



Méthodes de séparation 1D et 2D

Grégory Genta-Jouve

Spectrométrie de masse appliquée aux Substances Naturelles

Introduction

La chromatographie permet de séparer les molécules présentes dans un mélange complexe.

Elle est utilisée en amont de la détection en masse pour permettre d'obtenir des informations plus précises sur l'échantillon étudié.

Classiquement, les séparations sont faites en phase inverse (C8, C18 ou C6-phenyl) mais de plus en plus de couplage à n-dimensions sont réalisés afin d'augmenter l'efficacité ainsi que la sélectivité de la séparation.

Efficacité = nombre de plateaux théoriques

Sélectivité = aptitude du système à séparer deux molécules

La phase stationnaire

La phase la plus utilisée en LC-MS est la silice greffée C18 (phase inverse) car elle permet de séparer une grande variété de métabolites.

Elle peut être utilisée avec de nombreux solvants:

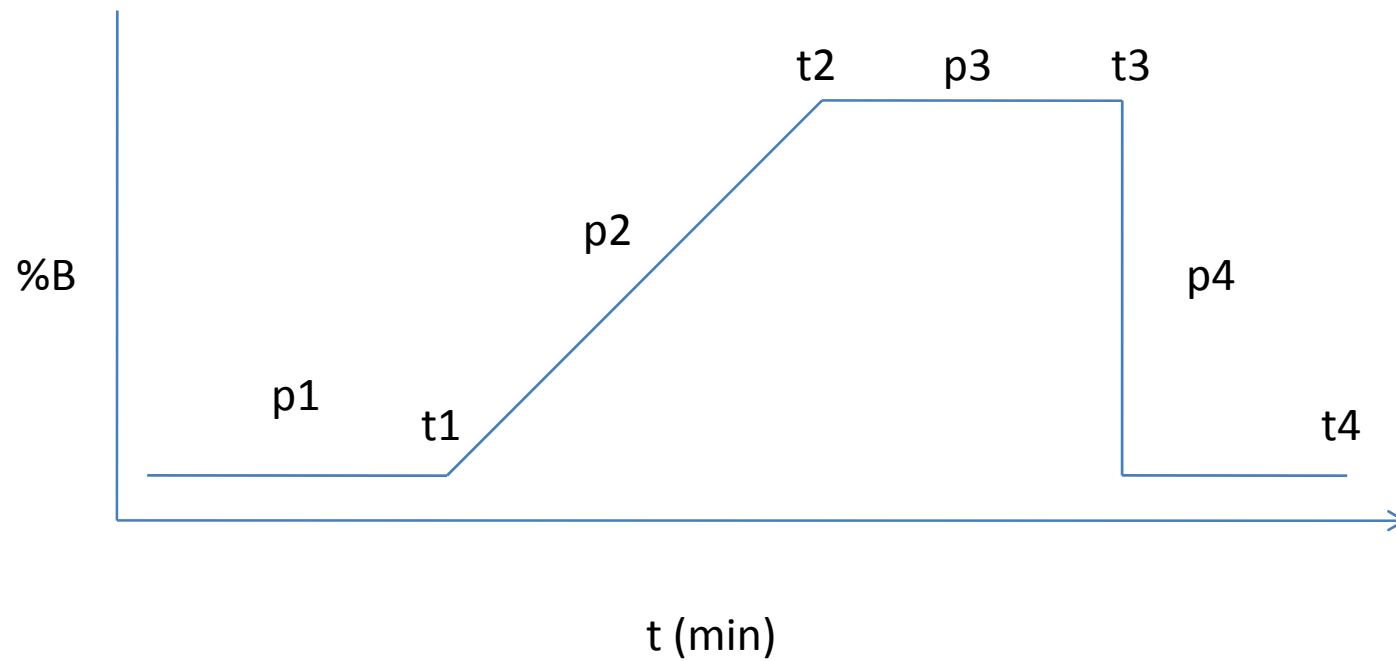
- Eau
- Methanol
- Acetonitrile
- Isopropanol
- Etc...

A différents pH (acide ou basique)

Le paramètre de la séparation est la mise au point du gradient.

