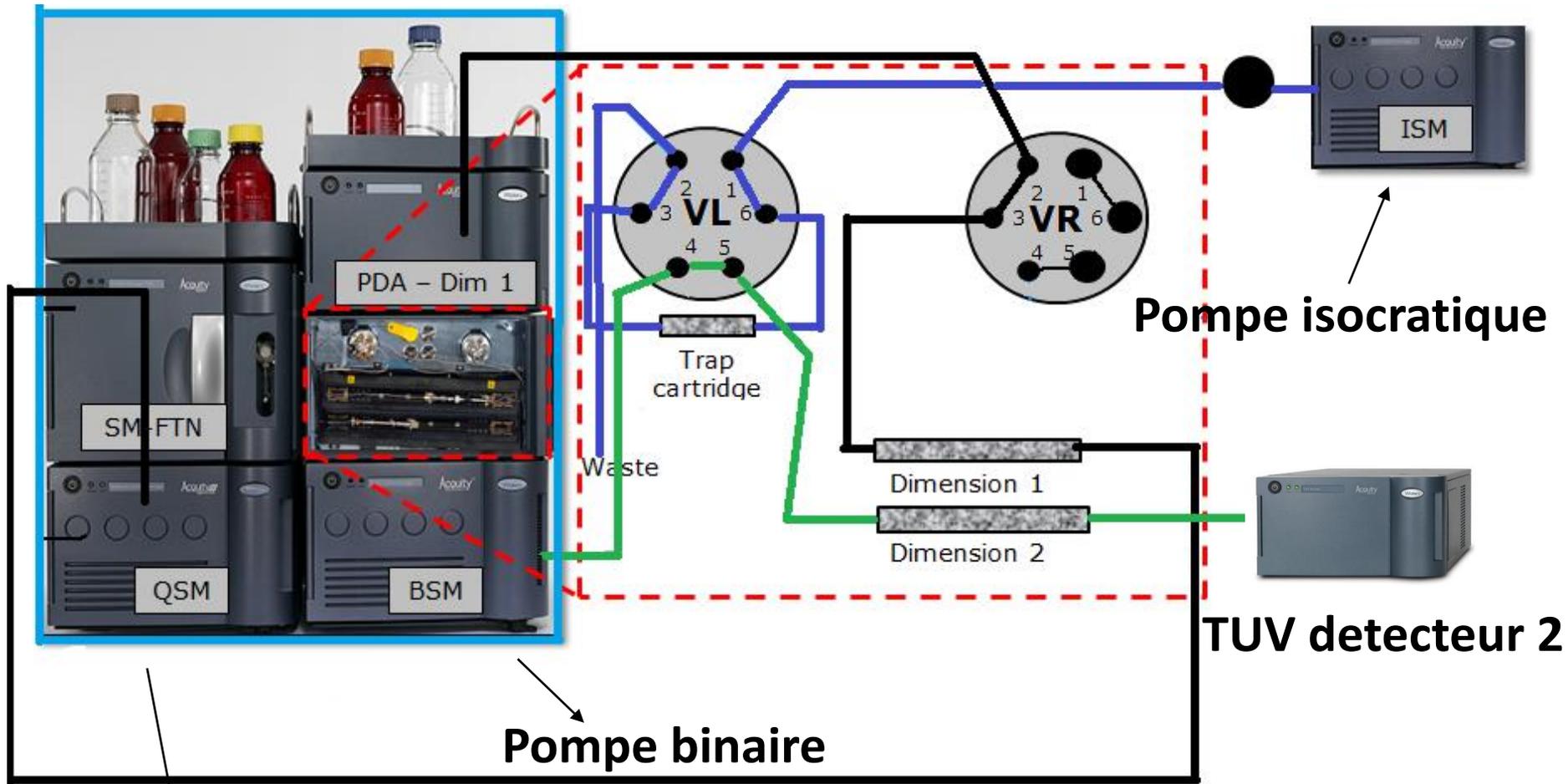




# Description générale du système LC 2D



Pompe quaternaire

Pompe binaire

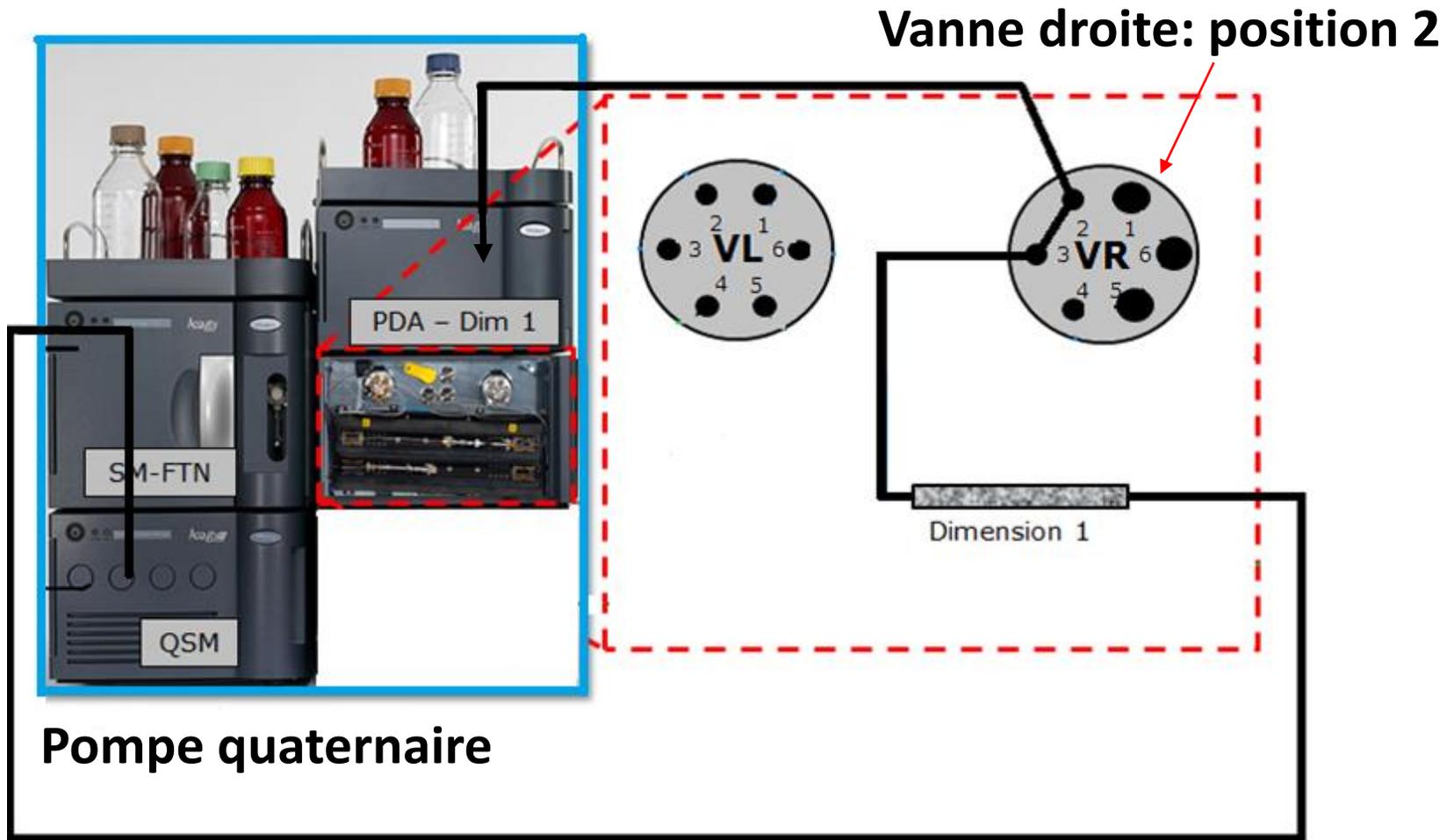
Pompe isocratique

TUV detecteur 2

- > Circuit 1
- > Circuit 2
- > Circuit 3



# Circuit 1 alimenté par la pompe quaternaire

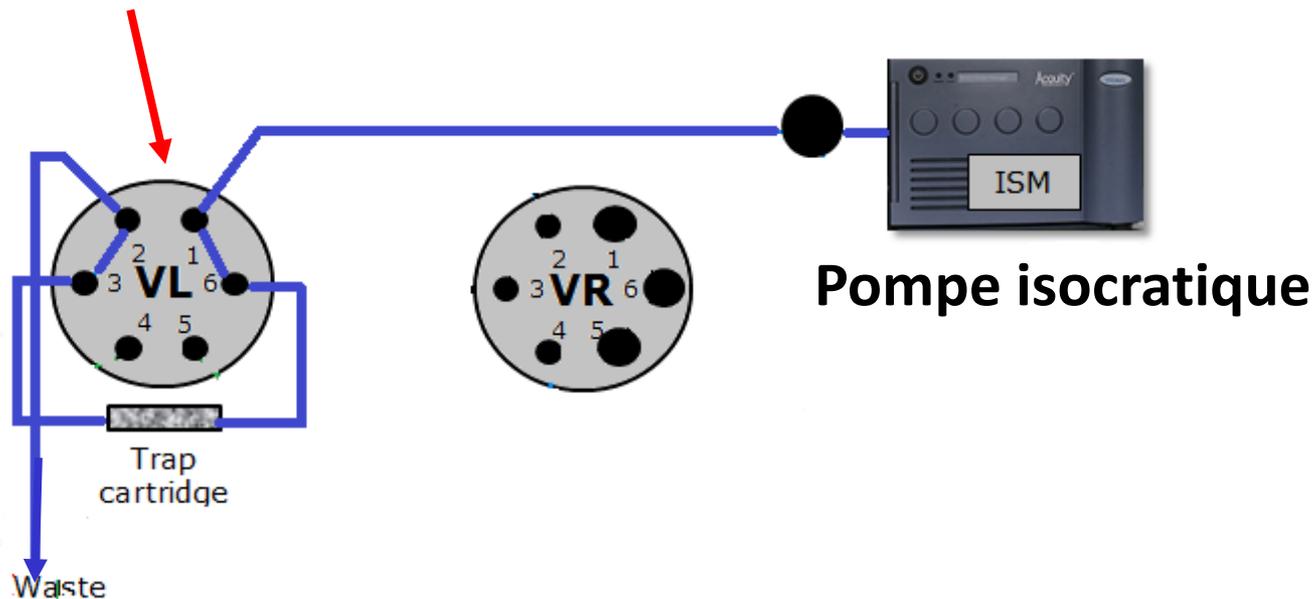


→ **Circuit 1**



# Circuit 2 alimenté par la pompe isocratique

Vanne de gauche: position 2

