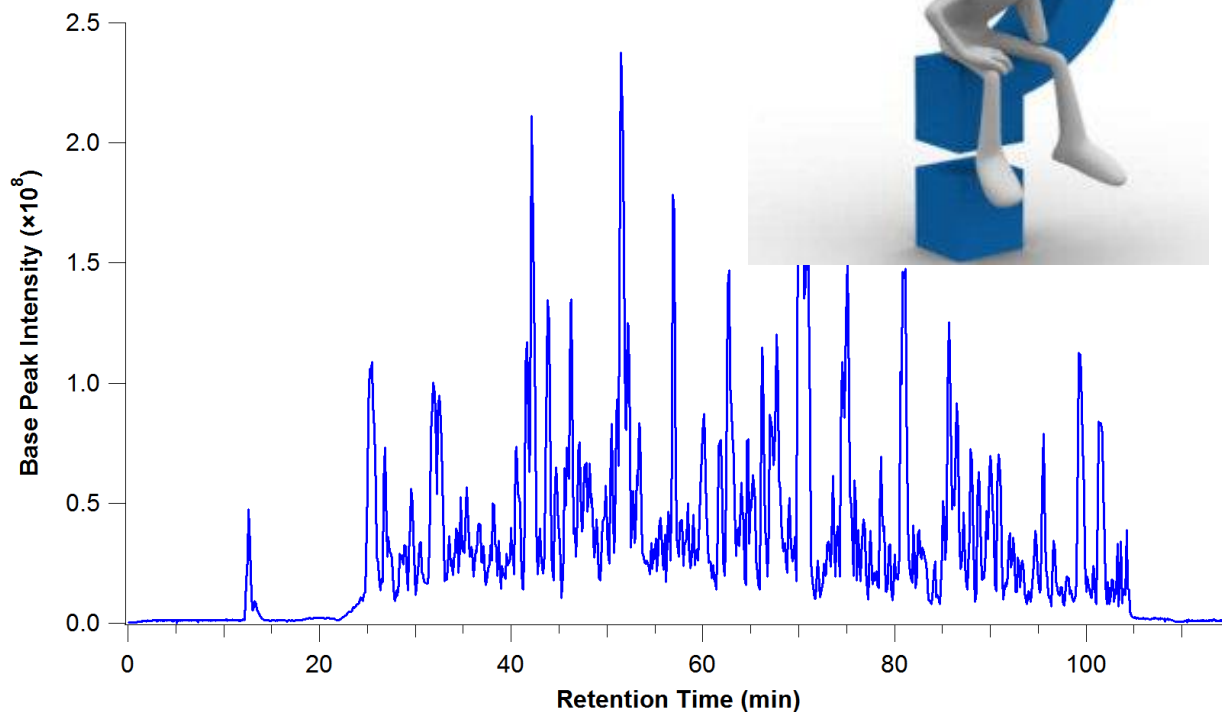


Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Petr Kozlík

Katedra analytické chemie

e-mail: kozlik@natur.cuni.cz



Sylabus přednášky:

Validace chromatografické metody:

➤ Správnost

➤ Přesnost

➤ Linearita

➤ Mez detekce a kvantifikace

➤ Selektivita

➤ Robustnost

Řešení problémů v LC

Validace metody v LC

Ověření (důkaz), že daná metoda je vhodná k danému účelu a poskytuje výsledky s definovanou jistotou.

Validace nebo revalidace:

- Před uvedením metody do běžné praxe
- Změna podmínek pro které byla metoda validována (rozdílná matrice vzorku)
- Změna vlastní metody (objem nástřiku, změna gradientu)
- Transfer metody do jiné laboratoře

Validace metody v LC

Směrnice:

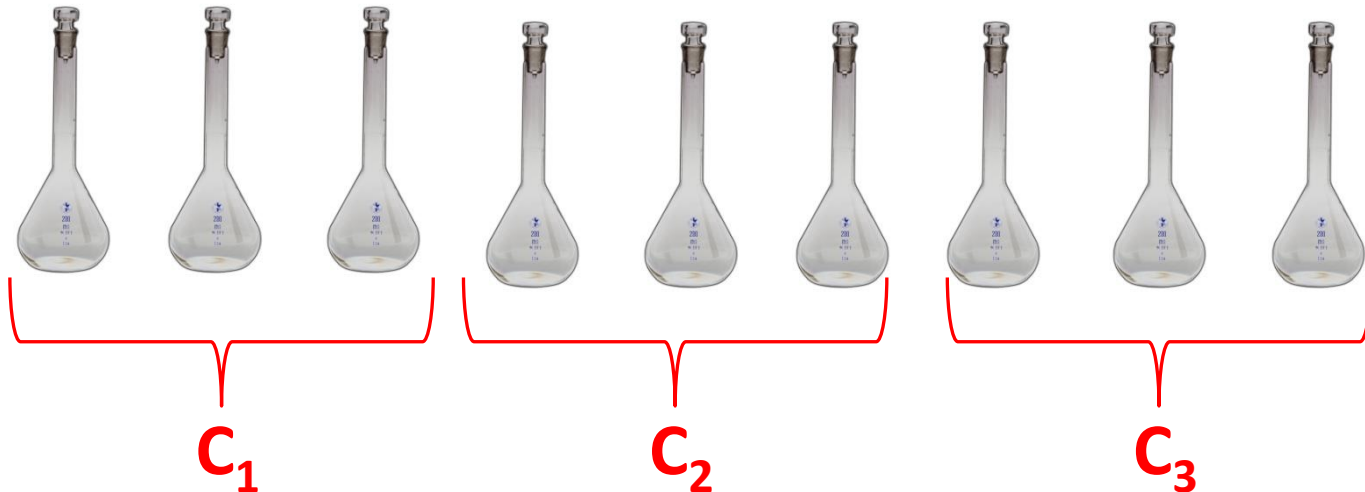
- ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
- FDA (Federal and Drug Administration)
- EMA (European Medicines Agency)
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Validace metody v LC

Správnost metody (accuracy): Správnost analytické metody vyjadřuje míru shody mezi nalezenou a skutečnou hodnotou.

Správnost metody se zjistí buď analýzou modelového vzorku (obvyklý přístup), nebo použitím jiné nezávislé metody.

Výtěžnost je definována jako poměr nalezené a skutečné hodnoty, v %.



Validace metody v LC

Přesnost metody (precision)

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru shody nalezených výsledků pro řadu stanovení, provedených se stejným homogenním reálným vzorkem za předepsaných podmínek. Přesnost metody může být ověřena na třech úrovních: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost (repeatability) vyjadřuje přesnost metody za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Někdy označována jako intra-assay precision.

Mezilehlá přesnost (intermediate precision): Mezilehlá přesnost vyjadřuje míru shody výsledků v rámci jedné laboratoře – analýza provedená jiným analytikem, na jiném zařízení, v jiný den, atd.

Reprodukovatelnost (reproducibility): Reprodukovatelnost vyjadřuje míru shody výsledků mezi různými laboratořemi.

Validace metody v LC

Opakovatelnost (repeatability)

6 opakování na 100% koncentrační hladině hlavní látky

3 opakování pro 3 koncentrační hladiny

Mezilehlá přesnost (intermediate precision)

Reflektuje rozdíly ve výsledcích způsobené například jiným analytikem, rozdílným instrumentem, rozdílné reagenty od různých dodavatelů, rozdílná šarže kolony atd.

Reprodukovatelnost (reproducibility): Reflektuje rozdíly ve výsledcích způsobené například v rozdílné laboratorní praxi mezi laboratořemi

