



Transfert de Méthodes LC : un changement de dimensions de colonne va-t-il accélérer mes analyses ?

Répondez à cette question en quelques secondes avec le logiciel en ligne de transfert de méthodes Restek Pro EZLC

Introduction

Le transfert de méthodes est un moyen efficace pour améliorer les méthodes de chromatographie liquide (LC), en économisant du temps, du solvant et des échantillons. Lors d'un transfert de méthodes, vous devez garder le même type de particules (par exemple SPP Raptor) et la même chimie de phase stationnaire (par exemple Biphenyl), mais il est possible qu'en utilisant une colonne plus courte, avec un diamètre interne plus faible et des particules plus petites, vous arriviez à augmenter votre cadence d'analyses tout en maintenant vos performances chromatographiques. Et la cadence d'analyses n'est qu'un seul des avantages potentiels d'un transfert de méthodes, à laquelle on peut ajouter plus de temps pour les maintenances de routine ou d'autres avantages liés à des méthodes plus rapides, tel que l'économie de solvant par exemple.

Mais seulement changer la colonne peut ne pas suffire, en particulier dans les cas où la séparation et la résolution de paires critiques sont essentielles. Vous devez modifier les conditions de la méthode afin qu'elles correspondent à la nouvelle colonne pour ne pas perdre en résolution, et c'est là que les logiciels de transfert de méthodes entrent en jeu.

Pour obtenir une séparation similaire sur un temps d'analyse plus court, vous devez changer votre colonne pour une colonne avec de plus petites dimensions, tout en maintenant la même efficacité (généralement exprimée en nombre total de plateaux théoriques). Mais il n'est pas toujours simple voire même possible de trouver de dimensions de colonne maintenant le même nombre de plateaux théoriques que la colonne d'origine (plus ou moins 10%). Cela ne veut pas dire qu'un transfert de la méthode est impossible ; cela veut simplement dire qu'il y aura des modifications dans votre séparation analytique. La nouvelle colonne et la nouvelle méthode peuvent encore vous aider à atteindre des performances chromatographiques acceptables sur un temps d'analyse plus court donc il vaut la peine de prendre du temps sur le logiciel de transfert de méthodes pour explorer toutes les options.

Voyons maintenant comment utiliser le logiciel de transfert de méthodes Restek Pro EZLC (www.restek.com/ezlc-mt/fr) pour déterminer si le transfert de votre méthode sur une nouvelle colonne vous fera gagner du temps tout en donnant des résultats fiables de qualité.

Scénario de transfert de méthode LC

Dans cet exemple, notre laboratoire a développé avec succès une méthode sur une colonne Raptor Biphenyl en 3.0 x 100 mm, 2.7µm. Nous avons également une colonne en 2.1 x 50 mm, 2.7µm au laboratoire et, sachant que le passage sur une colonne de plus petites dimensions peut diminuer le temps d'analyse, nous avons donc voulu savoir si nous pouvions transférer notre méthode sur cette colonne plus courte au diamètre interne plus faible.

