

Ajuste físico do volume de atraso do gradiente como uma ferramenta para a transferência bem-sucedida dos métodos de HPLC

Autores: Tibor Muellner e Holger Franz, Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha

Palavras-chave: transferência de métodos, volume de atraso do gradiente, GDV ajustável, dispositivo de medição, volume inativo, kit de transferência do método, conformidade regulatória

Introdução

A transferência dos métodos cromatográficos de um instrumento antigo de HPLC para um instrumento de uma geração mais recente ou a transferência de métodos entre instrumentos de fornecedores diferentes são tarefas desafiadoras para muitos profissionais de HPLC. As diferenças nos designs de hardware podem afetar os resultados cromatográficos, tais como o modo de controle do termostato do compartimento da coluna, o pré-aquecimento do eluente e os métodos do gradiente, sobretudo os volumes do instrumento, conforme definido por tecnologias de bomba utilizadas, designs dos coletores de amostras automáticos e canos do sistema¹.

As ferramentas e possibilidades para que um usuário minimize o impacto das diferenças dos instrumentos nos métodos validados de cromatografia são normalmente limitadas por agências regulatórias. Por exemplo, o capítulo <621> da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) lista as alterações permitidas de um método sem necessidade de revalidação, e é frequentemente utilizado como referência para graus de liberdade durante a transferência de métodos de HPLC². Alterações adicionais que englobam configurações específicas do sistema (por exemplo, controle do termostato de ar forçado vs. ar parado de um forno de coluna) ou alterações mecânicas de um instrumento (por exemplo, trocar um pré-aquecedor de coluna passivo por um ativo) costumam ser consideradas aceitáveis enquanto um instrumento está qualificado com uso de uma determinada configuração.

Para métodos de HPLC de gradiente, o volume de atraso do gradiente (GDV) do instrumento desempenha um papel fundamental para a transferência bem-sucedida do método. O GDV é definido como o volume a partir do ponto de mistura dos eluentes até a cabeça da coluna¹. Alterações no GDV ou na duração de um intervalo isocrático são explicitamente permitidas, de acordo com o capítulo <621> da USP. Portanto, essas alterações são ferramentas populares para uma transferência bem-sucedida do método. No entanto, alterações no intervalo isocrático não são universalmente aplicáveis, pois são limitadas às aplicações onde um intervalo isocrático é prescrito². A compensação baseada em software de diferenças no GDV, normalmente por uma alteração temporal do evento de injeção ou uma alteração do perfil do gradiente, pode levantar questões das autoridades regulatórias.

Estratégias de ajuste do volume de atraso do gradiente

Alterações manuais do volume de atraso do gradiente

Estratégias comuns para alterar o GDV de um sistema consistem em adicionar componentes fluidicos de grande volume na via de fluxo, ou seja, colocar misturadores ou capilares de grande volume entre a bomba e o coletor de amostras automático. Embora essas alterações normalmente ajudem a imitar um instrumento-fonte, as desvantagens são que os misturadores e capilares apresentam volumes fixos, logo, não permitem uma configuração exata do GDV. Particularmente em ambientes regulamentados, essas alterações de hardware exigem uma (re)qualificação do instrumento alterado e, assim, alterações frequentes no hardware do sistema não são práticas. Consequentemente, isso significa que a configuração de um sistema está frequentemente bloqueada para uma configuração de hardware fixa.

Troca das vias de fluxo com diferentes volumes de atraso do gradiente

Vários produtos comerciais tentam contornar essa limitação oferecendo duas vias de fluxo separadas: uma fornece um GDV baixo para respostas curtas do gradiente, exigidas para aplicações que utilizam colunas de HPLC de calibre estreito, e uma via de fluxo de GDV grande, dedicada a oferecer compatibilidade com métodos/instrumentos de HPLC legados. Assim, com esses produtos, o usuário pode alternar entre o desempenho completo e a compatibilidade legado. As desvantagens dessa abordagem são:

1. O esforço pelo GDV mínimo pode levar a um desempenho de mistura reduzido,
2. As duas vias de fluxo são estáticas e não podem ser adicionalmente ajustadas,
3. O instrumento é otimizado para transferir métodos legados somente a partir de um único tipo de sistema-fonte.