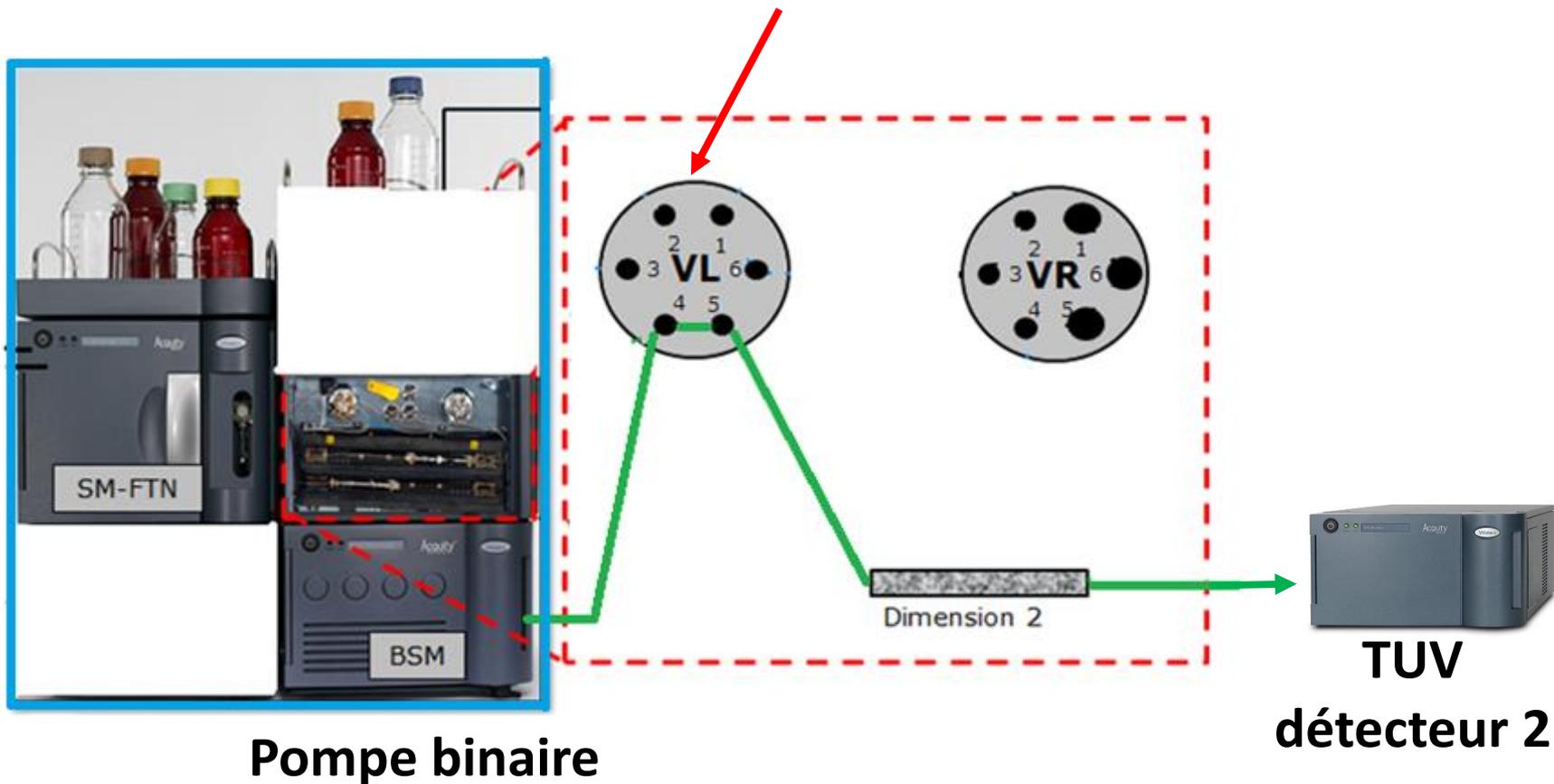


→ Circuit 2



# Circuit 3 alimenté par la pompe binaire

Vanne gauche: position 2



→ Circuit 3

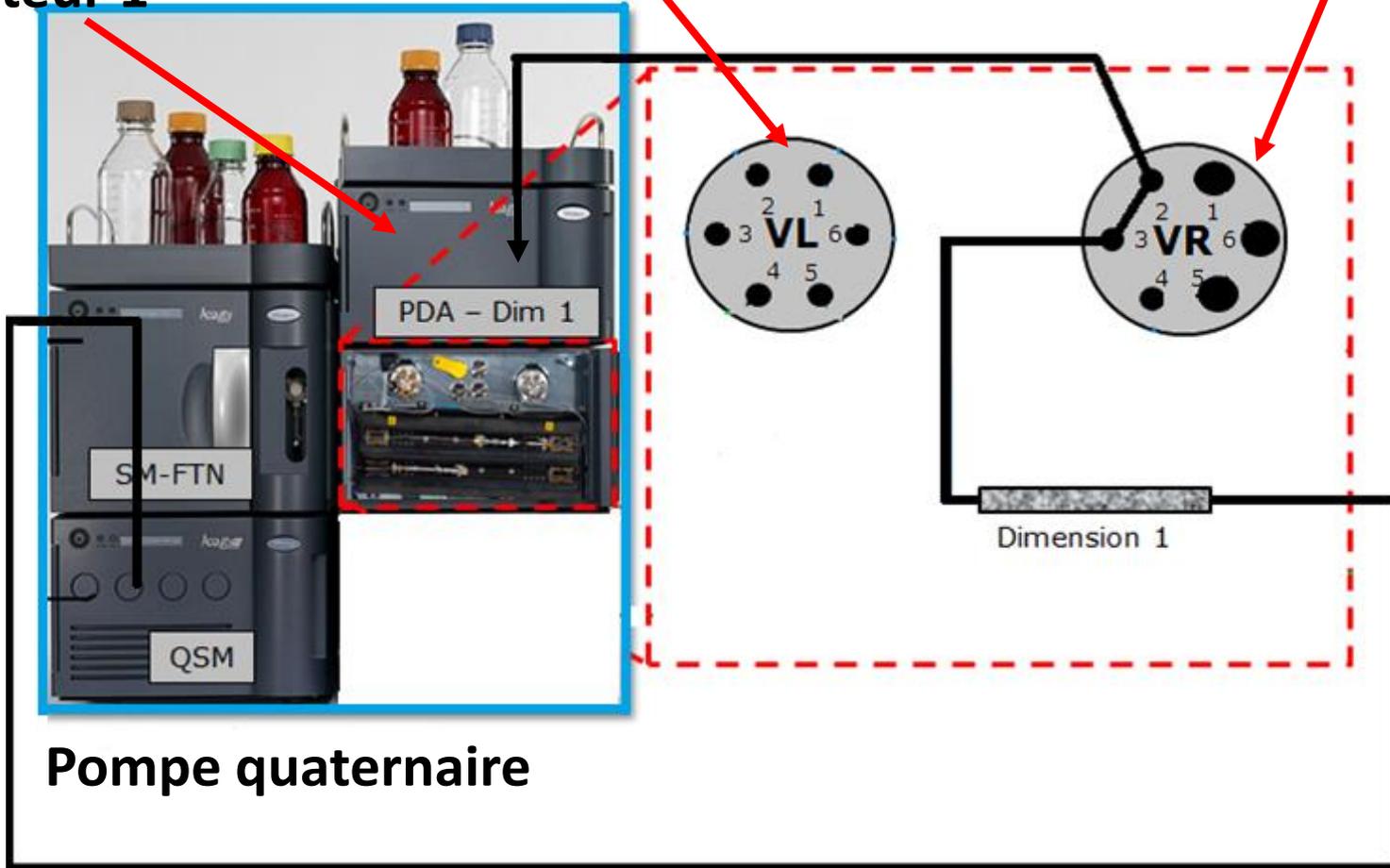


# Phase 1: Analyse en dimension 1

Vanne de gauche: position 2

Vanne de droite: position 2

Détecteur 1



Pompe quaternaire

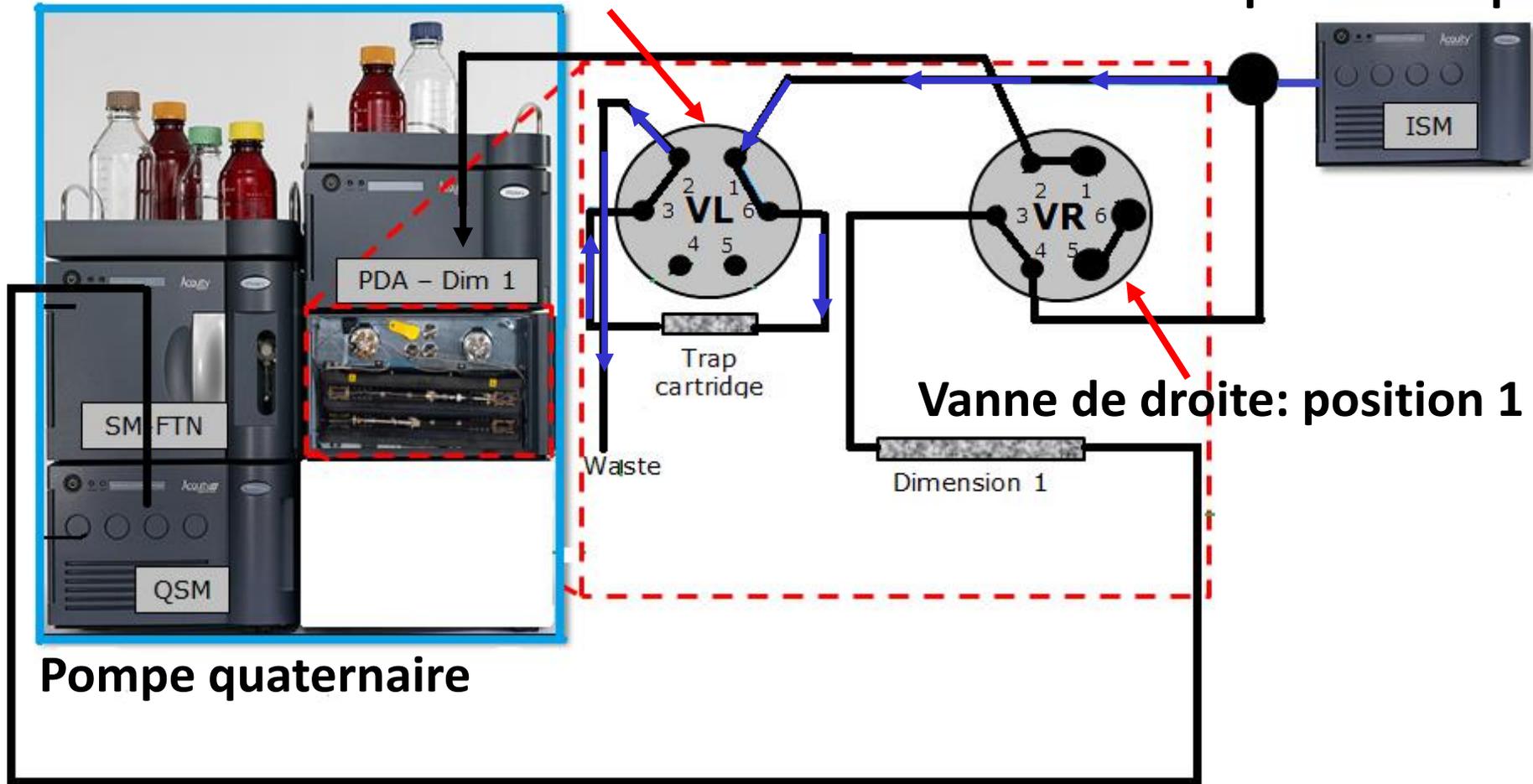
→ Circuit 1 (dimension 1)