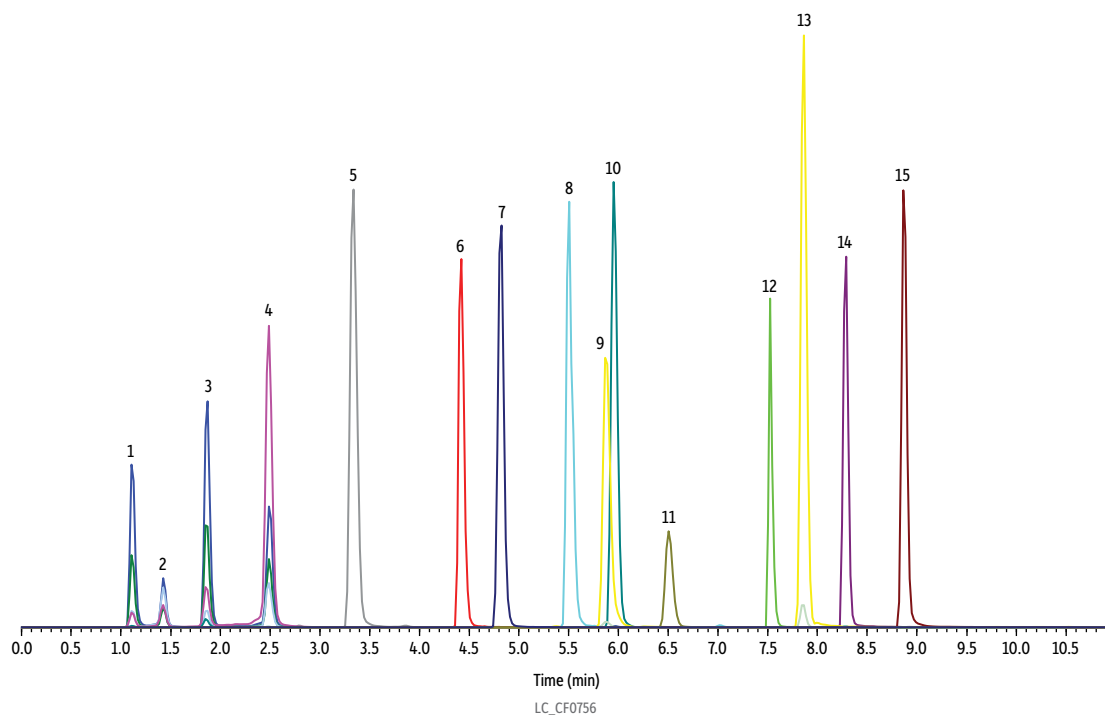
Dans ce cas précis, la plus petite des deux colonnes présente une perte importante du nombre de plateaux théoriques. Cela signifie que nous devons nous attendre à avoir une séparation différente sur un temps d'analyse plus court avec une méthode correctement transférée, et nous devons donc faire attention à ne pas trop compromettre les résolutions des paires critiques suite à ce transfert de méthode LC. Mais, même si nous savons que nous n'obtiendrons pas exactement la même séparation, pourrions-nous tout de même obtenir des performances chromatographiques acceptables ?

Calculer les conditions de la nouvelle méthode et prédire les nouveaux résultats est la définition même d'un logiciel de transfert de méthodes. Voyons donc comment cela fonctionne.

Exemple de transfert de méthode

Nous souhaitons transférer l'analyse de certaines drogues sur une colonne de plus petites dimensions pour voir si nous pouvons réduire encore davantage notre temps d'analyse mais sans sacrifier les performances chromatographiques de la colonne d'origine, dont nous sommes satisfaits. Sur les 15 molécules, il y a 5 paires de composés isobares qui nécessitent d'être séparés chromatographiquement, la MS/MS n'étant pas en mesure de les différencier. La méthode originale permet cette séparation chromatographique et nous allons donc nous intéresser plus particulièrement à ce point pour la méthode transférée. La Figure 1 montre les résultats de la méthode d'origine sur une colonne en 3.0 x 100 mm, 2.7µm.

Figure 1 : Résultats chromatographiques sur la colonne et la méthode d'origine.



Peaks	t_r (min)	Precursor Ion	Product Ion
1. Morphine	1.11	286.2	152.1
2. Hydromorphone	1.43	286.2	184.9
3. Norcodeine	1.86	286.1	151.9
4. Norhydrocodone	2.49	286.1	199.0
5. 6 β -Naltrexol	3.32	344.3	326.1
6. Tramadol	4.42	264.2	58.0
7. Normeperidine	4.82	234.1	160.2
8. Mirtazapine	5.50	266.1	195.1
9. Clozapine	5.87	328.2	271.1
10. Pentazocine	5.95	286.2	218.1
11. 7-Aminoflunitrazepam	6.50	284.1	135.0
12. Fluoxetine	7.53	310.1	148.0
13. Loxapine	7.86	328.1	271.1
14. EMDP	8.28	264.2	235.2
15. Thioridazine	8.87	371.2	126.1

Column Raptor Biphenyl (cat.# 9309A1E)

Dimensions: 100 mm x 3.0 mm ID

Particle Size: 2.7 μ m

Pore Size: 90 Å

Temp.: 40 °C

Sample

Diluent: Water

Conc.: 0.5-10 μ g/mL

Inj. Vol.: 5 μ L

Mobile Phase

A: Water, 0.1% formic acid

B: Methanol, 0.1% formic acid

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0.00	1.0	85	15
6.50	1.0	50	50
10.00	1.0	0	100

Detector MS/MS

Ion Source: Electrospray

Ion Mode: ESI+

Mode: MRM

Instrument UHPLC

Notes

A standard mix with 15 drugs of abuse was prepared in concentrations ranging from 500-10,000 ng/mL in water. The solution was vortexed at 3000 rpm for 10 seconds to mix, and the supernatant was injected for LC-MS/MS analysis.

