

Les Bonnes Pratiques en HPLC et UPLC

Les clés de la réussite pour vos analyses en HPLC
et/ou UPLC

La présentation va débuter dans quelques instants



Vérifier votre configuration audio. Vous devez entendre
une petite musique...

Les Bonnes Pratiques en HPLC et UPLC

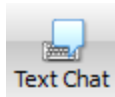
Les clés de la réussite pour vos analyses en HPLC
et/ou UPLC

Philippe Vassault

Responsable Business Colonne – Europe du Sud

Laura Charrier

Ingénieur Support Technique - France



Posez vos questions à tout moment en utilisant la boîte de dialogue.

Challenges dans les laboratoires

- S'assurer et veiller à l'exactitude des résultats analytiques via une démarche d'assurance qualité
- Minimiser le temps consommé dans le diagnostic de pannes instruments.
- Travailler avec des analyses robustes qui donneront des résultats pérennes quel que soit le technicien, le système, et le laboratoire.



Resultat du sondage d'inscription

- Question 1 : Dans votre laboratoire, vous utilisez principalement

Choices	Response Ratio	No. of Responses
I'HPLC	61% 	119
I'UHPLC	12% 	24
I'UPLC	28% 	54

- Question 2 : Sur les 6 derniers mois, avez-vous rencontré des difficultés sur une de vos méthodes ?

Choices	Response Ratio	No. of Responses
Oui	62% 	120
Non	39% 	77

- Question 3 : Quelle durée de vie de colonne, en nombre d'injections, attendez-vous ?

De 100 à 15 000 injections....

Sommaire

- Introduction
- Les aspects importants à considérer pour le bon déroulement d'une analyse chromatographique :
 - Les échantillons
 - Les phases mobiles
 - Le système
 - La colonne
 - La méthode

Préparation de l'échantillon

- Vérifier l'absence de particules visibles après la dilution de l'échantillon
 - **Photo** de ce que peut donner la dilution d'un produit fini à cause d'une formulation ou d'une matrice complexe et d'une description insuffisante ou inadéquate de la monographie



Donepezil Tablet Formulation:
Dilution en solvant, agitation
mécanique et sonication (d'après la
pharmacopée US)

Les conseils pour la préparation d'échantillons HPLC/UPLC

- Une filtration systématique :
 - Sur filtre à 0.2µm/0.45µm compatible avec le diluent utilisé.
- L'utilisation d'un filtre en ligne est recommandée.
- Une centrifugation peut être nécessaire pour enlever les microparticules.
 - Une centrifugation de 4000 à 12000RPM pendant 5 à 30 min permettra d'enlever les particules invisibles.



Donepezil Tablet dilué
préparé selon la
monographie
SALE (**très mauvaise**)



Echantillon après filtration
sur 0.2µm
Particules très fines:
Solution trouble (toujours
mauvaise)



Echantillon après filtration
et centrifugation à
12000RPM
Solution limpide(OK)

Cas des échantillons biologiques

Pourquoi des Echantillons plus Propres ?

Éliminer les interférences de la matrice d'échantillons

- Minimiser les effets de matrice
 - Élimination de la suppression/accroissement ionique
 - Réduction du bruit de fond

Meilleures limites de détection – sensibilité accrue

- Moins de variabilité dans les résultats obtenus
- Plus robustes entre les différentes matrices d'échantillons
 - i.e. Plasmas provenant de différents sujets ou espèces
- Gagner en sensibilité
- Minimiser l'encrassement du système et de la colonne

Solutions de préparation d'échantillon

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Niveau de propreté croissant

- Sirocco:
 - Précipitation de protéines rapide et simple
 - Echantillon filtrés
- Ostro:
 - Enlève les protéines et les phospholipides
 - Combinaison d'une Précipitation/filtration (pour les portéines) et d'une interaction sur sorbent (pour les phospholipides)
 - Des échantillons biologiques plus propres rapidement
- Oasis:
 - Sorbent polymérique pour de la SPE
 - Disponible en différents formats et différentes chimies
 - Plus spécifique pour des échantillons plus propres.



Recommandations Phases mobiles

- Utiliser des solvants, tampons et additifs de “haute qualité”

- Solvants organiques :
 - Qualité **High Grade** LC ou LC/MS, ne pas les filtrer
JT Baker, Biosolve, Fisher Optima LC/MS Grade

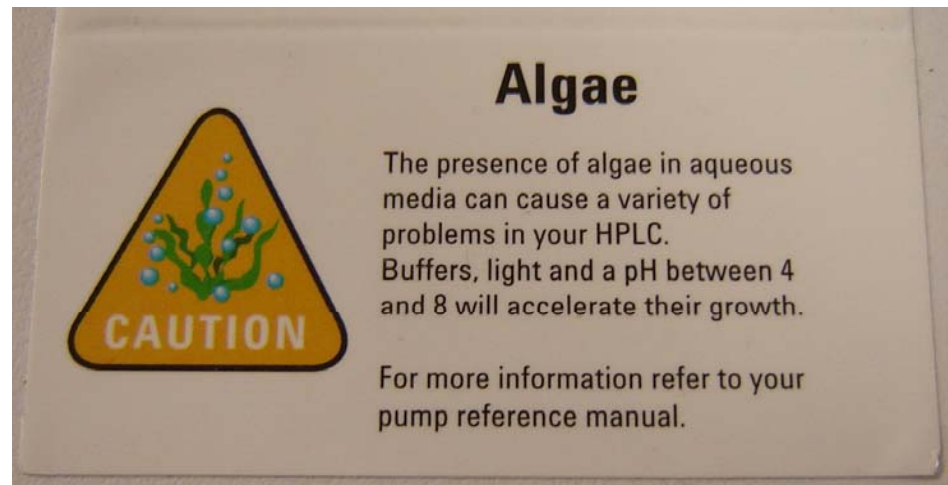
- L'eau :
 - L'eau Milli-Q est filtrée à travers une membrane 0.22 µm, pas besoin de la refiltrer.
 - Les tampons et réactifs compatibles LC/MS n'ont pas besoin d'être re-filtrés.
 - Changer les phases aqueuses chaque jour (UPLC) ou tous les 2 jours (HPLC)
 - Ne pas transférer les nouveaux solvants aqueux dans la bouteille déjà en utilisation.

Précautions à prendre pour les phases mobiles

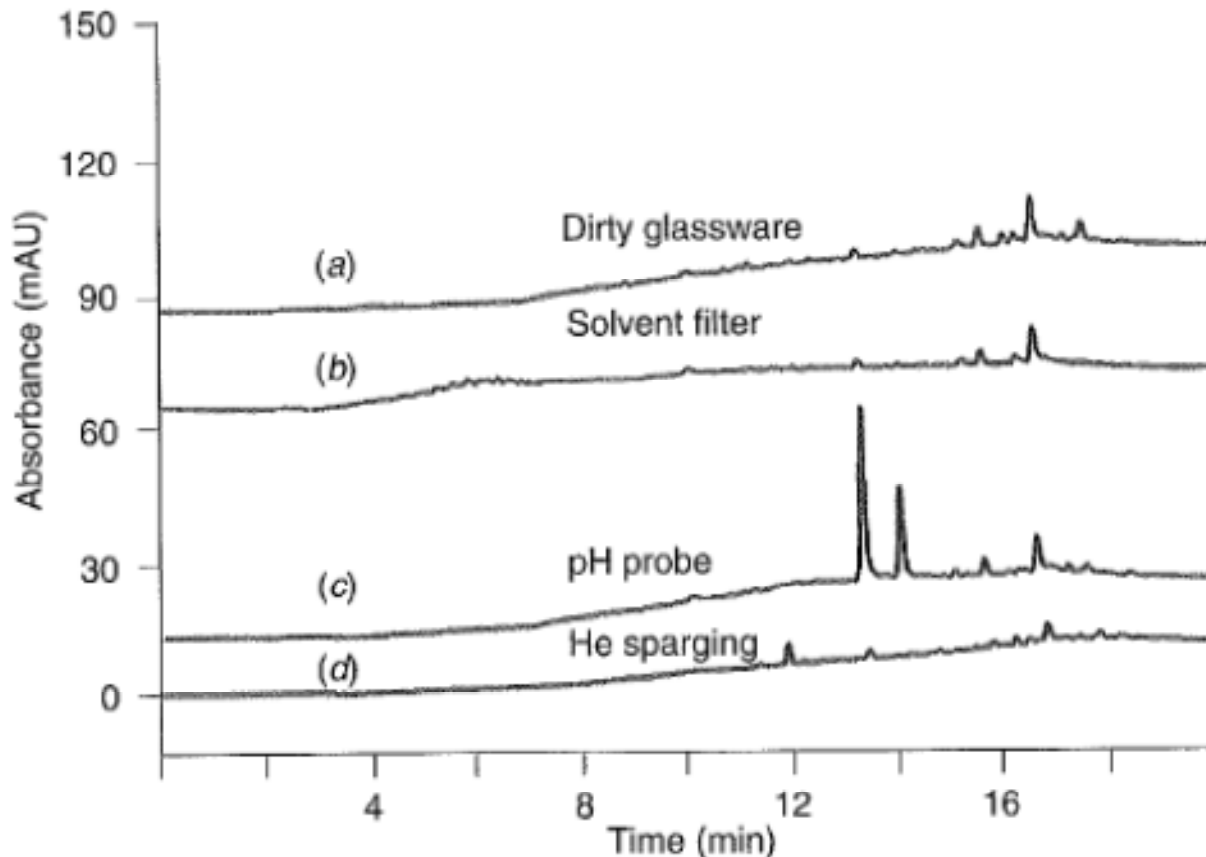
- Toutes les bouteilles doivent être fermées
 - Ne pas utiliser du *Parafilm*® pour couvrir les bouteilles
 - il peut se dissoudre et créer un pic parasite.
- Utiliser des bouteilles avec une certaine qualité de verre
 - en verre borosilicate pour les phases mobiles à haut pH.
- Utiliser de la verrerie propre (pour les bouteilles et la filtration)
 - Ne pas les laver au lave-vaisselle et utiliser des détergents

Contamination bactérienne : source de problème en UPLC comme en HPLC.

- La contamination bactérienne est une source classique de bouchage de colonne en UPLC, mais peut aussi l'être en HPLC
- Faire attention aux lignes 100% aqueuses :
 - Préparer les phases 100% aqueuse quotidiennement.
 - Note: Les filtres en lignes peuvent laisser passer certaines bactéries.
 - **Meilleure solution :**
 - En gradient: ajoutez 5 à 10% de solvant organique dans la bouteille contenant la phase aqueuse et modifier le gradient en conséquence.
 - En isocratique: prémélangez la phase mobile avec l'organique nécessaire.
- Nettoyez régulièrement les crépines



Autres sources de contamination



- Préparez et manipulez les échantillons proprement :
 - Utilisez des vials à un niveau de certification adapté à votre détection et à l'application :
"Vial selector" "Filter Selector"
<http://www.waters.com/app/selector/en/vials.html>
<http://www.waters.com/app/selector/en/filters.html>

TruView™ LCMS
CERTIFIED



Trucs et Astuces

CERTIFIED Containers

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

- Qu'est ce que c'est ?
 - Un kit de bouteilles certifiées pour une faible concentration TOC (Carbone Organique Total)
 - <15ppb TOC : les bouteilles ne contiennent pas de contaminants organiques
 - Pour éviter les problèmes de pics fantômes.

- Waters Certified Container Low Volume Kit
Référence 186007278
 - 5 Bouteilles de 250 mL
 - 1 Bouteille de 500 mL
 - 1 kit de bouchons

- Trouver les sources d'une contamination est consommateur de temps
 - Utiliser des contenants « Ultra-Clean » est un élément clé permettant d'obtenir des résultats fiables



Dysfonctionnements liés aux colonnes

- Colonne endommagée
 - Hydrolyse du ligand
 - Vide
 - Bouchage

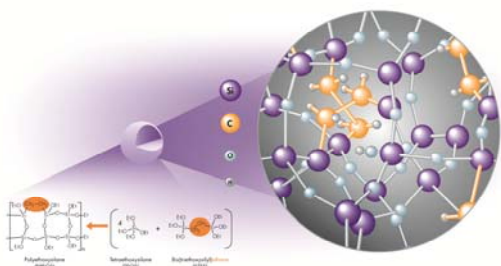
- Temps d'équilibration/rééquilibration insuffisant
 - 10 volumes de colonnes pour une bonne équilibration

- Interactions secondaires
 - Interactions ioniques
 - Interaction métalliques

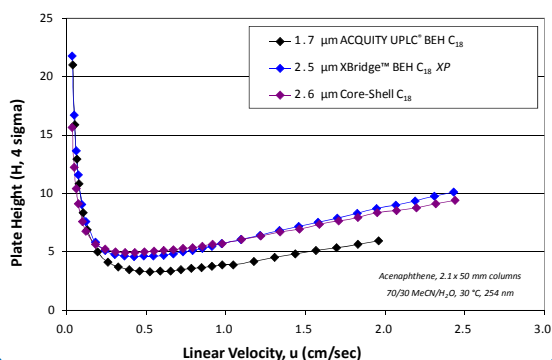
- Variabilité de fabrication

What makes an LC column reproducible?

