

# Stabilité de la colonne Agilent Poroshell HPH C18 à pH faible et élevé

## Note d'application

### Auteur

William Long  
Agilent Technologies, Inc.

### Introduction

L'un des facteurs déterminants pour la réussite d'une méthode chromatographique est la stabilité de la colonne HPLC. Lors du développement d'un protocole d'analyse par LC en phase inverse, et dans l'attente de sa validation, les chromatographistes étudient les aspects du protocole qui pourraient poser problème. L'un des aspects essentiels est la durée de vie de la colonne dans les conditions d'analyse spécifiques de la méthode. La silice présente de nombreuses propriétés qui en font un support excellent pour les colonnes de HPLC en phase inverse. Cependant, sa solubilité augmente considérablement lorsque le pH de la phase mobile atteint et dépasse des valeurs de pH comprises entre 7 et 8. Dans une étude sur la stabilité des colonnes HPLC en silice à pH élevé menée par Rockland Technologies, plusieurs résultats clés ont été rapportés, à savoir que la post-silanisation protège la silice de la dissolution, que la stabilité de colonne augmente avec la densité de la phase greffée, et que, pour un même pH, la durée de vie des colonnes est significativement plus longue avec des phases mobiles organiques qu'avec des tampons de phosphate. Des études ont démontré que la dégradation du remplissage de phase greffée à des valeurs de pH comprises entre 9 et 10 était essentiellement due à la dissolution du support en silice et ne découlait pas de l'hydrolyse des liaisons covalentes des groupements siloxane. En principe, la stabilité chimique et thermique de colonnes de LC en phase inverse peut être améliorée en perfectionnant les substrats utilisés et la chimie de greffage [1-4].

Il est généralement conseillé de développer une méthode LC en phase inverse par des phases mobiles de faible pH, que les analytes soient acides, neutres ou basiques. Ces recommandations reposent sur le raisonnement suivant : à pH faible les analytes acides sont neutres et donc bien retenus. Les groupements silanol résiduels à la surface du remplissage en silice sont quant à eux protonés. De ce fait, moins d'interactions secondaires sont possibles entre les analytes acides et basiques et la surface du support en silice. En revanche, les composés basiques qui sont chargés positivement à faible pH, sont souvent peu retenus, ou présentent des pics de forme médiocre dans ces conditions. Une autre raison favorisant l'utilisation d'un pH faible est la mauvaise stabilité de colonnes en silice à pH élevé.



**Agilent Technologies**

Comme indiqué auparavant, deux approches ont été menées pour concevoir des colonnes de HPLC en silice stables à pH élevé. Une des stratégies employées pour améliorer la stabilité est d'utiliser une chimie de greffage spéciale, comme pour la colonne Agilent ZORBAX Extend C-18 [3]. La colonne ZORBAX Extend C18 est greffée avec un ligand bidenté pour protéger la silice de la dissolution à pH élevé. Une autre manière d'atteindre une stabilité à pH élevé est de modifier directement la silice afin de baisser sa solubilité. C'est cette approche qui est utilisée pour les particules Poroshell de 2,7- $\mu\text{m}$  et 4- $\mu\text{m}$ , organiquement modifiées et donc moins susceptibles de se détériorer à pH élevé.

La durée de vie d'une colonne Agilent Poroshell HPH C18 est ici évaluée dans une phase mobile classique à faible pH (TFA à 0,1 %) ainsi que dans une phase mobile à pH élevé (bicarbonate d'ammonium à 10 mM, pH 10) lors d'une analyse en gradient avec de l'acétonitrile.