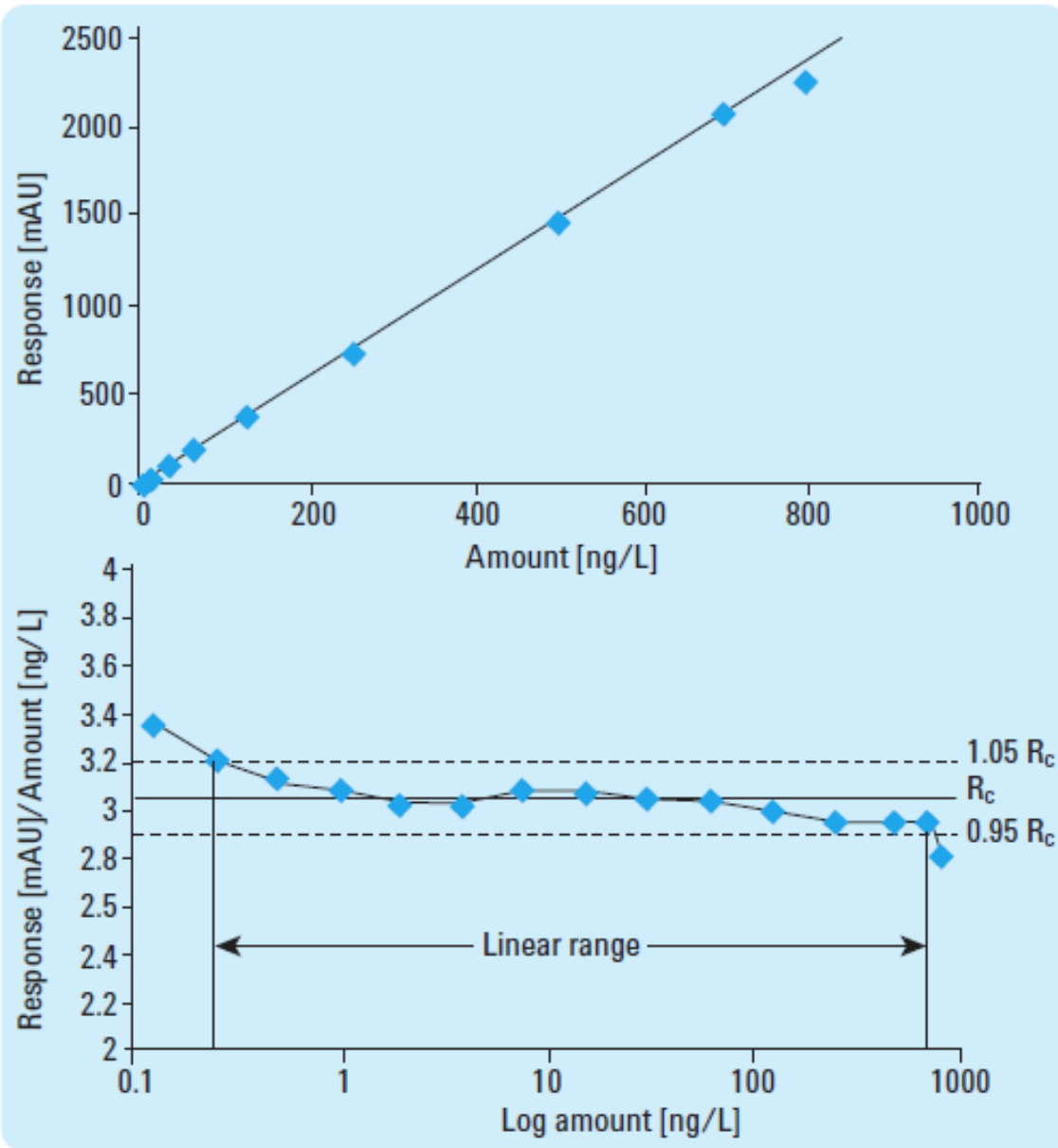
Validace metody v LC

Linearita: Linearita analytické metody je její schopnost, v daném rozsahu, poskytovat odezvy (resp. výsledky), které jsou přímo úměrné koncentraci (množství) analytu ve vzorku.

Provedení:

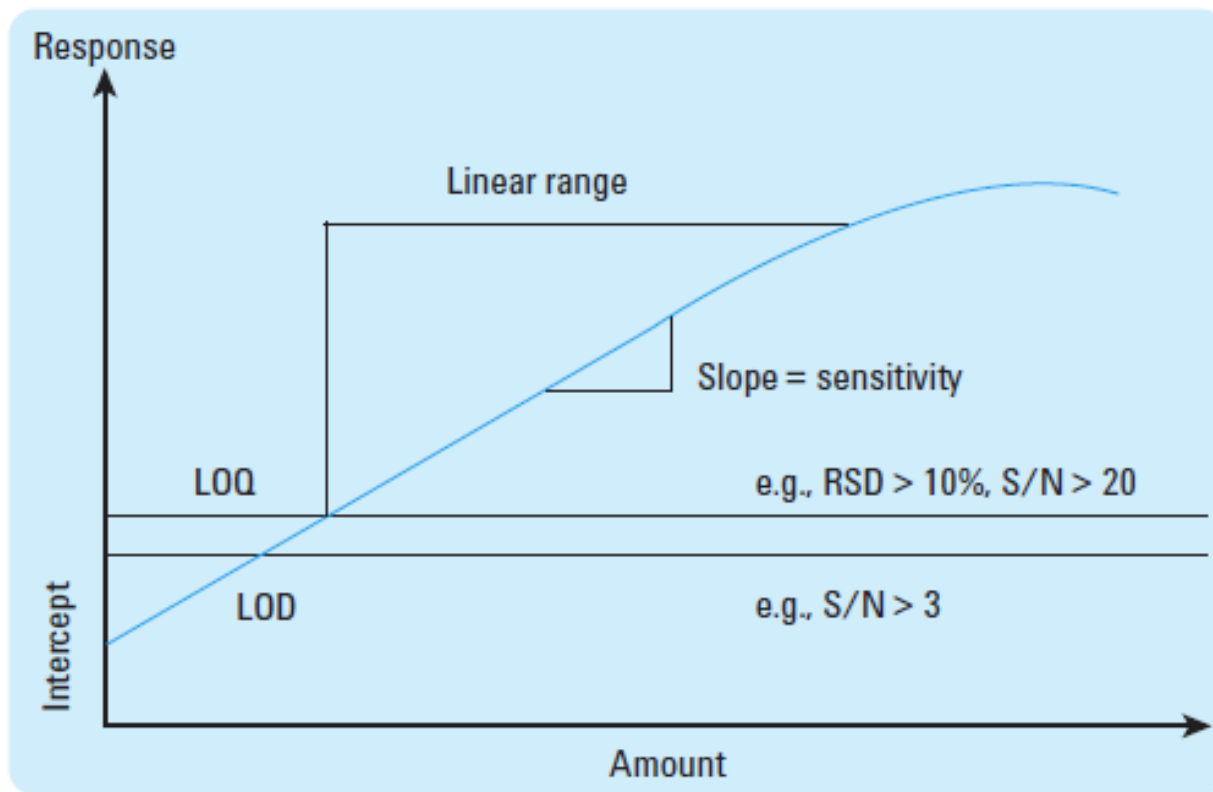
Připraví se sada modelových vzorků sestávajících z matrice a stanovovaného analytu. Přídavek API se realizuje buď vážením, nebo ředěním zásobního roztoku. Linearita se ověří v rozsahu minimálně 5ti koncentračních hladin, pro každou koncentrační hladinu se připraví 3 nezávislé modelové vzorky.

Validace metody v LC



Intercept by mel byt blízky nule, pokud ne – doložit, že to neovlivňuje správnost

Validace metody v LC



Rozmezí koncentrací – rozmezí mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací, pro které byla ukázána vhodná správnost, přesnost a linearita.

Validace metody v LC

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Detekční limit analytické metody je nejnižší detekovatelná koncentrace analytu ve vzorku, nestanovovaná kvantitativně. Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Kvantitativní limit analytické metody je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, stanovitelná s dostatečnou přesností a správností.

Veličina	Vzorec
Detekční limit	$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{a}$
Kvantitativní limit	$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$

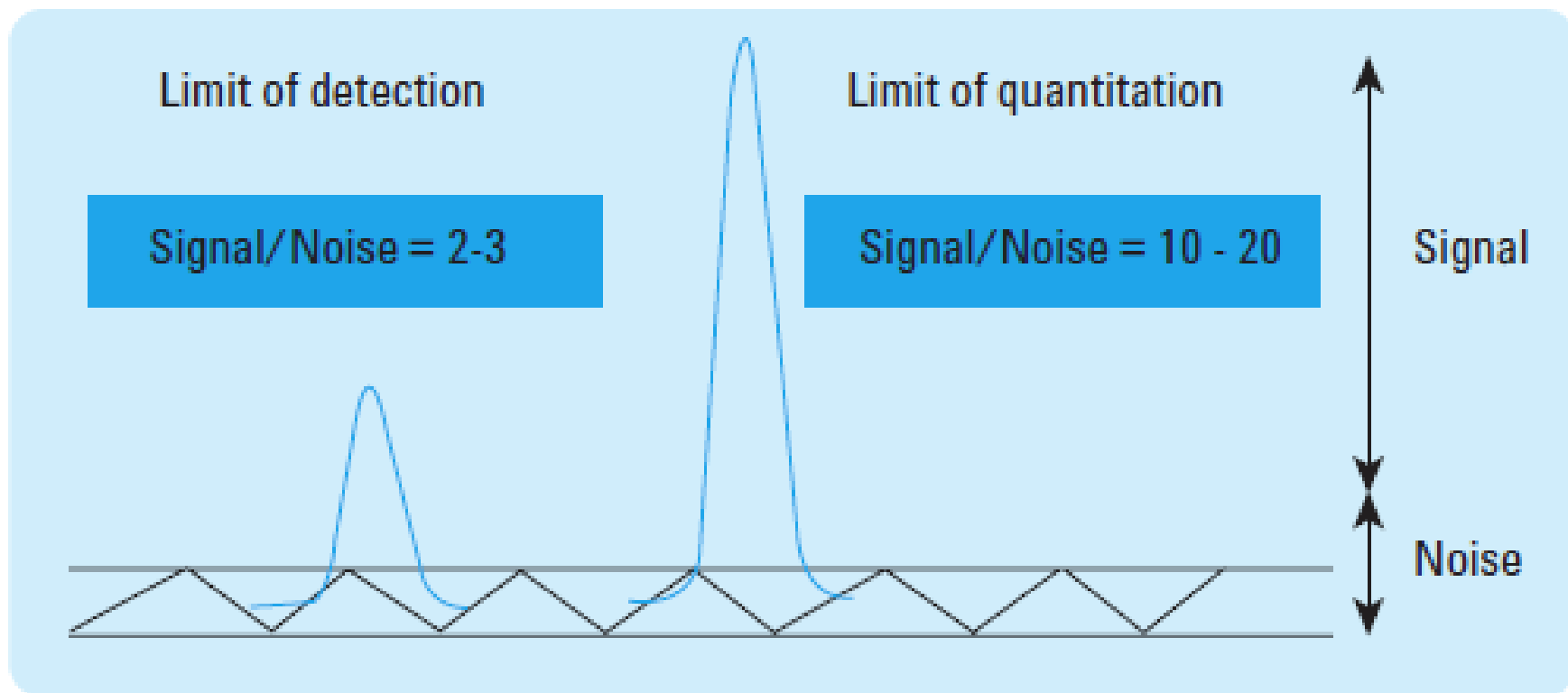
Kde:

σ je průměrná hodnota šumu (rozpětí šumu) z chromatogramů roztoku placeba, respektive rozpouštědla vzorku, v příslušném časovém intervalu (pokud lze – alespoň 5ti násobek šířky píku v polovině jeho výšky a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík)

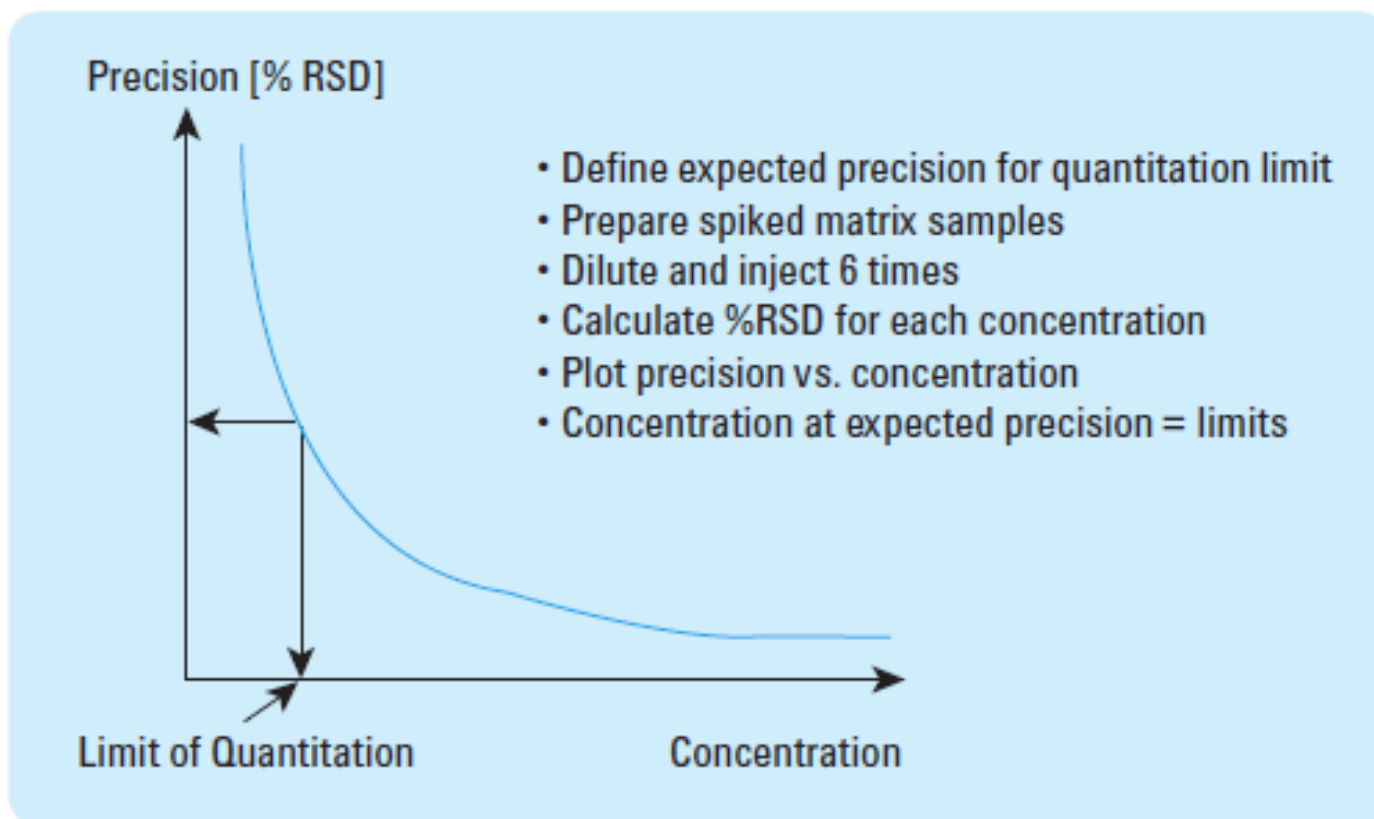
a je směrnice přímky (závislost výšky píku na koncentraci) získaná při měření linearity

Validace metody v LC

Mez detekce a mez stanovitelnosti



Validace metody v LC



Hodnoty LOD a LOQ musí být ověřeny experimentálně
Hodnoty LOD a LOQ by měly být doprovázeny hodnotami
správnosti a přesnosti

Validace metody v LC

Selektivita metody

Selektivita je schopnost nezkresleně stanovit analyt v přítomnosti dalších látek, jejichž přítomnost se očekává (látky neruší stanovení).

Provedení: Porovnají se chromatogramy roztoku placebo (resp. rozpouštědla vzorku) s chromatogramy referenčního roztoku, roztoku vzorku, a pokud je to relevantní – rovněž roztoku vzorku spikovaném degradačními produkty a nečistoty ze syntézy.

V případě potřeby se provedou stresové testy (zvýšená teplota, zvýšená teplota + zvýšená vlhkost nebo přídavek vody, světlo, změny pH, oxidační činidlo) s doporučeným cílem degradace API do 10 % a zkontroluje se peak purity.

