



Eau ultrapure pour procédure analytique HPLC



Pour en savoir plus : www.sartorius.com

Introduction

L'HPLC désigne la procédure analytique de chromatographie en phase liquide qui permet la séparation, l'identification et la quantification de substances. La technique HPLC (pour High Pressure Liquid Chromatography, chromatographie en phase liquide à haute pression) a été développée dans les années 1960. La qualité des appareils et des matériaux remplissant les colonnes s'étant perpétuellement améliorée, on parle, depuis les années 1970, de High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance) [1].

Lors de l'analyse HPLC, le mélange à séparer est acheminé dans la colonne de séparation à l'aide d'un solvant (éluant) ou d'un mélange de solvants (éluant/phase mobile) et via un injecteur et une pompe. La colonne de séparation est généralement constituée d'un tube en acier inoxydable et elle contient ce qu'on appelle la phase stationnaire. La phase stationnaire est généralement composée de particules poreuses de gel de silice ou de polymères, à la surface desquelles sont liés des ligands chimiques. Ces ligands sont responsables des interactions sélectives des analytes avec la phase stationnaire, qui sont nécessaires à une séparation chromatographique efficace. En fonction de l'échantillon et de la phase stationnaire, on peut utiliser plusieurs mécanismes de séparation, comme l'adsorption, la force de van der Waals, l'échange d'ions, l'exclusion stérique, etc. Pendant la séparation, les substances échantillons sont retenues plus ou moins longtemps par le matériau de la colonne et quittent donc la colonne après des durées différentes. Les différents composants échantillons sont ensuite enregistrés par le détecteur et évalués dans un ordinateur. Le résultat est un chromatogramme. Le nombre des pics correspond au nombre de composants échantillons séparés, la surface est proportionnelle à leur quantité (cf. Kromidas 2000 [1]).

L'une des applications classiques de l'HPLC est l'analyse des sucres. Pour la mise en évidence spécifique de ces sucres, des méthodes enzymatiques (p. ex.

détermination GOD/POD pour le glucose [2]) ou spectroscopiques (p. ex. détermination du fructose d'après Dische et Borenfreund [3]) ont pu être appliquées. Actuellement, dans la procédure analytique moderne, les sucres sont souvent déterminés à l'aide d'une chromatographie sur couche mince (CCM), d'une chromatographie en phase gazeuse (CPG) et d'une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Ces méthodes sont principalement utilisées pour séparer des mélanges composés de plusieurs sucres [4].

Lors de l'HPLC, comme elle est décrite ici, la phase mobile doit être particulièrement pure, tant du point de vue physique que chimique. Elle ne doit contenir aucune particule, aucune particule en suspension d'origine mécanique et aucune substance dissoute libérée tardivement par la colonne et émettant un signal. Souvent, la qualité de l'éluant est décisive pour la fiabilité d'une analyse HPLC. La présence d'impuretés en traces dans l'éluant par gradient peut entraîner des pics fantômes. Au cours de l'analyse, ces substances en traces sont enrichies dans la colonne, d'où elles s'écoulent plus abondamment lors du remplacement d'éluant suivant. L'eau utilisée pour la phase mobile doit être stérile. Elle peut ainsi être mélangée avec des substances (p. ex. sels de cuivre, azoture de sodium) qui empêchent la contamination de la phase mobile ou l'apparition d'algues [5]. Il convient de respecter les recommandations du fabricant de la colonne, car l'utilisation d'additifs inadaptés peut entraîner des dommages irréparables de la colonne.

Même une eau douce ou distillée contient encore des quantités considérables de substances organiques qui peuvent occasionner des pics fantômes [5]. Une phase mobile impure peut créer des dépôts sur la phase stationnaire et provoquer des colmatages, qui se manifesteront à travers une augmentation de la pression et un décalage de la durée des échantillonnages.

L'eau requise pour l'analyse HPLC peut être achetée auprès de divers fabricants, mais elle peut aussi être fabriquée sur place et selon les besoins de l'établissement grâce à un système de préparation de l'eau, p. ex. le système arium® pro VF.

Les paragraphes suivants rendent compte d'expériences de séparation de mélanges de sucres au cours desquelles l'eau ultrapure fabriquée grâce à arium® pro VF servait de phase mobile.



