

Méthodologie de l'Upti Select kit

La méthode que je vais essayer d'expliquer le plus simplement possible consiste à savoir en peu de temps quelle phase stationnaire C18 dois-je utiliser pour la séparation d'un composé. Souvent, en tant que développeur, je suis confronté à ce genre de problème et achète inutilement des phases stationnaires qui souvent me donnent la même résolution puisque faisant partie de la même famille que la phase précédente utilisée. (voir Chart de Tchapla dans mon site www.laubscherlabs.com sous rubrique « references » et chercher Tchapla-poster).

1) Phases Uptisphere C18 :

Il existe un kit de 5 phases stationnaires Uptisphere à savoir

Uptisphere ODB : apolaire à moyennement polaire (70 – 80 % utilisée en chromato)

Uptisphere HDO : moyennement polaire et utilisée avec 100% H₂O

Uptisphere NEC : très polaire et utile pour séparer des composés sortant avec le front de solvant

Uptisphere HSC : très apolaire et utilisable à des pH de 10

Uptisphere TF : phase utile pour séparation selon la différence de forme.

Ayant remarqué que ces 5 phases stationnaires étaient présentes dans la plupart des groupes dans le Chart de Tchapla, nous avons décidé de fabriquer un kit composé de ces cinq phases stationnaires.

Le problème est de savoir avec quelle concentration ou mélange de solvant allons-nous devoir travailler selon si nous avons une ODB, une HDO ou une TF par exemple.

Pour cela nous avons développé une méthode qui permet en peu de temps de connaître la phase stationnaire utile à la séparation qui nous intéresse.

2) Procédé :

Mon explication va se faire avec Méthanol alors que la méthode fonctionne également avec Acétonitrile

Utiliser une colonne Uptisphere ODB 250 x 4.6 mm 5µm

Solvant : Methanol/H₂O dont la concentration en phase organique donc MeOH ici ne doit pas être inférieure à 60 % et supérieure à 80 % (voir équation mathématique pour recherche de linéarité)

Injecter le mélange à analyser et relever la valeur du dernier temps de rétention (Tx ou RP)

Rincer la colonne et injecter dans les mêmes conditions de phase mobile, un mélange de standards fabriqués par nos soins.

Relever les 5 temps de rétention T1,T2,T3,T4 et T5

Choisir une valeur k situé entre 8 et 12 ; k étant un facteur de rétention permettant de rétablir la linéarité recherchée par l'équation

Après avoir obtenu ces valeurs, à savoir : T_x , K et T_1, T_2, T_3, T_4 et T_5 , les insérer dans une table de calcul qui est une sorte de petit logiciel et qui va nous calculer en % les valeurs exactes en MeOH ou Acétonitril que nous devons utiliser pour analyser notre mélange qui nous intéresse.

De ce fait, nous allons donc réaliser 5 chromatogrammes avec MeOH/H₂O, un chromatogramme par phase stationnaire (ODB, HDO, NEC, HSC et TF) et de même nous répéterons l'opération avec la phase mobile Acétonitrile/H₂O dont les différentes concentrations nous auront été calculées également.

Nous obtenons donc 10 chromatogrammes (5 avec MeOH et 5 avec AC N).

A ce moment précis, si notre mélange est séparable avec une phase stationnaire C18, nous devons parmi les 10 chromatogrammes trouver un chromatogramme satisfaisant.

En supposant que le chromatogramme effectué avec MeOH/H₂O comme phase mobile et Uptisphere ODB comme phase stationnaire nous donne une séparation satisfaisante, nous savons dès à présent que la phase stationnaire ne peut être que Uptisphere ODB ou équivalent appartenant au même groupe (voir Chart de Tchaplà).

A présent, il ne nous reste plus qu'à optimiser avec cette phase stationnaire et obtenir la meilleure résolution et temps de rétention souhaités.

L'avantage de cette méthodologie est qu'une fois la phase stationnaire connue, rien ne nous oblige à continuer de travailler avec Uptisphere (raisons diverses : validation, habitude de travail). L'important est de bien choisir la phase stationnaire qui appartient à la famille de l'Uptisphere ODB par exemple : voir chart de Tchaplà.