## Équipements et méthodes

Un système LC Agilent 1290 Infinity a été utilisé. Il comprenait les éléments suivants :

- Pompe binaire Agilent 1290 Infinity, pouvant générer une pression de jusqu'à 1200 bars (G4220A), modifiée avec un joint en PEEK dans la vanne de dérivation du solvant (joint de rotor en PEEK FL réf. 5068-0171)
- Compartiment à colonne thermostatée Agilent 1290 Infinity (TCC) (G1316C)
- Échantillonneur automatique haute performance Agilent 1290 Infinity (G4226A) avec joint de rotor en PEEK (joint de rotor en PEEK FL réf. 5068-0170)
- Détecteur à barrette de diodes Agilent 1260 Infinity (DAD) (G4220A) ayant un chemin de 10 mm et une cellule de 1 $\mu\text{L}$ .
- Logiciel OpenLAB Agilent, version C.01.05, était utilisé pour piloter le système de HPLC et traiter les données.
- Colonne Agilent Poroshell HPH C18, 2,1  $\times$  50 mm, 4 $\mu\text{m}$  (réf. 699770-702)

Les échantillons contenaient de la quinine, de la nortriptyline, de l'amitriptyline, du hexanophénone, de l'acétophénone, de l'acide 4-chlorocinnamique et du 2-hydroxy-5-méthyl-benzaldéhyde. Ils étaient préparés dans 50:50 d'eau/acétonitrile à 1 mg/mL. Les phases mobiles utilisées étaient des phases couramment employées dans les laboratoires de chromatographie, à savoir l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% et le tampon de bicarbonate d'ammonium. Le tampon a été préparé par dissolution de bicarbonate d'ammonium dans de l'eau pour obtenir une solution à 10 mM, puis le pH a été ajusté à la valeur voulue à l'aide de base concentrée (hydroxyde d'ammonium). Le phosphate de sodium dibasique et le phosphate de sodium mono-basique utilisés pour les tampons ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich, Corp. L'acétonitrile était fabriqué par Burdick and Jackson et acheté auprès de Honeywell. L'eau 18 M $\Omega$  était fourni par Millipore.

Le détecteur UV était réglé sur 254 nm, 80 Hz.

## Résultats et discussion

Les tests de stabilité ont été réalisés avec une phase mobile à faible pH (TFA à 0,1%) et une phase mobile à pH élevé (bicarbonate d'ammonium à 10 mM, pH 10).

### Stabilité dans la solution de TFA à 0,1%

Dans la première expérience, 2 000 injections ont été réalisées sur une colonne neuve. Un échantillon contenant de la quinine, du phénol, de la nortriptyline, du hexanophénone, de l'acétophénone et de l'acide 4-chlorocinnamique était injecté toutes les quatre minutes. L'échantillon contenait les types de composés acides, bases et neutres trouvés dans quasiment tous les échantillons complexes. Du TFA à 0,1 % est une phase mobile courante en chromatographie (pH ~2). Tous les pics étaient retenus au même volume d'élution tout au long de l'expérience. Cette expérience démontre que la colonne Poroshell HPH C18 est stable et peut être utilisée pour des analyses de routine à pH faible (Figure 1). La forme de pic était excellente tout au long de l'expérience. Le temps d'analyse de la méthode était d'environ sept minutes par injection ; l'expérience a donc duré environ 10 jours et a consommé environ 5 L d'acétonitrile et 5 L de phase mobile aqueuse.

### Stabilité dans le bicarbonate d'ammonium à 10 mM, pH 10

Une deuxième expérience a été menée avec du bicarbonate d'ammonium à 10 mM, pH 10 (Figure 2). Il s'agit d'une phase mobile utilisée couramment avec les colonnes hybrides, mais elle n'est en général pas utilisée avec les colonnes de HPLC classiques en silice. Cette phase mobile permet de contrôler le pH car son pouvoir tampon est important, et elle permet également une détection par MS car le tampon est volatil. Il a été signalé que les tampons carbonate détérioraient les colonnes en silice bien plus que d'autres tampons comme la glycine ou le borate [5]. Les mêmes échantillons que pour l'expérience avec le TFA à 0,1% ont été utilisés pour évaluer la durée de vie de la colonne à pH élevé. La principale différence entre les deux expériences est l'ordre d'élution des composés. Comme illustré dans la figure 3, la modification du pH de la phase mobile change l'ordre d'élution analytes, ce qui démontre une modification importante de la sélectivité.

