

HPLC lahutuse optimeerimine

2005/2006 kevad

1

Kromatograafilise lahutuse optimeerimine

- Vaatleme pöördfaas-kromatograafiat

Retentsiooni vähendamiseks	Retentsiooni suurendamiseks
Polaarsem kolonn (C _N , C ₄)	Vähempolaarne kolonn (C ₈ , C ₁₈)
Vähempolaarne mobiilfaas: suurem orgaanika % või vähempolaarne org. solvent	Polaarsem mobiilfaas: suurem vee % või polaarsem org. solvent
Kõrgem temperatuur	Madalam temperatuur

2005/2006 kevad

2

Eluent

- Eluent peab ...
 - lahustama proovi komponente
 - kandma proovi komponendid läbi kolonni
 - **tagama analüüdi lahutumise mõistliku aja jooksul**
- Eluent ei tohi ...
 - kahjustada kolonni või teisi süsteemi osi
 - takistada detekteerimist

2005/2006 kevad

3

Elueeriv jõud (*solvent strength*)

- Tugevaks nimetatakse solventi (eluendi komponenti), mille sisalduse suurendamine toob kaasa analüüdi retentsiooniaja lühenemise.
- Pöördfaas-kromatograafias on tugev komponent orgaaniline ja nõrk – vesi.
- Elueerivat jõudu reguleeritakse tugeva ja nõrga komponendi segamisega erinevates vahekordades.

2005/2006 kevad

4

Solvendi polaarsuse indeks

- Polaarsuste skaalad on mitmeid, jaotuskromatograafia jaoks kõige kasulikum on polaarsuse indeks P' .

Solvent	Polaarsusindeks, P'
n-heksaan	0.1
dietüüleeter	2.8
metüleenkloriid	3.4
THF	4.0
Kloroform	4.1
Metanool	5.1
MeCN (ACN)	5.8
vesi	10.2

2005/2006 kevad

5

Solvendisegude polaarsus

- Eluendi komponentide A ja B polaarsusindeks P'_{AB} avaldub ruumalaosade v_A ja v_B kaudu järgmiselt:

$$P'_{AB} = v_A P'_A + v_B P'_B$$

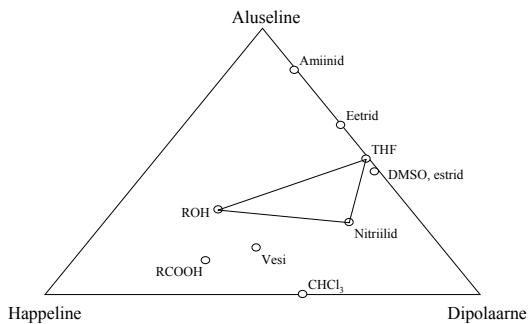
- Mahtuvusfaktor k' muutub tavaliselt **umbes 10** korda, kui P' muuta 2 ühiku võrra.

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_1 - P'_2)/2}$$

2005/2006 kevad

6

Solvendi valiku kolmnurk

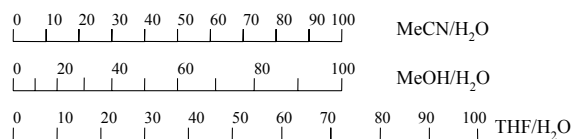


2005/2006 kevad

7

Elueeriv jõud

- Kõige sobivamad orgaanilised lahendid pöördfaas-kromatograafia jaoks on metanool (MeOH), atsetonitriil (MeCN, ACN) ja tetrahydrofuraan (THF).
- Segude suhteline tugevus leitakse nomogrammilt.



2005/2006 kevad

8

Eluendi valik – lahutus

- Lahutusvõime R_s avaldub järgmiselt:

$$R_s = \frac{\sqrt{N} (\alpha - 1)}{4} \frac{k'}{\alpha (k' + 1)}$$

- Kolonni efektiivsust (N) saab suurendada kasutades pikemat kolonni või peeneteralisemat täidist.
- Mahtuvusfaktorit (k') saab optimeerida vee ja orgaanilise lahendiga vahetamisega.

