

Optimisation de l'efficacité à l'aide des colonnes Agilent InfinityLab Poroshell 120

100 000 plateaux en moins de 5 minutes à l'aide de la
technologie de couplage des colonnes

Note d'application

Alimentaire, environnemental, chimique, pharmaceutique

Auteurs

Angelika Gratzfeld-Hüsgen et
Edgar Naegele
Agilent Technologies
Waldbronn, Allemagne

Résumé

Les colonnes basées sur des technologies de particules superficiellement poreuses sont une alternative aux colonnes basées sur des particules inférieures à 2 µm. L'association de ces colonnes au système de LC Agilent 1290 Infinity produit des séparations à haute efficacité. Les colonnes Agilent InfinityLab Poroshell 120 proposent :

- Moins de contrepression
- Plus d'efficacité
- Une capacité de volume comparable



Agilent Technologies

Introduction

Récemment, les colonnes à particules inférieures à 2 µm ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur haute efficacité. Il est possible de les utiliser à des débits plus élevés que ceux évalués par l'équation de Van Deemer. La perte d'efficacité à des débits plus élevés est mineure par rapport à l'efficacité au débit optimal. Il est possible de raccourcir les temps d'analyse et les temps de cycle, et d'obtenir des résultats plus vite.

L'inconvénient de ces colonnes est que des contrepressions considérablement plus élevées sont observées en raison de la granulométrie fine. Dans de nombreux cas, en particulier pour les colonnes longues à particules inférieures à 2 µm, les instruments LC doivent permettre des contrepressions de > 400 bars.

La technologie de particules superficiellement poreuses propose une alternative aux analyses à haute résolution¹, parce que ces colonnes présentent considérablement moins de contrepression. L'efficacité de ces colonnes, par rapport à celle des colonnes à particules inférieures à 2 µm, est légèrement moindre. Il est possible d'obtenir un nombre de plateaux très élevé en couplant les colonnes, en raison de la contrepression réduite.

Cette note d'application démontre que le couplage de trois colonnes longues Agilent InfinityLab Poroshell 120 permet des efficacités extrêmement élevées. Il est également démontré que la contrepression peut être maintenue en dessous de 400 bars, sauf si un équipement LC spécial est disponible. Dans ce cas, des débits plus élevés sont possibles pour réduire les temps d'analyse et de stabilisation. Enfin, une comparaison a été faite entre une colonne à couche externe poreuse de 2,7 µm et une colonne présentant une granulométrie inférieure à 2 µm.

Données expérimentales

Équipement

Un système de LC Agilent 1290 Infinity équipé d'une pompe binaire, d'un passeur automatique d'échantillons, d'un compartiment à colonne thermostaté et d'un détecteur à barrette de diodes avec une cellule à trajet optique de 10 mm, a été utilisé pour les expériences.

Colonnes

Une colonne de 1,8 µm Agilent ZORBAX à résolution rapide et haut débit, 4,6 mm × 150 mm, et une colonne de 2,7 µm Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 mm × 150 mm, ont été utilisées. Il est possible d'utiliser ces colonnes jusqu'à 600 bars.

Logiciel

Logiciel de station de travail analytique Agilent ChemStation, révision B.04.02

Résultats et discussion

Avantages potentiels des colonnes à particules superficiellement poreuses

La technologie des colonnes à particules superficiellement poreuses est basée sur des particules constituées d'un noyau plein et d'une couche externe superficiellement poreuse. Ces particules sont constituées d'un noyau plein de 1,7 µm avec une couche en silice poreuse de 0,5 µm. Au total, la granulométrie est d'environ 2,7 µm. Les particules superficiellement poreuses de 2,7 µm fournissent 40-50 % de contrepression en moins et 80-90 % de l'efficacité d'une particule totalement poreuse inférieure à 2 µm. Les particules superficiellement poreuses ont une distribution de la taille de particule plus étroite qu'une particule totalement poreuse. Cela donne une colonne plus homogène et réduit la diffusion dans la colonne. En parallèle, la petite particule et la couche externe poreuse permettent une résistance réduite au transfert de masse. Il en résulte des débits plus élevés sans perte d'efficacité^{1,2}.

