



# Effets nocifs de l'acide formique sans adjonction de sel sur l'analyse HILIC des composés basiques

A. Carl Sanchez et Monika Kansal - Phenomenex Inc., Torrance, Californie

Contact France : Phenomenex SAS, Tel : 01 30 09 21 10, Fax : 01 30 09 21 11, Email : franceinfo@phenomenex.com, Web : www.phenomenex.com

## Résumé

L'acide formique est un additif souvent utilisé dans la phase mobile afin d'ajuster le pH en chromatographie liquide à phase inverse (RPLC), surtout si elle est couplée à une détection par spectrométrie de masse (MS). Cette pratique a été étendue aux séparations en chromatographie liquide par interaction hydrophile (HILIC). Cependant, les mécanismes d'action et l'importance relative des cations et des anions des tampons sont très différents en mode HILIC et en mode RPLC. C'est la raison pour laquelle la sélection du tampon en mode HILIC doit tenir compte des propriétés chimiques du tampon, de l'analyte et du sorbant utilisés en chromatographie. Le choix du tampon adéquat assurera la réussite ou l'échec de l'analyse HILIC. Ce document a pour objet d'examiner le comportement de l'acide formique avec et sans adjonction des différents sels sur la séparation des analytes basiques en mode HILIC. Il propose des recommandations pour le choix des tampons destinés à l'analyse HILIC des composés basiques.

## Introduction

La robustesse constitue une exigence habituelle des méthodes analytiques ; elle se définit comme l'aptitude de la méthode à fournir des résultats exacts et précis malgré des variations mineures sur le plan de l'équipement et des conditions ambiantes. Précédemment, le mode HILIC a souffert d'une réputation de robustesse insuffisante. Cependant, si les conditions font l'objet d'une sélection judicieuse, où les propriétés physiques de l'analyte, du tampon et du sorbant pour chromatographie, comme l'activité des silanols de surface, sont prises en considération, il est possible de développer de robustes méthodes HILIC. Le mécanisme de rétention HILIC repose principalement sur la partition des analytes polaires entre une couche de solvant enrichie d'eau à proximité de la surface du sorbant et l'éluant relativement plus hydrophobe. D'autres processus physiques jouent également un rôle majeur pour déterminer la rétention et la sélectivité en mode HILIC, tels que l'échange d'ions, la liaison hydrogène, l'interaction de type dipôle-dipôle, etc. Une étude

récentement menée par Hemstrom et Irgum (1) donne un aperçu plus détaillé des mécanismes de rétention en mode HILIC. L'analyse HILIC est généralement effectuée à l'aide de phases mobiles contenant des concentrations élevées (> 70 % v/v) d'acétonitrile. Les solvants organiques ont un effet prononcé sur la valeur de  $pK_a$  des tampons et des analytes, en particulier si la concentration est supérieure à 50 % (v/v). Plusieurs documents de recherche ont décrit en détail l'effet de différents solvants organiques sur la valeur de  $pK_a$  des analytes (2,3). En général, le  $pK_a$  des bases faibles diminue si la teneur organique augmente, alors que le  $pK_a$  des acides faibles augmente. Les variations de la valeur de  $pK_a$  peuvent être assez sensibles dans l'environnement hautement organique employé en mode HILIC. Par exemple, les bases faibles avec un  $pK_a$  en milieu aqueux inférieur à ~4 ne seront généralement pas protonées dans les phases mobiles HILIC lorsque 0,1 % (v/v) d'acide formique est utilisé. Le  $pK_a$  de la base diminue dans la phase mobile HILIC lorsque le  $pK_a$  de l'acide formique augmente. L'augmentation du  $pK_a$  de l'acide formique entraîne une élévation du pH de la phase mobile. La combinaison de ces changements de valeurs opposés du  $pK_a$  résulte en une présence de 0,1 % (v/v) d'acide formique trop faible pour protoner les bases avec un  $pK_a < 4$ . C'est pourquoi l'acide formique peut assurer une performance chromatographique acceptable pour les bases faibles avec un  $pK_a$  en milieu aqueux < ~4. Cependant, les composés basiques avec un  $pK_a$  en milieu aqueux supérieur à ~4 peuvent être protonés dans des conditions d'analyse HILIC avec de l'acide formique. Les bases protonées peuvent participer à des interactions par échange de cations avec les silanols résiduels à la surface du sorbant. Des interactions par échange de cations mal contrôlées peuvent donner lieu à une performance chromatographique médiocre. C'est pourquoi, lors de la sélection d'un tampon pour l'analyse de composés basiques, la valeur de  $pK_a$  des analytes concernés est un facteur à considérer, ainsi que la nature et le  $pK_a$  du tampon.