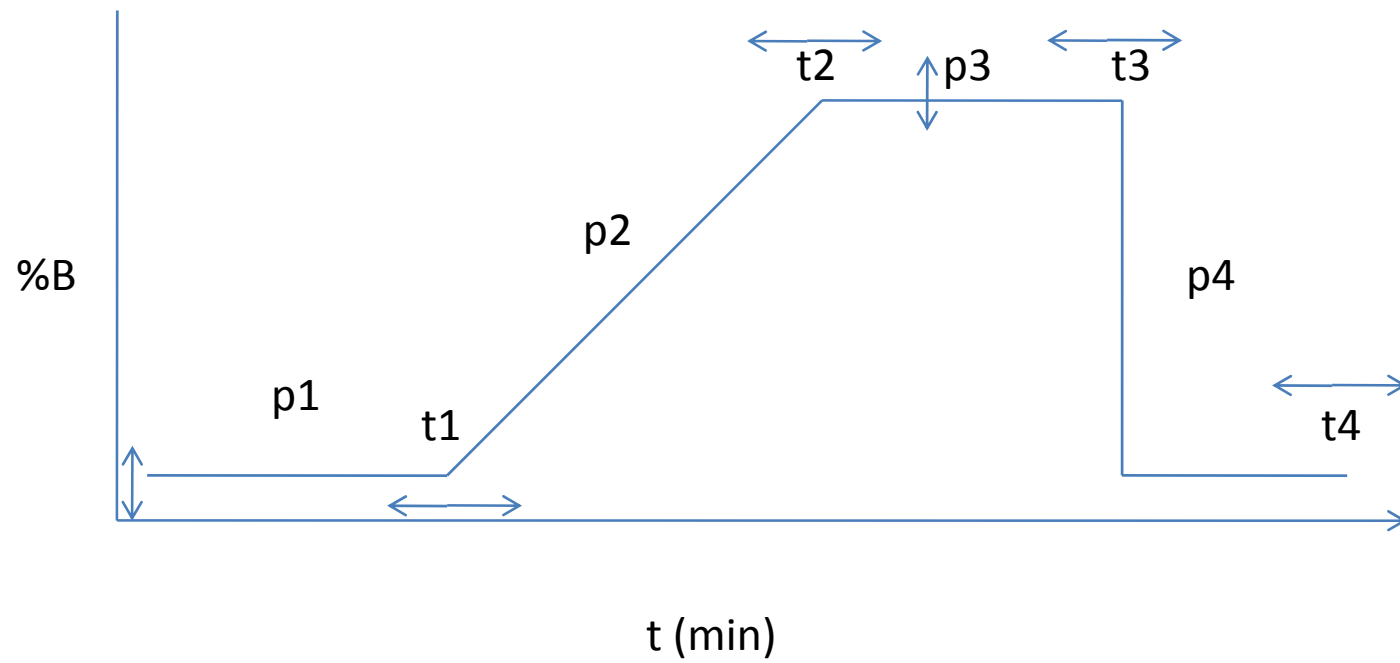
Mise au point du gradient

Allure d'un gradient standard



Mise au point du gradient

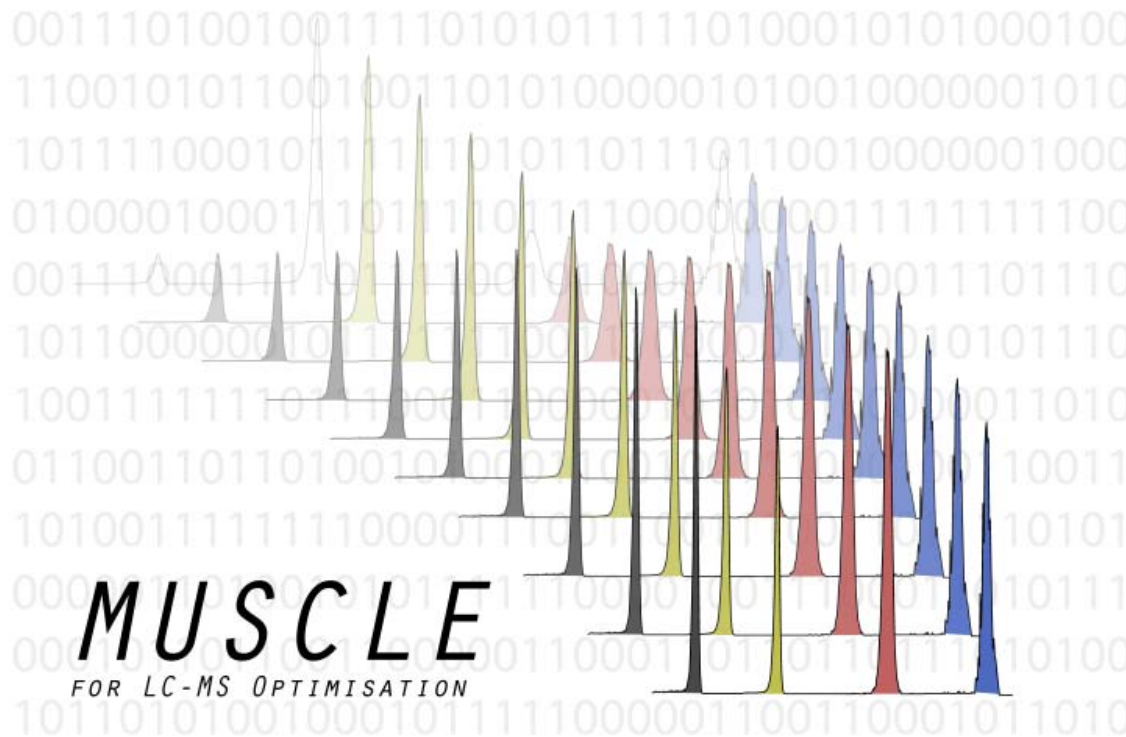
Allure d'un gradient standard



Mise au point du gradient

De nombreux paramètres sont à prendre en compte et des outils ont été développés pour aider à la mise au point des conditions de séparation des extraits:

- Drylab
- GOAT
- MUSCLE



Présentation de MUSCLE

MUSCLE est un logiciel qui permet l'optimisation des conditions d'acquisition de données LC-MS.

MUSCLE prend le contrôle de l'ordinateur sur lequel il est installé et change les paramètres (p1, t1, p2, t2, etc...) en fonction du profil chromatographique obtenu en temps réel.