Volume de atraso do gradiente livremente ajustável

Os sistemas HPLC Vanquish™ Core da Thermo Scientific™ utilizam um dispositivo de medição no coletor de amostras automático para aspirar a amostra antes da injeção. O dispositivo de medição faz parte da via de fluxo e contribui para o GDV do sistema HPLC. No entanto, o volume ejetado do dispositivo de medição pode ser alterado pelo movimento de um pistão, mudando assim o GDV geral do sistema HPLC. Esse volume ejetado é chamado de

volume inativo. O volume inativo pode ser diminuído por meio de um comando de software até um volume baixo para imitar um sistema com um GDV pequeno (Figura 1, esquerda), ou aumentado até um volume alto para simular um sistema com um GDV mais elevado. O volume inativo definido e o volume de injeção são independentes entre si, ou seja, qualquer combinação dos dois é possível. A configuração do volume inativo é rastreada pela trilha de auditoria do software do Sistema de Dados de Cromatografia (CDS) Chromeleon™ da Thermo Scientific™ (versão 7.2.10 MuA e superior); portanto, é totalmente auditável. Essa funcionalidade também está disponível com a Integração de Instrumento Padrão (SII) da Thermo Scientific™ para o software Xcalibur™ da Thermo Scientific™ (versão 1.6).

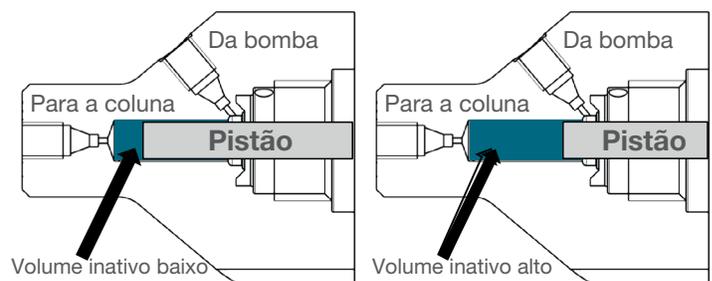


Figura 1. Efeito da posição do pistão do dispositivo de medição no volume de atraso do gradiente. A geometria é projetada para garantir que, independentemente da posição do pistão, todo o volume inativo seja ejetado, isto é, a geometria previne a ocorrência de zonas estagnadas em todas as posições do pistão (volumes inativos) e taxas de fluxo.

Já que o sistema Vanquish Core apresenta um GDV menor do que a maioria dos sistemas HPLC de rotina, que tipicamente apresentam um GDV na faixa de 1,1 a 1,4 mL (para bombas de mistura de baixa pressão), a configuração do volume inativo de até 230 µL é normalmente suficiente para compensar as diferenças de GDV. Um exemplo típico é apresentado na Figura 2, onde a configuração do volume inativo foi utilizada para transferir um método para impurezas na clorexidina de um sistema de LC Agilent 1260 Infinity para um sistema HPLC Vanquish Core. Por meio da adaptação do volume inativo, a correspondência dos tempos de retenção do pico pode ser muito aprimorada. Para detalhes deste exemplo de transferência de método, consulte a Nota de Aplicação 73309: Straightforward transfer of an EP method for chlorhexidine impurity analysis from an Agilent 1260 Infinity LC system to a Vanquish Core HPLC system (Transferência direta de um método de EP para análise de impurezas na clorexidina a partir de um sistema de LC Agilent 1260 Infinity para um sistema HPLC Vanquish Core)³.