A) Sorbents



B) Packing



C) Engineering

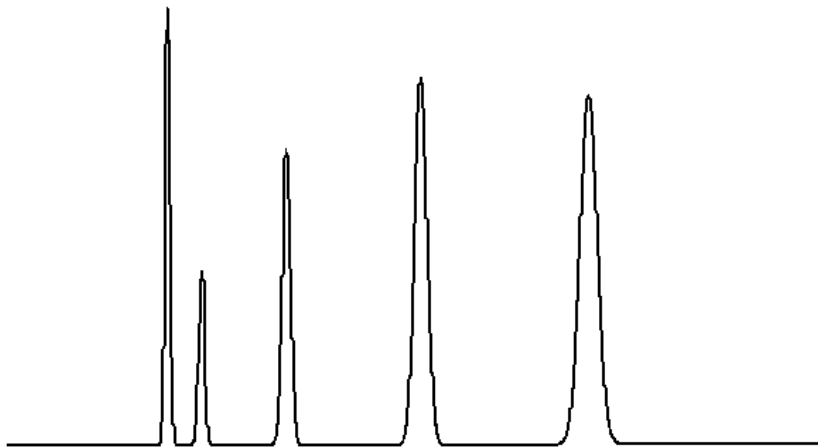


All are CRITICAL!

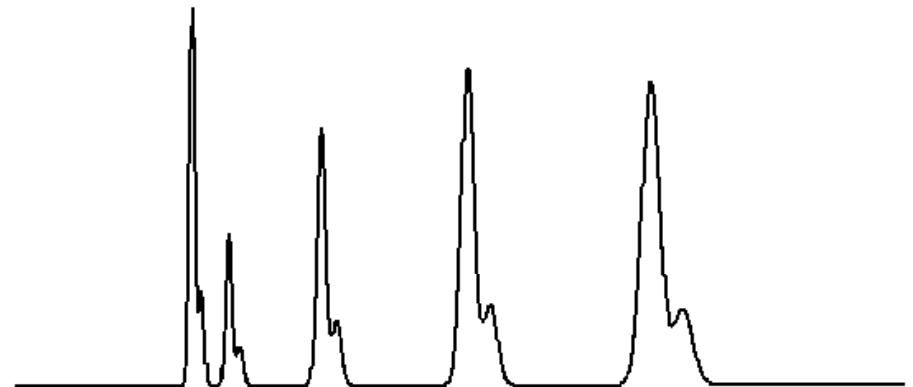
Effet d'un vide présent dans la colonne

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Colonne bien remplie



Colonne avec un espace vide



- ▶ Changement de forme de pic
- ▶ Changement de sensibilité
- ▶ Changement de résolution

Trucs est Astuces

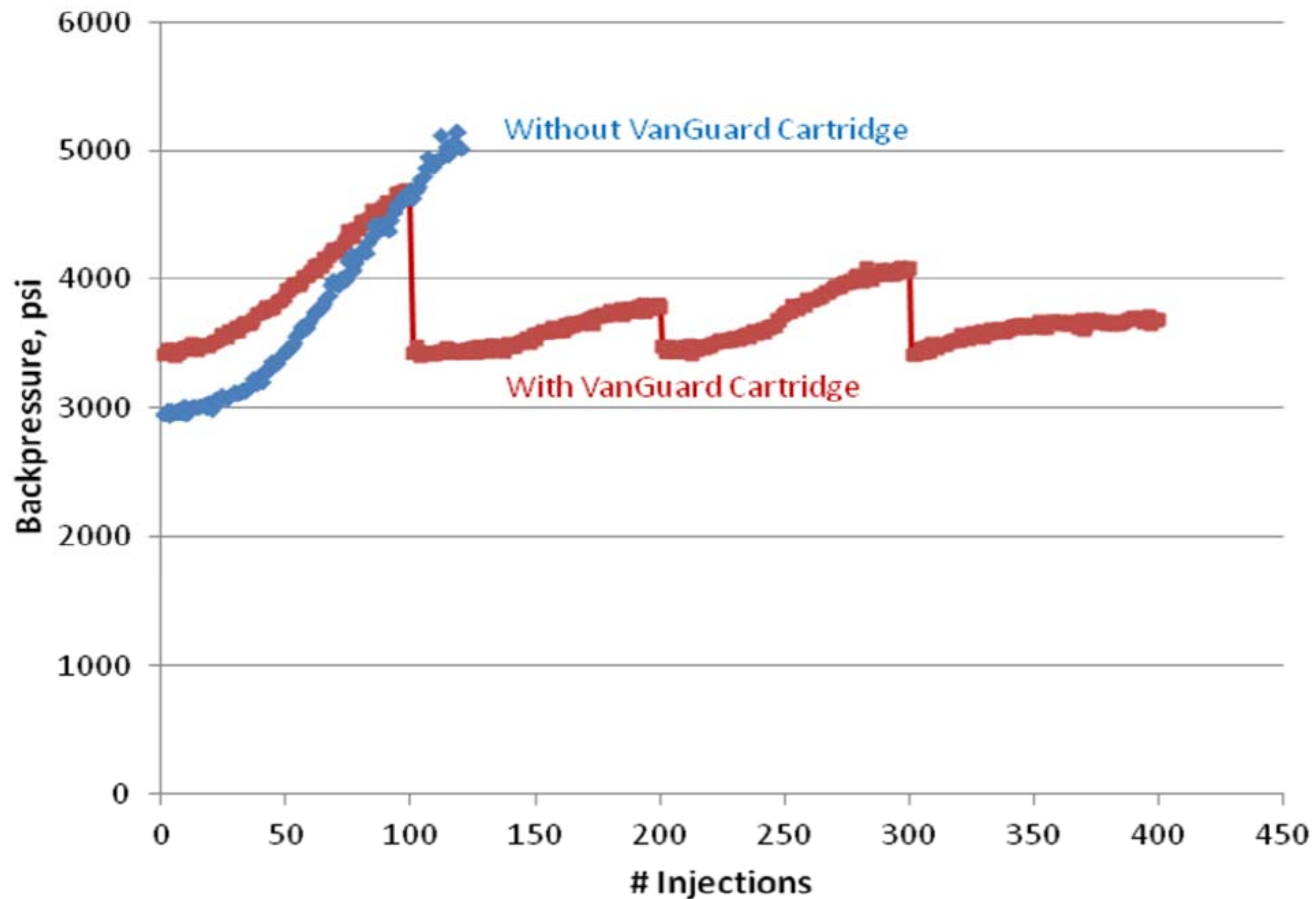
Recommandations Colonnes

- Une colonne déjà utilisée peut avoir été altérée chimiquement
- Lors de l'utilisation d'une nouvelle colonne, si la colonne a été altérée, les résultats seront différents.

Pour éviter d'avoir à refaire un développement

- ▶ Toujours utiliser une **“Colonne neuve”** lors d'un développement de méthode

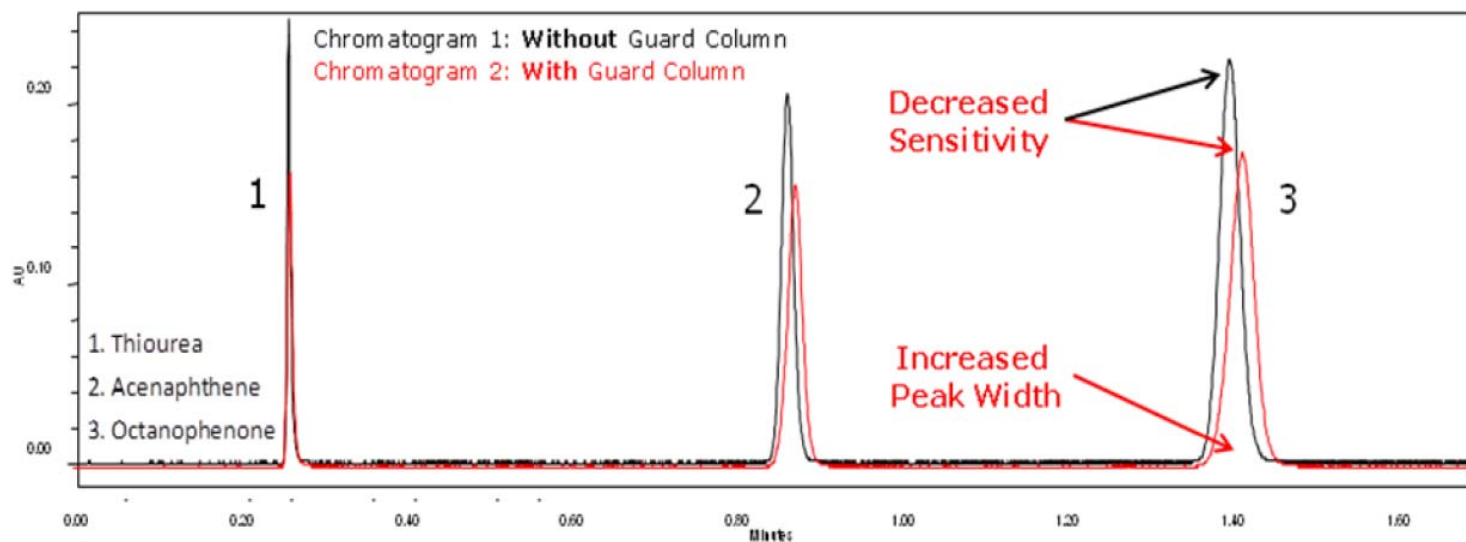
Usage de précolonnes pour augmenter la durée de vie des colonnes



- Echantillon alimentaire contenant de la cellulose, de la cellulose végétale, de la silice et du stéarate de magnésium dissout dans 50/50 Eau/Acétonitrile

Inconvénient des colonnes de garde :

- Source de fuites potentielles
- Perte de résolution à cause de connexions inadaptées
- Source de variabilité inter laboratoire
- Augmentation du temps de rétention
- Nécessité d'avoir la même chimie que la colonne pour limiter les risques de changement de sélectivité



NOUVELLES colonnes de garde

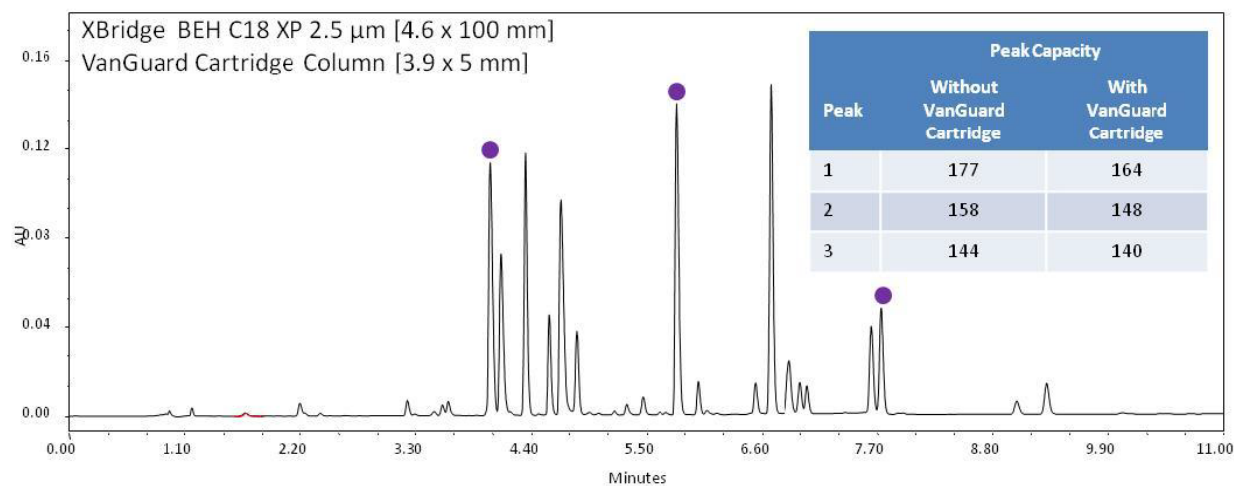
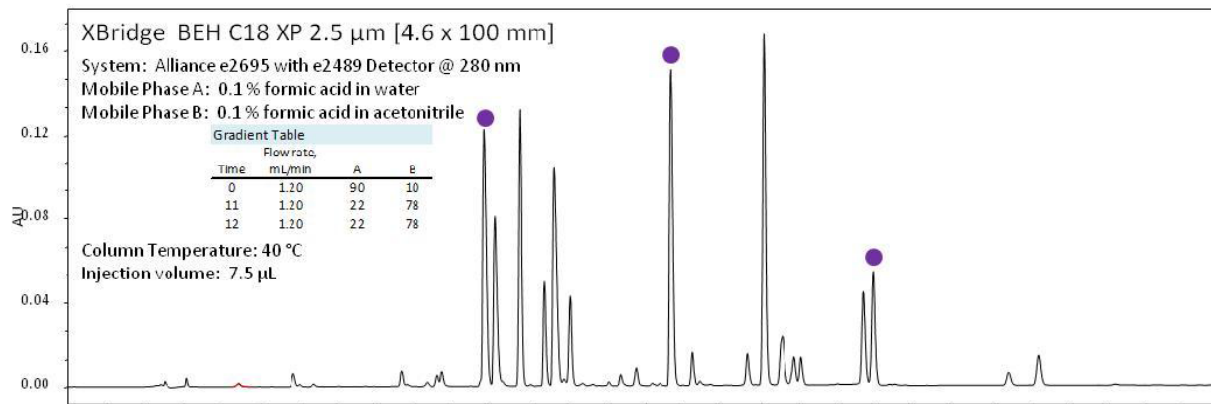
- Nouveau format de précolonnes pour l'HPLC :
 - Connexion directe sur la colonne pour minimiser les volumes morts
 - Choix entre deux formats de ferrule d'entrée de colonne
 - Haute performance du packing pour maintenir la séparation
 - Disponible sur toutes les granulométries (2.5µm à 5µm)



VANGUARD™
COLUMN PROTECTION

Nouvelles précolonnes VanGuard

- Augmentez la durée de vie de vos colonnes sans perdre la qualité de vos séparations:



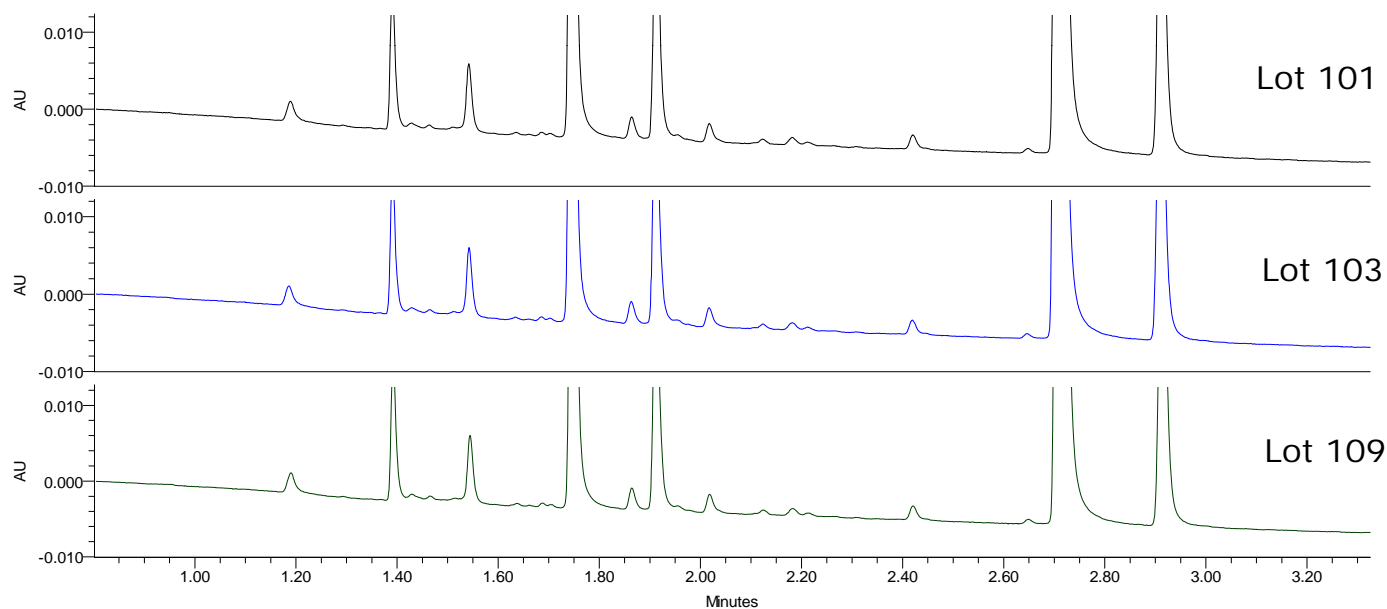
Trucs est Astuces

Recommandations Colonnes

- Tester 3 lots différents de colonnes pour juger de la qualité, de la fiabilité de la robustesse de la méthode.

Tests avec un kit de "Method Validation"

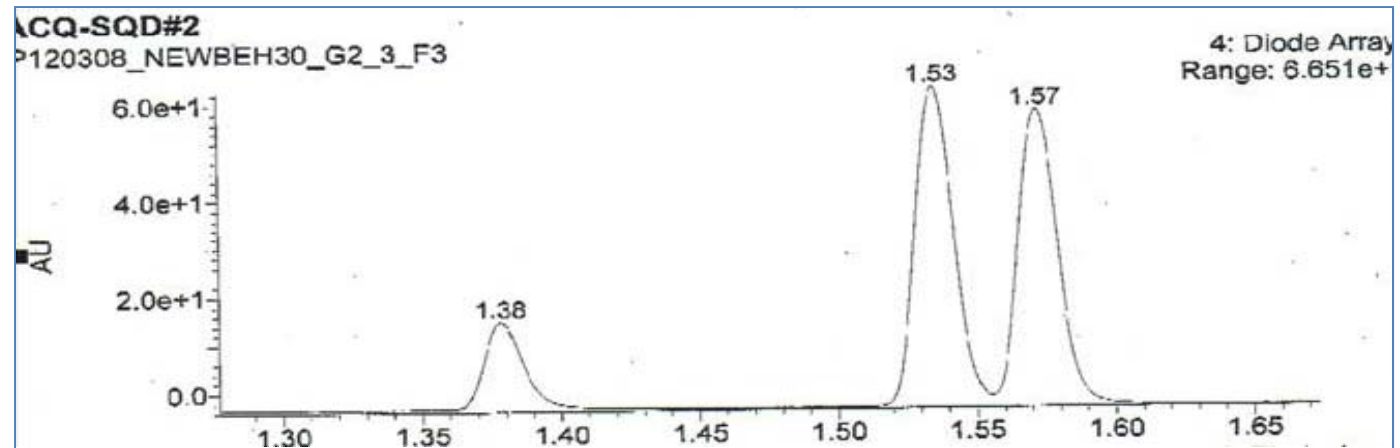
ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 2.1 x 50 mm Method Validation Kit (P/N 186005571)



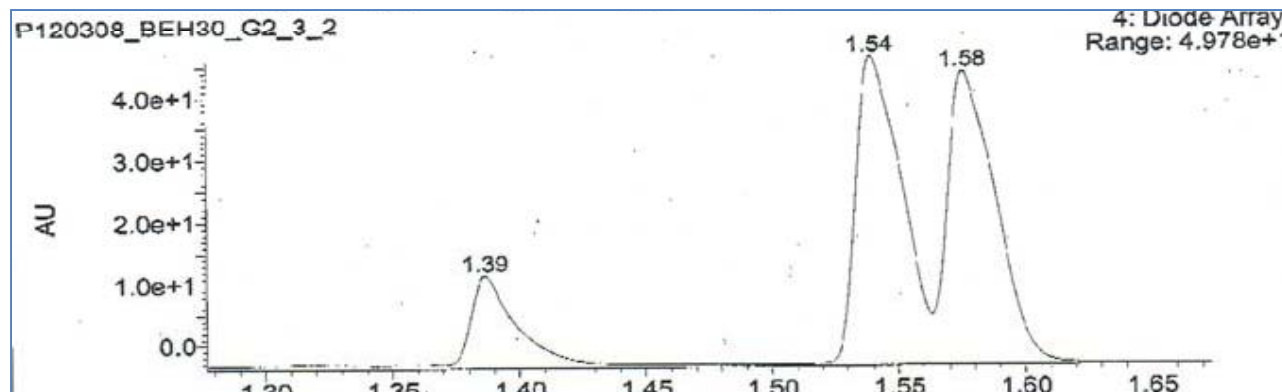
Test	Acceptance Criteria	Ziprasidone	Zip-Imp 1	Zip-Imp 2	Zip-Imp 3	Zip-Imp 4	Result
Intermediate Precision	Ret Time < 2% RSD Peak Area < 5% RSD	1.1	1.1	1.1	0.9	0.8	Pass
		1.7	2.1	2.6	3.8	4.9	

Problème de perte de performance :

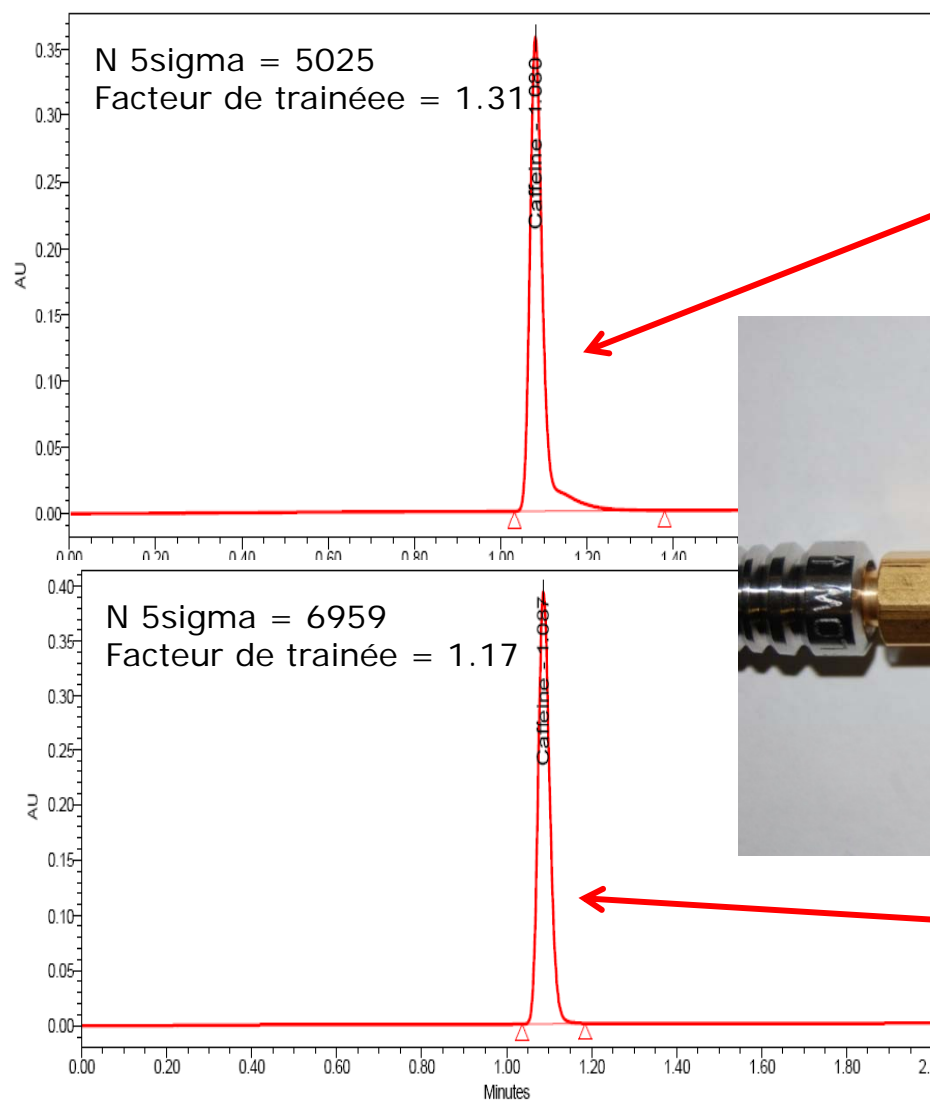
- Performance requise pour l'analyse :



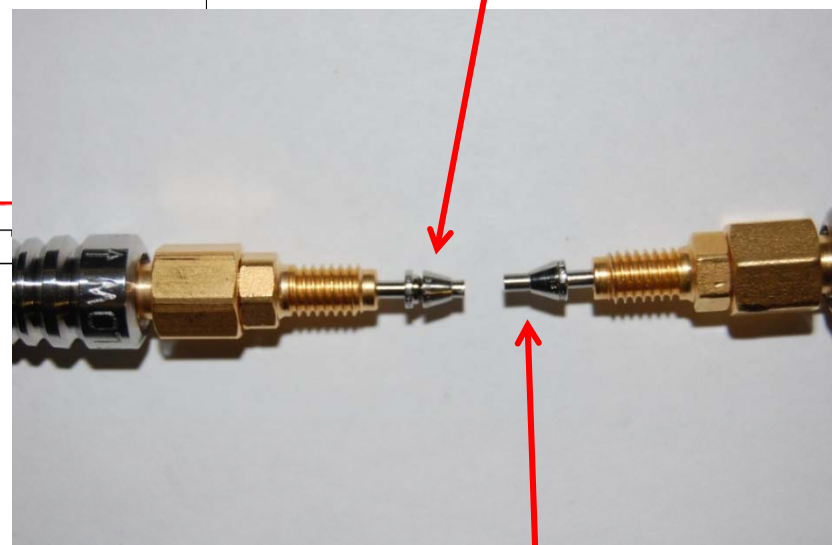
- Résultat obtenu sur une colonne neuve :



Noix de la ferrule sertie de manière incorrecte



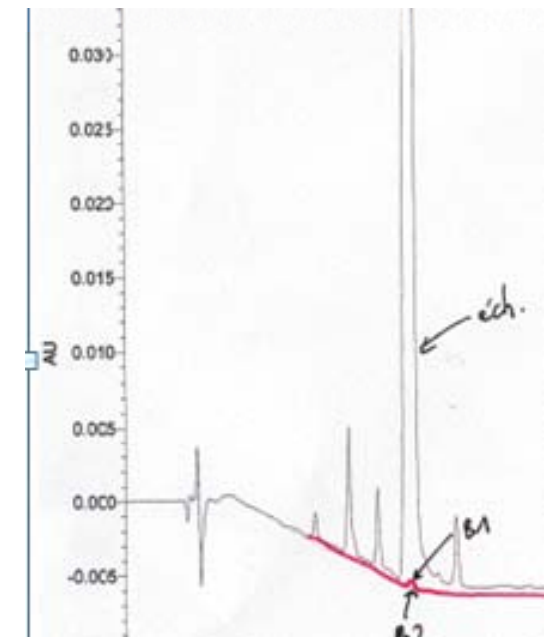
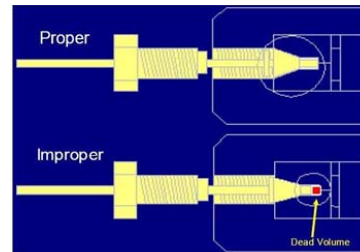
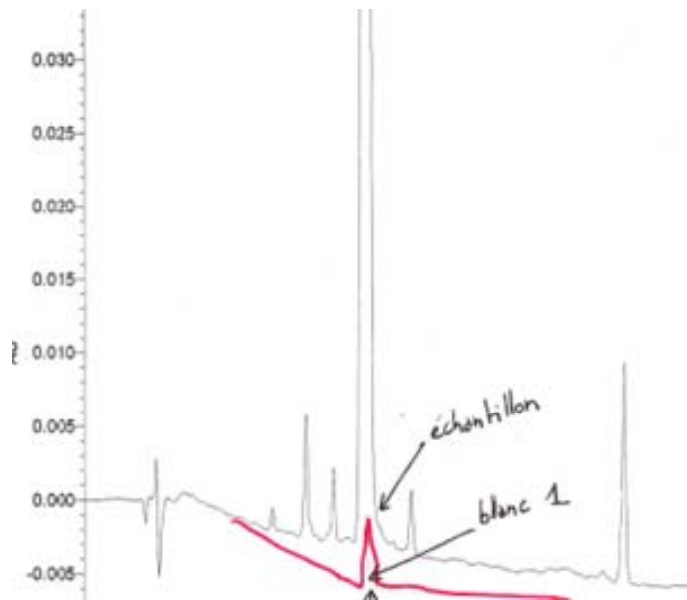
Mauvaise position de la noix de ferrule



Position correcte de la noix de ferrule

Effet mémoire sur un échantillon

Des connexions incorrectes sur la vanne d'injection peuvent être responsables de volume mort où peuvent s'accumuler certains produits.