Un algorithme génétique est utilisé pour l'optimisation et seules quelques conditions de séparation sont conservées durant l'optimisation.

Présentation de MUSCLE

L'algorithme d'optimisation utilise le principe de l'évolution Darwinienne (survie du plus adapté) en fonction de critères précis:

- Nombre de pics détectés
- Temps total du run

Dans le cadre d'analyse LC-MS, un bon run est un run qui permet une séparation maximale en un minimum de temps.

Les opérations qui miment la nature sont:

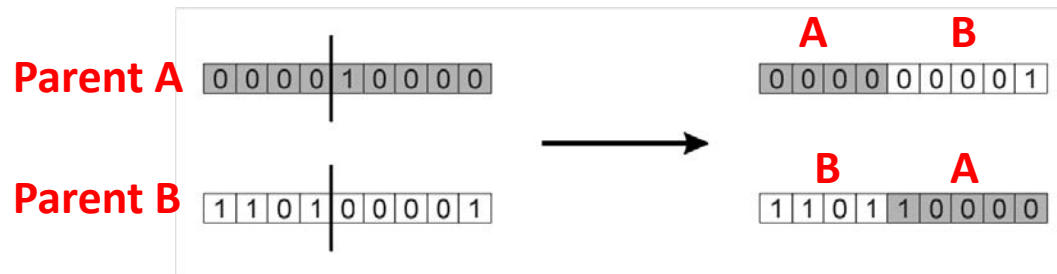
- Sélection naturelle
- Crossover
- Mutation

Présentation de MUSCLE

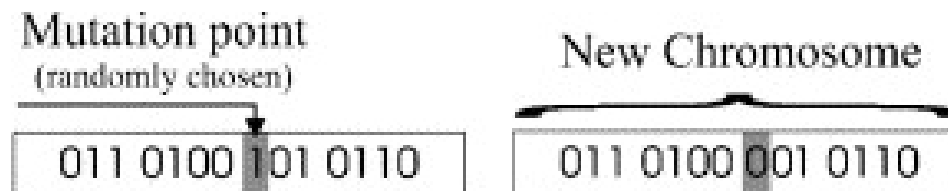
Habituellement, les AG sont utilisés in silico avec un nombre presque illimité d'itérations.