2005/2006 kevad

9

Eluendi valik – lahutus (2)

- Selektiivsuse (α) suurendamiseks:
 - muuta eluendi koostist, sh. pH
 - statsionaarse faasi muutmise
 - kasutada spetsiaalseid lisandeid
 - muuta kolonni temperatuuri

2005/2006 kevad

10

Mahtuvusfaktor

- Kõigi analüütide k' peaks olema vahemikus 1 ... 20.
 - k' reguleerida vee/orgaanika suhte muutmisega
 - orgaanika % suurendamine 10 võrra vähendab mahtuvusfaktoreid umbes 2 ... 3 korda
- k' väärtuste piirkonda väljendatakse suurusega R_k

$$R_k = \frac{k'_{\text{suurim}}}{k'_{\text{vähim}}}$$

- $R_k > 20$ – kasuta gradienti
- $R_k = 20$ – vali elueeriv jõud selliselt, et $1 < k' < 20$
- $R_k < 20$ – vali elueeriv jõud selliselt, et vähim $k' = 1$

2005/2006 kevad

11

Selektiivsus – elueeriv jõud

- Selektiivsuse (α) parandamiseks:
 - kui $R_k \ll 20$, siis enamasti piisab elueeriva jõu muutmisest
- Süstemaatiline lähenemine
 1. Optimeeri MeCN/vesi korral k' , R_k ja α . (Valmis?)
 2. Optimeeri MeOH/vesi korral k' , R_k ja α . (Valmis?)
 3. Optimeeri THF/vesi korral k' , R_k ja α . (Valmis?)
 4. Sega eluendid (1) ja (2) vahekorras 1:1
 5. Sega eluendid (1) ja (3) vahekorras 1:1
 6. Sega eluendid (2) ja (3) vahekorras 1:1
 7. Sega eluendid (1), (2) ja (3) vahekorras 1:1:1

2005/2006 kevad

12

Eluendi pH mõju

- Eluendi pH avaldab mõju vaid happeliste või aluseliste analüütide kromatografeerimisele.
- Kui kasutatava eluendi pH juures on
 - analüüdi molekulid neutraalses vormis, siis on nende retentsiooniaeg maksimaalne
 - analüüt täielikult ioniseerunud, siis
 - katioonid elueeruvad väga kiiresti
 - anioonid ei interakteeru stacionaarse faasiga solvaatkatte tõttu
 - analüüt osaliselt ioniseerunud ($|\text{pH} - \text{pK}| < 2$), siis võib piigi kuju olla moonutatud.

2005/2006 kevad

13

Temperatuur

- Temperatuuri mõju selektiivsusefaktorile on reeglina väike.
- Raskete proovide puhul saab seda efekti siiski ära kasutada.
- Kõrgemal temperatuuril on efektiivsus (N) reeglina suurem.
- Kui temperatuur mõjutab molekuli struktuuri või ionisatsioonitasakaalu, siis võib temperatuuri mõju olla märkimisväärne.

2005/2006 kevad

14

Meetodi valideerimine

2005/2006 kevad

15

Valideerimine

- Validation: 'Confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specified intended use are fulfilled.' [ISO 8402:1994]
- Mõnevõrra lihtsustatult:
 - Valideerimine on protseduur, mille käigus dokumenteeritakse tingimused, mille juures süsteem teeb seda, mida ta tegema peab.

2005/2006 kevad

16

Meetodi valideerimine

- Method Validation:
 1. The process of establishing the performance characteristics and limitations of a method and the identification of the influences which may change these characteristics and to what extent. Which analytes can it determine in which matrices in the presence of which interferences? Within these conditions what levels of precision and accuracy can be achieved?
 - Kui ei peeta silmas konkreetset analüütilist probleemi.
 2. The process of verifying that a method is fit for purpose, i.e. for use for solving a particular analytical problem.
 - Meetodit arendatakse kindlal otstarbel.

2005/2006 kevad

17

Kogu süsteemi valideerimine

- Koosneb vähemalt neljast etapist:
 1. Tarkvara valideerimine
 2. Riistvara valideerimine/kvalifitseerimine (*qualification*)
 3. Meetodi valideerimine
 4. Süsteemi sobivuse (*suitability*) testimine
- Kvalifitseerimine on valideerimise protseduuride alamhulk.

2005/2006 kevad

18

Kogu süsteemi valideerimine 2

- Kvalifitseerimine algab seadme tootja juures: toodet arendatakse ja toodetakse vastavalt GMP, ISO 9000 jmt.
- IQ – *installation qualification*
 - Enne istalleerimist: kõigi osade ja juhendite olemasolu ning seadme asukoha tingimuste (*site requirements*) kontroll.
 - Installeerimise ajal: seadmete seerianumbrite, installeerija jpm info talletamine.
- OQ – *operational qualification*
 - Vastavus spetsifikatsioonile
- PQ – *performance qualification*
 - Töötamine tulevastes töötingimustes

2005/2006 kevad

19

Meetodi valideerimine. Kellele?