Une mauvaise connexion entraîne un effet mémoire.

Premier blanc 0.1 %
Deuxième blanc 0.01 %.

Avec des connexions correctes :
Premier blanc <0.005 %

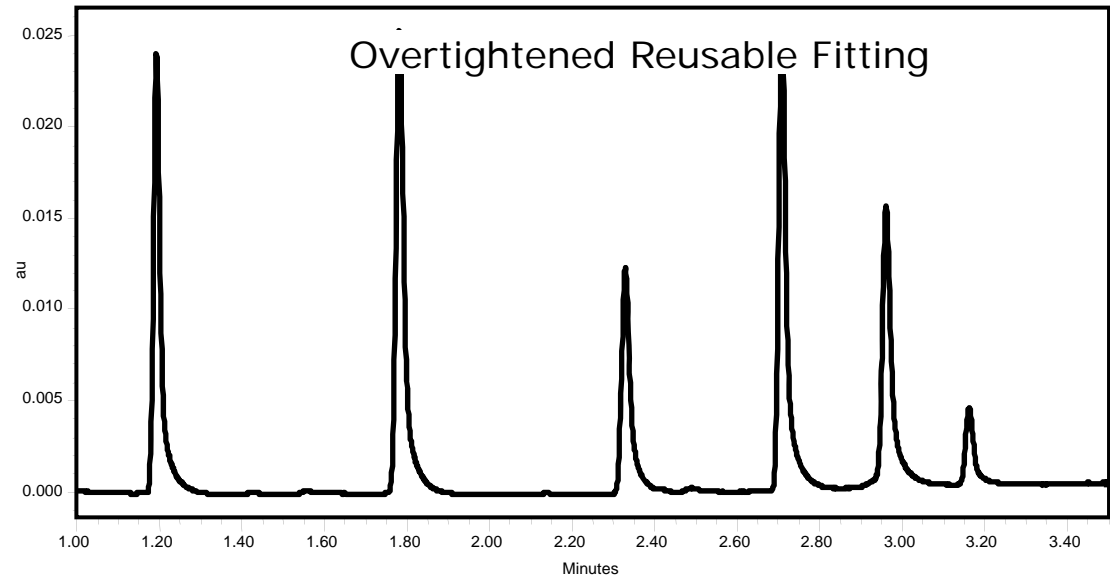
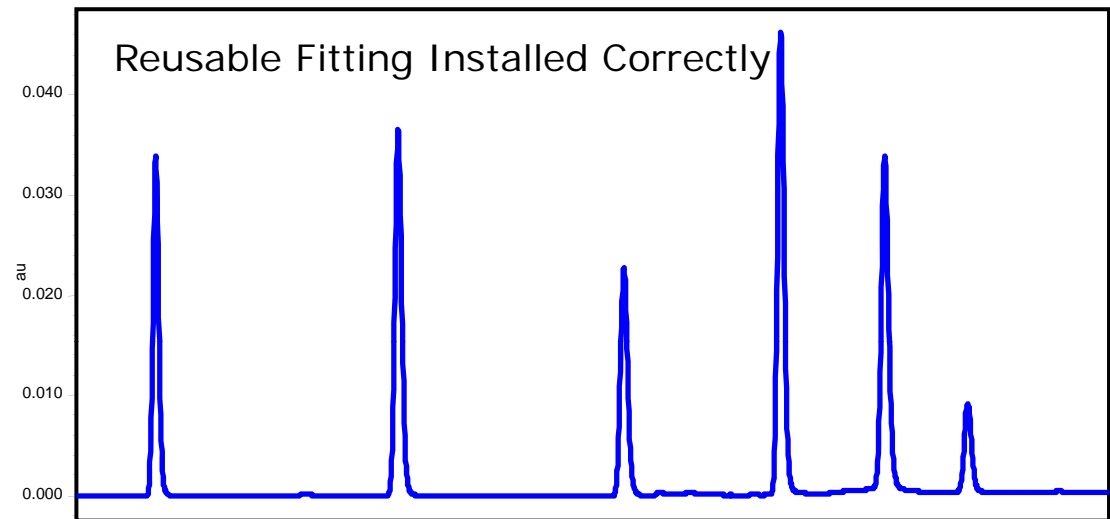
Ferrule réutilisable en serrage à main serrée trop fort



Normal Ferrule



Deformed Ferrule

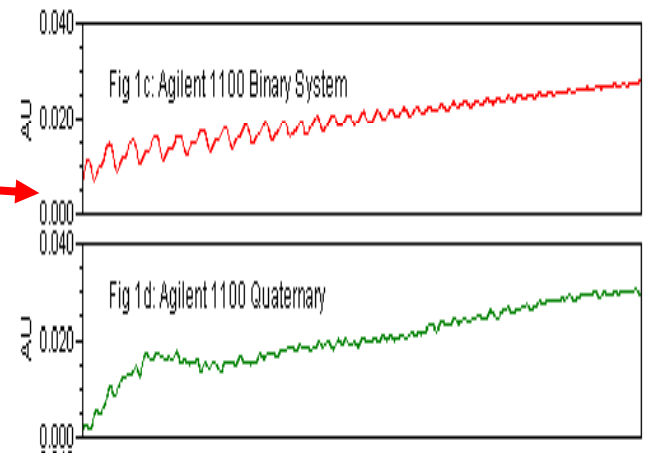
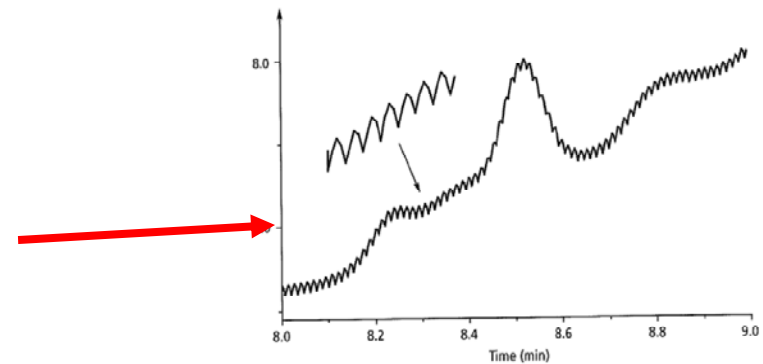


Bruit relatif à la circulation de la phase mobile

Bruit cyclique de l'ordre de la seconde à la minute :

Souvent relatif à des fluctuations de débit/pression de la pompe.

- Bulle d'air dans la pompe
 - Dégaser les solvants
- Problème de clapets
 - Remplacer les clapets
- Problème de joint de piston
 - Remplacer les joints
- Piston défectueux
 - Remplacer le piston
- Chambre de mélange des solvants inadéquate
 - Augmenter le volume de la chambre de mélange



Cellule de détecteur encrassée :

Cellule Neuve (Tracé Noir)

On constate une légère dérive du au gradient Eau/Acétonitrile.

Mesures constatées à 230 nm sous eau :

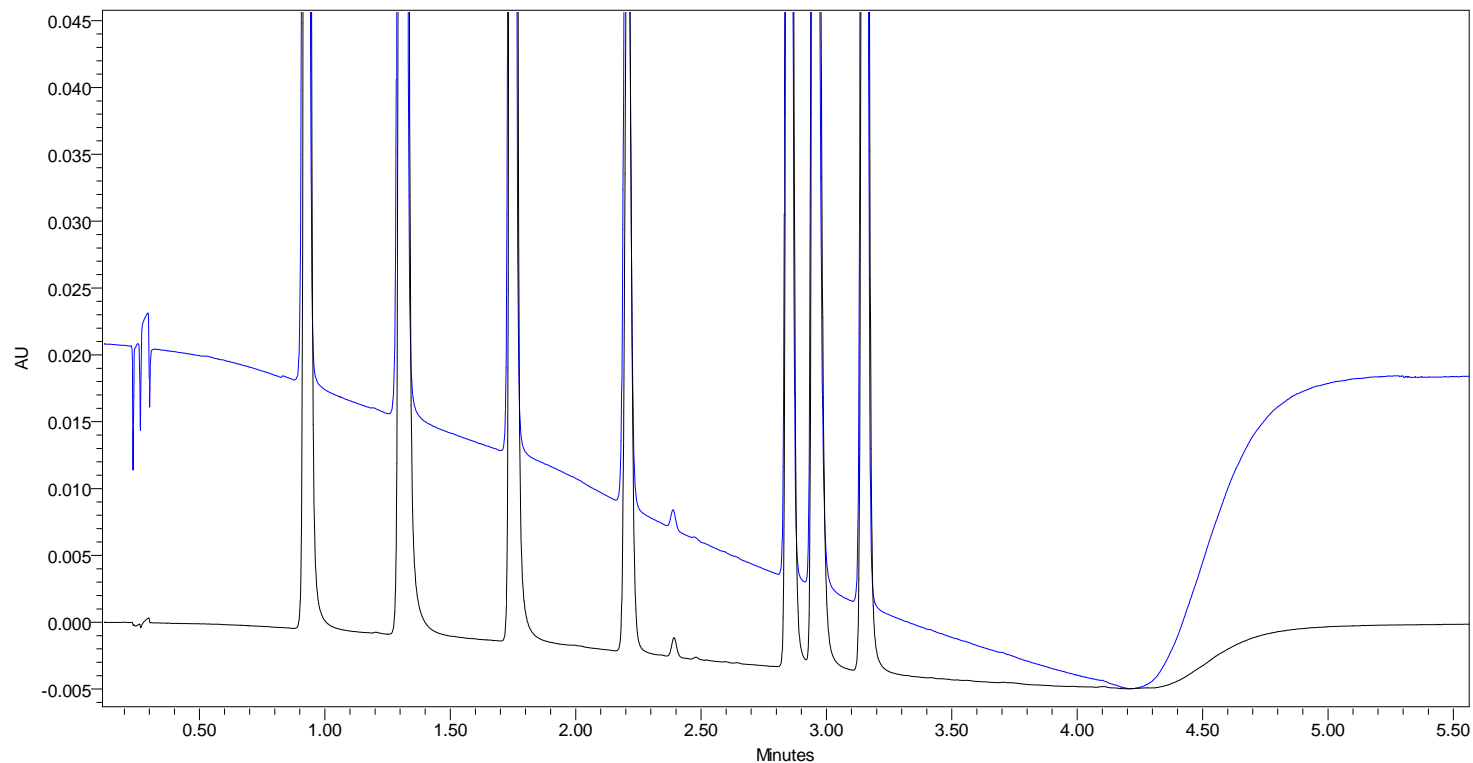
Référence: 174 nA
Sample: 126 nA

Ancienne Cellule encrassée (Tracé Bleu)

L'énergie au niveau du sample est très faible avec une dérive accentuée. Normalement le sample doit être supérieur à 100.

Mesures relevées à 230 nm sous eau :

Référence : 171 nA
Sample : 5 nA



Neutrals QCRM

- Spécialement formulé pour fournir rapidement et facilement une évaluation du système dans diverses conditions analytiques de phase inverse.
- Les composés sélectionnés ont les caractéristiques suivantes :
 - Bien séparé en phase inverse
 - Bonne absorbance à 254nm
 - Peuvent être séparés dans une large gamme de conditions

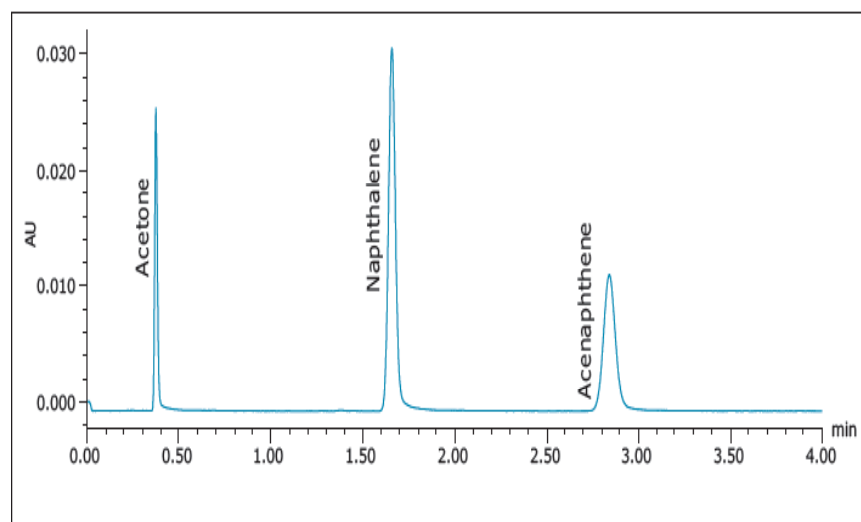


Neutrals QCRM Référence: 186006360

Diagnostic des systèmes en utilisant les QCRM

Troubleshooting Common System Problems Using Waters Neutrals Quality Control Reference Material

Kenneth D. Berthelette, Mia Summers, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, 34 Maple St., Milford, MA, USA