Dans le cadre d'optimisation de gradient LC-MS, plusieurs conditions de départ sont générées en utilisant un échantillonnage par hypercube latin.

Après les dix premiers runs, les deux meilleures conditions sont utilisées pour produire deux nouvelles générations de conditions:

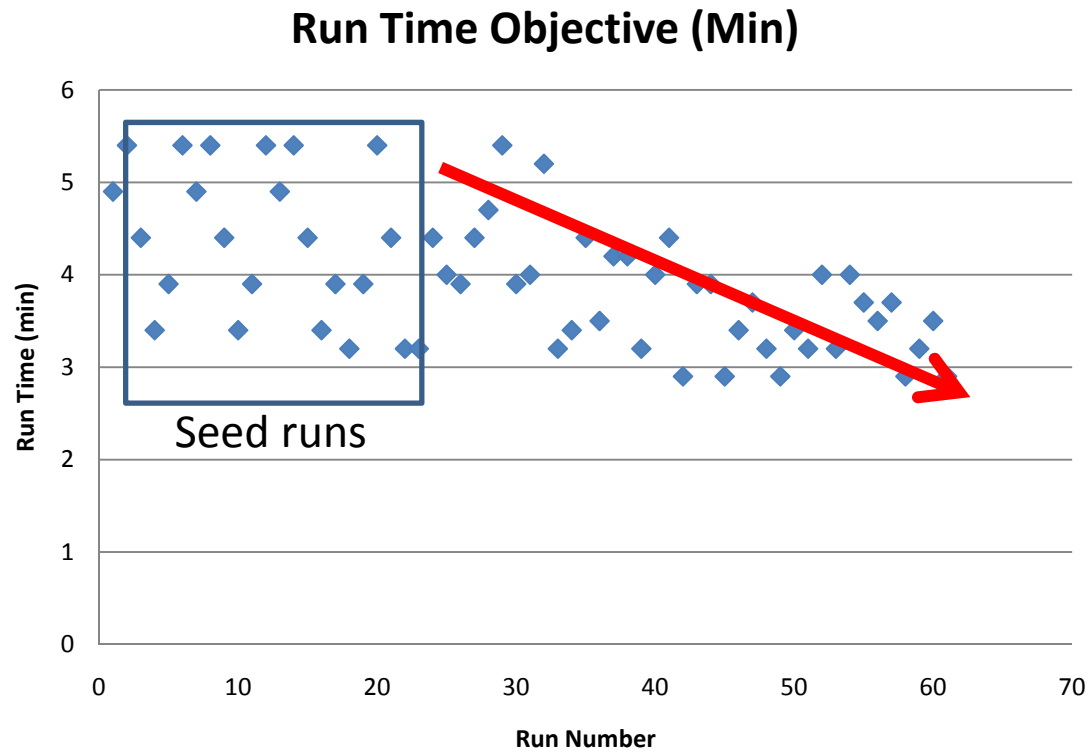


Les nouvelles conditions sont aussi mutées de manière aléatoire.