## Conditions expérimentales

Le système chromatographique comprenait un système Agilent de la série 1100 avec pompe binaire (Palo Alto, Californie), un dégazeur de solvant en ligne, un échantillonneur automatique, un module de surveillance de la température de la colonne et un détecteur à barrette de diodes Agilent 1100, ou encore un spectromètre de masse Applied Biosystems API3000 en tandem avec une interface d'ionisation par électrospray (ESI) TurbolonSpray®. Pour les analyses UV, le système était contrôlé par le logiciel HP Chemstation et pour les analyses MS en tandem, par le logiciel Analyst 1.41.

Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur une colonne Phenomenex Luna® 3 µm HILIC, 100 x 2 mm DI (Torrance, Californie).

## Produits chimiques

La nicotine et la cotinine (1 mg/ml dans du méthanol) ont été obtenues auprès de Cerilliant (Round Rock, Texas). La norcotine, l'acyclovir, le ganciclovir, le toluène (marqueur du volume mort) et tous les tampons et sels (chlorure de lithium, chlorure de potassium, chlorure de sodium, chlorure d'ammonium, formiate d'ammonium, acétate d'ammonium) ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Bellefonte, Pennsylvanie). L'acétonitrile (ACN) a été obtenu auprès de Honeywell Burdick and Jackson (Muskegon, Michigan) et l'acide formique auprès de EMD Biosciences (Madison, Wisconsin). Une solution-mère de norcotine (5 mg/ml) a été préparée en dissolvant 25 mg de norcotine dans 5 ml d'ACN. Elle a été ensuite diluée afin d'obtenir une concentration de norcotine de 1 mg/ml par l'ajout de 1 ml de solution-mère à 4 ml d'ACN. Des étalons (0,1 mg/ml chacun) ont été préparés en ajoutant 100 µl de chaque mg/ml de solution-mère à 700 µl de solution d'ACN. Une solution-mère constituée d'acyclovir et de ganciclovir (0,5 mg/ml) a été préparée en dissolvant 5 mg de chaque composé dans 10 ml d'hydroxyde d'ammonium à 0,1 % (v/v) dans de l'eau. Elle a été ensuite diluée afin d'obtenir des concentrations d'acyclovir et de ganciclovir de 2,5 µg/ml en ajoutant 100 µl de solution-mère à un

tampon de 20 ml d'ACN (90/10)/100 mM de formiate d'ammonium (pH 3,2). Des étalons (500 ng/ml) ont été préparés en ajoutant 1 ml de solution-mère à 2,5 µg/ml à un tampon de 4 ml d'ACN (90/10)/100 mM de formiate d'ammonium (pH 3,2).

## Conditions chromatographiques

Une solution-mère de phase mobile HILIC a été préparée en combinant 1,8 l d'ACN, 200 ml d'eau et 2 ml d'acide formique. La solution de la phase mobile (0,1 % [v/v] d'acide formique dans un mélange d'ACN/eau [90/10]) a été séparée en 7 parties aliquotées différentes de 250 ml. Des solutions-mères séparées (2,5 M) ont été préparées pour chaque sel. Dans chaque partie aliquotée de 250 ml de solution de phase mobile, 1 ml d'une solution-mère de sel différent a été ajouté pour donner une concentration de sel effective de 10 mM. Dans l'aliquote restante de 250 ml de solution de phase mobile, 1 ml d'eau a été ajouté pour assurer que la force électrolytique de toutes les phases mobiles soit équivalente. Toutes les séparations ont été effectuées de manière isocratique à 0,4 ml/min, avec une colonne dont la température était réglée à 25 °C et un volume d'injection de 1 µl. La nicotine et les métabolites ont été détectés par absorption dans les UV à 260 nm. Le ganciclovir et l'acyclovir ont été détectés par MS couplée en tandem en mode ion positif avec transitions de masse, respectivement 256,2 → 152,3 et 226,2 → 152,2.