L'étape suivante consiste à renseigner les informations sur notre colonne et méthode d'origine dans le logiciel de transfert de méthodes afin que celui-ci puisse calculer les conditions de méthode transférées en accord avec les dimensions de la nouvelle colonne. Il est à noter que lorsque l'on utilise ce logiciel, vous devez transférer les méthodes entre des colonnes ayant le même type de particules, par exemple de FPP à FPP ("Fully Porous Particles") ou de SPP à SPP ("Superficially Porous Particles" ou particules "Core-shell"). La Figure 2 montre comment saisir les valeurs d'origine : dimensions de la colonne, volume d'injection, "dwell" volume, volume extra-colonne et les conditions de phase mobile – une analyse en gradient dans ce cas.

Faites particulièrement attention aux valeurs par défaut du "dwell" volume et du volume extra-colonne car même si ces valeurs ne sont pas forcément celles de votre instrument, elles sont très importantes puisque le logiciel en tiendra compte lorsqu'il déterminera des valeurs comme les résolutions de paires critiques ou les temps de rétention des composés dans les conditions transférées. Si vous ne connaissez pas ces valeurs pour votre instrument, elles peuvent se trouver dans la documentation liée à l'instrument, mais vous pouvez également les demander à votre fabricant d'instrument ou trouver des moyens de les déterminer de manière empirique. Vous pouvez avoir plus de détails sur ces valeurs dans le glossaire du logiciel, accessible en cliquant sur le bouton "?" en haut à droite.

Figure 2 : Première étape dans l'utilisation d'un logiciel de transfert de méthodes LC : entrer les détails sur la colonne, l'instrument et la méthode actuels.

Pro EZLC Method Translator

Column	Original	Translation
Length	100	100 mm
Inner Diameter	3	3 mm
Particle Size	2.7	2.7 µm

Volume Effects		
Injection Volume	5	5 µL
Dwell Volume	0.25	0.25 mL
Extra-Column Volume Effect	17	8 µL

Method Program						
<input type="radio"/> Isocratic <input checked="" type="radio"/> Gradient	Time (min)	%B	Flow (mL/min)	Time (min)	%B	Flow (mL/min)
Steps (2-8) 5	0	15	1	0	15	1
	6.5	50	1	6.5	50	1
	10	100	1	10	100	1
	10.01	15	1	10.01	15	1
	11	15	1	11	15	1

Results		
Speed Gain	1.00	1.00 x
Back Pressure	1.00	1.00 x
Critical Pair Resolution	2.00	2.28 R _s
Compound Retention Time	10	10 min
Injection	100	100
Total Time	1100.00	1100.00 min
Solvent Usage	1100.00	1100.00 mL

Excellent translation

L'étape suivante consiste à entrer les dimensions de la nouvelle colonne, puis c'est au logiciel de transférer de faire son travail ! La Figure 3 montre la nouvelle colonne que nous souhaitons utiliser dans cet exemple. Une fois que les détails de la nouvelle colonne ont été saisis, un message d'avertissement peut s'afficher, comme c'est le cas dans notre exemple. L'avertissement sert à vous alerter de possibles changements de sélectivité avec les nouvelles conditions de la méthode (nous déterminerons plus loin dans notre exemple si cet avertissement était valable ou non). Pour obtenir une sélectivité similaire, il est important que la méthode transférée corresponde aux conditions de phase mobile avec lesquelles les composés sont élués dans la méthode d'origine. Le logiciel de transfert va tenter de déterminer de nouvelles conditions de phase mobile qui permettent aux composés d'éluer avec la même composition de phase mobile que la méthode d'origine, mais parfois les dimensions de la nouvelle colonne ne le permettent malheureusement pas. Si le volume de la nouvelle colonne est significativement différent de celui de la colonne d'origine, certains composés pourront être élués avant ou après que la composition d'origine de la phase mobile ne soit atteinte sur la nouvelle colonne. Dans ce cas, les composés à élution précoce peuvent éluer dans des conditions différentes de %B, et cela peut impacter votre sélectivité. Si vous souhaitez plus d'informations sur ce point, explorez le glossaire du logiciel. Il existe également une version téléchargeable du logiciel Pro EZLC, comprenant un tableau spécial permettant de visualiser cet effet.

Figure 3 : Renseigner manuellement les dimensions de la nouvelle colonne.