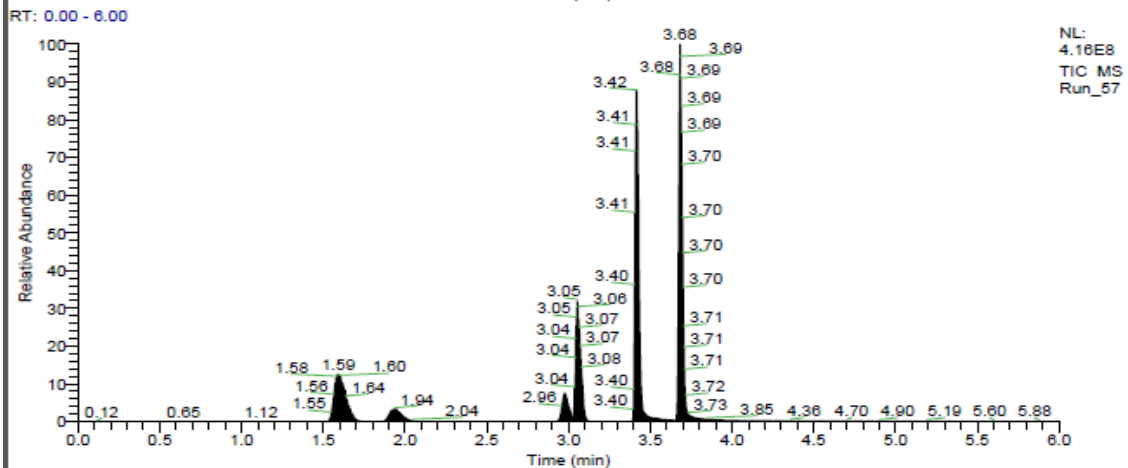
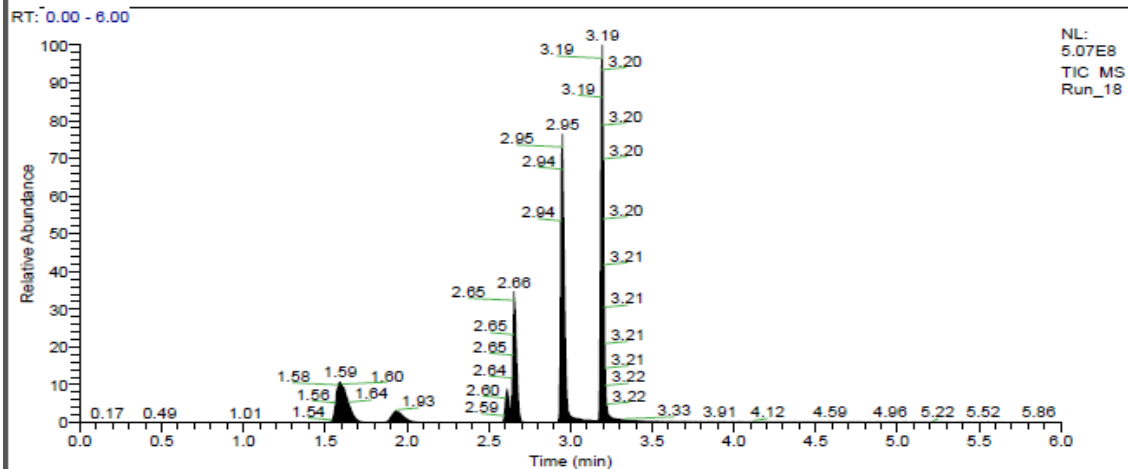
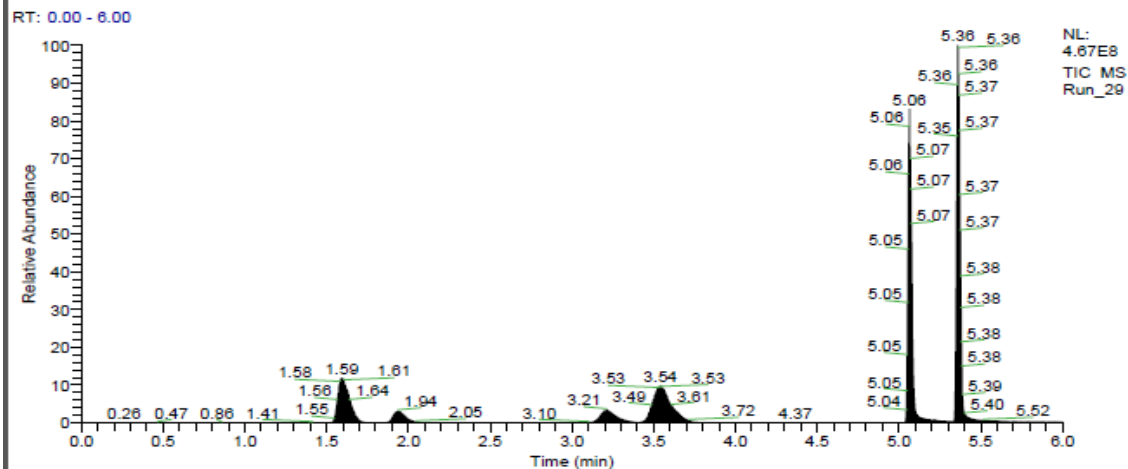
Présentation de MUSCLE

Après n cycles, plusieurs « bonnes » conditions de séparation sont proposées.

