

SOMMAIRE

Résumé	v
Liste des publications	vii
Introduction	1
Partie A : Synthèse bibliographique et problématique	3
Chapitre I Les phases stationnaires greffées apolaires et l'analyse de solutés basiques	5
I.A Introduction	5
I.B La matrice de silice	5
I.B.1 Propriétés générales	5
I.B.2 Méthode de synthèse de la silice : le sol-gel	10
I.C Les silices greffées apolaires	13
I.C.1 Méthodes de greffage	13
I.C.2 Propriétés du support greffé	19
I.D De l'origine de la diversité des phases : réduction de l'accès aux silanols résiduels et extension de la gamme de polarité	21
I.D.1 Introduction	21
I.D.2 Stratégies d'élimination des silanols	21
I.D.3 Stratégies de masquage des silanols	23
I.D.4 Combinaisons	27
I.E Conclusion	27
Chapitre II Pourquoi une classification fondée sur une caractérisation ciblée ?	29
II.A Introduction	29
II.B Les tests spectroscopiques	31
II.C Les tests chromatographiques	32
II.C.1 Tests basés sur des modèles	32
II.C.2 Tests descriptifs	33
II.D Conclusion	42
Chapitre III L'apport de la chimiométrie à la classification des colonnes chromatographiques	43
III.A Analyse de corrélation	44
III.A.1 Principe	44
III.A.2 Applications	45
III.A.3 Limitations	47
III.B Analyse en Composantes Principales	48
III.B.1 Principe	48
III.B.2 Applications	48
III.B.3 Limitations	49
III.C Analyse en Clusters	50
III.C.1 Principe	50
III.C.2 Applications	51
III.C.3 Limitations	52
III.D Couplages ACP-AHC	52
III.E Conclusion	53

Partie B : Développement du test _____ **55**

Chapitre IV Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables _____ **59**

IV.A Introduction _____ **59**

IV.B Effet sur la force isoéluante _____ **59**

IV.B.1 Principe de l'étude et choix des solutés _____ 60

IV.B.2 Conditions expérimentales _____ 60

IV.B.3 Résultats et discussion _____ 61

IV.C Effet sur les phases stationnaires _____ **63**

IV.C.1 Conditions expérimentales _____ 63

IV.C.2 Résultats _____ 64

IV.D Conclusion _____ **75**

Chapitre V Construction du test : d'un test étendu à un test réduit pertinent _____ **77**

V.A Introduction et principe _____ **77**

V.B Partie expérimentale _____ **77**

V.B.1 Appareillage _____ 77

V.B.2 Jeu de solutés _____ 77

V.B.3 Conditions chromatographiques _____ 79

V.B.4 Colonnes testées _____ 80

V.C Traitement des données _____ **81**

V.C.1 Prétraitement/Organisation des données _____ 81

V.C.2 Outils chimiométriques utilisés _____ 82

V.D Résultats et discussion _____ **82**

V.D.1 Test dans les conditions étendues _____ 82

V.D.2 Réduction du test _____ 86

V.D.3 Test final _____ 93

V.E Conclusion _____ **94**

Chapitre VI Pouvoir discriminant du test : étude de la variabilité interlot _____ **97**

VI.A Introduction _____ **97**

VI.B Partie expérimentale _____ **99**

VI.B.1 Instrumentation _____ 99

VI.B.2 Conditions chromatographiques _____ 99

VI.B.3 Phases stationnaires _____ 100

VI.C Traitement des données _____ **100**

VI.C.1 Modèle _____ 100

VI.C.2 Principe de l'exploitation _____ 100

VI.D Résultats et discussion _____ **101**

VI.D.1 Résultats sur les colonnes SymmetryShield RP18 _____ 101

VI.D.2 Résultats sur les colonnes XTerra RP18 _____ 103

VI.D.3 Comparaison des dispersions interlot _____ 104

VI.E Conclusion _____ **107**

Chapitre VII Etude de robustesse : domaine d'application _____ **109**

VII.A Introduction _____ **109**

VII.B Plan d'expériences utilisé _____ **109**

VII.B.1 Identification des facteurs et des réponses _____ 109

VII.B.2 Sélection du modèle _____ 110

VII.B.3 Plan d'expérimentation _____ 110

VII.C Réalisation expérimentale _____ **112**

VII.C.1 Réalisation des essais _____ 112

VII.C.2 Protocole opératoire de chaque essai _____ 112

VII.D	Principe de l'exploitation	112
VII.D.1	Elimination des réponses peu informatives	112
VII.D.2	Calcul des effets et interprétation statistique	113
VII.D.3	Construction du domaine robuste	113
VII.E	Résultats et discussion	116
VII.E.1	Indice d'information et sélection des réponses	116
VII.E.2	Estimation des coefficients du modèle et interprétation	116
VII.E.3	Détermination du domaine de robustesse	122
VII.F	Conclusion	126
Partie C : Applications		129
Chapitre VIII Extension de la base de données		131
VIII.A	Introduction	131
VIII.B	Conditions expérimentales	131
VIII.B.1	Instrumentation	131
VIII.B.2	Conditions chromatographiques	131
VIII.B.3	Colonnes testées	131
VIII.C	Préliminaires à l'exploitation : étude de la rétentivité moyenne des solutés	133
VIII.D	Résultats et discussion	134
VIII.D.1	Principe	134
VIII.D.2	Interprétation physico-chimique des classifications obtenues par Analyse en Composantes Principales	134
VIII.D.3	Etude des classifications et illustrations chromatographiques	151
VIII.E	Conclusion	164
Chapitre IX Construction des cartes d'identité : aide au choix raisonné des colonnes chromatographiques		165
IX.A	Introduction	165
IX.B	Sélection des descripteurs	165
IX.B.1	Choix des descripteurs potentiels	165
IX.B.2	Etudes de corrélations	165
IX.B.3	Rapport informativité/robustesse	170
IX.C	Caractérisation des supports	171
IX.C.1	Visualisation des cartes d'identité sous forme de diagrammes radars	171
IX.C.2	Colonnes de même phase stationnaire	173
IX.C.3	Colonnes de phases stationnaires différentes	176
IX.D	Du choix raisonné des colonnes chromatographiques	183
IX.D.1	Principe	183
IX.D.2	Définition des phases protégées	183
IX.E	Conclusion	184
Conclusion générale		185
Références bibliographiques		187
Listes des abréviations		209
Liste des tableaux		211
Liste des tableaux		211

<i>Liste des figures</i>	213
<i>Annexes</i>	217
<i>Annexe 1 Rappel sur les interactions</i>	219
<i>Annexe 2 Mélanges hydroorganiques et composés ionisables</i>	221
<i>Annexe 3 Caractéristiques des composés</i>	225
<i>Annexe 4 Instrumentation</i>	231
<i>Annexe 5 Préparation des tampons et des phases mobiles</i>	233
<i>Annexe 6 Protocole du test</i>	235
<i>Annexe 7 Caractéristiques des colonnes testées</i>	241
<i>Annexe 8 Effet chromatographique de la contamination support par des impuretés métalliques</i>	243
<i>Annexe 9 Etude interlot</i>	245
<i>Annexe 10 Comparaison régression PLS/régression MLR</i>	257
<i>Annexe 11 Extension de la base de données : ACP interprétées</i>	259

Résumé

Lors du développement d'une nouvelle méthode de séparation, choisir la colonne CPL appropriée parmi les plus de 600 disponibles commercialement constitue un challenge d'autant plus difficile à relever que le mélange à séparer implique des produits basiques, rendant nécessaire le besoin d'une caractérisation et d'une classification des phases stationnaires. Pour ce faire, la seule approche simple et valide repose sur un test chromatographique effectué systématiquement sur toutes les phases stationnaires d'intérêt. La littérature propose de nombreux tests dédiés à la caractérisation des phases stationnaires. Cependant, aucun d'entre eux n'apparaît comme satisfaisant pour caractériser *in extenso* les phases, notamment les plus récentes, du fait de conditions trop restreintes en termes de solvants et de solutés sondes, dont les propriétés physico-chimiques ne recouvrent que trop partiellement celles des composés à séparer.

Partant de ce constat, nous avons développé notre propre procédure de test, avec une approche radicalement différente : au lieu de choisir des solutés et des conditions *a priori* dont on postule finalement le pouvoir de caractérisation, nous les avons sélectionnés en maximisant leur variété sans pour autant négliger des aspects pratiques de mise en place. Nous avons aussi démontré en premier lieu que ce n'est pas tant la colonne en soi qu'il est intéressant de caractériser, mais plutôt le couple colonne/solvant. D'un point de vue méthodologique, notre procédure a d'abord été réalisée dans conditions étendues afin de maximiser le potentiel de caractérisation. La combinaison d'un raisonnement chromatographique avec les outils de l'analyse multivariée nous a permis de réduire considérablement la procédure initiale de test sans perte significative d'information. Ainsi, le test réduit comporte au final 15 solutés, un seul niveau de pH fixé à 5 et deux niveaux de fraction pour chaque modificateur organique, en l'occurrence le méthanol et l'acétonitrile.

Une fois les conditions du test sélectionnées, nous nous sommes ensuite intéressé à la validation de notre méthodologie, point souvent éludé dans la littérature. Nous avons donc réalisé une étude de robustesse de notre test grâce à la méthode des plans d'expériences. Associé à une étude portant sur l'interlot de phases stationnaires, le plan D-optimal mis en place a permis non seulement de définir le domaine de robustesse du test, de façon à ce que tout utilisateur sache précisément les tolérances applicables aux facteurs lors de la mise en place du test, mais aussi d'éclaircir les mécanismes gouvernant la rétention grâce au modèle du second degré utilisé.

Ensuite, nous avons appliqué notre procédure de caractérisation à un plus grand nombre de phases stationnaires afin d'obtenir des cartes contenant plus de 70 couples colonne/solvant, pour l'essentiel dédiés à l'analyse des composés pharmaceutiques (colonnes « Special Base »). Notre étude ne s'est pas limitée à un simple aspect descriptif : nous avons porté une attention particulière à l'interprétation physico-chimique, notamment en reliant les axes des représentations à des grandeurs thermodynamiques et des types d'interaction intervenant dans les mécanismes de rétention. Outre l'évaluation de nouvelles phases, nous nous sommes aussi intéressé aux paramètres qui affectent une colonne dégradée dans des conditions réelles d'analyse. Les classifications obtenues en combinant Analyse en Composantes Principales et Analyse Hiérarchique en Clusters montrent aussi des différences de comportements suivant la fraction de modificateur organique pour nombre de colonnes.

La construction de cartes d'identité, qui repose sur la sélection de descripteurs issus des classifications, à la fois informatifs et robustes, offre une représentation synthétique des classifications obtenues, mettant ainsi en évidence pour chaque phase stationnaire des relations entre son comportement chromatographique et son organisation, dépendante à la fois de sa structure et de la composition de la phase mobile.

Liste des publications

- [1] K. Le Mapihan, J. Vial, A. Jardy, Organic Solvent Effects in Reversed-Phase Liquid Chromatography in Relation to Column Testing, *Chromatographia*, 57 (2003) S163.
- [2] K. Le Mapihan, J. Vial, A. Jardy, Testing of "special base" columns in reversed-phase liquid chromatography: A rational approach considering solvent effects, *Journal of Chromatography A*, 1030 (2004) 135.
- [3] K. Le Mapihan, J. Vial, A. Jardy, RPLC column testing: Robustness study of the test, *Journal of Chromatography A*, accepté pour publication.
- [4] K. Le Mapihan, J. Vial, A. Jardy, RPLC column testing: The role of organic solvent through an extended set of columns, *Journal of Chromatography A*, soumis.

Introduction

La chromatographie en phase liquide sur phase stationnaire apolaire s'est imposée comme une méthode de choix pour l'analyse de composés pharmaceutiques. En raison de la multiplicité des procédures de fabrication des colonnes, provenant des voies d'obtention variées pour la matrice de silice, de la pluralité des greffons, des différentes méthodes de greffage et de traitements ultérieurs éventuels, de nombreuses phases stationnaires apolaires sont disponibles. Si cette diversité permet en théorie de couvrir une large gamme de problèmes séparatifs, elle constitue aussi une difficulté de taille pour l'analyste confronté au choix de la colonne adéquate. Ce choix est rendu d'autant plus difficile que sont réunies dans des catégories génériques des phases aux propriétés chromatographiques très différentes. En outre, cette diversité s'est encore accentuée avec l'apparition des phases dites « special base » ou « base deactivated », dédiées à l'analyse de composés basiques, comme on en rencontre fréquemment dans le domaine pharmaceutique. Ces composés, qui se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs groupements amine, sont susceptibles de développer avec les silanols résiduels présents en surface des interactions supplémentaires à l'origine souvent d'asymétrie de pic et de perte de résolution. Derrière l'appellation « special base » se dissimule une multitude de stratégies visant à diminuer ces interactions indésirables. Au niveau de l'industrie pharmaceutique, la problématique du choix de la colonne est devenue critique : comment sélectionner rationnellement une phase stationnaire apte à la séparation de composés basiques d'intérêt, qui possède de surcroît une bonne durée de vie, parmi plus de 600 disponibles commercialement [1] ? Le besoin de caractérisation n'émane pas seulement d'une industrie à la recherche d'un outil pour optimiser son développement de méthodes, mais de tous les utilisateurs, puisque ce problème se pose aussi lors du simple remplacement d'une colonne qui n'est plus commercialisée. La seule approche rationnelle consiste à fournir une méthodologie, fondée sur des mesures chromatographiques, pour la caractérisation des phases stationnaires d'intérêt. Si la procédure de test s'avère fiable et robuste, elle pourra être mise en œuvre pour établir une base de données dédiée à la classification des colonnes, ouverte à l'incorporation de nouvelles phases. Plusieurs approches ont été décrites dans la littérature, mais aucune ne s'est imposée à ce jour, probablement parce que des conditions expérimentales trop restreintes conduisent à des contradictions dans les classifications proposées.

Ce constat nous a conduit à développer notre propre procédure de test avec pour objectif d'obtenir un outil de caractérisation performant et fiable. A cette fin, notre approche se veut complètement différente de celles jusqu'alors utilisées, en reprenant la procédure à la base.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'objet à caractériser : s'agit-il de la colonne analytique dans l'absolu, comme le considèrent la plupart des tests, ou faut-il prendre aussi en compte le modificateur organique ? Les tests existants fonctionnant généralement dans un seul solvant, souvent le méthanol, présument de fait la possibilité d'une extrapolation directe d'un solvant à un autre. Mais la nature du solvant a-t-elle un impact sur les caractérisations ?

Une fois choisi l'objet à caractériser, il s'agit ensuite de déterminer les conditions chromatographiques du test. Au lieu de choisir des solutés et des conditions *a priori* dont on postule le pouvoir de caractérisation, nous les avons sélectionnés pour leur grande variété. D'un point de vue méthodologique, nous avons d'abord mis en œuvre notre procédure sur un panel représentatif de colonnes dans des conditions étendues, afin de maximiser le potentiel de caractérisation. La combinaison d'un raisonnement chromatographique avec l'analyse multivariée nous a ensuite permis de réduire considérablement la procédure initiale de test sans perte significative d'information.

Une fois les conditions du test réduites sélectionnées de manière optimale, nous nous sommes penchés sur l'aspect validation de notre procédure de test. En effet, comme toute méthode chromatographique, et bien qu'il en soit fait peu de cas dans la littérature, le test a vocation à être utilisé en dehors du cadre du laboratoire où il a été développé et donc à être transféré à d'autres laboratoires. Pour cela, notre procédure doit subir une étape de validation.

Aussi, nous avons porté une attention particulière à une étude interlot pour mettre en évidence les limites du pouvoir discriminant de notre test. Nous nous sommes attachés en outre à en examiner la robustesse, de manière à déterminer les variations limites que pouvait tolérer notre protocole expérimental sans remettre en cause les résultats obtenus.

Ensuite, nous avons appliqué notre procédure de caractérisation à un plus grand nombre de phases stationnaires afin d'obtenir une cartographie, contenant plus de 70 couples colonne/solvant essentiellement dédiés à l'analyse des composés pharmaceutiques (colonnes « Special Base »). Nous nous sommes aussi intéressés aux caractéristiques qui évoluent lors de la dégradation d'une colonne dans des conditions réelles d'analyse. Nous examinerons les potentialités de la combinaison d'outils chimiométriques pour relier objectivement les familles de phase stationnaires à leurs comportements chromatographiques.

Pour permettre les comparaisons visuelles des colonnes, l'étape ultime du développement de notre procédure de caractérisation comporte la construction de cartes d'identité. Celle-ci repose sur la sélection de descripteurs issus des classifications, qui sont à la fois informatifs et robustes, et offre un moyen simple d'identification.

Partie A : Synthèse bibliographique et problématique

Chapitre I Les phases stationnaires greffées apolaires et l'analyse de solutés basiques

I.A Introduction

Pour assurer des standards séparatifs de haute qualité et respecter les recommandations et/ou obligations réglementaires de type ICH, FDA ou des différentes pharmacopées, l'analyse de composés pharmaceutiques doit pouvoir disposer de supports possédant les caractéristiques suivantes :

- Des phases stationnaires présentant une modularité des propriétés de rétention et de sélectivité, pour faire face à tout type d'analyse ;
- Une bonne stabilité à long terme tant d'un point de vue mécanique que chimique, notamment sur une gamme étendue de pH et pour des températures supérieures à l'ambiante si besoin est ;
- Des particules possédant une haute surface spécifique pour une meilleure capacité d'échange et de distribution homogène en ce qui concerne leur taille et leur diamètre de pores ;
- Des pores de taille adaptée à celle des molécules à séparer et de connectivité suffisante pour permettre un transfert de masse efficace ;
- Une matrice homogène en énergie de surface et aisément modifiable chimiquement.

Ces critères présupposent l'emploi d'un matériau dont la chimie est connue, tant au niveau de la maîtrise de sa synthèse qu'au niveau de la modification de sa surface. Répondant à cette condition préalable et présentant une haute surface spécifique alliée à une forte résistance mécanique, la silice s'est imposée comme le matériau de choix. Ainsi, la plupart des phases stationnaires sont constituées de particules de silices greffées. D'autres supports répondant à ces critères sont aussi disponibles, comme ceux à base de polymères, d'autres oxydes de métaux (oxydes de zirconium [2], d'aluminium, de titane [3-22]), ou de carbone graphitisé poreux [23-28]. Cependant, nous nous limiterons aux phases stationnaires à base de silice eu égard à l'importance de leur offre et de la prépondérance de leur utilisation dans l'analyse des composés pharmaceutiques.

I.B La matrice de silice

La silice SiO_2 , ou dioxyde de silicium, est le matériau le plus abondant de la croûte terrestre. Que ce soit sous forme cristalline (quartz, cristobalite, etc...) ou sous forme amorphe (verre anhydre ou silice colloïdale hydratée), la silice est utilisée dans un très grand nombre d'applications industrielles qui couvrent des domaines très différents : l'électronique, l'optique, les céramiques, la pétrochimie (catalyse, lubrifiants, revêtements de surface, renforcement de polymères), les industries des silicones et cimentière... La silice pouvant servir d'adsorbant, on retrouve son emploi en chromatographie depuis les années 1920.

I.B.1 Propriétés générales

La silice utilisée en chromatographie est une silice amorphe et poreuse [29]. Comme elle est hydroxylée et hydratée, on la désigne communément sous le terme de « gel de silice » [30] de formule $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Si sa résistance mécanique a pour origine le matériau en masse, les

propriétés d'adsorption lui sont par contre conférées par sa grande surface d'échange. Or comme pour tous matériaux, la surface n'est jamais régulière, d'autant moins lorsqu'ils sont poreux. Afin de mieux appréhender la complexité de cette surface, nous détaillerons les propriétés générales de ce matériau suivant le cheminement de la Figure I-1.

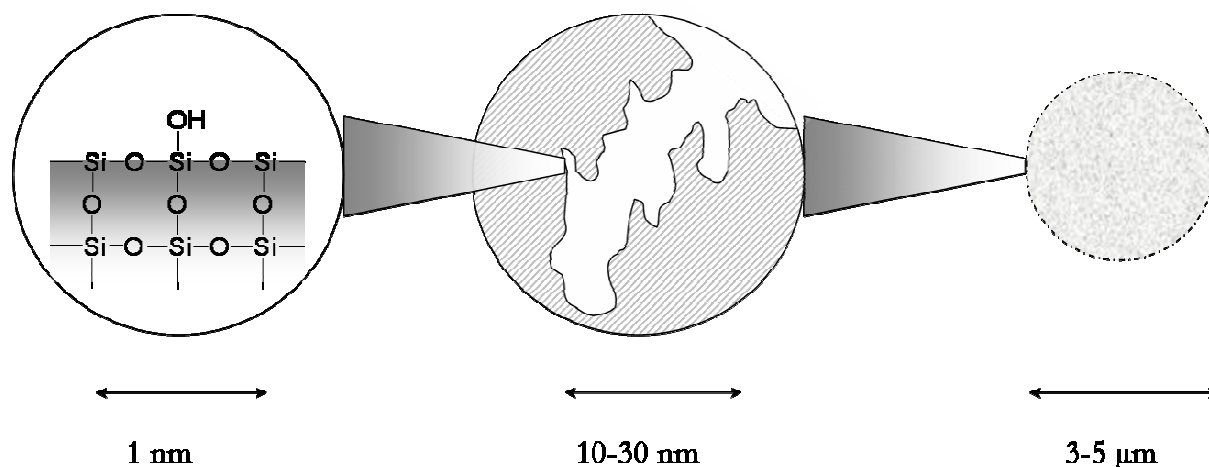


Figure I-1 : Structure de la silice à différentes échelles.

En premier lieu, nous nous intéresserons aux caractéristiques locales de la silice à l'échelle de quelques atomes ($< 1\text{ nm}$), puis nous décrirons les propriétés supplémentaires apportées par l'organisation du matériau à différents ordres de grandeur, que ce soit à l'échelle du pore ou de la particule (quelques micromètres).

I.B.1.a Nature de la surface et chimie des silanols

A l'échelle atomique, la silice s'organise suivant un réseau formé de tétraèdres SiO_4 (hybridation des orbitales de type sp^3) liés chacun par leurs sommets. La surface du gel se compose de deux types de fonctions chimiques : les ponts siloxane Si-O-Si et les groupements silanol Si-OH . Si les ponts siloxane constituent la structure interne du réseau de silice, ils ne constituent pas pour autant l'essentiel de son squelette en surface¹. En effet, la présence d'eau en surface assure l'ouverture d'un certain nombre de ponts pour former des groupements silanol. La concentration de chacun de ces groupements varie suivant la température. A température ambiante, lorsque la surface est à son maximum d'hydroxylation, le nombre de groupes hydroxyles par unité de surface, α_{OH} , avoisine $4,6 \pm 0,5 \text{ OH.nm}^{-2}$ (soit $7,6 \pm 0,8 \text{ µmol/m}^2$) [31] tandis qu'au-delà de 1200°C , seuls les ponts siloxane persistent. Ces derniers, résultant alors de la déshydratation de deux silanols voisins, sont hydrophobes et ne participent guère au phénomène d'adsorption, qui trouve en revanche son origine dans la présence des groupements silanol : hydrophiles, ils sont capables d'interagir par liaisons hydrogène mais aussi par liaisons de type π [32, 33] (cf. Annexe 1). On distingue différents types de silanols : les silanols libres ou isolés, les silanols vicinaux ou associés (liés par liaison hydrogène) et les silanols géminaux (encore dénommés silanediols). La distance moyenne séparant deux silanols isolés est estimée à $0,5 \text{ nm}$. Pour que deux groupements puissent interagir par liaison H, il faut qu'ils soient séparés de moins de $0,31 \text{ nm}$. Lorsque la distance est inférieure à $0,28 \text{ nm}$, les silanols sont qualifiés de vicinaux puisqu'ils peuvent alors interagir avec plusieurs de leurs homologues [32]. La Figure I-2 résume de façon simplifiée les différents groupements présents à la surface de la silice, dont l'existence a pu être mise en évidence par la combinaison de techniques spectroscopiques (IR et RMN).

¹ Le squelette interne de silice possède néanmoins des défauts de type :

1. chimique : la présence d'eau incorporée en masse lors de la synthèse du matériau ;
2. mécanique : la formation d'ultramicropores ($d < 1 \text{ nm}$), de diamètre comparable à celui des molécules d'eau et dont la surface n'est pas accessible aux atomes de krypton utilisés pour mesurer la surface spécifique.

Tout ceci se traduit par l'existence de groupements silanol internes.

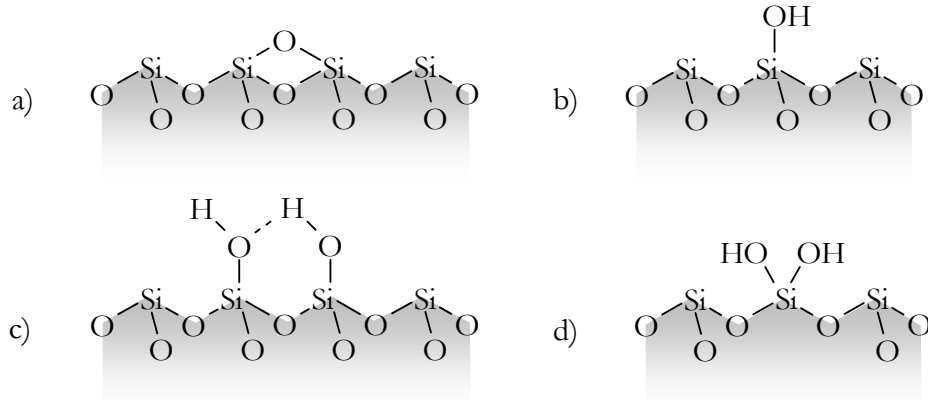


Figure I-2 : Différents types de groupements en surface de la silice (d'après [30, 31, 33]) ; a) pont siloxane, b) silanol isolé, c) silanols vicinaux, d) silanols géminaux.

Suivant la terminologie Q^n utilisée en RMN, où n indique le nombre de liaisons O–Si rapportées à un atome central de silicium, les différents types de silanols s'identifient comme suit : Q^4 pour les siloxanes de surface (-110 ppm), Q^3 pour les silanols isolés (-101 ppm) et Q^2 pour les silanols géminaux (-92 ppm) [34]. La Figure I-3 montre un exemple de spectre RMN de silice vierge [35] : en plus des ponts siloxane et des silanols isolés, elle révèle la présence de silanols géminaux.

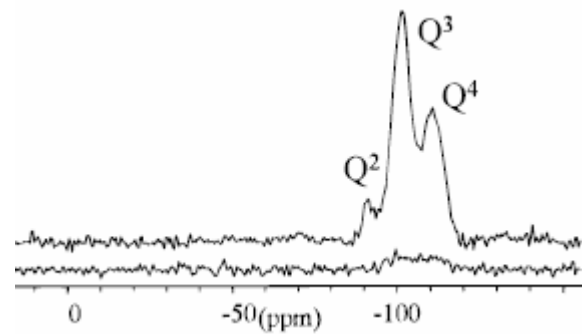
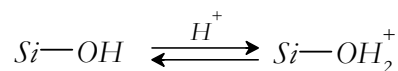


Figure I-3 : Spectre RMN ^{29}Si CP MAS (^1H - ^{29}Si cross-polarization magic angle-spinning) de la silice vierge Rx-Sil [35].

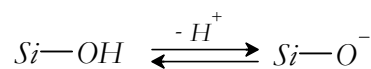
L'aire moyenne occupée par un groupement hydroxyle est évaluée à 0,217 nm² [29]. Cependant, elle est dépendante du type de silanol : elle s'élève à 0,450 nm² pour un silanol isolé tandis qu'elle est réduite à 0,068 nm² pour des silanols vicinaux, pour une température inférieure à 300°C [31].

En présence d'eau, la surface de silice présente divers stades d'hydratation : autant les silanols peuvent n'être que simplement hydratés s'ils ne sont liés qu'à une seule molécule d'eau, autant la surface peut être entièrement recouverte d'une couche d'eau mono ou plurimoléculaire, aboutissant à un gel de silice fortement hydraté et dont les propriétés d'adsorption seront alors totalement masquées.

En milieux aqueux, les groupements silanol possèdent des propriétés chimiques particulières. De manière générale en milieu solvaté protique, le pH joue un rôle important en déterminant la réactivité des surfaces du solide. En conditions acides (pH < PZC, où PZC est le point de charge nulle) a lieu la réaction :



L'oxyde de silicium, protoné, est alors chargé positivement et peut donner lieu à des phénomènes d'échange d'anions. En conditions basiques (pH > pI), les oxydes de métaux subissent une perte de proton selon la réaction :



Ils se retrouvent alors chargés négativement, jouant le rôle cette fois-ci d'un échangeur de cations. En pratique, tout dépend de la valeur du point de neutralité et des constantes de réactions. Pour la silice, la valeur du point de neutralité vaut environ 2,5 [5] et la réaction de protonation est

Chapitre I

caractérisée par $\log K = -1,9$ [32] : elle apparaît donc comme très peu probable. Par contre, les silanols sont connus pour être des acides faibles. Etant donnée l'hétérogénéité de nature des silanols, il est plus réaliste de considérer une distribution de pK_{As} , généralement située entre 3 et 7 et centrée sur 5, plutôt que l'existence d'une valeur unique. Les caractéristiques de cette distribution dépendent de la nature de la silice, et donc de sa synthèse. Seule la réaction de déprotonation est considérée en pratique et la possibilité d'échange de cations est envisagée.

La solubilité constitue aussi une propriété fondamentale du matériau. La dissolution de la silice dans l'eau est une hydrolyse selon : $(SiO_2)_x + 2H_2O \rightarrow (SiO_2)_{x-1} + Si(OH)_4$. Le processus de dissolution est difficile à interpréter car il s'avère complexe. En effet, il dépend de la pression, de la température, de la structure de la silice, de la taille des particules mises en jeu, de la surface spécifique et du pH de la solution aqueuse. Si en deçà de $pH=8$, la dissolution s'avère constante et négligeable, l'hydrolyse s'accélère au-delà de $pH=9$, à cause de la formation d'ions silicate en plus de l'acide silicique $Si(OH)_4$ [29, 30].

D'un point de vue chromatographique, ce dernier point constitue manifestement une limitation de l'utilisation de la silice pour l'analyse de composés basiques, que l'on rencontre fréquemment en milieu pharmaceutique. En effet, pour éviter un mécanisme d'échange de cations : $Si-O^- - A^+ + BH^+ \rightleftharpoons Si-O^- - BH^+ + A^+$ peu désirable d'un point de vue analytique (la distribution hétérogène des pK_{As} des silanols induit une traîne de pic chromatographique qui nuit à la qualité de l'analyse), il est préférable d'opérer l'analyse avec des composés basiques sous forme non chargée. Pour cela, il peut être souhaitable d'élever le pH de la phase aqueuse, au-delà de 9, ce qui occasionne la dissolution du support.

I.B.1.b Géométrie et énergie de surface

Les matériaux solides ne possèdent jamais une surface parfaitement plane ou régulière, y compris ceux extrêmement organisés comme le PTFE ou le carbone sous forme graphite : persiste toujours un degré de désordre, variant suivant la nature du solide. Le désordre est plus prononcé pour les matériaux non cristallins, ou amorphes, comme la silice utilisée à des fins chromatographiques. Les surfaces réelles des solides présentent un degré limité d'organisation, quantifié par la dimension fractale D . Sa valeur pour la silice amorphe est estimée à $2,94 \pm 0,04$ [36] pour un maximum de 3. Elle dénote donc une très grande porosité et explique ainsi les propriétés particulièrement adsorbantes de ce support. Ces propriétés fractales sont étroitement liées aux mécanismes de croissance du matériau [37].

En effet, la silice amorphe croît selon un processus d'agglomération de noyaux locaux (« local clusters »). Ces unités structurales, dont un exemple est représenté en Figure I-4, engagent en moyenne 36,7 tétraèdres SiO_2 . L'organisation du noyau permet la formation de cycles à 6, 7 ou 8 arrêtes de tétraèdres [38], pouvant donner naissance à des interactions supplémentaires entre groupements silanols, rapprochés par la topologie quasi-fractale du matériau.

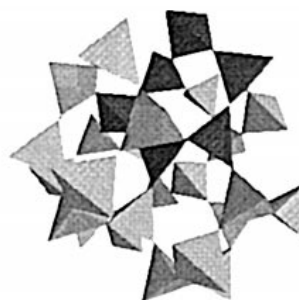


Figure I-4 : Noyau local typique d'une silice amorphe, dont la structure est dérivée de celle de la β -cristobalite ; il comporte 12 cycles à 6, dont un est représenté en gris foncé (d'après [38]).

De l'agencement de ces noyaux vont dépendre la structure, l'épaisseur des parois et la distribution des pores. Par voie de conséquence, leur organisation régit aussi la surface spécifique S_p du support. Puisque hétérogénéités énergétique et géométrique sont liées sur ces surfaces [39, 40], il en résulte une hétérogénéité d'adsorption, qui gouverne la réactivité du support.

Comme l'illustre la Figure I-5, la topologie de la silice poreuse amorphe s'avère extrêmement compliquée ; toutefois certains travaux de synthèses permettent d'apporter des éclaircissements [37, 41-43]. Quoi qu'il en soit, ce domaine fait encore l'objet d'investigations approfondies. Par exemple, le choix du type de modélisation pour la répartition des silanols est encore sujet à débat [44-46].

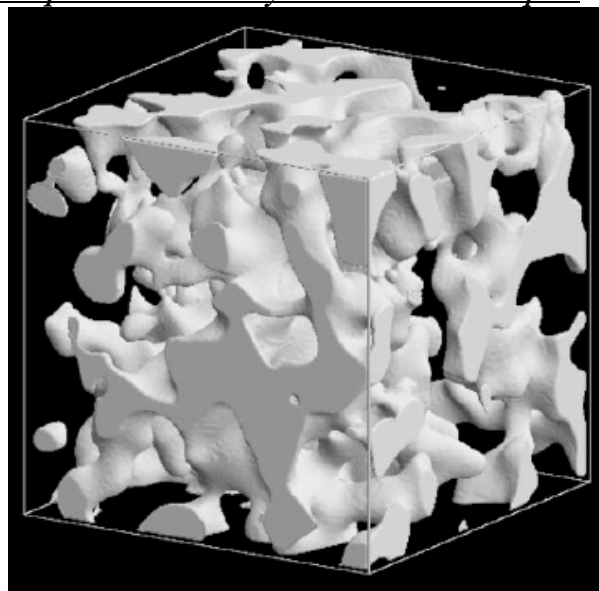


Figure I-5 : Représentation tridimensionnelle du Vycor, verre de silice poreuse ; le réseau poreux est représenté en gris (échelle de l'arrête du cube : 100 nm) [47].

I.B.1.c Structure des pores

La structure poreuse d'un solide est caractérisée par les paramètres suivants : la porosité du matériau, le diamètre, la forme et la distribution de taille des pores, leur connectivité ainsi que leur volume et surface spécifique [41, 48-51]. Ces paramètres sont issus de différentes mesures de sorption.

La porosité d'un matériau se définit par celle offerte aux molécules en phases gazeuse ou liquide. Selon les recommandations de l'IUPAC [52], le diamètre moyen de pore \bar{D} définit la catégorie à laquelle le matériau appartient :

- $\bar{D} < 2 \text{ nm}$: solide microporeux ;
- $2 < \bar{D} < 20 \text{ nm}$: solide mésoporeux ;
- $\bar{D} > 50 \text{ nm}$: solide macroporeux.

La surface spécifique S_p et le volume de pore v_p sont déduits d'isothermes d'adsorption. Les silices utilisées classiquement en chromatographie sont mésoporeuses et possèdent généralement une distribution de pores unimodale². Le Tableau I-1 regroupe les caractéristiques générales de ces silices.

Tableau I-1 : Valeurs typiques de silices mésoporeuses.

<i>Caractéristique</i>	<i>Valeurs</i>	<i>Modèle d'adsorption</i>
\bar{D}	4-20 nm	Barrett-Joyner-Halenda (BJH)
S_p	50-500 m ² g ⁻¹	Brunauer, Emmet, Teller (BET)
v_p	0,5-1,2 cm ³ g ⁻¹	loi de Gurvitsch

I.B.1.d Propriétés physiques : morphologie, taille et distribution des particules

La majorité des silices pour la chromatographie sont constituées de particules sphériques, dont le diamètre nominal varie entre 3 à 5 μm : la forme sphérique est en effet celle qui offre la meilleure résistance mécanique et la moindre résistance à l'écoulement. Les performances de la colonne vont être en partie déterminées par la distribution du diamètre des particules, dont

² Dans certains cas (particules agglutinées ou silices monolithiques), cette distribution peut s'avérer bimodale.

l'étendue est estimée par le rapport d_{p90}/d_{p10} . Une distribution étendue de particules se traduit par :

1. Une élévation de la perte de charge due aux petites particules, provoquant un tassement du lit, qui s'accompagne de la création d'un volume mort et de chemins préférentiels ;
2. Une perte d'efficacité provenant des particules de diamètres plus élevés.

Une distribution étendue mène donc à la détérioration des performances de la colonne, raison pour laquelle l'on cherche à obtenir des distributions aussi resserrées que possible.

Les propriétés géométriques et thermodynamiques dépendant du procédé de synthèse du matériau [37], l'objectif de la section suivante consiste à illustrer les résultats issus de différentes voies d'obtention de la silice, toutes provenant du procédé sol-gel.

I.B.2 Méthode de synthèse de la silice : le sol-gel

Historiquement, les premières silices employées pour la chromatographie possédaient une forme irrégulière, comme l'illustre la Figure I-6. Cependant, ce type de silice, du fait de son procédé de fabrication – notamment le broyage [53], s'est avéré limitante en termes de pureté, d'efficacité et de résistance mécanique.

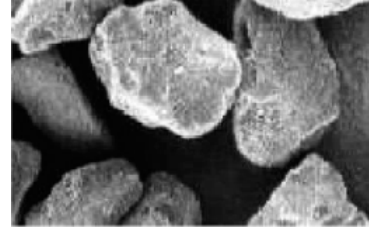


Figure I-6 : Silice de forme irrégulière [54]

L'apparition de particules de silice de forme sphérique, grâce au développement de la technique dite de *sol-gel*, a permis l'avènement de la Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP), méthode devenue incontournable pour la séparation de composés pharmaceutiques notamment. Cette section va donc s'intéresser à la procédure sol-gel, qui a sans conteste révolutionné la synthèse de la silice. La teneur en cations métalliques définit 2 types de silice, le type A et le type B.

I.B.2.a Procédure générale du *sol-gel*

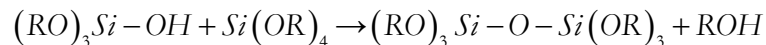
La méthode se décompose schématiquement en deux grandes étapes [29, 55]. Elle consiste d'abord à réaliser un *sol* (c'est-à-dire une suspension colloïdale) de silice par l'hydrolyse d'alkoxysilanes³, qui ensuite se condensent et polymérisent en polyalkoxysiloxanes suivant les étapes :

1. Hydrolyse

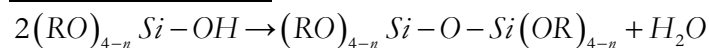


2. Condensation

a. Hétérocondensation :



b. Homocondensation :



Parmi les alkoxysilanes les plus utilisés, citons le tétraméthoxysilane (TMOS) [56], et le tétraéthoxysilane (TEOS ou TES) [57]. En pratique, ces réactifs sont introduits dans un mélange hydroorganique auquel est ajouté un catalyseur (de l'acide chlorhydrique par exemple). La polycondensation hydrolytique produit une suspension colloïdale de particules sphériques de

³ Historiquement, il s'agissait de l'hydrolyse de silicates solubles en milieu alcalin, générant des acides polysiliciques. Du fait de leur facilité à être distillé, l'emploi d'alkoxysilanes s'est imposé car il permet d'obtenir une silice de très haute pureté et quasiment dépourvue de métaux.

Les phases stationnaires greffées apolaires et l'analyse de solutés basiques

silice non poreuse et amorphe. La taille des particules (1 à 100 nm) est influencée par de nombreux paramètres, parmi lesquels le pH de la solution, les concentrations en solvant(s), précurseur(s), sel(s), la température et la nature des réactifs.

S'en suit une étape durant laquelle les particules du *sol* vont s'interconnecter par polycondensation pour former un réseau tridimensionnel rigide et poreux, le *gel*. Suivant les conditions (rapport $\text{SiO}_2/\text{H}_2\text{O}$, nature et concentration du catalyseur, des précurseurs), le processus de gélification peut prendre quelques secondes ou minutes à quelques heures, voire mois. Le *gel* biphasique alors obtenu, occupe le même volume que le *sol*. D'un point de vue macroscopique, le *sol* voit croître sa viscosité au fur et à mesure de son agrégation tridimensionnelle. C'est durant cette étape que la silice acquiert en grande partie sa porosité. Le *gel* alors encore hydraté (*hydrogel*) est ensuite séché pour former un *xérogel*. Pendant le séchage, le mélange hydroorganique s'évapore des pores, causant une densification du gel. La contraction de volume provoque un abaissement de la porosité du *xérogel*. Peuvent s'ajouter en outre des étapes intermédiaires de vieillissement – par traitement acide ou basique [29]– et de rinçage avant le séchage du gel.

L'obtention de particules nécessite de disperser rapidement le gel pour obtenir des gouttellettes. Ceci peut s'effectuer par :

1. Séchage par atomisation (« Spray drying »), consistant en la pulvérisation du gel suivie de son séchage ;
2. Dispersion mécanique du gel (ou de la suspension colloïdale), à laquelle succèdent des étapes d'émulsion et d'extraction de l'eau résiduelle (« oil emulsion ») ;
3. Précipitation suite à l'ajout de monomères.

La récente synthèse de Nawrocki [5] permet d'approfondir ces procédures.

La forme sphérique des particules, dont un exemple est présenté en Figure I-7, provient simplement de la minimisation de leur énergie de surface lors de la dispersion et du séchage. L'ajustement de divers paramètres expérimentaux permet de contrôler le diamètre des particules, la taille et la distribution des pores, rendant ainsi les propriétés de surface plus homogènes.

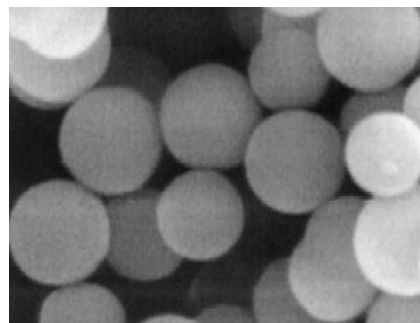


Figure I-7 : Exemple de silice de forme sphérique (diamètre de 1,7 μm) [53].

I.B.2.b Procédures dérivées du *sol-gel*

La procédure générale connaît de nombreuses variantes [5, 29, 53, 54, 56, 58-74]. Loin de les décrire toutes, la discussion suivante s'attachera à illustrer les différences de morphologies pouvant être ainsi obtenues.

I.B.2.b.i Silice particulière

Initialement, la technique *sol-gel* possédait pour objectif la synthèse de silice de forme sphérique.

Les ORMOSIL

Outre la silice inorganique ultrapure, la technologie *sol-gel* autorise des copolymérisations pour inclure des groupements fonctionnels organiques, donnant naissance à des matériaux hybrides, à la fois organiques et inorganiques [75]. Ils sont encore dénommés ORMOSIL pour « organically modified silicates » [56, 59, 76]. Parmi les groupements utilisés, citons $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_6\text{H}_5$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ou $-(\text{CH}_2)_3\text{SH}$. La Figure I-8 reprend le cas d'une silice hybride commerciale, la XTerra (Waters), utilisée en chromatographie.

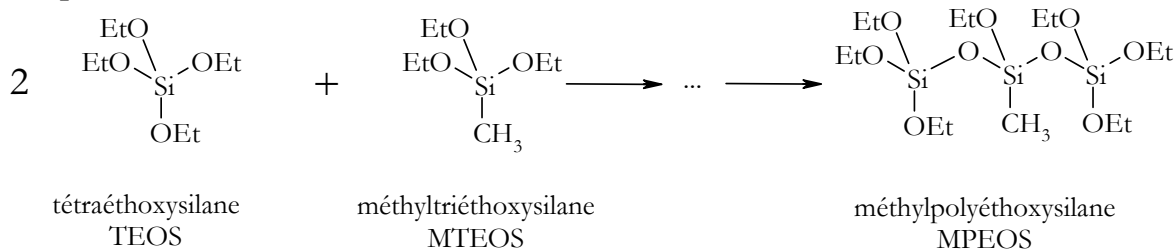


Figure I-8 : Exemple de synthèse de particules hybrides

Le groupement méthyle est non seulement présent dans la structure interne mais aussi en surface de la particule. Par conséquent, ces particules de silice inorganique/organique présentent en surface un nombre réduit – d’approximativement 33%– de groupements silanol par rapport à une silice ultra pure classique.

Méthode polyéthoxysiloxane (PES)

Cette voie de synthèse, développée par Unger [29, 77], utilise le tétraéthoxysilane qui par hydrolyse fournit du polyéthoxysiloxane (PES). Ce PES, émulsionné avec un mélange hydroalcoolique, précipite sous forme de sphères solides d’hydrogel de silice lors de l’ajout du catalyseur. Cette approche s’éloigne de la procédure *sol-gel* classique puisque l’obtention de l’*hydrogel* s’effectue non pas par gélification mais plutôt par coacervation⁴.

Agglutination de particules de silices

Une autre variante consiste à agglutiner des particules primaires, issues de la voie PES [29, 57, 77]. Si ces dernières sont poreuses, le processus offre la possibilité de conférer à l’agglomérat une distribution bimodale des pores, ce qu’illustre la Figure I-9.

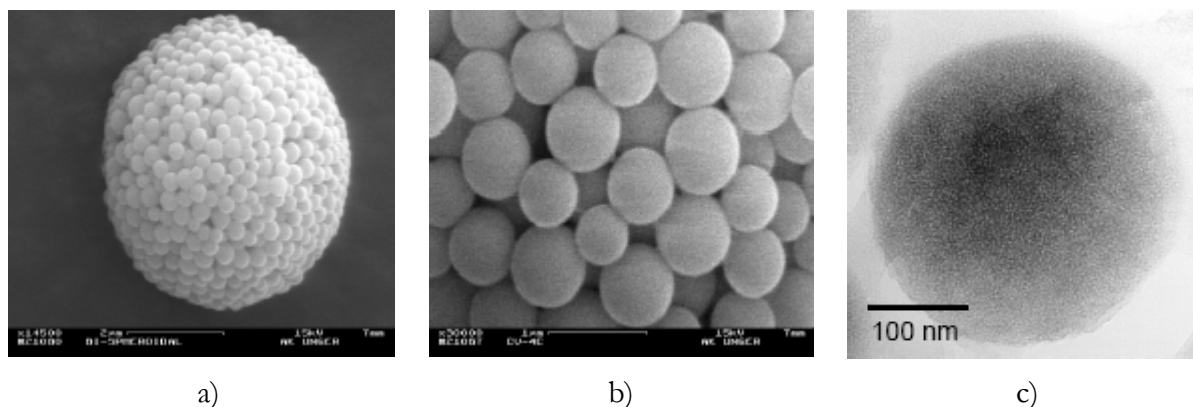


Figure I-9 : Exemple de particule de silice possédant une distribution bimodale de pores ; images MEB de a) l’agglomérat et b) des particules primaires tandis qu’en c) est représentée l’image MEB haute résolution d’une particule sphérique primaire.

La silice présente deux distribution de taille de pores, l’une à 2,2 nm et l’autre variant de 22 à 200 nm suivant la température utilisée pour la synthèse. Cette seconde distribution est recherchée dans le but d’obtenir de meilleures efficacités d’un point de vue chromatographique tout en modérant la perte de charge, autorisant ainsi l’utilisation d’un débit supérieur à celui employé avec une silice particulaire conventionnelle. Cette situation est intermédiaire entre les silices particulières à distribution unimodale de pores et les silices monolithiques.

I.B.2.b.ii Synthèse de monolithes macroporeux

Les phases monolithiques sont aussi issues du procédé *sol-gel* [58, 67-74]. Constitué d’un seul tenant, le monolithe s’oppose macroscopiquement aux silices particulières. Il se caractérise par sa structure bimodale de pores (cf. Figure I-10).

⁴ Dans le processus de coacervation, les particules de silice sont entourées d’une couche adsorbée ; rendues moins hydrophiles, elles ne forment pas de réseau entre elles. Les particules s’agrègent alors en une phase liquide concentrée immiscible avec la phase aqueuse.

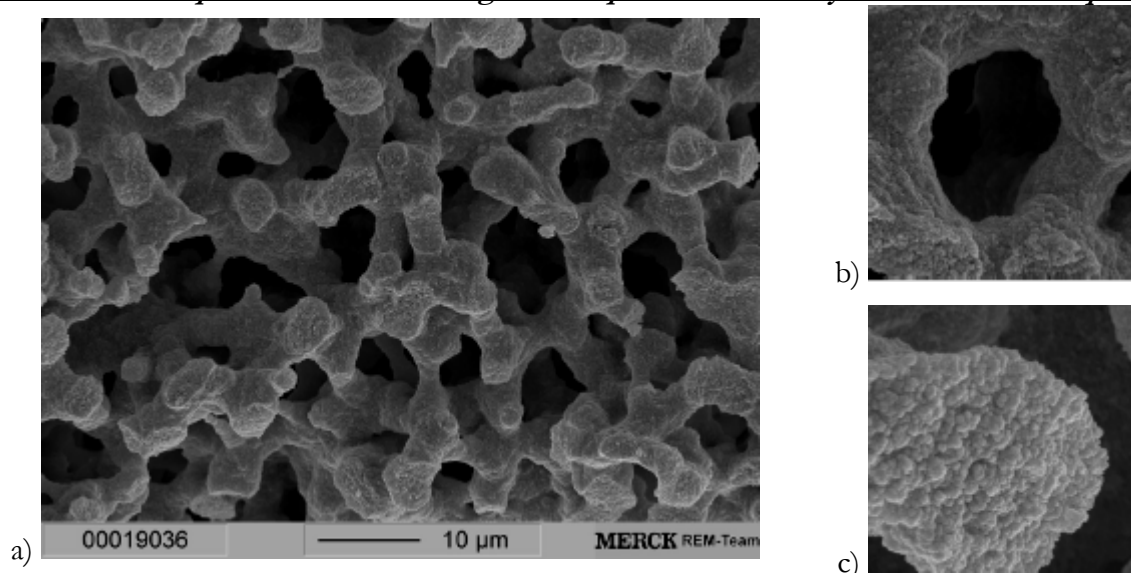


Figure I-10 : Images MEB a) de la structure typique poreuse d'un monolithe de silice, b) d'un macropore et c) de la structure mésoporeuse du squelette de silice [73].

Au niveau de la synthèse, la séparation des voies particulaire et monolithique s'effectue pendant la formation du *gel*, lors de la séparation de phase : la voie monolithique s'appuie sur une décomposition spinodale, qui se caractérise par de petites fluctuations de composition sur de grandes distances alors qu'un procédé classique de germination est caractérisé par de grandes variations de composition sur de petites distances. La microstructure résultante consiste en une dispersion uniforme de petites particules cohérentes interconnectées [78].

Les silices monolithiques à vocation chromatographique possèdent des macropores de 1-2 µm et des mésopores de 10 nm. Elles offrent des surfaces spécifiques comparables à celles des silices particulaires de 5 µm de diamètre avec des pertes de charges 5 fois inférieures. En outre, les monolithes permettent de s'affranchir du tri des particules suivant leur dimension.

Bien que toutes issues du même procédé *sol-gel*, qui s'avère extrêmement flexible, les différentes voies de synthèse génèrent des géométries de surface très variées, entraînant ainsi une grande hétérogénéité énergétique du support.

Quant à l'influence du procédé de synthèse sur la stabilité des matrices de silices, nous la discuterons au travers de celle des supports greffés apolaires. Ce point sera traité en section I.C.2.b, p 20.

I.C Les silices greffées apolaires

La discussion se limite aux phases stationnaires constituées de particules de silice. Elle peut être extrapolée au cas des silices monolithiques greffées après l'obtention du support physique⁵.

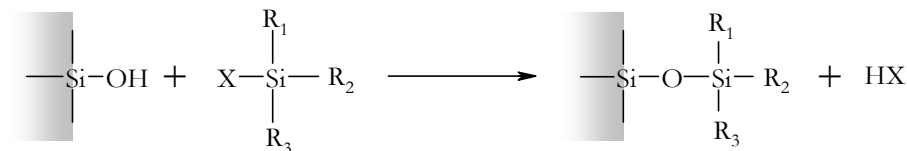
I.C.1 Méthodes de greffage

I.C.1.a Principe

La silice vierge répond déjà en soi aux critères définis en I.A. Son utilisation directe en tant que phase stationnaire chromatographique s'avère cependant délicate, eu égard aux équilibres lents d'adsorption peu compatibles avec la réalisation de gradients d'élution. Cependant, du fait de la présence de nombreux groupements silanol en surface, la silice offre des possibilités considérables de modifications pour réaliser des séparations fondées sur des interactions de type partage apolaire.

⁵ Il est en effet possible d'envisager la possibilité pour les silices monolithiques de s'affranchir de l'étape de greffage en l'intégrant directement à la synthèse du *sol-gel*.

Le greffage consiste à réaliser une substitution sur le groupement silanol par un groupement alkyl, qui procurera à la phase stationnaire son caractère hydrophobe. Quatre types de greffage peuvent être envisagés : Si-O-C, Si-C, Si-N, et Si-O-Si. Pour des raisons de stabilité (hydrolyse en milieu aqueux ou hydroorganique), seul celui reposant sur la création de pont siloxane s'avère utilisable. La réalisation de ce pont est obtenue par l'action d'un groupe partant X d'un silane quadri-substitué sur un groupement silanol du gel de silice, comme l'illustre la Figure I-11.



Avec X=Cl, OCH₃,...

Figure I-11 : Principe du greffage de la silice.

Dans la plupart des cas, ce sont des chlorosilanes qui sont employés à cet effet. Le silane est dit monofonctionnel dans le cas où R₁, R₂ et R₃ sont des groupements alkyls, difonctionnel quand R₃ s'avère un groupe partant ou trifonctionnel si seul R₂ est un groupement alkyl. Selon la fonctionnalité du chlorosilane, la phase greffée obtenue possédera des caractéristiques différentes. Les conditions opératoires, notamment la présence ou l'absence d'eau, permettent d'obtenir des greffages monomériques, polymériques ou oligomériques.

I.C.1.b Les différents types de greffon

La majorité des méthodes développées pour l'analyse de composés pharmaceutiques utilisent des silices greffées *n*-octyle ou *n*-octadécyle (cf. Figure I-12).

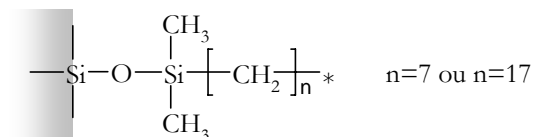


Figure I-12 : Structure des phases greffées conventionnelles.

D'autres types de greffons existent, différant par la longueur de chaîne alkyle ou par l'ajout d'autres fonctionnalités (inclusions de cycles, d'hétéroatomes). Ainsi, parmi les greffons *n*-alkyle, le nombre de carbone de la chaîne hydrocarbonée peut varier de 1 à 34 [79].

Les chaînes courtes (C1 à C4) sont plutôt réservées à des séparations dans le domaine des protéines, tandis que les chaînes plus longues (au-delà d'un octadécyle) sont réservées aux composés type caroténoïdes ou HAP, nécessitant une reconnaissance de forme accrue.

L'ajout d'hétéroatomes ou de cycles permet d'engendrer des sélectivités supplémentaires par le développement d'interactions particulières. Loin de vouloir être exhaustive (cf. [80] pour plus de détails), la Figure I-13 propose un aperçu des différentes phases obtenues après greffage type phényle, perfluoré ou cyanopropyle.

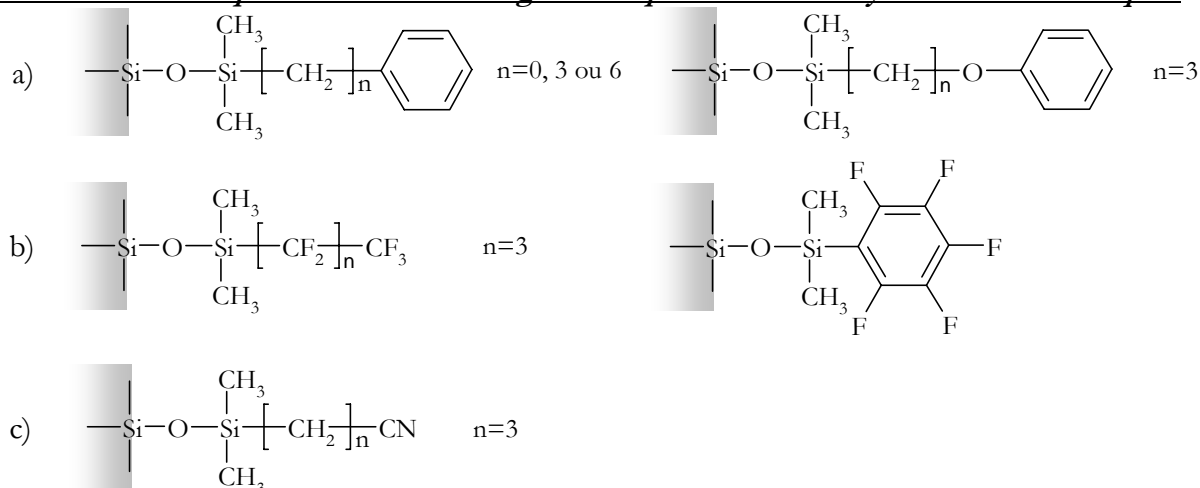


Figure I-13 : Exemples de phases greffées a) phényle, b) fluorées et c) cyano.

Les phases fluorées possèdent des sélectivités particulières vis-à-vis de solutés comprenant des halogènes [81]. Quant aux phases cyanopropyle, elles peuvent être utilisées à la fois en modes de partages apolaire et polaire, sous réserve d'opérer avec une gamme de pH assez réduite⁶.

Plus confidentielles, les phases greffées cholestéryl [82-84], *n*-alkylfluorényle [85, 86], imidenaphtalène [87], calixarène [88], phtalocyanine ou fullerène, dont un aperçu est donné dans la synthèse de Saito [84], sont dédiées à des applications très spécifiques.

Au final, les greffons se différencient par la longueur de la chaîne alkyle principale et l'intégration éventuelle d'hétéroatomes ou de cycles. Mais à cette diversité du groupement central R2, qui définit généralement les interactions que pourra développer la phase stationnaire, se combine en plus celle des groupements R1 et R3 : par exemple, le méthyle peut être remplacé par un phényle [84]...

I.C.1.c Les différents types de greffage

La présence ou l'absence d'eau, combinée à la fonctionnalité du greffon, permet d'obtenir des types de greffages différents.

I.C.1.c.i Greffage monomérique

En absence de toute trace d'eau, l'emploi de greffons mono-, di- ou trifonctionnel aboutit à un greffage de type monomérique (cf. Figure I-14).

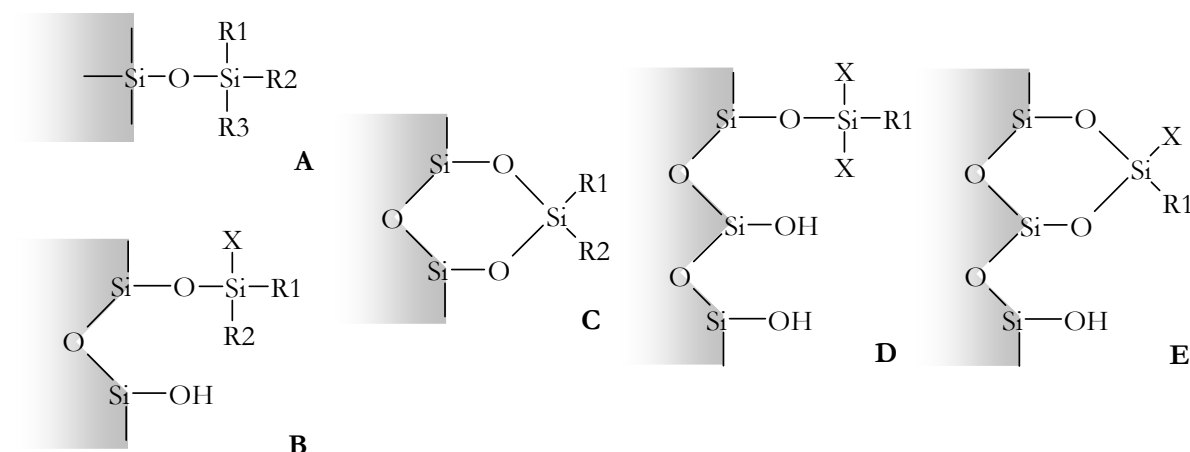


Figure I-14 : Greffage monomérique obtenu, en absence d'eau, par un silane monofonctionnel en A, difonctionnel en B et C, trifonctionnel en D et E.

⁶ Pour pH<1,5 et pH>7, le groupement nitrile s'hydrolyse en groupement amide.

Le greffage d'une monocouche de greffons suggère une organisation semblable à celle d'une $\frac{1}{2}$ membrane lipidique [80], en monocouche organique auto-assemblée (« Self Assembled Monolayer » ou SAM), comme le propose la Figure I-15. Cette modélisation permet de concevoir des interactions entre analytes et phase stationnaire qui s'opèrent via leur pénétration dans la couche alkyle.

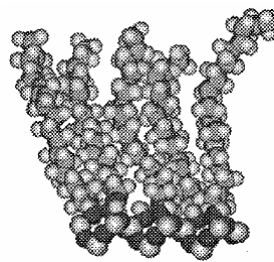


Figure I-15 : Structure pour un gel de silice modifié octadécyle pour $T=350K$ [89].

Cependant, il est difficile de prévoir un état précis de conformations des chaînes. En effet, la minimisation de l'énergie conformationnelle va dépendre de plusieurs paramètres. Au niveau de chaque greffon, la gaine de solvation résulte de la combinaison de deux facteurs :

1. La composition de la phase mobile, c'est-à-dire de la teneur et de la nature du modificateur organique, définissant une gaine *statique* ;
2. La température, responsable de l'agitation thermique du greffon⁷, ajoutant une dimension *dynamique* à la gaine statique.

Au niveau de l'ensemble des greffons, il faut aussi tenir compte d'une contrainte d'espace. En effet, le taux de greffage gouverne l'espace dévolu à chaque greffon, et le nombre de conformations sera d'autant plus réduit que la densité de greffons sera élevée, jusqu'à atteindre idéalement un état *all-trans*, dense plus difficile à pénétrer. Pour des raisons d'encombrement stérique⁸, le taux de greffage ne dépasse jamais guère plus de 50%⁹ des groupements silanols accessibles en surface. De plus, compte tenu de l'hétérogénéité énergétique de surface, il est possible que le greffage ne se réalise pas de façon homogène, aboutissant à des surfaces localement homogènes, mais globalement hétérogènes. La Figure I-16 présente deux exemples opposés de conformations, en considérant un taux de greffage usuel d'un octadécylsilane.

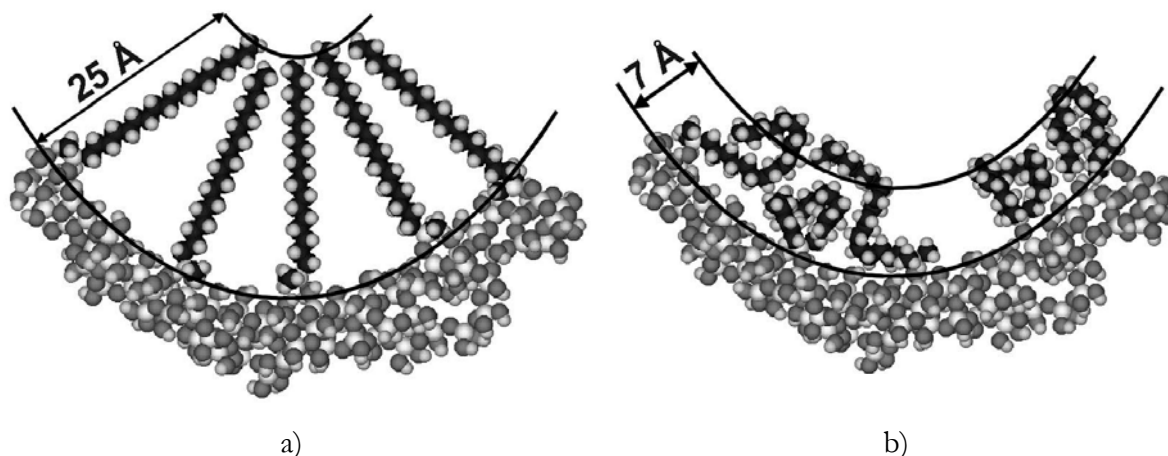


Figure I-16 : Modélisation de surface de silice modifiée avec un greffon octadécylsilane en conformation *all-trans* (à gauche) et à énergie minimale (à droite), d'après [90].

Suivant la conformation des chaînes, le volume de phase et la surface hydrocarbonnée accessible peuvent donc varier considérablement.

⁷ La transition de phase des chaînes octadécyle s'effectue pour des températures comprises entre 5 et 30°C, recouvrant partiellement la gamme de température utilisée usuellement en chromatographie ; pour des chaînes octyle, la transition de phase a lieu en dessous de l'ambiante.

⁸ En raison de la présence des deux groupements méthyle sur l'atome de silicium du greffon, l'aire occupée pour chaque greffon s'élève à 0,4 nm² environ, alors qu'un gel de silice possède une densité de 5 groupements silanol au nm².

⁹ Le taux est dépendant de la longueur de la chaîne alkyle à greffer : pour une chaîne en C1, la densité de greffage s'élève à 4,16 $\mu\text{mol.m}^{-2}$, soit un taux de greffage de 52% tandis que pour une chaîne C18, la densité de greffage ne se monte qu'à 2,51 $\mu\text{mol.m}^{-2}$, correspondant à un taux de greffage de 31%.

Les phases stationnaires greffées apolaires et l'analyse de solutés basiques

Cette technique de greffage, si elle est suffisamment maîtrisée, permet de produire des lots de phases stationnaires greffées de manière plus reproductible qu'avec les autres types de greffage. C'est la raison pour laquelle cette technique est la plus répandue.

I.C.1.c.ii Greffage polymérique

Deux approches sont possibles pour un greffage polymérique du support : une polymérisation verticale, qui s'effectue en solution, ou une polymérisation horizontale, en surface de la silice.

Polymérisation verticale ou polymérisation en solution

La présence d'eau lors de l'utilisation d'un greffon di- ou trifonctionnel complique la réaction de greffage. En effet, soit le greffon peut réagir avec les silanols et se lier à la surface de silice via un pont siloxane, soit le greffon réagit avec l'eau, générant un groupement silanol à la place d'un groupe partant sur le greffon (cf. Figure I-17).

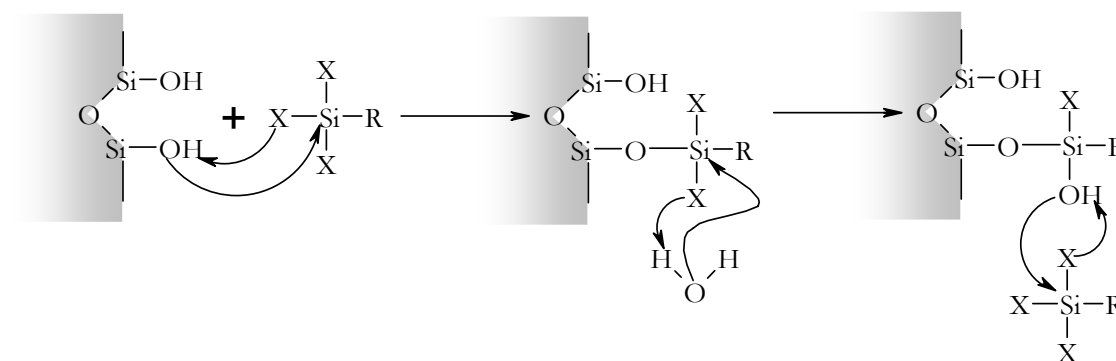


Figure I-17 : Mécanisme réactionnel conduisant à une polymérisation verticale.

Ce groupement silanol sur le greffon modifié peut alors être engagé dans une réaction avec un autre greffon, menant ainsi à une polymérisation verticale orientée, comme le montre la Figure I-18.

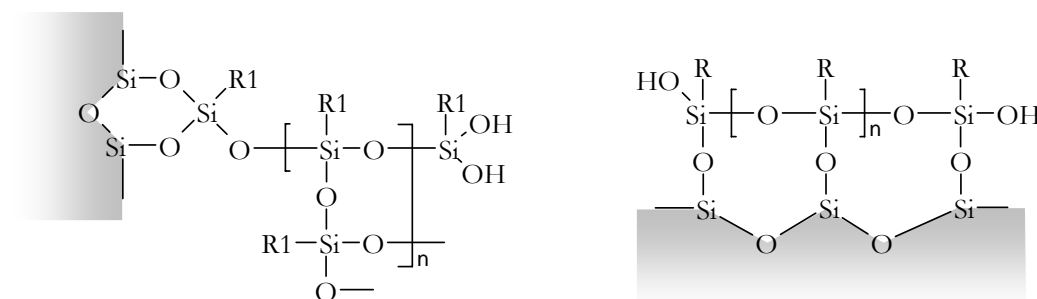


Figure I-18 : Greffage polymérique obtenu par un silane trifonctionnel en présence d'eau.

La phase stationnaire résultante possède une structure de type multicouche à l'origine de mécanismes de rétention plus complexes que ceux se produisant sur une silice greffée monomérique : au partage s'ajoute un mécanisme reposant sur la reconnaissance de forme, provenant de la rigidité accrue de la phase. Néanmoins se posent quelques problèmes inhérents à la polymérisation des greffons. Notamment, l'efficacité de ces phases s'avère souvent inférieure à celle des phases monomériques, en raison d'une accessibilité plus réduite.

Polymérisation horizontale ou polymérisation en surface

Cette voie de synthèse, récemment développée, permet d'obtenir un greffage reposant sur une polymérisation horizontale orientée, fondée sur le principe des monocouches organiques auto-assemblées ou SAM [91, 92].

Chapitre I

L'intérêt de ce type de polymérisation monocouche réside en l'obtention d'un greffage mixte de chaînes alkyle de longueurs différentes, comme l'illustre la Figure I-19, avec un espacement entre les grandes chaînes alkyle modulable.

Par opposition à la polymérisation verticale, cette voie repose sur une polymérisation contrôlée s'opérant uniquement en surface de la silice, préalablement hydratée d'une monocouche d'eau [93, 94].

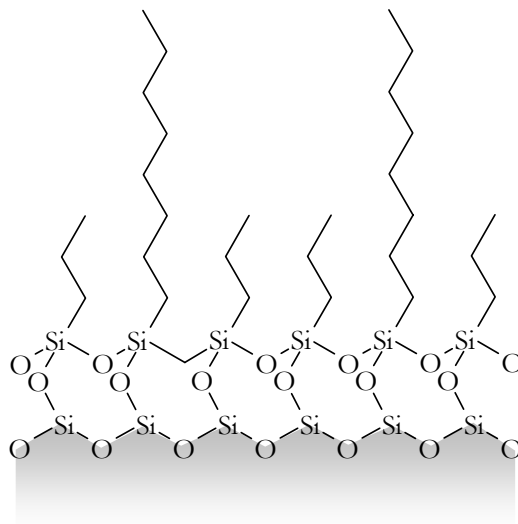


Figure I-19 : Greffage issue d'une polymérisation horizontale orientée.

Organisation et conformations des chaînes alkyle

L'approche utilisée pour réaliser la modification polymérique mène à différentes natures de densité de greffage [93]. En effet la Figure I-20 montre que pour un taux de greffage globalement similaire, la densité de greffage varie localement : autant une polymérisation en solution permet d'obtenir un greffage homogène, autant la polymérisation en surface se distingue par de fortes variations locales de la densité de greffage.

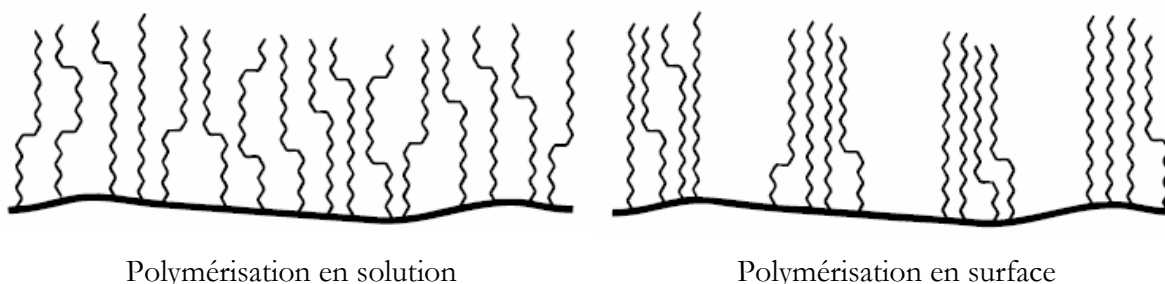


Figure I-20 : Illustration schématique de l'organisation des chaînes alkyle sur la surface de silice en fonction du type de polymérisation employé [93].

Dans ce dernier cas, le greffage est homogène localement, mais hétérogène dans sa globalité. Ces variations locales de densité de chaînes induisent des différences de conformations des chaînes alkyle en fonction de l'approche choisie pour la polymérisation.

I.C.1.c.iii Greffage oligomérique

Un troisième type de greffe peut être obtenu par le contrôle de chacune des différentes étapes de la réaction. Le greffage oligomérique alors obtenu résulte en réalité d'une polymérisation verticale séquentielle contrôlée, pour laquelle chaque étape constitue une synthèse monomérique à partir du même silane. D'un point de vue sélectivité, ce type de phase possède un comportement intermédiaire entre les phases monomériques et polymériques [95, 96].

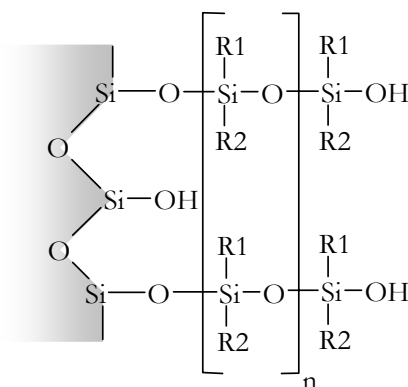


Figure I-21 : Greffe oligomérique.

De manière générale, les greffes polymériques ou oligomériques s'avèrent plus stables que les greffes monomériques, notamment en terme de résistance aux pH bas et élevés. En contrepartie, leur synthèse, plus délicate à mettre en œuvre (eu égard à une teneur en eau et un degré de polymérisation difficilement contrôlables) se traduit par une plus grande variabilité lot-à-lot des phases stationnaires.

I.C.2 Propriétés du support greffé

I.C.2.a Les groupements silanol résiduels

Le taux de greffage variant de 25 à 50% [97, 98], il reste donc en surface au minimum 50% de groupements silanol n'ayant pas réagi. Par leur capacité notamment à interagir par mécanisme d'échange d'ions¹⁰ avec des composés cationiques lorsqu'ils sont sous forme anionique SiO^- , ils sont souvent invoqués pour expliquer les traînes de pic constatées pour des composés basiques sous forme BH^+ , entraînant une perte de résolution chromatographique gênante pour la séparation. Aussi plusieurs solutions ont été proposées pour résoudre les problèmes attribués aux silanols résiduels :

1. L'emploi d'un pH suffisamment acide pour la phase mobile, afin de s'affranchir de l'ionisation des groupements silanol ; cependant, ces conditions se révèlent souvent insuffisamment discriminantes pour séparer les composés d'intérêt, pas assez retenus du fait de leur état ionisé ;
2. L'utilisation d'un pH suffisamment élevé pour la phase mobile, pour supprimer l'ionisation des composés basiques, au risque d'être confronté à des problèmes de stabilité de la phase stationnaire – la silice se dissout à pH alcalin – et des solutés à analyser – certains produits se dégradent rapidement en milieu alcalin ;
3. L'addition à la phase mobile d'un agent cationique compétiteur, par exemple la triéthylamine, qui se charge du blocage des sites indésirables, pour diminuer la traîne de pic, sans pour autant la supprimer et susceptible d'entraîner des perturbations au niveau de la détection [33, 99, 100].

D'autre part, à la présence de silanols résiduels se combine celle d'impuretés métalliques [101]. En effet, ces impuretés contenues dans la silice initiale, qui ont tendance à se concentrer en surface de la matrice, constituent des sites de Lewis et exaltent l'acidité des silanols adjacents [102], comme le montre la Figure I-22.

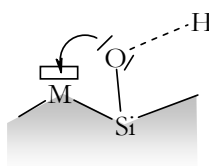


Figure I-22 : Exaltation de l'acidité d'un silanol par un métal.

Les silanols dont l'acidité est renforcée par les métaux sont source d'interactions fortes avec des agents chélatants et certains composés basiques. La présence de cations métalliques participe ainsi à l'hétérogénéité chimique de surface de la silice. En pratique, s'affranchir de toute contamination métallique est difficile puisque que l'instrumentation est elle-même source de cations métalliques : cela requerrait au moins l'utilisation d'instruments dépourvus de pièces métalliques en contact avec le circuit fluide [103]. Le taux d'impuretés métalliques natif, c'est-à-dire contenu au niveau de la phase stationnaire avant utilisation, dépend de son procédé de synthèse [50] et permet de définir deux catégories de silice [104-106] :

¹⁰ Sont considérées ici comme prépondérantes les interactions coulombiennes. Cependant, d'autres interactions peuvent avoir lieu avec les groupements silanols, d'intensités moindres mais non négligeables, comme les interactions ion-dipôle permanent ou dipôle permanent- dipôle permanent (cf. Annexe 1).

Chapitre I

Type A les silices traditionnelles, contenant une large teneur en impuretés métalliques (valeurs typiques : 1000 ppm de sodium, 200 ppm d'aluminium et 150 ppm pour le fer) ;

Type B les silices ultra pures, de technologie plus récente, voient leur taux global s'abaisser à moins de 20 ppm.

La différence entre ces deux types de silice se retrouve sur les mesures de pK_a des silanols de silices vierges ou greffées [107, 108] : outre la présence de plusieurs classes de silanols se distinguant par des acidités différentes, les silices de type A se révèlent toujours plus acides que leurs homologues de type B.

Les phases stationnaires dédiées à l'analyse de composés basiques possèdent toutes des silices de type B [109], raison pour laquelle nous nous limiterons à cette dernière catégorie dans nos travaux.

I.C.2.b Stabilité des phases greffées

La silice répondant aux critères de stabilité mécanique, nous nous intéresserons surtout au domaine de stabilité chimique des supports greffés et aux stratégies utilisées pour en repousser les limites.

I.C.2.b.i Stabilité en pH

Si les phases conventionnelles sont prétendument utilisables pour des pH compris entre 3 et 8, voire 9, leur stabilité à long terme limite l'utilisation à une gamme plus restreinte, entre 3 et 7 [110]. C'est aux extrémités de ce domaine que les phases greffées ont fait l'objet de nombreuses études de stabilité en pH.

A pH acide

A bas pH, la phase stationnaire est sensible à l'hydrolyse acide de ses greffons, qui se produit au niveau des ponts siloxane. Dès lors, tous les facteurs qui permettent de réduire l'accessibilité à la base du greffon¹¹ accroissent la stabilité de la phase. Ainsi, les phases C18 se révèlent plus résistantes à l'hydrolyse acide du greffon que leurs homologues en C8, C4 ou C1 [97]. De même, des densités de greffage supérieures, l'emploi de greffons bi- ou trifonctionnels et des greffages préférentiellement polymériques – verticaux ou horizontaux, cette dernière voie s'avérant remarquablement stable en conditions acides [111] – vont contribuer à la stabilité de la phase stationnaire. Partant de ce constat, la modification de la base du greffon a été envisagée avec succès [97, 112].

A pH alcalin

A pH élevé, la phase stationnaire est fragilisée non pas par l'hydrolyse du greffon mais par la dissolution de la matrice de silice. Toutes les stratégies visant à réduire l'accessibilité cette fois-ci aux silanols résiduels permettront d'augmenter la stabilité du support. Etant donné qu'environ 50% des silanols n'ont pas réagi à l'issue du greffage, la première étape consiste souvent à réaliser un « end-capping », ou traitement de recouvrement terminal, qui sera plus détaillé dans la section I.D.2.a (page 21). En outre, les stratégies utilisées pour améliorer la stabilité en conditions acides peuvent se recouper avec celles visant à repousser les limites de stabilité en conditions alcalines : il en va ainsi de celles consistant à maximiser le nombre de liaisons covalentes avec le support, comme l'augmentation de la densité de greffage.

Une autre approche consiste non pas à effectuer un greffage supplémentaire, mais à réduire dès le départ le nombre de silanols accessibles pour augmenter le domaine de stabilité aux pH alcalins, en faisant appel aux supports type ORMOSIL. Une silice de type XTerra voit sa limite de dissolution repoussée au-delà de $pH=11,5$ [113, 114].

¹¹ Ces stratégies seront traitées plus en détails en I.D.3.a (page 23).

Aussi, la combinaison de plusieurs techniques n'est pas non plus exclue : citons exemple le cas d'une silice hybride greffée et dotée d'un « end-capping ».

I.C.2.b.ii Facteurs supplémentaires

Aux conditions de pH s'ajoutent des paramètres affectant la phase stationnaire qu'il est nécessaire de prendre en compte pour envisager une utilisation à long terme du support. Ainsi, à partir de pH=7, l'utilisation combinée de tampons inorganiques – en particulier le phosphate et le carbonate – à des températures supérieures à 60°C sont à proscrire [115, 116] (pour plus de détails, cf. Annexe 2).

I.D De l'origine de la diversité des phases : réduction de l'accès aux silanols résiduels et extension de la gamme de polarité

I.D.1 Introduction

Les groupements silanol résiduels sont indésirables à plusieurs titres. Sources de mécanismes de rétention secondaires, ils provoquent la traîne de pic voire l'adsorption irréversible de certains composés. Leur présence non seulement affecte le comportement chromatographique de la phase stationnaire mais offre aussi autant de points d'accès à la dissolution de la matrice.

Afin d'améliorer la stabilité du support et de s'affranchir totalement de la présence des silanols, nuisibles à leur yeux, les fabricants ont systématiquement recours aux combinaisons de stratégies de protection, engendrant une diversité supplémentaire à celle déjà présente eu égard aux différences entre les matrices, les greffons et les techniques de greffage. C'est cette diversité que nous allons nous attacher à détailler, selon la catégorie de protection : statique ou dynamique.

I.D.2 Stratégies d'élimination des silanols

La première option, radicale, consiste à éliminer les silanols à l'origine d'un mécanisme supplémentaire d'échange d'ions avec les composés basiques, provoquant des comportements chromatographiques rédhibitoires pour l'analyse de composés pharmaceutiques. La suppression des silanols implique une modification chimique de la surface de la silice nécessitant la formation de liaisons covalentes : la protection résultante sera donc statique.

I.D.2.a Recouvrement terminal

Cette approche consiste à réaliser un deuxième greffage au moyen d'un organosilane d'encombrement réduit – typiquement un C1, qui pourra réagir avec les groupements silanol peu accessibles pour des raisons stériques à des greffons à chaîne plus longue : il s'agit de la procédure de « end-capping », ou traitement de recouvrement terminal, réalisée souvent à base de triméthylchlorosilane (TMCS) ou d'hexaméthylidisilazane (HMDS) [112, 117], comme l'illustre la Figure I-23.

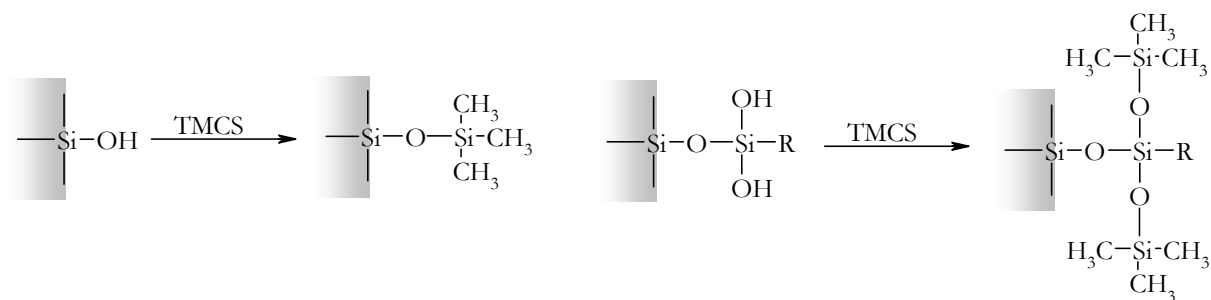


Figure I-23 : Réaction de « end-capping ».

Des procédures de double, voire de triple, « end-capping » ont été rapportées pour leur efficacité supérieure [115, 118, 119], mais ces procédés étant encore sous protection de brevets, nous ne possédons aucune information à leur sujet. Citons aussi le développement d'une procédure unique de « end-capping » à base de hexaméthylcyclotrisiloxane (effectuée à une

température supérieure à 350°C), cette approche procure une phase stationnaire inerte et stable, au contraire du procédé TMCS¹² [120-122].

Néanmoins, l'efficacité du traitement de « end-capping » n'est jamais totale : pour des raisons d'encombrement stérique, la couverture ne peut être parfaite. En effet, un traitement par le TMCS ne permet d'éliminer que 50% des groupements silanol restants en surface.

Le « end-capping » est généralement de caractère apolaire. Cependant, il est possible de modifier la surface avec des greffons possédant une fonction polaire à leur extrémité (de type hydroxyle ou thiol par exemple) : le « end-capping » sera caractérisé alors par sa nature polaire. Généralement, la difficulté de ce type de greffage réside en la possibilité pour la fonction polaire de réagir avec la surface. Le greffon polaire est plus encombrant puisqu'il nécessite une chaîne en C3 pour espacer suffisamment la fonction polaire de la surface, rendant moindre l'efficacité de couverture. Ces difficultés expliquent aussi le retard de développement de ce type de « end-capping » vis-à-vis de leurs homologues apolaires.

La plupart des phases stationnaires dédiées aux applications pharmaceutiques ont subi au moins un « end-capping ».

I.D.2.b Densité de greffage

Le principe consiste à essayer de saturer la surface de la matrice de ponts siloxanes, donc à optimiser les conditions pour atteindre un taux de greffage maximal, qui va néanmoins varier en fonction de :

1. La fonctionnalité du greffon – un greffon trifonctionnel n'atteindra jamais un taux de greffage comparable à celui d'un monofonctionnel ;
2. La longueur du greffon – pour des raisons stériques, les densités maximales de greffage suivent un ordre inverse à celui du nombre de carbones de la chaîne hydrocarbonée : C8>C12>C18 ;
3. Du nombre de silanols accessibles pour la modification, dépendants de la nature de la silice.

Dans le cadre d'un greffage monomérique, l'objectif consiste à obtenir une monocouche de greffons aussi dense que possible, de façon à éliminer une partie des silanols lors du greffage, et masquer ensuite par effet d'écran ceux qui persistent à l'issue de la modification et du « end-capping ».

I.D.2.c Encapsulation

Le principe de cette technique repose sur le recouvrement de la particule de silice d'une fine couche de polymère de silicone [123], de polybutadiène ou de polyéthylèneglycol. Le recouvrement s'effectue soit par adsorption sur la particule, soit par création de liaisons covalentes. Selon le polymère utilisé, une modification ultérieure peut avoir lieu, comme le montre la Figure I-24.

¹² En terme de stabilité à pH acide, ce greffon n'est pourtant pas le plus stable, puisque c'est celui qui protégera le moins le pont siloxane.

1. Encapsulation polymérique avec un silicone
2. Modification alkyle

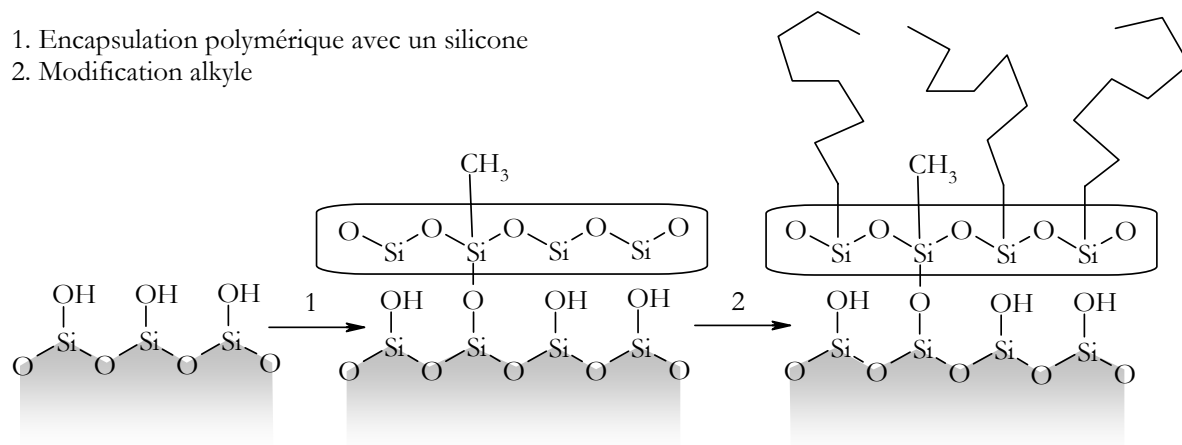


Figure I-24 : Synthèse de particules encapsulées.

Pour saisir l'intérêt de cette phase, revenons d'abord sur quelques caractéristiques des phases stationnaires à base de copolymères. Les phases en polymères poreux présentent un domaine de stabilité en pH plus étendu que celui des phases à base de silice. Néanmoins, elles pèchent par défaut d'efficacité, eu égard à leur faible coefficient de diffusion D_s . Leur faible résistance mécanique, combinée à des problèmes de compatibilité avec certains solvants, constitue aussi un inconvénient majeur qui limite leur utilisation. L'encapsulation polymérique revêt donc un intérêt particulier : la phase obtenue bénéficie à la fois de la résistance mécanique de la silice et de l'extension du domaine de stabilité en pH conférée par le polymère. En outre, le polymère rend inaccessibles les silanols en surface de la matrice n'ayant pas réagi, sous réserve d'encapsulation parfaite de la particule. Le polymère, si la couche s'avère assez fine pour permettre des transferts de masse rapides, assure une efficacité correcte. Il apporte aussi une sélectivité particulière.

I.D.2.d Support de silice hybride

De par sa structure, la silice hybride ne possède en surface que peu de groupements silanol comparativement aux silices classiques. Cette moindre densité entraîne un taux de greffage réduit, mais confère aux particules un domaine de stabilité en pH étendu, notamment à pH alcalin. En outre, la technologie de silice hybride associé à un greffage monomérique trifonctionnel offre suffisamment de stabilité pour s'affranchir d'un « end-capping » qui risque d'être hydrolysé aux pHs acides.

Les techniques d'élimination des silanols s'avèrent relativement efficaces [107, 124] pour préserver le support tout en étendant variablement le domaine d'utilisation. Certaines, comme la haute densité de greffage ou l'encapsulation, ne procurent pas qu'une protection statique : elles fournissent aussi une protection dynamique, due à la conformation et à la thermalisation des chaînes hydrocarbonées, qui par effet d'écran masque des silanols sans pour autant les éliminer.

I.D.3 Stratégies de masquage des silanols

Il s'agit cette fois-ci non pas d'éliminer les groupements silanol mais d'en réduire fortement l'accès, par une protection dynamique se basant soit sur l'encombrement stérique, soit en incluant une barrière polaire.

I.D.3.a Protection stérique

Pour restreindre l'accès aux silanols résiduels, une solution consiste à encombrer la base du greffon, comme illustré sur la Figure I-25.

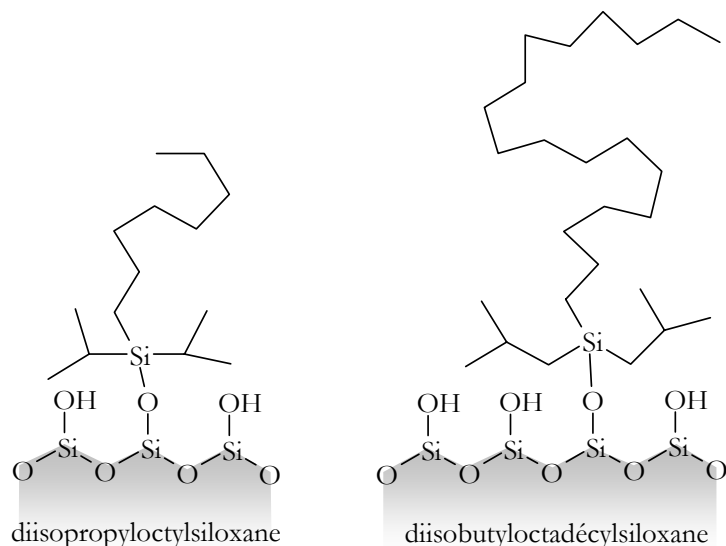


Figure I-25 : Exemples de phases stationnaires munies d'une base de greffon encombrante (par exemple Zorbax StableBond).

Cependant, le choix du greffon va conditionner le type d'application, en fonction des conditions, acides ou alcalines.

A pH acide, la fragilité de la phase stationnaire tient à l'accessibilité du pont siloxane, qu'une base encombrante (« bulky ») peut se charger de réduire [97]. L'effet protecteur du groupement isopropyle ou isobutyle est avéré en milieu acide [125], avec une limite de stabilité en pH abaissée à 1. Cependant, l'encombrement en base du greffon provoque une densité de greffage moindre par rapport à une base diméthyle [35] : dans le cas d'un greffon diisobutyle-*n*-octadécyle, seuls 25% des groupements silanols réagissent contre 34% pour un diméthyle-*n*-ocatdécyle traditionnel [98] – valeur pouvant d'ailleurs atteindre 45% pour un greffage haute densité [126]. Le groupement isopropyle participe aussi à l'hydrophobie de la phase [127]. L'utilisation d'autres bases de greffon peut être envisagée, comme par exemple un groupement phényle [84]. Néanmoins, la plus grande occurrence de silanols, même s'ils peuvent jouer un rôle bénéfique au procédé de séparation [127], constitue un inconvénient majeur pour la stabilité de la phase en milieu alcalin [118].

Une stratégie similaire peut être employée afin non pas de réduire l'accès au pont siloxane mais de masquer les silanols résiduels : c'est le cas des greffons « multi-dentates », dont un exemple est représenté en Figure I-26.

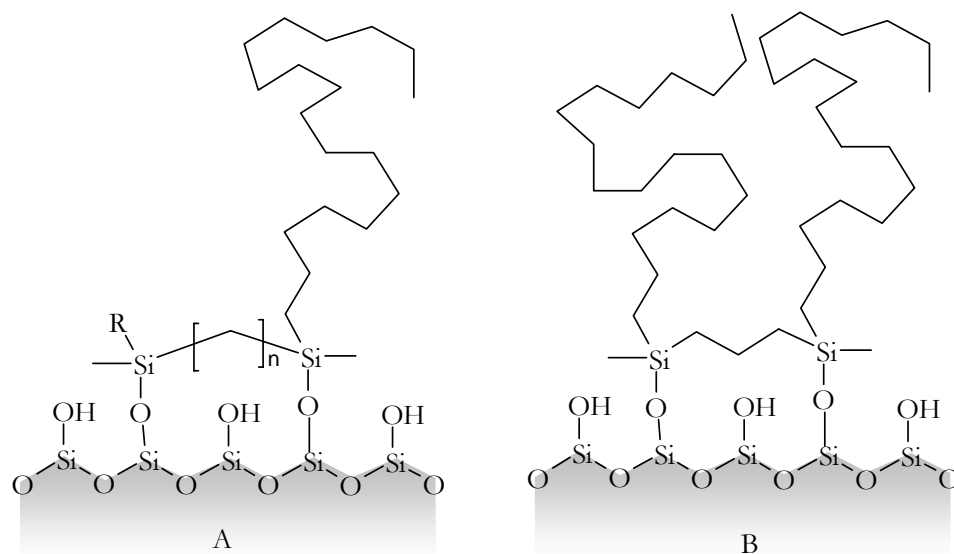


Figure I-26 : Phase « bidentate » ; A : structure générale avec un groupement R méthyle, *n*-butyle, *n*-octyle ou *n*-octadécyle et $n=2$ ou 3 ; B : structure de la phase Zorbax Extend C18 [119].

Les phases stationnaires greffées apolaires et l'analyse de solutés basiques

Leur greffage s'effectue au moyen de deux liaisons covalentes, ce qui permet de réduire plus efficacement le nombre de silanols résiduels qu'avec un greffon encombré monofonctionnel. De plus, la présence du pont éthyle ou propyle procure une gêne stérique supplémentaire, qui contribue à restreindre l'accès aux siloxanes, comme l'atteste la stabilité de ce type de phase à pH acide [119]. Mais surtout, elle confère au greffon un pouvoir couvrant suffisant vis-à-vis des silanols accessibles pour pouvoir envisager l'utilisation prolongée¹³ de la phase stationnaire à des pHs élevés (jusqu'à pH 11) [119].

I.D.3.b Barrière polaire

A côté de la protection stérique, la barrière polaire constitue une deuxième stratégie de masquage des silanols. Elle apporte en outre un gain en polarité par rapport aux greffons purement alkyle. Cette barrière peut soit s'insérer dans la chaîne hydrocarbonée, soit se situer en surface de la matrice.

I.D.3.b.i Groupement polaire intercalé

Le principe consiste à greffer des chaînes alkyle contenant un groupement polaire [128], comme l'illustre la Figure I-27.

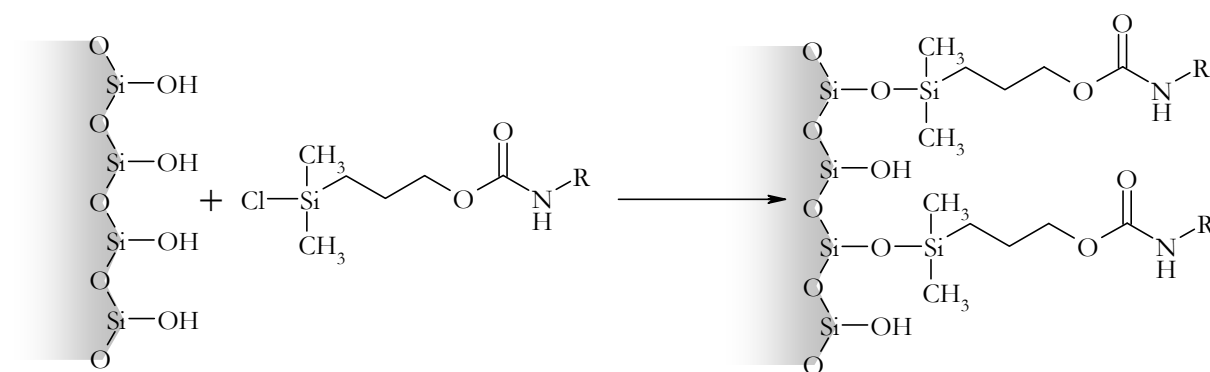


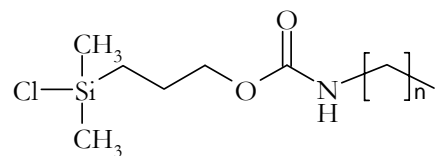
Figure I-27 : Greffage de chaînes de type alkylcarbamate.

D'une part, l'établissement de liaisons H entre les groupements carbamates permet, du fait de leur structure dipolaire, d'organiser la base du greffon. D'autre part, le probable enrichissement local en eau contribue à isoler les silanols accessibles en surface de la matrice de la couche alkyle, siège du mécanisme hydrophobe de rétention. Ainsi, la présence du groupement carbamate opère comme une barrière de polarité hydrophile dont l'objectif principal est de constituer un écran dynamique entre la phase alkyle et la surface de la matrice de silice, de manière à s'affranchir des effets indésirables des silanols résiduels. Par conséquent, cette stratégie permet aussi d'étendre la gamme de pH utilisable, à bas comme à haut pH, la barrière polaire réduisant l'accès aux ponts siloxane comme aux silanols résiduels, sans pour autant atteindre des stabilités comparables à celles obtenues avec un greffon à base encombrante.

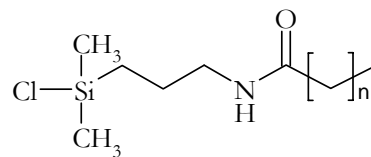
En outre, le groupement polaire intercalé apporte des sélectivités différentes de celles des chaînes purement alkyle [129-135], se signalant notamment par une hydrophobie moins élevée et une affinité plus marquée pour les composés polaires que leurs homologues purement alkyle. Enfin, la présence du groupement polaire intercalé autorise l'utilisation de phases mobiles purement aqueuses, alors que les phases alkyle procurent dans ces conditions des rétentions médiocres, phénomène attribuable à des difficultés de mouillage de la phase [136] plutôt qu'à un collapsus de la phase stationnaire.

La Figure I-28 donne un aperçu des greffons possédant un groupement polaire intercalé. Diverses fonctions sont représentées : si certaines comme le carbamate [128] ou l'amide [137-141] sont arrivées à maturité et commercialisées, d'autre sont encore en cours de développement, comme le groupement urée [142-146], éther [147, 148] ou thioéther [87, 149].

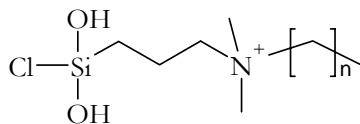
¹³ Durée d'utilisation qui dépend bien entendu de la nature du tampon (cf. Annexe 2).



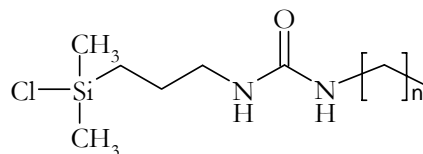
Carbamate n=7 ou 17



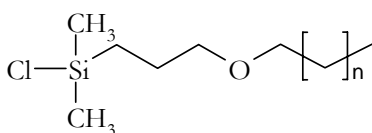
Amide n=4, 14 ou 17



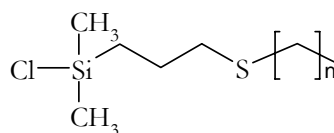
Amonium quaternaire n=7 ou 17



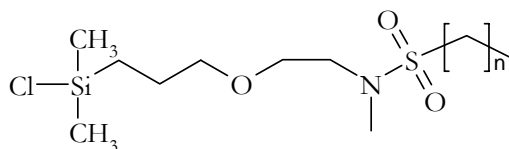
Urée n=4 ou 14



Ether n=7 ou 17



Thioéther n=7, 13 ou 17



Sulfonamide+Ether n=15

Figure I-28 : Exemples de groupements polaires intercalés.

Les différences qui résident au niveau de la nature du groupement polaire intercalé ne font qu'accroître encore la diversité des phases stationnaires.

I.D.3.b.ii Modification de surface

Outre la présence d'un groupement polaire intercalé, il est possible de mettre en place une barrière polaire directement en surface de la matrice, afin d'éviter les interactions avec les silanols résiduels.

Signalons d'abord qu'à l'issue du procédé de synthèse, afin de réduire l'hétérogénéité énergétique de surface, la matrice de silice subit une étape de déshydroxylation/réhydroxylation, afin de contrôler l'état de surface de la silice avant sa modification [33, 99, 104, 150, 151] : la déshydroxylation permet d'éliminer les silanols isolés, sites d'adsorption forte, et la réhydroxylation permet de générer une surface dotée d'un maximum de silanols associés, comme le montre la Figure I-29.

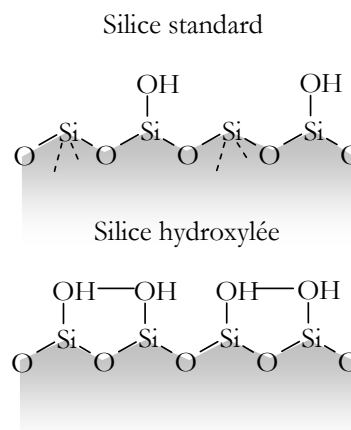


Figure I-29 : Association de silanols.

La création d'une barrière polaire en surface s'effectue souvent au moyen d'un « end-capping » polaire, dont le groupement fonctionnel n'est en général pas communiqué. Cependant, on peut suggérer des fonctions hydroxyle ou thiol sur une chaîne en C3, comme sur la Figure I-30, d'après les données de la littérature [105, 135, 149].

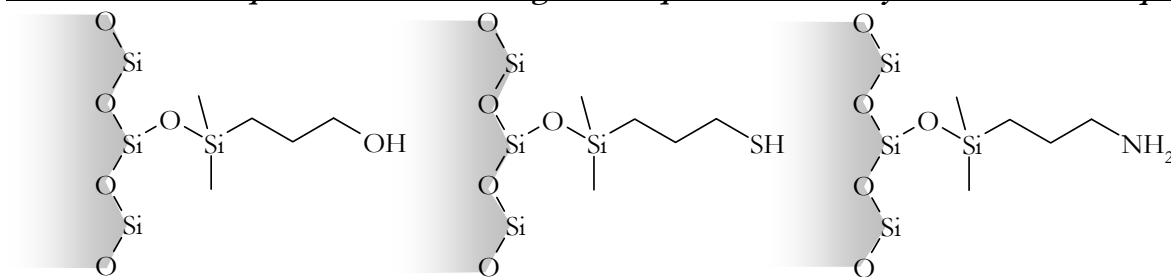


Figure I-30 : Fonctions proposées pour un « end-capping » polaire.

Certaines fonctions peuvent se protoner en milieu acide, renforçant la barrière par effet répulsif. Quant aux autres modifications de surface, les fabricants ne laissent filtrer aucune information à leur sujet, rendant incontournable la caractérisation chromatographique de ces phases.

I.D.4 Combinaisons

Très fréquemment, les phases stationnaires combinent plusieurs stratégies pour optimiser leur protection vis-à-vis des silanols résiduels et/ou l'hydrolyse de leurs greffons. Ainsi, les phases stationnaires sont en majorité dotées d'un « end-capping », qu'elles possèdent des greffons purement alkyle ou contenant un groupement polaire intercalé. Le cas des XTerra illustre cette possibilité de combinaison : la silice hybride est associée dans un cas à un greffon monofonctionnel alkylcarbamate et à un « end-capping » (XTerra RP), dans l'autre cas à un greffon alkyle trifonctionnel et est dépourvue de « end-capping » (XTerra MS). Ces deux phases sont destinées à des applications différentes.

La notion d'hybridation porte à la fois sur la matrice de silice (ORMOSIL) et la modification (SAM). L'hybridation est encore en cours de développement et va continuer à accroître la diversité des phases stationnaires.

I.E Conclusion

En résumé, l'extrême diversité des phases résulte de la combinaison de diversités au niveau de la matrice (silices sphériques ultrapures, silice organo-inorganique, silice monolithique), du greffon (chaîne principale et base), du greffage (monomérique, polymérique et oligomérique) et des stratégies de protection employées (« end-capping » polaire ou apolaire, présence d'un groupement polaire intercalé...), qui permettent d'étendre le domaine de polarité. Ces combinaisons conduisent à une telle diversité qu'il est difficile d'effectuer rationnellement un choix de support lors du développement d'une nouvelle méthode. Il s'avère donc indispensable de disposer d'une méthodologie pour caractériser et classer les phases, ainsi que pour guider l'utilisateur dans son choix.

Chapitre II Pourquoi une classification fondée sur une caractérisation ciblée ?

II.A Introduction

La grande diversité des phases stationnaires trouve son origine dans les multiples combinaisons de stratégies de protection des greffons et/ou vis-à-vis des silanols résiduels. Lors du développement d'une nouvelle méthode chromatographique, l'analyste est alors confronté au dilemme suivant : comment choisir rationnellement une colonne adaptée ? S'impose dès lors la nécessité de caractériser et de classer les phases stationnaires, afin de guider l'utilisateur dans sa sélection.

Les fabricants fournissent un certain nombre de paramètres physiques, comme la taille des particules, des pores et le taux de carbone¹⁴. Des données supplémentaires, comme la surface spécifique ou le volume de pore, peuvent aussi être mises à disposition de l'utilisateur. Cependant, elles ne sont pas fournies de façon systématique¹⁵. De surcroît, les méthodes employées pour réaliser les mesures ne sont que très rarement indiquées : ceci rend le jeu de données entre fournisseurs non comparables, du fait de la dépendance des mesures à la méthode utilisée. Quant au chromatogramme test fourni, remarquable de simplicité mais qui souffre aussi d'un problème d'hétérogénéité (solutés injectés et conditions différant suivant le fournisseur et la phase stationnaire), nous serons amené à discuter de son utilité réelle en Partie B.

Ces critères¹⁶, s'avèrent insuffisants pour déduire le comportement chromatographique du support et expliquer des variations de sélectivité en fonction de la colonne utilisée, qui reposent sur des différences plus subtiles.

Il est d'ailleurs paradoxal de constater la faiblesse du cadre réglementaire concernant les phases stationnaires face à la surrégulation¹⁷ imposée aux méthodes séparatives. En effet, la colonne chromatographique ne fait l'objet d'aucune normalisation alors que la séparation, dont la colonne est un élément essentiel, doit quant à elle satisfaire aux critères exigeants des différentes pharmacopées (Ph. Eur., USP, JP etc...) et des diverses agences officielles (FDA, EMEA, AFSSAPS, etc...). Au final, les monographies se contentent seulement d'indiquer un critère général pour la phase stationnaire, par exemple C8 ou C18, respectant la seule classification officielle existante qu'est celle de l'USP. Même si cette classification répartit les phases stationnaires en 46 catégories, dont le Tableau II-1 se propose de reprendre les catégories relatives uniquement aux phases à base de silice greffée abordées au chapitre précédent, seules 4 correspondent aux colonnes C8 et C18 (codes L1, L2, L7 et L42). La classification ne distingue pas les phases à base de silice irrégulière de celles reposant sur des silices sphériques. De plus, elle ne fait aucun cas de leur pureté et ne référence pas non plus les greffons à groupement polaire intercalé, bien que couramment utilisés dans l'industrie pharmaceutique¹⁸.

¹⁴ Ce ne sont souvent que des valeurs nominales, sujettes à variations.

¹⁵ Ces données sont variables en fonction des fabricants et des distributeurs.

¹⁶ Ces critères ne servent qu'à adapter l'échelle – préparative, analytique, micro ou nano – de la séparation au volume de l'échantillon.

¹⁷ Même si les normes tendent à s'harmoniser, grâce au comité international d'harmonisation (ICH).

¹⁸ Nous nous limiterons à ces exemples, le cas des ORMOSIL étant trop récent pour être pris en compte par ces classifications.

Tableau II-1 : Classification des phases stationnaires selon l'USP [152].

Catégorie USP	Description de la phase stationnaire
L1	Particules (3-10 µm de diamètre) de céramique ou de silice poreuse greffées octadécylsilane (ODS ou C ₁₈)
L2	Gel de silice à la porosité de surface contrôlée lié à un support solide sphérique (30-50 µm de diamètre) greffé C ₁₈
L3	Particules de silice poreuse (5-10 µm de diamètre)
L4	Gel de silice à la porosité de surface contrôlée lié à un support solide sphérique (30-50 µm de diamètre)
L7	Particules (3-10 µm de diamètre) de céramique ou de silice poreuse greffées octylsilane (C ₈)
L8	Gel de silice poreuse greffé essentiellement par une couche monomoléculaire d'aminopropylsilane (10 µm)
L10	Particules (3-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées nitrile (CN)
L11	Particules (5-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées phényles
L13	Particules (3-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées C ₁
L15	Particules (3-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées C ₆
L16	Particules (5-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées C ₂
L18	Particules (3-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées amino (NH ₂) et cyano (CN)
L20	Particules (5-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffée dihydroxypropane
L26	Particules (5-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées butylsilane (C ₄)
L27	Particules de silice poreuse (30-50 µm de diamètre)
L28	Support multifonctionnel consistant en une silice sphérique de haute pureté, \bar{D} = 10 nm, greffé avec une fonctionnalité anionique (amine) en plus d'un greffon conventionnel C ₈
L30	Particules (3-10 µm de diamètre) de silice poreuse greffées éthylsilane
L33	Phase capable de séparer des protéines de 4000 à 400000 Da. Sphérique, à base de silice et stable sur une grande échelle de pH.
L42	Particules de silice poreuse de 5 µm de diamètre greffées octylsilane et octadécylsilane
L43	Particules de silice poreuse (5 à 10 µm de diamètre) greffées pentafluorophényle
L44	Support multifonctionnel consistant en une silice sphérique de haute pureté, \bar{D} = 6 nm, greffé avec une fonctionnalité cationique (de fonctionnalité acide sulfonique) en plus d'un greffon conventionnel C ₈

Dès lors, cette classification s'avère fort peu utile à l'analyste, de par sa conception et son obsolescence. Quant à la nomenclature de l'IUPAC [153], si elle recommande de se baser sur le type de greffon et de greffage, elle ne prend pas plus en compte la nature de la silice et les groupements polaires intercalés que la classification USP.

Les classifications officielles ne sont d'aucune aide pour l'utilisateur, pour qui le choix d'une phase stationnaire s'avère encore plus délicat depuis l'émergence des colonnes dites « base deactivated ». L'absence de norme ne fait que souligner au final la difficulté à caractériser ces supports, c'est-à-dire choisir des critères sur lesquels se fonder.

Pour caractériser les phases stationnaires, la littérature propose l'alternative entre une approche spectroscopique et une approche chromatographique.

II.B Les tests spectroscopiques

Dès lors qu'il s'agit de caractériser un solide ou sa surface, les techniques spectroscopiques sont particulièrement adaptées. Elles permettent de compléter les mesures de sorption – portant sur la matrice vierge – ainsi que celles issues des analyses élémentaires, thermiques et microcalorimétriques, effectuées sur le support greffé. Parmi les méthodes utilisées, citons les spectroscopies de fluorescence [124, 154-157], infrarouge – souvent à transformée de Fourier (IRTF) [89, 123, 150, 158], Raman [159-167], à résonance magnétique nucléaire (RMN) [34, 45, 168-175], à diffusion de neutrons [176-178], à rayons X (XPS) [179, 180] et spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS) [180]. Ces méthodes peuvent aussi être associées à des techniques de microscopie, comme par exemple celle à force atomique (AFM) [16].

