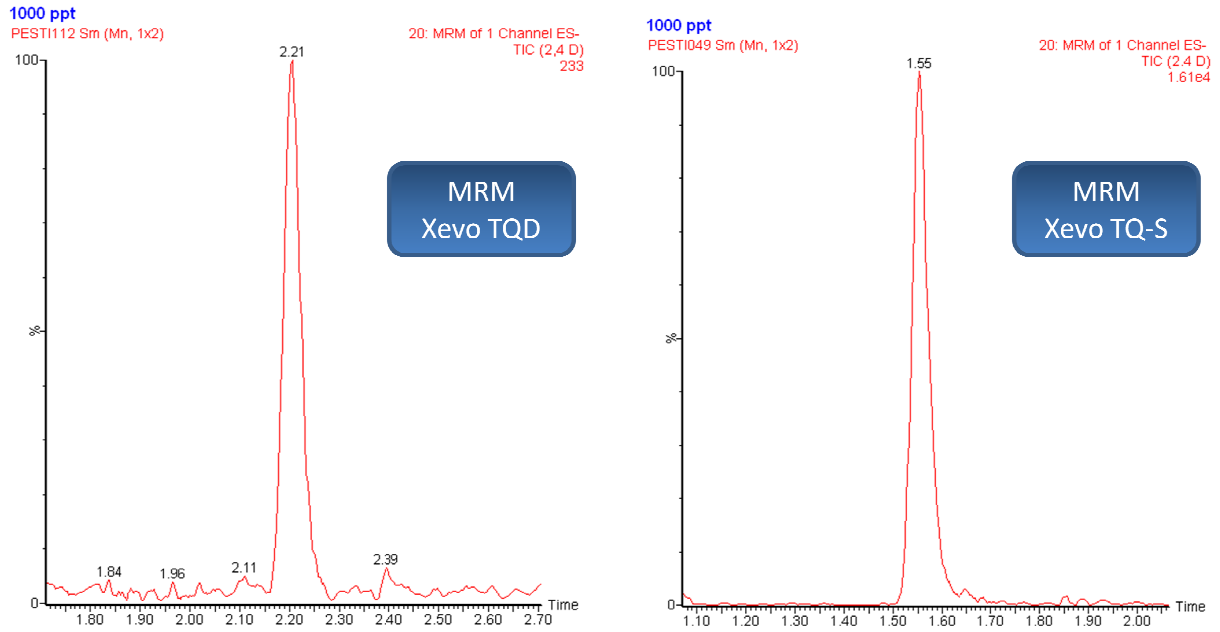


Figure 43 : Signaux du 2.4 D en mode MRM avec le Xevo TQD et le Xevo TQ-S

Les performances du Xevo TQ-S permettent de réaliser des recherches de traces (au niveau du ppm) mais surtout d'ultra-traces (au niveau du ppt) sans réaliser une pré-concentration des échantillons au préalable.

Conclusion

La société Waters est un constructeur d'appareil de mesure analytique. Son objectif est l'innovation technologique afin de proposer des solutions adaptées à ses clients et répondant à leurs besoins. Le stage que j'ai réalisé a permis d'établir des données sur la performance des instruments au sein d'une gamme d'appareil.

Waters introduit en 2004 un système innovant améliorant la résolution, la sensibilité et la vitesse d'analyse de l'HPLC. Il s'agit de l'Acquity UPLC. Quelques années après, deux autres systèmes UPLC ont été introduits venant élargir la gamme Acquity : l'HClass et l'IClass.

La première partie de mon stage a été d'évaluer leurs performances. Une étude sur les acides aminés, une sur des filtres UV et des conservateurs ainsi qu'une sur des esters d'alkyle d'acide sulfonique ont été choisies, et ont été réalisées sur ces différents instruments.

Au cours de ces études, nous avons pu voir que le volume mort de chaque système influe sur la séparation, rendant compte d'une caractéristique du système influant sur ses performances. Un autre paramètre a également été mis en évidence : la température. Nous avons démontré que le préchauffage de l'éluant est à prendre en considération, car nous pouvons observer une modification de la séparation des composés, surtout entre le système UPLC de 2004 et les systèmes plus récents.

Suite à une étude statistique des résultats obtenus avec ces différentes études, nous avons déterminé un facteur moyen de performance entre chaque système. Ce facteur rend compte d'un gain ou d'une perte moyenne que l'on peut obtenir sur l'ensemble de la séparation des composés au niveau de la résolution, avec une utilisation optimale du préchauffage de la phase mobile selon le système utilisé. Toutefois ces facteurs ne rendent pas compte des possibilités de coélution que l'on peut rencontrer lors de transfert d'analyse. On obtiendra en moyenne une baisse de 8 % de la résolution lors d'un transfert d'un système UPLC vers un système HClass. Ceci s'explique principalement par l'augmentation du volume mort avec un système quaternaire comme l'HClass (environ 400 μ L) en comparaison de celui d'un système binaire comme l'UPLC (environ 120 μ L). A l'inverse on obtiendra en moyenne une amélioration de 8 % de la résolution lors d'un transfert d'un système UPLC vers un système IClass. Cette amélioration est la conséquence de la diminution du volume mort de ce dernier

système binaire (environ 90 μL), limitant d'avantage la dispersion au niveau du système, mais également l'amélioration du préchauffage de la phase mobile. L'unique différence entre les systèmes HClass et IClass est la pompe, soit la différence de volume mort. Nous pourrions ainsi obtenir en moyenne une amélioration de 13 % de la résolution lors d'un transfert d'un système HClass vers un système IClass.

Il existe dans la gamme Acquity, trois détecteurs UV. Waters met à disposition un détecteur permettant de faire des acquisitions à une longueur d'onde précise, le TUV, et deux détecteurs permettant de réaliser des acquisitions de spectre UV, le PDA et le PDA $e\lambda$. La seconde partie de mon stage a été d'évaluer leurs performances en comparant leur sensibilité de détection.

Le PDA et le PDA $e\lambda$ sont de conception similaire. La seule différence est le réseau permettant dans un cas une détection de 190 à 500 nm et dans l'autre jusqu'à 800 nm. Le TUV est de conception différente car on effectue une acquisition à une longueur d'onde donnée et non plus sur une plage de longueur d'onde.

Suite à une étude statistique des résultats obtenus, nous avons déterminé un facteur moyen de performance entre chaque détecteur. Ce facteur rend compte d'un gain moyen que l'on peut attendre sur l'ensemble de la séparation des composés au niveau de la sensibilité, et donc du signal/bruit. Nous pourrions ainsi observer une amélioration moyenne de la sensibilité d'un facteur 2 avec un PDA en comparaison d'un PDA $e\lambda$. Nous pourrions obtenir une amélioration moyenne de la sensibilité avec un TUV d'un facteur 2 en comparaison de ce que l'on détecterait avec un PDA. La variation du bruit de fond est en lien avec la conception du détecteur, entraînant une différence de sensibilité, qui est d'autant plus visible entre un TUV et un PDA $e\lambda$, où l'on peut observer une amélioration moyenne de la sensibilité d'un facteur 4.

Ces quatre dernières années, Waters a renouvelé sa gamme complète de spectromètre de masse de la gamme quadripôle. Chaque détecteur est de conception différente, entraînant les différences de sensibilité et donc d'utilisation. Waters nous propose désormais un simple quadripôle, le SQD 2, et trois triple quadripôle, le Xevo TQD, le Xevo TQ MS et le Xevo TQ-S. La troisième partie de mon stage a été d'évaluer leurs performances en comparant leur sensibilité de détection. Une étude permettant de séparer et analyser un mélange de 20 pesticides a été utilisée afin de réaliser cette évaluation. Ces mesures ont été effectuées sur des solutions standard, sans effet de matrice.

Avec l'appui d'une étude statistique des résultats, nous avons évalué la différence de sensibilité entre un SQD 2 et un Xevo TQD. Nous avons ainsi démontré que quelque soit le mode d'acquisition utilisé, le SQD 2 est plus sensible que le Xevo TQD. Sur l'ensemble de la séparation, nous pouvons perdre en moyenne 2/3 en sensibilité avec un Xevo TQD vis-à-vis d'un SQD 2 en mode FS, et une perte moyenne de 1/3 en mode SIR. Toutefois, le mode d'acquisition permettant d'avoir la meilleure sensibilité avec le Xevo TQD est le mode MRM. Ce mode d'acquisition est plus sélectif et améliore la sensibilité. Pour une molécule donnée, nous pouvons obtenir une sensibilité équivalente avec le SQD 2 en mode SIR et le Xevo TQD en mode MRM.

Afin de démontrer le gain de sensibilité apporté par un Xevo TQ-S, une comparaison des signaux/bruit en mode MRM obtenus avec cet instrument et le Xevo TQD a été réalisée. Il en résulte que grâce aux performances du Xevo TQ-S, le dosage des ultra-traces est nettement facilité. Avec l'analyse des pesticides, nous avons obtenu un facteur moyen de 11.5 entre ces spectromètres de masse. Ce gain est la conséquence de la très nette hausse de sensibilité apporté par la nouvelle conception du système de transfert des ions disponible sur le Xevo TQ-S. Nous pouvons également atteindre cette gamme de concentration avec un Xevo TQD, à condition de réaliser une étape de pré-concentration en amont.

Pour de prochaines études, dans le but de déterminer plus précisément les différences de sensibilité entre les spectromètres de masse de la gamme triple quadripôle, il est nécessaire d'inclure d'une part le Xevo TQ MS, et d'autre part de réaliser plusieurs études sur des « familles de molécules » différentes des pesticides comme les stéroïdes ou les polyphénols par exemple.

En 2012, Waters lance une nouvelle technologie : la Chromatographie de Convergence Ultra Performante (UPC²™). Cette technologie est basée sur les principes de la SFC avec des performances comparables à ce que l'on peut obtenir en UPLC. Elle se positionne comme étant une alternative analytique à certaines applications en LC ou GC. Il serait donc intéressant de réaliser une étude comparative montrant le réel potentiel de cet instrument vis à vis des techniques chromatographies classiques.

Annexes

ANNEXE 1 : SCHEMA DE PRINCIPE D'UNE POMPE.....	96
ANNEXE 2 : SCHEMA DE PRINCIPE D'UN INJECTEUR.....	97
ANNEXE 3 : CHIMIE DES COLONNES WATERS HPLC.....	98
ANNEXE 4 : CHIMIE DES COLONNES WATERS UPLC.....	101
ANNEXE 5 : SCHEMA DE PRINCIPE D'UN DETECTEUR UV.....	103
ANNEXE 6 : CONDITIONS MS/MS DES PESTICIDES	104
ANNEXE 7 : MESURE DU VOLUME MORT (DWEELL VOLUME).....	105
ANNEXE 8 : ACQUITY UPLC COLUMN CALCULATOR	107
ANNEXE 9 : RESULTATS OBTENUS POUR L'ETUDE DES ACIDES AMINES	109
ANNEXE 10 : RESULTATS OBTENUS POUR L'ETUDE DES FILTRES UV ET CONSERVATEURS.....	113
ANNEXE 11 : RESULTATS OBTENUS POUR L'ETUDE DES ESTERS D'ALKYLE D'ACIDE SULFONIQUE	115
ANNEXE 12 : TEST DE GRUBBS	117
ANNEXE 13 : TEST DE SHAPIRO-WILK.....	118
ANNEXE 14 : COEFFICIENT D'ASYMETRIE DE FISHER	119
ANNEXE 15 : COEFFICIENT D'APLATISSEMENT DE PEARSON	120
ANNEXE 16 : TEST DE FISCHER	121
ANNEXE 17 : ANALYSE DE LA VARIANCE (ANOVA)	122
ANNEXE 18 : TEST DE BONFERRONI	124
ANNEXE 19 : RESULTATS SERVANT A LA COMPARAISON DES DETECTEURS UV.....	125
ANNEXE 20 : TEST DE DIXON.....	126
ANNEXE 21 : RESULTATS DE L'ANALYSE DES PESTICIDES.....	128
ANNEXE 22 : TEST DE STUDENT.....	130

Annexe 1 : Schéma de principe d'une pompe

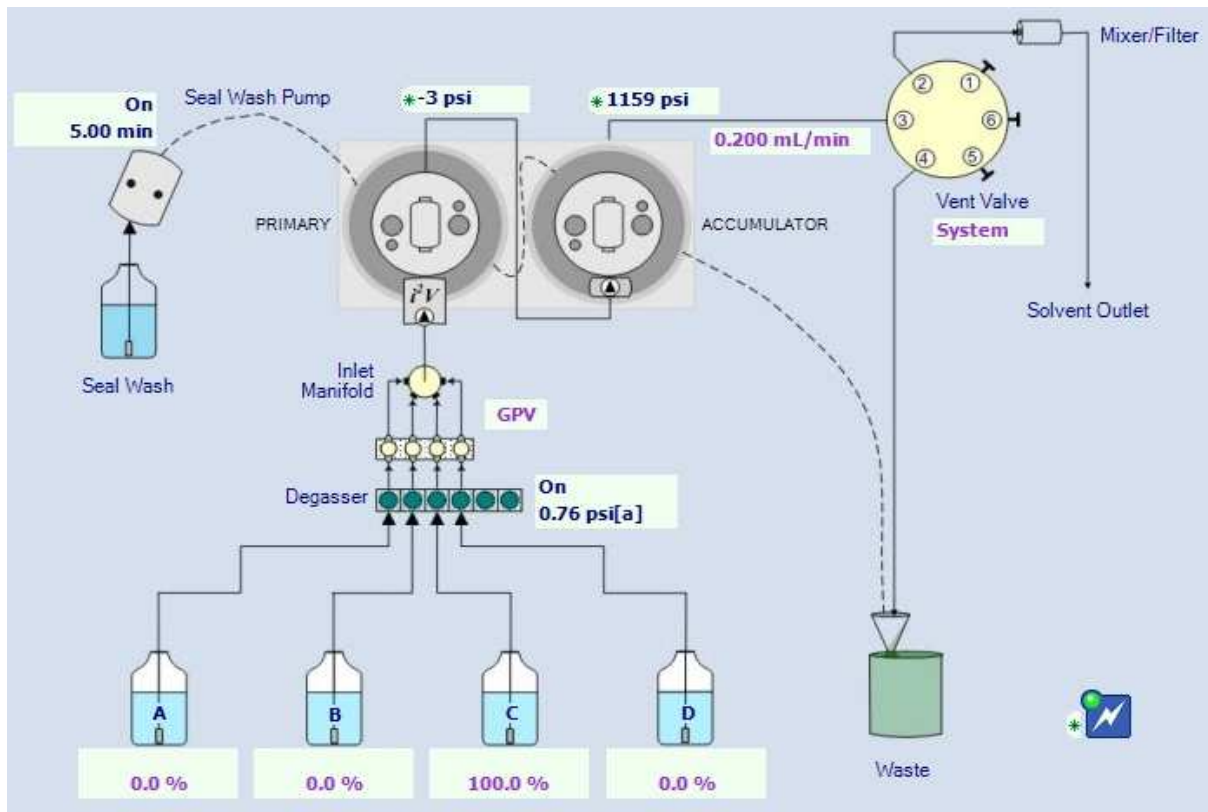


Figure 44 : Schéma de principe de fonctionnement d'une pompe quaternaire. Il s'agit d'une capture d'image provenant de la console de pilotage Acquity UPLC de la pompe QSM de l'HClass.