# Phase 2: piégeage sur la cartouche

Vanne de gauche: position 2

Pompe isocratique



Pompe quaternaire

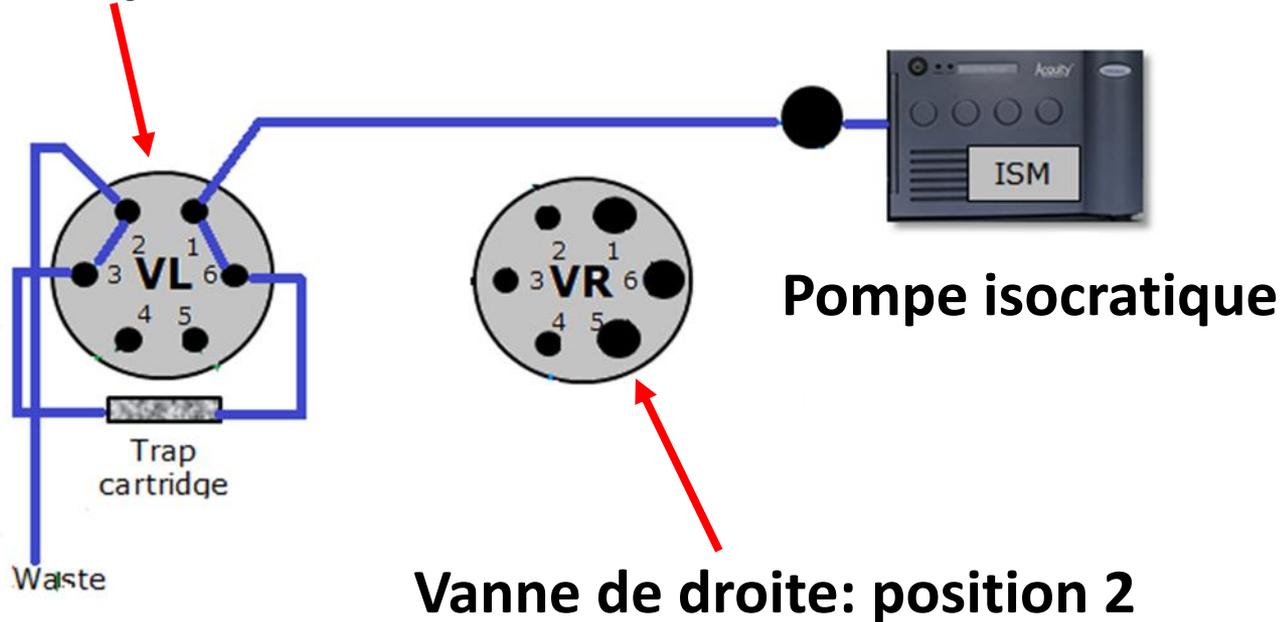
Vanne de droite: position 1

→ Circuit 1 et → Circuit 2



# Phase 3: rinçage du piège

Vanne de gauche: position 2



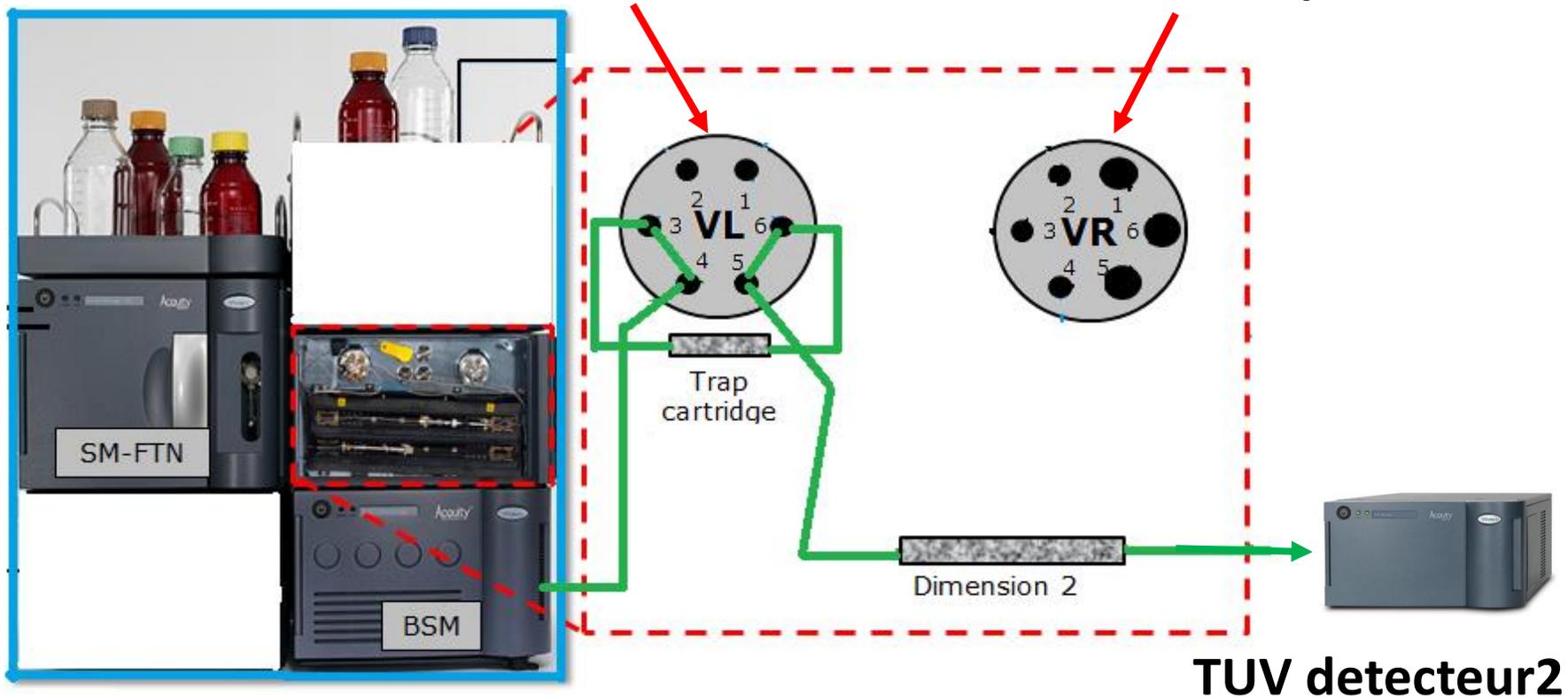
→ Circuit 2



# Phase 4 : élution du piège et analyse en dimension 2

Vanne de gauche: position 1

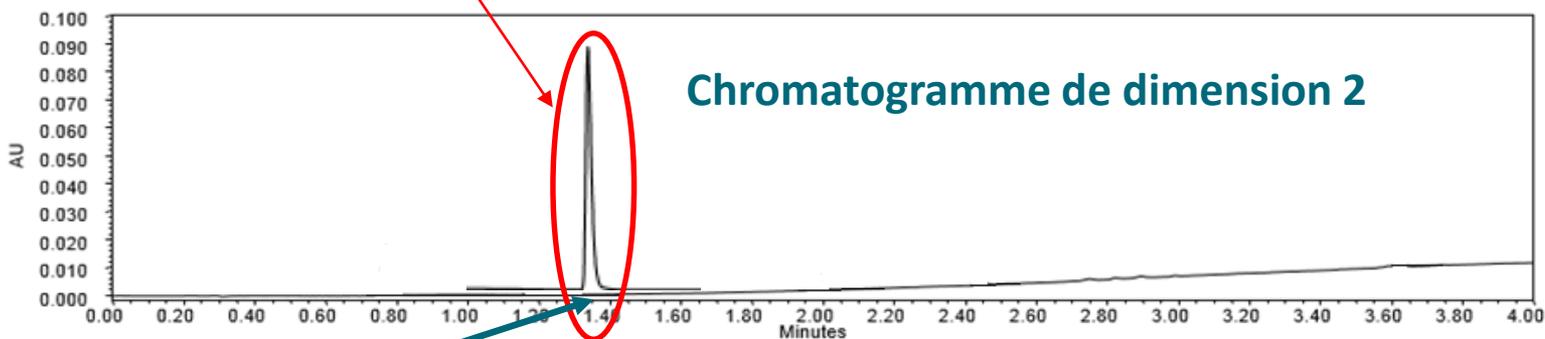
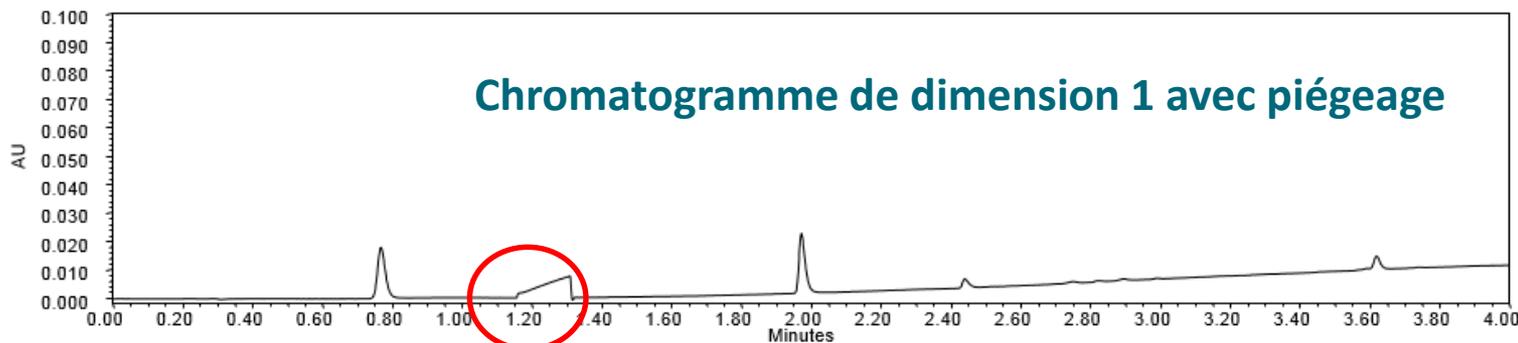
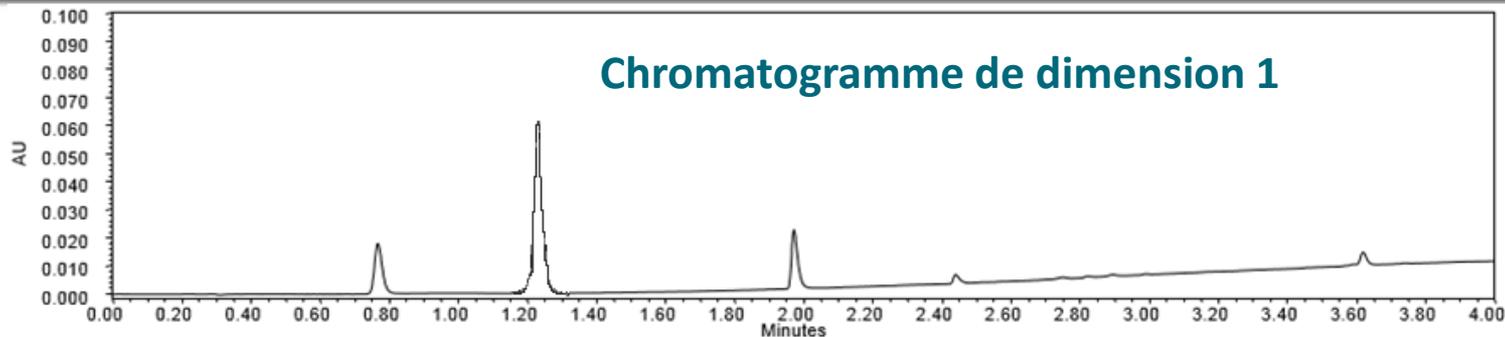
Vanne de droite: position 2