Les approches spectroscopiques, notamment l'IRTF et la RMN, permettent d'obtenir des renseignements précieux quant à la présence des différents groupes en surface, avant et après greffage. Cependant, outre leur difficulté de mise en œuvre¹⁹, il s'avère délicat d'étudier au moyen de ces techniques les phases stationnaires solvatées, à l'image de la spectroscopie Raman [160]. Seule la spectroscopie RMN s'avère capable d'un tel pouvoir d'investigation, comme le montre la Figure II-1.

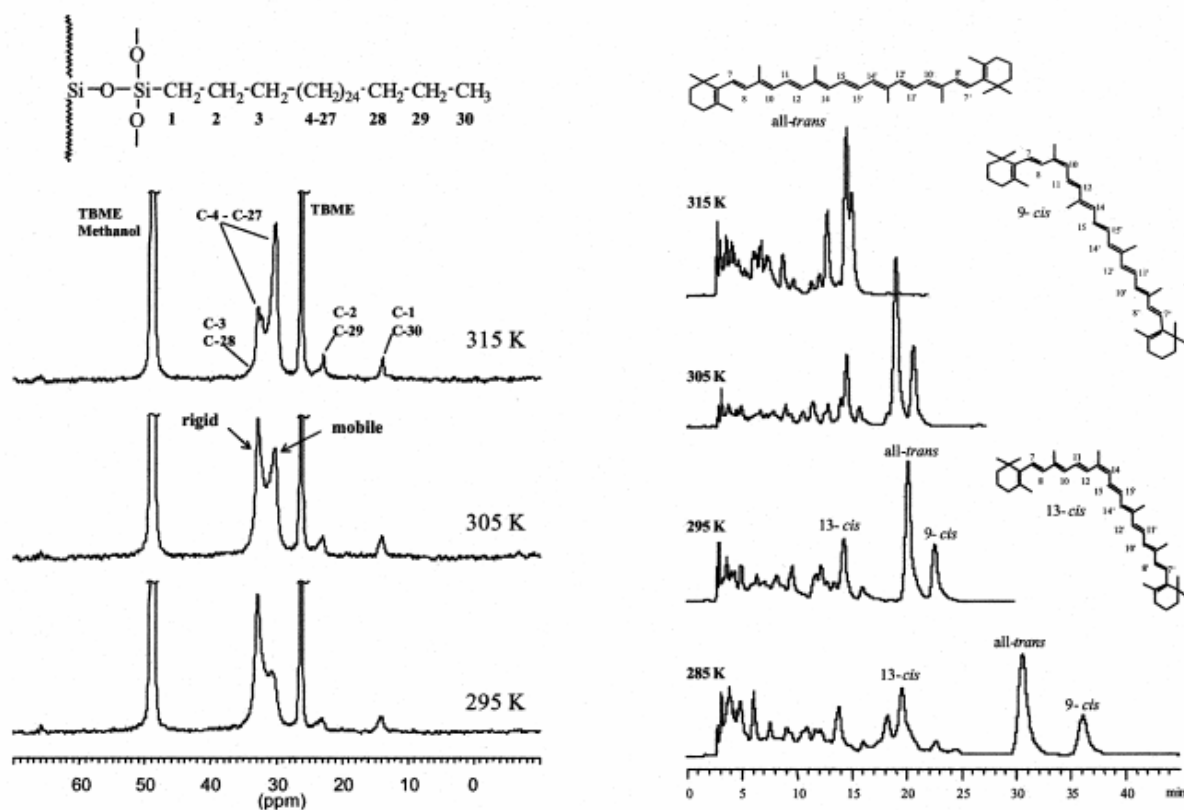


Figure II-1 : Etude de l'effet de la température sur une phase stationnaire en C30 via ses spectres RMN « HR-MAS » et ses chromatogrammes relatifs à une séparation d'isomères du β -carotène [34].

La température affecte la conformation et la mobilité des greffons, ce qui se traduit chromatographiquement sur la sélectivité des isomères du β -carotène.

Les techniques spectroscopiques sont fondamentales pour approfondir notre connaissance des phases stationnaires. Néanmoins, il peut s'avérer délicat de vouloir extrapoler le comportement des phases en milieu non solvato à leur comportement chromatographique.

Pour toutes ces raisons, il est préférable de se tourner vers une caractérisation chromatographique, plus facile de mise en œuvre et offrant – ou censée offrir – un résultat à la lecture plus directe, dans l'optique d'une sélection de colonne pour le développement d'une nouvelle méthode.

¹⁹ Ces équipements lourds ne sont pas à la portée de tous les utilisateurs.

II.C Les tests chromatographiques

Les tests chromatographiques peuvent se répartir en deux catégories :

1. ceux qui se fondent sur un modèle pour décrire les différences entre les supports ;
2. ceux qui cherchent à caractériser les phases, sans postuler de modèle *a priori*.

II.C.1 Tests basés sur des modèles

Ce type de test recherche l'adéquation à un modèle postulé *a priori*. Selon la nature du modèle, ils peuvent se subdiviser en deux classes.

II.C.1.a Modèle thermodynamique

La rétention chromatographique est souvent utilisée pour déterminer l'enthalpie et l'entropie de transfert d'un soluté de la phase mobile vers la phase stationnaire. Ces deux grandeurs thermodynamiques peuvent donc être employées comme des descripteurs pour caractériser les phases stationnaires, via un jeu de solutés et des conditions de phase mobile fixés. Ces grandeurs sont généralement obtenues au moyen de l'équation de Van't Hoff [181]

$$\ln k = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} + \ln \Phi = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi, \text{ où } k, \Delta H^\circ, \Delta S^\circ, R, T \text{ et } \Phi \text{ représentent}$$

respectivement le facteur de rétention du soluté, l'enthalpie standard de transfert, l'entropie standard de transfert, la constante des gaz parfaits, la température absolue et le rapport des volumes de phase (c'est-à-dire le rapport du volume de phase stationnaire V_s au volume de phase mobile V_m contenus dans la colonne). Les graphes dits de Van't Hoff sont obtenus en traçant $\ln k$ en fonction de $1/T$. En cas de relation linéaire, la valeur de la pente permet d'accéder à ΔH° tandis que l'ordonnée à l'origine fournit une valeur pour ΔS° dépendante du rapport de phase [182-184]. Une non linéarité de la relation est souvent attribuée à une dépendance de l'enthalpie de transfert avec la température. Cependant, comme l'ont soulevé Chester et Coym [185], cette dernière interprétation n'est valide que si Φ est indépendant de la température, ce qui n'est pas toujours le cas. Ainsi, même avec des enthalpies de transfert constantes, une non linéarité du graphe de Van't Hoff peut être observée. Comme en outre, la mesure de Φ dépend du soluté [185], le modèle thermodynamique peut être remis en cause, du fait de l'incertitude régnant au niveau de la mesure des valeurs réelles des descripteurs ΔH° et ΔS° .

II.C.1.b Modèles de rétention

Il existe de nombreux modèles pour étudier la rétention. Par définition, un modèle est spécifique et est tributaire du nombre de paramètres à déterminer. Si le modèle repose sur un nombre de variables trop limité, son pouvoir d'investigation en sera d'autant plus réduit. C'est pourquoi nous limiterons notre discussion aux modèles les plus complets, c'est-à-dire ceux du type QSRR (« quantitative structure-retention relationships ») [173, 174, 186-191], ceux de Horvath, Jandera ou de Galushko s'avérant trop restreints [192]. Les modèles QSRR peuvent se décrire comme des combinaisons linéaires permettant de mettre en relation des paramètres physico-chimiques déterminés pour des analytes, dont les descripteurs moléculaires sont connus. Ces modèles ont connu un vaste champ d'application ces vingt-cinq dernières années : la prédiction de rétention pour un nouveau soluté, l'identification des descripteurs structuraux les plus informatifs, l'exploration des mécanismes moléculaires régissant la séparation, l'évaluation de propriétés physico-chimiques complexes de composés et la prédiction de l'activité biologique relative de certains principes actifs [193]. L'approche généralement considérée pour la caractérisation des phases est de type LSER (« Linear solvation energy relationships ») [194-200]. L'équation générale, initialement développée par Kamlet et Taft [201-207], est de type $\log SP = C_1 + rR_2 + s\pi_2^H + a\sum\alpha_2^H + b\sum\beta_2^H + vV_x$. SP (« Solute property ») désigne une propriété du soluté (dans le cadre de la caractérisation chromatographique, sa rétention), R_2 , un excès de réfractivité molaire de l'analyte, V_x , un paramètre caractéristique de la taille du soluté

(par exemple son volume molaire), π_2^H , une mesure de la polarité ou de la polarisabilité du composé, $\sum \alpha_2^H$ et $\sum \beta_2^H$, des propriétés donneur (acidité) et accepteur (basicité) de liaisons H respectivement [191, 195, 201-203, 208-212]. Les coefficients C, r, s, a, b et v sont en relation avec la nature chimique des phases mobile et stationnaire. Leur valeur dépend de la combinaison phase stationnaire/phase mobile et fait abstraction de tout terme d'interaction [200]. Ces termes peuvent servir de descripteurs pour caractériser les phases, toujours avec un jeu de solutés et des conditions chromatographiques fixés. Ce modèle général, en l'état, souffre principalement d'une capacité de prédiction médiocre (± 10 -20% sur les facteurs de rétention), qui le prive de l'éventuelle mise en évidence des différences de résolution comprises entre 0,5 et 2,0. Ce phénomène peut être attribué à l'exclusion par le modèle de certaines propriétés de rétention, comme la capacité d'échange de cations ou la contribution de la sélectivité stérique, puisque aucun coefficient ne les reprend. C'est la raison pour laquelle un autre modèle a été proposé, basé sur des sélectivités [105, 106, 134, 213-215]. L'équation est alors : $\log \alpha = \log(k/k_{ref}) = \eta' H + \sigma' S + \beta' A + \alpha' B + \kappa' C$, où $\eta' H$ représente les interactions hydrophobes, $\sigma' S$, la sélectivité stérique, $\beta' A$, les interactions par liaison hydrogène entre les solutés accepteurs et les silanols, $\alpha' B$, celles – éventuelles – entre des solutés donneurs et un groupe accepteur non identifié, $\kappa' C$, les interactions d'échange d'ions entre les silanols ionisés et les composés basiques protonés. Ce modèle plus raffiné possède une meilleure capacité de prédiction, mais se fonde toujours sur la même hypothèse d'absence d'interaction entre phases mobile et stationnaire pour la détermination des coefficients.

Cette approche, qui se veut aussi complète que possible, a recours à un grand nombre de solutés pour obtenir une caractérisation des phases. La détermination des coefficients s'effectue au moyen d'une régression linéaire multiple [200]. Compte tenu des corrélations – partielles mais avérées – entre certains descripteurs [215], les résultats gagneraient en justesse par l'emploi d'un outil plus adapté, comme la régression PLS.

En résumé, l'approche reposant sur une modélisation *a priori*, si elle offre une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent la rétention, ne s'avère pas adaptée à la problématique de caractérisation des phases stationnaires, eu égard au nombre élevé de solutés (67 pour [213]) et à la spécificité du modèle, qui confine la caractérisation à certaines propriétés des phase stationnaires.

II.C.2 Tests descriptifs

Les tests descriptifs, connus sous le patronyme « empirical tests » dans la littérature, reposent sur le principe d'identification des informations pertinentes sans modélisation préalable, de manière à obtenir une caractérisation qui ne soit pas limitée par un quelconque modèle. La possibilité d'une modélisation *a posteriori* n'est cependant pas exclue. A notre avis, il s'agit de la seule approche simple et viable pour caractériser les colonnes. Il n'existe pas à ce jour de consensus général quant aux conditions chromatographiques (solutés et phases mobiles) de ces tests. Ce manque d'uniformité a considérablement entravé la progression de la caractérisation des phases stationnaires. La discussion qui suit s'attachera d'abord à présenter les tests qui font référence, sans pour autant qu'aucun ne se soit imposé. Ensuite, nous les détaillerons en fonction des types de descripteurs considérés.

II.C.2.a Catégories de tests

Nous pouvons classer les tests descriptifs en deux catégories, selon leur génération et leur mode de représentation des données. Mais de manière générale, les conditions chromatographiques sont réduites, dans un souci de simplicité et de facilité de mise en œuvre.

La première génération de tests se compose essentiellement des tests de Sander et Wise (NIST) [216], de Tanaka²⁰ [217] et d'Engelhardt [1, 218]. Celui de Tanaka a été repris par Cruz et Euerby [132, 219, 220]. Une étude européenne récente s'est basée sur une combinaison des tests de Tanaka et d'Engelhardt [221]. La particularité de ces tests consiste à attribuer *a priori* aux solutés la capacité à sonder une ou plusieurs propriétés physico-chimiques de la phase stationnaire. A une propriété chromatographique d'un soluté sonde correspond donc un descripteur. Les solutés, neutres ou basiques, et tous de petites tailles, sont ainsi censés mieux sonder la phase stationnaire, pour des raisons d'accessibilité. Ces caractéristiques sont aussi communes aux approches de Daldrup [222], d'Eymann [223], de Gonnet [224], de Walters [225] ou encore de Verzele [226]. Néanmoins, ajoutant ainsi à la diversité de tests, certaines de leurs conditions chromatographiques ont été modifiées, en remplaçant dans l'éluant la phase purement aqueuse par un tampon de pH, gage de meilleure répétabilité du test [227, 228].

II.C.2.a.ii Tests utilisant uniquement des composés basiques

Contrairement aux tests fondateurs, certains tests, dédiés à l'analyse pharmaceutique, ne font appel qu'à un seul type de solutés et ne sont constitués que de composés basiques (cf. Figure II-2 et Figure II-3) : il s'agit des tests de McCalley [227-233], repris par Stella et *al.* [234, 235], et de celui de Vervoort [193, 236, 237]. Les sondes ne se voient pas ici attribuer de rôle ou de sens physico-chimique préalable particulier. La définition des descripteurs s'effectuera donc ultérieurement, lors du mode de représentation choisi, que nous aborderons au chapitre III. Cependant, en dehors des établissements autorisés, ce test n'est pas facile à mettre en œuvre, faute de disponibilité des composés. En effet, nombre d'entre eux sont soit des stupéfiants (morphine, amphétamine), soit non commerciaux (composés Organon).

De surcroît, ces tests, du fait de la monovalence des solutés, vont être extrêmement sensibles à toute variation modifiant le mécanisme mixte de rétention de composés basiques. En effet, développés avant l'apparition des silices de type B, ces tests fournissent des facteurs de rétention désormais très faibles en raison de la faible teneur en impuretés métalliques des silices actuelles : ainsi pour une colonne Zorbax Extend C18 à pH 7, 10 solutés sur 15 possèdent un facteur de rétention inférieur strictement à 2 (dont 9 pour lequel $k < 1$) tandis qu'à pH=10,5, il reste encore 8 composés peu retenus ($k < 2$) [238]. Il n'est pas réaliste dans de telles conditions d'espérer obtenir des résultats pertinents, d'autant plus si l'étude exploite des grandeurs comme l'asymétrie, qui nécessitent une rétention minimale pour s'affranchir d'une déformation du pic d'origine instrumentale²¹.

²⁰ En toute rigueur, ce test devrait porter le nom de Kimata, mais l'usage faisant, il est à chaque fois cité sous le nom du dernier auteur, Tanaka.

²¹ Concernant toujours la même étude, les résultats sont d'ailleurs plus cohérents avec des produits élués à pH=10,5, donc plus retenus, qu'à pH=7.

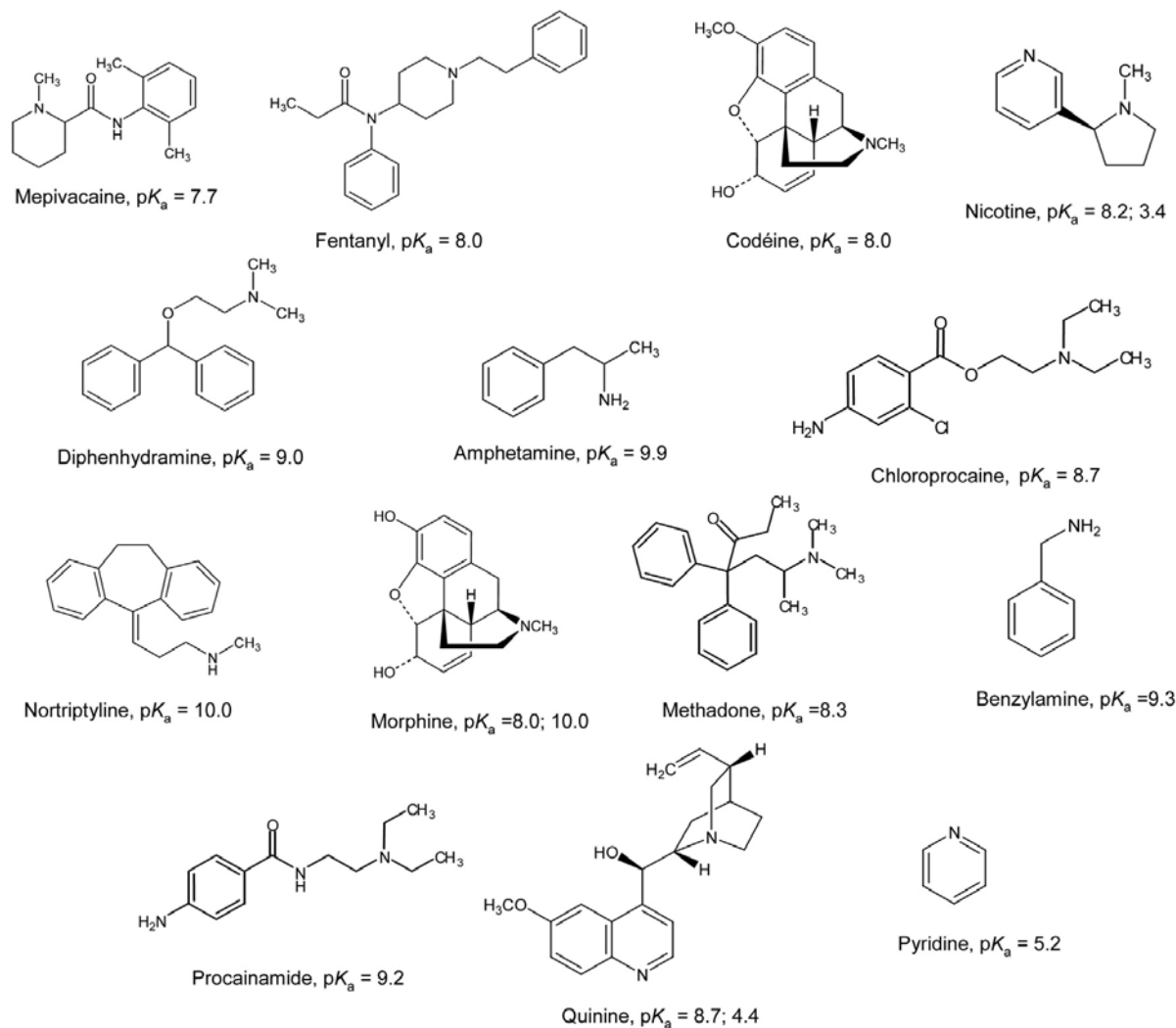


Figure II-2 : Composés des tests de McCalley complétés par ceux de Stella et al. (reproduit d'après [238]).

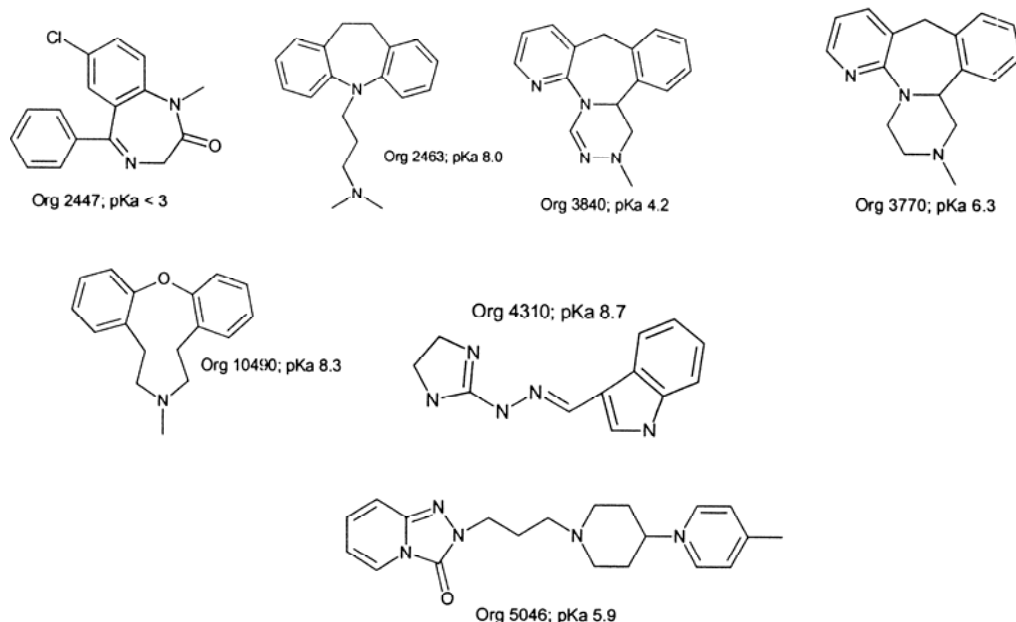


Figure II-3 : Structures des composés Organon (reproduit d'après [239]).

Ces tests ne permettent pas d'obtenir des résultats fiables en l'état : il est impératif de déterminer de nouvelles conditions chromatographiques plus adaptées.

II.C.2.b Propriétés des réponses

Les tests utilisant uniquement des composés basiques ne possédant pas de descripteurs a priori, nous limiterons la discussion aux propriétés des réponses des tests fondateurs et de leurs dérivés. En général, ils s'attachent à caractériser au moins l'hydrophobie des phases et à évaluer l'activité des silanols résiduels [192, 193, 240, 241].

II.C.2.b.i Hydrophobie

Pour déterminer les caractéristiques d'hydrophobie de la phase, la plupart des tests comportent des dérivés du benzène : il s'agit d'alkylbenzènes homologues pour Tanaka [217], Engelhardt [218], Gonnet [224], Cruz [219] et May [242], Walters [225] emploie l'anthracène avec le benzène, tandis que Neue [243-245] utilise le toluène, l'acénaphène et le naphthalène. Citons encore le couple nitrobenzène/toluène pour Eymann [223]. Si les composés sont similaires, la détermination de l'hydrophobie connaît quelques variantes : en effet, le facteur de rétention du pentylbenzène peut être associé au nombre de chaînes alkyle, tandis que souvent l'hydrophobie est associée à la sélectivité méthylène α_{CH_2} déterminée à partir des facteurs de rétention de deux homologues successifs différant d'un groupement $-CH_2$: cet incrément correspondant à une contribution stérique minimale, il permet de traduire la densité globale des chaînes alkyles.

Quant à la densité locale des greffons, Sander et Wise ont proposé de l'évaluer via les rétentions d'isomères d'hydrocarbures polyaromatiques (ou HAP), basé sur le modèle de fente, ou « slot model » [246], représenté en Figure II-4.

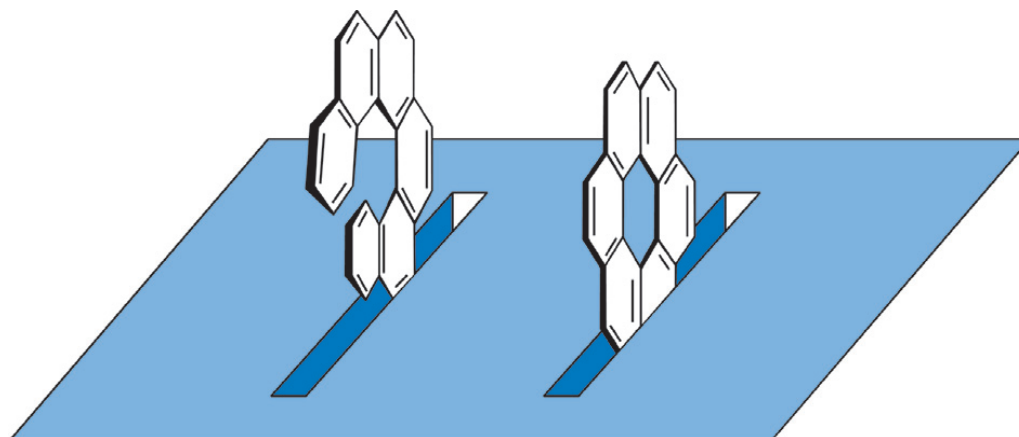


Figure II-4 : Représentation schématique du « slot model » pour la rétention des HAP.

Ce modèle s'appuie sur la reconnaissance de forme des molécules, définissant la sélectivité de forme, ou « Shape selectivity » [94, 96, 247-253], en représentant la silice greffée comme une surface à fentes, dans lesquelles les solutés pénètrent durant la rétention. En principe, les solutés de forme plane occuperont un plus grand nombre de fentes disponibles que des composés plus volumineux et non planaires. Les caractéristiques des fentes résultant de la densité de greffage ainsi que de sa nature (monomérique ou polymérique), la séparation d'un mélange d'HAP peut donc donner accès à ces paramètres. Ceci a d'ailleurs fait l'objet récemment d'une certification de matériau de référence [216], que nous allons détailler.

Le mélange certifié 869a se compose de Benzo[*a*]pyrène (BaP), de dibenzo[*g,p*]chrysène (TBN ou tétrabenzonaphtalène) et de phénanthro[3,4-*d*]phénanthrène (PhPh), représentés sur la Figure II-5.

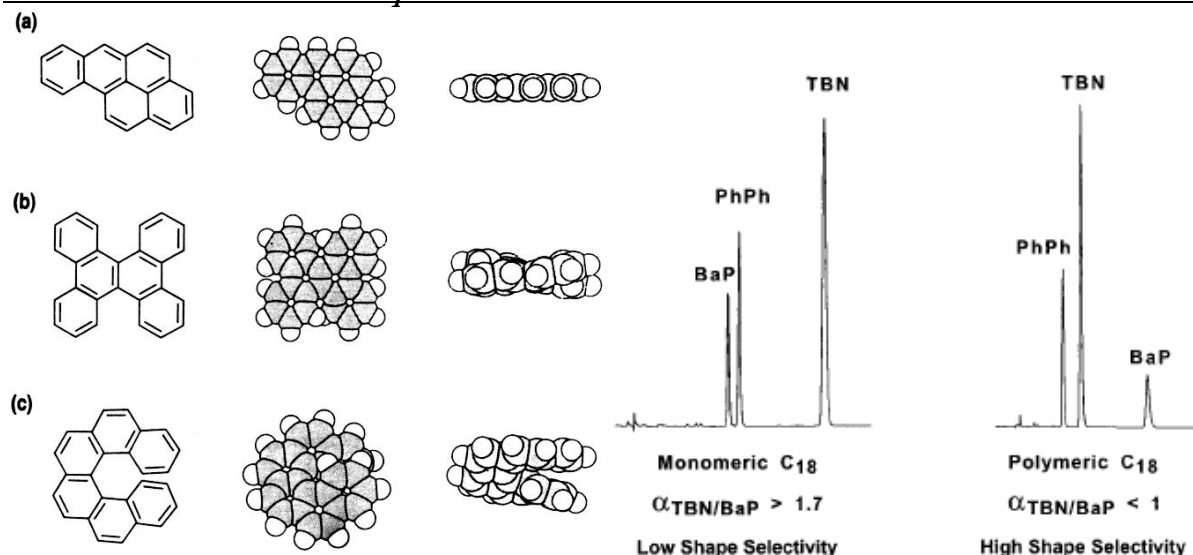


Figure II-5 : Structures et modélisations moléculaires du benzo[a]pyrène en (a), du dibenzo[g,p]chrysène en (b) et phénanthro[3,4-c]phénanthrène en (c) [249] et deux chromatogrammes du SRM 869a, obtenus sur deux phases stationnaires différentes [94].

L'ordre d'élution des trois composés et la sélectivité TBN/BaP, notée $\alpha_{TBN/BaP} = k_{TBN}/k_{BaP}$ permettent d'obtenir les informations suivantes, valables uniquement pour les colonnes C₁₈ :

1. L'ordre d'élution $BaP \leq PhPh \leq TBN$ est caractéristique d'un greffage monomérique, $PhPh < TBN \leq BaP$, d'un greffage polymérique (silanes trifonctionnels en présence d'eau) et $PhPh < BaP < TBN$, de phases stationnaires aux propriétés intermédiaires (monomérique dense ou polymérique basse densité).
2. Si $\alpha_{TBN/BaP} \leq 1$, le greffage est polymérique, si $\alpha_{TBN/BaP} \geq 1,7$, il est monomérique tandis que si $1 \leq \alpha_{TBN/BaP} < 1,7$, il s'agit soit d'un greffage di- ou trifonctionnel à basse densité, soit d'un greffage monomérique haute densité

Le principal inconvénient de cette caractérisation réside dans la dangerosité des composés injectés : le benzo[a]pyrène est en effet connu pour son effet carcinogène. Dans le test de Tanaka [217], les composés utilisés, l'o-terphényle et le triphénylène (cf. Figure II-6), ne présentent pas cet inconvénient tout en assurant la même fonction que ceux de Sander et Wise, mais ils ne rentrent pas dans la composition du mélange certifié 869a.

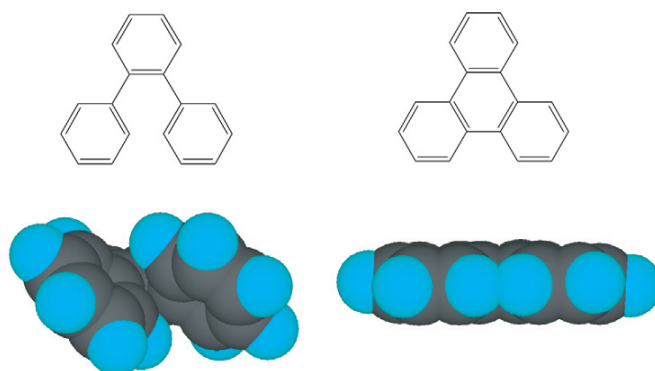


Figure II-6 : Structures 2D et 3D de l'o-terphényle et du triphénylène (d'après [84]).

L'indicateur de ce test est alors la sélectivité $\alpha_{O/T} = k_{Triphénylène}/k_{o-Terphénylène}$, encore appelée sélectivité de forme²².

²² Dans un souci de clarté, nous réservons le terme sélectivité stérique au modèle de Wilson *et al.*, qui sous-entend des molécules sondes plus volumineuses, et la sélectivité de forme (« shape selectivity ») à celle déterminée par la paire triphénylène/o-terphénylène.

Chapitre II

Récemment, Saito a proposé de caractériser la sélectivité stérique des phases stationnaires au moyen de fullerènes [84, 254]. Si cette sélectivité peut être utile vis-à-vis de molécules globulaires, son évaluation ne s'avère pas capitale pour l'analyse de composés pharmaceutiques : par contre, la caractérisation de l'activité des silanols de la phase revêt un intérêt autrement important.

II.C.2.b.ii Activité des silanols résiduels

S'il existe un certain consensus au niveau des indicateurs reliés à des composés neutres, les indicateurs destinés à évaluer l'activité des groupements silanol constituent un sujet plus difficile à appréhender, compte tenu de la diversité des interactions pouvant s'établir avec les silanols résiduels. En effet, ces interactions peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle (le dipôle pouvant être permanent ou induit). Il est d'autant plus difficile de retenir des descripteurs homogènes que les tests concernant ce sujet sont soumis à – de nombreuses – modifications, à l'image de celui d'Engelhardt.

D'un point de vue général, la caractérisation de l'activité des groupements silanol résiduels repose sur des sélectivités entre :

1. des composés pour lesquels la rétention met en jeu des mécanismes mixtes, se basant sur des interactions hydrophobes et polaires ;
2. des composés pour lesquels la rétention est uniquement due à des interactions hydrophobes.

De surcroît, les auteurs n'utilisent pas une nomenclature commune : quand certains englobent sous un seul indicateur l'activité silanol, Tanaka préfère distinguer les interactions par liaisons H des interactions ioniques. La capacité des silanols à établir des liaisons H avec les composés polaires est alors évaluée au moyen du rapport $k_{\text{caféine}}/k_{\text{phénol}}$, la caféine étant un composé basique neutre ($\text{pK}_a < 1$). La capacité d'échange d'ions (IEC) des silanols est quant à elle mise en évidence via la benzylamine à différents pH (3 et 7) ; l'IEC est définie alors par $k_{\text{benzylamine}}/k_{\text{phénol}}$.

Les descripteurs généraux pour décrire l'activité des silanols font quant à eux appel aux sélectivités du N,N-diéthyle-*m*-toluamide et de l'anthracène [225], de l'aniline et du phénol [218], de la théophylline et de la caféine [224], du naphthalène et du nitronaphthalène [226]. Au test d'Engelhardt initialement décrit [218] s'ajoute la séparation de trois toluidines isomères et l'asymétrie du pic de la *p*-éthylaniline [1]. Le sens de ce dernier type de descripteur repose sur l'idée que l'asymétrie de pic d'un composé basique est corrélée globalement aux silanols résiduels, c'est-à-dire qu'elle dépend à la fois de leur nombre, de leur activité et de leur accessibilité.

Concernant l'activité des silanols, les descripteurs possèdent des natures différentes. Sans étude plus approfondie, il n'est pas possible de sélectionner les plus pertinents, c'est-à-dire ceux qui sont à la fois informatifs et qui possèdent un certain degré de robustesse. En outre, une étude récente de Gritti et Guiochon [255] invalide partiellement certaines des hypothèses de base de ces tests, à savoir le pouvoir de sonde de composés neutres polaires notamment au niveau des asymétries de pics : celles constatées pour la caféine et le phénol ne proviendraient pas d'interactions par liaison H, mais d'une hétérogénéité de sites de la couche alkyle.

II.C.2.b.iii Cations métalliques

Comme nous l'avons signalé dans le Chapitre I, les impuretés métalliques, lorsqu'elles sont en position adjacente à des silanols résiduels, exaltent leur acidité. De nombreuses approches ont été proposées pour évaluer le taux d'impuretés lors d'une caractérisation chromatographique, grâce à l'acétylacétone [226] ou à des composés aromatiques di- ou tri-hydroxylés [256, 257]. Le seul test s'avérant efficace repose sur des solutés chélatants. Ainsi, un composé basique possédant des propriétés de chélation avec des cations métalliques, comme le 2,2'-bipyridyl (cf. Figure II-7), peut révéler une traîne de pic très importante, voire être irrémédiablement adsorbé à la surface de

Pourquoi une classification fondée sur une caractérisation ciblée ?

la silice dans les cas les plus extrêmes. Engelhardt utilise ces propriétés du 2,2'-bipyridyl, en comparant son asymétrie à celle du 4,4'-bipyridyl, qui ne possède pas de propriété chélatante, pour évaluer le taux d'impuretés métalliques [101].

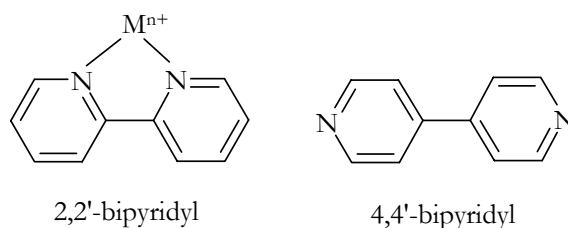


Figure II-7 : Formules développées du 2,2'-bipyridyl (chélatant) et du 4,4'-bipyridyl.

Ainsi, un taux $MF = \frac{As_{2,2'-bipyridyl}}{As_{4,4'-bipyridyl}} \times 100$ inférieur à 200 est caractéristique d'une colonne

neuve à silice ultra-pure, alors qu'il sera supérieur à 300 pour des colonnes de générations plus anciennes et/ou plus usagées, puisque l'instrumentation et les solvants contaminent la colonne au cours de son utilisation.

Néanmoins, ces valeurs sont relatives à un milieu hydro-organique non tamponné, afin d'éviter la suppression de l'effet, comme l'illustre la Figure II-8.

Ceci pose le problème de la pertinence de tels tests, puisque les colonnes sont continuellement contaminées par les solvants et l'appareillage, et que l'analyse de composés basiques requiert l'utilisation d'un milieu tamponné eu égard au gain en robustesse engendré.

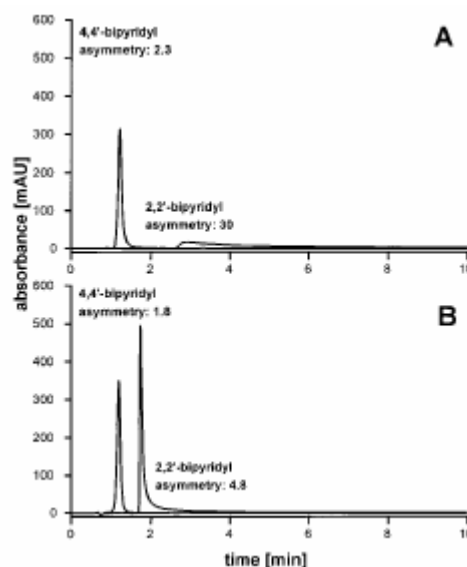


Figure II-8 : Influence du tampon sur le test d'impuretés métalliques ; (A) milieu non tamponné, (B) milieu tamponné à 1 mM de phosphate pH=7 [101].

Après avoir présenté les caractéristiques des tests classiques, intéressons-nous aux classifications qui en sont issues.

II.C.2.c Classifications associées aux tests

Dans le cadre de ce chapitre, nous nous limitons aux classifications « directes » ne faisant pas appel à un traitement de données particulier. Les autres seront abordées dans le chapitre suivant. Les tests chromatographiques permettent d'obtenir des classifications aisément interprétables, dont les axes sont définis par les descripteurs choisis.

Suivant le nombre de descripteur(s), les classifications obtenues peuvent être unidimensionnelles, bidimensionnelles. Au-delà, comme dans le cas du test de Tanaka et de ses dérivés, la représentation s'effectue au moyen d'un diagramme radar, typiquement à 6 ou 7 axes.

Le prototype de classification unidimensionnelle est fourni par Sander et Wise : suivant la valeur que prend $\alpha_{TBN/BaP}$, les phases stationnaires sont réparties en trois catégories (cf. page 37), reprise sur la Figure II-9.

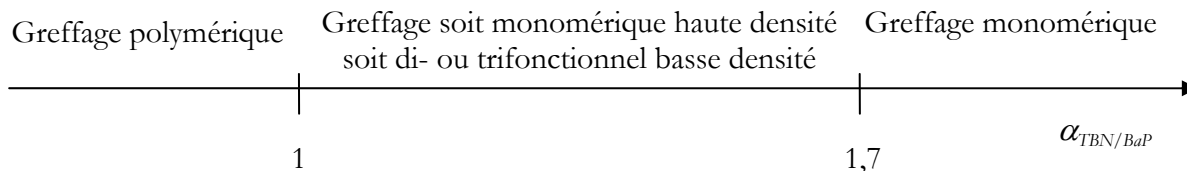


Figure II-9 : Ordre de sélectivité de forme déterminée par la sélectivité $\alpha_{TBN/BaP}$.

Généralement, les classifications bidimensionnelles prennent pour abscisse un descripteur relatif à l'hydrophobie et pour ordonnée, un descripteur global correspondant à l'activité des silanols, comme présenté sur la Figure II-10.

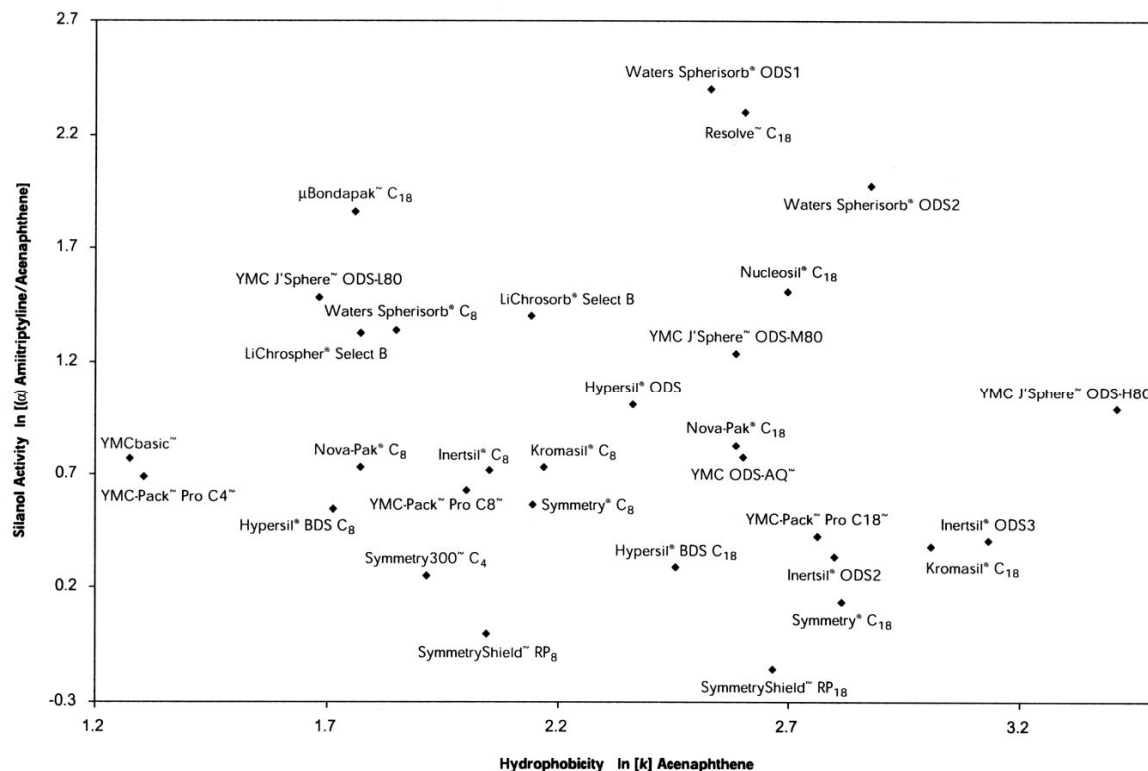


Figure II-10 : Classification hydrophobie/activité silanol issue du catalogue Waters.

Sur cette classification, les phases stationnaires s'avèrent réparties de façon homogène. De fait, sous réserve de représentativité, deux points éloignés représentent deux phases stationnaires au comportement chromatographique très différent, et inversement pour deux points proches.

La Figure II-11 présente une classification issue du même test que la précédente, mais qui permet de distinguer les phases stationnaires suivant la présence et la nature d'un groupement polaire intercalé. Afin d'assurer une meilleure lisibilité, les axes hydrophobie et polarité ont été permutés. Cette classification souligne ainsi la difficulté à obtenir par ce procédé, certes simple, des classifications exhaustives en terme d'informativité.

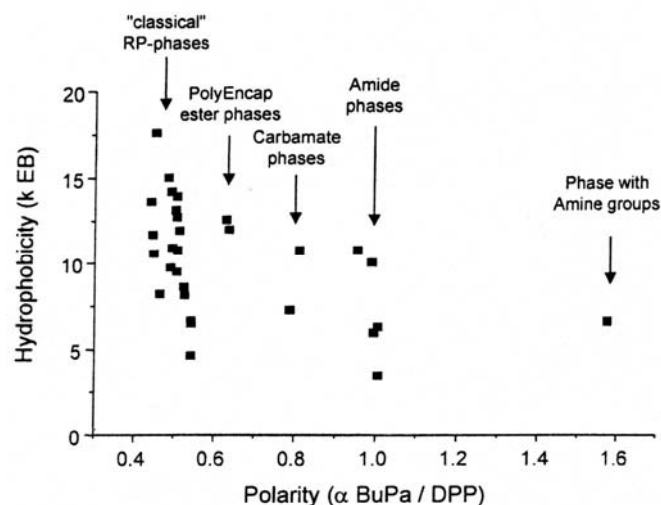


Figure II-11 : Classification bidimensionnelle permettant de discriminer les phases à groupement polaire intercalé [130] ; BuPa signifie butylparabène, DPP, dipropylphatlate et EB, éthylbenzène.

Pourquoi une classification fondée sur une caractérisation ciblée ?

En outre, si différentes classes apparaissent clairement en projection sur l'axe des abscisses, la répartition ne semble plus aussi objective au niveau bidimensionnel : les groupes sont fondés sur les caractéristiques fournies par le constructeur et non sur leur position réelle dans les classifications obtenues.

Ce défaut d'objectivité en regroupement est souvent constaté, comme l'illustre l'exemple suivant, tiré d'un test réalisé dans des conditions subcritiques [258].

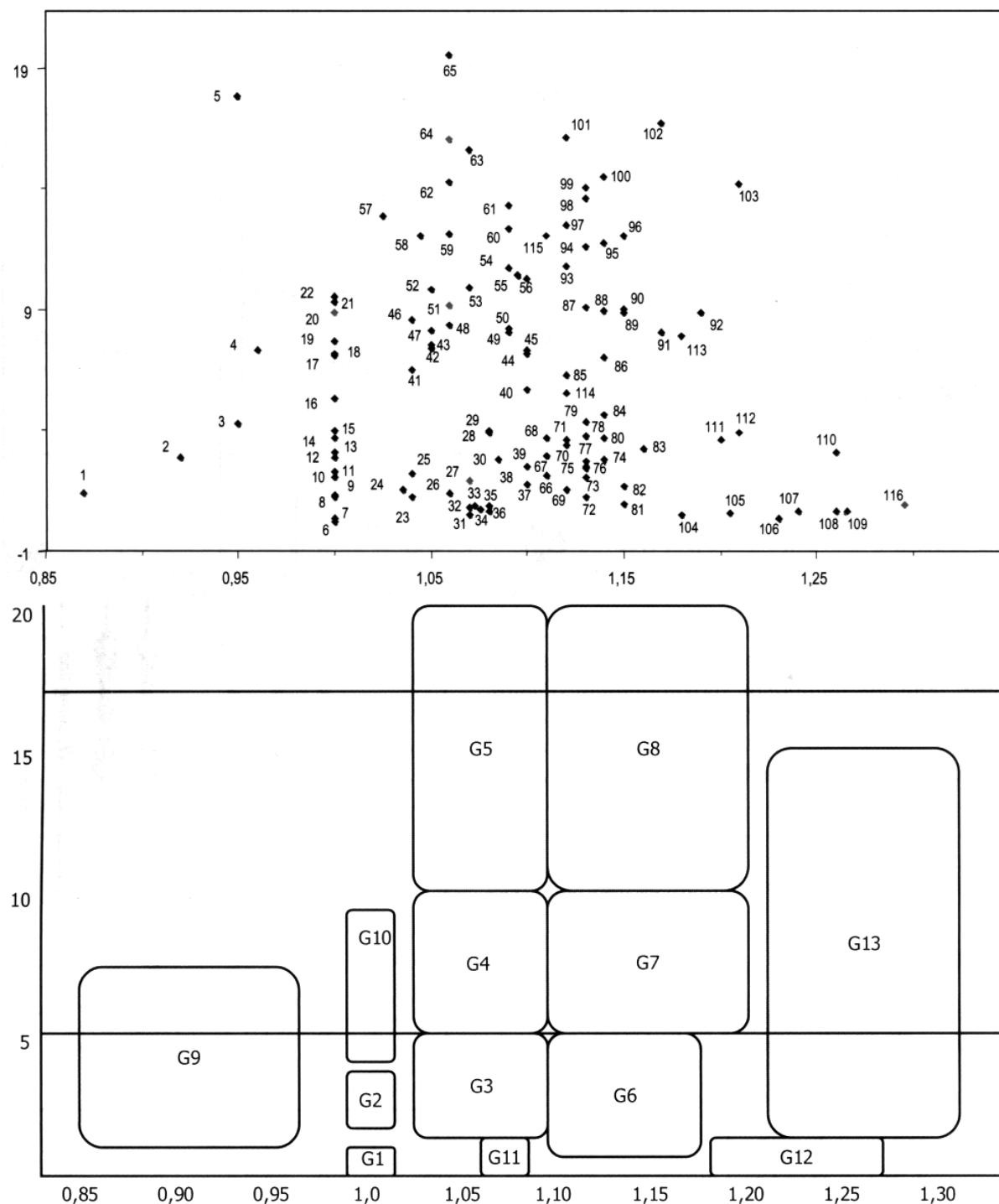


Figure II-12 : Classification adaptée de [258] et regroupements effectués (reproduit du catalogue Interchim).

En abscisse, la sélectivité $13\text{cis}/\beta\text{-all trans carotène}$ permet de retrouver le type de greffage de la phase : entre 1 et 1,1, il s'agit d'un greffage monofonctionnel, au-delà de 1,2, le greffage est polymérique tandis qu'entre 1,1 et 1,2, le greffage est qualifié d'intermédiaire. L'abscisse est donc analogue à l'échelle du NIST. Quant à l'axe des ordonnées, défini par la sélectivité $\beta\text{-carotène}/\text{zéaxanthine}$, il traduit une échelle décroissante de polarité : pour des

Chapitre II

valeurs inférieures à 5, les sites polaires sont accessibles tandis qu'au-delà de 10, ils ne le sont que très faiblement. Les regroupements effectués ne s'avèrent manifestement pas être issus de la classification (la logique voudrait que les points les plus proches appartiennent à un même groupe), ni du comportement chromatographique des phases stationnaires, mais découlent d'une volonté de retrouver sur les classifications des familles de phases aux caractéristiques connues.

II.D Conclusion

Les tests descriptifs offrent une approche séduisante car peu contraignante pour la caractérisation des phases stationnaires. Néanmoins, cette approche est perfectible. En effet, la recherche de tests simples a conduit les auteurs à multiplier de manière anarchique les conditions chromatographiques. En dépit de cette pluralité, les capacités exploratoires de ces tests restent confinées en raison de gammes trop restreintes en termes de soluté, de tampon et surtout de modificateur organique.

Faute de consensus, aucun test n'a pu s'imposer, que ce soit à propos des choix concernant les phases éluantes, les composés sondes, ou les autres conditions expérimentales, et en terme d'interprétabilité. Il est en outre possible que les descripteurs choisis, dédiés à l'évaluation de propriétés similaires, soient liés entre eux, du moins partiellement. Seule une analyse chimiométrique pourra nous apporter des éléments de réponse à cette interrogation. L'analyse multivariée va non seulement pallier ce probable inconvénient mais va aussi permettre de rationaliser les représentations et de rendre les classifications plus objectives.

Chapitre III L'apport de la chimiométrie à la classification des colonnes chromatographiques

Face à la diversité des phases stationnaires, la littérature propose de nombreux tests descriptifs ayant pour objectif de caractériser et de classer les supports chromatographiques. Cependant, cette approche, simpliste, se trouve confrontée à diverses limitations, notamment en ce qui concerne la pertinence, la représentation et l'interprétation des résultats.

Vouloir prendre en compte tous les descripteurs proposés dans la littérature contribue à multiplier inutilement le nombre de représentations bidimensionnelles, à l'image de celles de Neue [244].

La possible redondance des descripteurs peut se révéler néfaste au niveau des classifications. Pour cela, une réflexion s'impose sur le bien-fondé des représentations bidimensionnelles quant aux propriétés de leurs axes. En effet, pour classer et regrouper efficacement les supports, il est impératif que le plan de la classification soit défini par des vecteurs orthogonaux, c'est-à-dire des descripteurs indépendants, ne serait-ce que pour respecter la notion de distance euclidienne. Dans le cas contraire, il est nécessaire de définir une autre métrique. Nonobstant, ce préalable n'est jamais vérifié sur les classifications bidimensionnelles classiques, puisque les diagrammes bidimensionnels se basent sur des descripteurs postulés manifestement indépendants²³. En conséquence, cela constitue une entrave à des regroupements rationnels pour classer les phases, puisqu'ils risquent d'être effectués de façon impropre.

Les classifications obtenues reposent en outre sur une méthode de regroupement consistant à retrouver des familles de colonnes selon les caractéristiques fournies par le constructeur, au mépris du comportement chromatographique rendu sur les classifications.

L'analyse multivariée a été utilisée par certains auteurs pour corriger les défauts évoqués précédemment. Divers outils chimiométriques, parmi lesquels trois méthodes descriptives, s'avèrent particulièrement adaptés à notre problématique : il s'agit des études de corrélations, de l'analyse en composantes principales (ACP) et de l'analyse en clusters. En effet, les études de corrélations permettent la mise en évidence d'éventuelles relations entre des variables, donc donnent une estimation du degré de redondance entre les descripteurs. L'un des objectifs de l'ACP est d'obtenir des représentations informatives tout en s'assurant de l'orthogonalité des axes de représentation des données. Quant à l'analyse en clusters, il s'agit d'une méthode de regroupement fondée sur des critères géométriques, donc objectifs. La discussion qui suit permet

²³ Les diagrammes bidimensionnels classiques reposent sur des axes dont le sens est postulé. Souvent, un axe est censé représenter l'hydrophobie, et l'autre l'activité des silanols. Néanmoins, l'axe attribué à l'activité des silanols est souvent déterminé au moyen d'un composé basique ionisé. Or comme tout composé ionisable, sa rétention est due à un mécanisme mixte mettant en jeu à la fois des interactions de type hydrophobe et – éventuellement – des interactions avec des silanols résiduels, ionisés ou non. Il semble alors difficile d'envisager l'indépendance des variables définissant les axes. Pour tenter de s'affranchir de ce problème, et pour des raisons de variabilité réduite, nombre d'auteurs préfèrent la sélectivité aux facteurs de rétention par exemple. Seulement, il faudrait en toute rigueur procéder à une transformation supplémentaire du jeu de variables, en passant au logarithme de la sélectivité, de manière à soustraire les contributions énergétiques « indésirables » hydrophobes des contributions dues aux interactions avec les silanols. Cette transformation n'est que rarement effectuée à notre connaissance. En outre, il est peu probable qu'elle assure de manière parfaite la soustraction de l'effet hydrophobe pour ne laisser qu'un effet purement dû aux silanols. Enfin, effectuer cette transformation ne permet pas pour autant d'assurer l'orthogonalité des variables définissant les axes.

de présenter ces méthodes et d'illustrer la façon dont elles ont été appliquées à la problématique de caractérisation et de classification des phases stationnaires jusqu'à présent.

III.A Analyse de corrélation

Il est assez fréquent dans le domaine des sciences appliquées d'être confronté à des phénomènes aux comportements liés. La mise en évidence de la liaison peut s'effectuer de façon descriptive, sans avoir recours à un modèle²⁴.

III.A.1 Principe

Les études de corrélation permettent de déceler une éventuelle relation entre des réponses mesurées sur un même objet [259, 260].

Dans le cas de deux variables, ceci se réalise au moyen de la covariance, qui par définition, caractérise la liaison entre les variables x et y et peut être estimée par :

$$\text{cov}(x, y) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i \right],$$
 où n représente le nombre de mesures. Ainsi, dans le cas d'une relation linéaire entre les deux variables de type $y=ax$, la valeur absolue de la covariance est maximale : $\text{cov}(x, y) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n a(x_i - \bar{x})^2 = a s_x^2$.

L'usage de la covariance est souvent délaissé au profit du coefficient de corrélation (linéaire) de Pearson, indicateur issu simplement de la normalisation de la covariance par les écart-types

estimés de chaque variable :
$$r(x, y) = \frac{\text{cov}(x, y)}{s_x s_y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}.$$

Ce coefficient, sans dimension, mesure l'intensité de la liaison linéaire entre deux variables observées. Il est indépendant des unités de mesure de X et de Y . Sa valeur peut varier entre -1, signifiant une corrélation négative et parfaite²⁵, et +1, pour une corrélation positive parfaite. Néanmoins, signalons que l'obtention de ces valeurs extrêmes n'est jamais observée en pratique à cause des erreurs de mesure.

L'existence d'une corrélation entre deux variables peut être décelée graphiquement. Le report des couples d'observations (x_i, y_i) sur un graphique en prenant pour abscisse la variable X et pour ordonnée la variable Y constitue un nuage de points, encore appelé diagramme de dispersion, dont la forme permettra de constater une éventuelle relation entre les deux variables, comme le montre la Figure III-1.

²⁴ L'objectif principal des statistiques descriptives est de fournir une meilleure lisibilité du système étudié afin d'en améliorer la compréhension. En cela, elles constituent une étape préliminaire indispensable à toute tentative de modélisation.

²⁵ La corrélation parfaite correspond à une relation linéaire.

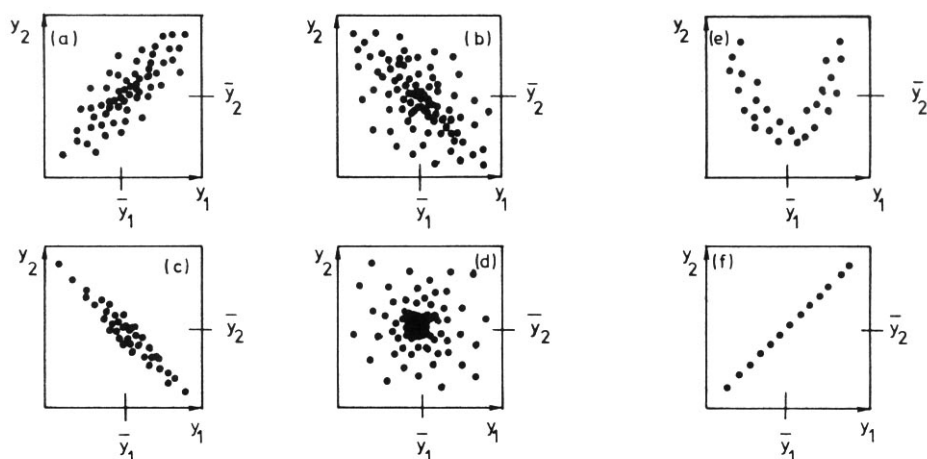


Figure III-1: Diagrammes de dispersion de variables aléatoires y_1 et y_2 avec divers coefficients de corrélation : (a) $r=0,75$; (b) $r=-0,32$; (c) $r=-0,95$; (d) $r=0$; (e) $r=0$ et (f) $r=1$.

Si deux variables sont indépendantes, leur coefficient de corrélation est nul. Cependant, la réciproque n'est pas vraie : il suffit que la relation entre les deux variables soit d'une autre nature que linéaire (cas e sur la Figure III-1).

Il est possible d'étendre le traitement à m variables. L'établissement de ces corrélations pour un jeu de m variables constitue d'ailleurs une étape préalable indispensable à l'analyse multivariée [261]. Néanmoins, les études de corrélations s'effectuent en général sur des paires de variables.

Le fait que le coefficient de corrélation linéaire, lorsqu'il est significatif, fournit une indication de l'intensité de la relation linéaire entre deux variables, permet d'envisager un ajustement linéaire du nuage de points, de type $y=ax+b$, définissant ainsi la droite de régression. Ainsi, la littérature rend compte des études de corrélations de deux manières, l'examen des valeurs du coefficient r ou du diagramme de dispersion ajusté par une relation linéaire, ce que va illustrer la section suivante.

III.A.2 Applications

La littérature propose de nombreux tests pour caractériser les phases stationnaires. Aussi, devant cette diversité, quelques auteurs ont réalisé des synthèses comparatives [192, 239, 245, 262], qui s'appuient sur des études de corrélations. Ces résultats sont présentés soit sous forme d'un tableau de corrélations (cf. Tableau III-1), soit au moyen d'une régression linéaire (cf. Figure III-2).

Chapitre III

Tableau III-1 : Coefficients de corrélation (r) entre des descripteurs estimant des mêmes propriétés chromatographiques ; \mathcal{A} représente l'aire du pic et h sa hauteur [262].

Propriété	Descripteur ($N_{T_{el}}^{\circ}$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Efficacité	N_{MPPH} (II)	1	0,903	0,917						
	$N_{toluène}$ (VII)		1	0,982						
	$N_{pentylbenzène}$ (VIII)			1						
Hydrophobie	$k_{diazepam}/k_{MPPH}$ (II)	1	0,629	0,364	0,377	0,505	0,383	0,523	0,561	
	$k_{toluène}/k_{MPPH}$ (II)		1	0,692	0,707	0,672	0,713	0,657	0,764	
	$k_{toluène}$ (VII)			1	0,999	0,667	0,989	0,579	0,669	
	$k_{ethylbenzène}$ (VII)				1	0,7	0,994	0,615	0,726	
	$k_{ethylbenzène}/k_{toluène}$ (VII)					1	0,734	0,976	0,95	
	$k_{pentylbenzène}$ (VIII)						1	0,663	0,768	
	$k_{ethylbenzène}/k_{toluène}$ (VIII)							1	0,943	
	$k_{pentylbenzène}/k_{diazepam}$ (VIII)								1	
Activité des silanols	$\mathcal{A}_{diphényldramine}$ (II)	1	0,816	0,212	0,63	0,65	0,545	0,637		
	$k_{diphényldramine}/k_{MPPH}$ (II)		1	0,18	0,71	0,663	0,335	0,463		
	$k_{catéine}/k_{phénol}$ (VI)			1	0,067	0,681	0,388	0,107		
	$k_{pyridine}/k_{catéine}$ (VI)				1	0,815	0,15	0,349		
	$k_{pyridine}/k_{phénol}$ (VI)					1	0,547	0,482		
	$\mathcal{A}_{pyridine}$ (VI)						1	0,465		
	$\mathcal{A}_{p-éthylaniline}$ (VII)							1		
Impuretés métalliques	DERT (I)	1	0,8	-0,327	0,211	-0,116	0,061	0,4	-0,072	0,518
	$\mathcal{A}_{acétylacétone}/h_{acétylacétone}$ (III)		1	-0,453	0,51	0,3	0,118	-0,092	0,343	0,631
	$N_{acétylacétone}$ (III)			1	-0,294	0,006	-0,27	-0,146	0,189	-0,145
	$\mathcal{A}_{acétylacétone}$ (III)				1	0,113	-0,028	-0,076	0,522	0,364
	$k_{2,2'-dipyridyl}$ (VI)					1	0,362	-0,461	0,259	0,018
	$k_{2,3-dihydroxynaphthalène}$ (VI)						1	0,484	0,028	-0,013
	$\mathcal{A}_{2,2'-dipyridyl}$ (VI)							1	-0,171	0
	$\mathcal{A}_{2,3-dihydroxynaphthalène}$ (VI)								1	0,382
	$k_{2,3-dihydroxynaphthalène}/k_{2,2'-dipyridyl}$ (VI)									1

Dans un souci de lisibilité, le Tableau III-1 se présente sous forme de matrices diagonales supérieures. Les valeurs de r traduisent des degrés disparates de corrélation : certains indicateurs d'hydrophobie s'avèrent très corrélés, comme les facteurs de rétention du toluène et du pentylbenzène, tandis que d'autres ne sont que très faiblement corrélés voire pas du tout, à l'image du couple $\{\mathcal{A}_{2,2'-dipyridyl}^- \quad k_{2,3-dihydroxynaphthalène}/k_{2,2'-dipyridyl}\}$. La plupart des couples de

L'apport de la chimiométrie à la classification des colonnes chromatographiques
descripteurs possèdent des degrés intermédiaires de corrélation²⁶. Cette étude démontre que certains descripteurs s'avèrent fortement redondants (forte corrélation) et pourront être sujet à élimination, alors que d'autres sont complémentaires (corrélation faible à nulle)²⁷.

Au contraire des tableaux de corrélations, à vocation exploratoire, l'approche de la droite de régression n'est généralement envisagée que lorsque l'on soupçonne une tendance à une forte corrélation, ce qu'illustre la Figure III-2.

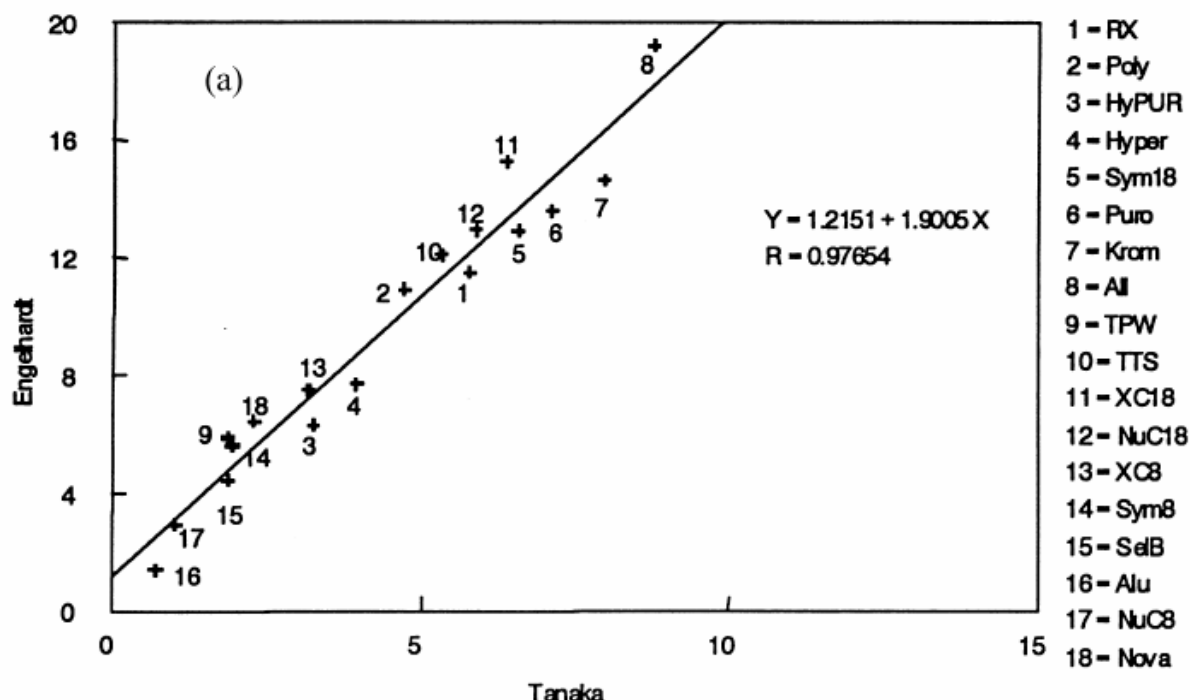


Figure III-2 : Droite de régression du facteur de rétention de l'éthylbenzène (Engelhardt) en fonction de celui du pentylbenzène (Tanaka) pour des phases purement alkyle [192].

Cette approche permet de montrer une équivalence entre deux variables. Ainsi réaliser le test de Tanaka au détriment de celui d'Engelhardt ne porte pas réellement à conséquence, du moins sur le descripteur étudié, puisqu'ils produisent des résultats pouvant être considérés comme similaires. Les études de corrélations sous cette forme sont généralement utilisées pour relier entre eux certains descripteurs qui peuvent être de nature similaire ou différente [245].

III.A.3 Limitations

Les études de corrélations souffrent de leur binarité. En effet, si elles permettent de conclure rapidement en cas de très haute ou de très faible corrélation, leur interprétation s'avère cependant délicate, voire limitée dans les cas intermédiaires, qui sont les plus fréquents dans notre problématique.

D'autre part, dans le cadre de la réduction du nombre de descripteurs, si des corrélations élevées entre deux d'entre eux signifient leur quasi-équivalence, elles ne suffisent pas à sélectionner le plus pertinent des deux. Pour cela, il faudra faire appel à d'autres outils.

²⁶ Il est cependant dommage qu'il ne soit aucunement fait mention du seuil de significativité, qui permettrait d'établir la limite inférieure de corrélation en deçà de laquelle il est inutile de considérer la relation.

²⁷ Etant donné le type de données (grandeurs de rétention et asymétries de pic), il est difficile de concevoir des relations entre ces paramètres autres que linéaires. Ainsi, une corrélation nulle signifie indépendance des descripteurs.

III.B.1 Principe

L'analyse en composantes principales (ACP) possède pour objectif d'opérer une réduction dimensionnelle tout en préservant au maximum l'information initiale, désignée par le terme variance dans le vocabulaire de l'analyse multivariée.

L'ACP est un outil statistique adapté à l'interprétation de larges tableaux de données, constitués d'individus définis par leurs coordonnées sur les axes définis par les variables initiales [263-265]. L'ACP réalise une projection du jeu de variables initiales sur un nombre d'axes réduit, dénommées les composantes principales (CP), déterminées par simples combinaisons linéaires des variables initiales. Elle permet donc d'opérer une réduction dimensionnelle. Les CP, vecteurs orthogonaux du nouveau repère, sont orientées de façon à ce que la première composante retranscrive un maximum de variance initiale ; la seconde composante est calculée de façon à reprendre un maximum de la variance résiduelle et ainsi de suite. L'ACP est donc capable d'extraire l'essentiel de l'information issue d'un jeu de données initial tout en opérant une réduction dimensionnelle. Souvent, l'analyse n'est pas réalisée sur le jeu brut de variables, mais sur un jeu de variables préalablement transformé. La transformation la plus commune porte sur la normalisation des variables, qui sont dites centrées réduites (cf. Figure III-3) : de moyenne nulle et d'écart-type unitaire, elles possèdent un poids *a priori* équivalents pour la définition des composantes principales, même si initialement leurs valeurs et variations étaient très différentes.

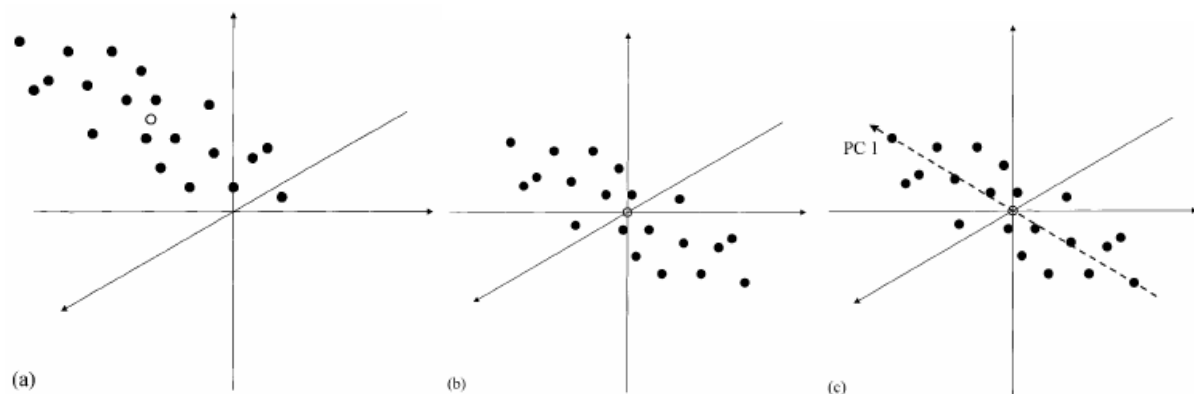


Figure III-3 : Principe de l'ACP normée ; (a) calcul du barycentre (cercle évidé) du nuage de points, (b) sur lequel le nouveau repère est centré ; (c) la première composante principale PC1, qui passe par l'origine, est déterminée de façon à décrire le plus de variation possible [266].

La projection des individus dans l'espace des composantes principales est appelée « score plot », tandis que celle des variables initiales définit le « loading plot »²⁸.

La projection sur des plans permet de visualiser, certes partiellement, les similitudes entre les individus : la distance entre deux points s'interprète en effet en terme de corrélations. Ainsi, plus les individus sont éloignés graphiquement, plus ils sont différents et vice-versa. De même, le « loading plot » permet d'identifier les variables les plus importantes, c'est-à-dire celles qui sont les plus distantes à la fois de l'origine (la distance à l'origine traduisant directement le poids de l'objet dans le nouveau repère) et les unes des autres, tout en assurant leur non colinéarité (donc peu corrélés).

III.B.2 Applications

L'analyse en composantes principales étant un outil conçu pour établir des représentations objectives et fiables, elle est employée dans de nombreux domaines à la recherche de cartographies propres. Ainsi, elle connaît de nombreuses applications en sécurité alimentaire, afin de dépister d'éventuelles fraudes [267, 268], en environnement [269-272], en pharmacie [273], en archéologie [274]. Dans la problématique de caractérisation des phases, cette technique

²⁸ Dans la suite du manuscrit, nous avons choisi de conserver les appellations anglosaxonnes, faute de traduction pertinente disponible.

L'apport de la chimiométrie à la classification des colonnes chromatographiques

représente une solution de choix pour s'affranchir du problème de représentation inhérent aux axes imposés. Outre les tests utilisant uniquement des composés basiques [228, 233-236, 238, 275], d'autres tests descriptifs y font appel [132, 219, 220, 262, 276-280]. La Figure III-4, tirée d'un exemple de tests descriptifs, montre les deux types de représentations obtenues avec l'ACP.

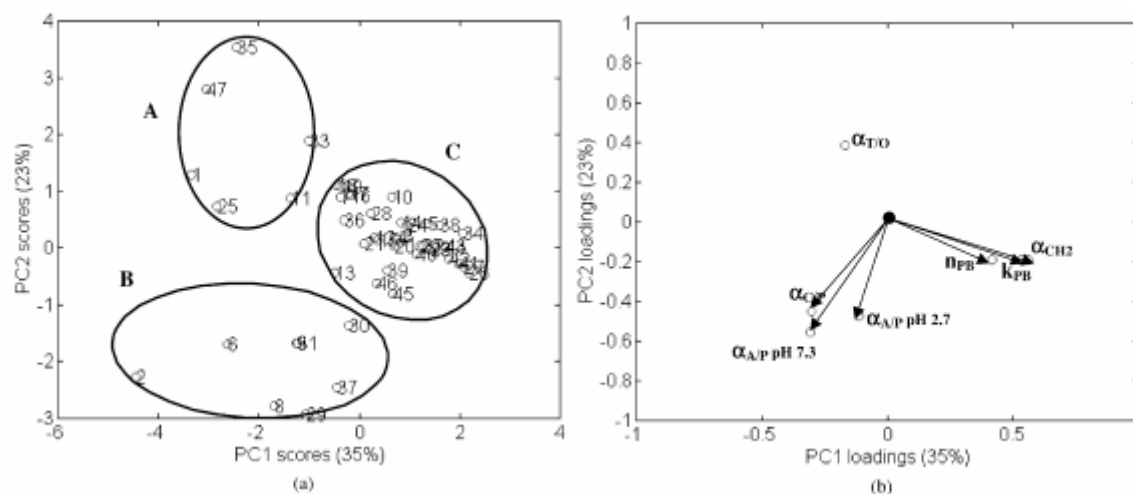


Figure III-4 : Projections sur le plan défini par les deux premières composantes en (a) de 47 objets – ici des phases stationnaires : « score plot » et (b) des 7 variables initiales : « loading plot » [278].

Le « score plot » décrit 58% de l'information initiale, illustrant ainsi le pouvoir de réduction dimensionnelle de l'ACP. En effet, les sept variables initiales définissent un espace à sept dimensions. Or deux dimensions suffisent à l'ACP pour rendre compte de la majeure partie de l'information. Cependant, ces deux composantes sont déterminées au moyen de sept variables initiales : la réduction dimensionnelle s'effectue au niveau des représentations, et non au niveau des variables.

Sur le « loading plot », trois directions semblent se dégager : la première est définie par un seul vecteur $\alpha_{T/O}$, traduisant la sélectivité de forme, la seconde, par le triplet de vecteurs α_{CH_2} , facteur de rétention et efficacité du pentylbenzène, descripteurs liés à des notions d'hydrophobie, la troisième, par le triplet de vecteurs relatifs aux descripteurs des différentes activités des silanols. La superposition du « score plot » et du « loading plot » s'avère être un guide précieux pour l'interprétation, la direction d'une variable définissant des zones pour les individus. Dès lors, des points objets se distribuant le long de vecteurs définis par les variables d'origine se verront alors associés graduellement aux mêmes propriétés physico-chimiques. D'autre part, deux des trois directions physico-chimiques sont définies par trois variables. Une réduction du nombre de variable pourrait donc être envisagée. Cependant, il faut garder à l'esprit que seule 58% de l'information est retranscrite par le plan CP1-CP2 : il en reste 42% pour laquelle ces mêmes variables risquent de ne pas être corrélées.

III.B.3 Limitations

Dans le cas présenté, l'interprétation de l'analyse en composantes s'effectue aisément. Néanmoins, interpréter de façon simple les représentations issues de l'ACP s'avère souvent délicat, surtout si les variables d'origine mettent en jeu des grandeurs chromatographiques de natures différentes, comme les facteurs de rétention et l'asymétrie.

Concernant la réduction dimensionnelle, si généralement elle est réelle au niveau des représentations, elle ne peut s'effectuer au niveau des variables qu'après l'examen du ou des « loading plots », en s'assurant que la corrélation ne se limite pas aux premières composantes principales. D'autre part, il est impératif d'avoir un jeu d'individus représentatif pour l'étude, faute de quoi l'élimination peut se révéler inappropriée [132].

Enfin, si l'ACP est un outil adapté à la visualisation et à la représentation des données, il ne procure pas de classifications de façon objective : très souvent, les regroupements sont

Chapitre III

effectués de façon subjective en fonction des caractéristiques fournies par les constructeurs, comme l'illustre la Figure III-5.

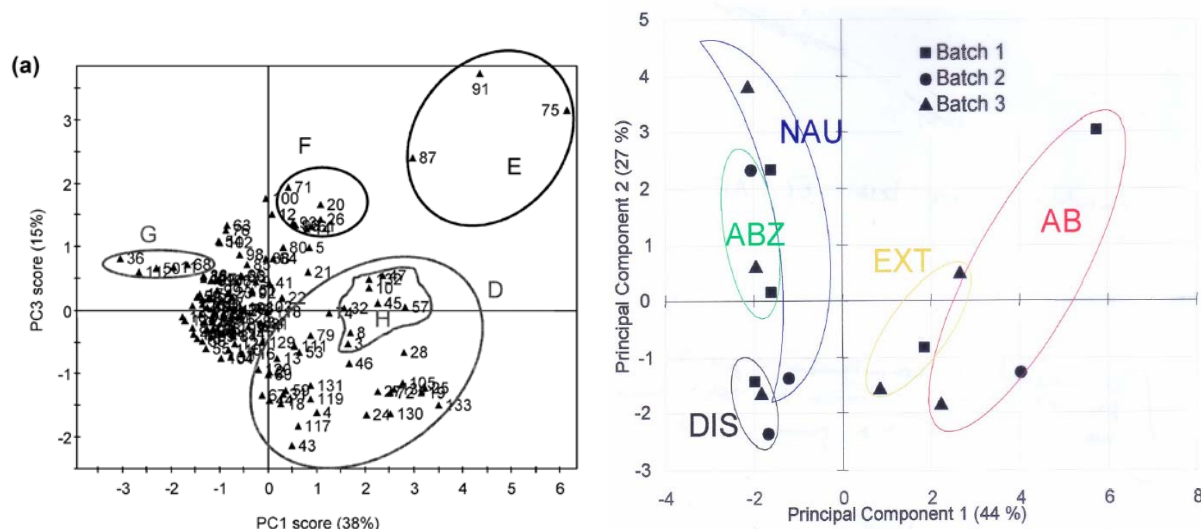


Figure III-5 : Regroupements effectués sur des ACP, d'après [132] et [235].

Afin d'éviter de retomber ce travers, il est indispensable de procéder à une étape de classification qui permette des regroupements fiables et objectifs, ce qu'offre l'analyse en clusters.

III.C Analyse en Clusters

III.C.1 Principe

Lors du chapitre précédent, nous avons vu que sur les représentations uni- ou bidimensionnelles, les groupes sont généralement définis par des valeurs seuil, relatives à des caractéristiques connues que l'on désire retrouver sur la classification, au risque de ne pas procéder à des regroupements objectifs et logiques, ce qu'illustre la Figure III-6.

Cet exemple est tiré d'une procédure de test chromatographique mettant en jeu 25 colonnes différentes, provenant de 3 lots de synthèse distincts de 5 phases stationnaires.

Pour chaque phase, un lot est représenté par une seule colonne à l'exception d'un, constitué de trois colonnes. Dès lors, la représentation issue de l'ACP permet d'estimer graphiquement les dispersions interlot et intralot pour les 5 phases stationnaires considérées. Comme l'attestent les formes insolites obtenues pour certains clusters, les regroupements se fondent uniquement sur l'appartenance commune à chaque type de support considéré. D'un point de vue géométrique, une des colonnes Extend C18 ne peut pas être associée à ses homologues de même phase, puisqu'elle se situe au beau milieu du groupe des Nucleosil AB.

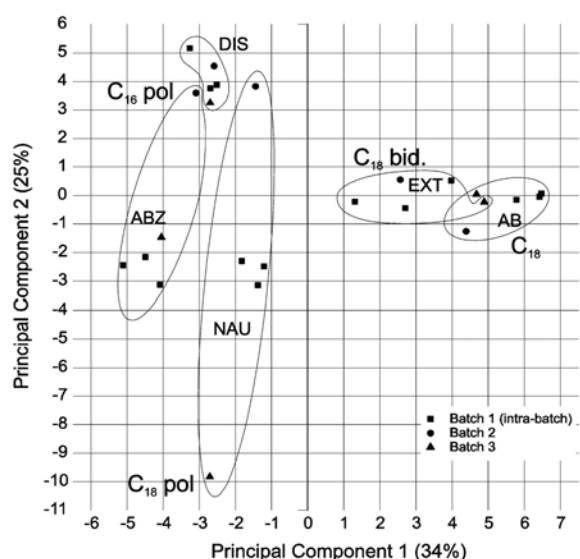


Figure III-6 : Exemple de regroupements sur un « Score plot » [234].

Il est donc souhaitable d'utiliser une méthode de classification qui soit aussi objective que possible.

L'analyse en clusters consiste à regrouper les individus en groupes selon un critère de similitude $s_{ij} = 100 \times (1 - d_{ij}/d_{\max})$, où d_{ij} désigne la distance entre deux points et d_{\max} , la distance maximale constatée séparant deux points [265].

L'analyse en clusters est une méthode qui divise un ensemble d'objets en classes de façon à ce que les objets similaires appartiennent à une même classe [265, 281, 282]. Il s'agit donc d'un outil utilisé pour la reconnaissance de forme qui détecte les similitudes entre les objets en fonction de la distance qui les sépare. La distance choisie est usuellement de type euclidienne. Comme dans le cas de l'ACP, il est possible d'effectuer l'analyse sur un jeu de données transformées préalablement. Une normalisation permet ainsi de réaliser l'analyse sur des variables de poids homogène.

Il existe de nombreuses méthodes pour former les clusters. La méthode dite hiérarchique commence par considérer chaque objet comme un groupe unité, contenant un seul individu, et compare alors les distances séparant chacun de ces groupes. Les deux groupes les plus proches sont ensuite reliés et fusionnent pour donner un nouveau groupe. S'en suit à nouveau une étape de comparaison des distances suivie de la combinaison des deux groupes les plus proches. La procédure itérative continue jusqu'à n'obtenir plus qu'un seul groupe, selon un processus d'agglomération. Les étapes successives de regroupement peuvent se visualiser sous forme d'un dendrogramme, dont la forme peut varier en fonction du critère choisi pour définir le « linkage », distance entre les groupes constitués de plus d'un objet.

La méthode hiérarchique s'oppose à celle du « k -means ». Cette dernière, plus adaptée aux larges bases de données, consiste en une procédure itérative qui produit une solution unique pour un nombre k de groupes désirés [265, 281].

III.C.2 Applications

Comme l'ACP, l'analyse en clusters connaît un vaste domaine d'applications [267, 268, 270, 272, 281-286], dont celui de la caractérisation des phase stationnaires [219, 280, 287, 288].

La Figure III-7 reprend un exemple de la littérature [244]. L'analyse en clusters est effectuée sur les 4 variables suivantes : $k_{\text{acénaphène}}$, $\alpha_{\text{butylparabène/dipropylphthalate}}$, $\alpha_{\text{propranolol/toluamide à pH 3}}$, $\alpha_{\text{amitriptyline/acénaphthène à pH 7}}$.

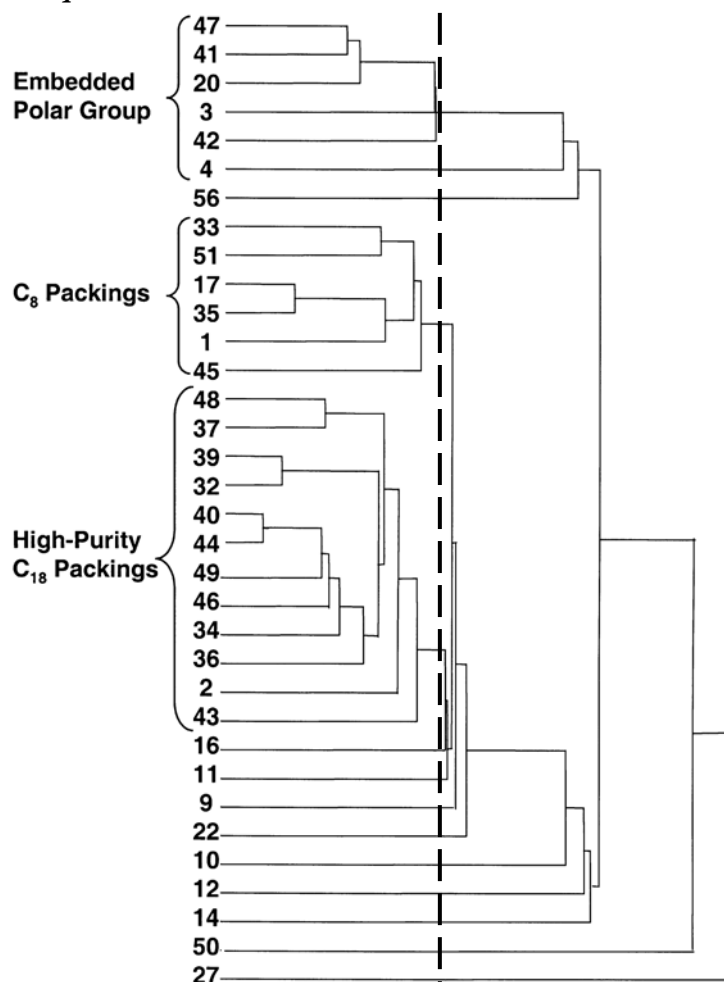


Figure III-7 : Dendrogramme de l'analyse en cluster de 34 phases stationnaires effectuée sur 4 descripteurs d'intérêt (adaptée de [244]).

Le nombre de groupes est déterminé par la section du dendrogramme à un degré de similitude défini par l'utilisateur. D'après l'auteur, l'analyse permet de dégager trois groupes distincts de phases stationnaires, les autres constituant des clusters isolés. Néanmoins, l'examen du dendrogramme sectionné ne permet pas de retrouver exactement ces groupes. En effet, la phase n°4, possède bien un groupement carbamate et donc appartient bien à la famille des phases possédant un groupement polaire intercalé. Cependant, cette appartenance n'est pas révélée par la classification, puisque la phase n°4 est isolée à ce degré de similitude. Quoi qu'il en soit, ce regroupement erroné ne doit pas masquer la capacité de l'analyse en clusters pour l'obtention d'une classification.

III.C.3 Limitations

L'analyse en clusters est dépendante de nombreux paramètres : ainsi, la définition de la métrique et le choix du type de lien pour la procédure d'agglomération peuvent modifier l'aspect du dendrogramme. D'autre part, ces critères doivent être adaptés aux dimensions du jeu de données, que ce soit en nombre d'individus ou de variables. L'analyse en clusters peut aussi pâtir de la non-orthogonalité des variables, support au calcul. Enfin, le niveau de similitude choisi pour la section du dendrogramme, qui détermine le nombre de groupes, apparaît comme le seul paramètre restant arbitraire.

III.D Couplages ACP-AHC

Comme souligné à la section III.B.3, la détermination des groupes une fois l'analyse en composantes principales effectuée manque d'objectivité. Très souvent les ACP et les analyses en clusters sont réalisées en parallèle, et leurs résultats comparés [267-270, 272, 284, 286, 289]. Cependant, réaliser une analyse en cluster sur les coordonnées issues de l'ACP peut s'avérer un

L'apport de la chimiométrie à la classification des colonnes chromatographiques
choix judicieux [290, 291], d'autant plus si le « score plot » présente une forme caractéristique en V [274]. En effet, outre le gain dimensionnel conféré par l'ACP, une analyse en clusters effectuée dans l'espace des composantes principales et basée sur une définition euclidienne de la distance équivaut à une analyse en clusters effectuée dans l'espace des variables initiales et basée sur la distance de Mahalanobis. Cette dernière favorise les regroupements de forme allongée, bien adaptés à notre problématique alors qu'une définition euclidienne de la distance privilégie les clusters de forme circulaire [290, 292].

Cette approche n'a été que très rarement utilisée dans la littérature [293, 294], et n'a pas encore été appliquée, à notre connaissance, à la problématique de caractérisation des phases stationnaires.

III.E Conclusion

La chimiométrie apporte les outils pour la caractérisation et la classification des phases stationnaires. Dans la littérature, les études de corrélation, les analyses en composantes principales et les analyses en clusters ont été mises en œuvre pour traiter cette problématique. Toutefois, les auteurs n'ont pas exploité la complémentarité entre ces outils et les ont utilisés en parallèle. Dans un souci de clarté et d'objectivité scientifique, il nous semble judicieux d'examiner les potentialités de couplages interactifs entre ces outils. Quoi qu'il en soit, développer une nouvelle méthodologie de caractérisation des phases ne peut s'effectuer correctement sans prendre en compte l'outil chimiométrique.

Partie B : Développement du test

Comme nous l'avons vu précédemment, devant le nombre pléthorique de phases stationnaires disponibles, choisir une colonne adéquate relève de la gageure sans l'aide d'un outil adapté. L'utilisateur dispose de nombreux tests dans la littérature. Seulement, ces derniers pèchent souvent par excès de simplicité tant d'un point de vue chromatographique que d'un point de vue traitement et visualisation des données. Partant de ce constat, il nous apparaît nécessaire de développer une nouvelle méthodologie qui prenne en compte dans sa conception les faiblesses relevées dans la partie précédente en tentant de répondre aux questions suivantes :

1. Au niveau du solvant, faut-il prendre en compte sa nature pour la caractérisation des phases stationnaires ? Autrement formulé, quel individu faut-il caractériser : la colonne seule ou le couple colonne solvant, comme pressenti par Rohrschneider [295] ? Pour cela, il nous faudra mener une étude systématique de l'impact de la nature du solvant sur différentes phases stationnaires.
2. Au niveau des conditions chromatiques du test, comment les choisir de façon à ce qu'elles maximisent l'information fournie sans rendre la dimension et le nombre d'expériences rédhibitoires ? Afin d'éviter le piège classique des conditions trop restreintes, nous nous sommes imposés de mettre en place une procédure préliminaire dans des conditions étendues. L'objectif ultime est de procéder à la sélection optimale des conditions du test réduit.

Ces deux premières étapes nous permettront, outre la mise au point du test chromatographique, de définir les individus et les variables d'intérêt utilisés dans l'Analyse en Composantes Principales, en vue de l'obtention des classifications. A la mise au point du test, comme pour toute procédure chromatographique, doit succéder l'étape de validation, qui présente plusieurs objectifs : évaluer le pouvoir d'investigation du test, établir sa (ou ses) limite(s) et déterminer sa fidélité. Ceci se fera au travers de deux études : l'une portant sur la variabilité interlot, l'autre sur la robustesse du test.

3. Via l'étude interlot, nous saurons si le test est capable de distinguer des colonnes remplies avec la même phase stationnaire mais issues de lots de synthèse différents.
4. Grâce à l'étude de robustesse, nous connaîtrons la résistance du test au voisinage des conditions nominales. Nous pourrons ainsi définir le domaine de robustesse du test.

A l'issue des étapes 3 et 4 seront définies les tolérances expérimentales acceptables au niveau des conditions chromatographiques et du degré d'investigation désiré.

Chapitre IV Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables

IV.A Introduction

La littérature propose de nombreux tests chromatographiques pour caractériser les phases stationnaires. Si l'influence du modificateur organique sur les solutés injectés et sur le pH de la phase mobile en fonction de sa teneur a fait l'objet d'études poussées [296-301], son impact sur la caractérisation des phases a souvent été négligé. En effet, la plupart des tests sont effectués dans un seul solvant, le plus souvent dans le méthanol [101, 184, 192, 216, 218, 220, 239, 240, 242-244, 302-304], parfois dans l'acétonitrile [225], ou bien encore dans le CO₂ subcritique [258]. Si certaines procédures ont recours à plusieurs solvants, les caractérisations ne peuvent néanmoins être comparées. En effet, les tests ne s'effectuent pas suivant un plan expérimental équilibré, au sens statistique du terme. Le déséquilibre porte sur :

1. L'évaluation des propriétés chromatographiques, qui, selon celles considérées, s'effectue dans des solvants différents. Ainsi souvent l'hydrophobie est évaluée dans le méthanol et les caractéristiques relatives aux silanols résiduels (telle que la capacité d'échange d'ions), dans l'acétonitrile [133] ;
2. Le jeu de solutés sondes, qui est souvent très restreint et peut être composé seulement de composés neutres [20, 305] ou de composés basiques [129, 184, 193, 227, 231, 232, 236, 239].

De fait, les caractérisations obtenues ne peuvent couvrir l'ensemble des caractéristiques chromatographiques. Partant du principe que la rétention d'un soluté résulte des interactions impliquant le « système chromatographique dans son ensemble » [295], c'est-à-dire colonne et phase mobile, il s'avère *a priori* utile d'envisager l'influence du solvant pour la caractérisation des phases stationnaires greffées. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'évaluer un ensemble de différentes phases greffées apolaires systématiquement dans deux solvants et avec un jeu de composés comprenant des solutés neutres et basiques. Ainsi, nous serons à même de juger de l'influence de la nature du solvant sur chaque paramètre chromatographique mesuré en fonction du type de composé injecté.

IV.B Effet sur la force isoéluante

Pour comparer les influences respectives du méthanol et de l'acétonitrile, il nous faut au préalable déterminer des conditions d'élutions comparables, c'est-à-dire définir les conditions globalement isoéluentes entre méthanol et acétonitrile pour des fractions massiques de méthanol situées entre 0,2 et 0,75, domaine de notre étude.

D'après Snyder [30, 306, 307], la force éluante S se définit selon la relation $\log k = \log k_{eau} - S\phi$ où $\log k_{eau}$ représente la valeur du facteur de rétention extrapolée dans l'eau pure et ϕ , la fraction volumique de solvant dans le mélange hydro-organique. Outre la valeur de S – considérée comme constante pour tous les solutés et comprise *grosso modo* entre 0,8 et 0,9, cette relation constitue en réalité une approximation de la relation quadratique $\log k = \log k_{eau} + A\phi^2 - B\phi$ [308]. L'approximation linéaire, valable uniquement sur de petits domaines de variations de ϕ , n'est donc pas applicable sur les gammes de variations envisagées dans l'étude. Selon Schoenmakers, S dépend de la nature du solvant et peut aussi dépendre du soluté. Ainsi, pour le méthanol et le tétrahydrofurane, S suit une relation linéaire en fonction de

Chapitre IV

$\log k_{\text{can}} : S = p + q \log k_{\text{can}}$, traduisant une dépendance en fonction du composé. En revanche, S dépend uniquement de la fraction en solvant lorsque ce dernier est l'acétonitrile.

D'un point de vue expérimental, peu importent les valeurs respectives de S pour le méthanol et l'acétonitrile : seul compte le rapport isoéluant $f_{\text{MeOH} \rightarrow \text{MeCN}} = \frac{\varphi_{\text{MeCN}}}{\varphi_{\text{MeOH}}}$ pour obtenir des rétentions similaires. Ce sont les valeurs de ce rapport que nous allons déterminer.

IV.B.1 Principe de l'étude et choix des solutés

Au travers de cette étude, il s'agit de déterminer les fractions d'acétonitrile et de méthanol qui conduisent à une rétention équivalente pour une série de composés neutres. En effet, la rétention des composés basiques reposant fréquemment sur un mécanisme mixte, comprenant à la fois de l'effet hydrophobe et de l'échange d'ion, il n'apparaît pas envisageable de définir des rapports isoéluaux avec ce type de composés.

Compte tenu de la gamme d'étude, une seule série de composés ne pourra suffire pour obtenir des temps de rétention raisonnables. Pour couvrir convenablement l'intervalle de fraction massique [0,2-0,75], nous avons donc employé différentes séries de composés :

- A 75% de méthanol : le butylbenzène, le pentylbenzène, l'*o*-terphényle et le triphénylène (solutés du test de Tanaka) ;
- A 50% de méthanol : le toluène, l'éthylbenzène et le phénol ;
- Entre 20% et 35% de méthanol : le phénol seul.

Aux teneurs élevées en solvant (50% et 75%), nous avons utilisé une série d'alkylbenzènes scindée sur les deux niveaux pour lesquels on postulera un comportement similaire de ces solutés. En conséquence, les variations observées pour f ne pourront être imputables qu'au solvant et non au soluté. D'autre part, à niveau de méthanol fixé, f peut dépendre de deux paramètres, à savoir la nature du soluté et la fraction massique d'acétonitrile φ . Donc si dépendance il y a sur f , elle ne pourra provenir que de φ sur cette série d'alkylbenzènes. Par contre, l'influence éventuelle du soluté pourra être mise en évidence avec des composés différents, comme l'*o*-terphényle et le triphénylène.

Concernant les niveaux à faible teneur en solvant, les alkylbenzènes se seraient révélés beaucoup trop retenus : notre choix s'est donc porté le phénol, sonde neutre que l'on peut espérer représentative des composés polaires. Mais étant donné sa solubilité – meilleure dans le méthanol que dans l'acétonitrile, il est probable de devoir apporter une correction δ aux valeurs de f . C'est pourquoi, malgré un facteur de rétention relativement réduit, nous l'avons également injecté à 50% de méthanol en compagnie du toluène et de l'éthylbenzène afin de déterminer δ .

IV.B.2 Conditions expérimentales

Notre choix s'est porté sur une colonne classique²⁹ Kromasil C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm , Akzo Nobel), de greffage monomérique, montée sur une chaîne chromatographique Varian-Waters, décrite plus en détails dans l'Annexe 4. La température de la colonne est fixée à 40°C au moyen d'un bain thermorégulé Bioblock 18205 et d'une jaquette à eau Alltech. Les phases mobiles eau/méthanol ou eau/acétonitrile sont préparées par pesées, ce qui nous procure une précision sans équivalent par rapport à une préparation volumétrique. Nous pourrions donc ajuster finement les rapports isoéluaux avec un pas $\Delta f = 0,01$: en effet, pour une phase de 200 g à 15% de méthanol, un pas de $\Delta f = 0,01$ correspond à 0,3 g de solvant, soit 30 fois l'erreur de lecture de la balance de précision. Après chaque changement de force éluante, un minimum d'une demi-heure d'équilibre est requis.

²⁹ Par classique, nous entendons une phase stationnaire de technologie récente, c'est-à-dire constituée d'une silice ultra pure sphérique et à faible teneur en impuretés métalliques, greffée C18 mais sans groupement polaire intercalé.

IV.B.3 Résultats et discussion

Nous avons étudié la relation liant la rétention de chacun des solutés à f pour trois niveaux de φ_{MeOH} fixés. On observe effectivement une relation linéaire de type $\log k = a \times f + b$ au voisinage des trois niveaux considérés. De fait, cette relation peut aussi s'écrire $\log k = \frac{a}{\varphi_{MeOH}} \times \varphi_{MeCN} + b$ où $\frac{a}{\varphi_{MeOH}}$ représente la pente affranchie du niveau de méthanol. Les résultats correspondants, consignés dans le Tableau IV-1, confirment la validité de l'approximation de Snyder pour des intervalles réduits de fraction de solvant (à φ_{MeOH} fixé, f varie comme φ_{MeCN}).

Tableau IV-1 : Valeurs des pentes a et a/φ_{MeOH} , et de l'ordonnée à l'origine $\log k_{eau}$ pour chacun des composés à niveaux φ_{MeOH} fixés.

φ_{MeOH}	Soluté	a	a/φ_{MeOH}	$\log k_{eau}$
0,75	<i>o</i> -Terphényle	-2,388	-3,185	2,945
	Triphénylène	-2,200	-2,933	2,862
	Pentylbenzène	-2,231	-2,974	2,923
	Butylbenzène	-2,083	-2,778	2,624
0,5	Ethylbenzène	-1,779	-3,097	2,601
	Toluène	-1,548	-3,557	2,192
	Phénol	-1,304	-2,608	1,503
0,3	Phénol	-0,971	-3,235	1,233

La pente a semble varier notablement en fonction du niveau de φ_{MeOH} , que ce soit pour le même composé ou pour des composés d'une même famille. Même en tenant compte du niveau de φ_{MeOH} , la pente vaut -2,608 et -3,235 pour le phénol à des niveaux de φ_{MeOH} respectifs de 0,5 et 0,3. D'autre part, concernant toujours le phénol, l'ordonnée à l'origine diffère aussi suivant φ_{MeOH} . Or dans le cadre de cette approximation linéaire, cette valeur correspond à $\log k_{eau}$. Cette propriété étant uniquement relative au soluté, il faut en déduire la non validité de l'approximation dès que la variation de φ_{MeOH} excède 10%, confirmant ainsi les travaux de Schoenmakers. La répétition de l'injection du mélange éthylbenzène, toluène et phénol pour $\varphi_{MeOH}=0,5$ à des rapports f de 0,75 et 0,76 permet d'évaluer statistiquement l'impact des facteurs solutés et f sur la rétention via une analyse de la variance, connue sous l'acronyme ANOVA. Cette approche constitue un outil parfaitement adapté pour évaluer les effets de facteurs contrôlés et des interactions éventuelles [309]. S'ils s'avèrent statistiquement significatifs, il est alors possible d'estimer quantitativement leurs contributions à la dispersion de l'ensemble. Dans le cadre de cette étude, nous avons effectué une ANOVA à 2 facteurs contrôlés en plan factoriel.

L'analyse de la variance confirme la significativité de chacun des facteurs étudiés ainsi que celle de l'interaction f^* solutés, cette dernière invalidant l'hypothèse de pente invariante du soluté proposée par Snyder.

Concernant les valeurs du rapport isoéluant, répertoriées dans le Tableau IV-2, elles varient de façon manifeste avec le niveau de solvant.

Tableau IV-2 : Valeurs du rapport isoéluant f en fonction de la fraction massique en méthanol φ_{MeOH} .

	φ_{MeOH}	f		φ_{MeOH}	f
<i>o</i> -Terphényle	0,75	0,850	Phénol	0,5	0,770
Triphénylène	0,75	0,805	Phénol	0,35	0,710
Butylbenzène	0,75	0,870	Phénol	0,3	0,690
Pentylbenzène	0,75	0,870	Phénol	0,25	0,675
Toluène	0,5	0,750	Phénol	0,2	0,660
Ethylbenzène	0,5	0,750			

Si f peut être considéré comme constant à φ_{MeOH} fixé pour une famille de composés homologues, il varie en fonction de la teneur en solvant, comme l'illustre l'exemple des

Chapitre IV

alkylbenzènes. Le rapport f dépend aussi de la nature du soluté, comme le montrent les cas de l'*o*-terphényle et surtout du triphénylène (0,85 et 0,805 contre 0,87 pour les alkylbenzènes). A cela une raison essentielle : la solubilité de ces composés diffère de celle des alkylbenzènes entre le méthanol et l'acétonitrile.

Reste désormais à effectuer le raccordement entre les composés neutres élués à haute teneur en solvant et le phénol élué à plus faible teneur. On observe à $\varphi_{MeOH}=0,5$ un décalage pour f de 0,02 entre le phénol et les alkylbenzènes. Du fait de sa capacité à interagir par liaisons H avec le méthanol, interactions qui ne peuvent se produire avec l'acétonitrile, la sonde polaire sous-estime très certainement le pouvoir éluant de l'acétonitrile. Dès lors, les valeurs relatives au phénol doivent subir une correction $\delta=-0,02$, que l'on postulera constante sur le domaine d'étude.

Ceci nous mène au graphique de la Figure IV-1, permettant de déterminer le rapport isoéluant entre méthanol et acétonitrile en fonction de la teneur initiale en méthanol.

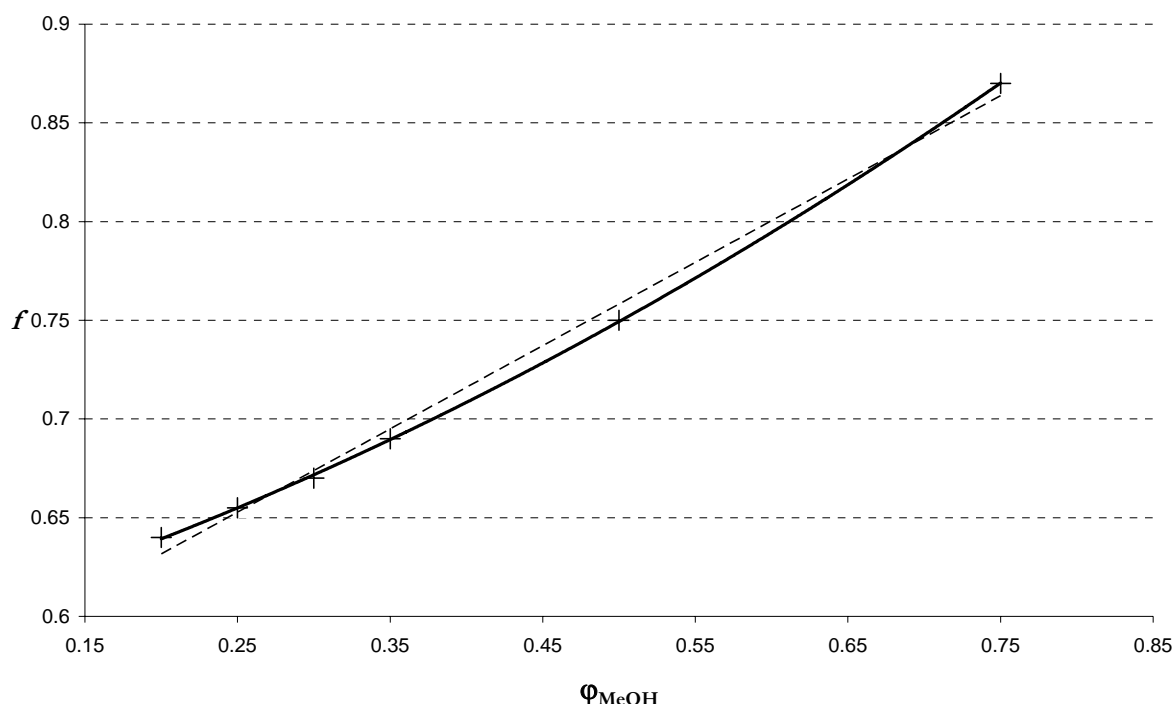


Figure IV-1 : Détermination du rapport isoéluant f entre l'acétonitrile et le méthanol.

En première approximation, une relation linéaire, tracée en pointillés, sur la Figure IV-1, pourrait s'avérer satisfaisante : $f = 0,4219\varphi_{MeOH} + 0,5472$ ($R^2 = 0,994$). Néanmoins, l'écart alors constaté pour $\varphi_{MeOH}=0,5$ s'élève à 0,01, entraînant sur les facteurs de rétention une erreur non négligeable de 0,5. Notre choix s'est donc porté sur une relation quadratique qui présente une meilleure adéquation, avec un terme quadratique statistiquement significatif ($\alpha=0,05$) : $f = 0,215\varphi_{MeOH}^2 + 0,2157\varphi_{MeOH} + 0,5875$ ($R^2 = 0,9999$). Cette dernière s'avère suffisamment précise et sera retenue pour la suite.

Au final, la force éluante de l'acétonitrile vis-à-vis du méthanol diminue au fur et à mesure qu'augmente la teneur en modificateur organique sur le domaine étudié. Ce phénomène s'avère complexe à interpréter. D'un point de vue physico-chimique, les mélanges hydro-organiques à base d'acétonitrile ou de méthanol ne sont pas binaires mais au moins ternaires : il existe en effet une phase constituée de complexes Modificateur Organique-Eau [310-315]. Du fait de sa capacité à interagir par liaisons hydrogène avec l'eau, le méthanol voit la structure de ses clusters constitués avec l'eau varier en fonction de sa concentration, suivant des proportions de 1 pour 5 molécules d'eau à basse concentration en méthanol contre une stoechiométrie de parité à haute teneur en modificateur organique [313]. Ainsi, la concentration en complexes évolue plus

Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables

graduellement avec l'addition de méthanol qu'avec l'acétonitrile : les concentrations maximales en complexes s'obtiennent à 70% en volume de méthanol contre 40-50% en acétonitrile [315] (cf. Annexe 2). Partant du principe que le modificateur organique pur possède une affinité supérieure pour la phase stationnaire et ne contribue donc pas majoritairement à la rétention des solutés sur ce domaine de variations, l'évolution de la force éluante est alors directement reliée à celle de la concentration des complexes. Puisque sur la gamme de variations étudiée, la concentration des complexes en méthanol s'accroît tandis que celle de ceux en acétonitrile stagne puis diminue, l'origine du phénomène s'en trouve élucidée, à la fois au niveau de la monotonie du comportement (rapport f globalement croissant) et permet d'expliquer l'origine du second degré.

IV.C Effet sur les phases stationnaires

Une fois les rapports globalement isoéluaux établis, il nous est dès lors possible d'étudier l'influence de la nature du solvant sur un ensemble de phases stationnaires. L'étude se focalisant sur l'impact du solvant sur les grandeurs relatives à la rétention, l'évaluation portera uniquement sur les facteurs de rétention et les asymétries de pic en fonction du type de composé injecté.

IV.C.1 Conditions expérimentales

IV.C.1.a Instrumentation

Nous avons réalisé cette étude sur deux chaînes chromatographiques distinctes : une chaîne Varian-Waters dont les données sont acquises via le logiciel ClassVP et une chaîne HP 1050-1100 pilotée sous Chemstation, dont les modules sont entièrement décrits dans l'Annexe 4.

IV.C.1.b Conditions chromatographiques

Parmi les solutés sélectionnés pour mettre en évidence l'influence du solvant, certains appartiennent au test de Tanaka [217]. Ainsi, le butylbenzène, le pentylbenzène, l'*o*-terphényle et le triphénylène nous permettront d'avoir accès à des mesures relatives à l'hydrophobie, aux

sélectivités méthylène $\alpha_{CH_2} = \frac{k_{Pentylbenzène}}{k_{Butylbenzène}}$ et de forme $SS = \frac{k_{Triphénylène}}{k_{o-Terphényle}}$. A ce jeu de composés neutres

ont été ajoutés deux composés basiques, que sont la clofazimine et l'amiodarone, possédant respectivement un pK_a de 8,51 et de 8,73 [316] et dont les principales caractéristiques sont rappelées en Annexe 2.

Nous avons exécuté l'étude dans deux phases mobiles à chaque fois nouvellement préparées – l'une à base de méthanol, l'autre à base d'acétonitrile – et dont les rapports massiques ont été déterminé en IV.B. Les mélanges hydroorganiques sont donc les suivants : méthanol/phase aqueuse 70 : 30 (m/m) et acétonitrile/phase aqueuse 59 : 41 (m/m).

Afin de garantir une meilleure fiabilité au test, il est nécessaire de tamponner les phases aqueuses [232, 317]. Nous avons donc utilisé un tampon acétate 30 mM de pH 5. La préparation détaillée du tampon et des phases mobiles est expliquée dans l'Annexe 5.

Les solutés ont été dilués dans la phase mobile méthanol/tampon acétate de façon à atteindre les concentrations suivantes : 150 ppm pour les alkylbenzènes, 20 ppm pour l'*o*-terphényle, 3 ppm pour le triphénylène et 50 ppm pour les composés basiques. Au moins une heure d'équilibration est requise pour chaque phase mobile avant toute injection. Ces dernières, dont le volume est fixé à 10 μ L, sont effectuées à 3 reprises en ce qui concerne le mélange. En outre, les analytes sont injectés séparément de manière à confirmer leur identité mais aussi vérifier qu'aucune interaction ne se développe entre eux et biaise les temps de rétention. Les composés provenant du test de Tanaka sont détectés à 254 nm, les solutés basiques, à 230 nm. L'injection de thiourée dans la phase acétonitrile permet d'établir une estimation du volume de rétention nulle des colonnes testées.

Chapitre IV

IV.C.1.c Colonnes étudiées

Les caractéristiques disponibles concernant les colonnes utilisées durant cette étude (toutes de dimension 150 mm×4.6 mm I.D.) sont reportées dans le Tableau IV-3.

Hormis la phase J'Sphere ODS H80, dont le greffage est polymérique, toutes les autres sont de type monomérique. Pour plus de détails, se reporter à l'Annexe 8.

Tableau IV-3 : Caractéristiques des colonnes étudiées ; \bar{D} , d_p , %C et S_p désignent respectivement le diamètre moyen des pores (nm), le diamètre des particules (μm), le taux de carbone et la surface spécifique (m^2g^{-1}).

Colonne	\bar{D}	d_p	% C	S_p	Fabricant	Commentaires
CapcellPak C8 UG 120	12	5	10	300	Shiseido	Silice encapsulée C8
Zorbax Eclipse XDB C8	10	5	7,6	180	Agilent	
Symmetry C8	10	5	12,2	344	Waters	Silice greffée C8 haute densité
Kromasil C8	10	5	12	340	Akzo Nobel	
XTerra RP 8	10	3,5	13,4	174	Waters	Silice hybride greffée alkylcarbamate (C8 ou C18)
XTerra RP 18	10	3,5	14,4	172	Waters	
SymmetryShield RP 18	10	3,5	17,0	339	Waters	Silice greffée octadécylcarbamate
Zorbax StableBond C18	8	3,5	10	300	Agilent	Silice greffée diisobutyloctadecyle
Nucleosil C18 HD	10	5	20	350	Macherey Nagel	
J'Sphere ODS H80	8	4	22	*	YMC	Silice greffée C18 haute densité

* : valeur non fournie par le fabricant ou le fournisseur

IV.C.2 Résultats

Nous avons systématiquement étudié l'impact du modificateur organique sur les facteurs de rétention et les asymétries de pic de chacun des composés. En outre, pour les composés neutres, il nous semblait intéressant de déterminer l'influence du solvant sur les sélectivités α_{CH_2} et SS .

Concernant les asymétries de pics, nous avons utilisé une définition adaptée de l'asymétrie U.S.P., rappelée dans l'Annexe 6. Ainsi, cette modification permet aux traînes en tête et queue de pic de même amplitude d'affecter la valeur unitaire d'un écart équivalent en valeur absolue, ce qui n'est pas le cas dans la définition initiale.

