



## Symposium du DSRG : vendredi 14/10/2016

### «Vers une centralisation accrue et automatisée de la préparation des injectables»

#### Analyse chimique : UPLC vs HPLC

Pr L.Galanti, MD, PhD

Laboratoire de biologie médicale, CHU UCL Namur, Yvoir, Belgique

La chromatographie liquide a été inventée au début du 19<sup>ième</sup> siècle par Mikhail Tswett, un botaniste russe, qui a séparé la chlorophylle et les caroténoïdes. En 1952, Archer Martin et Richard Synge ont reçu le prix Nobel de Chimie pour leur Théorie et Pratique de la Chromatographie de Partage.

La chromatographie est une méthode physico-chimique permettant la séparation de différents composants d'une solution par leur répartition entre deux phases, une phase mobile et une phase stationnaire. Elle est classifiée en fonction de la nature du support (couche mince, colonne) et de la phase mobile (liquide, gaz). Différents mécanismes d'interaction sont utilisés pour la séparation (adsorption, partage, échange d'ions, exclusion stérique, ...). L'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) s'est développée au fil du temps avec des progrès technologiques permettant l'émergence de l'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). L'appareillage HPLC ou UPLC comporte une chambre de mélange, un injecteur, une pompe, une colonne, un détecteur et un intégrateur. Le détecteur, en absence d'un détecteur universel, peut être de différents types : UV visible avec ou sans barrette de diodes, fluorescence, électrochimique pour les plus utilisés en chimie clinique. Les détecteurs UV, fluorescence et électrochimique sont sensibles et spécifiques, en particulier le détecteur UV avec barrette de diodes, peuvent travailler en mode gradient et sont peu sensibles aux variations de température et de débit. Les détecteurs à fluorescence et électrochimique sont sensibles à l'oxygène dissous. Les détecteurs UV sont d'entretien plus facile, le détecteur électrochimique nécessitant un entretien constant de sa cellule. Le principe de l'UPLC est identique à celui de l'HPLC. Cependant, le diamètre des particules de la phase stationnaire en UPLC est inférieur à celui de l'HPLC (1.75 à 1.8µm versus 3-10 µm), la pression de travail (>15000 psi versus 5000 psi) et la température de la colonne supérieures, le volume d'échantillon plus faible avec une cellule de détection plus réduite. L'UPLC a ainsi permis d'augmenter la vitesse d'analyse tout en augmentant la résolution et la sensibilité. A titre d'exemple, le passage de l'HPLC à l'UPLC pour doser la vitamine A et la cotinine urinaire a permis une diminution du volume d'échantillon et du temps d'analyse d'un facteur 2 à 10. HPLC et UPLC sont utilisées au laboratoire pour le dosage de paramètres cliniques courants (vitamines, hormones, ...) ou marqueurs spéciaux et pour l'analyse de la stabilité des médicaments en solutions (antibiotiques, antiviraux, antifongiques, antiinflammatoires, antitumoraux, ...).

Les domaines d'intérêt de cette technologie sont très variés : chimie, environnement, industrie alimentaire, pharmacie, biosciences et médecine. Ses avantages sont nombreux : possibilité d'analyse quantitative, précise et reproductible de différents types de composés, technique flexible, personnalisable et automatisable avec un haut pouvoir de séparation et une grande sensibilité de détection. Cependant cette technique reste relativement complexe et doit encore faire appel à un personnel qualifié.

Les défis de la chromatographie restent multiples : augmentation de la sensibilité, spécificité, précision, fiabilité et facilité d'utilisation, et diminution du temps d'analyse et des coûts. Actuellement HPLC et UPLC sont de plus en plus souvent couplés à la spectrométrie de masse permettant une intégration simultanée des données optiques et de masse, la confirmation de l'identification d'un composé, la quantification de composés de faible concentration, la limitation des co-élutions et la détection de molécules n'absorbant pas dans l'UV.

L'HPLC et l'UPLC sont un moyen fiable d'identification et de quantification de nombreux composés, incontournable dans de nombreux domaines scientifiques et en développement constant, pouvant être couplé à d'autres méthodes d'analyse mais qui nécessite encore une certaine expertise.