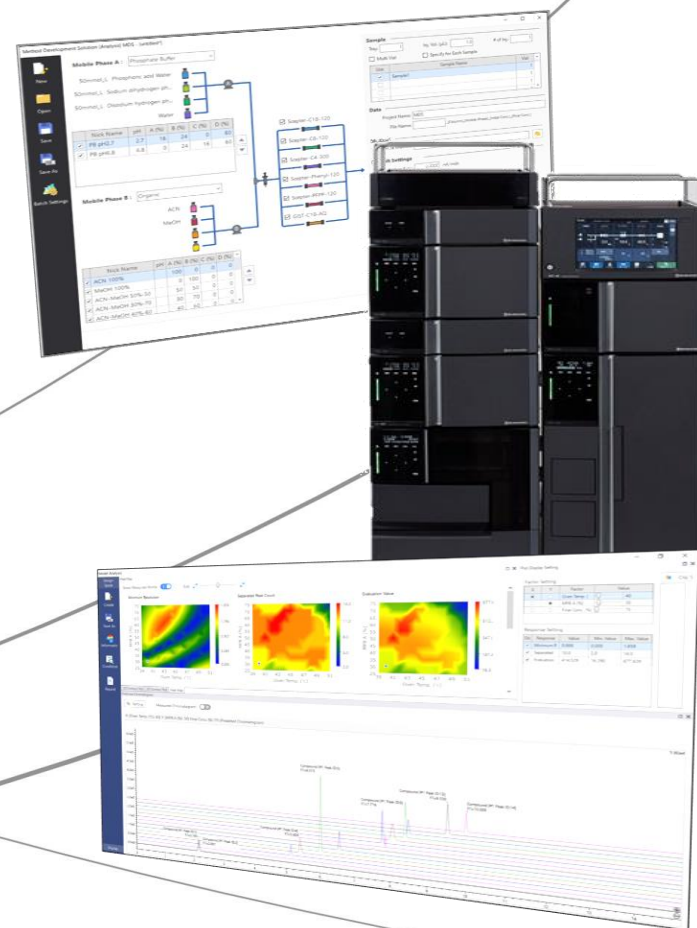


Rychlý vývoj metod s LabSolutions MD

Ing. David Maxa
Aplicační specialista pro LC, LC-MS, GC, GC-MS



Tradiční vývoj LC metody

1. Stanovení cílů
2. Výběr mobilních fází pro testování
3. Výběr kolon pro testování
4. Vytvoření základní metody

5. Změna jedné proměnné
→ Uložit jako...

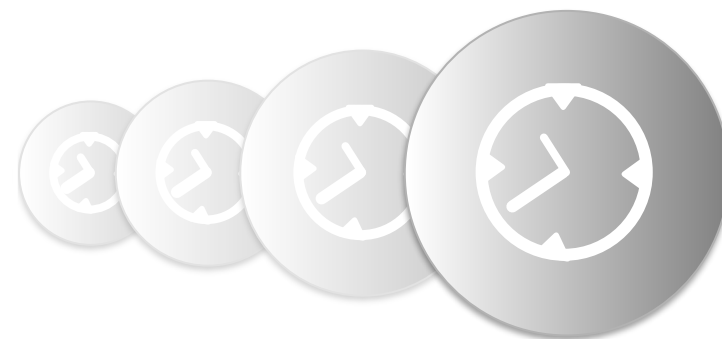
6. Změna jedné proměnné
→ Uložit jako...