Illustration 1: système de fabrication d'eau ultrapure arium® pro VF (© Sartorius)

Description du système de fabrication d'eau ultrapure arium® pro VF

Le système arium® pro VF (ill. 1) a été conçu pour produire de l'eau ultrapure à partir d'eau potable prétraitée, et pour éliminer les impuretés résiduelles de cette eau. La production d'eau ultrapure exige une recirculation continue de l'eau ultrapure dans le système et un flux d'eau constant, ce que l'on obtient par un système de pompe avec régulation de la pression. La conductivité de l'eau d'alimentation (entrée d'eau) et de l'eau produite (sortie d'eau) est mesurée. Le système arium® pro VF (modèle précédent ayant les mêmes caractéristiques techniques que le système représenté avec un nouveau design) utilisé au cours des analyses présentées ici fonctionne avec deux cartouches différentes. Elles sont remplies d'un adsorbant spécial au charbon actif et de résines échangeuses d'ions à lit mélangé afin de fournir de l'eau extrêmement pure à faible teneur en TOC. De plus, le

système est également équipé d'une lampe UV qui a un effet germicide et oxydant à des longueurs d'onde de 185 et 254 nm.

Le système arium® pro VF comprend également un module ultrafiltrant qui sert de filtre pour la filtration tangentielle. Les membranes d'ultrafiltration utilisées retiennent les colloïdes, les microorganismes, les endotoxines, l'ARN et l'ADN.

Un filtre final de 0,2 µm est installé à la sortie de l'eau pour éliminer les particules et les bactéries pendant le soutirage de l'eau ultrapure produite.

Matériaux et méthodes

L'analyse des échantillons a été effectuée à l'aide d'un système HPLC Agilent série 1200 équipé d'une colonne « HPLV Rezex RNM Carbohydrate Na+8% » de l'entreprise Phenomenex [6]. Cette colonne est remplie de copolymère polystyrène-divinylbenzène réticulé, modifié avec des groupes de sulfonate de sodium. Ce matériau utilise le mécanisme d'exclusion des ions. Cela signifie que les analytes sont séparés selon différentes interactions ioniques. Les groupes de sulfonates présents à la surface du matériau entraînent la charge négative des pores. Par conséquent, les molécules à charge négative ne peuvent pénétrer dans les pores du matériau et éluent plus rapidement. Cette exclusion se base sur l'équilibre Gibbs-Donnan pour les ions sur membranes. Les analytes qui peuvent pénétrer dans les pores sont ensuite séparés sur la base de différences stériques et d'interactions hydrophobes et polaires avec les groupes fonctionnels à la surface de la phase stationnaire. Pour des informations plus détaillées sur le mécanisme de séparation, voir [7].

Les durées de rétention des différents sucres ont été déterminées grâce à l'enregistrement de l'indice de réfraction (RI). Le signal RI est communiqué dans un chiffre sans dimension en nRIU (nano Refractive Index Unit) et indique la différence entre l'indice de réfraction de l'échantillon dans

Tableau 1 : méthode HPLC

Paramètres		
Débit	[ml/min]	0,6
Temps	[min]	25
Pression maximale	[bar]	70
Température du four à colonne	[°C]	75
Température du détecteur RI	[°C]	35
Volume d'injection	[µl]	2



La France possède le train le plus rapide au monde. Nous proposons les équipements de laboratoire SCALA.

Équipements de laboratoire
Made in Germany





la cellule échantillon et la phase mobile dans la cellule de référence.

L'eau ultrapure utilisée comme phase mobile a été fabriquée grâce au système arium® pro VF.

Déroulement de l'analyse HPLC

Lors de la préparation des analyses, la colonne Rezex a été amenée à la température de 75 °C dans le four à colonne et rincée pendant la nuit au rythme de 0,6 ml/min avec l'eau ultrapure arium® pro VF. L'unité optique du détecteur RI a été amenée à la température de 35 °C. Les échantillons à analyser ont été ajoutés à l'eau ultrapure arium® pro VF et préfiltrés à l'aide d'un filtre à seringue de 0,2 µm (filtre à seringue Sartorius Minisart® RC4 17822). L'analyse HPLC des échantillons a été effectuée selon les paramètres définis d'une méthode établie pour l'HPLC [6] (tableau 1).

