



Utilisation de pH-LC™ pour le contrôle de la sélectivité des composés acides et basiques sur la colonne Gemini®-NX

Par Lawrence Loo, Phil Koerner, Terrell Mathews et Jason Lam, 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

Introduction

L'utilisation du pH de la phase mobile pour contrôler les états d'ionisation des analytes (pH-LC™) dans les séparations HPLC en phase inverse constitue une méthode hautement efficace pour modifier la sélectivité. L'espèce ionisée d'un analyte présente une polarité plus élevée (moins d'hydrophobicité) que l'espèce neutre, ce qui entraîne une perte de la rétention prévue pour l'analyte en question. Ce résultat peut être attribué à une plus faible interaction avec la phase stationnaire hydrophobe et une plus grande affinité avec la partie aqueuse de la phase mobile. Les espèces ionisées ont également des interactions ioniques avec les silanols libres et activés, ce qui a un impact sur la forme des pics et la reproductibilité.

L'acidification de la phase mobile pour neutraliser les groupements silanols est une méthode couramment utilisée pour réduire les interactions secondaires. Cependant, elle ne résout pas le problème présenté par la faible interaction hydrophobe des analytes ionisés avec la phase stationnaire, en particulier les composés basiques à pK_a élevé. De plus, il est possible que les groupements silanols de surface ne partagent pas le même pK_a , c'est pourquoi ils ne sont pas tous neutralisés au même pH.

Le rapport entre le pH de la phase mobile et les états d'ionisation des analytes peut être illustré sur la Figure 1.

Sur cette Figure, le pH de la phase mobile dans lequel survient une dissociation partielle (mélange d'espèces ionisées et neutres) d'acides et de bases, doit être supérieur ou inférieur de deux unités au pK_a de l'analyte. Pour obtenir des états d'ionisation majoritairement simples dans une solution, le pH de la phase mobile doit être supérieur d'au moins deux unités au pK_a de l'analyte.

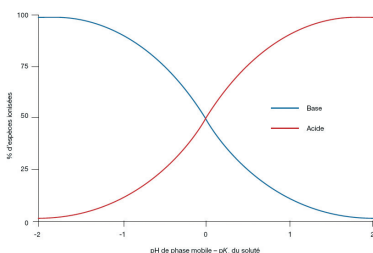


Figure 1 : Rapport entre le pH de la phase mobile et les états d'ionisation d'un soluté

Nous avons analysé l'efficacité de l'utilisation de la technique pH-LC™ pour la séparation d'un mélange de composés acides (naproxène), basiques (amitriptyline) et neutres (toluène) à l'aide d'une colonne Gemini®-NX 5 μ m C18, 150 x 4,6 mm, spécialement conçue pour être très tolérante aux changements du pH dans la phase mobile, sans risque de dégradation. Les structures et les pK_a sont indiqués dans le Tableau 1.

Conditions expérimentales

Système

Système HPLC Agilent HP1100 équipé d'une pompe quaternaire (G1311A), d'un dégazeur (G1322A), d'un échantillonneur automatique (G1313A) et d'un détecteur DAD (G1315B). Un sélecteur de chauffage/refroidissement à 6 colonnes (POWERSelector™) d'Analytical Sales and Services, Inc. a été utilisé. Données analysées à l'aide du logiciel ChemStation (Rév. A.10.02).

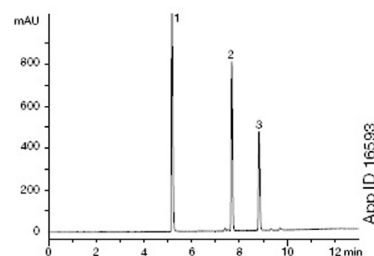
Substances

Acide formique 98 %, qualité ACS, d'EMD (FX0440-11)
Acétate d'ammonium, qualité HPLC, de Fluka (17836)
Phosphate monobasique de potassium, qualité ACS, de Fluka (P285-3)
Bicarbonate d'ammonium > 99 %, de

Fluka (09832)
Hydrochlorure d'amitriptyline > 98 %, de Sigma (A8404)
Naproxène 98 %, d'Aldrich (284785)
Toluène 99,5 %, de Sigma (179418)

Résultats et analyse

Cette expérience a mis en évidence les différents effets du pH de la phase mobile, en présence de tampons variés, sur un mélange de molécules étalons acides, basiques et neutres.



pH 2,7

Phase mobile : A : 0,1 % acide formique dans l'eau

B : 0,1 % acide formique dans l'acétonitrile

Gradient : A/B (95/5) à (5/95) en 10 min, maintenir pendant 2 min

Débit : 1,5 ml/min

Température : Ambiante

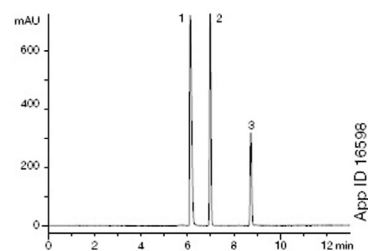
Détection : UV à 254 nm

Échantillon : 1. Amitriptyline

2. Naproxène

3. Toluène

Dans une phase mobile à pH 2,7, l'amitriptyline (base) (pK_a 9,4) est ionisée et présente une rétention à 5,2 minutes. Le naproxène (acide) (pK_a 4,5) est neutre et présente une rétention à 7,7 minutes. Le toluène, la molécule étalon neutre, présente une rétention relativement inchangée (8,7 minutes) pour toute la plage de pH.