→ Circuit 3 (dimension 2)



# Phase 4 : élution du composé piégé en dimension 2



$RT \text{ apparent D2} = RTD1 + \text{durée piégeage} + \text{durée rinçage} + RTD2$



# Configuration de l'instrumentation

M1\_rifamycine in Pharmaphysic\_ETU0509TRA02 as System/Administrator - Instrument Method ...

File Edit View Help

Waters Quaternary Solvent Manager ACQ-QSM  
Waters Sample Manager FTN ACQ-FTN  
Waters Column Manager ACQ-CM  
Waters Binary Solvent Manager ACQ-BSM  
Waters Isocratic Solvent Manager ACQ-ISM  
Waters PDA Detector ACQ-PDA  
Waters TUV Detector ACQ-TUV

### Quaternary Solvent Manager

Auto • Blend Plus™

General Misc Data

Solvents

A: Tampon 7.5/ACN 90/

B: Tampon 7.5 /ACN 30/

C:

D:

Pressure Limits

Low: 0 psi

High: 15000 psi

Seal Wash Period: 5.00 min

Gradient:

	Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.800	80.0	20.0	0.0	0.0	Initial
2	26.00	0.800	41.0	59.0	0.0	0.0	6
3	30.00	0.800	20.0	80.0	0.0	0.0	6
4	32.00	0.800	80.0	20.0	0.0	0.0	6

Comment:

Ready





# Programmation du déroulement des phases

Waters Column Manager ACQ-CM

Mode  
 Column Selection  Advanced

General | Data | Events

Valve Position:  
Left Valve: Position 2  
Right Valve: Position 2

Temperature Control:  
1: Off °C  
2: Off °C  
 Alarm Band: ± 5.0 °C  
 Shutdown all temperatures

Comment:

Ready

Column Manager

Mode  
 Column Selection  Advanced

General | Data | Events

Run Events  2D Repeat

	Time (min)	Event	Action
1	1.20	Right Valve	Position 1
2	1.35	Right Valve	Position 2
3	2.35	Left Valve	Position 1
4			
5			
6			
7			
8			



# Mise en place LC2D

La répétabilité de l'injecteur est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en deuxième dimension après piégeage?

La répétabilité de l'élution est-elle altérée lorsqu'un composé est analysé en deuxième dimension?

Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

Y-a-t-il une difficulté particulière de piégeage dans le cas d'un gradient d'élution dans le circuit 1 (QSM)?

Y-a-t-il un écart entre l'aire du pic d'un composé analysé en première dimension et l'aire du pic de ce même composé après cutting et deuxième dimension?

Le piégeage peut-il être répété de façon quantitative dans un objectif d'augmentation de sensibilité?

Le cutting perturbe-t-il le reste du chromatogramme de 1ere dimension?

...

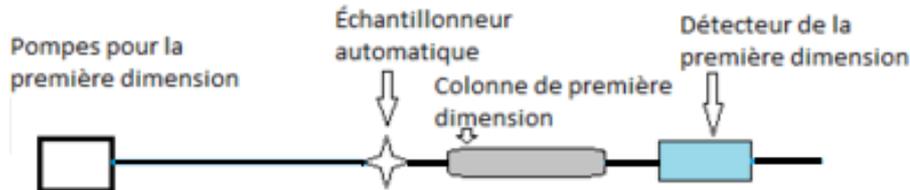




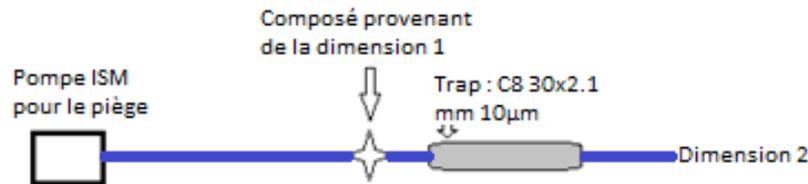
# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension (circuit 1)

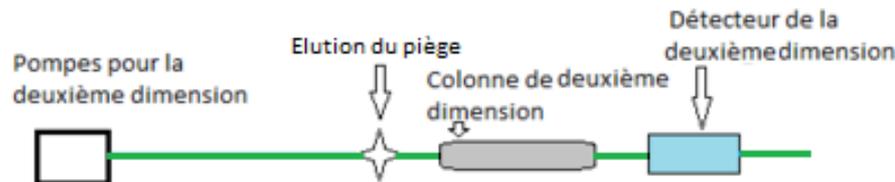


### Piégeage (circuit 2)



Dimension 1 et dimension 2 ont des conditions chromatographiques identiques (phase stationnaire, phase mobile, température)

### Deuxième dimension (circuit 3)

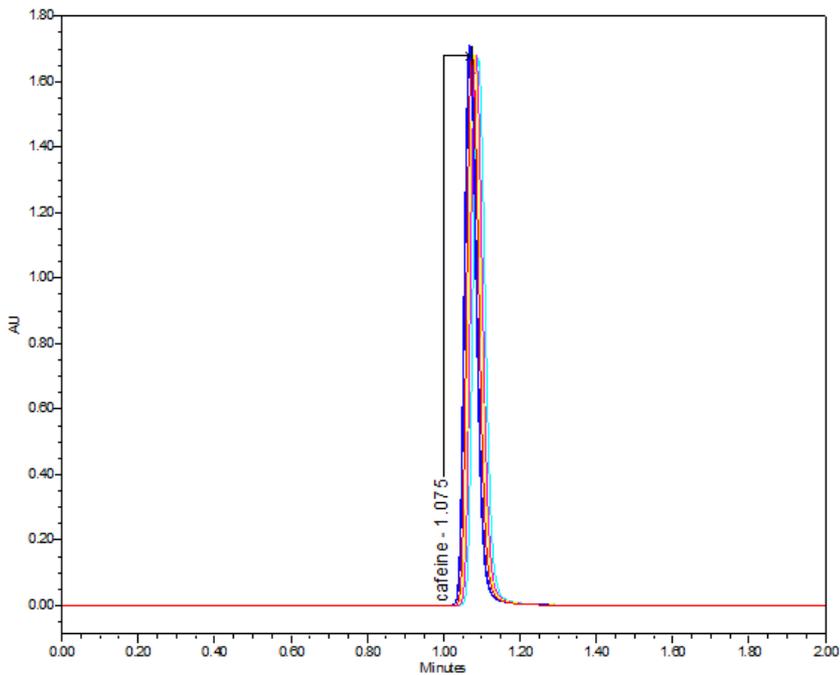




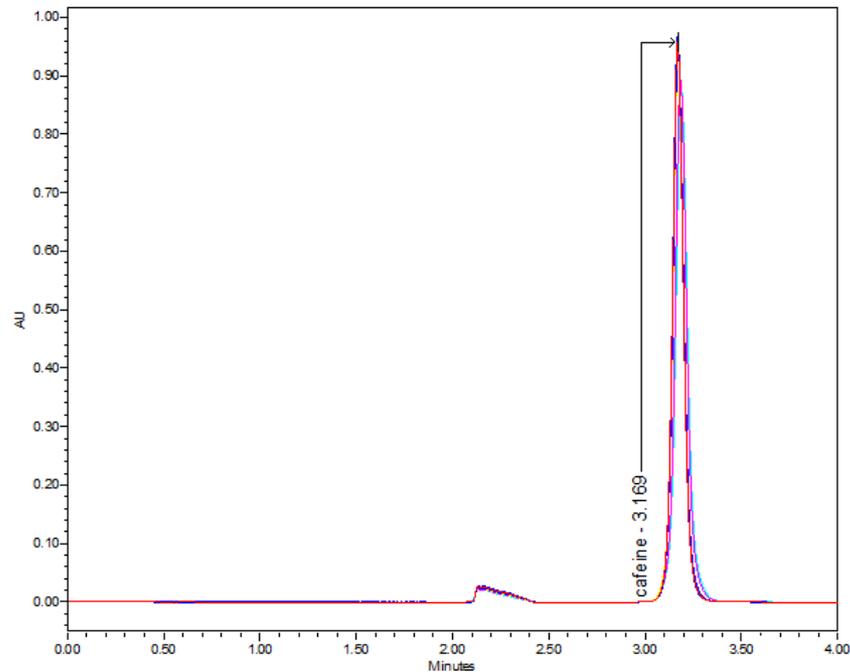
# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