7. Změna jedné proměnné
→ Uložit jako...

8. Změna jedné proměnné
→ Uložit jako...

9. Změna jedné proměnné
→ Uložit jako...

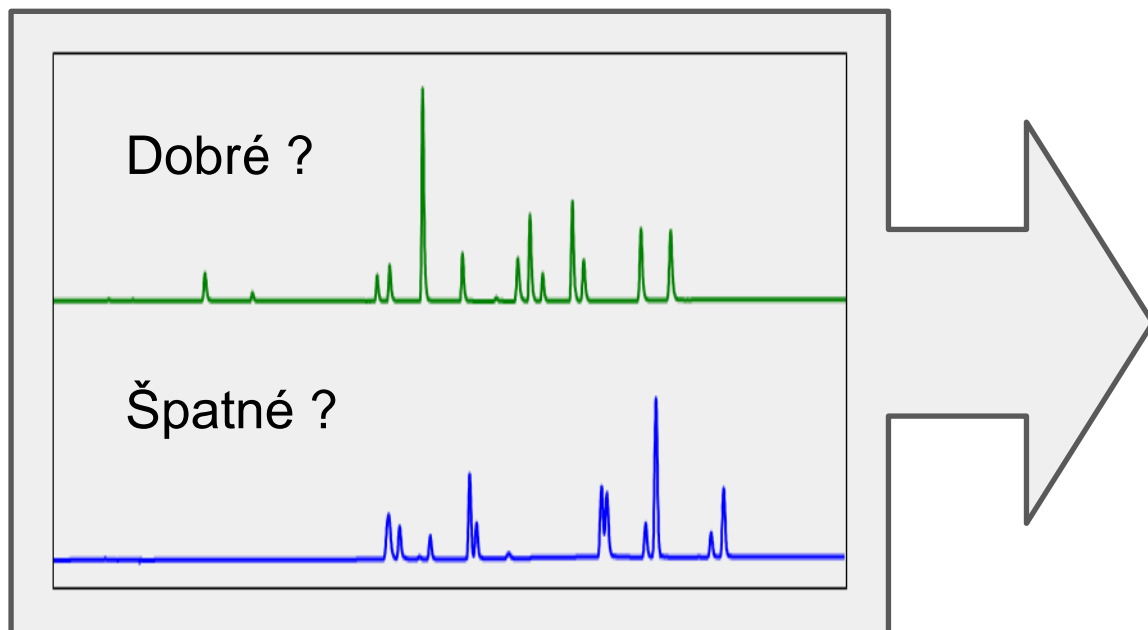
10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ...



- Velké množství metod!
- **Pracné!**
- **Zdlouhavé!**
- **Jednoduché udělat chybu!**

Tradiční vývoj LC metody

- Hodnocení výsledků „okometricky“ pohledem na chromatogram
 - Při metodě pokus-omyl se spoléháme na zkušenosti a know-how analytika
- Poptávka po efektivním, automatizovaném procesu, který je méně závislý na zkušenostech operátora

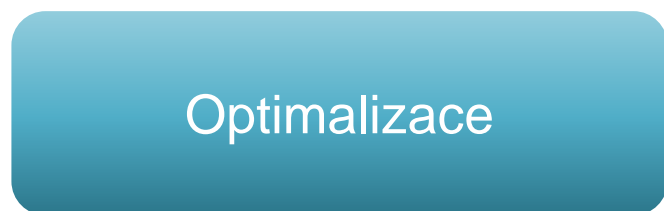
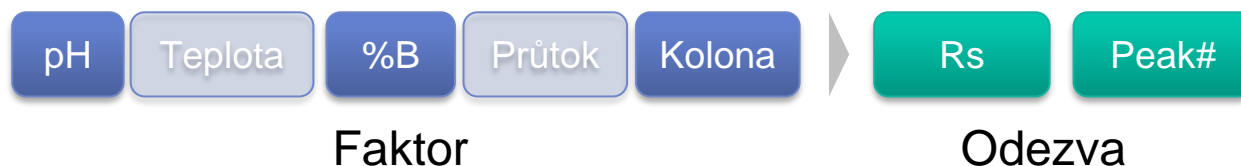