## Résultats et analyse

### Résultats avec 0,1 % (v/v) d'acide formique dans la phase mobile

Les analytes basiques avec une valeur de  $pK_a$  en milieu aqueux > ~4 peuvent être ionisés dans des conditions d'analyse HILIC avec 0,1 % (v/v) d'acide formique et subir ainsi un échange de cations avec le sorbant. Avec ces analytes, l'acide formique ne permet généralement pas d'obtenir la meilleure performance chromatographique. Une explication de ce comportement s'appuie sur le fait que le cation hydronium généré par l'acide formique ne présente pas de concurrence efficace face aux groupements des silanols ionisés. C'est pourquoi la composante



## Maintenant tout le monde peut avoir la Raman Touch. L'annonce d'une avancée dans la spectroscopie Raman

Profitez de tous les bénéfices de la spectroscopie Raman sans investir beaucoup en temps, en argent ou en efforts. Les tous nouveaux systèmes Thermo Scientific Raman DXR rendent cela possible.

Les systèmes Raman DXR vous permettent de vous concentrer sur vos problèmes particuliers et non sur la maîtrise de l'instrument. Des optiques brevetées, des accessoires d'échantillonnage révolutionnaires et un logiciel intuitif joignent leurs forces pour vous donner un instrument d'analyse intelligent – qui élimine les obstacles à l'application du Raman aux problèmes de chaque instant.

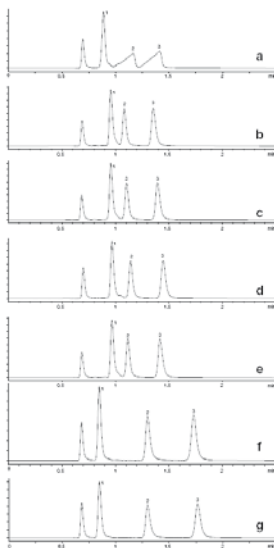
Ainsi, si vous voulez utiliser la spectroscopie Raman de façon simple et abordable, ne vous embarrassez pas de compromis. Passez simplement au DXR Thermo Scientific. Visitez le site [www.spectroscopysimplified.com](http://www.spectroscopysimplified.com), appelez le 01 60 92 48 00 ou envoyez un e-mail à [analyze.fr@thermofisher.com](mailto:analyze.fr@thermofisher.com)

Moving science forward

**Thermo**  
SCIENTIFIC  
Part of Thermo Fisher Scientific



d'échange d'ions qui fait partie de la rétention des analytes basiques cationiques a une plus grande influence sur la performance d'ensemble de la séparation. L'effet combiné du cation hydronium et de l'anion formiate sur la couche d'eau proche de la surface du sorbant peut constituer un facteur supplémentaire. Les effets que différents cations et anions ont sur la structure de locale de l'eau au niveau ou à proximité des surfaces d'espèces diverses, telles que les protéines, les colloïdes et les polymères hydrosolubles, sont bien documentés dans la littérature scientifique (4-7). Comme le mécanisme de rétention en mode HILIC dépend fortement de la couche d'eau semi-immobilisée proche de la surface du sorbant, il est prévu que la performance chromatographique HILIC sera affectée par des changements dans la structure de l'eau localisée et la solvation des ligands occasionnés par les différents cations et anions des tampons. En outre, la force ionique des ~10 % d'acide formique dissocié est faible comparée à celle de tampons préparés à partir de sels. Il en résulte une mauvaise forme des pics, un équilibrage de colonne lent et une reproductibilité médiocre dans l'ensemble avec l'acide formique sans adjonction de sel. La **Figure 1** représente des chromatogrammes indiquant un équilibrage de colonne en mode HILIC à l'aide de 0,1 % (v/v) d'acide formique avec la nicotine, la cotinine et la nornicotine comme analytes basiques. Les valeurs de  $pK_a$  de ces composés sont toutes > 4 et leurs structures et autres propriétés physiques sont illustrées sur la **Figure 2**. Comme indiqué sur cette figure, les temps de rétention diminuent à mesure que le temps passe et les analytes présentent généralement une mauvaise forme de pics lorsque l'acide formique est utilisé sans adjonction de sel. C'est cette instabilité du temps de rétention qui a probablement contribué à l'opinion que le mode HILIC ne présente pas la même robustesse que le mode RPLC. Le comportement non reproductible de la nicotine et des métabolites se distingue nettement de la bonne performance chromatographique des composés basiques faibles, l'acyclovir et le ganciclovir, illustrés sur la **Figure 3**. Ces deux composés ont un  $pK_a$  < 3 et montrent une bonne performance chromatographique avec l'acide formique sans adjonction de sel. Alors qu'il est possible d'améliorer la rétention et la sélectivité pour l'acyclovir et le ganciclovir avec 10 mM de formiate d'ammonium à force ionique plus élevée et pH de 3,2, les deux conditions de la phase mobile assurent une bonne performance.