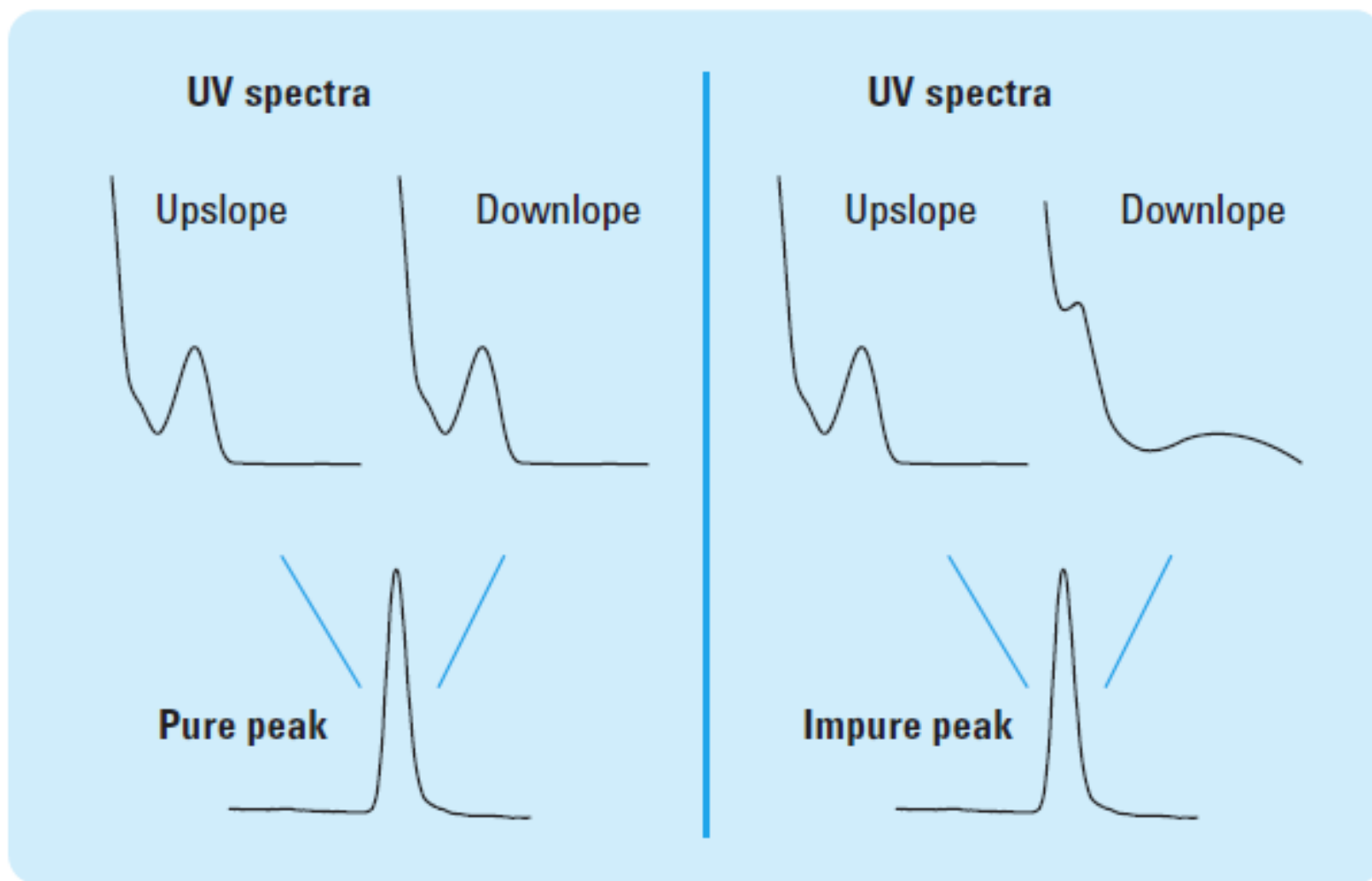
DAD detektor – změna vlnové délky

MS detektor – výběr různých skenů

Změna chromatografické metody

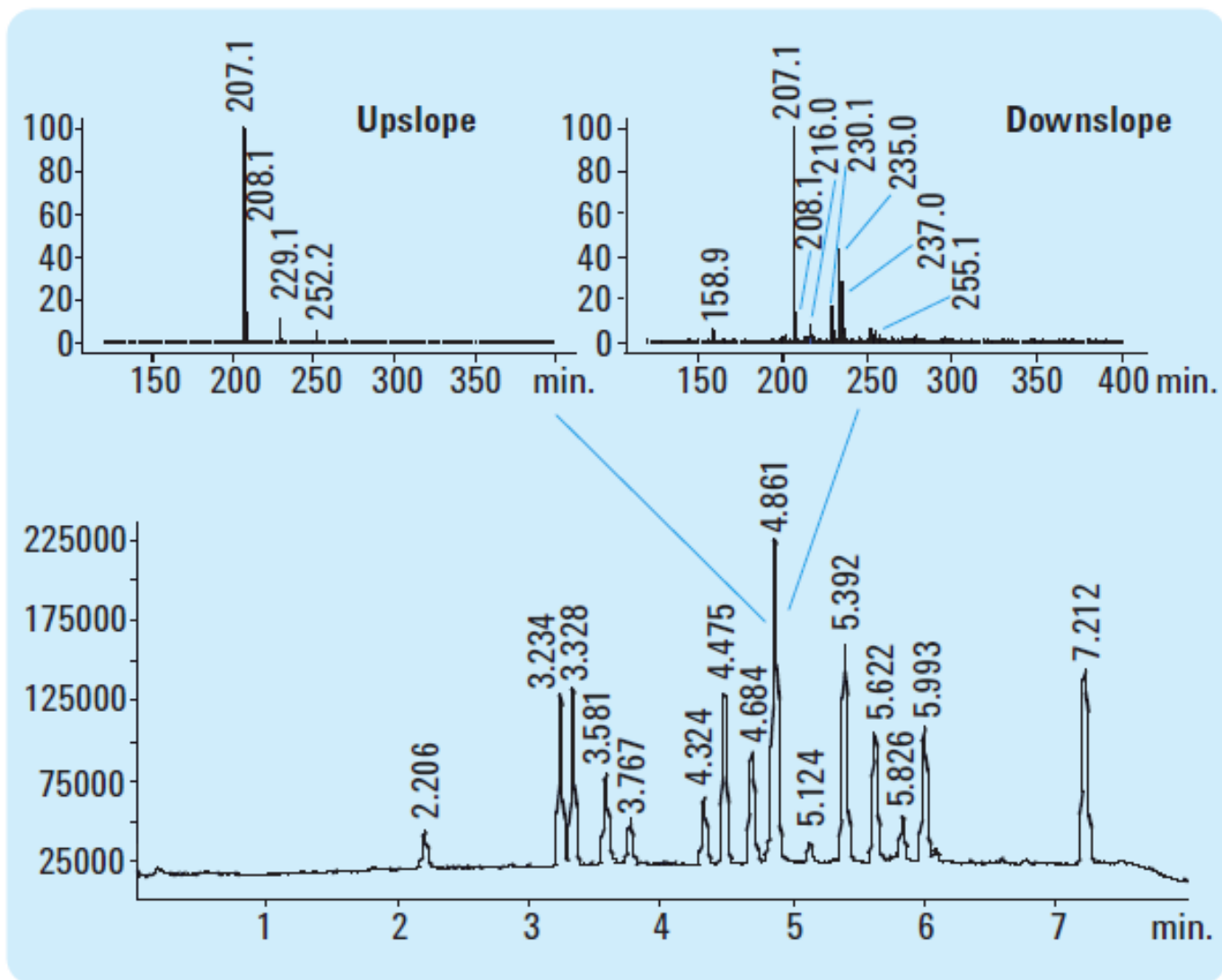
Validace metody v LC

Selektivita metody



Validace metody v LC

Selektivita metody



Validace metody v LC

Robustnost metody

Robustnost analytické metody je její schopnost nebýt ovlivněna malými změnami v podmínkách analýzy.

Provedení: Sleduje se vliv specifických změn na analytickou metodu.

- a) Změnou jednotlivých analytických podmínek metody a posouzením dopadu na analýzu (jednorozměrná analýza dat).
- b) Analýzou vhodného počtu referenčních vzorků za předem definované sady (kombinací) podmínek, s následnou kvantifikací a vyhodnocením dat (vícerozměrná analýza dat). Pro volbu modelu a následné vyhodnocení dat se použije vhodný algoritmus (např. Plackett- Burman, dílčí faktoriální design, apod.).

Validace metody v LC

Robustnost metody

Podmínky:

- Výběr kolony: Pro předepsaný typ kolony minimálně dvě různé kolony, které se liší šarží sorbentu.
- Složení mobilní fáze: Koncentrační změny organických komponent – obvykle 2-5 % absolutních a koncentrační změny solí, kyselin, bazí, či chirálních modifikátorů – obvykle v minimálním rozsahu ± 10 % relativních.
- pH mobilní fáze/složky mobilní fáze: Změny obvykle v rozsahu $\pm 0,2$ - $0,5$ jednotky pH.
- Průtok mobilní fáze: Změny obvykle v rozsahu ± 10 % relativních
- Teplota kolony: Změny obvykle v rozsahu ± 5 °C

Validace metody v LC

Stabilita

Během nakládání s analyty může docházet k jejich degradaci (během přípravy vzorku, při skladování v lednici, v autosampleru apod.)

Běžně se testuje:

Stabilita látky v roztoku v autosampleru po 24 a 48h

Stabilita látky v roztoku “ na stole” po 24 a 48h

Stabilita látky v pevném stavu “ na stole” po 24 a 48h

Validace metody v LC

Test způsobilosti chromatografického systému

Test způsobilosti představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění adekvátní účinnosti chromatografického systému. Za tímto účelem se provádí obvykle na začátku analýzy, po jakékoli změně v chromatografickém systému (např. nová mobilní fáze) a v případě jakéhokoli podezření na špatnou funkci chromatografického systému.

Test způsobilosti obvykle zahrnuje dva nebo více parametrů:

- Systémová opakovatelnost – za účelem prokázání schopnosti chromatografického systému poskytovat opakovatelnou odezvu.

- Vhodný separační parametr (například rozlišení) – za účelem prokázání adekvátní separační schopnosti chromatografického systému. Volba separačního parametru se provede na základě dat z robustnosti metody.

Validace metody v LC

Příklady z validačního reportu:

SYSTEM SUITABILITY TEST

a) System repeatability

5 successive injections of reference solution

Injection no.	Peak area of [redacted] [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Peak area of [redacted] [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]
1	403832	1160881
2	405286	1162560
3	404367	1161946
4	404463	1162376
5	404405	1162015
Average	404471	1161955
RSD [%]	0.13	0.06

b) Symmetry factor

Symmetry factor (according to Ph.Eur.) of [redacted] peak was 1.1 and of [redacted] peak was 1.3 in the chromatogram of reference solution on current conditions.

Acceptance criteria:

System repeatability: $\leq 1.5\%$

Symmetry factor: 0.8 – 1.6

Result: Complies.

Validace metody v LC

Příklady z validačního reportu:

a) PRECISION

Repeatability (1st analyst, 1st instrument) & Intermediate precision (2nd analyst, 2nd instrument)

Analyses of 6 sample solutions (6 sample solutions by the first analyst and 6 sample solutions by the second analyst) obtained from multiple sampling of the same homogeneous authentic sample.