Configuration de votre système

Les expériences suivantes évaluent la performance des colonnes Agilent InfinityLab Poroshell 120. Le diamètre intérieur est de 4,6 mm et la longueur de colonne de 150 mm pour toutes les colonnes utilisées.

- Évaluation du nombre de plateaux d'une seule colonne à 1,5 mL/min
- Évaluation du nombre de plateaux pour trois colonnes couplées à 1,5 mL/min
- Évaluation du nombre de plateaux pour trois colonnes couplées à des débits plus élevés
- Précision des temps de rétention en mode isocratique et en mode gradient
- Comparaison d'une couche externe poreuse par rapport à une colonne à particules inférieures à 2 µm

L'efficacité de la colonne (nombre de plateaux) est généralement mesurée en mode isocratique. Pour un pic symétrique, utilisez l'équation suivante pour calculer le nombre de plateaux (N) :

$$N = 5,54 (RT/W)^2$$

RT est le temps de rétention et W la largeur de pic à mi-hauteur.

Évaluation des nombres de plateaux pour une seule colonne

Les composés suivants sont utilisés pour évaluer le nombre de plateaux pour une seule colonne : uracile, acétophénone, benzène et toluène.

Le chromatogramme obtenu et les nombres de plateaux évalués sont illustrés dans la Figure 1.

Le résultat est environ 35 000 plateaux par colonne pour le toluène dans les conditions chromatographiques indiquées.

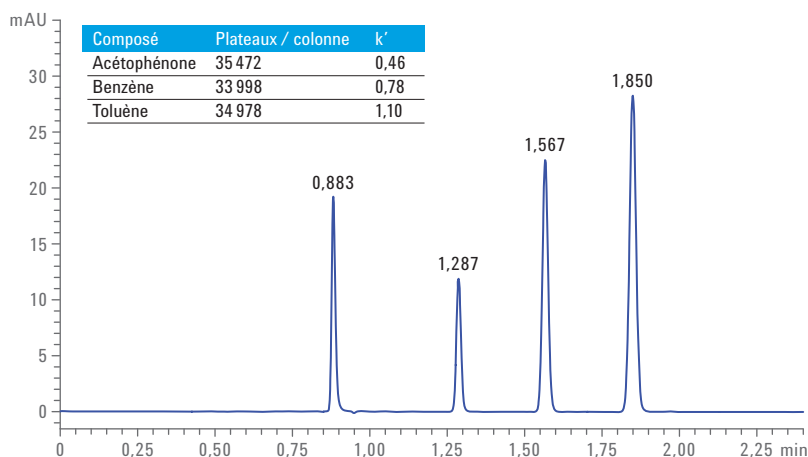


Figure 1 : Chromatogramme pour évaluer N pour la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 × 150 mm.

Évaluation des nombres de plateaux pour trois colonnes couplées

Le nombre de plateaux pour une colonne est d'environ 35 000 plateaux. On prévoit que trois colonnes donnent un nombre de plateaux de 105 000 plateaux. Le couplage de colonnes est effectué à l'aide de capillaires en acier inoxydable, 90 × 0,12 mm. Le nombre de plateaux est évalué à différents débits.

Les chromatogrammes obtenus sont illustrés dans la Figure 2. Si un système de LC de 400 bars est utilisé, il est possible d'obtenir environ 80 000 plateaux à un débit de 1 mL/min. Cependant, il est possible d'obtenir des débits et des efficacités plus élevés avec ce système de LC, qui permet une pression jusqu'à 1 200 bars.

À un débit de 1,5 mL/min, le nombre de plateaux obtenu d'environ 103 000 plateaux est proche de la valeur attendue.