IV.C.2.a Traitement des données par ANOVA

Comme nous avons étudié les 10 colonnes dans chacun des solvants en procédant à trois injections répétées pour chaque soluté, nous sommes en mesure d'exploiter les données par ANOVA. Dans notre cas, les facteurs contrôlés sont la colonne et le solvant. Comme les facteurs sont en liaison factorielle, il nous faut considérer l'interaction « Colonne×Solvant » traduisant la possibilité *a priori* de voir l'effet du solvant dépendre de la colonne. Les tests statistiques ont été menés avec seuil $\alpha=10\%$ ³⁰. Pour caractériser quantitativement l'influence d'un facteur ou d'une interaction significative, nous avons préféré aux écart-types les coefficients de variation ou CV ,

exprimés en pourcentage comme le décrit l'Eq I-1 : $CV_i(\%) = \frac{\hat{\sigma}_i}{\bar{x}} \times 100$ Eq. IV-1

³⁰ Le seuil est fixé à 10% et non 5% comme usuellement en raison de nombre de degrés de liberté réduits concernant le facteur Solvant (1 ddl).

Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables

En effet, cette définition nous permet d'évaluer l'impact de l'effet d'un facteur ou d'une interaction en terme de pourcentage de la réponse moyenne considérée \bar{x} .

IV.C.2.b Résultats sur les composés neutres

IV.C.2.b.i Propriétés de rétention

Facteurs de rétention

La Figure IV-2 illustre les moyennes des facteurs de rétention pour chacun des composés neutres injectés sur les 10 phases stationnaires, à la fois pour des mélanges hydroorganiques à base de méthanol et d'acétonitrile.

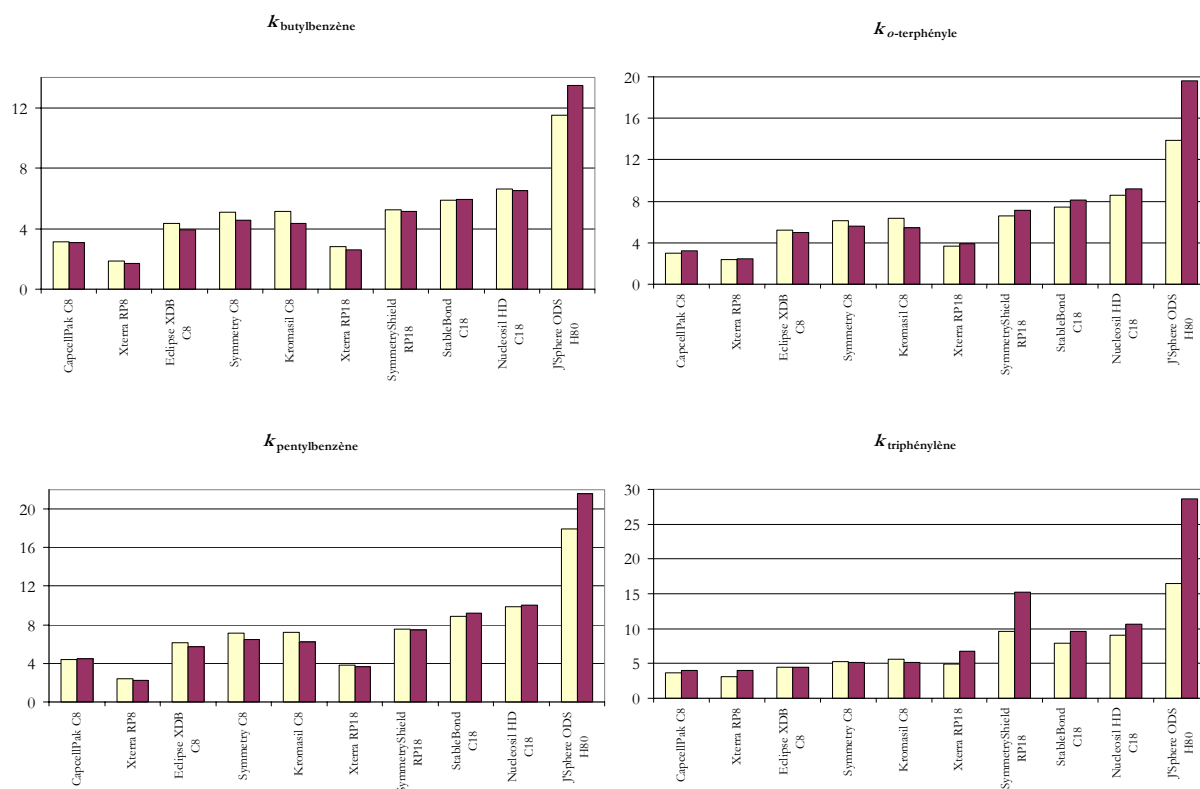


Figure IV-2 : Facteurs de rétention (moyennes des trois injections) pour le butylbenzène, le pentylbenzène, l'*o*-terphényle et le triphénylène pour chaque colonne testée dans l'acétonitrile (□) et le méthanol (■) en tant que modificateur organique.

En considérant que la rétention des alkylbenzènes procure une estimation de l'hydrophobie des supports chromatographiques, les phases possédant un groupement polaire intercalé (comme la SymmetryShield RP18) semblent présenter une hydrophobie en deçà de celles à groupement purement alkyle (comme la J'Sphere ODS H80). Ce phénomène, constaté quel que soit la nature du solvant utilisé, confirme ainsi des résultats énoncés dans la littérature [129-131, 133, 134]. En ce qui concerne les alkylbenzènes, le facteur solvant n'apparaît que faiblement influent, mis à part sur la J'Sphere ODS H80, seule phase de ce test possédant un greffage polymérique. Ceci montre manifestement que les conditions déterminées en IV.B sur une colonne Kromasil C18 et définies comme globalement isoéluantes restent valables pour les supports de type monomérique. Par exemple, la colonne Nucleosil C18 HD retient légèrement plus le pentylbenzène en éluant méthanol alors que l'inverse se produit pour le butylbenzène. Pour les composés polyaromatiques, le solvant possède une influence bien plus marquée. Cette tendance est confirmée par les résultats de l'ANOVA regroupés dans le Tableau IV-4.

Chapitre IV

Tableau IV-4 : Estimation des différentes sources de variation par ANOVA pour les facteurs de rétention des composés neutres.

Soluté	Source de variation			
	Colonne (CV%)	Solvant (CV%)	Interaction Colonne*Solvant (CV%)	Résiduelle (CV%)
Butylbenzène	56,30	N.S. (*)	10,16	0,24
Pentylbenzène	61,91	N.S.	11,92	0,13
Triphénylène	58,94	9,20	33,58	0,21
o-Terphényle	55,89	N.S.	19,77	0,19

(*) : non significatif

La répétabilité des injections, traduite par la variabilité résiduelle, est excellente. L'effet du facteur colonne s'avère similaire pour tous les solutés. Les sondes hydrophobes peuvent être considérées comme de bons indicateurs – en première approximation – pour déterminer l'hydrophobie globale de la phase stationnaire. A l'exception du triphénylène, dont les paramètres de solubilité entre méthanol et l'acétonitrile diffèrent de manière trop importante, l'effet du solvant n'apparaît pas significatif, confirmant des conditions choisies plutôt isoéluantes pour les solutés considérés. Cependant, si le modificateur organique n'intervient pas de façon directe avec un effet propre, l'interaction solvant-colonne se révèle systématiquement significative, traduisant une influence du solvant dépendante de la phase stationnaire utilisée. L'interaction est plus forte pour les polyaromatiques que pour les alkylbenzènes. La Figure IV-2 illustre ce phénomène, en comparant la rétention du pentylbenzène (faible interaction colonne-solvant) à celle du triphénylène (forte interaction colonne-solvant) entre deux colonnes chromatographiques.

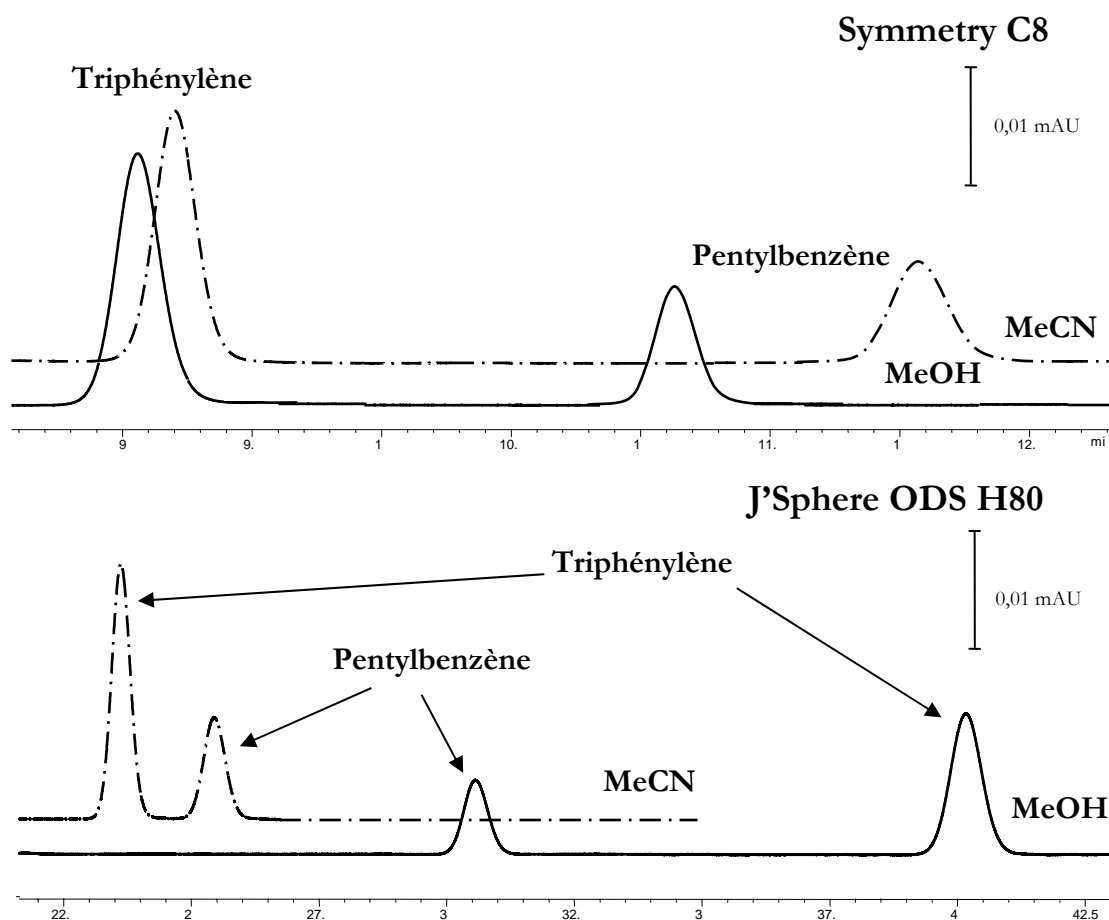


Figure IV-3 : Chromatogrammes du pentylbenzène et du triphénylène en éluants méthanol (MeOH) et acétonitrile (MeCN) sur une colonne Symmetry C8 et une colonne J'Sphere ODS H80.

Sur la colonne Symmetry C8, quasiment aucune différence n'est visible alors que sur la colonne J'Sphere ODS H80, les facteurs de rétention décroissent fortement lors du passage du méthanol à l'acétonitrile. De plus, l'inversion entre le triphénylène et le pentylbenzène observée

Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables

sur la J'Sphere ODS H80 démontre que les composés polyaromatiques sont beaucoup plus affectés que les alkylbenzènes par le changement de solvant. Cette interaction peut être interprétée physico-chimiquement. Les phénomènes de solvation affectent non seulement les solutés mais aussi les greffons, et ce différemment selon leur nature (monomérique ou polymérique, incluant ou non un groupement polaire intercalé). De ce point de vue, le triphénylène semble être la sonde la plus sensible pour mettre en évidence le processus de solvation différentielle des chaînes alkyle, probablement en relation avec sa forme planaire.

Sélectivités

La Figure IV-4 montre l'effet du solvant sur les sélectivités méthylène et de forme.

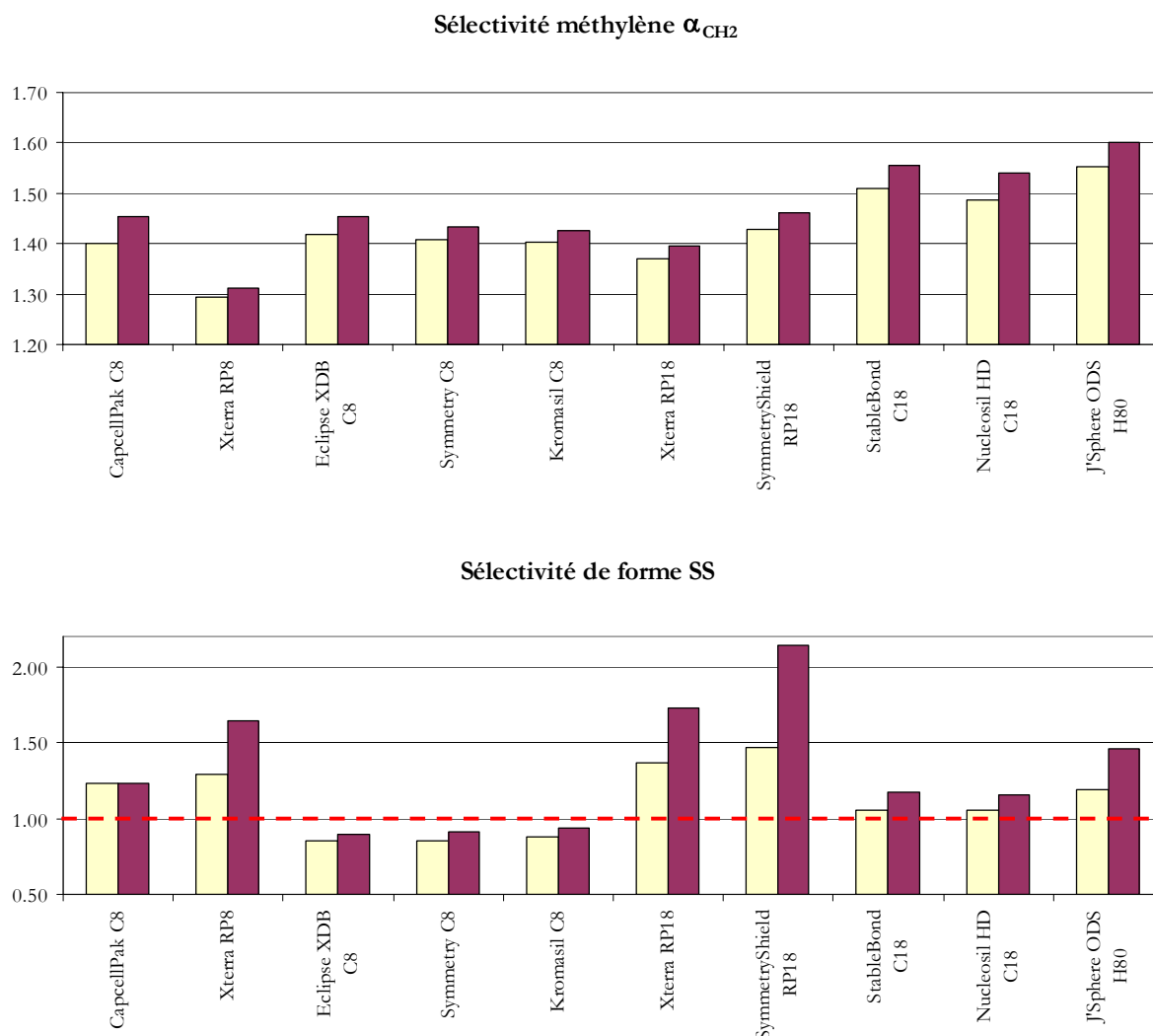


Figure IV-4 : Moyennes des sélectivités méthylène (haut) et de forme (bas) pour chaque colonne avec pour modificateur organique l'acétonitrile (□) et le méthanol (■)

Les colonnes C8 monomériques possèdent une sélectivité de forme inversée ($SS < 1$), comparées aux C18 conventionnelles. De plus, on constate qu'à sélectivité méthylène équivalente, les phases à groupement polaire intercalé démontrent une sélectivité de forme supérieure à celle de leurs homologues alkyle. Enfin, pour toutes les phases stationnaires, les sélectivités s'avèrent plus élevées en méthanol qu'en acétonitrile, et de manière encore plus marquée pour les phases polymériques ou à groupement polaire intercalé. Cependant, ces variations de la sélectivité de forme possèdent différentes sources. Comme initialement décrit par Sander et Wise [94], la sélectivité de forme augmente avec (1) la chimie de modification de surface (polymérique ou non), (2) la densité de greffage, (3) la longueur des chaînes alkyle, (4) la fraction organique de la phase mobile et (5) la température.

Les points 1, 3 et 4, sont vérifiés dans notre étude, exceptée dans le cas de la Capcell C8, à base de silice encapsulée. En outre, le comportement particulier des phases à groupement polaire intercalé, qui se traduit par (a) une sélectivité de forme notablement plus élevée que celles des phases purement alkyle et (b) une forte augmentation de cette sélectivité en remplaçant l'acétonitrile par le méthanol, ne peut être raisonnablement expliqué par les contributions 1 à 5. Contrairement à ce qui se produit avec l'acétonitrile pour modificateur organique, des liaisons H peuvent s'établir entre des groupements polaires intercalés et la phase mobile lorsqu'elle contient du méthanol. Ces interactions supplémentaires augmentent l'ordre des chaînes, qui, apparaissant plus rigides, favorisent la reconnaissance de forme. Ainsi, nous avons identifié la présence d'un groupement polaire intercalé dans le greffon alkyle comme un facteur supplémentaire entraînant l'élévation de la sélectivité de forme. L'étude réalisée permet en outre d'évaluer l'importance relative de la présence d'un groupement polaire intercalé. En effet, les phases stationnaires de type XTerra, du fait de la nature de leur matrice en silice hybride, possèdent un nombre réduit de silanols en surface avant modification. En conséquence, elles présentent aussi des densités de greffage moindres par rapport aux phases à base de silice pure. Néanmoins, l'ordre global sur la sélectivité de forme observé est le suivant³¹ : C8 monomérique < C18 monomérique < C18 polymérique < Hybride Polaire C8 < Hybride Polaire C18 < Polaire C18. Ce faisant, la présence d'un groupement polaire s'avère être un facteur prépondérant pour la sélectivité de forme, les facteurs longueur de chaîne et densité de greffage agissant aussi, mais de façon secondaire. Ces facteurs peuvent se classer par ordre d'influence relative : Groupement Polaire > Longueur de chaîne > Densité de greffage. N'ayant pas envisagé de variation de la fraction de solvant ou de la température, il ne nous est pas possible de conclure quant à leurs influences relatives respectives.

Sur les sélectivités, l'ANOVA nous procure les résultats suivants :

- Concernant la sélectivité méthylène, l'effet principal est engendré par la colonne (5,41 %) alors que le solvant et l'interaction colonne*solvant ne possèdent qu'une influence mineure (respectivement 1,74% et 0,64% pour une résiduelle de 0,07%) ;
- Pour la sélectivité de forme, si l'effet principal est encore dû à la colonne (21,05%), les influences du modificateur organique et de l'interaction sont beaucoup plus prononcées (9,84% et 12,43% pour une résiduelle de 0,07%).

La Figure IV-5 illustre ces résultats, et notamment l'interaction colonne*solvant, par la comparaison de deux phases stationnaires possédant des sélectivités méthylène semblables en éluants méthanol (1,42) et acétonitrile (1,46).

Au contraire de la sélectivité méthylène (α_{1-3}) qui reste quasiment constante quelque soit la colonne testée ou le solvant utilisé, la sélectivité de forme (α_{2-4}) se révèle extrêmement sensible à la nature de la phase stationnaire. Ainsi, α_{2-4} reste inchangée sur l'Eclipse XDB-C8, que le modificateur organique soit le méthanol ou l'acétonitrile, alors qu'elle est notablement modifiée sur la SymmetryShield RP18, dont le greffon possède un groupement polaire intercalé, lors de la permutation de solvant.

³¹ Dans un souci de clarté, nous utilisons une notation abrégée. Par défaut, les phases stationnaires possèdent une matrice à base de silice ultra pure sphérique ; seuls sont indiqués alors le greffon et le type de greffage. La notation Hybride signifie que la phase stationnaire est à base de silice hybride ; les phases hybrides évaluées dans cette étude possédant toute le même type de greffage – monomérique, cette information n'est pas relatée. Si le greffon comporte un groupement polaire intercalé, cela se traduit par Polaire.

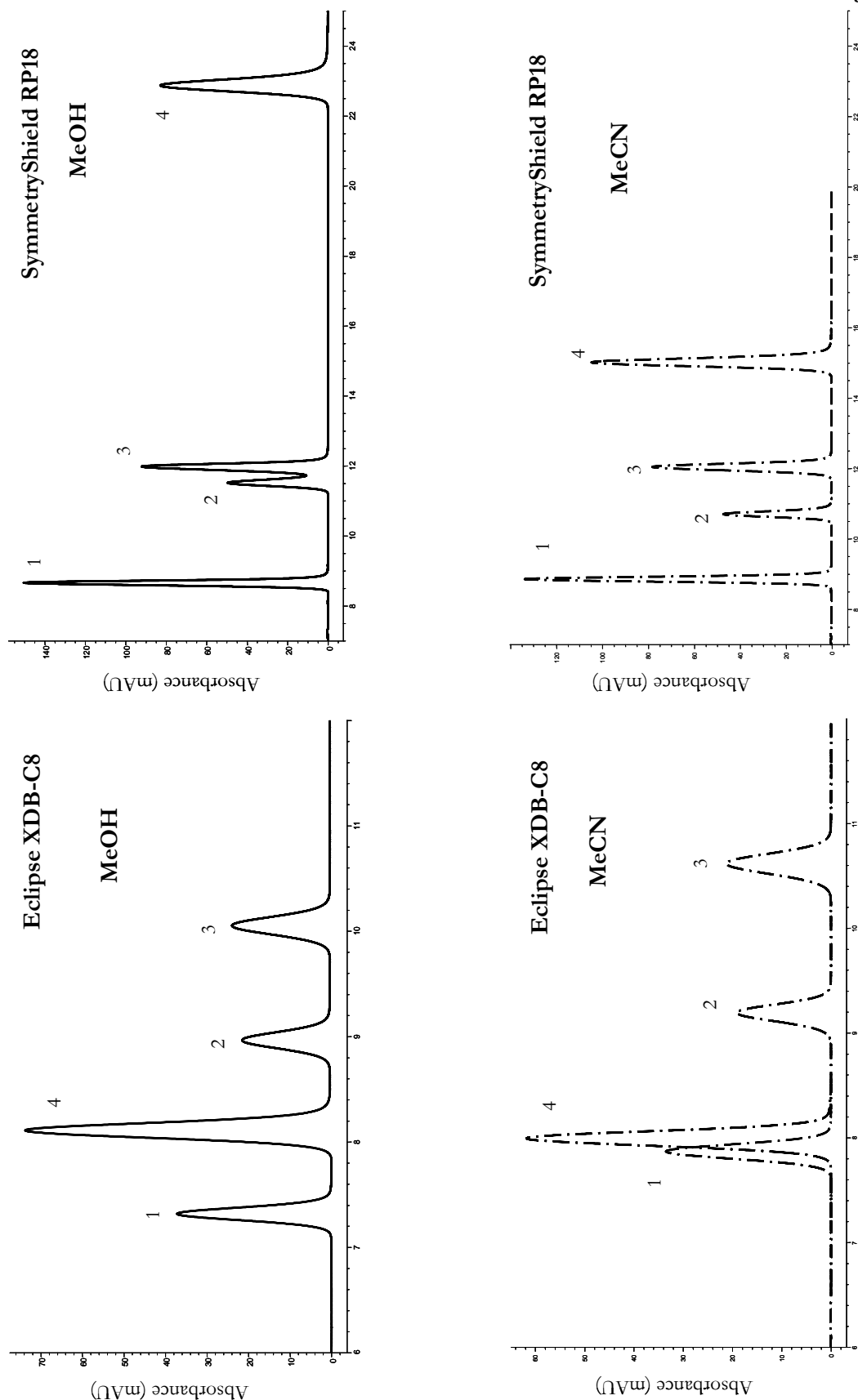


Figure IV-5 : Chromatogrammes du mélange constitué des composés de Tanaka (1=butylbenzène ; 2=o-terphényle ; 3=pentylbenzène et 4=triphénylène) sur une colonne Eclipse XDB C8 et une colonne SymmetryShield RP18 avec phases mobiles à base de méthanol ou d'acétonitrile.

Les résultats sur les asymétries de pic des composés neutres sont consignés dans la Figure IV-6.

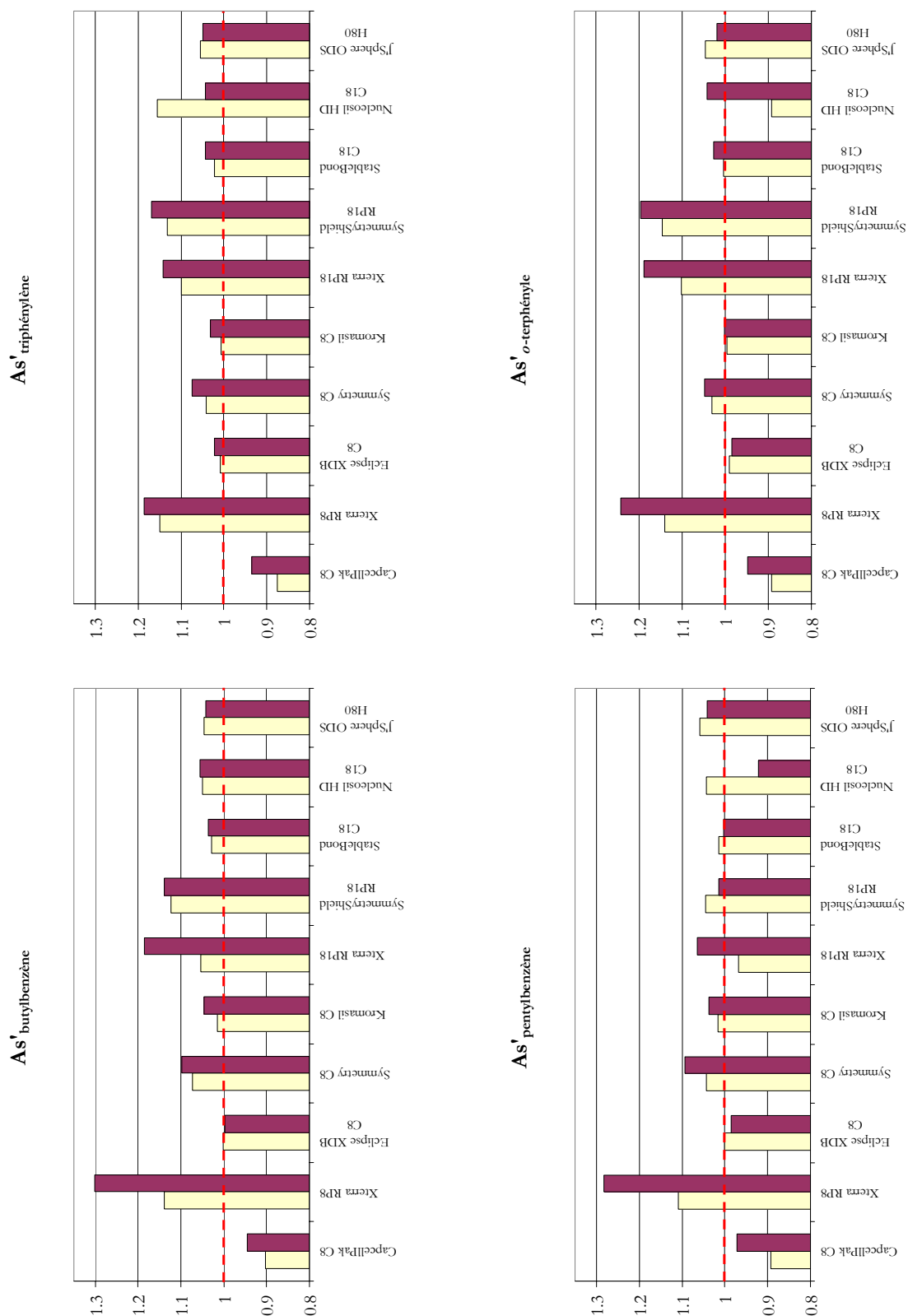


Figure IV-6 : Moyennes des asymétries de pic du butylbenzène, du pentylbenzène, de l'o-terphényle et du triphénylène sur chaque colonne étudiée avec de l'acétonitrile (□) et du méthanol (■) en tant que modificateur organique.

Si les asymétries sont relativement proches de la valeur unitaire règne néanmoins une certaine disparité. Ainsi, sur les colonnes hybrides (XTerra), l'asymétrie est étonnamment élevée

Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables

pour les composés neutres, surtout dans le méthanol. Ce phénomène trouve probablement sa cause dans la possibilité d'interactions supplémentaires entre les groupes méthyle présents en surface du support et les sondes neutres. Quant à l'asymétrie particulière relevée sur la CapcellPak C8, elle pourrait être attribuée à son procédé de synthèse, l'encapsulation polymérique. Les résultats de l'ANOVA, regroupés dans le Tableau IV-5, démontrent que même dans le cas de composés neutres, l'asymétrie de pic observée dépend à la fois du modificateur organique et de l'identité de la colonne, soit directement soit par le biais de l'interaction.

Tableau IV-5 : Estimation des différentes sources de variation par ANOVA pour les asymétries de pic des composés neutres.

Soluté	Source de variation			
	Colonne (CV%)	Solvant (CV%)	Interaction Colonne*Solvant (CV%)	Résiduelle (CV%)
Butylbenzène	5,96	1,80	3,81	0,98
Pentylbenzène	N.S.	N.S.	5,59	1,27
Triphénylène	6,04	N.S.	3,06	1,93
o-Terphényle	7,46	2,35	3,64	1,14

Tout comme pour les facteurs de rétention, le modificateur organique se révèle être pour les solutés neutres un facteur influent, dont l'effet dépend de la colonne. Désormais, intéressons-nous à l'impact du solvant sur les composés basiques sélectionnés.

IV.C.2.c Résultats sur les composés basiques

IV.C.2.c.i Facteurs de rétention

La Figure IV-7 montre des résultats sur les facteurs de rétention des solutés basiques extrêmement dépendants de la colonne considérée.

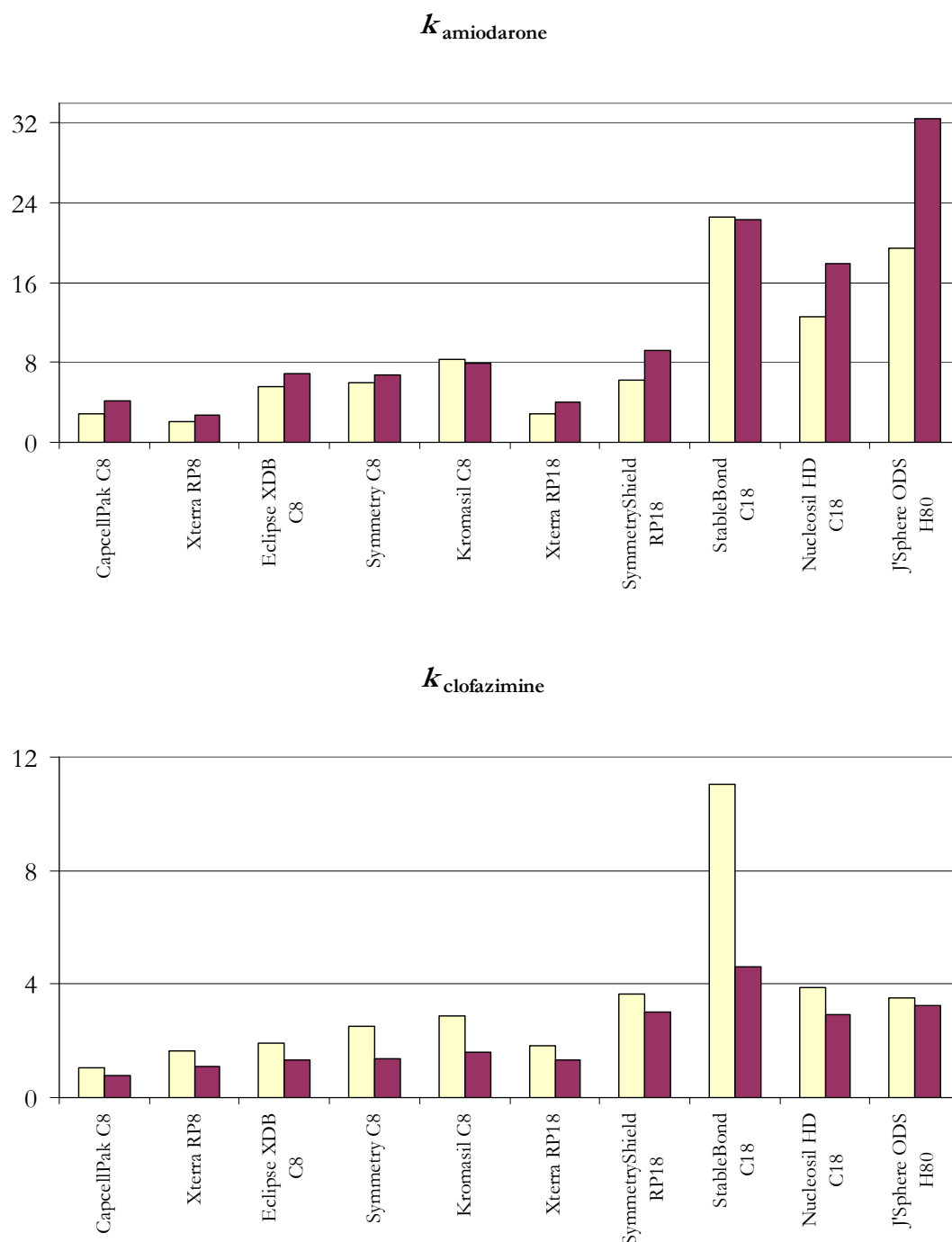


Figure IV-7 : Moyennes des facteurs de rétention pour l'amiodarone et la clofazimine pour chacune des colonnes étudiées avec pour modificateur organique l'acétonitrile (□) et le méthanol (■).

A titre d'exemple, le facteur de rétention de l'amiodarone est divisé d'un facteur 30 entre la J'Sphere ODS H 80 et la XTerra RP8, alors que pour les neutres, ce facteur n'a jamais excédé 10. Cependant, l'effet de la phase stationnaire n'est pas le seul à jouer, la rétention des composés basiques apparaît beaucoup plus complexe qu'elle ne l'est pour les neutres : alors que le facteur de rétention de l'amiodarone s'accroît globalement en passant de l'acétonitrile au méthanol, c'est exactement l'inverse qui se produit pour la clofazimine. Les résultats issus de l'ANOVA confirment cette tendance : les facteurs colonne (74,15% pour l'amiodarone et 42,77% pour la clofazimine) et solvant (9,10% et 19,42% respectivement) s'avèrent extrêmement influents, tout comme leur interaction (28,00% et 47,34% pour des résiduelles respectivement de 0,33% et 1,03%), bien plus en tout cas que pour les composés neutres.

La nature mixte du mécanisme de rétention des composés basiques est très certainement à l'origine de ce phénomène [33]. Les interactions intenses dues aux groupements silanol résiduels

Méthanol et acétonitrile : deux modificateurs non interchangeables

rendent les composés basiques plus sensibles que les composés neutres à la composition de la phase mobile et à la nature des phases stationnaires mises en jeu. Le taux de dissociation des silanols résiduels à la surface de la phase greffée est directement lié au pH de la phase mobile et à la distribution de pK_A des groupements silanol, qui dépend de la nature de la silice [301, 318]. Dans les conditions de l'étude, les silanols sont partiellement ionisés sous forme SiO^- . Le pH de la phase mobile détermine aussi le degré de protonation des solutés. Ainsi, les composés basiques peuvent développer des interactions à la fois par liaison H et par échange de cation. Dans le cas d'une interaction régie partiellement par liaison H, la nature du modificateur organique possède une influence essentielle : du fait de sa capacité à établir des liaisons H, le méthanol est reconnu pour son effet masquant envers les silanols résiduels, rôle auquel ne peut prétendre l'acétonitrile.

La Figure IV-8 montre le rôle joué par la phase stationnaire sur la rétention des composés basiques.

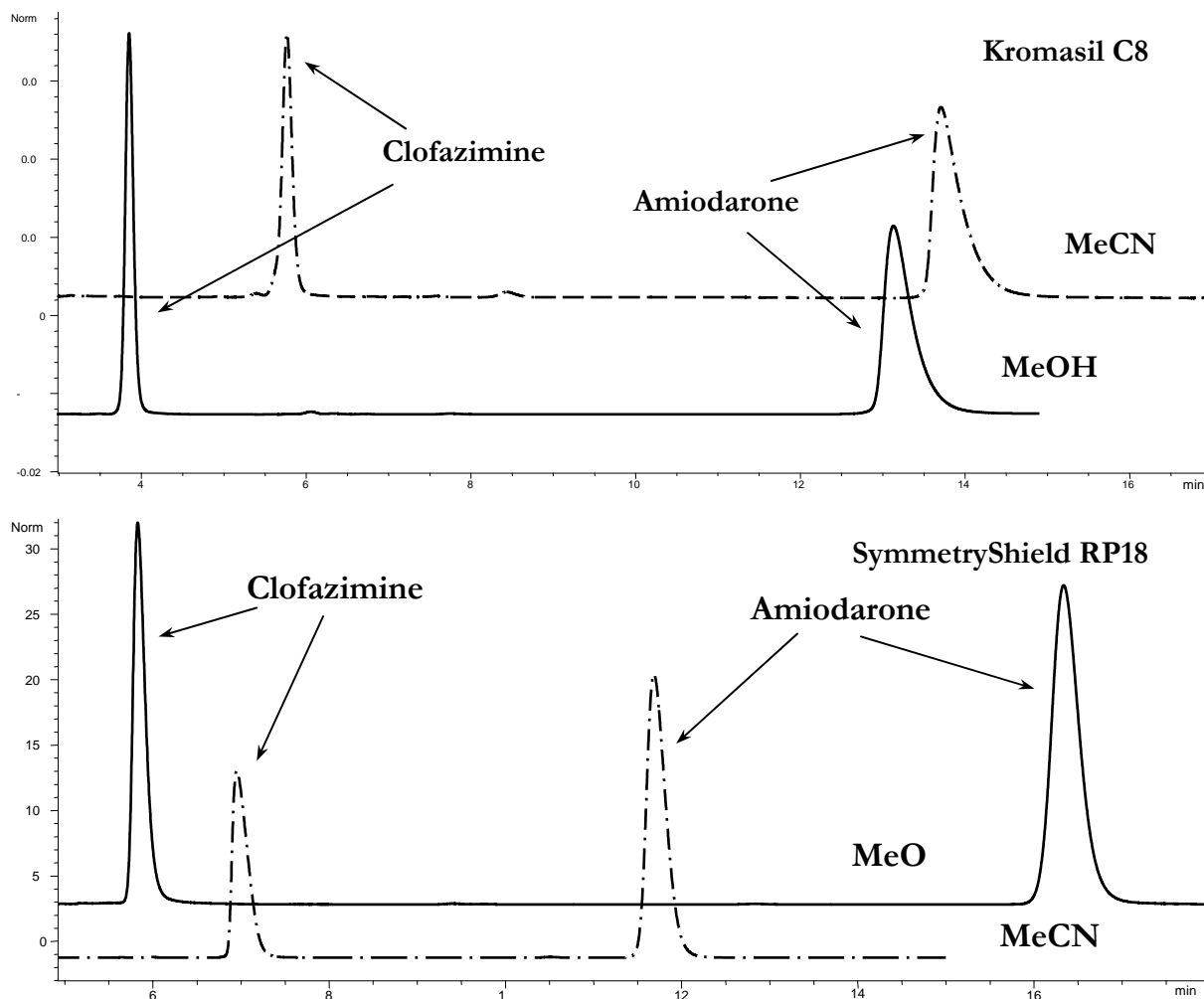


Figure IV-8 : Chromatogrammes de la clofazimine et de l'amiodarone sur des colonnes Kromasil C8 et SymmetryShield RP18 avec le méthanol et l'acétonitrile pour modificateur organique.

Ainsi, la clofazimine est manifestement plus affectée que l'amiodarone par le changement de solvant méthanol/acétonitrile sur la Kromasil C8 tandis que la situation s'inverse sur la SymmetryShield RP18.

Ces différences de comportement, qui proviennent de la combinaison du solvant et de la phase stationnaire, ne sont pas simples à prévoir puisqu'elles dépendent fortement de la phase stationnaire utilisée.

La Figure IV-9 présente les résultats obtenus sur les asymétries de pic des composés basiques.

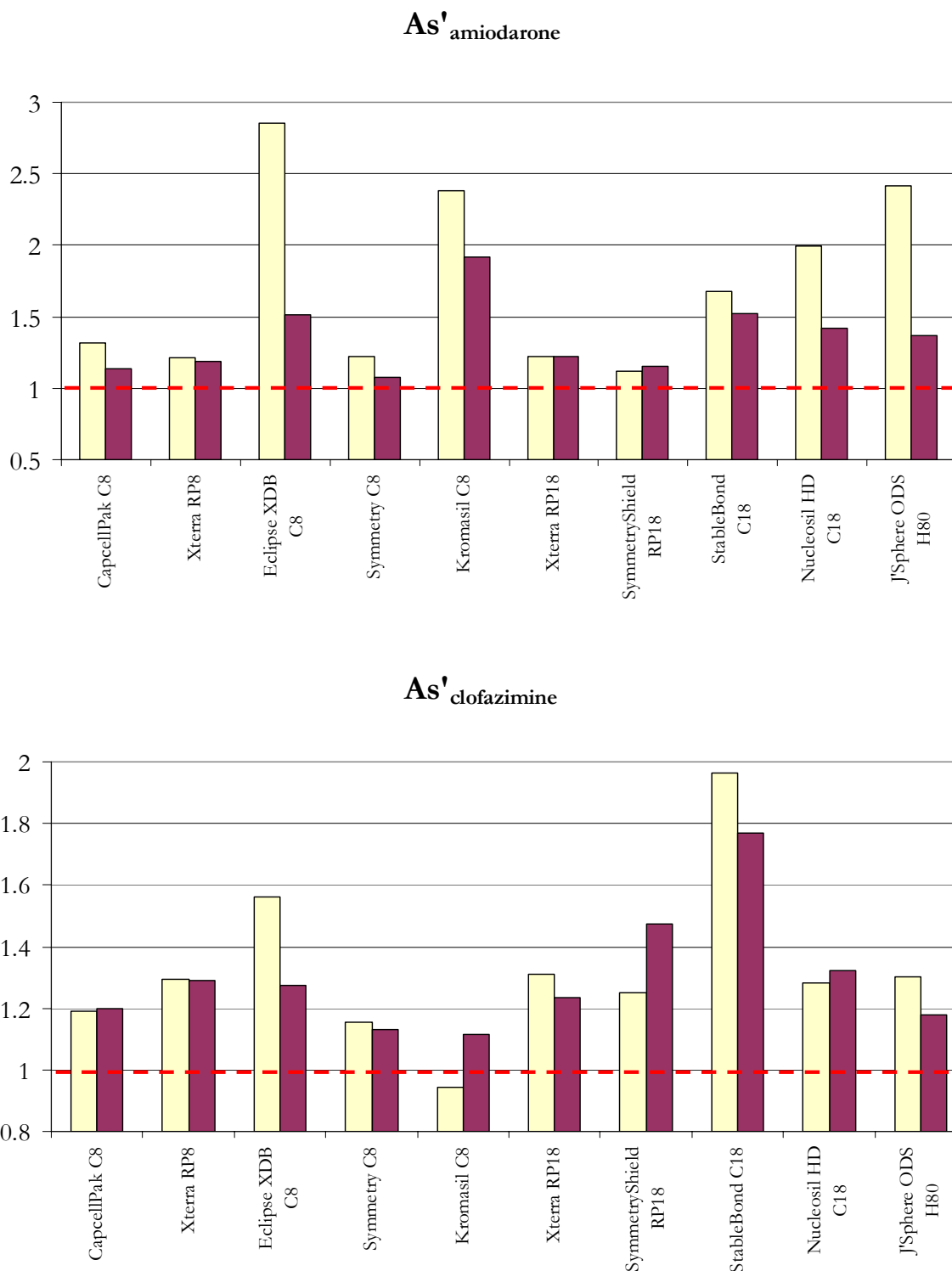


Figure IV-9 : Moyennes des asymétries de pic pour l'amiodarone et la clofazimine pour chacune des colonnes étudiées avec pour modificateur organique l'acétonitrile (□) et le méthanol (■)

L'acétonitrile induit une augmentation significative de l'asymétrie de pic, en raison de son incapacité à rentrer en compétition pour les interactions mettant en jeu des liaisons H entre silanols résiduels et composés basiques, et ce même si les composés sont moins retenus. L'ANOVA démontre un effet de la colonne toujours important (5,10% pour l'amiodarone et 13,51% pour la clofazimine), cependant bien moindre que l'interaction colonne*solvant (21,64%

pour l'amiodarone et 8,06% pour la clofazimine). Soulignons encore le comportement différent des solutés basiques : l'amiodarone s'avère plus sensible à l'effet du solvant (13,37%) au contraire de la clofazimine, pour laquelle l'influence du solvant n'est pas significative.

IV.D Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer comment se manifeste l'effet du solvant sur les facteurs de rétention, les sélectivités et les asymétries de pic, pour des composés neutres ou basiques. L'amplitude des variations observées dépend de la phase stationnaire considérée. Dès lors, le modificateur organique, de par l'amplitude de son influence, ne peut pas être considéré comme un facteur secondaire dans le cadre des tests de colonnes : les caractérisations ne pourront être utilisables que si le solvant de test s'avère être identique à celui utilisé dans les conditions opératoires. En outre, la présence systématique de l'interaction phase stationnaire*solvant peut s'avérer problématique pour des caractérisations postulant un modèle *a priori*. En effet, pour celles se fondant sur le modèle des paramètres de solvation, l'existence de cette interaction invalide l'hypothèse $\alpha = \alpha_{\text{Phase Stationnaire}} - \alpha_{\text{Phase Mobile}}$ des modèles de rétention. Par conséquent, nous avons choisi de nous intéresser aux couples colonne/solvant plutôt que de considérer la colonne seule. En pratique, cela implique le développement d'une méthodologie tenant compte dans sa conception de ce facteur négligé jusqu'à présent dans la caractérisation des phases stationnaires.

Chapitre V Construction du test : d'un test étendu à un test réduit pertinent

V.A Introduction et principe

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il est indispensable de tenir compte de la nature du solvant dans la caractérisation des phases stationnaires. Le choix des conditions, y compris les solutés, constitue un autre point de controverse : les tests reposent communément sur de petits solutés dont on postule *a priori* leur capacité à sonder les caractéristiques du support chromatographique. Les conditions choisies s'avèrent alors rarement représentatives de celles couramment utilisées. Il nous est donc paru nécessaire de construire un test approprié aux nouvelles phases par le biais d'une approche que nous pouvons qualifier d'inverse à celle suivie jusqu'à présent dans la littérature : notre méthodologie consiste à sélectionner les conditions du test *a posteriori*, et non de les supposer *a priori*. Seulement, opérer une sélection suppose la mise en place au préalable d'un premier test étendu, qui maximise le nombre de conditions de façon à ne conserver que les plus intéressantes. Pour étendre au maximum la capacité de caractérisation de ce premier test, il nous faut multiplier autant que possible la diversité des conditions chromatographiques. A cette fin, nous avons intégré trois paramètres principaux en plus de la nature du solvant, dont nous avons démontrée les effets notoires sur les phases stationnaires [319] : les solutés, les niveaux de pH et la fraction massique de solvant. Le test dans des conditions étendues repose sur une large gamme de solutés, différant suivant les propriétés physico-chimiques, la présence d'hétéroatomes, la masse moléculaire et la structure tridimensionnelle. Concernant les niveaux de pH, la plupart des tests réalisés avec des milieux hydro-organiques tamponnés possèdent un à deux niveaux de pH, aux voisinages de 3 et de 7. Nous avons décidé d'introduire un niveau intermédiaire à pH 5. Nous avons envisagé quatre fractions massiques pour chacun des modificateurs organiques. Nous avons effectué ce test étendu sur 12 colonnes chromatographiques représentatives de celles utilisées dans l'industrie pharmaceutique. Pour obtenir nos classifications, le traitement de données repose sur la combinaison de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Analyse Hiérarchique en Clusters (AHC). Cette approche combinée à des raisonnements physico-chimiques va nous permettre de réduire les conditions de notre test de manière rationnelle et objective.

V.B Partie expérimentale

V.B.1 Appareillage

L'Annexe 4 décrit en détails les trois systèmes chromatographiques utilisés lors de l'étape de construction du test.

V.B.2 Jeu de solutés

Les solutés sélectionnés pour le test étendu doivent respecter le cahier des charges suivant dans le but d'assurer un maximum de diversité :

- Couvrir une gamme étendue de propriétés physico-chimiques, en termes d'hydrophobie, de polarité et de constantes d'acidité tout en fournissant une diversité d'hétéroatomes, de masses moléculaires et de conformations spatiales ;

- Etre aisément disponibles pour quiconque désire mettre en œuvre la procédure de test, ce qui signifie des solutés peu onéreux, en vente libre³² et possédant une stabilité chimique suffisante pour ne pas être confronté à des phénomènes de dégradation.

Pour remplir les conditions requises, notre choix s'est porté notamment sur des composés pharmaceutiques connus et dont le brevet a expiré. Pour autant, quelques composés « classiques », comme ceux du test de Tanaka [217], figurent dans cette liste de 32 composés. Brièvement, le jeu des solutés se constitue, par ordre alphabétique, d'amiodarone, d'ampicilline, d'atropine, de benzylamine, de buspirone, de *n*-butylbenzène, de caféine, de chlorpropamide, de clofazimine, de cyanocobalamine, de dextrométhorphane, de digitoxine, de diltiazem, de *p*-éthylaniline, d'éthylbenzène, de furosémide, d'imipramine, de lopéramide, de nortriptyline, de *n*-pentylbenzène, de phénol, de primidone, de quinine, de réserpine, de strychnine, d'*o*-terphényle, de toluène, de triphénylène, de *d*-tubocurarine et de vancomycine. Tous ces composés sont représentés sur la Figure V-1.

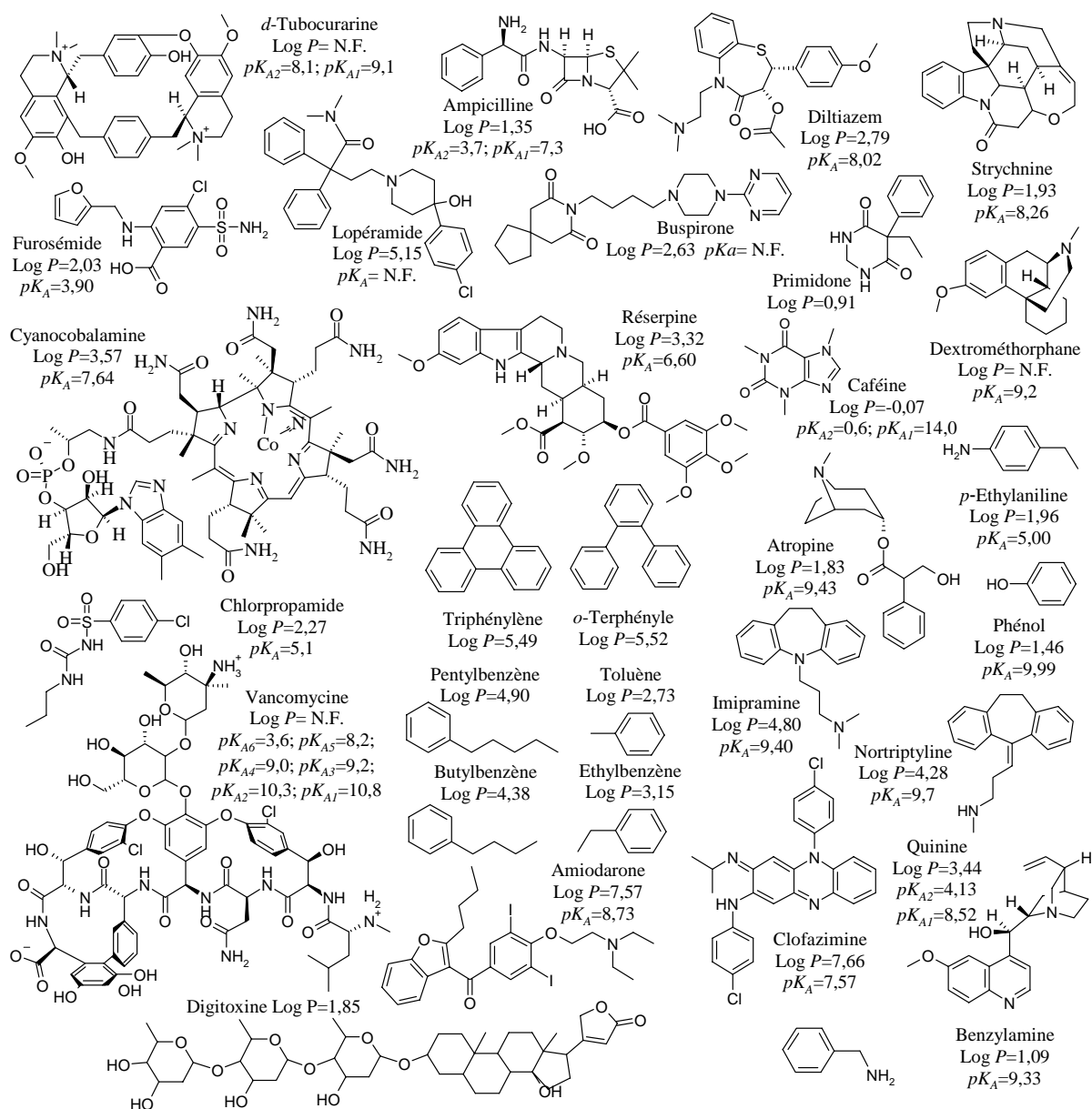


Figure V-1 : Caractéristiques des composés du test.

Au final, le jeu de solutés possède des valeurs de $\log P$ distribuées entre -0,07 et 7,66, des masses moléculaires réparties entre 92 et 1450 g.mol⁻¹ et des constantes d'acidité comprises entre

³² Ce qui exclut d'office les produits stupéfiants ou sous protection de brevet

1,9 et 10,0. L'Annexe 3 détaille les caractéristiques de ces composés. Les solutés sont répartis au niveau du test dans 4 phases mobiles différentes selon les fractions de solvant de manière à obtenir des paramètres chromatographiques fiables³³.

V.B.3 Conditions chromatographiques

V.B.3.a Préparation des tampons

Afin d'obtenir un test fiable, on se doit de tamponner la phase aqueuse du mélange hydro-organique [227]. Le protocole de préparation des tampons aux pH 3, 5 et 7 est fourni dans l'Annexe 5.

V.B.3.b Préparation des phases mobiles

Les rapports iso-éluant entre le méthanol et l'acétonitrile sont issus des résultats du Chapitre IV. Le Tableau V-1 regroupe les rapports des 4 niveaux nécessités par le test pour chacun des modificateurs organiques.

Tableau V-1 : Niveaux de teneur en solvant pour le méthanol et l'acétonitrile.

<i>Eluant</i>	<i>% méthanol (m/m)</i>	<i>% acétonitrile (m/m)</i>
A	70	59
B	45	33
C	30	20
D	15	9

Rappelons qu'une nouvelle préparation des phases mobiles est effectuée par pesée pour chaque colonne.

V.B.3.c Conditions d'injection

Le Tableau V-2 indique dans quelles phases mobiles les composés sont injectés : les lettres correspondent au niveau de force éluante, et le chiffre, au pH du tampon de la phase aqueuse.

Tableau V-2 : Conditions d'injection.

<i>Soluté</i>	<i>Eluants</i>	<i>Soluté</i>	<i>Eluants</i>
Digitoxine	A5	Dextrométhorphan	C3; C5; C7
Clofazimine	A3; A5; A7	Phénol	C3; C5; C7
Amiodarone	A3; A5; A7	Furosémide	C3; C5; C7
Butylbenzène*	A5; A7	Chlorpropamide	C3; C5; C7
Pentylbenzène*	A5; A7	p-Ethylaniline	C3; C5; C7
o-Terphényle*	A5; A7	Quinine	D3; C5; C7
Triphénylène*	A5; A7	Primidone	D3; C5; C7
Réserpine	A7; B3; B5	Strychnine*	D3; D5; C7
Toluène*	B5; B7	d-Tubocurarine	D3; D5; C7
Ethylbenzène*	B5; B7	Ampicilline	D3; D5; C7
Lopéramide	B3; B5; B7	Atropine	D3; D5; D7
Imipramine	C3; B5; B7	Cyanocobalamine	D3; D5; D7
Nortriptyline	C3; B5; B7	Vancomycine	D3; D5; D7
Diltiazem	C3; B5; B7	Caféine*	D3; D5; D7
Buspirone	C3; B5; B7	Benzylamine*	D3; D5; D7

* $\lambda=254$ nm

Hormis la digitoxine, nous avons injecté tous les composés neutres à même niveau de force éluante et aux 3 niveaux de pH : de cette manière, il nous est possible de détecter une éventuelle erreur de préparation de l'éluant. Les composés ont été injectés aux concentrations suivantes : 50 ppm pour la majorité d'entre eux, à l'exception des alkylbenzènes (150 ppm), de l'o-

³³ Il est impératif d'obtenir des facteurs de rétention raisonnables – ni trop faibles, ni trop élevés, pour pouvoir négliger les effets de l'instrumentation sur les asymétries de pic et les efficacités correspondantes (cf. Annexe 4).

Chapitre V

terphényle (20 ppm), du triphénylène (3 ppm), de la benzylamine (600 ppm), de la strychnine (100 ppm) et de la *d*-tubocurarine (100 ppm). Après chaque changement de phase mobile, on requiert au minimum une heure pour l'équilibre. Le volume des 3 injections des mélanges est fixé à 10 µL. En outre, les composés sont injectés séparément de manière à les identifier sans équivoque et s'assurer qu'aucune interaction ne vienne perturber la rétention. Les composés sont en majorité détectés à 230 nm, sauf ceux marqués d'une étoile dans le Tableau V-2, qui sont détectés à 254 nm. L'injection de thiourée à 59% en masse d'acétonitrile permet d'estimer le volume de rétention nulle de la colonne.

V.B.4 Colonnes testées

Nous avons appliqué le test dans les conditions étendues à un groupe de colonnes, représentatives de celles utilisées dans l'industrie pharmaceutique mais différentes par nature. Les colonnes sélectionnées diffèrent par leur chaîne alkyle (greffon C8, C16 ou C18) et par leurs stratégies de protection vis-à-vis des groupements silanol résiduels. Par souci de simplicité, nous pouvons schématiquement séparer en deux catégories distinctes les stratégies de protection :

1. Le masquage des silanols ou l'atténuation de leur effet grâce à l'utilisation d'une matrice de silice ultra pure, greffée avec des chaînes particulières permettant une gêne d'ordre stérique ou électrostatique ;
2. La réduction physique du nombre de silanols, par l'utilisation d'une silice de technologie hybride ou d'une silice encapsulée, par l'augmentation la densité de greffage, ou par la réalisation d'un ou plusieurs « end-capping » successifs.

Ces différents types de protection, combinés entre eux, constituent la principale origine de l'extrême diversité des phases stationnaires dédiées aux composés basiques, désignées sous l'appellation générique « special base » ou « base deactivated ». Les caractéristiques disponibles des 12 colonnes testées, fournies par les fabricants sont référencées dans le Tableau V-3 (se référer à l'Annexe 7 pour une description plus en détails).

Sauf indication contraire, la matrice constituant le support chromatographique est à base de silice sphérique ultra pure. L'abréviation est obtenue par concaténation de la nature du greffon, de sa longueur et de l'ordre dans lequel a été testé la phase stationnaire. La nature du greffon est symbolisée par une lettre (correspondant à la première initiale du terme anglais) : E signifie Encapsulée (« Encapsulated »), P, groupement Polaire intercalé (« Polar embedded graft ») et C, chaîne purement alkyle (« pure hydroCarbonaceous moiety »). Toutes les colonnes sont de dimensions 150 mm × 4.6 mm I.D. exceptées la Symmetry C18 (250 mm × 4.6 mm I.D.).

Aucune colonne à end-capping polaire ne figure dans ce jeu de phases stationnaires. De commercialisation récente, nous ignorons leur stabilité à l'usage. Or ce facteur est fondamental pour le développement de méthode, mais aussi dans le contexte de la construction de ce test : eu égard à la durée de la procédure dans les conditions étendues, le risque de dégradation des phases n'est pas négligeable et doit être minimisé, d'où l'absence de ce type de phases à ce stade du développement du test.

Tableau V-3 : Caractéristiques des colonnes testées.

<i>Colonne</i>	\bar{D}	d_p	% C	S_p	<i>Fabricant</i>	<i>Commentaires</i>	<i>Abréviation</i>
CapcellPak C8 UG 120	12	5	10	300	Shiseido	Silice encapsulée C8	E8_1
XTerra RP 8	10	3,5	13,4	174	Waters	Silice hybride greffée octylcarbamate	P8_1
Discovery RP Amide C16	18	5	12,0	198	Supelco	Greffon hexadécylamide	P16_1
Eclipse XDB C8	10	5	7,6	180	Zorbax	Greffage C8 monomérique haute densité	C8_1
Symmetry C8	10	5	12,2	344	Waters		C8_2
Kromasil C8	10	5	12	340	Akzo Nobel		C8_3
XTerra RP 18	10	3,5	14,4	172	Waters	Silice hybride greffée octadécylcarbamate	P18_1
SymmetryShield RP 18	10	3,5	17,0	339	Waters	Greffon octadécylcarbamate	P18_2
J'Sphere ODS H80	8	4	22	*	YMC	Greffage C18 polymérique haute densité	C18_1
Stable Bond C18	8	3,5	10	300	Zorbax	Greffon diisopropyloctadecyle	C18_2
Nucleosil C18 HD	10	5	20	350	Macherey Nagel	Greffage C18 monomérique haute densité	C18_3
Symmetry C18	10	5	19,5	341	Waters		C18_4

* : valeur non fournie

V.C Traitements des données

Pour obtenir nos classifications, nous avons utilisé une procédure générique en 3 étapes, illustrée schématiquement par la Figure V-2. Il s'agit d'abord d'effectuer un prétraitement des données avant de réaliser une analyse en composantes principales, couplée ensuite à une analyse hiérarchique en clusters, pour aboutir aux classifications finales.



Figure V-2 : Procédure de traitement des données

Nous allons discuter chacune de ces étapes dans les sous-sections suivantes.

V.C.1 Prétraitement/Organisation des données

Nous avons testées 12 colonnes au moyen de 30 solutés et en faisant varier les 3 facteurs que sont la nature du modificateur organique (méthanol ou acétonitrile), sa teneur (4 niveaux chacun) et le pH (3, 5 et 7).

L'ACP étant uniquement capable de gérer des données de type numérique, il est absolument nécessaire de réorganiser les nôtres afin de les rendre compatibles. En pratique, nous avons fait appel à une technique d'« unfolding » [320] de façon à obtenir un jeu de 5040 données, constitué de 210 descripteurs et de 24 couples colonne/solvant.

Concernant la nature du solvant, nos résultats précédents ont montré qu'il est préférable de considérer le couple colonne/solvant à la colonne en elle-même : en associant la nature du solvant à la phase stationnaire, le nombre d'individus passe de 12 à 12 colonnes×2 solvants=24. En pratique, et pour une meilleure lisibilité sur les classifications, les couples sont identifiés de la manière suivante : l'identité de la colonne suivant l'abréviation fournie sur le Tableau V-3 précédée d'un symbole définissant le solvant de test (un triangle pour l'acétonitrile, un cercle pour

Chapitre V

le méthanol). Quant au niveau de pH, la solution envisagée consiste à l'inclure dans la définition des variables de l'ACP, construites dès lors de la manière suivante : $Variable = Paramètre\ Chromatographique \parallel Soluté \parallel pH$. Par exemple, le facteur de rétention de l'ampicilline à pH=5 se traduit par : $k_{ampicilline_5}$. Ainsi, nous bénéficions de 270 variables exploitables en ACP (3 paramètres×30 solutés×3 pH).

Comme les solutés sont injectés parmi 4 niveaux de solvant de manière à obtenir des facteurs de rétention raisonnables, il n'est pas nécessaire de faire apparaître le facteur teneur en solvant dans l'identification des variables, puisque cette information est déjà incluse lors de la donnée du pH et du soluté. Concernant les composés neutres injectés à différents niveaux de pH, un seul niveau est conservé pour l'analyse de données, de façon à éviter des redondances volontaires. Après l'élimination des variables en excès, la base de données finale se compose de 210 variables × 24 individus.

V.C.2 Outils chimiométriques utilisés

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) [264, 265, 291] s'avère un outil puissant pour l'interprétation des grands jeux de données. Cette méthode de projection est capable en effet de recueillir l'information principale du jeu de données total sur un espace dimensionnellement réduit par rapport à celui d'origine. Dans le cas présent, les individus sont constitués de couples colonne/solvant. Les données sont centrées réduites de manière à attribuer à chaque variable la même importance et la fiabilité des classifications obtenues est assurée par une validation croisée.

Nous avons ensuite exécuté une Analyse Hiérarchique en Clusters sur les classifications de manière à regrouper objectivement les individus par similarité. La définition de la distance choisie est de type euclidienne.

V.D Résultats et discussion

V.D.1 Test dans les conditions étendues

Nous avons réalisé en première intention une ACP sur le jeu complet des données enregistrées, comprenant facteurs de rétention (k), asymétries de pic (A_s) et efficacité (b). Néanmoins, l'impossibilité manifeste d'interpréter les classifications nous a conduit à traiter chaque type de paramètre chromatographique de façon séparée. Nous avons donc travaillé dans trois sous-espaces différents : le sous-espace des facteurs de rétention, celui des asymétries de pic et celui des efficacités. Néanmoins, en cas de mécanisme de rétention mixte, il existe une corrélation entre les différents paramètres : l'indépendance des espaces n'est alors plus assurée. En dépit de la probable non orthogonalité des sous-espaces entre eux, nous avons privilégié cette organisation qui préserve le sens chromatographique.

V.D.1.a Facteurs de rétention

Comme l'illustre la Figure V-3, la première composante principale (CP1) reprend 67% de l'information totale disponible, et la seconde (CP2), 13%. Ces deux premières composantes résument à elles seules 80% de l'information totale. Cet exemple démontre la puissance de l'analyse multivariée pour la réduction dimensionnelle : 2 dimensions suffisent au lieu de 70...

Le « score plot » dans le plan CP1-CP2 possède une forme caractéristique en V, rendant l'utilisation de l'analyse en clusters particulièrement attractive pour l'interprétation [290].

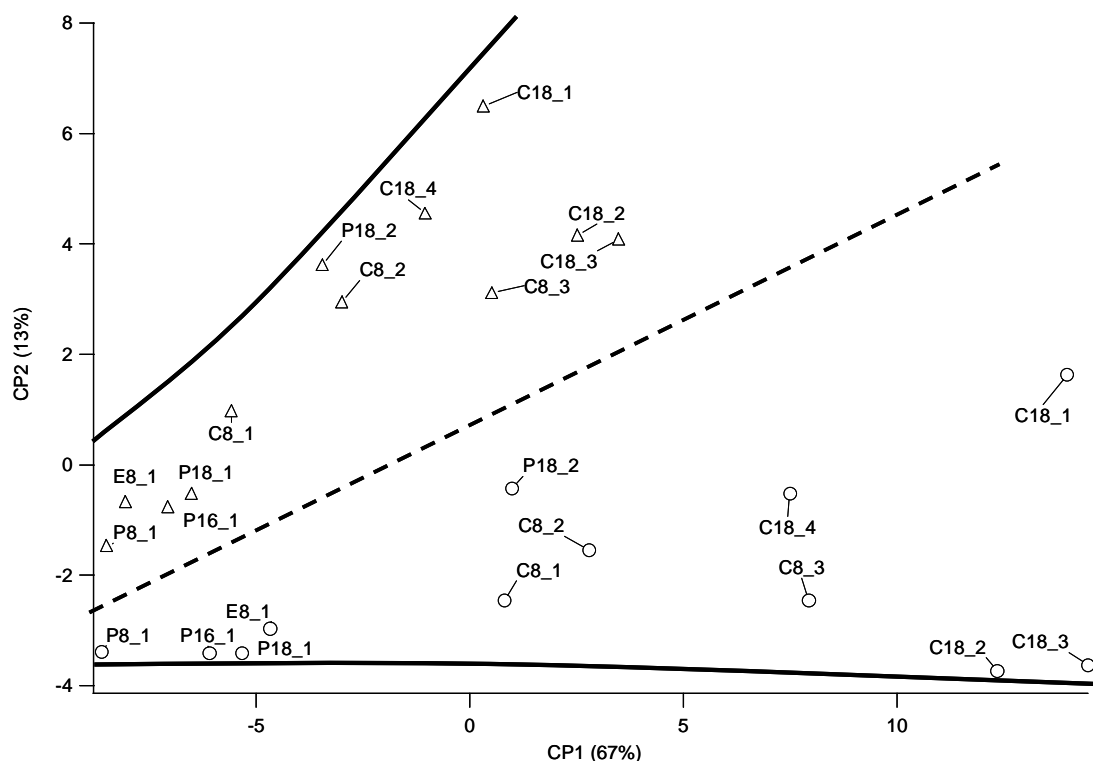


Figure V-3 : « Score plot » CP1-CP2 sur les couples colonne/solvant issus de tous les facteurs de rétention ; la forme en V et la bissectrice correspondante sont schématisées respectivement en traits pleins et pointillés.

Une fois tracée la bissectrice, les phases se répartissent en deux catégories selon le solvant de test. La Figure V-4 montre le dendrogramme obtenu pour l'Analyse Hiérarchique en Clusters réalisée à partir du « score plot » CP1-CP2.

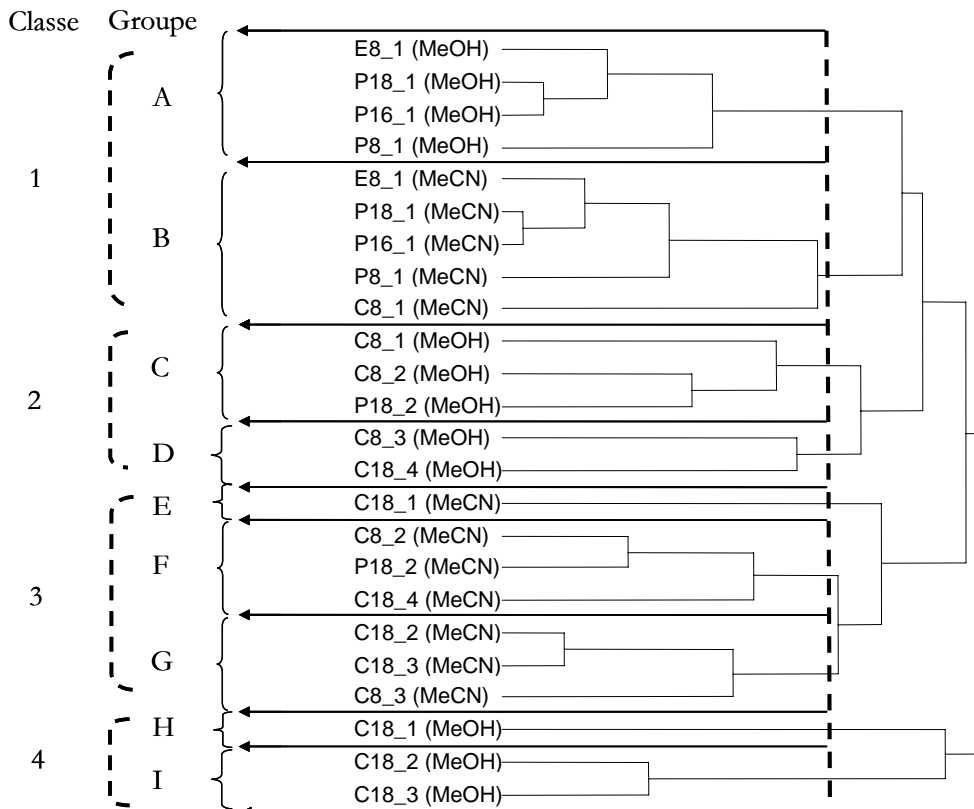


Figure V-4 : Dendrogramme des similitudes entre les couples colonne/solvant obtenus par AHC à partir du « score plot » CP1-CP2 calculés d'après les facteurs de rétention.

Chapitre V

Le nombre de groupes est déterminé par le nombre de branches sectionnées par la ligne verticale en pointillés. De ce découpage résultent 9 groupes, qui nous mènent à l'interprétation suivante. Cela nous permet tout d'abord de confirmer le regroupement des couples colonne/solvant considérés selon la nature du modificateur organique, soulignant la nécessité de considérer le couple colonne/solvant plutôt que la colonne en soi. Ce comportement, qui n'était que suggéré en Figure V-4, apparaît désormais clairement sur la Figure V-5. On retrouve toutes les colonnes évaluées dans l'acétonitrile (groupes B, E, F et G) dans la partie supérieure du graphique.

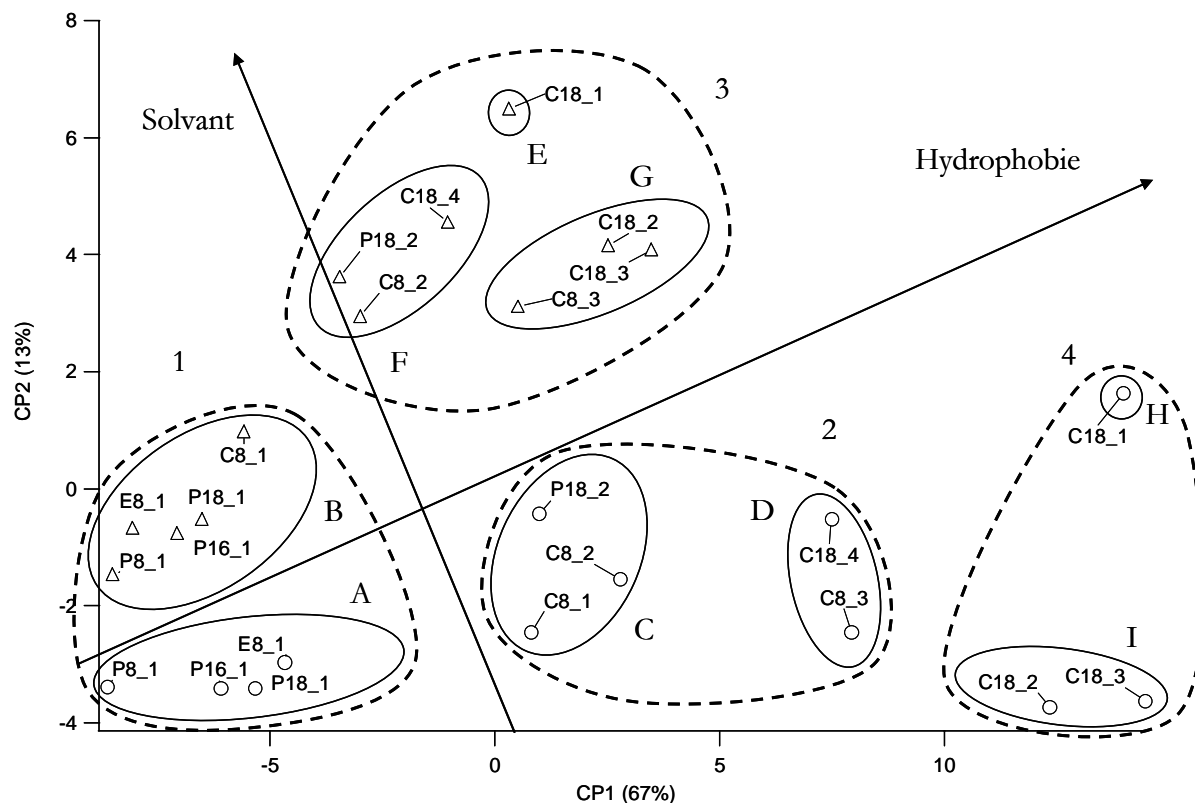


Figure V-5 : Interprétation du « score plot » CP1-CP2 des couples colonne/solvant obtenus avec tous les facteurs de rétention.

On peut remarquer que les couples colonne/solvant sont aussi ordonnés suivant leur hydrophobie : toutes les phases remarquées pour leur faible rétention sont regroupées dans la classe 1, de même pour celles possédant des rétention intermédiaires (classes 2 et 3) ou élevées (classe 4). Ceci signifie que sur ce « score plot », les individus s'organisent suivant deux directions privilégiées : l'hydrophobie de la phase et le modificateur organique. De surcroît, la discrimination des phases stationnaires selon le solvant apparaît d'autant moins marquée que leur hydrophobie est faible, comportement que nous avons déjà remarqué d'un point de vue chromatographique. La classe 1, résultant de la fusion des groupes A et B, constitue aussi le point de départ de la forme en V de la classification. Cette forme particulière provient certainement d'un effet non linéaire du processus de solvation des chaînes alkyles, phénomène dépendant de la nature du solvant.

Le loading plot correspondant à la Figure V-5 révèle une distribution en forme de croissant pour les variables (Figure V-6).

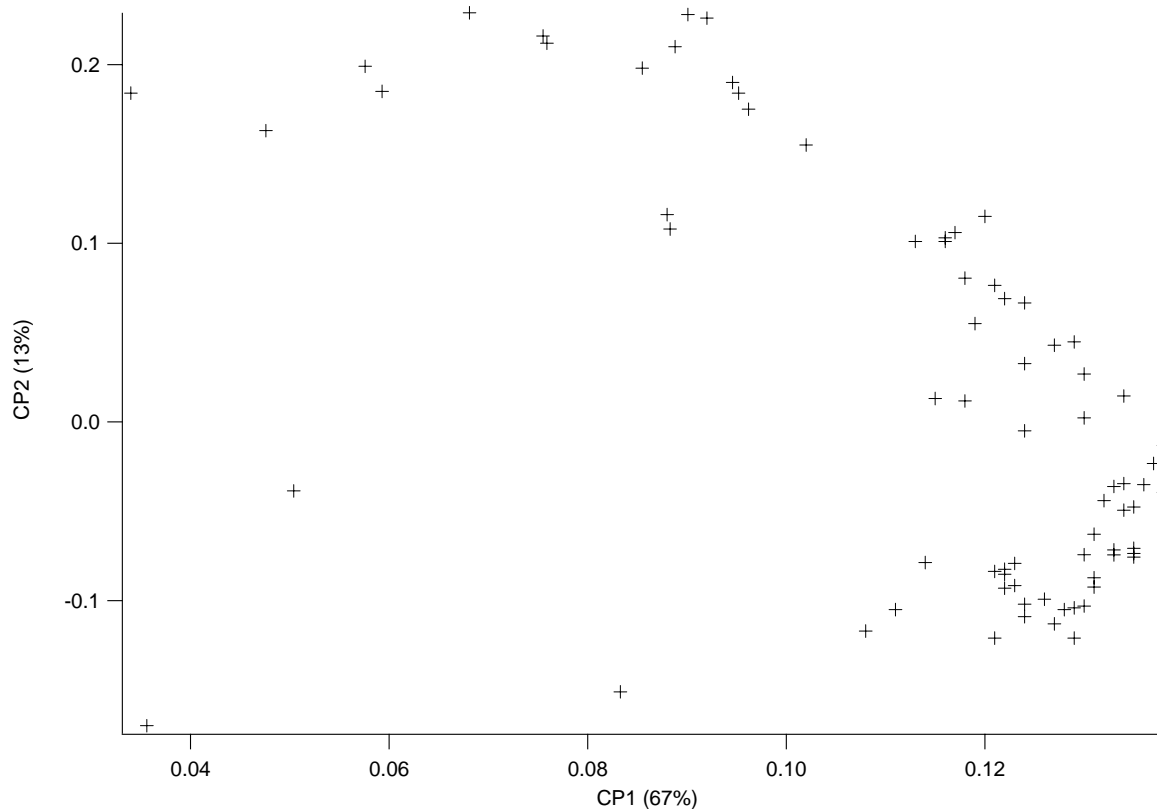


Figure V-6 : « Loading plot » CP1-CP2 ; le nom des variables d'origine n'est pas figuré pour des raisons de lisibilité.

Aucune des variables ne se situe au voisinage de l'origine des axes, et donc par conséquent aucune n'est facilement éliminable selon ce critère usuel. En outre, la plupart sont proches les unes des autres, traduisant un haut degré de corrélation. Une réduction apparaît donc possible, mais elle s'avère surtout nécessaire pour extraire l'information non redondante.

Dans notre cas, le « loading plot » n'est pas d'une grande aide à l'interprétation, étant donnée la forme nébuleuse que prend la répartition des variables, confirmant l'intérêt d'une combinaison ACP-AHC. Ce dernier point souligne la difficulté de la réduction dimensionnelle de l'ACP. En effet, à ce stade, nous disposons de représentations bidimensionnelles simples pour les colonnes mais sommes toujours dans l'incapacité de pouvoir sélectionner les variables les plus pertinentes, et donc de réduire la procédure de test.

V.D.1.b Asymétries de pic

La Figure V-7 résume l'ACP interprétée, c'est-à-dire le résultat figuré de l'AHC réalisée sur l'ACP, obtenue avec les asymétries de pic.

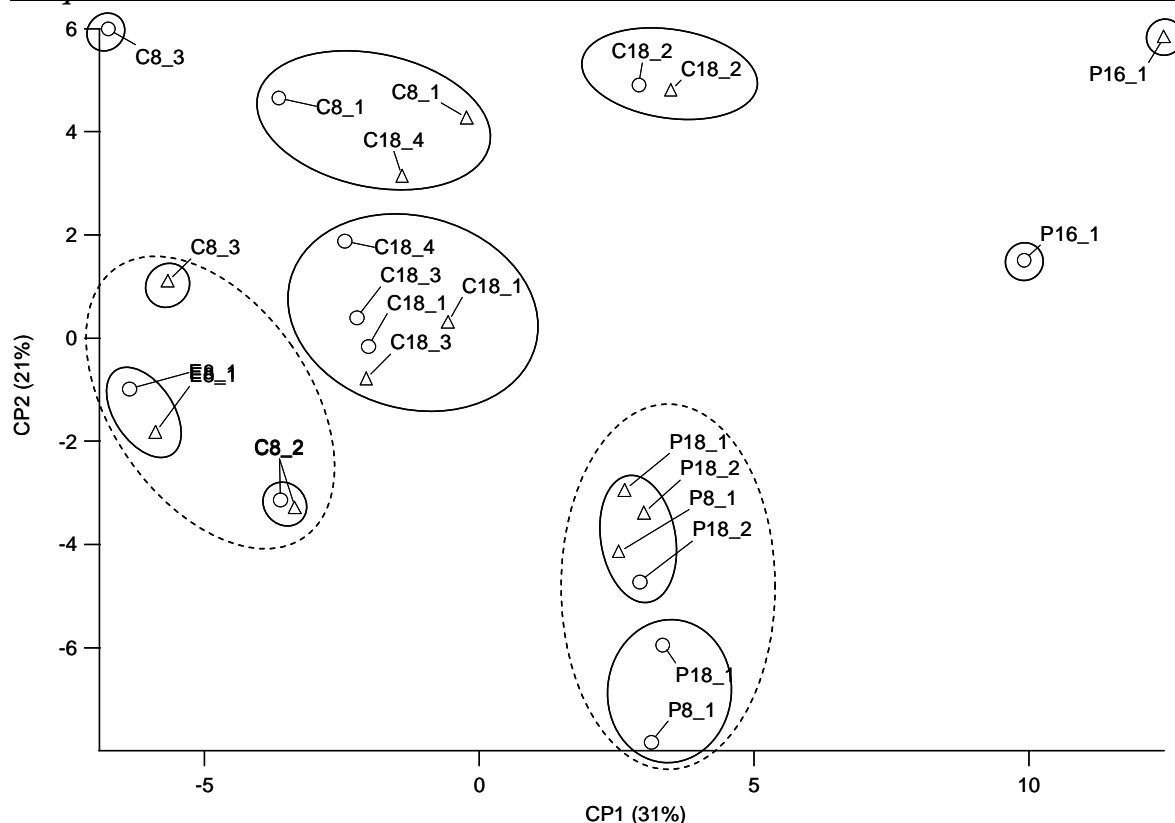


Figure V-7 : « Score plot » PC1-PC2 interprété des couples colonne/solvant construit sur toutes les asymétries de pic ; l'AHCl a été réalisée dans l'espace défini par les deux premières composantes principales calculées sur les asymétries de pic.

De l'analyse en clusters réalisée sur 52% de l'information totale (portée par les deux premières composantes principales) ressortent 11 groupes. Si l'on sectionne le dendrogramme vers des similitudes légèrement moins importantes, c'est-à-dire en se rapprochant du tronc central, ce ne sont plus que 8 groupes que nous isolons, figurés en pointillés, au lieu de 11. L'effet du modificateur organique est beaucoup moins présent que pour les classifications issues des facteurs de rétention. Toutes les colonnes possédant un greffon alkylcarbamate apparaissent dans le même groupe, se démarquant visiblement des autres, relatifs à un greffon alkylamide (2 « clusters » isolés) ou des greffons purement alkyle. Le greffon diisopropyloctadécyle (C18_2) se détache des autres purement alkyle, ces colonnes possédant soit une haute densité de greffage – monomérique ou polymérique – soit une encapsulation, stratégies réputées fournir une meilleure protection vis-à-vis des silanols résiduels. Au final, il semble que les couples colonne/solvant s'agencent par type et niveau de protection.

Concernant l'efficacité, nous avons appliqué les mêmes procédures. Les classifications obtenues pécant par manque d'interprétabilité, les résultats ne seront pas présentés ici. Cette observation confirme par ailleurs les problèmes régulièrement rencontrés au niveau des efficacités [221].

V.D.2 Réduction du test

La durée rédhibitoire du test, puisque dépassant une semaine d'expériences par colonne, ne permet pas de l'appliquer à un plus grand nombre de phases stationnaires, et encore moins de le transférer en l'état. Simplement, cette étape constitue un passage obligé dans l'optique d'une sélection optimale des conditions par une méthodologie objective que nous allons décrire.

V.D.2.a Principe et méthodologie

L'ACP permet de réduire considérablement la quantité de variables initiales à quelques composantes principales. Reprenons le cas des ACP sur les facteurs de rétention : d'un espace initial à 70 variables, donc à 70 dimensions, nous obtenons une représentation qui regroupe 80% de l'information totale disponible à l'aide de 2 composantes principales seulement, soit 2

dimensions. Néanmoins, les composantes principales étant de simples combinaisons linéaires des variables originelles, le fait de ne conserver que les deux premières composantes n'entraîne aucune réduction du nombre de variables initiales, puisque toutes sont nécessaires à la construction de ces composantes. En résumé, si la représentation graphique est simplifiée, il n'en est rien pour le protocole expérimental. L'objectif de la méthodologie proposée consiste à opérer une réduction du jeu de variables initiales tout en minimisant son impact sur les classifications finales. Pour ce faire, différentes approches peuvent être envisagées.

Par définition, les variables proches de l'origine, portent peu d'information ; si elles existent, ce seront les premières à éliminer. Cette approche pouvant se révéler insuffisante, nous pouvons écarter les variables voisines, i.e. fortement corrélées, via un processus itératif [276, 278] jusqu'à ce que l'ACP ne fournisse plus de classifications stables. Néanmoins, si les variables sont réparties en nuage diffus, ce qui est notre cas, il peut s'avérer difficile de choisir de façon objective les meilleures pour le jeu final. D'autre part, cela pourrait nous conduire à éliminer des variables très corrélées par construction expérimentale, comme les facteurs de rétention des alkylbenzènes, sur lesquels repose la définition du rapport isoéluant : ils sont donc utiles, ne serait-ce que d'un point de vue chromatographique pour l'expérimentateur. Les éliminer en partie est difficilement envisageable, que ce soit expérimentalement ou pour le traitement de données : rappelons que leur rapport définit la sélectivité méthylène. Mieux vaut donc éviter de se priver de variables dont la transformée peut aussi s'avérer utile par la suite.

La troisième possibilité, celle que nous avons adoptée, consiste à mettre en œuvre une méthodologie de réduction rationnelle pour sélectionner les variables les plus informatives tout en préservant les classifications. La minimisation de la durée du test repose sur l'élimination de conditions chromatographiques entières, telles que certains niveaux de pH, de teneur en modificateur organique et de solutés. En effet, il paraît peu concevable pour l'opérateur de mettre en pratique un test « réduit » comprenant 24 phases mobiles différentes, signifiant la perte d'au moins une journée consacrée aux diverses mises en équilibre³⁴. Afin d'éviter une telle situation, malheureusement pas improbable d'un point de vue rigoureusement mathématique, le principe de notre réduction se fonde sur la recherche du nombre minimal de niveaux nécessaire pour préserver les classifications initiales, c'est-à-dire retrouver des groupes similaires à ceux révélés par le test dans les conditions étendues. En outre, nous avons appliqué une contrainte supplémentaire : les classifications nouvellement obtenues doivent rester interprétables, sinon le test n'a plus aucune raison d'être.

En pratique, le principe consiste à incrémenter d'une unité le nombre de niveaux, en commençant avec un niveau unique comme palier par défaut. Nous avons suivi cette méthodologie en appliquant d'abord une réduction en niveaux de pH, puis en niveaux de teneur en modificateur organique. Pour être sélectionnés, les niveaux doivent respecter les critères de qualité de reconnaissance suivants :

- La nouvelle classification doit permettre de reconnaître les groupes identifiés sur la classification dans les conditions étendues, toutes les deux obtenues avec des degrés de similitude équivalents menant à un nombre de clusters similaire ;
- La nouvelle classification ne doit comporter aucun mésappariement : des colonnes de natures variées possédant des comportements chromatographiques différents doivent se retrouver séparées dans la classification, faute de quoi ce phénomène, associé à une perte du pouvoir discriminant, conduira à l'élimination du niveau.

De cette façon, les classifications obtenues dans les conditions étendues seront préservées, voire améliorées, du fait de l'élimination du bruit introduit par certaines variables.

³⁴A titre d'illustration, l'évaluation des phases dans les conditions du test étendu requiert 24 phases mobiles, ce qui nous conduit déjà à 24 h consacrées à la mise en équilibre. Ajoutons que le dépouillement de données – saisie de 15000 données brutes – s'avère aussi rédhibitoire que la partie chromatographique...

V.D.2.b Réduction du nombre de niveaux de pH

La première étape de la réduction s'opère sur les niveaux de pH. Le processus itératif débute avec un seul niveau (3, 5 ou 7). L'examen des classifications interprétées doit nous permettre de conclure quant à l'éventuelle suffisance d'un seul niveau pour les facteurs de rétention. Si tel est le cas, cela doit être confirmé sur les asymétries de pic. Sinon, nous devons recommencer la procédure avec deux niveaux combinés. Si cela s'avère encore insuffisant, il ne nous sera pas possible de réduire le test en niveaux de pH.

V.D.2.b.i Facteurs de rétention

La Figure V-8 représente l'ACP interprétée obtenue à chaque niveau de pH et incluant les groupes trouvés via l'AHC.

L'analyse en clusters montre clairement des classifications préservées aux pH=5 et pH=7, au contraire du pH=3. Concernant ce dernier niveau, la séparation en 2 demi-plans provoquée par le modificateur organique devient confuse, spécialement pour les colonnes de faible pouvoir rétentif. D'autre part, les classifications obtenues au travers des niveaux 5 et 7 paraissent s'être affinées par rapport à la classification globale, nous amenant à une meilleure distinction selon l'hydrophobie des phases stationnaires : effectivement, la colonne Symmetry C18 n'apparaît plus dans le groupe des phases moyennement rétentes. L'analyse en clusters semble plus performante aux pH 5 et 7, menant à des classifications interprétées épurées : le pH=3 introduit manifestement une dispersion supplémentaire qui nuit au pouvoir de discrimination du test, confirmant en outre la nécessité de réduire le jeu de variables initiales, dont certaines s'avèrent plus ou moins bruitées.

D'un point de vue physico-chimique, sélectionner les niveaux 5 et 7 de pH n'a rien de très surprenant : à ces valeurs, les groupements silanol résiduels sont partiellement dissociés et peuvent être particulièrement bien révélés par des sondes basiques, elles aussi partiellement ionisées. Autrement dit, ces niveaux, plus équilibrés en termes de population de silanols, sont plus informatifs eu égard à la richesse des mécanismes de rétention qui peuvent intervenir. A pH 3, le mécanisme d'échange de cations est beaucoup moins probable car les silanols restent sous forme neutre même si les composés basiques sont tous ionisés.

De plus, les classifications et les regroupements obtenus pour les facteurs de rétention des niveaux de pH 5 et 7 ne s'avèrent pas très éloignés. D'après l'Annexe 2 portant sur les mélanges hydro-organiques, si le pH de l'éluant est peu modifié par l'ajout de faibles quantités de modificateur organique, il l'est beaucoup lorsque l'on en augmente la teneur (ceci étant fonction de la nature du tampon et du modificateur). Or le tampon change de nature entre les deux niveaux : la dissociation d'un acide $AH \rightleftharpoons A^- + H^+$ à pH 5 crée deux charges à solvater tandis qu'à pH 7, la protonation de la base $\bar{B} + H^+ \rightleftharpoons BH^+$ laisse le nombre de charges constant. A haute teneur en solvant, les pHs vont donc se rapprocher : le tampon acétate voit sa valeur augmenter et le tampon TRIS, sa valeur diminuer, d'autant plus que la teneur en solvant augmente et que le modificateur est peu protique. Ce phénomène peut expliquer des classifications relativement proches entre 5 et 7, au contraire du pH 3, alors qu'il s'agit du même intervalle de pH. Même si le tampon phosphate (pH 3) possède un comportement similaire à celui de l'acétate (le tampon repose à chaque fois sur une dissociation d'acide), il ne procure pas la même richesse en terme de mécanisme de rétention : la dissociation des silanols suit la même tendance que celle des tampons acides, rendant peu favorable l'échange de cations. La Figure V-9, basée sur les facteurs de rétention de la clofazimine et de l'amiodarone, illustre parfaitement ce propos.

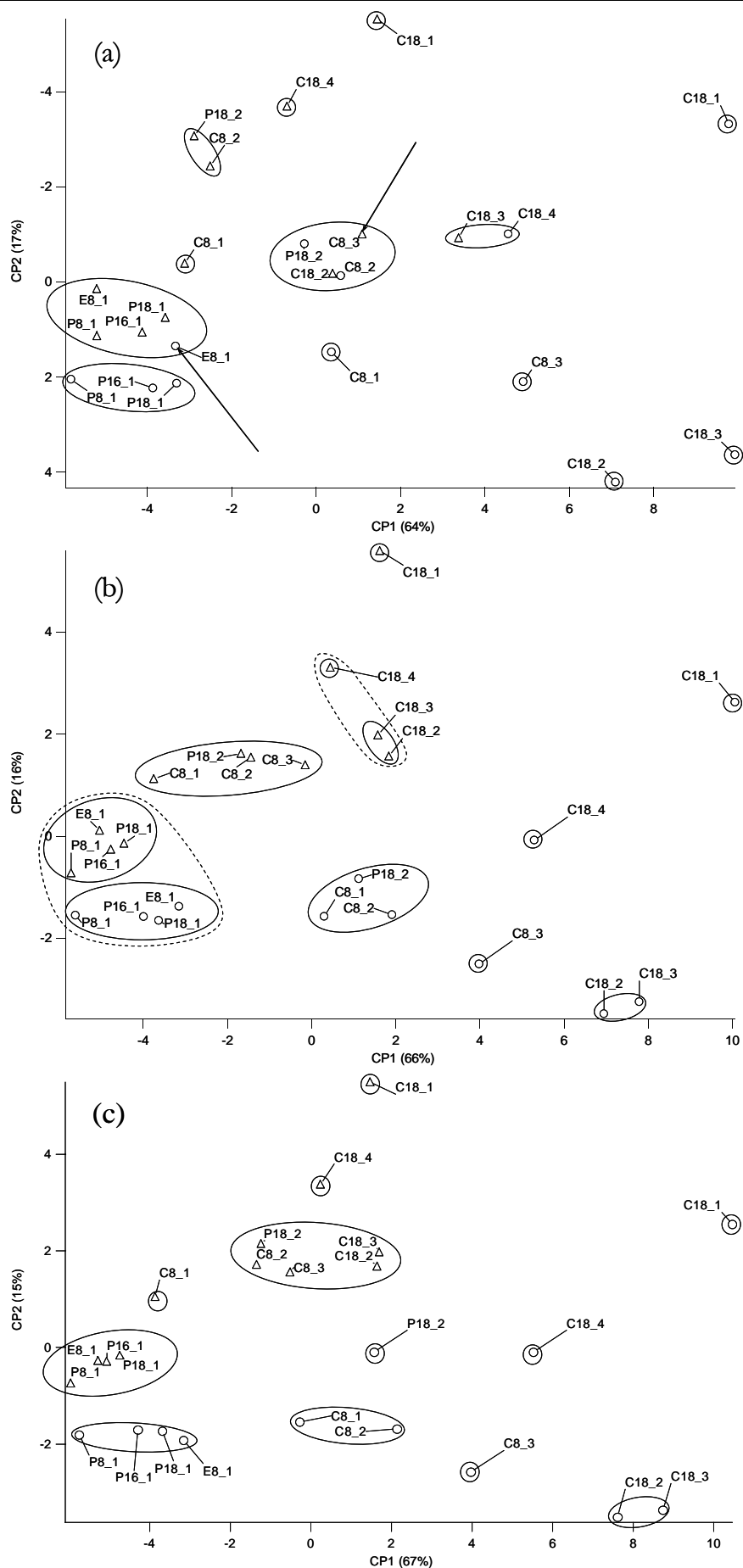


Figure V-8 : « Score plots » CP1-CP2 interprétés des couples colonne/solvant construits à partir des facteurs de rétention pour chaque niveau de pH ; (a) pH=3, les flèches indiquent les mauvais appariements entre les couples colonne/solvant et les groupes auxquels ils appartiennent ; (b) pH=5 ; (c) pH=7.

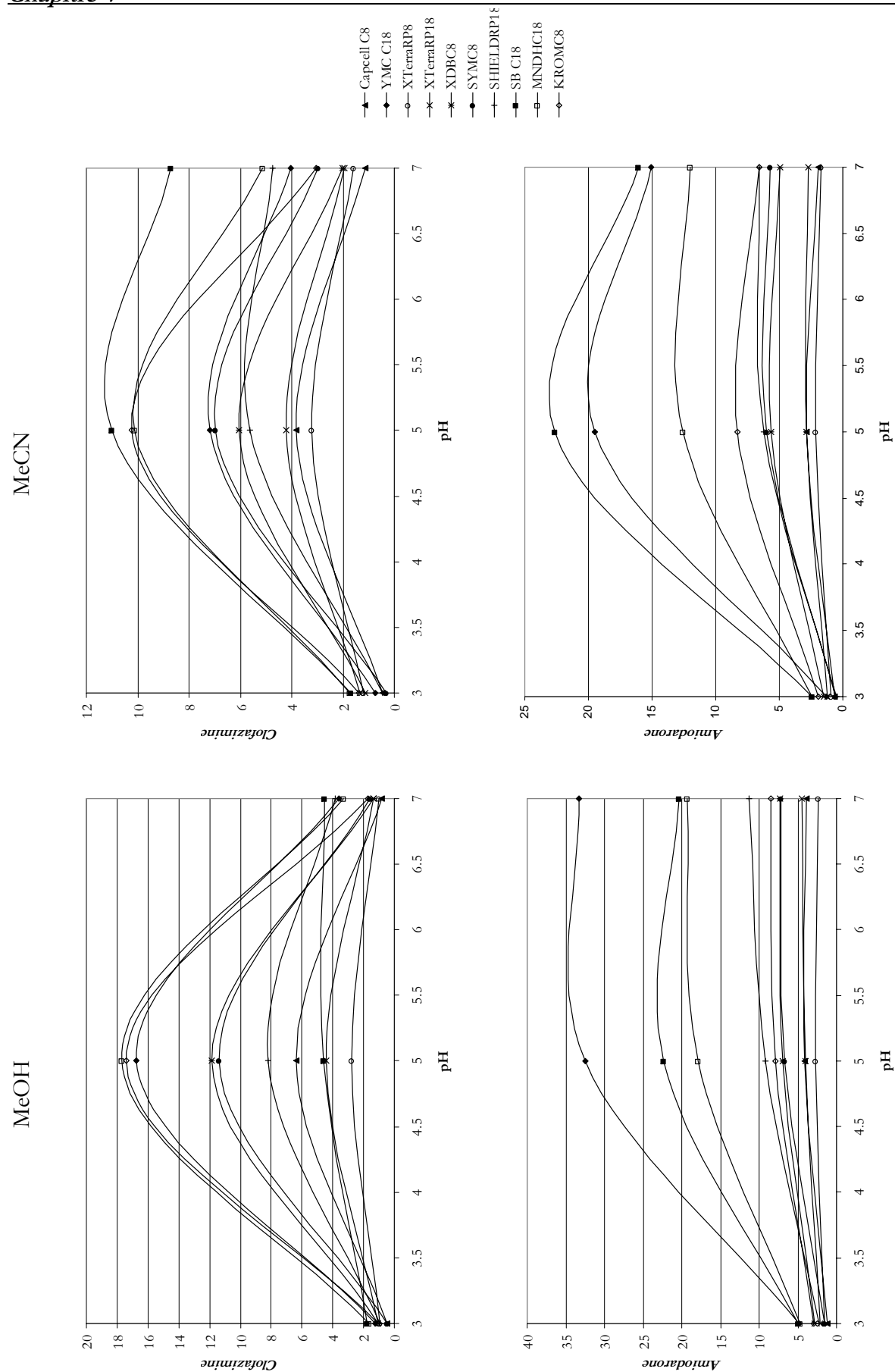


Figure V-9 : Variations du facteur de rétention des composés basiques à haute teneur en solvant en fonction du pH de la phase aqueuse.

Construction du test : d'un test étendu à un test réduit

De par l'étendue des facteurs de rétention occasionnés aux pH 5 et pH 7 pour la clofazimine et l'amiodarone, ces niveaux de pH s'avèrent les plus intéressants, le niveau pH 3 apparaissant clairement nivelant en terme d'information. Les inversions de rétention entre pH 5 et pH 7 sur les composés basiques sont probablement attribuables aux différentes distributions de pK_a des groupements silanol, dépendantes des phases stationnaires [318].

A ce stade, seuls les pH 5 et 7 sont conservés. Reste maintenant à examiner les classifications obtenues sur les asymétries de pics pour sélectionner un niveau et valider ce choix.

V.D.2.b.ii Asymétries de pic

Comme nous avons rejeté le pH=3 pour la sélection d'un niveau unique, nous ne le mentionnerons pas sur les résultats présentés dans la Figure V-10, relatifs aux seuls pH 5 et 7.

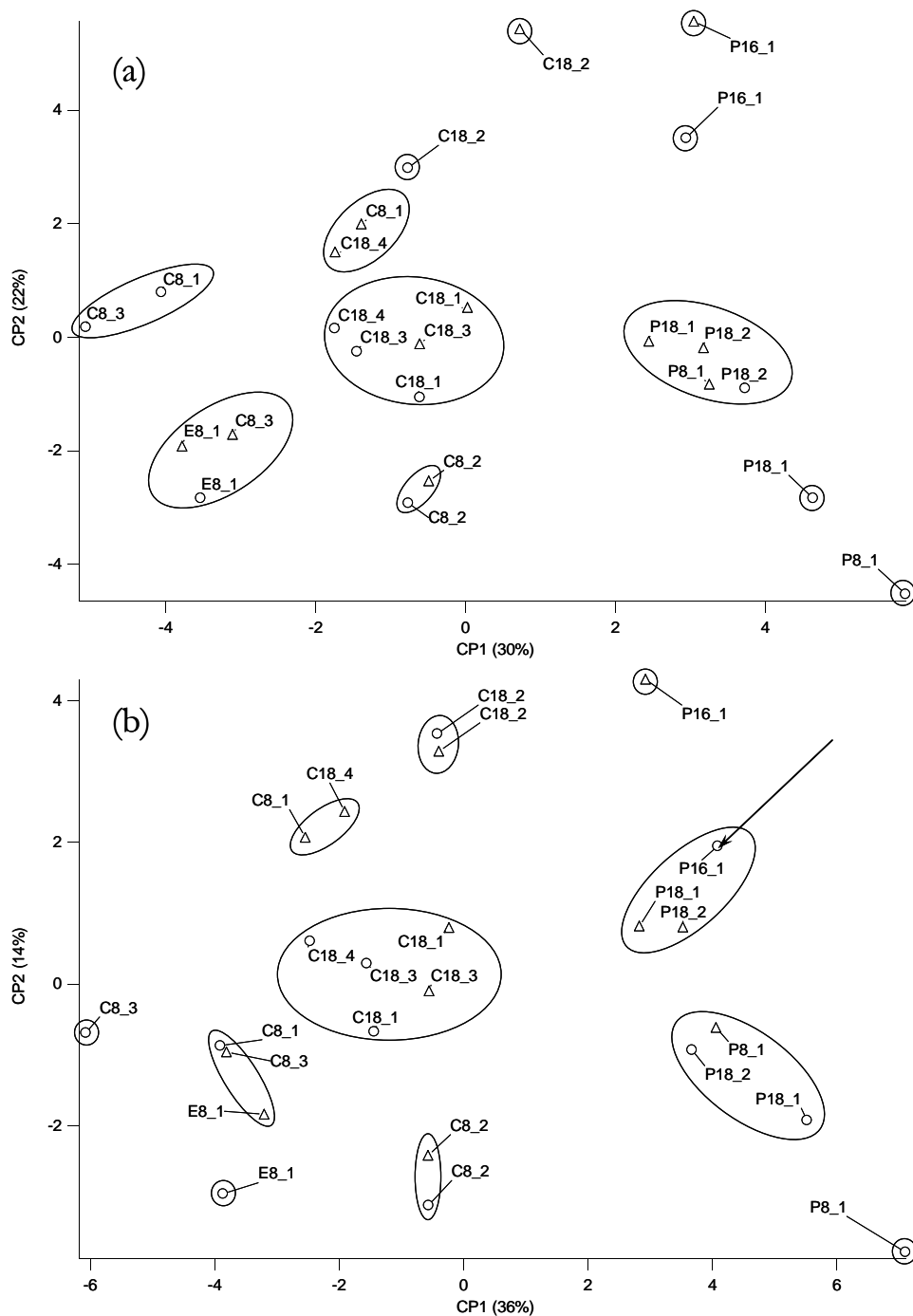


Figure V-10 : « Score plots » CP1-CP2 interprétés des couples colonne/solvant construits à partir des asymétries de pic pour chaque niveau de pH ; (a) pH=5 ; (b) pH=7 ; chaque flèche indique une mauvaise association entre colonnes greffées alkylamide et les colonnes greffées alkylcarbamate.

Le « score plot » CP1-CP2 des asymétries retranscrit environ 50% de l'information initiale, contre 80% pour celui des facteurs de rétention.

La séparation due au solvant est plus prononcée sur les représentations à pH 5 et 7 que sur celle obtenue dans les conditions étendues. Ceci peut être attribué à l'effet de la nature du modificateur organique sur le pH et les pK_A , plus marqué aux pHs considérés : du fait de l'apparition de mécanismes de rétention mixtes, les composés basiques ont tendance à voir augmenter leurs asymétries de pic. Cependant, le nombre de groupes – 11 à 12 – requis pour réaliser une classification pertinente reste équivalent. Se produit en outre une diminution du pouvoir discriminant à pH 7 entre les phases possédant un groupement polaire intercalé dans le greffon alkyle : on perd la distinction en fonction de la nature de ce groupement. En conséquence, ceci nous permet d'éliminer le niveau pH 7.

Pour les efficacités, la représentation à pH 5 est similaire à celle obtenue dans les conditions étendues. Au final, le pH 5 se révèle être le seul niveau qui préserve les mêmes groupes que ceux observés dans les conditions étendues, que ce soit pour les facteurs de rétention, mais aussi les asymétries de pic et les efficacités (résultats non figurés). Cela nous permet de réduire la procédure d'un facteur 3 sans perte significative d'information.

V.D.2.c Réduction du nombre de niveaux de fraction en solvant

Comme nous l'avons vu précédemment, la contrainte d'optimalité consiste à rechercher le nombre minimal de conditions sans perturber de façon significative les classifications. Le choix d'une seule teneur en solvant s'étant avéré infructueux, nous étudions donc la possibilité de la combinaison de 2 niveaux de fraction en modificateur organique.

V.D.2.c.i Facteurs de rétention

Plusieurs combinaisons de 2 niveaux de fraction de solvant ont été envisagées. Seule la combinaison A/D s'avère capable de préserver la classification originale sur les facteurs de rétention. La Figure V-11 représente le « score plot » obtenu dans ces conditions.

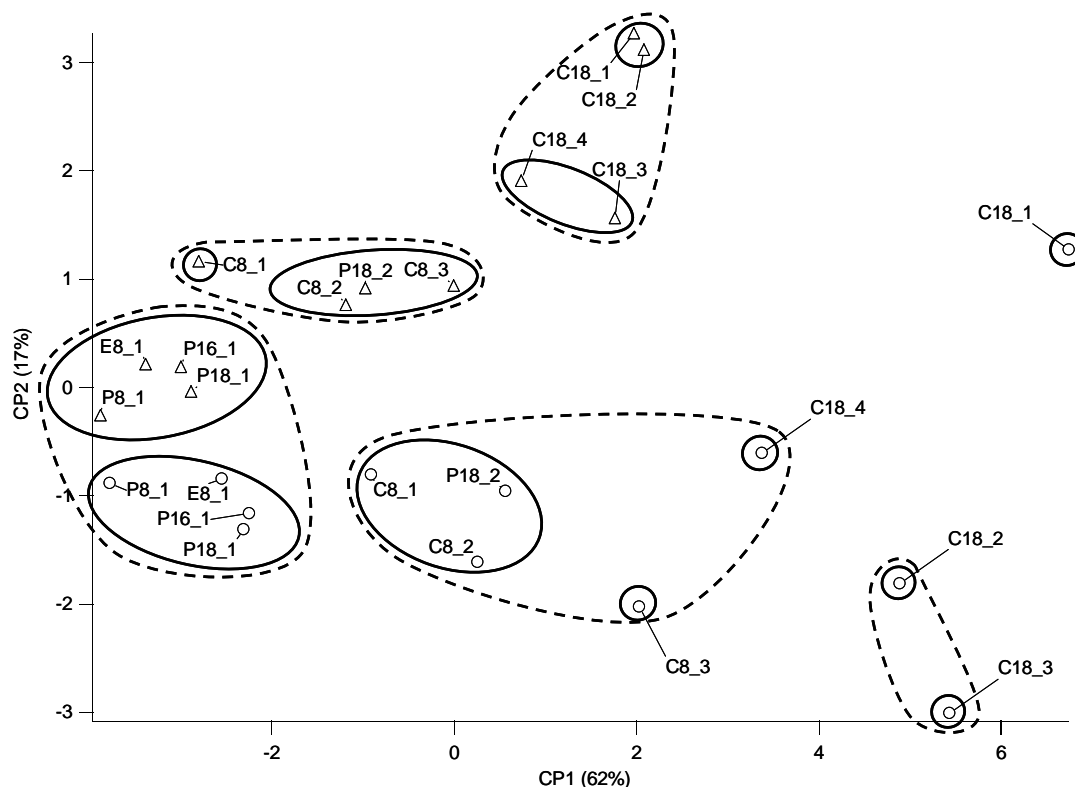


Figure V-11 : « Score plot » CP1-CP2 interprété des couples colonne/solvant construits à partir des facteurs de rétention au niveaux de teneur en solvant A et D.

Nous trouvons dans ce cas 12 clusters autorisant encore une classification en fonction de l'hydrophobie des phases stationnaires testées et de la nature du modificateur organique. Comme

nous l'avions déjà remarqué sur la Figure V-3, les phases les moins rétentives sont rassemblées dans un seul groupe si le dendrogramme est sectionné à un degré de similitude plus faible.

V.D.2.c.ii Asymétries de pic

La Figure V-12 résume la classification obtenue aux niveaux A et D de solvant.