■ Neutral QCRM PN : 186006360

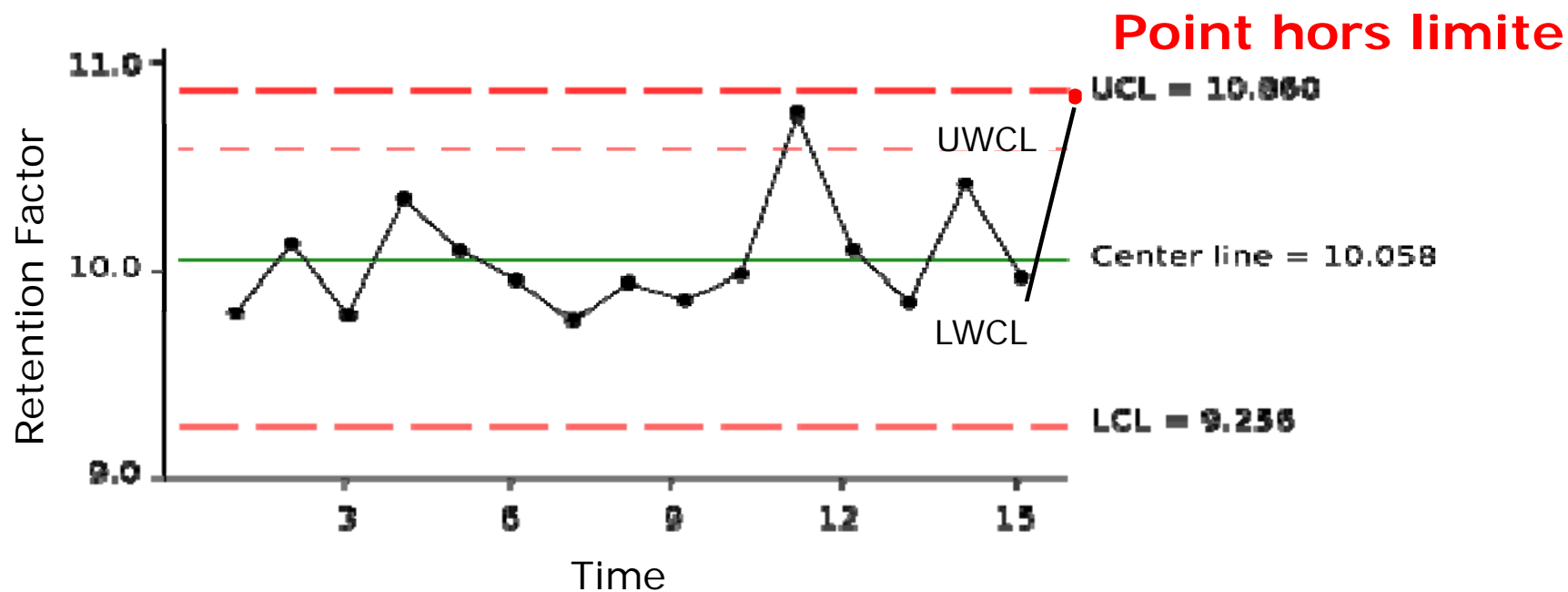
	Acetone	Naphthalene	Acenaphthene
Benchmarking Data (n=45)			
Retention Time Average (min)	0.323	1.633	2.893
Retention Time %RSD	0.690	0.440	0.440
USP Tailing Factor	1.180	1.130	1.080
USP Plate Count	3144	11009	10436

Table 2. Data gathered during system benchmarking, demonstrating a well operating system with a low retention time %RSD (n=45).

Problem #	Problem description
1	Poor column performance
2	Leak in pump
3	Poor check valve performance
4	Improper column fitting connections
5	Air bubble in system
6	Error in mobile phase preparation

Graphique de controle

Facteur de rétention



- Les problèmes de rétention peuvent venir entre autres :
 - Pompe
 - Fuite
 - Température de la colonne
 - Composition du solvant
 - pH
 - Temps d'équilibration
 - Stabilité de la phase stationnaire
 - Contamination de la colonne
 - Effondrement hydrophobique
 - ...

QCRMs disponibles :

<u>Standard</u>	<u>Part Number</u>
Neutrals	186006360
Reversed-Phase	186006363
LCMS	186006963
Quad LCMS	186007362
QDa	186007345
Preparative	186006703
Dye Standard	716000765
HILIC	186007226
SEC125	186006519
SEC200	186006518
SEC450	186006842
IEX Cation	186006870
IEX Anion	186006869



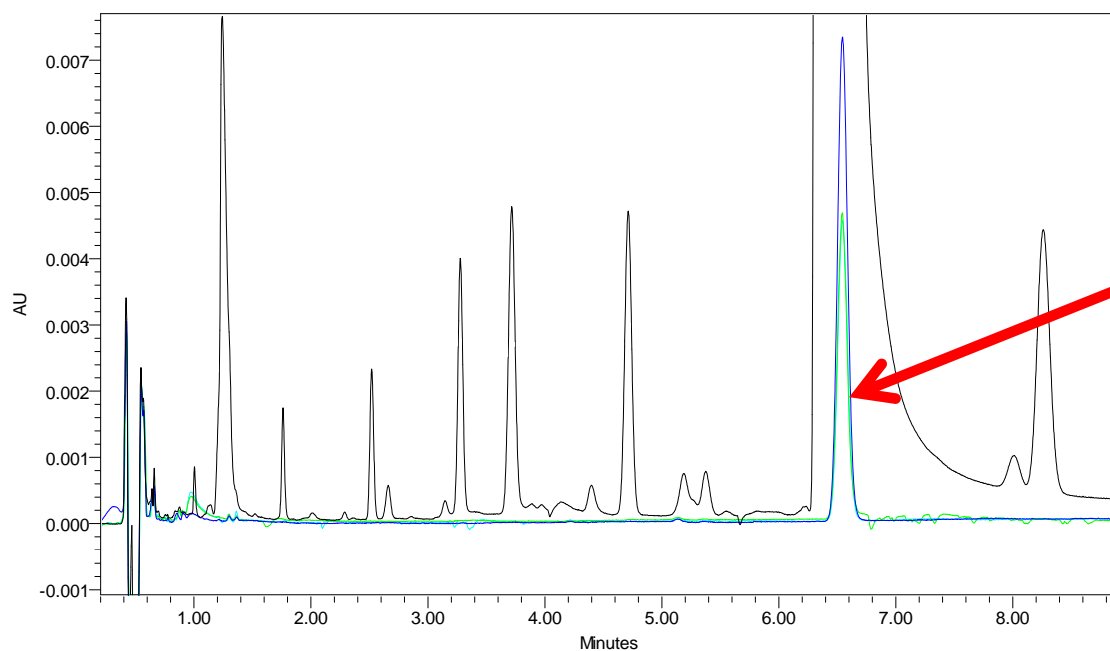
Sommaire

- Introduction
- Les aspects importants à considérer pour le bon déroulement d'une analyse chromatographique :
 - Les échantillons
 - Les phases mobiles
 - Le système
 - La colonne
 - La méthode

Solvant de rinçage de l'aiguille

Conditions :

Cellule de détection :	10 mm (trajet optique)
Pre Injecteur Wash Time :	10 s
Post Injecteur Wash Time :	90 s
Volume de l'échantillon dans le flacon :	200 µl
Solvant de rinçage de l'aiguille :	25:25:25 Eau:MeOH:ACN:IPA
Volume de la boucle :	100 µl
Volume injecté :	25 µl

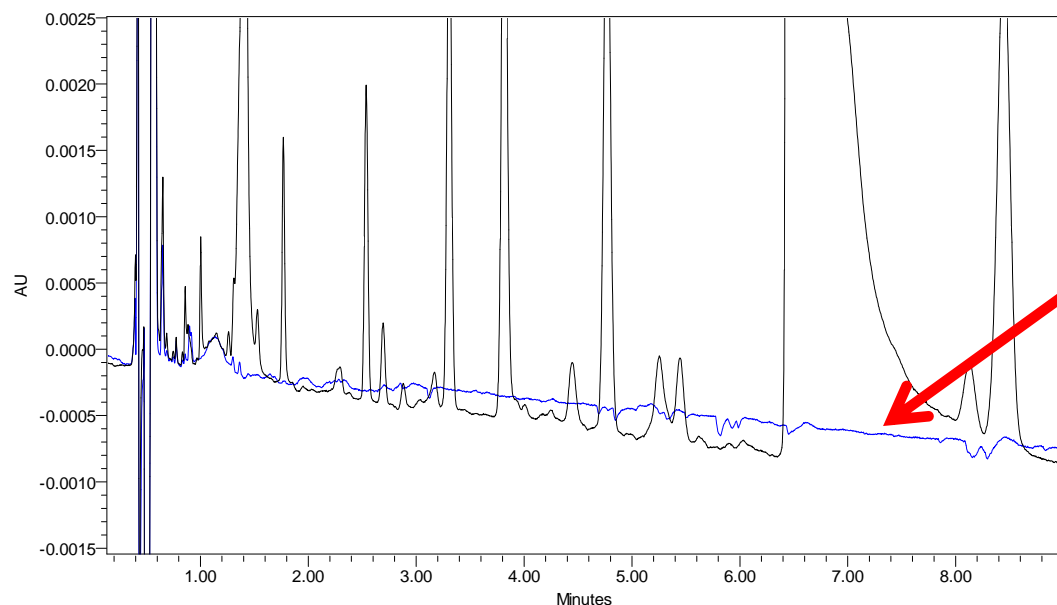


Problème : Car le blanc n'est pas blanc, même après trois blancs injectés à la suite de l'échantillon.

Solvant de rinçage de l'aiguille

Nouvelles Conditions :

Cellule Haute sensibilité :	25 mm (trajet optique)
Pre Injecteur Wash Time :	0 s (paramètre par défaut)
Post Injecteur Wash Time :	6 s (paramètre par défaut)
Volume de l'échantillon dans le flacon :	200 µl
Solvant de rinçage de l'aiguille :	100 % IPA
Volume de la boucle :	100µl
Volume injecté :	10 µl



Le premier blanc est maintenant parfaitement blanc dès la première injection consécutivement à l'échantillon. Le solvant de rinçage de l'extérieur de l'aiguille est maintenant adapté par rapport à la nature de l'échantillon.

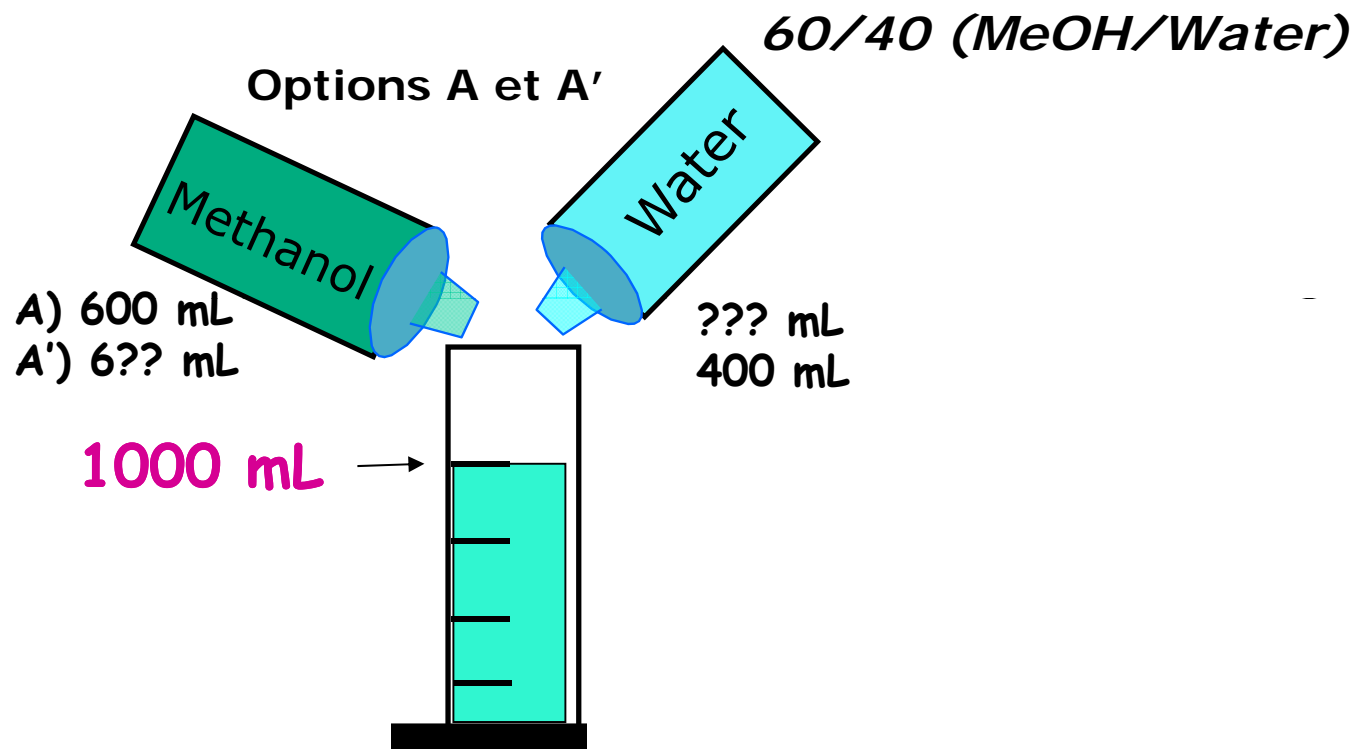
Préparation des phases mobiles

Comment préparer une phase mobile 40/60 Eau/Méthanol ?

- Avec une éprouvette graduée, mesurer 400ml d'eau et compléter à 1L avec le méthanol
- Avec une éprouvette graduée, mesurer 600ml de méthanol et compléter à 1L avec l'eau
- Avec une éprouvette graduée mesurer 400ml d'eau, puis 600ml de méthanol et les mélanger
- Peser 600g d'eau et 400g de méthanol, et les mélanger.