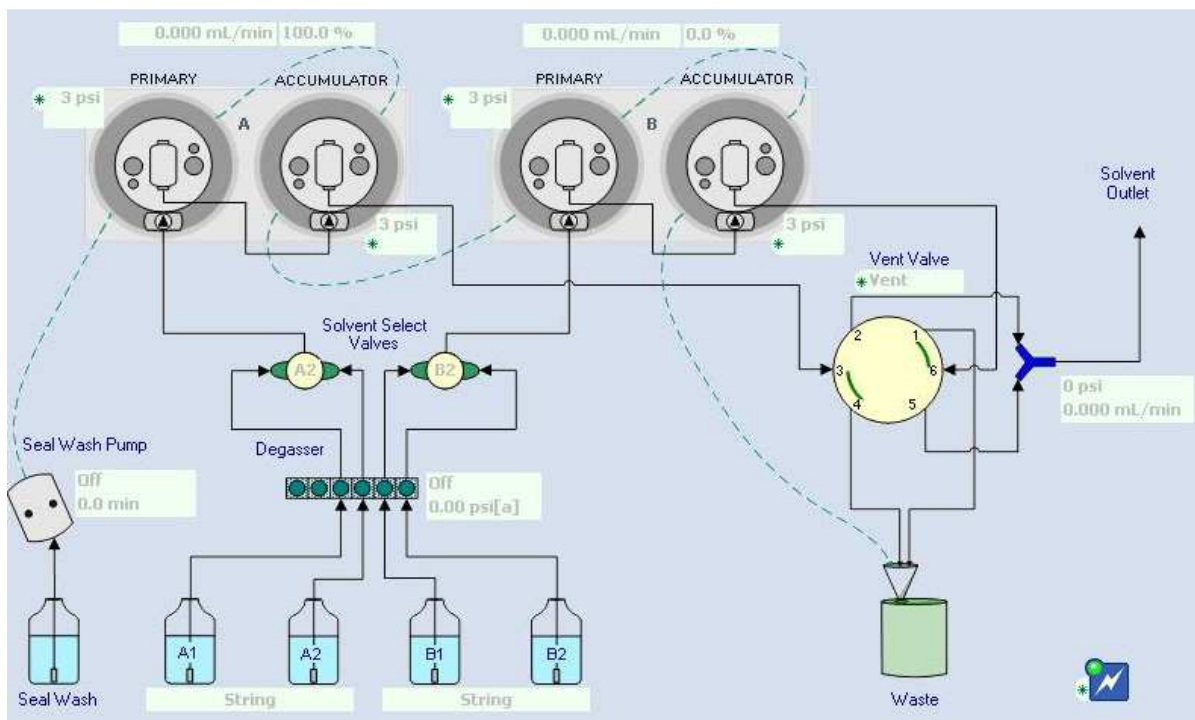


Figure 45 : Schéma de principe de fonctionnement d'une pompe binaire. Il s'agit d'une capture d'image provenant de la console de pilotage Acquity UPLC de la pompe BSM de l'UPLC.

Annexe 2 : Schéma de principe d'un injecteur

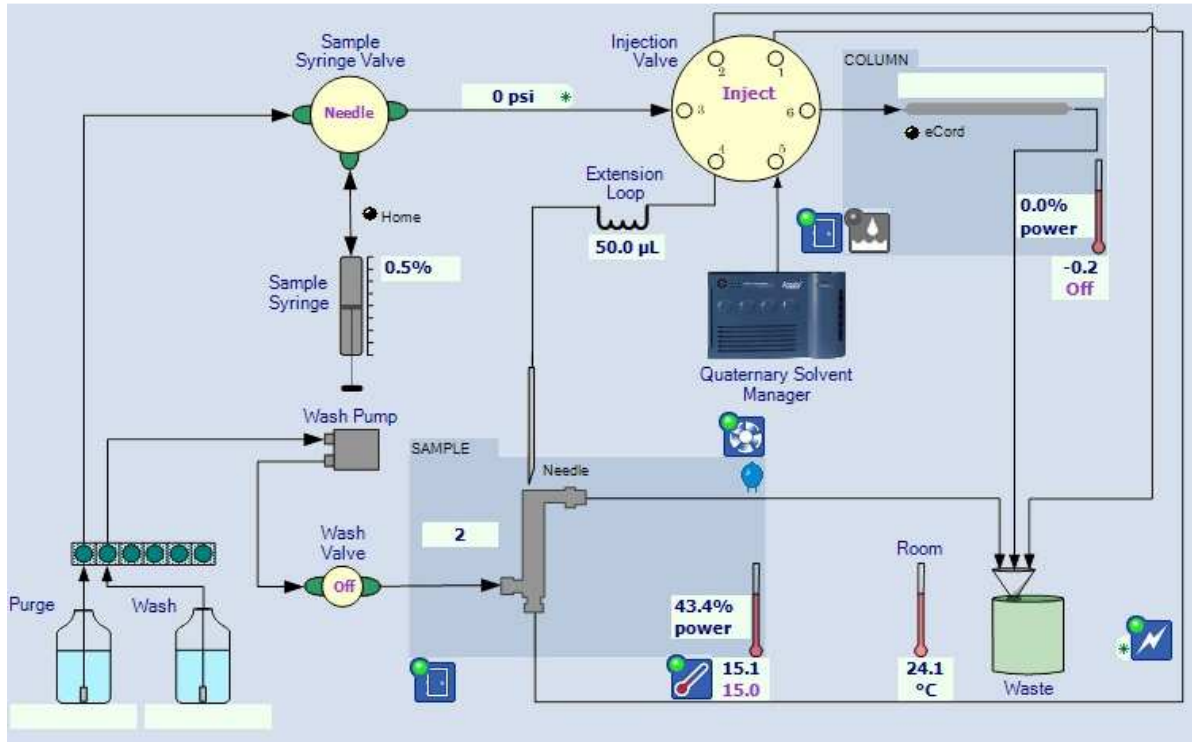


Figure 46 : Schéma de principe de fonctionnement d'un injecteur en ligne. Il s'agit d'une capture d'image provenant de la console de pilotage Acquity UPLC de l'injecteur FTN de l'HClass.

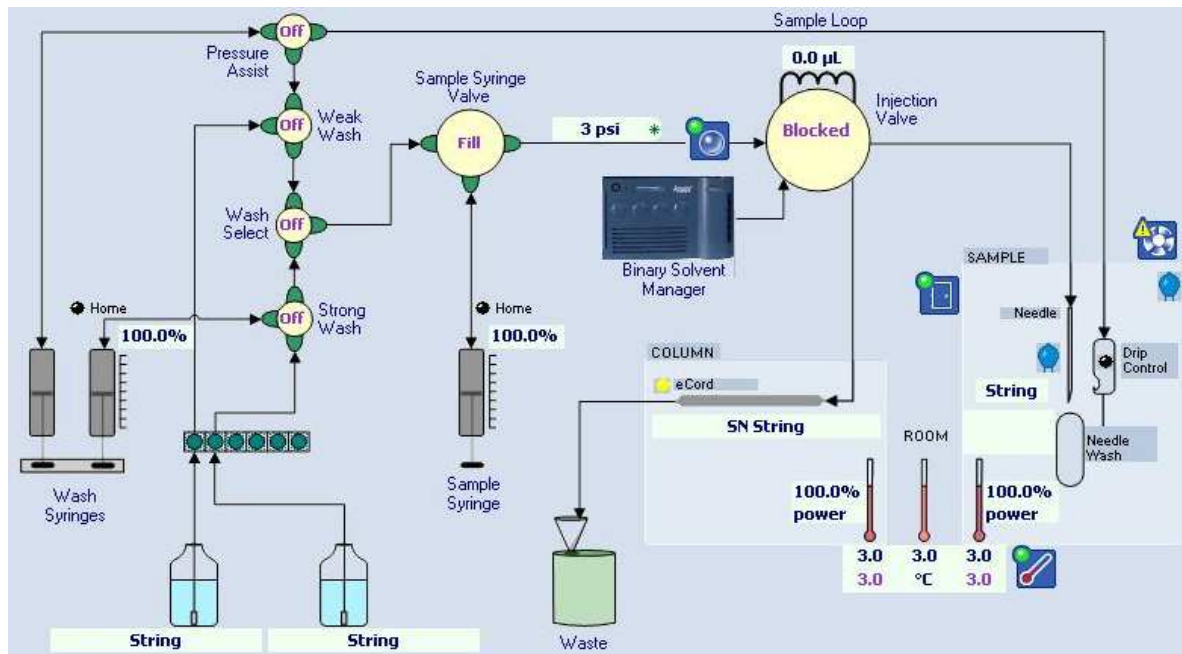


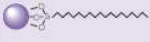
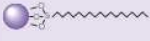

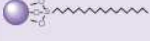
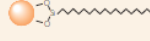
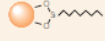
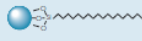

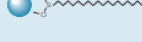


Figure 47 : Schéma de principe de fonctionnement d'un injecteur hors ligne. Il s'agit d'une capture d'image provenant de la console de pilotage Acquity UPLC de l'injecteur SM de l'UPLC.


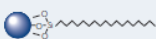
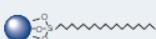
Annexe 3 : Chimie des colonnes Waters HPLC

	USP Class No.	pH Range (Room Temp.)	Temperature Limits	Particle Size	Pore Size	Surface Area	Carbon Load	
NEW XSelect HPLC Columns								
CSH C ₁₈		L1	1-11	Low pH = 80 °C High pH = 45 °C	3.5, 5 µm	130Å	185 m ² /g	15%
		Selectivity Features: General purpose reversed-phase column that offers excellent pH stability and rapid mobile-phase re-equilibration for method development. Charged Surface Hybrid (CSH) technology enables superior peak shape and increased loading capacity for basic compounds. Bonding: Trifunctional C ₁₈ ligand, fully end-capped, bonded to a CSH particle substrate.						
CSH Phenyl-Hexyl		L11	1-11	Low pH = 80 °C High pH = 45 °C	3.5, 5 µm	130Å	185 m ² /g	14%
		Selectivity Features: General purpose alternative selectivity ligand that provides pi-pi interactions with polyaromatic compounds, while maintaining excellent reproducibility at pH extremes. Charged Surface Hybrid (CSH) technology enables superior peak shape and increased loading capacity for basic compounds. Bonding: Trifunctional C ₆ Phenyl ligand, fully end-capped, bonded to a CSH particle substrate.						
CSH Fluoro-Phenyl		L43	1-8	Low pH = 60 °C High pH = 45 °C	3.5, 5 µm	130Å	185 m ² /g	10%
		Selectivity Features: General purpose column that provides a very high degree of analyte selectivity, especially when using low-pH mobile phases. Charged Surface Hybrid (CSH) technology enables superior peak shape and increased loading capacity for basic compounds. Bonding: Trifunctional propyl fluorophenyl ligand, non-encapped, bonded to a CSH particle substrate.						
XBridge HPLC Columns								
C ₁₈		L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	2.5, 3.5, 5, 10 µm	130Å	185 m ² /g	18%
		Selectivity Features: General purpose column ideally suited for method development due to extreme pH stability and applicability to the broadest range of compound classes. Bonding: Trifunctional C ₁₈ , fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
C ₈		L7	1-12	Low pH = 60 °C High pH = 60 °C	2.5, 3.5, 5, 10 µm	130Å	185 m ² /g	13%
		Selectivity Features: General purpose column ideally suited for method development due to extreme pH stability and applicability to the broadest range of compound classes. Bonding: Trifunctional C ₈ , fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
Shield RP18		L1	2-11	Low pH = 50 °C High pH = 45 °C	2.5, 3.5, 5, 10 µm	130Å	185 m ² /g	17%
		Selectivity Features: Alternate selectivity as compared to straight chain C ₁₈ , particularly with phenolic analytes. Compatible with 100% aqueous-phase composition. Bonding: Monofunctional embedded polar C ₁₈ , fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
Phenyl		L11	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m ² /g	15%
		Selectivity Features: Excellent method development column for alternate selectivity, particularly in regard to polyaromatic compounds. Unique level of pH stability for a Phenyl bonded phase. Bonding: Trifunctional C ₆ Phenyl, fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
HILIC		L3	1-9	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m ² /g	unbonded
		Selectivity Features: Excellent for retention of very polar, basic, water soluble analytes. Specifically designed and tested for HILIC separations using mobile phases containing high concentrations of organic solvent. Bonding: Unbonded Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						