Sample no.	1 st analyst: [REDACTED]			2 nd analyst: [REDACTED]		
	Weight [mg]	Response [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Assay [mg/tbl. flm.]	Weight [mg]	Response [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Assay [mg/tbl. flm.]
1	280.02	400362	100.2	280.23	395082	98.4
2	280.34	399193	99.8	280.67	395341	98.3
3	280.50	399515	99.9	280.41	395934	98.6
4	280.40	400305	100.0	280.77	397350	98.8
5	280.13	401931	100.4	280.29	400758	99.8
6	280.08	400504	100.2	280.61	398850	99.2
Average	–	–	100.1	–	–	98.9
RSD [%]	–	–	0.22	–	–	0.57
95% confidence interval	–	–	<99.8; 100.3>	–	–	<98.3; 99.4>
Reference 1	15.958	404471	–	16.261	410103	–
Reference 2	15.966	404939	–	16.800	425666	–
Difference between averages of two analysts $\Delta = 1.2$ %						

Acceptance criteria:

RSD: ≤ 2.0 %

Δ : ≤ 3.0 %

Result: Complies

Validace metody v LC

Příklady z validačního reportu:

b) LINEARITY

Analysis of 15 solutions of model samples consisting of placebo (100 % of the test concentration) with different additions of reference standard(s) (20 %, 50 %, 70 %, 100 % and 130 % of the test concentration, 3 model samples per level).

Sample no.	Level [% of the test concentration]	Concentration	Response [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Residuals [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Response ratio [$\mu\text{V}\cdot\text{s}/\%$ of the test conc.]
1	20	20.0	79976	-0.3	3998
2		20.0	79911	-65.3	3995
3		20.0	80205	228.7	4009
4	50	50.0	202405	-671.1	4047
5		50.0	202796	-280.1	4055
6		50.0	202629	-447.1	4052
7	70	70.0	285201	58.4	4073
8		70.0	285680	537.4	4080
9		70.0	285513	370.4	4078
10	100	100.0	408569	326.7	4085
11		100.0	409543	1300.7	4094
12		100.0	407813	-429.3	4077
13	130	130.0	530825	-517.1	4082
14		130.0	530836	-506.1	4082
15		130.0	531436	93.9	4087
Average					4060
RSD [%]					0.8
Regression line					$y = 4102x - 2090$
Residual sum of squares [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]					3729766
Correlation coefficient r					1.000
Intercept b_{tc} [% of signal at the test concentration]					0.51

Acceptance criteria:

Correlation coefficient $r: \geq 0.999$

Intercept $b_{tc}: \leq 2\%$

Result: Complies

Validace metody v LC

Příklady z validačního reportu:

c) ACCURACY

Analysis of 15 solutions of model samples consisting of placebo (100 % of the test concentration) with different additions of reference standard(s) (20 %, 50 %, 70 %, 100 % and 130 % of the test concentration, 3 model samples per level).

Sample no.	Level [% of the test concentration]	Concentration	RS added [$\mu\text{g/ml}$]	Response [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Determination [$\mu\text{g/ml}$]	Recovery [%]
1	20	20.0	16.00	79976	15.74	98.4
2		20.0	16.00	79911	15.72	98.2
3		20.0	16.00	80205	15.78	98.6
4	50	50.0	40.01	202405	39.83	99.6
5		50.0	40.01	202796	39.90	99.7
6		50.0	40.01	202629	39.87	99.7
7	70	70.0	56.01	285201	56.12	100.2
8		70.0	56.01	285680	56.21	100.4
9		70.0	56.01	285513	56.18	100.3
10	100	100.0	80.02	408569	80.39	100.5
11		100.0	80.02	409543	80.58	100.7
12		100.0	80.02	407813	80.24	100.3
13	130	130.0	104.02	530825	104.45	100.4
14		130.0	104.02	530836	104.45	100.4
15		130.0	104.02	531436	104.57	100.5
Average						99.9
RSD [%]						0.8
95% confidence interval						<98.8; 100.9>
Reference		Weight [mg]		Response [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]		
1		15.970		405895		
2		15.994		406333		

Acceptance criterion:

Recovery: 98.0 – 102.0 %

Result: Complies

result: Complies

Validace metody v LC

Příklady z validačního reportu:

e) ROBUSTNESS

ROBUSTNESS – CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The following changes in chromatographic conditions were verified:

Different columns	Column 1	Column 2
Retention times [min]:		
- XXXXXXXXXX	2.22	2.21
- XXXXXXXXXX	2.56	2.54
- XXXXXXXXXX	2.65	2.63
- XXXXXXXXXX	2.79	2.77
- XXXXXXXXXX	2.91	2.90
- XXXXXXXXXX	3.44	3.45
Symmetry factor of XXXXXXXXXX peak	1.25	1.29
Symmetry factor of XXXXXXXXXX peak	0.97	0.95

Column 1 = ACQUITY CSH Phenyl - Hexyl 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm, S.N. 01053213315629

Column 2 = ACQUITY CSH Phenyl - Hexyl 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm, S.N. 01043209715828

pH of a component A of mobile phase	2.3	2.5	2.7
Retention times [min]:			
- XXXXXXXXXX	2.02	2.22	2.40
- XXXXXXXXXX	2.51	2.56	2.61
- XXXXXXXXXX	2.61	2.65	2.70
- XXXXXXXXXX	2.75	2.79	2.83
- XXXXXXXXXX	2.87	2.91	2.95
- XXXXXXXXXX	3.43	3.44	3.45
Symmetry factor of XXXXXXXXXX peak	1.25	1.25	1.28
Symmetry factor of XXXXXXXXXX peak	1.60	0.97	0.82

Troubleshooting – řešení problémů v LC



předcházení problémů – prevence a údržba systému (těsnící kroužky u LC apod)

testovací metoda – gradientová X isokratická
sleduje se retence, opakovatelnost nástřiku,
účinnost, rozlišení a jiné (námi nadefinované
parametry)

ověření míchání MF, dávkovaného objemu, tlaku

Troubleshooting – řešení problémů v LC

běžné problémy související s LC:

- netěsnost systému – podtékání
- šum a drift základní linie
- abnormální tlak
- nepravidelný retenční čas
- plocha píku
- tvar píku

Troubleshooting – řešení problémů v LC

netěsnost systému – podtékání

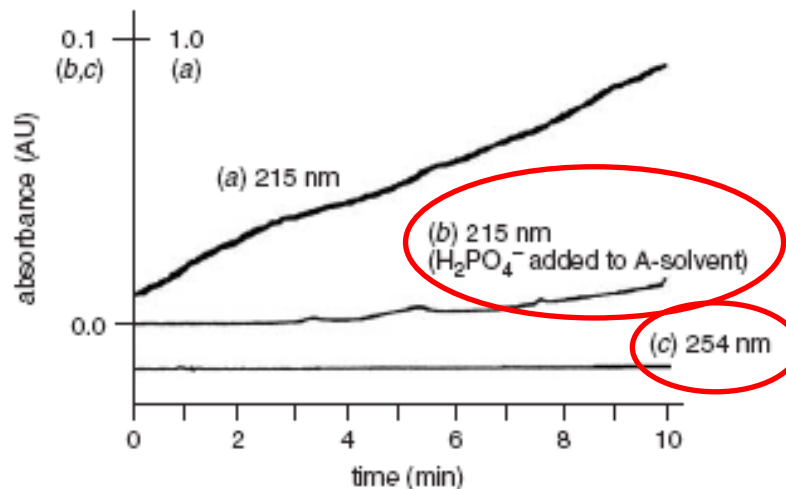
- jeden z nejběžnějších problémů
- jednotlivé části LC systému obsahují senzory
- horší identifikace při nepatrném podtékání

- podtékání pumpy
- podtékání spojů
- podtékání autosampleru – vícecestný ventil
- podtékání kolony
- podtékání detektoru

Troubleshooting – řešení problémů v LC

šum a drift základní linie

pozorován hlavně u gradientové eluce



přidána látka do A složky, která též absorbuje při dané vlnové délce (potlačení rozdílu při gradientu)

změna vlnové délky

Figure 17.6 Baselines obtained using water-methanol or phosphate-methanol gradients, 5–80% B in 10 minutes. (a) Gradient at 215 nm and 1.0 AU full-scale; solvent A: water; solvent B: methanol; (b) same as (a), except solvent A: 10 mM potassium phosphate (pH-2.8) and 0.1 AU full-scale; (c) same as (a), except 254 nm and 0.1 AU full-scale. Adapted from [20].