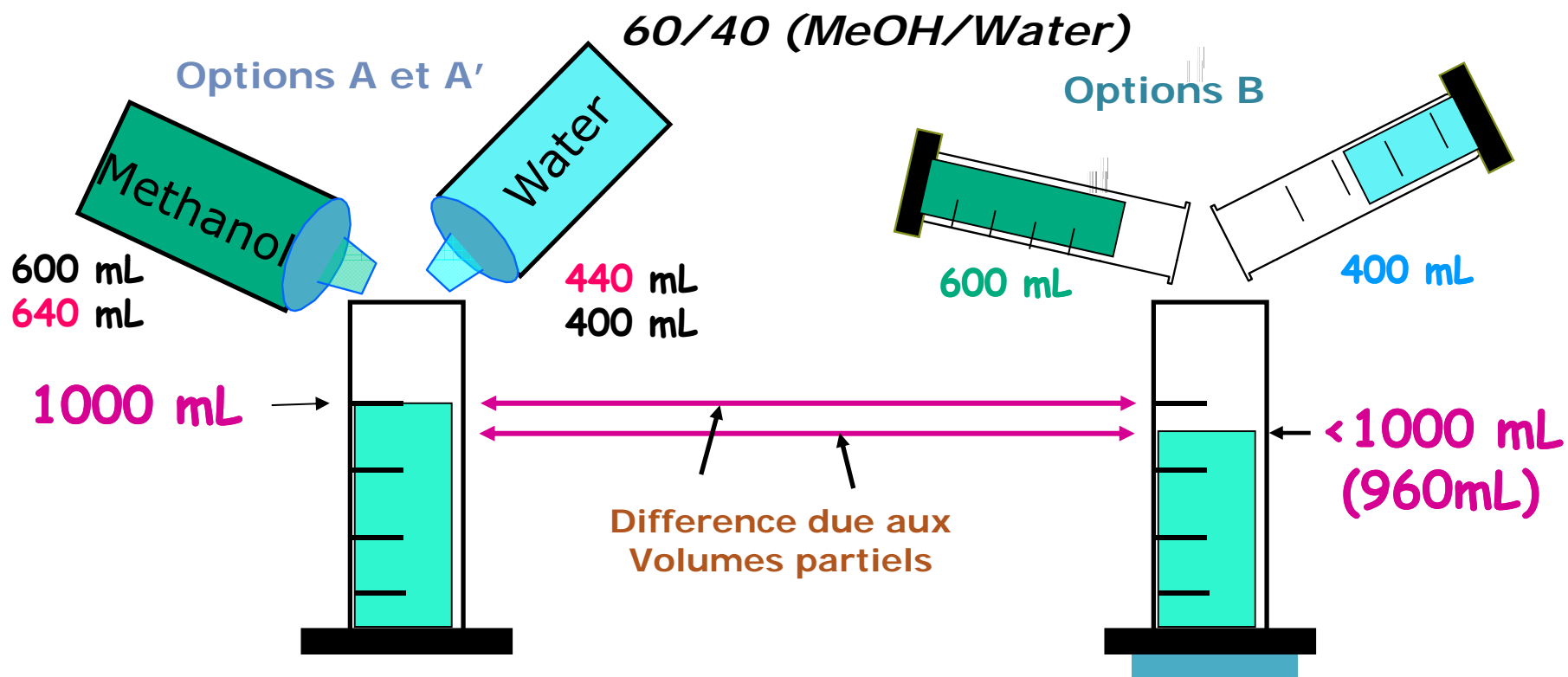


Importance de la phase mobile pour la reproductibilité



Options A et A':
Ajouter directement les solutions organiques et aqueuses dans l'éprouvette

Importance de la phase mobile pour la reproductibilité

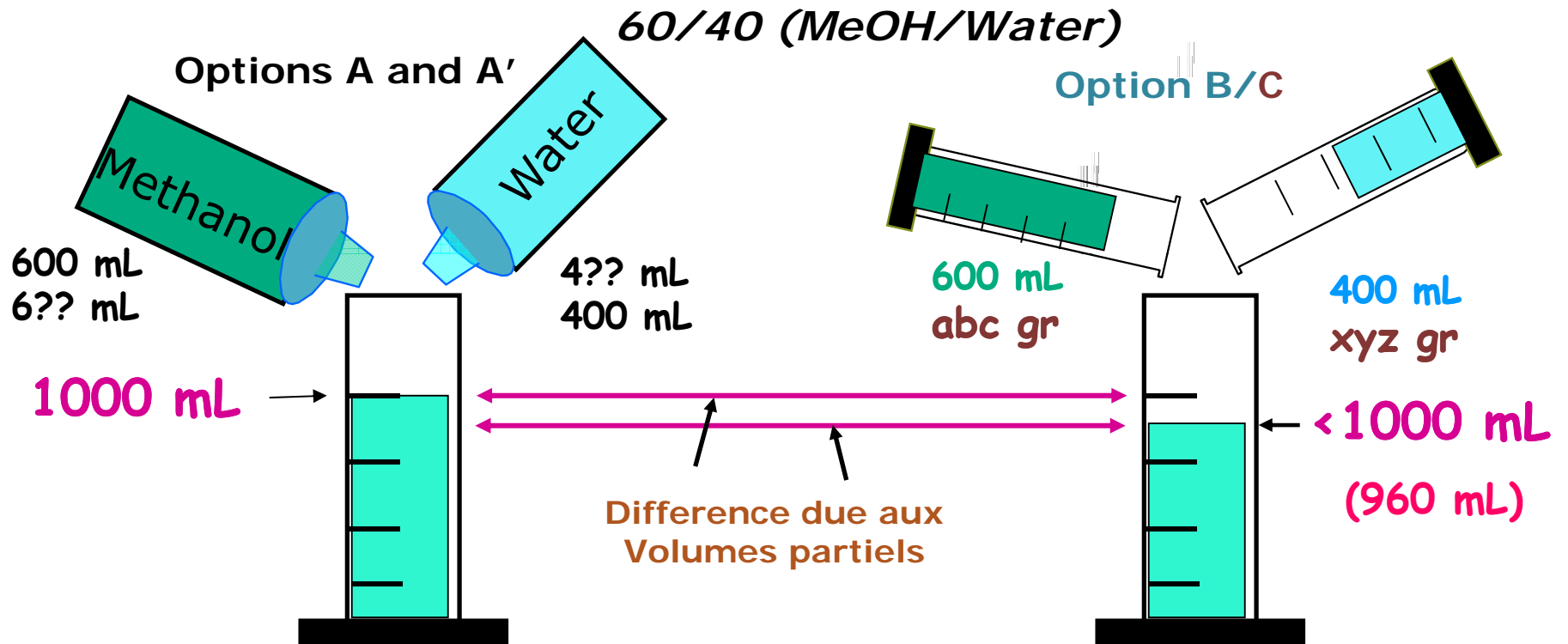


Options A et A':

Ajouter directement les solutions organiques et aqueuses dans l'éprouvette (pas recommandé car dépend de l'ordre d'ajout des solvants)

Options B: mesure séparée des deux volumes suivie du mélange.

Importance de la phase mobile pour la reproductibilité



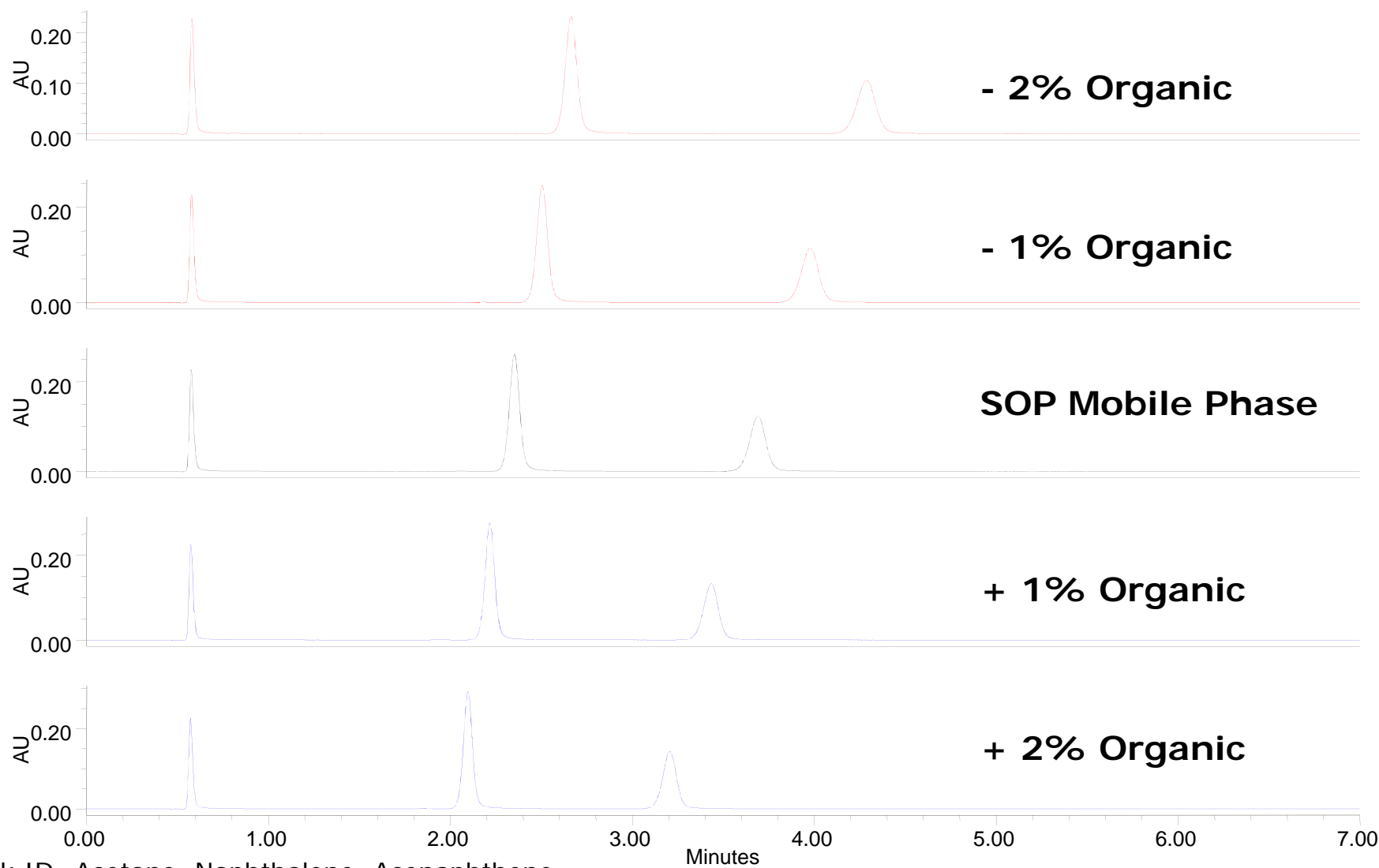
Options A et A' :

Ajouter directement les solutions organiques et aqueuses dans l'éprouvette (pas recommandé car dépend de l'ordre d'ajout des solvants)

Option B: mesure séparée des deux volumes suivie du mélange.

Option C: pesée de la quantité voulue de chaque constituant.

Différence de rétention due à la variabilité de la phase mobile

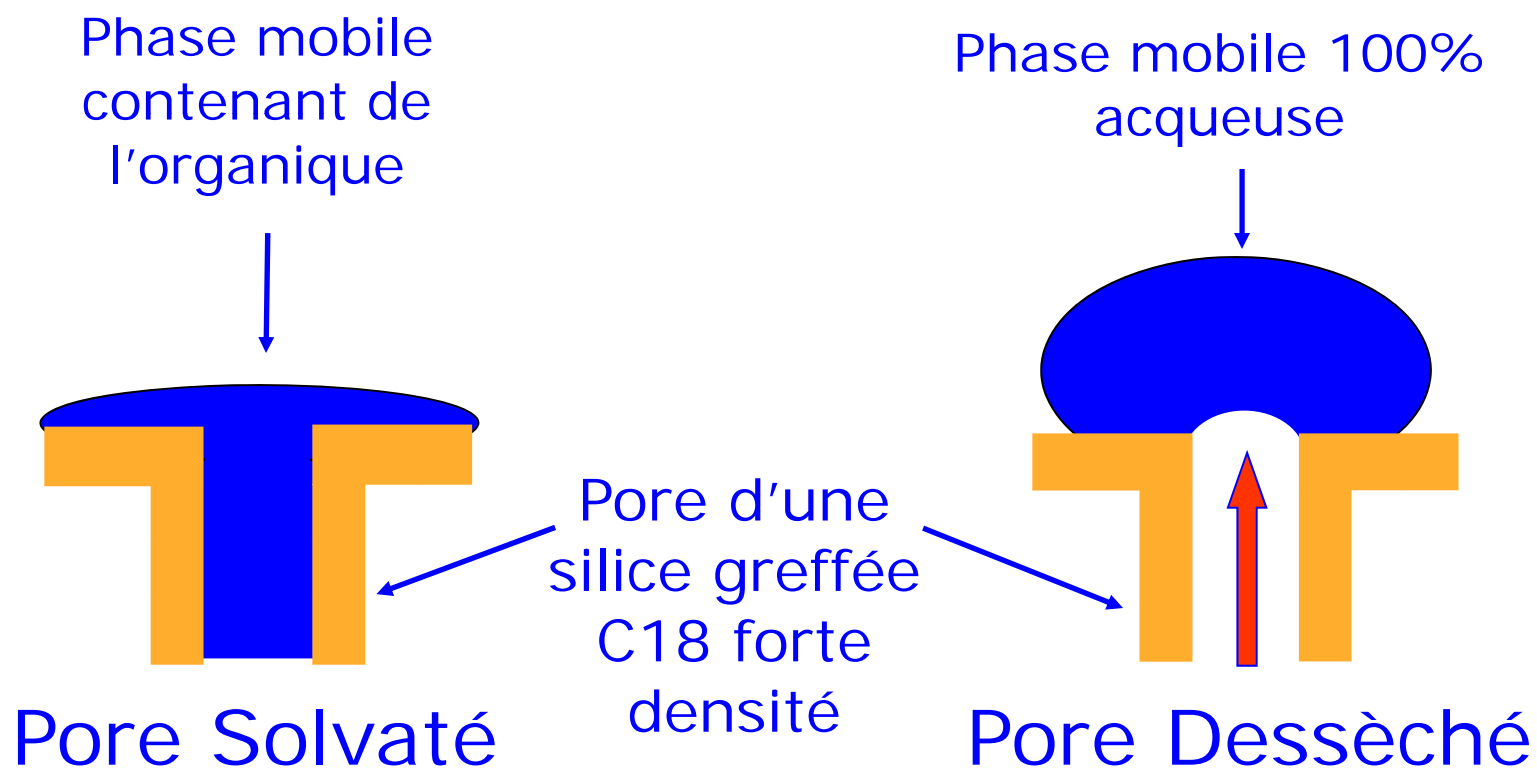


Peak ID: Acetone, Naphthalene, Acenaphthene

50/50 v/v Amm. Form. pH 3 buffer / Acetonitrile 0.5mL / min 30°C 1µL injection 2.1 x 50 mm Columns

Qu'est-ce que le dessecchage des pores ou "Hydrophobic Collapse?"

