

Couplage Chromatographie Liquide Phase Normale - Spectrométrie de Masse : Utilisation d'un Liquide de Gainage pour Assister l'Ionisation Electrospray

Laurence Charles¹, Marion Girod¹, Frédéric Laure², Phila Raharivelomanana², Jean-Pierre Bianchini²

¹JE Théorie, Recherche et Applications Concertées en Spectrométrie, Université Aix-Marseille I & III, France

²Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de la Polynésie Française, Tahiti, Polynésie Française

Résumé / Abstract

Une nouvelle interface qui permet le couplage de la chromatographie liquide phase normale à la spectrométrie de masse via une source d'ionisation electrospray est présentée.

Une solution d'acétate d'ammonium dans le méthanol, introduite à l'extrémité de la sonde electrospray, forme un liquide de gainage faiblement miscible à l'effluent chromatographique mais permet une ionisation efficace des composés ciblés.

Les résultats obtenus lors de l'optimisation des conditions expérimentales suggèrent que le processus electrospray est contrôlé par le liquide de gainage qui constituerait la couche externe des gouttelettes chargées.

A novel interface that allows normal-phase liquid chromatography to be coupled with electrospray ionization is presented.

A make-up solution of ammonium acetate in methanol, infused at the tip of the electrospray probe, provides a sheath liquid which is poorly miscible with the chromatographic effluent, but promotes efficient ionization of the targeted analytes.

Optimizing experimental conditions, results were obtained that suggest the electrospray process is under the control of the sheath liquid which would form the external layer of the charged droplets.

Introduction

Les éluants apolaires classiquement utilisés en HPLC phase normale ne présentent pas les propriétés nécessaires au bon déroulement du processus d'ionisation electrospray.¹ Le couplage de cette technique séparative à la spectrométrie de masse est classiquement réalisé en ajoutant à l'effluent chromatographique une solution dont la composition favorise l'ionisation electrospray.²

Cette configuration analytique, appelée "jonction liquide", nécessite une parfaite miscibilité des 2 phases liquides utilisées, ce qui limite les possibilités de couplage. D'autre part, l'introduction post-colonne d'un liquide engendre une dilution des analytes et une dégradation de la résolution chromatographique.

Nous avons développé une interface qui permet d'optimiser les conditions expérimentales d'ionisation indépendamment des conditions de séparation chromatographique. Cette configuration, inspirée des méthodes de couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse,³ consiste à introduire la solution assistant l'ionisation à l'extrémité de la sonde electrospray, sous la forme d'un liquide de gainage.

Les performances de cette méthode ont été évaluées pour l'analyse de néoflavonoïdes dans des extraits de plante⁴ et pour le dosage de l'amitrole dans l'eau.⁵

Conditions expérimentales

Systèmes chromatographiques

◆ Néoflavonoïdes	t (min)	%A	%B
Colonne QS Lichrosorb Si (250 x 4.6 mm, 5 µm)	0	90	10
A: iso-octane	20	60	40
B: iso-octane / isopropanol (90:10, v/v)	30	10	90
Débit: 1 mL/min	40	10	90

◆ Amitrole	t (min)	%A	%B
Colonne Lichrospher 100 NH ₂ (250 x 4.0 mm, 5 µm)	0	90	10
iso-octane / éthanol (60:40, v/v) isocratique	20	60	40
Débit: 1.5 mL/min	40	10	90

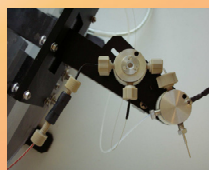
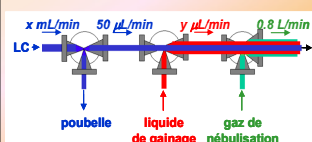
Liquide de gainage

Le liquide de gainage est une solution d'acétate d'ammonium (NH₄OAc) dans le méthanol, dont la composition et le débit ont été optimisés pour chaque couplage. Cette solution est délivrée à l'extrémité de la sonde electrospray au moyen d'une pompe pousse-seringue.

Spectrométrie de Masse

Instrument: spectromètre de masse triple quadripôle Sciex API III Plus équipé d'une source electrospray assistée pneumatiquement et opérée en mode positif. Les molécules protonées, [M+H]⁺, sont générées par dissociation des adduits ammonium dans l'interface du spectromètre de masse. Le signal MS/MS diagnostique de chaque analyte est enregistré en mode réaction multiple.

Configuration de l'interface



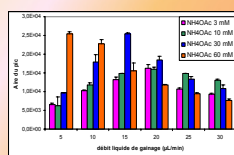
Cette interface est constituée d'un arrangement triaxial :

➤ l'effluent chromatographique, dont le débit est réduit à 50 µL/min au moyen d'un connecteur T, est introduit dans la région atmosphérique de la source electrospray par un capillaire de silice;

➤ le capillaire de silice est inséré dans un tube métallique (le tube interne) qui délivre le liquide de gainage à la sortie du capillaire;

➤ un troisième tube concentrique (le tube externe) permet l'arrivée du gaz de nébulisation qui assiste la formation de l'aérosol.