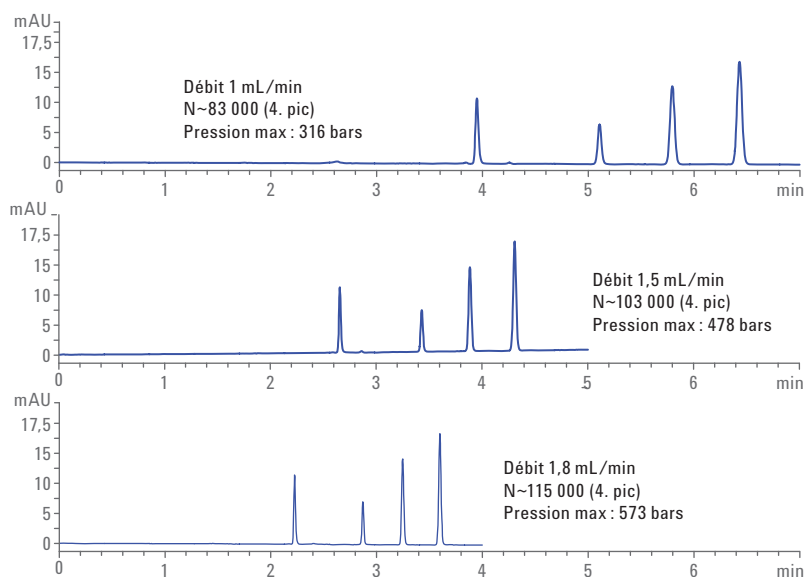


Figure 2. Deux chromatogrammes pour évaluer N pour trois colonnes couplées Agilent InfinityLab Poroshell 120, 150 mm × 4,6 mm, à différents débits.

Conditions de chromatographie

Paramètre	Valeur
Colonne	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Échantillon	Thiocarbamide, acétophénone, benzène, toluène
Phase mobile	Eau:acétonitrile = 30:70
Débit	1,5 mL/min
Volume d'injection	1 μL
Température de colonne	50 °C
Détecteur	Détecteur à barrette de diodes 254 nm/10, réf. 360/100 nm, 20 Hz, cellule standard

Conditions de chromatographie

Paramètre	Valeur
Échantillon	Thiocarbamide, acétophénone, benzène, toluène
Colonne	Trois colonnes de 2,7 μm couplées Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm
Phase mobile	Eau:acétonitrile = 20:80
Débit	1, 1,5, 1,8 mL/min
Volume d'injection	1 μL
Température de colonne	60 °C
Détecteur	Détecteur à barrette de diodes 254 nm/10, réf. 360/100 nm, 20 Hz, cellule standard

Le meilleur résultat pour le toluène avec environ 115 000 plateaux est obtenu à 1,8 mL/min avec un temps de rétention < 5 minutes (Tableau 1).

Pour des valeurs de k' plus élevées, de bons résultats sont obtenus à l'aide de trois colonnes couplées. Un débit de 1,2 mL/min est utilisé (Figure 3).

Précision des temps de rétention mode isocratique

La précision en mode isocratique à 1,5 mL/min est évaluée et les résultats sont illustrés dans la Figure 4 ainsi qu'une superposition de six analyses consécutives. La précision des temps de rétention est < 0,034 % de déviation standard relative, et la précision des zones est < 0,66 % de déviation standard relative, sauf pour l'uracile.

Tableau 1. Nombres de plateaux à un débit de 1,8 mL/min.

Composé	Plateaux	k'
Acétophénone	114 120	0,29
Benzène	109 931	0,46
Toluène	114 800	0,62