- Problème liée aux méthodes utilisant des phases mobiles 100% aqueuses sur des colonnes C18 non adaptées.



Désolvatation des pores: *A quoi cela ressemble-t-il ?*

- En travaillant avec une phase mobile très riche en eau sur des colonnes fortement hydrophobes, des variations soudaines du V_0 ainsi que des temps de rétention peuvent avoir lieu. Cela indique que les pores expulsent la phase mobile et se dessèchent, ne permettant plus la rétention. ^{*1}

- 10% de réduction du volume mort est observée
- 23% de perte de rétention de l'analyte;

ACQUITY UPLC® BEH C₁₈

L = 5 cm

F = 0.3 mL/min

P = 2,040

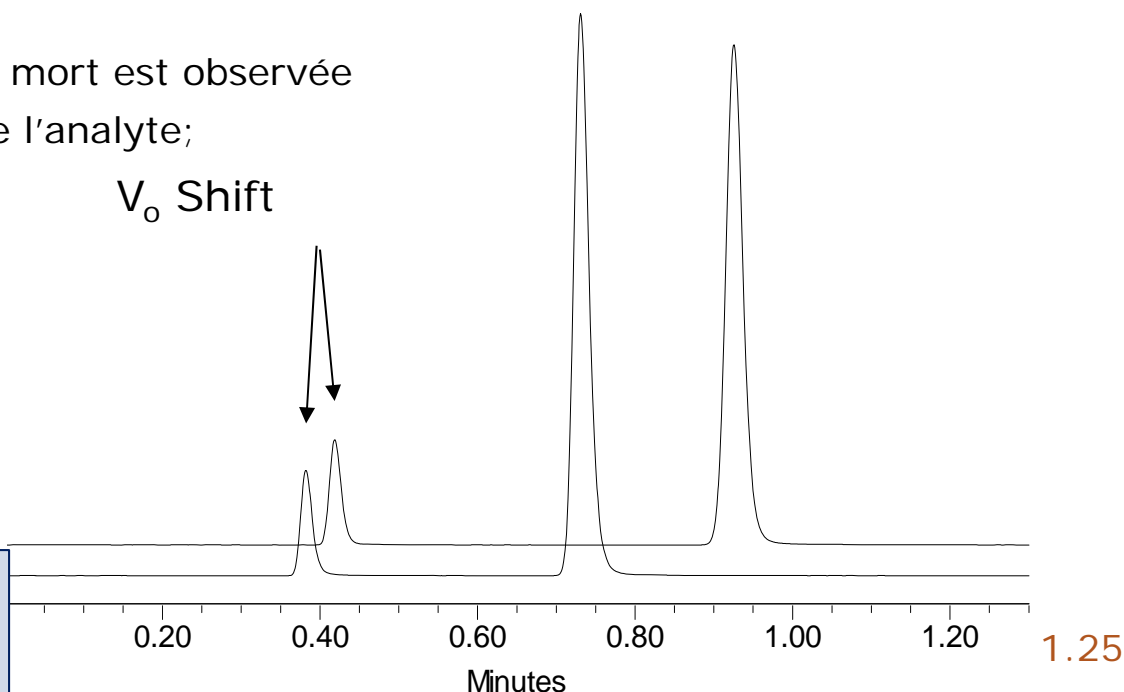
T = 90 °C

% Dewet = 23.10

V_0 Shift

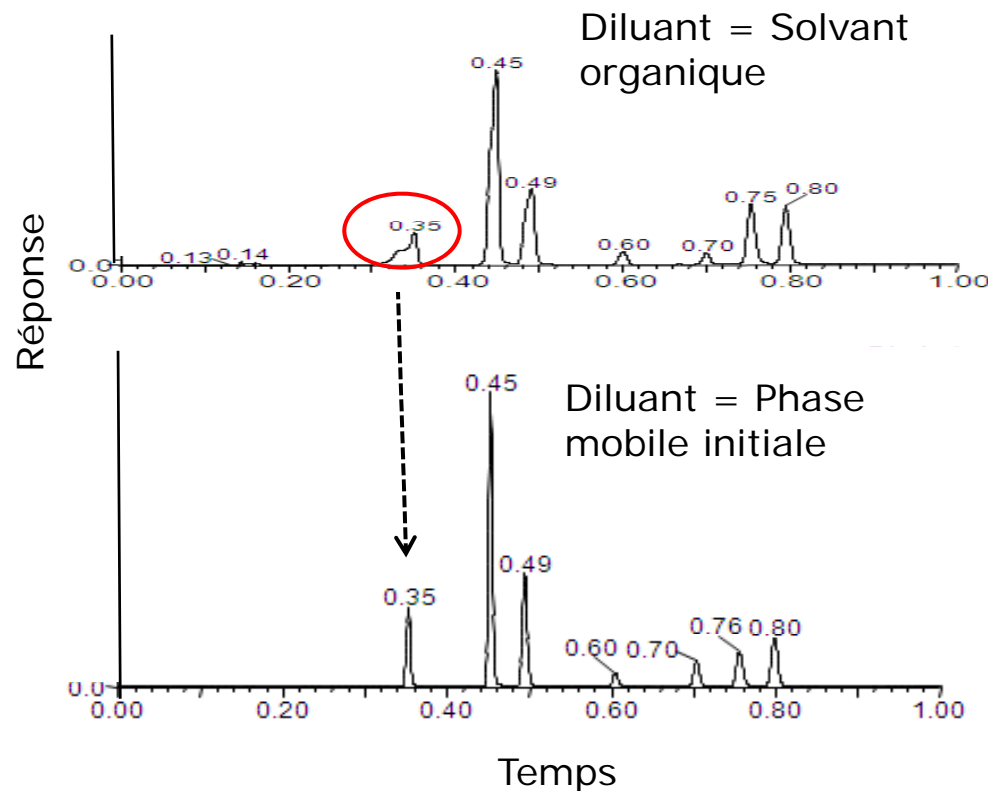


-Atlantis T3
-XSelect HSS T3
-XBridge BEH Shield RP18



^{*1} T.H. Walter, P. Iraneta and M. Capparella J. Chromatogr. A 1075 (2005) 177-183

Effet du solvant de mise en solution de l'échantillon

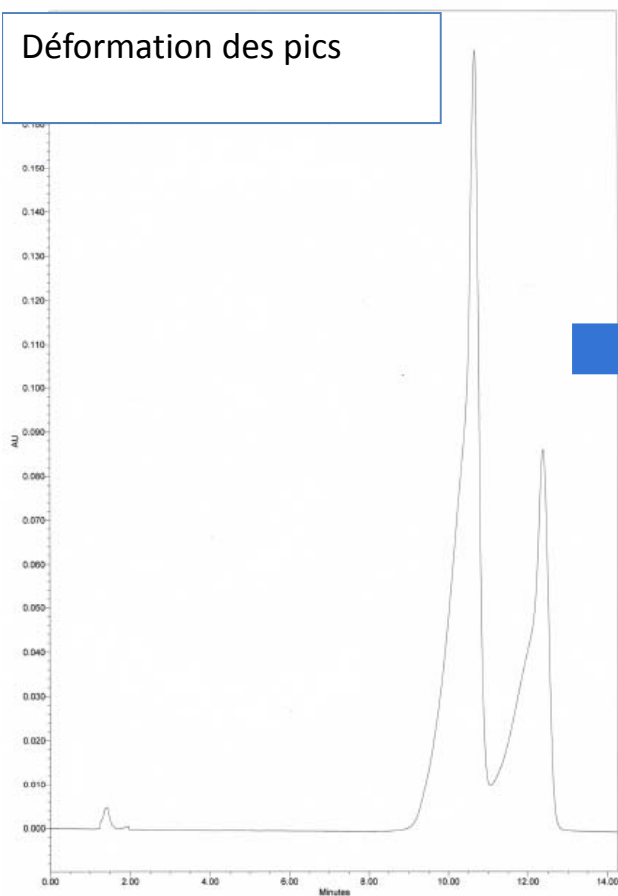


- Si le solvant d'injection est trop fort
- ▶ Fronting sur le 1^{er} pic
 - ▶ Tous les pics sont déformés
 - ▶ Perte de sensibilité
 - ▶ Changement de résolution

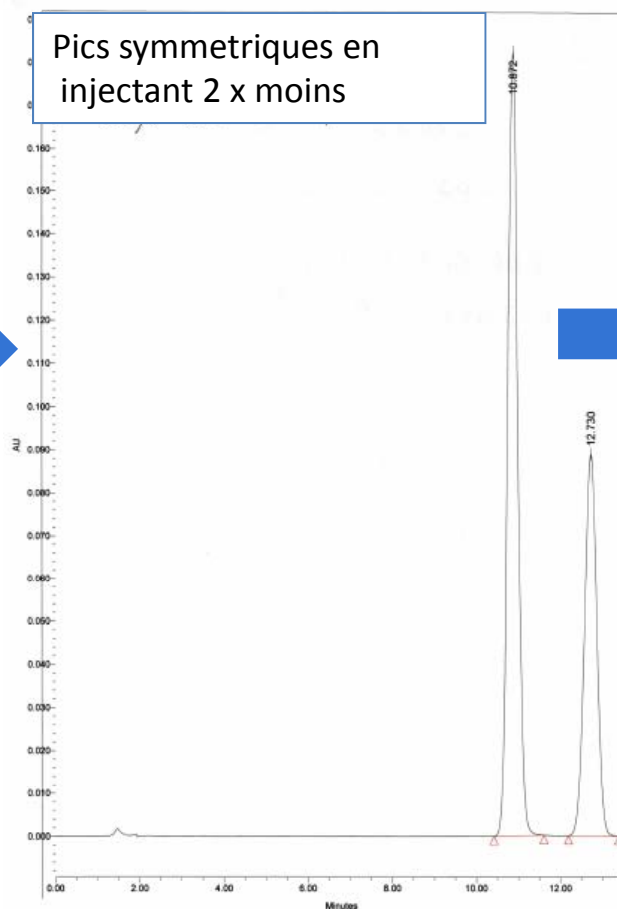
Séparation sur colonne de phase inverse, conditions initiales de gradient = 95%eau 5%ACN

Mise en solution de l'échantillon dans 100 % de phase organique.

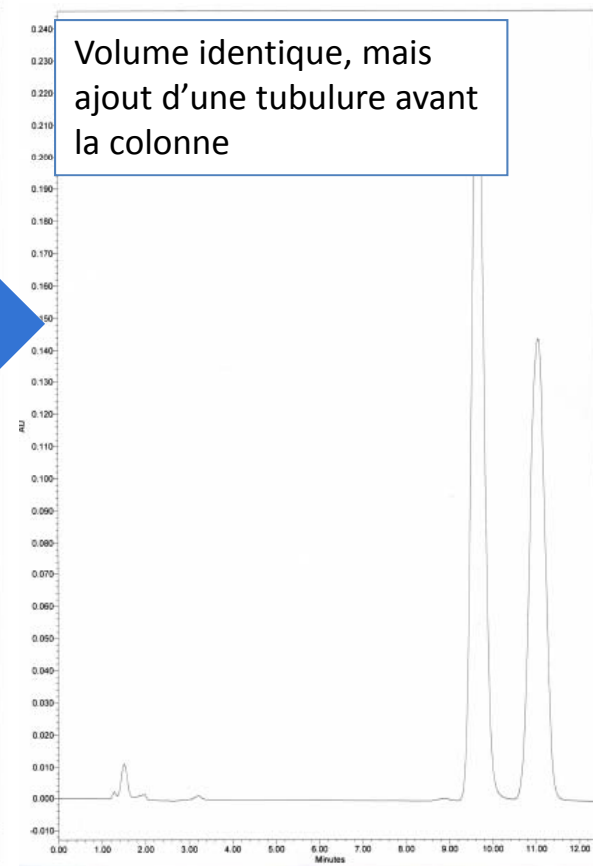
Déformation des pics



Pics symétriques en injectant 2 x moins



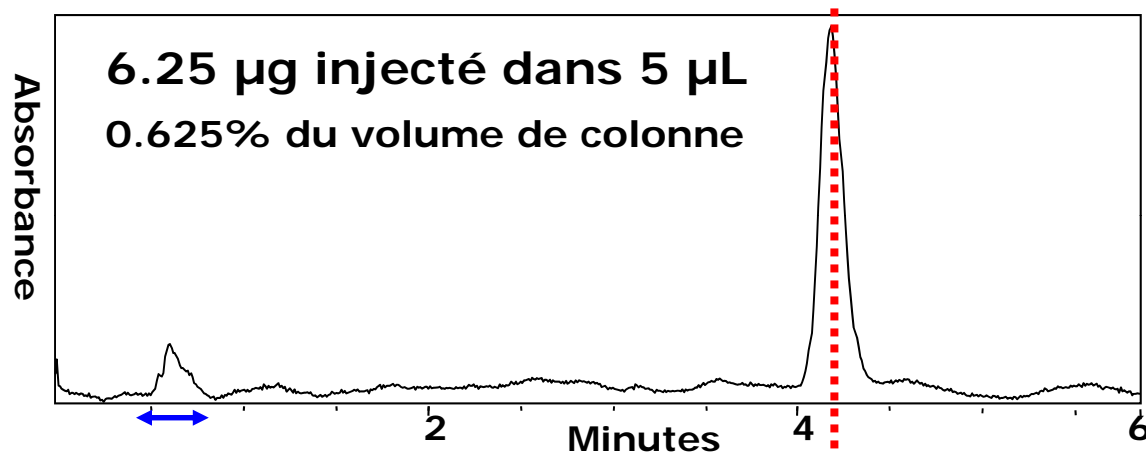
Volume identique, mais ajout d'une tubulure avant la colonne



Pics symétriques en mettant de la phase aqueuse dans l'échantillon si c'est possible. Ou alors si ce n'est pas possible, ajouter une tubulure 10/1000 ème entre la colonne et l'injecteur pour créer un volume de mélange suffisant. On peut essayer de mettre une pré-colonne à l'entrée de la colonne.