Troubleshooting – řešení problémů v LC

šum a drift základní linie

pozorován hlavně u gradientové eluce

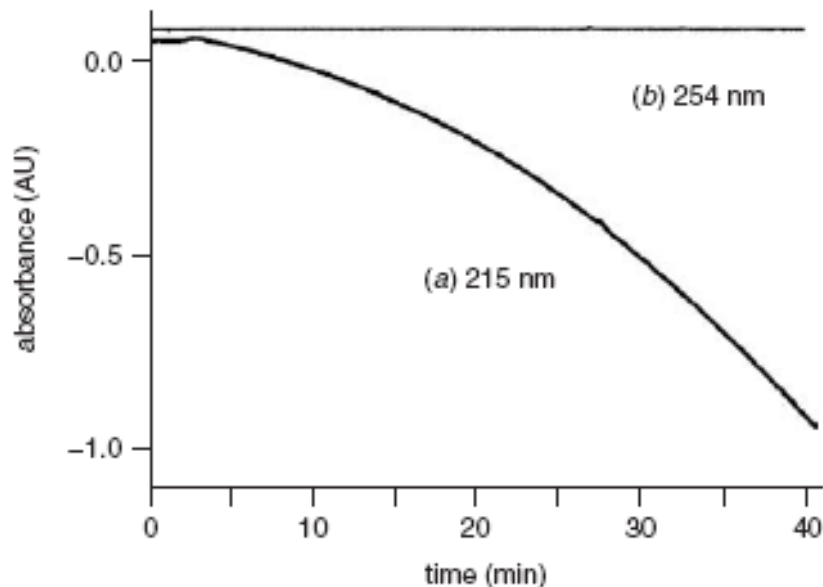
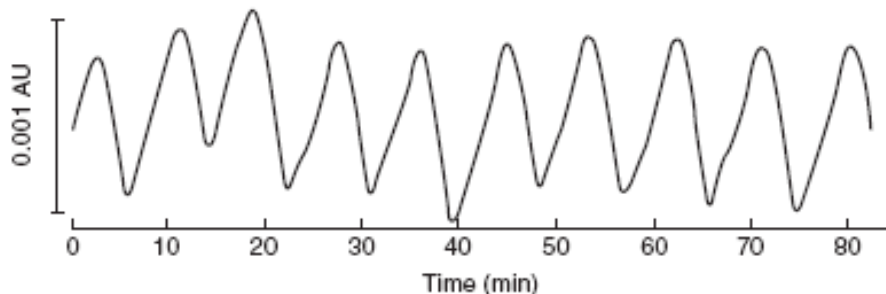


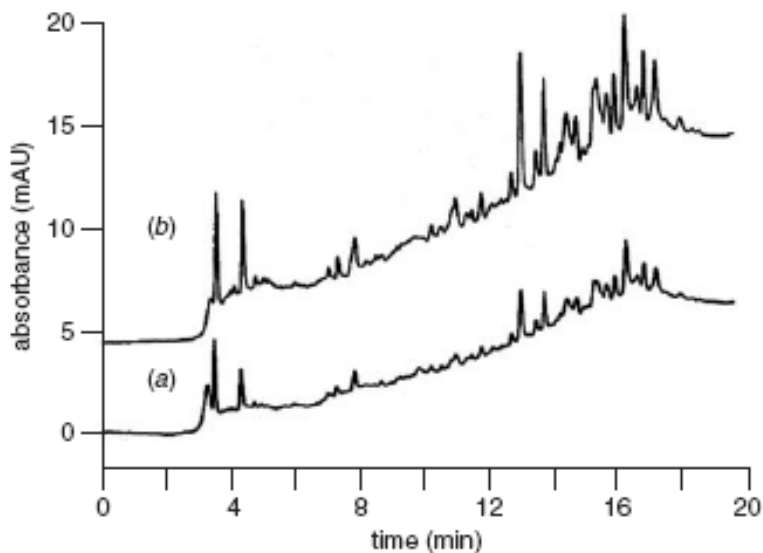
Figure 17.7 Baselines obtained using ammonium acetate-methanol gradients. Solvent A: 25-mM ammonium acetate (pH-4); solvent B: 80% methanol in water; gradient: 5–100% B in 40 minutes. (a)215-nm detection; (b)254 nm. Adapted from [20].

Troubleshooting – řešení problémů v LC

šum a drift základní linie



bublinka v systému



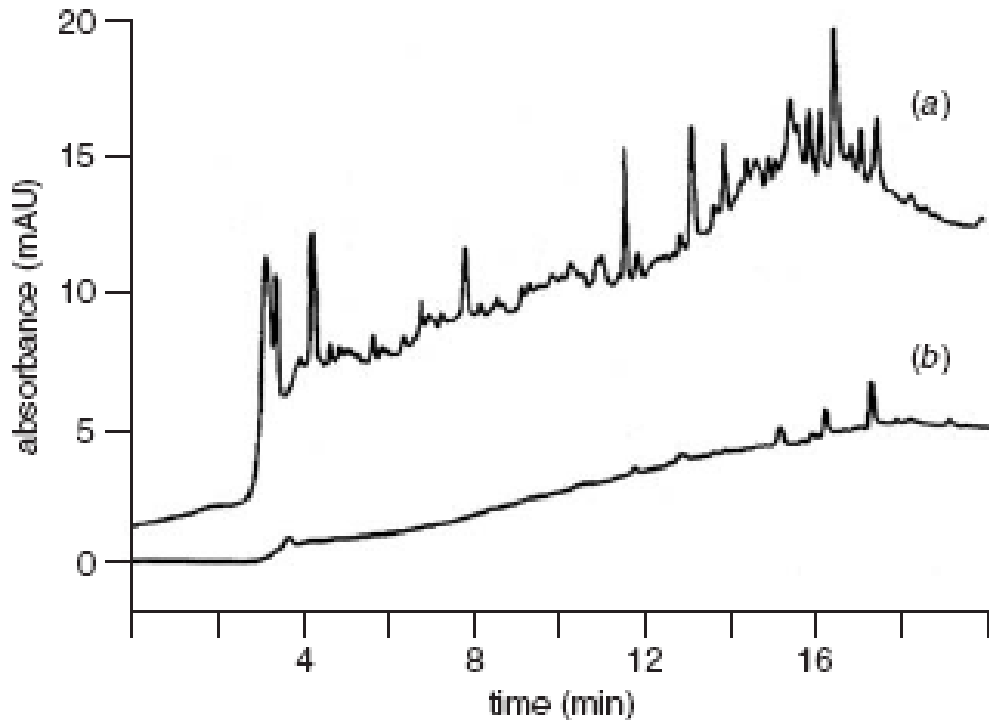
špinavý pufr – porovnání doby
ekvilibrace

Figure 17.11 Effect of impurities in the A-solvent on a gradient chromatogram: blank gradient runs after (a) 10-minute and (b) 30-minute equilibration. C_{18} column; gradient 5–80% ACN–10-mM phosphate buffer (pH-7) in 15-minute plus 5-minute hold at 80%; UV detection at 215 nm. Adapted from [7].

Troubleshooting – řešení problémů v LC

šum a drift základní linie

úprava pH pufru s pH elektrodou (a) a namíchání pufru bez pH elektrody (b)



Troubleshooting – řešení problémů v LC

šum a drift základní linie

System nebo chromatografická kolona není dostatečně ekvilibrována	Nechat delší čas ekvilibrovat
Kontaminovaná nebo degradována kolona nebo předkolona.	Nová kolona, regenerace kolony
Netěsnost v systému (dávkování vzorku, cela detektoru, spoje kapilár).	Zkontrolovat systém
Mobilní fáze je kontaminována, popřípadě je špatně odvzdušněna.	Nová příprava MF; použít čistější chemikále.
Kontaminovaná cela detektoru.	Propláchnout celu detektoru; pozor na tlakové limity
Teplotní změny v systému na chromatografické koloně	Kolonu termostatovat

Troubleshooting – řešení problémů v LC

abnormální tlak

Tlak systému závisí na viskozitě MF, průtoku, teplotě a rozměrech kolony a kapilár.

Vysoký tlak:

- kontrolujeme metodu
- zablokovaná odpadní kapilára
- ucpané inline filtry
- ucpaná fritá v koloně
- ucpaná detekční cela

Nízký tlak:

- kontrolujeme metodu
- netěsnost systému
- problémy s pumpou
- došla MF 😊

Troubleshooting – řešení problémů v LC

nepravidelný retenční čas

- Zkontrolovat metodu
- Pulzace LC čerpadla
- Malá ekvibrace kolony
- Netermostatovaná kolona
- Špatní míšení MF
- Kontaminace kolony, ireverzibilní vazba nečistot na koloně
- Netěsnost systému

Troubleshooting – řešení problémů v LC

plocha píku

Může se zvyšovat nebo snižovat.

