

Программа
прикладной школы-семинара по жидкостной хроматографии 2017
«Разработка и трансфер ВЭЖХ-методик»

26-29 сентября 2017, г. Томск

Специфичность в ВЭЖХ

- Специфичность определения. Специфичность хроматографического разделения и специфичность детектирования.
- Классификация выполняемых анализов по характеру поставленной цели: рутинные (targeted) и исследовательские (untargeted) разделения. Различия в подходах к решению аналитических задач обоих типов.
- Виды детектирования, применяемые в ВЭЖХ. Оптические, испарительные, электрохимические, масс-селективные детекторы. Преимущества и недостатки различных видов детектирования.
- Принцип выбора детектора с оптимальной для данной аналитической задачи специфичностью.
- Способы ВЭЖХ детектирования, недооцененные в фармацевтическом анализе.

Качественный и количественный анализ

- Основы качественного анализа. Проверка отрицательной гипотезы. Идентификация соединений. Способы повышения надежности идентификации соединений: хроматографические и спектральные. Ограничения процедуры “peak purity test”, реализуемой на диодно-матричных детекторах.
- Проведение разметки хроматограммы. Различные способы проведения разметки; параметра разметки.
- Функции автоматической разметки. Настройка автоматической разметки.
- Основы количественного анализа. Основы статистики. Методы внутреннего и внешнего стандартов. Отклик детектора. Одноточечная и многоточечная градуировки, целесообразность их применения в различных случаях. Одноточечная градуировка. Доверительный интервал. Типы многоточечной градуировки. Модели аппроксимации. Линейная аппроксимация и ее параметры. Типичные затруднительные ситуации и ошибки, допускаемые при применении многоточечной градуировки с аппроксимацией линейной регрессией.

Разработка хроматографического разделения. Основные режимы хроматографии

- Основные параметры разделения. Факторы, определяющие разрешение пары пиков.
- Оптимальное удерживание. Оптимальная селективность. Оптимальная эффективность.
- Общий алгоритм разработки ВЭЖХ методики.
- Основные адсорбционные (RP, NP, HILIC, IC, CT, LEC) и эксклюзионные (SEC, IEX) режимы жидкостной хроматографии.
- Модель удерживания для обращенно-фазового (RP) режима. Регулирование удерживания и селективности. Преимущества и недостатки обращенно-фазовой хроматографии.
- Модель удерживания для нормально-фазового (NP) и гидрофильного (HILIC) режимов. Регулирование удерживания и селективности.
- Модель удерживания для ионного (IC) режима. Регулирование удерживания и селективности.
- Буферные растворы, применяемые в ВЭЖХ. Выбор буфера. Выбор концентрации и ионной силы.

Смешанные хроматографические режимы. Работа с ион-парными системами

- Смешанные ВЭЖХ режимы, широко применяемые на практике. Понимание характерной (уникальной) селективности ВЭЖХ неподвижной фазы как следствия смешения двух или более ВЭЖХ режимов.
- Преимущества и недостатки смешанных режимов. Целесообразность их применения.
- Смешанные режимы в обращенно-фазовой хроматографии (RP/HILIC, RP+IC, RP/CT, RP + SEC).
- Смешанные режимы в гидрофильной хроматографии (HILIC + IC).
- Смешанные режимы в нормально-фазовой хроматографии (NP/CT).

- Регулирование доли каждого из вкладов в смешанном режиме.
- Применение динамического модифицирования для перехода к смешанным режимам.
- Ион-парные системы, их преимущества и недостатки. В каких случаях применяют добавки ион-парных реагентов. Насколько применение ион-парного режима вообще оправдано.
- Как работают добавки ион-парных реагентов; какие ион-парные реагенты наиболее популярны.
- Как бороться с плохой воспроизводимостью ион-парных разделений.
- Совместимы ли ион-парные разделения и градиентное элюирование.
- Как можно удешевить ион-парное разделение.
- Как уйти от применения ион-парной добавки.
- Техника работы при использовании ион-парных реагентов.

Оценка удерживания и селективности разделения соединений

- Оценка удерживания соединения в основных и смешанных режимах по его структурной химической формуле.
- Сложные случаи при анализа многокомпонентных лекарственных средств. Проведение разделения при наличии в смеси веществ разной природы (ионные/неионные, полярные/неполярные и др.) Примеры из фармацевтической отрасли.