Dans cette expérience, une colonne Poroshell HPH C18 a été évaluée avec une méthode gradient utilisant du bicarbonate d'ammonium et de l'acétonitrile à pH 10. Comme l'indique la figure 2, le temps de rétention de tous les composés était stable tout au long de l'analyse des 2 000 injections, sauf pour la nortriptyline. Des résultats similaires ont déjà été rapportés pour la nortriptyline sur des colonnes d'autres fabricants avec un décalage de son pic [6].

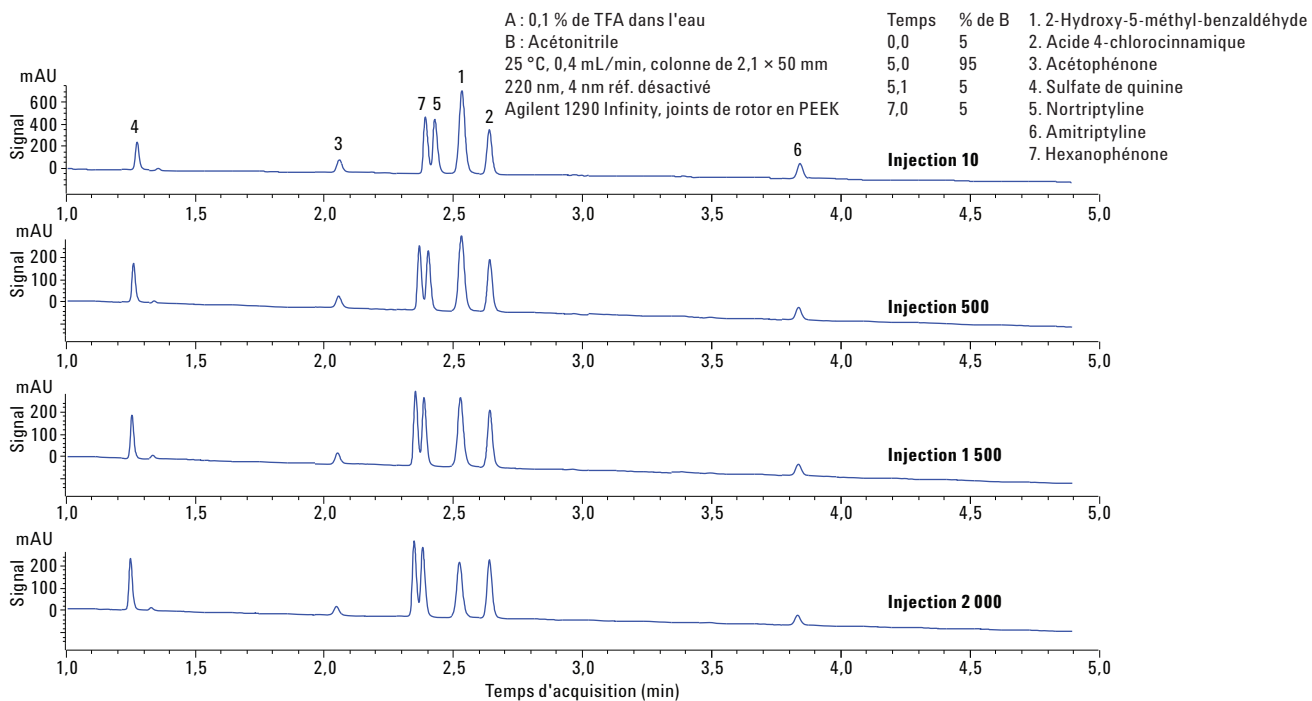


Figure 1. Durée de vie de la colonne Agilent Poroshell HPH C18 sur 2 000 injections dans une phase mobile acide courante, le TFA à 0,1 %.