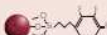
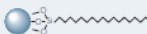
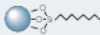
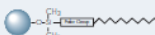
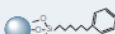

	USP Class No.	pH Range (Room Temp.)	Temperature Limits	Particle Size	Pore Size	Surface Area	Carbon Load
XBridge HPLC Columns							
Amide	—	2-11	Low pH = 90 °C High pH = 90 °C	3.5 µm	130Å	185 m ² /g	12%
	<p>Selectivity Features: Rugged HILIC stationary phase designed to separate a wide range of very polar compounds. Especially good at separating carbohydrates (saccharides) using high concentrations of organic modifier, elevated temperature and high pH. Compatible with all modern detectors including MS, ELSD, UV and Fluorescence.</p> <p>Bonding: Trifunctional amide bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.</p>						
BEH130 C₁₈ (Peptide Separation Technology)	L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	3.5, 5, 10 µm	130Å	185 m ² /g	18%
	<p>Selectivity Features: pH and temperature stable, small pore, C₁₈, UPLC column for peptides. Specifically QC tested with peptide map.</p> <p>Bonding: Trifunctional C₁₈, fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.</p>						
BEH300 C₁₈ (Peptide Separation Technology)	L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	3.5, 5, 10 µm	300Å	90 m ² /g	12%
	<p>Selectivity Features: pH and temperature stable, wide pore, C₁₈, UPLC column for peptides. Specifically QC tested with peptide map.</p> <p>Bonding: Trifunctional C₁₈, fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.</p>						
BEH300 C₄ (Protein Separation Technology)	L26	1-10	Low pH = 80 °C High pH = 50 °C	3.5 µm	300Å	90 m ² /g	8%
	<p>Selectivity Features: pH and temperature stable, wide pore, C₄, UPLC column for proteins. Specifically QC tested with protein mixture.</p> <p>Bonding: Proprietary monofunctional C₄ bonding to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.</p>						
BEH C₁₈ (Oligonucleotide Separation Technology)	L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	2.5 µm	130Å	185 m ² /g	18%
	<p>Selectivity Features: pH and temperature stable, small pore, C₁₈, UPLC column for synthetic DNA and RNA. Specifically QC tested with synthetic DNA ladder.</p> <p>Bonding: Trifunctional C₁₈, fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.</p>						
SunFire HPLC Columns*							
C₁₈	L1	2-8	Low pH = 50 °C High pH = 40 °C	2.5, 3.5, 5, 10 µm	100Å	340 m ² /g	16%
	<p>Selectivity Features: General purpose method development column. Very high loading capacity, particularly for basic analytes in low pH mobile phases. Ideally suited for purification and impurity profile assays.</p> <p>Bonding: Difunctional C₁₈, fully endcapped, bonded to high purity silica substrate.</p>						
C₈	L7	2-8	Low pH = 40 °C High pH = 40 °C	2.5, 3.5, 5, 10 µm	100Å	340 m ² /g	12%
	<p>Selectivity Features: General purpose method development column. Very high loading capacity, particularly for basic analytes in low pH mobile phases. Less hydrophobic, therefore, less retentive than C₁₈ for most analytes.</p> <p>Bonding: Difunctional C₈, fully endcapped, bonded to high purity silica substrate.</p>						
Atlantis HPLC Columns*							
T3	L1	2-8	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	3, 5, 10 µm	100Å	330 m ² /g	14%
	<p>Selectivity Features: Retention of polar compounds, compatible with 100% aqueous mobile phases, superior stability under low pH conditions. Specifically designed for enhanced retention of polar analytes.</p> <p>Bonding: T3 (C₁₈) bonding and endcapping, bonded to high purity silica substrate.</p>						
HILIC	L3	1-5	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	3, 5 µm	100Å	330 m ² /g	unbonded
	<p>Selectivity Features: Excellent for retention of very polar, basic, water soluble analytes. Specifically designed and tested for HILIC separations using mobile phases containing high concentrations of organic solvent.</p> <p>Bonding: Unbonded high purity silica substrate.</p>						
C₁₈	L1	3-7	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	3, 5, 10 µm	100Å	330 m ² /g	12%
	<p>Selectivity Features: Retention of polar compounds. Designed for compatibility with 100% aqueous mobile phases.</p> <p>Bonding: Difunctional C₁₈ bonding, fully endcapped, bonded to high purity silica substrate.</p>						



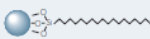

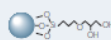

* Atlantis and SunFire HPLC columns do not offer a sub-2 µm analog.

HSS HPLC Columns

<p>HSS C₁₈</p> 	<p>L1</p>	<p>1-8</p>	<p>Low pH = 45 °C High pH = 45 °C</p>	<p>3.5, 5 µm</p>	<p>100Å</p>	<p>230 m²/g</p>	<p>15%</p>	<p>Selectivity Features: High performance C₁₈ chemistry, increased retention, superior peak shape, resists acid hydrolysis at low pH. Designed for UPLC separations where silica-based C₁₈ selectivities are desired. Bonding: High coverage trifunctional C₁₈, fully endcapped, bonded to High Strength Silica (HSS) HPLC particle substrate.</p>
<p>HSS C₁₈ SB</p> 	<p>L1</p>	<p>2-8</p>	<p>Low pH = 45 °C High pH = 45 °C</p>	<p>3.5, 5 µm</p>	<p>100Å</p>	<p>230 m²/g</p>	<p>8%</p>	<p>Selectivity Features: Unique, non-endcapped C₁₈ chemistry designed specifically for method development scientists. Offers unique Selectivity for Bases (SB) when operating under low pH conditions and transferability between UPLC and HPLC separations. Bonding: Intermediate coverage tri-functionally bonded C₁₈, no endcapping, bonded to High Strength Silica (HSS) HPLC particle substrate.</p>
<p>HSS T3</p> 	<p>L1</p>	<p>2-8</p>	<p>Low pH = 45 °C High pH = 45 °C</p>	<p>3.5, 5 µm</p>	<p>100Å</p>	<p>230 m²/g</p>	<p>11%</p>	<p>Selectivity Features: Aqueous mobile-phase compatible HPLC column designed for extreme retention. Combines polar compound retention with transferability between UPLC and HPLC separations. Bonding: T3 (C₁₈) bonding and endcapping, bonded to High Strength Silica (HSS) HPLC particle substrate.</p>

Annexe 4 : Chimie des colonnes Waters UPLC

		USP Class No.	pH Range (Room Temp.)	Temperature Limits	Particle Size	Pore Size	Surface Area	Carbon Load
CSH C ₁₈		L1	1-11	Low pH = 80 °C High pH = 45 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	15%
		Selectivity Features: General purpose reversed-phase column that offers excellent pH stability and rapid mobile-phase re-equilibration for method development. Charged Surface Hybrid (CSH) technology enables superior peak shape and increased loading capacity for basic compounds. Bonding: Trifunctional C ₁₈ ligand, fully end-capped, bonded to a CSH particle substrate.						
CSH Phenyl-Hexyl		L11	1-11	Low pH = 80 °C High pH = 45 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	14%
		Selectivity Features: General purpose alternative selectivity ligand that provides pi-pi interactions with polyaromatic compounds, while maintaining excellent reproducibility at pH extremes. Charged Surface Hybrid (CSH) technology enables superior peak shape and increased loading capacity for basic compounds. Bonding: Trifunctional C ₆ Phenyl ligand, fully end-capped, bonded to a CSH particle substrate.						
CSH Fluoro-Phenyl		L43	1-8	Low pH = 60 °C High pH = 45 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	10%
		Selectivity Features: General purpose column that provides a very high degree of analyte selectivity, especially when using low-pH mobile phases. Charged Surface Hybrid (CSH) technology enables superior peak shape and increased loading capacity for basic compounds. Bonding: Trifunctional propyl fluorophenyl ligand, non-encapped, bonded to a CSH particle substrate.						
BEH C ₁₈		L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	18%
		Selectivity Features: General purpose column ideally suited for method development due to extreme pH stability and applicability to the broadest range of compound classes. Bonding: Trifunctional C ₁₈ , fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
BEH C ₈		L7	1-12	Low pH = 60 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	13%
		Selectivity Features: General purpose column ideally suited for method development due to extreme pH stability and applicability to the broadest range of compounds classes. Bonding: Trifunctional C ₈ , fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
BEH Shield RP18		L1	2-11	Low pH = 50 °C High pH = 45 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	17%
		Selectivity Features: Alternate selectivity as compared to straight chain C ₁₈ , particularly with phenolic analytes. Compatible with 100% aqueous-phase composition. Bonding: Monofunctional embedded polar C ₁₈ , fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
BEH Phenyl		L11	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	15%
		Selectivity Features: Excellent method development column for alternate selectivity, particularly in regard to polyaromatic compounds. Unique level of pH stability for a Phenyl bonded phase. Bonding: Trifunctional C ₆ Phenyl, fully endcapped, bonded to Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						
BEH HILIC		L3	1-9	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	unbonded
		Selectivity Features: Excellent for retention of very polar, basic, water soluble analytes. Specifically designed and tested for HILIC separations using mobile phases containing high concentrations of organic solvent. Bonding: Unbonded Ethylene Bridged Hybrid (BEH) substrate.						

	USP Class No.	pH Range (Room Temp.)	Temperature Limits	Particle Size	Pore Size	Surface Area	Carbon Load
BEH Amide 	—	2-11	Low pH = 90 °C High pH = 90 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	12%
BEH130 C₁₈ (Peptide Separation Technology) 	L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	18%
BEH300 C₁₈ (Peptide Separation Technology) 	L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	300Å	90 m ² /g	12%
BEH300 C₄ (Protein Separation Technology) 	L26	1-10	Low pH = 80 °C High pH = 50 °C	1.7 µm	300Å	90 m ² /g	8%
BEH C₁₈ (Oligonucleotide Separation Technology) 	L1	1-12	Low pH = 80 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	18%
BEH Glycan (Glycan Separation Technology) 	—	2-11	Low pH = 90 °C High pH = 90 °C	1.7 µm	130Å	185 m ² /g	12%
BEH200 SEC 	L33	1-8	Low pH = 60 °C High pH = 60 °C	1.7 µm	200Å	216 m ² /g	12%
HSS C₁₈ 	L1	1-8	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	1.8 µm	100Å	230 m ² /g	15%
HSS C₁₈ SB 	L1	2-8	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	1.8 µm	100Å	230 m ² /g	8%
HSS T3 	L1	2-8	Low pH = 45 °C High pH = 45 °C	1.8 µm	100Å	230 m ² /g	11%

Annexe 5 : Schéma de principe d'un détecteur UV

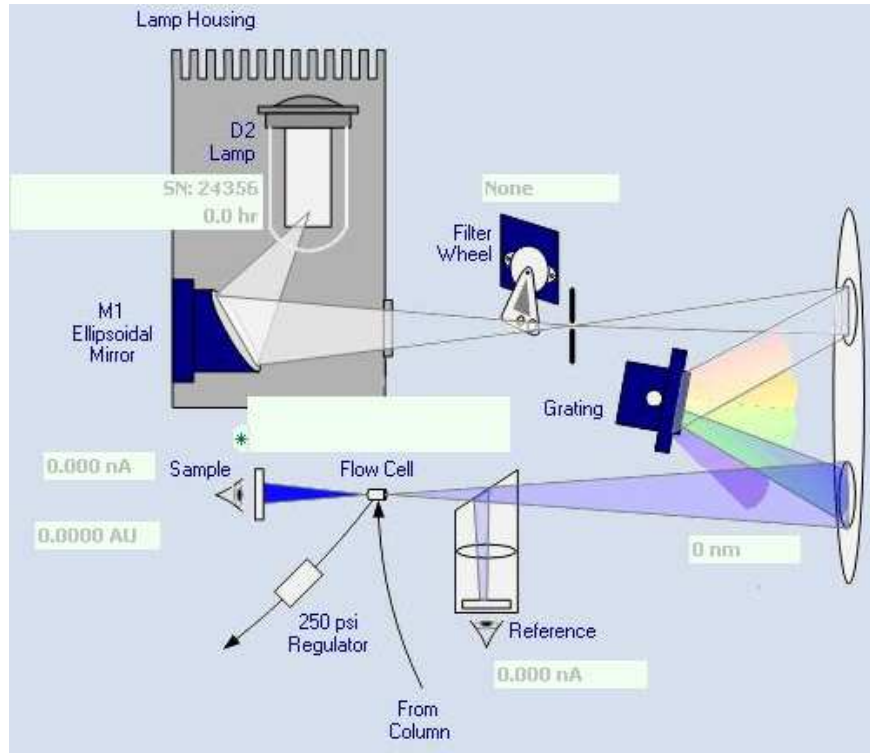


Figure 48 : Schéma de principe de fonctionnement d'un détecteur UV mono longueur d'onde. Il s'agit d'une capture d'image provenant de la console de pilotage Acquity UPLC du détecteur Acquity UPLC TUV.