Pro EZLC Method Translator

Column	Original	Translation
Length	100	50 mm
Inner Diameter	3	2.1 mm
Particle Size	2.7	2.7 µm

Volume Effects

Injection Volume	5	1 µL
Dwell Volume	0.25	0.25 mL
Extra Column Volume Effect	17	8 µL

Method Program

☐ Isocratic
☒ Gradient

Steps (2-8)	Time (min)	%B	Flow (mL/min)
0	15	1	0.49
6.5	50	1	0.49
10	100	1	0.49
10.01	15	1	0.49
11	15	1	0.49

Results

Peak order may change in first half of gradient

Speed Gain	1.00	2.00 x
Back Pressure	1.00	0.50 x
Critical Pair Resolution	2.00	1.41 R _s
Compound Retention Time	10	8.37 min
Injections	100	100
Total Time	1100.00	550.00 min
Solvent Usage	1100.00	269.50 mL

Utiliser la partie sur les effets des volumes

La Figure 4 montre le nouveau volume d'injection et les nouvelles conditions de la méthode calculés par le logiciel Pro EZLC. Utiliser les mêmes "dwell" volume et volume extra-colonne si vous transférez la méthode sur le même instrument sans autres modifications. Mais si vous transférez la méthode sur un autre instrument (même du même modèle), ou faites certaines modifications à votre instrument, vous devrez alors prendre en compte les nouvelles valeurs pour ces deux volumes.

Figure 4 : Nouveau volume d'injection correspondant aux nouvelles dimensions de colonne et nouvelles conditions de la méthode pour tenter de faire correspondre le profil d'élution à celui de la méthode d'origine.

Pro EZLC Method Translator

Column	Original	Translation
Length	100	50 mm
Inner Diameter	3	2.1 mm
Particle Size	2.7	2.7 µm

Volume Effects

Injection Volume	5	1 µL
Dwell Volume	0.25	0.25 mL
Extra-Column Volume Effect	17	17 µL

Method Program

☐ Isocratic
 ☒ Gradient

Steps (2-8)	Time (min)	%B	Flow (mL/min)	Time (min)	%B	Flow (mL/min)
5	0	15	1	0	15	0.49
	6.5	50	1	3.2	50	0.49
	10	100	1	5	100	0.49
	10.01	15	1	5.01	15	0.49
	11	15	1	5.5	15	0.49

Results

Peak order may change in first half of gradient

Speed Gain	1.00	2.00 x
Back Pressure	1.00	0.50 x
Critical Pair Resolution	2.00	1.15 Rx
Compound Retention Time	10	3.37 min
Injections	100	100
Total Time	1100.00	550.00 min
Solvent Usage	1100.00	269.50 mL

Notez qu'il est possible de transférer des méthodes isocratiques ainsi que des méthodes en gradient, et que le débit transféré et calculé est un champ modifiable. Vous pouvez modifier ce débit calculé et ainsi voir comment il peut modifier les temps de rétention de vos analytes et leur résolution, comme il est montré dans la section Résultats ci-dessous.


Le logiciel de transfert de méthodes Pro EZLC tente de calculer des valeurs de débit se trouvant dans la plage idéale correspondante aux dimensions données des colonnes, donc si le débit transféré et calculé sort de cette plage de valeurs, le logiciel Pro EZLC l'ajustera dans une plage correspondante à la nouvelle colonne. Pour plus d'information sur cette fonctionnalité, veuillez consulter le glossaire.

Interprétation des résultats

Cette partie du logiciel de transfert de méthodes LC montrera les gains en vitesse d'analyse et les modifications attendues de contre-pression avec la méthode transférée sur la nouvelle colonne. Il vous permet également de calculer les économies de temps et de solvants sur un nombre donné d'analyses. Dans cet exemple, on remarque que la nouvelle méthode produit des résultats en deux fois moins de temps, avec deux fois moins de pression, et en utilisant seulement le quart de la quantité de solvant requise par la méthode de départ. Mais aurons-nous toujours une résolution adéquate pour nos paires critiques ? Les champs "Résolution de paire critique" et "Temps de rétention du composé" nous permettront de déterminer si la nouvelle colonne et la nouvelle méthode fourniront toujours des résultats acceptables.

Si nous nous attardons à nouveau sur les résultats de la méthode d'origine, nous pouvons voir que la paire critique avec la plus petite valeur de résolution est la paire morphine (pic 1) / hydromorphone (pic 2), avec une résolution de 4.88. Ces deux sont assez bien séparés et résolus et nous pouvons donc penser que la perte d'efficacité entre la colonne d'origine et la nouvelle colonne ne sacrifiera pas la résolution, mais nous pouvons vérifier cela tout simplement en renseignant la résolution d'origine de 4.88 dans le champ approprié et regardant la résolution attendue avec la nouvelle méthode (Figure 5). Nous renseignons également le temps de rétention de la morphine pour avoir une idée de sa modification avec les nouvelles conditions.