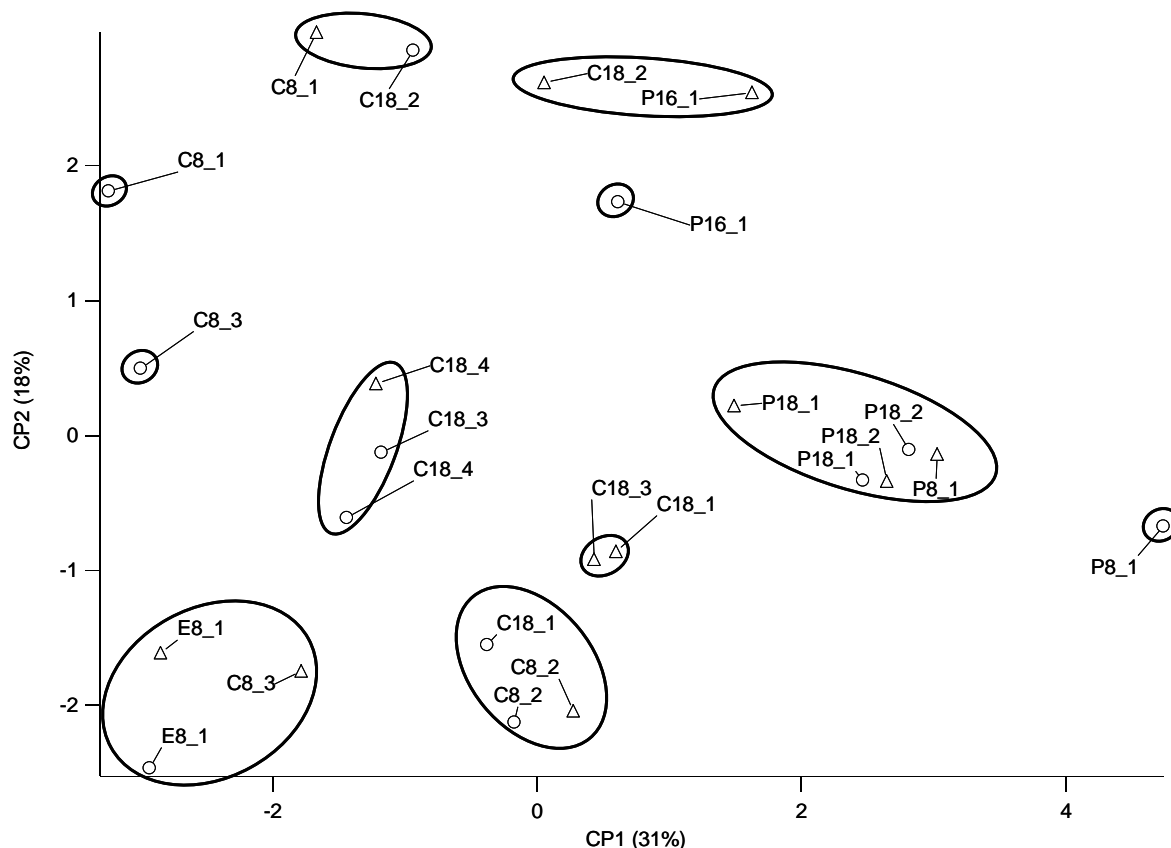


Figure V-12 : « Score plot » CP1-CP2 interprété des couples colonne/solvant construits à partir des asymétries de pic au niveaux de teneur en solvant A et D.

La classification initiale est préservée, même si elle s'obtient via 13 clusters au lieu de 11 (cf. Figure V-7)³⁵. Dans ces conditions, le test est toujours capable de distinguer les colonnes possédant un groupement polaire intercalé selon sa nature. La représentation est sujette à une rotation de $\pi/2$ dans le sens trigonométrique par rapport à l'originale. Une permutation des deux premières composantes principales s'est certainement produite lors de cette dernière étape de réduction. Ce phénomène n'est pas étonnant eu égard à la quantité d'information assez similaire portée par chaque composante et il n'est très pénalisant puisque l'on conserve notre classification.

De telles conditions se révèlent aussi suffisantes pour préserver la classification initiale sur les efficacités (résultat non figuré).

V.D.3 Test final

Les conditions du test réduit sont reportées dans le Tableau V-4.

Compte tenu de l'excellente répétabilité de l'injection ($CV < 0,5\%$ sur les facteurs de rétention, cf. page 66), deux injections au lieu de trois seront suffisantes.

³⁵ Cette différence n'apparaît pas significative, du fait qu'on travaille sur des variables bruitées.

Chapitre V

Tableau V-4 : Conditions chromatographiques sélectionnées

Conditions	Solvant	Teneur en solvant (%)	Soluté
Tampon acétate 30 mM pH=5.00 à 25 °C	MeOH	70	thiourée, digitoxine, clofazimine, amiodarone, butylbenzène*,
T=40°C	MeCN	59	pentylbenzène*, <i>o</i> - terphényle*, triphénylène*
Débit= 1 mL min ⁻¹	MeOH	15	strychnine*, benzylamine*, caféine*, <i>d</i> -tubocurarine, atropine, ampicilline,
λ = 254 nm pour les solutés marqués d'une (*) ; λ = 230 nm sinon	MeCN	9	vancomycine, cyanocobalamine

Nous sommes donc parvenus à un test réduit préservant une large gamme de solutés, réalisé à un pH intermédiaire, pH 5, avec 2 modificateurs organiques, au moyen seulement de 2 niveaux de teneur. La durée du test a été considérablement réduite, puisque divisée par un facteur 6. Dès lors, il est possible d'évaluer une nouvelle phase en une journée, et ceci dans deux modificateurs organiques différents.

Remarque : Nous pouvons tracer un parallèle entre les résultats de cette réduction et l'approche des plans d'expériences : le pH constitue notre point au centre tandis que les variations opérées se réalisent à travers les niveaux de teneur en modificateur organique et la diversité de nos solutés.

En outre, comme les structures des groupes avant et après réduction sont similaires, voire améliorées ce qui permet d'affiner les classifications, il apparaît que la procédure suivie a permis de réaliser une réduction du test sans perte significative d'information. Il est à noter que les composés sélectionnés maintiennent des diversités de structure et de propriété remarquables, confirmant la nécessité de posséder des composés différents les uns des autres pour une procédure de test pertinente.

V.E Conclusion

Cette étude a démontré qu'il était possible de construire un test grâce à une approche de sélection optimale des conditions. Le test réduit final se compose de conditions qui se sont révélées les plus pertinentes par rapport à celles du test étendu. Le couplage ACP-AHC s'est révélé extrêmement précieux à la fois pour la compréhension des classifications et la sélection objective des meilleures conditions. L'analyse en clusters s'est avérée aussi un atout pour améliorer la qualité de l'interprétation des « score plots ». L'effet du solvant, mis en évidence au chapitre précédent, est confirmé, notamment pour les facteurs de rétention. Au final, le test réduit est capable de distinguer des phases stationnaires *a priori* très différentes les uns des autres. Il nous faut maintenant nous intéresser à la capacité de notre procédure d'évaluation à différencier des colonnes dont les comportements chromatographiques sont plus proches. En outre, pour achever le développement de notre test et avant d'envisager un transfert dans des conditions correctes vers un autre laboratoire, ou même ajouter de nouvelles phases stationnaires, il faut s'assurer de la fiabilité de notre procédure.

Notre test est désormais mis au point. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les résultats et les classifications obtenues ne sont jamais que des estimations et non les valeurs vraies elles-mêmes, auxquelles nous ne pouvons avoir accès. Dans la littérature, peu de tests tiennent compte de cette nuance, pourtant fondamentale. Comme pour toute méthode chromatographique en phase de développement, nous avons choisi de valider notre procédure de test avant d'envisager son utilisation « en routine » dans le but d'étendre la base de données de colonnes testées, ou d'espérer la mettre en œuvre dans d'autres laboratoires. C'est dans cet esprit que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la fidélité de notre procédure et l'étude de sa robustesse. Très peu d'auteurs se sont penchés sur la répétabilité de leur test, ou encore sur la variabilité introduite dans leur caractérisation par le lot de fabrication des colonnes ou leur remplissage (correspondant aux fidélités intermédiaires intralot et interlot), et encore moins sur la reproductibilité du test.

Concernant les variabilités intralot et interlot des phases stationnaires, l'étude la plus consistante est certainement à mettre au crédit de Kele et Guiochon [103, 321-326]. Quelques autres ont aussi abordé ce point, mais plus dans l'optique de visualiser l'impact de l'interlot sur leurs classifications [132, 234, 238, 327] que de quantifier de manière systématique l'effet de ce facteur. Dans son étude [243], Neue a parfaitement démontré les progrès réalisés ces vingt dernières années par les fabricants de phases pour diminuer leur variabilité interlot, facteur souvent invoqué lors de l'échec d'un transfert de méthode.

Outre la détermination des dispersions introduites par le lot de synthèse d'une même phase stationnaire et la répétabilité du test qui feront l'objet des deux chapitres suivants, le couplage de ces deux études nous donnera accès au domaine de robustesse du test et donc aux tolérances applicables aux conditions expérimentales. Nous aurons accès aux limites du pouvoir résolutif du test, qui peuvent être assimilées aux limites de détection/quantification dans une procédure de validation.

Chapitre VI Pouvoir discriminant du test : étude de la variabilité interlot

VI.A Introduction

La colonne chromatographique, de par sa nature discrète, s'avère le maillon faible de la chaîne de mesure, constituant ainsi un facteur limitant pour la validation. La Figure VI-1 illustre la différence de comportements chromatographiques observés sur deux colonnes neuves de lots de synthèse différents sur la phase Nucleosil, toutes conditions égales par ailleurs.

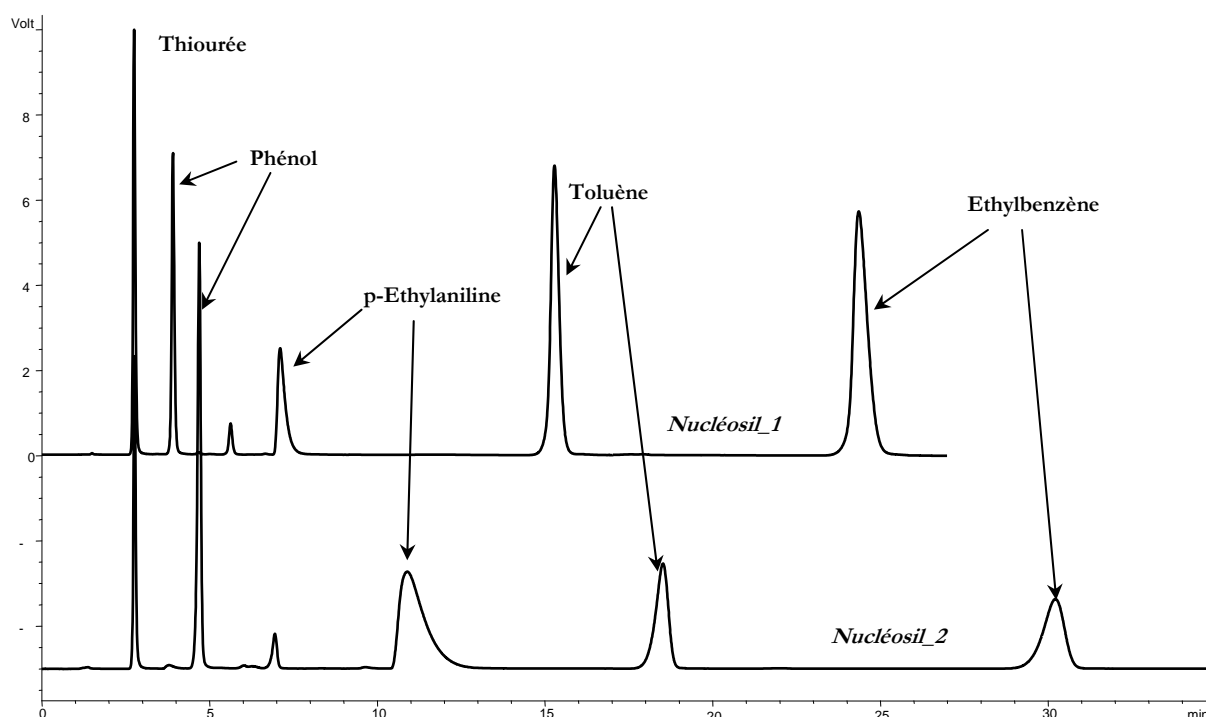


Figure VI-1 : Chromatogrammes obtenus en mélange eau/méthanol 50 : 50 (*m/m*) pour deux colonnes Nucleosil C18 neuves issues de lots différents.

Deux ans séparent la colonne Nucleosil_1 de la Nucleosil_2, colonne la plus récente. D'une part, hormis le marqueur de volume de rétention nulle qu'est la thiourée, tous les composés sont plus retenus sur la Nucleosil_2, indépendamment de leur nature. L'augmentation du facteur de rétention des composés hydrophobes que sont le toluène et l'éthylbenzène traduit une surface hydrocarbonée accessible plus importante. D'autre part, on observe pour la *p*-éthylaniline, composé basique, une traîne de pic clairement plus prononcée sur la Nucleosil_2. Ce phénomène, conjugué à une rétention globalement plus élevée, signifie probablement un changement du procédé de synthèse de la phase stationnaire qui se répercute sur le comportement chromatographique³⁶. De telles modifications ne sont pas acceptables lorsque la phase stationnaire est utilisée en méthode de routine pour le contrôle qualité ou le suivi de production : si la séparation à effectuer est remise en cause, ce qui est fort probable, il est alors nécessaire de revalider la méthode. A notre connaissance, ce problème de fidélité lot à lot concerne tous les fabricants de phases stationnaires pour cette technologie datant de 10-15 ans.

³⁶ Les colonnes étant à l'état neuf, tout phénomène de dégradation ou de vieillissement lié à l'utilisation est exclu. De plus, le stockage ne semble pas avoir affecté la Nucléosil_1, plus efficace.

Chapitre VI

Néanmoins, la maîtrise de la synthèse a été grandement améliorée depuis, comme l'a démontré une étude de Neue *et al.* [243], dont les résultats sont résumés dans le Tableau VI-1.

Tableau VI-1 : Estimation du coefficient de variation sur les sélectivités engendré par l'interlot de phases stationnaires de générations différentes (d'après [243]).

Composés	Sélectivité	μ Bondapak C18	Nova-Pak C18	Symmetry C18
Neutres hydrophobes	toluène/acénaphène naphtalène/acénaphène	<1,5%	1,10%	0,44%
Polaires et non basiques	butylphthalate/toluène propylphthalate/toluène	1,10% 2,80%		
Basiques	propranolol/acénaphène doxépine/acénaphène amitriptyline/acénaphène	7,00% 7,30%	3,40% 4,30%	2,20%

Introduisant la notion de « génération », ces résultats démontrent les progrès réalisés ces vingt dernières années par les fabricants de phases pour diminuer leur variabilité interlot, facteur d'échec lors d'un transfert de méthode.

Ce constat pourrait justifier à lui seul la nécessité d'établir une procédure de caractérisation des phases stationnaires : une fois la dispersion interlot évaluée pour une phase stationnaire donnée, son report sur les classifications montrera sans équivoque si une nouvelle colonne possède un comportement chromatographique conforme aux attentes de l'utilisateur. Autrement, il sera possible de sélectionner la phase stationnaire la plus proche en vue d'une revalidation.

Si l'évaluation de la fidélité des tests est rarement abordée dans la littérature, la problématique des variabilités intra et interlot des phases stationnaires a fait l'objet de quelques études, dont la plus complète est certainement à mettre au crédit de Kele et Guiochon, dont une synthèse des résultats est fournie dans le Tableau VI-2 et le Tableau VI-3 (pour plus de détails, cf. Annexe 9).

Tableau VI-2 : Coefficients de variation des intra et interlots sur les facteurs de rétention (d'après [103, 321-326]).

CV (%)	Symmetry C18		Kromasil C18		Luna C18 (2)			Vydac 218TP C18	
	1 lot, 5 colonnes	10 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	1 lot, 5 colonnes	1 lot, 4 colonnes	9 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots
Test 1	0,14	1,19	0,34	2,78	1,35	0,25	2,92	0,16	3,90
Test 2	0,12	1,10	0,58	2,79	1,28 ₅	0,51	2,36	2,53	5,92
Test 3	0,29	2,15	0,63	2,42	1,33	0,93	2,07	1,00	6,87
Test 4	0,24	1,28	0,80 ₅	3,05	1,49	0,38	2,50	0,70	7,62
Test 5	0,22 ₅	2,00	1,32	3,68	6,80	1,84	6,27	5,80	19,52

Tableau VI-3 : Coefficients de variation des intra et interlots sur les asymétries de pic (d'après [103, 321-326]).

CV (%)	Symmetry C18		Kromasil C18		Luna C18 (2)		Vydac 218TP C18		Chromolith
	1 lot, 5 colonnes	10 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	1 lot, 5 colonnes	9 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	6 lots
Test 1	0,67	2,94	1,34	1,024	2,95	4,92	1,45	3,63	2,17
Test 2	1,21	5,21	2,56	25,00	2,61	4,72	2,71	8,47	4,93
Test 3	6,68	15,21	7,41	32,32	10,38	11,45	11,11	12,61	10,09
Test 4	0,94	4,94	4,01	9,97	3,31	7,88	4,32	7,71	9,12
Test 5	1,45	4,28	3,38	7,51	4,60	5,58	8,97	8,70	2,84

Hormis le cas de la Luna C18 (2), la variabilité intralot est généralement inférieure à la variabilité interlot sur les facteurs de rétention. Comme dans le Tableau VI-1, ces variabilités se

distinguent d'autant plus facilement qu'elles sont évaluées à l'aide de composés basiques. En outre, elles apparaissent plus marquées sur les asymétries de pic – la Vydac 218TP C18 exclue. Partant de ce constat ont été menées d'autres études reposant uniquement sur les mesures d'asymétrie de pic [234, 235, 238, 327], avec des résultats contradictoires. En effet, Vervoort *et al.* [327] ont mis en évidence la dispersion interlot des Luna C18(2) au travers des asymétries de pic des composés basiques alors que cette même dispersion n'est pas significative sur les facteurs de rétention. Dans d'autres études [234, 235, 238], la dispersion intralot s'avère supérieure à celle de l'interlot, alors que l'ordre attendu est plutôt : $\hat{\sigma}_{\text{Interlot}} > \hat{\sigma}_{\text{Intralot}} > \hat{\sigma}_{\text{Résiduelle}}$. Concernant ce dernier point, l'alternative est la suivante :

- Soit nous sommes confrontés à un état de surface insuffisamment maîtrisé au niveau de l'intralot, caractérisé par une dispersion élevée des propriétés physico-chimiques du support : ce délicat problème est connu pour les phases polymériques [324] et peut aussi se produire sur des silices monomériques comme l'illustre le cas de la Luna [323] ;
- Soit la procédure de test ne s'avère pas adaptée, du fait de conditions chromatographiques trop nivelantes :
 - Les sondes trop peu retenues [129, 232, 234, 235, 327] soumettent les pics chromatographiques à des effets extra-colonnes conduisant à des déformations d'origine purement instrumentale, comme le montre l'Annexe 4 ;
 - Les conditions de test ne permettent pas de discriminer au mieux les supports, par exemple à cause d'un pH trop élevé [238].

Ajoutons qu'en l'absence d'étude portant sur l'évaluation de la fidélité des procédures de test, il est difficile de conclure quant à la non mise en évidence de la dispersion interlot.

Cependant, l'intralot s'avère généralement acceptable d'un point de vue chromatographique puisqu'il ne constitue plus un facteur limitant *a priori* pour le transfert de méthode sur les phases stationnaires de conception assez récente. Lorsqu'un cas tel que celui de la Luna – exceptionnel sur les greffages monomériques – se présente, la dispersion engendrée ne relève plus d'un intralot usuel. Néanmoins, cette possibilité renforce la nécessité d'établir une caractérisation capable de mettre en évidence d'éventuelles non-conformités de colonne. L'objectif de ce chapitre consiste donc à étudier la dispersion engendrée par le lot de synthèse sur deux phases stationnaires de générations distinctes et dont l'interlot est clairement défini³⁷. L'évaluation sera réalisée dans des conditions optimales de répétabilité – c'est-à-dire en limitant au maximum l'impact des facteurs liés à la préparation. Contrairement à d'autres études [132, 234, 238, 327], nous nous attacherons à une quantification systématique de l'interlot plutôt qu'à une visualisation de l'impact de l'interlot sur les classifications, qui sera traitée dans la troisième partie intitulée Applications.

VI.B Partie expérimentale

VI.B.1 Instrumentation

L'étude s'est effectuée sur une seule chaîne chromatographique HP 1050-110 (cf. Annexe 4) pour limiter au maximum les sources de dispersion.

VI.B.2 Conditions chromatographiques

Les conditions pour l'étude interlot ont été sélectionnées à l'issue du chapitre précédent (cf. Tableau V-4). L'Annexe 6 fournit de plus amples détails quant à la préparation des phases mobiles.

³⁷ Ceci n'est pas le cas de tous les fournisseurs : certains procèdent à des mélanges de lots afin de limiter la variabilité interlot, au détriment de l'intralot.

Chapitre VI

Afin de réaliser l'étude dans les meilleures conditions de répétabilité, nous n'avons utilisé qu'une seule préparation de tampon de 10 L.

VI.B.3 Phases stationnaires

Les deux phases stationnaires choisies – la SymmetryShield RP18 et la XTerra RP18 – sont de générations récentes. Elles possèdent la même granulométrie (3,5 μm), le même type de greffage (monomérique), et le même greffon (octadécylcarbamate), mais diffèrent par leur matrice de silice : la SymmetryShield est constituée de silice sphérique ultra pure tandis que la XTerra est à base de silice hybride. Pour chaque phase stationnaire ont été testées 3 colonnes, chacune de lot différent, et de dimension commune 150*4,6 mm. Ceci nous mène donc à 3 lots par phase stationnaire, dont les caractéristiques disponibles sont consignées dans le Tableau VI-4.

Tableau VI-4 : Tableau des caractéristiques des phases stationnaires testées.

Phase stationnaire	Type de Silice	N° Lot	S_p (m^2/g)	C %	Taux de greffage ($\mu\text{moles}/\text{m}^2$)	\bar{D} (nm)	Rapport 90%/10%	Métaux (ppm)		
								Al	Fe	Na
SymmetryShield RP 18	Ultra pure	101	340	17,50	3,22	9	1,39	<1	3	3
		102	340	17,48	3,22	9	1,39	<1	3	3
		103	340	17,46	3,23	9	1,39	<1	3	3
XTerra RP 18	Hybride	108	182	14,77	2,26	12,9	1,48	<1	<1	<1
		109	176	14,62	2,29	13,4	1,49	3	<1	<1
		110	176	14,60	2,28	13,4	1,49	3	<1	<1

Le diamètre des pores mesuré est proche du nominal (respectivement 10 et 12,5 nm sur la SymmetryShield RP18 et la XTerra RP18). D'après ces données, la phase XTerra semble posséder des caractéristiques plus dispersées que la SymmetryShield, au regard de la surface spécifique, des taux de carbone et de greffage.

VI.C Traitement des données

VI.C.1 Modèle

Il nous faut effectuer le traitement des données par une ANOVA à un facteur contrôlé, à savoir le lot, suivant la démarche décrite ci-dessous. Nous ne détaillerons pas les calculs inhérents à ce modèle, amplement renseignés dans la littérature [261, 328, 329].

VI.C.2 Principe de l'exploitation

Le test se composant de 15 solutés et de deux modificateurs organiques, évaluer l'impact du facteur lot sur chaque analyte en fonction du solvant nous mène à quelques 30 exploitations par paramètre, soit 90 en tenant compte des trois paramètres k, As' et h. Ceci constitue le premier niveau du traitement de données. Dans un souci de lisibilité et de clarté, il nous faut impérativement regrouper l'information de façon à fournir – à l'idéal – une valeur unique reflétant la dispersion interlot pour chaque paramètre. Ainsi, pour chaque type de paramètres, nous avons choisi de travailler à différents niveaux de regroupements de données, selon la démarche proposée dans le Tableau VI-5.

Tableau VI-5 : Niveaux d'exploitation.

<i>Niveau</i>	<i>Facteurs pris en compte (nombre de modalités)</i>	<i>Degré de regroupement</i>	<i>Nombres d'estimations (pour un type de dispersion)</i>
1	Analyte (15), Solvant (2), Phase Stationnaire (2)	chaque composé est pris isolément	30
2	Classe de composés (3), Solvant (2), Phase stationnaire (2)	regroupement par classes de composés	6
3	Classe de composés (3), Phase stationnaire (2)	regroupement par solvant et classes de composés	3
4	Phase stationnaire (2)	estimation globale	1

Le degré du regroupement le plus élevé est par définition moins informatif que les précédents, sinon les niveaux de regroupement par classes de composés (niveaux 2 et 3) n'auraient pas lieu d'être. Cependant, cette estimation globale offre une évaluation unique de la dispersion interlot propre à chaque phase stationnaire.

D'un point de vue expérimental, la répétabilité d'injection est un paramètre essentiellement instrumental dépendant des conditions chromatographiques : elle peut donc être considérée indépendante de la phase stationnaire. Dès lors, d'un point de vue statistique, il nous paraît judicieux de cumuler la répétabilité obtenue sur les 6 colonnes, de manière à augmenter le nombre de degrés de liberté de la résiduelle : au niveau 1, cela se traduit par une élévation de 3 à 6 degrés de liberté³⁸.

Les coefficients de variation, au même titre que les écart-types, ne sont pas additifs, contrairement aux variances. La valeur obtenue lors des regroupements résulte donc d'une

moyenne quadratique, selon la formule : $\overline{CV(\%)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k CV(\%)_i^2}{k}}$, et non d'une moyenne arithmétique classique.

VI.D Résultats et discussion

Tous les résultats pour chaque niveau d'exploitation figurent dans l'Annexe 10. A titre d'illustration, nous détaillons la procédure sur les facteurs de rétention de la SymmetryShield.

VI.D.1 Résultats sur les colonnes SymmetryShield RP18

VI.D.1.a Niveau 1

Le Tableau VI-6 regroupe les résultats de premier niveau pour les facteurs de rétention obtenus sur la phase SymmetryShield RP18, avec respectivement le méthanol et l'acétonitrile pour modificateur organique.

³⁸ 3 modalités pour le facteur lot et 2 répétitions nous mènent à $3 \times (2-1) = 3$ ddl, contre $6 \times (2-1) = 6$ ddl en prenant 6 modalités pour le facteur lot.

Chapitre VI

Tableau VI-6 : Estimation de la dispersion et des coefficients de variation par ANOVA des facteurs de rétention de chacun des solutés sur la phase SymmetryShield.

Modificateur organique		MeOH				MeCN			
Soluté	Source de variation	Lot		Résiduelle		Lot		Résiduelle	
		$\hat{\sigma}$	CV (%)	$\hat{\sigma}$	CV (%)	$\hat{\sigma}$	CV (%)	$\hat{\sigma}$	CV (%)
Digitoxine		0,0252	1,57	0,0026	0,16	0,0186	2,99	0,0006	0,09
Clofazimine		0,1350	4,39	0,0052	0,17	0,1796	4,63	0,0082	0,21
Amiodarone		0,3419	3,28	0,0096	0,09	0,2448	3,41	0,0088	0,12
Butylbenzène		0,0518	1,00	0,0017	0,03	0,0552	1,03	0,0017	0,03
Pentylbenzène		0,0671	0,89	0,0021	0,03	0,0756	0,99	0,0028	0,04
o-Terphényle		0,0645	0,90	0,0023	0,03	0,0681	1,02	0,0028	0,04
Triphénylène		0,0984	0,64	0,0043	0,03	0,0929	0,95	0,0037	0,04
Strychnine		0,1177	2,36	0,0160	0,32	0,0772	1,55	0,0140	0,28
d-Tubocurarine		0,1698	2,68	0,0566	0,89	0,3341	2,63	0,0129	0,10
Atropine		0,1254	2,76	0,0406	0,89	0,0866	1,74	0,0112	0,23
Ampicilline		0,0270	0,89	0,0105	0,35	0,0099	0,82	0,0038	0,31
Cyanocobalamine		0,0586	1,23	0,0195	0,41	0,0211	0,72	0,0101	0,34
Vancomycine		0,0332	1,83	0,0134	0,74	0,0190	2,05	0,0069	0,74
Caféine		0,0407	1,15	0,0126	0,36	0,0102	0,42	0,0106	0,43
Benzylamine		0,0333	4,41	0,0041	0,54	0,0161	2,66	0,0063	1,04

En premier lieu, la variabilité résiduelle dépend essentiellement de deux paramètres, la teneur en modificateur organique et le type de soluté :

1. Elle s'avère plus élevée à basse qu'à haute teneur en solvant, du fait manifestement d'une viscosité plus importante de l'éluant. De plus, nous avons observé que les phases mobiles riches en eau sont plus enclines à réabsorber un gaz dissout plus rapidement, source de moindre répétabilité du débit au niveau de la pompe.
2. Pour les composés ionisables et/ou polaires, elle est bien supérieure à celle des neutres apolaires.

La même tendance est observée pour le facteur lot. Les sondes basiques se montrent particulièrement discriminantes, 2 à 4 fois plus que les composés neutres. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de Kele et Guiochon [103, 321-325]. Par contre, le modificateur organique ne semble pas influencer notablement sur la variabilité résiduelle ni sur la dispersion interlot.

VI.D.1.b Niveau 2

En regroupant les solutés par classes suivant leurs propriétés physico-chimiques, nous obtenons le Tableau VI-7.

Tableau VI-7 : Coefficients de variations interlot et résiduelle (%) des classes de solutés sur les facteurs de rétention pour chaque modificateur organique.

Famille de solutés	MeOH		MeCN	
	Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle
Hydrophobes dont	2,25	0,10	2,56	0,10
Neutres hydrophobes				
(solutés de Tanaka)	0,87	0,03	1,00	0,04
Polaires hydrophobes	3,29	0,15	3,74	0,15
Hydrophiles	2,42	0,61	1,77	0,52

A haute teneur en solvant, il apparaît une relation entre dispersion et propriété physico-chimique des composés, que ce soit en méthanol ou en acétonitrile. A même force éluante, la capacité supplémentaire de discrimination entre les lots des solutés basiques provient certainement du mécanisme mixte de rétention. Nous pouvons établir approximativement les contributions relatives à la dispersion interlot mesurées par les facteurs de rétention, sous réserve de simple additivité quadratique :

- 1% provient de la rétention purement hydrophobe, sondée par les solutés neutres : ceci peut être attribué à des variations au niveau du taux de greffage par exemple ;
- Plus de 3% sont directement reliés aux interactions de type ion-ion et ion-dipôle, mettant en jeu des groupements silanol résiduels, auxquels sont particulièrement sensibles les composés basiques. En toute rigueur, on ne peut exclure des interactions entre les sondes et les groupements carbamate.

A basse teneur en solvant, les composés hydrophiles s'avèrent moins discriminants que leurs homologues basiques hydrophobes. Le changement de solvant se traduit par une diminution de la variabilité interlot, vraisemblablement attribuable à l'augmentation de la teneur en phase aqueuse (de 85% à 91%), masquant de fait les silanols.

VI.D.1.c Niveaux 3 et 4

Le modificateur organique n'ayant que peu d'effet sur les variabilités interlot de même bien évidemment que sur la résiduelle, il est donc envisageable d'opérer un regroupement selon ce facteur. Les résultats issus de ce traitement pour les trois paramètres facteur de rétention asymétrie de pic et efficacité figurent dans le Tableau VI-8.

Tableau VI-8 : Coefficients de variation interlot et résiduelle (%) des classes de solutés et estimations globales pour les trois paramètres sur la phase SymmetryShield RP18.

Niveau	Famille de solutés	k		As'		b	
		Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle
3	Hydrophobes	2,41	0,10	9,91	0,43	10,24	0,92
	Neutres	0,94	0,03	8,31	0,45	4,01	0,84
	Polaires	3,52	0,15	11,71	0,41	14,95	1,02
	Hydrophiles	2,12	0,57	7,27	1,13	10,54	3,12
4	Global	2,26	0,42	8,60	0,88	10,41	2,36

L'ordre globalement observé $CV_{Lot}(k) < CV_{Lot}(As') < CV_{Lot}(b)$ est conforme aux données de la littérature. Cependant, concernant les asymétries et les efficacités, une variabilité plus forte ne s'avère pas synonyme de pouvoir discriminant : en effet, ces paramètres, moins répétables (surtout à basse teneur en modificateur organique), sont à ce jour insuffisamment modélisés pour appréhender leurs comportements, parfois problématiques [221]. Ainsi, il nous paraît délicat de fonder une étude sur ces paramètres comme l'ont fait d'autres auteurs [234, 235, 238, 327] en l'absence d'évaluation de la fidélité de la procédure de test.

Reste maintenant à effectuer une exploitation similaire sur la phase XTerra RP18.

VI.D.2 Résultats sur les colonnes XTerra RP18

Le dépouillement des données montre des résultats en tous points similaires à ceux obtenus avec la phase SymmetryShield. Le Tableau VI-9 résume les résultats obtenus au terme de l'exploitation sur les trois paramètres chromatographiques d'intérêt pour les niveaux 3 et 4.

Chapitre VI

Tableau VI-9 : Coefficients de variation interlot et résiduelle (%) des classes de solutés et estimations globales pour les trois paramètres sur la phase XTerra RP18.

Niveau	Famille de solutés	k		As'		b	
		Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle
3	Hydrophobes	1,77	0,15	2,81	0,41	9,08	0,64
	Neutres	1,33	0,06	2,43	0,40	10,05	0,59
	Polaires	2,23	0,23	3,24	0,41	7,59	0,71
	Hydrophiles	0,94	0,67	4,31	1,60	6,35	2,47
4	Global	1,39	0,50	3,69	1,20	7,74	1,86

Le coefficient de variation de la variabilité résiduelle apparaît plus élevée que sur la phase SymmetryShield, alors que les dispersions sont rigoureusement identiques (résiduelle cumulée) : ce phénomène traduit simplement la moindre rétention de la XTerra par rapport à la SymmetryShield³⁹. Quant à l'origine de la dispersion interlot, plus élevée que sur la SymmetryShield pour les neutres hydrophobes, il est probable qu'elle soit due à une synthèse moins bien maîtrisée sur les supports hybrides : nous avons déjà noté dans le Tableau VI-4 des caractéristiques plus dispersées pour la XTerra. Cependant, la diminution de l'interlot remarquée sur les composés basiques hydrophobes et les solutés hydrophiles semble nous indiquer une meilleure protection contre les groupements silanol résiduels.

Concernant les estimations globales sur les paramètres chromatographiques, l'ordre préalablement constaté sur la SymmetryShield $CV_{Lot}(k) < CV_{Lot}(As') < CV_{Lot}(b)$ est conservé, cependant avec des dispersions moindres.

VI.D.3 Comparaison des dispersions interlot

Le Tableau VI-10 récapitule les résultats interlot pour le plus haut niveau de regroupement (niveau 4) obtenus sur les deux phases stationnaires.

Tableau VI-10 : Coefficients de variation interlot et résiduelle (%) au niveau 4 de regroupement pour les trois paramètres chromatographiques sur les deux phases stationnaires étudiées.

Phase stationnaire	k		As		b	
	Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle	Interlot	Résiduelle
SymmetryShield RP18	2,26	0,42	8,60	0,88	10,41	2,36
XTerra RP18	1,39	0,50	3,69	1,20	7,74	1,86

Sur les trois paramètres chromatographiques, la dispersion interlot de la phase SymmetryShield apparaît manifestement plus élevée que celle de la XTerra, et ce d'un facteur environ deux concernant les facteurs de rétention et les asymétries de pic.

Comme les travaux de Kele et Guiochon incluent la phase Symmetry C18, il nous paraît intéressant de confronter leurs résultats aux nôtres, pour comparer 3 phases stationnaires de génération distincte. A cette fin, il nous faut intégrer ces résultats de façon homogène. Etant donné que les tests utilisés par Kele et Guiochon ne comportent pas de composés basiques hydrophobes, sources de variabilité maximale au niveau de l'interlot, la comparaison ne peut s'effectuer que sur certains solutés possédant des caractéristiques communes ou similaires. En effet, introduire l'intégralité de nos résultats nous aurait conduit à surestimer la variabilité interlot obtenue lors de notre test par rapport aux mélanges de Guiochon et à donc biaiser la comparaison. Notre choix s'est donc porté sur :

1. Des composés de Tanaka – mélange constitué de butylbenzène, de pentylbenzène, d'*o*-terphényle et de triphénylène ;

³⁹ Le fait que le coefficient de variation de la résiduelle de la XTerra soit plus élevé que celui de la SymmetryShield n'est pas imputable à l'écart type mais à des moyennes de rétention différentes, en l'occurrence moins élevée pour la XTerra.

Pouvoir discriminant du test : étude de la variabilité interlot

2. Des solutés hydrophiles généralement ionisables et porteurs d'une fonction basique, à savoir l'aniline, un mélange de toluidines, la caféine, la pyridine, le propranolol, l'amitriptyline et la benzylamine.

Les résultats, présentés dans le Tableau VI-11, démontrent clairement une amélioration de la dispersion interlot, au fur et à mesure des générations, notamment au niveau des composés hydrophiles.

Tableau VI-11 : Coefficients de variation obtenus pour trois générations différentes de phase stationnaire ; pour la phase Symmetry C18, les résultats sont adaptés de [322].

Solutés	Symmetry C18	SymmetryShield RP18	XTerra RP18
Tanaka	1,35	0,94	1,33
Hydrophiles	2,44	2,12	0,94
Moyenne	1,97	1,64	1,15

En partant du principe que la dispersion des composés neutres reflète la qualité du greffage, et celle des solutés hydrophiles, le degré de protection vis-à-vis des silanols résiduels, l'interprétation est la suivante :

- S'agissant du passage de la Symmetry C18 à la SymmetryShield RP18, à base de la même silice mais avec un greffon différent, l'amélioration porte à la fois sur la maîtrise du greffage et sur l'effet protecteur supplémentaire apporté par le groupement carbamate enchâssé.
- Concernant le passage de la silice pure à la silice hybride, à même greffon, le gain apporté par le nouveau support en terme de protection vis-à-vis des silanols résiduels compense une moindre fidélité au niveau de la surface hydrocarbonée accessible.

En tout état de cause, cette comparaison nous permet de confirmer la notion de « génération » proposée par Neue.

La Figure VI-2 permet d'appréhender d'un point de vue chromatographique les progrès effectués entre ces deux générations de phase stationnaire au travers de deux mélanges issus de notre test : le mélange de Tanaka et un mélange constitué de digitoxine (neutre), de clofazimine et d'amiodarone, ces deux derniers composés étant basiques.

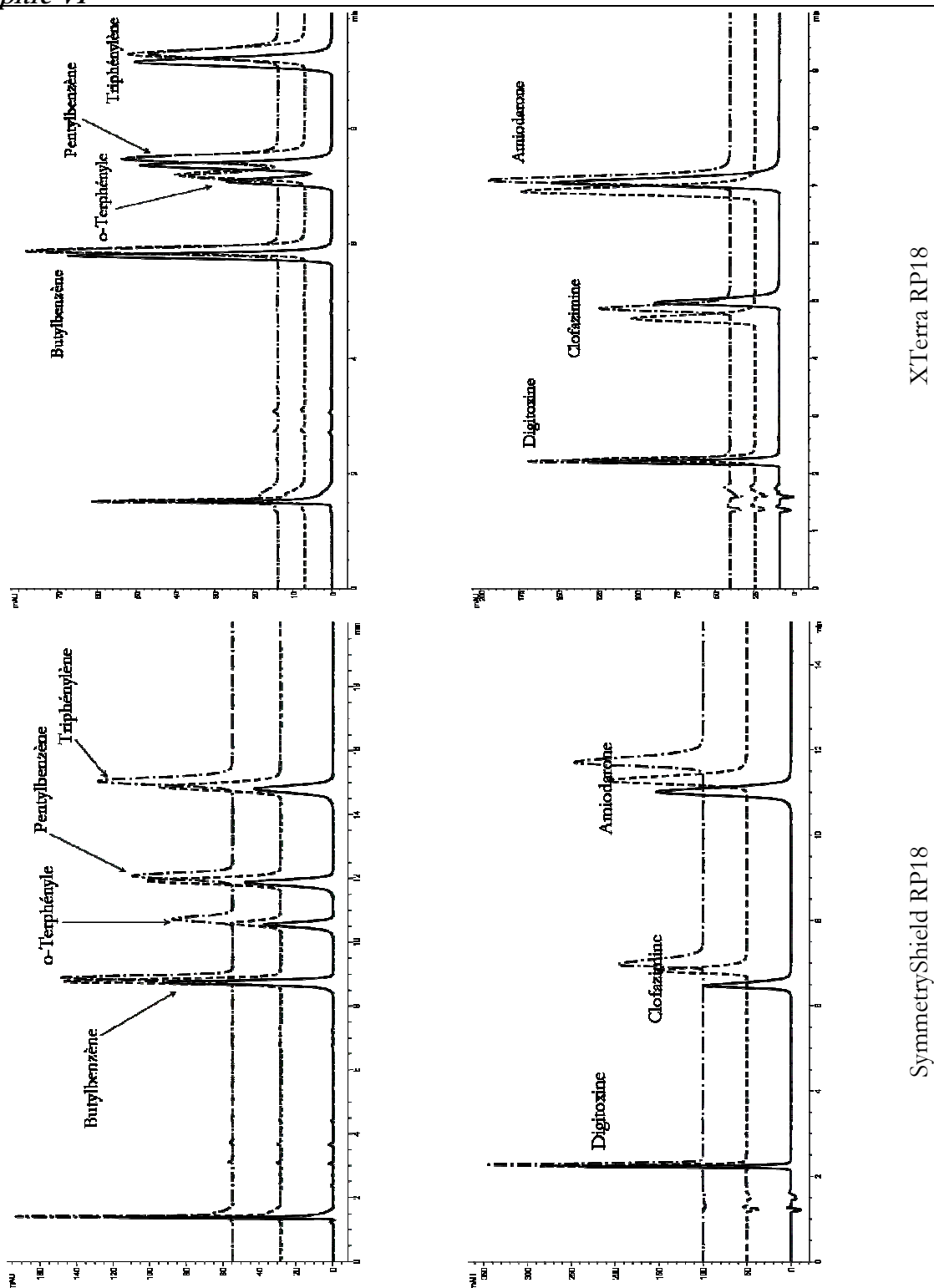


Figure VI-2 : Chromatogrammes obtenus sur trois lots de phase SymmetryShield RP18 et XTerra RP18 à haute teneur en acétonitrile.

Pour la phase SymmetryShield RP18, la différence interlot se remarque mieux avec les composés basiques : visuellement, nous pouvons comparer l'étendue de la dispersion à temps de rétention équivalent pour une comparaison honnête. Elle s'élève à 0,25 min pour le pentylbenzène contre 0,75 min pour l'amiodarone, soit un facteur trois. Nous retrouvons donc sur les chromatogrammes le même ordre de grandeur séparant les dispersions interlot caractérisées par les composés hydrophobes neutres ou basiques.

Pour la phase XTerra RP18, l'étendue de la dispersion est encore une fois plus importante sur les composés basiques – 0,2 min pour l'amiodarone – que sur les neutres

hydrophobes – 0,1 min pour l'*o*-terphényle, soit un facteur deux, moindre que dans le cas de la SymmetryShield.

Ces chromatogrammes soulignent la nécessité d'introduire des composés basiques, hydrophobes de préférence, dans la procédure de caractérisation des phases stationnaires de manière à avoir des sondes sensibles capables de mettre en évidence de faibles différences.

Remarque : Le fait que la dispersion interlot dépende de la phase stationnaire empêche tout approfondissement du traitement de données selon un modèle, certes plus complexe, mais potentiellement plus informatif.

En effet, en faisant varier quatre facteurs – la phase stationnaire *P*, le lot de phase *L*, le solvant *S* et l'analyte *A*, l'étude s'organise potentiellement selon un plan mixte à quatre facteurs, dont trois sont en relation factorielle, et deux en lien pyramidal, comme illustré par la Figure VI-3.

Phase Stationnaire × *Solvant* × *Analyte*

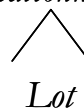


Figure VI-3 : Plan mixte à 4 facteurs

Cependant, pour pouvoir traiter les données suivant le modèle mathématique relatif à ce plan : $R_{ijkl\alpha} = m + A_i + S_j + P_k + AS_{ij} + AP_{ik} + SP_{jk} + ASP_{ijk} + L_{l(i,j,k)} + \varepsilon_{ijkl\alpha}$, il faut satisfaire impérativement au critère d'homoscédaticité, ou homogénéité des variances au niveau de chaque facteur, c'est-à-dire supposer $\sigma_{SymmetryShield} \approx \sigma_{XTerra}$, hypothèse invalidée par nos résultats.

VI.E Conclusion

Cette étude confirme la notion de « génération » de colonne, introduite par Neue [243, 301, 318]. En outre, elle souligne la nécessité d'utiliser des sondes basiques, bien plus pertinentes que les composés neutres pour la mise en évidence de la variabilité interlot. Mais pour savoir si le test est réellement capable de distinguer des colonnes de lots différents en utilisation normale, il faut désormais évaluer la répétabilité intrinsèque de notre procédure, étape intégrée à l'étude de robustesse qui fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre VII Etude de robustesse : domaine d'application

VII.A Introduction

Contrairement aux méthodes chromatographiques usuelles, les procédures de test ne sont jamais validées, ne serait-ce que partiellement. Néanmoins, quelques auteurs ont mené une évaluation de la fidélité de leur méthode [131, 132].

Concernant la reproductibilité d'un test, le meilleur moyen de l'évaluer s'effectue au travers d'un circuit interlaboratoire [330]. Une étude récente portant sur la certification d'une colonne HPLC comme matériau de référence (matériau de référence certifié BCR-722) et impliquant 8 laboratoires a permis d'obtenir, grâce à un protocole opératoire très strict, des reproductibilités très satisfaisantes pour les sélectivités méthylène et de forme [221]. Une autre comparaison entre laboratoires⁴⁰ [262] a permis d'accéder aux reproductibilités de nombreux descripteurs, mais aussi de confirmer leurs corrélations partielles, déjà démontrées dans des études précédentes [192, 239] et consolidées par Neue *et al.* [245]. Dans l'étude de Kele et Guiochon, des précautions particulières ont été prises, comme l'utilisation d'une préparation unique de tampon, afin de minimiser les sources d'erreurs introduites par des facteurs potentiellement influents. Il est clair que des conditions opératoires insuffisamment maîtrisées rendent probable l'introduction d'incertitudes, qui se traduisent inévitablement par un effet de flou brisant les classifications [245]. Si les facteurs influents pour la rétention en phase inverse sont clairement identifiés [221, 301, 326], leur impact est encore trop souvent estimé au moyen d'études ne faisant varier qu'un seul facteur à la fois [244], dont on sait qu'elles sont incapables de révéler des interactions potentielles entre facteurs, au contraire de la méthode des plans d'expériences (DoE).

Afin de démontrer la transférabilité de notre procédure, nous devons évaluer sa robustesse. Selon l'ICH, une procédure analytique est dite robuste si elle se trouve peu affectée par de petites variations des conditions expérimentales, variations provoquées délibérément mais du même ordre de grandeur que celles pouvant survenir de manière fortuite à l'occasion de la mise en œuvre de la méthode ou de son transfert. Une étude de robustesse permet donc d'évaluer la fiabilité de la méthode en routine. A ce jour, la robustesse des tests chromatographiques n'a quasiment jamais été prise en considération. A notre connaissance, la littérature ne fait mention qu'une fois de résultats issus d'un plan d'expériences [132] sans que la méthodologie n'ait encore été publiée. Second volet du développement du test, l'objectif de ce chapitre est d'évaluer la robustesse de notre procédure de test [331] et de définir son domaine de robustesse grâce à la méthode des plans d'expériences.

VII.B Plan d'expériences utilisé

VII.B.1 Identification des facteurs et des réponses

Nous avons identifié quatre facteurs comme potentiellement influents dans la procédure de caractérisation : la teneur en solvant (%S) de la phase mobile, la concentration du tampon (Conc.), son pH (pH) et la température de la colonne (T). Ces facteurs appartiennent à une catégorie de variables continues, encore dite de « process ». Le Tableau VII-1 indique les niveaux choisis pour chacun de ces facteurs.

⁴⁰ Cette comparaison interlaboratoire reposant sur deux, voire trois, laboratoires seulement ne peut être qualifiée de circuit interlaboratoire, qui doit mettre en jeu au moins 6 laboratoires différents.

Tableau VII-1 : Variations appliquées aux paramètres chromatographiques dans l'étude de robustesse, correspondant aux niveaux bas (-1), central (0) et haut (+1).

Facteurs	Niveau bas (-1)		Point au centre (0)		Niveau haut (+1)	
Fraction de solvant (% <i>m/m</i>)	69,5	58,5	70	59	70,5	59,5
	14,5	8,5	15	9	15,5	9,5
Température (°C)	39		40		41	
pH	4,8		5,0		5,2	
Concentration du tampon (mM)	27		30		33	

Concernant la teneur en solvant, les variations appliquées pourraient paraître de bien faible amplitude au premier abord. Cependant, rappelons que, dans le cadre d'une étude de robustesse, les variations appliquées se doivent d'être du même ordre de grandeur que celles qui peuvent se produire fortuitement en pratique, ce qui explique une amplitude apparemment réduite. Quoiqu'il en soit, elles ne représentent pas moins de 10 fois les erreurs potentielles de pesées.

Nous avons considéré comme réponses les trois types de paramètres classiques en chromatographie : les facteurs de rétention (k), les asymétries de pics (A_s comme définies précédemment [319]) et la hauteur de plateau réduite (h), nous menant à 3 paramètres×15 solutés=45 réponses.

VII.B.2 Sélection du modèle

Pour réaliser une étude de robustesse, deux choix s'offrent à nous suivant l'objectif de l'étude. S'il s'agit de vérifier uniquement la robustesse à l'intérieur du domaine d'étude, un plan dit de « screening », tels ceux de type Plackett-Burmann [332-338] ou supersaturé [339-341], peut s'avérer suffisant. Si l'étude de robustesse constitue une étape à part entière dans le processus de développement (couplée à la phase d'optimisation par exemple) et/ou si l'utilisateur est à la recherche d'un modèle permettant de définir un domaine de robustesse, c'est-à-dire un domaine à l'intérieur duquel pourront être tolérées des variations sans que les résultats obtenus puissent être remis en cause, il est préférable d'utiliser des plans plus performants, mais aussi plus gourmands en essais. Notre étude s'inscrit dans ce cadre. Nous désirons obtenir des surfaces de réponses au voisinage des conditions nominales, il est donc impératif d'utiliser un modèle au moins du second degré. Comme nous ne pouvons négliger *a priori* les interactions d'ordre 2 du type %S*T ou pH*Conc., nous les avons toutes conservées pour la modélisation de sorte que les réponses expérimentales sont décrites par le modèle polynomial de degré 2 dont l'équation est la suivante :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i < j}^4 \sum_{j=1}^4 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad \text{Eq. VII-1}$$

VII.B.3 Plan d'expérimentation

Les plans fractionnaires et/ou factoriels complets à deux niveaux (et encore moins les plans de « screening ») ne conviennent pas aux modèles quadratiques. Quant aux plans classiques de surface de réponse du type central composite [342-344] ou Box-Behnken [345, 346], ils requièrent beaucoup trop d'essais [347]. Nous avons donc été amenés à utiliser un plan asymétrique pour réduire le nombre d'expériences (et par conséquent la durée de l'étude) afin d'éviter tout biais eu égard à la possibilité de vieillissement de la colonne testée [348]. Au final, notre choix s'est porté sur un plan D-optimal [266, 329, 347, 349] constitué de 16 points expérimentaux (autant que de variables à déterminer) et de 6 points au centre, qui permettront d'évaluer la répétabilité du test et donc serviront de base pour tester la significativité de l'influence des facteurs et interactions. Les 6 points au centre sont répartis régulièrement de

manière à assurer le contrôle d'un éventuel vieillissement. L'ensemble des expériences réalisées est représenté dans le Tableau VII-2.

Tableau VII-2 : Matrice des essais.

Ordre des expériences	% Solvant	T	pH	Conc.	Ordre des expériences	% Solvant	T	pH	Conc.
1	0	0	0	0	12	1	1	0	0
2	0	0	0	-1	13	-1	1	-1	1
3	-1	0	1	0	14	-1	1	-1	-1
4	0	1	1	1	15	0	0	0	0
5	1	1	-1	-1	16	-1	1	1	-1
6	0	0	0	0	17	-1	-1	1	-1
7	1	0	-1	1	18	0	-1	-1	0
8	-1	-1	-1	-1	19	-1	-1	0	1
9	1	-1	1	1	20	0	0	0	0
10	0	0	0	0	21	1	1	1	-1
11	1	-1	-1	-1	22	0	0	0	0

Le plan sélectionné ne possède pas uniquement un bon critère de D-optimalité. Le critère de G-optimalité [350, 351] qui traduit une minimisation de la fonction de variance d'autant plus importante qu'il s'accroît, s'élève à 96,82 dans notre cas, ce qui correspond à un plan efficace pour l'investigation du voisinage des conditions nominales.

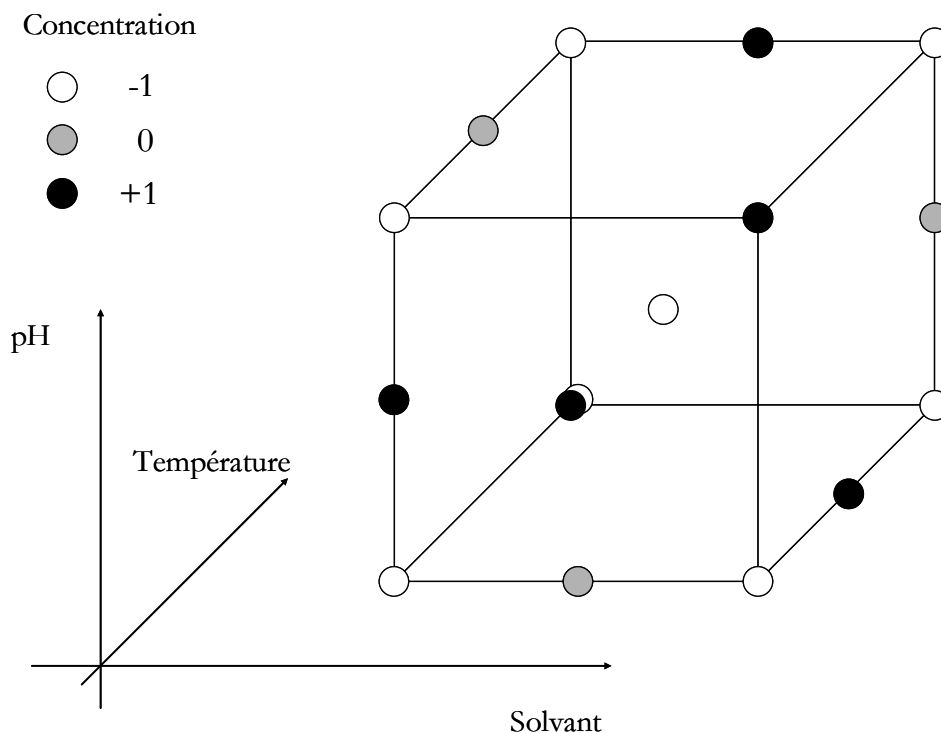


Figure VII-1 : Représentation du plan D-optimal à 4 facteurs sélectionnés.

La représentation des points expérimentaux sur la Figure VII-1 permet de mieux appréhender la structure du plan : le plan D-optimal sélectionné s'appuie manifestement sur un plan factoriel fractionnaire (points aux sommets de l'hypercube) sur lequel ont été rajoutés des points aux milieux des arêtes, typiques d'un plan de Box-Behnken.

Nous avons réalisé cette étude sur une seule chaîne chromatographique HP 1050-1100 pilotée sous Chemstation, décrite en détails dans l'Annexe 4.

VII.C.1 Réalisation des essais

Idéalement, les essais doivent être réalisés dans un ordre aléatoire afin de minimiser les effets de facteurs non contrôlés susceptibles d'affecter les résultats. Cependant, compte tenu de la durée de l'étude, nous avons inclus des contraintes supplémentaires afin de minimiser l'impact de toute dérive provenant d'un vieillissement de la phase stationnaire [348] :

1. Afin de détecter tout changement de comportement chromatographique lié au vieillissement de la colonne, il est impératif d'effectuer régulièrement des points au centre, en plus de ceux réalisés au début et à la fin de l'étude ;
2. Nous avons utilisé deux colonnes de même phase stationnaire, une pour chaque solvant, afin d'autoriser une comparaison fiable des effets selon le modificateur organique utilisé et sans biais dû au vieillissement.

Comme nous ne disposons pas de deux colonnes de même lot de fabrication (variabilité la plus faible), nous avons choisi deux colonnes de lots différents : en effet, les résultats du chapitre précédent ont révélé une fidélité interlot satisfaisante sur les trois lots différents de SymmetryShield RP18. Nous avons respecté le même ordre des essais en méthanol et en acétonitrile, tel que figuré sur le Tableau VII-2.

VII.C.2 Protocole opératoire de chaque essai

Chaque essai a été réalisé de manière aussi indépendante que possible. Ainsi, un essai correspond à une préparation spécifique de phases mobiles. Ces dernières ont été préparées de façon similaire à ce qui est décrit dans l'Annexe 6, qui reprend les conditions sélectionnées au terme du Chapitre V. Néanmoins, nous y avons porté quelques modifications de manière à contrôler plus finement les variations appliquées. En effet, comme par définition le pH et la concentration du tampon sont liés, sa préparation a été revue afin de faire varier simultanément ces deux facteurs de manière maîtrisée. Au lieu d'ajuster le pH du tampon avec une solution d'acide concentrée jusqu'à atteindre la valeur du pH désirée, nous préférons dissoudre les quantités appropriées de sel d'acétate de sodium et d'acide acétique titré ($1,031 \text{ mol.L}^{-1}$, $d=1.010$). La pesée de chacun de ces produits, neufs et dédiés à cette étude, permet de contrôler les variations à appliquer avec une maîtrise suffisante. La valeur du pH est alors vérifiée *a posteriori* pour valider la préparation au moyen d'un pH-mètre étalonné en tenant compte de la température des solutions étalons (généralement à même température que celle régnant au laboratoire) et du tampon. Le reste du protocole est identique à celui décrit au Chapitre V.

Les phases mobiles ont donc été préparées suivant ce protocole modifié, en prenant bien évidemment en compte les variations à appliquer aux niveaux de chaque facteur. Pour chacun des essais, les réponses chromatographiques sont obtenues en moyennant les valeurs des données recueillies sur deux chromatogrammes correspondant aux injections répétées.

VII.D Principe de l'exploitation

Cette partie explicite l'approche que nous avons choisie pour déterminer le domaine de robustesse.

VII.D.1 Elimination des réponses peu informatives

Pour sélectionner de manière optimale les réponses, il faut tenir compte à la fois de la répétabilité et du degré d'information des réponses, comme le réalise l'indice d'information des

réponses [352], décrit par l'équation suivante : $Indice\ d'Information = 1 - \frac{Variance\ Résiduelle}{Variance\ Totale}$ ⁴¹. La

variance résiduelle correspond à la répétabilité aux points aux centres. Plus l'indice d'information est proche de la valeur unitaire, plus la réponse considérée est informative. S'agissant du critère de rejet pour les réponses à faible informativité, le seuil a été fixé à 0,5. En dessous de cette valeur, les réponses, considérées alors comme peu pertinentes, pourront être éliminées.

VII.D.2 Calcul des effets et interprétation statistique

Les coefficients du modèle polynomial (donné par l'Eq. VII-1) sont généralement estimés par régression linéaire multiple, encore dénommée MLR (« Multiple Linear Regression »). Cependant, le fait que ce type de régression repose sur l'hypothèse d'indépendance des variables d'entrée (c'est-à-dire les facteurs) constitue un inconvénient majeur. En effet, des facteurs tels que la température, le pH et la teneur en solvant sont bien connus pour leur interdépendance. Il nous a donc paru judicieux d'utiliser la régression dite PLS (« Partial Least Squares regression ») au lieu de la régression linéaire classique, parce que cette dernière ne nécessite pas une covariance nulle entre les facteurs. Par conséquent, elle traite plus efficacement les facteurs corrélés entre eux que ne le fait la régression multiple. Ce dernier point est d'ailleurs vérifié en Annexe 10. La régression PLS a été largement décrite dans la littérature [353-358]. Comme c'est classiquement le cas, les réponses sont préalablement centrées et réduites avant d'effectuer la régression. Nous avons utilisé la validation croisée pour déterminer le nombre de composantes PLS nécessaires. Nous avons aussi fait appel à des outils plus classiques comme l'ANOVA pour calculer (par excès⁴²) des intervalles de confiance des coefficients estimés afin de déterminer le seuil de significativité des coefficients avec $\alpha=5\%$ (risque d'erreur de type I). La qualité du modèle peut être évaluée au moyen de deux outils : sa qualité d'ajustement R^2 et sa qualité de prédiction Q^2 définies comme suit : $R^2 = \frac{SS_{REG}}{SS}$ et $Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SS}$ où SS_{REG} , SS et $PRESS$ représentent respectivement la somme des carrés de la régression, la somme des carrés totaux et celle de l'erreur de prédiction⁴³. Au final, R^2 indique la partie de variation de la réponse expliquée par le modèle tandis que Q^2 renvoie à celle prédite par le modèle. A l'idéal, des valeurs de R^2 et Q^2 très proches de 1 traduisent un modèle de bonne qualité avec un bon pouvoir prédictif. Ces indicateurs sont ceux qui traduisent le mieux la qualité du modèle [352]. Enfin, signalons que R^2 surestime et que Q^2 sous-estime la qualité du modèle.

Afin de permettre une meilleure comparaison, ce seront les coefficients normalisés, selon la relation : $\frac{Coefficient\ estimé}{Réponse\ Moyenne} \times 100$ que nous discuterons, et non les coefficients bruts.

VII.D.3 Construction du domaine robuste

VII.D.3.a Principe

A ce stade, seules les réponses possédant un indice d'information suffisamment élevé ont été conservées. Si aucun facteur n'apparaît influent, alors la réponse est robuste dans le domaine expérimental. Dans le cas contraire, si certains coefficients s'avèrent influents, il nous faudra délimiter le domaine de robustesse, à l'intérieur duquel les réponses pourront être considérées comme robustes. Pour cela, nous devons définir un critère de « tolérance ». Partant du principe que la variabilité interlot de la phase stationnaire utilisée est suffisamment réduite et acceptable en développement pharmaceutique, nous l'avons employée pour définir l'étendue du domaine de robustesse du test. En conséquence, les conditions robustes ne permettront plus de distinguer

⁴¹ L'indice d'information est dénommé de façon impropre « Reproducibility » dans le logiciel MODDE.

⁴² La régression PLS n'étant pas capable d'estimer ces intervalles, la régression linéaire multiple en fournit des estimations, toujours par excès. L'avantage à cela est que les coefficients dont l'influence sera mise en évidence seront indéniablement significatifs, même en limite de seuil.

⁴³ Notations de la régression PLS et non celle de l'ANOVA (Q_R , Q_T et Q), pour des raisons d'homogénéité.

des colonnes remplies avec la même phase stationnaires provenant de lots de synthèse différents, pour peu que leur variabilité interlot soit inférieure ou semblable à celle de la SymmetryShield. Dès lors, les dispersions engendrées respectivement par l'interlot et la répétabilité du test doivent être comparées.

VII.D.3.b Détermination de la répétabilité du test

Dans le cadre du plan d'expériences, l'étude de répétabilité grâce aux 6 points centraux constitue une étape préalable indispensable, dont la principale raison d'être est de servir de base aux tests statistiques pour établir la significativité de l'influence d'un facteur ou d'une interaction. Dans le cadre plus général de l'approfondissement de la connaissance du test, la répétabilité du test, faisant intervenir le facteur préparation, constitue un fondamental qu'il faut évaluer. Etant donné qu'entre les 6 points au centre, nous avons continué d'utiliser les colonnes, il paraît plus prudent de tenir compte de l'éventualité d'une dérive sur les réponses, attribuable à un phénomène de vieillissement du support dans notre cas. La procédure que nous allons détailler permet d'abord de vérifier la présence d'une dérive et de s'en affranchir ensuite le cas échéant.

Le premier point d'intérêt consiste à étudier l'influence des points centraux, à ce moment-là défini comme facteur nominal (discontinu) par ANOVA. Si ces derniers ne présentent pas d'influence notable sur les réponses, elles seront conservées en raison de leur bonne répétabilité. Dans le cas inverse, l'investigation doit se poursuivre. La façon dont ont été agencés les points centraux lors de l'étude nous permet alors de changer la nature du facteur point central, de nominale à continue. Il nous est alors possible de révéler le cas échéant sur une réponse un biais provenant d'un facteur dépendant du temps et donc non contrôlé, comme l'illustre la Figure VII-2.

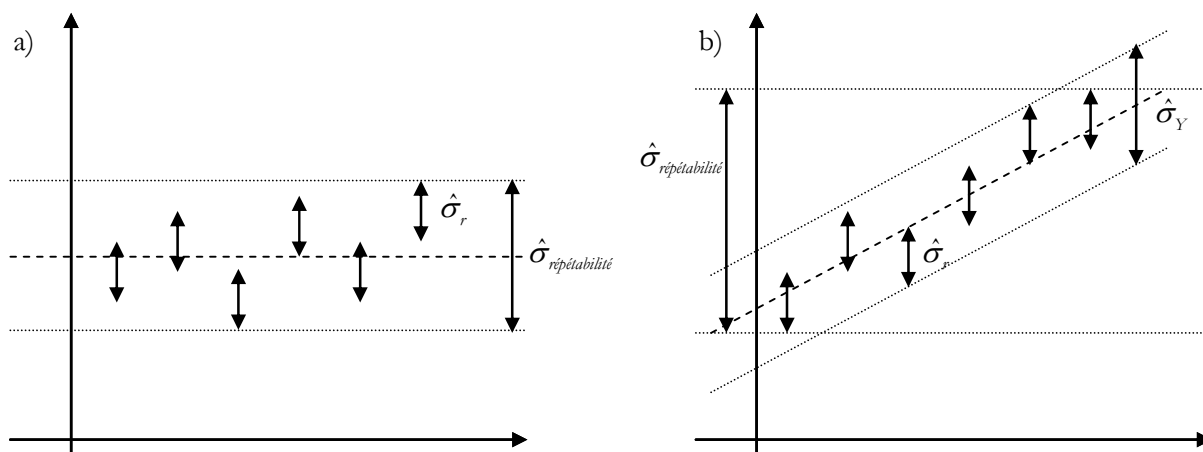


Figure VII-2 : Schématisation des différents types d'erreur a) erreurs purement aléatoires, b) présence d'un biais ; $\hat{\sigma}_r$ correspond à la variabilité résiduelle, $\hat{\sigma}_{\text{répétabilité}}$, la variabilité de répétabilité du test, $\hat{\sigma}_Y$ représente l'écart type lié de régression.

Cette dérive de la réponse, qui peut traduire un vieillissement du support chromatographique, provoque alors une surestimation de la répétabilité du test. Pour l'interprétation du plan d'expérience, ceci ne constitue pas un inconvénient majeur : cela revient à relever le seuil de limite de significativité des coefficients des facteurs. Par contre, pour une étude de fidélité, surestimer outrancièrement la variabilité de répétition représente un défaut majeur, surtout dans le cadre d'une méthodologie de caractérisation des phases stationnaires. En effet, cela reviendrait à augmenter la limite de détection du test, qui, si elle est trop élevée, entrave sa capacité à distinguer des phases stationnaires différentes par leur nature et leur comportement chromatographique.

Afin d'estimer l'intensité de la dérive, il convient d'effectuer une régression linéaire suivant la méthode des moindres carrés. Si la pente ne s'avère pas significative (avec α fixé à 0,05), la réponse est conservée et la répétabilité, directement évaluée. Dans le cas contraire, la répétabilité correspond à l'écart type lié de régression $\hat{\sigma}_Y$, mais il est alors nécessaire de choisir une valeur seuil de pente maximum tolérée pour conserver la réponse. Des valeurs de 0,05 pour

les facteurs de rétentions et de 0,10 pour les asymétries et les efficacités peuvent paraître raisonnables au regard de la littérature. Ainsi, cette procédure permet de s'affranchir d'un éventuel biais dû au vieillissement des phases stationnaires lors de l'étude de robustesse.

VII.D.3.c Comparaison Interlot/Répétabilité du test

Il s'agit au travers de cette simple⁴⁴ comparaison de s'assurer de la fiabilité du critère de tolérance. En effet, la construction du domaine de robustesse, qui détermine la limite de détection du test, prend pour critères ceux de sa répétabilité affranchie de la dérive de vieillissement et de la variabilité interlot. Il faut garder en mémoire que cette dernière a été estimée dans des conditions dévolues à l'étude interlot, afin de limiter les variations dues à la préparation. Or il s'agit désormais de tenir compte du facteur préparation qui est inclus dans la définition de la répétabilité du test. La comparaison devrait en général vérifier la supériorité de la variabilité interlot face à la répétabilité du test, auquel cas l'interlot sert de support au critère de tolérance. Mais dans le cas où la variabilité interlot s'avère plus réduite que la répétabilité du test, c'est cette dernière qui servira de critère de tolérance : le domaine de robustesse ne peut pas être moins étendu que la région délimitée par la répétabilité du test, qui ne fait que traduire des variations (expérimentales) purement fortuites. Au final, pour calculer les intervalles autorisés, nous avons affecté autour de la moyenne de chaque réponse deux fois la valeur des écart-types correspondants.

VII.D.3.d Visualisation du domaine robuste

Etant donné que les réponses sont fonction des quatre facteurs étudiés, nous avons projeté l'hyperplan de réponse (la surface de réponse 4D) dans des sous-espaces de dimension 2 (des plans à deux facteurs), définissant ainsi un ensemble de courbes de niveau. Les courbes de niveau correspondant aux valeurs limites autorisées sont ensuite tracées sur chacun de ces sous-espaces. Pour faciliter la visualisation et permettre une meilleure compréhension de la construction, nous avons fait appel systématiquement aux 3 mêmes graphiques : $y=f(\%S, pH)$, $y=f(\%S, T)$, et $y=f(\%S, Conc.)$. Pour chaque réponse, il convient donc de faire figurer 6 graphiques eu égard à la nature du facteur solvant (variable discontinue à deux niveaux). Les domaines de robustesse du test sont alors déduits des intersections des domaines valides pour toutes les réponses. Au-delà, les réponses ne pourront plus être considérées comme robustes.

⁴⁴ Elle ne s'effectue pas au moyen d'un test statistique, puisque pour construire le domaine de robustesse, seul importe le maximum de variation.

VII.E.1 Indice d'information et sélection des réponses

Le Tableau VII-3 regroupe les valeurs des indices d'information pour tous les paramètres chromatographiques.

Tableau VII-3 : Indice d'information des paramètres chromatographiques de chaque soluté ; les valeurs en italique indiquent des indices inférieurs à la valeur limite de rejet fixée à 0,5.

Soluté	k		A_s		b	
	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH
Digitoxine	0,985	0,989	-0,200	0,558	0,123	0,100
Clofazimine	0,981	0,996	0,185	0,107	-0,200	0,685
Amiodarone	0,997	1,000	0,651	0,887	0,352	0,967
Butylbenzène	0,971	0,994	-0,200	0,440	0,202	0,360
<i>o</i> -Terphényle	0,972	0,996	-0,200	0,555	0,198	0,806
Pentylbenzène	0,973	0,997	-0,200	-0,200	0,169	0,781
Triphénylène	0,970	0,996	-0,200	-0,200	0,191	0,467
Strychnine	0,996	0,996	0,036	-0,148	0,381	0,030
<i>d</i> -Tubocurarine	0,954	0,975	0,095	-0,200	-0,200	-0,200
Atropine	0,989	0,996	-0,200	0,557	0,834	0,889
Ampicilline	0,994	0,982	-0,200	0,021	-0,014	0,565
Cyanocobalamine	0,991	0,995	-0,200	-0,143	-0,062	0,617
Vancomycine	0,984	0,995	-0,200	0,252	-0,011	0,651
Caféine	0,994	0,987	-0,200	-0,200	0,069	-0,200
Benzylamine	0,994	0,983	-0,192	0,815	0,792	0,792

Tous les facteurs de rétention possèdent un indice d'information élevé, synonyme de leur très grande informativité. De fait, aucun ne doit être éliminé. Quant aux asymétries et aux efficacités, le nombre de réponses utiles décroît de façon manifeste, surtout dans l'acétonitrile, modificateur organique pour lequel seule l'amiodarone dépasse le seuil de non rejet. Dans le méthanol, le nombre de réponses qui pourront faire l'objet d'une discussion est plus élevé (5 contre 1 par exemple sur les asymétries).

VII.E.2 Estimation des coefficients du modèle et interprétation

D'une manière générale, nous discuterons des coefficients significatifs du modèle (cf. Eq. VII-1) en fonction de la teneur en modificateur organique et des propriétés physico-chimiques des solutés. Mais avant toute chose, signalons que les coefficients les plus influents correspondent aux facteurs principaux, et que peu d'interactions sont finalement significatives : il s'agit probablement d'un effet positif de l'utilisation de la régression PLS (cf. Annexe 10). De fait, le modèle final sera plus facile à interpréter et à relier à des mécanismes de rétention que s'il n'avait comporté des termes d'interactions d'ordre 2. Nous organiserons la discussion en fonction du niveau de teneur en modificateur organique, haut ou bas.

VII.E.2.a Haute teneur en modificateur organique

Les Tableau VII-4 et Tableau VII-5 donnent les coefficients normalisés pour les facteurs de rétention des composés hydrophobes respectivement dans le méthanol et l'acétonitrile.

Concernant les composés neutres, la qualité d'ajustement du modèle apparaît satisfaisante avec chacun des modificateurs organiques. Seuls les facteurs teneur en solvant et la température s'avèrent influents pour tous les solutés, quel que soit le modificateur organique, exception faite de la digitoxine trop peu retenue dans l'acétonitrile. Ceci confirme le mécanisme de rétention attendu, de type partage. Les effets des facteurs mis en évidence sont encore plus prononcés dans le méthanol. La teneur en solvant apparaît généralement deux fois plus influente que la température, à par dans le cas du triphénylène. Quant aux asymétries et aux efficacités correspondantes, la modélisation échoue (valeurs de Q^2 très basses), rendant les coefficients inexploitable, malgré un indice d'information potentiellement intéressant (valeurs supérieures à

Etude de robustesse : domaine d'application

0,5). Ce phénomène, combiné à la haute variabilité observée pour les points au centre, confirme le problème de reproductibilité de tels paramètres chromatographiques déjà rencontré au niveau des mesures d'efficacité pendant le circuit interlaboratoire sur le projet européen d'une colonne de référence, « HPLC column as a reference material » [221].

Tableau VII-4 : Estimations des coefficients normalisés pour la modélisation des facteurs de rétention des composés neutres à haut niveau de solvant ; seuls les coefficients significatifs sont figurés.

Solvant	<i>Digitoxine</i>		<i>Butylbenzène</i>		<i>Pentylbenzène</i>		<i>o-Terphényle</i>		<i>Triphénylène</i>	
	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN
Moyenne	1,65	0,64	5,26	5,39	7,67	7,69	7,33	6,73	15,62	9,86
%S		-2,19	-3,44	-2,58	-3,84	-2,80	-3,98	-2,98	-3,79	-2,61
T			-1,53	-1,04	-1,72	-1,14	-1,77	-1,11	-2,46	-1,52
pH										
Conc.										
%S*%S										
T*T										
pH*pH										
Conc.*Conc.										
%S*T										
%S*pH										
%S*Conc.										
T*pH										
T*Conc.										
pH*Conc.										
R^2	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99
Q^2	0,61	0,73	0,70	0,68	0,71	0,69	0,74	0,70	0,81	0,75

Tableau VII-5 : Estimations des coefficients normalisés pour la modélisation des facteurs de rétention des composés basiques à haut niveau de solvant ; seuls les coefficients significatifs sont figurés.

Solvant	<i>Clofazimine</i>		<i>Amiodarone</i>	
	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN
Moyenne	2,98	4,06	10,07	7,15
%S	-3,57	-1,99	-3,45	-1,25
T	-1,11			1,42
pH	10,08	10,89	18,05	19,39
Conc.	-1,36		-1,10	
%S*%S				
T*T				
pH*pH			2,12	3,99
Conc.*Conc.				
%S*T				
%S*pH	-0,54		-0,69	
%S*Conc.				
T*pH				
T*Conc.				
pH*Conc.				
R^2	1,00	0,99	1,00	1,00
Q^2	0,90	0,57	0,92	0,70

Pour les composés basiques, à savoir la clofazimine et l'amiodarone, si la teneur en solvant possède un effet du même ordre de grandeur que celui constaté sur les neutres, la température, au contraire, est à peine mise en évidence. Le pH, comme attendu, s'avère le facteur le plus influent : il intervient à la fois par des termes linéaire et quadratique 3 à 15 fois plus importants que ceux relatifs au solvant. De plus, la valeur du coefficient linéaire du pH ne semble pas beaucoup dépendre de la nature du modificateur organique, au contraire du terme quadratique, noté uniquement pour l'amiodarone. Manifestement, au voisinage des conditions nominales du test, la rétention de la clofazimine peut s'approximer par une fonction linéaire du pH tandis que pour l'amiodarone, il est nécessaire de rajouter un terme correctif quadratique

Chapitre VII

[359]. Afin d'expliquer ce phénomène, nous nous sommes appuyés sur des données publiées [360-363]. Nous pouvons alors estimer de façon approximative⁴⁵ le pH apparent des phases mobiles en fonction de la teneur et de la nature du modificateur organique : à 25°C, de 5,00 en solution purement aqueuse, le pH d'un tampon acétate s'élève à 6,7 avec 70% de méthanol et jusqu'à 7,5 avec 59% d'acétonitrile. Concernant les solutés, s'agissant de composés basiques, leur pK_a va au contraire s'abaisser avec l'ajout de modificateur organique. En première approximation, prenons une dérive moyenne de -0,6 pour chaque sonde quel que soit le solvant : les pK_a s de la clofazimine et de l'amiodarone descendent respectivement à 7,0 et 8,1. En intégrant ces valeurs dans l'équation régissant la rétention des composés ionisables en fonction du pH,

$k = \frac{k_{\bar{B}} + k_{BH^+} \cdot 10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$, où $k_{\bar{B}}$ et k_{BH^+} représentent les facteurs de capacité des espèces \bar{B} et

BH^+ , nous obtenons la modélisation de la Figure VII-3. Précisons toutefois que les facteurs de rétention sont fictifs, n'ayant pas accès aux valeurs réelles relatives aux formes complètement ionisée et neutre pour les composés, qui fixent d'ailleurs la valeur de la pente pour l'approximation linéaire.

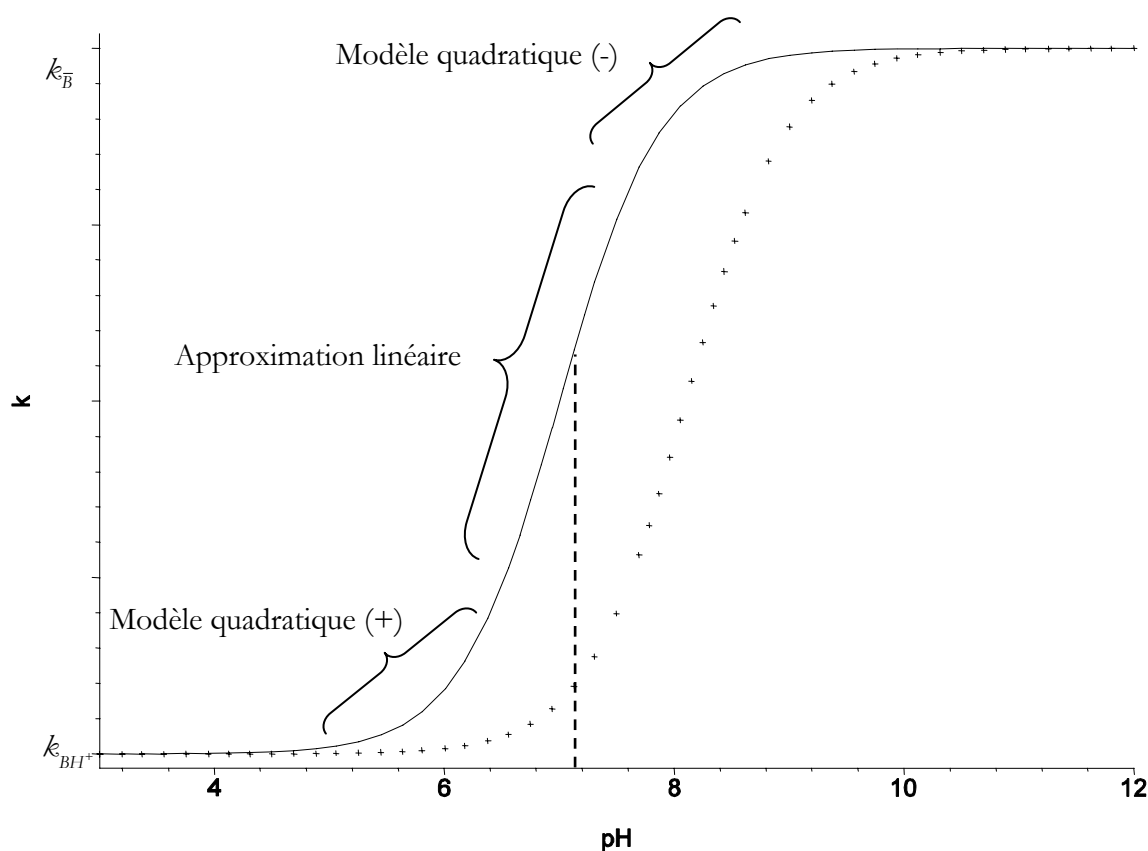


Figure VII-3 : Modélisation du facteur de rétention de composés basiques en fonction du pH apparent de la phase mobile ; pK_a fixés à 7,0 (trait plein) et à 8,1 (croix), la valeur de pH apparent (fixée pour l'exemple à 7,2) est figurée sous la forme de pointillés.

S'agissant de la clofazimine, pour les deux modificateurs organiques, la rétention se situe toujours dans le domaine de l'approximation linéaire. Quant à l'amiodarone, la modélisation de sa rétention nécessite un modèle quadratique pour les deux modificateurs organiques. D'après le Tableau VII-5, le coefficient du second degré est d'ailleurs deux fois plus important dans l'acétonitrile que dans le méthanol. Cette variation peut s'expliquer par la mise en jeu de phénomènes de solvation différentielle des espèces conjuguées du couple \bar{B}/BH^+ qui dépendent de la nature du solvant.

⁴⁵ Toutes les données disponibles faisant état d'une température à 25°C, nous ne pourrions pas évaluer le pH apparent de nos phases mobiles à 40°C. Néanmoins, l'élévation de température ne remettant pas en cause l'ordre des pH et pK_a apparents, le raisonnement exposé reste valable.

Les facteurs température et concentration, lorsqu'ils sont mis en évidence, s'avèrent faiblement influents. Pour la température, autant le coefficient pour la clofazimine est homogène avec ceux des composés neutres, autant l'inversion de signe constatée pour l'amiodarone s'avère difficile à expliquer de façon simple, des phénomènes compensateurs pouvant être mis en jeu. En effet, la hausse de la température provoque une élévation de la constante de dissociation, qui se traduit par une diminution de la concentration de BH^+ mais *a contrario* une augmentation de celle de SiO^- , phénomène pouvant expliquer au final une rétention ayant tendance à augmenter [110, 364]. Etant donnée la valeur relativement faible de Q^2 , nous ne discuterons pas plus en détails l'absence de ce comportement sur la clofazimine dans l'acétonitrile. Le facteur concentration, influent dans le méthanol uniquement, révèle sans équivoque la participation d'un mécanisme d'échange de cations à la rétention des composés basiques. Notons néanmoins que la qualité de prédiction du modèle est meilleure en méthanol, vraisemblablement grâce à la présence supplémentaire du facteur concentration et du terme d'interaction solvant*pH.

Quant à l'asymétrie de pic et à l'efficacité de l'amiodarone (résultats non figurés), le pH s'affirme comme le principal facteur influent, dans les deux modificateurs organiques, à l'exception de l'efficacité dans l'acétonitrile où aucun facteur n'est mis en évidence (valeurs très faibles pour R^2 et Q^2). L'accroissement du pH induit des réductions de l'asymétrie de pic et de la hauteur de plateau réduite, traduisant une meilleure efficacité. Ce phénomène, combiné à l'influence de la concentration sur les facteurs de rétention, possède certainement pour origine la diminution de la fraction de la base sous forme protonée pendant l'augmentation du pH : en partant du principe que la plupart des groupements silanol sont déjà dissociés, la part d'échange d'ions participant au mécanisme de rétention diminue avec le nombre de BH^+ , impliquant une meilleure symétrie de pic et consécutivement une meilleure efficacité.

VII.E.2.b Basse teneur en modificateur organique

Le Tableau VII-6 regroupe les résultats obtenus pour les coefficients normalisés des facteurs de rétention des composés hydrophiles, élus à basse teneur en modificateur organique.

Tableau VII-6 : Estimations des coefficients normalisés pour la modélisation des facteurs de rétention au niveau bas de solvant ; seuls les coefficients significatifs sont figurés.

	<i>Strychnine</i>		<i>d-Tubocurarine</i>		<i>Atropine</i>		<i>Ampicilline</i>	
Solvant	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN
Moyenne	5,01	5,17	6,48	14,10	4,54	5,18	3,04	1,22
%S	-4,79	-8,69	-8,76	-13,92	-4,54	-8,49	-4,43	-10,02
T	-2,14	-2,33	-2,87	-2,97	-1,76	-1,65	-1,59	-0,49
pH	6,86	6,42	13,37	12,26	5,59	5,85	2,23	3,22
Conc.	0,89	0,84			1,19	1,02		
%S*%S		0,86						
T*T								
pH*pH								
Conc.*Conc.								
%S*T								
%S*pH					-0,55			
%S*Conc.								
T*pH								
T*Conc.								
pH*Conc.			-1,57					
R^2	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00
Q^2	0,89	0,88	0,68	0,57	0,85	0,88	0,79	0,79

Chapitre VII

	<i>Cyanocobalamine</i>		<i>Vancomycine</i>		<i>Caféine</i>		<i>Benzylamine</i>	
Solvant	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN	MeOH	MeCN
Moyenne	4,89	3,05	1,83	0,98	3,61	2,51	0,75	0,63
%S	-9,17	-18,06	-9,36	-18,25	-4,41	-7,43	-2,14	-4,48
T	-3,30	-2,54	-2,91	-1,99	-1,93	-1,79	-1,13	-1,46
pH			4,74	5,62			6,18	6,83
Conc.							1,42	1,26
%S*%S								
T*T								
pH*pH								
Conc.*Conc.								
%S*T								
%S*pH								
%S*Conc.								
T*pH								
T*Conc.								
pH*Conc.						0,55		
R^2	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99
Q^2	0,68	0,85	0,78	0,81	0,72	0,80	0,84	0,70

Deux facteurs sont systématiquement mis en évidence : il s'agit de la teneur en modificateur organique et de la température.

Encore une fois, les qualités d'ajustement et de prédiction atteignent des valeurs élevées. La cyanocobalamine et la caféine se comportent comme des solutés neutres, puisque leur facteur de rétention ne dépend que de la teneur en modificateur organique et de la température. Pour la caféine, les coefficients sont comparables à ceux observés pour les composés hydrophobes dans le méthanol. Cependant, le coefficient de la teneur en solvant relatif à la cyanocobalamine s'avère deux fois plus important en comparaison avec les valeurs obtenues à haut niveau de solvant. Pour comprendre ce phénomène, qui s'accroît encore dans l'acétonitrile, il est nécessaire de prendre en compte tous les composés, y compris ceux dépendants du pH. Comme on constate des résultats similaires pour la vancomycine et que ces deux composés possèdent une masse moléculaire élevée, il nous paraît intéressant d'étudier une possible relation entre la masse moléculaire du composé et l'effet relatif de la teneur en solvant correspondant, représentée en Figure VII-4.

A la fois pour l'acétonitrile et le méthanol (non figuré), on note une dépendance en fonction de la masse des composés, mais uniquement pour les composés de nature hydrophile. Cette relation est deux fois plus intense dans le solvant non protique. L'existence même de cette dépendance semble prouver que les mécanismes mis en jeu à basse teneur en solvant diffèrent de ceux qui gouvernent la rétention à haut niveau de modificateur organique.

A faible niveau de solvant, la phase stationnaire est certainement moins bien solvatée par la phase mobile : le volume de phase se retrouve plus réduit, et l'état global, plus ramassé, sans qu'elle soit effondrée. En outre, l'élévation de la masse moléculaire entraînant aussi une augmentation du rayon apparent du soluté, elle affecte tous les paramètres qui régissent la rétention suivant la théorie solvophobe : la formation de la cavité, les interactions soluté-éluant ainsi que la surface de contact [365]. L'interaction hydrophobe s'exprimant d'autant plus que la phase mobile est riche en eau, il apparaît plus logique de la mettre en évidence à ce niveau de solvant plutôt qu'au précédent. Comme la théorie solvophobe englobe les mécanismes de partage et d'adsorption [366], il nous semble qu'à basse teneur en solvant, la rétention est plutôt régie par des phénomènes surfaciques, donc plutôt gouvernée par adsorption, tandis qu'à haut niveau de modificateur organique est privilégié un mécanisme de partage, par définition de nature volumique, autorisant le phénomène de pénétration des solutés dans la phase stationnaire.

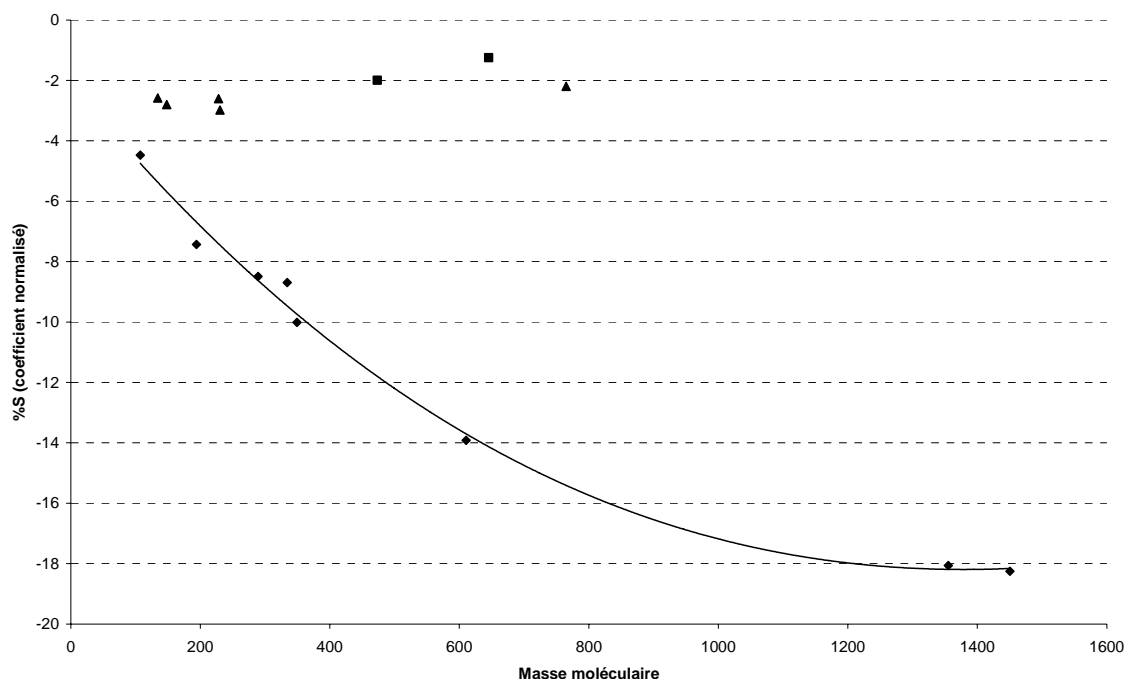


Figure VII-4 : Graphique du coefficient normalisé de la teneur en solvant en fonction de la masse moléculaire des solutés en acétonitrile ; ◆ composés hydrophiles ; ● composés basiques hydrophobes ; ■ composés neutres hydrophobes.

Pour tous les composés autres que la caféine et la cyanocobalamine, le pH s'avère être logiquement aussi un facteur influent de première catégorie. L'influence relative des facteurs principaux dépend de la nature du modificateur organique. Dans le méthanol, l'ordre d'influence constaté est $\text{pH} > \%S > T > \text{Conc.}$ tandis qu'en acétonitrile, on observe une inversion des deux premiers facteurs : $\%S > \text{pH} > T > \text{Conc.}$. Cette fois-ci, la teneur en solvant semble plus affecter les solutés hydrophiles ionisables que leur homologues hydrophobes et le pH se révèle moins influent qu'auparavant. Ainsi, la présence d'un terme quadratique n'est plus nécessaire pour assurer une bonne modélisation : puisqu'à basse teneur en solvant, les constantes d'acidité se rapprochent de celles observées dans l'eau, un modèle linéaire suffit, les zones de pH et de pK_a ne se recouvrant plus. Cependant, il est intéressant de relever l'inversion de l'effet de la concentration entre la basse et la haute teneur en solvant, lorsqu'il est révélé significatif. Autant à haut niveau de solvant, ce facteur traduisait la participation d'un mécanisme d'échange de cations à la rétention des composés basiques, autant à basse teneur en modificateur organique, cela ne semble pas être le cas. Les solutés basiques considérés sont très majoritairement sous forme ionisée aux niveaux de teneur considérés. En outre, la concentration en acétate de la phase mobile avoisine celle de la phase tamponnée purement aqueuse. Dès lors, il est possible d'envisager un mécanisme d'appariement d'ion entre les ions acétate CH_3COO^- et les bases BH^+ , selon la théorie de des ions structurants/déstructurants⁴⁶ [367-372] : la formation d'un complexe ionique entre l'acétate et la base ionisée produit un ensemble globalement neutre, par conséquent plus retenu par interactions apolaires avec la phase stationnaire que chaque sous-ensemble chargé. Cette contribution à la rétention dépend de l'accessibilité du groupement basique, donc de la conformation de la molécule basique chargée. Sur la *d*-tubocurarine, ce phénomène n'est pas mis en évidence, vraisemblablement pour cause de manque d'accessibilité des groupements basiques. Dans le cas contraire, la concentration en acétate, toujours largement supérieure à celle du soluté⁴⁷, se révélerait par un coefficient plus élevé que celui des composés monocationiques. L'absence de ce phénomène pour la *d*-tubocurarine est en outre confirmée par l'influence du facteur pH, deux fois plus importante que pour les autres composés basiques. En effet, le pH ne possède qu'une influence minimale sur la rétention des complexes.

⁴⁶ Cette théorie est connue sous le vocable anglo-saxon de « chaotropicity »

⁴⁷ Condition sine qua non à la formation de ces complexes ioniques

Chapitre VII

Concernant les asymétries de pics de l'atropine et de la benzylamine, la qualité d'ajustement du modèle est beaucoup trop réduite pour permettre une quelconque discussion sur l'influence des facteurs mis en évidence. Quant aux efficacités, on trouve par ordre d'influence le pH suivi de la concentration du tampon.

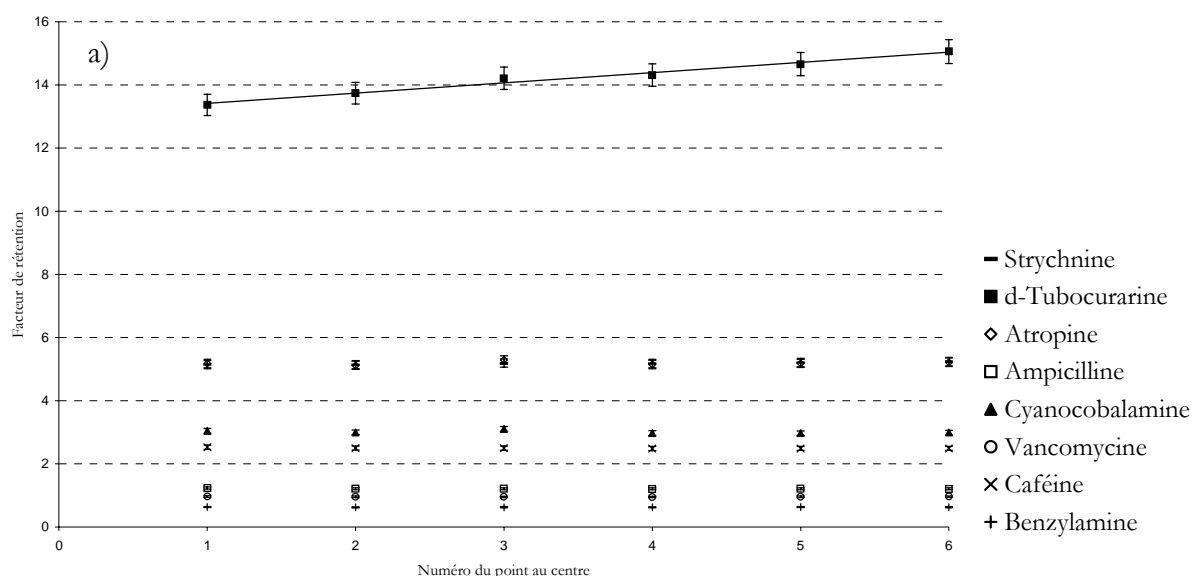
VII.E.3 Détermination du domaine de robustesse

L'objectif essentiel de ce chapitre consiste à définir un domaine de confiance, à l'intérieur duquel de petites variations expérimentales pourront être tolérées puisqu'elles n'affecteront pas les résultats de la procédure de test. La première étape consiste à estimer la répétabilité du test selon la procédure que nous avons décrite.

VII.E.3.a Mise en évidence du vieillissement

L'ANOVA à un facteur contrôlé démontre que la variabilité introduite par les points centraux est significative, et ceci pour toutes les réponses (résultats non détaillés). Ce phénomène n'est pas surprenant si on rappelle que la répétabilité du test se rapproche plus d'une variabilité journalière (« day-to-day reproducibility ») qu'une variabilité résiduelle obtenue dans les meilleures circonstances possible, comme celle d'injection. En outre, les valeurs obtenues sont tout à fait en accord avec celles de Visky et al. [262]. Dès lors, nous nous sommes attachés à approfondir notre étude pour vérifier le comportement des paramètres chromatographiques en fonction de l'ordre des points centraux, donc en fonction du temps, l'objectif étant d'estimer les incertitudes générées par de nouvelles préparations d'éluant. Un simple examen graphique de la Figure VII-5 permet déjà d'affirmer la présence d'une dérive temporelle dans le méthanol et encore plus prononcée dans l'acétonitrile, pour au moins un des composés, en l'occurrence la *d*-tubocurarine.

D'après notre expérience sur la procédure de test, cette sonde est extrêmement sensible à la présence d'impuretés métalliques, dont l'effet, déjà détaillé au Chapitre II, est illustré en Annexe 8. Eu égard à la durée de l'investigation (10 jours par colonnes soit pas moins de 15 L d'éluant, avec un volume moyen écoulé entre deux points centraux de 3 L), il n'est pas improbable qu'une contamination métallique provenant de l'appareillage puisse s'être produite [101], ce qui expliquerait l'élévation des facteurs de rétention des composés sensibles. De manière similaire, les asymétries de pic et les efficacités de ce composé dans le méthanol et dans l'acétonitrile se voient détériorées.



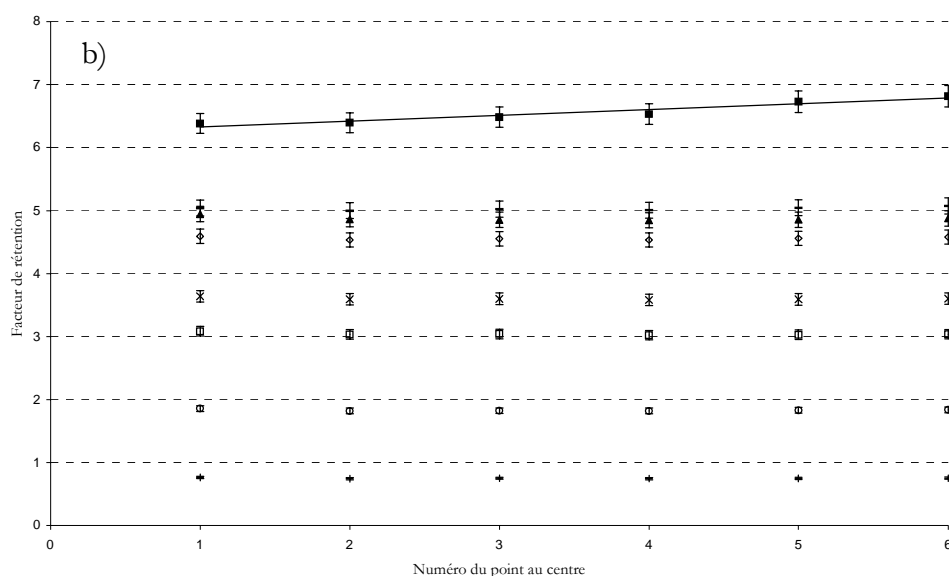


Figure VII-5 : Représentation graphique de la répétabilité des facteurs de rétention des solutés les plus hydrophiles du test avec pour modificateur organique a) l'acétonitrile, b) le méthanol.

Ainsi, l'approche rigoureuse que nous avons choisie permet de mettre en évidence un phénomène de vieillissement, certes limité, mais qui entache la répétabilité d'une erreur systématique menant à surestimer la répétabilité réelle du test.

VII.E.3.b Comparaison variabilité interlot/répétabilité du test

Dans le Tableau VII-7 figurent les dispersions relatives engendrées par la répétabilité du test (affranchie du biais temporel le cas échéant en prenant l'écart type lié de régression) et la fidélité interlot (résultats issus du Chapitre VI).

Tableau VII-7 : CV (%) engendrés sur les facteurs de rétention par la variabilité interlot et la répétabilité du test.

Soluté	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Répétabilité	Interlot	Répétabilité	Interlot
Digitoxine	0,50	1,57	0,29	2,99
Clofazimine	0,66	4,39	0,65	4,63
Amiodarone	0,37	3,28	0,29	3,41
Butylbenzène	0,29	1,00	0,47	1,03
Pentylbenzène	0,26	0,89	0,52	0,99
<i>o</i> -terphényle	0,27	0,90	0,50	1,02
Triphénylène	0,29	0,64	0,53	0,95
Strychnine	0,47	2,36	0,27	1,55
<i>d</i> -Tubocurarine	0,73	2,68	0,74	2,63
Atropine	0,50	2,76	1,65	1,74
Ampicilline	0,70	0,89	0,84	0,85
Cyanocobalamine	0,71	1,23	2,47	0,76
Vancomycine	0,78	1,83	3,70	2,11
Caféine	0,54	1,15	0,60	0,51
Benzylamine	0,89	4,41	0,72	2,66

Pour la plupart des solutés, la variabilité interlot s'avère supérieure à la répétabilité du test. Seules font exception la cyanocobalamine, la vancomycine et la caféine, uniquement en phase acétonitrile.

VII.E.3.c Construction du domaine de robustesse

Comme précédemment convenu, nous avons choisi la variabilité interlot (donnée dans le Tableau VII-7) pour déterminer le domaine robuste du test. Nous avons appliqué la procédure

Chapitre VII

décrite dans la section VII.D.3 à toutes les réponses, au rythme de 6 plans de courbe de niveaux par paramètre chromatographique. La Figure VII-6 illustre la construction d'un domaine de confiance.

Par souci de lisibilité, nous avons décomposé la construction selon le niveau de modificateur organique.

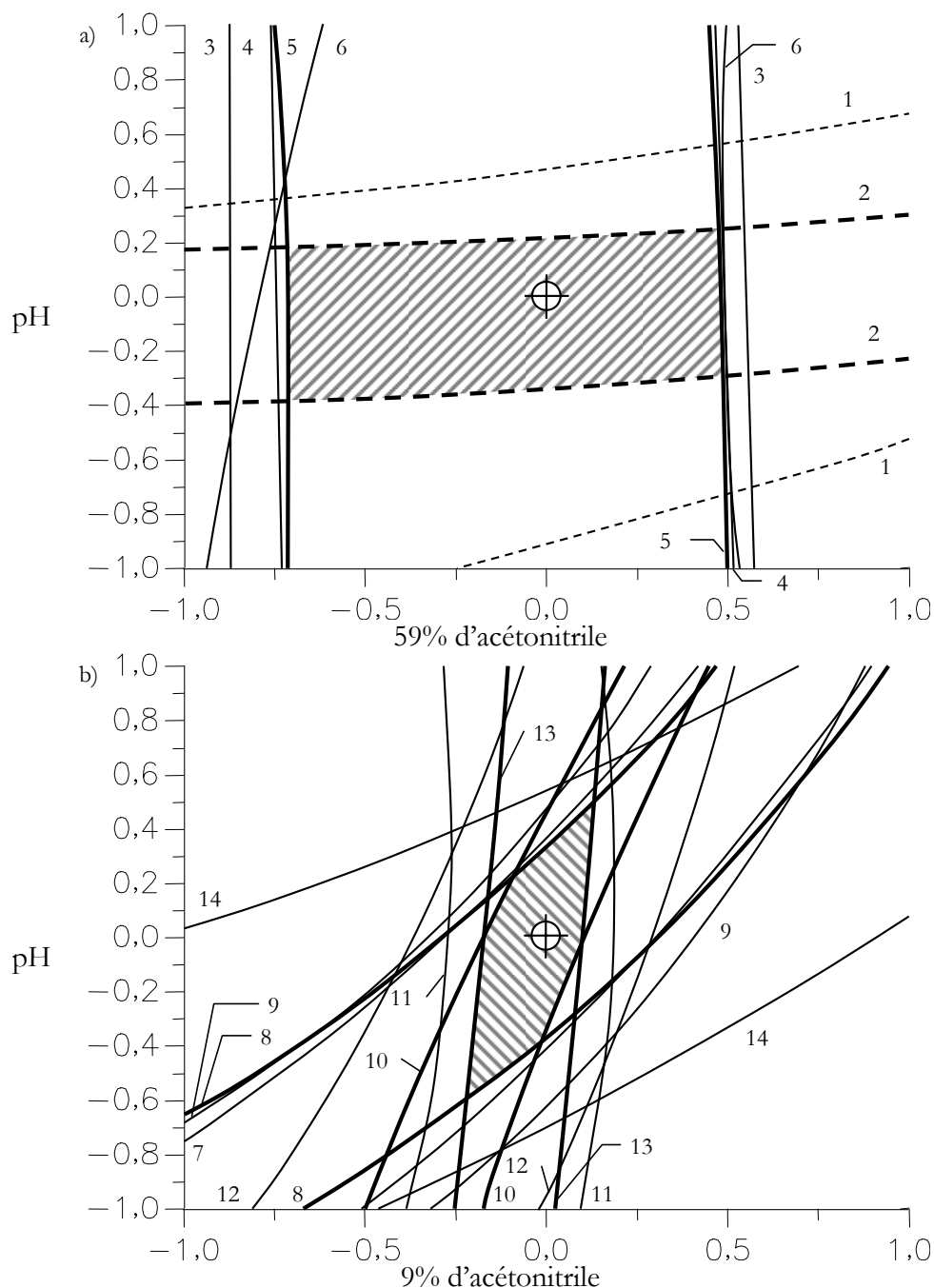


Figure VII-6 : Lignes de niveau correspondant aux valeurs limites des facteurs de rétention des analytes en fonction du pH et du niveau de teneur en acétonitrile : (a) haute teneur, (b) basse teneur ; (1) clofazimine, (2) amiodarone, (3) butylbenzène (4) pentylbenzène, (5) *o*-terphényle, (6) triphénylène, (7) strychnine, (8) *d*-tubocurarine, (9) atropine, (10) ampicilline, (11) cyanocobalamine, (12) vancomycine, (13) caféine, (14) benzylamine ; la mire situe les conditions nominales dans le domaine de robustesse.

Les lignes numérotées représentent les valeurs limites obtenues une fois appliqué le critère de tolérance sur les facteurs de rétention de chaque solutés. Les lignes en gras indiquent les niveaux limitants, qui définissent alors le domaine de confiance, figuré en zone hachurée. Nous n'avons pas fait figurer les lignes de niveaux de la digitoxine, ce composé n'étant pas limitant sur le domaine considéré. La Figure VII-6a démontre que les frontières du domaine robuste dépendent des propriétés physico-chimiques des composés : les sondes neutres sont limitantes en terme de teneur en solvant tandis que les basiques, dont les lignes de niveaux sont figurées en

pointillés, s'avèrent restrictives en pH. Au contraire, les lignes diagonales de la Figure VII-6b soulignent le fait que l'effet des facteurs pH et teneur en solvant est similairement limitant pour les composés basiques. Ceci confirme, si besoin est, les différences de prépondérance de mécanismes de rétention à haute et basse teneur en solvant. Notons par ailleurs une surface de tolérance plus réduite à faible qu'à forte teneur en solvant dans ce cas précis. Le domaine de robustesse résulte au final de l'intersection des deux surfaces intermédiaires issues de la Figure VII-6, pour aboutir au diagramme $y=f(\%MeCN, pH)$ de la Figure VII-7 (en haut à gauche), qui rassemble tous les résultats obtenus pour les domaine de robustesse. Au final, seuls trois composés s'avèrent limitants pour notre exemple de construction : l'amiodarone, l'ampicilline et la caféine.

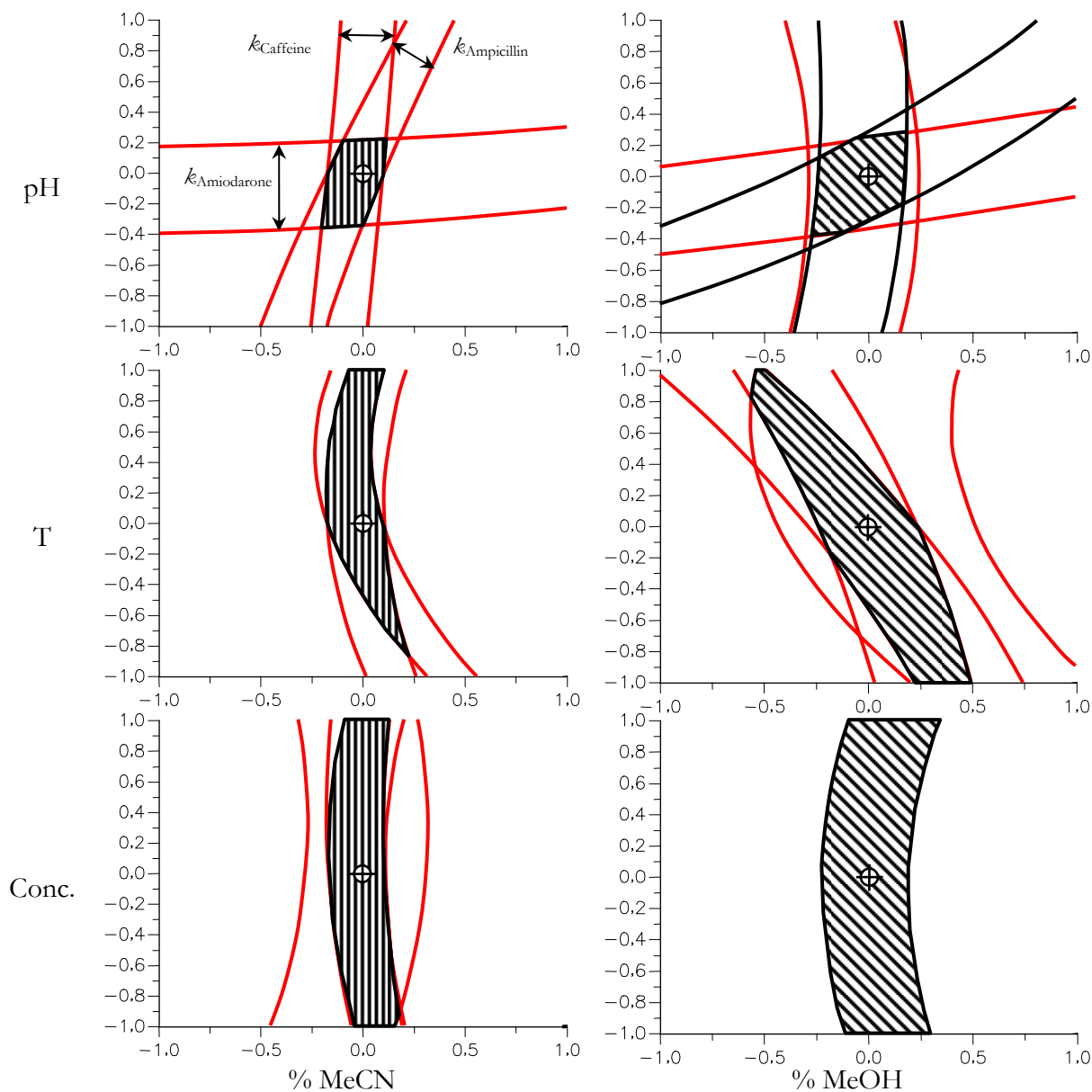


Figure VII-7 : Domaines robustes (régions hachurées) en acétonitrile (à gauche) et en méthanol (à droite) en fonction du pH, de la température et de la concentration du tampon ; la mire indique l'emplacement du point au centre.

Tout d'abord sur la Figure VII-7, les conditions nominales sont relativement bien centrées dans les domaines de confiance, confirmant *a posteriori* le bien-fondé de nos précédents résultats. Ensuite, les régions obtenues dans les phases mobiles contenant de l'acétonitrile s'avèrent toujours plus restreintes que celles contenant du méthanol. Ce phénomène peut être expliqué par l'effet masquant de ce dernier : au contraire de l'acétonitrile, le méthanol est capable d'interagir avec les silanols résiduels et les analytes par liaisons H. En conséquence, les éluants à base d'acétonitrile sont plus enclins à révéler des interactions potentielles entre les solutés et le support chromatographique, en rendant les sondes plus sensibles de fait. Dès lors, on peut

Chapitre VII

s'attendre à une discrimination facilitée des supports en acétonitrile. Néanmoins ce possible effet de meilleure sensibilité, qui reste à vérifier, ne procure pas que des avantages : afin de préserver au test un niveau de confiance similaire à celui de méthanol, les domaines de robustesse se voient d'autant plus réduits que leur pouvoir d'exploration augmente, nécessitant une meilleure maîtrise encore des conditions expérimentales. D'un point de vue purement pratique, le Tableau VII-8 résume les écarts maxima tolérés aux conditions nominales.

Tableau VII-8 : Limites de tolérance des conditions nominales.

<i>Test</i>	<i>Fraction de solvant (m/m)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Concentration (mM)</i>
MeCN	± 0,05%	± 0,4	± 0,05	± 3
MeOH	± 0,08%	± 0,4	± 0,05	± 3

Au final, les domaines de robustesse pourraient paraître plutôt restreints. Cependant, rappelons que les variations délibérément imposées pendant l'étude de robustesse se doivent d'être contrôlées et comparées aux erreurs expérimentales susceptibles de se produire. Par exemple, prenons le cas d'une préparation de phase mobile de 400 g contenant 70% de méthanol : réaliser une erreur de 0,05%, correspondant au dixième du domaine d'étude, représente une erreur de pesée de 0,2 g, valeur largement supérieure à l'erreur de lecture d'une balance classique de précision (cas le plus défavorable : 0,1 g). Ainsi, même si les domaines de robustesse peuvent sembler réduits, il faut se garder de conclure hâtivement : la procédure de test offre un espace de robustesse suffisant dans l'optique d'un transfert vers d'autres laboratoires. Il faut néanmoins souligner qu'un tel niveau de précision n'aurait jamais pu être atteint avec une préparation volumétrique des phases mobiles, renforçant ainsi notre choix pour les conditions du protocole expérimental.