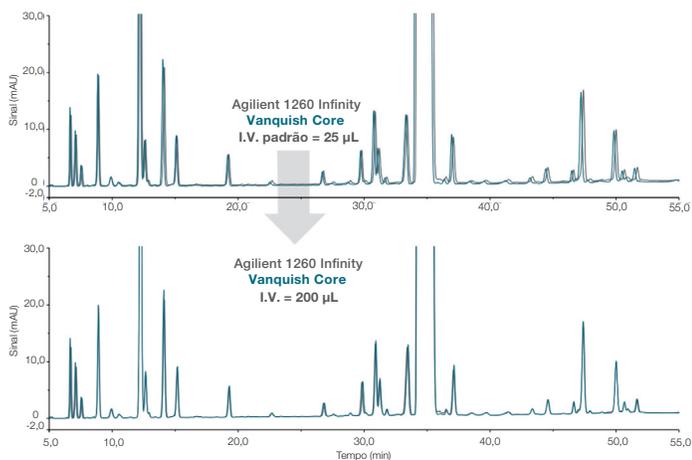


Figura 2. Exemplo de transferência de um sistema HPLC Série Agilent 1260 Infinity para um sistema HPLC Vanquish Core de um método que determina impurezas na clorexidina. A sobreposição excelente dos resultados pode ser alcançada aumentando o GDV do sistema em 175 µL. Reproduzido da Nota de Aplicação 73309: transferência direta de um método de EP para análise de impurezas na clorexidina a partir de um sistema de LC Agilent 1260 Infinity para um sistema HPLC Vanquish Core³.

Para aumentar a flexibilidade do GDV, um Kit de Transferência do Método (P/N 6036.2100) está disponível para os sistemas HPLC Vanquish Core. Ele consiste em uma válvula alternável de 6 entradas e 2 posições e um loop de 200 µL que pode ser inserido na via de fluxo. A configuração fluidica é representada na Figura 3. Alternar a válvula permite aumentar o volume de atraso do gradiente em mais 200 µL. Como esse volume adicional é colocado antes do ponto de injeção, a dispersão do sistema não é afetada.

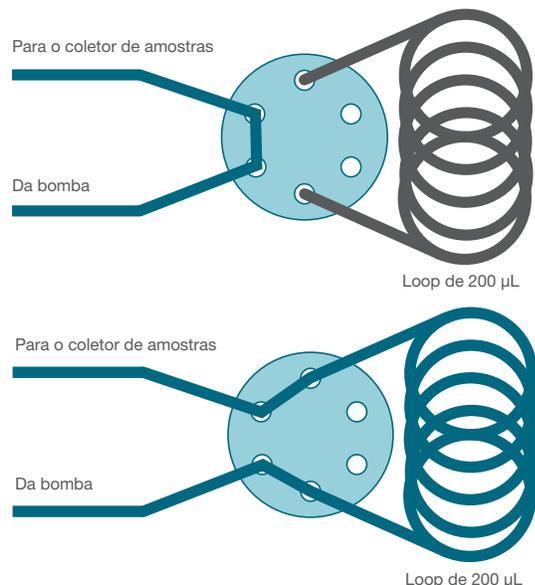


Figura 3. Volume de atraso do gradiente adicional alternável. Na posição de bypass, o fluxo da bomba está diretamente conectado ao coletor de amostras, o que é análogo a um instrumento sem um kit de transferência do método instalado (imagem superior). Quando a válvula é alternada, o loop se torna parte da via de fluxo, adicionando o volume do loop ao volume de atraso do gradiente geral do sistema (imagem inferior).

O ajuste do GDV por meio do volume inativo do dispositivo de medição do sistema Vanquish Core agora pode ser combinado ao loop alternável na via de fluxo. Uma combinação das duas funções permite um ajuste da etapa de 1 µL do GDV do sistema ao longo de uma faixa de 430 µL, reduzindo-o em 25 µL e aumentando o GDV do sistema em 405 µL, em comparação à configuração padrão. Isso pode ser alcançado ao ajustar o volume inativo do dispositivo de medição, o loop de 200 µL ou com uma combinação dos dois. Esse conceito também é demonstrado na Figura 4.

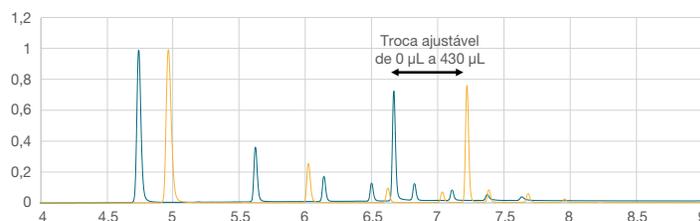


Figura 4. Impacto de diferentes GDV em uma separação do gradiente utilizando um sistema HPLC Vanquish Core. O menor GDV pode ser alcançado por meio da configuração do volume inativo de 0 µL enquanto alterna o loop de transferência do método para fora da via de fluxo. O maior GDV pode ser implementado por meio da configuração do volume inativo de 230 µL e alternando o loop para dentro da via de fluxo simultaneamente, o ajuste do GDV é possível em etapas de 1 µL em uma faixa de 430 µL.