Labsolutions MD a vývoj založený na AQbD

- Metodické posouzení faktorů ovlivňující metodu krok po kroku



→ Screening hlavních faktorů ovlivňujících separaci



→ Optimalizace separačních podmínek



Experimentální design Design Space

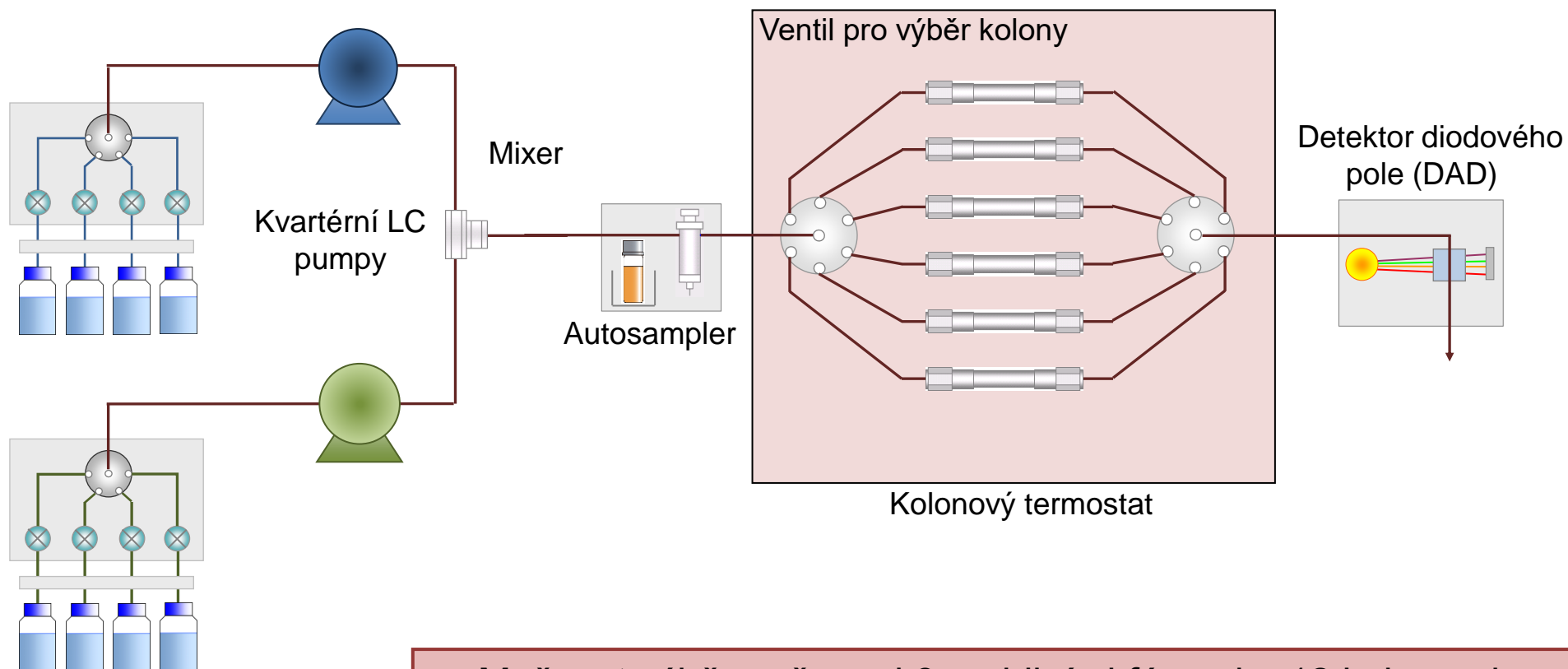


→ Zhodnocení robustnosti analytické metody

ANOVA

Factor	SSR	df	MS	F value
Effect	1108.25	6	184.71	0.926
Error	7976.86	40	199.42	-
Total	9085.11	46	-	-

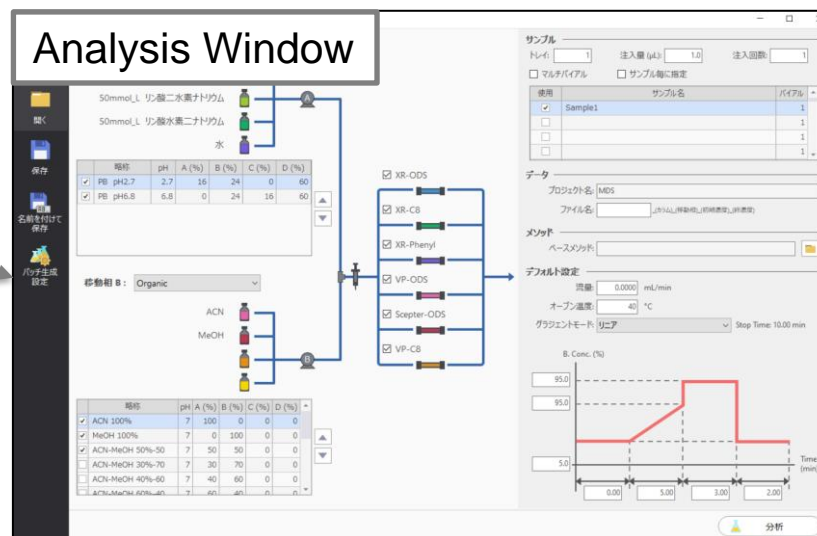
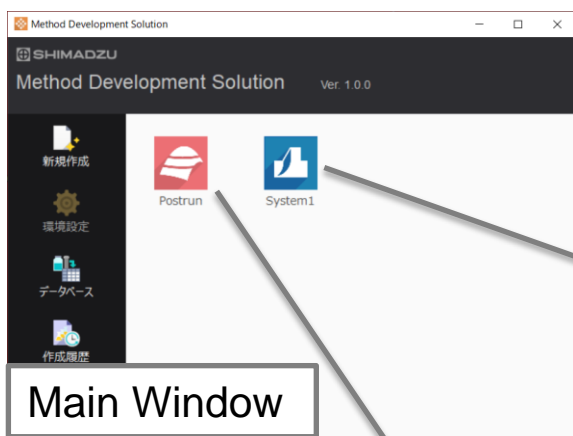
Nexera Method Scouting System