VII.F Conclusion

Nous avons évalué la robustesse de notre procédure de test et la méthodologie proposée a permis de mettre en lumière les différentes possibilités d'investigation de la méthode des plans d'expériences. En premier lieu, elle nous a autorisé la visualisation des régions robustes en fonction de la nature du modificateur organique, de la température, du pH et de la concentration du tampon aqueux, et par conséquent les écarts que peut tolérer le protocole lors de l'application de la procédure de test. En second lieu, la méthode est apparue comme un outil précieux pour éclairer les mécanismes d'interactions qui gouvernent la rétention, suivant les propriétés physico-chimiques des solutés. A ce stade, nous avons pu établir le domaine de confiance du test. Cette étape était indispensable avant d'ajouter de nouvelles phases stationnaires à notre base de données et de regrouper les colonnes par propriétés similaires. L'extension de la base de données, nécessaire pour confirmer le pouvoir de caractérisation du test, permettra d'affiner l'interprétation de nos classifications. Ces dernières seront d'autant plus utiles au choix rationnel d'une colonne en phase de développement de méthode qu'elles seront compréhensibles. En outre, si le test s'avère assez discriminant, nous serons alors en mesure d'assurer le suivi des colonnes en cours d'utilisation et donc de définir une durée d'utilisation robuste.

Une fois achevées l'évaluation de la dispersion interlot et l'étude de robustesse, nous pouvons finaliser le couplage de ces deux derniers chapitres, déjà amorcé lors de la construction des domaines de confiance.

Lors de la construction des régions robustes, nous nous étions contentés de prendre le maximum des coefficients de variation entre ceux introduits par le facteur lot et ceux produits par la répétabilité du test : peu nous importait au final la significativité du facteur lot, pour deux valeurs voisines de dispersion due au lot ou à la répétabilité du test, le but étant alors d'ouvrir les domaines de robustesse autant que possible.

Par définition, le test « robuste » n'est plus capable de distinguer des colonnes de même phase stationnaire possédant une dispersion interlot similaire ou inférieur à celle de la SymmetryShield RP18. Il s'agit désormais de savoir, si en adoptant des conditions similaires à celles prises pour l'étude interlot, c'est-à-dire en adoptant des critères stricts pour limiter la variabilité de préparation, notamment l'utilisation d'un tampon de pH unique, le test est réellement capable de mettre en évidence l'interlot. Pour cela, nous avons effectué une simple comparaison statistique des coefficients de variation, avec pour fonction discriminante

$$F = \frac{CV(\%)_{Lot}^2}{CV(\%)_{Répétabilité}^2}. \text{ Le Tableau VII-9 récapitule les résultats concernant la phase}$$

SymmetryShield RP18.

Tableau VII-9 : Comparaison des coefficients de variation des facteurs de rétention pour la phase SymmetryShield en méthanol et en acétonitrile.

Solvant	<i>MeOH</i>				<i>MeCN</i>			
Soluté	<i>Source de variation</i>		<i>Test F</i>	<i>Proba</i>	<i>Source de variation</i>		<i>Test F</i>	<i>Proba</i>
	<i>Lot</i>	<i>Répétabilité</i>			<i>Lot</i>	<i>Répétabilité</i>		
Digitoxine	1,570	0,496	10,022	1,78E-02	2,985	0,287	107,941	7,71E-05
Clofazimine	4,388	0,659	44,274	6,60E-04	4,632	0,653	50,289	4,88E-04
Amiodarone	3,281	0,370	78,768	1,66E-04	3,408	0,289	138,671	4,17E-05
Butylbenzène	1,004	0,292	11,845	1,27E-02	1,034	0,468	4,886	6,67E-02
Pentylbenzène	0,894	0,255	12,276	1,18E-02	0,992	0,520	3,649	1,05E-01
o-Terphényle	0,897	0,267	11,251	1,41E-02	1,023	0,504	4,128	8,74E-02
Triphénylène	0,642	0,288	4,955	6,51E-02	0,953	0,527	3,271	1,24E-01
Strychnine	2,364	0,469	25,405	2,40E-03	1,553	0,271	32,847	1,33E-03
d-Tubocurarine	2,683	0,731	13,483	9,68E-03	2,626	0,741	12,545	1,13E-02
Atropine	2,757	0,495	31,084	1,51E-03	1,740	1,650	1,112	3,99E-01
Ampicilline	0,893	0,701	1,621	2,87E-01	0,824	0,844	0,954	4,46E-01
Cyanocobalamine	1,228	0,713	2,968	1,41E-01	0,719	2,469	0,085	9,20E-01
Vancomycine	1,825	0,781	5,461	5,53E-02	2,048	3,695	0,307	7,48E-01
Caféine	1,153	0,542	4,517	7,58E-02	0,416	0,600	0,479	6,45E-01
Benzylamine	4,408	0,890	24,539	2,60E-03	2,660	0,717	13,771	9,25E-03

En prenant un risque de première espèce α fixé à 0,10 (au lieu de 0,05 classiquement en raison du faible nombre de degré de liberté du facteur lot), le test permet de distinguer les lots de la phase SymmetryShield dans le méthanol. Cependant dans l'acétonitrile, il s'avère plus délicat de les distinguer. En effet, deux des composés de Tanaka s'avèrent peu informatifs tandis qu'à bas niveau de solvant, seuls trois composés sont capables de mettre en évidence le facteur lot.

Concernant la phase XTerra RP 18, dont les résultats de la comparaison figurent dans le Tableau VII-10, le constat se révèle assez simple à formuler : le test n'est capable de distinguer des lots différents qu'à haute teneur en solvant. A bas niveau de solvant, la répétabilité du test s'avère trop médiocre pour prétendre révéler une dispersion interlot aussi réduite. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les phases sélectionnées pour cette étude sont de générations récentes et leur variabilité interlot est jugée satisfaisante par leurs utilisateurs mais aussi certains fournisseurs [243].

Tableau VII-10 : Comparaison des coefficients de variation des facteurs de rétention pour la phase XTerra en méthanol et en acétonitrile.

Solvant	MeOH				MeCN			
Soluté	Source de variation		Test F		Source de variation		Test F	
	Lot	Répétabilité		Proba	Lot	Répétabilité		Proba
Digitoxine	1,84	0,496	13,756	9,27E-03	2,39	0,287	69,271	2,26E-04
Clofazimine	0,99	0,659	2,275	1,98E-01	4,00	0,653	37,464	9,79E-04
Amiodarone	0,93	0,370	6,363	4,23E-02	1,70	0,289	34,648	1,17E-03
Butylbenzène	1,47	0,292	25,434	2,40E-03	1,24	0,468	6,989	3,56E-02
Pentylbenzène	1,61	0,255	39,671	8,56E-04	1,30	0,520	6,220	4,40E-02
o-Terphényle	1,20	0,267	20,229	4,01E-03	1,08	0,504	4,564	7,45E-02
Triphénylène	1,59	0,288	30,264	1,61E-03	1,06	0,527	4,048	9,01E-02
Strychnine	0,45	0,469	0,918	4,58E-01	0,28	0,271	1,058	4,14E-01
d-Tubocurarine	< 0,45	0,731			0,80	0,741	1,161	3,85E-01
Atropine	< 0,31	0,495			0,34	1,650	0,042	9,59E-01
Ampicilline	1,38	0,701	3,867	9,66E-02	1,05	0,844	1,562	2,97E-01
Cyanocobalamine	0,67	0,713	0,875	4,72E-01	1,02	2,469	0,170	8,48E-01
Vancomycine	1,00	0,781	1,645	2,82E-01	1,05	3,695	0,081	9,23E-01
Caféine	1,25	0,542	5,316	5,79E-02	0,58	0,600	0,935	4,52E-01
Benzylamine	1,68	0,890	3,563	1,09E-01	1,31	0,717	3,336	1,20E-01

En appliquant le test dans les conditions strictes de l'interlot, l'utilisateur peut espérer mettre en évidence des dispersions analogues ou supérieures à celle de la XTerra, mais uniquement à haut niveau de solvant. A bas niveau de solvant, les différences entre les lots paraissent s'atténuer : il peut s'agir d'un nivellement de la variabilité dans des conditions fortement aqueuses comme de l'atteinte de la limite de détection du test, même avec un protocole astreignant en terme de préparation pour en limiter l'impact sur les résultats.

La phase de développement de notre test est désormais achevée. Seulement, à l'issu de la réduction optimale des conditions, les interprétations physico-chimiques des classifications alors obtenues sont encore assez limitées. Capable de distinguer sans équivoque des phases stationnaires – volontairement – différentes, l'application du test à un plus grand nombre de phases nous autorisera à :

1. Vérifier le pouvoir discriminant de l'outil mis en place, avec la volonté de mettre en évidence des différences entre des colonnes de conception proche et des effets dus au vieillissement ;
2. Approfondir les interprétations physico-chimiques des classifications, afin d'en améliorer leur compréhension.

Avec comme objectif final la caractérisation de chacune des phases testées au moyen de cartes d'identité, l'extension de notre base de données nous permettra d'accéder pour chaque descripteur, dont nous connaissons désormais le degré de robustesse, à son informativité. Cette notion nous faisait défaut jusqu'à présent puisque nous avons développé notre test sur un jeu très partiel de colonnes. Ensuite, il sera possible de construire, et non de choisir *a priori*, des descripteurs qui réalisent les meilleurs compromis informativité/robustesse pour établir les cartes d'identité.

Partie C : Applications

Chapitre VIII Extension de la base de données

VIII.A *Introduction*

Une fois notre méthodologie de caractérisation développée, il est désormais possible de l'appliquer de façon fiable à un nombre plus élevé de phases stationnaires. L'extension de la base de données présente de multiples objectifs :

1. Visualiser comment se traduisent les dispersions interlot sur les classifications ;
2. Vérifier que le test est capable de discerner des phases stationnaires différentes mais possédant un comportement chromatographique éventuellement proche ; les différences entre les phases peuvent se révéler plus petites que lors de la sélection des conditions du test, où les phases étaient volontairement très distinctes ;
3. Explorer la capacité du test à assurer le suivi des phases stationnaires dans l'optique de la mise en place d'un contrôle de réception de nouveaux lots et d'un test de conformité ; celui-ci peut s'appliquer à des colonnes neuves comme à des colonnes usagées pour juger de leur évolution dans le temps ;
4. Approfondir l'interprétation physico-chimique des classifications.

Ce dernier point représente une étape indispensable à la construction à partir de descripteurs pertinents de « cartes d'identité » des phases stationnaires. Ainsi, nous pouvons mieux appréhender la signification non seulement des composantes principales, mais aussi des paramètres chromatographiques utilisés pour leur détermination, et leur attribuer un sens physico-chimique de façon objective.

VIII.B *Conditions expérimentales*

VIII.B.1 **Instrumentation**

Nous avons utilisé trois chaînes chromatographiques distinctes, décrites en Annexe 4.

VIII.B.2 **Conditions chromatographiques**

Les conditions chromatographiques du test ont été établies à l'issue du Chapitre V. Le protocole détaillé figure dans l'Annexe 6.

VIII.B.3 **Colonnes testées**

Le Tableau VIII-1 regroupe les 42 colonnes auxquelles nous avons appliqué la procédure de test. Constitué de 35 phases stationnaires différentes, ce panel, bien entendu non exhaustif, est représentatif des colonnes utilisées pour le développement des méthodes dans l'industrie pharmaceutique. A l'exception des colonnes Symmetry C18 (250*4,6 mm), SymmetryShield RP8 et Chromolith Performance RP18-e (100*4,6 mm), toutes sont de dimensions 150*4,6 mm.

Tableau VIII-1 : Caractéristiques disponibles des colonnes testées.

Phase stationnaire	\bar{D}	d_p	% C	S_p	Fournisseur	Commentaires ⁴⁸	Abréviation
Capcell Pak C8 UG 120	12	5	10	300	Shisheido	1a; 3b; 4c	E8_1
XTerra RP 8	12,5	3,5	13,37	174	Waters	1b; 2a; 5a	P8_1
Discovery RP Amide C16	18	5	12,04	198	Supelco	1a; 2b; 5a	P16_1
XTerra RP 18	12,5	3,5	14,42	172	Waters	1b; 2a; 5a	P18_1
SymmetryShield RP 18	10	3,5	17,04	339	Waters	1a; 2a; 5a	P18_2
Zorbax Eclipse XDB-C8	8	5	7,6	180	Agilent	1a; 5a	C8_1
Symmetry C8	10	5	12,15	344	Waters	1a; 5a	C8_2
Kromasil C8	10	5	12	340	Akzo Nobel	1a; 5a	C8_3
J'sphere ODS-H80	8	4	22	—	YMC	1a; 3a; 4c; 5c	C18_1
Zorbax StableBond C18	8	3,5	10	180	Agilent	1a; 4b	C18_2
Nucleosil C18 HD	10	5	20	350	Macherey-Nagel	1a; 5a	C18_3
Symmetry C18	10	5	19,45	341	Waters	1a; 5a	C18_4
Aquasil C18	10	5	12	310	ThermoHypersil	1a; 5b	A18_1
Zorbax Stable Bond Aq	8	5	—	180	Agilent	1a; 4c; 5c	A18_2
YMC-Pack ODS-AQ	12	4	14	300	YMC	1a; 5b	A18_3
Synergi Hydro-RP	8	4	19	475	Phenomenex	1a; 5b	A18_4
Uptisphere HDO	12	5	16	324	Interchim	1a; 4c; 5b	A18_5
Luna C8 (2)	9,7	5	14,15	421	Phenomenex	1a; 5a	C8_4
Zorbax Stable Bond C8	8	3,5	5,5	180	Agilent	1a; 4a	C8_5
Zorbax Eclipse XDB-C8	8	5	7,6	180	Agilent	1a; 5a	C8_6
Symmetry C18 (usagée)	10	5	19,1	335	Waters	1a; 5a	C18_5
Chromolith Performance RP-18e	13	(5)	18	300	Merck	1c; 5a	C18_6
Discovery C18	18	5	12,44	199	Supelco	1a; 5a	C18_7
Uptisphere ODB	12	5	17,4	330	Interchim	1a; 5a	C18_8
Uptisphere NEC	12	5	16	333	Interchim	1a	C18_9
Uptisphere HSC	—	5	19,2	—	Interchim	1a; 5a	C18_10
Uptisphere TF	—	5	13,3	—	Interchim	1a; 3c; 4c; 5a	C18_11
BetaMax Neutral	6	5	29	—	ThermoHypersil	1a; 5a	C18_12
Nucleodur 100-5 C18 EC	11	5	17,5	—	Macherey-Nagel	1a; 5a	C18_13
Nucleodur C18 Gravity	11	5	18	—	Macherey-Nagel	1a; 5a	C18_14
Hypersil GOLD	17,5	5	10	220	ThermoHypersil	1a; 5a	C18_15
HyPURITY Advance	—	5	—	—	ThermoHypersil	1a; 2b; 5a	P8_2
SymmetryShield RP8	10	3,5	14,73	343	Waters	1a; 2a; 5a	P8_3
Polaris C18-A	8	5	—	220	Ansys	1a; 2d; 5a	P18_3
Polaris Amide C18	8	5	—	220	Ansys	1a; 2b; 5a	P18_4
Polaris C18-Ether	8	5	—	220	Ansys	1a; 2c; 5a	P18_5
SymmetryShield RP 18	10	3,5	17,5	340	Waters	1a; 2a; 5a	P18_6
SymmetryShield RP 18	10	3,5	17,48	340	Waters	1a; 2a; 5a	P18_7
SymmetryShield RP 18	10	3,5	17,46	340	Waters	1a; 2a; 5a	P18_8
XTerra RP 18	12,5	3,5	14,77	182	Waters	1b; 2a; 5a	P18_9
XTerra RP 18	12,5	3,5	14,62	176	Waters	1b; 2a; 5a	P18_10
XTerra RP 18	12,5	3,5	14,6	176	Waters	1b; 2a; 5a	P18_11

48

N°	Commentaires	a	b	c	d
1	Type de silice	Sphérique Ultra pure	Sphérique Hybride	Monolithique	
2	Groupe polaire intercalé *	Carbamate	Amide	Ether	Non spécifié
3	Type de greffage**	Polymérique	Encapsulation polymérique	Trifonctionnel	
4	Base du greffon***	Diisopropylalkyle	Diisobutylalkyle	Non spécifié	
5	Endcapping*	Apolaire	Polaire	Non spécifié	
* si présent ** autre que monomérique *** autre que diisométhylalkyle					

Pour plus de lisibilité et d'homogénéité au niveau des classifications, nous avons repris les conventions d'abréviation employées au Chapitre V. Les phases sont donc identifiées de la manière suivante :

1. La première lettre correspondant à l'initiale relative à la nature de la phase : A traduit la présence d'un type Aqua, C, celle d'un greffon purement hydroCarboné, P, celle d'un groupement Polaire intercalé et E dénote une Encapsulation polymérique ;
2. La longueur de la chaîne alkyle : 8, 16 ou 18 atomes de carbone ;
3. Le numéro de test, incrémenté au fur et à mesure du nombre de colonnes caractérisées appartenant à une même catégorie.

VIII.C Préliminaires à l'exploitation : étude de la rétention moyenne des solutés

Résultant de l'ajout de phases stationnaires, la connaissance expérimentale du test nous a conduit à examiner la pertinence de certains composés qui génèrent des paramètres chromatographiques moins fiables, de par le bruit qu'ils introduisent face à l'information réelle qu'ils transmettent sur la phase stationnaire testée. Sont donc mis sur la sellette les solutés peu retenus, avec un facteur de rétention moyen inférieur à 2. Cette ultime étape de sélection n'était réalisable qu'après avoir testé un nombre plus élevé de phases. Néanmoins, la procédure d'élimination ne peut se fonder sur le seul critère de la valeur moyenne de rétention. Il faut en effet aussi considérer son coefficient d'information $CI^{(0)} = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{x}} \times 100^{49}$: une amplitude de variation réduite ($CI < 50\%$) signifie un nivellement de l'information, auquel cas le composé correspondant pourra être exclu du test. Dans le cas inverse, il faudra examiner les « loading plots » : seront éliminés les candidats qui s'avèrent être proches à la fois :

- De l'origine du repère, ce qui traduit un faible apport d'information ;
- Des autres solutés, ce qui signifie une information redondante avec ces derniers.

Le Tableau VIII-2 regroupe les valeurs moyennes des facteurs de rétention et les coefficients de variation relatifs à chaque soluté, sur l'ensemble des 42 colonnes testées.

Tableau VIII-2 : Moyennes et coefficients d'information des facteurs de rétention des solutés sur les 42 colonnes testées.

Soluté	MeCN		MeOH		2 solvants	
	Moyenne	CI (%)	Moyenne	CI (%)	Moyenne	CI (%)
Digitoxine	0,62	38,35	1,80	47,64	1,21	71,46
Clofazimine	4,19	88,55	2,42	55,63	3,30	88,18
Amiodarone	12,28	108,46	14,17	84,79	13,23	95,61
Butylbenzène	5,34	53,57	5,39	60,72	5,36	56,95
Pentylbenzène	7,87	57,76	8,19	65,24	8,03	61,45
<i>o</i> -Terphényle	6,55	52,58	7,38	62,97	6,97	58,66
Triphénylène	7,67	52,67	10,81	62,19	9,24	62,07
Ampicilline	1,14	29,29	3,79	44,18	2,46	72,84
Atropine	6,75	46,79	7,15	53,81	6,95	50,42
Benzylamine	0,70	34,52	0,90	41,69	0,80	41,15
Caféine	2,57	42,38	4,81	60,61	3,69	66,68
Cyanocobalamine	2,93	67,59	7,14	94,63	5,03	106,87
Strychnine	6,89	60,72	9,13	91,12	8,01	82,88
Vancomycine	0,69	39,88	1,51	42,64	1,10	58,38
<i>d</i> -Tubocurarine	20,74	73,33	13,88	110,34	17,31	89,87

⁴⁹ Le coefficient d'information est calculé comme celui de variation, mais la qualification diffère dans un souci de clarté ; il s'agit d'employer la variation non pas au sens classique du terme, mais au sens de l'analyse multivariée, ou variation équivaut à information. Au lieu d'estimer statistiquement une dispersion, le CI traduit une mesure d'information. Ainsi, plus le coefficient d'information est élevé, plus le paramètre chromatographique est porteur d'information.

Chapitre VIII

La benzylamine possédant un facteur de rétention systématiquement inférieur à 1, elle est écartée définitivement du test. Les autres composés susceptibles d'être éliminés sont la digitoxine et la vancomycine à cause de leur faible facteur de rétention. Par contre, leurs cas ne peuvent s'affranchir d'une discussion au regard des « loading plots », qui sera menée préalablement à l'interprétation des classifications.

Notons que les conditions chromatographiques s'avèrent remarquablement isoéluantes pour le pentylbenzène et plus encore pour le butylbenzène, composés à partir desquels nous avons basé notre définition du rapport isoéluant, ce qui le valide *a posteriori*.

VIII.D Résultats et discussion

VIII.D.1 Principe

L'ajout de phases stationnaires permet d'étoffer les classifications descriptives. En outre, les « loading plots » devraient avoir gagné en lisibilité suite à la réduction du test⁵⁰ et leur utilisation peut désormais être envisagée.

L'invariance des classifications entre le développement de la procédure de caractérisation et celles obtenues par l'application du test aux 42 colonnes pourra être un argument supplémentaire en faveur du test. D'un point de vue pratique, savoir dans quelles zones de l'espace des composantes principales se situent les colonnes ne revêt que peu d'intérêt si l'on ignore la signification physico-chimique des axes. Pour pallier ce défaut d'interprétation, nous utiliserons les « loading plots », désormais exploitables, interactivement avec les « score plots », de manière à converger vers des interprétations physico-chimiques des classifications, que l'examen des chromatogrammes permettra de valider.

A l'étape d'interprétation physico-chimique des classifications succédera celle de leur exploitation, raison pour laquelle la discussion relative aux « score plots » sera volontairement limitée dans la section VIII.D.2 pour être détaillée dans la section VIII.D.3.

A l'exception du cas de l'amiodarone, comme les asymétries et les efficacités ne se sont pas révélées être des paramètres robustes, nous poursuivrons notre étude uniquement sur les facteurs de rétention.

VIII.D.2 Interprétation physico-chimique des classifications obtenues par Analyse en Composantes Principales

Avec l'ajout des nouvelles colonnes, l'ACP globale sur les facteurs de rétention semble perdre de son pouvoir discriminant. Pour y remédier, nous avons effectué des ACPs selon la fraction de modificateur organique, ce qui s'avère plus pertinent tout en assurant l'invariance des classifications ainsi obtenues par rapport à celles issues du test réduit. Ce phénomène souligne les différences au niveau des mécanismes régissant la rétention suivant la fraction de modificateur organique mise en jeu.

Conformément à la convention du Chapitre V, le solvant de test apparaît symboliquement sous la forme d'un cercle pour le méthanol et d'un triangle pour l'acétonitrile.

VIII.D.2.a Analyse en Composantes Principales à haut niveau de solvant

VIII.D.2.a.i Description générale de la classification

La Figure VIII-1 représente la classification obtenue à haute teneur en modificateur organique avec tous les solutés, y compris la digitoxine. La classification recouvre 88% de l'information totalement disponible.

⁵⁰ Initialement, l'utilisation des « loading plots » pour l'interprétation n'était pas envisageable du fait de leur organisation en forme de nébuleuse, traduisant de fortes corrélations entre les variables d'origine.

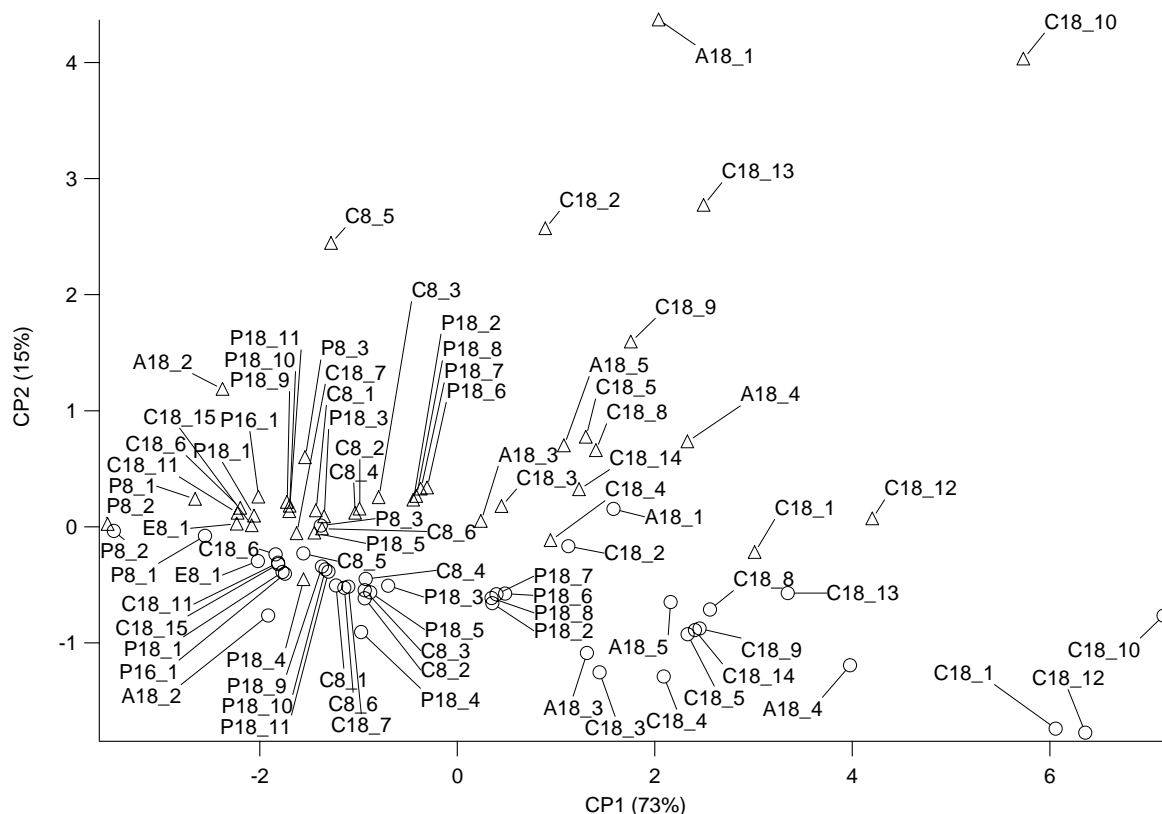


Figure VIII-1 : « Score plot » CP1-CP2 obtenus sur les facteurs de rétention à haut niveau de solvant.

Nous retrouvons des comportements similaires aux classifications précédemment obtenues :

1. Selon CP1, les phases se répartissent en fonction de leur hydrophobie. L'ordre observé est en effet globalement le suivant : C8 à groupement polaire enchâssé < C8 haute densité ~ C18 à groupement polaire enchâssé < C18 < C18 haute densité.
2. Selon CP2, on observe un éclatement de la classification suivant le solvant de test, toutes les colonnes testées dans l'acétonitrile se situant dans la partie supérieure du plan, et celles évaluées dans le méthanol, dans la partie inférieure.
3. Dans le plan CP1-CP2, la classification possède toujours une forme de V, traduisant un effet non linéaire du modificateur organique.

Pour mieux comprendre cette classification, il faut élucider le mécanisme qui gouverne la séparation suivant le solvant de test, ainsi que l'origine de l'étendue différente de la répartition des couples colonnes/solvant selon la nature du solvant. A cette fin, il nous faut compléter l'étude par l'examen des « loading plots », qui permettra en outre de discuter de l'éventuel rejet de la digitoxine.

VIII.D.2.a.ii Interprétation des « loading plots » correspondants

La Figure VIII-2 présente les « loading plots » relatifs aux plans CP1-CP2 et CP2-CP3. La digitoxine ne possédant dans son voisinage aucune autre variable, ce qui est synonyme d'une information apportée non redondante, elle sera conservée dans la suite du test.

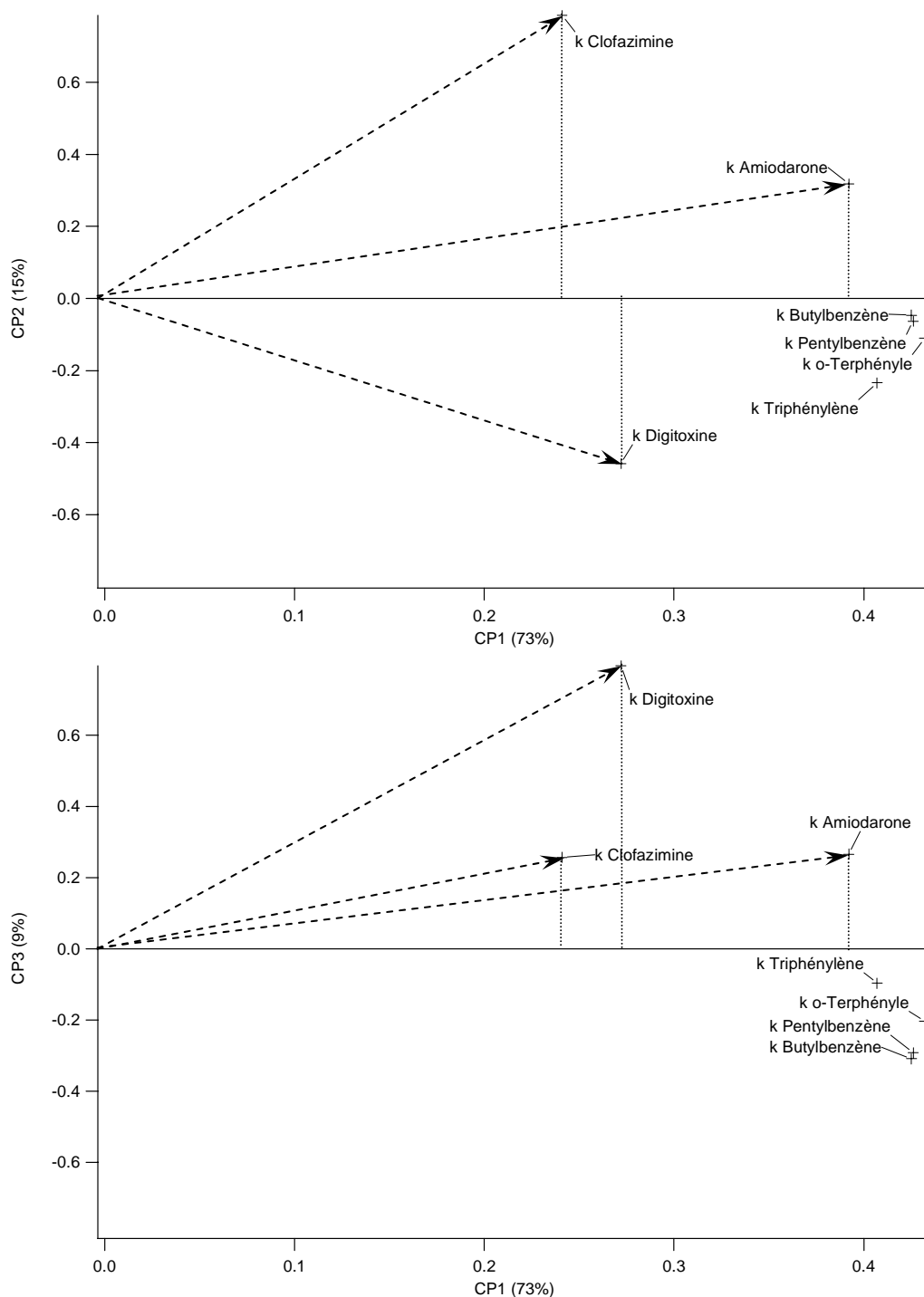


Figure VIII-2 : « Loading plots » CP1-CP2 et CP2-CP3 des facteurs de rétention obtenus à haut niveau de solvant.

Les trois premières composantes principales traduisent à elles seules 97% de l'information totale disponible. La première composante est définie essentiellement par des composés de Tanaka, neutres hydrophobes (vecteurs quasi-colinéaires à CP1)⁵¹.

Concernant les deux premières composantes principales, elles ne sont pas simplement définies par une catégorie unique de composés : par exemple, les composés basiques participent à la définition de CP2 de même qu'ils contribuent aussi à celle de CP1. Ce phénomène ne fait que

⁵¹ En toute rigueur, il faudrait procéder à une légère rotation dans le sens rétrograde pour construire un nouveau repère défini par $(\overrightarrow{CP1'}, \overrightarrow{CP2'}, \overrightarrow{CP3'})$. Ainsi, $CP1'$ serait principalement calculée à partir des neutres de Tanaka et correspondrait à la surface hydrocarbonée accessible des phases stationnaires. Cependant, compte tenu de la faible valeur de l'angle de rotation, nous nous sommes affranchi de cette opération, qui n'apporte pas d'élément nouveau à notre discussion et ne modifie pas notre interprétation.

confirmer la mixité du mécanisme de rétention de tels solutés. Il valide aussi notre approche, qui consiste à attribuer *a posteriori* un sens physico-chimique aux classifications issues d'ACP : imposer des axes *a priori* selon deux catégories de composés de natures différentes n'assure en rien l'orthogonalité de la classification obtenue, condition *sine qua non* cependant à une interprétation fiable.

Attribuer un sens physico-chimique à CP2 et CP3, pas aussi explicites que CP1, nécessite d'approfondir l'interprétation du « loading plot ». Trois composés jouent un rôle prépondérant dans les définitions de CP2 et CP3 : l'amiodarone, la clofazimine (solutés basiques), et la digitoxine, seule sonde neutre injectée à ce niveau de solvant qui soit aussi capable d'interagir par liaisons H. Au premier abord, CP2 semble construite à partir de la projection des facteurs de rétention des sondes basiques tandis que CP3 semble se baser principalement sur celle de la digitoxine. A ceci s'ajoute entre CP2 et CP3 une inversion de l'influence de la digitoxine : sa composante se soustrait à celle des basiques sur CP2 alors qu'elle s'additionne à ces dernières sur CP3.

D'un point de vue physico-chimique, ce phénomène peut s'interpréter de la manière suivante. La clofazimine et l'amiodarone sont des composés basiques, qui, dans les conditions du test à haut niveau de solvant, existent sous deux formes BH^+ et \bar{B} . Le fait que la projection de la digitoxine, soluté neutre, se soustraie à celle des deux solutés basiques semble indiquer que l'on ne conserve au final pour CP2 que la contribution d'une seule forme globale ionisée BH^+ , affranchie de sa forme conjuguée par soustraction. Pour CP3, définie essentiellement par le facteur de rétention de la digitoxine, les composés basiques ajoutent une contribution positive, qui par orthogonalité⁵², ne peut être que de nature neutre, ce qui conduit à définir CP3 à l'aide de contributions de formes neutres uniquement.

Ainsi, partant du principe que CP2 est régie par un composé ionisé virtuel, et CP3 par un composé neutre virtuel mais capable d'interagir par liaisons H, nous pouvons en déduire que CP2 relate des interactions⁵³ de types ion-ion et ion-dipôle, tandis que nous pouvons attribuer à CP3 des interactions uniquement de type dipôle-dipôle. De surcroît, CP3 ne recouvre pas qu'un seul type d'interaction dipôle-dipôle, puisqu'elle est régie par des composés capables d'interactions de natures différentes, π et/ou H. L'ordre constaté est le suivant : les interactions de type π , dont le domaine se recouvre partiellement avec celui des interactions de type accepteurs de liaison H, puis celles de type donneurs-accepteurs de liaisons H. Ainsi, CP3 est aussi organisée par échelle d'intensité d'interaction croissante.

VIII.D.2.a.iii Classifications interprétées

La Figure VIII-3 reprend les « score plots » en indiquant les significations physico-chimiques attribuées aux trois premières composantes principales.

⁵² Par construction et par définition, toutes les composantes principales respectent un critère d'orthogonalité entre elles.

⁵³ Le passage des facteurs de rétention aux interactions, termes d'énergie, n'est pas trivial. En effet, il faut garder à l'esprit que $k = \exp\left(\frac{-\Delta G^\circ}{RT}\right)$. Cependant, eu égard aux valeurs de ΔG° , la fonction exponentielle peut s'approximer par un polynôme du second degré dans l'intervalle 2 à 10 de valeurs de k . Par conséquent, même si la relation n'est pas linéaire, elle permet d'établir un lien assez direct entre les facteurs de rétention et les interactions.

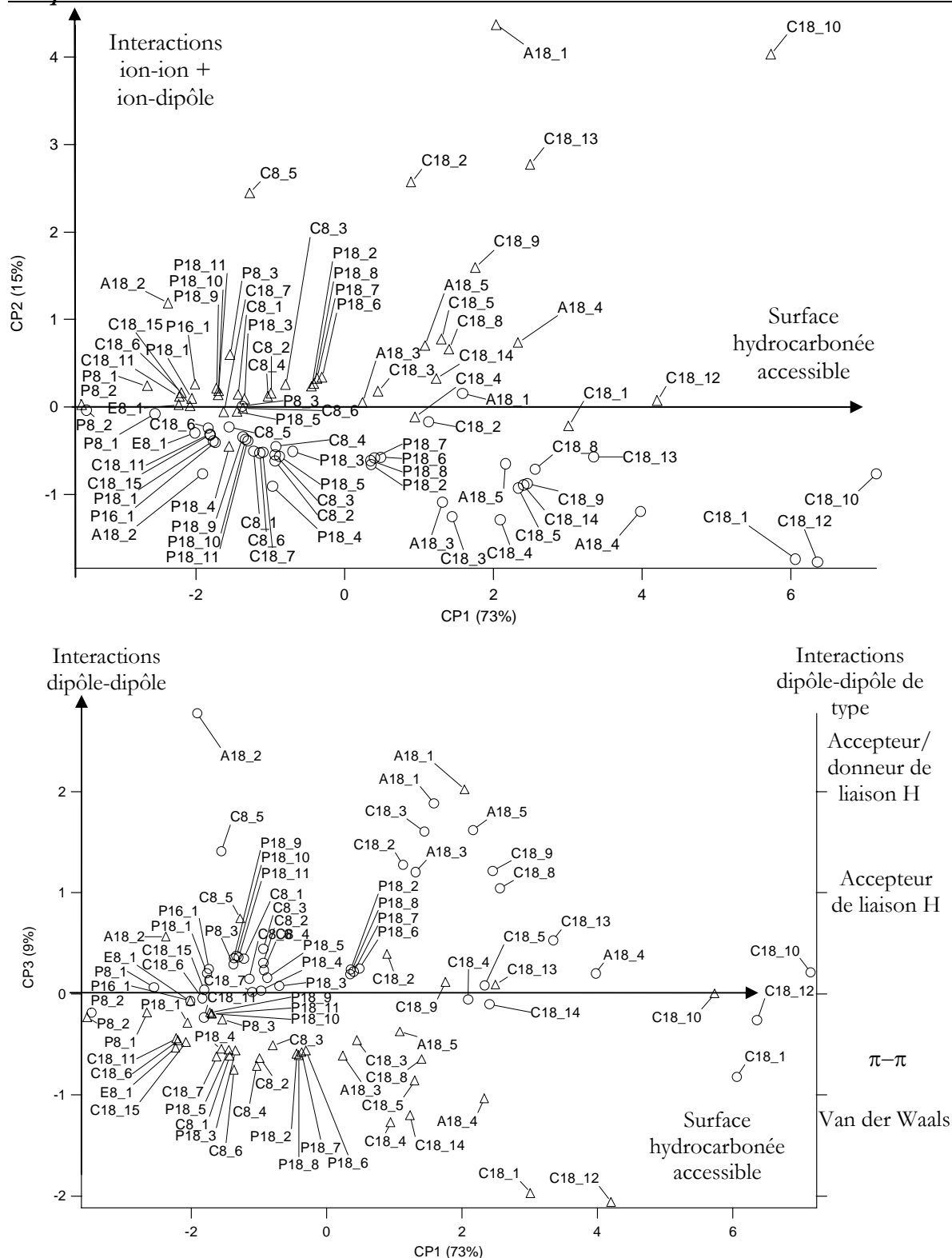


Figure VIII-3 : « Score plots » interprétés des plans CP1-CP2 (en haut) et CP1-CP3 (en bas).

L'interprétation physico-chimique explique aussi l'éclatement de la classification selon CP2 suivant la nature du solvant. En effet, le méthanol, étant capable d'interagir par liaison H au contraire de l'acétonitrile, masque par effet de compétition la majorité des interactions ion-dipôle que pourrait mettre en évidence le composé ionisé virtuel. A contrario dans l'acétonitrile, l'effet de ces interactions n'en sera que plus prononcé. La présence d'un type d'interaction ion-dipôle dans l'acétonitrile permet d'expliquer :

1. La non superposition des couples colonne-solvant suivant le modificateur organique : il n'y a en effet aucune raison de penser que les interactions ion-ion différeront

notablement d'un solvant à l'autre, eu égard à des permittivités relatives de même ordre de grandeur ;

2. Une répartition des projections des couples colonne/solvant sur CP2 plus large dans l'acétonitrile que dans le méthanol.

Ceci confère à l'acétonitrile un pouvoir discriminant plus élevé. Cependant, rendre les sondes plus sensibles ne confère pas que des avantages, comme nous l'avons déjà remarqué au chapitre précédent : les domaines de robustesse sont aussi plus réduits.

Concernant la classification CP1-CP3, l'effet du solvant n'est plus aussi clairement observé que sur CP1-CP2. Ce phénomène provient certainement du recouvrement (en terme d'intensité) des interactions π - π et accepteur de liaison H, déjà constaté sur le « loading plot ».

Reste désormais à valider notre interprétation physico-chimique par l'examen de différents chromatogrammes.

VIII.D.2.a.iv Vérification chromatographique de l'interprétation

La vérification des interprétations physico-chimiques se fonde sur des exemples de colonnes greffées octadécyle, possédant ou non un « end-capping », de type apolaire ou polaire. La Figure VIII-4 montre les 3 chromatogrammes du mélange de Tanaka obtenus sur trois phases stationnaires, distinctes selon leur projection sur CP1, mais de même projection sur CP2.

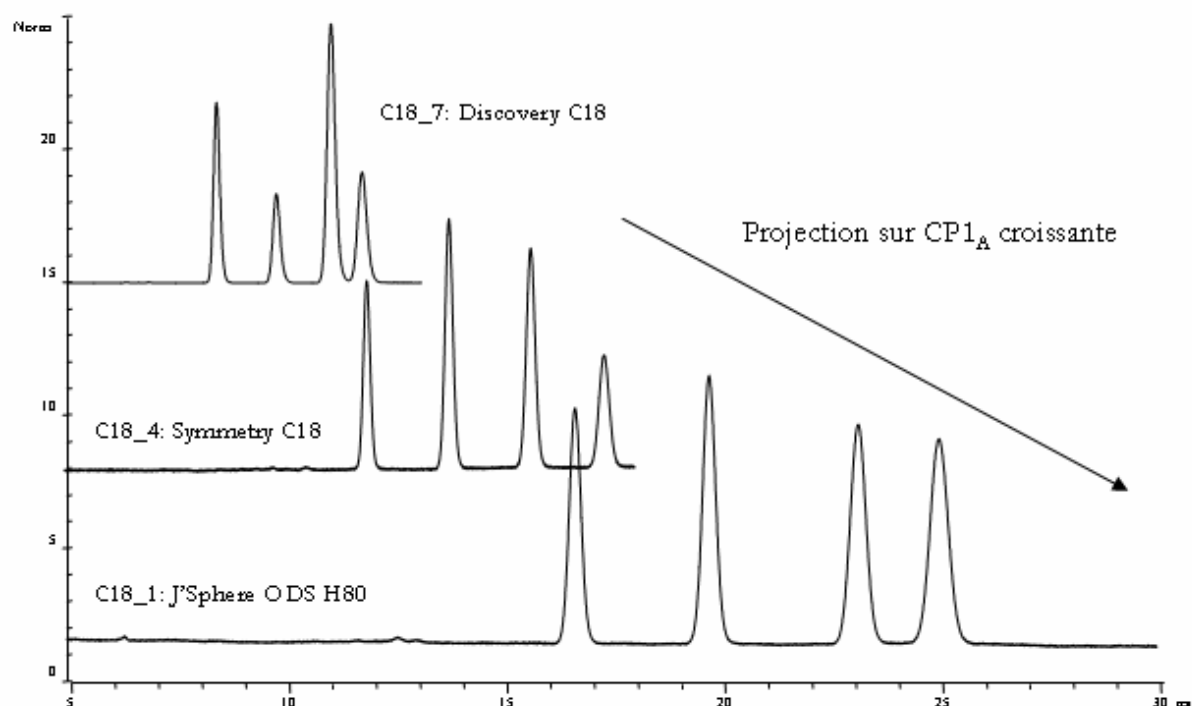


Figure VIII-4 : Chromatogrammes des neutres de Tanaka obtenus sur trois phases stationnaires C18 avec l'acétonitrile pour modificateur organique ; ordre de rétention : butylbenzène, *o*-terphényle, triphénylène et pentylbenzène.

Ce mélange gouverne la première composante principale CP1. L'ordre croissant constaté sur la classification entre la Discovery C18 et la J'Sphere ODS H80 ne fait que restituer le déplacement du barycentre du groupe de composés neutres hydrophobes vers des rétentions de plus en plus élevées, traduisant une augmentation de la surface hydrocarbonée accessible.

La Figure VIII-5 reprend le comportement chromatographique de 3 phases stationnaires possédant une projection similaire sur CP1, mais de valeur croissante sur CP2 et sur CP3.

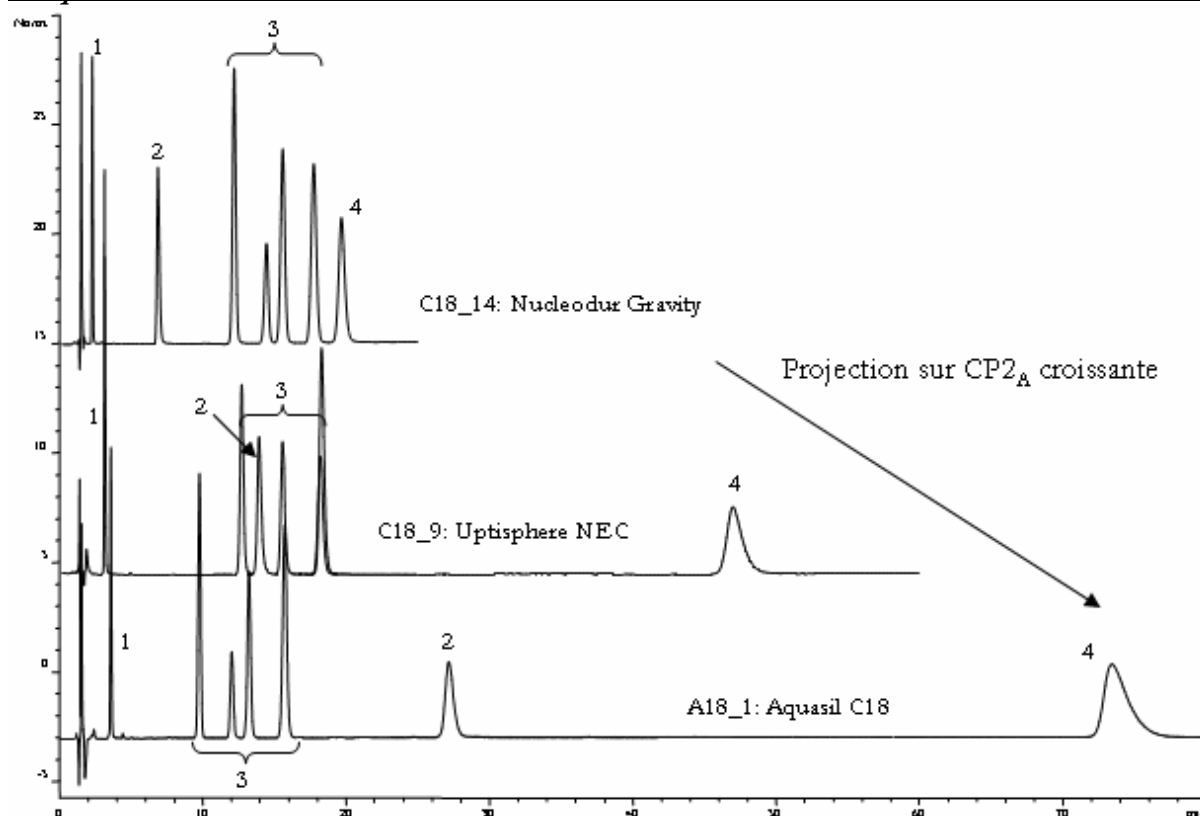


Figure VIII-5 : Chromatogrammes obtenus sur 3 phases stationnaires différant selon CP2 avec l'acétonitrile pour modificateur organique ; mélange constitué de digitoxine (1), de clofazimine (2), de neutres de Tanaka (3) et d'amiodarone (4).

Les composés basiques, indexés sous les numéros 2 et 4, voient leur rétention augmenter, dans le même ordre que sur CP2. Si la clofazimine possède une influence deux fois supérieure à celle de l'amiodarone dans la définition de CP2 (cf. le « loading plot » de la Figure VIII-2), c'est parce qu'elle s'avère simplement plus discriminante au niveau du comportement chromatographique : dans les deux premiers cas, elle est éluée avant le groupe des neutres de Tanaka, tandis que pour la troisième colonne, elle est éluée après. Cette différence de comportement provient certainement de la structure tridimensionnelle des composés basiques : la clofazimine, de forme plane, est plus encline à sonder les groupements silanol que l'amiodarone, dont la forme de type globulaire peut constituer un handicap.

Globalement, les hydrophobies constatées sont similaires. Les 3 phases stationnaires étudiées, d'après notre classification, possèdent des surfaces hydrocarbonées accessibles semblables. Il faut néanmoins noter une limitation de l'interprétation de CP1. En effet, d'après les chromatogrammes, l'Aquasil C18 (A18_1) présente une hydrophobie inférieure aux deux autres. Mais la forte rétention de l'amiodarone, qui participe dans une moindre mesure que les neutres de Tanaka à la définition de CP1, explique la même projection sur cette composante que pour les deux autres colonnes. L'Aquasil C18 (A18_1) représente donc un cas « limite » pour notre classification, eu égard aux interactions dipolaires qu'elle est capable de développer grâce au caractère polaire de son « end-capping ». D'après la projection de ses coordonnées sur CP3, ces interactions sont de type donneur-accepteur de liaisons H. Concernant l'Uptisphere NEC (C18_9), elle se situe pour CP3 au niveau des accepteurs de liaisons H, ce qui n'est pas surprenant pour une phase dépourvue de recouvrement terminal. Quant à la Nucleodur Gravity (C18_14), elle ne s'avère ni donneur ni accepteur de liaison H d'après notre classification sur CP3, ce qui est confirmé sur le chromatogramme de la Figure VIII-5 par la faible rétention de la digitoxine.

La Figure VIII-6 illustre la diversité d'interactions incluses dans la définition de CP2.

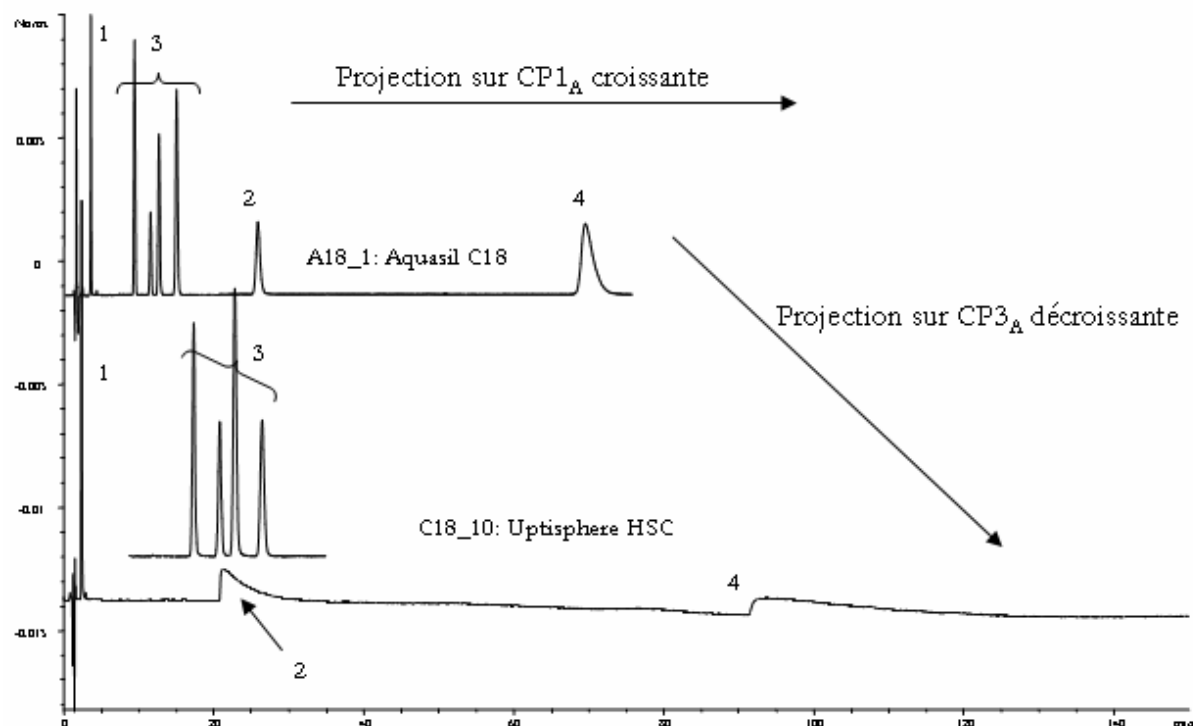


Figure VIII-6 : Chromatogrammes obtenus sur deux phases stationnaires de projection sur CP2 similaire mais de projection sur CP1 croissante avec l'acétonitrile pour modificateur organique ; pour l'identification des composés, cf. Figure VIII-5.

Dans le cas de l'Aquasil C18 (A18_1), la clofazimine est éluée après le groupe de composés de Tanaka, tandis que pour l'Uptisphere HSC, elle possède un temps de rétention similaire à ceux des composés neutres. L'amiodarone, quant à elle, est fortement retenue pour les deux phases considérées. Cependant, les asymétries correspondantes laissent présager de mécanismes de rétention différents : autant sur l'Aquasil C18 (A18_1), la faible asymétrie constatée indique préférentiellement des interactions de type ion-dipôle, autant la forte asymétrie constatée sur l'Uptisphere HSC⁵⁴ (C18_10) est le fruit d'interactions de type ion-ion.

Ces quelques exemples, qui, hormis celui de l'Aquasil C18, concernent des colonnes purement octadécyle, illustrent la diversité des comportements qui existe au sein des phases stationnaires dites « classiques » : la simple rétention de sondes neutres hydrophobe peut varier de plus d'un facteur 2, pour des phases d'appellation C18, dont certaines s'avèrent clairement moins rétentes que des C8 !

Les classifications à haute teneur en modificateur organique possèdent désormais leur interprétation physico-chimique, sur un total de 97% de l'information totale disponible. Il s'agit maintenant de procéder de la même manière pour les classifications obtenues à bas niveau de solvant.

VIII.D.2.b Analyse en Composantes Principales à bas niveau de solvant

VIII.D.2.b.i Examen et interprétation des « loading plots »

Examinons d'abord le cas de la vancomycine sur le « loading plot », représenté sur la Figure VIII-7.

⁵⁴ L'asymétrie prononcée de l'amiodarone sur l'Uptisphere dénote certainement une surcharge du mécanisme basé sur les interactions ioniques, due au nombre réduit de groupement silanol accessibles mais capables d'interactions de forte intensité.

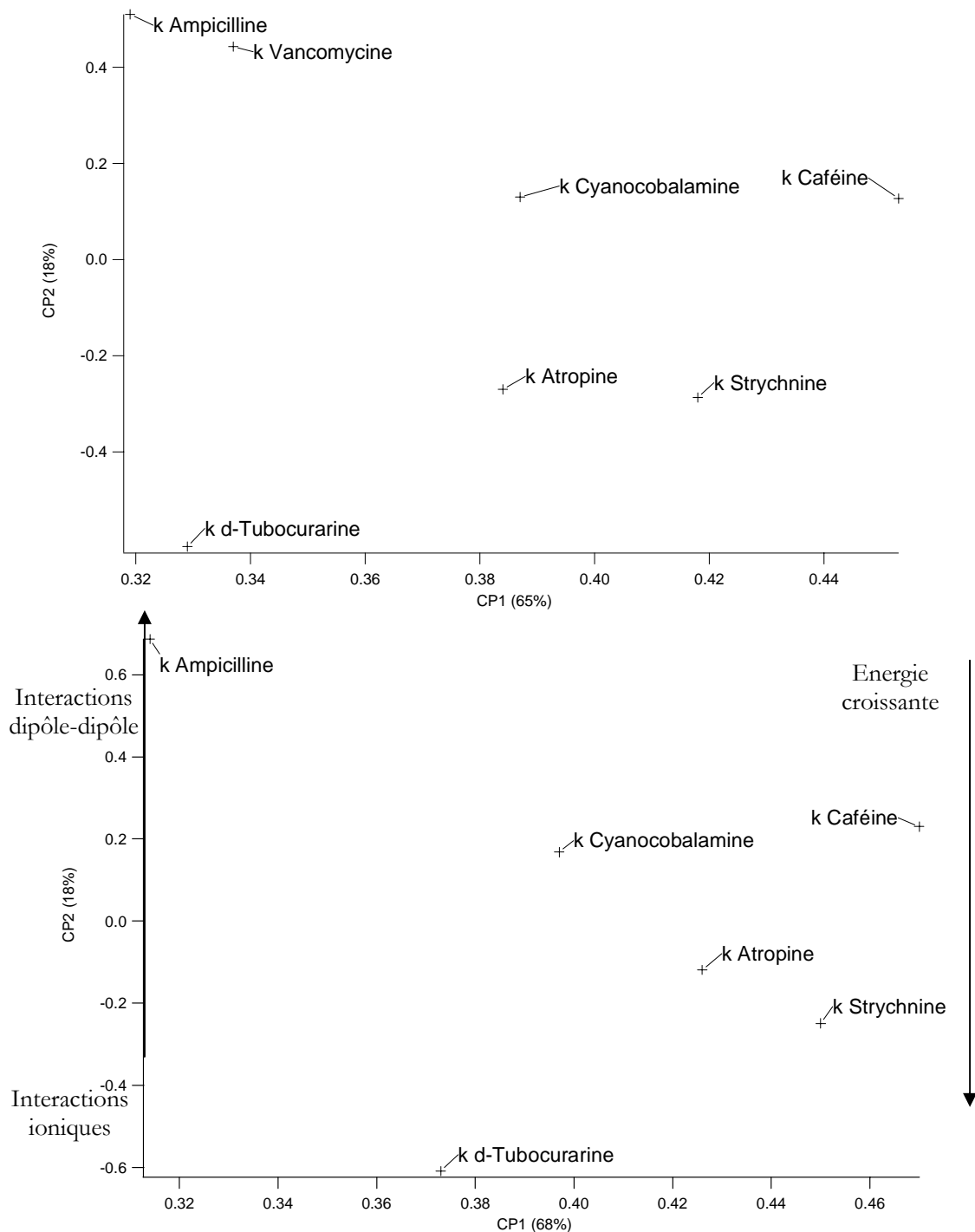


Figure VIII-7 : « Loading plots » du plan CP1-CP2 à partir d'un jeu de 7 variables d'origine (en haut) et après élimination de la vancomycine (en bas).

Contrairement au cas de la digitoxine (cf. Figure VIII-2), le facteur de rétention de la vancomycine est très proche de celui de l'ampicilline sur CP1-CP2. Ceci conduit à l'élimination de la vancomycine. En effet, non seulement ce composé est peu retenu et l'information qu'il porte risque d'être entachée d'erreur, mais elle s'avère de surcroît redondante par rapport à celle de l'ampicilline. Le rejet de la vancomycine porte l'information totale disponible sur le plan CP1-CP2 de 83% à 86%, ce qui peut laisser supposer que la vancomycine était source de bruit. En outre, la répartition des variables d'origine n'apparaît que peu affectée par l'élimination de la vancomycine : les projections sur CP1 et CP2 sont légèrement modifiées en intensité, mais pas en terme d'ordre.

L'examen du seul « loading plot » ne permet pas d'attribuer de signification particulière à CP1. Par contre pour CP2, la projection des facteurs de rétention semble s'organiser par échelle de polarité. En effet, l'ampicilline est sous forme globalement neutre (zwitterion) ; la

cyanocobalamine, globulaire, se comporte comme un neutre, au même titre que la caféine, tandis que les trois composés restants sont sous forme BH^+ et ordonnés suivant leur sensibilité aux silanols résiduels, particulièrement lorsque leur acidité est exaltée à l'occasion d'une contamination métallique (cf. Annexe 8). Signalons que les valeurs croissantes selon CP2 traduisent une rétention de plus en plus faible dans l'acétonitrile par rapport au méthanol : si les trois premiers composés, neutres, sont beaucoup moins retenus (l'ampicilline l'étant le moins), l'atropine ne voit pas son facteur de rétention grandement modifié par le changement de solvant tandis que la *d*-tubocurarine s'avère toujours beaucoup plus retenue avec l'acétonitrile qu'avec le méthanol. Il est donc vraisemblable que CP2 corresponde à des interactions d'intensité croissante, partant d'interactions ioniques pour aboutir à des interactions dipôle-dipôle induit. Eu égard à la proportion de phase aqueuse (85% à 91%), il est difficile de concevoir que les silanols puissent être autant engagés dans des liaisons de type ion-ion ou ion-dipôle qu'à haute teneur en modificateur organique. Cependant, on peut raisonnablement considérer que les effets masquants de la phase mobile seront plus prononcés avec le mélange à base de méthanol (plus proche du milieu purement aqueux en terme de liaisons H) qu'avec celui contenant de l'acétonitrile. Ainsi, les interactions ioniques seront favorisées avec le méthanol.

VIII.D.2.b.ii Classification interprétée

Le « score plot » issu du jeu des six composés sélectionnés est représenté sur la Figure VIII-8.

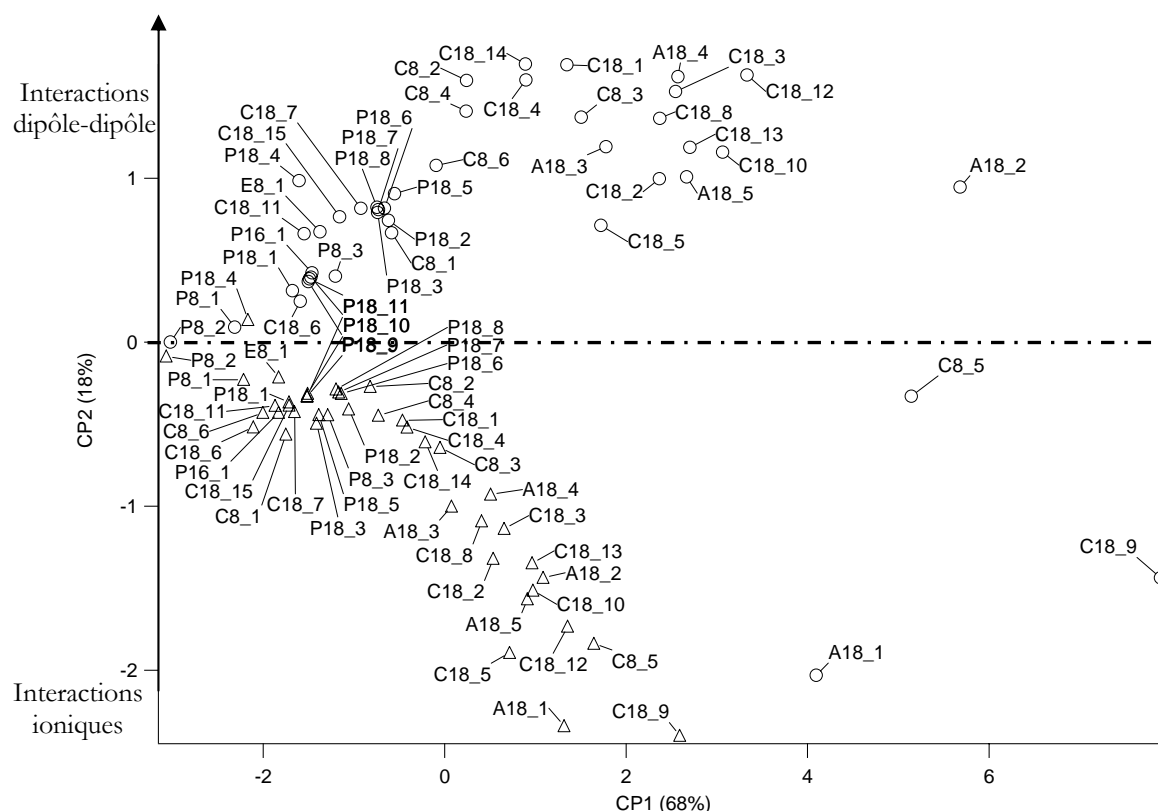


Figure VIII-8 : « Score plot » de CP1-CP2 partiellement interprété.

A l'exception des trois colonnes C8_5, C18_9 et A18_1 testées dans le méthanol, nous sommes en présence d'une classification qui se divise suivant le solvant de test : toutes les phases évaluées dans le méthanol se situent dans le demi-plan délimité par les valeurs positives de CP2 (axe figuré en pointillé), et inversement pour toutes les colonnes testées dans l'acétonitrile. La classification possède toujours une forme de V, encore plus prononcée qu'à haut niveau de solvant. Ce phénomène valide l'interprétation que nous avons faite de CP2. En effet, avec le mélange acétonitrile/tampon (9/91), le phénomène d'écran de charge – en terme d'interactions H – est moins prononcé qu'avec le mélange méthanol/eau (15/85), ce dernier solvant organique apportant une contribution supplémentaire en liaisons H : les interactions ioniques seront donc

Chapitre VIII

favorisées en milieu acétonitrile. Le sens physico-chimique de la première composante principale, qui reprend 68% de l'information totale disponible, s'avère complexe à élucider. Nous avons donc fait appel à l'Analyse Hiérarchique en Clusters (AHC), à titre de guide pour l'interprétation des classifications (cf. Figure VIII-9).

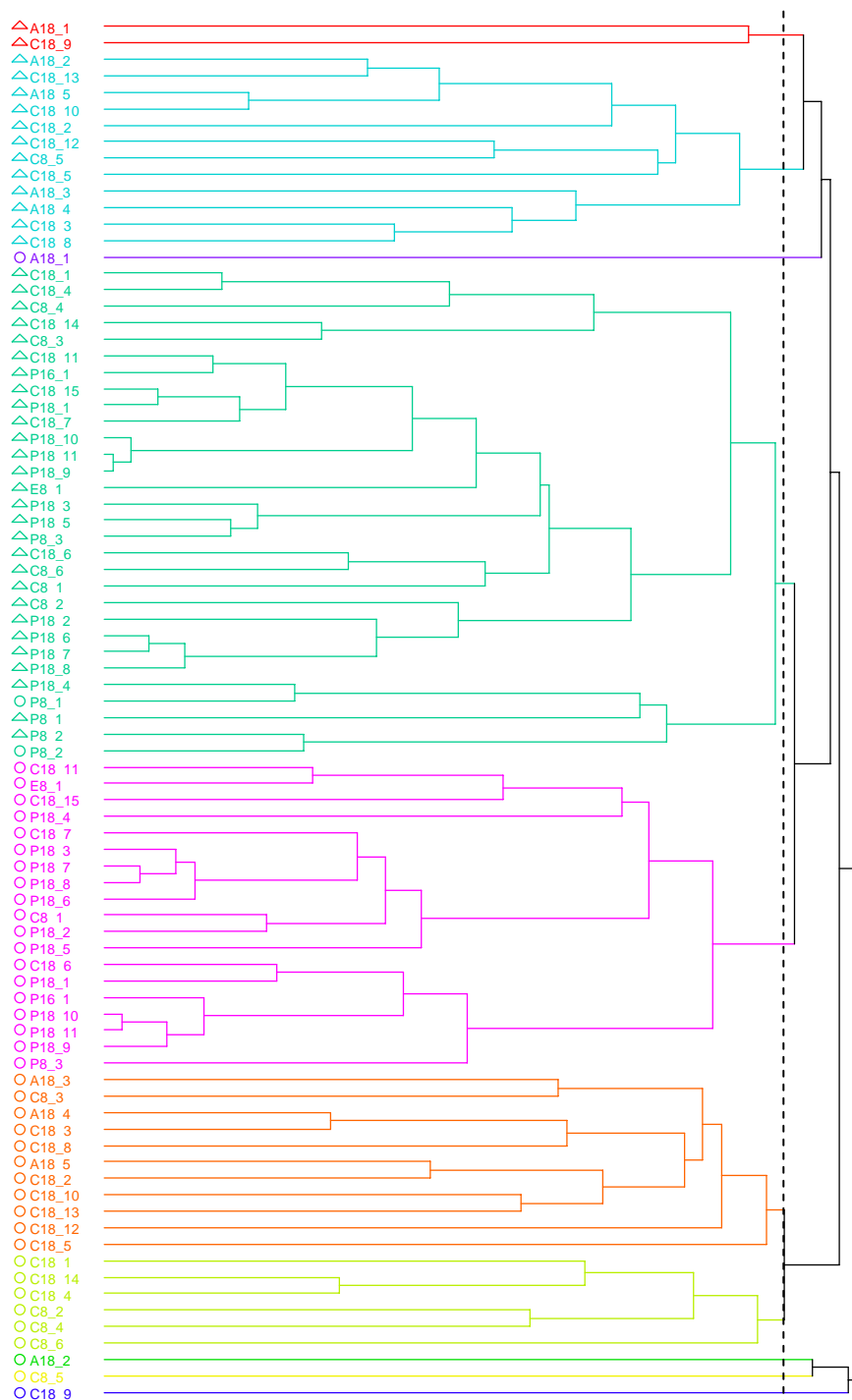


Figure VIII-9 : Analyse en cluster effectuée sur les coordonnées des couples colonne/solvant.

L'analyse en clusters a été effectuée sur la classification relative à la fraction basse en solvant, et les couleurs, qui identifient chacun des 10 groupes obtenus, ont été reportés sur le « score plot » à haute teneur en solvant. Ont été ainsi identifiées plusieurs catégories de phases :

- les groupes 1 et 2, constitués généralement de phases comprenant un groupement polaire intercalé ;
- les groupes 3, 4 et 5 représentent globalement les mêmes phases stationnaires de type purement alkyle (C8 et C18) qui diffèrent selon la présence et la nature de leur « end-capping » (polaire ou apolaire) ;

- le groupe 6, ainsi que les 4 autres couples colonne/solvant isolés, reprend des phases soit dépourvues de « end-capping » (C18_9 et C8_5), soit possédant un « end-capping » polaire ou assimilé (A18_1 et A18_2).

L'analyse en clusters confirme l'éclatement de la classification selon CP2, en fonction du solvant de test. La Figure VIII-10 reprend les « score plots » obtenus à bas et haut niveaux de modificateur organique.

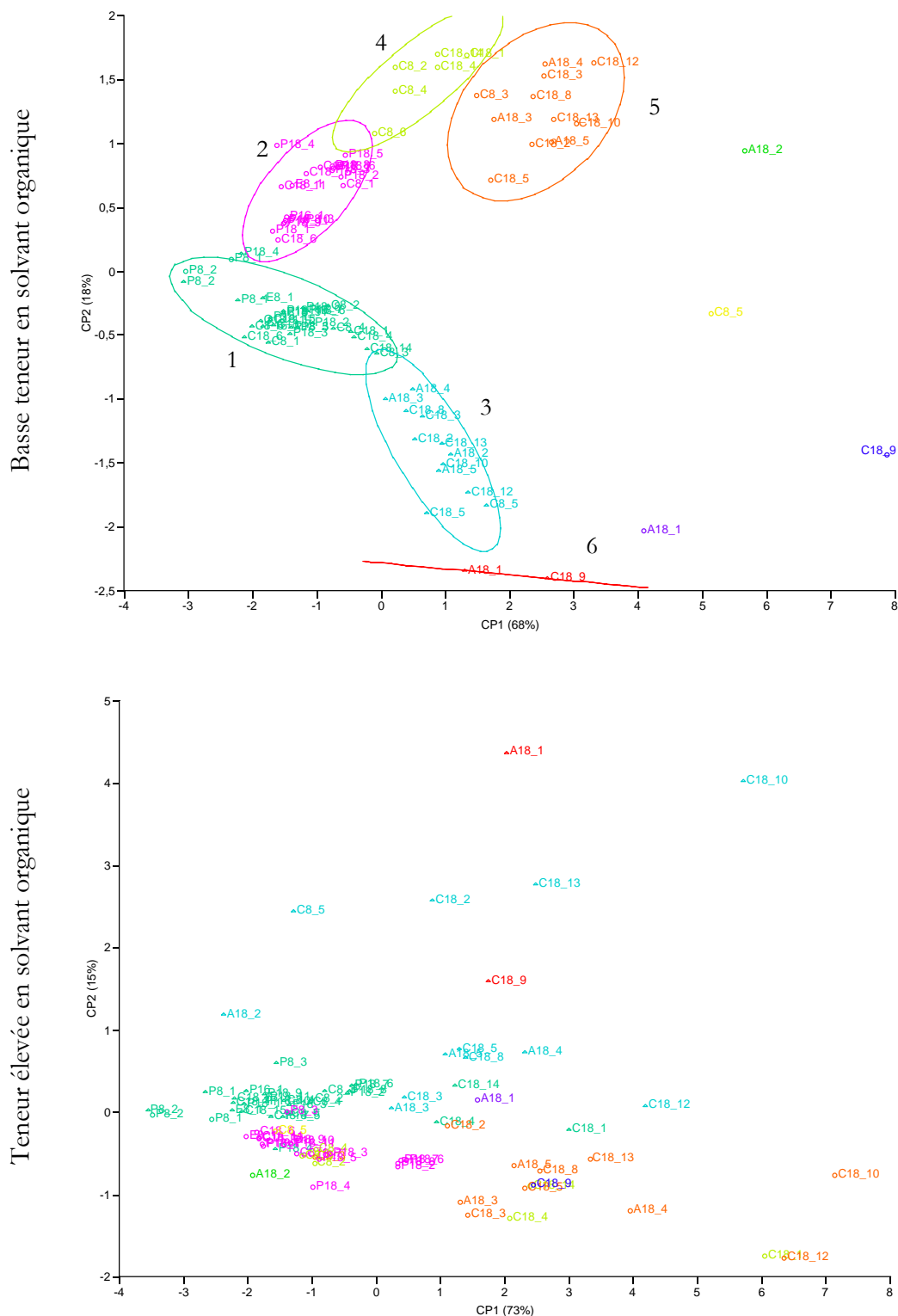


Figure VIII-10 : ACP interprétées par AHC à bas et haut niveaux de teneur en modificateur organique ; chaque couleur correspond à un groupe (10 au total) identifié à basse teneur en solvant.

Chapitre VIII

La Figure VIII-10 illustre la nécessité pour la procédure de test de contenir plusieurs niveaux de fraction en solvant organique.

On retrouve donc un semblant d'organisation le long de CP1 selon la surface hydrocarbonée accessible, avec des phases organisées dans l'ordre suivant : C8 à groupement polaire intercalé < C18 à groupement polaire intercalé < C8 haute densité < C18. Cependant, la surface de phase offerte à haut niveau de solvant n'est certainement pas équivalente à celle à bas niveau en modificateur organique, du fait de différences de conformations des greffons, qui sont solvatés différemment selon la nature et la teneur en solvant organique.

D'après le Chapitre IV, les phases possédant un groupement polaire intercalé apparaissent plus rigides, donc plus ordonnées que leurs homologues purement alkyles. En outre, les regroupements similaires pour les individus des groupes 1 et 2 entre bas et haut niveaux de solvant contrastent avec les modifications observées pour de nombreuses phases C18, classiques ou de type Aqua. Ces dernières se répartissent d'ailleurs dans des groupes différents, soulignant une probable diversité des supports regroupés sous cette appellation, imprécise faute d'information disponible. Ce phénomène sera discuté plus en détail dans la section VIII.D.3.c. Cependant, il est concevable que la présence d'un « end-capping » polaire, d'un traitement de surface autorisant l'utilisation du support avec des phases mobiles 100% aqueuse et/ou d'une base de greffon alkyle type diisopropyle puisse entraîner une perturbation supplémentaire à celle se produisant sur des phases purement alkyles, ce qui se traduit par un accroissement du désordre pour l'organisation des greffons.

L'ordre observé des groupes selon CP1 respecte un désordre croissant de structure locale de la phase stationnaire. Ce phénomène nous permet donc d'interpréter d'un point de vue thermodynamique CP1 : cette composante traduit le degré de désordre – ou le degré d'hétérogénéité énergétique des sites actifs – de la phase stationnaire (cf. Figure VIII-11).

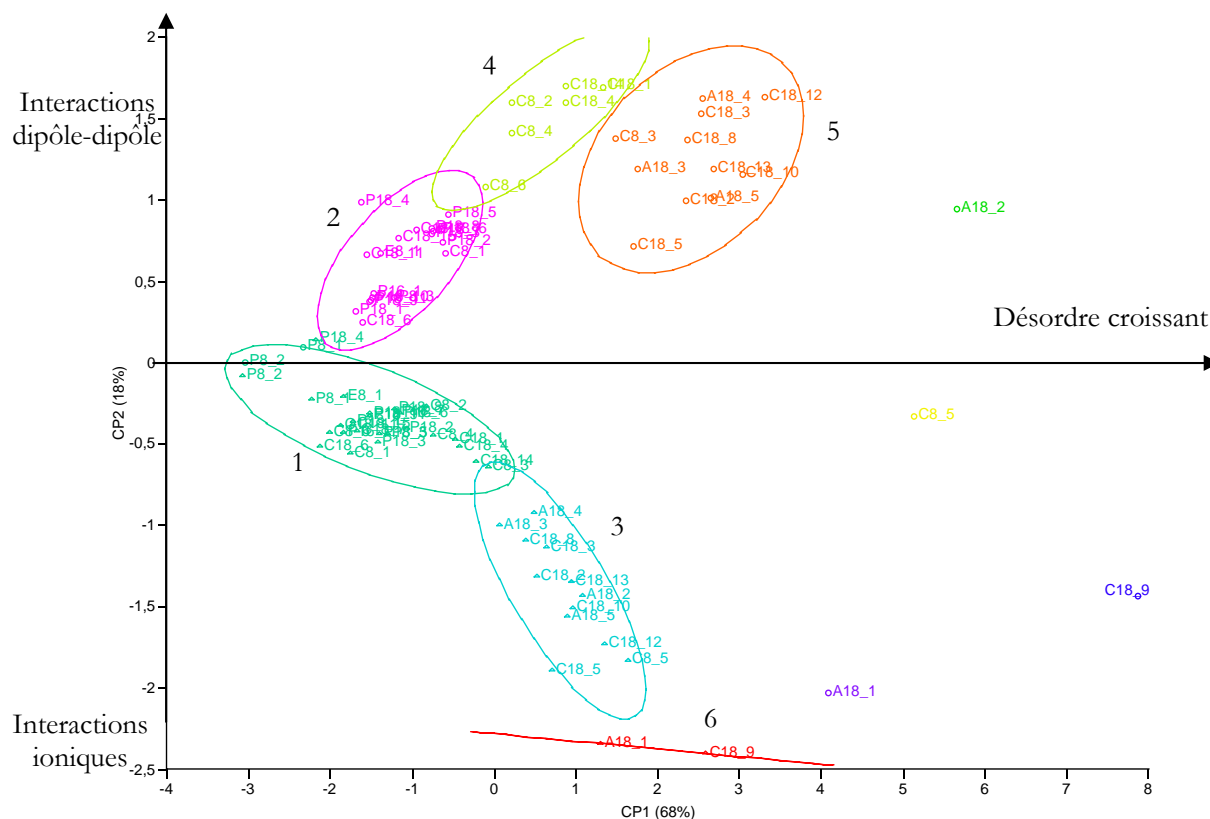


Figure VIII-11 : « Score plot » de CP1-CP2 suivi d'une AHC (10 groupes).

Cette interprétation peut être rapprochée des résultats d'une récente étude de Gritti et Guiochon [255]. Ces auteurs ont en effet associé l'asymétrie de pic observée pour deux composés neutres polaires, la caféine et le phénol, à une hétérogénéité énergétique de la structure locale de

la couche C18. Ayant écarté tout mécanisme d'adsorption de type liaison H avec des groupements silanol résiduels, ils attribuent ce phénomène à une interaction surfacique supplémentaire provenant de sites d'adsorption sur les chaînes alkyles.

Or, la caféine fait aussi partie de notre jeu de solutés et s'avère d'ailleurs la sonde qui possède le plus d'influence dans la définition de CP1 (cf. Figure VIII-7). Partant du principe qu'en présence d'un mécanisme de rétention mixte⁵⁵ et par analogie avec les composés basiques, la rétention est toujours reliée à l'asymétrie de pic observée, le facteur de rétention de la caféine pourrait donc constituer une mesure de l'hétérogénéité énergétique de la phase, dont l'ordre est forcément plus perturbé à basse qu'à haute teneur en solvant organique. Ainsi, sous réserve d'un comportement des autres solutés polaires équivalent à la caféine, ce que peut laisser supposer déjà le cas du phénol, CP1 peut être associée à une mesure du désordre, c'est-à-dire à l'entropie de la phase.

VIII.D.2.b.iii Vérification chromatographique de l'interprétation

Autant la vérification d'interactions de différentes natures possède un sens chromatographique direct, autant lorsqu'il s'agit d'une interprétation thermodynamique, le lien est bien moins évident. C'est pourquoi nous ne proposerons une illustration chromatographique que pour CP2. La Figure VIII-12 montre 2 chromatogrammes obtenus sur deux phases stationnaires, de même projection sur CP1 mais distinctes selon leur projection sur CP2.

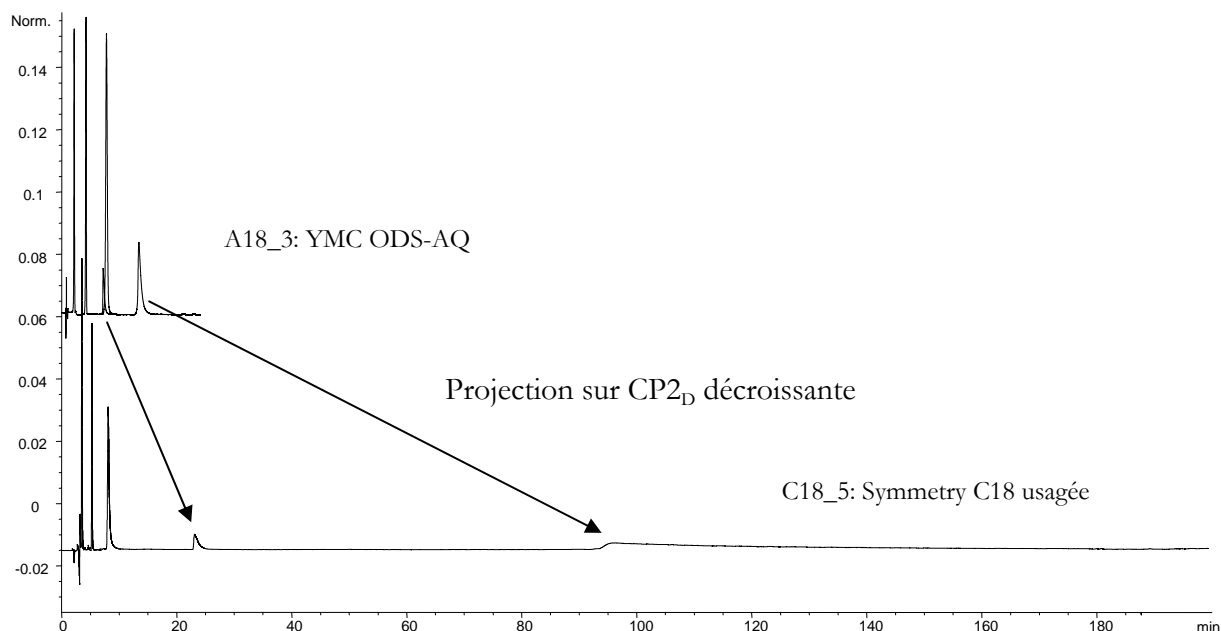


Figure VIII-12 : Chromatogrammes obtenus sur 2 phases stationnaires différant selon CP2 ; A18_3 est testée dans le méthanol et C18_5 dans l'acétonitrile ; ordre d'élution : ampicilline, cyanocobalamine, atropine et *d*-tubocurarine

La différence entre ces deux comportements chromatographiques réside en l'élévation de la rétention des composés basiques (ici l'atropine et la *d*-tubocurarine) et de leur asymétrie de pic, celles des composés neutres n'étant pas modifiées. Ce phénomène traduit l'apparition d'un mécanisme de rétention secondaire fondé sur des interactions de forte intensité, de type ionique, ce qui confirme notre interprétation de CP2.

⁵⁵ Par association de mécanisme de natures et/ou d'énergies différentes

Lors de cette synthèse, nous cherchons à relier nos interprétations physico-chimiques des ACP à des grandeurs thermodynamiques, en comparant toujours bas et haut niveau de solvant. La Figure VIII-13 présente les analyses hiérarchiques en clusters effectuées sur l'ensemble des composantes principales interprétées, au nombre respectivement de 3 et 2 à haut et bas niveaux de solvant.

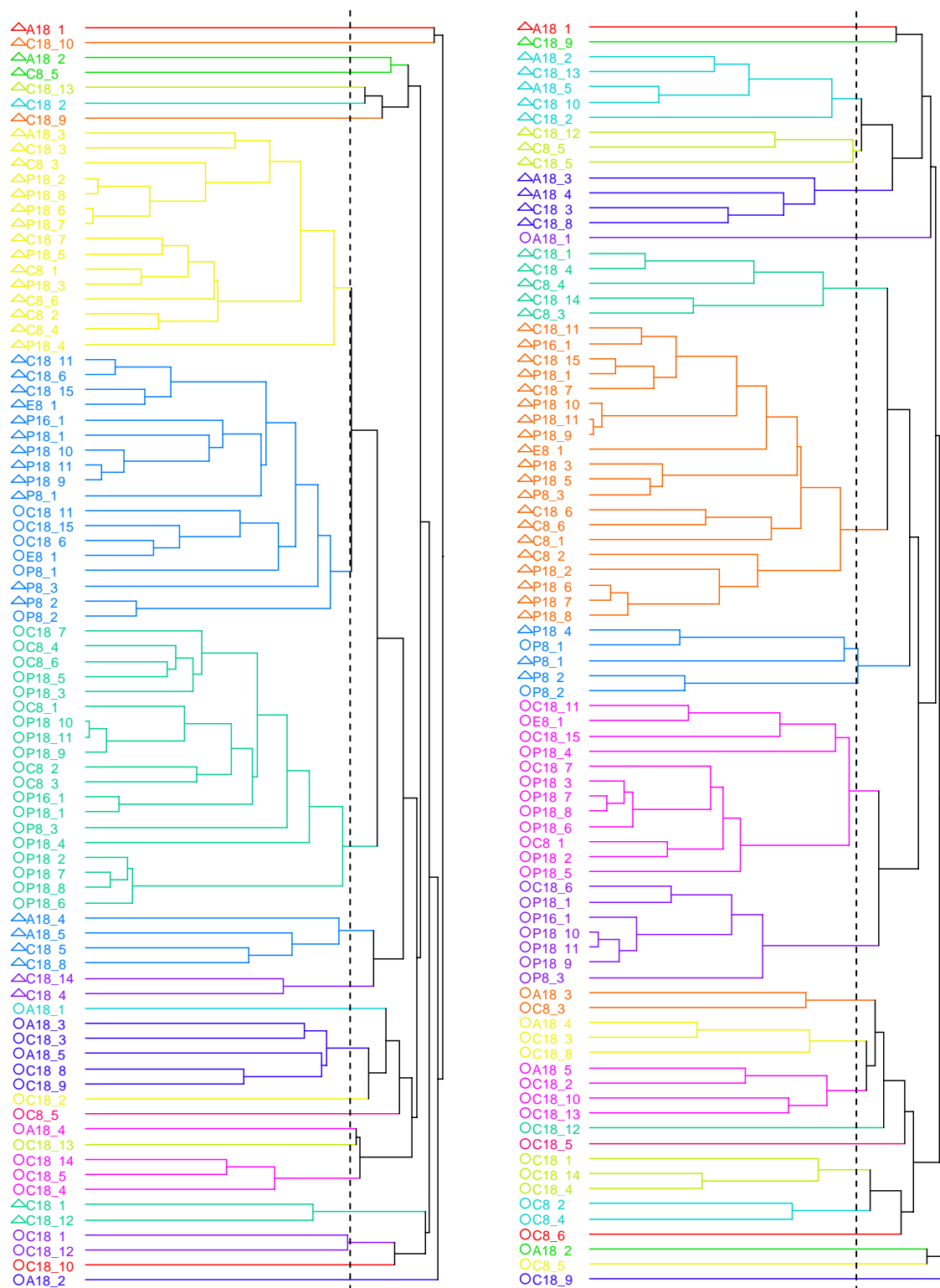


Figure VIII-13 : Analyse en clusters effectuée sur les coordonnées des couples colonne/solvant.

Les dendrogrammes ont été sectionnés à des niveaux de similitude équivalents (ligne pointillée), conduisant chaque fois à 23 regroupements.

Ces regroupements sont reportés sur leurs classifications respectives, comme le montre la Figure VIII-14

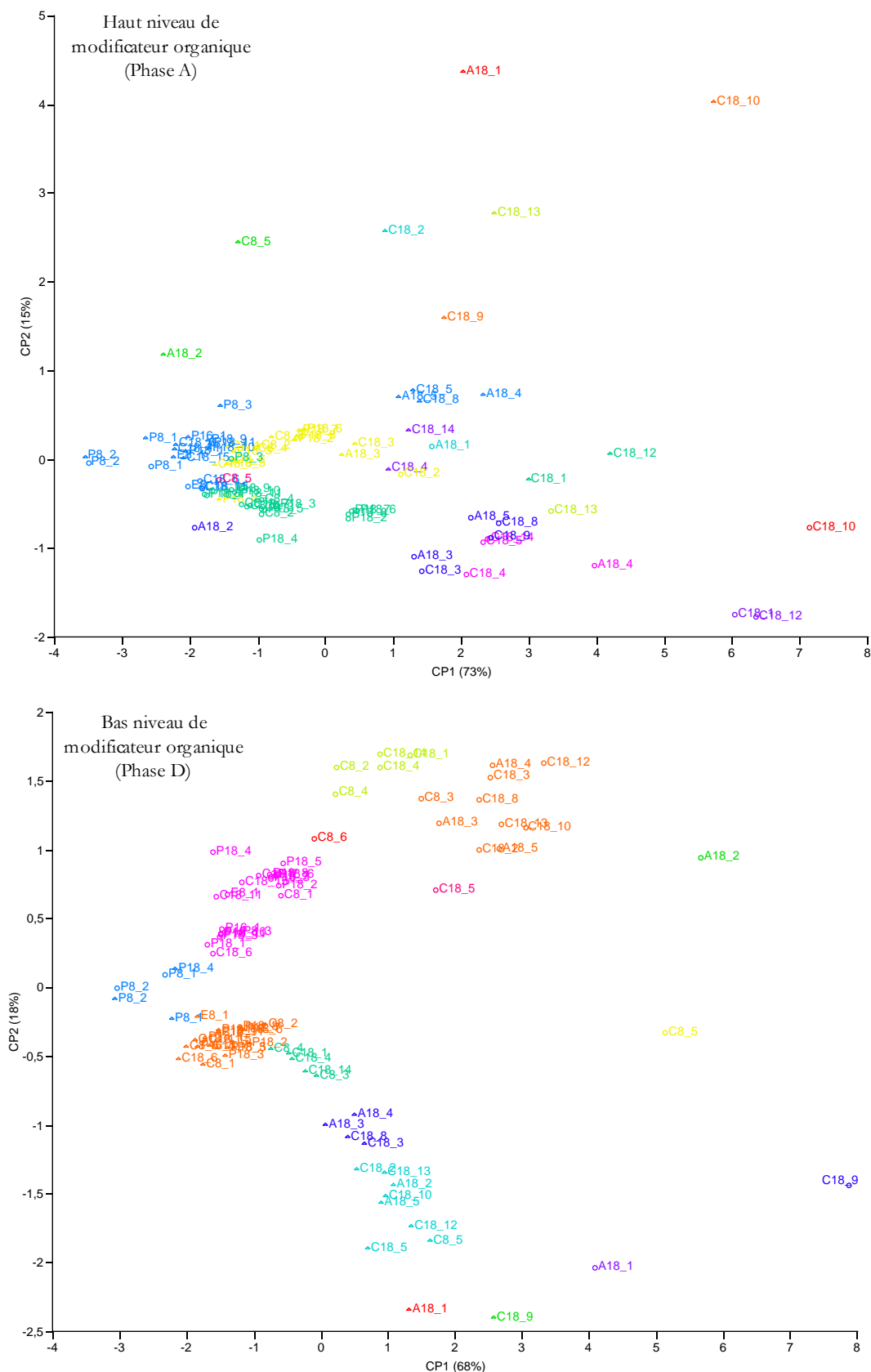


Figure VIII-14 : « Score plots » de CP1-CP2 interprétés par AHC à haut et bas niveaux de solvant.

Résultant de la projection de CP3_A⁵⁶ sur le plan CP1_A-CP2_A, le recouvrement de certains groupes sur la classification à haut niveau de solvant traduit l'apport discriminant de CP3_A, améliorant ainsi l'analyse en clusters. La Figure VIII-15 reprend cette classification en configuration tridimensionnelle.

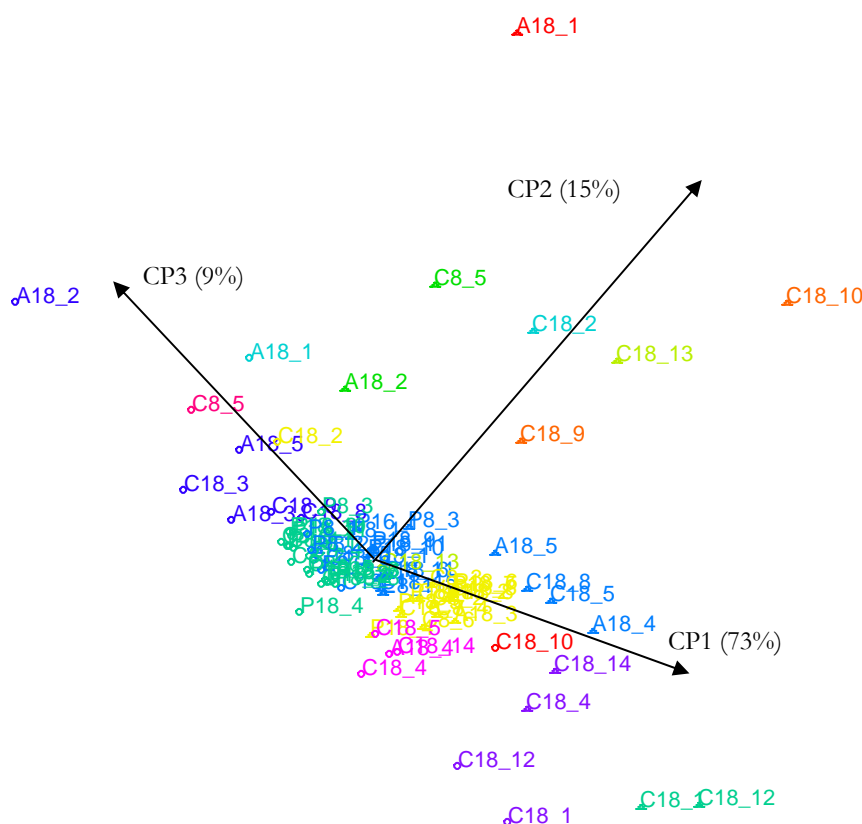


Figure VIII-15 : Représentation tridimensionnelle de la classification interprétée à haut niveau de solvant.

D'après l'étude de robustesse, les conditions majoritairement organiques sont plus robustes que celles majoritairement aqueuses, entraînant une meilleure qualité de l'information obtenue et permettant d'interpréter plus d'information – 97% contre 86%. Cet écart correspond à la quantité d'information apportée par une composante principale supplémentaire : 3 composantes ont fait l'objet d'une interprétation à haut niveau de solvant contre 2 à bas niveau. L'introduction de la troisième composante apporte un gain en discrimination : par exemple, elle permet de distinguer les colonnes Uptisphere HDO (A18_5), Uptisphere ODB (C18_8) et Uptisphere NEC (C18_9) des colonnes Symmetry C18 (C18_5) et Nucleodur Gravity (C18_14), rassemblées sur le seul plan CP1-CP2. Ce phénomène explique aussi par le nombre différents de couples colonne/solvant isolés : l'analyse en clusters met en évidence 13 groupes constitués d'un seul individu colonne/solvant à haute teneur en modificateur organique, contre 9 à basse teneur.

Quoiqu'il en soit, les classifications représentées en Figure VIII-14 démontrent une grande diversité de comportement chromatographique des phases stationnaires, suivant la fraction de solvant de la phase mobile. Ce point justifie *a fortiori* la nécessité pour la procédure de test de posséder au moins deux niveaux de teneur en solvant.

Outil indispensable à l'obtention des classifications, l'ACP se révèle précieuse pour leur interprétation. Sa capacité à décomposer, selon la nature, l'information contenue dans les variables d'origine est indispensable à l'attribution du sens physico-chimique des premières composantes principales :

⁵⁶ Nouvelle convention : afin de pouvoir comparer les composantes principales issues de différents repères, elles sont désormais indicées par la phase mobile, A ou D.

- A haut niveau de solvant, les trois premières composantes représentent 97% de l'information totale disponible
 1. CP1_A (73%) est reliée à l'**hydrophobie** de la phase, donc à la surface hydrocarbonée accessible ;
 2. CP2_A (15%) reflète des **interactions ioniques**, sans distinguer celles de type ion-ion de celles de type ion-dipôle ;
 3. CP3_A (9%) se fonde sur des interactions de type **dipôle-dipôle**, allant des interactions π aux liaisons H.
- A bas niveau de solvant, 86% de l'information totale est regroupée sur les deux premières composantes principales
 1. CP1_D (68%) est reliée au degré de **désordre énergétique** de la couche hydrocarbonée ;
 2. CP2_D (18%) reflète des interactions d'**intensité décroissante**, de ionique à dipôle-dipôle.

Les différences constatées au niveau des classifications confirment un des résultats de l'étude de robustesse, à savoir les différences de mécanismes mis en jeu pour la rétention selon les fractions de modificateur organique. D'après notre interprétation, CP1_D est relative à l'hétérogénéité énergétique de la couche hydrocarbonée, donc à l'entropie du système. Ceci confirme, en accord avec Vailaya et Horváth [366], l'existence d'un mécanisme d'adsorption à faible teneur en modificateur organique suggérée par l'étude de robustesse. Par contre à haut niveau de solvant, CP1_A traduit une rétention plutôt de type partage, mécanisme d'origine enthalpique, rejoignant sur ce point Ranatunga et Carr [373].

Pour chaque niveau de solvant, CP1 traduit des propriétés de rétention faisant appel aux interactions de type Van der Waals, relatives à la surface hydrocarbonée accessible. Selon le niveau de solvant, la rétention est gouvernée majoritairement par un processus soit enthalpique, soit entropique respectivement à haut et bas niveaux de solvant.

VIII.D.3 Etude des classifications et illustrations chromatographiques

Après l'interprétation physico-chimique des classifications vérifiée par l'examen des chromatogrammes intervient une étape plus appliquée, qui permettra de déterminer si le test est capable :

1. De distinguer des colonnes différentes mais de comportement proche ;
2. De visualiser des colonnes remplies de même phase stationnaire mais de différents lots de synthèse (visualisation sur les classifications des dispersions interlot du Chapitre VI) ;
3. De distinguer des colonnes de même phase stationnaire mais de durée d'utilisation différentes.

Le principe de notre étude consiste à s'intéresser aux comportements de familles de phases stationnaires sur les classifications, en fonction de la fraction de solvant. Bien que sur les classifications, les familles ne se détachent pas les unes des autres, nous raisonnerons sur leurs structures apparentées :

- Les phases traditionnelles, à base de silice greffée alkyle, C8 ou C18 ;
- Les phases à groupement polaire intercalé ;
- Les phases possédant un traitement de surface supplémentaire, de manière à discuter des phases de type Aqua et de l'influence de la présence et de la nature du « end-capping ».

La connaissance que nous aurons tirée de nos classifications nous permettra alors d'étudier le comportement d'une colonne usagée et d'expliquer le mécanisme de sa dégradation.

Les représentations pleine page des ACPs sont fournies en Annexe 11.

VIII.D.3.a Les phases classiques C8 et C18

Nous nous intéressons dans cette section aux phases purement alkyles de type C8 et C18, qui soit possèdent un « end-capping » apolaire, soit n'ont subi aucun traitement postérieur au greffage.

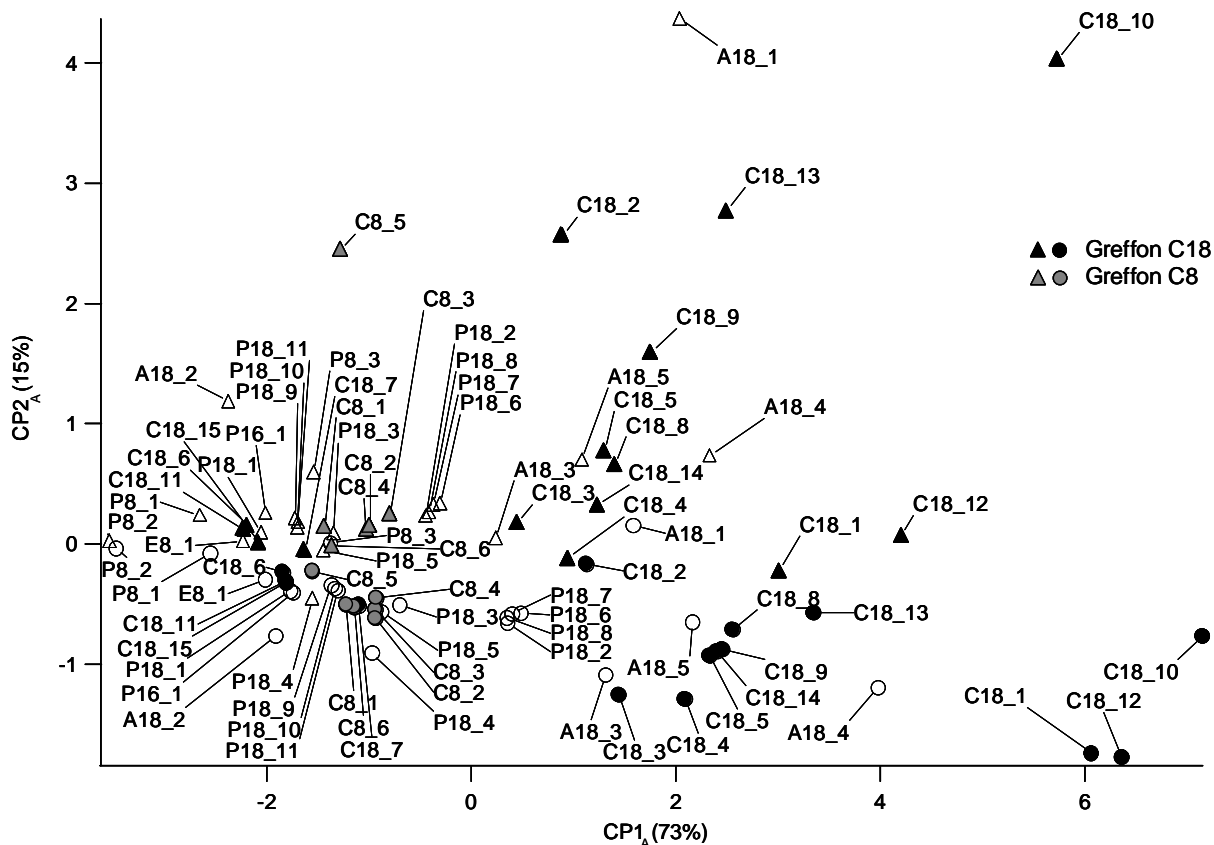


Figure VIII-16 : ACP illustrée pour les phases purement alkyles à haut niveau de solvant.

Sur la Figure VIII-16 (haute teneur en modificateur organique), la projection des couples colonne/solvant sur $CP1_A$ permet de les classer par groupes répartis dans l'ordre suivant :

1. C18 L : un groupe de phases C18 se situant autour de -2, traduisant une hydrophobie faible ;
2. C8 H : les silices greffées octyle sont distribuées dans un intervalle assez étroit [-1,8 ; 0,8], donc d'hydrophobie moyenne ;
3. C18 H : un groupe de phases C18 pour lesquelles la projection prend une valeur positive, synonyme d'hydrophobie élevée, mais dont la distribution est étendue.

A haut niveau de solvant, les silices greffées octadécyle se répartissent donc en deux groupes distincts d'hydrophobies éloignées, encadrant celui des C8 peu dispersées. Le comportement – inattendu – des phases C18 révélant une hydrophobie inférieure à celle de leur homologues en C8, contribue à la diversité des phases stationnaires, rendant le choix d'une phase dite traditionnelle non trivial.

La projection sur $CP2_A$ montre pour les deux premiers groupes une distribution resserrée, à l'exception remarquable de la StableBond C8 (C8_5), dépourvue de « end capping », soulignant la qualité de protection de ces supports vis-à-vis des interactions de type ioniques. Concernant le groupe des C18 d'hydrophobie élevée – C18 H, la distribution des projections sur $CP2_A$ est

beaucoup plus étendue ce qui traduit là encore une diversité de comportement chromatographique qui révèle des protections inégales vis-à-vis des interactions ioniques.

La Figure VIII-17 reprend l'ACP illustrée à bas niveau de solvant.

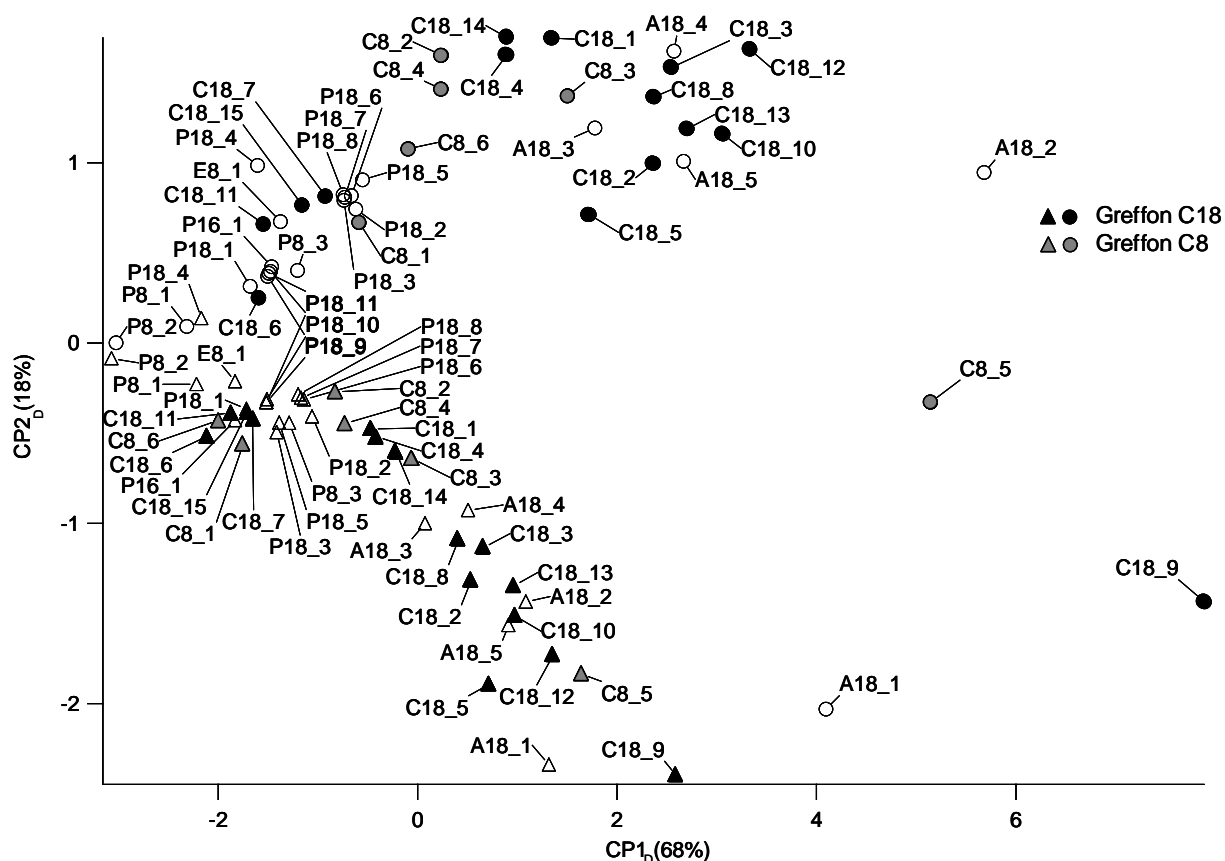


Figure VIII-17 : ACP illustrée pour les phases purement alkyles à bas niveau de solvant.

Dans ces conditions majoritairement aqueuses, la projection sur CP1 ne permet plus d'identifier les groupes isolés précédemment. En effet, seul le groupe des colonnes C18 peu rétentes reste distinguable tandis que les deux autres classes identifiées à haut niveau de solvant sont beaucoup plus diffuses et se répartissent tout au long de CP1. Il faut néanmoins remarquer que les couples qui voient leur position relative initiale à haut niveau de solvant fortement modifiée correspondent à des phases non « endcappées », comme la StableBond C8 (C8_5) et l'Uptisphere NEC (C18_9). Nous discuterons de ces cas et de leur répartition à la lumière de la section ID3c, relative aux traitements de surface.

De surcroît, l'effet très prononcé de la nature du solvant, qui se traduit par une forme en V très ouvert, semble montrer que les changements de positions relatives entre couples colonne/solvant ne s'opèrent pas uniquement selon CP1, mais aussi suivant CP2, indiquant une possible relation de causalité entre désordre de la couche hydrocarbonée et le type d'interaction⁵⁷.

Concernant le comportement atypique des C18 peu rétentes, il peut être attribué à diverses origines selon les cas :

- L'Uptisphere TF (C18_11) possède un greffage trifonctionnel, ce qui se traduit par une moindre densité de greffons ; cependant, cela lui procure aussi une plus grande rigidité en base de greffon, vérifiée par une sélectivité de forme semblable à celle des phases à groupement polaire intercalé ;
- La Discovery C18 (C18_7) et l'Hypersil GOLD (C18_15) ne se distinguent pas par une sélectivité de forme particulière mais ont en commun un diamètre de pores

⁵⁷ Ce phénomène souligne en outre l'imparfaite colinéarité entre CP1 et la direction interprétée : il est probable de devoir effectuer une rotation de CP1 dans le sens rétrograde d'un angle $\alpha \sim 15-20^\circ$.

presque 2 fois supérieur en moyenne aux autres C18, signifiant une surface spécifique plus réduite expliquant leur faible pouvoir de rétention ;

- La Chromolith Performance RP-18^e (C18_6), de support monolithique, possède une porosité plus élevée (0,85) que celle des homologues particulaires.

Au final, la Figure VIII-16 et la Figure VIII-17 illustrent une grande diversité de comportement chromatographiques pour des colonnes censées être « classiques ». Cette diversité apparaît d'autant plus élevée qu'elle s'avère aussi dépendante du niveau de solvant. Par exemple, à haut niveau de modificateur organique, les phases Uptisphere NEC (18_9) et Nucleodur Gravity (C18_14) sont quasiment confondues dans le méthanol sur le plan CP1_A-CP2_A, alors qu'à faible teneur en solvant, elles s'avèrent extrêmement différentes. Le fait qu'elles soient aussi séparées suivant CP3_A indique de probables corrélations entre CP1_D/CP3_A et CP2_D/CP3_A, dont l'étude sera abordée au chapitre suivant.

VIII.D.3.b Les phases à groupement polaire intercalé

Les phases à groupement polaire intercalé que nous avons testées possèdent des intercalants de natures différentes : carbamate, amide et éther. Ces groupements sont les plus fréquemment rencontrés sur les phases commerciales. Quant à la phase Polaris C18-A (P18_3) dont la nature de greffon nous est inconnue, nous rapprocherons son comportement de celui des phases les plus proches sur les classifications.

La Figure VIII-18 reprend les classifications à haut et bas niveaux de solvant, sur lesquelles les phases possédant un groupement polaire intercalé se voient attribuer un symbole particulier suivant la nature du groupement.

De manière générale, que ce soit à haut ou bas niveau de modificateur organique, ces phases se retrouvent dans les mêmes regroupements, voisins des C18 peu rétentes et des C8. Toutes apparaissent systématiquement moins rétentes que leurs homologues purement alkyles C8 ou C18, confirmant les résultats du Chapitre IV et en accord avec la littérature [130-133]. La faible étendue relevée sur la deuxième CP indique :

- A haut niveau de solvant, la faible occurrence des interactions de type ionique ; au regard de cette classification, la quasi-absence d'interactions de type ion-dipôle rend peu vraisemblable l'implication du groupement polaire intercalé dans les mécanismes gouvernant la rétention des solutés basiques hydrophobes ; par contre, il contribue manifestement à une protection active des groupements silanol résiduels ;
- A bas niveau de solvant, les interactions développées restent dans un registre de faible à moyenne intensité, dénotant la persistance de la protection vis-à-vis des silanols résiduels, mais aussi l'effet stabilisateur que procure le groupement polaire à la chaîne alkyle dans ces conditions.

A haut niveau de modificateur organique, ces phases occupent des zones de l'espace qui leur sont propres, permettant ainsi de les distinguer selon la nature de leur groupement intercalé⁵⁸. Par contre, à basse teneur en modificateur organique, certaines classes se recouvrent : ainsi la phase alkyléther (P18_5) se rapproche des phases alkylcarbamate.