pH 4,8

Phase mobile : A : 10 mM acétate d'ammonium, pH 4,8

B : Acétonitrile

Gradient : A/B (95/5) à (5/95) en 10 min, maintenir pendant 2 min

Débit : 1,5 ml/min

Température : Ambiante

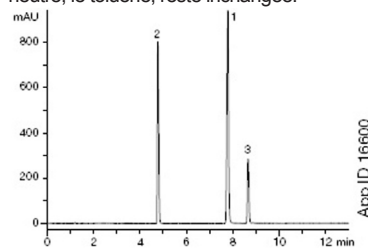
Détection : UV à 254 nm

Échantillon : 1. Amitriptyline

2. Naproxène

3. Toluène

Dans une phase mobile à pH 4,8, l'amitriptyline (base) manifeste une rétention accrue (6,1 min), qui peut être attribuée à l'interaction ionique avec des silanols activés. Le naproxène (acide) est partiellement dissocié (ionisé et neutre) et montre une perte de rétention (7 min). La rétention du composé neutre, le toluène, reste inchangée.



pH 7,0

Phase mobile : A : 20 mM Phosphate de potassium, pH 7,0

B : Acétonitrile

Gradient : A/B (95/5) à (5/95) en 10 min, maintenir pendant 2 min

Débit : 1,5 ml/min

Température : Ambiante

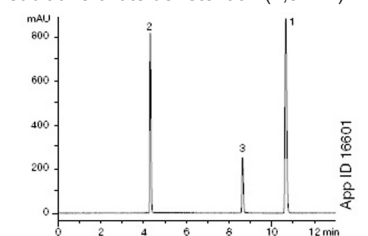
Détection : UV à 254 nm

Échantillon : 1. Amitriptyline

2. Naproxène

3. Toluène

Dans une phase mobile à pH 7,0 l'amitriptyline (base) présente une légère augmentation de rétention (7,8 min) alors que le naproxène (acide), qui est proche d'une espèce principalement ionisée, subit une chute de rétention (4,8 min).



pH 10,5

Phase mobile : A : 10 mM bicarbonate d'ammonium, pH 10,5

B : Acétonitrile

Gradient : A/B (95/5) à (5/95) en 10 min, maintenir pendant 2 min

Débit : 1,5 ml/min

Température : Ambiante

Détection : UV à 254 nm

Échantillon : 1. Amitriptyline

2. Naproxène

3. Toluène

pH, conductivité, O₂, pour les « professionnels »

ProfiLine

La nouveauté!

...simplement
mobiles

Les nouveaux appareils de poche de WTW

- Étanches conforme IP67
- Panneau graphique rétro-éclairé
- Interface USB permettant l'accès direct au ordinateur

WTW France S.a.r.l.
Tél. 04 66 25 46 10 - Fax 04 66 25 46 11
E-Mail: wtwFrance@wtw.fr - Internet: www.WTW.com

WTW, a Nova Analytics company



Dans une phase mobile à pH 10,5, l'amitriptyline (base) est principalement neutre et présente la plus forte rétention (10,6 min), presque le double par rapport à la rétention au pH 2,7. Le naproxène (acide) montre une diminution minimale de rétention (4,3 min) du fait qu'il reste dans un état principalement ionisé. Le toluène reste inchangé.

Les structures et les valeurs pK_a de chaque analyte figurent ci-dessous.

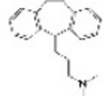
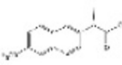

Étalon	Analyte	pK_a
Basique	Amitriptyline 	9.5
Acide	Naproxène 	4.5
Neutre	Toluène 	n/a

Tableau 1. Molécules étalons basiques, acides et neutres et valeurs pK_a correspondantes

Conclusion

Avec l'emploi du pH de la phase mobile en conjonction avec la colonne Gemini-NX C18 à haute stabilité du pH, une manipulation puissante de la sélectivité peut être obtenue lors de l'analyse de composés ionisables à l'aide de la HPLC en phase inverse. Il est possible d'accroître la rétention de la plupart des composés basiques en augmentant le pH de la phase mobile au-dessus de leurs valeurs pK_a . Les mêmes avantages peuvent être obtenus pour la plupart des composés acides par une diminution du pH de la phase mobile sous leurs valeurs pK_a .

La flexibilité de la méthode fournie et l'amélioration de la sélectivité grâce à ces techniques font de Gemini-NX l'élément idéal pour le développement de nouvelles méthodes où les colonnes risquent d'être exposées à une variété de pH avant même d'établir les méthodes optimales en fonction du composé à analyser.