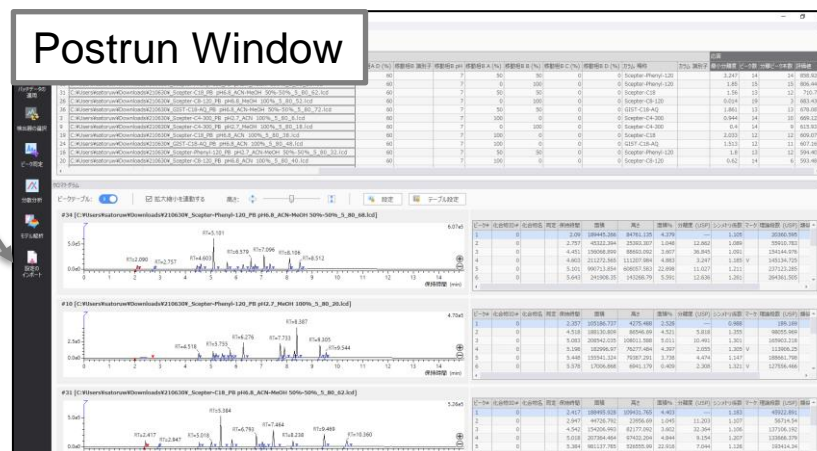
- Možnost výběru až mezi 8 mobilními fázemi a 12 kolonami
- UHPLC systém (tlaková odolnost 130 MPa)

LabSolutions MD - Workflow

- „Workflow“ od analýzy po procesování výsledků



Plná integrace do LabSolutions



- Vytvoření sekvence
- Vytvoření DoE
- Import DoE

- Chromatogram
- Identifikace pík
- ANOVA
- Simulace separace
- Report

LabSolutions MD - Workflow

Fáze screeningu

- Rychlá a jednoduchá tvorba sekvencí
 - Plně automatizovaná tvorba metod a sekvencí

1. Výběr mobilní fáze

Mobile Phase A: Phosphate Buffer

50mmol_L Phosphoric acid Water
50mmol_L Sodium dihydrogen ph...
50mmol_L Disodium hydrogen ph...
Water

	Nick Name	pH	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
<input checked="" type="checkbox"/>	PB pH2.7	2.7	16	24	0	60
<input checked="" type="checkbox"/>	PB pH6.8	6.8	0	24	16	60

Mobile Phase B: Organic

ACN
MeOH

	Nick Name	pH	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
<input checked="" type="checkbox"/>	ACN 100%		100	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	MeOH 100%		0	100	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	ACN-MeOH 50%-50		50	50	0	0
<input type="checkbox"/>	ACN-MeOH 30%-70		30	70	0	0
<input type="checkbox"/>	ACN-MeOH 40%-60		40	60	0	0

2. Výběr kolony

- Scepter-C18-120
- Scepter-C8-120
- Scepter-C4-300
- Scepter-Phenyl-120
- Scepter-PFPP-120
- GIST-C18-AQ

3. Informace o vzorku

Sample

Tray: 1 Inj. Vol. (µL): 1.0 # of Inj.: 1

Multi Vial Specify for Each Sample

Use	Sample Name	Vial
<input checked="" type="checkbox"/>	Sample1	1
<input type="checkbox"/>		1
<input type="checkbox"/>		1

4. Analytické podmínky

File Name: ..._(Column)_(Mobile Phase)_(Initial Conc.)_(Final Conc.)