⁵⁸ L'analyse en clusters permet de séparer P8_3 des P18_3 et P18_5 dans l'acétonitrile ; seule fait exception la P18_5 dans le méthanol, confondue avec des phases C8.

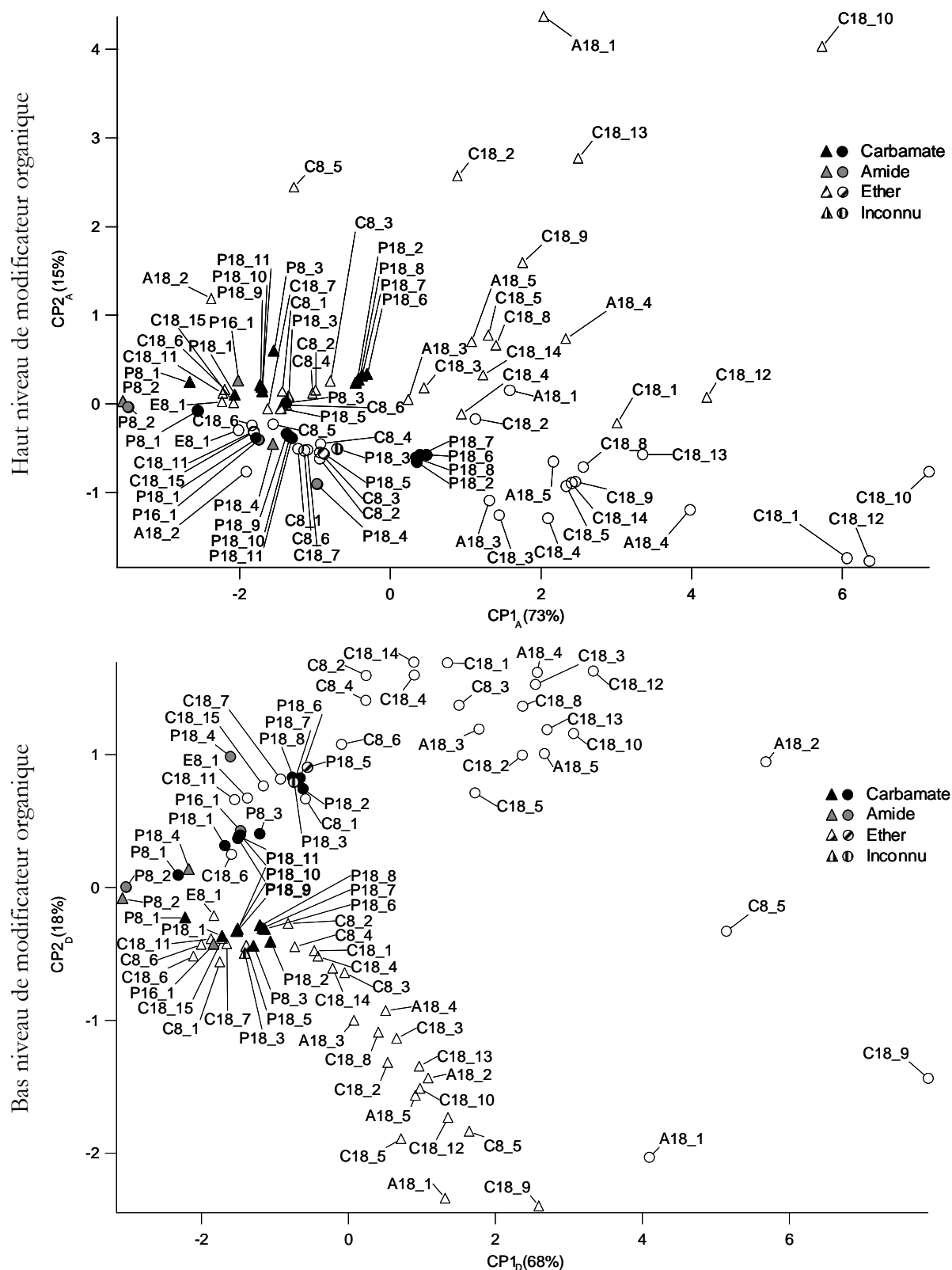


Figure VIII-18 : ACP illustrée pour les phases à groupement polaire intercalé à haute et basse teneurs en solvant.

Concernant les phases à groupement amide, elles exhibent des comportements divers et ne peuvent être regroupées. L'HyPURITY Advance (P8_2), du fait des rétentions extrêmement faibles qu'elle engendre, s'avère un cas limite pour la classification. La Polaris Amide C18 (P18_4) révèle un comportement particulier, puisque testée en acétonitrile, elle apparaît dans la zone de l'espace réservée aux phases stationnaires testées dans le méthanol. Quant à la Discovery RP Amide C16 (P16_1), elle possède comme attendu une hydrophobie inférieure à celle de l'alkylamide P18_4.

Chapitre VIII

La phase dont la nature du groupement polaire est inconnue Polaris C18-A (P18_3) s'avère posséder un comportement voisin de la Polaris C18-Ether (P18_5), à groupement éther, pour toutes les fractions en solvant et comme le confirme la Figure VIII-19.

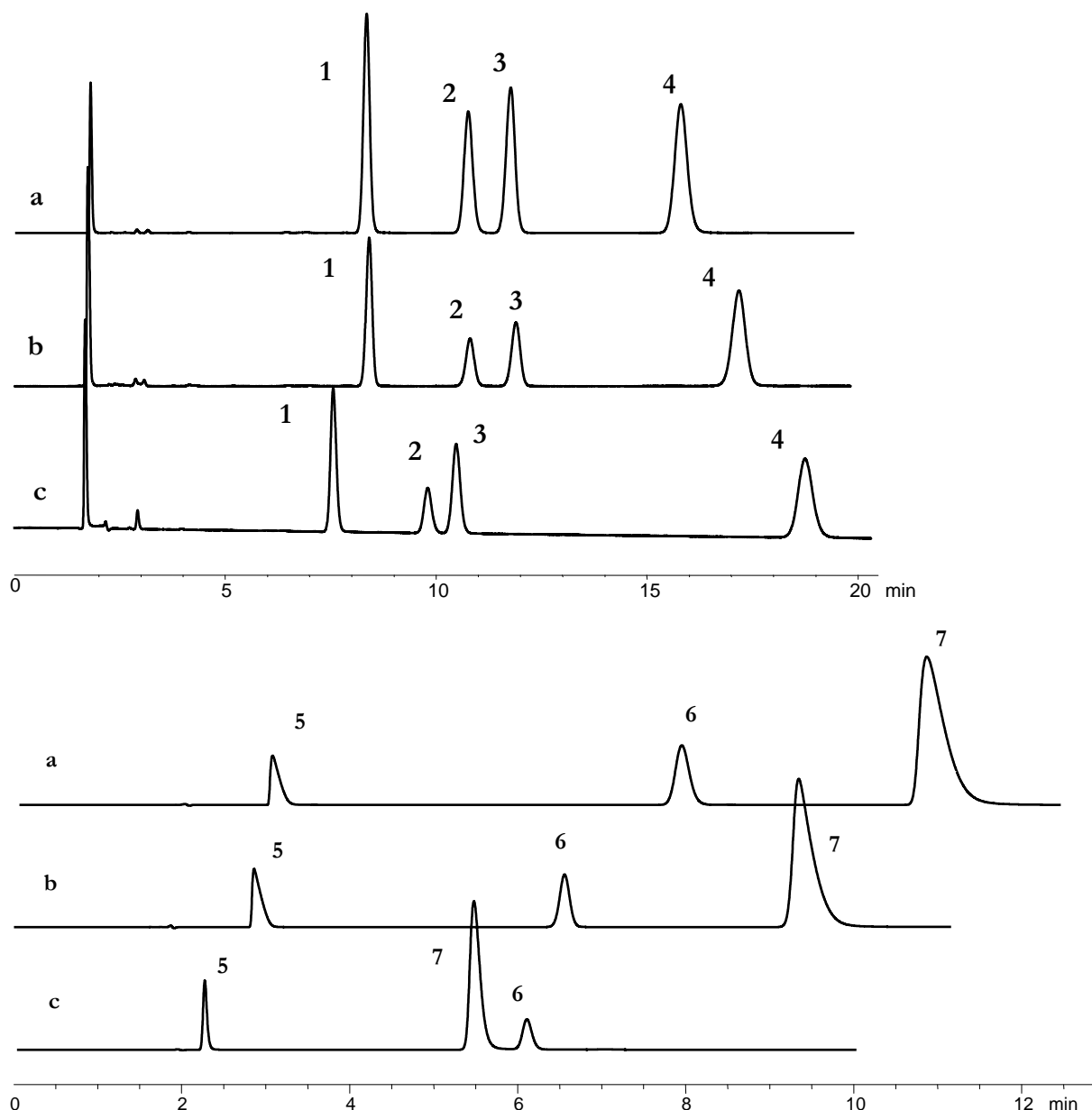


Figure VIII-19 : Chromatogrammes obtenus sur les phases Polaris (a) Ether (P18_5), (b) C18-A (P18_3) et (c) Amide C18 (P18_4) avec le méthanol pour modificateur organique ; (1), butylbenzène, (2), o-terphényle, (3), pentylbenzène, (4) triphénylène, (5) benzylamine, (6), caféine et (7) strychnine.

Les phases Polaris C18-A et Ether possèdent un comportement chromatographique très voisin, en termes de rétention et de sélectivité. Par contre, la Polaris Amide C18 se distingue par des sélectivités différentes, à l'image de sa sélectivité de forme (entre les composés 2 et 4) et de l'inversion entre la caféine et la strychnine (composés 6 et 7), phénomène uniquement relevé pour cette phase parmi les 42 colonnes évaluées.

Parmi les colonnes possédant un groupement carbamate figurent celles ayant fait l'objet de l'étude interlot au Chapitre VI. Le report de ces résultats permet de visualiser sur les classifications la dispersion interlot relative aux deux phases, testées dans des conditions plus exigeantes que celles du domaine de robustesse. Ces dispersions sont représentées en Figure VIII-20.

La Figure VIII-20 confirme une de dispersion interlot deux fois plus élevée pour la SymmetryShield RP18 (P18_6, P18_7 et P18_8) que pour la XTerra RP18 (P18_9, P18_10 et P18_11). De surcroît, autant l'interlot peut encore être discerné à haute teneur en solvant⁵⁹, autant à basse teneur, la dispersion interlot tend à se confondre avec de la dispersion interphase, surtout lorsque le méthanol est le modificateur organique. Cette visualisation de l'interlot au sein d'une classification plus étoffée confirme la nécessité d'évaluer les dispersions interlot avec un protocole aux conditions plus exigeantes, ce qui revient à dédier à ce genre d'étude un protocole restrictif, si nécessité il y a réellement d'évaluer cette dispersion. En effet, quelques auteurs, parmi lesquels Neue [243], n'estiment plus nécessaire de devoir l'évaluer car depuis la génération Symmetry, elle s'avère suffisamment réduite pour ne plus être considérée comme limitante.

Nous allons nous pencher sur l'influence des traitements de surface dans nos classifications. Par traitement de surface, nous entendons « end-capping » apolaire et polaire, et par extension tous les procédés visant à améliorer le comportement des phases alkyle en milieu 100% aqueux. Ces phases sont plus connues sous l'appellation Aqua.

1. Influence de la présence de « end-capping » apolaire et de sa génération ;
2. Influence des traitements de surface des phases dites Aqua, y compris le « end-capping » polaire.

⁵⁹ Les SymmetryShield RP18 se distinguent facilement des autres phases sur le plan CP1_A-CP2_A, alors que pour les XTerra, il faut faire appel à CP3_A

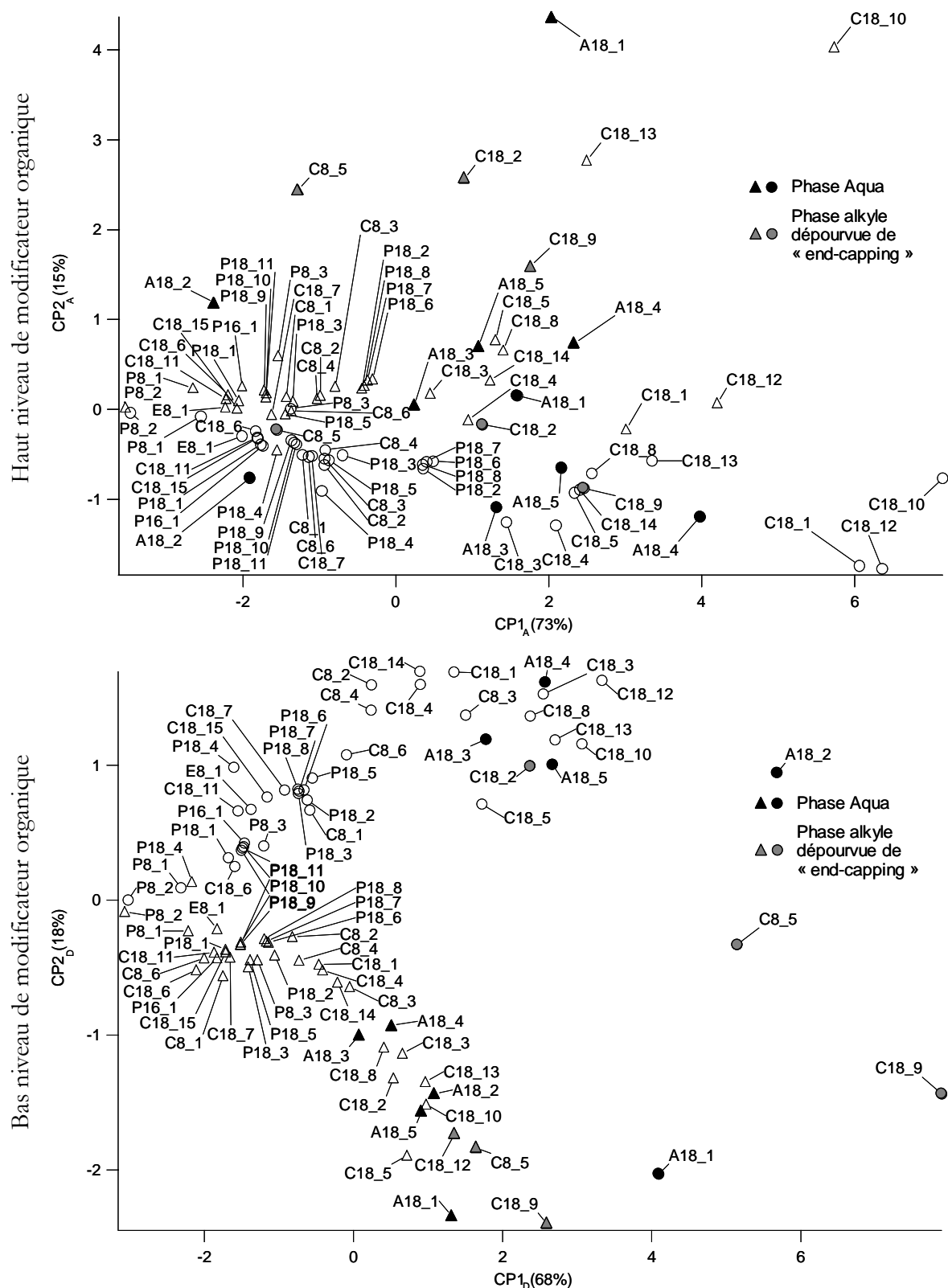


Figure VIII-21 : ACP illustrée pour les phases Aqua et celles dépourvues de « end-capping » à haute et basse teneurs en solvant.

Les phases dépourvues de « end-capping » et Aqua font l'objet d'un repérage particulier dans un souci de meilleure lisibilité. D'une manière générale, ces phases occupent des zones de l'espace différentes suivant le niveau de teneur en solvant : à haut niveau de modificateur organique, leur étendue couvre toute la classification tandis qu'à bas niveau, elles se situent dans le demi-plan défini par les valeurs positives de $CP1_D$.

VIII.D.3.c.i Effet du « end-capping » apolaire

Présence ou non de « end-capping »

Parmi les phases purement alkyle testées, certaines n'ont pas subi de traitement de recouvrement terminal : il s'agit des Zorbax StableBond C8 et C18 (respectivement identifiées C8_5 et C18_2). Les phases StableBond possèdent cependant une base de greffon particulière, qui fera l'objet d'une discussion plus approfondie dans la section VIII.D.3.d.

D'après les informations du fabricant, la seule différence entre l'Uptisphere NEC (C18_9) et l'Uptisphere ODB (C18_8) réside en la présence d'un « end-capping » : il s'agit en effet de la même phase – même matrice de silice greffée selon des procédures identiques avec les mêmes greffons – sur laquelle est effectué un recouvrement terminal dans le cas de la C18_8.

A haut niveau de solvant, ces deux phases possèdent un comportement voisin dans le méthanol alors que dans l'acétonitrile, elles sont clairement séparées⁶⁰. Ce phénomène confirme l'effet nivelant du méthanol vis-à-vis des interactions ioniques, qui sont mises en évidence dans l'acétonitrile. La phase dépourvue de « end-capping » marque une propension pour ce type d'interactions, du fait du nombre plus élevé de silanols accessibles. Ce point ne constitue pas forcément un inconvénient : l'ajout d'une interaction polaire, dont le mécanisme ne sera pas rapidement saturé⁶¹, peut éventuellement apporter un gain de résolution pour l'analyse (cf. pic peu asymétrique de l'amiodarone sur la Figure VIII-5).

A bas niveau de solvant, ces phases se différencient plus l'une de l'autre qu'à haut niveau de solvant : l'Uptisphere ODB reste dans les groupes des phases greffées octadécyle classiques (cf. Figure VIII-14), tandis que l'Uptisphere NEC apparaît complètement isolée sur la classification, surtout en méthanol, ses voisins les moins éloignés étant l'Aquasil C18 (A18_1) et la Zorbax StableBond C8 (C8_5) pour les deux modificateurs organiques.

L'absence de « end-capping » agit donc d'autant plus sur le comportement chromatographique que la teneur en solvant organique est basse.

Génération de « end-capping »

Les procédures de « end-capping » étant en grande majorité brevetées, il nous est difficile de les comparer faute d'information. Cependant, nous pouvons étudier l'influence de la génération de recouvrement terminal, par analogie avec celle de synthèse des phases stationnaires, sachant que, d'après les informations du fabricant, les phases Nucleodur EC (C18_13) et Nucleodur Gravity (C18_14) diffèrent uniquement par leur type de « end-capping », apolaire dans tous les cas. Pour la C18_13, le « end-capping » repose sur le greffage « classique » d'un ligand triméthylesilyle. Quant à celui de la C18_14, sa structure ne nous a pas été révélée.

A haut niveau de solvant, ces deux phases s'avèrent plus distantes que ne le sont les Uptisphere ODB et NEC. La Nucleodur EC révèle systématiquement des interactions ioniques plus fortes que la Nucleodur Gravity, traduisant un « end-capping » moins efficace, propice au développement d'interactions de type ionique.

A bas niveau de solvant, les écarts observés sont identiques pour les deux modificateurs organiques. La Nucleodur EC se positionne dans le même groupe que l'Uptisphere ODB tandis que la Nucleodur Gravity se rapproche de la Symmetry C18 (C18_4) et des C8 à haute densité de greffage, connues pour leur degré de protection élevé, toujours supérieur à celui de leur homologue C18.

En résumé, les phases C18 à bas niveau de solvant se répartissent sur CP1_D dans l'ordre : « end-capping » de dernière génération < « end-capping » classique < absence de « end-capping ».

⁶⁰ Des regroupements déterminés par l'Analyse en Clusters, on en déduit que ces phases appartiennent au même groupe dans le méthanol, ce qui n'est pas le cas dans l'acétonitrile.

⁶¹ Le nombre suffisamment élevé de sites permet d'éviter un phénomène de surcharge, souvent à l'origine de traînes de pic réductrices.

Compte tenu du peu d'information dont nous disposons, la catégorie Aqua désigne simplement des phases stationnaires ayant subi un traitement de surface⁶² qui les rend aptes à une utilisation dans des conditions purement aqueuses. Ce traitement peut consister en un « end-capping » de type polaire, comme cela est le cas pour l'Aquasil C18 (A18_1), la YMC-Pack ODS-AQ (A18_3) et la Synergi Hydro-RP (A18_4). Pour les deux autres, nous ignorons totalement le traitement effectué.

A haut niveau de solvant, la projection des coordonnées des phases Aqua sur CP1_A couvre une large gamme d'hydrophobie. Sur CP2_A, on note aussi une diversité des comportements, traduisant des interactions de type ioniques d'intensités différentes. Concernant l'Aquasil C18, l'étude du chromatogramme en Figure VIII-6 laisse à penser que les interactions ion-dipôle sont prépondérantes par rapport à celle de type ion-ion, soulignant de fait la nature polaire non ionique du « end-capping ». Signalons aussi que le passage du méthanol à l'acétonitrile se traduit par un décalage suivi d'une dilatation de la classification obtenue dans le méthanol, confirmant l'effet discriminant de l'acétonitrile.

A bas niveau de solvant, l'effet de décalage/dilatation s'amplifie, mais en inversant l'ordre des modificateurs organiques : cette fois-ci le méthanol provoque une dilation de la classification par rapport à celle obtenue dans l'acétonitrile. Les comportements des colonnes YMC-Pack ODS-AQ et Synergi Hydro-RP se révèlent plus proches à basse qu'à haute teneur en solvant organique. Leur éloignement de l'Aquasil C18 indique probablement des natures différentes de « end-capping » polaire.

La diversité des comportements observés pour les phases d'appellation Aqua démontre que ce qualificatif se révèle aussi peu précis que celui de « base deactivated ».

VIII.D.3.d Effet de la base du greffon

Les colonnes Zorbax StableBond possèdent une base de greffon particulière : au lieu d'un diméthylalkyle, leur greffon est constitué d'une base di-isopropyle (ligand en C8) ou di-isobutyle (chaîne C18). Cette base encombrée est censée conférer à la phase une protection stérique vis-à-vis des silanols résiduels [125], ce qui doit leur permettre de s'affranchir d'une étape de recouvrement terminal. Un encombrement à la base du greffon se traduit par une densité de greffage inférieure à celle de leurs homologues diméthylalkyle, phénomène qui est vérifié sur le plan CP1_A-CP2_A : les hydrophobies de C8_5 et de C18_2 font figure de bornes inférieures pour les phases purement alkyle. D'autre part, malgré l'encombrement stérique généré par la base du greffon, sont révélées sur CP2_A des interactions ioniques d'intensité supérieures à celles se produisant avec des phases de greffon plus traditionnel mais possédant un « end-capping ».

A bas niveau de solvant, si la Zorbax StableBond C18 se situe dans le groupe des colonnes type octadécyle, son homologue en C8⁶³ se situe au contraire à des valeurs élevées de CP1_D. La chaîne latérale en C3 provoque certainement une gêne stérique sur le greffon C8 supérieure à celle engendrée par la chaîne en C4 vis-à-vis du C18. Par conséquent, la base du greffon perturbe la conformation de ce dernier, qui, désorganisé, exhibe alors une hétérogénéité énergétique plus importante. La base en C4 s'avère moins déstabilisante pour le greffon C18, qui maintient sa position dans les C18. Quant à la phase Zorbax Stable Bond Aq (A18_2)⁶⁴, résultat du couplage d'une base de greffon encombrante à un traitement de type Aqua (différent d'un « end-capping »), un phénomène similaire à celui de la Zorbax StableBond C8 se produit dans les deux solvants. Il peut à nouveau s'interpréter en termes de désorganisation du greffon, provenant à la fois de la base encombrante mais aussi du traitement la rendant hydrophile. Ce dernier

⁶² Par opposition au groupement polaire intercalé dans le greffon

⁶³ Suite à une contamination métallique provenant de nos solvants organiques (cf. Annexe 9), la colonne C8_5 a dû subir un traitement à base de complexants afin de neutraliser l'effet rédhitoire des ions Al³⁺ sur la rétention, sans pour autant garantir un retour à l'état de surface initial ; cependant, l'incertitude résidant plutôt sur les temps de rétention des composés basiques, nous pouvons poursuivre notre raisonnement sur CP1_D, moins affectée que CP2_D.

⁶⁴ La longueur de chaîne du greffon reste inconnue à ce jour.

semble aussi jouer en défaveur de l'organisation de la couche hydrocarbonée par effet répulsif, alors que pour les phases sans « end-capping » possédant un greffon diméthylalkyle, la désorganisation est plutôt imputable à des différences de polarités entre la surface rendue hydrophyle et la base de la chaîne alkyle, hydrophobe. La présence d'un groupement polaire intercalé permet de s'affranchir de ce phénomène de répulsion, qui affecte plus les greffons de type octadécyle que ceux de type octyle.

En résumé, d'après nos interprétations, CP1_D traduit bien le degré de désorganisation de la phase stationnaire, provoqué par un état de surface de la matrice de silice de plus en plus déstabilisateur, soit par effet répulsif soit par différences de polarité. Quant au rôle du méthanol, il semble que ce modificateur organique engendre une désorganisation encore plus forte des phases stationnaires. Ce phénomène peut découler de deux origines :

1. La phase méthanol peut s'avérer trop proche de la phase purement aqueuse, auquel cas la phase stationnaire est moins bien solvatée qu'avec une phase acétonitrile ;
2. Une association entre complexes méthanol/eau et phases stationnaire, similaire à un « coating », peut engendrer des sites d'interactions supplémentaires, faibles si l'association s'effectue avec la matrice, plus fortes si il s'agit d'une association avec les greffons ; dans ce dernier cas, la présence de zones de solvation discontinues pourrait engendrer des sites potentiels d'interactions hétérogènes d'un point de vue énergétique.

Néanmoins, les traitements de surface ne s'avèrent pas tous déstabilisateurs. Ainsi, la position de la CapellPak sur les classifications, à haut et bas niveaux en solvant, toujours proche de phases à groupement polaire intercalé, indique probablement un effet stabilisateur de l'encapsulation pour la base du greffon. Cet effet stabilisateur, pourvoyeur de rigidité du greffon, était déjà suggéré lors Chapitre IV par une sélectivité de forme plus élevée que celle observée sur des silices greffées C8 haute densité. Cependant, ce résultat nécessiterait d'être consolidé, par le test d'une CapcellPak C18 par exemple.

VIII.D.3.e Etude du phénomène de vieillissement

Nous envisageons désormais d'étudier les différences de comportements entre deux colonnes, l'une neuve, l'autre usagée, fournies par notre partenaire industriel, et si possible de cerner les mécanismes responsables de la perte de résolution constatée pour la seconde colonne. L'étude a porté sur deux colonnes Symmetry C18 (250*4,6 mm), de deux lots distincts. La colonne usagée (C18_5) a été utilisée préalablement dans des conditions d'analyse, qui si elles ne peuvent être qualifiées de tout à fait usuelles⁶⁵, n'ont rien en commun avec des conditions volontairement dégradantes comme dans d'autres études [116, 374-376]. Après deux jours d'utilisation, la colonne ne satisfait plus aux critères de conformité pour la séparation à opérer, mais reste cependant utilisable, condition minimale requise pour l'évaluer au moyen de notre procédure de test. La Figure VIII-22 représente des agrandissements dans la zone d'intérêt des plans CP1-CP2 obtenus respectivement à haute et basse teneur en modificateur organique.

⁶⁵ Triple gradient de mélange hydro-organique à base d'acétonitrile et de tampon phosphate 20 mM, de pH et de concentration en agent d'appariement d'ions, débit de 2 mL/min, T=26°C

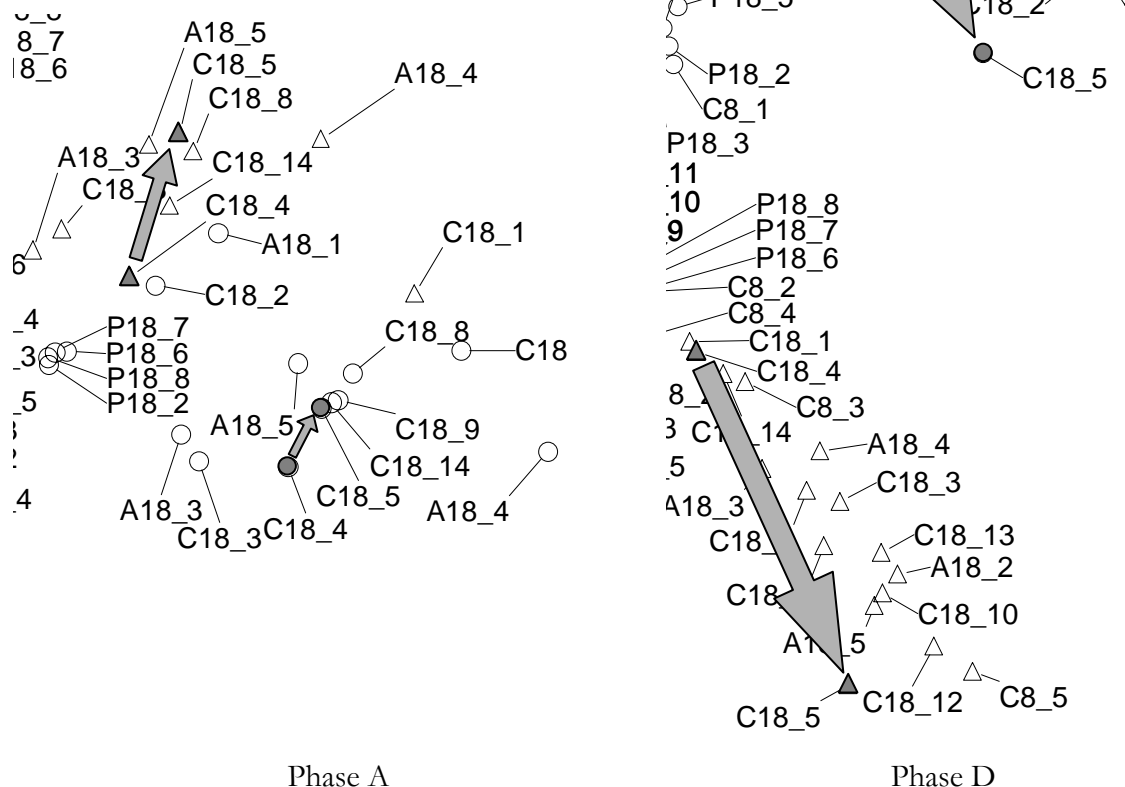


Figure VIII-22 : Agrandissements des plans CP1-CP2 aux deux niveaux de teneur en modificateur organique.

Les échelles d'agrandissement étant conservées pour autoriser une comparaison fiable entre les niveaux de solvant, la différence entre les colonnes neuve et usagée est plus marquée à basse teneur en modificateur organique et d'autant plus que le solvant est l'acétonitrile. Ce phénomène est illustré d'un point de vue chromatographique sur la Figure VIII-23.

A haut niveau de méthanol, nous n'observons pas de différence notable⁶⁶ pour la rétention des composés neutres (solutés 1, 3, 4, 5 et 6), ce qui signifie une surface hydrocarbonée accessible invariée et donc l'absence de perte de greffons au cours de l'utilisation. Par contre, les composés basiques 2 et 4 s'avèrent plus retenus sur la colonne usagée que sur la colonne neuve, traduisant un accroissement des interactions ioniques (qui incluent les types ion-dipôle et ion-ion). A bas niveau de méthanol, la différence de rétention pour la strychnine, sonde basique, est encore plus prononcée, confirmant ainsi la contribution plus importante d'un mécanisme d'échange d'ions. En outre, la caféine voit aussi son temps de rétention s'élever, dans une moindre mesure, signifiant une légère modification de l'état de surface perturbant la structure de la phase stationnaire. Tous ces arguments sont en faveur de l'activation de groupements silanol supplémentaires. Comme nous avons écarté l'hypothèse de perte des chaînes greffées octadécyle, ce comportement chromatographique ne peut provenir que de l'hydrolyse du « end-capping ».

⁶⁶ L'étendue de la dispersion constatée est de l'ordre de grandeur de la variabilité interlot

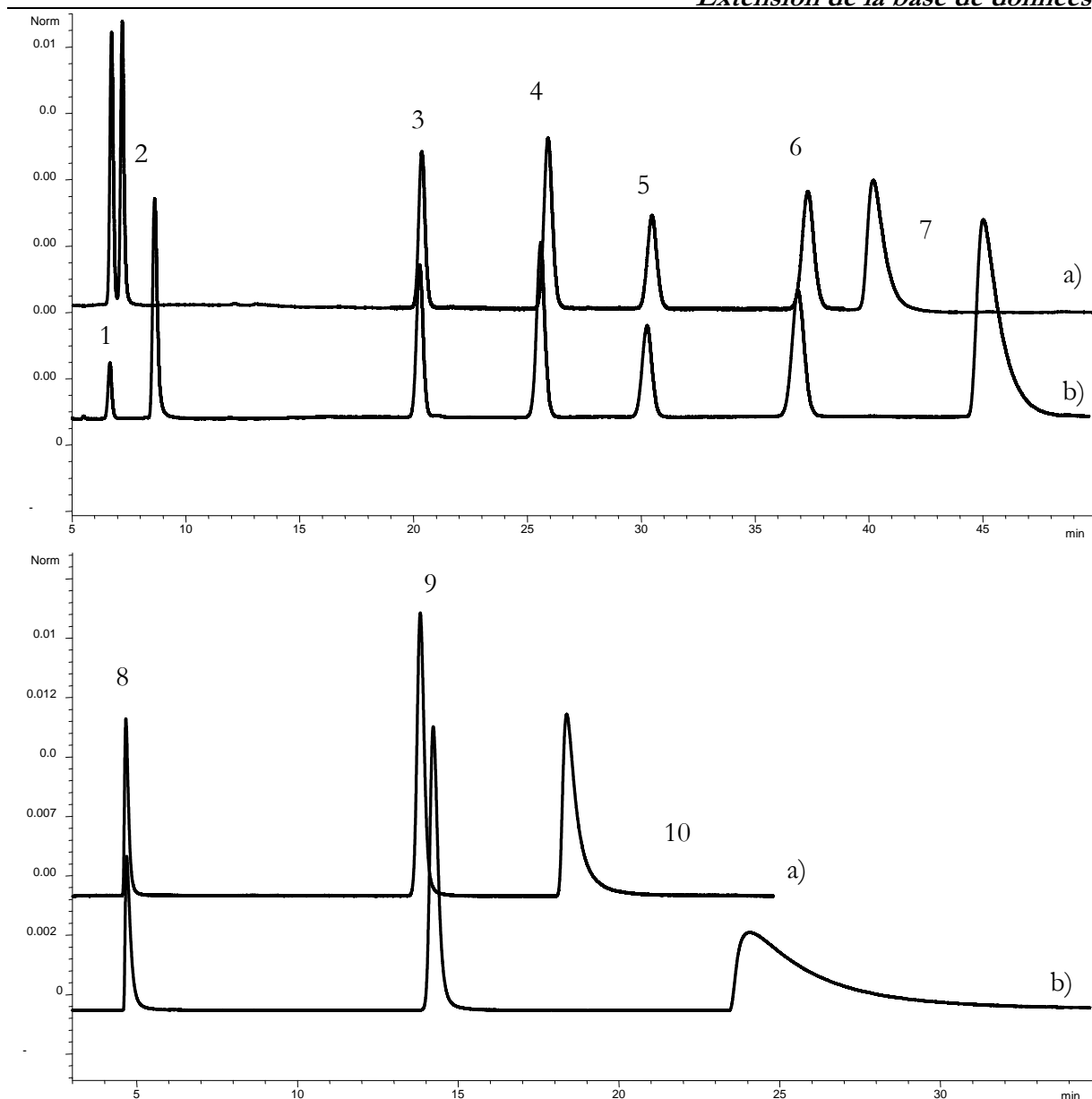


Figure VIII-23 : Chromatogrammes obtenus sur des colonnes Symmetry C18 a) neuve et b) usagée avec le méthanol pour modificateur organique ; composés injectés : digitoxine (1), clofazimine (2), butylbenzène (3), o-terphényle (4), pentylbenzène (5), triphénylène (6), amiodarone (7), benzylamine (8), caféine (9) et strychnine (10).

Ce résultat est cohérent avec ceux de Scholten [376], qui a démontré par RMN du ^{29}Si des phénomènes de dégradation « mixte » des phases stationnaires purement alkyles. En effet, à pH basique agressif, la dissolution de la matrice de silice n'intervient pas seule : la dégradation du support greffé s'avère dépendre aussi de la nature du greffon, en termes de longueur, de solubilité dans l'éluant et de fonctionnalité de greffage, conduisant à l'ordre de dégradation constaté $\text{C8}_{\text{monomérique}} > \text{C8}_{\text{difonctionnel}} > \text{C8}_{\text{trifonctionnel}} > \text{C18}$. En suivant un raisonnement comparable à celui qui régit la solubilité de paires d'ions en fonction de celle du contre-ion, les greffons triméthylsilanes, du fait de leur meilleure solubilité dans la phase mobile que les greffons octadécyles, favorisent la solubilisation de l'entité matrice/greffon : il apparaît donc logique que le « end-capping » de la phase Symmetry C18 soit éliminé avant les greffons C18. La solubilisation des entités (triméthylsilane/cluster de silice) laisse localement un support vierge de greffon alkyle, ce qui se traduit par l'apparition de groupements silanols.

Au final, cette étude de vieillissement se rapporte à un problème de traitement de surface. L'augmentation du taux de silanols accessibles provoque à la fois une modification de l'état de surface, qui entraîne une élévation de l'hétérogénéité énergétique de la phase, mais engendre aussi des interactions supplémentaires. Cet effet cumulatif explique probablement une plus grande

Chapitre VIII

discrimination des comportements chromatographiques à bas niveau qu'à haut niveau de solvant. Ce phénomène souligne à nouveau l'importance de la nature du solvant et de sa fraction dans la phase mobile pour le test, mais aussi pour le développement de méthodes chromatographiques.

VIII.E Conclusion

L'application du test à un nombre plus élevé de phases stationnaires a permis d'éliminer au final deux composés peu retenus (la benzylamine et la vancomycine) et d'alléger ainsi de manière ultime la procédure. Evaluer les phases selon deux niveaux de teneur en modificateur organique s'est aussi avéré indispensable : la nature des mécanismes de rétention ne dépend pas seulement de la nature du solvant employé, mais aussi de sa fraction, démontrant ainsi le bien-fondé du point de vue de Rohrschneider [295].

Le couplage ACP-AHC s'est révélé décisif pour l'interprétation des classifications. Associé à une utilisation simultanée des « score plots » et de leurs « loading plots », il permet l'attribution d'un sens physico-chimique aux composantes principales, résumée dans le Tableau VIII-3 ainsi que les relations thermodynamiques qui ont en été déduites.

Tableau VIII-3 : Signification des composantes principales et taux d'information interprété, à haut et bas niveaux de solvant.

<i>Teneur en modificateur organique</i>	<i>Elevée</i>		<i>Basse</i>	
CP	Variance expliquée	Interprétation	Variance expliquée	Interprétation
CP1	73%	Hydrophobie Rétention de type partage gouvernée par ΔH°	68%	Désordre de la structure de la phase Rétention de type adsorption gouvernée par ΔS°
CP2	15%	Interactions ioniques : ion-ion et ion-dipôle	18%	Distribution des interactions en échelle d'intensité : de ion-dipôle à ion-ion
CP3	9%	Interactions dipôle- dipôle		
Quantité d'information interprétée	97%		86%	

A bas niveau de solvant, la plus faible quantité d'information interprétée s'explique par la moindre robustesse de la phase D par rapport à la phase A.

D'un point de vue chromatographique, les classifications permettent d'illustrer la grande diversité de comportement de notre échantillon de phases stationnaires. Reste désormais non plus à les classer, mais à les caractériser en leur attribuant une carte d'identité. Pour cela, il fallait connaître les descripteurs les plus pertinents, c'est-à-dire ceux réalisant les meilleurs compromis apport d'information/robustesse. Connaissant ces deux contributions, le choix rationnel des descripteurs peut désormais être envisagé, ce qui fera l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IX Construction des cartes d'identité : aide au choix raisonné des colonnes chromatographiques

IX.A Introduction

Les ACP ont permis d'obtenir les classifications des phases stationnaires testées, regroupées par familles de comportement. Le passage d'une classification, effectuée à partir d'un ensemble de colonnes, à une caractérisation individuelle nécessite la définition d'un jeu de descripteurs fiables et informatifs. La littérature offre un nombre pléthorique de prétendants, cependant souvent partiellement corrélés entre eux [262], signifiant une redondance de l'information. Quant à leur fiabilité, très rares sont ceux qui ont fait l'objet d'une véritable étude. A contrario, nous connaissons la signification et la robustesse des composantes principales à la base de nos classifications. D'autre part, l'orthogonalité des composantes d'une ACP assure l'absence de redondance de l'information. Pour toutes ces raisons, les composantes principales sont aptes à fournir des descripteurs potentiels. Dans un souci de simplicité, nous nous proposons donc de les comparer à des descripteurs usuels pour lesquels nous pouvons déterminer la valeur dans nos conditions, ceci afin d'opérer une sélection de ceux qui réalisent le meilleur compromis informativité/robustesse et qui sont aussi peu redondants que possible. A l'issue de cette étape, il sera alors possible d'établir les cartes d'identité relatives à chaque colonne évaluée, au moyen de descripteurs informatifs et fiables.

IX.B Sélection des descripteurs

La sélection s'effectue en plusieurs étapes. Il s'agit d'abord de choisir un jeu de descripteurs potentiels, dont font partie nos composantes principales interprétées mais aussi constitué de grandeurs plus classiques, telles que les sélectivités ou le taux de carbone. Interviendra alors une étude de corrélation qui permettra de mettre en évidence d'éventuelles redondances entre les descripteurs. Si ces dernières sont présentes, elle permettront d'opérer une sélection des descripteurs qui s'avèrent porter la même information, dont on évaluera alors la qualité du rendu via leur rapport informativité/robustesse.

IX.B.1 Choix des descripteurs potentiels

Les classifications issues du Chapitre VII font appel à 5 composantes principales, dont 3 à haut niveau de solvant et 2 et à basse teneur en modificateur organique. A l'issue de l'étude de robustesse a été ajoutée l'asymétrie du pic de l'amiodarone, seul paramètre de ce type qui se soit révélé fiable et modélisable. Nous nous proposons donc de confronter ces descripteurs potentiels aux sélectivités méthylène et de forme, déterminées à partir des facteurs de rétention des composés neutres de Tanaka, mais aussi au taux de carbone, paramètre généralement mentionné par les fournisseurs et réputé indiquer l'hydrophobie de la phase stationnaire.

A bas niveau de solvant, nous n'avons pas pu reprendre de descripteurs qui puissent être considérés comme équivalents aux nôtres, faute de données disponibles dans ces conditions dans la littérature.

IX.B.2 Etudes de corrélations

Les études de corrélations sont des outils privilégiés eu égard à leur simplicité, pour comparer différents descripteurs [192, 253, 262, 301]. L'objectif premier de notre étude de corrélation consiste à mettre en évidence d'éventuelles liaisons, qui seront autant de redondances, entre des paramètres. L'approche que nous proposons repose en premier lieu sur une étude de

Chapitre IX

l'ensemble de notre jeu de phases stationnaires. Si la corrélation est faible ($r < 0,50$), tous les paramètres pourront être conservés. A contrario, si l'étude révèle des corrélations partielles plus fortes, alors nous développerons notre discussion en fonction des différentes familles de phases stationnaires, dont nous avons démontré qu'elles ne présentent pas le même comportement chromatographique suivant leur nature et la fraction en solvant organique.

IX.B.2.a Etude globale

La Figure IX-1 présente le diagramme de corrélations obtenu pour tous les paramètres étudiés, qui permet de visualiser simplement la présence d'une relation entre deux descripteurs potentiels lorsque l'ellipse de confiance à 95% prend une forme allongée selon la première ou la seconde bissectrice.

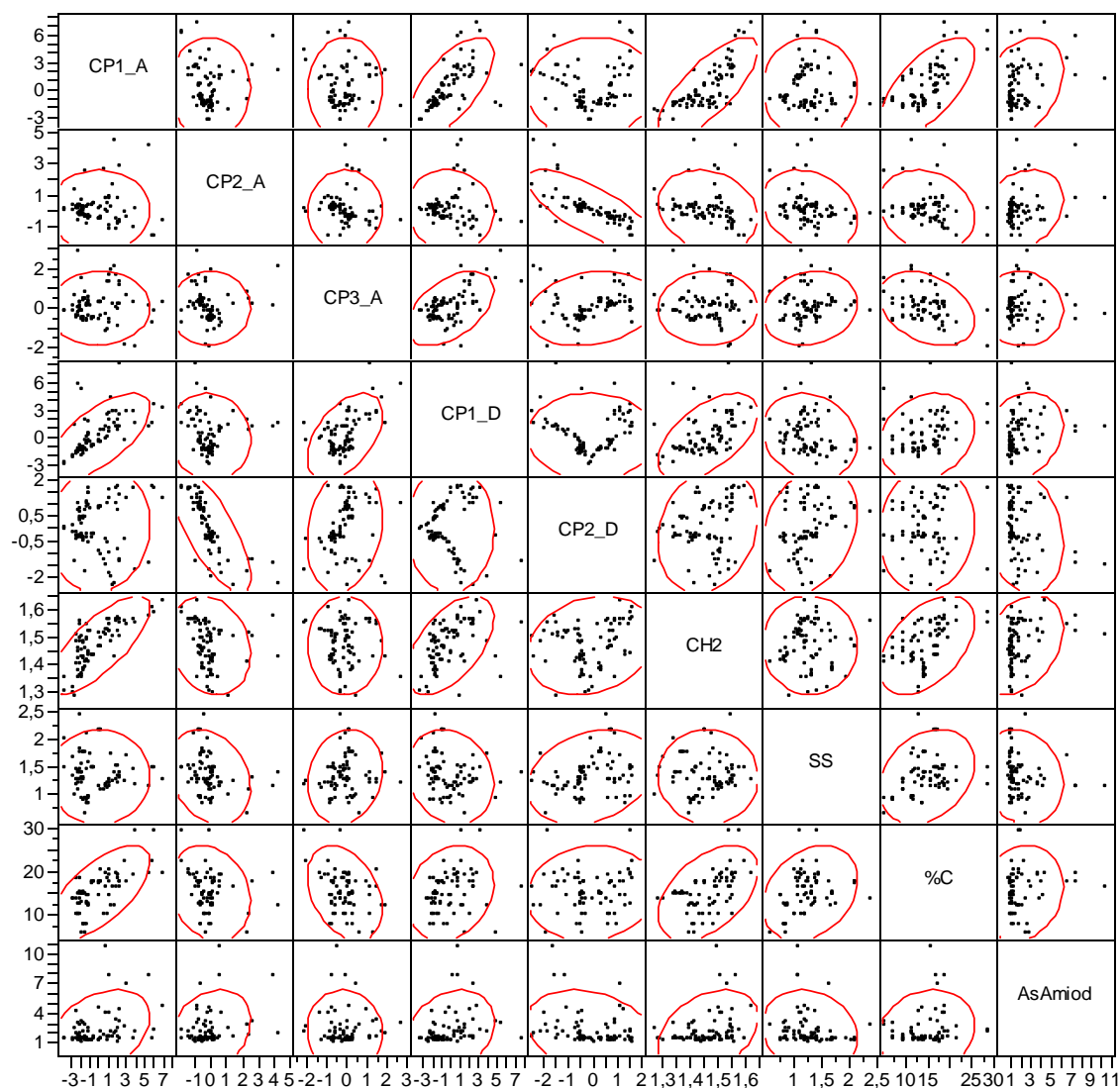


Figure IX-1 : Diagramme de corrélation entre les 5 composantes principales sélectionnées, les sélectivités méthylène (CH2) et de forme (SS), le taux de carbone (%C) et l'asymétrie de pic de l'amiodarone.

Aucune corrélation forte ne transparait de la Figure IX-1. Cependant des tendances apparaissent, montrant de probables relations entre :

- Le taux de carbone %C et CP1_A ;
- CP1_A, CP1_D et α_{CH2} ;
- CP2_A et CP2_D.

Le Tableau IX-1 reprend la matrice de corrélation dont est issue la Figure IX-1.

Tableau IX-1: Matrice des corrélations de tous les descripteurs potentiels pour toutes les phases stationnaires testées.

r	$CP1_A$	$CP2_A$	$CP3_A$	$CP1_D$	$CP2_D$	α_{CH_2}	SS	%C	$As_{Amiodarone}$
$CP1_A$	1,00								
$CP2_A$	-0,01	1,00							
$CP3_A$	0,03	0,02	1,00						
$CP1_D$	0,67	-0,07	0,50	1,00					
$CP2_D$	0,07	-0,76	0,20	-0,02	1,00				
α_{CH_2}	0,76	-0,19	0,01	0,56	0,21	1,00			
SS	0,01	-0,25	0,15	-0,17	0,26	-0,01	1,00		
%C	0,67	-0,20	-0,35	0,21	0,09	0,48	0,28	1,00	
$As_{Amiodarone}$	0,36	0,27	-0,05	0,25	-0,25	0,35	-0,16	0,14	1,00

Au niveau de chaque jeu de composantes principales, relatif à une fraction en modificateur organique, le très faible degré de corrélation permet de vérifier l'indépendance des composantes principales. A contrario, concernant le jeu global des 5 composantes principales, on observe une tendance prononcée à la corrélation ($|r| > 0,50$) pour les paires $\{CP1_A; CP1_D\}$ et $\{CP2_A; CP2_D\}$, et dans une moindre mesure pour $\{CP1_D; CP3_A\}$. Si pour chaque niveau de solvant, nous sommes assurés de l'orthogonalité des composantes principales par construction, il n'est pas garanti qu'en effectuant des ACPs sur deux types de fraction organique, les sous-espaces définis soient orthogonaux entre eux, ce que confirme le Tableau IX-1. $CP1_A$ et $CP1_D$ en tant que premières composantes principales rendent compte d'une majeure partie de la rétention; il est donc légitime de s'attendre à ce qu'elles soient au moins partiellement corrélées⁶⁷. Cette corrélation n'étant que partielle, ces descripteurs ne sont cependant pas équivalents, ce qui consolide notre interprétation à leur égard : $CP1_A$ traduit une rétention gouvernée par enthalpie tandis que $CP1_D$ reflète une rétention à contribution majeure entropique. Un raisonnement similaire peut être appliqué à la paire $\{CP2_A; CP2_D\}$, relatant des interactions – notamment de type ionique – qui permettent de distinguer les phases stationnaires suivant le solvant de test. Quant à la corrélation de la paire $\{CP1_D; CP3_A\}$, elle était pressentie à l'examen des classifications lors du Chapitre VIII, ces deux composantes autorisant la discrimination entre les phases de types Aqua de celles à greffon purement alkyle.

Cependant, la plus forte corrélation est à mettre au crédit de la paire $\{CP1_A; \alpha_{CH_2}\}$ ⁶⁸. La présence de cette relation était attendue de la part de deux descripteurs censés refléter l'hydrophobie de la phase. Par contre, le taux de carbone ne démontre qu'une corrélation partielle avec $CP1_A$ ⁶⁹ : ceci démontre bien que cette caractéristique, souvent mise à disposition des utilisateurs, n'offre qu'une image incomplète de l'hydrophobie des phases. Le cas des phases constituées d'une matrice de silice hybride illustre d'ailleurs la limitation de cette notion. En effet, les phases hybrides présentent un taux de carbone jusqu'à deux fois supérieur à celui des phases en C8 tout en révélant une hydrophobie, évaluée par $CP1_A$ ou la sélectivité méthylène, qui leur est bien inférieure (cf. Chapitre VIII). Ce phénomène trouve son explication dans la nature de la mesure du taux de carbone : en tant que mesure globale de la teneur en carbone, il tient compte aussi des atomes carbone constituant la matrice hybride mais qui ne participent pas à la rétention. Par conséquent, cette mesure aboutit à une surestimation de l'hydrophobie de la phase. En résumé, ce descripteur s'avère moins pertinent que $CP1_A$ ou α_{CH_2} , confirmant des résultats précédents [192]. Cette raison apparaît suffisante pour écarter le pourcentage de carbone du jeu de descripteurs.

⁶⁷ La présence de cette corrélation autorise dès lors la comparaison des positions des couples colonne/solvant sur les classifications obtenues à haut et bas niveau de solvant.

⁶⁸ Par effet de ricochet, on observe une corrélation pour la paire $\alpha_{CH_2}/CP1_D$, moindre que pour $\alpha_{CH_2}/CP1_A$, confirmant nos interprétations des CP1s : $CP1_A$ reflète une notion claire d'hydrophobie alors que $CP1_D$ y est moins liée.

⁶⁹ Cette corrélation s'avère encore plus faible avec α_{CH_2}

Chapitre IX

Concernant les deux descripteurs restants, la sélectivité de forme SS et l'asymétrie de pic de l'amiodarone, ils s'avèrent constituer des descripteurs quasiment indépendants. Ceci confirme d'ailleurs la nature de l'asymétrie : l'asymétrie de pic de l'amiodarone, indépendante de la rétention, relate le nombre de sites accessibles de haute énergie pouvant être engagés dans un mécanisme de rétention, principal ou secondaire, limitant en terme de capacité. De fait, l'asymétrie participe à l'évaluation du degré de protection.

Du fait d'un nombre significatif de corrélations partielles entre les descripteurs, notamment les composantes principales déterminées à différents niveaux de solvant, et gardant à l'esprit le comportement des regroupements effectués sur les classifications lors du Chapitre VIII, selon la nature de la phase stationnaire, il est préférable d'approfondir notre investigation en fonction de ce dernier facteur, pour vérifier le cas échéant une dépendance entre familles de phases stationnaires et degrés de corrélation partielle de paires de descripteurs

IX.B.2.b Etude par familles de phases stationnaires

L'étude se poursuit en fonction des trois grandes familles de phases stationnaires mises en évidence au chapitre précédent : les phases purement alkyles (Tableau IX-2), celles possédant un groupement polaire intercalé (Tableau IX-3) et enfin les phases de type Aqua (Tableau IX-4).

Tableau IX-2 : Matrice des corrélations obtenue pour les seules phases alkyles (C).

r	$CP1_A$	$CP2_A$	$CP3_A$	$CP1_D$	$CP2_D$	α_{CH2}	SS	$As_{Amiodarone}$
$CP1_A$	1,00							
$CP2_A$	-0,04	1,00						
$CP3_A$	-0,06	-0,05	1,00					
$CP1_D$	0,55	-0,12	0,56	1,00				
$CP2_D$	0,10	-0,74	0,32	0,03	1,00			
α_{CH2}	0,76	-0,21	-0,01	0,32	0,26	1,00		
SS	0,28	-0,28	0,01	0,07	0,27	0,67	1,00	
$As_{Amiodarone}$	0,37	0,36	-0,01	0,13	-0,20	0,25	0,17	1,00

Tableau IX-3 : Matrice des corrélations obtenue pour les phases à groupement polaire intercalé (P).

r	$CP1_A$	$CP2_A$	$CP3_A$	$CP1_D$	$CP2_D$	α_{CH2}	SS	$As_{Amiodarone}$
$CP1_A$	1,00							
$CP2_A$	-0,35	1,00						
$CP3_A$	0,15	-0,66	1,00					
$CP1_D$	0,90	-0,29	0,23	1,00				
$CP2_D$	0,41	-0,91	0,76	0,40	1,00			
α_{CH2}	0,65	-0,55	0,05	0,67	0,48	1,00		
SS	0,47	-0,74	0,67	0,27	0,77	0,29	1,00	
$As_{Amiodarone}$	-0,31	0,58	-0,16	-0,26	-0,55	-0,36	-0,33	1,00

Tableau IX-4 : Matrice des corrélations obtenue pour les phases Aqua (A).

r	$CP1_A$	$CP2_A$	$CP3_A$	$CP1_D$	$CP2_D$	α_{CH2}	SS	$As_{Amiodarone}$
$CP1_A$	1,00							
$CP2_A$	-0,03	1,00						
$CP3_A$	-0,23	0,06	1,00					
$CP1_D$	-0,18	-0,38	0,79	1,00				
$CP2_D$	0,17	-0,78	0,15	0,38	1,00			
α_{CH2}	0,83	-0,39	-0,35	-0,23	0,37	1,00		
SS	0,57	-0,03	0,40	0,46	-0,06	0,35	1,00	
$As_{Amiodarone}$	-0,15	0,02	-0,31	-0,23	-0,27	0,07	-0,34	1,00

De par leur diversité, les niveaux de corrélations s'avèrent dépendre de la nature des phases stationnaires. Commençons par les corrélations entre composantes principales uniquement.

Concernant la paire $\{CP1_A; CP1_D\}$, on observe une corrélation décroissante dans l'ordre : $P > global > C > A \approx 0$. Cet ordre traduit bien une quasi invariance des regroupements des phases P et de leur positions sur les classifications à haut et bas niveau de solvant, contre une modification des groupes des phases alkyles (type C) et une dispersion totale des groupes Aqua (A) entre haut et bas niveaux de modificateur organique.

Les corrélations pour $\{CP2_A; CP2_D\}$ respectent l'ordre $P > A > global > C$, signifiant la présence d'une contribution dipolaire commune à la détermination des secondes composantes principales.

La paire $\{CP1_D; CP3_A\}$ reprend quant à elle un ordre de corrélation inverse à $\{CP1_A; CP1_D\}$, avec $A > C \geq global > P \approx 0$, confirmant ainsi la signification de $CP3_A$ (interactions de type dipôle-dipôle) et son utilité pour distinguer les phases à groupement purement alkyle mais de stratégies de protection différentes vis-à-vis des groupements silanol résiduels. D'ailleurs, la forte corrélation, constatée pour $\{CP2_A; CP3_A\}$ ⁷⁰ et uniquement pour les phases à groupement polaire intercalé, prouve que $CP3_A$ n'apporte pas un gain significatif d'information pour ce type de phases, alors que cette composante en introduit un réel pour les autres familles. Ce phénomène démontre clairement que les composantes principales d'un même sous-espace fournissent des apports d'information différenciés selon la nature des phases stationnaires.

Abordons désormais les corrélations mettant en jeu des sélectivités.

La sélectivité méthylène se révèle partiellement corrélée à $CP1_A$ pour toutes les familles de phases (ordre de corrélation $A > global \approx C > P$) et avec les composantes $CP2_A$ et $CP1_D$ ⁷¹ uniquement pour les phases P. Si la corrélation avec $CP1_A$ est attendue, celle avec $CP2_A$ l'est beaucoup moins et traduit certainement une modification de la surface hydrocarbonée accessible en fonction de la nature du modificateur organique pour les phases P.

La sélectivité de forme est globalement peu corrélée avec les autres descripteurs, hormis quelques cas que nous allons détailler. La sélectivité de forme n'est reliée à la sélectivité méthylène que pour les phases purement alkyles, qui regroupent des greffons C8 et C18. On retrouve ainsi les résultats de Sander et Wise [377], pour qui la sélectivité de forme SS dépend de la longueur du greffon. De surcroît, cette corrélation confirme la primauté de l'influence du groupement polaire intercalé, mais aussi des fonctions polaires de façon plus générale, sur la longueur de la chaîne alkyle. D'autre part, la sélectivité de forme s'avère associée avec $CP2_A$ ⁷² seulement pour les phases comprenant un groupement polaire intercalé, soulignant l'importance des interactions dipolaires pour l'orientation et l'organisation de la couche alkyle dont dépend la sélectivité de forme.

L'asymétrie de pic de l'amiodarone ne révèle pas de corrélation particulière avec les autres descripteurs, sauf avec les secondes composantes principales et uniquement pour les phases à groupement polaire intercalé, exprimant ainsi l'effet de la nature du modificateur organique sur l'efficacité de protection.

A ce stade d'investigation, les jeux de composantes principales s'avèrent partiellement corrélés, avec la rétention pour dénominateur commun. Néanmoins, ces relations dépendent des familles de phases stationnaires. Dès lors, il n'est pas envisageable d'éliminer une composante principale de l'ensemble des descripteurs présélectionnés pour cause de redondance partielle de l'information, compte tenu de leur potentiel à discriminer certains types de phases. Au sortir des études de corrélations sont encore en lice 8 descripteurs potentiels, dont 5 composantes principales, une asymétrie et 2 sélectivités. Cependant reste désormais à discuter le cas $CP1_A$, proche de la sélectivité méthylène, au travers de leur rapport degré d'information/robustesse.

⁷⁰ Les paires $CP2_A/CP2_D$ et $CP2_A/CP3_A$ exhibant une corrélation prononcée, et ce uniquement pour les phases à groupement polaire intercalé, nous ne discuterons pas de la corrélation $CP3_A/CP2_D$, transitivement reliée aux deux précédentes.

⁷¹ Cette dernière corrélation $\alpha_{CH2}/CP1_D$ découle des corrélations multiples pour les couples $CP2_A/CP3_A$ et $CP1_D/CP3_A$ se produisant seulement pour les phases P.

⁷² Ainsi que $CP3_A$ et $CP2_D$, par effet transitif.

IX.B.3 Rapport informativité/robustesse

La sélectivité méthylène est connue pour une faible sensibilité apparente par rapport aux facteurs de rétention sur lesquels elle est basée [219]. Ce phénomène est une fois encore vérifié, via le coefficient d'information⁷³, qui s'élève à 5,30% pour α_{CH_2} , contre 26,53% et 59,82% respectivement pour la sélectivité de forme et les facteurs de rétention des neutres de Tanaka⁷⁴. Ainsi, la sélectivité méthylène atténue fortement les variations mises en évidence par les facteurs de rétention, à l'inverse de la sélectivité de forme qui, pour sa part, semble très informative.

Cependant, les sélectivités des solutés neutres possèdent des coefficients de variation environ dix fois inférieurs à ceux de leurs facteurs de rétention relatifs, comme le montrent les travaux de Kele et Guiochon [103, 321-325] : les sélectivités sont aussi plus robustes.

Les informativités et les niveaux de robustesse respectifs de la sélectivité méthylène et de CP1_A conduisent donc à des rapports informativité/robustesse équivalents.

La sélectivité méthylène se déterminant simplement comme le rapport de deux facteurs de rétention d'homologues successifs, il existe une grande diversité de définitions pour ce descripteur. En reprenant les facteurs de rétention d'alkylbenzènes homologues du Chapitre V, mesurés sur un premier panel de 12 phases stationnaires, le Tableau IX-5 montre qu'il est

possible de définir deux sélectivités méthylène différentes $\alpha_{CH_2}^A = \frac{k_{Pentylbenzène}}{k_{Butylbenzène}}$ et $\alpha_{CH_2}^B = \frac{k_{Ethylbenzène}}{k_{Toluène}}$,

respectivement déterminées dans les conditions chromatographiques des phases A (70% de méthanol ou 59% d'acétonitrile) et B (45% de méthanol ou 33% d'acétonitrile) du Chapitre V.

Tableau IX-5 : Sélectivités méthylène déterminés lors du test en conditions étendues.

Phase stationnaire	Abréviation	Modificateur organique	$\alpha_{CH_2}^A$	$\alpha_{CH_2}^B$
Capcell Pak C8 UG 120	E8_1	Méthanol	1,455	1,842
		Acétonitrile	1,400	1,701
XTerra RP8	P8_1	Méthanol	1,311	1,590
		Acétonitrile	1,292	1,568
Discovery RP Amide C16	P16_1	Méthanol	1,489	1,756
		Acétonitrile	1,417	1,689
XTerra RP18	P18_1	Méthanol	1,395	1,684
		Acétonitrile	1,369	1,642
SymmetryShield RP18	P18_2	Méthanol	1,461	1,791
		Acétonitrile	1,430	1,713
Zorbax Eclipse XDB-C8	C8_1	Méthanol	1,455	1,866
		Acétonitrile	1,418	1,745
Symmetry C8	C8_2	Méthanol	1,434	1,843
		Acétonitrile	1,407	1,733
Kromasil C8	C8_3	Méthanol	1,427	1,819
		Acétonitrile	1,405	1,709
J'Sphere ODS H80	C18_1	Méthanol	1,601	1,982
		Acétonitrile	1,554	1,855
Zorbax StableBond C18	C18_2	Méthanol	1,556	1,939
		Acétonitrile	1,510	1,817
Nucleosil C18 HD	C18_3	Méthanol	1,540	1,918
		Acétonitrile	1,488	1,788
Symmetry C18	C18_4	Méthanol	1,557	1,905
		Acétonitrile	1,521	1,811

⁷³ Le coefficient d'information définit l'informativité d'une variable (cf. section VIII.C page 133)

⁷⁴ Moyenne quadratique des CI (%)

Non seulement les valeurs de $\alpha_{CH_2}^A$ et $\alpha_{CH_2}^B$ sont affectées par les conditions chromatographiques – la fraction et la nature du modificateur organique, et le choix des solutés homologues – mais ces variations introduites par le choix des conditions s'avèrent aussi plus prononcées que celles observées entre les phases stationnaires. En effet, on constate des écarts de 0,3 à 0,4 entre nos deux définitions de la sélectivité à couple colonne/solvant identique, alors qu'entre des phases d'hydrophobie différentes, la différence observée n'excède jamais 0,3 entre les deux phases extrêmes, la J'Sphere ODS H80 (C18_1) et la XTerra RP8 (P8_1).

De surcroît, si la sélectivité méthylène était équivalente à CP1_A, l'ordre d'hydrophobie attendu serait le suivant : le groupe des C18 « atypiques » peu rétentes (C18 L) < le groupe des C8 (C8 H) < les groupes des C18 « classiques » (C18 H). Or la Figure IX-2, tracée avec toutes les phases alkyle testées, montre une inversion entre le groupe des C18 peu rétentes et celui des C8, défaut qui explique que la corrélation ne soit que partielle ($r=0,76$).

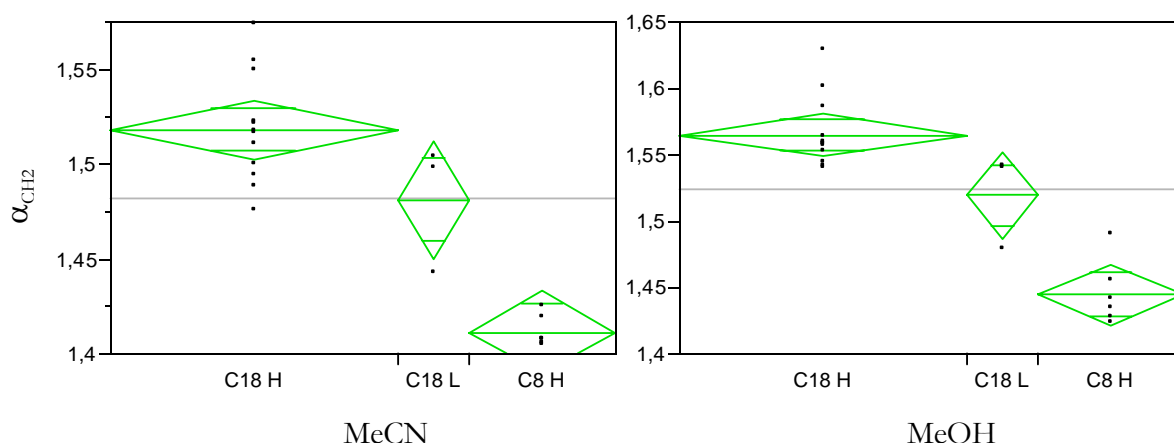


Figure IX-2 : Valeurs de la sélectivité méthylène déterminée à partir du couple pentylbenzène/butylbenzène en fonction des sous-familles de phases alkyles.

Ainsi, la sélectivité méthylène ne s'avère pas aussi discriminante que CP1_A, qui elle est véritablement reliée à l'hydrophobie de la phase. Des deux descripteurs, nous ne conserverons donc que CP1_A. De plus, sélectionner CP1_A au lieu de α_{CH_2} permet non seulement de préserver une dimension temporelle⁷⁵ qui facilite la relation caractérisation/comportement chromatographique, mais aussi de conserver une interprétation thermodynamique plus directe qu'avec un rapport de facteurs de rétention.

A l'issue des études de corrélations et de la discussion concernant la sélectivité méthylène, sont conservés au final sept descripteurs : les cinq composantes principales, la sélectivité de forme et l'asymétrie du pic de l'amiodarone. Ces descripteurs vont désormais servir de base à la construction des cartes d'identité des colonnes.

IX.C Caractérisation des supports

IX.C.1 Visualisation des cartes d'identité sous forme de diagrammes radars

Les 7 descripteurs sélectionnés, à la fois informatifs et robustes, sont rassemblés dans le Tableau IX-6. Le report des valeurs correspondantes pour chacune des colonnes testées sur ces descripteurs permet de visualiser leurs caractéristiques en construisant des diagrammes similaires à ceux utilisés par Kimata [217] ou Cruz [219], pour aboutir à la « carte d'identité ».

⁷⁵ Les facteurs de rétention sont bien entendu adimensionnels, du fait de la normalisation par le temps de rétention nulle. Cependant, cette transformation préserve la dimension temporelle de ces variables, au contraire des sélectivités : une valeur de k élevée se traduit automatiquement par un temps de rétention également élevé.

Chapitre IX

Tableau IX-6 : Descripteurs sélectionnés pour la caractérisation des phases stationnaires

Descripteur	Détermination	Interprétation
CP1 _A	$CP1_A = 0,392 \cdot x_{Amiodarone} + 0,272 \cdot x_{Digitoxine} + 0,241 \cdot x_{Clofazimine}$ $+ 0,425 \cdot x_{Butylbenzène} + 0,426 \cdot x_{Pentylbenzène}$ $+ 0,432 \cdot x_{o-Terphényle} + 0,407 \cdot x_{Triphénylène}$	Rétention gouvernée par enthalpie, hydrophobie
CP2 _A	$CP2_A = 0,318 \cdot x_{Amiodarone} - 0,458 \cdot x_{Digitoxine} + 0,785 \cdot x_{Clofazimine}$ $- 0,046 \cdot x_{Butylbenzène} - 0,064 \cdot x_{Pentylbenzène}$ $- 0,110 \cdot x_{o-Terphényle} - 0,234 \cdot x_{Triphénylène}$	Interactions ioniques : ion-ion & ion-dipôle
CP3 _A	$CP3_A = 0,266 \cdot x_{Amiodarone} + 0,795 \cdot x_{Digitoxine} + 0,257 \cdot x_{Clofazimine}$ $- 0,309 \cdot x_{Butylbenzène} - 0,292 \cdot x_{Pentylbenzène}$ $- 0,203 \cdot x_{o-Terphényle} - 0,097 \cdot x_{Triphénylène}$	Interactions dipôle-dipôle
CP1 _D	$CP1_D = 0,314 \cdot x_{Ampicilline} + 0,373 \cdot x_{d-Tubocurarine} + 0,426 \cdot x_{Atropine}$ $+ 0,450 \cdot x_{Strychnine} + 0,470 \cdot x_{Caféine} + 0,397 \cdot x_{Cyanocobalamine}$	Rétention gouvernée par entropie, désordre croissant de la phase
CP2 _D	$CP2_D = -0,687 \cdot x_{Ampicilline} + 0,609 \cdot x_{d-Tubocurarine} + 0,119 \cdot x_{Atropine}$ $+ 0,249 \cdot x_{Strychnine} - 0,230 \cdot x_{Caféine} - 0,168 \cdot x_{Cyanocobalamine}$	Interactions dipolaires
SS	$SS = \frac{k_{Triphénylène}}{k_{o-Terphényle}}$	Sélectivité de forme
As _{Amiodarone}	As	Degré de protection

avec $x_i = \frac{k_i - \bar{k}_i}{\sigma_i}$ où $\bar{k}_i = \frac{\sum_{j=1}^n k_{i,j}}{n}$ et $\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (k_{i,j} - \bar{k}_i)^2}{n}}$ pour n colonnes testées (cf. Tableau IX-7).

Tableau IX-7 : Valeurs de la moyenne et l'écart-type du facteur de rétention pour chaque soluté.

Phase	Soluté	Moyenne μ_i	Ecart-type σ_i	Phase	Soluté	Moyenne μ_i	Ecart-type σ_i
A	Amiodarone	13,226	12,645	D	Ampicilline	0,314	0,687
	Digitoxine	1,209	0,864		d-Tubocurarine	0,373	-0,609
	Clofazimine	3,300	2,91		Atropine	0,426	-0,119
	Butylbenzène	5,364	3,055		Strychnine	0,450	-0,249
	Pentylbenzène	8,031	4,935		Caféine	0,470	0,230
	o-Terphényle	6,967	4,087		Cyanocobalamine	0,397	0,168
	Triphénylène	9,241	5,736				

Le nombre de descripteurs pour construire ces diagrammes est équivalent à ceux déjà utilisés (six pour Kimata, sept pour Cruz). Notre caractérisation ne partage avec les caractérisations précitées qu'un seul descripteur, la sélectivité de forme, déterminé qui plus est dans des conditions chromatographiques différentes.

Pour des raisons d'homogénéité sur les cartes d'identité, les valeurs de CP2_D sont inversées par rapport à celles des classifications : ainsi, le descripteur correspondant traduit des interactions d'intensité croissante, de dipolaires à ioniques.

Dans un souci de lisibilité, les valeurs relatives aux descripteurs sont codées préalablement à leur report sur chacun des axes. Le Tableau IX-8 restitue l'intervalle de variation constaté.

Tableau IX-8 : Etendue des valeurs observées pour chacun des descripteurs.

	Codage	CP1 _A	CP2 _A	CP3 _A	CP1 _D	CP2 _D	SS	As _{Amiodarone}
Valeur minimale	0	-3,565	-1,758	-2,044	-3,067	-2,399	0,606	1,018
Valeur maximale	1	7,07	4,349	2,75	7,891	1,696	2,424	10,51

Désormais, intéressons nous aux cartes d'identité de colonnes, soit remplies d'une même phase stationnaire, soit de phases différentes, en organisant leur présentation et leur discussion en nous appuyant sur les classifications précédentes.

Sur les cartes d'identité, la nature du modificateur organique utilisé est signalée par les symboles \circ et \triangle , respectivement pour le méthanol et l'acétonitrile.

IX.C.2 Colonnes de même phase stationnaire

IX.C.2.a Influence du lot

La Figure IX-3 représente les diagrammes obtenus pour les phases stationnaires de l'étude de la dispersion interlot (Chapitre VI).

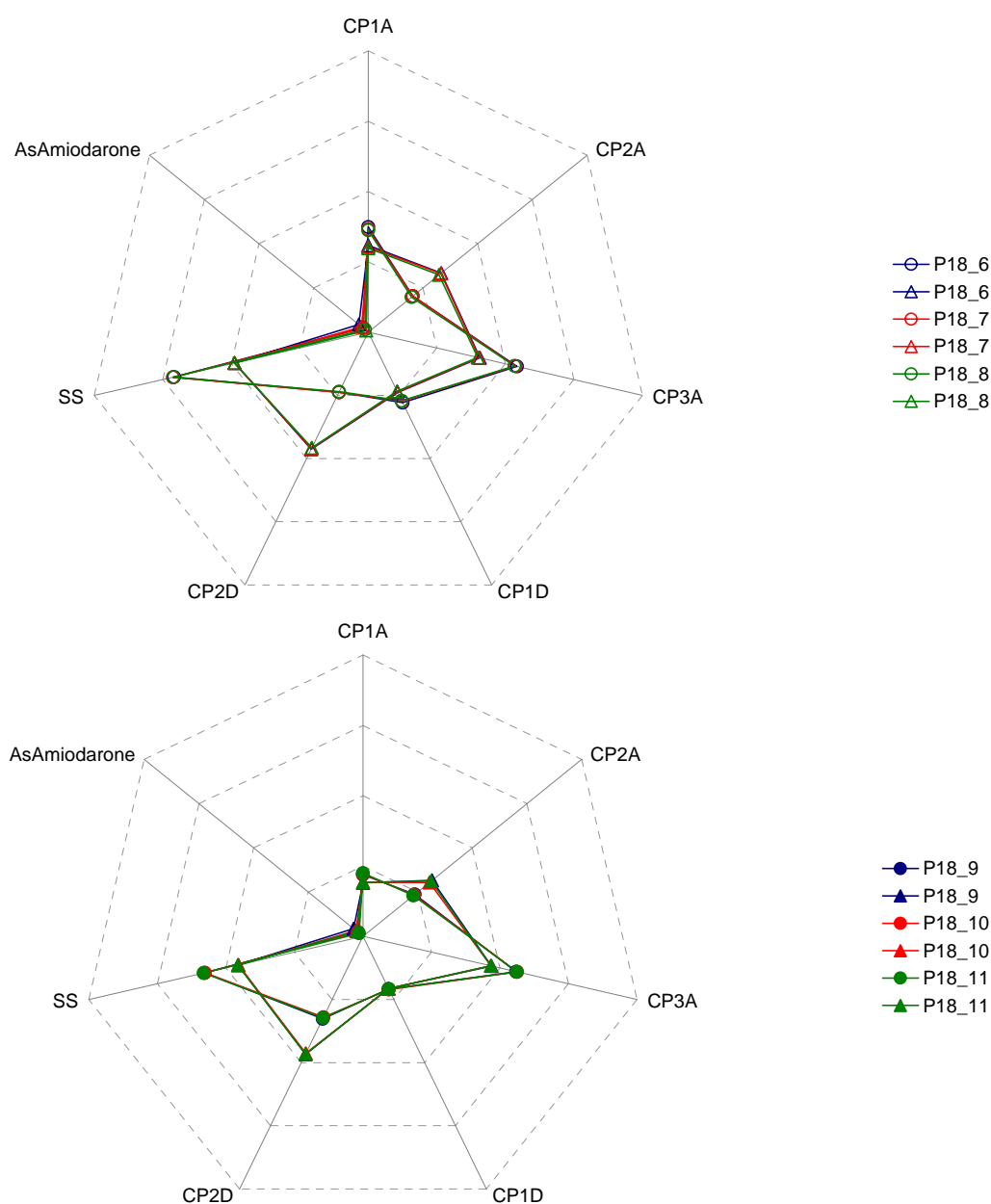


Figure IX-3 : Cartes d'identité des phases SymmetryShield RP18 (symboles évidés) et XTerra RP18 (symboles pleins).

Pour chaque phase stationnaire, le recouvrement constaté sur les cartes d'identité ne permet pas de distinguer aisément les différents lots de phase, confirmant la faible dispersion interlot, mais soulevant aussi la question de la pertinence à vouloir mettre en évidence d'aussi faibles différences éventuelles [243].

Les deux phases stationnaires ne différant que par leur matrice de silice, hybride dans le cas de la XTerra RP18, les cartes d'identité permettent une comparaison directe de l'influence de la nature de la matrice, comme l'illustre la Figure IX-4.

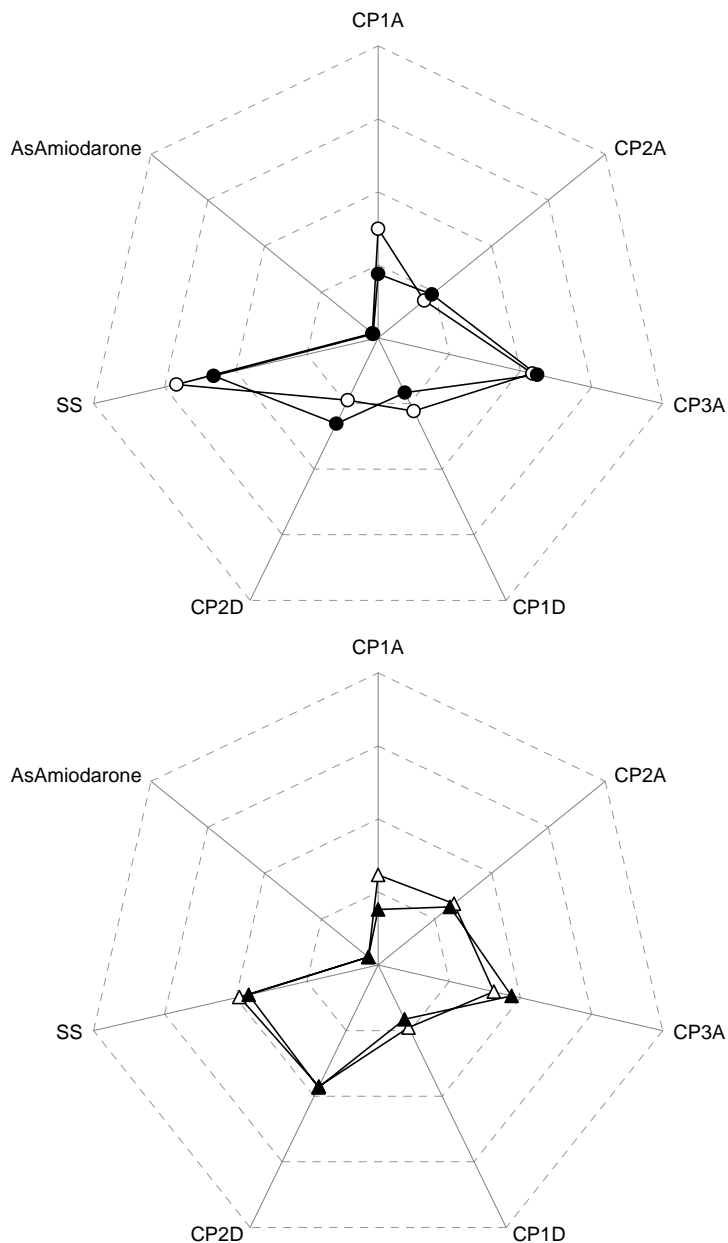


Figure IX-4 : Superposition des cartes d'identité de la SymmetryShield RP18 P18_6 (symboles évidés) et de la XTerra RP18 P18_9 (symboles pleins).

Hormis leurs valeurs respectives sur CP1_A, relative à l'hydrophobie de la phase⁷⁶, ces phases se différencient d'avantage lorsque le méthanol est employé comme modificateur organique et aussi à basse teneur en solvant (CP1_D et CP2_D). Signalons en outre les valeurs prises pour l'asymétrie du pic de l'amiodarone, à la fois faibles et très proches.

⁷⁶ Les XTerra RP18 exhibent une hydrophobie moindre que celle des SymmetryShield RP18, du fait d'une densité de greffage inférieure, eu égard au nombre de silanols pouvant être engagés dans cette étape.

IX.C.2.b Influence du vieillissement

La Figure IX-5 présente les cartes d'identités relatives aux 2 colonnes de phases Symmetry C18 différant par leur degré d'utilisation.

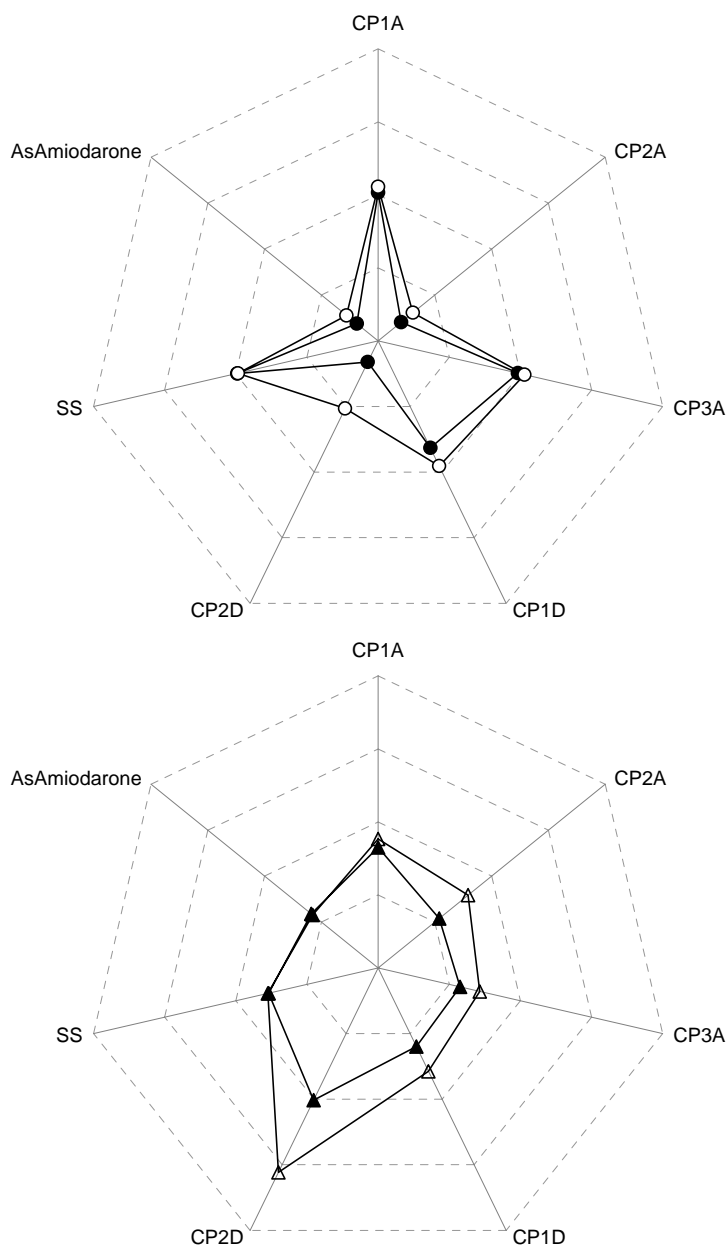


Figure IX-5 : Cartes d'identité des phases Symmetry C18 neuve C18_4 (symboles pleins) et usagée C18_5 (symboles évidés).

Quel que soit le solvant utilisé, les cartes d'identité font apparaître des différences entre les colonnes neuve et usagée, qui au regard des figures de la sous-section IX.C.2.a (page 173), ne peuvent être attribuées à la dispersion interlot. Ces différences sont d'autant plus prononcées sur les CP2 et CP3_A notamment lorsque l'acétonitrile est utilisé, traduisant pour la colonne usagée un accroissement des interactions avec les silanols. Les cartes d'identité illustrent ainsi d'une manière plus synthétique nos interprétations.

Intéressons nous maintenant à la façon dont se traduisent des différences entre phases stationnaires sur leur carte d'identité.

IX.C.3.a Influence du groupement polaire intercalé

Compte tenu des phases testées, il est possible de mettre en lumière sur les cartes d'identités l'influence non seulement de la présence d'un groupement polaire intercalé, mais aussi de sa nature.

IX.C.3.a.i Présence du groupement polaire intercalé

La Figure IX-6 présente la comparaison de deux phases stationnaires ne différant que par la présence d'un groupement polaire intercalé, la Symmetry C18 (C18_4) en étant dépourvue.

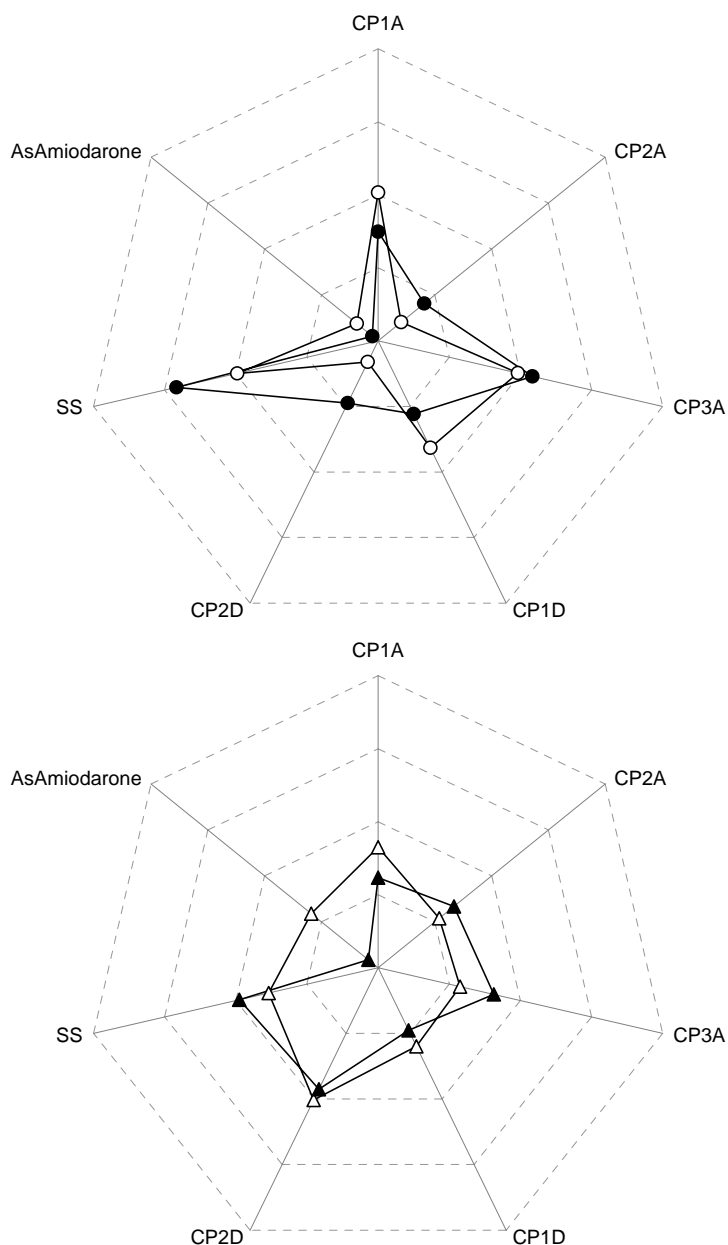


Figure IX-6 : Cartes d'identité des phases SymmetryShield RP18 P18_6 (symboles pleins) et Symmetry C18_4 (symboles évidés).

Ces cartes permettent de retrouver aisément des résultats précédents : la phase alkylcarbamate révèle une hydrophobie inférieure ($CP1_A$) à celle de son homologue purement alkyle, mais présente une sélectivité de forme accrue. Les différences mises en évidence varient aussi en fonction de la nature du solvant, notamment en ce qui concerne l'asymétrie de pic de l'amiodarone. Celle-ci est plus prononcée dans l'acétonitrile pour la Symmetry C18. La forme de la carte d'identité est moins affectée par le changement de solvant sur la SymmetryShield RP18 que sur la Symmetry C18, qui passe d'une forme concave à convexe).

IX.C.3.a.ii Nature du groupement polaire intercalé

La Figure IX-7 reprend les caractérisations de phases possédant chacune un groupement polaire intercalé de nature différente.

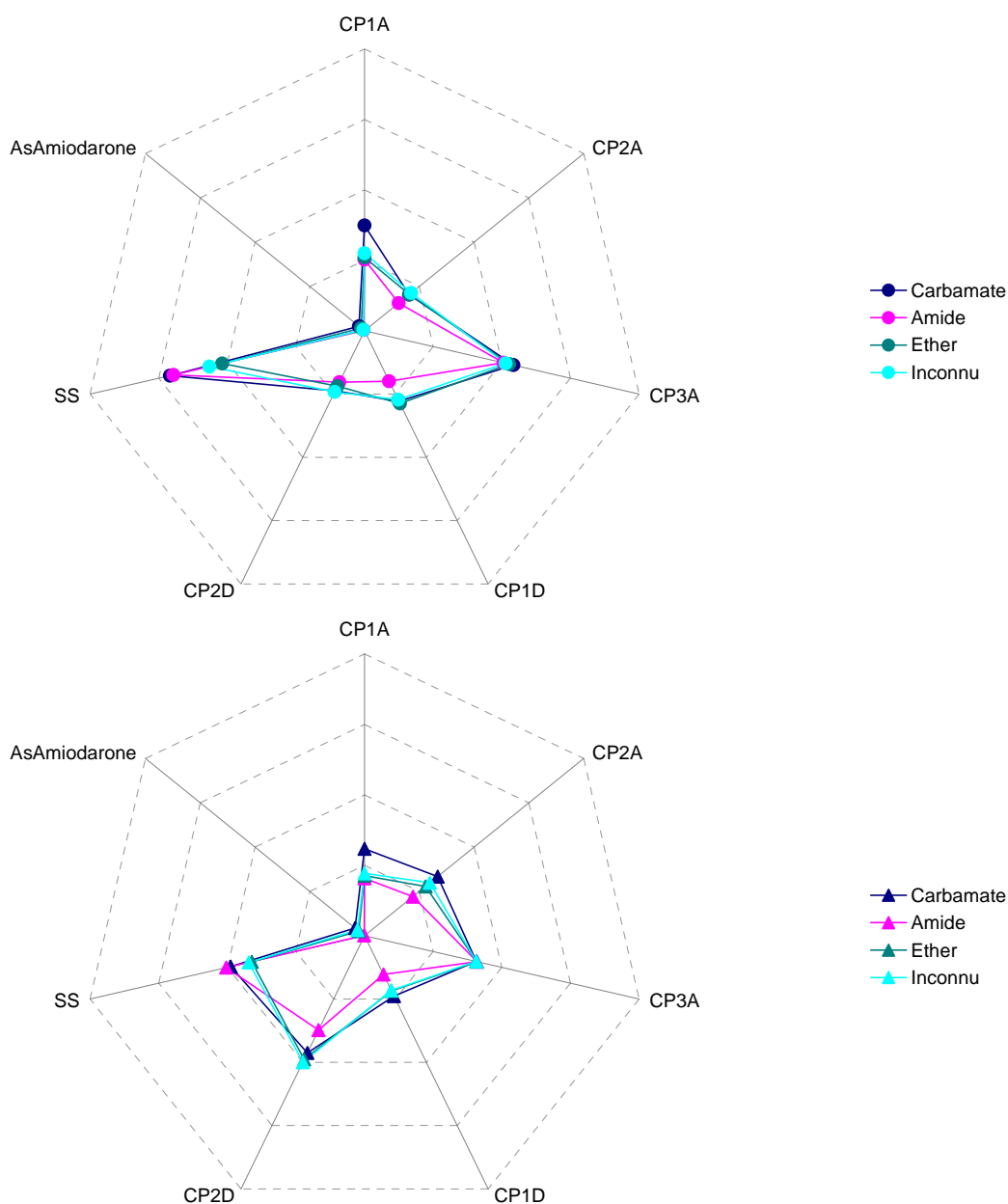


Figure IX-7 : Cartes d'identité des phases SymmetryShield RP18 P18_6 (groupement carbamate), Polaris Amide C18 P18_4 (groupement amide), Polaris C18-Ether P18_5 (Ether) et Polaris C18-A P18_3 (groupement de nature inconnue).

Globalement, les cartes d'identité sont pratiquement superposables, signifiant l'appartenance à une même famille de phases stationnaires, caractérisée notamment par une faible hydrophobie, une sélectivité de forme prononcée et une bonne symétrie de pic pour l'amiodarone.

La phase au groupement dont la nature reste inconnue s'avère posséder une caractérisation voisine de celle possédant un groupement éther, semblant indiquer une fonction apparentée. Cette hypothèse reste cependant à vérifier, puisque deux fonctions différant seulement d'un atome d'oxygène – amide et carbamate – ne procurent pas des caractérisations aussi semblables.

IX.C.3.b.i « End capping » apolaire

Présence de « end-capping »

La Figure IX-8 compare les caractérisations obtenues pour deux phases identiques de par leur matrice, leur greffon et leur greffage, mais dont une – l’Uptisphere NEC – n’a pas subi de traitement de « end-capping ».

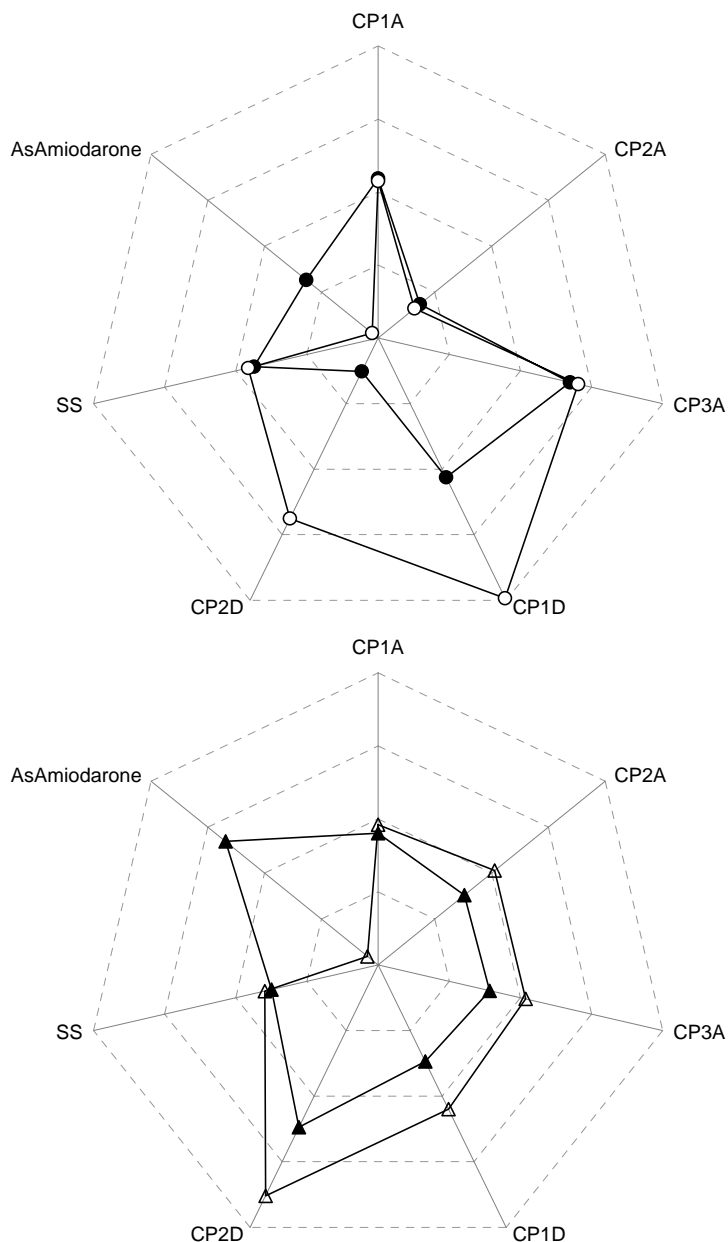


Figure IX-8 : Cartes d'identité des phases Uptisphere ODB C18_8 (symboles pleins) et Uptisphere NEC C18_9 (symboles évidés).

L'absence de « end-capping » se traduit sur la carte d'identité d'une manière très marquée, surtout sur les axes CP1_D, CP2_D, c'est-à-dire à bas niveau de solvant, et l'asymétrie de l'amiodarone. Le pic de l'amiodarone devient d'ailleurs beaucoup plus asymétrique en acétonitrile qu'en méthanol avec la colonne possédant un « end-capping », alors que pour celle qui en est dépourvue, le changement de solvant n'affecte pas l'asymétrie du pic, qui reste faible. Concernant ce dernier descripteur, associé au degré de protection de la phase, les caractérisations indiquent finalement un traitement plus efficace pour la phase qui en est dépourvue ! Ce résultat, apparemment contradictoire, sera éclairé à la lumière de la discussion portant sur la définition des phases dites protégées, ou « base deactivated », en section IX.D.

Génération de « end-capping » apolaire

La Figure IX-9 présente les cartes d'identité de deux phases se différenciant uniquement par leur technologie de « end-capping », afin de montrer l'influence de la génération de « end-capping » apolaire sur les caractérisations.

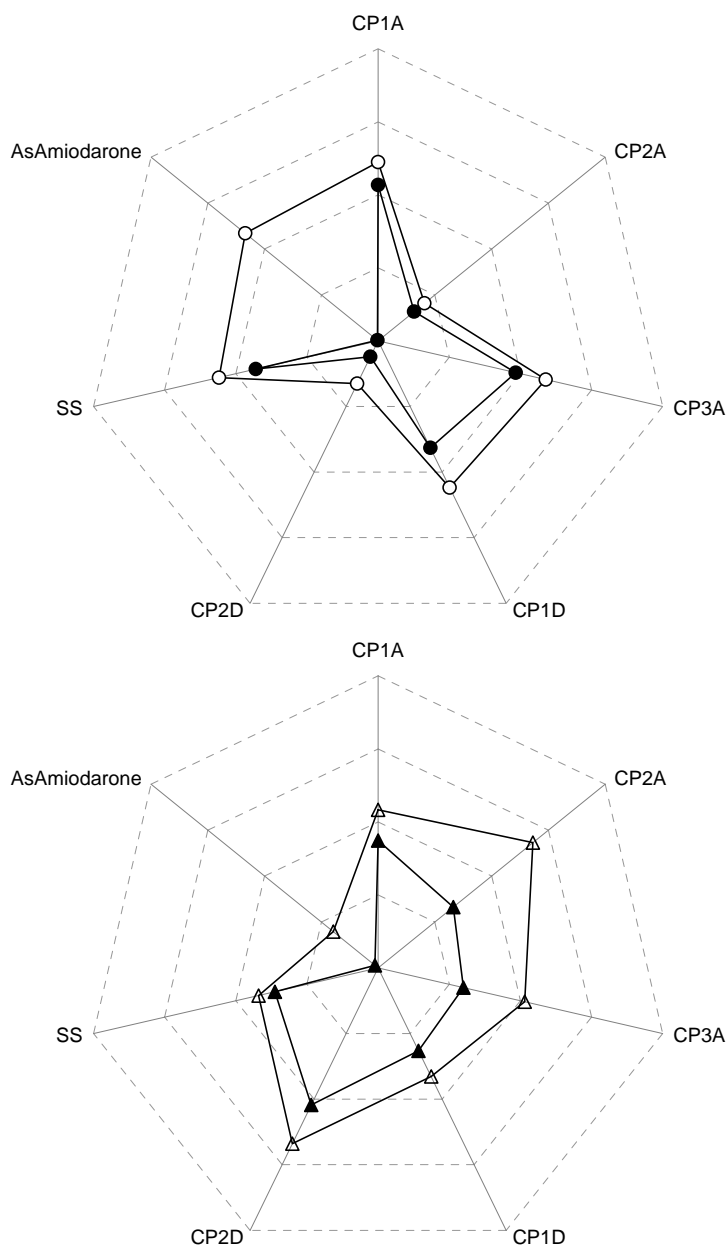


Figure IX-9 : Cartes d'identité des phases Nucleodur Gravity (symboles pleins) et Nucleodur EC (symboles évidés).

La différence due au type de traitement est mise en évidence surtout pour l'asymétrie de pic de l'amiodarone, qui cette fois-ci s'améliore dans l'ordre des générations, et par une réduction prononcée de CP2_A et CP3_A dans l'acétonitrile.

Cette fois-ci, l'asymétrie en valeur absolue s'avère beaucoup plus prononcée dans le méthanol qu'en acétonitrile, contrairement à la Figure IX-8.

La Figure IX-10 illustre la différence de nature du « end-capping », polaire (Aquasil C18) ou apolaire (Symmetry C18).

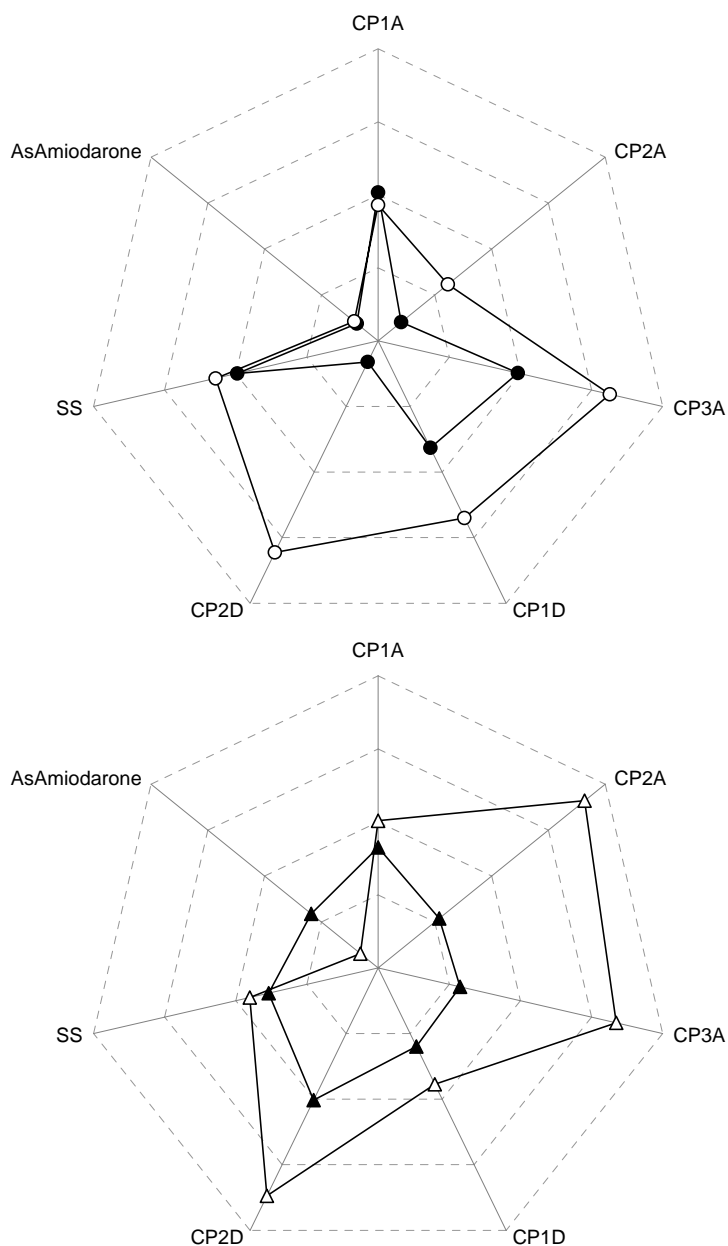


Figure IX-10 : Cartes d'identité des phases Symmetry C18 C18_4 (symboles pleins) et Aquasil C18 A18_1 (symboles évidés).

L'hydrophobie (selon CP1_A) et la sélectivité de forme (SS) constituent les seuls points communs aux caractérisations des deux phases. Pour toutes les autres composantes principales, on note des valeurs plus élevées pour l'Aquasil C18, traduisant pour cette phase une plus grande occurrence des interactions polaires, légitime étant donné la nature du traitement. L'asymétrie du pic de l'amiodarone, identique dans le méthanol pour les deux phases stationnaires considérées, se différencie en acétonitrile avec encore une valeur plus basse pour la phase à « end-capping » polaire.

IX.C.3.b.iii Influence de la nature du groupement polaire

Sur la Figure IX-11 sont superposées les caractérisations relatives aux phases Aqua, i.e. ayant subi un traitement de surface polaire. Trois d'entre elles possèdent un « end-capping » de type polaire : il s'agit de l'Aquasil C18 (A18_1), de la YMC-Pack ODS-AQ (A18_3) et de la Synergi Hydro-RP (A18_4).

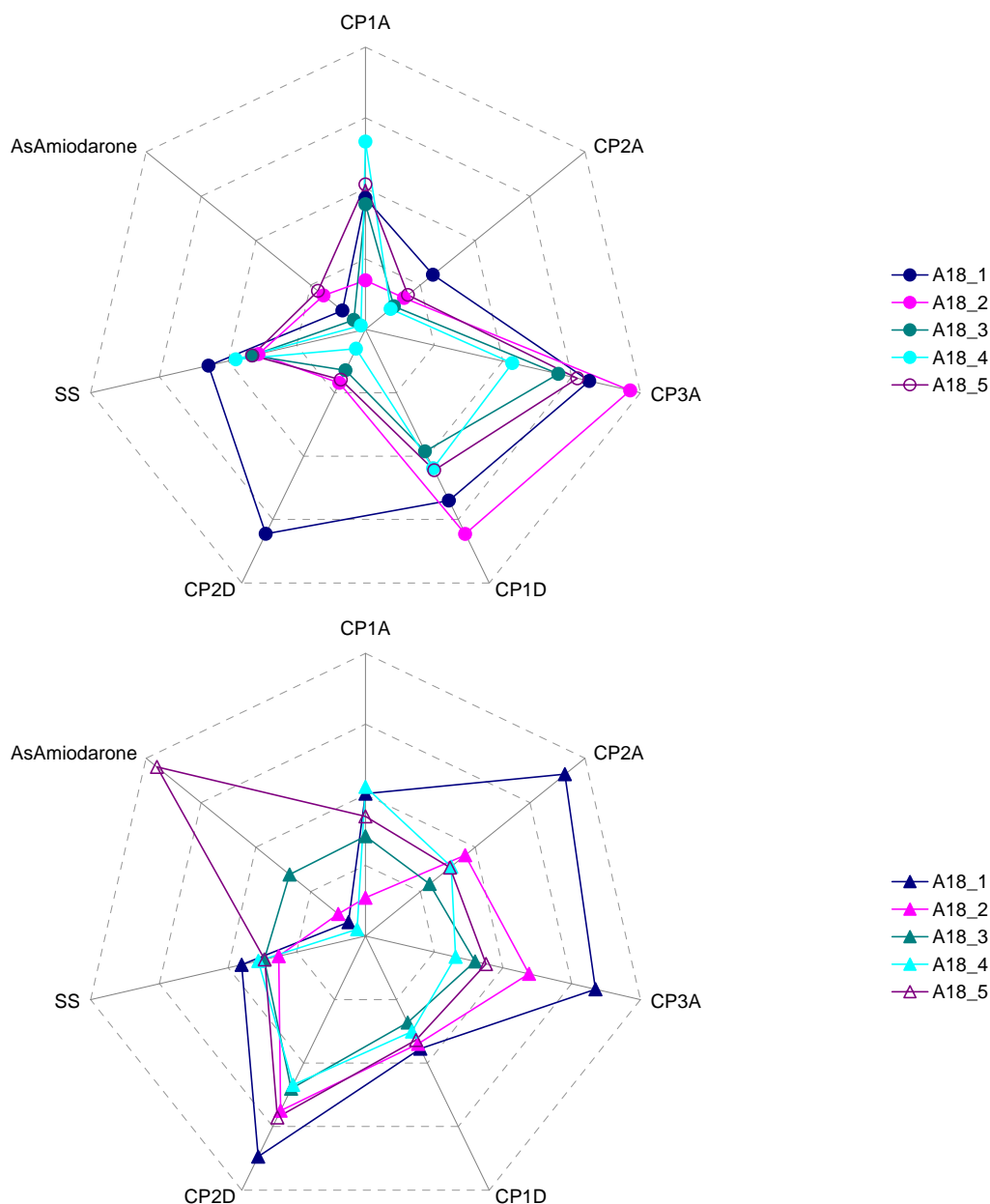


Figure IX-11 : Cartes d'identité des phases de type Aqua.

Le caractère Aqua des phases peut se traduire par quelques traits communs dans le méthanol, à savoir une asymétrie assez réduite pour le pic de l'amiodarone et des valeurs élevées pour CP3_A et CP1_D. Cependant, de manière générale, on note surtout la complexité des superpositions, ce qui confirme l'hétérogénéité de l'appellation Aqua. Les phases à « end-capping » polaire se distinguent très certainement par la nature de leur(s) traitement(s) au regard des diversités de comportement.

La Figure IX-12 compare les caractérisations obtenues pour la CapcellPak C8, issue d'une encapsulation polymérique, et celle correspondant à la SymmetryShield RP8, qui possède un groupement polaire intercalé.

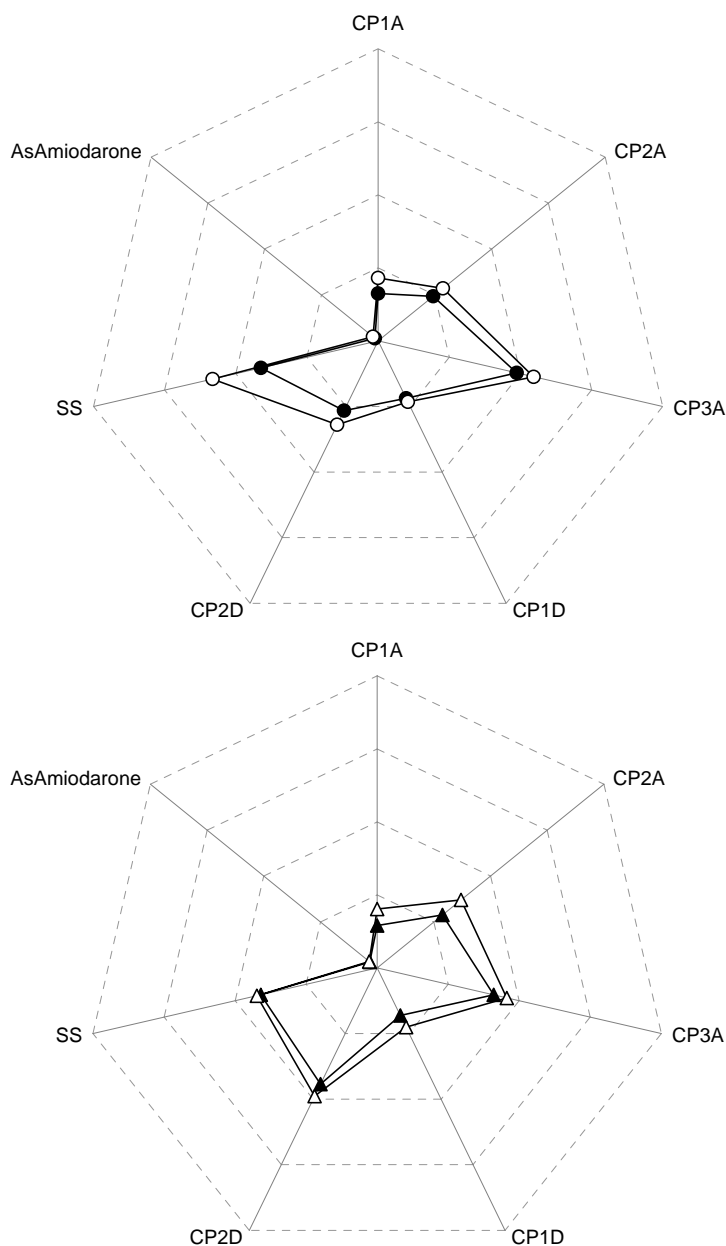


Figure IX-12 : Cartes d'identité des phases CapcellPak C8 E8_1 (symboles pleins) et SymmetryShield RP8 P8_3 (symboles évidés).

Bien qu'issues de procédés de synthèse différents, les cartes d'identité possèdent des formes quasiment superposables, que ce soit dans le méthanol ou l'acétonitrile. La seule différence, mineure, réside en une moindre sélectivité de forme de la silice encapsulée dans le méthanol. Ces cartes d'identité, qui ne font que traduire des comportements chromatographiques similaires, confirment en outre notre interprétation quant à l'effet stabilisateur de l'encapsulation, effet équivalent à un groupement polaire intercalé.