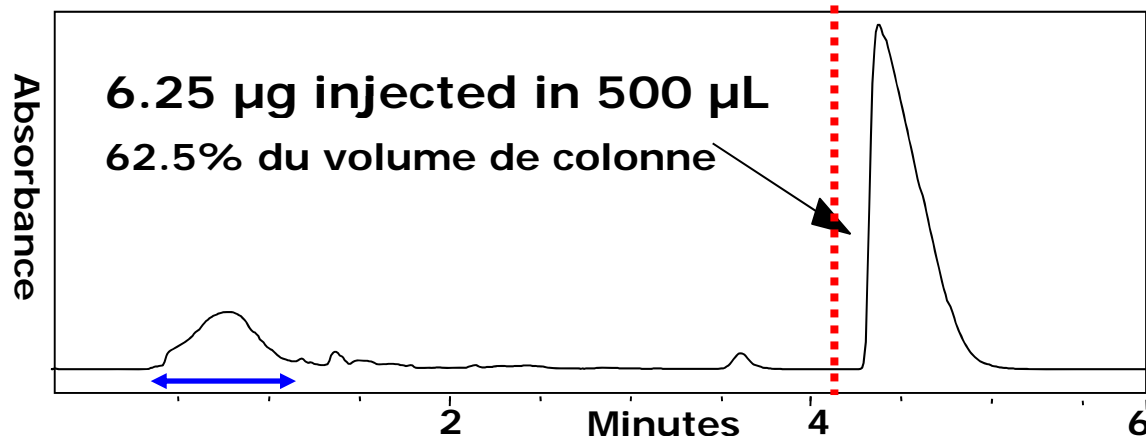
Volume d'injection en fonction de la colonne

- En analytique, volume d'injection compris entre **1 à 5%** du volume total de la colonne :



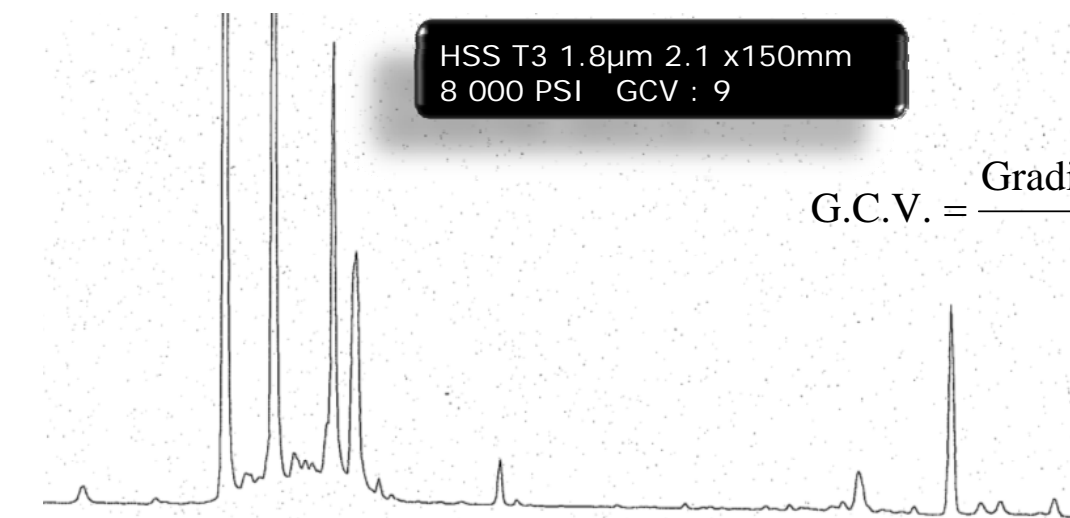
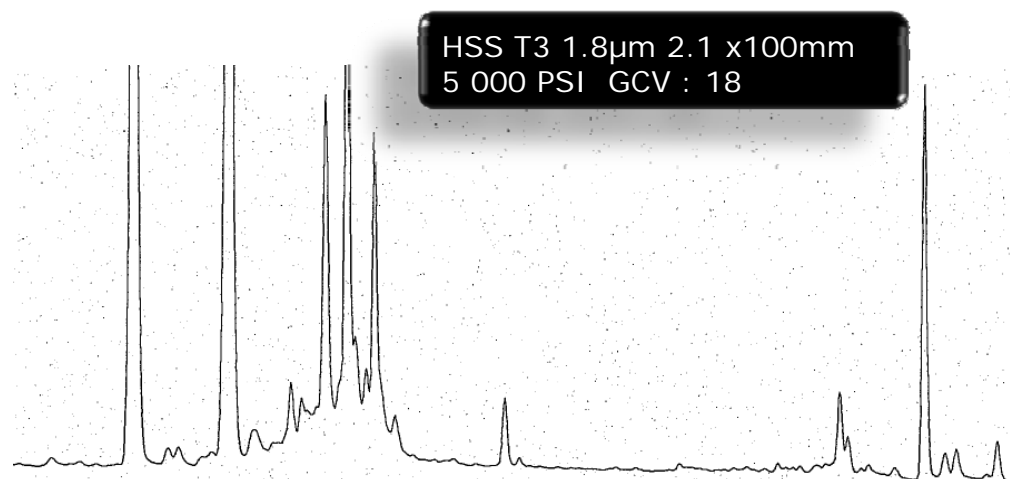
Volume de la colonne:
0.8 mL (800 µL)
(4.6 X 50mm ODS)

Premier pic observé
bien plus large
(← →)



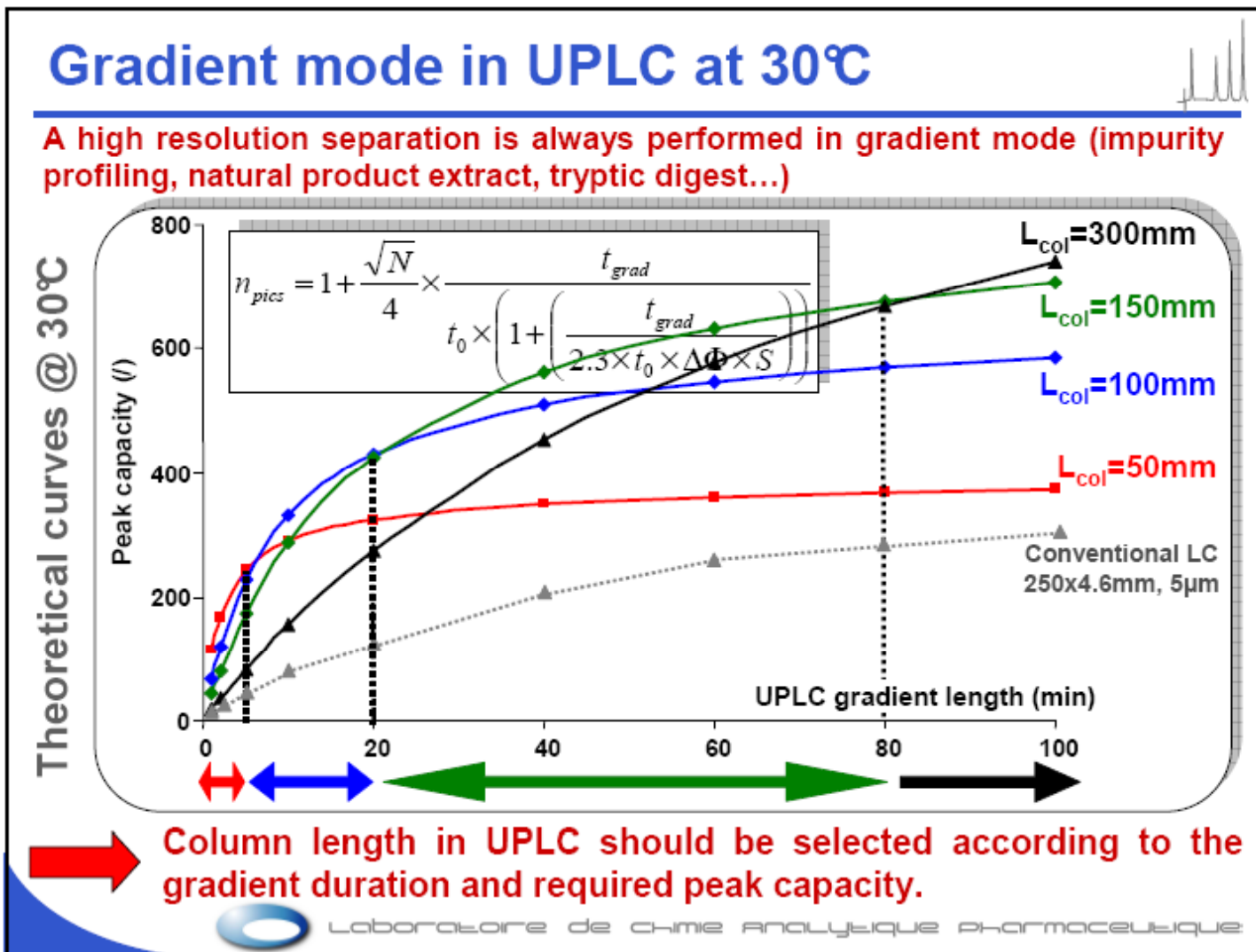
Le volume d'éluion
du pic se déplace
proportionnellement
au volume injecté
(.....)

Longueur de la colonne



$$\text{G.C.V.} = \frac{\text{Gradient duration} \times \text{Flow rate}}{\text{Column Volume}}$$

Capacité de pic en fonction du temps de gradient et de la longueur de colonne (constant particle size 1.7µm)



Les bonnes pratiques pour une méthode chromatographique

- Bien décrire la mise en œuvre de la phase mobile.
- Diluer l'échantillon dans les conditions initiales du gradient.
- Déterminer le solvant de lavage de l'aiguille adapté à l'analyse
- Le volume de l'échantillon doit être compris entre **1 et 5% du volume de la colonne**.
- Le temps de gradient doit permettre de passer de **10 à 15 fois le volume de la colonne** pour tirer le maximum de performance de la colonne.

Les bonnes pratiques chromatographique

- Utilisez de la verrerie et des consommables propres et de qualité :



LCGC and LCMS certified vials are now available

Les bonnes pratiques chromatographique

- Vérifiez régulièrement la performance de vos systèmes et de votre colonne en utilisant les standards QCRM pour identifier immédiatement les problèmes :



Catalogue en ligne :
<http://asr.waters.com/>



Experience Waters Analytical
Standards and Reagents E-Catalog



Les bonnes pratiques chromatographique

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

- Augmentez la durée de vie de vos colonnes sans perdre en qualité de séparation en utilisant les nouvelles colonnes de garde. (CORTECS, XBridge, XSelect)

VAN GUARD™
COLUMN PROTECTION

Extend column lifetime.

VanGuard™ Column Protection
now available for HPLC columns!

VAN GUARD™
COLUMN PROTECTION

waters.com/vanguard



30% DE REMISE

+ 1 PORTE-CARTOUCHES GRATUIT*

Avec les précolonnes VanGuard, augmentez la durée de vie de vos colonnes, tout en préservant la qualité de vos séparations.



VAN GUARD™
COLUMN PROTECTION

Performance et grand choix de configurations :

- Protection efficace des colonnes contre les particules et contaminations chimiques,
- Augmentation de la durée de vie des colonnes tout en préservant la qualité des séparations,
- Connexion simple, rapide et directe pour minimiser les effets extra-colonnes et réduire ainsi les risques de fuite,
- Format compatible en mode HPLC, UHPLC et UPLC®,
- Disponibilité sur une large gamme de tailles de particules (de 2,5 µm à 5 µm), de diamètres internes (de 2,1 mm à 4,6 mm) et de chimie (CORTECS®, XBridge®, XSelect®).

Pour toute question technique sur le choix des précolonnes ou pour toute demande de devis, veuillez nous contacter au 0820 885 885 ou par email demandclient_france@waters.com.

*Conditions de l'offre:

Cette offre inclut un porte-cartouches gratuit + une remise de 30% sur les 3 premiers packs de précolonnes VanGuard (conditionnement : 3 précolonnes par pack). L'offre s'applique sur une seule commande jusqu'au 30 avril 2015, uniquement en France et non cumulable avec toute autre promotion. Pour bénéficier de l'offre, il faut IMPÉRATIVEMENT mentionner le code EP sur votre bon de commande.

Questions