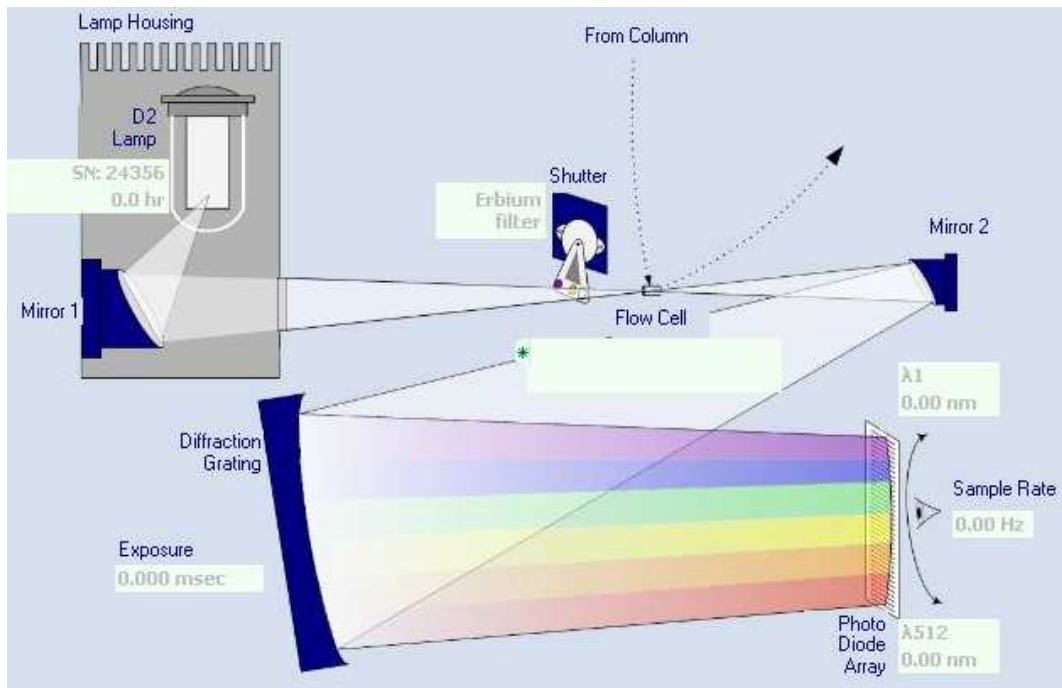


Figure 49 : Schéma de principe de fonctionnement d'un détecteur UV à barrette de diode. Il s'agit d'une capture d'image provenant de la console de pilotage Acquity UPLC du détecteur Acquity UPLC PDA.

Annexe 6 : Conditions MS/MS des pesticides

Tableau XI : Conditions optimisées d'acquisition MS/MS des différents pesticides.

No.	Composé	Mode	Ion précurseur (m/z)	Cône (V)	Energie de Collision (eV)	Ion fils (m/z)
1	Methamidophose (MET)	ESI+	142.0	30	15	93.9
2	Piclorame (PIC)	ESI+	240.9	30	22	194.9
3	Methomyde (MTL)	ESI+	163.0	20	10	87.9
4	Imidaclopride (IMI)	ESI+	256.0	28	20	175.0
5	Diméthoate (DIM)	ESI+	229.9	25	8	198.8
6	Carbendazime (CAR)	ESI+	192.0	35	18	160.0
7	2,4 D	ESI-	218.9	22	11	161.0
8	Carbofurane (CRB)	ESI+	222.0	32	12	165.0
9	Atrazine (ATR)	ESI+	216.0	45	18	174.0
10	Diuron (DIU)	ESI+	233.0	35	19	72.0
11	Ametryne (AME)	ESI+	228.1	41	18	186.0
12	Parathion-méthyle (PAR)	ESI+	263.9	38	20	125.0
13	Propanile (PROPA)	ESI+	217.9	35	15	161.9
14	Malathion (MAL)	ESI+	330.9	29	13	127.0
15	Terbutryne (TER)	ESI+	242.1	40	20	186.0
16	Propiconazole (PROPIL)	ESI+	342.0	40	18	159.0
17	Pirimiphos-méthyle (PIR)	ESI+	306.0	55	30	108.0
18	Butachlore (BUT)	ESI+	312.0	18	12	238.0
19	Chlorpyrifose (CHLOR)	ESI+	349.8	30	18	197.9
20	Pendimethaline (PEN)	ESI+	282.0	19	10	212.0

Annexe 7 : Mesure du volume mort (Dwell Volume)

Afin de garantir les performances de séparation d'une analyse sur un système, la mesure du volume mort du nouveau et ancien système chromatographique est la première étape à réaliser. Le volume mort est spécifique au système mesuré, et potentiellement différent entre deux systèmes de même configuration. Il est recommandé d'appliquer la même méthodologie de mesure du volume si l'on a plusieurs systèmes à évaluer.

La méthodologie suivante est utilisée afin de réaliser les transferts de méthodes entre les systèmes UPLC® et est inspirée d'une note technique de Waters [38] :

- Retirer la colonne et placer une union entre le capillaire de sortie du four colonne et d'entrée du détecteur.
- Placer en voie A de l'acétonitrile, en voie B de l'acétonitrile avec 0,5% d'acétone. Rincer les voies.
- La détection est réalisée à 254 nm avec une injection de 0 µL.
- Programmer un gradient linéaire à un débit de 0.75 mL/min comme suit : 0 – 5 min, 0% B ; 5 – 15 min, 100% B ; 25 – 35 min, 0% B immédiatement.
- Nous obtenons alors les profils observables sur la Figure 50 :

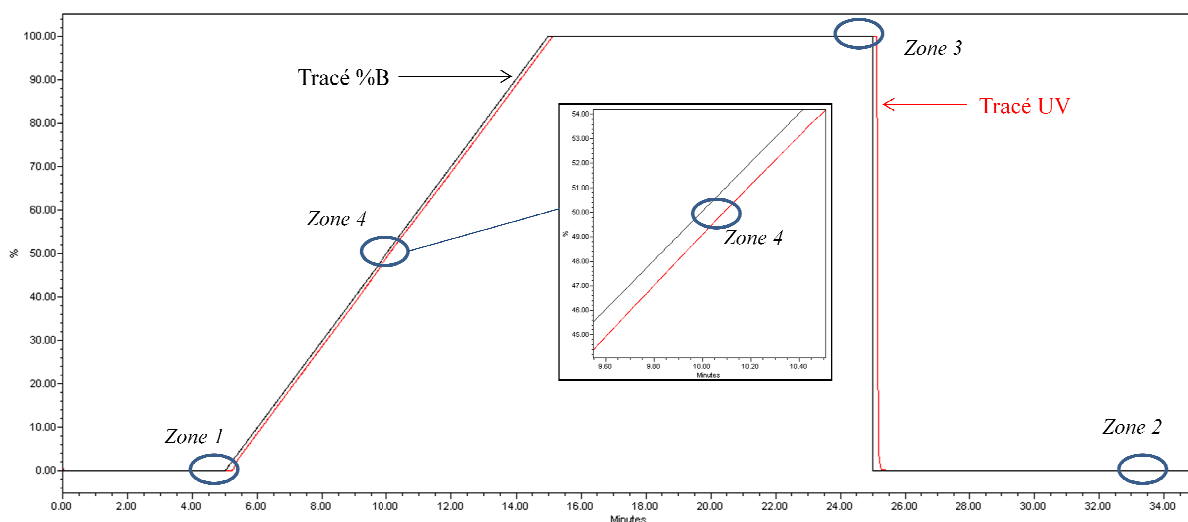


Figure 50 : Détermination du volume mort d'un système chromatographique.

- Mesurer l'absorbance moyenne entre 4 et 5 min (Zone 1) et entre 33 et 34 min (Zone 2). En déduire une valeur moyenne $M1$. Mesurer l'absorbance moyenne $M2$ entre 24 et 25 min (Zone 3). Soustraire $M1$ à $M2$ et diviser par 2 afin de lire l'absorbance correspondant à 50% B. Déterminer le temps t_{UV} correspondant à cette absorbance. Déterminer le temps $t_{\%B}$ correspondant à 50% B sur le tracé théorique du %B. Soustraire t_{UV} à $t_{\%B}$ afin d'obtenir l'écart de temps entre le tracé théorique (Tracé %B) et le tracé expérimental (Tracé UV). En multipliant cette valeur par le débit de la phase mobile, on obtient le volume mort du système étudié.

Annexe 8 : Acquity UPLC Column Calculator

L'Acquity UPLC Column Calculator est un logiciel fourni avec Empower lors de l'acquisition d'une UPLC. Il permet de faire simplement et rapidement le transfert d'un gradient HPLC vers UPLC et inversement, et entre des systèmes binaires et quaternaires.

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A (Aqueous)	%B (Organic)	Column Volumes
▶ 1	Initial	0.70	99.9	0.1	--
	0.54	0.70	99.9	0.1	1.65
	5.74	0.70	90.9	9.1	15.92
	7.74	0.70	78.8	21.2	6.12
	8.64	0.70	40.4	59.6	2.76
	9.50	0.70	99.9	0.1	2.63
*					

Figure 51 : Première étape de transfert de gradient avec l'Acquity UPLC Column Calculator.

Comme on peut le voir sur la Figure 51, il suffit d'indiquer la température de travail, les dimensions de la colonne avant et après le transfert, le volume d'injection et le volume mort de chaque système.

Concernant les dimensions de la colonne, il n'est pas obligatoire de les conserver lors du transfert. Toutefois il est recommandé de préserver un ratio longueur de colonne sur la taille des particules constant ou très proche afin de garantir la préservation de la séparation entre les deux systèmes.

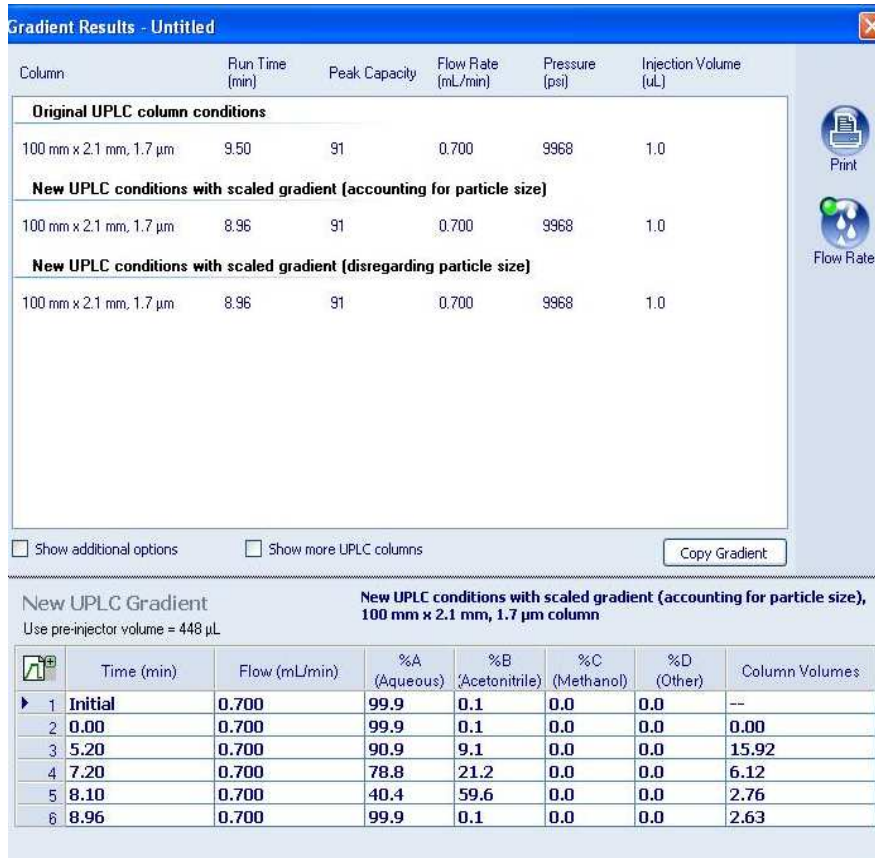


Figure 52 : Résultats obtenus avec le calculateur pour réaliser l'analyse sur le nouveau système UPLC.

La Figure 52 nous montre les résultats proposés par le logiciel pour réaliser le transfert. Nous pouvons voir qu'il nous indique le nouveau gradient, le volume d'injection, l'utilisation si nécessaire de débiter le gradient avant injection et le volume correspondant et enfin la pression maximale du système si l'on a renseigné les bons solvants préalablement.

Annexe 9 : Résultats obtenus pour l'étude des acides aminés

Détermination de la performance instrumentale sur une analyse :

Tableau XII : Récapitulatif des résultats obtenus sur UPLC et HClass des résolutions et des plateaux théoriques pour les 24 acides aminés.

Acide aminé	Résolution		Plateaux théoriques		Acide aminé	Résolution		Plateaux théoriques	
	UPLC	HClass	UPLC	HClass		UPLC	HClass	UPLC	HClass
His	4.29	$\frac{1.63}{x}$ 0.38	26894	$\frac{22872}{x}$ 0.85	Pro	12.91	$\frac{13.01}{x}$ 1.01	192510	$\frac{142193}{x}$ 0.74
Asn	4.05	$\frac{5.64}{x}$ 1.39	40749	$\frac{26850}{x}$ 0.66	AABA	17.15	$\frac{16.66}{x}$ 0.97	220583	$\frac{154939}{x}$ 0.70
Tau	5.21	$\frac{5.54}{x}$ 1.06	64572	$\frac{35174}{x}$ 0.54	Orn	5.76	$\frac{6.50}{x}$ 1.13	362065	$\frac{250906}{x}$ 0.69
Ser	5.23	Coélution	69614	Coélution	Cys	10.98	$\frac{10.01}{x}$ 0.91	464723	$\frac{384268}{x}$ 0.83
Arg	1.18		69538			Lys	2.99	Coélution	667231
Gln	< 0.75	$\frac{1.39}{x}$	Non calculé	41738	Tyr	2.69	517250		
Gly	< 0.75	$\frac{4.98}{x}$	83919	$\frac{48749}{x}$ 0.58	Met	4.30	$\frac{5.21}{x}$ 1.21	539114	$\frac{390985}{x}$ 0.73
Asp	5.92	$\frac{5.15}{x}$ 0.87	96358	$\frac{57968}{x}$ 0.60	Val	5.54	$\frac{5.96}{x}$ 1.08	736157	$\frac{551952}{x}$ 0.75
Glu	10.81	$\frac{11.11}{x}$ 1.03	127079	$\frac{85337}{x}$ 0.67	Ile	29.10	$\frac{28.52}{x}$ 0.98	1242306	$\frac{945955}{x}$ 0.76
Thr	10.07	$\frac{10.56}{x}$ 1.05	143732	$\frac{109004}{x}$ 0.76	Leu	3.07	$\frac{2.98}{x}$ 0.97	1226677	$\frac{958709}{x}$ 0.78
Ala	10.50	$\frac{10.11}{x}$ 0.96	158337	$\frac{120504}{x}$ 0.76	Phe	4.33	$\frac{3.57}{x}$ 0.82	1218349	$\frac{940859}{x}$ 0.77
GABA	4.09	$\frac{3.88}{x}$ 0.95	174484	$\frac{129035}{x}$ 0.74	Trp	4.08	$\frac{3.36}{x}$ 0.82	1328465	$\frac{1211688}{x}$ 0.91

Tableau XIII : Récapitulatif des résultats obtenus sur UPLC et IClass des résolutions et des plateaux théoriques pour les 24 acides aminés.