IX.D Du choix raisonné des colonnes chromatographiques

IX.D.1 Principe

L'outil de caractérisation mis en place peut servir de guide au choix raisonné des colonnes chromatographiques. Les cartes d'identité obligent déjà à prendre en compte la nature et le niveau de teneur du solvant employé. Le choix de la phase dépend ensuite de l'objectif fixé. S'il s'agit d'un remplacement de phase stationnaire, il suffit d'en choisir une présentant une carte d'identité la plus proche possible de celle à remplacer dans les conditions utilisées. S'il s'agit du développement d'une nouvelle méthode chromatographique mettant en jeu des composés à caractère basiques, il faut alors envisager la sélection de phases stationnaires présentant cette fois-ci des cartes d'identité différentes afin de maximiser les chances d'obtenir la séparation souhaitée. Dans ce cas, les phases doivent aussi posséder un comportement satisfaisant vis-à-vis des composés basiques. Ce dernier point soulève la notion des phases dites protégées, plus connues sous la qualification « base deactivated », appellation regroupant toutes les stratégies pour réduire l'accès aux silanols résiduels.

IX.D.2 Définition des phases protégées

Comme vu sur la Figure IX-8, une colonne possédant un « end-capping » peut engendrer des résultats moins satisfaisants qu'une colonne qui en est dépourvue. Ce résultat, interpellant, s'explique à la lumière de l'origine de l'asymétrie. En effet, le « end-capping » provoque une diminution sensible du nombre de silanols accessibles (sites plus énergétiques que ceux engagés dans le mécanisme de partage), abaissant de fait la capacité du support mettant en jeu ce mécanisme de rétention. La limite de surcharge atteinte puis dépassée se traduit par une asymétrie de pic croissante. Ainsi, une phase à « end-capping » trop partiel peut provoquer des traînes de pics plus importantes qu'une colonne non protégée, ce qu'illustrent les cartes d'identité en Figure IX-8 et la Figure IX-13.

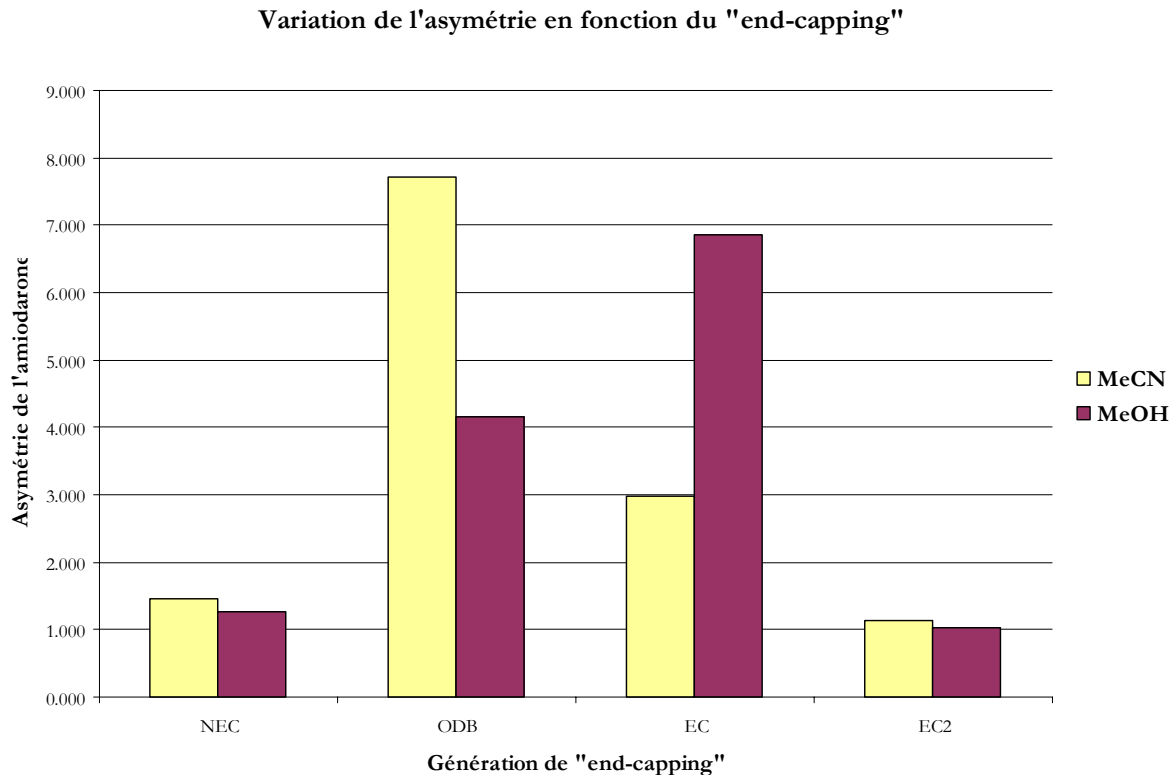


Figure IX-13 : Variation de l'asymétrie du pic de l'amiodarone en fonction de la génération de « end-capping » ; NEC : absence de « end-capping », ODB et EC : « end-cappings » classiques, EC2 : dernière génération de « end-capping ».

Chapitre IX

La Figure IX-13 résume l'influence de la génération du « end-capping » sur l'asymétrie de pic de l'amiodarone : la présence du traitement n'assure pas une meilleure asymétrie du pic en soi (aspect qualitatif), faut-il encore qu'il soit efficace (aspect quantitatif).

Pour définir les colonnes possédant une protection satisfaisante, le seul critère d'asymétrie sur l'amiodarone ne peut donc suffire, puisqu'il peut aboutir à qualifier de protégées des colonnes n'ayant subi aucun traitement correspondant. L'introduction d'un second descripteur relatif aux interactions ioniques et dipolaires semble approprié pour compléter le critère d'asymétrie. Selon les conditions chromatographiques, CP2_A ou CP2_D sera choisi. Ainsi, une phase devra respecter de faibles valeurs à la fois pour l'asymétrie du pic de l'amiodarone et pour les secondes composantes principales pour pouvoir être qualifiée de « protégée ».

IX.E Conclusion

Les études de corrélation ont montré que certains descripteurs étaient partiellement corrélés. Les degrés de redondance observés varient suivant les familles de phases stationnaires, confirmant ainsi nos interprétations des composantes principales. Nous avons donc ainsi pu écarter certains descripteurs plus usités mais qui s'avèrent finalement moins pertinents. Une fois le jeu final de descripteurs sélectionné, nous avons obtenu les cartes d'identité des phases stationnaires évaluées à travers le test, cartes qui fournissent une visualisation fidèle des classifications. Ces cartes peuvent désormais servir de guide pour la sélection d'un jeu de phases protégées lors du développement d'une nouvelle méthode chromatographique.

Enfin, si certaines phases de type Aqua ont révélé des comportements extrêmes par rapport à des phases C18 plus classiques, les phases cyano et phényle, non reportées dans le manuscrit montrent les limites de la procédure, non pas d'un point de vue chromatographique, mais en terme de rendu des données : certains descripteurs pourraient se révéler plus pertinents que ceux adoptés pour la construction des cartes d'identité.

Conclusion générale

La procédure que nous avons développée nous a permis d'obtenir un test chromatographique réduit, répondant ainsi à un critère de simplicité indispensable à son application. Le test s'avère capable de distinguer des colonnes aux comportements chromatographiques proches, et de degrés d'utilisation différents. Les classifications obtenues, entièrement interprétées, permettent de guider l'analyste dans son choix de phase stationnaire tout en prenant en compte la composition de la phase mobile. Les représentations obtenues mettent en effet en lumière l'influence du solvant, en fonction de sa nature et de sa teneur. Ce facteur, négligé jusqu'à présent, apparaît comme fondamental et doit être pris en compte pour le choix de la colonne et des conditions chromatographiques. En outre, les classifications ont permis de mettre en évidence des sous-catégories de phases stationnaires que les descripteurs classiques, comme la sélectivité méthylène, ne sont pas capables de distinguer. Les résultats obtenus soulignent la pertinence de notre approche pour le développement de cette procédure de caractérisation et permettent aussi d'affiner la notion de protection des phases.

Préalable indispensable à un éventuel transfert, nous avons évalué la fiabilité de notre procédure de caractérisation au cours de son développement, ce qui nous a permis de définir les conditions ainsi que le protocole de transfert. Le test est actuellement en cours de prise en main par notre partenaire industriel. A terme, il permettra d'évaluer le comportement de nouvelles phases stationnaires et de vérifier la conformité des colonnes récemment reçues, avant et pendant leur utilisation en développement de méthode comme en analyse de routine.

Outre le remplacement par une colonne équivalente, les classifications obtenues offrent la possibilité de sélectionner des jeux de phases stationnaires possédant des comportements chromatographiques différents tout en présentant un degré de protection satisfaisant, définissant ainsi des jeux réduits de colonnes pour le développement de méthode.

La combinaison des aspects chromatographiques et chimiométriques du test a permis d'approfondir la connaissance des mécanismes de rétention, en fonction du type de phase stationnaire, de la nature et de la fraction en modificateur organique. Ainsi, l'utilisation des plans d'expériences, sous réserve d'un modèle adéquat, s'est révélé d'une ambivalence étonnante : outre la détermination du domaine de robustesse du test, elle a apporté des éclaircissements qui se sont révélés fondamentaux pour appréhender les phénomènes sous-tendant les classifications. La combinaison de divers outils chimiométriques a donc été essentielle pour guider et fiabiliser nos interprétations physico-chimiques et s'avère constituer une aide précieuse au décryptage des mécanismes de rétention.

Nous espérons que ces travaux décrivent de façon suffisamment complète l'espace des phases stationnaires apolaires pour pouvoir extrapoler au comportement chromatographique les caractérisations obtenues. Les conditions chromatographiques non agressives de notre procédure permettent d'évaluer un grand nombre de phases stationnaires fonctionnant en partage apolaire. Pour approfondir la caractérisation des colonnes résistantes à haut pH, il serait intéressant d'évaluer la pertinence d'un complément à notre procédure de test intégrant des phases mobiles à pH 10-11. Sur le même principe, d'autres études pourraient aussi être envisagées quant à la composition de la phase mobile – phase 100% aqueuse, mélange ternaire – pour déterminer les limites en extrapolation du test en fonction de différents paramètres.

Enfin, la procédure proposée connaîtrait une application ultime si par la corrélation à des séparations réelles de produits pharmaceutiques, mettant en jeu des produits principaux et des substances apparentées, effectuées sur des colonnes appartenant à des groupes différents, elle aboutissait à l'explication des différences de sélectivités, permettant le cas échéant de remonter aux propriétés physico-chimiques des solutés.

Références bibliographiques

- [1] H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert, A Chromatographic Test Procedure for Reversed-Phase HPLC Column Evaluation, *LCGC*, 15, (1997), p. 856-866.
- [2] C.J. Dunlap, C.V. McNeff, D. Stoll, P.W. Carr, Zirconia stationary phases for extreme separations, *Analytical Chemistry*, 73, (2001), p. 598A-607A.
- [3] Y.-L. Hu, Y.-Q. Feng, J.-D. Wan, S.-L. Da, Comparison of chromatographic properties of Lewis base-modified mixed oxides as stationary phases for HPLC, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25, (2002), p. 83 - 99.
- [4] J. Dai, X. Yang, P.W. Carr, Comparison of the chromatography of octadecyl silane bonded silica and polybutadiene-coated zirconia phases based on a diverse set of cationic drugs, *Journal of Chromatography A*, 1005, (2003), p. 63-82.
- [5] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *Journal of Chromatography A*, 1028, (2004), p. 1-30.
- [6] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *Journal of Chromatography A*, 1028, (2004), p. 31-62.
- [7] J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, Chemistry of zirconia and its use in chromatography, *Journal of Chromatography A*, 657, (1993), p. 229-282.
- [8] P.T. Jackson, P.W. Carr, Study of polar and nonpolar substituted benzenes and aromatic isomers on carbon-coated zirconia and alkyl bonded phases, *Journal of Chromatography A*, 958, (2002), p. 121-129.
- [9] M. Grun, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schuth, K.K. Unger, Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 740, (1996), p. 1-9.
- [10] J. Li, P.W. Carr, Retention characteristics of polybutadiene-coated zirconia and comparison to conventional bonded phases, *Analytical Chemistry*, 68, (1996), p. 2857-2868.
- [11] J. Li, P.W. Carr, Evaluation of temperature effects on selectivity in RPLC separations using polybutadiene-coated zirconia, *Analytical Chemistry*, 69, (1997), p. 2202-2206.
- [12] J. Li, P.W. Carr, A study of the efficiency of polybutadiene-coated zirconia as a reversed-phase chromatographic support, *Analytical Chemistry*, 69, (1997), p. 2193-2201.
- [13] J. Li, P.W. Carr, Effect of temperature on the thermodynamic properties, kinetic performance, and stability of polybutadiene-coated zirconia, *Analytical Chemistry*, 69, (1997), p. 837-843.
- [14] J. Li, D.H. Reeder, A.V. McCormick, P.W. Carr, Factors influencing polybutadiene deposition within porous chromatographic zirconia, *Journal of Chromatography A*, 791, (1997), p. 45-52.
- [15] J. Li, Y. Hu, P.W. Carr, Fast separations at elevated temperatures on polybutadiene-coated zirconia reversed-phase material, *Analytical Chemistry*, 69, (1997), p. 3884-3888.
- [16] M. Pursch, D.L. Vanderhart, L.C. Sander, X. Gu, T. Nguyen, S.A. Wise, D.A. Gajewski, C30 Self-Assembled Monolayers on Silica, Titania, and Zirconia: HPLC Performance, Atomic Force Microscopy, Ellipsometry, and NMR Studies of Molecular Dynamics and Uniformity of Coverage, *Journal of the American Chemical Society*, 122, (2000), p. 6997-7011.
- [17] D.H. Reeder, J. Li, P.W. Carr, M.C. Flickinger, A.V. McCormick, Models for polybutadiene pore wall coatings in porous zirconia, *Journal of Chromatography A*, 760, (1997), p. 71-79.
- [18] D. Xiang, L. Tang, J.A. Blackwell, Evaluation of the stability and selectivity for various adjustable stationary phases using zirconium oxide supports in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 953, (2002), p. 67-77.

- [19] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, Analysis and critical comparison of the reversed-phase and ion-exchange contributions to retention on polybutadiene coated zirconia and octadecyl silane bonded silica phases, *Journal of Chromatography A*, 996, (2003), p. 13-31.
- [20] J. Zhao, P.W. Carr, Comparison of the retention characteristics of aromatic and aliphatic reversed phases for HPLC using linear solvation energy relationships, *Analytical Chemistry*, 70, (1998), p. 3619-3628.
- [21] J. Zhao, P.W. Carr, Synthesis and evaluation of an aromatic polymer-coated zirconia for reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 71, (1999), p. 5217-5224.
- [22] J. Zhao, P.W. Carr, A comparative study of the chromatographic selectivity of polystyrene- coated zirconia and related reversed-phase materials, *Analytical Chemistry*, 72, (2000), p. 302-309.
- [23] Q.-H. Wan, M.C. Davies, P.N. Shaw, D.A. Barrett, Retention Behavior of Ionizable Isomers in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Comparative Study of Porous Graphitic Carbon and Octadecyl Bonded Silica, *Analytical Chemistry*, 68, (1996), p. 437-446.
- [24] C.F. Poole, Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids, *Journal of Chromatography A*, 1037, (2004), p. 49-82.
- [25] E. Forgacs, Retention characteristics and practical applications of carbon sorbents, *Journal of Chromatography A*, 975, (2002), p. 229-243.
- [26] M.-C. Hennion, Graphitized carbons for solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 885, (2000), p. 73-95.
- [27] E. Forgacs, T. Cserhati, Relationship between retention characteristics and physicochemical parameters of solutes on porous graphitized carbon column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, (1998), p. 505-510.
- [28] V. Camel, Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58, (2003), p. 1177-1233.
- [29] K.K. Unger, *Porous silica* ed. Amsterdam: Elsevier scientific publishing company, 1979, 336 pages.
- [30] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, 1st ed. Paris: Masson, 1991, 919 pages.
- [31] L.T. Zhuravlev, The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 173, (2000), p. 1-38.
- [32] G.M.S. El Shafei, Silica Surface Chemical Properties. *Adsorption on silica surfaces* / ed. par E. Papirer. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2000, p. 35-62.
- [33] J. Nawrocki, The silanol group and its role in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 779, (1997), p. 29-71.
- [34] K. Albert, NMR investigations of stationary phases, *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 215-224.
- [35] A.B. Scholten, J.W.d. Haan, H.A. Claessens, L.J.M.v.d. Ven, C.A. Cramers, Fundamental Study of Residual Silanol Populations on Alkylsilane-Derivatized Silica Surfaces, *Langmuir*, 12, (1996), p. 4741 -4747.
- [36] D. Avnir, P. Pfeifer, Fractal dimension in chemistry - an intensive characteristic of surface irregularity, *Nouveau Journal de Chimie*, 7, (1983), p. 71-72.
- [37] F. Ehrburger-Dolle, Fractal characteristics of silica surfaces and aggregates. *The surface properties of silicas* / ed. par A.P. Legrand. ed. Chichester: John Wiley and Sons, 1998, p. 83-143.
- [38] C.E. Jesurum, V. Pulim, L.W. Hobbs, Topological modeling of amorphized tetrahedral ceramic network structures, *Journal of Nuclear Materials*, 253, (1998), p. 87-103.
- [39] W. Rudzinski, S.-L. Lee, C.-C.S. Yan, T. Panczyk, A Fractal Approach to Adsorption on Heterogeneous Solid Surfaces. 1. The Relationship between Geometric and Energetic Surface Heterogeneities, *Journal of Physical Chemistry B*, 105, (2001), p. 10847-10856.

- [40] W. Rudzinski, S.-L. Lee, T. Panczyk, C.-C.S. Yan, A Fractal Approach To Adsorption on Heterogeneous Solids Surfaces. 2. Thermodynamic Analysis of Experimental Adsorption Data, *Journal of Physical Chemistry B*, 105, (2001), p. 10857-10866.
- [41] H. Van Damme, Nanoscale and Mesoscale Morphology of Silica Surfaces. *Adsorption on silica surfaces* / ed. par E. Papirer. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2000, p. 119-166.
- [42] J.J. Meyers, O.K. Crosser, A.I. Liapis, Pore network modelling: determination of the dynamic profiles of the pore diffusivity and its effect on column performance as the loading of the solute in the adsorbed phase varies with time, *Journal of Chromatography A*, 908, (2001), p. 35-47.
- [43] J.J. Meyers, A.I. Liapis, Network modeling of the intraparticle convection and diffusion of molecules in porous particles packed in a chromatographic column, *Journal of Chromatography A*, 827, (1998), p. 197-213.
- [44] M.M. Branda, R.A. Montani, N.J. Castellani, The distribution of silanols on the amorphous silica surface: a Monte Carlo simulation, *Surface Science*, 446, (2000), p. L89-L94.
- [45] I.-S. Chuang, G.E. Maciel, Probing Hydrogen Bonding and the Local Environment of Silanols on Silica Surfaces via Nuclear Spin Cross Polarization Dynamics, *Journal of American Chemical Society*, 118, (1996), p. 401-406.
- [46] I.-S. Chuang, G.E. Maciel, A Detailed Model of Local Structure and Silanol Hydrogen Bonding of Silica Gel Surfaces, *Journal of Physical Chemistry B*, 101, (1997), p. 3052-3064.
- [47] R.J.-M. Pellenq, B. Rousseau, P.E. Levitz, A Grand Canonical Monte Carlo study of argon adsorption/condensation in mesoporous silica glasses, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3, (2001), p. 1207-1212.
- [48] J.J. Meyers, S. Nahar, D.K. Ludlow, A.I. Liapis, Determination of the pore connectivity and pore size distribution and pore spatial distribution of porous chromatographic particles from nitrogen sorption measurements and pore network modelling theory, *Journal of Chromatography A*, 907, (2001), p. 57-71.
- [49] G.A. Heeter, A.I. Liapis, Estimation of pore diameter for intraparticle fluid flow in bidisperse porous chromatographic particles, *Journal of Chromatography A*, 761, (1997), p. 35-40.
- [50] K.K. Unger, D. Kumar, V. Ehwald, F. Grossmann, Adsorption on Silica Surfaces from Solution and Its Impact on Chromatographic Separation Techniques. *Adsorption on silica surfaces* / ed. par E. Papirer. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2000, p. 565-596.
- [51] Y. Yao, A.M. Lenhoff, Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1037, (2004), p. 273-282.
- [52] J. Rouquerol, D. Avnir, C.W. Fairbridge, D.H. Everett, J.H. Haynes, N. Pernicone, J.D.F. Ramsay, K.S.W. Sing, K.K. Unger, Recommendations for the characterization of porous solids, *Pure and Applied Chemistry*, 66, (1994), p. 1739-1758.
- [53] K.K. Unger, D. Kumar, M. Grun, G. Buchel, S. Ludtke, T. Adam, K. Schumacher, S. Renker, Synthesis of spherical porous silicas in the micron and submicron size range: challenges and opportunities for miniaturized high-resolution chromatographic and electrokinetic separations, *Journal of Chromatography A*, 892, (2000), p. 47-55.
- [54] F.C. Leinweber, U. Tallarek, Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases: Hydrodynamics and adsorption capacity, *Journal of Chromatography A*, 1006, (2003), p. 207-228.
- [55] G. Cerveau, R.J.P. Corriu, E. Framery, Sol-gel chemistry: evidence of redistribution at silicon atom induced by NaOH as catalyst during ageing, *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIC - Chemistry*, 4, (2001), p. 79-83.
- [56] M.M. Collinson, Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, (2002), p. 30-38.
- [57] C. du Fresne von Hohenesche, V. Stathopoulos, K.K. Unger, A. Lind, M. Lindén, Formation of hierarchically ordered silicas prepared by spray drying of nanosized spheres.

- Characterization of Porous Solids VI* / ed. par F. Rodríguez-Reinoso, B. McEnaney, J. Rouquerol, K.K. Unger. ed. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 2002, p. 339-346.
- [58] E.C. Peters, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Rigid Macroporous Polymer Monoliths, *Advanced Materials*, 11, (1999), p. 1169-1181.
- [59] J.N. Hay, H.M. Raval, Synthesis of Organic-Inorganic Hybrids via the Non-hydrolytic Sol-Gel Process, *Chemistry of Materials*, 13, (2001), p. 3396-3403.
- [60] A.C. Pierre, G.M. Pajonk, Chemistry of Aerogels and Their Applications, *Chemical Reviews*, 102, (2002), p. 4243-4266.
- [61] L.L. Hench, J.K. West, The sol-gel process, *Chemical Reviews*, 90, (1990), p. 33-72.
- [62] M. Pursch, A. Jäger, T. Schneller, R. Brindle, K. Albert, E. Lindner, The Sol-Gel Method: A New Way to Reversed Phase Materials. Synthesis and Characterization by Solid-State NMR Spectroscopy, *Chemistry of Materials*, 8, (1996), p. 1245-1249.
- [63] S. Mann, S.L. Burkett, S.A. Davis, C.E. Fowler, N.H. Mendelson, S.D. Sims, D. Walsh, N.T. Whilton, Sol-Gel Synthesis of Organized Matter, *Chemistry of Materials*, 9, (1997), p. 2300-2310.
- [64] M.M. Collinson, Sol-Gel Strategies for the Preparation of Selective Materials for Chemical Analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29, (1999), p. 289-311.
- [65] L. Chu, M.I. Tejedor-Tejedor, M.A. Anderson, Particulate sol-gel route for microporous silica gels, *Microporous Materials*, 8, (1997), p. 207-213.
- [66] J. Livage, F. Beteille, C. Roux, M. Chatry, P. Davidson, Sol-gel synthesis of oxide materials, *Acta Materialia*, 46, (1998), p. 743-750.
- [67] N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations, *Journal of Chromatography A*, 965, (2002), p. 35-49.
- [68] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, Monolithic LC Columns, a new type of chromatographic support could lead to higher separation efficiencies., *Analytical Chemistry*, 73, (2001), p. 420A-429A.
- [69] U. Ciesla, F. Schuth, Ordered mesoporous materials, *Microporous and Mesoporous Materials*, 27, (1999), p. 131-149.
- [70] F. Schüth, W. Schmidt, Microporous and Mesoporous Materials, *Advanced Materials*, 14, (2002), p. 629-638.
- [71] G. Oye, J. Sjöblom, M. Stocker, Synthesis, characterization and potential applications of new materials in the mesoporous range, *Advances in Colloid and Interface Science*, 89-90, (2001), p. 439-466.
- [72] K. Cabrera, G. Wieland, D. Lubda, K. Nakanishi, N. Soga, H. Minakuchi, K.K. Unger, SilicaROD(TM) -- A new challenge in fast high-performance liquid chromatography separations, *Trends in Analytical Chemistry*, 17, (1998), p. 50-53.
- [73] K. Cabrera, Applications of silica-based monolithic HPLC columns, *Journal of Separation Science*, 27, (2004), p. 843-852.
- [74] F.C. Leinweber, D. Lubda, K. Cabrera, U. Tallarek, Characterization of Silica-Based Monoliths with Bimodal Pore Size Distribution, *Analytical Chemistry*, 74, (2002), p. 2470-2477.
- [75] K.K. Unger, N. Becker, P. Roumeliotis, Recent developments in the evaluation of chemically bonded silica packings for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 125, (1976), p. 115-127.
- [76] R. Corriu, Monophasic organic-inorganic hybrid materials, *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIC - Chemistry*, 1, (1998), p. 83-89.
- [77] K. Unger, B. Scharf, Controlled porosity silica supports from hydrolytic polycondensation reaction of poly (ethoxysiloxane), *Journal of Colloid and Interface Science*, 55, (1976), p. 377-380.
- [78] F. Findik, Modulated Structures in Cu-32Ni-3Cr And Cu-46Ni-17Cr Alloys, *Canadian Metallurgical Quarterly*, 41, (2002), p. 337-347.
- [79] C.M. Bell, L.C. Sander, S.A. Wise, Temperature dependence of carotenoids on C18, C30 and C34 bonded stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 757, (1997), p. 29-39.

- [80] C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, A. Tchaplal Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and their Importance for Evaluating these Supports. Part I, *Chromatographia*, 53, (2001), p. S113-S131.
- [81] H. Glatz, C. Blay, H. Engelhardt, W. Bannwarth, New Fluorous Reversed Phase Silica Gels for HPLC Separations of Perfluorinated Compounds, *Chromatographia*, 59, (2004), p. 567-570.
- [82] M.A. Al-Haj, P. Haber, R. Kaliszan, B. Buszewski, M. Jezierska, Z. Chilmonzyk, Mechanism of separation on cholesterol-silica stationary phase for high-performance liquid chromatography as revealed by analysis of quantitative structure-retention relationships, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, (1998), p. 721-728.
- [83] B. Buszewski, M. Jezierska, M. Welniak, R. Kaliszan, Cholesteryl-silica stationary phase for liquid chromatography; Comparative study of retention behavior and selectivity, *Journal of Chromatography A*, 845, (1999), p. 433-445.
- [84] Y. Saito, H. Ohta, K. Jinno, Design and characterization of novel stationary phases based on retention behavior studies with various aromatic compounds, *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 225-241.
- [85] W. Wielandt, A. Ellwanger, K. Albert, E. Lindner, n-Alkyl fluorenyl phases in chromatography: I. Synthesis and characterization, *Journal of Chromatography A*, 805, (1998), p. 71-83.
- [86] A. Ellwanger, R. Brindle, M. Kaiser, W. Wielandt, E. Lindner, K. Albert, n-Alkyl fluorenyl phases in chromatography: II. Dynamic behavior and high-performance liquid chromatography applications, *Journal of Chromatography A*, 858, (1999), p. 133-153.
- [87] J. Horak, N.M. Maier, W. Lindner, Investigations on the chromatographic behavior of hybrid reversed-phase materials containing electron donor-acceptor systems: II. Contribution of [pi]-[pi] aromatic interactions, *Journal of Chromatography A*, 1045, (2004), p. 43-58.
- [88] Q.Y. Huai, B. Zhao, Y.M. Zuo, Preparation and Evaluation of an End-Capped p-tert-Butyl-Calix[4]arene-Bonded-Silica Stationary Phase for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia*, 59, (2004), p. 637-645.
- [89] S. Singh, J. Wegmann, K. Albert, K. Müller, Variable Temperature FT-IR Studies of n-Alkyl Modified Silica Gels, *Journal of Physical Chemistry B*, 106, (2002), p. 878-888.
- [90] I. Rustamov, T. Farcas, F. Ahmed, F. Chan, R. LoBrutto, H.M. McNair, Y.V. Kazakevich, Geometry of chemically modified silica, *Journal of Chromatography A*, 913, (2001), p. 49-63.
- [91] M.J. Wirth, H.O. Fatunmbi, Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica: a potential chromatographic stationary phase, *Analytical Chemistry*, 64, (1992), p. 2783-2786.
- [92] M.J. Wirth, H.O. Fatunmbi, Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica. 2. Application to chromatographic silica gel, *Analytical Chemistry*, 65, (1993), p. 822-826.
- [93] M. Pursch, L.C. Sander, K. Albert, Chain Order and Mobility of High-Density C18 Phases by Solid-State NMR Spectroscopy and Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 68, (1996), p. 4107-4113.
- [94] L.C. Sander, M. Pursch, S.A. Wise, Shape Selectivity for Constrained Solutes in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 71, (1999), p. 4821-4830.
- [95] L.C. Sander, S.A. Wise, Synthesis and characterization of polymeric C18 stationary phases for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 56, (1984), p. 504-510.
- [96] L.C. Sander, S.A. Wise, Retention and selectivity for polycyclic aromatic hydrocarbons in reversed-phase liquid chromatography. *Retention and selectivity in liquid chromatography* / ed. par R.M. Smith. ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995, p. 337-369.
- [97] J.J. Kirkland, J.L. Glajch, R.D. Farlee, Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings, *Analytical Chemistry*, 61, (1989), p. 2-11.

- [98] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, The Column. *Practical HPLC Method Development* / ed. Second ed. New York: Wiley-Interscience, 1997, p. 174-232.
- [99] J. Nawrocki, Silica surface controversies, strong adsorption sites, their blockage and removal. Part 2, *Chromatographia*, 31, (1991), p. 193-205.
- [100] R. Kaliszan, M.P. Marszall, M. Jan Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids, *Journal of Chromatography A*, 1030, (2004), p. 263-271.
- [101] H. Engelhardt, T. Lobert, Chromatographic Determination of Metallic Impurities in Reversed-Phase HPLC Columns, *Analytical Chemistry*, 71, (1999), p. 1885-1892.
- [102] J. Nawrocki, Silica surface controversies, strong adsorption sites, their blockage and removal. Part 1, *Chromatographia*, 31, (1991), p. 177-192.
- [103] M. Kele, G. Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns; I. Experimental protocol, *Journal of Chromatography A*, 830, (1999), p. 41-54.
- [104] J. Köhler, J.J. Kirkland, Improved silica-based column packings for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 385, (1987), p. 125-150.
- [105] J.J. Gilroy, J.W. Dolan, P.W. Carr, L.R. Snyder, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: V. Higher metal content (type-A) alkyl-silica columns, *Journal of Chromatography A*, 1026, (2004), p. 77-89.
- [106] J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: IV. Type-B alkyl-silica columns, *Journal of Chromatography A*, 1000, (2003), p. 757-778.
- [107] A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U.D. Neue, Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 986, (2003), p. 33-44.
- [108] J.M. Herrero-Martinez, A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, Characterization of the acidity of residual silanol groups in microparticulate and monolithic reversed-phase columns, *Journal of Chromatography A*, In Press, (2004).
- [109] F. Gritti, G. Guiochon, Surface Heterogeneity of Six Commercial Brands of End-Capped C18-Bonded Silica. RPLC Separations, *Analytical Chemistry*, 75, (2003), p. 5726-5738.
- [110] D.V. McCalley, Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column, *Journal of Chromatography A*, 902, (2000), p. 311-321.
- [111] R.W.P. Fairbank, Y. Xiang, M.J. Wirth, Use of Methyl Spacers in a Mixed Horizontally Polymerized Stationary Phase, *Analytical Chemistry*, 67, (1995), p. 3879-3885.
- [112] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Second ed. New York: Wiley-Interscience, 1997, 800 pages.
- [113] U.D. Neue, T.H. Walter, B.A. Alden, Z. Jiang, R.P. Fisk, J.T. Cook, K.H. Glose, J.L. Carmody, J.M. Grassi, Y.-F. Cheng, Z. Lu, R.J. Crowley, Use of high-performance LC packings from pH 1 to pH 12, *American Laboratory*, (1999), p. 36-39.
- [114] Y.-F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.E. O'Gara, R.P. Fisk, Hybrid Organic-Inorganic Particle Technology: Breaking Through Traditional Barriers of HPLC Separations, *LC-GC*, 18, (2000), p. 1162-1172.
- [115] 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, *Journal of Chromatography A*, 728, (1996), p. 259-270.
- [116] 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, *Journal of Chromatography A*, 762, (1997), p. 97-112.
- [117] J.J. Pesek, M.T. Matyska, R.J. Yu, Synthesis and characterization of endcapped C18 stationary phases using a silica hydride intermediate, *Journal of Chromatography A*, 947, (2002), p. 195-203.

- [118] 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, *Journal of Chromatography A*, 691, (1995), p. 3-19.
- [119] J.J. Kirkland, J. J. B. Adams, M.A.v. Straten, H.A. Claessens, Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 70, (1998), p. 4344-4352.
- [120] Y. Sudo, End-capping of octadecylsilylated silica gels by high-temperature silylation, *Journal of Chromatography A*, 737, (1996), p. 139-147.
- [121] Y. Sudo, Optimization of end-capping of octadecyl-silylated silica gels by high-temperature silylation, *Journal of Chromatography A*, 757, (1997), p. 21-28.
- [122] Y. Sudo, T. Wada, Characteristics of octadecylsilylated silica gels end-capped by high-temperature silylation, *Journal of Chromatography A*, 813, (1998), p. 239-246.
- [123] E. Tonhi, S. Bachmann, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: I. Physical and chemical characterizations, *Journal of Chromatography A*, 948, (2002), p. 97-107.
- [124] M.J. Wirth, M.D. Ludes, D.J. Swinton, Spectroscopic Observation of Adsorption to Active Silanols, *Analytical Chemistry*, 71, (1999), p. 3911-3917.
- [125] A.B. Scholten, J.W. de Haan, H.A. Claessens, L.J.M. van de Ven, C.A. Cramers, ²⁹-Silicon NMR evidence for the improved chromatographic siloxane bond stability of bulky alkylsilane ligands on a silica surface, *Journal of Chromatography A*, 688, (1994), p. 25-29.
- [126] F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, Comparison of the adsorption equilibrium of a few low-molecular mass compounds on a monolithic and a packed column in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 978, (2002), p. 81-107.
- [127] A.B. Scholten, H.A. Claessens, J.W. de Haan, C.A. Cramers, Chromatographic activity of residual silanols of alkylsilane derivatized silica surfaces, *Journal of Chromatography A*, 759, (1997), p. 37-46.
- [128] J.E. O'Gara, B.A. Alden, T.H. Walter, J.S. Petersen, C.L. Niederlaender, U.D. Neue, Simple preparation of a C8 HPLC stationary phase with an internal polar functional group, *Analytical Chemistry*, 67, (1995), p. 3809-3813.
- [129] D.V. McCalley, Comparison of the performance of conventional C18 phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 844, (1999), p. 23-38.
- [130] H. Engelhardt, R. Grüner, M. Scherer, The Polar Selectivities of Non-polar Reversed Phases, *Chromatographia*, 53, (2001), p. S154-S161.
- [131] U.D. Neue, Y.-F. Cheng, Z. Lu, B.A. Alden, P.C. Iraneta, C.H. Phoebe, K. Van Tran, Properties of Reversed Phase Packings with an Embedded Polar Group, *Chromatographia*, 54, (2001), p. 169-186.
- [132] M.R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis, *Journal of Chromatography A*, 994, (2003), p. 13-36.
- [133] J. Layne, Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 957, (2002), p. 149-164.
- [134] N.S. Wilson, J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VI. Columns with embedded or end-capping polar groups, *Journal of Chromatography A*, 1026, (2004), p. 91-100.
- [135] P.A. Tate, J.G. Dorsey, Column selection for liquid chromatographic estimation of the $\log k'$ hydrophobicity parameter, *Journal of Chromatography A*, 1042, (2004), p. 37-48.
- [136] N. Nagae, T. Enami, S. Doshi, The Retention Behavior of Reversed-Phase HPLC Columns with 100% Aqueous Mobile Phase, *LCCG North America*, 20, (2002), p. 964-972.
- [137] B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, Studies of physicochemical and chromatographic properties of mixed amino-alkylamide bonded phases, *Journal of Chromatography A*, 673, (1994), p. 11-19.

- [138] T. Czajkowska, I. Hrabovsky, B. Buszewski, R.K. Gilpin, M. Jaroniec, Comparison of the retention of organic acids on alkyl and alkylamide chemically bonded phases, *Journal of Chromatography A*, 691, (1995), p. 217-224.
- [139] T. Czajkowska, M. Jaroniec, Selectivity of alkylamide bonded-phases with respect to organic acids under reversed-phase conditions, *Journal of Chromatography A*, 762, (1997), p. 147-158.
- [140] C.P. Jaroniec, R.K. Gilpin, M. Jaroniec, Comparative studies of chromatographic properties of silica-based amide-bonded phases under hydro-organic conditions, *Journal of Chromatography A*, 797, (1998), p. 103-110.
- [141] P. Kasturi, B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, Reordering / resonance studies of alkylamide phases, *Journal of Chromatography A*, 659, (1994), p. 261-265.
- [142] C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, Development of new urea-functionalized silica stationary phases: Characterization and chromatographic performance, *Journal of Chromatography A*, 913, (2001), p. 65-73.
- [143] C.R. Silva, S. Bachmann, R.R. Schefer, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, Preparation of a new C18 stationary phase containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 948, (2002), p. 85-95.
- [144] C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, New generation of sterically protected C18 stationary phases containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 987, (2003), p. 127-138.
- [145] C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, Evaluation of the applicability and the stability of a C18 stationary phase containing embedded urea groups, *Journal of Chromatography A*, 987, (2003), p. 139-146.
- [146] C.R. Silva, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, Chromatographic and column stability at pH 7 of a C18 dimethylurea polar stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1030, (2004), p. 157-166.
- [147] N.T. Miller, B. Feibush, B.L. Karger, Wide-pore silica-based ether-bonded phases for separation of proteins by high-performance hydrophobic-interaction and size exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 316, (1984), p. 519-536.
- [148] N.T. Miller, B.L. Karger, High-performance hydrophobic-interaction chromatography on ether-bonded phases : Chromatographic characteristics and gradient optimization, *Journal of Chromatography A*, 326, (1985), p. 45-61.
- [149] J. Horak, W. Lindner, Investigations on the chromatographic behavior of hybrid reversed-phase materials containing electron donor-acceptor systems: I. Contribution of sulfur-aromatic interactions, *Journal of Chromatography A*, 1043, (2004), p. 177-194.
- [150] J. Köhler, D.B. Chase, R.D. Farlee, A.J. Vega, J.J. Kirkland, Comprehensive characterization of some silica-based stationary phase for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 352, (1986), p. 275-305.
- [151] J.D. Sunseri, W.T. Cooper, J.G. Dorsey, Reducing residual silanol interactions in reversed-phase liquid chromatography: Thermal treatment of silica before derivatization, *Journal of Chromatography A*, 1011, (2003), p. 23-29.
- [152] M.R.C. Marques, HPLC Packings Used in the USP–NF, *Pharmaceutical Forum*, 26, (2000).
- [153] R.M. Smith, A. Marton, Classification and characterization of stationary phases for liquid chromatography: Part I. Descriptive terminology, *Pure and Applied Chemistry*, 69, (1997), p. 1475-1480.
- [154] J.W. Carr, J.M. Harris, Heterogeneity of reversed-phase chromatographic surfaces: quenching of sorbed pyrene fluorescence, *Analytical Chemistry*, 59, (1987), p. 2546-2550.
- [155] M.E. Montgomery, M.A. Green, M.J. Wirth, Orientational dynamics of a hydrophobic guest in a chromatographic stationary phase: effect of wetting by alcohol, *Analytical Chemistry*, 64, (1992), p. 1170-1175.
- [156] M.E. Montgomery, M.J. Wirth, Spectroscopic Study of the Molecular Basis of Wetting of a C18 Surface by Long-Chain n-Alcohols, *Analytical Chemistry*, 66, (1994), p. 680-684.

- [157] J.D. Burbage, M.J. Wirth, Effect of wetting on the reorientation of acridine orange at the interface of water and a hydrophobic surface, *Journal of Physical Chemistry*, 96, (1992), p. 5943-5948.
- [158] K. Jinno, T. Ibuki, N. Tanaka, M. Okamoto, J.C. Fetzner, W.R. Biggs, P.R. Griffiths, J.M. Olinger, Retention behaviour of large polycyclic aromatic hydrocarbons in reversed-phase liquid chromatography on a polymeric octadecylsilica stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 461, (1989), p. 209-227.
- [159] C.A. Doyle, T.J. Vickers, C.K. Mann, J.G. Dorsey, Characterization of liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy Effect of ligand type, *Journal of Chromatography A*, 779, (1997), p. 91-112.
- [160] C.A. Doyle, T.J. Vickers, C.K. Mann, J.G. Dorsey, Characterization of C18-bonded liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy; the effect of mobile phase composition, *Journal of Chromatography A*, 877, (2000), p. 25-39.
- [161] C.A. Doyle, T.J. Vickers, C.K. Mann, J.G. Dorsey, Characterization of C18-bonded liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy; the effect of temperature, *Journal of Chromatography A*, 877, (2000), p. 41-59.
- [162] M.W.J. Ducey, C.J. Orendorff, J.E. Pemberton, L.C. Sander, Structure-Function Relationships in High-Density Octadecylsilane Stationary Phases by Raman Spectroscopy. 1. Effects of Temperature, Surface Coverage, and Preparation Procedure, *Analytical Chemistry*, 74, (2002), p. 5576 -5584.
- [163] M.W.J. Ducey, C.J. Orendorff, J.E. Pemberton, L.C. Sander, Structure-Function Relationships in High-Density Octadecylsilane Stationary Phases by Raman Spectroscopy. 2. Effect of Common Mobile-Phase Solvents, *Analytical Chemistry*, 74, (2002), p. 5585-5592.
- [164] C.J. Orendorff, J. Michael W. Ducey, J.E. Pemberton, L.C. Sander, Structure-Function Relationships in High-Density Octadecylsilane Stationary Phases by Raman Spectroscopy. 3. Effects of Self-Associating Solvents, *Analytical Chemistry*, 75, (2003), p. 3028 -3036.
- [165] C.J. Orendorff, J. Michael W. Ducey, J.E. Pemberton, L.C. Sander, Structure-Function Relationships in High-Density Octadecylsilane Stationary Phases by Raman Spectroscopy. 4. Effects of Neutral and Basic Aromatic Compounds, *Analytical Chemistry*, 75, (2003), p. 3037 -3043.
- [166] R. Wang, S.L. Wunder, Thermal Stability of Octadecylsilane Monolayers on Silica: Curvature and Free Volume Effects, *Journal of Physical Chemistry B*, 105, (2001), p. 173-181.
- [167] Y.D. Glinka, M. Jaroniec, Spontaneous and Stimulated Raman Scattering from Surface Phonon Modes in Aggregated SiO₂ Nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B*, 101, (1997), p. 8832-8835.
- [168] E. Bayer, E. Baumeister, U. Tallarek, K. Albert, G. Guiochon, NMR imaging of the chromatographic process. Deposition and removal of gadolinium ions on a reversed-phase liquid chromatographic column, *Journal of Chromatography A*, 704, (1995), p. 37-44.
- [169] Y. Bereznitski, M. Jaroniec, Characterization of silica-based octyl phases of different bonding density: Part I. Thermal stability studies, *Journal of Chromatography A*, 828, (1998), p. 51-58.
- [170] Y. Bereznitski, M. Jaroniec, M.E. Gangoda, Characterization of silica-based octyl phases of different bonding density: Part II. Studies of surface properties and chromatographic selectivity, *Journal of Chromatography A*, 828, (1998), p. 59-73.
- [171] R. Brindle, M. Pursch, K. Albert, ¹H MAS NMR spectroscopy of chemically modified silica gels: a fast method to characterize stationary interphases for chromatography, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 6, (1996), p. 251-266.
- [172] M.D. Bruch, H.O. Fatunmbi, Nuclear magnetic resonance analysis of silica gel surfaces modified with mixed, amine-containing ligands, *Journal of Chromatography A*, 1021, (2003), p. 61-70.
- [173] B. Buszewski, R.M. Gadzaa-Kopciuch, M. Markuszewski, R. Kaliszan, Chemically Bonded Silica Stationary Phases: Synthesis, Physicochemical Characterization, and

- Molecular Mechanism of Reversed-Phase HPLC Retention, *Analytical Chemistry*, 69, (1997), p. 3277-3284.
- [174] B. Buszewski, K. Krupczynska, R.M. Gadzaa-Kopciuch, G. Rychlicki, R. Kaliszan, Evaluation of HPLC columns: A study on surface homogeneity of chemically bonded stationary phases, *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 313-321.
- [175] K. Jinno, CP-MAS¹³C Nuclear magnetic resonance spectra for identification of functionality of octadecylsilica bonded phases, *Journal of Chromatographic Science*, 27, (1989), p. 729-734.
- [176] J.P. Beaufiles, M.C. Hennion, R. Rosset, Neutron scattering study of alkyl chain motion on reversed-phase liquid chromatographic packings, *Analytical Chemistry*, 57, (1985), p. 2593-2596.
- [177] L.C. Sander, C.J. Glinka, S.A. Wise, Determination of bonded phase thickness in liquid chromatography by small angle neutron scattering, *Analytical Chemistry*, 62, (1990), p. 1099-1101.
- [178] C.J. Glinka, L.C. Sander, S.A. Wise, M.L. Hunnicutt, C.H. Lochmuller, Determination of pore accessibility in silica microparticles by small angle neutron scattering, *Analytical Chemistry*, 57, (1985), p. 2079-2084.
- [179] D. Pleul, R. Frenzel, M. Eschner, F. Simon¹, X-ray photoelectron spectroscopy for detection of the different Si-O bonding states of silicon, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, (2003), p. 1276-1281.
- [180] D.A. Barrett, V.A. Brown, M.C. Davies, P.N. Shaw, Characterization of a Range of Alkyl-Bonded Silica HPLC Stationary Phases: Correlation of Quantitative Surface Analysis Data with the Retention Behavior of Neutral, Acidic, and Basic Solutes, *Analytical Chemistry*, 68, (1996), p. 2170-2178.
- [181] J.H. van't Hoff, The Relation of Physical Chemistry to Physics and Chemistry, *Journal of Physical Chemistry*, 9, (1905), p. 81-89.
- [182] L.A. Cole, J.G. Dorsey, Temperature dependence of retention in reversed-phase liquid chromatography. 1. Stationary-phase considerations, *Analytical Chemistry*, 64, (1992), p. 1317-1323.
- [183] L.A. Cole, J.G. Dorsey, K.A. Dill, Temperature dependence of retention in reversed-phase liquid chromatography. 2. Mobile-phase considerations, *Analytical Chemistry*, 64, (1992), p. 1324-1327.
- [184] R.J.M. Vervoort, E. Ruyter, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, Characterisation of reversed-phase stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic pharmaceuticals by thermodynamic data, *Journal of Chromatography A*, 964, (2002), p. 67-76.
- [185] T.L. Chester, J.W. Coym, Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy, *Journal of Chromatography A*, 1003, (2003), p. 101-111.
- [186] M.A. Al-Haj, R. Kaliszan, B. Buszewski, Quantitative structure-retention relationships with model analytes as a means of an objective evaluation of chromatographic columns, *Journal of Chromatographic Science*, 39, (2001), p. 29-38.
- [187] T. Baćzek, M. Markuszewski, R. Kaliszan, M.A. van Straten, H.A. Claessens, Linear and Quadratic Relationships between Retention and Organic Modifier Content in Eluent in Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography: A Systematic Comparative Statistical Study, *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, (2000), p. 667-676.
- [188] B. Buszewski, M. Jezierska-Switala, R. Kaliszan, A. Wojtczak, K. Albert, S. Bachmann, M.T. Matyska, J.J. Pesek, Selectivity Tuning and Molecular Modeling of New Generation Packings for RP-HPLC, *Chromatographia*, 53, (2001), p. S204-S212.
- [189] T. Baćzek, R. Kaliszan, Quantitative structure/retention relationships in affinity chromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, (2001), p. 83-98.
- [190] R. Kaliszan, Retention data from affinity high-performance liquid chromatography in view of chemometrics, *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 715, (1998), p. 229-244.

- [191] R. Kaliszan, M.A. van Straten, M. Markuszewski, C.A. Cramers, H.A. Claessens, Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships, *Journal of Chromatography A*, 855, (1999), p. 455-486.
- [192] H.A. Claessens, M.A. van Straten, C.A. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski, Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 826, (1998), p. 135-156.
- [193] R.J.M. Vervoort, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals, *Journal of Chromatography A*, 897, (2000), p. 1-22.
- [194] Jung Hag Park, Je Joon Chae, Tae Hwa Nah, Myung Duk Jang, Characterization of some silica-based reversed-phase liquid chromatographic columns based on linear solvation energy relationships, *Journal of Chromatography A*, 664, (1994), p. 149-158.
- [195] S. Werlich, J.T. Andersson, Characterization of some functionalized RP-HPLC phases by the use of linear solvation energy relationships, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364, (1999), p. 3-14.
- [196] A. Wang, P.W. Carr, Comparative study of the linear solvation energy relationship, linear solvent strength theory, and typical-conditions model for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 965, (2002), p. 3-23.
- [197] L. Szepeszy, V. Hada, Influence of Column Characteristics on Retention and Selectivity in RP-HPLC, *Chromatographia*, 54, (2001), p. 99-108.
- [198] L. Szepeszy, Effect of molecular interactions on retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 960, (2002), p. 69-83.
- [199] L. Szepeszy, Evaluation of column characteristics in RPLC using linear solvation energy relationships (LSERs), *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 201-214.
- [200] M. Reta, P.W. Carr, P.C. Sadek, S.C. Rutan, Comparative study of hydrocarbon, fluorocarbon, and aromatic bonded RP- HPLC stationary phases by linear solvation energy relationships, *Analytical Chemistry*, 71, (1999), p. 3484-3496.
- [201] M.J. Kamlet, R.W. Taft, The solvatochromic comparison method. I. The beta-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities, *Journal of American Chemical Society*, 98, (1976), p. 377-383.
- [202] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The alpha-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *Journal of American Chemical Society*, 98, (1976), p. 2886-2894.
- [203] M.J. Kamlet, J.L. Abboud, R.W. Taft, The solvatochromic comparison method. 6. The π^* scale of solvent polarities, *Journal of American Chemical Society*, 99, (1977), p. 6027-6038.
- [204] A. Sandi, L. Szepeszy, Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship; I. Evaluation based on retention factors, *Journal of Chromatography A*, 818, (1998), p. 1-17.
- [205] A. Sandi, L. Szepeszy, Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship; II. Evaluation of selectivity, *Journal of Chromatography A*, 818, (1998), p. 19-30.
- [206] A. Sandi, M. Nagy, L. Szepeszy, Characterization of reversed-phase columns using the linear free energy relationship; III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition, *Journal of Chromatography A*, 893, (2000), p. 215-234.
- [207] J.A. Platts, M.H. Abraham, D. Butina, A. Hersey, Estimation of Molecular Linear Free Energy Relationship Descriptors by a Group Contribution Approach. 2. Prediction of Partition Coefficients, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 40, (2000), p. 71-80.
- [208] P.C. Sadek, P.W. Carr, R.M. Doherty, M.J. Kamlet, R.W. Taft, M.H. Abraham, Study of retention processes in reversed-phase high-performance liquid chromatography by the use of the solvatochromic comparison method, *Analytical Chemistry*, 57, (1985), p. 2971-2978.

- [209] P.W. Carr, R.M. Doherty, M.J. Kamlet, R.W. Taft, W. Melander, C. Horvath, Study of temperature and mobile-phase effects in reversed-phase high-performance liquid chromatography by the use of the solvatochromic comparison method, *Analytical Chemistry*, 58, (1986), p. 2674-2680.
- [210] C.T. Lay, P.W. Carr, M.H. Abraham, Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships I. The stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 752, (1996), p. 1-18.
- [211] M.H. Abraham, D.S. Ballantine, B.K. Callihan, Revised linear solvation energy relationship coefficients for the 77-phase McReynolds data set based on an updated set of solute descriptors, *Journal of Chromatography A*, 878, (2000), p. 115-124.
- [212] C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham, Characterizing the selectivity of stationary phases and organic modifiers in reversed-phase high-performance liquid chromatographic systems by a general solvation equation using gradient elution, *Journal of Chromatographic Science*, 38, (2000), p. 503-511.
- [213] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P.W. Carr, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography; I. A general quantitative relationship, *Journal of Chromatography A*, 961, (2002), p. 171-193.
- [214] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography; II. Effect of a change in conditions, *Journal of Chromatography A*, 961, (2002), p. 195-215.
- [215] N.S. Wilson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, L.C. Sander, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography; III. The physico-chemical basis of selectivity, *Journal of Chromatography A*, 961, (2002), p. 217-236.
- [216] L.C. Sander, S.A. Wise, *SRM 869a Column selectivity test mixture for liquid chromatography polycyclic aromatic hydrocarbons*, Certificate of Analysis, NIST, 1998, Gaithersburg, MD
- [217] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation Between a Preparation Method and Retention Behaviour of Stationary Phase, *Journal of Chromatographic Science*, 27, (1989), p. 721-728.
- [218] H. Engelhardt, M. Jungheim, Comparison and characterization of reversed phases, *Chromatographia*, 29, (1990), p. 59-68.
- [219] E. Cruz, M.R. Euerby, C.M. Johnson, C.A. Hackett, Chromatographic Classification of Commercially Available Reverse-Phase HPLC Columns, *Chromatographia*, 44, (1997), p. 151-161.
- [220] M.R. Euerby, P. Petersson, A classification of commercially available RPLC columns - a tool for rational selection, *LCGC Europe*, 13, (2000), p. 665-677.
- [221] R.M. Smith, P.V.S. Rao, S. Dube, H. Shah, Problems of the Interlaboratory Transferability of the Measurement of the Properties of a Reversed-Phase HPLC Column, *Chromatographia*, 57, (2003), p. S27-S38.
- [222] T. Daldrup, B. Kardel, A simple test to characterise C8/C18-bonded phases, particularly for toxicological screening, *Chromatographia*, 18, (1984), p. 81-83.
- [223] W. Eymann, HPLC in industry- a well established procedure for characterizing RP-stationary phases, *Chromatographia*, 45, (1997), p. 235-242.
- [224] C. Gonnet, C. Bory, G. Lachatre, Comparative study of some commercial chemically bonded phases in classical reversed-phase chromatography and in ion-pair reversed-phase liquid chromatography, *Chromatographia*, 16, (1982), p. 242-246.
- [225] M.J. Walters, *Journal of AOAC International*, 70, (1987), p. 465.
- [226] M. Verzele, C. Dewaele, The evaluation of "reversed-phase" high-performance liquid chromatography packing materials, *Chromatographia*, 18, (1984), p. 84-86.
- [227] D.V. McCalley, Effect of organic solvent modifier and nature of solute on the performance of bonded silica reversed-phase columns for the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography., *Journal of Chromatography A*, 738, (1996), p. 169-179.

- [228] D.V. McCalley, R.G. Brereton, High-performance liquid chromatography of basic compounds: Problems, possible solutions and tests of reversed-phase columns, *Journal of Chromatography A*, 828, (1998), p. 407-420.
- [229] D.V. McCalley, Influence of analyte stereochemistry and basicity on peak shape of basic compounds in high-performance liquid chromatography with reversed-phase columns, using pyridine and alkyl-substituted derivatives as probe compounds, *Journal of Chromatography A*, 664, (1994), p. 139-147.
- [230] D.V. McCalley, Influence of organic solvent modifier and solvent strength on peak shape of some basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column, *Journal of Chromatography A*, 708, (1995), p. 185-194.
- [231] D.V. McCalley, Influence of organic solvent modifier and solvent strength on peak shape of some basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column*1, *Journal of Chromatography A*, 708, (1995), p. 185-194.
- [232] D.V. McCalley, Comparative evaluation of bonded-silica reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography using strongly basic compounds and alternative organic modifiers buffered at acid pH, *Journal of Chromatography A*, 769, (1997), p. 169-178.
- [233] R.G. Brereton, D.V. McCalley, Evaluation procedures for reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns in the analysis of strongly basic compounds using principal components analysis for data assessment, *The Analyst*, 123, (1998), p. 1175-1185.
- [234] C. Stella, P. Seuret, S. Rudaz, P.-A. Carrupt, J.-Y. Gaudrit, P. Lanteri, J.-L. Veuthey, Characterization of chromatographic supports for the analysis of basic compounds, *Journal of Separation Science*, 25, (2002), p. 1351-1363.
- [235] C. Stella, P. Seuret, S. Rudaz, A. Tchaplal, J.-Y. Gaudrit, P. Lanteri, J.-L. Veuthey, Simplification of a Chromatographic Test Methodology for Evaluation of Base Deactivated Supports, *Chromatographia*, 56, (2002), p. 665-672.
- [236] R.J.M. Vervoort, M.W.J. Derksen, F.A. Maris, Selection of stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic compounds using chemometric methods, *Journal of Chromatography A*, 678, (1994), p. 1-15.
- [237] R.J.M. Vervoort, M.W.J. Derksen, A.J.J. Debets, Monitoring of new silica-based reversed-phase stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic pharmaceuticals using principal components analysis, *Journal of Chromatography A*, 765, (1997), p. 157-168.
- [238] C. Stella, S. Rudaz, M. Mottaz, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, Analysis of basic compounds at high pH values by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 27, (2004), p. 284-292.
- [239] R.J.M. Vervoort, E. Ruyter, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, Characterisation of reversed-phase liquid chromatography stationary phases for the analysis of basic pharmaceuticals: eluent properties and comparison of empirical test methods, *Journal of Chromatography A*, 931, (2001), p. 67-79.
- [240] H.A. Claessens, Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, 20, (2001), p. 563-583.
- [241] C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, A. Tchaplal Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatographic Tests and their Importance for Evaluating these Supports. Part II, *Chromatographia*, 53, (2001), p. S132-S140.
- [242] W.E. May, N.M. Trahey, *SRM 870 Column performance test mixture for liquid chromatography*, Certificate of analysis, NIST, 2000, Gaithersburgs, MD
- [243] U.D. Neue, E. Serowik, P. Iraneta, B.A. Alden, T.H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings; I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings, *Journal of Chromatography A*, 849, (1999), p. 87-100.
- [244] U.D. Neue, B.A. Alden, T.H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings; II.

- Classification of reversed-phase packings, *Journal of Chromatography A*, 849, (1999), p. 101-116.
- [245] U.D. Neue, K. VanTran, P.C. Iraneta, B.A. Alden, Characterization of HPLC packings, *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 174-186.
- [246] S.A. Wise, L.C. Sander, Factors affecting the reversed-phase liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbon, *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, 8, (1985), p. 248-255.
- [247] K.A. Lippa, L.C. Sander, S.A. Wise, Chemometric studies of polycyclic aromatic hydrocarbon shape selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, (2004), p. 365-377.
- [248] M. Pursch, R. Brindle, A. Ellwanger, L.C. Sander, C.M. Bell, H. Handel, K. Albert, Stationary interphases with extended alkyl chains: a comparative study on chain order by solid-state NMR spectroscopy, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 9, (1997), p. 191-201.
- [249] L.C. Sander, R.M. Parris, S.A. Wise, P. Garrigues, Shape discrimination in liquid chromatography using charge-transfer phases, *Analytical Chemistry*, 63, (1991), p. 2589-2597.
- [250] S.A. Wise, L.C. Sander, Evaluation of Shape Selectivity in Liquid Chromatography, *LCGC North America*, 8, (1990), p. 378.
- [251] L.C. Sander, S.A. Wise, Subambient temperature modification of selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 61, (1989), p. 1749-1754.
- [252] L.C. Sander, S.A. Wise, Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 59, (1987), p. 2309-2313.
- [253] H. Engelhardt, M. Nikolov, M. Arangio, M. Scherer, Studies on Shape Selectivity of RP C18 - Columns, *Chromatographia*, 48, (1998), p. 183-189.
- [254] Y. Saito, H. Ohta, K. Jinno, Chromatographic Separation of Fullerenes., *Analytical Chemistry*, 76, (2004), p. 266A-272A.
- [255] F. Gritti, G. Guiochon, Physical origin of peak tailing on C18-bonded silica in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1028, (2004), p. 75-88.
- [256] Y. Ohtsu, Y. Shiojima, T. Okumura, J.-i. Koyama, K. Nakamura, O. Nakata, K. Kimata, N. Tanaka, Performance of polymer-coated silica C18 packing materials prepared from high-purity silica gel ; The suppression of undesirable secondary retention processes, *Journal of Chromatography A*, 481, (1989), p. 147-157.
- [257] K. Kimata, N. Tanaka, T. Araki, Suppression of the effect of metal impurities in alkylsilylated silica packing materials, *Journal of Chromatography A*, 594, (1992), p. 87-96.
- [258] E. Lesellier, A. Tchaplal, Subcritical chromatography with organic modifiers on octadecyl packed columns: Recent developments for the analysis of high molecular weight organic compounds. *Supercritical fluid chromatography with Packed Columns : techniques and applications* / ed. par C. Berger, K. Anton, J. Stubenrauch. ed. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 195-221.
- [259] G. Baillargeon, *Méthodes statistiques de l'ingénieur*, 3 ed. Trois-Rivières: SMG, 1990, 738 pages.
- [260] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Straight Line Regression and Calibration. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A* / ed. par D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, p. 171-230.
- [261] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4 ed. Harlow: Prentice Hall, 2000, 271 pages.
- [262] D. Visky, Y. Vander Heyden, T. Ivanyi, P. Baten, J. De Beer, Z. Kovacs, B. Noszal, E. Roets, D.L. Massart, J. Hoogmartens, Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation, *Journal of Chromatography A*, 977, (2002), p. 39-58.

- [263] L. Lebart, A. Morineau, M. Prion, *Statistique exploratoire multidimensionnelle*, 3rd ed. Paris: Dunod, 2000, 456 pages.
- [264] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Principal Component. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A* / ed. par D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, p. 519-556.
- [265] J.N. Miller, J.C. Miller, Multivariate analysis. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* / ed. par J.N. Miller, J.C. Miller. 4 ed. Harlow: Prentice Hall, 2000, p. 214-238.
- [266] J. Gabrielsson, N.-O. Lindberg, T. Lundstedt, Multivariate methods in pharmaceutical applications, *Journal of Chemometrics*, 16, (2002), p. 141-160.
- [267] I.S. Arvanitoyannis, M.N. Katsota, E.P. Psarra, E.H. Soufleros, S. Kallithraka, Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics), *Trends in Food Science and Technology*, 10, (1999), p. 321-336.
- [268] M.L. Morales, G.A. Gonzalez, J.A. Casas, A.M. Troncoso, Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging, *European Food Research and Technology*, 212, (2001), p. 676-682.
- [269] V. Simeonov, D.L. Massart, G. Andreev, S. Tsakovski, Assessment of metal pollution based on multivariate statistical modeling of 'hot spot' sediments from the Black Sea, *Chemosphere*, 41, (2000), p. 1411-1417.
- [270] T. Suzuki, K. Ide, M. Ishida, S. Shapiro, Classification of Environmental Estrogens by Physicochemical Properties Using Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41, (2001), p. 718-726.
- [271] D. Brodnjak-Voncina, D. Dobcnik, M. Novic, J. Zupan, Chemometrics characterisation of the quality of river water, *Analytica Chimica Acta*, 462, (2002), p. 87-100.
- [272] M.M.C. Ferreira, C.G. Faria, E.T. Paes, Oceanographic characterization of northern Sao Paulo Coast: a chemometric study, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 47, (1999), p. 289-297.
- [273] A. Detroyer, V. Schoonjans, F. Questier, Y. Vander Heyden, A.P. Borosy, Q. Guo, D.L. Massart, Exploratory chemometric analysis of the classification of pharmaceutical substances based on chromatographic data, *Journal of Chromatography A*, 897, (2000), p. 23-36.
- [274] R. Aruga, The problem of multivariate classification of samples with radial (or V-shaped) chemical data, *Talanta*, 60, (2003), p. 937-944.
- [275] R.G. Brereton, D.V. McCalley, Procrustes analysis for the comparison of test methods in reversed-phase high performance liquid chromatography of basic compounds, *The Analyst*, 124, (1999), p. 227-238.
- [276] D. Visky, Y. Vander Heyden, T. Ivanyi, P. Baten, J. De Beer, Z. Kovacs, B. Noszal, P. Dehouck, E. Roets, D.L. Massart, J. Hoogmartens, Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests: Rational column classification by a minimal number of column test parameters, *Journal of Chromatography A*, 1012, (2003), p. 11-29.
- [277] M.R. Euerby, A.P. McKeown, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available perfluorinated stationary phases for reversed-phase liquid chromatography using Principal Component Analysis, *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 295-306.
- [278] T. Ivanyi, Y. Vander Heyden, D. Visky, P. Baten, J. De Beer, I. Lazar, D.L. Massart, E. Roets, J. Hoogmartens, Minimal number of chromatographic test parameters for the characterisation of reversed-phase liquid chromatographic stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 954, (2002), p. 99-114.
- [279] D. Visky, Y. Vander Heyden, T. Ivanyi, P. Baeten, J. De Beer, B. Noszal, E. Roets, D.L. Massart, J. Hoogmartens, Characterisation of Reversed Phase Liquid Chromatographic Columns by Chromatographic Tests, *Pharmeuropa*, 14, (2002), p. 288-297.

- [280] S.J. Schmitz, H. Zwanziger, H. Engelhardt, Characterization of reversed phases by chemometric methods, *Journal of Chromatography A*, 544, (1991), p. 381-391.
- [281] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Cluster Analysis. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B* / ed. par D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, p. 57-86.
- [282] N. Bratchell, Cluster analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 6, (1987), p. 105-125.
- [283] V. Schoonjans, N. Taylor, B.D. Hudson, D.L. Massart, Characterization of the similarity of chemical compounds using electrospray ionization mass spectrometry and multivariate exploratory techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, (2002), p. 537-548.
- [284] R. Vendrame, M.M.C. Ferreira, C.H. Collins, Y. Takahata, Structure-activity relationships (SAR) of contraceptive progestogens studied with four different methods using calculated physicochemical parameters, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 20, (2002), p. 345-358.
- [285] O. Beckonert, M. E. Bollard, T.M.D. Ebbels, H.C. Keun, H. Antti, E. Holmes, J.C. Lindon, J.K. Nicholson, NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbour approaches, *Analytica Chimica Acta*, 490, (2003), p. 3-15.
- [286] H. Duflou, W. Maenhaut, J. De Reuck, Application of principal component and cluster analysis to the study of the distribution of minor and trace elements in normal human brain, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 9, (1990), p. 273-286.
- [287] M.F. Delaney, A.N. Papas, M.J. Walters, Chemometric classification of reversed-phase high-performance liquid chromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 410, (1987), p. 31-41.
- [288] M. Righezza, J.R. Chrétien, Factor analysis and experiment design in high-performance liquid chromatography : X. Chemometric characterization of packings, solvents and solutes with hierarchical ascending classification and correspondence factor analysis, *Journal of Chromatography A*, 544, (1991), p. 393-411.
- [289] S.K. Poole, C.F. Poole, Chemometric classification of the solvent properties (selectivity) of commonly used gas chromatographic stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 697, (1995), p. 415-427.
- [290] B. Massart, Q. Guo, F. Questier, D.L. Massart, C. Boucon, S. de Jong, B.G.M. Vandeginste, Data structures and data transformations for clustering chemical data, *Trends in Analytical Chemistry*, 20, (2001), p. 35-41.
- [291] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Analysis of Measurement Tables. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B* / ed. par D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, p. 87-160.
- [292] R. De Maesschalck, D. Jouan-Rimbaud, D.L. Massart, The Mahalanobis distance, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 50, (2000), p. 1-18.
- [293] A. Jakab, G. Schubert, M. Prodan, E. Forgacs, PCA, followed by two-dimensional nonlinear mapping and cluster analysis, versus multilinear regression in QSRR, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25, (2002), p. 1-16.
- [294] H. Scsibrany, M. Karlovits, W. Demuth, F. Muller, K. Varmuza, Clustering and similarity of chemical structures represented by binary substructure descriptors, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 67, (2003), p. 95-108.
- [295] L. Rohrschneider, Characterization of stationary phases by retention data and solvation parameters, *Journal of Separation Science*, 24, (2001), p. 3-9.
- [296] J. Barbosa, G. Fonrodona, I. Marques, V. Sanz-Nebot, I. Toro, Solvent effects on protonation equilibria of peptides and quinolones by factor analysis applied to the correlation between dissociation constants and solvatochromic parameters in acetonitrile-water mixtures, *Analytica Chimica Acta*, 351, (1997), p. 397-405.

- [297] I. Marques, G. Fonrodona, S. Buti, J. Barbosa, Solvent effects on mobile phases used in liquid chromatography: factor analysis applied to protonation equilibria and solvatochromic parameters, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, (1999), p. 472-479.
- [298] J. Barbosa, I. Toro, R. Berges, V. Sanz-Nebot, Retention behaviour of peptides, quinolones, diuretics and peptide hormones in liquid chromatography; Influence of ionic strength and pH on chromatographic retention, *Journal of Chromatography A*, 915, (2001), p. 85-96.
- [299] J. Barbosa, G. Fonrodona, I. Marques, S. Buti, I. Toro, Factor analysis applied to the correlation between dissociation constants and solvatochromic parameters in water-acetonitrile mixtures; I. Solvent effects on the dissociation of carboxylic acid groups in some diuretics, quinolones, buffers and peptides, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, (1997), p. 104-111.
- [300] J. Barbosa, D. Barron, J.L. Beltran, S. Buti, On the role of solvent in acid-base equilibria of diuretics in acetonitrile-water mixed solvents, *Talanta*, 45, (1998), p. 817-827.
- [301] U.D. Neue, C.H. Phoebe, K. Tran, Y.-F. Cheng, Z. Lu, Dependence of reversed-phase retention of ionizable analytes on pH, concentration of organic solvent and silanol activity, *Journal of Chromatography A*, 925, (2001), p. 49-67.
- [302] H. Engelhardt, H. Low, W. Gotzinger, Chromatographic characterization of silica-based reversed phases, *Journal of Chromatography A*, 544, (1991), p. 371-379.
- [303] M. Turowski, T. Morimoto, K. Kimata, H. Monde, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, Selectivity of stationary phases in reversed-phase liquid chromatography based on the dispersion interactions, *Journal of Chromatography A*, 911, (2001), p. 177-190.
- [304] N. Tanaka, K. Kimata, K. Hosoya, H. Miyanishi, T. Araki, Stationary phase effects in reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 656, (1993), p. 265-287.
- [305] L.C. Tan, P.W. Carr, Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships; II. The mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 799, (1998), p. 1-19.
- [306] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, Gradient elution in high-performance liquid chromatography : I. Theoretical basis for reversed-phase systems, *Journal of Chromatography A*, 165, (1979), p. 3-30.
- [307] J.W. Dolan, J.R. Gant, L.R. Snyder, Gradient elution in high-performance liquid chromatography : II. Practical application to reversed-phase systems, *Journal of Chromatography A*, 165, (1979), p. 31-58.
- [308] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. De Galan, Influence of organic modifiers on the retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography and its consequences for gradient elution, *Journal of Chromatography*, 185, (1979), p. 179-195.
- [309] J.N. Miller, J.C. Miller, Significance tests. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* / ed. par J.N. Miller, J.C. Miller. 4 ed. Harlow: Prentice Hall, 2000, p. 42-74.
- [310] E.D. Katz, C.H. Lochmuller, R.P.W. Scott, Methanol-water association and its effect on solute retention in liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 61, (1989), p. 349-355.
- [311] Y.C. Guillaume, C. Guinchard, Retention Mechanism of Weak Polar Solutes in Reversed Phase Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 68, (1996), p. 2869 -2873.
- [312] Y.C. Guillaume, C. Guinchard, ACN Clusters in a Water/ACN Mixture, with Implications for the RPLC Weak Polar Solute Retention, *Analytical Chemistry*, 69, (1997), p. 183 -189.
- [313] Y.C. Guillaume, C. Guinchard, Participation of Cluster Species in the Solvation Mechanism of a Weak Polar Solute in a Methanol/Water Mixture over a 0.2-0.7 Water Fraction Range: High-Performance Liquid Chromatography Study, *Analytical Chemistry*, 70, (1998), p. 608 -615.
- [314] E. Peyrin, F.-X. Perrin, Y.C. Guillaume, Retention Behavior Modelization of Monoprotic and Diprotic Species in a Hydroorganic Acetonitrile/Water Mixture, *Analytical Chemistry*, 71, (1999), p. 2708 -2713.

- [315] S. Nigam, A. de Juan, R.J. Stubbs, S.C. Rutan, Characterization of methanol-water and acetonitrile-water association using multivariate curve resolution methods, *Analytical Chemistry*, 72, (2000), p. 1956-1963.
- [316] F. Boury, J.-C. Gautier, Y. Bouligand, J.-E. Proust, Interfacial properties of amiodarone: the stabilizing effect of phosphate anions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, (2001), p. 219-227.
- [317] D.V. McCalley, Influence of sample mass on the performance of reversed-phase columns in the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 793, (1998), p. 31-46.
- [318] A. Mendez, E. Bosch, M. Roses, U.D. Neue, Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns, *Journal of Chromatography A*, 986, (2003), p. 33-44.
- [319] K. Le Mapihan, J. Vial, A. Jardy, Organic Solvent Effects in Reversed-Phase Liquid Chromatography in Relation to Column Testing, *Chromatographia*, 57, (2003), p. S163-S170.
- [320] A. Bolck, A.K. Smilde, Multivariate characterization of RP-HPLC stationary phases. *Retention and selectivity in liquid chromatography* / ed. par R.M. Smith. ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995, p. 403-449.
- [321] M. Kele, G. Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns; III. Results obtained with Kromasil C18 columns, *Journal of Chromatography A*, 855, (1999), p. 423-453.
- [322] M. Kele, G. Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatographic columns; II. Results obtained with Symmetry C18 columns, *Journal of Chromatography A*, 830, (1999), p. 55-79.
- [323] M. Kele, G. Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns; IV. Results obtained with Luna C18 (2) columns, *Journal of Chromatography A*, 869, (2000), p. 181-209.
- [324] M. Kele, G. Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns; V. Results obtained with Vydac 218TP C18 columns, *Journal of Chromatography A*, 913, (2001), p. 89-112.
- [325] M. Kele, G. Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on six batches of monolithic columns, *Journal of Chromatography A*, 960, (2002), p. 19-49.
- [326] A. Felinger, M. Kele, G. Guiochon, Identification of the factors that influence the reproducibility of chromatographic retention data, *Journal of Chromatography A*, 913, (2001), p. 23-48.
- [327] R.J.M. Vervoort, E. Ruyter, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, Influence of batch-to-batch reproducibility of Luna C18(2) packing material, nature of column wall material, and column diameter on the liquid chromatographic analysis of basic analytes, *Journal of Separation Science*, 24, (2001), p. 167-172.
- [328] CEA, *Statistique appliquée à l'exploitation des mesures - Tome 2* ed. Paris: Masson, 1978, 2, 267 pages.
- [329] *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics : Part A* / ed. par D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. Amsterdam: Elsevier, 1997 pages.
- [330] J. Vial, A. Jardy, Interlaboratory Studies: the Best Way to Estimate the Characteristics of Dispersion of an HPLC Method and a Powerful Tool for Analytical Transfers, *Chromatographia*, 53, (2001), p. S141-S148.
- [331] K. Le Mapihan, J. Vial, A. Jardy, Testing of "special base" columns in reversed-phase liquid chromatography: A rational approach considering solvent effects, *Journal of Chromatography A*, 1030, (2004), p. 135-147.
- [332] R. Gotti, S. Furlanetto, V. Andrisano, V. Cavrini, S. Pinzauti, Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulfate, *Journal of Chromatography A*, 875, (2000), p. 411-422.

- [333] H. Fabre, N. Mesplet, Robustness testing for a capillary electrophoresis method using the "short-end injection" technique, *Journal of Chromatography A*, 897, (2000), p. 329-338.
- [334] O. Devos, B. Fanget, A.-I. Saber, L. Paturel, E. Naffrechoux, J. Jarosz, Use of a Plackett-Burman Design with Multivariate Calibration for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Micellar Media by Synchronous Fluorescence, *Analytical Chemistry*, ASAP Article, (2001).
- [335] P.W. Araujo, R.G. Brereton, Experimental design I. Screening, *Trends in Analytical Chemistry*, 15, (1996), p. 26-31.
- [336] Y.V. Heyden, C. Hartmann, D.L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, Ruggedness tests for a high-performance liquid chromatographic assay: comparison of an evaluation at two and three levels by using two-level Plackett-Burman designs, *Analytica Chimica Acta*, 316, (1995), p. 15-26.
- [337] Y.L. Loukas, A Plackett-Burman screening design directs the efficient formulation of multicomponent DRV liposomes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, (2001), p. 255-263.
- [338] L.C. Rodriguez, R.B. Garcia, A.M. Garcia Campana, J.M. Bosque Sendra, A new approach to a complete robustness test of experimental nominal conditions of chemical testing procedures for internal analytical quality assessment, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 41, (1998), p. 57-68.
- [339] Y. Vander Heyden, S. Kuttatharmmakul, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, Supersaturated Designs for Robustness Testing, *Analytical Chemistry*, 72, (2000), p. 2869-2874.
- [340] R. Cela, E. Martinez, A.M. Carro, Supersaturated experimental designs. New approaches to building and using it; Part I. Building optimal supersaturated designs by means of evolutionary algorithms, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 52, (2000), p. 167-182.
- [341] R. Cela, E. Martinez, A.M. Carro, Supersaturated experimental designs: new approaches to building and using it; Part II. Solving supersaturated designs by genetic algorithms, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 57, (2001), p. 75-92.
- [342] J. Vial, A. Jardy, Use of experimental designs to evaluate the ruggedness of a quantitative HPLC method, *Analysis*, 26, (1998), p. 15-24.
- [343] J. Vial, A. Jardy, Utilisation des plans d'expériences pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse quantitative par Chromatographie en Phase Liquide, *Analysis*, 26, (1998), p. 15-24.
- [344] P.W. Araujo, R.G. Brereton, Experimental design II. Optimization, *Trends in Analytical Chemistry*, 15, (1996), p. 63-70.
- [345] R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petocz, The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, (2002), p. 995-1007.
- [346] M. Preu, D. Guyot, M. Petz, Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions, *Journal of Chromatography A*, 818, (1998), p. 95-108.
- [347] J. Goupy, Plans d'optimisation. *Plans d'expériences pour surfaces de réponse* / ed. ed. Paris: Dunod, 1999, p. 181-362.
- [348] Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry. *Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical technological products* / ed. par M.M.W.B. Hendriks, J.H.D. Boer, A.K. Smilde. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1996, p. 79-147.
- [349] P.F. de Aguiar, B. Bourguignon, M.S. Khots, D.L. Massart, R. Phan-Thau-Luu, D-optimal designs, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30, (1995), p. 199-210.
- [350] J. Goupy, *Plans d'expériences pour surfaces de réponse* ed. Paris: Dunod, 1999 pages.

- [351] J.-P. Gauchi, Plans d'expériences optimaux pour modèles linéaires. *Plans d'expériences - Application à l'entreprise* / ed. par J.-J. Droesbeke, J. Fine, G. Saporta. 1 ed. Paris: Technip, 1997, 1, p. 509.
- [352] UmetricsAB, *MODDE 6 User Guide and Tutorial* ed. Umeå, 2001 pages.
- [353] S. Wold, M. Sjostrom, Chemometrics, present and future success, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44, (1998), p. 3-14.
- [354] M. Tenenhaus, *La Régression PLS*, 1st ed. Paris: Technip, 1998, 254 pages.
- [355] H. Martens, M. Hoy, F. Westad, D. Folkenberg, M. Martens, Analysis of designed experiments by stabilised PLS Regression and jack-knifing, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, (2001), p. 151-170.
- [356] S. Wold, J. Trygg, A. Berglund, H. Antti, Some recent developments in PLS modeling, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, (2001), p. 131-150.
- [357] S. Wold, M. Sjostrom, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58, (2001), p. 109-130.
- [358] L. Eriksson, E. Johansson, C. Wikstrom, Mixture design--design generation, PLS analysis, and model usage, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 43, (1998), p. 1-24.
- [359] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, An Introduction to Experimental Design. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A* / ed. par D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1997, p. 643-658.
- [360] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. pH Scale in Methanol-Water and the pK and pH Values of Buffers, *Analytical Chemistry*, 68, (1996), p. 3651-3657.
- [361] I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Rosés, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 4. Mobile-Phase pH Measurement in Methanol/Water, *Analytical Chemistry*, 72, (2000), p. 1802-1809.
- [362] M. Roses, E. Bosch, Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds, *Journal of Chromatography A*, 982, (2002), p. 1-30.
- [363] M. Roses, Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1037, (2004), p. 283-298.
- [364] D.V. McCalley, Selection of suitable stationary phases and optimum conditions for their application in the separation of basic compounds by reversed-phase HPLC, *Journal of Separation Science*, 26, (2003), p. 187-200.
- [365] A. Vailaya, C. Horváth, Solvophobic Theory and Normalized Free Energies of Nonpolar Substances in Reversed Phase Chromatography, *Journal of Physical Chemistry B*, 101, (1997), p. 5875-5888.
- [366] A. Vailaya, C. Horvath, Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption?, *Journal of Chromatography A*, 829, (1998), p. 1-27.
- [367] R. LoBrutto, A. Jones, Y.V. Kazakevich, Effect of counter-anion concentration on retention in high-performance liquid chromatography of protonated basic analytes, *Journal of Chromatography A*, 913, (2001), p. 189-196.
- [368] A. Jones, R. LoBrutto, Y. Kazakevich, Effect of the counter-anion type and concentration on the liquid chromatography retention of [beta]-blockers, *Journal of Chromatography A*, 964, (2002), p. 179-187.
- [369] F. Gritti, G. Guiochon, Role of the buffer in retention and adsorption mechanism of ionic species in reversed-phase liquid chromatography: I. Analytical and overloaded band profiles on Kromasil-C18, *Journal of Chromatography A*, 1038, (2004), p. 53-66.
- [370] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of the pH, the concentration and the nature of the buffer on the adsorption mechanism of an ionic compound in reversed-phase liquid chromatography: II. Analytical and overloaded band profiles on Symmetry-C18 and Xterra-C18, *Journal of Chromatography A*, 1041, (2004), p. 63-75.

- [371] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behavior of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: I. XTerra-C18, *Journal of Chromatography*, 1033, (2004), p. 43-55.
- [372] F. Gritti, G. Guiochon, Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behavior of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: II. Symmetry-C18, *Journal of Chromatography*, 1033, (2004), p. 57-69.
- [373] R.R.P. Ranatunga, P.W. Carr, A study of the enthalpy and entropy contributions of the stationary phase in reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 72, (2000), p. 5679-5692.
- [374] A. Bolck, A.K. Smilde, C.H.P. Bruins, Monitoring aged reversed-phase high performance liquid chromatography columns, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 46, (1999), p. 1-12.
- [375] A. Bolck, A.K. Smilde, K.A.A. Duineveld, P.M.J. Coenegracht, Multivariate quality assessment of aged RP-HPLC columns, *Journal of Chemometrics*, 10, (1996), p. 351-370.
- [376] A.B. Scholten, J.W.d. Haan, H.A. Claessens, L.J.M.v.d. Ven, C.A. Cramers, ²⁹Si NMR Model Dissolution Study of the Degradation of Reversed Phases for High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66, (1994), p. 4085-4092.
- [377] L.C. Sander, S.A. Wise, Influence of Stationary Phase Chemistry on Shape Recognition in Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 67, (1995), p. 3284-3292.
- [378] S.K. Poole, S. Patel, K. Dehring, H. Workman, C.F. Poole, Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis*1, *Journal of Chromatography A*, 1037, (2004), p. 445-454.
- [379] S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M.R. Euerby, Determination of ionisation constants of organic bases in aqueous methanol solutions using capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1026, (2004), p. 251-259.
- [380] S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M.R. Euerby, Determination of pKa values of organic bases in aqueous acetonitrile solutions using capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1004, (2003), p. 71-79.
- [381] G.W. Tindall, Mobile-Phase Buffers, Part II — Buffer Selection and Capacity, *LCGC North America*, 20, (2002), p. 1114-1118.
- [382] G.W. Tindall, Mobile-Phase Buffers, Part I — The Interpretation of pH in Partially Aqueous Mobile Phases, *LCGC North America*, 20, (2002), p. 1028-1032.
- [383] G.W. Tindall, Mobile-Phase Buffers, Part III — Preparation of Buffers, *LCGC North America*, 21, (2003), p. 28-32.
- [384] G.W. Tindall, R.L. Perry, Explanation for the enhanced dissolution of silica column packing in high pH phosphate and carbonate buffers, *Journal of Chromatography A*, 988, (2003), p. 309-312.
- [385] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, pH measurements in acetonitrile--water mixtures by use of a glass electrode, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10, (1992), p. 1047-1051.
- [386] J. Barbosa, J.L. Beltran, V. Sanz-Nebot, Ionization constants of pH reference materials in acetonitrile--water mixtures up to 70% (w/w), *Analytica Chimica Acta*, 288, (1994), p. 271-278.
- [387] E. Jimenez-Lozano, I. Marques, D. Barron, J.L. Beltran, J. Barbosa, Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector, *Analytica Chimica Acta*, 464, (2002), p. 37-45.
- [388] S.K. Poole, C.F. Poole, A Method for Estimating the Solvent Strength Parameter in Liquid-Solid Chromatography, *Chromatographia*, 53, (2001), p. S162-S166.
- [389] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 5. pH Scales and the Retention of Acids and Bases with Acetonitrile-Water Mobile Phases, *Analytical Chemistry*, 72, (2000), p. 5193-5200.
- [390] J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Claessens, Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings, *Journal of Chromatography A*, 797, (1998), p. 111-120.

Listes des abréviations

CPL : Chromatographie en Phase Liquide
MeOH : Méthanol
MeCN : Acétonitrile
 \bar{D} : diamètre de pore (nm)
 d_p : diamètre des particules (μm)
 S_p : surface spécifique (m^2g^{-1})
 v_p : volume de pore ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)
%C : taux de carbone
MEB : microscope électronique à balayage
 ΔS° : Variation d'entropie de distribution du soluté entre deux phases
 ΔH° : Variation d'enthalpie de distribution du soluté entre deux phases
SAM : « Self Assembled Monolayer »
QSRR : « quantitative structure –retention relationship »
 k : facteur de rétention
 A_s : Asymétrie du pic
 A_s' : Asymétrie modifiée de pic
 h : hauteur de plateau réduite
 R_s : Résolution
 \mathcal{A} : aire du pic
 \mathcal{H} : hauteur de pic
T : température (K)
 D_s : coefficient de diffusion de la phase stationnaire
 f : rapport isoéluant entre le méthanol et l'acétonitrile
 λ : longueur d'onde (nm)
 φ_{MeOH} : Fraction massique de méthanol
 φ_{MeCN} : Fraction massique d'acétonitrile
 α_{CH_2} : Sélectivité méthylène
 SS : Sélectivité de forme (« Shape selectivity »)
%S : Teneur massique en solvant organique
Conc. : Concentration du tampon
 $\hat{\sigma}$: écart-type estimé
 \bar{x} : moyenne de x
Test F : test de Fisher-Snédecor
Proba : Probabilité
 r : coefficient de corrélation linéaire de Pearson
 CV : coefficient de variation
 CI : coefficient d'information
ANOVA : « ANalyse Of VAriance »/Analyse de la Variance
AHC : Analyse Hiérarchique en Clusters
ACP : Analyse en Composantes Principales
CP : Composante Principale
PLS : « Partial Least Square »

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Valeurs typiques de silices mésoporeuses.	9
Tableau II-1 : Classification des phases stationnaires selon l'USP [152].	30
Tableau III-1 : Coefficients de corrélation (r) entre des descripteurs estimant des mêmes propriétés chromatographiques ; \bar{A} représente l'aire du pic et h sa hauteur [262].	46
Tableau IV-1 : Valeurs des pentes a et a/ϕ_{MeOH} , et de l'ordonnée à l'origine $\log k_{eau}$ pour chacun des composés à niveaux ϕ_{MeOH} fixés.	61
Tableau IV-2 : Valeurs du rapport isoéluant f en fonction de la fraction massique en méthanol ϕ_{MeOH} .	61
Tableau IV-3 : Caractéristiques des colonnes étudiées ; \bar{D} , d_p , %C et S_p désignent respectivement le diamètre moyen des pores (nm), le diamètre des particules (μm), le taux de carbone et la surface spécifique ($m^2 g^{-1}$).	64
Tableau IV-4 : Estimation des différentes sources de variation par ANOVA pour les facteurs de rétention des composés neutres.	66
Tableau IV-5 : Estimation des différentes sources de variation par ANOVA pour les asymétries de pic des composés neutres.	71
Tableau V-1 : Niveaux de teneur en solvant pour le méthanol et l'acétonitrile.	79
Tableau V-2 : Conditions d'injection.	79
Tableau V-3 : Caractéristiques des colonnes testées.	81
Tableau V-4 : Conditions chromatographiques sélectionnées	94
Tableau VI-1 : Estimation du coefficient de variation sur les sélectivités engendré par l'interlot de phases stationnaires de générations différentes (d'après [243]).	98
Tableau VI-2 : Coefficients de variation des intra et interlots sur les facteurs de rétention (d'après [103, 321-326]).	98
Tableau VI-3 : Coefficients de variation des intra et interlots sur les asymétries de pic (d'après [103, 321-326]).	98
Tableau VI-4 : Tableau des caractéristiques des phases stationnaires testées.	100
Tableau VI-5 : Niveaux d'exploitation.	101
Tableau VI-6 : Estimation de la dispersion et des coefficients de variation par ANOVA des facteurs de rétention de chacun des solutés sur la phase SymmetryShield.	102
Tableau VI-7 : Coefficients de variations interlot et résiduelle (%) des classes de solutés sur les facteurs de rétention pour chaque modificateur organique.	102
Tableau VI-8 : Coefficients de variation interlot et résiduelle (%) des classes de solutés et estimations globales pour les trois paramètres sur la phase SymmetryShield RP18.	103
Tableau VI-9 : Coefficients de variation interlot et résiduelle (%) des classes de solutés et estimations globales pour les trois paramètres sur la phase XTerra RP18.	104
Tableau VI-10 : Coefficients de variation interlot et résiduelle (%) au niveau 4 de regroupement pour les trois paramètres chromatographiques sur les deux phases stationnaires étudiées.	104
Tableau VI-11 : Coefficients de variation obtenus pour trois générations différentes de phase stationnaire ; pour la phase Symmetry C18, les résultats sont adaptés de [322].	105
Tableau VII-1 : Variations appliquées aux paramètres chromatographiques dans l'étude de robustesse, correspondant aux niveaux bas (-1), central (0) et haut (+1).	110
Tableau VII-2 : Matrice des essais.	111
Tableau VII-3 : Indice d'information des paramètres chromatographiques de chaque soluté ; les valeurs en italique indiquent des indices inférieurs à la valeur limite de rejet fixée à 0,5.	116
Tableau VII-4 : Estimations des coefficients normalisés pour la modélisation des facteurs de rétention des composés neutres à haut niveau de solvant ; seuls les coefficients significatifs sont figurés.	117
Tableau VII-5 : Estimations des coefficients normalisés pour la modélisation des facteurs de rétention des composés basiques à haut niveau de solvant ; seuls les coefficients significatifs sont figurés.	117
Tableau VII-6 : Estimations des coefficients normalisés pour la modélisation des facteurs de rétention au niveau bas de solvant ; seuls les coefficients significatifs sont figurés.	119
Tableau VII-7 : CV (%) engendrés sur les facteurs de rétention par la variabilité interlot et la répétabilité du test.	123
Tableau VII-8 : Limites de tolérance des conditions nominales.	126
Tableau VII-9 : Comparaison des coefficients de variation des facteurs de rétention pour la phase SymmetryShield en méthanol et en acétonitrile.	127
Tableau VII-10 : Comparaison des coefficients de variation des facteurs de rétention pour la phase XTerra en méthanol et en acétonitrile.	128
Tableau VIII-1 : Caractéristiques disponibles des colonnes testées.	132
Tableau VIII-2 : Moyennes et coefficients d'information des facteurs de rétention des solutés sur les 42 colonnes testées.	133

Tableau VIII-3 : Signification des composantes principales et taux d'information interprété, à haut et bas niveaux de solvant. _____	164
Tableau IX-1 : Matrice des corrélations de tous les descripteurs potentiels pour toutes les phases stationnaires testées. _____	167
Tableau IX-2 : Matrice des corrélations obtenue pour les seules phases alkyles (C). _____	168
Tableau IX-3 : Matrice des corrélations obtenue pour les phases à groupement polaire intercalé (P). _____	168
Tableau IX-4 : Matrice des corrélations obtenue pour les phases Aqua (A). _____	168
Tableau IX-5 : Sélectivités méthylène déterminés lors du test en conditions étendues. _____	170
Tableau IX-6 : Descripteurs sélectionnés pour la caractérisation des phases stationnaires _____	172
Tableau IX-7 : Valeurs de la moyenne et l'écart-type du facteur de rétention pour chaque soluté. _____	172
Tableau IX-8 : Etendue des valeurs observées pour chacun des descripteurs. _____	173

Liste des figures

Figure I-1 : Structure de la silice à différentes échelles.	6
Figure I-2 : Différents types de groupements en surface de la silice (d'après [30, 31, 33]) ; a) pont siloxane, b) silanol isolé, c) silanols vicinaux, d) silanols géminaux.	7
Figure I-3 : Spectre RMN ^{29}Si CP MAS (^1H - ^{29}Si cross-polarization magic angle-spinning) de la silice vierge Rx-Sil [35].	7
Figure I-4 : Noyau local typique d'une silice amorphe, dont la structure est dérivée de celle de la β -cristobalite ; il comporte 12 cycles à 6, dont un est représenté en gris foncé (d'après [38]).	8
Figure I-5 : Représentation tridimensionnelle du Vycor, verre de silice poreuse ; le réseau poreux est représenté en gris (échelle de l'arrête du cube : 100 nm) [47].	9
Figure I-6 : Silice de forme irrégulière [54]	10
Figure I-7 : Exemple de silice de forme sphérique (diamètre de 1,7 μm) [53].	11
Figure I-8 : Exemple de synthèse de particules hybrides	12
Figure I-9 : Exemple de particule de silice possédant une distribution bimodale de pores ; images MEB de a) l'agglomérat et b) des particules primaires tandis qu'en c) est représentée l'image MEB haute résolution d'une particule sphérique primaire.	12
Figure I-10 : Images MEB a) de la structure typique poreuse d'un monolithe de silice, b) d'un macropore et c) de la structure mésoporeuse du squelette de silice [73].	13
Figure I-11 : Principe du greffage de la silice.	14
Figure I-12 : Structure des phases greffées conventionnelles.	14
Figure I-13 : Exemples de phases greffées a) phényle, b) fluorées et c) cyano.	15
Figure I-14 : Greffage monomérique obtenu, en absence d'eau, par un silane monofonctionnel en A, difonctionnel en B et C, trifonctionnel en D et E.	15
Figure I-15 : Structure pour un gel de silice modifié octadécyle pour $T=350\text{K}$ [89].	16
Figure I-16 : Modélisation de surface de silice modifiée avec une greffon octadécylsilane en conformation all-trans (à gauche) et à énergie minimale (à droite), d'après [90].	16
Figure I-17 : Mécanisme réactionnel conduisant à une polymérisation verticale.	17
Figure I-18 : Greffage polymérique obtenu par un silane trifonctionnel en présence d'eau.	17
Figure I-19 : Greffage issue d'une polymérisation horizontale orientée.	18
Figure I-20 : Illustration schématique de l'organisation des chaînes alkyle sur la surface de silice en fonction du type de polymérisation employé [93].	18
Figure I-21 : Greffe oligomérique.	18
Figure I-22 : Exaltation de l'acidité d'un silanol par un métal.	19
Figure I-23 : Réaction de « end-capping ».	21
Figure I-24 : Synthèse de particules encapsulées.	23
Figure I-25 : Exemples de phases stationnaires munies d'une base de greffon encombrante (par exemple Zorbax StableBond).	24
Figure I-26 : Phase « bidentate » ; A : structure générale avec un groupement R méthyle, n-butyle, n-octyle ou n-octadécyle et $n=2$ ou 3 ; B : structure de la phase Zorbax Extend C18 [119].	24
Figure I-27 : Greffage de chaînes de type alkylcarbamate.	25
Figure I-28 : Exemples de groupements polaires intercalés.	26
Figure I-29 : Association de silanols.	26
Figure I-30 : Fonctions proposées pour un « end-capping » polaire.	27
Figure II-1 : Etude de l'effet de la température sur une phase stationnaire en C30 via ses spectres RMN « HR-MAS » et ses chromatogrammes relatifs à une séparation d'isomères du β -carotène [34].	31
Figure II-2 : Composés des tests de McCalley complétés par ceux de Stella et al. (reproduit d'après [238]).	35
Figure II-3 : Structures des composés Organon (reproduit d'après [239]).	35
Figure II-4 : Représentation schématique du « slot model » pour la rétention des HAP.	36
Figure II-5 : Structures et modélisations moléculaires du benzo[a]pyrène en (a), du dibenzo[g,p]chrysène en (b) et phénanthro[3,4-c]phénanthrène en (c) [249] et deux chromatogrammes du SRM 869a, obtenus sur deux phases stationnaires différentes [94].	37
Figure II-6 : Structures 2D et 3D de l'o-terphényle et du triphénylène (d'après [84]).	37
Figure II-7 : Formules développées du 2,2'-bipyridyl (chélatant) et du 4,4'-bipyridyl.	39
Figure II-8 : Influence du tampon sur le test d'impuretés métalliques ; (A) milieu non tamponné, (B) milieu tamponné à 1 mM de phosphate pH=7 [101].	39
Figure II-9 : Ordre de sélectivité de forme déterminée par la sélectivité $\alpha_{\text{TN/BaP}}$.	40
Figure II-10 : Classification hydrophobie/activité silanol issue du catalogue Waters.	40
Figure II-11 : Classification bidimensionnelle permettant de discriminer les phases à groupement polaire intercalé [130] ; BuPa signifie butylparabène, DPP, dipropylphatlate et EB, éthylbenzène.	40
Figure II-12 : Classification adaptée de [258] et regroupements effectués (reproduit du catalogue Interchim).	41

Figure III-1 : Diagrammes de dispersion de variables aléatoires y_1 et y_2 avec divers coefficients de corrélation : (a) $r=0,75$; (b) $r=-0,32$; (c) $r=-0,95$; (d) $r=0$; (e) $r=0$ et (f) $r=1$.	45
Figure III-2 : Droite de régression du facteur de rétention de l'éthylbenzène (Engelhardt) en fonction de celui du pentylbenzène (Tanaka) pour des phases purement alkyle [192].	47
Figure III-3 : Principe de l'ACP normée ; (a) calcul du barycentre (cercle évidé) du nuage de points, (b) sur lequel le nouveau repère est centré ; (c) la première composante principale PC1, qui passe par l'origine, est déterminée de façon à décrire le plus de variation possible [266].	48
Figure III-4 : Projections sur le plan défini par les deux premières composantes en (a) de 47 objets – ici des phases stationnaires : « score plot » et (b) des 7 variables initiales : « loading plot » [278].	49
Figure III-5 : Regroupements effectués sur des ACP, d'après [132] et [235].	50
Figure III-6 : Exemple de regroupements sur un « Score plot » [234].	50
Figure III-7 : Dendrogramme de l'analyse en cluster de 34 phases stationnaires effectuée sur 4 descripteurs d'intérêt (adaptée de [244]).	52
Figure IV-1 : Détermination du rapport isoéluant f entre l'acétonitrile et le méthanol.	62
Figure IV-2 : Facteurs de rétention (moyennes des trois injections) pour le butylbenzène, le pentylbenzène, l'o-terphényle et le triphénylène pour chaque colonne testée dans l'acétonitrile () et le méthanol () en tant que modificateur organique.	65
Figure IV-3 : Chromatogrammes du pentylbenzène et du triphénylène en éluants méthanol (MeOH) et acétonitrile (MeCN) sur une colonne Symmetry C8 et une colonne J'Sphere ODS H80.	66
Figure IV-4 : Moyennes des sélectivités méthylène (haut) et de forme (bas) pour chaque colonne avec pour modificateur organique l'acétonitrile () et le méthanol ()	67
Figure IV-5 : Chromatogrammes du mélange constitué des composés de Tanaka (1=butylbenzène ; 2=o-terphényle ; 3=pentylbenzène et 4=triphénylène) sur une colonne Eclipse XDB C8 et une colonne SymmetryShield RP18 avec phases mobiles à base de méthanol ou d'acétonitrile.	69
Figure IV-6 : Moyennes des asymétries de pic du butylbenzène, du pentylbenzène, de l'o-terphényle et du triphénylène sur chaque colonne étudiée avec de l'acétonitrile () et du méthanol () en tant que modificateur organique.	70
Figure IV-7 : Moyennes des facteurs de rétention pour l'amiodarone et la clofazimine pour chacune des colonnes étudiées avec pour modificateur organique l'acétonitrile () et le méthanol () .	72
Figure IV-8 : Chromatogrammes de la clofazimine et de l'amiodarone sur des colonnes Kromasil C8 et SymmetryShield RP18 avec le méthanol et l'acétonitrile pour modificateur organique.	73
Figure IV-9 : Moyennes des asymétries de pic pour l'amiodarone et la clofazimine pour chacune des colonnes étudiées avec pour modificateur organique l'acétonitrile () et le méthanol ()	74
Figure V-1 : Caractéristiques des composés du test.	78
Figure V-2 : Procédure de traitement des données	81
Figure V-3 : « Score plot » CP1-CP2 sur les couples colonne/solvant issus de tous les facteurs de rétention ; la forme en V et la bissectrice correspondante sont schématisées respectivement en traits pleins et pointillés.	83
Figure V-4 : Dendrogramme des similitudes entre les couples colonne/solvant obtenus par AHC à partir du « score plot » CP1-CP2 calculés d'après les facteurs de rétention.	83
Figure V-5 : Interprétation du « score plot » CP1-CP2 des couples colonne/solvant obtenus avec tous les facteurs de rétention.	84
Figure V-6 : « Loading plot » CP1-CP2 ; le nom des variables d'origine n'est pas figuré pour des raisons de lisibilité.	85
Figure V-7 : « Score plot » PC1-PC2 interprété des couples colonne/solvant construit sur toutes les asymétries de pic ; l'AHC a été réalisée dans l'espace défini par les deux premières composantes principales calculées sur les asymétries de pic.	86
Figure V-8 : « Score plots » CP1-CP2 interprétés des couples colonne/solvant construits à partir des facteurs de rétention pour chaque niveau de pH ; (a) pH=3, les flèches indiquent les mauvais appariements entre les couples colonne/solvant et les groupes auxquels ils appartiennent ; (b) pH=5 ; (c) pH=7.	89
Figure V-9 : Variations du facteur de rétention des composés basiques à haute teneur en solvant en fonction du pH de la phase aqueuse.	90
Figure V-10 : « Score plots » CP1-CP2 interprétés des couples colonne/solvant construits à partir des asymétries de pic pour chaque niveau de pH ; (a) pH=5 ; (b) pH=7 ; chaque flèche indique une mauvaise association entre colonnes greffées alkylamide et les colonnes greffées alkylcarbamate.	91
Figure V-11 : « Score plot » CP1-CP2 interprété des couples colonne/solvant construits à partir des facteurs de rétention au niveaux de teneur en solvant A et D.	92
Figure V-12 : « Score plot » CP1-CP2 interprété des couples colonne/solvant construits à partir des asymétries de pic au niveaux de teneur en solvant A et D.	93
Figure VI-1 : Chromatogrammes obtenus en mélange eau/méthanol 50 : 50 (m/m) pour deux colonnes Nucleosil C18 neuves issues de lots différents.	97
Figure VI-2 : Chromatogrammes obtenus sur trois lots de phase SymmetryShield RP18 et XTerra RP18 à haute teneur en acétonitrile.	106
Figure VI-3 : Plan mixte à 4 facteurs	107
Figure VII-1 : Représentation du plan D-optimal à 4 facteurs sélectionnés.	111

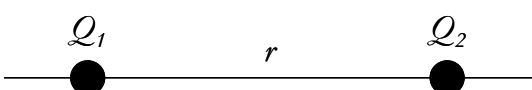
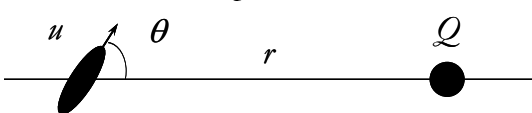
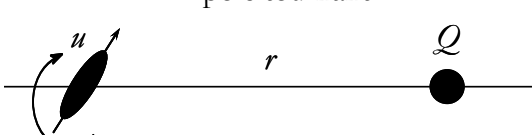
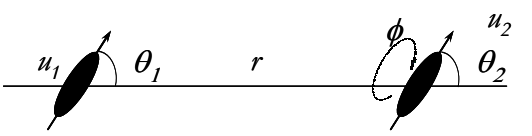
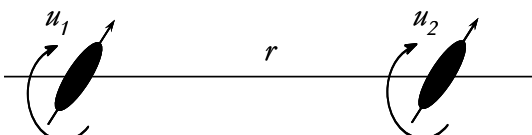
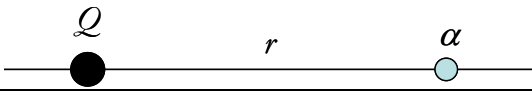
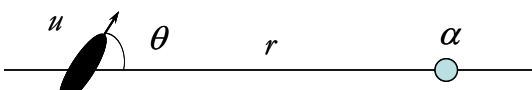
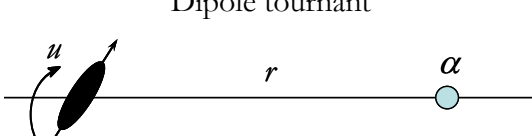
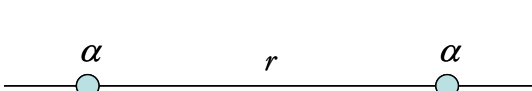
Figure VII-2 : Schématisation des différents types d'erreur a) erreurs purement aléatoire, b) présence d'un biais ; $\hat{\sigma}_r$ correspond à la variabilité résiduelle, $\hat{\sigma}_{\text{répétabilité}}$, la variabilité de répétabilité du test, $\hat{\sigma}_y$ représente l'écart type lié de régression.	114
Figure VII-3 : Modélisation du facteur de rétention de composés basiques en fonction du pH apparent de la phase mobile ; pK_A fixés à 7,0 (trait plein) et à 8,1 (croix), la valeur de pH apparent (fixée pour l'exemple à 7,2) est figurée sous la forme de pointillés.	118
Figure VII-4 : Graphique du coefficient normalisé de la teneur en solvant en fonction de la masse moléculaire du solutés en acétonitrile ; ◆ composés hydrophiles ; ● composés basiques hydrophobes ; ■ composés neutres hydrophobes.	121
Figure VII-5 : Représentation graphique de la répétabilité des facteurs de rétention des solutés les plus hydrophiles du test avec pour modificateur organique a) l'acétonitrile, b) le méthanol.	123
Figure VII-6 : Lignes de niveau correspondant aux valeurs limites des facteurs de rétention des analytes en fonction du pH et du niveau de teneur en acétonitrile : (a) haute teneur, (b) basse teneur ; (1) clofazimine, (2) amiodarone, (3) butylbenzène (4) pentylbenzène, (5) o-terphényle, (6) triphénylène, (7) strychnine, (8) d-tubocurarine, (9) atropine, (10) ampicilline, (11) cyanocobalamine, (12) vancomycine, (13) caféine, (14) benzylamine ; la mire situe les conditions nominales dans le domaine de robustesse.	124
Figure VII-7 : Domaines robustes (régions hachurées) en acétonitrile (à gauche) et en méthanol (à droite) en fonction du pH, de la température et de la concentration du tampon ; la mire indique l'emplacement du point au centre.	125
Figure VIII-1 : « Score plot » CP1-CP2 obtenus sur les facteurs de rétention à haut niveau de solvant.	135
Figure VIII-2 : « Loading plots » CP1-CP2 et CP2-CP3 des facteurs de rétention obtenus à haut niveau de solvant.	136
Figure VIII-3 : « Score plots » interprétés des plans CP1-CP2 (en haut) et CP1-CP3 (en bas).	138
Figure VIII-4 : Chromatogrammes des neutres de Tanaka obtenus sur trois phases stationnaires C18 avec l'acétonitrile pour modificateur organique ; ordre de rétention : butylbenzène, o-terphényle, triphénylène et pentylbenzène.	139
Figure VIII-5 : Chromatogrammes obtenus sur 3 phases stationnaires différant selon CP2 avec l'acétonitrile pour modificateur organique ; mélange constitué de digitoxine (1), de clofazimine (2), de neutres de Tanaka (3) et d'amiodarone (4).	140
Figure VIII-6 : Chromatogrammes obtenus sur deux phases stationnaires de projection sur CP2 similaire mais de projection sur CP1 croissante avec l'acétonitrile pour modificateur organique ; pour l'identification des composés, cf. Figure VIII-5.	141
Figure VIII-7 : « Loading plots » du plan CP1-CP2 à partir d'un jeu de 7 variables d'origine (en haut) et après élimination de la vancomycine (en bas).	142
Figure VIII-8 : « Score plot » de CP1-CP2 partiellement interprété.	143
Figure VIII-9 : Analyse en cluster effectuée sur les coordonnées des couples colonne/solvant.	144
Figure VIII-10 : ACP interprétées par AHC à bas et haut niveaux de teneur en modificateur organique ; chaque couleur correspond à un groupe (10 au total) identifié à basse teneur en solvant.	145
Figure VIII-11 : « Score plot » de CP1-CP2 suivi d'une AHC (10 groupes).	146
Figure VIII-12 : Chromatogrammes obtenus sur 2 phases stationnaires différant selon CP2, A18_3 est testée dans le méthanol et C18_5 dans l'acétonitrile ; ordre d'élution : ampicilline, cyanocobalamine, atropine et d-tubocurarine	147
Figure VIII-13 : Analyse en clusters effectuée sur les coordonnées des couples colonne/solvant.	148
Figure VIII-14 : « Score plots » de CP1-CP2 interprétés par AHC à haut et bas niveaux de solvant.	149
Figure VIII-15 : Représentation tridimensionnelle de la classification interprétée à haut niveau de solvant.	150
Figure VIII-16 : ACP illustrée pour les phases purement alkyles à haut niveau de solvant.	152
Figure VIII-17 : ACP illustrée pour les phases purement alkyles à bas niveau de solvant.	153
Figure VIII-18 : ACP illustrée pour les phases à groupement polaire intercalé à haute et basse teneurs en solvant.	155
Figure VIII-19 : Chromatogrammes obtenus sur les phases Polaris (a) Ether (P18_5), (b) C18-A (P18_3) et (c) Amide C18 (P18_4) avec le méthanol pour modificateur organique ; (1), butylbenzène, (2), o-terphényle, (3), pentylbenzène, (4) triphénylène, (5) benzylamine, (6), caféine et (7) strychnine.	156
Figure VIII-20 : Agrandissements des plans CP1-CP2 aux deux niveaux de teneur en modificateur organique.	157
Figure VIII-21 : ACP illustrée pour les phases Aqua et celles dépourvues de « end-capping » à haute et basse teneurs en solvant.	158
Figure VIII-22 : Agrandissements des plans CP1-CP2 aux deux niveaux de teneur en modificateur organique.	162
Figure VIII-23 : Chromatogrammes obtenus sur des colonnes Symmetry C18 a) neuve et b) usagée avec le méthanol pour modificateur organique ; composés injectés : digitoxine (1), clofazimine (2), butylbenzène (3), o-terphényle (4), pentylbenzène (5), triphénylène (6), amiodarone (7), benzylamine (8), caféine (9) et strychnine (10).	163

Figure IX-1 : Diagramme de corrélation entre les 5 composantes principales sélectionnées, les sélectivités méthylène (CH ₂) et de forme (SS), le taux de carbone (%C) et l'asymétrie de pic de l'amiodarone.	166
Figure IX-2 : Valeurs de la sélectivité méthylène déterminée à partir du couple pentylbenzène/butylbenzène en fonction des sous-familles de phases alkyles.	171
Figure IX-3 : Cartes d'identité des phases SymmetryShield RP18 (symboles évidés) et XTerra RP18 (symboles pleins).	173
Figure IX-4 : Superposition des cartes d'identité de la SymmetryShield RP18 P18_6 (symboles évidés) et de la XTerra RP18 P18_9 (symboles pleins).	174
Figure IX-5 : Cartes d'identité des phases Symmetry C18 neuve C18_4 (symboles pleins) et usagée C18_5 (symboles évidés).	175
Figure IX-6 : Cartes d'identité des phases SymmetryShield RP18 P18_6 (symboles pleins) et Symmetry C18_4 (symboles évidés).	176
Figure IX-7 : Cartes d'identité des phases SymmetryShield RP18 P18_6 (groupement carbamate), Polaris Amide C18 P18_4 (groupement amide), Polaris C18-Ether P18_5 (Ether) et Polaris C18-A P18_3 (groupement de nature inconnue).	177
Figure IX-8 : Cartes d'identité des phases Uptisphere ODB C18_8 (symboles pleins) et Uptisphere NEC C18_9 (symboles évidés).	178
Figure IX-9 : Cartes d'identité des phases Nucleodur Gravity (symboles pleins) et Nucleodur EC (symboles évidés).	179
Figure IX-10 : Cartes d'identité des phases Symmetry C18 C18_4 (symboles pleins) et Aquasil C18 A18_1 (symboles évidés).	180
Figure IX-11 : Cartes d'identité des phases de type Aqua.	181
Figure IX-12 : Cartes d'identité des phases CapcellPak C8 E8_1 (symboles pleins) et SymmetryShield RP8 P8_3 (symboles évidés).	182
Figure IX-13 : Variation de l'asymétrie du pic de l'amiodarone en fonction de la génération de « end-capping » ; NEC : absence de « end-capping », ODB et EC : « end-cappings » classiques, EC2 : dernière génération de « end-capping ».	183

Annexes

Annexe 1 Rappel sur les interactions

Les forces intermoléculaires peuvent se classer en deux grandes catégories : les forces attractives, de portées variables mais toujours supérieures à celles des forces répulsives. Dans le cadre de notre étude ne sont tenus compte que des forces attractives, en raison de leur portée suffisante. En effet, les interactions répulsives, typiquement en $1/r^{12}$, sont de nature quantique et ne s'avèrent pas affectées par des variations du milieu, du fait de leur portée trop courte. Le tableau suivant présente les différents types d'interactions attractives.