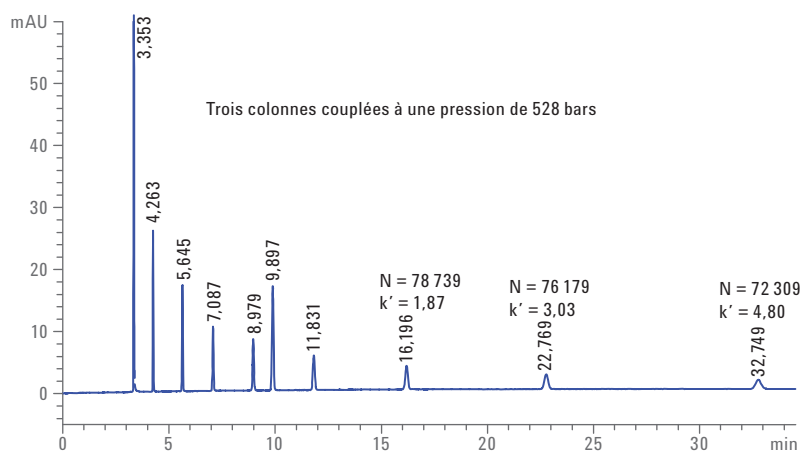


Figure 3. Nombres de plateaux à des valeurs de k' plus élevées pour trois colonnes couplées à 528 bars et à un débit de 1,2 mL/min.

Conditions de chromatographie

Paramètre	Valeur
Échantillon	Thiocarbamide + échantillon test : Ensemble de neuf composés, 100 ng/ μ L chacun, dissous dans un mélange eau / acétonitrile (65/35) 1. Acétanilide, 2. Acétophénone, 3. Propiophénone, 4. Butyrophénone (200 ng/ μ L), 5. Benzophénone, 6. Valérophénone, 7. Hexanophénone, 8. Heptanophénone, 9. Octanophénone
Colonne	Trois colonnes de 2,7 μ m couplées Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4,6 mm
Phase mobile	Acétonitrile/eau 60/40
Température de colonne	60 °C
Débit	1,2 mL/min
Détecteur	Détecteur à barrette de diodes 254 nm/10 nm, réf. 360/100 nm, 20 Hz, cellule standard

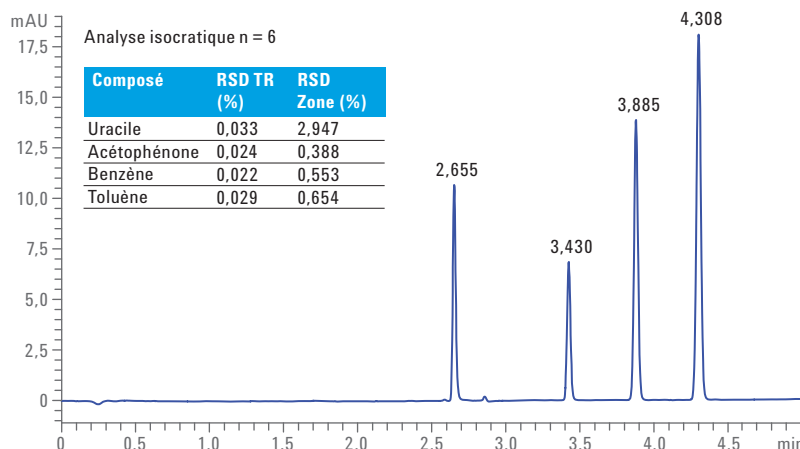


Figure 4. Superposition de six analyses consécutives en mode isocratique et données de précision pour les temps de rétention et les zones.

Conditions de chromatographie

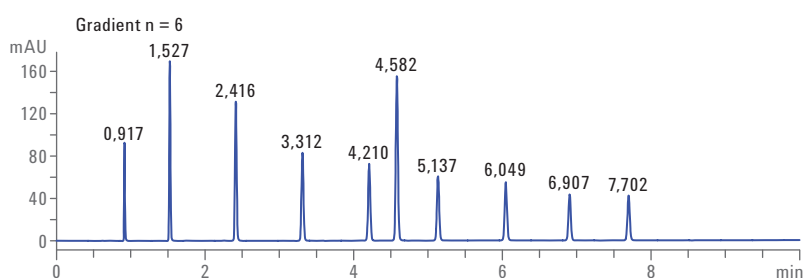
Paramètre	Valeur
Échantillon	Uracile, acétophénone, benzène, toluène
Colonne	Trois colonnes de 2,7 μ m couplées Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4,6 mm
Phase mobile	Eau:acétonitrile = 20:80
Débit	1,5 mL/min
Volume d'injection	1 μ L
Température de colonne	60 °C
Détecteur	Détecteur à barrette de diodes 254 nm/10 nm, réf. 360/100 nm, 20 Hz, cellule standard

Précision des temps de rétention et des zones en mode gradient

La précision de l'analyse en mode gradient est évaluée à l'aide d'un gradient entre 35 et 95 % en 10 minutes. Les résultats et la superposition de six analyses consécutives sont illustrés dans la Figure 5.