Method

Base Method:

Default Settings

Flow Rate: 0.8000 mL/min

Oven Temp.: 40 °C

Gradient Mode: Linear

B. Conc. (%)

95.0
95.0
5.0

0.00 5.00 3.00

Pressure Unit: MPa

5. Výběr DoE metody

Create Experimental Design

Create an experimental design using such as Plackett-Burman and Box-Behnken

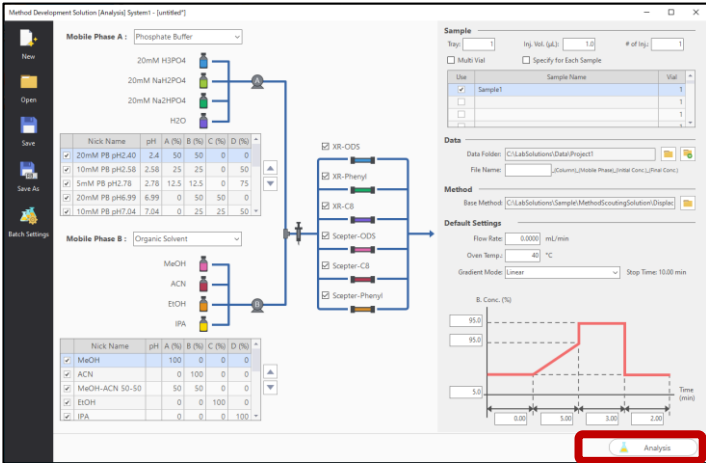
- Full Factorial Design
- Full Factorial Design
- Plackett-Burman
- Box-Behnken
- Central Composite Design
- Sequential Execution

Analysis

Tvorba sekvence

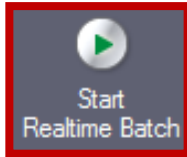
Fáze screeningu

- LabSolutions MD automaticky vytvoří sekvence, které se přenesou do LabSolutions
- Možná kontrola nastavených podmínek v sekvenci
- Možnost úpravy sekvence uživatelem → řádky mohou být kopírovány/vloženy, odstraněny, přidány



Create Batch

Sample Name	Název datového souboru Data File	Method File	Kolona Column Position	Mobilní fáze PumpA	PumpB	Nastavení gradientu Init. Conc.	Final Con	Gradient Time
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_002.lcd	tingSolution#AutoPurge#AutoPurgeB.lcm	1:XR0DS,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	B:MeOH	5	95	3
Sample	20110614_XR0DS_PhosBuf2.6_ACN_5_95_004.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	1:XR0DS,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
STD	20110614_XR0DS_PhosBuf2.6_ACN_5_95_005.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	1:XR0DS,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_006.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	2:XRPhenyl,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	0110614_XRPhenyl_PhosBuf2.6_ACN_5_95_007.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	2:XRPhenyl,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
STD	0110614_XRPhenyl_PhosBuf2.6_ACN_5_95_008.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	2:XRPhenyl,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_009.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	3:XRC8,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	20110614_XRC8_PhosBuf2.6_ACN_5_95_010.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	3:XRC8,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
STD	20110614_XRC8_PhosBuf2.6_ACN_5_95_011.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	3:XRC8,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_012.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	4:XR0DSII,60C,60MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	20110614_XR0DSII_PhosBuf2.6_ACN_5_95_013.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	4:XR0DSII,60C,60MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
STD	20110614_XR0DSII_PhosBuf2.6_ACN_5_95_014.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	4:XR0DSII,60C,60MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_015.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	5:XR0SIL,60C,20MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	20110614_XR0SIL_PhosBuf2.6_ACN_5_95_016.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	5:XR0SIL,60C,20MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
STD	20110614_XR0SIL_PhosBuf2.6_ACN_5_95_017.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	5:XR0SIL,60C,20MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_018.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	6:XR0DSIII,60C,100MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	20110614_XR0DSIII_PhosBuf2.6_ACN_5_95_019.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	6:XR0DSIII,60C,100MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
STD	20110614_XR0DSIII_PhosBuf2.6_ACN_5_95_020.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	6:XR0DSIII,60C,100MPa	A:PhosBuf2.6	A:ACN	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_021.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	1:XR0DS,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	B:MeOH	5	95	3
Sample	20110614_XR0DS_PhosBuf2.6_MeOH_5_95_022.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	1:XR0DS,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	B:MeOH	5	95	3
STD	20110614_XR0DS_PhosBuf2.6_MeOH_5_95_023.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	1:XR0DS,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	B:MeOH	5	95	3
Sample	ons\Data#Project1#EquilibData#20110614_024.lcd	#\LabSolutions\Data#Project1#Test.lcm	2:XRPhenyl,60C,35MPa	A:PhosBuf2.6	B:MeOH	5	95	3