Type d'interaction		Energie d'interaction $w(r)$
Ion-Ion		$Q_1 Q_2 / 4\pi\epsilon_0 r$ Energie coulombienne
Ion-Dipôle	Dipôle fixe	
		$-Qu \cos \theta / 4\pi\epsilon_0 r^2$
	Dipôle tournant	
		$-Q^2 u^2 / 6(4\pi\epsilon_0)^2 kTr^4$
Dipôle-Dipôle	Dipôle fixe - Dipôle tournant	
		$-u_1 u_2 \left[\frac{2 \cos \theta_1 \cos \theta_2}{- \sin \theta_1 \sin \theta_2 \cos \phi} \right] / 4\pi\epsilon_0 r^3$
	Dipôles tournants	
		$-u_1^2 u_2^2 / 3(4\pi\epsilon_0)^2 kTr^6$ Keesom (Orientation)
Ion- Dipôle induit		$-Q^2 \alpha / 2(4\pi\epsilon_0)^2 r^4$
Dipôle-Dipôle induit	Dipôle fixe	
		$-u^2 \alpha (1 + 3 \cos^2 \theta) / 2(4\pi\epsilon_0)^2 r^3$
	Dipôle tournant	
		$-u^2 \alpha / (4\pi\epsilon_0)^2 r^6$ Debye (Induction)
Dipôle induit-Dipôle induit		$-\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6}$ Energie de dispersion de London
Liaison H		Energie compliquée à modéliser, de courte portée et approximativement proportionnelle à $-1/r^2$

Les gammes d'intensité de ces forces, variant suivant les milieux considérés, sont résumées dans le tableau qui suit.

<i>Type d'interaction</i>	<i>Energie typique (kJ/mol)</i>
Forces covalentes	200-800
Force coulombienne	250
Ion-dipôle permanent	10-100
Liaison H	10-40
Dipôle fixe-dipôle tournant	2
Dipôle induit-dipôle induit	2
Dipôle tournant-dipôle tournant	0,6

En rapportant ces énergies typiques à l'énergie de thermalisation, les énergies de dispersion, d'induction et d'orientation, regroupées sous le terme d'énergies de Van der Waals, sont inférieures à kT ($T=300K$) : ce sont des interactions faibles. Ainsi, les interactions dipôle-dipôle ne sont pas capables d'entraîner l'alignement des dipôles.

A Structure des mélanges hydro-organiques

Si le méthanol et l'acétonitrile sont des solvants miscibles en toute proportion avec l'eau, leur solubilisation ne s'effectue néanmoins pas de manière homogène en substituant au hasard une molécule d'eau par une molécule de solvant organique. En effet, il faut tenir compte de phénomènes d'association de ces molécules [310], en raison du caractère amphiphile du méthanol et de l'acétonitrile. La formation de complexes ou de clusters peut s'interpréter en terme d'interactions « like dissolve like ». En première approximation, le mélange peut d'abord être considéré comme ternaire, comme l'illustre la figure suivante [315].

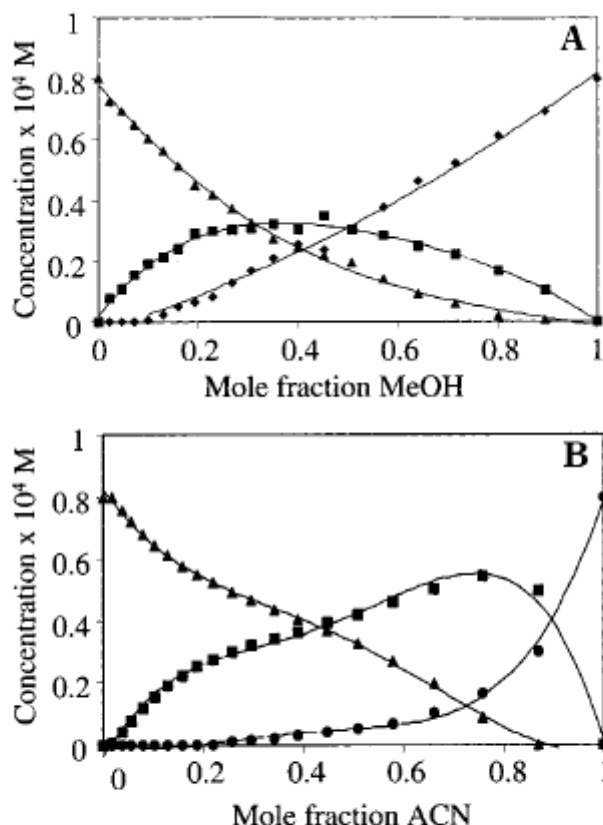


Figure 7. Estimated concentration profiles obtained by MCR-ALS method for DCMPVP in methanol–water mixtures (A) and acetonitrile–water mixtures (B). Methanol (◆), acetonitrile (●), methanol–water complex and acetonitrile–water complex (■), and water (▲). Lines joining the data points have been smoothed.

Le mélange hydro-organique est donc constitué d'une phase purement aqueuse, d'une phase purement organique et d'une phase constituée de complexes, dont la composition peut varier suivant les proportions relatives en modificateur organique (1 :1 jusqu'à 1 :5 [311-314]).

L'évolution de la concentration en complexes va avoir un impact sur la rétention, du fait de son influence sur la solvation des chaînes alkyle.

En sus, si la séparation à effectuer met en jeu des composés ionisables, l'ajout de modificateur organique ne va pas être sans conséquence.

B Effet du modificateur organique sur les solutés et les tampons

Si le méthanol et l'acétonitrile sont deux solvants qui possèdent des permittivité relatives similaires (respectivement 33 et 36,6), elles s'avèrent néanmoins moins élevées que celle de l'eau ($\epsilon=80$). En outre, ils ne sont néanmoins pas équivalents : le méthanol est un solvant protique, rôle que ne peut revendiquer l'acétonitrile. De fait, ces différences par rapport à l'eau vont influencer les constantes de dissociation des composés ionisables, en fonction de la nature de l'acide⁷⁷. Considérons les réactions de dissociation : $AH \rightleftharpoons A^- + H^+$ et $BH^+ \rightleftharpoons \bar{B} + H^+$. Pour un acide de type AH , la dissociation se traduit par la création de deux charges, tandis que pour l'acide de type BH^+ , il n'y a pas de création de charge. De fait, la dissociation pour AH sera plus difficile à réaliser en milieu hydro-organique qu'en milieu purement aqueux pour cause de moindre solvation des charges. Le pK_A des acides anioniques augmente avec la concentration de solvant organique, d'autant plus si ce dernier n'est pas protique. Concernant les acides de type BH^+ , le phénomène est plus complexe à interpréter : la dissociation est au départ favorisée par la meilleure solubilité de la base conjuguée \bar{B} ⁷⁸, ce qui entraîne une baisse du pK_A . Néanmoins, lorsque la concentration en solvant organique devient fortement majoritaire (>70% en fraction volumique), le pK_A augmente, du fait certainement de la solubilité limitante du proton eu égard à la faible proportion de phase purement aqueuse. De nombreux travaux ont été publiés à ce sujet [24, 193, 297, 360, 363, 378-389], dont sont tirées les figures suivantes, qui résument les variations des pK_A suivant le solvant et la nature du composé ionisable.

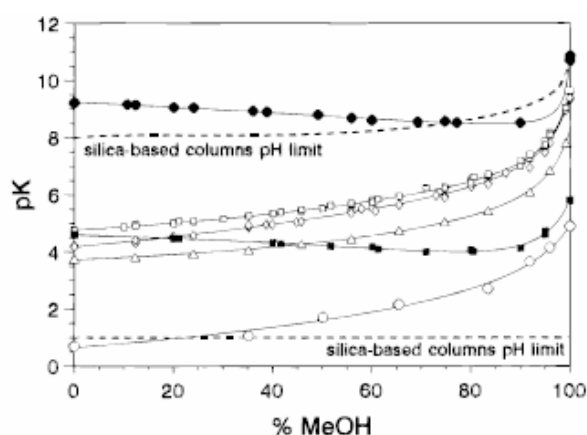


Figure 3. Variation of pK_A values of acids with the methanol–water composition: (○) trichloroacetic acid, (△) formic acid, (◇) benzoic acid, (□) acetic acid, (■) anilinium, and (●) ammonium. Symbols are experimental data, and the lines are computed by eq 15 from the parameters of Table 3.

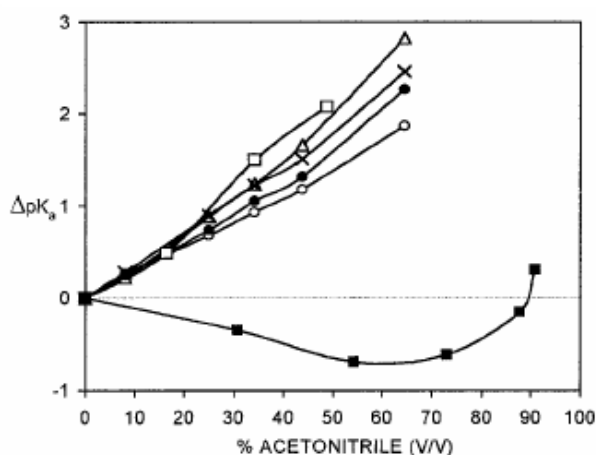
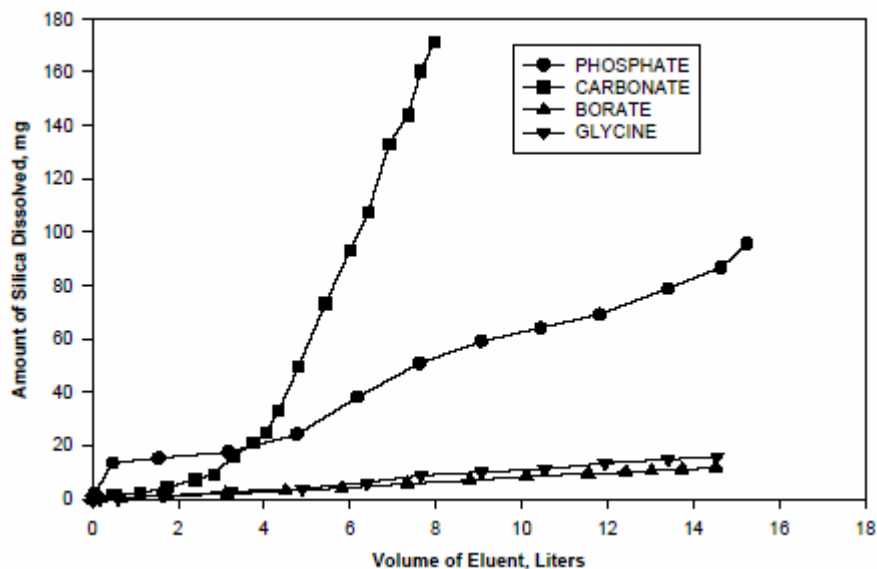


Figure 2. Variation of the pK_A of acids ($\Delta pK_A = \frac{1}{2}pK_A - \frac{1}{2}pK_A$) in acetonitrile–water mixtures with solvent composition: (○) pK_{A1} of citric acid, (●) pK_{A2} of citric acid, (×) pK_{A3} of citric acid, (△) acetic acid, (□) benzoic acid, and (■) pyridinium.

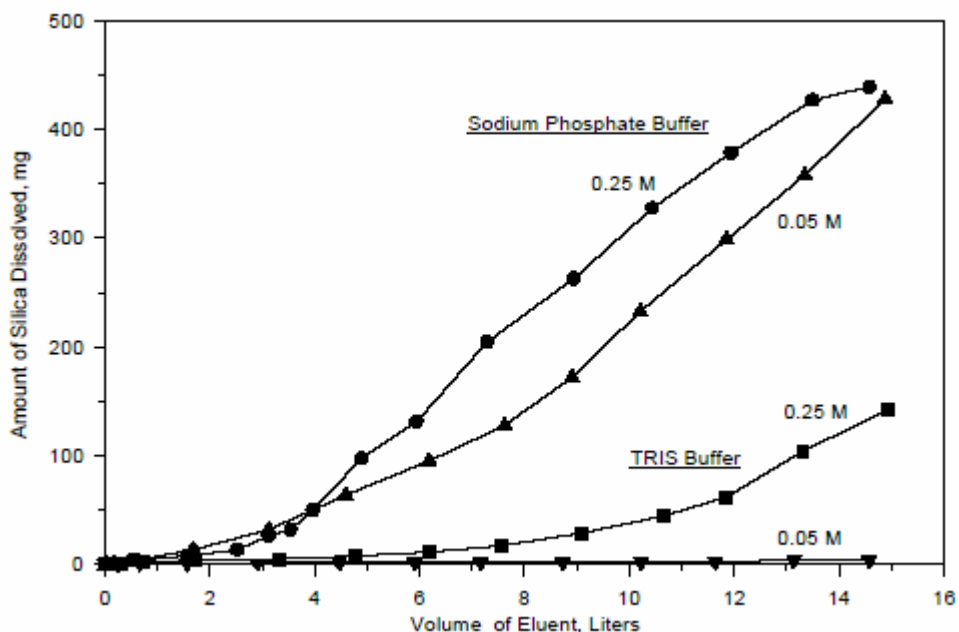
Comme la nature et de la teneur en modificateur organique influe sur la valeur du tampon de pH de la phase mobile et sur le pK_A des solutés, il faut tenir compte de ces paramètres d'un point de vue chromatographique non seulement pour leur conséquence sur la séparation, mais aussi sur la stabilité de la colonne chromatographique [115, 116, 118, 119, 390]. En effet, l'emploi de certains tampons, qualifiés d'agressifs, peut conduire à un pH apparent du milieu hydro-organique qui excède la limite de stabilité de la silice, menant à la dissolution de la matrice, comme le montre la figure suivante à pH 10 [115].

⁷⁷ Plutôt que les termes d'acides faibles neutres (« neutral weak acids ») et d'acides cationiques, nous préférons qualifier les acides suivant leur type : AH ou BH^+ .

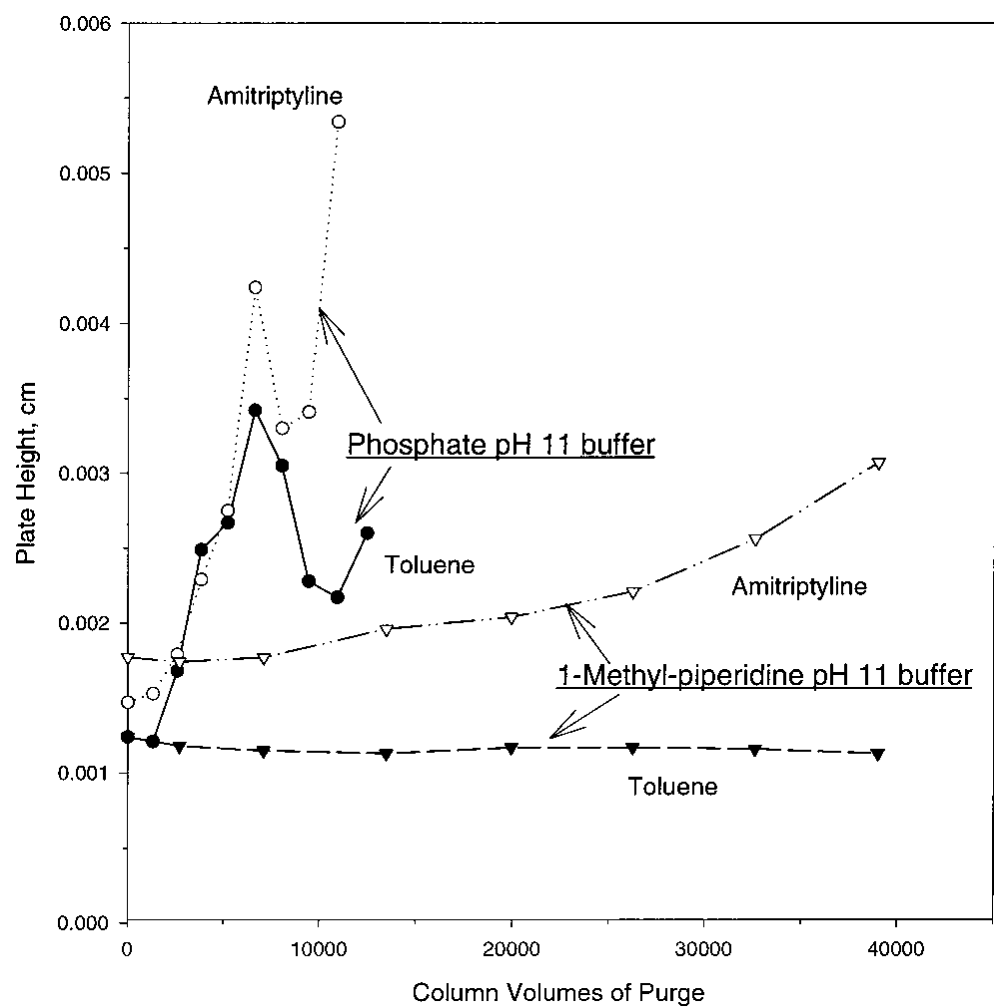
⁷⁸ La solvation du proton est certainement le fait de la phase purement aqueuse.



Ce phénomène explique aussi le succès rencontré par le tampon phosphate, réputé pour la qualité de résolution qu'il apporte aux séparations par rapport aux autres tampons à même pH aqueux : une fois le mélange hydro-organique réalisé, le pH apparent s'élève notablement, ce qui confère un avantage indéniable pour réaliser des séparations de mélanges constitués de composés basiques : le pH apparent dépasse leurs valeurs de pK_A (qui elle a tendance à diminuer). Néanmoins, ceci se réalise au détriment de la phase stationnaire. La concentration du tampon, elle aussi, possède une influence sur la dissolution de la matrice de silice, comme le démontre la figure ci-dessous à pH 7 [115].



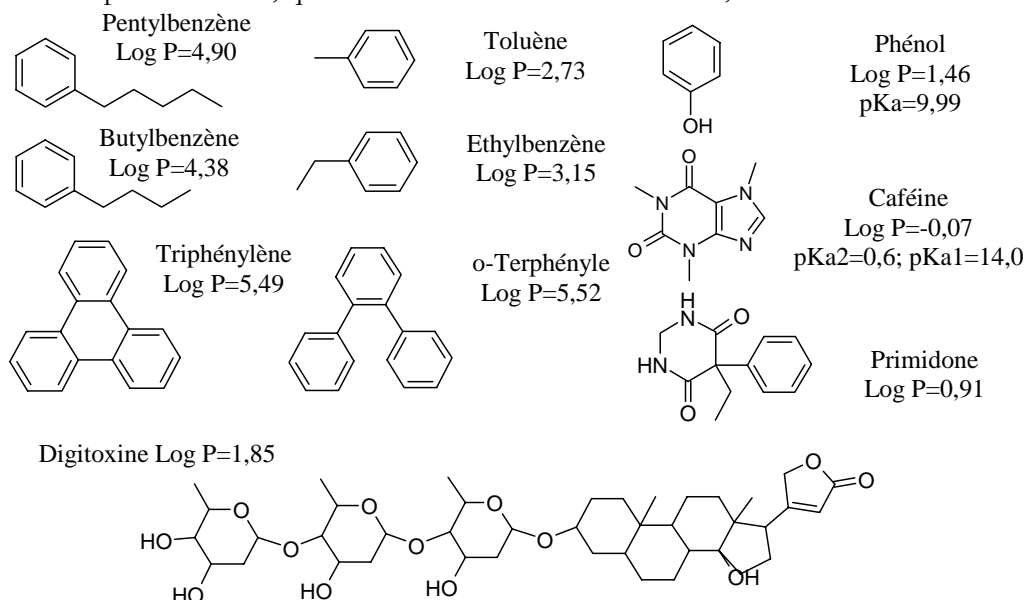
A titre d'ultime illustration, citons l'effet de la nature du tampon sur la stabilité d'une phase stationnaire Zorbax Extend, conçue pour un fonctionnement à pH élevé [119].



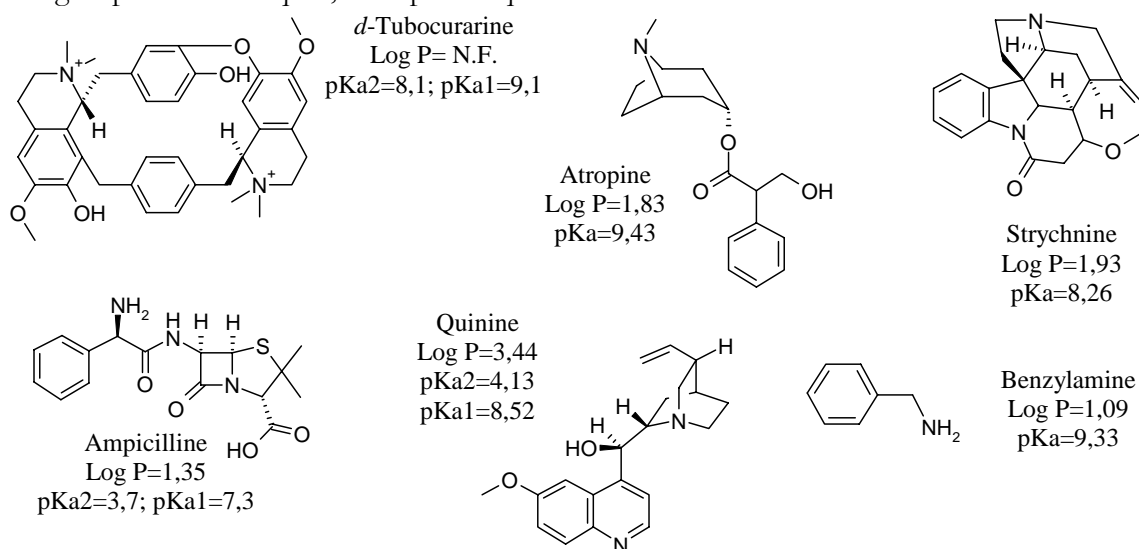
Encore une fois, le tampon phosphate se révèle très agressif.

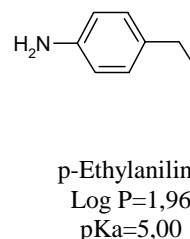
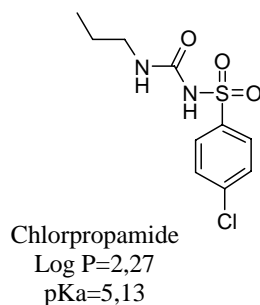
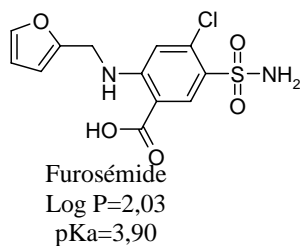
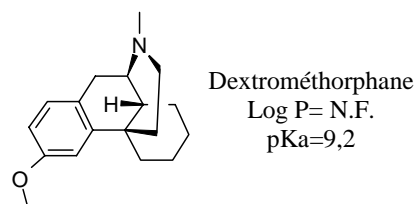
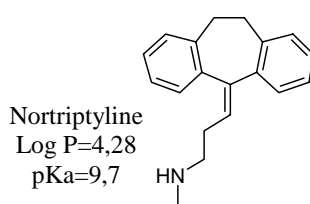
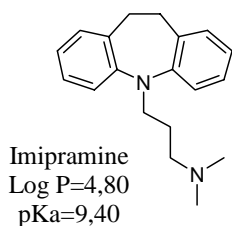
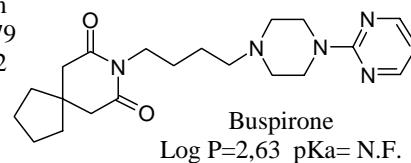
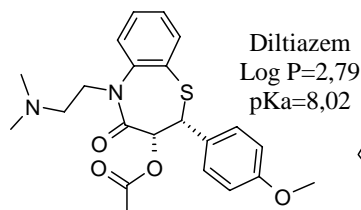
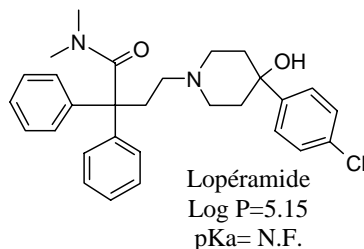
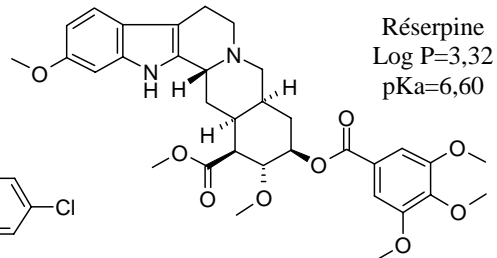
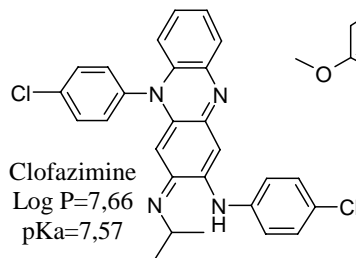
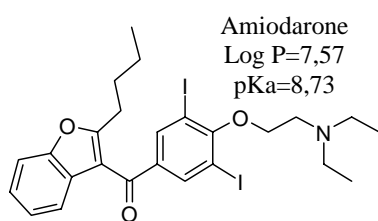
Cette annexe détaille les caractéristiques des composés utilisés lors de nos travaux. Tous sont disponibles commercialement, relativement peu onéreux et possèdent une stabilité suffisante. Les solutés ont été choisis pour leur diversité de propriétés physico-chimiques (présence d'un ou plusieurs hétéroatomes, large distribution de pK_a s, de $\log P$ s) et géométrique (taille et forme). Ces composés peuvent se répartir en trois catégories : les neutres, les ionisables et les globulaires.

Les composés neutres, qui incluent ceux du test de Tanaka, sont les suivants :

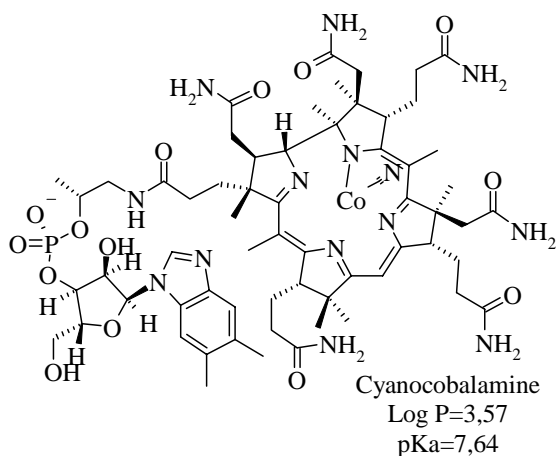
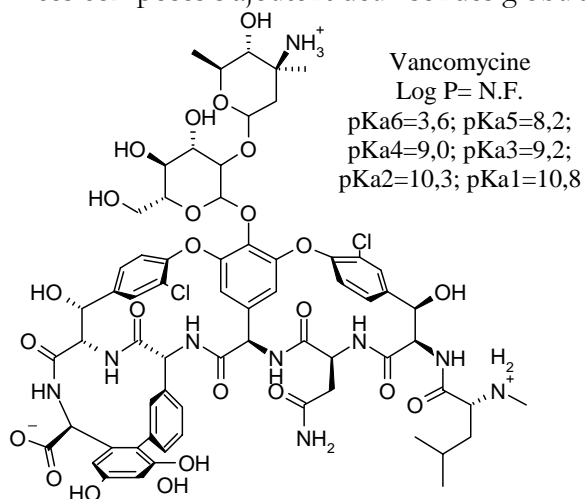


En plus de composés neutres, nous avons utilisés des solutés ionisables, possédant en majorité des groupements basiques, mais pas uniquement. Ils sont rassemblés ci-dessous :





A ces composés s'ajoutent deux sondes globulaires, dont l'état d'ionisation est difficile à prédire :

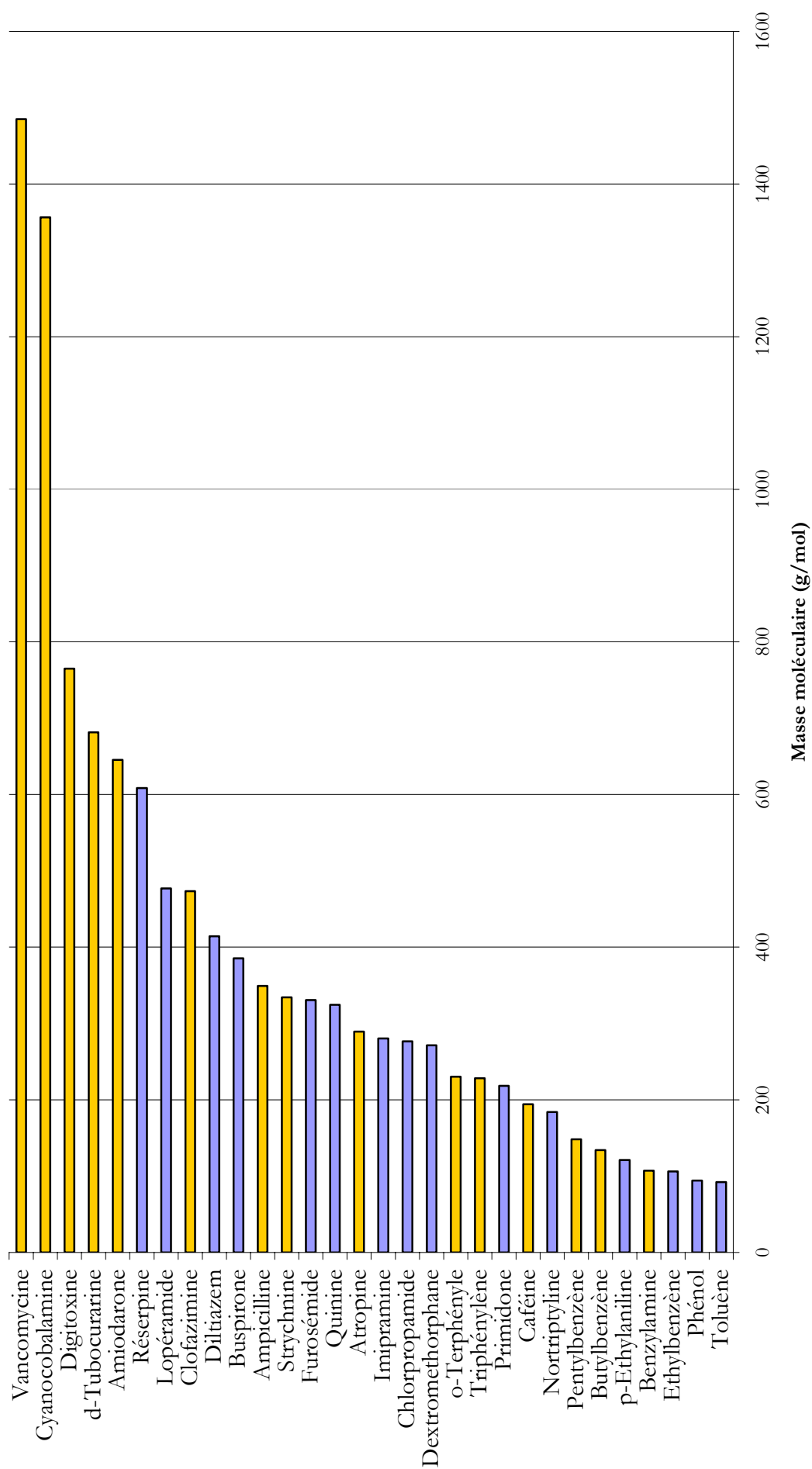


Le tableau ci-dessous récapitule les caractéristiques générales de ces composés.

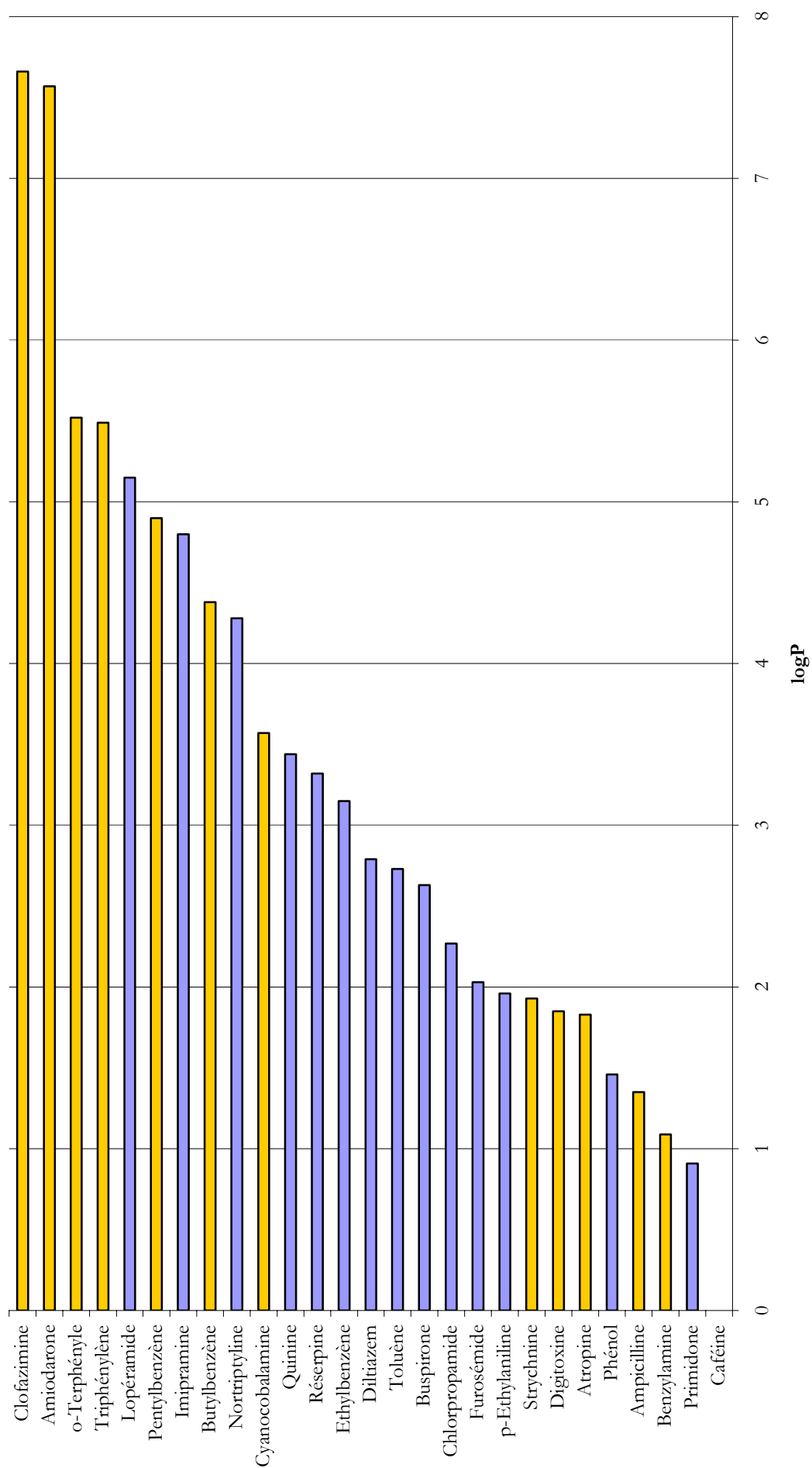
<i>Nom</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse moléculaire</i>	<i>LogP</i>	<i>pKa</i>
Toluène	C ₇ H ₈	92,14	2,73	N.A.
Phénol	C ₆ H ₆ O	94,11	1,46	9,99
Ethylbenzène	C ₈ H ₁₀	106,17	3,15	N.A.
Benzylamine	C ₇ H ₉ N	107,16	1,09	9,33
p-Ethylaniline	C ₈ H ₁₁ N	121,18	1,96	5,00
Butylbenzène	C ₁₀ H ₁₄	134,22	4,38	N.A.
Pentylbenzène	C ₁₁ H ₁₆	148,25	4,90	N.A.
Nortriptyline	C ₁₉ H ₂₁ N	184,2	4,28	9,7
Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	-0,07	0,6 ; 14,0
Primidone	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218,26	0,91	N.A.
Triphénylène	C ₁₈ H ₁₂	228,30	5,49	N.A.
o-Terphényle	C ₁₈ H ₁₄	230,31	5,52	N.A.
Dextrométhorphane	C ₁₈ H ₂₅ NO	271,41		9,20
Chlorpropamide	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ S	276,74	2,27	5,13
Imipramine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	280,42	4,80	9,40
Atropine	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	289,38	1,83	9,43
Quinine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324,43	3,44	4,13 ; 8,52
Furosémide	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	330,75	2,03	3,90
Strychnine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	334,42	1,93	8,26
Ampicilline	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	349,41	1,35	3,7 ; 7,3
Buspirone	C ₂₁ H ₃₁ N ₅ O ₂	385,51	2,63	N.A.
Diltiazem	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	414,53	2,79	8,02
Clofazimine	C ₂₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₄	473,41	4,30	8,51
Lopéramide	C ₂₉ H ₃₃ ClN ₂ O ₂	477,05	5,15	?
Réserpine	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	608,69	3,32	6,60
Amiodarone	C ₂₅ H ₂₉ I ₂ NO ₃	645,32	7,57	8,73
Tubocurarine	C ₃₉ H ₄₆ N ₂ O ₅ ⁺²	622,80		8,1 ; 9,1
Digitoxine	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	764,96	1,85	N.A.
Cyanocobalamine	C ₆₃ H ₈₉ CoN ₁₄ O ₁₄ P	1356,4	3,57	7,64
Vancomycine	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	1485		3,6 ; 8,2 ; 9 ; 9,2 ; 10,3 ; 10,8

Les composés s'avèrent régulièrement distribués en masse moléculaire et en logP, comme l'illustrent les figures suivantes.

Distribution de la masse moléculaire des composés

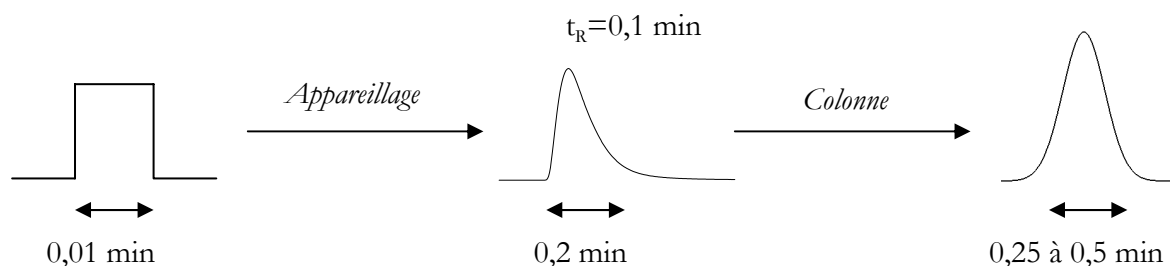


Distribution du logP des composés



A Processus chromatographique et évaluation de la dispersion entraînée par l'appareillage

Le processus chromatographique peut se modéliser de la façon suivante : le pic chromatographique, considéré comme gaussien, est le fruit d'une convolution de l'injection, assimilable idéalement à un pic de Dirac, par une gaussienne. La convolution est réalisée par la colonne chromatographique, qui peut donc être représentée comme une fonction qui transforme un Dirac en une gaussienne. En réalité, l'injection se modélise plutôt par une fonction créneau étroite. Mais surtout, il faut prendre en compte une fonction d'appareillage, à l'origine d'effets extra-colonne.



L'appareillage entraîne une déformation asymétrique du créneau d'injection, dépendante du soluté mais aussi du type de connectique utilisée (phénomènes d'adsorption). Pour pouvoir négliger cette déformation, il faut que le temps de séjour dans la colonne soit assez long, ce qui implique des facteurs de rétention supérieurs à 2 au minimum, voire 4. Cependant, les temps de résidence ne doivent pas être trop longs, sous peine d'être confronté à un phénomène de diffusion, donc de dilatation trop important.

Aussi, pour compléter la caractérisation de l'appareillage, il nous paraît important d'évaluer son volume mort intrinsèque, qui définit le temps de séjour de l'appareillage.

B Description des appareillages

Nous avons fait appel à quatre systèmes chromatographiques différents. Tous ont en commun un système de thermorégulation se fondant sur une jaquette à eau Alltech reliée à un bain thermostaté, dans laquelle est placée la colonne chromatographique.

<i>Eléments</i>	<i>Système 1</i>	<i>Système 2</i>	<i>Système 3</i>	<i>Système 4</i>
Pompe	pompe ternaire Varian Prostar 230 ou pompe quaternaire HP 1050	pompe quaternaire HP 1050		pompe ternaire Varian Prostar 230
Passeur d'échantillons	Waters 715 UltraWisp (carrousel thermorégulé par effet Pelletier)	Passeur d'échantillons HP 1050 (carrousel thermorégulé par bain thermostaté)		Waters 717 Wisp (carrousel thermorégulé par effet Pelletier)
Détecteur(s) UV-Visible	Waters 2487 UV ($\lambda = 230$ nm) monté en série avec Varian 2050 UV ($\lambda = 254$ nm)	HP 1100 à monolongueur d'onde variable	Système intégré HP1090 série II (pompe quaternaire, passeur d'échantillons, DAD)	Jasco 825-UV ($\lambda = 230$ nm) monté en série avec Spectromonitor III ($\lambda = 254$ nm)
Acquisition/Intégration des données brutes	Station d'acquisition sur PC fonctionnant à partir du logiciel Class-VP® 4.2 (Shimadzu)	Station d'acquisition sur PC sous Chemstation® 6.03 (Agilent Technologies)		Station d'acquisition sur PC fonctionnant à partir du logiciel Azur 3.0 (Datalys)
Système de thermorégulation de la colonne	bain thermorégulé Bioblock 18205 ($\pm 0.1^\circ\text{C}$)	bain thermorégulé Neslab RTE-101 ($\pm 0.03^\circ\text{C}$)	bain thermorégulé Neslab RTE-101 ($\pm 0.03^\circ\text{C}$)	bain thermorégulé Bioblock 18205 ($\pm 0.1^\circ\text{C}$)
Utilisation Chapitre	IV, V & VIII	IV, V, VI, VII et VIII	V	VIII

Annexe 5 Préparation des tampons et des phases mobiles

A pH 3 et 5, les tampons sont obtenus en introduisant dans des fioles jaugées de 2 L les quantités de sels (respectivement 4,770 g de dihydrophosphate de potassium et 3,281 g d'acétate de sodium pour 2 L de solution), pesées aussi précisément que possible. Une fois le volume complété au trait de jauge avec de l'eau ultrapure fraîchement produite (par un système de purification Milli-Q Plus de Millipore), le pH est ajusté à sa valeur correspondante à 25 °C avec l'acide conjugué concentré.

Quant au tampon à pH 7, il se prépare en additionnant 5,840 g de sel de chlorure de TRIS à 356,5 mg de TRIS. Une fois ces quantités introduites dans une fiole jaugée de 2 L, son volume est complété avec de l'eau ultrapure fraîchement produite. La valeur du pH est simplement vérifiée a posteriori, en tenant compte toujours de la dérive entraînée par les variations de température.

Tous les tampons sont filtrés (filtre 0,45 µm type HA de Millipore) et conservés à 4°C.

Les phases mobiles sont toutes préparées par **pesées**. Le mélange hydro-organique obtenu est au moins dégazé 20 min aux ultrasons.

A Introduction

Au terme du chapitre 5 ont été sélectionnées les conditions qui permettent de caractériser au mieux les phases stationnaires. L'objectif avoué de ce document est de permettre le transfert du test lors de sa mise en place dans un nouveau laboratoire. La description détaillée du protocole opératoire doit ainsi permettre de réaliser ce test tout en minimisant les variabilités expérimentales introduites par l'opérateur (en termes de préparation et de rendu des données), l'origine diverse des produits (solutés du test et solvants) et l'instrumentation.

B Spécifications du système chromatographique d'analyse

Le test est conduit sur un appareillage chromatographique à haute performance dont les modules doivent respecter les spécifications suivantes :

- La pompe doit être capable d'assurer en régime isocratique un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,03 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;
- Un passeur d'échantillons doit pouvoir réaliser de façon répétable des injections de $10 \text{ } \mu\text{L}$ de solutions maintenues par ailleurs à 1°C ;
- La colonne testée doit être disposée au sein d'un système de thermorégulation fixant la température fixée à $40^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$, et ceci de façon vérifiable : seul un système reposant sur un bain thermostaté, accompagné éventuellement d'une jaquette à eau, s'avère satisfaisant, contrairement aux systèmes à fours.
- Le système de détection U.V. doit être muni d'une cellule de volume interne inférieur ou égal à $13 \text{ } \mu\text{L}$;
- Le système d'acquisition des données doit posséder une fréquence d'échantillonnage minimale de 20 Hz .

Afin d'assurer la compatibilité des mesures entre différents instruments, il est nécessaire de contrôler le volume mort et donc d'ajuster les longueurs de connectique : 30 cm en amont et 45 cm en aval de la colonne. Par souci de simplicité et de manière à éviter une contamination métallique supplémentaire à celle introduite par l'instrumentation, on préférera des connectiques de type PEEK à celles en acier inoxydable. Toutes les mesures ont été réalisées avec des tubes en PEEK rouge de $0,13 \text{ mm}$ de diamètre interne.

C Préparation des solutés à injecter

Les solutés doivent être de qualité HPLC. Tous sont commercialement disponibles et d'un prix abordable. La plupart d'entre eux se conservent à température ambiante : seules l'amiodarone, la *d*-tubocurarine, l'ampicilline, la cyanocobalamine et la vancomycine doivent être conservées entre 2°C et 8°C . Le Tableau ci-dessous indique les valeurs cibles de pesée pour la préparation des solutions mères, ainsi que les conditions adéquates de dissolution.

L'ampicilline et la vancomycine requièrent un tampon acide pour une meilleure stabilité en solution : un tampon phosphate de potassium 20 mM $\text{pH}=3 \pm 0,1$ préparé selon [1] convient pleinement pour limiter leur cinétique de dégradation.

Toutes les solutions mères seront conservées au congélateur, pendant un délai inférieur à leur limite de stabilité. A la température de conservation, la clofazimine recristallise typiquement en bâtonnets : il faut donc atteindre à nouveau l'ambiante pour une dissolution totale du soluté et permettre un pipetage correct.

Phase d'injection	Produit	Préparation des solutions mère (flacons de 15 mL)		Préparation des solutions d'injection (flacons de 2 mL)		Délai de conservation
		Quantité cible à introduire	Solvant de dissolution	Volume à introduire	Solvant de dilution	
A	Thiourée	2 mg	MeOH-Eau 50/50	50 µL		> 6 mois
	Butylbenzène + Pentylbenzène	150 µL de chaque	MeOH	100 µL	MeOH-Eau 50/50	3 mois
	<i>o</i> -Terphényle	4 mg		100 µL		> 6 mois
	Triphénylène	1 mg		100 µL		> 6 mois
	Digitoxine	15 mg	MeOH-Eau	100 µL	MeCN-Eau 50-50	> 6 mois
	Amiodarone	15 mg	75/25	100 µL		> 6 mois
D	Clofazimine	15 mg	MeCN pur	100 µL		3 mois
	Atropine	60 mg	MeOH-Eau 15/85	200 µL	Eau pure	> 6 mois
	Strychnine	30 mg		100 µL		> 6 mois
	<i>d</i> -Tubocurarine	30 mg		100 µL		3 mois
	Benzylamine	45 mg		400 µL		> 6 mois
	Caféine	7,5 mg		100 µL		> 6 mois
	Cyanocobalamine	22,5 mg		100 µL		> 6 mois
	Ampicilline	60 mg	MeOH - Tampon	100 µL		3 mois
	Vancomycine	10 mg	pH = 3 15/85	100 µL		3 mois

Pour la plupart des produits basiques, la limite de conservation s'explique par des phénomènes de dégradation : la placement au congélateur permet de ralentir cette cinétique et d'éviter d'avoir à préparer régulièrement de nouvelles solutions mères. Concernant le butylbenzène et le pentylbenzène, le problème essentiel réside non pas en leur dégradation (même si on peut la constater en solution pure au bout de quelques années) mais plutôt en leur volatilité, que l'on limite en plaçant ces produits à basse température. C'est aussi pour limiter ce phénomène que l'on prépare une solution mère constituée du mélange de ces deux alkylbenzènes.

D Préparation des phases

1 Préparation du tampon acétate à pH=5 (30 mM)

Dans une fiole jaugée de 2 L, introduire 3,2812 g de CH₃COONa (pesé aussi précisément que possible). Compléter avec de l'eau MilliQ. Après dissolution complète, transférer dans un bécher de 2 L et ajuster au pH correspondant à la température de la solution avec du CH₃COOH à l'aide de l'étalonnage fourni ci-après.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>
15	5,077	19	5,046	23	5,015	27	4,985
16	5,069	20	5,039	24	5,008	28	4,977
17	5,062	21	5,031	25	5,000	29	4,969
18	5,054	22	5,023	26	4,992	30	4,962

Filtrer sur type HA 0,45 µm. Le tampon peut se conserver au frais jusqu'à 3 mois après préparation.

2 Préparation des phases mobiles

La préparation des phases mobiles doit s'effectuer impérativement par **pesées**. Ce point est fondamental : aucune préparation volumique, que ce soit via un mélange classique à l'aide d'éprouvettes graduées ou via un mélange effectué au niveau de la pompe, ne peut atteindre la précision de la pesée, qui permet de s'affranchir des problèmes de variations de densité des solvants organiques en fonction de la température. Or cette précision est requise pour le transfert du test. De manière à éviter toute perte due au mouillage des flacons lors du transfert de chacun des solvant, il est nécessaire d'effectuer la préparation dans **un seul flacon** taré pour chaque phase mobile, en introduisant d'abord le modificateur organique puis la phase aqueuse tamponnée afin d'éviter toute perte due au mouillage du flacon. Le mélange hydro-organique s'effectue dans un flacon taré selon les ratios suivants :

Phase	% MeOH (<i>m</i>)	% MeCN (<i>m</i>)
A	70	59
D	15	9

Pour chaque test, 4 phases mobiles sont donc à préparer.

Une fois le mélange réalisé, le dégazer aux ultrasons pendant 20 min.

E Conduite du test

En préalable à la conduite du test, la colonne nouvellement branchée doit être rincée de sa phase mobile de stockage (souvent à base d'acétonitrile uniquement) pour la rendre compatible avec un mélange hydro-organique tamponné. Ceci s'effectue à l'aide de 30 mL d'un mélange volumétrique MeCN-Eau 50/50.

Pour chaque nouvelle phase mobile est requise au moins une heure d'équilibration.

Le tableau suivant résume les conditions d'injections des solutés.

Conditions	Eluant	Solvant	Fraction massique de solvant (%)	Solutés
Tampon acétate 30 mM pH=5,00 à 25 °C	A	MeOH	70	thiourée, digitoxine, clofazimine, amiodarone, butylbenzène*, pentylbenzène*, <i>o</i> -terphényle*, triphénylène*
T=40°C		MeCN	59	
Débit= 1 mL.min ⁻¹	D	MeOH	15	strychnine*, benzylamine*, caféine*, <i>d</i> -tubocurarine, atropine, ampicilline, vancomycine, cyanocobalamine
λ= 254 nm pour les solutés (*); λ= 230 nm sinon		MeCN	9	

Les mélanges injectés diffèrent suivant la colonne testée, mais aussi suivant le type de détecteur. Quoiqu'il en soit, tous les solutés sont injectés 2 fois mélangés. Si besoin est d'identifier les pics chromatographiques sans ambiguïté, comme dans le cas du test d'une nouvelle phase stationnaire, leur reconnaissance s'effectue un à un à l'aide d'injections séparées.

En principe, si l'appareillage permet l'acquisition des deux longueurs d'onde en parallèle (détecteur type DAD, bi-longueur d'onde avec une fréquence de changement du réseau largement supérieure à celle de l'échantillonnage, ou encore deux détecteurs mono-longueur d'onde en cascade), un mélange complet pourra être injecté. Sinon, il faudra fractionner le mélange complet en tenant compte des longueurs d'onde d'acquisition. Ceci est valable aussi en cas de co-élution(s).

Pour la phase à haut niveau de solvant organique (éluant A), à défaut de mélange complet, on préconise d'injecter les deux mélanges suivants :

1. Thiourée, butylbenzène, pentylbenzène, *o*-terphényle et triphénylène ($\lambda=254$ nm)
2. Digitoxine, clofazimine et amiodarone ($\lambda=230$ nm)

Le premier mélange correspond en effet à PC1 et le deuxième à PC2 : cela permet ainsi de relier directement le comportement chromatographique du couple colonne-solvant à ses coordonnées dans la classification.

Quant à l'éluant D, on pourra suggérer d'injecter les mélanges :

1. Benzylamine, caféine et strychnine ($\lambda=254$ nm)
2. Vancomycine, atropine, *d*-tubocurarine, ampicilline et cyanocobalamine ($\lambda=230$ nm), quitte à injecter séparément l'ampicilline.

A titre indicatif, sur une colonne SymmetryShield 150×4,6 mm, des préparations de 200 g de s'avèrent largement suffisantes pour chacune des phases mobiles (haut et bas niveaux de solvant, que ce soit en méthanol ou en acétonitrile).

F Rendu des données

Par convention, le temps de rétention nulle t_0 nous est fourni par le temps de rétention de la thiourée en acétonitrile. Si deux détecteurs en cascade sont utilisés, tous les temps de rétention seront mesurés sur le détecteur le plus proche de la sortie de colonne, réglé préférentiellement à 230 nm (longueur d'onde d'acquisition pour la majorité des composés). En effet, mesurer les temps de rétention sur le détecteur le plus approprié reviendrait à introduire $2 t_0$ et donc deux longueurs de connectiques post-colonne différentes. Or, cela se traduit par un biais non tolérable sur les facteurs de rétention qui interdit tout rapport entre eux et toute comparaison entre classifications, comme l'illustre l'exemple suivant.

Soient Δk l'erreur sur les facteur de rétention, Δt_0 celle sur les temps de rétention nulle, t_r le premier temps de rétention du composé et t_0 le premier temps de rétention nulle ? Alors

$$\Delta k = \frac{\Delta t_0 \cdot (t_r - t_0)}{t_0 \cdot (t_0 + \Delta t_0)} \text{ ce qui équivaut à } \Delta k = 0,08 \text{ si } t_r = 5 \text{ min ou encore } \Delta k = 0,18 \text{ si } t_r = 10 \text{ min}$$

pour des valeurs fixes de $t_r = 1,5$ min et $\Delta t_0 = 0,05$ min. Il est donc impératif de n'avoir qu'une seule définition du t_0 .

Les autres paramètres chromatographiques tels que l'asymétrie et l'efficacité pourront cependant être mesurées avec le détecteur le plus approprié. Les facteurs de rétentions sont

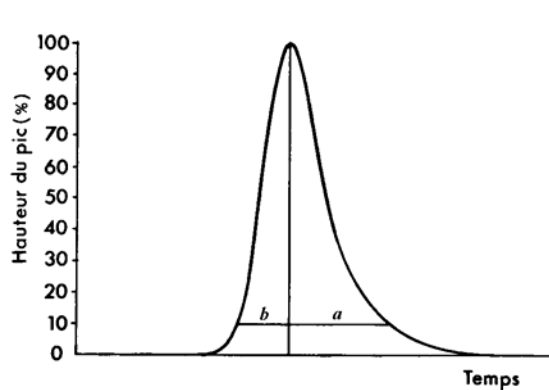
$$\text{calculés selon } k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}.$$

Les asymétries reposent sur la définition de la norme de la pharmacopée américaine

$$\text{USP : } A_s = \frac{a+b}{2b} \text{ à 5\% de hauteur. Afin}$$

d'équilibrer la définition de l'asymétrie, qui donne plus d'importance aux traînes en queue de pic qu'à celle en tête de pic, nous préférons utiliser des asymétries dérivées A_s' : si $A_s > 1$, alors $A_s' = A_s$,

$$A_s' = 2 - \frac{1}{A_s} \text{ autrement.}$$



Quant aux efficacités, il vaut mieux considérer la hauteur de plateau réduite b définie selon la norme ASTM pour s'affranchir du facteur diamètre de particule d_p : $b = \frac{L}{N \times d_p}$ avec

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 \text{ où } \delta \text{ représente la largeur du pic à mi-hauteur.}$$

Annexe 7

Caractéristiques des colonnes testées

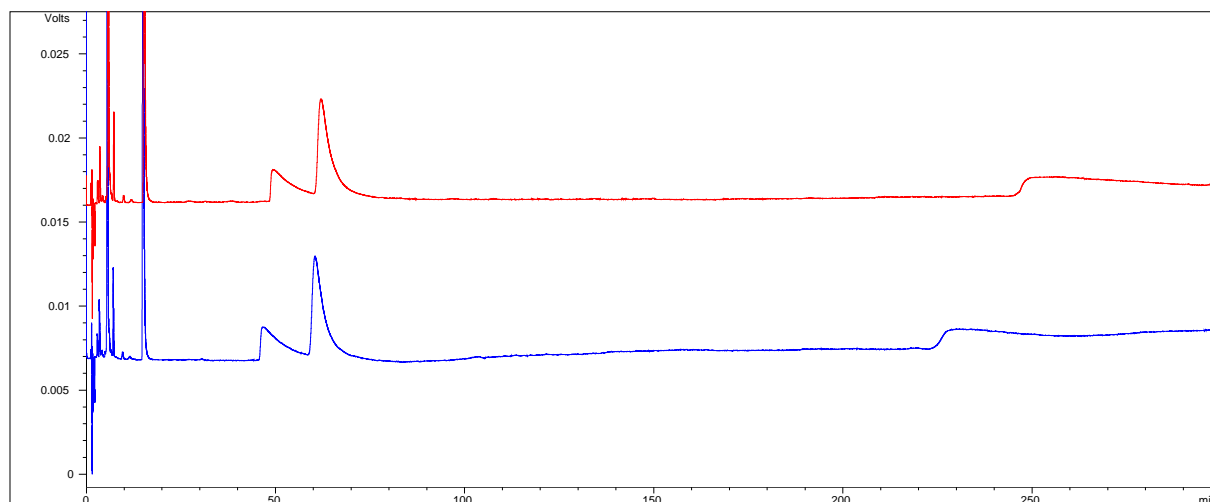
Les caractéristiques communes fournies par les fabricants sont répertoriées dans le tableau suivant.

Phase	Fabricant/Fournisseur	Dimensions (mm)	Silice	Type de greffon	Type de greffage	D (nm)	d _p (µm)	C %	S _p (m ² /g)	Longueur des greffons
SymmetryShield RP 18	Waters	150*4,6	Ultrapure	Alkylcarbamate	Monomérique	10	3,5	17,04	339	18
Symmetry C8	Waters	150*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	10	5	12,15	344	8
XTErra RP 8	Waters	150*4,6	Hybride	Alkylcarbamate	Monomérique	12,5	3,5	13,37	174	8
XTErra RP 18	Waters	150*4,6	Hybride	Alkylcarbamate	Monomérique	12,5	3,5	14,42	172	18
Discovery RP Amide C16	Supelco	150*4,6	Ultrapure	Alkylamide	Monomérique	18	5	12,04	198	16
Nucleosil C18 HD	Macherey-Nagel	150*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	10	5	20	350	18
JSphere ODS-H80	YMC	150*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Polymérique	8	4	22		18
Kromasil C8	Akzo-Nobel	150*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	10	5	12	340	8
Zorbax Eclipse XDB-C8	Agilent	150*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	8	5	7,6	180	8
Capcell Pak C8 UG 120	Shiseido	150*4,6	Ultrapure	Encapsulation polymérique	Encapsulation	12	5	10	300	8
Zorbax StableBond C18	Agilent	150*4,6	Ultrapure	Di-isobutylalkyle	Monomérique	8	3,5	10	180	18
Symmetry C18	Waters	250*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	10	5	19,45	341	18
Aquasil C18	ThermoHypersil	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	10	5	12		18
Zorbax Stable Bond Aq	Agilent	150*4,6	Ultrapure	Di-isopropyle...		8	5	Exclusif	180	18 ?
YMC-Pack ODS-AQ	YMC	150*3,0		Alkyle	Monomérique	12	4	14	300 (±40)	18
Synergi Hydro-RP	Phenomenex	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	8	4	19	475	18
Uptisphere HDO	Interchim	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	12	5	16	324	18
Luna C8 (2)	Phenomenex	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	9,7	5	14,15	421	8
Zorbax Stable Bond C8	Agilent	150*4,6	Ultrapure	Di-isopropylalkyle		8	3,5	5,5	180	8
Zorbax Eclipse XDB-C8	Agilent	150*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	8	5	7,6	180	8
Symmetry C18 (usage)	Waters	250*4,6	Ultrapure	Alkyle haute densité	Monomérique	10	5			18
Chromolith Performance RP-18e	Merck	100*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monolithe (2mm/13nm)	13	eq. 5	18	300	18
Discovery C18	Supelco	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	18	5	12,44	199	18
Uptisphere ODB	Interchim	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	12	5	17,4	330	18
Uptisphere NEC	Interchim	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	12	5	16	333	18
Uptisphere HSC	Interchim	150*4,6	Ultrapure	Alkyle			5	19,2	Propriétaire	18
Uptisphere TF	Interchim	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Trifonctionnel		5	13,3	Propriétaire	18
BetaMax Neutral	ThermoHypersil	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	6	5	29		18
Nucleodur 100-5 C18 EC	Macherey-Nagel	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	11	5	17,5		18
Nucleodur C18 Gravity 5µ	Macherey-Nagel	150*4,6	Ultrapure	Alkyle	Monomérique	11	5	18		18
Hypersil GOLD	ThermoHypersil	150*4,6	Ultrapure	Alkyle		17,5	5	10	220	18
Hypersil HYPURITY Advance	ThermoHypersil	150*4,6	Ultrapure	Alkyle à intercalant polaire	Monomérique		5			8
SymmetryShield RP8	Waters	100*4,6	Ultrapure	Alkylcarbamate	Monomérique	10	3,5	14,73	343	8
Polaris C18-A	Varian*	150*4,6	Ultrapure	Alkyle + gpt polaire	Monomérique	8	5		220	18
Polaris Amide C18	Varian*	150*4,6	Ultrapure	Alkylamide	Monomérique	8	5		220	18
Polaris C18-Ether	Varian*	150*4,6	Ultrapure	Alkyléther	Monomérique	8	5		220	18
SymmetryShield RP 18	Waters	150*4,6	Ultrapure	Alkylcarbamate	Monomérique	10	3,5	17,5	340	18
SymmetryShield RP 18	Waters	150*4,6	Ultrapure	Alkylcarbamate	Monomérique	10	3,5	17,48	340	18
SymmetryShield RP 18	Waters	150*4,6	Ultrapure	Alkylcarbamate	Monomérique	10	3,5	17,46	340	18
XTErra RP 18	Waters	150*4,6	Hybride	Alkylcarbamate	Monomérique	12,5	3,5	14,77	182	18
XTErra RP 18	Waters	150*4,6	Hybride	Alkylcarbamate	Monomérique	12,5	3,5	14,62	176	18
XTErra RP 18	Waters	150*4,6	Hybride	Alkylcarbamate	Monomérique	12,5	3,5	14,6	176	18

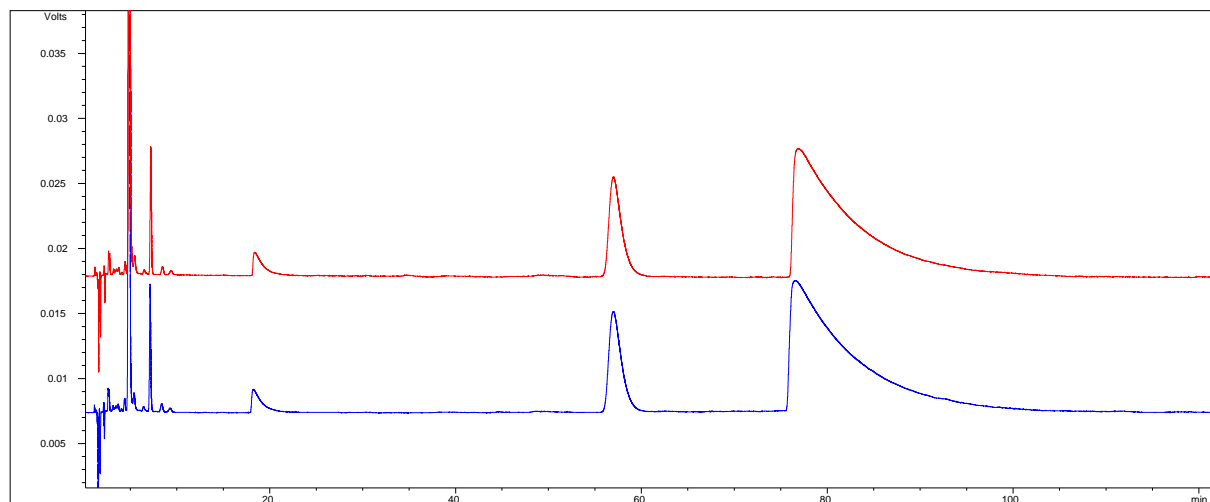
Annexe 8 Effet chromatographique de la contamination du support par des impuretés métalliques

Cette annexe présente le cas auquel nous avons été confronté sur la colonne Zorbax StableBond C8.

Durant la procédure d'évaluation, nous avons observé en phase D à 9% d'acétonitrile une non répétabilité du comportement chromatographique à l'occasion d'injections successives du mélange constitué de vancomycine, d'ampicilline, d'atropine, de strychnine et de *d*-tubocurarine (l'ordre cité est celui de l'élution). Comme le montre la figure suivante, la *d*-tubocurarine accuse un retard d'élution supérieur à 20 min sur la deuxième injection.



Ayant écarté un problème d'origine instrumentale, il apparaissait alors clairement qu'il s'agissait d'un problème de contamination métallique progressive. Un lavage de la colonne à l'acide oxalique (complexant des métaux) a permis d'obtenir un comportement chromatographique plus répétable, comme l'illustre la figure ci-dessous.



Le temps d'analyse s'est aussi vu divisé par un facteur 3. L'origine de la contamination a été identifiée : il s'agissait des bidons en aluminium contenant des solvants de qualité HPLC, dont le revêtement était défectueux, eu égard aux quantités d' Al^{3+} retrouvées dans les solvants analysés par ICP, comme l'indique le document suivant (la lettre derrière le solvant désigne le type de contenant : M pour bidon métallique et V pour bouteille de verre).

SERVICE CENTRAL D'ANALYSE



Vernaison, le 19 AOÛT 2002

E.S.P.C.I
Chimie Analytique
Madame HENNION
10, Rue Vauquelin
75231 PARIS Cedex 05

----- Veuillez trouver ci-apres, les resultats des dosages
effectues sur les echantillons de produits que vous nous avez adresses.

Votre Bon de Commande : 1272

LEMAPIHAN AL ppm
ACNV < 0.05
SCA 0210633

LEMAPIHAN AL ppm
ACNM 0.42
SCA 0210634

LEMAPIHAN AL ppm
MEDHV < 0.05
SCA 0210635

LEMAPIHAN AL ppm
MEDHM 0.06
SCA 0210636

} échantillons épuisés

RENSEIGNEMENTS: Mmes PERRUCCHIETTI et DOUCHET de 8h-12h et 13h-16h30
ou mel : bda@sca.cnrs.fr
('%' = GRAMMES POUR 100 GRAMMES --- 'PPM' = MICROGRAMMES PAR GRAMME)

Le Responsable

Le Directeur

A Synthèse bibliographique

Nous nous proposons de réaliser d'abord une synthèse succincte des travaux de Kele et Guiochon [103, 321-325], qui ont porté sur les variabilités intra et interlots de 6 phases stationnaires différentes. Ont été principalement employés 5 jeux de solutés, détaillés ci-dessous.

	<i>Solutés</i>
Test 1	Phénol, 1-Chloro-4-nitrobenzène, Toluène, Ethylbenzène, Propylbenzène, Butylbenzène, o-Terphényle, Pentylbenzène, Triphénylène
Test 2	Aniline, Phénol, Toluidines, N,N-Diméthylaniline, Ethylbenzoate, Toluène, Ethylbenzène
Test 3	Théobromine, Théophylline, Caféine, Pyridine, Phénol, 2,2-Dipyridyl, 2,3-Dihydroxynaphthalène
Test 4	Propranolol, Butylparaben, Dipropylphthalate, Naphtalène, Acenaphtène, Amitriptyline
Test 5	Procaïnamide, Benzylamine, Benzyl alcohol, Phenol, Acide benzoïque

Chaque test mettant en œuvre des solutés aux caractéristiques proches, il nous semble assez légitime de regrouper les résultats obtenus par classes de composés, grâce à l'utilisation de la moyenne quadratique des coefficients de variation. De cette manière, les résultats apparaîtront plus synthétiques, ce qui en facilitera la lecture. Nous nous limiterons aux facteurs de rétention et aux asymétries de pic.

Les données brutes de « reproductibilité » des facteurs de rétention des composés des 5 mélanges test sont reprises dans le tableau suivant.

CV(%)	Symmetry C18		Kromasil C18		Luna C18 (2)			Vydac 218TP C18	
	1 lot, 5 colonnes	10 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	1 lot, 5 colonnes	1 lot, 4 colonnes	9 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots
Phénol	0,125	0,72	0,413	2,273	1,115	0,235	1,628	0,197	3,625
1-Chloro-4-nitrobenzene	0,139	0,969	0,388	2,527	1,239	0,244	2,171	0,166	3,539
Toluène	0,136	1,137	0,378	2,812	1,204	0,231	2,764	0,164	3,764
Ethylbenzène	0,14	1,17	0,352	2,848	1,266	0,236	2,893	0,168	3,772
Propylbenzène					1,344	0,245	3,057		
Butylbenzène	0,144	1,264	0,298	2,948	1,43	0,253	3,233	0,157	3,877
o-Terphényle	0,15	1,267	0,281	2,951	1,509	0,267	3,245	0,154	4,033
Pentylbenzène	0,147	1,318	0,283	3,005				0,145	3,972
Triphénylène	0,148	1,53	0,327	2,806	1,611	0,27	3,826	0,131	4,533
Aniline	0,168	0,933	0,543	2,179	0,953	0,32	2,302	5,785	12,055
Phénol	0,12	0,754	0,572	2,218	1,271	0,454	1,346	0,176	3,14
Toluidines	0,083	0,866	0,611		1,227	0,518	2,221		
N,N-Diméthylaniline	0,08	1,23	0,611	3,283	1,244	0,5	2,424	2,202	3,905
Ethylbenzoate	0,114	1,114	0,615	2,659	1,475	0,599	2,053	0,229	3,235
Toluène	0,115	1,294	0,541	3,05	1,327	0,52	2,797	0,179	3,804
Ethylbenzène	0,113	1,364	0,557	3,147	1,431	0,581	2,99	0,182	3,891
Théobromine	0,262	0,841	0,679	2,13	1,515	0,891	1,822	0,438	8,912
Théophylline	0,227	0,793	0,633	2,238	1,51	0,925	1,899	1,763	6,25
Caféine	0,283	0,867	0,687	2,314	0,72	0,715	2,886	0,514	9,775
Pyridine	0,56	5,105	0,675	2,627	1,525	1,014	1,758		
Phénol	0,122	0,755	0,468	2,476	1,283	0,492	1,559	0,203	3,343
2,2-Dipyridyl	0,194	1,702	0,691	2,47	1,247	1,319	2,214		
2,3-Dihydroxynaphthalène	0,141	0,872	0,573	2,611				1,166	3,249
Propranolol	0,16	1,33	1,348	2,519	0,209	0,229	2,128	1,042	14,173
Butylparaben	0,282	0,828	0,321	2,516	2,022	0,55	2,016	0,518	2,829
Dipropylphthalate	0,252	1,043	0,525	2,804	1,629	0,408	1,99	0,524	3,025
Naphtalène	0,244	1,146	0,466	3,006					
Acénaphthène	0,269	1,247	0,472	3,12	1,894	0,435	3,192	0,563	3,771
Amitriptyline	0,228	1,857	1,121	4,061	0,834	0,121	2,904		
Procaïnamide					15,505	4,378		12,849	42,777
Benzylamine load 1					3,224	0,705	9,444		
Benzylamine load 2					3,233	0,501	9,846		
Benzylamine	0,264	2,804	2,412	6,272				1,727	6,458
Benzyl alcohol	0,18	1,528	0,728	1,911	2,005	0,303	1,643	0,374	3,536
Phénol	0,242	1,835	0,515	2,381	2,155	0,315	1,792	0,2	3,412
Acide benzoïque	0,206	1,572	0,58	2,372	2,721	0,371	2,088	0,316	3,138

En réalisant une moyenne quadratique des coefficients de variations, nous obtenons le tableau ci-dessous.

CV(%)	Symmetry C18		Kromasil C18		Luna C18 (2)			Vydac 218TP C18	
	1 lot, 5 colonnes	10 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	1 lot, 5 colonnes	1 lot, 4 colonnes	9 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots
Test 1	0,141	1,194	0,343	2,781	1,349	0,248	2,923	0,161	3,900
Test 2	0,116	1,101	0,579	2,791	1,285	0,506	2,357	2,532	5,923
Test 3	0,289	2,151	0,634	2,416	1,330	0,928	2,069	0,996	6,867
Test 4	0,242	1,282	0,805	3,050	1,488	0,381	2,497	0,697	7,620
Test 5	0,225	2,002	1,318	3,684	6,799	1,837	6,267	5,803	19,522

Nous procédons de même pour les asymétries de pic, dont les données brutes sont fournies ci-dessous.

CV(%)	Symmetry C18		Kromasil C18		Luna C18 (2)		Vydac 218TP C18		Chromolith 6 colonnes = 6 lots
	1 lot, 5 colonnes	10 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	1 lot, 5 colonnes	9 lots	1 lot, 5 colonnes	6 lots	
Thiourée	0,908	1,561	1,732	1,988	3,178	3,178	1,266	3,802	1,375
Phénol	0,702	1,841	1,346	1,218	3,067	4,153	1,284	3,958	1,224
1-Chloro-4-nitrobenzene	0,554	4,115	1,416	0,781	3,275	4,97	1,249	4,184	1,712
Toluène	0,728	2,799	1,259	0,838	3,383	5,199	1,585	4,349	1,921
Ethylbenzène	0,71	2,815	1,338	0,906	3,229	5,114	1,595	3,708	2,172
Propylbenzène					2,955	5,129			
Butylbenzène	0,65	2,937	1,406	1,21	2,728	4,851	1,619	3,167	2,435
o-Terphényle	0,607	2,706	1,388	1,177	2,38	4,832	1,321	3,24	2,657
Pentylbenzène	0,8	2,876	1,268	1,073			1,618	3,461	2,501
Triphénylène	0,603	3,01	1,333	0,882	2,371	4,998	1,28	2,634	2,368
Thiourée	0,636	1,592	0,838	1,504	2,105	3,073	1,288	3,859	1,718
Aniline	1,579	5,847	5,868	55,722	3,943	5,895	3,978	13,48	4,945
Phénol	0,758	2,272	0,901	1,483	3,497	4,374	1,471	5,807	1,366
Toluidines	1,824	8,519							3,421
N,N-Diméthylaniline	0,781	7,205	0,584	25,144	1,386	5,503	2,9	13,231	10,645
Ethylbenzoate	1,102	3,198	1,172	1,91	2,097	4,741	2,252	3,794	2,774
Toluène	1,029	2,763	1,173	1,819	1,957	4,06	2,486	3,527	2,227
Ethylbenzène	0,951	2,859	1,033	1,596	1,718	3,217	2,555	3,583	2,553
Thiourée	1,425	1,945	1,705	2,983	2,525	3,221	1,403	5,349	1,869
Théobromine	0,908	1,976	1,056	1,776	2,471	3,195	6,035	8,444	3,293
Théophylline	1,072	2,377	0,627	1,705	2,573	2,641	2,762	8,95	1,867
Caféine	1,129	3,612	0,785	1,969	2,218	4,075	1,338	2,953	3,797
Pyridine	1,121	12,452	2,856	48,98	4,147	11,72			4,791
Phénol	0,977	2,383	0,74	1,256	2,147	4,25	1,626	5,173	2,804
2,2-Dipyridyl	16,201	34,723	18,435	65,839	24,263	24,446			22,59
2,3-Dihydroxynaphthalene			5,774	23,779	11,215		23,845	24,65	11,968
Thiourée	0,711	1,681	1,399	6,218	4,328	5,132	3,254	5,188	1,618
Propranol	0,506	9,691	2,23	11,316	2,943	6,886	6,399	11,331	1,461
Butylparaben	0,789	2,44	3,046	7,55	3,572	7,816	2,897	5,304	10,498
Dipropylphthalate	0,854	2,572	3,108	8,685	3,525	7,988	2,839	6,043	2,089
Naphtalène	1,084	3,533	3,386	9,475					1,675
Acenaphthène	1,276	3,106	3,389	9,641	3,396	8,809	4,153	6,709	2,011
Amitriptyline	0,961	4,206	7,054	12,397	3,069	7,76			19,386
Thiourée			1,189	3,895	5,013	4,645	9,583	7,177	1,165
Procaïnamide	0,797	1,948	5,783	8,233	3,72	4,157	8,221	4,701	3,628
Benzylamine (load 1)					3,981	3,631			2,803
Benzylamine (load 2)					3,118	3,662			2,985
Benzylamine	0,606	2,923	1,602	8,874			7,854	8,278	
Benzyl alcohol	1,042	4,223	1,949	5,781	5,415	6,929	10,769	8,326	1,992
Phénol	1,409	4,125			5,652	6,971	8,11	10,86	1,964
Acide benzoïque	2,529	6,667	2,452	6,745	5,106	6,832	9,554	10,046	3,287

Les CV moyens relatifs aux asymétries figurent dans le tableau ci-contre.

CV(%)	<i>Symmetry C18</i>		<i>Kromasil C18</i>		<i>Luna C18 (2)</i>		<i>Vydac 218TP C18</i>		<i>Chromolith</i>
	<i>1 lot, 5 colonnes</i>	<i>10 lots</i>	<i>1 lot, 5 colonnes</i>	<i>6 lots</i>	<i>1 lot, 5 colonnes</i>	<i>9 lots</i>	<i>1 lot, 5 colonnes</i>	<i>6 lots</i>	<i>6 lots</i>
Test 1	0,673	2,945	1,345	1,024	2,947	4,916	1,453	3,628	2,170
Test 2	1,206	5,208	2,563	24,996	2,610	4,717	2,713	8,467	4,935
Test 3	6,682	15,215	7,407	32,317	10,378	11,451	11,109	12,606	10,093
Test 4	0,943	4,938	4,013	9,974	3,311	7,876	4,320	7,714	9,123
Test 5	1,447	4,281	3,385	7,507	4,596	5,585	8,970	8,704	2,845

Les résultats s'avèrent nettement plus dispersés qu'avec les facteurs de rétention.

Il apparaît alors intéressant de comparer ces valeurs à celles obtenues lors d'une autre étude, qui se fonde sur les mesures d'asymétries de composés basiques uniquement pour estimer les variabilités intra et interlots de différentes phases stationnaires ; ces résultats sont directement reproduits des travaux de Stella *et al.* [238].

<i>Phase stationnaire</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Variabilité</i>	<i>pH = 3,0</i>	<i>pH = 7,0</i>	<i>pH = 10,5</i>
Nucléosil C18 AB	Macherey-Nagel	intra-lot	2,9	11,6	—
		inter-lot	8,5	24,5	—
Supelcosil ABZ Plus	Supelco	intra-lot	5,1	8,8	—
		inter-lot	5	8,3	—
Discovery RP-C16 Amide	Supelco	intra-lot	2,1	3,1	—
		inter-lot	2,8	3,1	—
Nucléosil C18 Nautilus	Macherey-Nagel	intra-lot	3,7	6,3	—
		inter-lot	11	9,7	—
Zorbax Extend C18	Agilent	intra-lot	6	4,8	3,5
		inter-lot	6,3	13,8	4,3

B Résultats

Dans cette partie figurent tous les résultats du Chapitre VI, regroupés par niveaux d'exploitation pour les deux phases stationnaires étudiées.

1 Phase stationnaire : SymmetryShield RP18

a Facteurs de rétention

Au niveau 1, dans le méthanol

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	CV (%)	$\hat{\sigma}$	CV (%)
Digitoxine	0,0252	1,57	0,0026	0,16
Clofazimine	0,1350	4,39	0,0052	0,17
Amiodarone	0,3419	3,28	0,0096	0,09
Butylbenzène	0,0518	1,00	0,0017	0,03
Pentylbenzène	0,0671	0,89	0,0021	0,03
o-Terphényle	0,0645	0,90	0,0023	0,03
Triphénylène	0,0984	0,64	0,0043	0,03
Strychnine	0,1177	2,36	0,0160	0,32
d-Tubocurarine	0,1698	2,68	0,0566	0,89
Atropine	0,1254	2,76	0,0406	0,89
Ampicilline	0,0270	0,89	0,0105	0,35
Cyanocobalamine	0,0586	1,23	0,0195	0,41

Vancomycine	0,0332	1,83	0,0134	0,74
Caféine	0,0407	1,15	0,0126	0,36
Benzylamine	0,0333	4,41	0,0041	0,54

Au niveau 1, dans l'acétonitrile

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0186	2,99	0,0006	0,09
Clofazimine	0,1796	4,63	0,0082	0,21
Amiodarone	0,2448	3,41	0,0088	0,12
Butylbenzène	0,0552	1,03	0,0017	0,03
Pentylbenzène	0,0756	0,99	0,0028	0,04
o-Terphényle	0,0681	1,02	0,0028	0,04
Triphénylène	0,0929	0,95	0,0037	0,04
Strychnine	0,0772	1,55	0,0140	0,28
d-Tubocurarine	0,3341	2,63	0,0129	0,10
Atropine	0,0866	1,74	0,0112	0,23
Ampicilline	0,0099	0,82	0,0038	0,31
Cyanocobalamine	0,0211	0,72	0,0101	0,34
Vancomycine	0,0190	2,05	0,0069	0,74
Caféine	0,0102	0,42	0,0106	0,43
Benzylamine	0,0161	2,66	0,0063	1,04

Au niveau 2, par famille de solutés dans chaque solvant

	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Lot	Résiduelle	Lot	Résiduelle
Total	2,34	0,45	2,18	0,39
Neutres hydrophobes	0,87	0,03	1,00	0,04
Polaires hydrophobes	3,29	0,15	3,74	0,15
Hydrophobes	2,25	0,10	2,56	0,10
Hydrophiles	2,42	0,61	1,77	0,52

Au niveau 3, par famille de solutés pour les deux solvants

<i>2 solvants</i>	<i>Lot</i>	<i>Résiduelle</i>
Total	2,26	0,42
Neutres hydrophobes	0,94	0,03
Polaires hydrophobes	3,52	0,15
Hydrophobes	2,41	0,10
Hydrophiles	2,12	0,57

b Asymétries de pic

Au niveau 1, dans le méthanol

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0617	5,47	0,0050	0,44
Clofazimine	0,1474	10,82	0,0096	0,70
Amiodarone	0,0653	5,36	0,0018	0,15

Butylbenzène	0,0710	6,81	0,0041	0,39
Pentylbenzène	0,0589	5,73	0,0050	0,49
o-Terphényle	0,0911	8,15	0,0037	0,33
Triphénylène	0,0824	7,20	0,0044	0,38
Strychnine	0,1106	6,14	0,0095	0,53
d-Tubocurarine	0,1227	4,64	0,0633	2,39
Atropine	0,3722	14,90	0,0556	2,23
Ampicilline	0,1184	12,11	0,0096	0,98
Cyanocobalamine	0,0594	5,49	0,0069	0,64
Vancomycine	0,0431	3,91	0,0028	0,26
Caféine	0,0797	7,07	0,0133	1,18
Benzylamine	0,0426	1,98	0,0181	0,85

Au niveau 1, dans l'acétonitrile

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0643	5,43	0,0021	0,18
Clofazimine	0,3398	21,11	0,0062	0,39
Amiodarone	0,1673	13,10	0,0043	0,33
Butylbenzène	0,0836	8,42	0,0036	0,36
Pentylbenzène	0,0783	8,06	0,0064	0,66
o-Terphényle	0,1085	10,55	0,0057	0,55
Triphénylène	0,1077	10,35	0,0034	0,33
Strychnine	0,1939	9,71	0,0156	0,78
d-Tubocurarine	0,1319	3,58	0,0557	1,51
Atropine	0,1093	3,64	0,0283	0,94
Ampicilline	0,1053	9,96	0,0057	0,54
Cyanocobalamine	0,0563	5,22	0,0041	0,38
Vancomycine	0,0337	2,99	0,0048	0,43
Caféine	0,0794	7,14	0,0050	0,45
Benzylamine	0,0764	3,52	0,0254	1,17

Au niveau 2, par famille de solutés dans chaque solvant

	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Lot	Résiduelle	Lot	Résiduelle
Total	7,75	1,03	9,38	0,69
Neutres hydrophobes	7,03	0,40	9,41	0,49
Polaires hydrophobes	7,65	0,49	14,68	0,31
Hydrophobes	7,30	0,44	11,96	0,43
Hydrophiles	8,12	1,35	6,31	0,86

Au niveau 3, par famille de solutés pour les deux solvants

<i>2 solvants</i>	<i>Lot</i>	<i>Résiduelle</i>
Total	8,60	0,88
Neutres hydrophobes	8,31	0,45
Polaires hydrophobes	11,71	0,41
Hydrophobes	9,91	0,43
Hydrophiles	7,27	1,13

c Efficacité

Au niveau 1, dans le méthanol

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,1655	3,13	0,0654	1,24
Clofazimine	0,5559	12,30	0,0571	1,26
Amiodarone	0,1042	3,21	0,0101	0,31
Butylbenzène	0,1479	6,67	0,0292	1,32
Pentylbenzène	0,1469	6,60	0,0180	0,81
o-Terphényle	0,0964	4,06	0,0251	1,06
Triphénylène	0,0741	3,10	0,0242	1,01
Strychnine	0,3969	9,77	0,0726	1,79
d-Tubocurarine	< 0,1091	< 1,41	0,7059	9,14
Atropine	3,0123	31,00	0,4691	4,83
Ampicilline	< 0,0050	< 0,15	0,0937	2,77
Cyanocobalamine	0,0301	0,58	0,0328	0,63
Vancomycine	0,4216	4,16	0,2628	2,59
Caféine	0,0244	1,00	0,0411	1,68
Benzylamine	0,7826	7,24	0,2969	2,75

Au niveau 1, dans l'acétonitrile

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,2752	7,03	0,0544	1,39
Clofazimine	1,3794	31,97	0,0424	0,98
Amiodarone	0,2824	9,90	0,0092	0,32
Butylbenzène	0,0628	2,64	0,0120	0,50
Pentylbenzène	0,0294	1,18	0,0168	0,67
o-Terphényle	0,0384	1,73	0,0128	0,58
Triphénylène	0,0389	1,70	0,0082	0,36
Strychnine	0,6290	15,21	0,0485	1,17
d-Tubocurarine	0,6652	9,31	0,1185	1,66
Atropine	1,5797	14,89	0,2417	2,28
Ampicilline	0,0994	3,11	0,0420	1,31
Cyanocobalamine	0,0608	1,41	0,0781	1,82
Vancomycine	0,2658	3,83	0,0748	1,08
Caféine	0,0896	4,00	0,0364	1,63
Benzylamine	0,8199	8,30	0,1397	1,42

Niveau 2 : par famille de solutés dans chaque solvant

	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Lot	Résiduelle	Lot	Résiduelle
Total	9,71	3,09	11,06	1,27
Neutres hydrophobes	5,34	1,06	1,89	0,54
Polaires hydrophobes	7,56	1,04	19,74	1,00
Hydrophobes	6,39	1,05	13,00	0,77
Hydrophiles	11,87	4,11	9,02	1,59

Niveau 3 : par famille de solutés pour les deux solvants

<i>2 solvants</i>	<i>Lot</i>	<i>Résiduelle</i>
Total	10,41	2,36
Neutres hydrophobes	4,01	0,84
Polaires hydrophobes	14,95	1,02
Hydrophobes	10,24	0,92
Hydrophiles	10,54	3,12

2 Phase stationnaire : XTerra RP18

a Facteurs de rétention

Au niveau 1, dans le méthanol

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0230	1,84	0,0026	0,21
Clofazimine	0,0194	0,99	0,0052	0,26
Amiodarone	0,0542	0,93	0,0096	0,17
Butylbenzène	0,0454	1,47	0,0017	0,05
Pentylbenzène	0,0684	1,61	0,0021	0,05
o-Terphényle	0,0540	1,20	0,0023	0,05
Triphénylène	0,1236	1,59	0,0043	0,06
Strychnine	0,0168	0,45	0,0160	0,43
d-Tubocurarine	< 0,0218	< 0,45	0,0566	1,17
Atropine	< 0,0096	< 0,31	0,0406	1,28
Ampicilline	0,0253	1,38	0,0105	0,57
Cyanocobalamine	0,0238	0,67	0,0195	0,55
Vancomycine	0,0179	1,00	0,0134	0,75
Caféine	0,0317	1,25	0,0126	0,50
Benzylamine	0,0112	1,68	0,0041	0,62

Au niveau 1, dans l'acétonitrile

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0144	2,39	0,0006	0,09
Clofazimine	0,0996	4,00	0,0082	0,33
Amiodarone	0,0692	1,70	0,0088	0,22
Butylbenzène	0,0398	1,24	0,0017	0,05
Pentylbenzène	0,0566	1,30	0,0028	0,06
o-Terphényle	0,0448	1,08	0,0028	0,07
Triphénylène	0,0603	1,06	0,0037	0,07
Strychnine	0,0120	0,28	0,0140	0,33
d-Tubocurarine	0,0909	0,80	0,0129	0,11
Atropine	0,0136	0,34	0,0112	0,28
Ampicilline	0,0105	1,05	0,0038	0,38
Cyanocobalamine	0,0273	1,02	0,0101	0,38
Vancomycine	0,0113	1,05	0,0069	0,64
Caféine	0,0114	0,58	0,0106	0,54
Benzylamine	0,0084	1,31	0,0063	0,98

Niveau 2 : par famille de solutés dans chaque solvant

	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Lot	Résiduelle	Lot	Résiduelle
Total	1,21	0,59	1,55	0,39
Neutres hydrophobes	1,48	0,05	1,17	0,06
Polaires hydrophobes	1,32	0,22	2,86	0,23
Hydrophobes	1,41	0,15	2,07	0,16
Hydrophiles	1,00	0,79	0,88	0,52

Niveau 3 : par famille de solutés pour les deux solvants

<i>2 solvants</i>	<i>Lot</i>	<i>Résiduelle</i>
Total	1,39	0,50
Neutres hydrophobes	1,33	0,06
Polaires hydrophobes	2,23	0,23
Hydrophobes	1,77	0,15
Hydrophiles	0,94	0,67

b Asymétries de pic

Au niveau 1, dans le méthanol

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0148	1,25	0,0050	0,42
Clofazimine	0,0465	3,47	0,0096	0,72
Amiodarone	0,0246	2,04	0,0018	0,15
Butylbenzène	0,0307	2,44	0,0041	0,32
Pentylbenzène	0,0451	3,74	0,0050	0,42
o-Terphényle	0,0176	1,44	0,0037	0,30
Triphénylène	0,0214	1,84	0,0044	0,37
Strychnine	0,0685	4,35	0,0095	0,60
d-Tubocurarine	< 0,0334	< 2,04	0,0633	3,87
Atropine	0,1382	7,16	0,0556	2,88
Ampicilline	0,0137	1,23	0,0096	0,87
Cyanocobalamine	0,0105	0,96	0,0069	0,63
Vancomycine	0,0189	1,66	0,0028	0,25
Caféine	0,0289	2,46	0,0133	1,13
Benzylamine	0,0890	4,87	0,0181	0,99

Au niveau 1, dans l'acétonitrile

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,0353	2,76	0,0021	0,17
Clofazimine	0,0480	3,35	0,0062	0,44
Amiodarone	0,0692	5,14	0,0043	0,32
Butylbenzène	0,0237	2,11	0,0036	0,32
Pentylbenzène	0,0378	3,49	0,0064	0,59
o-Terphényle	0,0205	1,77	0,0057	0,49
Triphénylène	0,0163	1,41	0,0034	0,30
Strychnine	0,1050	6,22	0,0156	0,92
d-Tubocurarine	0,1178	6,27	0,0557	2,97

Atropine	0,1780	8,16	0,0283	1,30
Ampicilline	0,0260	2,17	0,0057	0,47
Cyanocobalamine	0,0309	2,65	0,0041	0,35
Vancomycine	0,0280	2,37	0,0048	0,41
Caféine	0,0294	2,45	0,0050	0,41
Benzylamine	0,0939	4,97	0,0254	1,34

Niveau 2 : par famille de soluté dans chaque solvant

	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Lot	Résiduelle	Lot	Résiduelle
Total	3,14	1,37	4,16	1,00
Neutres hydrophobes	2,52	0,36	2,33	0,44
Polaires hydrophobes	2,43	0,49	3,88	0,33
Hydrophobes	2,48	0,42	3,09	0,40
Hydrophiles	3,63	1,84	4,91	1,31

Niveau 3 : par famille de solutés pour les deux solvants

<i>2 solvants</i>	<i>Lot</i>	<i>Résiduelle</i>
Total	3,69	1,20
Neutres hydrophobes	2,43	0,40
Polaires hydrophobes	3,24	0,41
Hydrophobes	2,81	0,41
Hydrophiles	4,31	1,60

c Efficacités

Au niveau 1, dans le méthanol

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,1820	2,29	0,0654	0,82
Clofazimine	0,5138	7,79	0,0571	0,86
Amiodarone	0,1886	4,14	0,0101	0,22
Butylbenzène	0,3405	9,95	0,0292	0,85
Pentylbenzène	0,3262	10,00	0,0180	0,55
o-Terphényle	0,3679	9,57	0,0251	0,65
Triphénylène	0,4220	12,35	0,0242	0,71
Strychnine	0,4080	6,71	0,0726	1,19
d-Tubocurarine	< 0,1827	< 1,84	0,7059	7,13
Atropine	0,2758	2,51	0,4691	4,27
Ampicilline	0,0726	1,32	0,0937	1,71
Cyanocobalamine	0,3805	4,73	0,0328	0,41
Vancomycine	1,2432	8,33	0,2628	1,76
Caféine	0,2679	7,21	0,0411	1,11
Benzylamine	0,5281	4,83	0,2969	2,71

Au niveau 1, dans l'acétonitrile

Soluté	<i>Lot</i>		<i>Résiduelle</i>	
	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>	$\hat{\sigma}$	<i>CV (%)</i>
Digitoxine	0,4562	6,85	0,0544	0,82
Clofazimine	0,6296	13,17	0,0424	0,89
Amiodarone	0,2390	6,46	0,0092	0,25
Butylbenzène	0,2749	9,48	0,0120	0,41
Pentylbenzène	0,2456	8,64	0,0168	0,59
o-Terphényle	0,2905	10,09	0,0128	0,45
Triphénylène	0,2858	9,94	0,0082	0,29
Strychnine	0,6201	10,44	0,0485	0,82
d-Tubocurarine	0,9400	10,43	0,1185	1,31
Atropine	0,5173	4,65	0,2417	2,17
Ampicilline	0,3172	6,14	0,0420	0,81
Cyanocobalamine	0,0382	0,57	0,0781	1,16
Vancomycine	0,3136	2,79	0,0748	0,67
Caféine	0,3260	9,57	0,0364	1,07
Benzylamine	0,7234	6,88	0,1397	1,33

Niveau 2 : par famille de solutés dans chaque solvant

	<i>MeOH</i>		<i>MeCN</i>	
	Lot	Résiduelle	Lot	Résiduelle
Total	7,05	2,43	8,37	0,99
Neutres hydrophobes	10,53	0,70	9,56	0,45
Polaires hydrophobes	5,26	0,70	9,35	0,71
Hydrophobes	8,67	0,70	9,47	0,58
Hydrophiles	5,25	3,26	7,28	1,25

Niveau 3 : par famille de solutés pour les deux solvants

<i>2 solvants</i>	<i>Lot</i>	<i>Résiduelle</i>
Total	7,74	1,86
Neutres hydrophobes	10,05	0,59
Polaires hydrophobes	7,59	0,71
Hydrophobes	9,08	0,64
Hydrophiles	6,35	2,47

Annexe 10 Comparaison régression PLS/régression MLR

Cette annexe reprend les résultats de l'étude de robustesse du Chapitre VII, pour laquelle nous n'avions présenté que le dépouillement issu de la régression PLS. Nous nous proposons de comparer les résultats du plan d'expérience issus des régressions MLR et PLS. Nous nous limitons aux résultats concernant les facteurs de rétention.

Les tableaux ci-dessous reprennent les valeurs des coefficients normalisés significatifs du modèle, pour le méthanol et l'acétonitrile à haute teneur en modificateur organique.

MeOH	<i>k'</i> Clofazimine		<i>k'</i> Amiodarone		<i>k'</i> Digétoxicine		<i>k'</i> Butylbenzène		<i>k'</i> Pentylbenzène		<i>k'</i> o-Terphényle		<i>k'</i> Triphénylène	
	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS
Constant	2,98	2,98	10,14	10,07	1,65	1,65	5,25	5,26	7,66	7,67	7,32	7,33	15,60	15,62
%S	-4,48	-3,57	-4,43	-3,45	-5,52	-4,26	-4,44	-3,44	-4,96	-3,84	-5,14	-3,98	-4,89	-3,79
T	-1,48	-1,11			-2,02	-1,69	-1,85	-1,53	-2,09	-1,72	-2,16	-1,77	-3,03	-2,46
pH	12,77	10,08	23,06	18,05										
Conc	-1,92	-1,36	-1,29	-1,10										
%S*%S														
T*T					-1,08		-0,75		-0,75		-0,63		-0,73	
pH*pH	1,19		3,42	2,12										
Conc*Conc														
%S*T														
%S*pH	-0,96	-0,54	-1,11	-0,69										
%S*Conc														
T*pH														
T*Conc														
pH*Conc	-0,68													

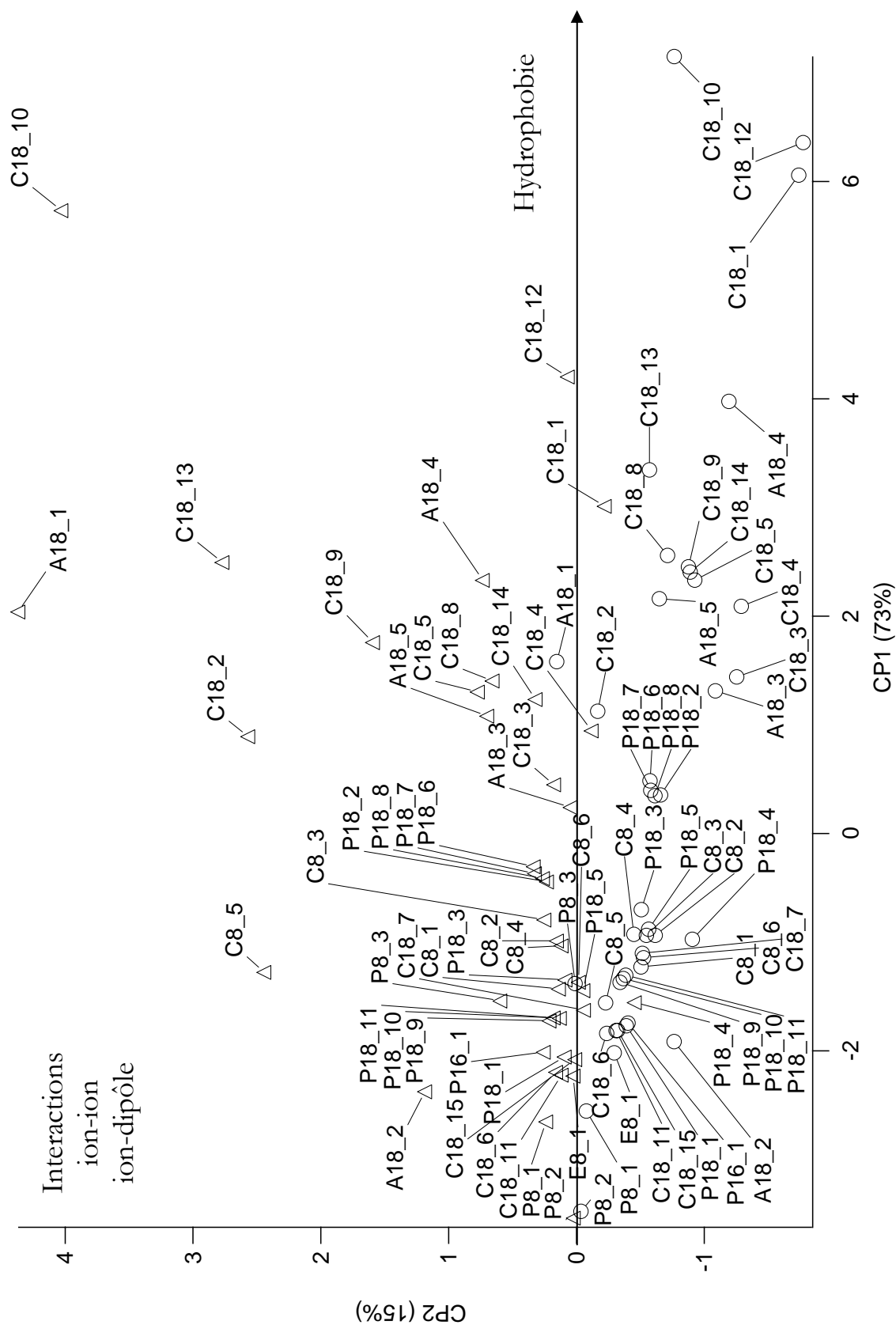
MeCN	<i>k'</i> Clofazimine		<i>k'</i> Amiodarone		<i>k'</i> Digétoxicine		<i>k'</i> Butylbenzène		<i>k'</i> Pentylbenzène		<i>k'</i> o-Terphényle		<i>k'</i> Triphénylène	
	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS
Constant	4,07	4,06	7,21	7,15	0,64	0,64	5,39	5,39	7,68	7,69	6,72	6,73	9,85	9,86
%S	-2,58	-1,99	-1,53	-1,25	-2,80	-2,19	-3,28	-2,58	-3,56	-2,80	-3,77	-2,98	-3,37	-2,61
T			1,62	1,42			-1,27	-1,04	-1,39	-1,14	-1,35	-1,11	-1,96	-1,52
pH	14,09	10,89	25,13	19,39										
Conc	-2,71		-1,78											
%S*%S														
T*T														
pH*pH			4,11	3,99										
Conc*Conc														
%S*T														
%S*pH														
%S*Conc														
T*pH														
T*Conc														
pH*Conc	-1,61													

La régression MLR se traduit toujours par des coefficients plus élevés que ceux obtenus avec la régression PLS, voire par l'apparition de coefficients supplémentaires. Il est possible que ces nouveaux coefficients possèdent une signification physico-chimique réelle. Néanmoins, la comparaison avec la régression PLS semble indiquer qu'ils jouent essentiellement un rôle compensateur, pour moduler l'influence des autres coefficients. Ceci se vérifie aussi à basse teneur en solvant (cf. tableaux suivants), soulignant ainsi la pertinence d'une approche PLS pour l'exploitation des plans d'expériences.

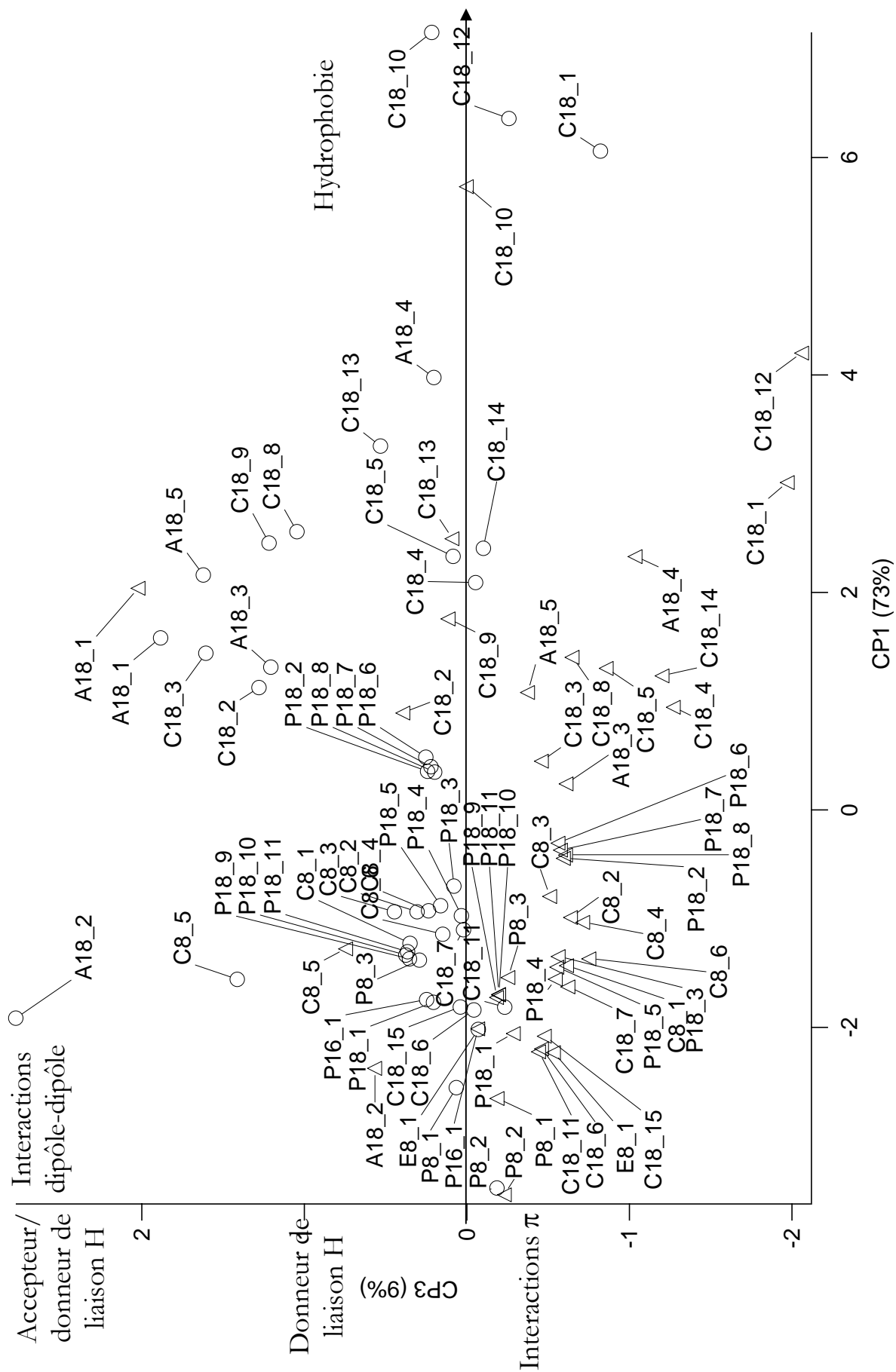
MeOH	<i>k'</i> Strychnine		<i>k'</i> d-Tubocurarine		<i>k'</i> Atropine		<i>k'</i> Ampicilline		<i>k'</i> Cyanocobalamin		<i>k'</i> Vancomycine		<i>k'</i> Caffeine		<i>k'</i> Benzylamine	
	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS
Constant	5,03	5,01	6,52	6,48	4,56	4,54	3,04	3,04	4,88	4,89	1,83	1,83	3,60	3,61	0,75	0,75
%S	-6,31	-4,79	-11,33	-8,76	-6,00	-4,54	-5,73	-4,43	-11,86	-9,17	-12,14	-9,36	-5,69	-4,41	-2,84	-2,14
T	-2,71	-2,14	-4,13	-2,87	-2,23	-1,76	-1,90	-1,59	-4,03	-3,30	-3,61	-2,91	-2,38	-1,93	-1,36	-1,13
pH	8,62	6,86	16,50	13,37	6,97	5,59	2,93	2,23	0,68		5,97	4,74			7,73	6,18
Conc	1,63	0,89			2,00	1,19									2,36	1,42
%S*%S									1,25							
T*T									-1,25							
pH*pH																
Conc*Conc																
%S*T									0,69							
%S*pH	-0,43				-0,78	-0,55					-0,67					
%S*Conc																
T*pH																
T*Conc																
pH*Conc			-2,45	-1,57	-0,50						-0,65					

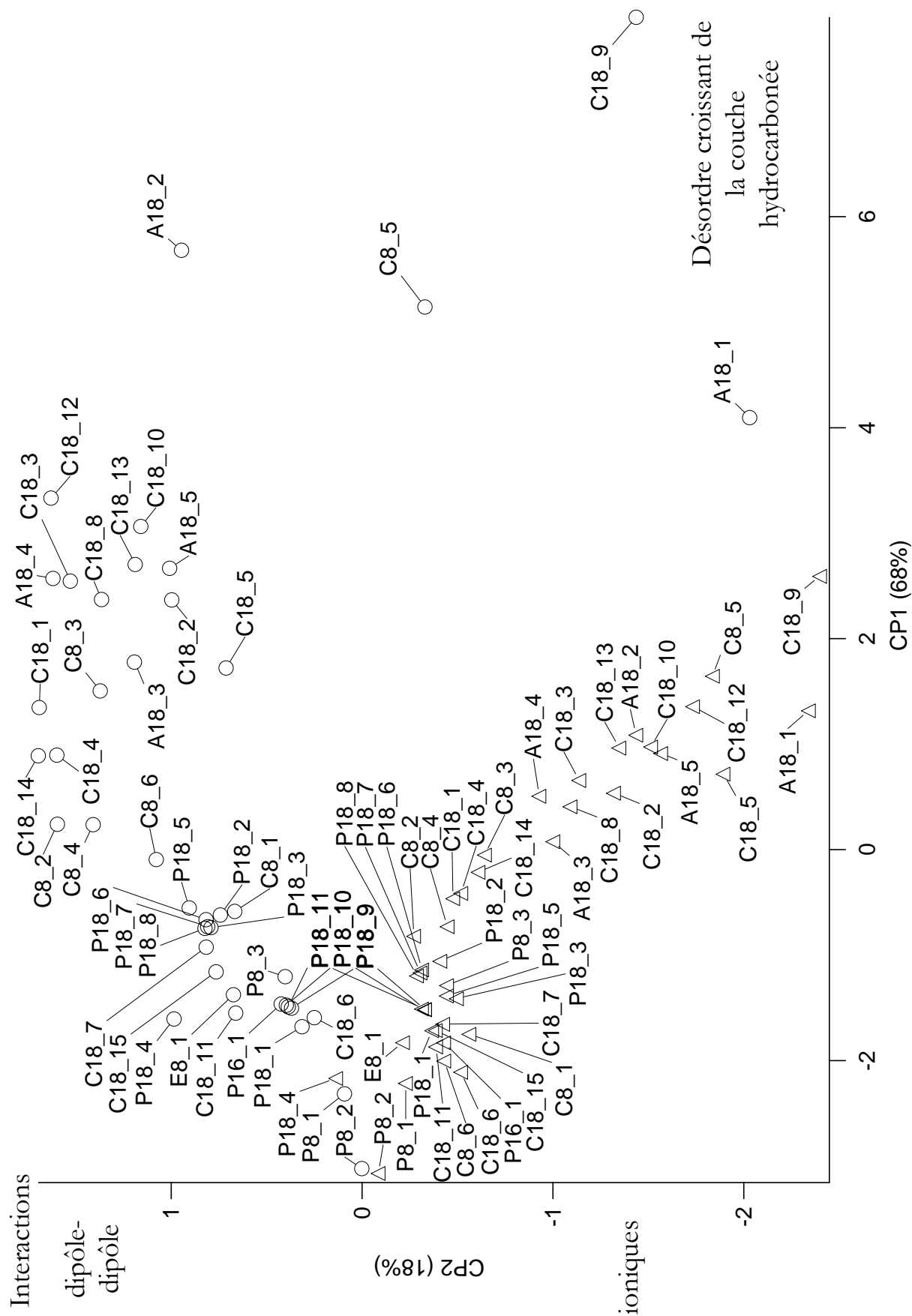
MeCN	<i>k'</i> Strychnine		<i>k'</i> d-Tubocurarine		<i>k'</i> Atropine		<i>k'</i> Ampicilline		<i>k'</i> Cyanocobalamin		<i>k'</i> Vancomycine		<i>k'</i> Caffeine		<i>k'</i> Benzylamine	
	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS	MLR	PLS
Constant	5,18	5,17	14,14	6,48	5,19	5,18	1,22	1,22	3,02	3,05	0,97	0,98	2,50	2,51	0,63	0,63
%S	-10,92	-8,69	-17,87	-8,76	-10,86	-8,49	-12,73	-10,02	-23,04	-18,06	-23,25	-18,25	-9,25	-7,43	-5,55	-4,48
T	-3,04	-2,33	-4,45	-2,87	-2,19	-1,65		-0,49	-3,13	-2,54	-2,56	-1,99	-2,23	-1,79	-1,97	-1,46
pH	8,16	6,42	15,02	13,37	7,33	5,85	4,24	3,22			7,14	5,62	0,80		8,84	6,83
Conc	0,89	0,84			1,29	1,02									1,39	1,26
%S*%S		0,86											1,65			
T*T																
pH*pH																
Conc*Conc																
%S*T																
%S*pH																
%S*Conc																
T*pH																
T*Conc																
pH*Conc				-1,57									0,89			

Cette annexe fournit les cartographies pleine page interprétées à haut et bas niveau de solvant.



ACP interprétée du plan CP1-CP2 – Haut niveau de solvant





ACP interprétée du plan CP1-CP2 – Bas niveau de solvant