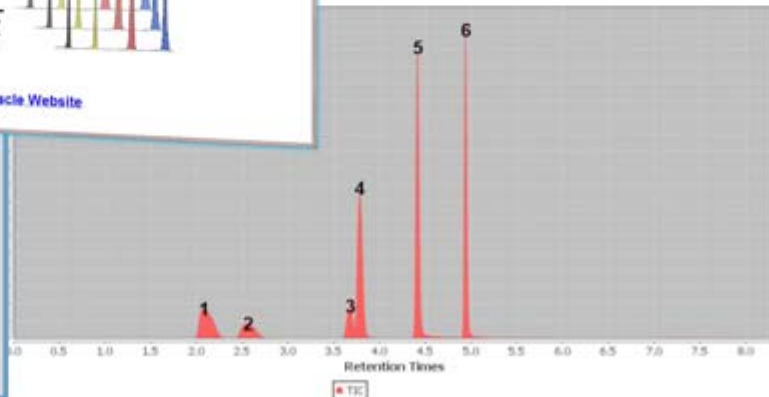
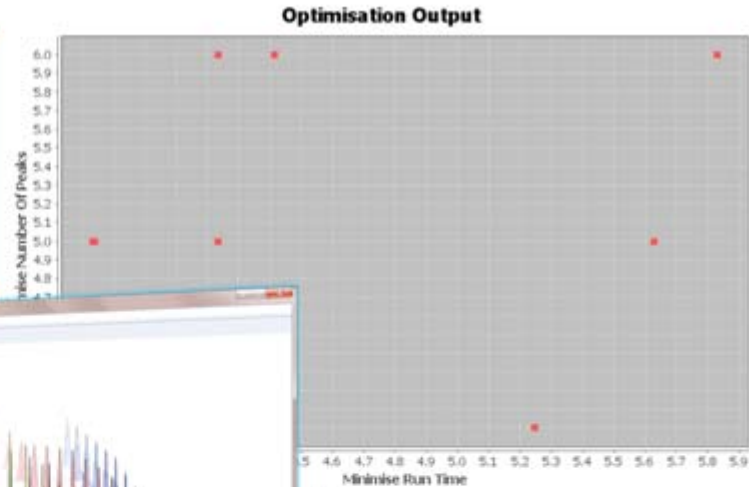
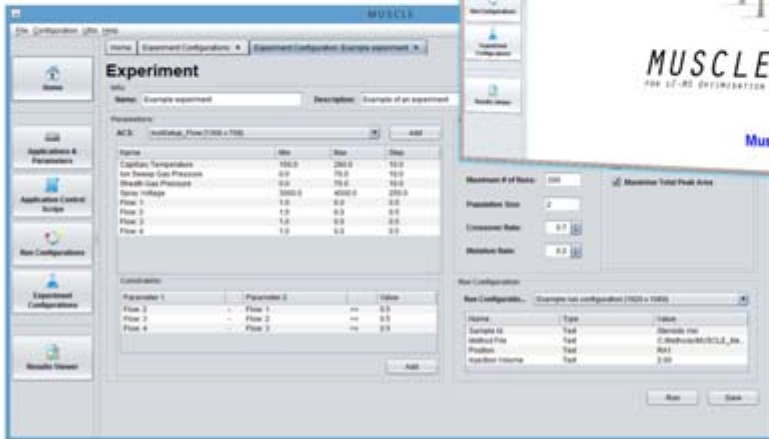
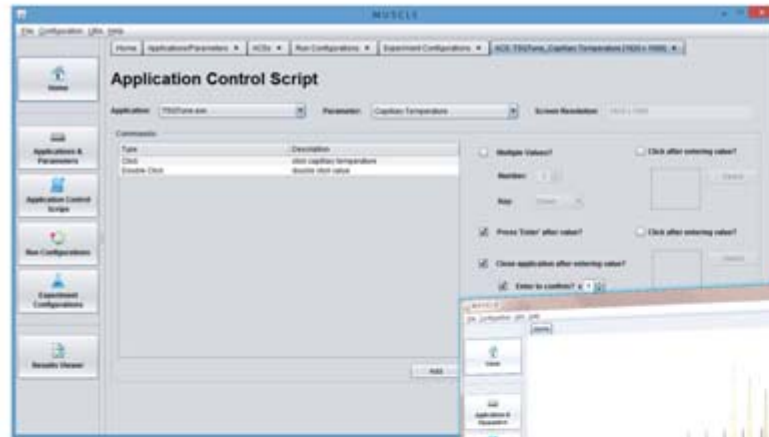