Неподвижные фазы в ВЭЖХ

- Современное состояние рынка неподвижных фаз (НФ): обзор. НФ различного типа для обращенно-фазовой (RP), гидрофильной (HILIC) и ионной (IC) хроматографии.
- Есть ли смысл в разнообразии неподвижных фаз. Зачем для одного вида хроматографии выпускают неподвижные фазы с различными типами прививок. Зачем нужны колонки различных типоразмеров, то есть разной длины и с разным размером частиц. Существуют ли “самые лучшие” колонки
- Что подразумевается под “качеством” колонки. Какую колонку можно считать качественной. Какие признаки свидетельствуют о нарушениях в технологии упаковки колонок. В каких случаях можно попытаться заменить плохо упакованную колонку у производителя. Как обезопасить себя от покупки плохо изготовленной колонки
- Какие основные типы обращенных фаз доступны на рынке. Какие существуют типы прививок для обращенно-фазовых силикагелей. Чем определяется величина удерживания на данной обращенной фазе? В чем состоит преимущество алкиламидных (C16-Amide и подобных ей) фаз. В чем состоит преимущество арил-привитых (PFP, PVE и подобных им) фаз. В чем состоит преимущество алкил-привитых фаз с ионными группами (C18/SAX, C18/SCX, C18/WCX).
- Что такое энд-кеппинг. Какими преимуществами обладает полярный энд-кеппинг. Как узнать тип энд-кеппинга обращенной фазы. Что обозначают различные аббревиатуры в названиях обращенно-фазовых колонок. Какие бывают химии полимерных обращенных фаз. Почему фазы на основе силикагеля применяют чаще полимерных фаз. В чем состоят преимущества и недостатки применения пористых обращенных фаз.
- Названия хроматографических колонок. Что обозначают различные аббревиатуры и сокращения в названии колонок.
- Тестирование обращенно-фазовых (RP) ВЭЖХ колонок.
- Как выбрать «колонку, аналогичную данной».

Градиентное элюирование в ВЭЖХ

- Градиентное элюирование в обращенно-фазовой хроматографии. Выбор профиля градиента.
- Техника проведения градиентного элюирования.
- Область применения градиентного элюирования. Ограничения градиентного элюирования.

Оптимизация ВЭЖХ-разделений

- Оптимизация ВЭЖХ разделения. Критерии оптимизации.
- Теория скоростей. Гидродинамика ВЭЖХ разделения. Алгоритм выбора оптимальной скорости потока.
- Алгоритм выбора оптимальной длины колонки и размера частиц адсорбента.

- Факторы, определяющие «дополнительное» уширение хроматографических пиков. Мертвые объемы. Перегрузка объемом пробы и количеством вещества.
- Факторы, влияющие на уширение хроматографических пиков. Правильная сборка жидкостной системы. Типы капилляров и фитингов, их правильное применение.

Разделение оптических изомеров. Работа с хиральными колонками.

- Оптические изомеры. Энантиомеры. Диастереомеры.
- Хиральные сорбенты. Классификация. Аббревиатуры и сокращения в названии коммерческих хиральных колонок.
- Разработка разделений. Механизмы разделения. Как выбрать хиральную колонку для разделения оптически активных изомеров исходя из их структуры?
- Предосторожности при работе с хиральными колонками.
- Регулирование селективности разделения изомеров на хиральных неподвижных фазах.
- Практические примеры хиральных разделений в фармацевтической отрасли.

Робастность и трансфер ВЭЖХ-методик

- Обеспечение прослеживаемости измерений в ВЭЖХ.
- Как на практике выглядит пригодное ВЭЖХ разделение. Критерии пригодности хроматографической системы.
- Квалификация протокола обработки данных. Различия в расчете параметров разделения (отношение сигнал/шум, эффективность, асимметрия, разрешение) по «стандартному» набору формул, формулам IUPAC и формулам USP.
- Основы валидации ВЭЖХ методик. Валидационные характеристики.
- Специфичность. Протокол валидации специфичности.
- Робастность. Особенности валидации робастности. Протокол валидации робастности. Упущения при валидации робастности как одна из основных причин невоспроизводимости ВЭЖХ методик. Как распознать неробастную методику.
- Подтверждение линейности. Определение пределов обнаружения/определения. Способы уменьшения пределов обнаружения/определения.
- Валидация правильности. Рабочий диапазон методики. Отличие нижней границы рабочего диапазона от предела определения.
- Оформление методики согласно международным рекомендациям.
- Трансфер ВЭЖХ методик. Протокол трансфера. Основные проблемы при трансфере методик. Неробастные ВЭЖХ измерения как основная причина затруднений при трансфере ВЭЖХ методик.

Практическая часть: разработка методики определения смеси фармацевтических соединений в твердой лекарственной форме

- Анализ химических структур целевых соединений, выявление их основных адсорбционных свойств. Выбор подходящих хроматографических режимов для разделения смеси целевых веществ. Выбор оптимальных способов регулирования селективности разделения.
- Проведение пробных разделений на выбранных неподвижных фазах в выбранных условиях. Расчет факторов удерживания, селективностей и разрешения критических пар. Выбор решения с оптимальной селективностью.
- Оптимизация разделения. Выбор скорости потока, длины колонки, диаметра частиц адсорбента.
- Валидация специфичности разделения.
- Расчет и формулирование критериев пригодности хроматографической системы.

Обсуждение вопросов и практических задач участников