**Figure 4 :** Effet du  $H^+$  (a),  $Li^+$  (b),  $Na^+$  (c),  $K^+$  (d),  $NH_4^+$  (e), du formiate  $NH_4^+$  (f) et de l'acétate  $NH_4^+$  (g) sur la séparation chromatographique de la cotinine (1), de la nicotine (2) et de la nornicotine (3). Le tout premier pic de chaque chromatogramme correspond au toluène, marqueur du volume mort. Séparation isocratique avec la colonne Luna 3  $\mu m$  HILIC 100 x 2 mm DI à 0,4 ml/min

**Effet de l'anion sur la rétention et la sélectivité**

Il a été démontré que les anions jouent généralement un rôle dominant dans le comportement structurant des électrolytes dans l'eau et c'est pourquoi le rôle de l'anion dans la performance chromatographique en mode HILIC ne peut pas être ignoré. Dans ces exemples, tous les sels étaient des chlorures, à l'exception du formiate et de l'acétate d'ammonium. Il est intéressant de noter que l'adjonction des sels de formiate et d'acétate d'ammonium a eu un plus grand impact sur la rétention que le sel de chlorure d'ammonium. Il faut aussi souligner la baisse de rétention pour la cotinine avec l'adjonction de formiate ou d'acétate d'ammonium. La rétention de la nicotine et de la nornicotine a augmenté avec l'adjonction de sels d'acétate alors que la rétention de la cotinine a diminué. Une explication de ce comportement est l'augmentation du pH de la phase mobile (unités de ~0,5 pH) avec l'adjonction d'acétate ou de formiate. Le  $pK_a$  du groupement fonctionnel de pyridinyl dans la cotinine est bien plus élevé que celui rencontré dans la nicotine et la nornicotine. C'est pourquoi l'augmentation observée du pH en phase aqueuse de 2,7 à ~3,2 avec l'adjonction de formiate ou d'acétate réduit probablement l'ionisation de ce composé. L'ionisation décroissante diminue le caractère hydrophile et réduit donc la rétention en mode HILIC. La valeur bien plus basse du  $pK_a$  (< 4) des groupements fonctionnels de pyridinyl dans la nicotine et la nornicotine explique pourquoi leur rétention ne diminue pas. Au contraire, ces composés présentent une rétention accrue qui peut être liée aux changements survenant dans la couche hydratée, comme indiqué plus haut.