- Inimkonna hüvanguks! ☺
- Valideerimist näevad ette mitmed asutused. Nt:
 - USP – United States Pharmacopoeia
 - FDA – Food and Drug Administration
 - APVMA – Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority
- Nõudmiste kooskõlastamiseks teevad paljud koostööd ICH – International Conference on Harmonisation

2005/2006 kevad

20

Kas kõik meetodid peab valideerima?

- Valideerimise ulatus sõltub analüüsi tüübist ja ülesandest.
 - Meetod laborisiseseks kasutamiseks vs levitamiseks.
 - Meetod lühiajaliseks vs igapäevaseks kasutamiseks.
 - Põhikomponendi vs jälgede analüüs.
- Edasises lähtume ICH definitsioonidest (varem olid need dokumendid Q2A ja Q2B):
 - <http://www.ich.org>

2005/2006 kevad

21

ICH meetodi valideerimise karakteristikud

- Mõõdetäpsus ehk täpsus (*accuracy*)
- Kordustäpsus (*precision*)
 - Korduvus (*repeatability*)
 - *intermediate precision*
 - Korratavus (*reproducibility*)
- Lineaarsus(?) (*linearity*)
- Mõõtepiirkond(?) (*range*)
- Avastamispiir (*detection limit, limit of detection*)
- Määramispiir (*quantitation limit, limit of quantitation*)
- Spetsiifilisus (*specificity*)
- Mittekapriissus (*robustness*)
- Süsteemi sobivus(?) (*system suitability*)

2005/2006 kevad

22

Valideerimise ulatus

	Ident.	Lisandi analüüs		Assay
		Kvant.	Limiiit	
Täpsus	-	+	-	+
Kordustäpsus				
Korduvus	-	+	-	+
<i>Interm. precision</i>	-	+	-	+
Spetsiifilisus	+	+	+	+
Avastamispiir	-	-	+	-
Määramispiir	-	+	-	-
Lineaarsus	-	+	-	+
Mõõtepiirkond	-	+	-	+

2005/2006 kevad

23

Täpsus (*accuracy*)

- Mõõtmisel saadud väärtuse lähedus “tõelisele” väärtusele.
- Väljendatakse saagisena (*recovery*), mis saadakse:
 - Võrdlemisel standardaine või -meetodiga.
 - Kasut. puhta aine (toimeaine) määramiseks.
 - Saagis spaikimiskatses.
 - Kasut. keerulise maatriksi korral (nt ravimvorm).
 - Lisamismeetod.
 - Kasut. juhul, kui ilma analüüdita maatriksit ei ole võimalik saada.
- Määrata vähemalt 3-l tasemel, igal 3 katset.

2005/2006 kevad

24

Kordustäpsus (*precision*)

- Selliste katsetulemuste kooskõla, mis on saadud meetodi korduval rakendamisel proovidele, mis on võetud homogeensest proovist.
 - Korduvus (*repeatability*) – samad tingimused, lühike ajavahemik. Sisaldab muuhulgas instrumentaalset täpsust.
 - *intermediate precision* – sama labor, kuid uued tingimused (lahused, proovivõtt, töötaja, päev jmt).
 - Korratavus (*reproducibility*) – eri laborite vahel.
- Määrata vähemalt:
 - 3-l tasemel, igal 3 katset VÕI
 - 6 katset 100% tasemel

2005/2006 kevad

25

Kordustäpsus (*precision*) 2

- Väljendatakse suhtelise standardhälvena (RSD – *relative standard deviation* vahel ka CV – *coefficient of variation*).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD (\%) = CV (\%) = \frac{100 \cdot SD}{\bar{x}}$$

- *Assay* puhul vaja RSD 1-2%, jälgede korral 15%.

2005/2006 kevad

26

Lineaarsus (*linearity*)

- Väljendab signaali kontsentratsioonisõltuvuse lineaarsust.
- Enamasti peetakse piisavaks vähimruutude meetodil saadud tõusu, algordinaadi ja regressioonikordaja esitamist. Lisama peaks graafiku. Jääkide (*residual*) ruutude summa ja vastav graafik võivad kasulikuks osutada.
 - Lineaarsuse hindamisel võib *response factor* vs kontsentratsioon isegi kasulik olla.
- Määrata vähemalt 5-l tasemel.