Tableau 1 : méthode HPLC

Résultats

Pour déterminer les durées de rétention des différents sucres, il a fallu les ajouter et les injecter un par un (illustration 2). Les sucres présentant des interactions plus ou moins fortes avec la phase stationnaire, des durées de rétention spécifiques ont été enregistrées pour chaque sucre avec le détecteur RI après leur passage dans la colonne.

Après détermination des différents sucres, un mélange de sucres a été fabriqué et séparé (ill. 2).

Les différents sucres ont été séparés les uns des autres. Les pics correspondant aux différentes durées de rétention peuvent être attribués aux différents sucres préalablement déterminés.

L'effet des impuretés, soit l'influence des sels, a été reconstruit grâce à une injection d'eau du robinet et de tampon phosphate salin (ill. 3).

L'injection d'eau du robinet (conductivité : 265 µS/cm) et du tampon phosphate salin (conductivité : 1700 µS/cm) présentent des signaux nets et peuvent ainsi être identifiées à coup sûr comme des impuretés. Les ions à charge multiple de l'eau du robinet se lient facilement aux groupes de sulfonates. Il en résulte une modification de l'équilibre de dissociation qui peut influencer les durées de rétention des sucres. Pour que l'analyse HPLC présente des durées de rétention stables sans pics fantômes, la phase mobile doit donc être dépourvue de sels et d'impuretés. L'eau arium utilisée ici présente une conductivité de 0,055 µS/cm et elle ne contient pas d'impuretés susceptibles de fausser les résultats. Cela se manifeste à travers la ligne de base rectiligne dépourvue de pics (ligne de base verte sur l'illustration 3).

La pression de la colonne pendant les phases est maintenue à 23 bar. Cela prouve l'absence de tout dépôt sur la colonne. Les blancs de méthode effectués au début et à la fin n'ont présenté aucune modification : il n'y avait donc aucune impureté dans la phase mobile.

Pour déterminer la reproductibilité et la limite de détection, des séries standard présentant différentes concentrations ont été analysées. L'exemple présenté ici est celui du raffinose.

Les durées de rétention identiques obtenues à chaque fois montrent une excellente reproductibilité. La série standard du raffinose présente un déroulement linéaire jusqu'à une concentration de 0,015 mg/ml (ill. 4).

L'établissement d'une droite standard à partir des surfaces de pics permet une quantification d'échantillons, ici du raffinose, avec une concentration inconnue.

Conclusion

Les résultats montrent que l'eau ultrapure arium® pro VF peut être utilisée sans problème comme phase mobile pour

l'analyse HPLC de sucres. Les interactions de l'échantillon avec la phase stationnaire ne sont pas influencées par la phase mobile car l'eau ultrapure présentant une conductivité de 0,055 µS/cm, elle peut être considérée comme dépourvue de toute impureté. Aucun pic fantôme n'apparaît sous l'effet de sels [5]. De plus, les essais permettent de conclure que l'absence d'impuretés n'entraîne aucun dépôt sur la phase stationnaire, lesquels se manifesteraient par une augmentation de la pression et un décalage de la durée des échantillonnages.

L'eau ultrapure arium® pro VF pouvant être fabriquée à tout moment constitue une alternative rentable à l'eau ultrapure disponible dans le commerce pour la production de phases à haute pureté requises pour les procédures analytiques HPLC

Bibliographie

- 1- Kromidas, Stavros : HPLC für Neueinsteiger, extrait d'Internet, ©by Novia GmbH, (2000)
 - 2- Hans Ulrich Bergmeyer, Principes de l'analyse enzymatique, volume II, Verlag Chemie, pages 1 179,1 180 (1970)
 - 3- Dische, Z. et Borenfreund, E. : A New Spectrophotometric Method for the Detection of Keto Sugars and Trioses, J. Biol. Chem. 192, 583-587, (1951)
 - 4- Süßwaren, livret 10, page 7, LCI-Focus, (2006)
 - 5- Gottwald, W. : RP-HPLC für Anwender. Série : Die Praxis der instrumentellen Analytik, Gruber, U. et Klein, W. (dir.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pages 7-8 (1993)
 - 6- Catalogue des produits de chromatographie 12/13, Phenomenex, pages 232-233, (2012)
 - 7- Weiß, Joachim : Ionenchromatographie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, chapitre 5, pp. 349 sqq. (2001)
- Remerciements
Nous remercions l'entreprise Phenomenex d'Aschaffenburg d'avoir gracieusement mis à notre disposition la colonne Rezex RNM Carbohydate.