Facilidade de uso e implementação do software

Quando um Kit de Transferência do Método Vanquish (P/N 6038.2100) é instalado, o GDV do sistema pode ser influenciado ao utilizar o loop, o dispositivo de medição ou ambos. Para instalar o kit, ele deve ser configurado na configuração do instrumento de CDS Chromeleon (versão 7.2.10 MuA ou superior), conforme exibido na Figura 5.

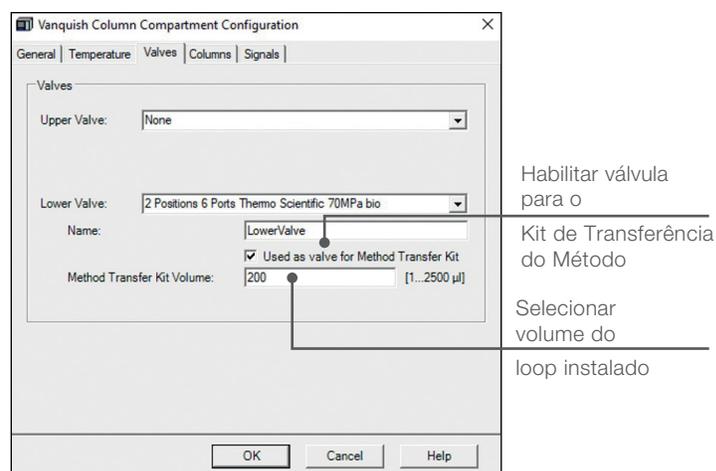


Figura 5. Tela de configuração do instrumento do CDS Chromeleon 7.3 que permite configurar o kit de transferência do método e definir o volume do loop. 200 µL é o volume do loop fornecido com o kit de transferência do método, outros volumes para loops personalizados também podem ser inseridos.

O volume do loop enviado com o kit de transferência do método é de 200 µL. Na configuração do instrumento do software Chromeleon, também é possível definir um volume diferente, por exemplo, para um loop personalizado.

O Editor de Método do Instrumento Chromeleon oferece acesso fácil para ajustar o GDV como um parâmetro de método regular, como a temperatura da amostra do compartimento da coluna, por exemplo. Isso permite configurar o GDV dentro de um método do instrumento e, portanto, individualmente para uma sequência ou até mesmo uma amostra específica. A Figura 6 apresenta capturas de tela do Editor de Método do Instrumento Chromeleon (imagem superior) e do Assistente de Método do Instrumento (imagem inferior) para ilustrar. A configuração da posição da válvula e do volume inativo é completamente rastreada nas trilhas de auditoria do CDS Chromeleon e, portanto, pode ser auditada a qualquer momento.

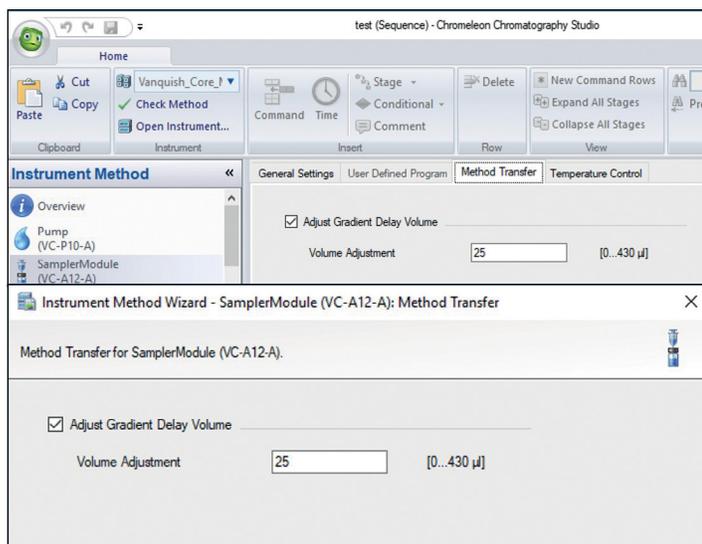


Figura 6. Editor de Método do Instrumento Chromeleon (imagem superior) e Assistente de Método do Instrumento (imagem inferior), que permitem ajustar o volume de atraso do gradiente do sistema durante a edição e a criação do método