Une excellente précision est obtenue pour les temps de rétention de tous les composés (déviations standard relatives < 0,04 %), sauf pour le thiocarbamide (Figure 5).

Les déviations standard relatives pour les zones de tous les pics de composé sont inférieures à 0,38 % pour une injection de 1 µL.



Pic	RSD TR (%)	RSD Zone (%)
Thiocarbamide	0,092	0,372
1	0,020	0,238
2	0,038	0,255
3	0,033	0,211
4	0,029	0,186
5	0,027	0,227
6	0,023	0,194
7	0,018	0,183
8	0,017	0,251
9	0,017	0,167

Conditions de chromatographie

Paramètre	Valeur
Échantillon	Thiocarbamide + échantillon test : Ensemble de neuf composés, 100 ng/µL chacun, dissous dans un mélange eau/acétonitrile (65/35) 1. Acétanilide, 2. Acétophénone, 3. Propiophénone, 4. Butyrophénone (200 ng/µL), 5. Benzophénone, 6. Valérophénone, 7. Hexanophénone, 8. Heptanophénone, 9. Octanophénone
Colonne	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Phase mobile	Eau et acétonitrile
Gradient	À 0 minute 35 % d'acétonitrile, à 10 minutes 95 % d'acétonitrile
Débit	1,5 mL/min
Volume d'injection	1 µL
Température de colonne	60 °C
Détecteur	Détecteur à barrette de diodes 245/10 nm, réf. 400/100 nm, 20 Hz, cellule standard

Figure 5. Superposition de 10 analyses consécutives en mode gradient et données de précision pour les temps de rétention et les aires.

Comparaison de la capacité de pics d'une colonne à couche externe poreuse par rapport à une colonne à particules inférieures à 2 µm

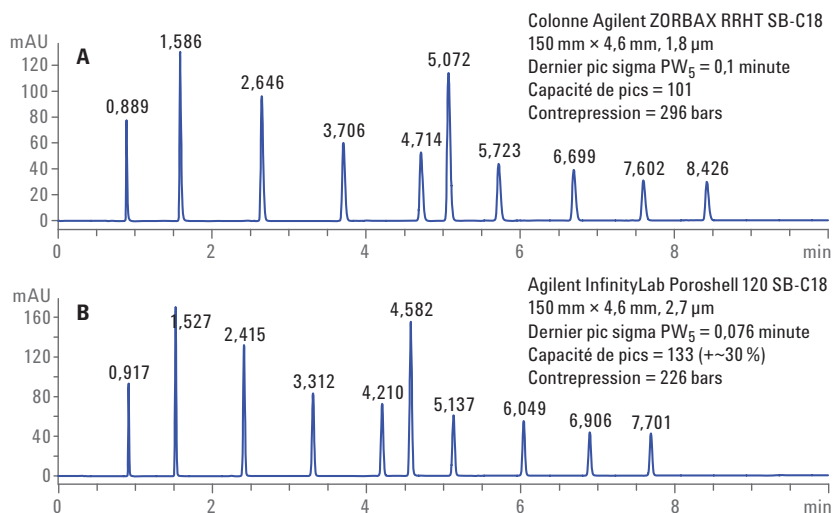
Afin d'illustrer la différence entre les colonnes à couche externe poreuse et celles à particules inférieures à 2 µm, deux colonnes de d.i. 150 × 4,6 mm sont comparées en analysant un ensemble de 10 composés (Figure 6).

La colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 présente des temps d'éluion plus courts et une largeur de pic plus petite, ce qui entraîne une capacité de pics plus élevée pour la colonne à couche externe poreuse. La colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 présente 133 pics avec une capacité de pics plus élevée que la colonne à particules inférieures à 2 µm avec une capacité de pics de 101 pics. Ceci montre une efficacité 30 % plus élevée pour la colonne InfinityLab Poroshell 120 par rapport à la colonne à particules inférieures à 2 µm pour les conditions utilisées.