2005/2006 kevad

27

Mõõtepiirkond (*range*)

- Vähim ja suurim analüüdi kontsentratsioon, mille juures meetod on piisavalt täpne (*accuracy*), kordustäpne (*precision*) ja lineaarne (*linearity*).
- Vajalik mõõtepiirkond on vahel määratud analüüsiülesandega ja see määratakse kindlaks koos lineaarsuse uuringuga.
- Vajalik mõõtepiirkond sõltub ülesandest:
 - Põhiline määramisel 80-120%
 - Sisalduste võrdlemisel (*content uniformity*) 70-130%

2005/2006 kevad

28

Avastamispiir (*detection limit, limit of detection, LOD*)

- Vähim analüüdi kontsentratsioon, mille korral analüüsimeetod annab usaldatava signaali.
- Määramiseks on mitu võimalust:
 - Signaal-müra suhte alusel (enamasti 3:1).
 - Signaali standardhälbe ja tõusu alusel. ($LOD = 3.3\sigma / m$, kus σ on standardhälve ja m on tõus)
 - ...

2005/2006 kevad

29

Määramispiir (*quantitation limit, limit of quantitation, LOQ*)

- Vähim analüüdi kontsentratsioon, mis annab usaldusväärset mõõdetava (kvantitatiivselt) signaali.
- Määramiseks on mitu võimalust:
 - Signaal-müra suhte alusel (enamasti 10:1).
 - Signaali standardhälbe ja tõusu alusel. ($LOQ = 10\sigma / m$, kus σ on standardhälve ja m on tõus)
 - ...
- Vahel esitatakse LOQ ka kontsentratsioonina, millest madalamal on täpsus (*precision*) väiksem kui mingi kehtestatud piir (nt RSD > 3%).

2005/2006 kevad

30

Spetsiifilisus (*specificity*)

- **Kõige olulisem parameeter.** Määratakse esimesena.
- Meetodi võime määrata analüüdi sisaldust kõigi teiste proovi komponentide juuresolekul.
- Kromatograafias on spetsiifilisuse saavutamiseks 2 teed:
 1. (eelistatum) Näidata, et kõik potentsiaalsed lisandid on analüüdi piigist lahus ($R_S \geq 2$).
 2. Kasutada selektiivset detektorit.

2005/2006 kevad

31

Spetsiifilisus (*specificity*) 2

- Võimalusi spetsiifilisuse kontrollimiseks:
 - Spaikimine tuntud (segavate) lisanditega.
 - Proovi lagunemise uuringud.
 - Piigi eraldamine ja analüüs muul meetodil.
 - Spetsiifilise lisadetectori kasutamine (DAD, MS vm).
 - Teine analüüsimeetod (kromatograafiline vm).
 - Kromatografeerimise tingimuste muutmine (solvent, gradiendi kiirus vm).

2005/2006 kevad

32

Mittekapriissus (*robustness*)

- Meetodi tundetus parameetrite väikeste muutuste suhtes. Kusjuures parameetreid muudetakse tahtlikult.
- Muudetavad parameetrid: kolonn, mobiilse faasi koostis (orgaanika sisaldus, pH, puhvri kontsentratsioon), voolukiirus, kolonni temperatuur, gradient jne.
- Eksperimente tuleb hoolega planeerida ja muutused kaardistada (*parameter mapping*). See võimaldab vähendada eksperimentide arvu ja meetodit arendada.

2005/2006 kevad

33

Süsteemi sobivus (*system suitability*)

- Väljendab kogu analüüsisüsteemi (instrument, standardid, proovid) sobivust ettenähtud tööks.
- Testimine sõltub konkreetsest ülesandest. Tavaliselt peab demonstreerima järgnevate parameetrite seast kahe sobivust:
 - Teoreetiliste taldrikute arv.
 - Sabatamise faktor (*tailing factor*).
 - Lahutus R_S või α .
 - Piigi kõrguse või pindala RSD.

2005/2006 kevad

34

Laboritevahelised võrdluskatsed

- On vajalikud kui meetodit hakkavad kasutama ka teised laborid.
- Tavaliselt ei kuulu see valideerimise juurde ja viiakse läbi alles vajaduse tekkimisel.

2005/2006 kevad

35

Meetodi dokumentatsioon

1. Meetodi ülevaade (põhimõte ja kasutusala).
2. Instrumentaalsed parameetrid.
3. Reaktiivid ja lahuste valmistamine.
4. Süsteemi sobivus. (Kirjeldada teste, millega hinnata.)
5. Analüüs (proov ja standardid).
6. Arvutuskäik ja/või andmetöötlus.
7. Näidiskromatogramm(id).
8. Viited.

2005/2006 kevad

36