Effets du liquide de gainage



□ à haut débit

➤ signal par dilution de l'analyte

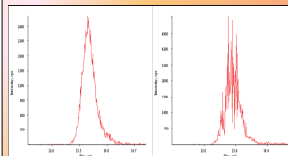
□ jusqu'à 20 µL/min

➤ signal avec le nombre de charges, par le débit ou de la concentration

... jusqu'à atteindre un maximum: plus la concentration en sel dans le liquide de gainage est importante, plus le débit à partir duquel on observe la diminution du signal est faible

Miscibilité des solvants

Un signal plus intense est obtenu dans la configuration "jonction liquide" grâce à de meilleures interactions entre les charges et les molécules d'analyte.⁶



liquide de gainage 60mM NH₄OAc @ 5 µL/min

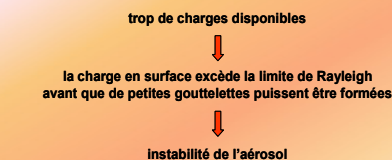
jonction liquide 60mM NH₄OAc @ 20 µL/min

Néanmoins, la faible miscibilité entre les 2 phases liquides engendre une instabilité de l'aérosol et une très mauvaise résolution du pic chromatographique.

L'aspect du signal obtenu avec le liquide de gainage suggère que les 2 phases liquides se mélangent peu.

Interprétation / processus Electrospray

La perte de sensibilité observée lors de l'utilisation du liquide de gainage pourrait être due à un effet de surcharge :



effet de surcharge ➔ peu de mélange entre les 2 liquides

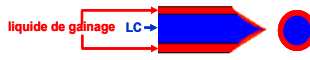
Rôle du liquide de gainage

Les gouttelettes chargées générées lors de l'électronebulisation présenteraient la composition suivante:

➤ une couche externe constituée par le liquide de gainage contenant les charges

➤ un cœur constitué par l'effluent chromatographique neutre

Cet effet serait d'autant plus favorisé que la miscibilité entre les 2 phases liquides est limitée.

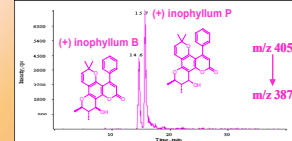


Application I - Néoflavonoïdes

Des néoflavonoïdes isolés de certaines parties de la plante *Calophyllum inophyllum* ont montré des propriétés anti-HIV.⁷

Pour rechercher ces molécules actives dans des extraits végétaux, il est nécessaire de séparer des composés isomères, comme les épimères inophyllum B et inophyllum P. Cette séparation n'a pu être réalisée que par HPLC phase normale.

liquide de gainage: MeOH à 60 mM NH₄OAc @ 5 µL/min



Le liquide de gainage permet l'ionisation electrospray des 2 épimères séparés par HPLC phase normale.

Performances de cette méthodologie

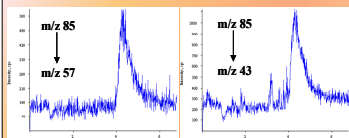
inophyllum B, LD = 25 ng/mL

inophyllum P, LD = 100 ng/mL

Application II - Amitrole

Le caractère fortement polaire de l'amitrole pose de nombreux problèmes pour analyser ce composé dans des échantillons d'eau. Notamment, pour être analysé par LC-MS, l'amitrole doit préalablement être dérivatisé afin d'être retenu en HPLC phase inverse⁸ ou ionisé en APCL.⁹

liquide de gainage: MeOH à 3 mM NH₄OAc @ 10 µL/min



Le liquide de gainage permet l'ionisation electrospray de l'amitrole après HPLC phase normale.

➔ détection spécifique et sensible de l'amitrole par spectrométrie de masse sans dérivatisation

Performances de cette méthodologie

La limite de détection de l'amitrole a été établie à 1.6 ng.

Conclusion

L'utilisation d'un liquide de gainage permet le couplage de la chromatographie phase normale à la spectrométrie de masse via une interface electrospray.

Les conditions d'ionisation peuvent être optimisées indépendamment des conditions chromatographiques car le liquide de gainage permet l'ionisation electrospray des composés même s'ils sont faiblement miscibles avec l'effluent chromatographique.

Références

- Wang G, Cole RB. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Cole RB (ed) Wiley: New York, 1997: 137.
- Shang DY, Ikonomou MG, Macdonald RW. *J. Chromatogr. A* 1999 (849) 467.
- Tsai CY, Hei GR. *J. Chromatogr. A* 1996 (743) 315.
- Charles L, Laure F, Raharivelomanana P, Bianchini JP. *J. Mass Spectrom.* 2005 (40) 75.
- Girod M, Delaurent C, Charles L. *Submitted for publication*.
- Lam W, Ramanathan R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002 (13) 345.
- Ishikawa T. *Heterocycles* 2000 (53) 453.
- Pachinger A, Eisner E, Begutler H, Kius H, Fresenius J. *Anal. Chem.* 1992 (64) 413.
- Bobeldijk I, Broeks K, Speksnijder P, van Leerdam T. *J. Chromatogr. A* 2001 (938) 15.