Comparaison de la capacité de volume

Afin de tester si les colonnes à couche externe poreuse ont une capacité de volume égale ou inférieure à la colonne garnie de particules de 1,8 µm, un échantillon fortement concentré est injecté. Le volume d'injection est de 10 µL et la concentration est d'environ 20 µg dans 10 µL (Figure 7).

Aucune différence majeure n'est observée pour le principal pic en utilisant les conditions choisies. La largeur de pic pour la colonne InfinityLab Poroshell 120 était quelque peu inférieure parce que, dans ce cas, le pic est élué plus tôt. La largeur de pic est généralement plus petite.



Conditions de chromatographie

Paramètre	Valeur
Échantillon	Thiocarbamide + échantillon test : Ensemble de neuf composés, 100 ng/µL chacun, dissous dans un mélange eau/acétonitrile (65/35) 1. Acétanilide, 2. Acétophénone, 3. Propiophénone, 4. Butyrophénone (200 ng/µL), Benzophénone, 6. Valérophénone, 7. Hexanophénone, 8. Heptanophénone, 9. Octanophénone
Colonne	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 1,8 µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Phase mobile	Eau et acétonitrile
Gradient	0 minute 35 % d'acétonitrile, 10 minutes 95 % d'acétonitrile
Débit	1,5 mL/min
Volume d'injection	1 µL
Température de colonne	60 °C
Détecteur	Détecteur à barrette de diodes 245/10 nm, réf. 400/100 nm, 20 Hz, cellule standard

Figure 6. Chromatogrammes d'un mélange de phénone analysé sur les colonnes à couche externe poreuse et à particules inférieures à 2 µm.

Comparaison du signal par rapport au bruit

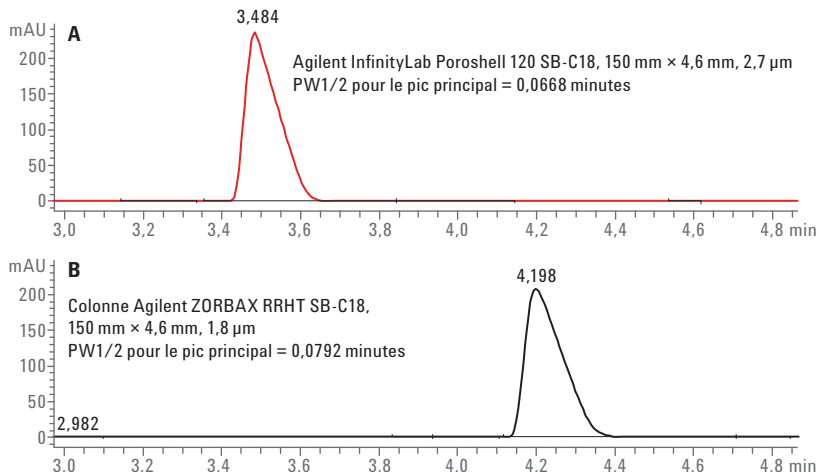
Les impuretés dans un produit pharmaceutique sont analysées pour évaluer le rapport signal sur bruit (S/B). Les impuretés sont présentes dans une plage de 0,02-0,03 pour cent. Les conditions chromatographiques sont énumérées dans la Figure 7.

La Figure 8 montre une superposition d'une section des chromatogrammes complets. Le tracé rouge représente le chromatogramme InfinityLab Poroshell 120 et le tracé noir représente le chromatogramme des particules inférieures à 2 µm.

Dans le Tableau 2, les calculs S/B pour les deux colonnes sont combinés. Les impuretés 1 et 2 sont analysées sur la colonne InfinityLab Poroshell 120 et sur la colonne à particules inférieures à 2 µm.

Tableau 2. Comparaison des rapports signal sur bruit pour les colonnes à couche externe poreuse et à particules de 1,8 µm.