**Conclusions**

L'acide formique est souvent utilisé pour régler le pH de la phase mobile en mode RPLC, mais ce n'est pas le meilleur choix pour la séparation des analytes basiques en mode HILIC. Pour les analytes avec une valeur de  $pK_a$  en phase aqueuse supérieure à ~4, les sels d'ammonium de l'acide acétique et formique assurent une bien meilleure performance chromatographique que l'acide formique et sont toujours compatibles avec la détection MS. Différents contre-ions ont montré qu'ils pouvaient améliorer la performance chromatographique des analytes basiques par rapport à celle observée avec l'acide formique sans adjonction de sel. Le mécanisme d'action responsable de l'amélioration de la performance avec adjonction de contre-ions est probablement la combinaison de plusieurs éléments : une compétition accrue pour les groupements d'échanges de cations silicates à la surface, les changements de propriétés de la couche hydratée et les changements de l'environnement du processus de solvation du ligand. Ces résultats montrent le mécanisme d'action mais aussi l'importance relative des cations et des anions du tampon, exerçant une influence bien plus forte sur la performance en matière de séparation des composés basiques en mode HILIC plutôt qu'en mode RPLC. C'est la raison pour laquelle le choix des anions et des cations du tampon doit prendre en considération le type (acide ou base) et la valeur de  $pK_a$  de l'analyte, ainsi que le type et la valeur de  $pK_a$  du tampon.

**Références bibliographiques**

1. P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, 9, 1784-1821 (2006).
2. S. Espinosa, E. Bosch, M. Roses, *Anal. Chem.*, 74, 3809-3818(2002).
3. L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Rafols, M. Roses, E. Bosch, *Anal. Chem.*, 79, 3180-3187 (2007).
4. W. Kunz, P.L. Nostro, B.W. Ninham, *Curr. Opin. Coll. Inter face Sci.*, 9, 1-18 (2004).
5. K.D. Collins, M.W. Washabaugh, *Quart. Rev. Biophys.*, 18,323-422 (1985).
6. R. Freitag, F. Garret-Flaudy, *Langmuir*, 18, 3434-3440(2002).
7. Y. Zhang, P.S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 658-663 (2006).
8. D. Reichenberg, *Ion Exchange Selectivity, in Ion Exchange, Vol. 1, J.A. Marinsky, Ed., (Marcel Dekker, New York, 1966).*

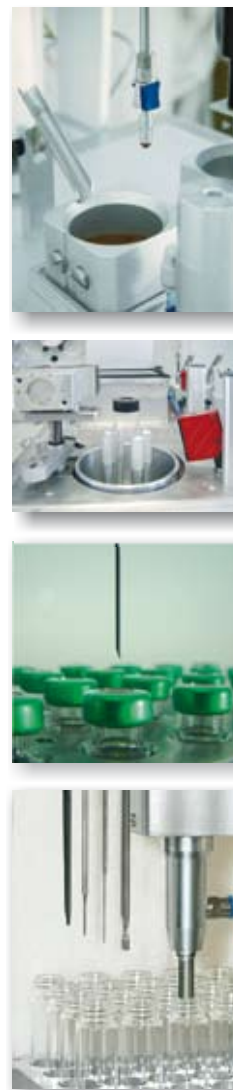
Luna est une marque déposée de Phenomenex, Inc.  
© 2008 Phenomenex, Inc. Tous droits réservés.

La copie ou la réutilisation des présentes informations est soumise à l'autorisation écrite de Phenomenex. Soumis aux termes et conditions standard de Phenomenex, consultables à l'adresse : [www.phenomenex.com/TermsAndConditions](http://www.phenomenex.com/TermsAndConditions)



Les applications évoluées nécessitent des solutions pertinentes. Nous fournissons des systèmes robotisés, à façon, et qui vous assurent des automatisations complètes, plus simples, plus rapides et par conséquent plus efficaces.

Nous intégrons bien plus que des outils de «liquid handling» classiques et c'est la combinaison



d' options et d' accéssoires pertinents, contrôlés par notre logiciel intelligent, qui rendent nos solutions uniques. Citons par exemple:

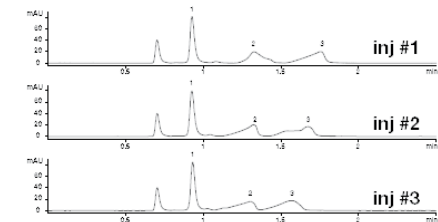
- distributions de poudres et de produits solides
- pesées
- contrôles de température(s)
- ouvertures et fermetures de flacons (à visser ou à serrer)
- prélèvement et distributions de produits visqueux
- filtrations sur tout support, SPE
- mise aux ultra-sons pour dissolutions et nettoyages
- pipetage et mises en solution sous atmosphère inerte
- mesures et ajustements de pH
- contrôle visuel des réactions ou des dissolutions par caméra
- et bien d'autres encore ...