- kontrolovat ředění
- kontrolovat UV-VIS spektrum
- jsme v lineární oblasti detektoru?
- kompatibilita solventu
- těkavé rozpouštědlo vzorku
- naplněná vialka až po okraj
- bublina v sampleru – propurgovat
- kompatibilita oplachu jehly
- koeluce z předešlých analýz

Troubleshooting – řešení problémů v LC

plocha píku

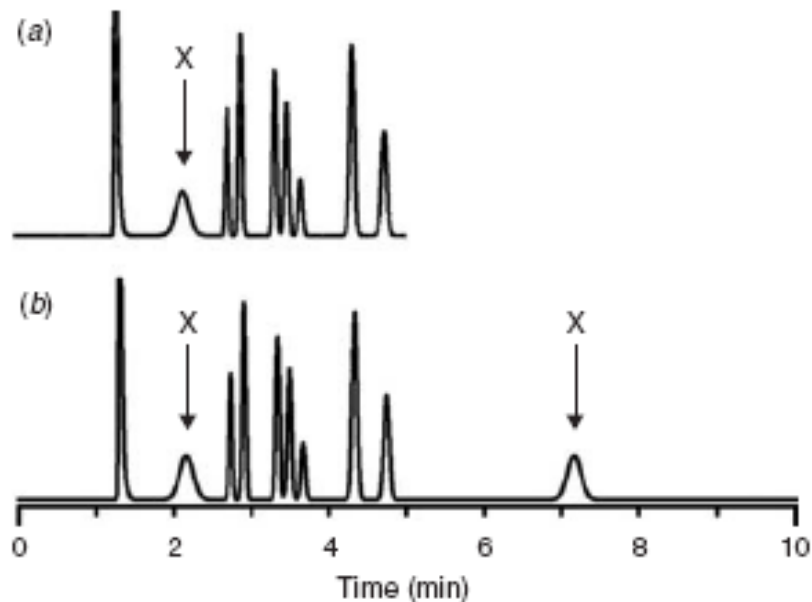
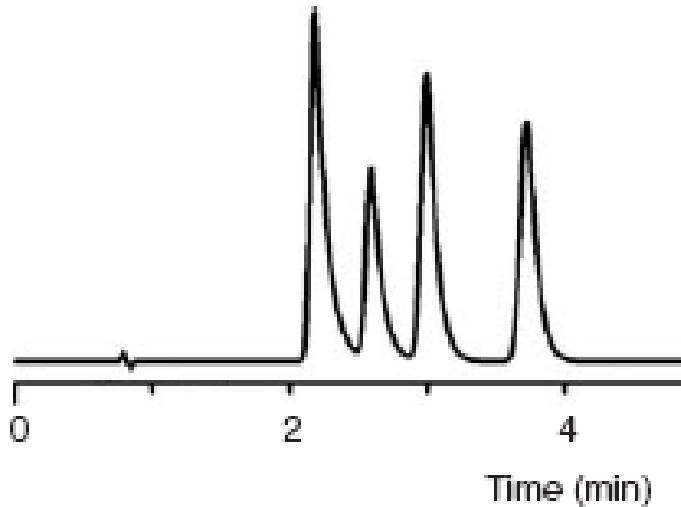


Figure 17.5 Example of late elution. (a) Broad peak (X) appears out of place in chromatogram; (b) entire chromatogram; extended run time allows peak to elute in proper position in chromatogram (≈ 7 min).

Troubleshooting – řešení problémů v LC

tvar píku

tailující píky



- mimokolonové příspěvky k rozšiřování zony analytu
- vysoká nástřiková koncentrace
- kontaminace inline filtru
- přiučpaná frita kolony

Troubleshooting – řešení problémů v LC

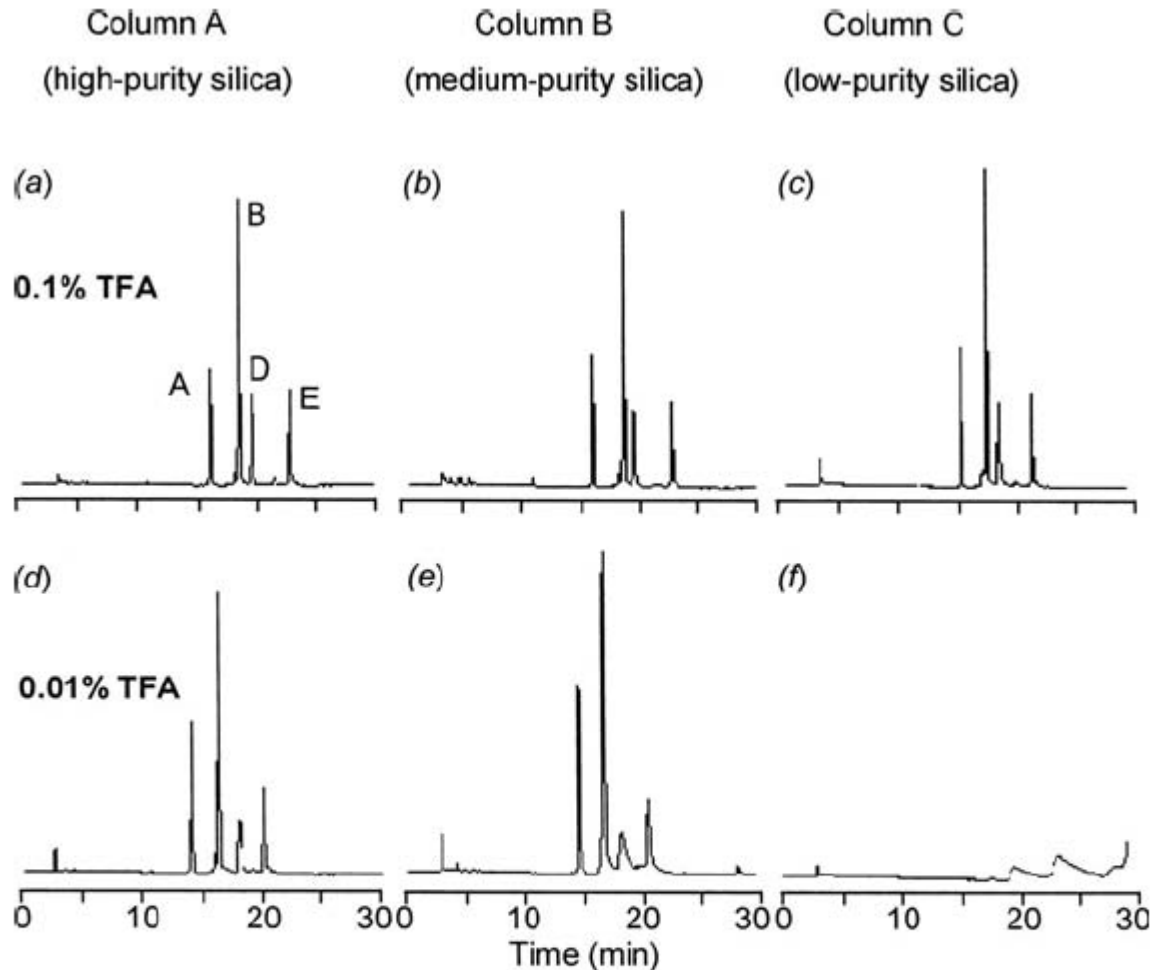
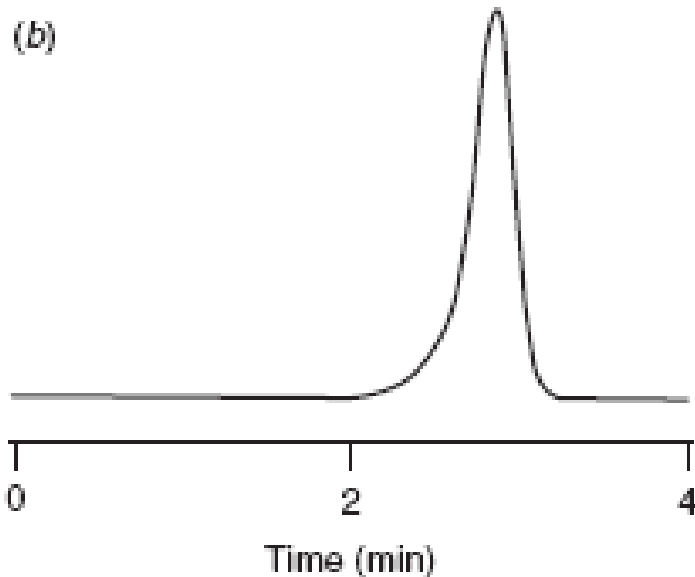


Figure 17.14 Influence of trifluoroacetic acid concentration on peak tailing for columns of varying silica purity. (a, d) High-purity silica (column A); (b, e) intermediate purity silica (column B); (c, f) low-purity silica (column C). (a-c) 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA); (d-f) 0.01% TFA. C₁₈, 30-nm pore silica particles, 5–70% ACN/TFA gradients. Sample: A, ribonuclease A; B, cytochrome C; C, holo-transferin, D, apomyoglobin. Data courtesy of Advanced Chromatography Technologies (ACT).