Pic	Agilent InfinityLab Poroshell 120 S/B	1,8 µm S/B
1	14	13,6
2	12,8	12



Conditions de chromatographie

Paramètre	Valeur
Échantillon test	Tramadol 2,022 mL/mL contenant des impuretés
Colonne	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Pompe	
Solvant A	Eau + 0,2 % de TFA
Solvant B	Acétonitrile + 0,16 % de TFA
Gradient	17 à 45 % B en 5 minutes, fin d'analyse : 7 minutes, durée postanalyse : 3 minutes
Débit	1,5 mL/min
Passeur automatique d'échantillons	
Volume d'injection	10 µL
Temps de rinçage	10 s
Compartment à colonne thermostaté	
Température	30 °C
Détecteur à barrette de diodes	1290 270/10 nm, réf. 360/100 nm, 20 Hz, Cellule standard de trajet optique de 10 mm

Figure 7. Comparaison de capacité des colonnes à couche externe poreuse et à particules inférieures à 2 µm ; volume d'injection 10 µL = 20 µg.

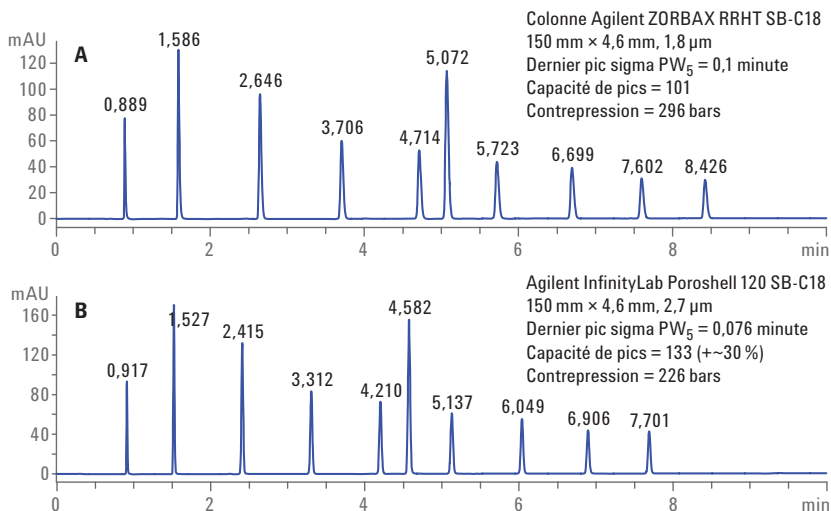


Figure 8. Comparaison du rapport signal sur bruit ; le rouge représente la couche externe poreuse et le tracé noir représente la colonne à particules de 1,8 µm. L'acide trifluoroacétique est utilisé comme modificateur.

Conclusion

Les colonnes à couche externe poreuse représentent une réelle alternative aux colonnes à particules inférieures à 2 µm. La contrepression inférieure permet des débits de 1 mL/min pour une colonne de 2,7 µm, 4,6 × 150 mm, sans dépasser la limite de 400 bars. Dans ce cas, 35 000 plateaux sont réalisables ou plus de 235 000 plateaux par mètre.

Le couplage de trois colonnes 4,6 × 150 mm entraîne un nombre de plateaux de 100 000 plateaux en moins de 5 minutes, sans dépasser la limite de 600 bars.

Les colonnes Agilent InfinityLab Poroshell 120 présentent des données d'une excellente précision pour l'analyse en mode isocratique et en mode gradient.

En général, pour les colonnes InfinityLab Poroshell 120, on peut prévoir des temps d'élution plus courts que ceux des colonnes avec une phase greffée à particules inférieures à 2 µm similaires si les mêmes conditions chromatographiques sont appliquées. Les temps d'élution plus courts entraînent des largeurs de pic plus petites et, par conséquent, des capacités de pics plus élevées.

Références

1. Cunliffe, J. M.; Maloney, T. D. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2-µm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3104-3109.
2. Griiti, F.; *et al.* Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. of Chromatog. A* **2007**, *1157*, 289-303.

www.agilent.com/chem

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Publié aux États-Unis, le 1er juin 2016
5990-5602FR



Agilent Technologies