## Conditions chromatographiques isocratiques (caféine)

### Première dimension (6 injections)



### Deuxième dimension après piégeage (6 injections)

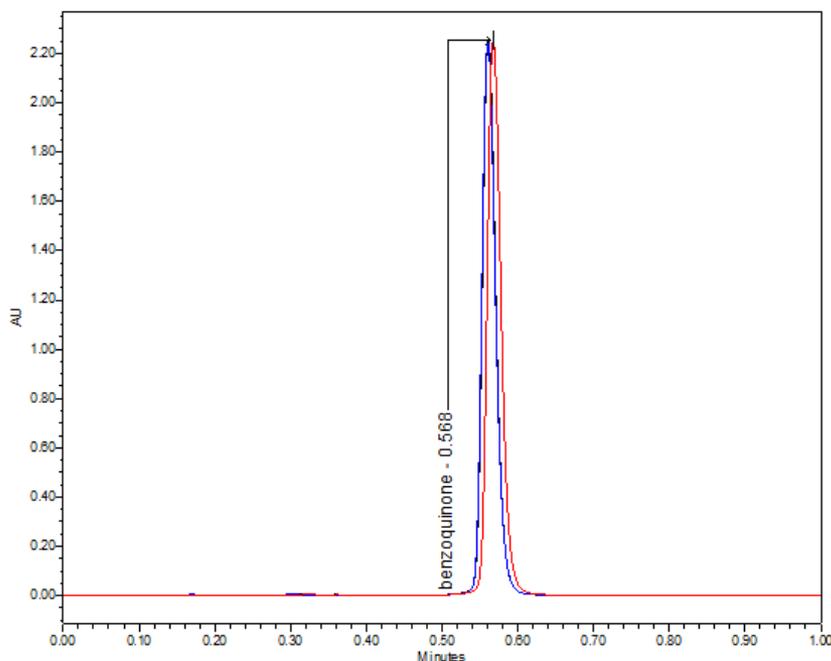




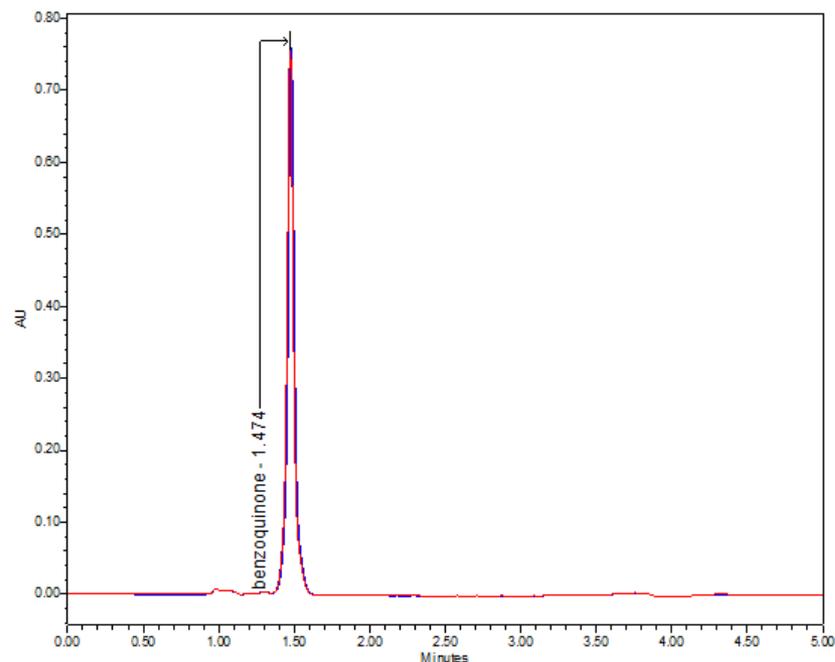
# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

## Conditions chromatographiques en élution gradient (benzoquinone)

### Première dimension (3 injections)



### Deuxième dimension après piégeage (3 injections)





## Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

### Comparaison de la dispersion sur les temps de rétention (cv en %)

	Dimension 1	Dimension 2
caféine (dimension 1 et 2 isocratique)	0.8	0.3
Benzoquinone (dimension 1 et 2 gradient)	0.7	0.3

Sur les deux exemples étudiés, il apparaît clairement que la répétabilité de l'injection (SM-FTN) de la dimension 1 n'est pas modifiée par le piégeage et l'analyse en 2<sup>ème</sup> dimension.

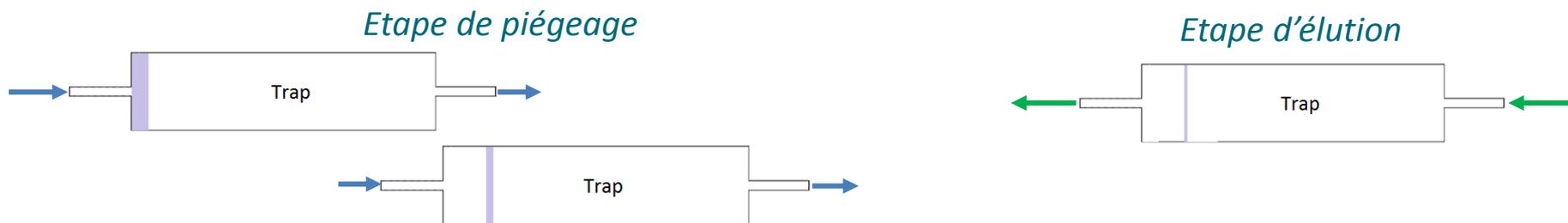


# Question 1: La répétabilité de l'injection est-elle modifiée lorsqu'un composé est analysé en 2<sup>ème</sup> dimension après piégeage?

## Comparaison de la dispersion sur les aires (cv en %)

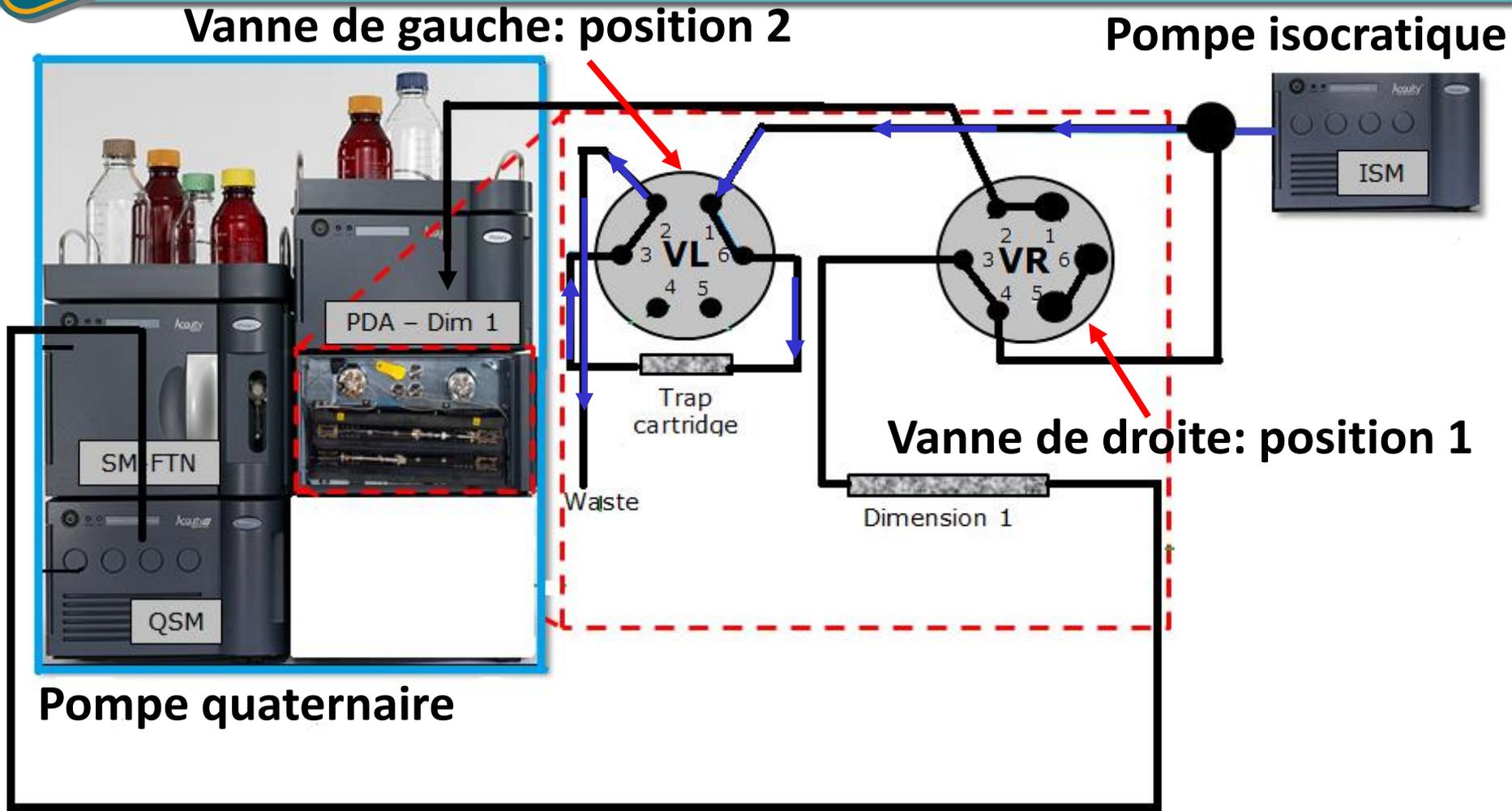
	Dimension 1	Dimension 2
Cafeine (n=6) (dimension 1 et 2 isocratique)	0.19	0.11
Benzoquinone (n=3) (dimension 1 et 2 gradient)	1.0	0.4

Sur les deux exemples étudiés il apparait clairement que la répétabilité d'injection n'est pas modifiée par le piégeage et l'analyse en 2<sup>ème</sup> dimension.





# Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?





## Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

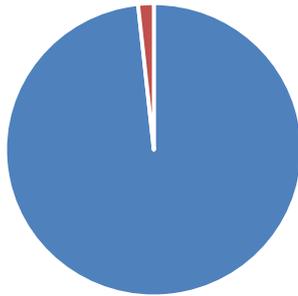
**Le débit du circuit 2 (ISM) a une influence très importante sur la composition de la phase qui traverse la cartouche et donc la qualité du piégeage**

Exemple en élution isocratique :

Circuit 1 = eau/acetonitrile-90/10-0,4 ml/min

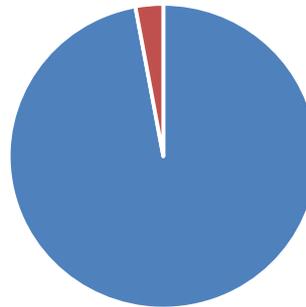
Circuit 2 = eau 100%

Débit = 2ml/min



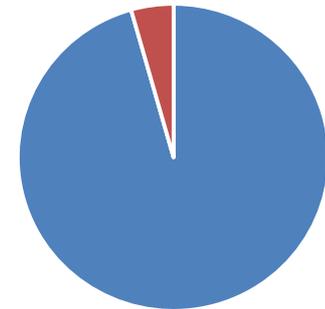
■ %eau ■ %org

Débit = 1ml/min



■ % eau ■ % org

Débit = 0.5 ml/min



■ %eau ■ %org

*Facteur de rétention sur un piège apolaire*



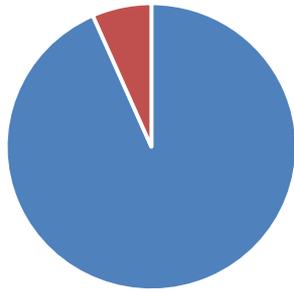
## Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

Exemple en gradient :

Circuit 1 = eau/acetonitrile-90/10 à 5/95 en 2.5 min-0,4 ml/min

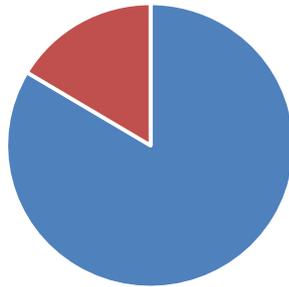
Circuit 2 = eau 100% - 1ml/min

T = 0.6 min



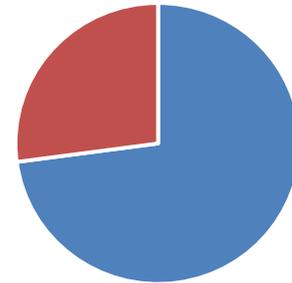
■ %eau ■ %org

T = 1.5 min



■ % eau ■ % org

T = 2.5 min



■ %eau ■ %org

Facteur de rétention sur un piège apolaire

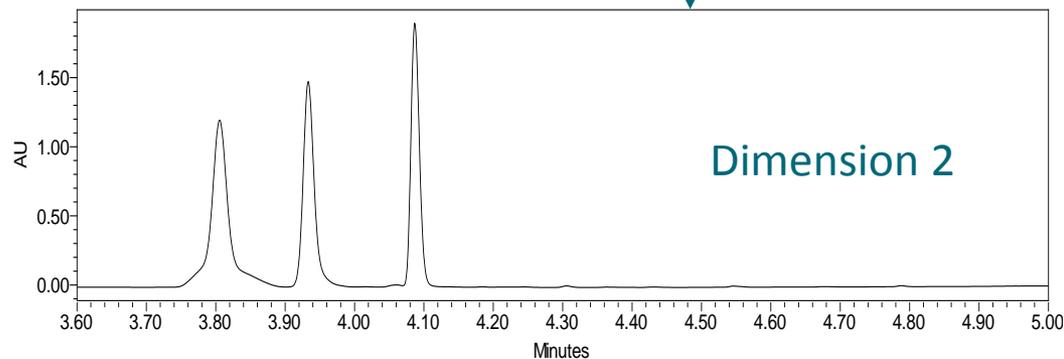
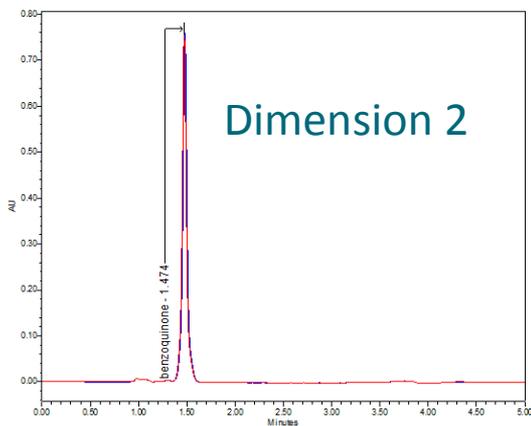
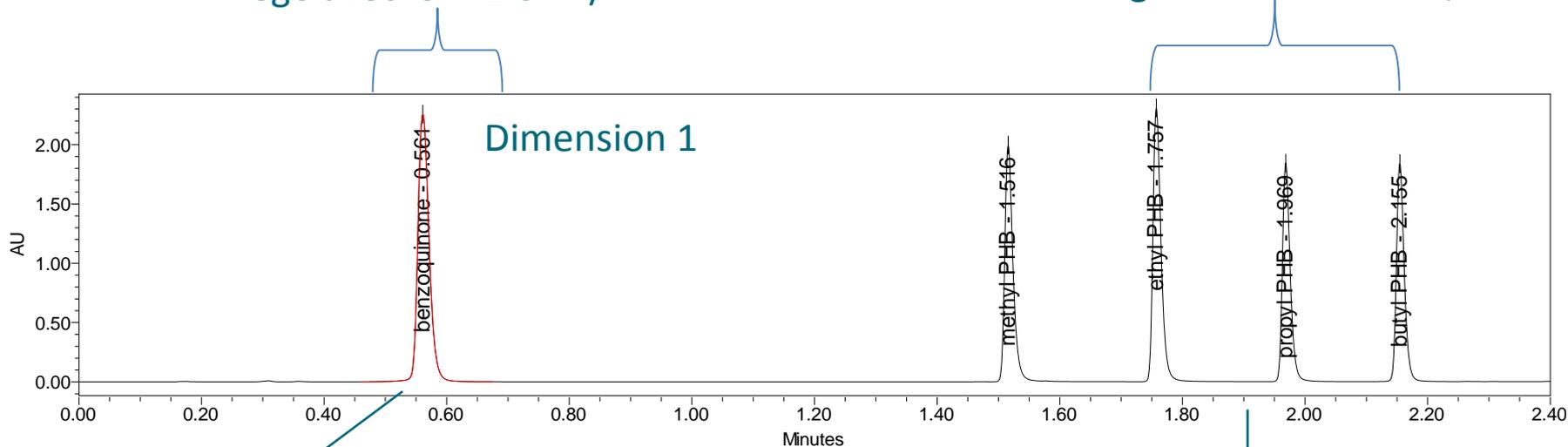


# Question 2 : Quelle est l'influence du débit de la phase mobile dans le circuit 2 (ISM) ?

## Exemple avec un piège C8

Piégé avec ISM 1.0 ml/min

Piégé avec ISM 1.8 ml/min

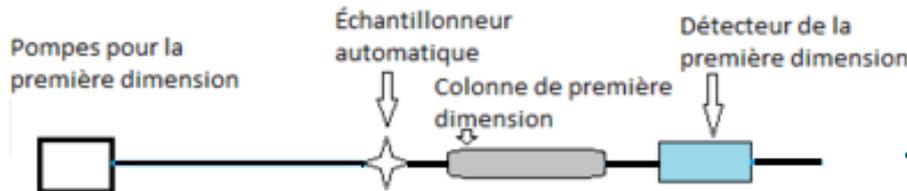


Changer la nature du piège

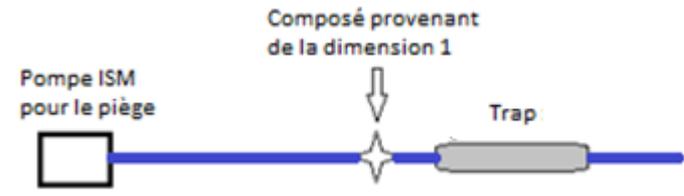
# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

## Conditions chromatographiques du test

### Première dimension



### Piégeage

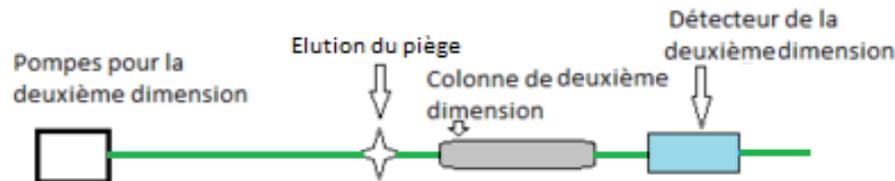


n répétitions

Chromatographie UHPLC de la dimension 1  
Colonne C18 – Circuit 1 = eau/ACN

Circuit 2 = eau

### Deuxième dimension

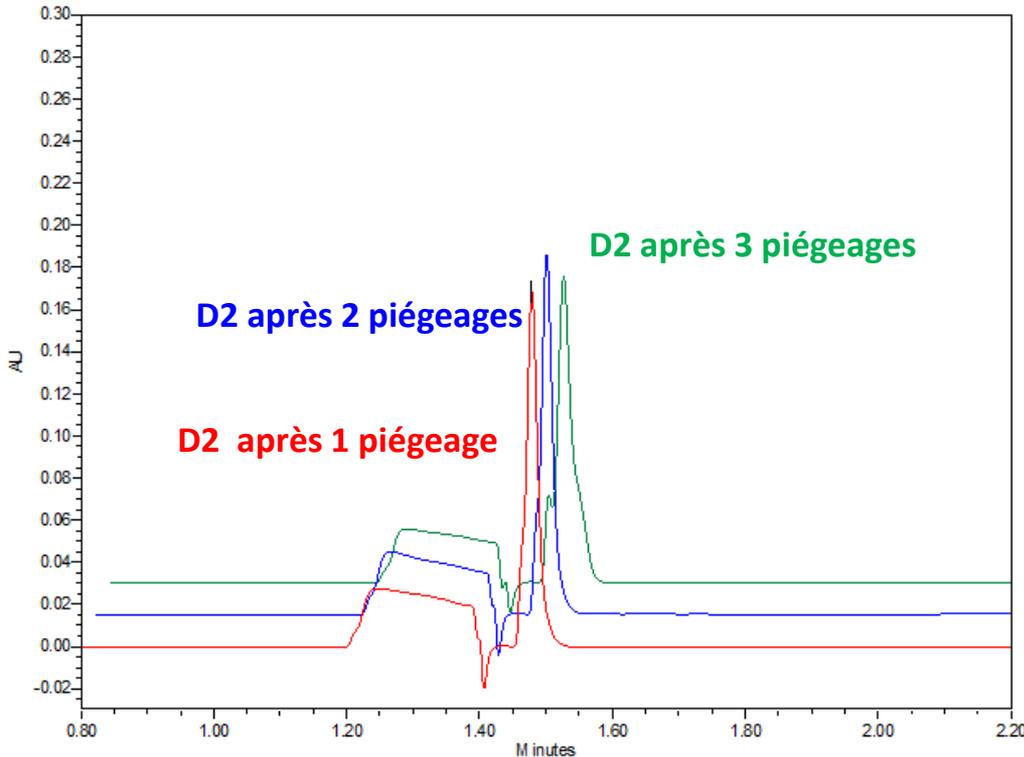


Chromatographie UHPLC de la dimension 2  
Colonne C18 – Circuit 3 = ACN



# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

## Analyse d'un composé de facteur de capacité K' faible (Caféine)

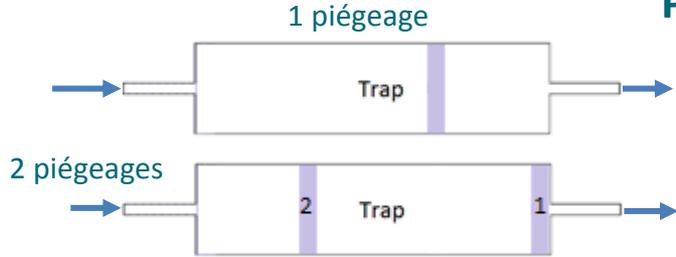


### Piégeage sur cartouche C8

	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	220 313
2 piégeages	222 706
3 piégeages	266 194