Acide aminé	Résolution		Plateaux théoriques		Acide aminé	Résolution		Plateaux théoriques	
	UPLC	IClass	UPLC	IClass		UPLC	IClass	UPLC	IClass
His	4.29	$\frac{4.87}{x \ 1.14}$	26894	$\frac{36591}{X \ 1.36}$	Pro	12.91	$\frac{12.97}{x \ 1.00}$	192510	$\frac{177035}{x \ 0.92}$
Asn	4.05	$\frac{4.68}{x \ 1.16}$	40749	$\frac{46524}{X \ 1.14}$	AABA	17.15	$\frac{16.64}{x \ 0.97}$	220583	$\frac{195593}{x \ 0.89}$
Tau	5.21	$\frac{5.78}{x \ 1.11}$	64572	$\frac{62910}{X \ 0.97}$	Orn	5.76	$\frac{6.26}{x \ 1.09}$	362065	$\frac{327778}{x \ 0.91}$
Ser	5.23	$\frac{5.17}{0.99}$	69614	$\frac{66906}{0.96}$	Cys	10.98	$\frac{9.39}{x \ 0.86}$	464723	$\frac{358723}{x \ 0.77}$
Arg	1.18	$\frac{1.32}{x \ 1.12}$	69538	$\frac{78981}{X \ 1.14}$	Lys	2.99	Coélution	667231	Coélution
Gln	< 0.75	1.05	Non calculé	74643	Tyr	2.69		517250	
Gly	< 0.75	4.29	83919	$\frac{76767}{X \ 0.91}$	Met	4.30	$\frac{5.50}{x \ 1.28}$	539114	$\frac{311243}{x \ 0.58}$
Asp	5.92	$\frac{5.49}{x \ 0.93}$	96358	$\frac{87098}{X \ 0.90}$	Val	5.54	$\frac{6.22}{x \ 1.12}$	736157	$\frac{534069}{x \ 0.73}$
Glu	10.81	$\frac{11.16}{x \ 1.03}$	127079	$\frac{111662}{X \ 0.88}$	Ile	29.10	$\frac{28.68}{x \ 0.99}$	1242306	$\frac{1126228}{x \ 0.91}$
Thr	10.07	$\frac{10.51}{x \ 1.04}$	143732	$\frac{131445}{X \ 0.91}$	Leu	3.07	$\frac{3.06}{x \ 1.00}$	1226677	$\frac{1132421}{x \ 0.92}$
Ala	10.50	$\frac{10.11}{x \ 0.96}$	158337	$\frac{141359}{X \ 0.89}$	Phe	4.33	$\frac{3.61}{x \ 0.83}$	1218349	$\frac{1129399}{x \ 0.93}$
GABA	4.09	$\frac{3.94}{x \ 0.96}$	174484	$\frac{149201}{X \ 0.86}$	Trp	4.08	$\frac{3.39}{x \ 0.83}$	1328465	$\frac{1204686}{x \ 0.91}$

Tableau XIV : Coefficient de corrélation linéaire de la gamme d'étalonnage et coefficient de variation du temps de rétention, de l'aire et de la hauteur sur une répétabilité de 6 injections d'une solution à 1 nmol/mL pour l'ensemble des acides aminés.

Acide aminé	UPLC			HClass			IClass		
	Etalonnage	Répétabilité (%)		Etalonnage	Répétabilité (%)		Etalonnage	Répétabilité (%)	
	R ²	CV t _r	CV Aire	R ²	CV t _r	CV Aire	R ²	CV t _r	CV Aire
His	0.9997	0.22	0.53	0.9983	0.22	0.37	0.9996	0.12	0.43
Asn	0.9999	0.19	0.45	0.9974	0.21	0.08	0.9997	0.01	0.69
Tau	0.9997	0.15	0.48	0.9972	0.18	0.16	0.9995	0.07	0.12
Ser	0.9997	0.13	0.71	Coélution			0.9994	0.05	0.80
Arg	0.9999	0.13	1.10				0.9990	0.04	2.03
Gln	0.9997	0.13	1.14	0.9976	0.18	0.45	0.9994	0.05	1.71
Gly	0.9997	0.12	0.63	0.9972	0.13	0.39	0.9996	0.04	0.38
Asp	0.9990	0.11	1.20	0.9952	0.10	0.21	0.9990	0.03	0.14
Glu	0.9992	0.09	0.48	0.9956	0.09	0.26	0.9992	0.02	0.19
Thr	0.9997	0.07	0.49	0.9970	0.08	0.28	0.9996	0.01	0.16
Ala	0.9996	0.06	0.42	0.9967	0.07	0.35	0.9995	0.01	0.36
GABA	0.9994	0.06	0.48	0.9963	0.07	0.94	0.9987	0.01	0.38
Pro	0.9997	0.05	0.52	0.9971	0.05	0.38	0.9996	0.01	0.54
AABA	0.9997	0.04	0.53	0.9971	0.05	0.21	0.9996	0.01	0.26
Orn	0.9996	0.04	0.35	0.9971	0.05	0.32	0.9998	0.01	0.16
Cys	0.9997	0.03	1.15	0.9971	0.03	0.43	0.9997	0.01	0.35
Lys	0.9995	0.02	0.24	Coélution			Coélution		
Tyr	0.9972	0.04	0.38						
Met	0.9997	0.03	0.57	0.9981	0.03	0.21	0.9997	0.01	0.32
Val	0.9997	0.02	0.66	0.9977	0.03	0.15	0.9997	0.01	0.37
Ile	0.9997	0.01	0.58	0.9979	0.02	0.19	0.9998	0.00	0.29
Leu	0.9997	0.01	0.48	0.9981	0.02	0.27	0.9998	0.00	0.34
Phe	0.9997	0.01	0.42	0.9984	0.01	0.19	0.9998	0.00	0.30
Trp	0.9997	0.01	1.01	0.9984	0.01	0.21	0.9996	0.01	1.09

Détermination de l'influence du système de préchauffage :

Tableau XV : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour Ser, Arg, Lys et Tyr formant des coélution sur les systèmes HClass et IClass.

Acide aminé	UPLC			HClass			IClass		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
Tau (3)	64572	2.192	0.020	35174	1.580	0.020	62910	1.983	0.019
Ser (4)	69614	2.375	0.021	Coélution			66906	2.151	0.020
Arg (5)	69538	2.418	0.022				78981	2.193	0.018
Gln (6)		2.447		41738	1.830	0.021	74643	2.226	0.019
Cys (16)	464723	6.262	0.022	384268	5.680	0.022	358723	5.969	0.023
Lys (17)	667231	6.363	0.018	Coélution			Coélution		
Tyr (18)	517250	6.453	0.021						
Met (19)	539114	6.607	0.021	390985	5.982	0.023	311243	6.347	0.027

Tableau XVI : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour Ser, Arg, Lys et Tyr sur le système HClass suivant le mode d'utilisation du preheater.

Acide aminé	UPLC			HClass preheater actif			HClass preheater éteint			HClass preheater passif		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
Tau (3)	64572	2.192	0.020	35174	1.58	0.020	74845	2.423	0.021	63338	2.363	0.022
Ser (4)	69614	2.375	0.021	Coélution			Coélution			Coélution		
Arg (5)	69538	2.418	0.022									
Gln (6)		2.447		41738	1.83	0.021	78050	2.701	0.023	70041	2.624	0.023
Cys (16)	464723	6.262	0.022	384268	5.68	0.022	1227541	6.223	0.013	861246	6.132	0.016
Lys (17)	667231	6.363	0.018	Coélution			1275759	6.258	0.013	882464	6.174	0.015
Tyr (18)	517250	6.453	0.021				999877	6.524	0.015	689089	6.395	0.018
Met (19)	539114	6.607	0.021	390985	5.982	0.023	834417	6.598	0.017	600710	6.485	0.020

Tableau XVII : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour Ser, Arg, Lys et Tyr sur le système IClass suivant le mode d'utilisation du preheater.

Acide aminé	UPLC			IClass preheater actif			IClass preheater éteint			IClass preheater passif		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
Tau (3)	64572	2.192	0.020	62910	1.983	0.019	113284	2.819	0.020	96980	2.394	0.018
Ser (4)	69614	2.375	0.021	66906	2.151	0.020	Coélution			88640	2.592	0.020
Arg (5)	69538	2.418	0.022	78981	2.193	0.018				105648	2.620	0.019
Gln (6)		2.447		74643	2.226	0.019	130892	3.071	0.020	108406	2.651	0.019
Cys (16)	464723	6.262	0.022	358723	5.969	0.023	1281689	6.662	0.014	808979	6.426	0.017
Lys (17)	667231	6.363	0.018	Coélution			1339295	6.693	0.014	945520	6.489	0.016
Tyr (18)	517250	6.453	0.021				1076707	6.965	0.016	816578	6.681	0.017
Met (19)	539114	6.607	0.021	311243	6.347	0.027	919469	7.034	0.017	725161	6.785	0.019

Annexe 10 : Résultats obtenus pour l'étude des filtres UV et conservateurs

Détermination de la performance instrumentale sur une analyse :

Tableau XVIII : Récapitulatif des résultats obtenus sur UPLC, HClass et IClass des résolutions et des plateaux théoriques pour les filtres UV et conservateurs.

Nom	Code	Résolution			Plateaux théoriques		
		UPLC	HClass	IClass	UPLC	HClass	IClass
2-phénoxyéthanol	1				64275	45882 x 0.71	43971 x 0.68
Acide benzoïque	2	1.65	0.98 x 0.59	0.98 x 0.59	64953	45110 x 0.69	44161 x 0.68
Méthylparabène	3	2.70	2.31 x 0.86	2.23 x 0.83	70450	49267 x 0.70	49135 x 0.70
Propylparabène	4	36.68	31.90 x 0.87	32.16 x 0.88	152037	107598 x 0.71	114581 x 0.75
Oxybenzone	5	37.14	31.28 x 0.84	32.6 x 0.88	244999	169256 x 0.69	182983 x 0.75
Avobenzone	6	34.70	27.89 x 0.80	29.47 x 0.85	545267	381627 x 0.70	396974 x 0.73
Octinoxate	7	2.68	2.29 x 0.85	2.43 x 0.91	566730	399285 x 0.70	415103 x 0.73
Octisalate	8	3.33	2.66 x 0.80	2.83 x 0.85	559290	385914 x 0.69	407840 x 0.73

Tableau XIX : Coefficient de corrélation linéaire de la gamme d'étalonnage et coefficient de variation du temps de rétention, de l'aire et de la hauteur sur une répétabilité de 6 injections d'une solution à 10.0 µg/mL pour l'ensemble des filtres UV et conservateurs.

Code	UPLC			HClass			IClass		
	Etalonnage	Répétabilité (%)		Etalonnage	Répétabilité (%)		Etalonnage	Répétabilité (%)	
	R ²	CV t _r	CV Aire	R ²	CV t _r	CV Aire	R ²	CV t _r	CV Aire
1	0.9998	0.01	0.43	0.9992	0.06	0.50	0.9997	0.05	0.50
2	0.9997	0.01	0.53	0.9992	0.06	0.47	0.9998	0.05	0.60
3	0.9999	0.01	0.10	0.9994	0.06	0.12	0.9998	0.05	0.22
4	0.9999	0.01	0.10	0.9993	0.06	0.12	0.9998	0.03	0.22
5	0.9998	0.01	0.25	0.9994	0.03	0.19	0.9998	0.02	0.19
6	1.0000	0.00	0.16	0.9998	0.02	0.25	0.9999	0.02	0.26
7	0.9999	0.00	0.14	0.9994	0.02	0.06	0.9999	0.02	0.19
8	0.9999	0.00	0.23	0.9994	0.02	0.19	0.9999	0.02	0.33

Détermination de l'influence du système de préchauffage :

Tableau XX : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour les filtres UV et les conservateurs sur les systèmes HClass et IClass.

Nom	UPLC			HClass			IClass		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
2-phénoxyéthanol (1)	64275	1.748	0.016	45882	1.690	0.019	43971	1.677	0.019
Acide benzoïque (2)	64953	1.794	0.017	45110	1.721	0.019	44161	1.709	0.019
Méthylparabène (3)	70450	1.870	0.017	49267	1.796	0.019	49135	1.780	0.019
Propylparabène (4)	152037	2.936	0.018	107598	2.867	0.021	114581	2.832	0.020
Oxybenzone (5)	244999	4.109	0.020	169256	4.022	0.023	182983	3.982	0.022
Avobenzone (6)	545267	5.802	0.018	381627	5.698	0.022	396974	5.667	0.021
Octinoxate (7)	566730	5.886	0.018	399285	5.781	0.022	415103	5.754	0.021
Octisalate (8)	559290	5.991	0.019	385914	5.880	0.022	407840	5.856	0.022

Tableau XXI : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour les filtres UV et les conservateurs sur le système IClass suivant le mode d'utilisation du preheater.