Troubleshooting – řešení problémů v LC

tvar píku

frontující píky



➤ nejsou tak časté

➤ pravděpodobně pracujeme v nelineární oblasti adsorpční isotermy (zkusit snížit nástřik)

➤ nabořená kolona

Troubleshooting – řešení problémů v LC

tvar píku

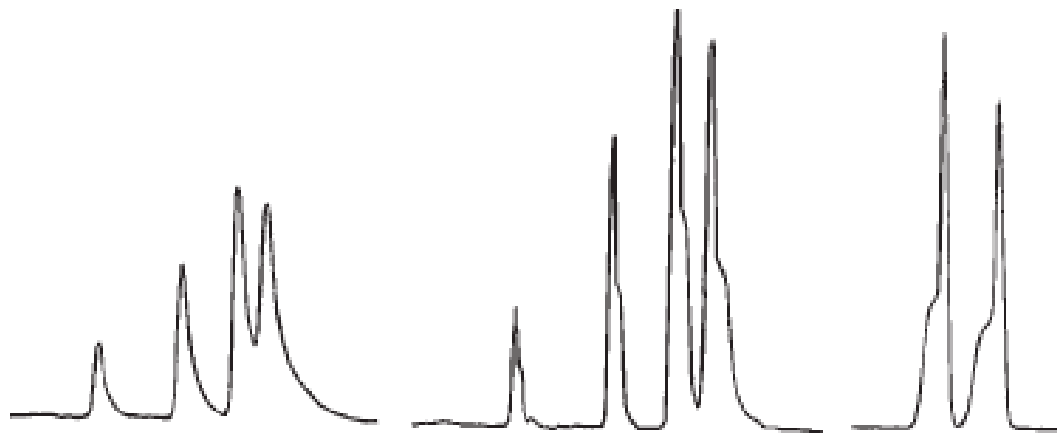
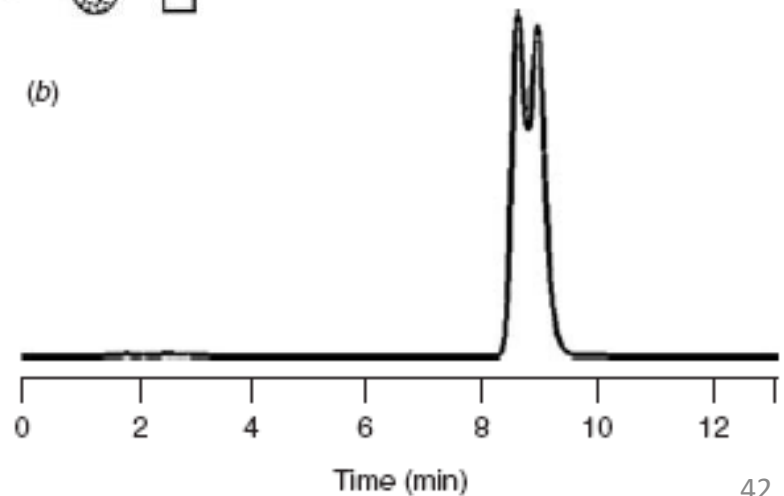
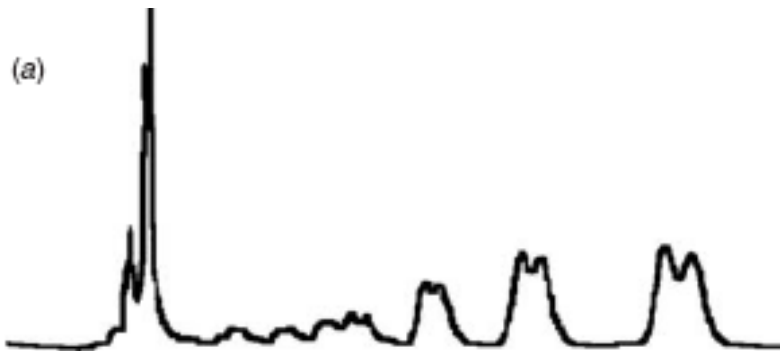
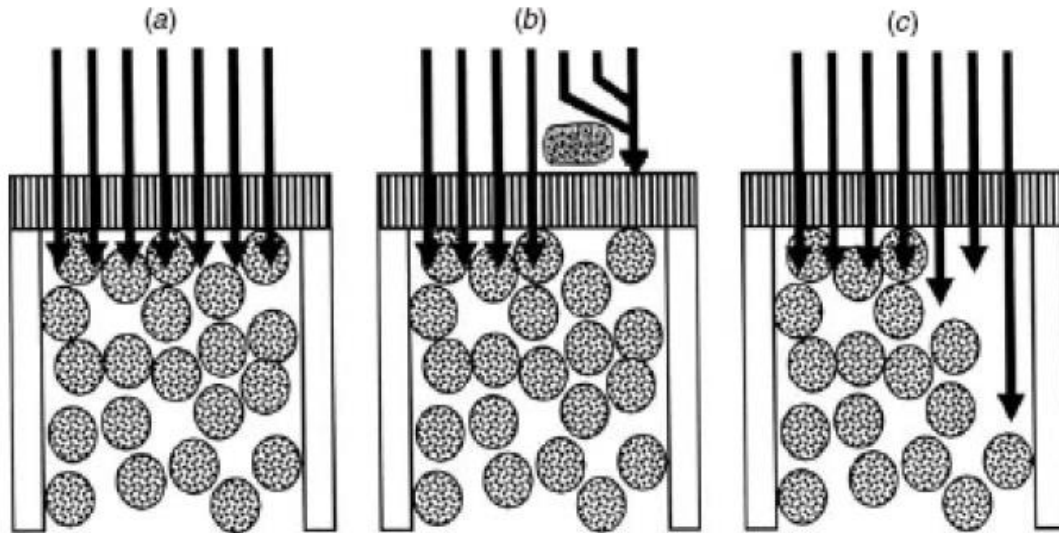


Figure 17.17 Examples of similar peak distortion for all peaks in the chromatogram, attributed in each case to a partially blocked column-inlet frit.

kontaminace kolony nebo přiučpání frity, vznik mrtvého objemu
otočit kolonu a nechat promýt 20-30 objemy MF

Troubleshooting – řešení problémů v LC

tvar píku



Troubleshooting – řešení problémů v LC

tvar píku

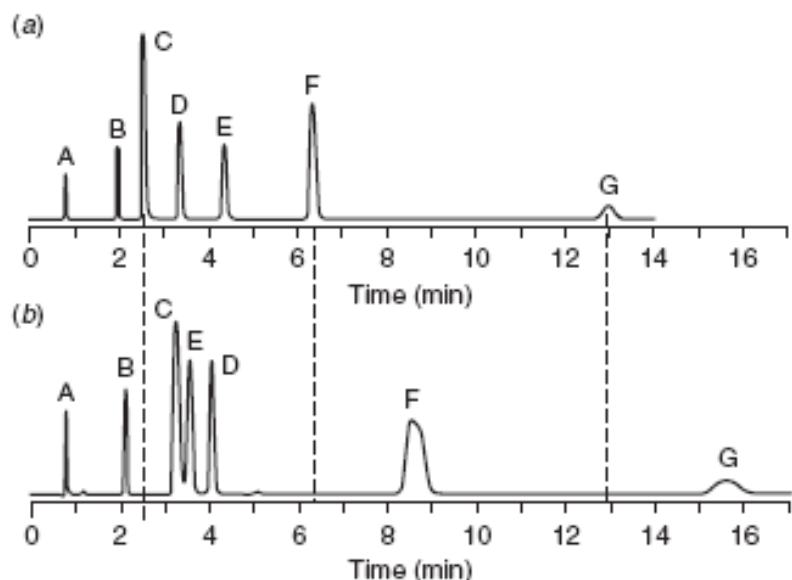
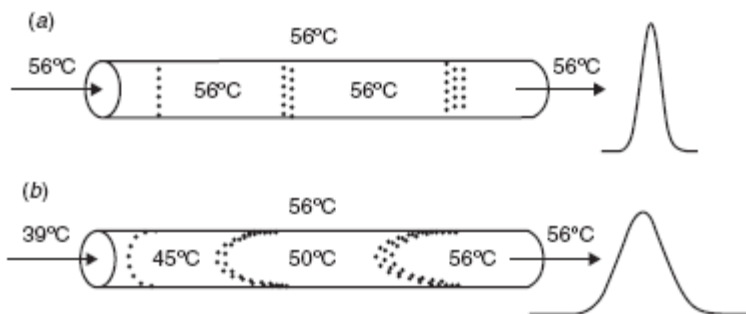


Figure 17.20 Effect of temperature mismatch of incoming mobile-phase and column. (a) Inlet solvent 56°C; oven 56°C (matched temperatures). (b) Inlet solvent 39°C; oven 56°C (unmatched temperatures). Sample: A, uracil; B, nitroethane; C, phthalic acid; D, 3,5-dimethylaniline; E, 4-chloroaniline; F, 3-cyanobenzoic acid; and G, 1-nitrobutane. 150 × 4.6-mm (5 μm) Zorbax SB-C₁₈ column; 90/10 50 mM potassium phosphate (pH-2.6)/ACN at 2.0 mL/min. Adapted from [28].



vliv teploty

Použité zdroje a zároveň doporučená literatura

Monografie:

Snyder R. L., Kirkland J. J.: Practical HPLC method development

Snyder R. L., Kirkland J. J.: Introduction to modern chromatography

Nováková L., Douša M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi (první a druhý díl)

Snyder R. L., Dolan J. W.: High performance gradient elution

Meyer V. R.: Practical high performance liquid chromatography

Dong M. W.: Modern HPLC for practicing scientists

Kromidas S.: More practical problem solving in HPLC

Internetové zdroje:

www.hpst.cz

www.waters.com

www.chromacademy.com

www.hplc.cz

<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/>

www.shimadzu.com

Časopisy:

Journal of Chromatography A, B

Journal of Separation Science

Analytical Chemistry

Chromatographia

Journal of Liquid Chromatography

LCGC