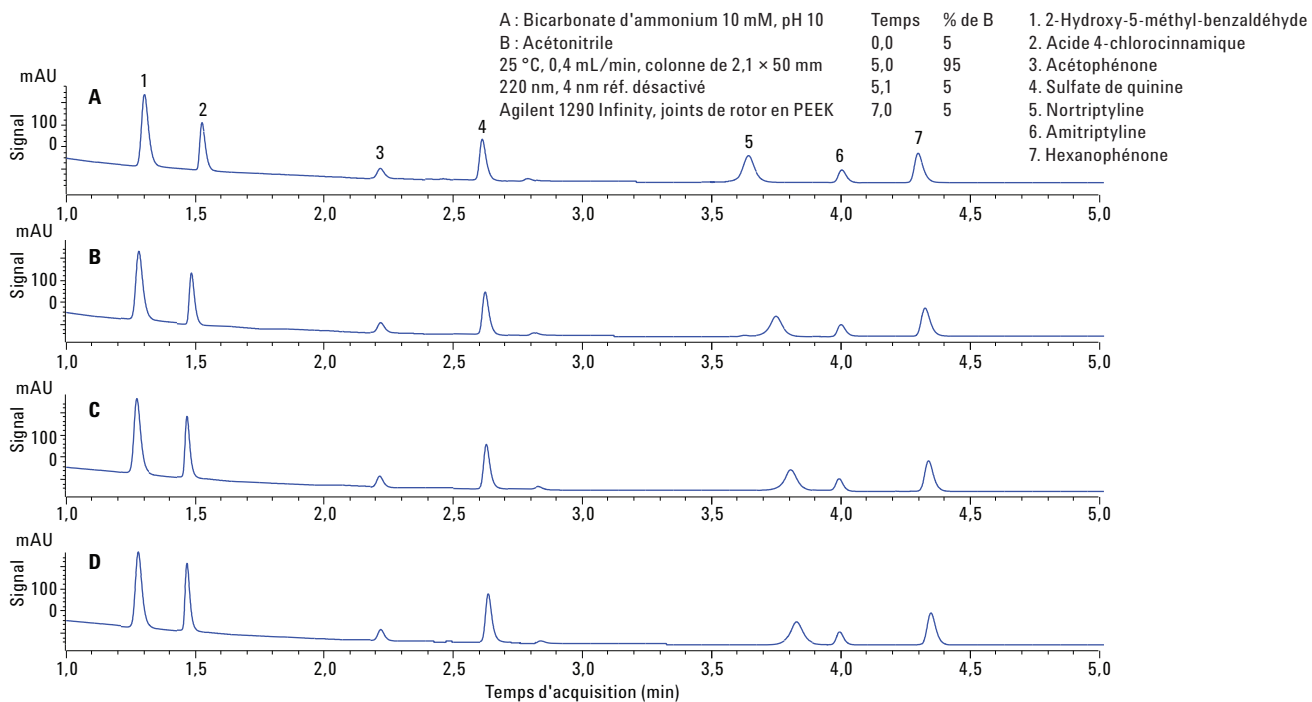


Figure 2. Durée de vie de la colonne Agilent Poroshell HPH C18 sur 2 000 injections dans une phase mobile basique, le bicarbonate d'ammonium à 10 mM, pH10.