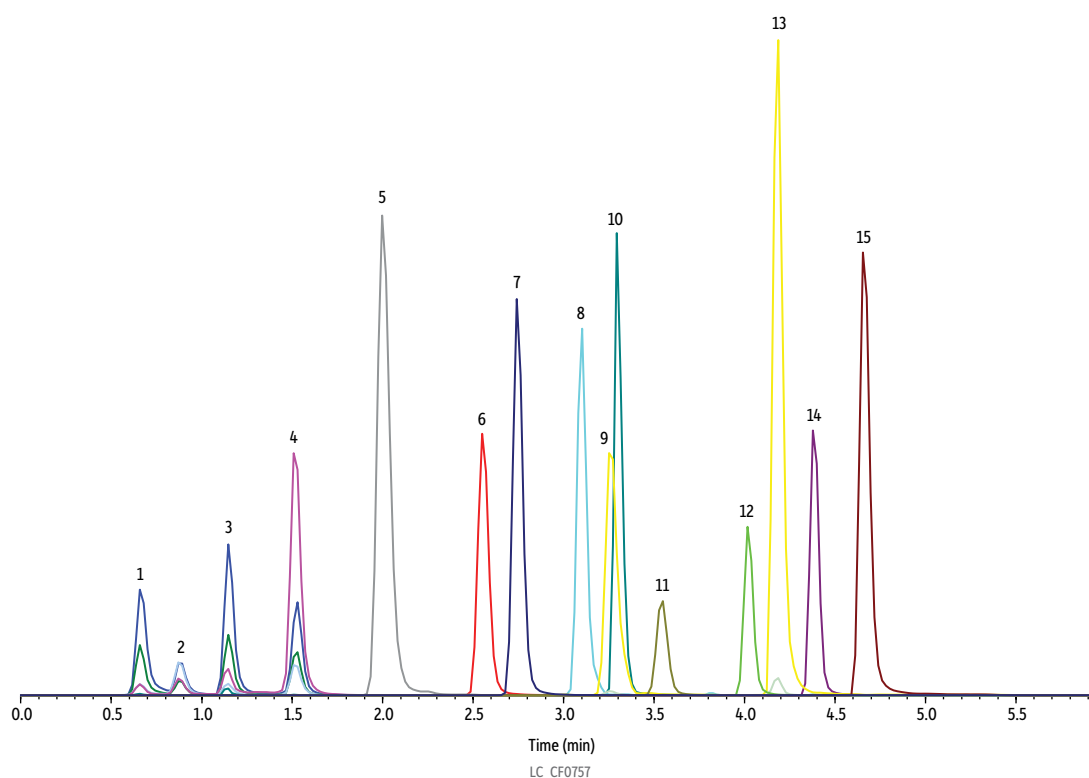
Figure 5 : Utilisation de la partie Résultats pour vérifier les résolutions et temps de rétention avec la nouvelle colonne et les nouvelles conditions de méthode.

Results		 Peak order may change in first half of gradient
Speed Gain	1.00	2.00 x
Back Pressure	1.00	0.50 x
Critical Pair Resolution	4.88	2.80 Rs
Compound Retention Time	1.11	0.65 min
Injections	100	100
Total Time	1100.00	550.00 min
Solvent Usage	1100.00	269.50 mL

Comme nous pouvions nous y attendre de par la perte en nombre de plateau, nous remarquons une diminution de la résolution entre ces deux paires critiques, mais nous remarquons également que la nouvelle résolution calculée est encore bien au-dessus de ce qui est requis pour avoir une séparation avec retour à la ligne de base ($R = 1.5$). En voyant ceci, nous pourrions conclure que si notre paire de composés la plus critique (éluant le plus tôt et ayant la résolution la plus faible) est toujours séparée et résolue avec la nouvelle colonne et les conditions transférées, alors tout devrait bien se passer pour le reste de notre séparation chromatographique, mais vérifions cela de façon pratique.

La Figure 6 montre les résultats empiriques d'un même mélange de composés analysés en utilisant les nouvelles dimensions de colonne et les conditions de méthode transférées.

Figure 6 : Résultats empiriques en utilisant la nouvelle colonne et les conditions de méthode transférées.