Nom	UPLC			IClass preheater actif			IClass preheater passif			IClass preheater absent		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
2-phénoxyéthanol (1)	64275	1.748	0.016	43971	1.677	0.019	85316	1.894	0.015	82520	1.767	0.014
Acide benzoïque (2)	64953	1.794	0.017	44161	1.709	0.019	93737	1.961	0.015	88467	1.825	0.014
Méthylparabène (3)	70450	1.870	0.017	49135	1.780	0.019	102475	2.036	0.015	96839	1.900	0.014
Propylparabène (4)	152037	2.936	0.018	114581	2.832	0.020	226773	3.091	0.015	204494	2.957	0.015
Oxybenzone (5)	244999	4.109	0.020	182983	3.982	0.022	362803	4.247	0.017	320943	4.134	0.017
Avobenzone (6)	545267	5.802	0.018	396974	5.667	0.021	625659	5.868	0.017	671536	5.842	0.017
Octinoxate (7)	566730	5.886	0.018	415103	5.754	0.021	635778	5.948	0.018	687936	5.924	0.017
Octisalate (8)	559290	5.991	0.019	407840	5.856	0.022	635014	6.059	0.018	684922	6.033	0.017

Annexe 11 : Résultats obtenus pour l'étude des esters d'alkyle d'acides sulfoniques

Détermination de la performance instrumentale sur une analyse :

Tableau XXII : Récapitulatif des résultats obtenus sur UPLC, HClass et IClass des résolutions et des plateaux théoriques pour les esters d'alkyl d'acides sulfoniques.

Nom	Code	Résolution			Plateaux théoriques		
		UPLC	HClass	IClass	UPLC	HClass	IClass
Acide benzènesulfonique	BA				2657	3344	5339
						x 1.26	x 2.01
Acide p-toluènesulfonique	TA	7.20	6.40	9.76	4900	5020	10217
			x 0.89	x 1.36		x 1.02	x 2.09
Méthyle benzènesulfonate	MBS	24.28	22.36	31.66	21327	16541	31873
			x 0.92	x 1.30		x 0.78	x 1.49
Ethyle benzènesulfonate	EBS	10.53	10.37	14.16	27835	24471	48077
			x 0.98	x 1.34		x 0.88	x 1.73
Méthyle p-toluènesulfonate	MTS	2.75	2.58	3.52	34209	26264	52415
			x 0.94	x 1.28		x 0.77	x 1.53
Ethyle p-toluènesulfonate	ETS	8.96	8.71	11.88	47621	37276	71963
			x 0.97	x 1.33		x 0.78	x 1.51

Tableau XXIII : Coefficient de corrélation linéaire de la gamme d'étalonnage et coefficient de variation du temps de rétention, de l'aire et de la hauteur sur une répétabilité de 6 injections d'une solution à 1 ppm pour l'ensemble des esters d'alkyle d'acides sulfoniques.

Code	UPLC			HClass			IClass		
	Etalonnage	Répétabilité (%)		Etalonnage	Répétabilité (%)		Etalonnage	Répétabilité (%)	
	R ²	CV t _r	CV Aire	R ²	CV t _r	CV Aire	R ²	CV t _r	CV Aire
BA	0.9989	0.04	0.22	0.9994	0.16	0.20	0.9920	0.10	0.38
TA	0.9994	0.03	0.10	0.9994	0.12	0.08	0.9940	0.10	0.28
MBS	0.9996	0.04	0.33	0.9996	0.10	0.45	0.9930	0.03	0.86
EBS	0.9997	0.04	0.79	0.9997	0.09	0.34	0.9961	0.03	0.31
MTS	1.0000	0.05	0.31	1.0000	0.08	0.23	0.9965	0.02	0.59
ETS	0.9885	0.04	0.30	0.9888	0.07	0.29	0.9871	0.02	0.82

Détermination de l'influence du système de préchauffage :

Tableau XXIV : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour les esters d'alkyles d'acides sulfoniques sur les systèmes HClass et IClass.

Code	UPLC			HClass			IClass		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
BA	2657	0.331	0.015	3344	0.318	0.013	5339	0.308	0.010
TA	4900	0.533	0.018	5020	0.474	0.016	10217	0.483	0.011
MBS	21327	1.348	0.022	16541	1.182	0.022	31873	1.215	0.016
EBS	27835	1.764	0.025	24471	1.582	0.024	48077	1.615	0.017
MTS	34209	1.878	0.024	26264	1.687	0.025	52415	1.719	0.018
ETS	47621	2.243	0.024	37276	2.053	0.025	71963	2.081	0.018

Tableau XXV : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour les esters d'alkyles d'acides sulfoniques sur le système HClass suivant le mode d'utilisation du preheater.

Code	UPLC			HClass preheater actif			HClass preheater éteint			HClass preheater passif		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
BA	2657	0.331	0.015	3344	0.318	0.013	4017	0.336	0.012	3399	0.336	0.014
TA	4900	0.533	0.018	5020	0.474	0.016	7093	0.523	0.015	6000	0.519	0.016
MBS	21327	1.348	0.022	16541	1.182	0.022	29862	1.316	0.018	24771	1.301	0.019
EBS	27835	1.764	0.025	24471	1.582	0.024	46584	1.730	0.019	37991	1.713	0.021
MTS	34209	1.878	0.024	26264	1.687	0.025	52082	1.848	0.019	41796	1.832	0.021
ETS	47621	2.243	0.024	37276	2.053	0.025	73462	2.212	0.019	59112	2.196	0.021

Tableau XXVI : Etude de la variation du nombre de plateaux théoriques pour les esters d'alkyles d'acides sulfoniques sur le système IClass suivant le mode d'utilisation du preheater.

Code	UPLC			IClass preheater actif			IClass preheater éteint			IClass preheater passif		
	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)	N _{th}	t _r (min)	w _{1/2} (min)
BA	2657	0.331	0.015	5339	0.308	0.010	5060	0.338	0.011	3567	0.334	0.013
TA	4900	0.533	0.018	10217	0.483	0.011	11545	0.559	0.012	8522	0.540	0.014
MBS	21327	1.348	0.022	31873	1.215	0.016	40177	1.404	0.016	30360	1.347	0.018
EBS	27835	1.764	0.025	48077	1.615	0.017	62830	1.818	0.017	45994	1.759	0.019
MTS	34209	1.878	0.024	52415	1.719	0.018	71730	1.939	0.017	51684	1.875	0.019
ETS	47621	2.243	0.024	71963	2.081	0.018	97221	2.293	0.017	72419	2.234	0.020

Annexe 12 : Test de Grubbs

Pour éliminer une valeur d'une série de résultat, deux possibilités sont envisageables. Si l'on connaît une cause (erreur de lecture, faute de calcul, etc.) expliquant cette valeur, on peut éliminer cette valeur. Dans le cas contraire, il faut avoir recours à un test statistique permettant de justifier l'élimination de la valeur aberrante avec une valeur α de se tromper.

Ce test doit être appliqué à des séries contenant un nombre de valeurs strictement supérieur à 25. Il permet de tester les valeurs extrêmes d'une série de résultat. Le test est basé sur la différence entre la moyenne de la série et la valeur extrême testée considérant l'écart type.

Le rapport critique T est calculé de la façon suivante :

$$T_{max} = \frac{x_n - \bar{x}}{s} \quad \text{ou} \quad T_{min} = \frac{\bar{x} - x_1}{s} \quad (26)$$

où x_n et x_1 sont les valeurs testées, \bar{x} la moyenne de la série et s l'écart type de la série [39-40].

Une fois le rapport calculé, on lit dans la table de Grubbs la valeur de T_{table} pour un risque α de 5 % et 1 %.

En appliquant ce test, si $T > T_{table}$ à un niveau de risque de 5 %, on déclare la valeur suspect. Si le test est toujours significatif au niveau de risque de 1 %, on déclare la valeur aberrante.

Annexe 13 : Test de Shapiro-Wilk

Afin de déterminer si une série de données provient d'une population caractérisée par une distribution normale, nous appliquons à chaque série de données un test de Shapiro-Wilk. Le nombre de mesure doit être compris entre 10 et 50. On calcule un rapport critique W pour une série de résultats ordonnés par ordre croissant :

$$W = \frac{\sum_{i=1}^n a_i d_i}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (27)$$

où d_i est la différence entre deux valeurs extrêmes de la série ($d_1 = x_n - x_1$, $d_2 = x_{n-1} - x_2$, $d_i = x_{n-i+1} - x_i$), a_i un coefficient lu dans la table des coefficients du test de Shapiro-Wilk, le numérateur correspond à la somme des carrés des écarts à la moyenne.

Une fois le rapport calculé, on lit dans la table des valeurs critiques du test de Shapiro-Wilk la valeur de W_{table} pour un risque α donné.

On émet deux hypothèses :

- H_0 : si $W > W_{\text{table}}$, les valeurs observées suivent une distribution normale au risque α considéré.
- H_1 : si $W < W_{\text{table}}$, les valeurs observées ne suivent pas une distribution normale au risque α considéré.

Annexe 14 : Coefficient d'asymétrie de Fisher

Ce test permet de déterminer statistiquement le caractère asymétrique de la distribution.

On estime un coefficient b_1 par la formule :

$$b_1 = \frac{|m_3|}{\sqrt{(m_2)^3}} \quad (29)$$

Où l'on détermine les facteurs m_2 et m_3 par les relations suivantes :

$$m_2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n} \quad \text{et} \quad m_3 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^3}{n} \quad (30)$$

Si la distribution suit rigoureusement une loi normale, b_1 est égal à 0.

Si la distribution est à asymétrie négative, avec un étalement à gauche, $b_1 < 0$.

Si la distribution est à asymétrie positive, avec un étalement à droite, $b_1 > 0$ [42-43].

Annexe 15 : Coefficient d'aplatissement de Pearson

Ce test permet de déterminer statistiquement le caractère aplati de la distribution.

On estime un coefficient b_2 par la formule :

$$b_1 = \frac{m_4}{\sqrt{(m_2)^3}} \quad (31)$$

Où l'on détermine les facteurs m_2 et m_4 par les relations suivantes :

$$m_2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n} \text{ et } m_4 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^4}{n} \quad (30)$$

Si la distribution suit rigoureusement une loi normale, b_2 est égal à 3.

Si la distribution est aplatie, $b_2 < 3$.

Si la distribution est pointue, $b_2 > 3$ [42-43].

Annexe 16 : Test de Fischer

Ce test permet de comparer statistiquement deux variances pour un risque α donné.

On émet deux hypothèses :

- H_0 : les deux variances sont égales au risque α considéré.
- H_1 : les deux variances ne sont pas égales au risque α considéré.

On estime les variances des séries 1 et 2 par la formule suivante :

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (31)$$

On calcule le degré de liberté v pour chaque série par $v = n - 1$.

On détermine le rapport des variances s_1^2/s_2^2 sachant que $s_1^2 > s_2^2$.

On évalue la valeur tabulée $F_{\alpha/2, v_1, v_2}$ dans la table de Fischer correspondante.

Si $s_1^2/s_2^2 < F_{\alpha/2, v_1, v_2}$, alors H_0 est accepté au risque α considéré.

Si $s_1^2/s_2^2 > F_{\alpha/2, v_1, v_2}$, alors H_0 est rejeté au risque α considéré [44].

Annexe 17 : Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance permet de comparer les moyennes de séries de résultats à la moyenne globale des résultats et de refléter les différences à travers une analyse de variabilité. Elle permet de tester l'égalité des moyennes des séries de résultats. Cette analyse n'est applicable que si les données des séries sont distribuées normalement, et que les variances sont significativement identiques [45].

La Figure 53 [45] présente la disposition des séries de résultats.

	Echantillon 1	Echantillon 2	//	Echantillon i	Echantillon r
Valeurs de la variable	x_{11}	x_{21}	//	x_{i1}	x_{r1}
	x_{12}	x_{22}	//	x_{i2}	x_{r2}
	x_{13}	x_{23}	//	x_{i3}	x_{r3}
	x_{1j}	x_{2j}	//	x_{ij}	x_{rj}
	x_{1N1}	x_{2N2}	//	x_{iNi}	x_{rNr}
Taille des échantillons	N_1	N_2	//	N_i	N_r
Moyenne	\bar{x}_1	\bar{x}_2	//	\bar{x}_i	\bar{x}_r

Figure 53 : Disposition des séries de résultats soumises à une analyse de la variance.

On émet deux hypothèses :

- H_0 : les moyennes sont significativement égales au risque α considéré.
- H_1 : les moyennes ne sont pas toutes égales au risque α considéré.

On calcule les écarts quadratiques Q_{total} , $Q_{résiduel}$ et $Q_{facteur}$, ainsi que les variances correspondantes avec les degrés de liberté comme le montre le Tableau XXVII [45].

Tableau XXVII : Formules de calcul des écarts quadratiques et des variances correspondantes.

Ecart quadratique	Degré de liberté	Variance
$Q_{total} = \sum x_{ij}^2 - N\bar{x}^2$	$N - 1$	$V_{total} = \frac{Q_{total}}{N - 1}$
$Q_{facteur} = \sum N_i \bar{x}_i^2 - N\bar{x}^2$	$r - 1$	$V_{facteur} = \frac{Q_{facteur}}{r - 1}$
$Q_{résiduel} = Q_{total} - Q_{facteur}$	$N - r$	$V_{résiduel} = \frac{Q_{résiduel}}{N - r}$

Nous pouvons ainsi déterminer le coefficient F par la formule ci-dessous :

$$F = \frac{V_{facteur}}{V_{résiduel}} \quad (30)$$

On compare ensuite ce facteur à la valeur critique $F_{(r-1),(N-r)}$ de la table de Snedecor Fischer.