Výpočet ušetření času

6 Mobilních fází
6 Kolon
2 Gradienty
2 Teploty

Fáze screeningu

$$6 \times 6 \times 2 \times 2 = \underline{144 \text{ kombinací}}$$

Manuální testování

LabsolutionsMD

Metoda

~ 5 hodin
 Vytvoření 144 metod
 2 min/metoda

2 minuty
 Vytvoření základní metody

Sekvence

~ 1,5 hodiny
 Zapsání každého řádku zvlášť
 30 s/řádek

5 minut
 Automatické vytvoření
 pomocí softwaru

Celkem

> 6 hodin

7 minut

- LabsolutionsMD zkrátí čas tvorby metod a sekvence pouze na pár minut
- Automatizované tvoření metod a sekvence značně snižuje šanci lidské chyby

Vyhodnocení dat

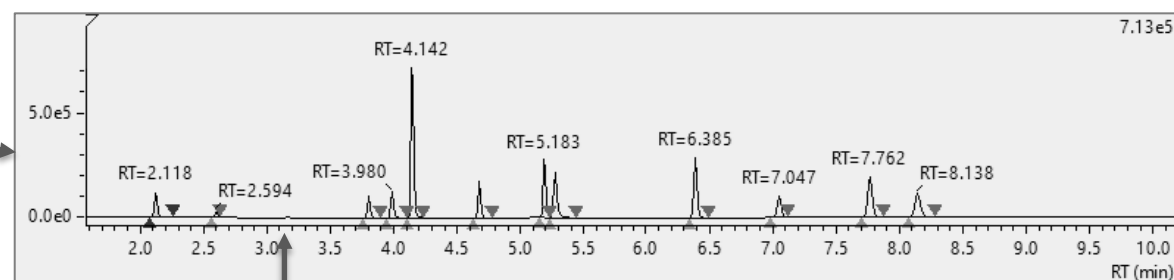
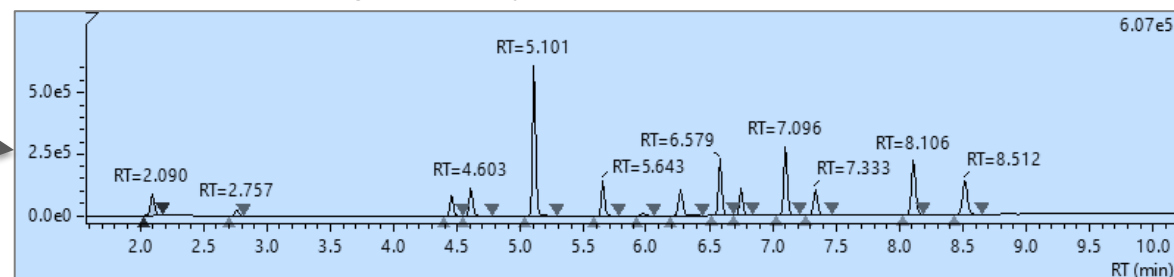
Fáze screeningu

- Hodnocení chromatogramů na základě počtu detekovaných píků a jejich rozlišení (hodnota **E**)

Seřazení podle hodnoty **E**

			Response
MPA pH	MPB B (%)	Column Nick Name	Evaluation Value
6.8	50	Scepter-Phenyl-120	858.926
2.7	100	Scepter-Phenyl-120	806.444
6.8	50	Scepter-C18	710.75
6.8	100	Scepter-C8-120	683.436
6.8	50	GIST-C18-AQ	678.087
2.7	0	Scepter-C4-300	669.122
2.7	100	Scepter-C4-300	615.931
6.8	0	Scepter-C18	609.077
6.8	0	GIST-C18-AQ	607.165
2.7	50	Scepter-Phenyl-120	594.407
6.8	0	Scepter-C8-120	593.484

Porovnání chromatogramů s vysokou a nízkou hodnotou **E**



Hodnota **E** je vypočítána jako:

Počet detekovaných píků (**P**) × Rozlišení (**R_s**)

Response Setting ×

Calculation Method:

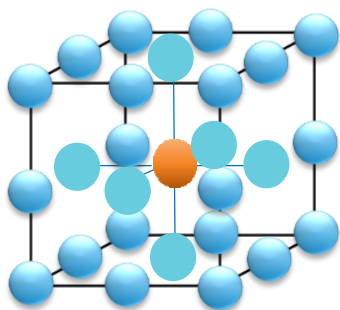
Evaluation Value

Upper Limit of Resolution:

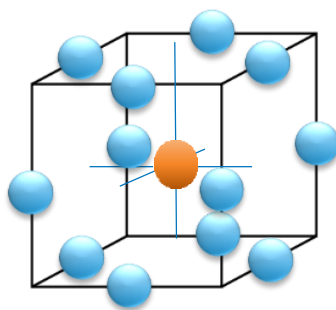
Max. hodnota rozlišení 5 -> zamezení nadhodnocení výsledků