Présentation de MUSCLE

Optimisation automatisée de la séparation de 6 composés par MUSCLE



Présentation de MUSCLE



LC x LC-MS

La sensibilité des appareils nous permet de détecter de plus en plus de molécules dans un extrait.

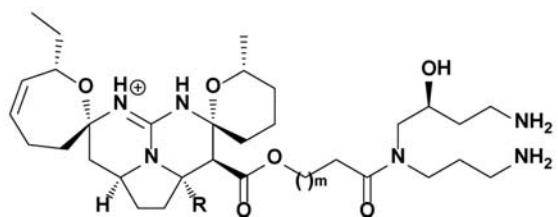
Les colonnes proposées actuellement ne permettent pas toujours d'obtenir une séparation assez bonne pour obtenir un retour à la ligne de base du signal.

Les informations obtenues en masse ne sont donc pas assez précises pour permettre l'identification des métabolites.

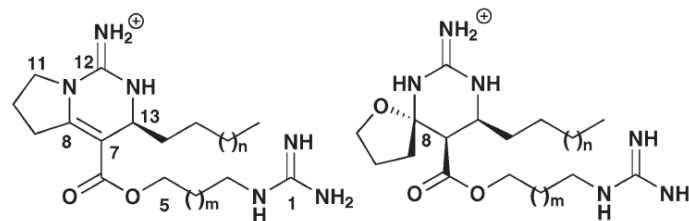
Le couplage de deux colonnes permet de résoudre ce problème.

Application de la LC x LC-MS à un extrait d'éponge marine *Crambe crambe*

De nombreux métabolites ont été isolés de cette éponge (crambescidines, crambescines, etc...) en suivant une approche classique (extraction/purification/RMN/MS)

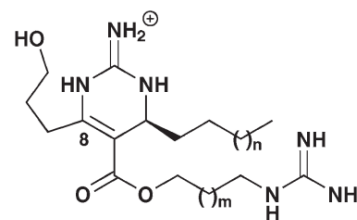


	m	R
Crambescidin-800:	14	H
Crambescidin-816:	14	OH
Crambescidin-830:	15	OH



Crambescins A

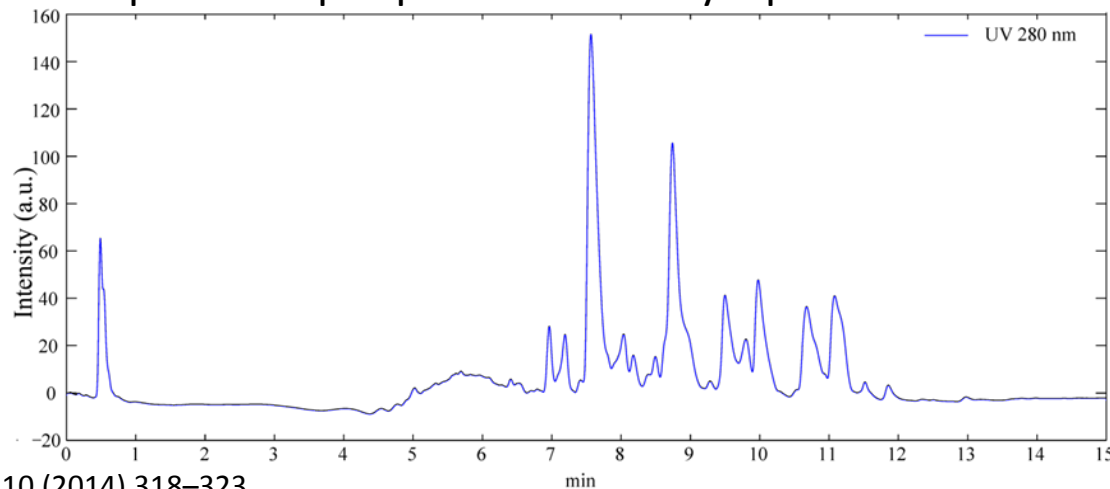
Crambescins B



Crambescins C

$m \geq 4$ and $n = 6$
Crambescins A1, B1 and C1
 $m = 2$ and $n \geq 8$
Crambescins A2, B2 and C2