Gemini est une marque déposée de Phenomenex, Inc. pH-LC est une marque de commerce de Phenomenex, Inc. ChemStation est une marque de commerce d'Agilent Technologies. POWERSelector est une marque de commerce d'Analytical Sales and Services, Inc. © 2008 Phenomenex, Inc. Tous droits réservés. La copie ou la réutilisation de ces informations est interdite sans l'autorisation écrite de Phenomenex

Speedwave four – Technologie innovatrice pour appareils de dissolution par micro-ondes

Par Dr. Dieter Gutwerk, BERGHOF Products + Instruments GmbH, Manager, Laboratory Technology
Contact : BERGHOF Products + Instruments GmbH, **Tel.** +49 7121 894-0 - **Fax** +49 7121 894-300 –
Email : info@berghof-instruments.de - **Web** : www.berghof-instruments.de
Contact France : Laurent Bertal, Courtage Analyses Services, **Tel** : +33-2-35 07 6000
Fax : +33-2-35-70 6439 - **Email** : bertal@onlinecas.com - **Web** : www.onlinecas.com

Berghof présente un nouveau système innovateur pour dissolutions par micro-ondes – le speedwave four. Les dissolutions par micro-ondes présentent l'avantage d'une phase de mise à température accélérée et de la dissolution simultanée de plusieurs échantillons. Ceci permet certes à l'utilisateur de traiter un plus grand nombre de prélèvements à la fois, mais la question de la manipulation et de la sécurité, ainsi que de la longévité des récipients et des frais d'exploitation du système reste un point sensible, car il s'avère également nécessaire d'utiliser des récipients sous pression en plastique avec des acides fortement concentrés à des températures de 200-250°C.

En considération de tous ces facteurs, le nouveau speedwave four présente des nouveautés extrêmement intéressantes :

Sécurité grâce à la saisie sans contact de la température et de la pression de tous les échantillons :

À l'aide du thermomètre speedwave DIRC, les températures de tous les échantillons sont mesurées directement et sans contact. Pas de perte de temps due à la mise à température de la paroi du récipient ou des capteurs. Le contrôle optique de la pression permet également la saisie sans contact de toutes les pressions intérieures du récipient. Une mesure dans un récipient référentiel ne s'avère nécessaire pour aucune des deux technologies. La puissance des micro-ondes est commandée à

l'aide du profil de température prescrit et, lorsque la pression intérieure du récipient s'approche de la pression maximum du récipient, par la pression. Le contrôle combiné de la température et de la pression assure la sécurité optimale du processus.

Manipulation extrêmement simple :

Le design « Top-Loading » de speedwave four, assurant le chargement par le haut, simplifie considérablement la manipulation. Plus besoin de soulever complètement le rotor lourd pour le poser dans le four : les récipients sont placés individuellement et retirés de la même façon à l'issue de la dissolution, de sorte que le micro-ondes peut être immédiatement équipé de nouveaux récipients, puis relancé. De ce fait, le débit d'échantillons augmente sensiblement.

Tous les récipients ne se composent que de peu de pièces, ils sont faciles et rapides à fermer et ouvrir, ceci s'effectuant manuellement, sans outillage spécial.

Les capteurs de température et de pression travaillent sans contact et sont « invisibles » à l'utilisateur. Vu qu'ils n'ont plus besoin d'être raccordés avant chaque dissolution, la manipulation du système s'en trouve extrêmement simplifiée.

Faibles frais d'exploitation :

Berghof n'utilise que des récipients sous pression massifs en TFM™-PTFE, dont le récipient et le couvercle se constituent intégralement de TFM™-PTFE résistant à la pression. La présence d'une enveloppe de pression et/ou d'un couvercle dans d'autres matières plastiques partiellement transparentes aux micro-ondes et ne résistant pas aux acides s'avère superflue. Ceci permet d'atteindre des longévités d'au moins 3 à 5 ans. Les récipients n'étant plus considérés comme matériel de consommation, ils font partie intégrante de la garantie de l'appareil. Les frais d'exploitation du système de dissolution s'en trouvent donc considérablement réduits.

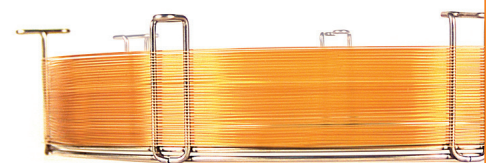


GC

- Les colonnes GC Zebron™ récompensées par le prix R&D
- Une stabilité accrue à haute température
- Une faible perte de phase

Des Solutions
Chromatographiques
Innovantes dans tous
les Secteurs

Pharmaceutique
Agroalimentaire
Toxicologie
Environnement
Pétrochimie



Contactez-nous pour être mis en relation
directe avec un conseiller technique.



phenomenex®

© 2008 Phenomenex, Inc. Tous droits réservés.

Pour plus d'informations rendez-vous sur :
www.phenomenex.com
Tél: 01 30 09 21 10
Fax: 01 30 09 21 11
Email: franceinfo@phenomenex.com

5930_r_2