Fáze optimalizace

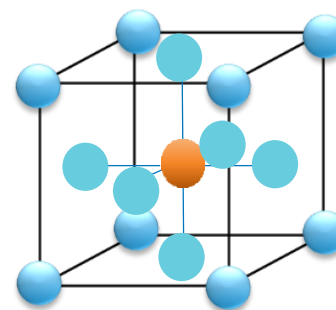
- Na základě vhodných podmínek vybraných ve screeningové fázi se vytvoří design experimentu (DoE).
- LabSolutions MD dokáže z limitovaných naměřených dat vytvořit simulaci separačních podmínek i mimo naměřená data – tzv. Design Space.



Full Factorial Design



BOX-Behnken Design



Central Composite Design

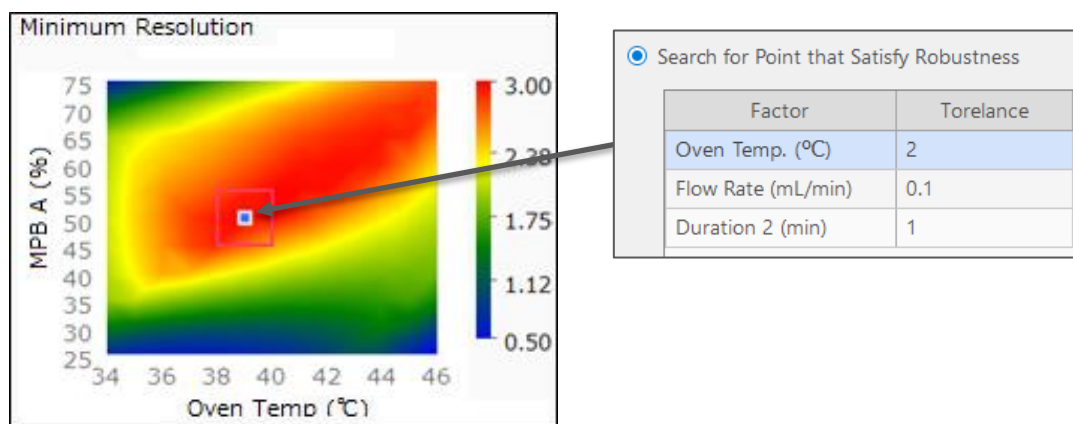
3 parametry, 3 hodnoty	Počet experimentů
Full Factorial Design	27
Box-Behnken Design	13 (snížení času analýz o 52 %)
Central Composite Design	15 (snížení času analýz o 44 %)

Vizualizace „Design Space“

Fáze optimalizace

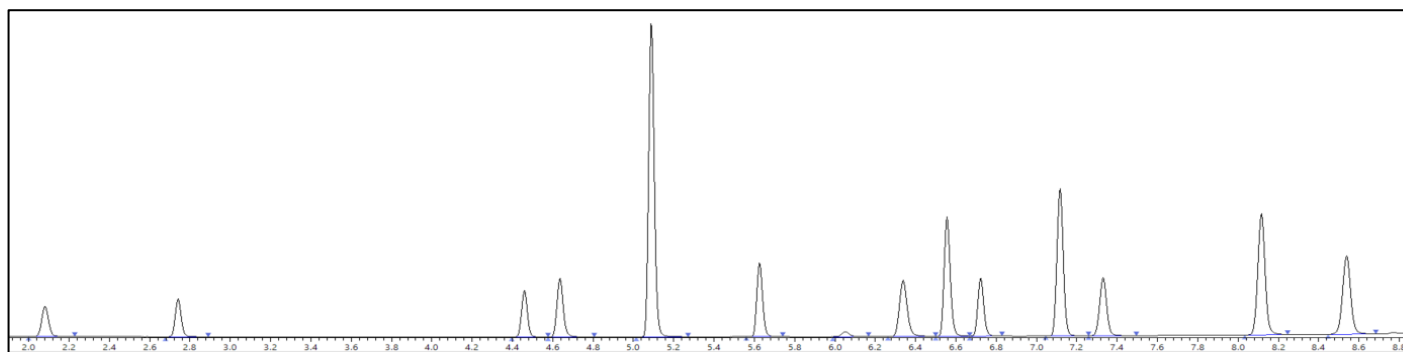


- Výsledek změny analytických podmínek je vizualizován pomocí heatmapy tzv. „Design Space“