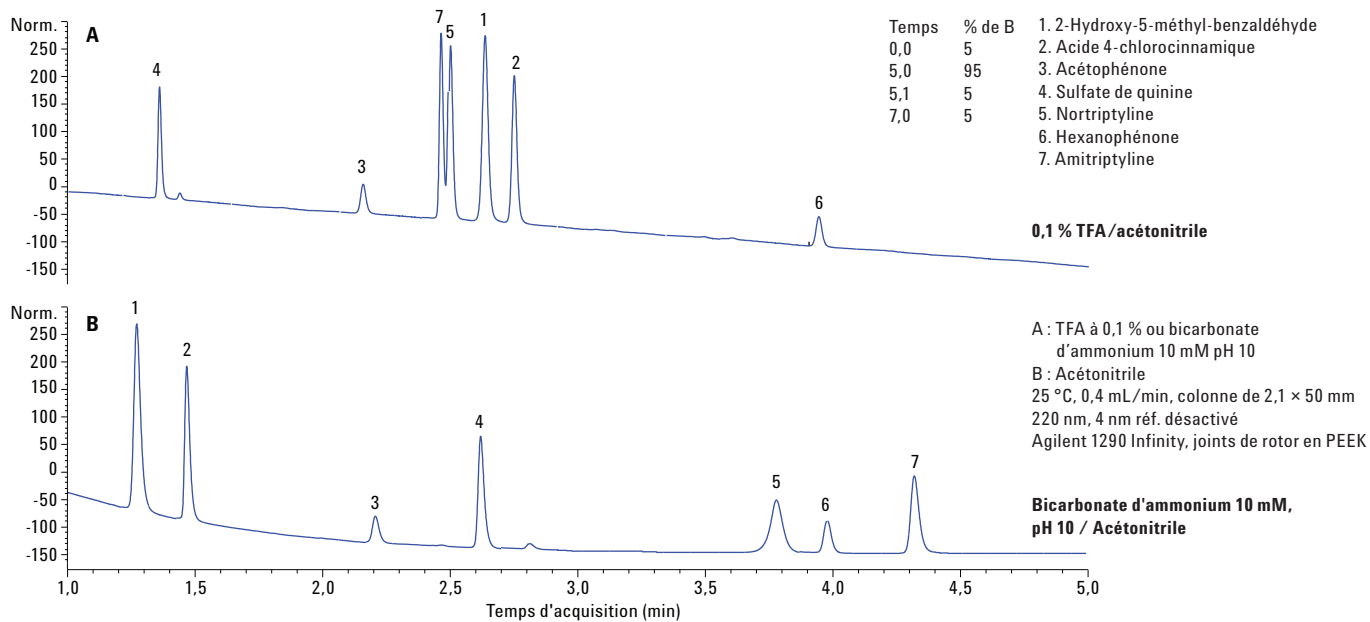


Figure 3. La colonne Agilent Poroshell HPH C18 peut être utilisée à faible pH dans du TFA à 0,1 % ou à pH élevé dans du bicarbonate d'ammonium à 10mM, pH10 pour une sélectivité radicalement différente.

## Conclusions

Alors que des phases mobiles à pH élevé telles que le tampon de bicarbonate d'ammonium peuvent détériorer les colonnes HPLC conventionnelles en silice, la colonne Agilent Poroshell HPH C18 présente d'excellentes performances dans cette phase mobile. Le TFA peut également détériorer les colonnes HPLC en hydrolysant la phase greffée. Cette technologie de colonne permet désormais aux scientifiques de profiter à la fois des caractéristiques des particules hybrides et des particules superficiellement poreuses. Les particules Poroshell HPH conservent à la fois une haute performance, ainsi qu'une grande efficacité et une faible contrepression grâce aux particules superficiellement poreuses utilisées dans d'autres phases Poroshell 120. La colonne Poroshell HPH conserve non seulement les avantages des particules superficiellement poreuses, mais y associe la stabilité chimique nécessaire dans des conditions de phase mobile à pH élevé.

## Références

1. J. J. Kirkland ; J. W. Henderson; J. J. DeStefano ; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *762*, 97-112.
2. J. J. Kirkland ; M. A. van Straten; H. A. Claessens. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns. *J. Chromatogr. A*. **1995**, *691*, 3-19.
3. J. J. Kirkland ; J. B. Adams Jr. ; M. A. van Straten ; H. A. Claessens. Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4344-4352.
4. C. Ye ; G. Terfloth ; Y. Li, A. Kord. A systematic stability evaluation of analytical RP-HPLC columns. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, *50*, 426-431.
5. H. A. Claessens ; M. A. van Straten ; J. J. Kirkland. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **1996**, *728*, 259-270.
6. W. J. Long. *Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH Stable Poroshell HPH Chemistries*; Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5022EN, **2014**.

## Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Imprimé aux États-Unis  
Le 15 décembre 2015  
5991-6525FR



**Agilent Technologies**