Notre expertise se traduit par des robots vraiment originaux, complets, qui satisfont vos besoins à 100%.

**ZINSSER ANALYTIC**

D-60489 Frankfurt, Eschborner Landstraße 135  
Téléphone: +49 (0)69 789 106-0  
Télécopie: +49 (0)69 789 106 80  
GB-Maidenhead, Berks, SL6 1AP, Howarth Road  
USA-Northridge, CA 91324  
19145 Parthenia Street, Suite C  
Hotline en France: Michel Serralunga  
Téléphone: +33(0)680044013  
email: [msinnoquest@wanadoo.fr](mailto:msinnoquest@wanadoo.fr)  
Internet: [www.zinsser-analytic.com](http://www.zinsser-analytic.com)

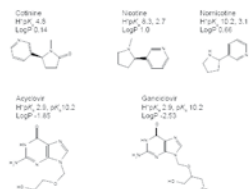
«Rendez-vous sur Forum LABO&BIOTECH du 3 au 6 juin, Stand 034»



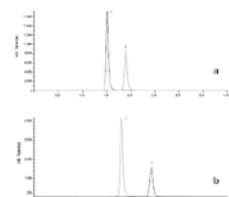
**Figure 1 :** Dérive du temps de rétention de la cotinine (1), de la nicotine (2) et de la nornicotine (3) avec 0,1 % (v/v) d'acide formique dans une phase mobile constituée d'un mélange d'acétonitrile/eau (90/10). Le tout premier pic de chaque chromatogramme correspond au toluène, marqueur du volume mort. Séparation isocratique avec la colonne Luna 3  $\mu m$  HILIC 100 x 2 mm DI à 0,4 ml/min

**Résultats avec 0,1 % (v/v) d'acide formique ajouté à 10 mM de sels dans la phase mobile**

Comme indiqué précédemment, pour les groupements fonctionnels basiques à  $pK_a$  plus élevé de la nicotine et de ses métabolites, l'acide formique sans adjonction de sel ne permet pas d'obtenir une bonne performance chromatographique. Cependant, les formes de pics et la stabilité du temps de rétention sont fortement améliorées si un cation avec une plus grande affinité pour les silanols ionisés, tels que l'ammonium, est ajouté à la phase mobile. Une série d'expériences démontrant l'effet du contre-ion cationique sur la reproductibilité de la forme des pics et du temps de rétention a été effectuée, et les résultats sont représentés sur la **Figure 4**. Comme indiqué sur cette figure, l'adjonction de 10 mM de chlorure de  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  ou  $NH_4^+$  a amélioré la forme des pics et la stabilité du temps de rétention (non illustrée) dans tous les cas. Les augmentations du temps de rétention observées avec l'adjonction de différents cations sont en corrélation avec l'inverse du rayon du cation à l'état hydraté et l'inverse de la série lyotropique « normale ». Il a été démontré que les groupements d'échanges d'ions faibles silicates à la surface du sorbant à base de silice se comportent différemment des échangeurs de cations forts de type sulfonates (8). Ces résultats apparemment anormaux sont probablement dus aux différences d'affinité des échangeurs de cations silicates comparés aux sulfonates (8). Les différents cations et l'anion associé sont également susceptibles d'affecter la couche hydratée proche de la surface du sorbant en modifiant la structure localisée de l'eau, la constante diélectrique et le potentiel zéta.



**Figure 2 :** Structure et propriétés physiques des molécules basiques testées de cotinine, nicotine, nornicotine, ganciclovir et acyclovir.



**Figure 3 :** Séparation en mode HILIC des composés basiques faibles ( $pK_a$  ~2,9), de type antiviraux comme l'acyclovir (1) et le ganciclovir (2), dans un mélange d'acétonitrile/eau (90/10) avec 0,1 % (v/v) d'acide formique (a) et un mélange d'acétonitrile/eau (90/10) avec 10 mM de formiate d'ammonium (b). Séparation isocratique avec la colonne Luna 3  $\mu m$  HILIC 100 x 2 mm DI à 0,4 ml/min