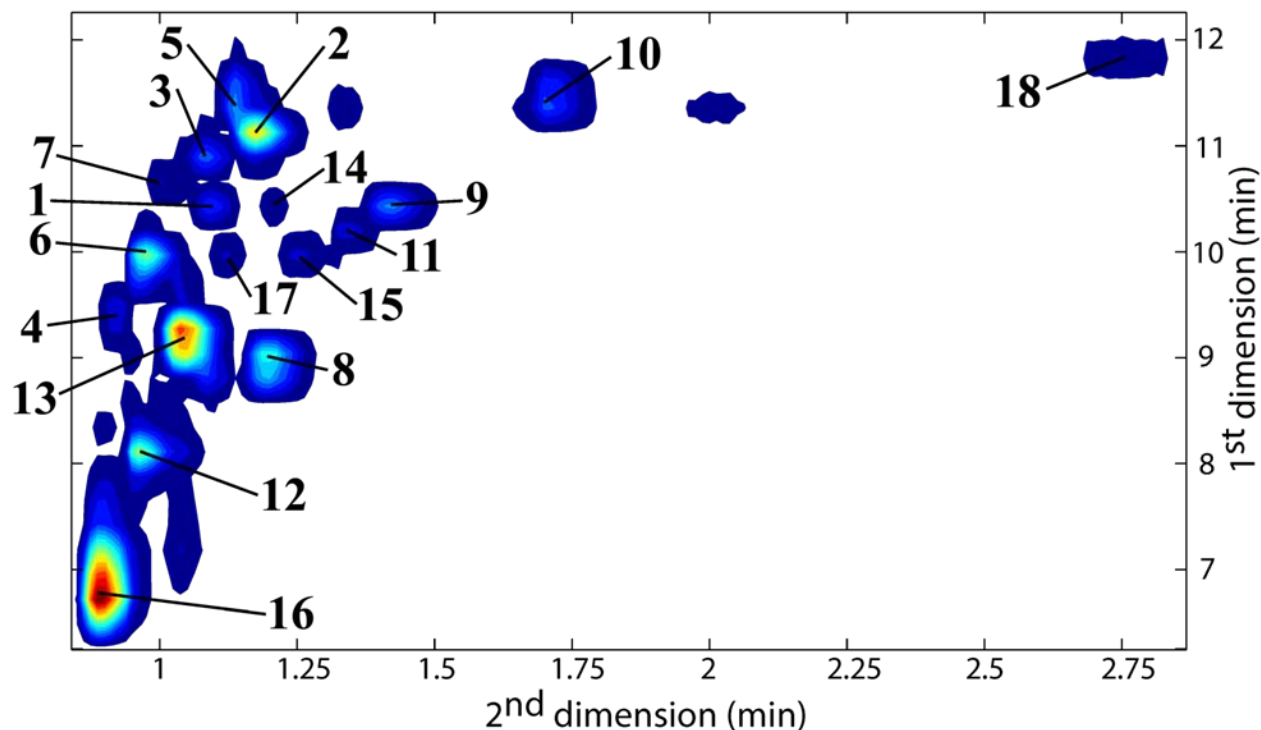
Quand on regarde le profil UV de la fraction méthanol, on constate que la séparation des pics n'est pas parfaite car il n'y a pas de retour à la ligne de base.



Application de la LC x LC-MS à un extrait d'éponge marine *Crambe crambe*

La première séparation est réalisée sur C6-phenyl.

La deuxième séparation est réalisée sur C18.



On constate que les pics sont bien séparés et on peut donc obtenir les spectres de masse MS/MS correspondant à chaque pic.