Peaks	t_r (min)	Precursor Ion	Product Ion
1. Morphine	0.66	286.2	152.1
2. Hydromorphone	0.88	286.2	184.9
3. Norcodeine	1.15	286.1	151.9
4. Norhydrocodone	1.51	286.1	199.0
5. 6β-Naltrexol	2.0	344.3	326.1
6. Tramadol	2.55	264.2	58.0
7. Normeperidine	2.74	234.1	160.2
8. Mirtazapine	3.1	266.1	195.1
9. Clozapine	3.26	328.2	271.1
10. Pentazocine	3.3	286.2	218.1
11. 7-Aminoflunitrazepam	3.54	284.1	135.0
12. Fluoxetine	4.02	310.1	148.0
13. Loxapine	4.18	328.1	271.1
14. EMDP	4.38	264.2	235.2
15. Thioridazine	4.66	371.2	126.1

Column Raptor Biphenyl (cat.# 9309A52)
Dimensions: 50 mm x 2.1 mm ID
Particle Size: 2.7 µm
Pore Size: 90 Å
Temp.: 40 °C

Sample
Diluent: Water
Conc.: 0.5-10 µg/mL
Inj. Vol.: 1 µL

Mobile Phase
A: Water, 0.1% formic acid
B: Methanol, 0.1% formic acid

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0.00	0.5	85	15
3.20	0.5	50	50
4.90	0.5	0	100

Detector MS/MS
Ion Source: Electrospray
Ion Mode: ESI+
Mode: MRM
Instrument UHPLC

Notes
A standard mix with 15 drugs of abuse was prepared in the concentrations ranging from 500-10,000 ng/mL in water. The solution was vortexed at 3000 rpm for 10 seconds to mix, and the supernatant was injected for LC-MS/MS analysis.

En analyse réelle, en utilisant la nouvelle colonne et la nouvelle méthode, le temps de rétention de la morphine était de 0.66 minute, soit seulement 0.01 minute de plus que le temps de rétention prédit par le logiciel de transfert de méthodes LC. La résolution entre la morphine et l'hydromorphone était de $R = 3.07$ lorsque la résolution prédite était de $R = 2.80$, soit une différence d'environ 10%, mais le logiciel reste toujours du côté "conservateur" en ce qui concerne la résolution de paires critiques. Donc, avec des résultats d'expérience démontrant une résolution encore meilleure que celle attendue, nous pouvons adopter la nouvelle colonne et les nouvelles conditions de méthode, sans craindre de perdre la résolution de nos paires critiques.

Si en revanche une paire critique avait eu une résolution de $R = 2$ dans les conditions d'origine, il est probable que ce transfert particulier (d'une colonne $3.0 \times 100 \text{ mm} - 2.7\mu\text{m}$ à une colonne $2.1 \times 50 \text{ mm} - 2.7\mu\text{m}$) aurait eu un pouvoir de résolution insuffisant dans les conditions transférées pour éviter une coélution (résolution prédite $R = 1.15$ dans ces conditions).

Conclusion

Il existe de nombreuses raisons pour lesquelles un laboratoire peut être intéressé à transférer une méthode d'une colonne à une autre, et un outil d'aide au transfert, en ligne et gratuit, comme le logiciel de transfert de méthodes Restek Pro EZLC, peut aider à déterminer les meilleures options en quelques minutes sur votre ordinateur plutôt qu'en quelques heures ou quelques jours au laboratoire. Et même si utilise majoritairement les transferts de méthodes LC pour gagner du temps, du solvant et/ou des échantillons, cela peut également fonctionner dans l'autre sens, comme dans l'exemple présenté ici. Si, par exemple, vous avez à transférer des méthodes développées sur des systèmes UHPLC de haute technologie vers des laboratoires équipés d'instruments HPLC "traditionnels", le logiciel de transfert de méthodes pourra vous aider à obtenir les mêmes résultats en utilisant des colonnes de plus grandes dimensions que celles d'origine.

Donc dans notre exemple, le laboratoire pourrait opérer le transfert en toute confiance, réduisant de moitié le temps d'analyse et la contre-pression (plus approprié pour les systèmes HPLC "traditionnels") et en utilisant juste le quart de la quantité de solvant qu'ils auraient autrement consommé, et il améliorera probablement également la sensibilité de la méthode.

Vous avez des méthodes à transférer dans votre laboratoire ? Si tel est le cas, n'hésitez pas à utiliser le logiciel de transfert de méthodes Restek Pro EZLC à l'adresse www.restek.com/ezlc-mt/fr et nous contacter si vous avez des questions. Bons transferts !