Si $F < F_{(r-1),(N-r)}$, H_0 est acceptée. A l'inverse si $F > F_{(r-1),(N-r)}$, H_0 est rejetée.

Annexe 18 : Test de Bonferroni

Le test de Bonferroni permet de comparer les moyennes de séries deux à deux. Ce test peut être un complément de l'analyse de la variance si l'hypothèse nulle est rejetée, car il permet de déterminer le ou les séries ayant une moyenne significativement différentes des autres.

Le nombre de comparaisons c est égale au nombre de possibilités de comparer la totalité n des moyennes deux à deux et se détermine par la formule suivante :

$$c = \frac{n!}{(n-2)!2!} \quad (31)$$

On définit un intervalle (a,b) tel que :

$$(a, b) = (\bar{x}_i - \bar{x}_j) \pm t_{(\alpha/2c),v} \times s \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}} \quad (32)$$

où \bar{x}_i et \bar{x}_j sont les moyennes des deux séries à comparer, t un coefficient critique dérivé de la loi de Student, α le degré de confiance, c le nombre total de comparaisons possibles, s la variance intra-série (résiduelle dans ANOVA), n_i et n_j le nombre de résultats dans les séries i et j et v le degré de liberté intra-série (résiduelle dans ANOVA).

Si la valeur zéro est comprise dans l'intervalle, les deux moyennes ne sont pas significativement différentes au risque α considéré. Si ce n'est pas le cas, les deux moyennes sont significativement différentes au risque α considéré [46].

Annexe 19 : Résultats servant à la comparaison des détecteurs UV

Tableau XXVIII : Résultats obtenus lors de la comparaison de sensibilité des détecteurs UV avec les acides aminés, les filtres UV et conservateurs et les esters d'alkyle d'acides sulfoniques.

Nom	Série S4		Série S5		Série S6	
	PDA eλ	PDA	PDA eλ	TUV	PDA	TUV
Asparagine	7.1	$\frac{12.3}{x \ 1.73}$	7.1	$\frac{28.1}{x \ 3.96}$	12.3	$\frac{28.1}{x \ 2.28}$
Serine	2.6	$\frac{7.3}{x \ 2.81}$	2.6	$\frac{16.9}{x \ 6.50}$	7.3	$\frac{16.9}{x \ 2.32}$
Glutamine	7.2	$\frac{14.1}{x \ 1.96}$	7.2	$\frac{32.0}{x \ 4.44}$	14.1	$\frac{32.0}{x \ 2.27}$
Acide aspartique	3.3	$\frac{5.9}{x \ 1.79}$	3.3	$\frac{14.2}{x \ 4.30}$	5.9	$\frac{14.2}{x \ 2.41}$
Thréonine	2.3	$\frac{4.0}{x \ 1.74}$	2.3	$\frac{9.3}{x \ 4.04}$	4.0	$\frac{9.3}{x \ 2.33}$
γ-aminobutyrique	7.2	$\frac{14.7}{x \ 2.04}$	7.2	$\frac{32.3}{x \ 4.49}$	14.7	$\frac{32.3}{x \ 2.20}$
α-aminobutyrique	5.9	$\frac{12.9}{x \ 2.19}$	5.9	$\frac{28.9}{x \ 4.90}$	12.9	$\frac{28.9}{x \ 2.24}$
Cystéine	1.9	$\frac{3.4}{x \ 1.79}$	1.9	$\frac{8.5}{x \ 4.47}$	3.4	$\frac{8.5}{x \ 2.50}$
Tyrosine	2.3	$\frac{4.8}{x \ 2.09}$	2.3	$\frac{10.3}{x \ 4.48}$	4.8	$\frac{10.3}{x \ 2.15}$
Valine	2.5	$\frac{4.4}{x \ 1.76}$	2.5	$\frac{8.3}{x \ 3.32}$	4.4	$\frac{8.3}{x \ 1.89}$
Leucine	5.0	$\frac{8.5}{x \ 1.70}$	5.0	$\frac{13.0}{x \ 2.60}$	8.5	$\frac{13.0}{x \ 1.53}$
Tryptophane	11.9	$\frac{27.1}{x \ 2.28}$	11.9	$\frac{60.6}{x \ 5.09}$	27.1	$\frac{60.6}{x \ 2.24}$
2-phénoxyéthanol	12.7	$\frac{15.8}{x \ 1.24}$	12.7	$\frac{30.9}{x \ 2.43}$	15.8	$\frac{30.9}{x \ 1.96}$
Propylparabène	10.4	$\frac{16.6}{x \ 1.60}$	10.4	$\frac{21.9}{x \ 2.11}$	16.6	$\frac{21.9}{x \ 1.32}$
Oxybenzone	10.9	$\frac{16.8}{x \ 1.54}$	10.9	$\frac{24.1}{x \ 2.21}$	16.8	$\frac{24.1}{x \ 1.43}$
Octinoxate	11.0	$\frac{10.2}{x \ 0.93}$	11.0	$\frac{29.6}{x \ 2.69}$	10.2	$\frac{29.6}{x \ 2.90}$
Acide p-toluènesulfonique	10.6	$\frac{21.4}{x \ 2.02}$	10.6	$\frac{27.5}{x \ 2.58}$	21.4	$\frac{27.5}{x \ 1.28}$
Ethyle benzènesulfonate	10.0	$\frac{15.6}{x \ 1.55}$	10.0	$\frac{18.6}{x \ 1.85}$	15.6	$\frac{18.6}{x \ 1.19}$
Ethyle p-toluènesulfonate	11.4	$\frac{16.6}{x \ 1.46}$	11.4	$\frac{21.1}{x \ 1.86}$	16.6	$\frac{21.1}{x \ 1.27}$

Annexe 20 : Test de Dixon

Le test de Dixon définit comment déterminer le caractère aberrant d'une valeur dans une série de données. On compare l'étendue entre la valeur à tester et une valeur proche avec l'étendue entre la valeur à tester et une valeur très éloignée (égale ou proche de l'étendue totale suivant le cas). Les données à prendre en compte diffèrent selon la taille et le nombre de valeurs de la série. On teste la valeur minimale et la valeur maximale. En cas de mise en évidence d'une valeur aberrante, recommencer le test avec la nouvelle série. Le nombre de valeurs de la série doit être inférieur ou égal à 25.

On classe les valeurs observées par ordre croissant ($x'_1 < x'_2 < \dots < x'_n$).

On applique ensuite les formules suivantes selon notre cas :

↳ Test de la valeur inférieure

$$\text{Pour } 4 \leq n \leq 7 \text{ calculer } r_{10} = \frac{x'_2 - x'_1}{x'_n - x'_1}.$$

$$\text{Pour } 8 \leq n \leq 10 \text{ calculer } r_{11} = \frac{x'_2 - x'_1}{x'_{n-1} - x'_1}.$$

$$\text{Pour } 11 \leq n \leq 13 \text{ calculer } r_{21} = \frac{x'_3 - x'_1}{x'_{n-1} - x'_1}.$$

$$\text{Pour } 14 \leq n \leq 25 \text{ calculer } r_{22} = \frac{x'_3 - x'_1}{x'_{n-2} - x'_1}.$$

↳ Test de la valeur supérieure

$$\text{Pour } 4 \leq n \leq 7 \text{ calculer } r_{10} = \frac{x'_n - x'_{n-1}}{x'_n - x'_1}.$$

$$\text{Pour } 8 \leq n \leq 10 \text{ calculer } r_{11} = \frac{x'_n - x'_{n-1}}{x'_n - x'_2}.$$

$$\text{Pour } 11 \leq n \leq 13 \text{ calculer } r_{21} = \frac{x'_n - x'_{n-2}}{x'_n - x'_2}.$$

$$\text{Pour } 14 \leq n \leq 22 \text{ calculer } r_{22} = \frac{x'_n - x'_{n-2}}{x'_n - x'_3}.$$

Une fois les rapports calculés, on lit dans la table de Dixon la valeur de r_{table} [47].

Si $r_{max} > r_{table}$, alors la valeur testée est significativement aberrante au risque de se tromper de 1% (niveau de confiance P de 99%). Cette valeur sera écartée de l'analyse.

Si $r_{max} < r_{table}$, alors la valeur testée n'est pas significativement aberrante au risque de se tromper de 1% (niveau de confiance P de 99%). Cette valeur sera conservée lors de l'analyse statistique.

Annexe 21 : Résultats de l'analyse des pesticides

Comparaison entre le SQD 2 et le Xevo TQD :

Tableau XXIX : Résultats obtenus lors de l'étude de comparaison du SQD 2 et du Xevo TQD avec une solution standard à 100 ppb.

Nom	Série S7		Série S8		Série S9		Série S10	
	SQD 2	XEVO TQD	SQD 2	XEVO TQD	SQD 2		FS	SIR
	FS	FS	SIR	SIR	FS	SIR	FS	SIR
Methamidophos	896.6	$\frac{299.7}{x \ 0.33}$	1573.4	$\frac{1414.9}{x \ 0.90}$	896.6	$\frac{1573.4}{x \ 1.75}$	299.7	$\frac{1414.9}{x \ 4.72}$
Piclorame	29.0	$\frac{11.0}{x \ 0.38}$	111.9	$\frac{62.2}{x \ 0.56}$	29.0	$\frac{111.9}{x \ 3.86}$	11.0	$\frac{62.2}{x \ 5.65}$
Méthomyl	39.5	$\frac{8.9}{x \ 0.23}$	959.1	$\frac{286.9}{x \ 0.30}$	39.5	$\frac{959.1}{x \ 24.28}$	8.9	$\frac{286.9}{x \ 32.23}$
Imidaclopride	244.1	$\frac{113.0}{x \ 0.46}$	543.0	$\frac{645.0}{x \ 1.19}$	244.1	$\frac{543.0}{x \ 2.22}$	113.0	$\frac{645.0}{x \ 5.71}$
Diméthoate	584.7	$\frac{115.1}{x \ 0.20}$	1341.8	$\frac{582.5}{x \ 0.43}$	584.7	$\frac{1341.8}{x \ 2.29}$	115.1	$\frac{582.5}{x \ 5.06}$
Carbendazime	147.6	$\frac{63.1}{x \ 0.43}$	334.3	$\frac{315.2}{x \ 0.94}$	147.6	$\frac{334.3}{x \ 2.26}$	63.1	$\frac{315.2}{x \ 4.99}$
2,4 D	19.3	$\frac{4.9}{x \ 0.25}$	111.5	$\frac{24.5}{x \ 0.22}$	19.3	$\frac{111.5}{x \ 5.78}$	4.9	$\frac{24.5}{x \ 5.00}$
Carbofurane	536.4	$\frac{139.3}{x \ 0.26}$	1503.3	$\frac{844.1}{x \ 0.56}$	536.4	$\frac{1503.3}{x \ 2.80}$	139.3	$\frac{844.1}{x \ 6.06}$
Atrazine	551.1	$\frac{103.4}{x \ 0.19}$	1792.3	$\frac{515.5}{x \ 0.29}$	551.1	$\frac{1792.3}{x \ 3.25}$	103.4	$\frac{515.5}{x \ 4.99}$
Diuron	304.0	$\frac{79.7}{x \ 0.26}$	593.0	$\frac{220.8}{x \ 0.37}$	304.0	$\frac{593.0}{x \ 1.95}$	79.7	$\frac{220.8}{x \ 2.77}$
Amétryne	494.0	$\frac{224.8}{x \ 0.46}$	955.5	$\frac{458.9}{x \ 0.48}$	494.0	$\frac{955.5}{x \ 1.93}$	224.8	$\frac{458.9}{x \ 2.04}$
Parathion-méthyle	6.0	$\frac{3.7}{x \ 0.61}$	43.0	$\frac{57.7}{x \ 1.34}$	6.0	$\frac{43.0}{x \ 7.17}$	3.7	$\frac{57.7}{x \ 15.74}$
Propanil	221.5	$\frac{57.2}{x \ 0.26}$	691.0	$\frac{297.8}{x \ 0.43}$	221.5	$\frac{691.0}{x \ 3.12}$	57.2	$\frac{297.8}{x \ 5.20}$
Malathion	647.9	$\frac{114.9}{x \ 0.18}$	804.9	$\frac{552.4}{x \ 0.69}$	647.9	$\frac{804.9}{x \ 1.24}$	114.9	$\frac{552.4}{x \ 4.81}$
Terbutryne	1198.3	$\frac{267.3}{x \ 0.22}$	939.9	$\frac{669.7}{x \ 0.71}$	1198.3	$\frac{939.9}{x \ 0.78}$	267.3	$\frac{669.7}{x \ 2.51}$
Propiconazole	158.0	$\frac{141.5}{x \ 0.90}$	636.8	$\frac{354.8}{x \ 0.56}$	158.0	$\frac{636.8}{x \ 4.03}$	141.5	$\frac{354.8}{x \ 2.51}$
Pirimiphos-méthyle	577.7	$\frac{230.0}{x \ 0.40}$	978.5	$\frac{868.8}{x \ 0.89}$	577.7	$\frac{978.5}{x \ 1.69}$	230.0	$\frac{868.8}{x \ 3.78}$
Butachlore	18.0	$\frac{10.6}{x \ 0.59}$	97.5	$\frac{49.9}{x \ 0.51}$	18.0	$\frac{97.5}{x \ 5.42}$	10.6	$\frac{49.9}{x \ 4.70}$
Chlorpyrifos	76.2	$\frac{38.4}{x \ 0.50}$	433.8	$\frac{347.1}{x \ 0.80}$	76.2	$\frac{433.8}{x \ 5.70}$	38.4	$\frac{347.1}{x \ 9.05}$
Pendiméthaline	25.9	$\frac{17.2}{x \ 0.67}$	194.9	$\frac{145.3}{x \ 0.75}$	25.9	$\frac{194.9}{x \ 7.53}$	17.2	$\frac{145.3}{x \ 8.43}$

Comparaison entre le Xevo TQD et le Xevo TQ-S :

Tableau XXX : Résultats obtenus lors de l'étude de comparaison du Xevo TQD et du Xevo TQ-S avec une solution standard à 1000 ppt.