Auteurs

Katrin Töppner, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Dirk Hansen, Phenomenex, Aschaffenburg
Elmar Herbig, Sartorius Weighing Technology, Göttingen
Date : 26.4.2013

Téléchargez gratuitement l'article complet dans la rubrique White Papers de notre site www.gazzetelabo.fr

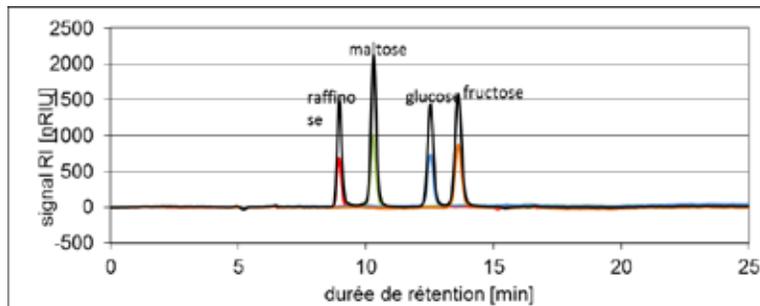


Illustration 2 : séparation de sucres injectés individuellement et d'un mélange de sucres via une colonne Rezex RNM Carbohydate Na+ 8% avec l'eau ultrapure arium® pro VF. bleu : mélange de sucres

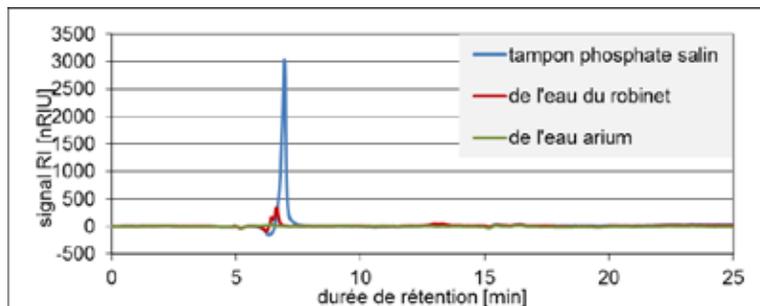


Illustration 3 : chromatogrammes du tampon phosphate salin, de l'eau du robinet et de l'eau arium

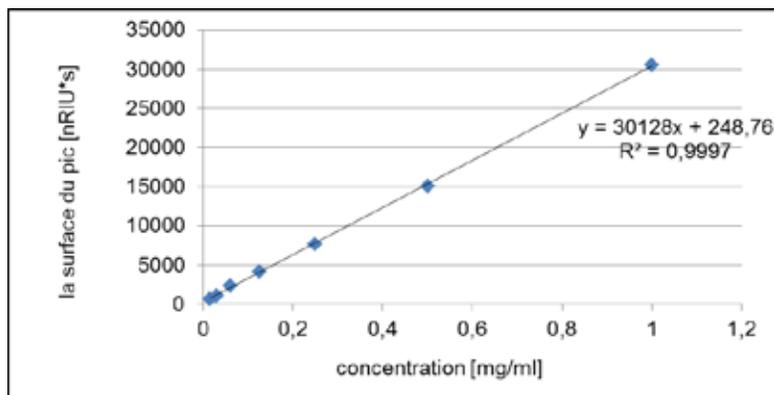


Illustration 4 : série standard pour le raffinose via une colonne Rezex RNM Carbohydate Na+ 8% avec eau ultrapure arium® pro VF

A la pointe de la qualité pour des analyses fiables!

- Pointes de pipette et pointes à filtre, standard ou Ultra Low Retention, stériles ou non.
- Nouvelles pointes**
Maintenant toutes les pointes jusqu'à 1000 µl sont exemptes de DNA, de RNase et d'ATP. Tailles supplémentaires!
- Nouvelles boîtes**
TipBox avec couvercle rabattant/cloche pour ouverture et fermeture d'une seule main
- Nouveaux racks**
TipRacks avec suremballage PET recyclable, réduction de déchets de plus de 20%
- Nouvelles unités de recharge**
TipStack™ – système de recharge peu encombrant se composant de 5 racks et d'1 TipBox

Le tout nouveau système de pointes BRAND!

NOUVEAU!

analytica: Hall B1/Stand 323

BRAND GMBH + CO KG
www.brand.de - info@brand.de