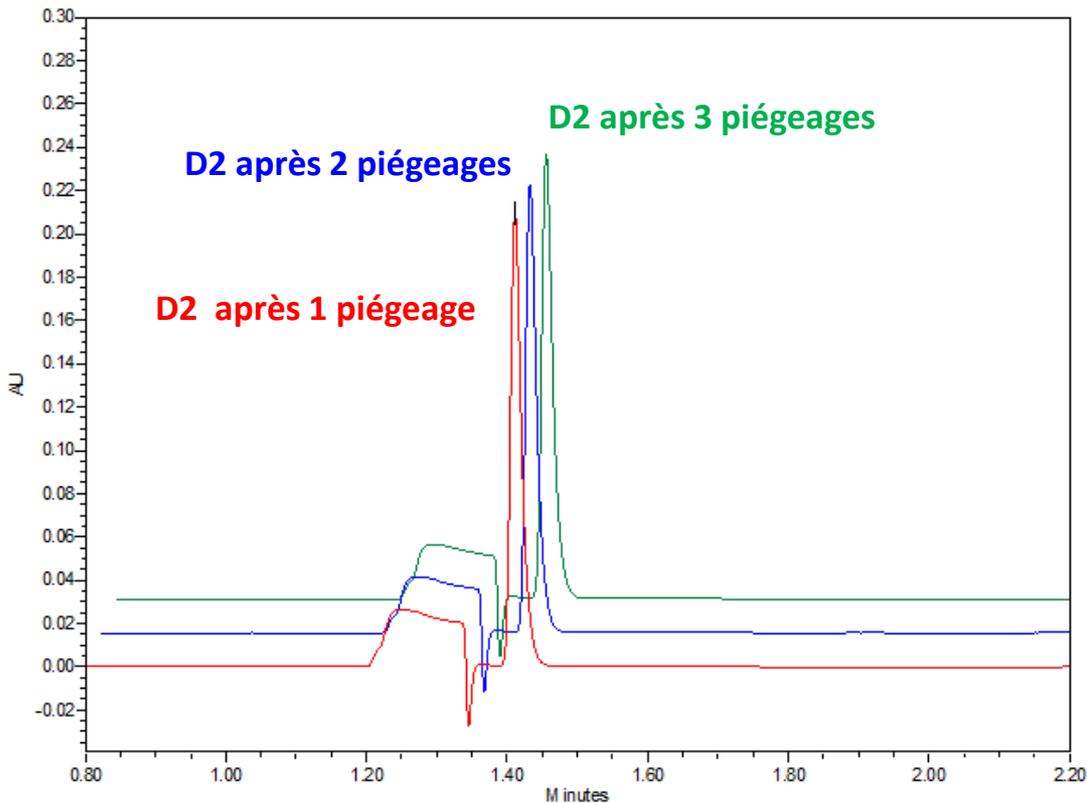
**Pas d'accumulation**





# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

## Analyse d'un composé de facteur de capacité $K'$ faible (Caféine)



### Piégeage sur cartouche C18

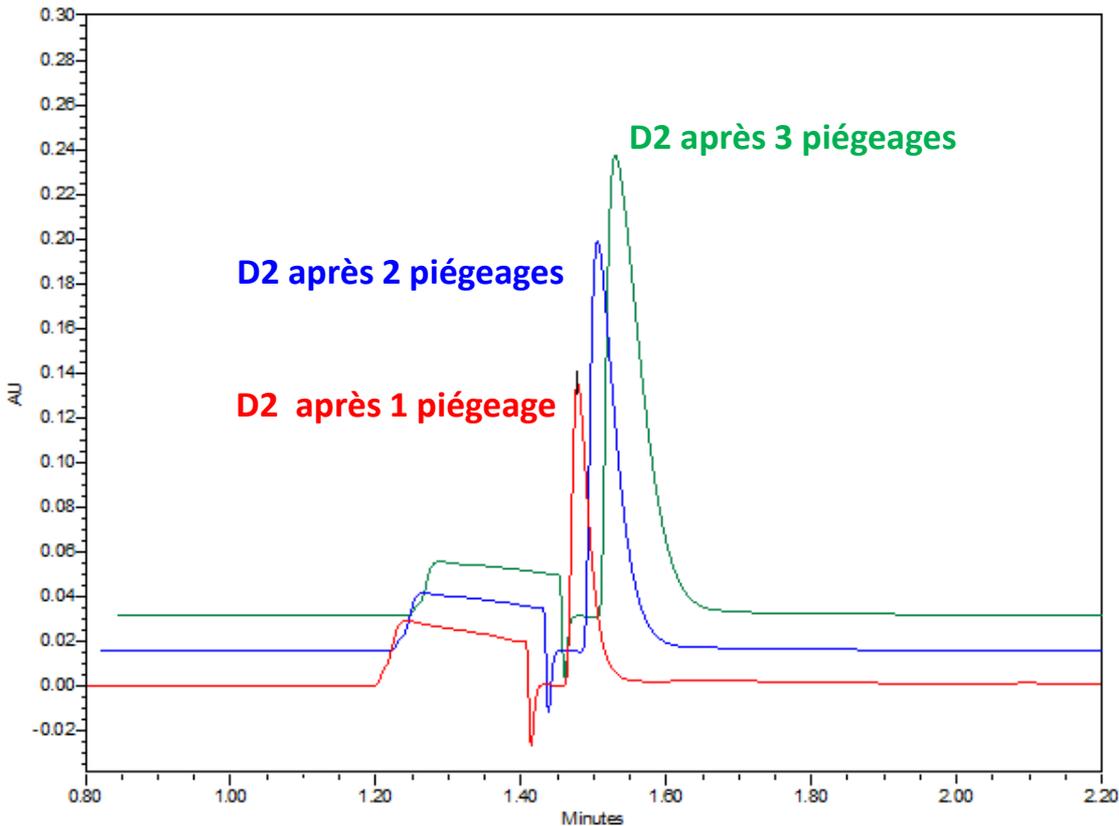
	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	232 163
2 piégeages	233 107
3 piégeages	233 501



**Pas d'accumulation**

# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

## Analyse d'un composé de facteur de capacité $K'$ faible (Caféine)



### Piégeage sur cartouche Oasis HLB

	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	233 415
2 piégeages	465 209
3 piégeages	698 602



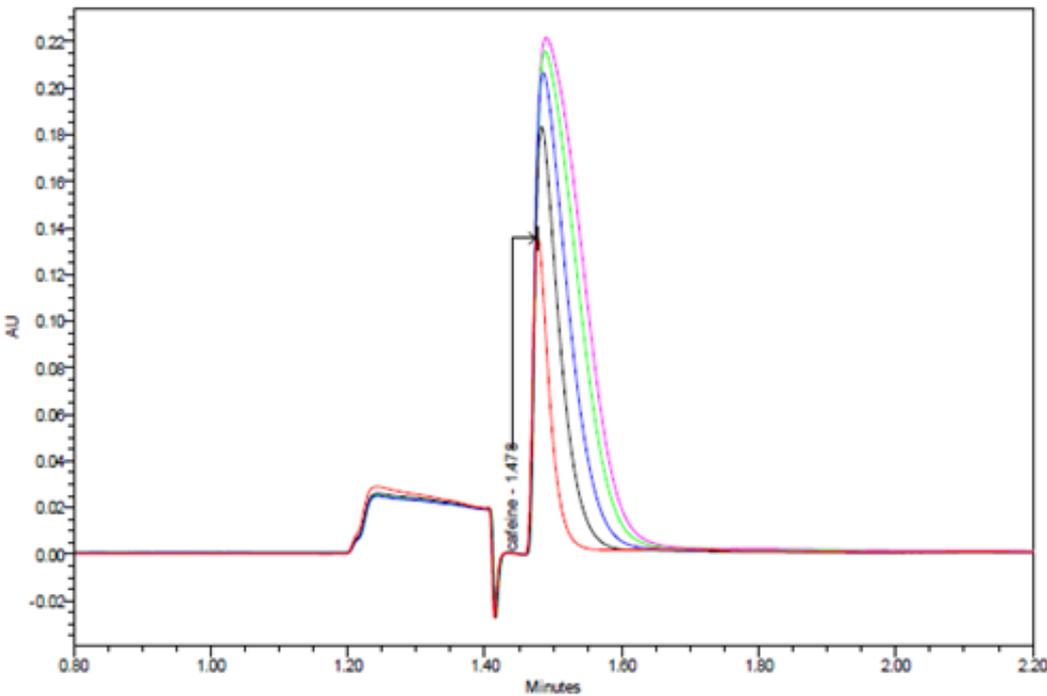
**Accumulation proportionnelle**





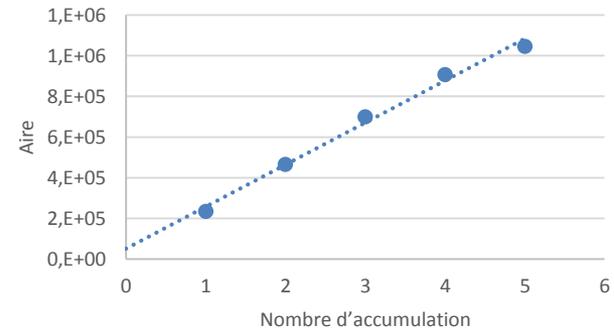
# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

## Analyse d'un composé de facteur de capacité $K'$ faible (Caféine)



- caffeine 1 piége + elution
- caffeine 2 pièges + elution
- caffeine 3 pièges + elution
- caffeine 4 pièges + elution
- caffeine 5 pièges + elution