Na základě zadaných požadavků SW automaticky vyhodnotí optimální separační parametry uvnitř „Design Space“

- Simulovaný chromatogram separačních podmínek uvnitř „Design Space“



Simulovaný chromatogram optimálních podmínek měření zvolených softwarem

Formula

Variable Setting	Factor	Variable	Step Size
<input checked="" type="checkbox"/>	Oven Temp. (°C)	x1	1
<input checked="" type="checkbox"/>	Flow Rate (mL/min)	x2	0.1
<input type="checkbox"/>	Duration 2 (min)	x3	1

Formula Type

Simple Setting

Degree: 1 2

Use Interaction Term

Advanced Setting

Formula Preview

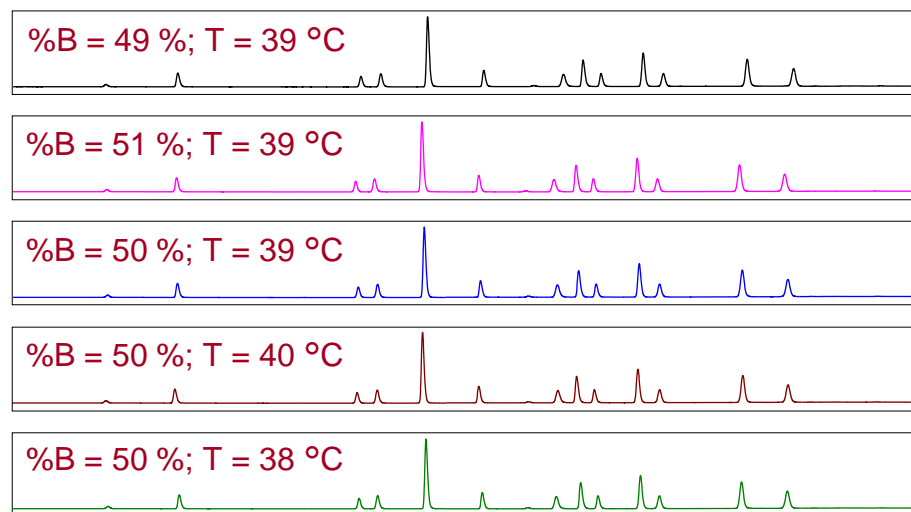
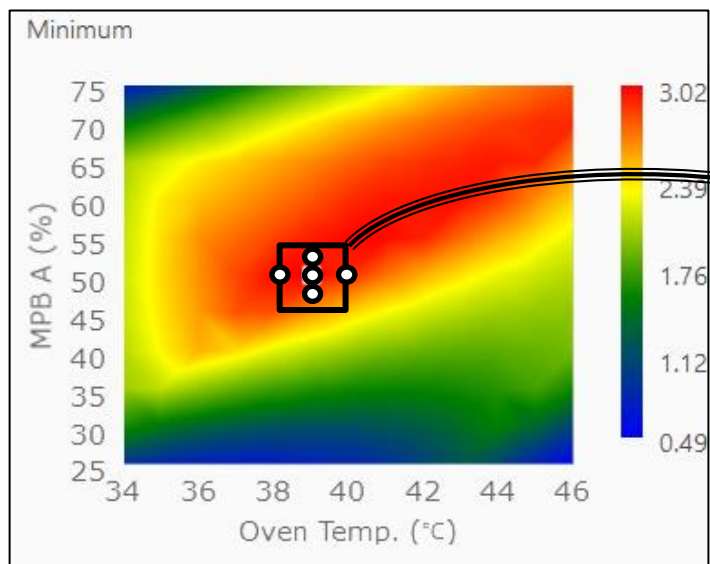
$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3(x_1)^2 + a_4(x_2)^2 + a_5x_1x_2$$

Polynomický model pro přesnou predikci RT

Zhodnocení robustnosti

Fáze validace

- Po stanovení optimálních separačních podmínek by měla být otestována robustnost metody řadou experimentů s lehce pozměněnými parametry metody
- LabSolutions MD umí automaticky vytvoří set experimentů pro spolehlivé zhodnocení robustnosti vyvinuté metody



Závěr

- LabSolutions MD Vás provede:
 - Screeningovou fází
 - Optimalizací metody
 - Ověřením robustnosti
- AQbD zajišťuje vývoj spolehlivých a robustních metod
- Snižuje nároky na zkušenosti operátora
- Značné urychlení vývoje metody

Thank you!

Welcome to the Shimadzu family.

Get ready to experience New Benchmarks.