Nom	Série S11	
	XEVO TQD	XEVO TQ-S
	MRM	MRM
Methamidophos	465.0	1895.0 x 4.1
Piclorame	207.3	830.0 x 4.0
Méthomyl	171.3	259.3 x 1.5
Imidaclopride	546.3	5771.7 x 10.6
Diméthoate	171.7	2554.0 x 14.9
Carbendazime	29.7	451.0 x 15.2
2,4 D	15.0	206.7 x 13.8
Carbofurane	259.0	2190.7 x 8.5
Atrazine	194.7	3595.0 x 18.5
Diuron	109.3	2279.3 x 20.8
Amétryne	150.0	4146.3 x 27.6
Parathion-méthyle	150.3	1021.0 x 6.8
Propanil	75.3	507.3 x 6.7
Malathion	327.7	2423.7 x 7.4
Terbutryne	200.7	2359.0 x 11.8
Propiconazole	88.7	1664.7 x 18.8
Pirimiphos-méthyle	184.0	750.3 x 4.1
Butachlore	25.3	292.3 x 11.5
Chlorpyrifos	197.3	1983.7 x 10.1
Pendiméthaline	24.7	306.0 x 12.4

Annexe 22 : Test de Student

Ce test permet de comparer statistiquement deux moyennes pour un risque α donné, issues de deux séries de valeurs de variances significativement égales.

On émet deux hypothèses :

H_0 : les deux moyennes sont égales au risque α considéré.

H_1 : les deux moyennes ne sont pas égales au risque α considéré.

Si n_1 et $n_2 < 30$, on procède de la façon suivante :

On estime les moyennes \bar{x}_1 et \bar{x}_2 , ainsi que les variances s_1^2 et s_2^2 des deux séries.

On calcule un écart type commun de la façon suivante :

$$s_{comb} = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad (33)$$

On calcule une valeur pondérée :

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{comb} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (34)$$

Avec un degré de liberté $v = n_1 + n_2 - 2$, on lit dans la table de Student la valeur $t_{\alpha/2, v}$

Si $t_{exp} < t_{\alpha/2, v}$, H_0 est acceptée, à l'inverse H_0 est rejetée.

Si n_1 et $n_2 > 30$, on procède de la façon suivante :

On calcule un rapport critique u de la façon suivante :

$$u = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (35)$$

On lit dans la table de Student la valeur $u_{\alpha/2}$.

Si $u < u_{\alpha/2}$, H_0 est acceptée, à l'inverse H_0 est rejetée [44 - 45].

Bibliographie

- [1] Wikipedia. In Mikhail Semenovitch Tswett. *Site de Wikipedia*, [En ligne]. http://fr.wikipedia.org/wiki/Mikhail_Semenovitch_Tswett (page consulté le 29 septembre 2011).
- [2] Faculté des Sciences d'Orsay. In Cours de chromatographie, Généralités sur la chromatographie. *Site de la Faculté des Sciences d'Orsay*, [En ligne]. <http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/Generalites%20chromato.html> (page consulté le 29 septembre 2011).
- [3] Waters Corporation. The history of Jim Waters and Waters Corporations, 1958-Present. *Waters Corporation*, 1-7, (2008).
- [4] F. Rouessac et A. Rouessac. Chromatographie liquide haute performance. In F. Rouessac et A. Rouessac (Ed), *Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes* (6^e édition), pp. 36-60, Paris : Dunod, 2004.
- [5] F. Colomb. In HPLC Principe et appareillage. *Site de Biotechnologies - Rouen* [En ligne]. <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9> (page consulté le 26 septembre 2011).
- [6] Waters Corporation. Waters Quality Parts®, Chromatography Columns and Supplies Catalog 2011/2012. *Waters Corporation*, 1-360, (2011).
- [7] Faculté des Sciences d'Orsay. In Cours de chromatographie. Théorie de la chromatographie (2). *Site de la Faculté des Sciences d'Orsay* [En ligne]. <http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/theoriechromato2.html> (page consulté le 30 septembre 2011).
- [8] A. De Villiers *et al.* Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations. *Journal of Chromatography A*, **1127**, 60-69, (2006).
- [9] Y. Xiang *et al.* Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography A*, **1104**, 198-202, (2006).
- [10] Wikipedia. In File : Van-deemter.jpg. *Site de Wikipedia* [En ligne]. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Van-deemter.jpg> (page consulté le 30 septembre 2011).
- [11] Waters Corporation. ACQUITY UPLC Column Solutions. *Waters Corporation*, 1-42, (2009).
- [12] L. Nováková *et al.* Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, **68**, 908-918, (2005).
- [13] V.G. Dongre *et al.* Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**, 236-242, (2008).
- [14] D. Di Benedetto et P. Breuil. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible. *Techniques de l'ingénieur*, **P 2795**, 1-20, (2007).
- [15] Waters Corporation. ACQUITY UPLC TUV Detector. Operator's Overview and Maintenance Guide. Revision A. *Waters Corporation*, 1-100, (2010).

- [16] Waters Corporation. ACQUITY UPLC Photodiode Array and eλPhotodiode Array Detector. Operator's Overview and Maintenance Guide. Revision A. *Waters Corporation*, 1-124, (2010).
- [17] G. Bouchoux et M. Sablier. Spectrométrie de masse. Principe et appareillage. *Techniques de l'ingénieur*, **P 2645**, 1-32, (2005).
- [18] Waters Corporation. LC/MS School. *Waters Corporation*, 1-947, (2011).
- [19] E. De Hoffmann et V. Stroobant. Mass Analysers. Quadrupole Analysers. In E. De Hoffmann et V. Stroobant (Ed). *Mass spectrometry. Principles and Applications* (3^e édition), pp. 88-100, Angleterre: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- [20] W. Liming *et al.* Fast determination of 26 amino acids and their content changes in royal jelly during storage using ultra-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 242-249, (2009).
- [21] Waters Corporation. UPLC Amino Acid Analysis Solution System Guide. Revision B. *Waters Corporation*, 1-152, (2007).
- [22] P.J. Lee *et al.* Acquity UPLC/PDA: UV filters agents and preservatives. *Waters Application Note*, 1-6, (2006).
- [23] P. Alden et M. Jones. Analysis of Benzenesulfonic Acid and P-Toluenesulfonic Acid Esters in Genotox Monitoring using UPLC[®]/UV-MS. Waters. *Application Note*, 1-10, (2010).
- [24] A.M. Botero-Coy *et al.* Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **402 (7)**, 2287-2300, (2012)
- [25] Waters Corporation. ACQUITY UPLC System. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-4, (2007).
- [26] Waters Corporation. ACQUITY UPLC H-Class System. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-5, (2010).
- [27] Waters Corporation. ACQUITY UPLC I-Class System. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-5, (2011).
- [28] Waters Corporation. ACQUITY UPLC TUV Detector. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-2, (2010).
- [29] Waters Corporation. ACQUITY UPLC PDA Detector. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-2, (2010).
- [30] Waters Corporation. ACQUITY UPLC PDA eλ Detector. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-2, (2010).
- [31] Waters Corporation. Waters SQ Detector 2. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-3, (2011).
- [32] Waters Corporation. Waters Xevo TQD. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-3, (2011).
- [33] Waters Corporation. Waters Xevo TQ MS. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-3, (2011).
- [34] Waters Corporation. Waters Xevo TQ-S. Instrument Specifications. *Waters Corporation*, 1-4, (2011).

- [35] Waters Corporation. Waters Xevo TQ-S brochure. Step up to the challenge with a step change in sensitivity. *Waters Corporation*, 1-14, (2010).
- [36] Waters Corporation. Using innovation to redefine routine analysis. Introducing the Xevo TQD. *Waters Corporation*, 1-28, (2011).
- [37] Waters Corporation. Waters Xevo TQ-S ACQUITY UPLC System. Customer Familiarization Guide. Revision A. *Waters Corporation*, 1-52, (2010).
- [38] Waters Corporation. AMDS Method transfer series instrument-to-instrument. Dwell Volume differences. Technical Note. *Waters Technical Note*, 1-4, (2003).
- [39] Sedimentology and Environmental Geology. In Grubbs test. *Site Sedimentology and Environmental Geology*, [En ligne]. <http://www.sediment.uni-goettingen.de/staff/dunkl/software/pep-grubbs.pdf> (page consulté le 16 février 2012).
- [40] F.E. Grubbs. Procedures for Detecting Outlying Observations in Sample. *Technometrics*, **11** (1), 1-21, (1969).
- [41] S.S. Shapiro et M.B. Wilk. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, **52** (3 et 4), 591-611, (1965).
- [42] Statistiques - Cours. Licence Scientifique. In Statistiques. *Site l'Université Claude Bernard - Lyon 1*, [En ligne]. <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/immediato/Math/Enseignement/07%20Statistiques/00.%20Cours/Cours%20%2081e%20partie%29.pdf> (page consulté le 21 mars 2012).
- [43] Traitement et Recherche de l'Information Statistique. In Les caractéristiques de dispersion. Les moments non centrés et les moments centrés d'ordre r. Asymétrie et aplatissement. *Site de l'Université Montpellier 1* [En ligne]. https://www.atlas.univ-montp1.fr/courses/MONINO0925211242/document/R%E9sum%E9s_des_cha%C3%BDtres_du_cours/stat3.pdf?cidReq=MONINO0925211242 (page consulté le 21 mars 2012).
- [44] Biostatistiques. In Chap4. Tests Paramétriques. *Site de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse* [En ligne]. http://www.biostat.envt.fr/spip/IMG/pdf/Microsoft_PowerPoint_-_TESTS_PARAMETRIQUES.pdf (page consulté le 21 mars 2012).
- [45] M. Evers. *Leçon 6. Exploitation statistique des résultats (II)*. Méthodologie Analytique – GAN105. Paris, France, 2009.
- [46] M. Evers. *Leçon 7. Exploitation statistique des résultats (III)*. Méthodologie Analytique – GAN105. Paris, France, 2009.
- [47] Ressources nationale de chimie. In Recherche de valeurs aberrantes. Test de Dixon. *Site du Ministère de l'Education nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche*. [En ligne]. <http://www.educnet.education.fr/rnchimie/math/benichou/tests/dixon/dixon.htm> (page consulté le 30 mars 2012).

UPC², UltraPerformance Convergence Chromatography, UPLC, UltraPerformance LC, Waters, Acquity UPLC, Acquity, BEH, XBridge, Alliance, XTerra, Q-Tof, Xevo, ZSpray, PICs, Survey Scan, RADAR, AccQ•Tag, Empower, MassLynx, ESCi, Stack Ring, StepWave, T-Wave, ScanWave, et Waters Quality Parts sont des marques de Waters Corporation. Toutes les autres marques appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Mise en place et évaluation des performances d'une nouvelle gamme de système de Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC®).

Mémoire d'Ingénieur C.N.A.M., Paris 2012

RESUME

Une évaluation des performances des différents instruments proposés par Waters est présentée. Trois systèmes de chromatographie liquide ultra performance (UPLC) composent la gamme Acquity : l'UPLC, l'HClass et l'IClass. Une approche statistique a montré une baisse de performance de l'HClass en comparaison de l'UPLC, conséquence de l'augmentation de la diffusion longitudinale avec ce système. L'IClass, présentant un volume mort plus faible que l'UPLC, permet d'obtenir des performances de séparation supérieures à cette dernière. La gamme Acquity contient trois détecteurs UV : le TUV, le PDA et le PDA $\epsilon\lambda$. L'étude statistique a montré une différence significative de sensibilité entre ces détecteurs, notamment entre les barrettes de diodes et le détecteur UV à double longueur d'onde. Le couplage avec un spectromètre de masse (MS) est très utilisé. Différents instruments MS ont également été étudiés. L'évaluation des performances a montré que le simple quadripôle SQD 2 était plus sensible que le Xevo TQD, un triple quadripôle, pour un même mode d'acquisition. Toutefois avec le mode MRM, le Xevo TQD permet d'être plus sélectif et aussi sensible que le SQD 2. La sensibilité maximale est obtenue avec le Xevo TQ-S, qui permet d'atteindre sans difficulté des seuils de détection de l'ordre de l'ultra-traces.

Mots clés : UPLC, UV, MS, évaluation, statistique, performance

SUMMARY

An evaluation of performance of different instruments proposed by Waters is presented. Three systems of ultra performance liquid chromatography (UPLC) compose the Acquity range : UPLC, HClass and IClass. A statistical approach showed a decrease in performance with HClass compared to UPLC, consequence of the increase of longitudinal diffusion in this system. IClass, who have a dwell volume smaller than the UPLC, provides separation performance superior to the latter. The Acquity range contains three UV detectors : TUV, PDA and PDA $\epsilon\lambda$. The statistical study showed a significant difference in sensitivity between these detectors, especially between the photodiodes array and the detector UV dual wavelength. Coupling with a mass spectrometer (MS) is very used. Different MS instruments have also been studied. Performance evaluation showed that the single quadrupole SQD 2 was more sensitive than the Xevo TQD, a triple quadrupole, for the same acquisition mode. However with the MRM mode, Xevo TQD can be more selective and sensitive as the SQD 2. Maximum sensitivity is obtained with the Xevo TQ-S, which can easily reach detection limits in the range of ultra-trace.

Key words : UPLC, UV, MS, evaluation, statistics, performance