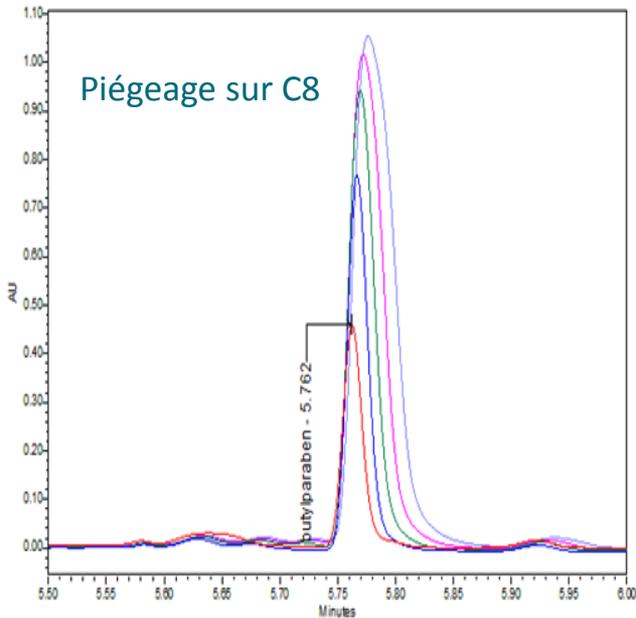
	Aires des pics Dimension 2
1 piégeage	233 415
2 piégeages	465 209
3 piégeages	698 602
4 piégeages	906 858
5 piégeages	1 046 441



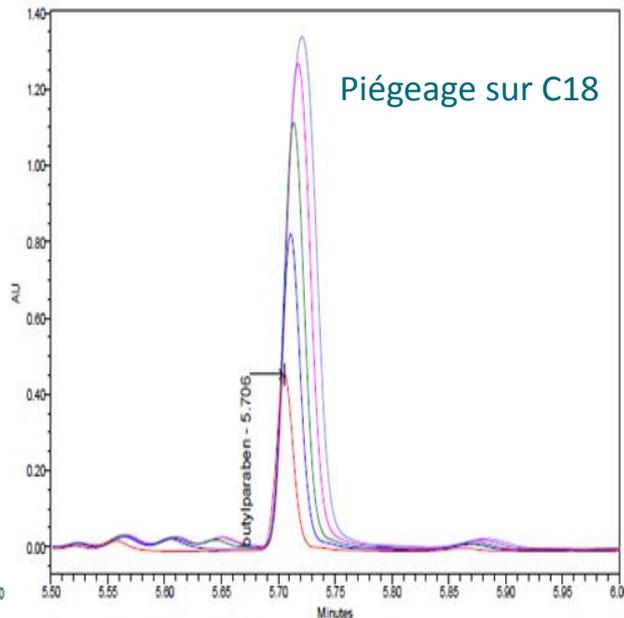


# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

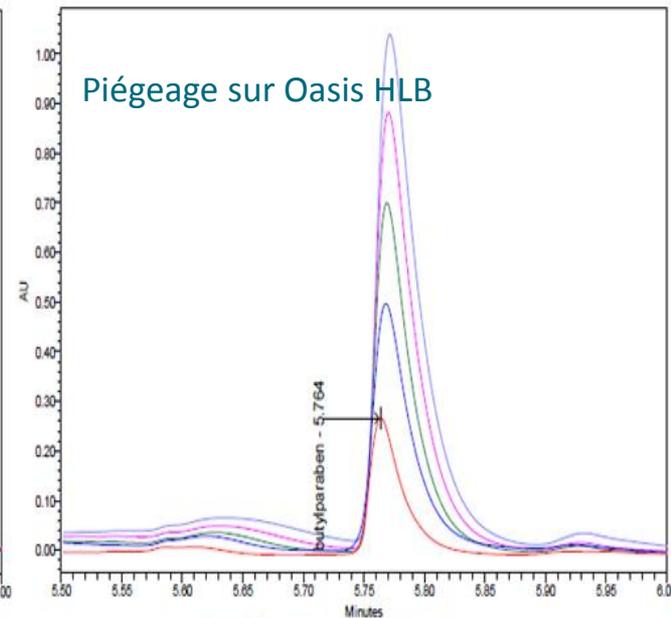
## Analyse d'un composé de facteur de capacité K' forte (butylparaben)



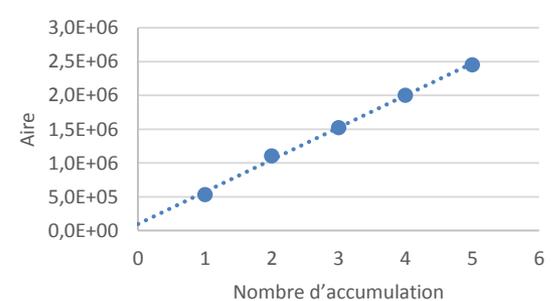
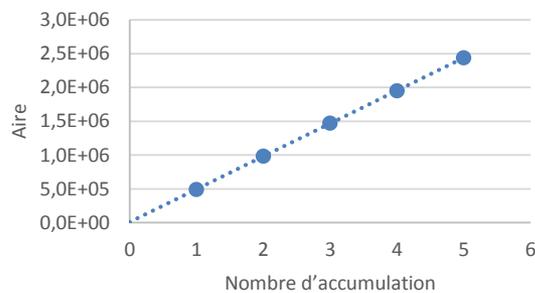
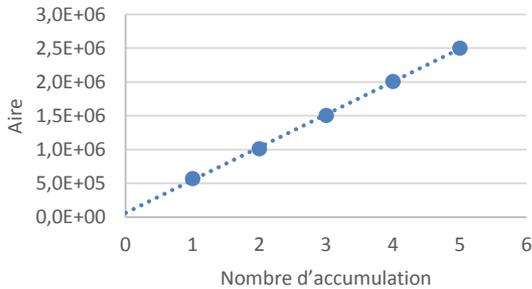
- SampleName butylparabene 1 piege+ elution
- SampleName butylparabene 2 pieges + elution
- SampleName butylparabene 3 pieges + elution
- SampleName butylparabene 4 pieges+elution
- SampleName butylparabene 5 pieges + elution



- SampleName butylparabene 1 piege+ elution
- SampleName butylparabene 2 pieges + elution
- SampleName butylparabene 3 pieges + elution
- SampleName butylparabene 4 pieges + elution
- SampleName butylparabene 5 pieges + elution



- SampleName butylparabene 1 piege+ elution
- SampleName butylparabene 2 pieges + elution
- SampleName butylparabene 3 pieges + elution
- SampleName butylparabene 4 pieges + elution
- SampleName butylparabene 5 pieges + elution





# Question 3 : Le composé peut-il être accumulé de façon quantitative par répétition du piégeage?

L'accumulation  
sur le piège est  
quantitative

Améliorer la  
sensibilité

Améliorer la  
LOD/LOQ

Stocker pour une  
autre analyse

Piégeage d'un  
groupe de pics

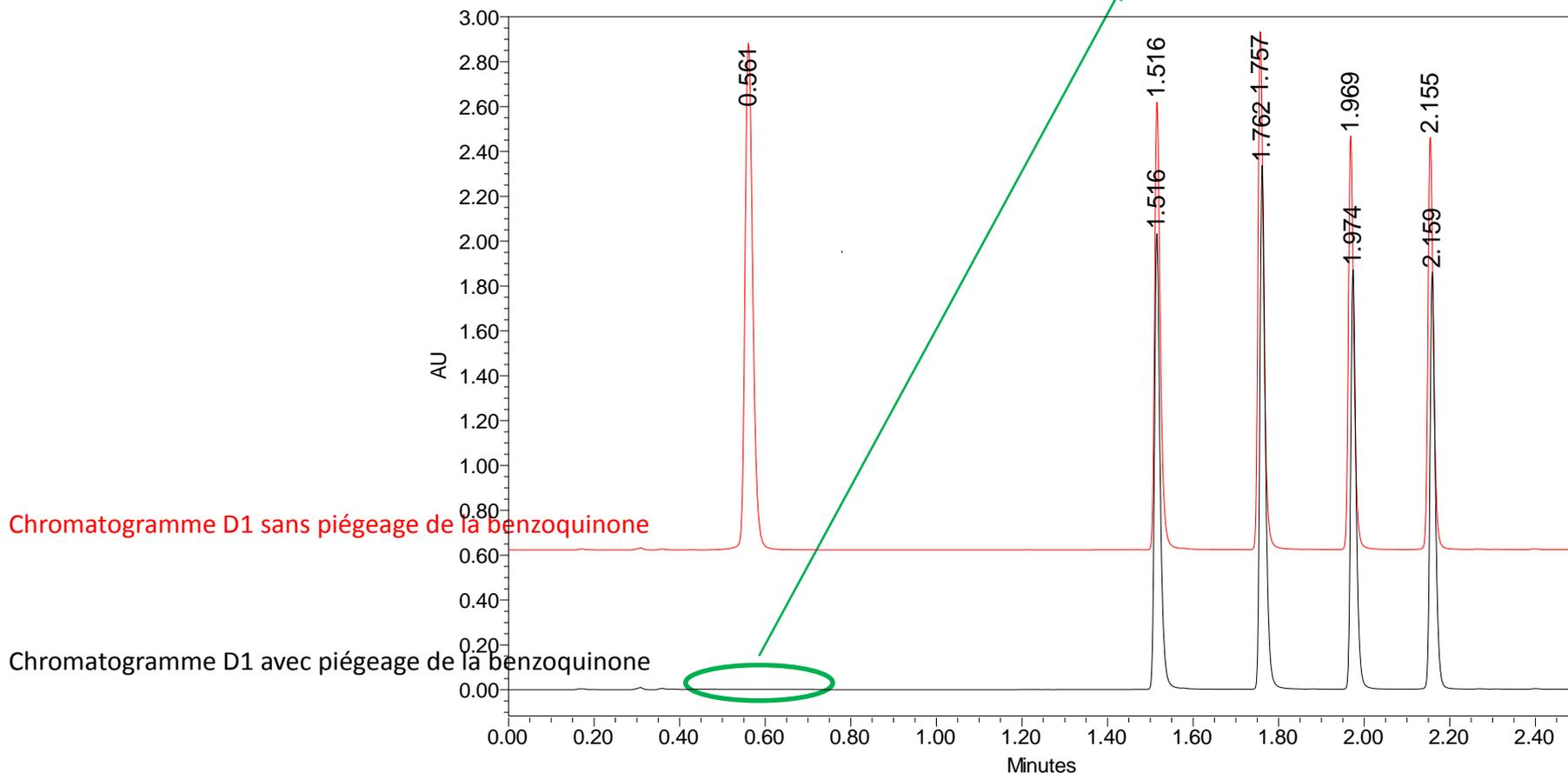
...

Perspectives d'applications multiples



## Question 4 : le cutting perturbe-t-il le reste du chromatogramme de 1ere dimension?

Absence du pic de la benzoquinone piégée



**Le piégeage ne perturbe pas le reste du chromatogramme de la dimension 1.**