Limitações de uso do volume do gradiente para transferência do método

Para um determinado método de HPLC do gradiente, uma alteração do GDV ou da duração do intervalo isocrático no início de um método pode influenciar os tempos de retenção em um cromatograma de maneira inconsistente. Picos que eluem durante o intervalo isocrático ou perto do mesmo são submetidos a um mecanismo de eluição isocrática completa ou parcial. Normalmente, seus picos de retenção são pouco ou nada afetados por alterações do GDV. Picos eluídos completamente pelo impacto do gradiente costumam apresentar um desvio conforme a diferença do GDV. Os dois efeitos em um cromatograma podem influenciar a resolução cromatográfica.

Para ilustrar esse efeito, é melhor vislumbrar um composto não retido e um fortemente retido durante a eluição do gradiente de uma etapa, conforme representado na Figura 7. Um composto não retido sempre eluirá no mesmo momento, independentemente de uma troca da etapa do gradiente em decorrência de volumes de atraso do gradiente diferentes. No entanto, um pico fortemente retido eluirá apenas quando a etapa do gradiente alcançar o analito na coluna, de maneira quase independente da duração absoluta do intervalo isocrático antes da etapa do gradiente. Nesse último caso, qualquer aumento do GDV se traduz diretamente em uma troca do tempo de retenção.

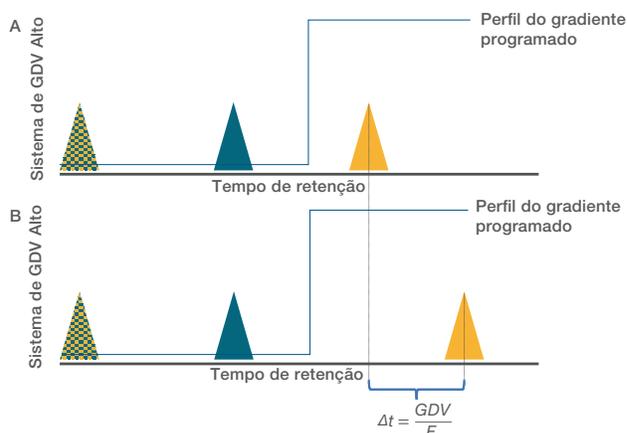


Figura 7. Impacto do GDV nos tempos de eluição dos picos não retido (azul) e fortemente retido (laranja) durante uma eluição do gradiente da etapa (A) para um sistema com GDV baixo e (B) para um sistema com GDV alto. O tempo de retenção do pico azul não é influenciado pelo GDV, enquanto o pico laranja é diretamente alterado pelo atraso do gradiente (com GDV = volume de atraso do gradiente [mL], F = fluxo [mL/min] e Δt = troca do tempo de retenção [min]).

Diretrizes para configurar o GDV durante a transferência do método

Se nenhuma informação sobre a diferença do GDV entre o sistema-fonte e o alvo estiver disponível, recomendamos o seguinte procedimento de transferência do método:

- i) Replicar o cromatograma no sistema HPLC Vanquish Core com uma configuração de volume inativo de 0 µL e nenhum loop conectado, utilizando as mesmas configurações e tabela do gradiente, tais como taxa de coleta de dados e filtro de sinal do detector (por exemplo, constante de tempo), que as implementadas no instrumento-fonte.
- ii) Compare os resultados entre os sistemas-fonte e o alvo.
- iii) Em caso de troca do tempo de retenção, identifique se uma troca em direção aos tempos de retenção anteriores está presente com o sistema HPLC Vanquish Core.
- iv) Insira uma troca de volume no Editor de Método do Instrumento Chromeleon (Figura 6) para compensar a troca do tempo de retenção (em caso de uma troca não completamente consistente, é possível focar em picos de eluição tardios) ao:

a. calcular o volume para compensar a troca do tempo de retenção com esta equação simples:

$$\Delta V = (t_1 - t_2) \times F$$

Com ΔV = volume de atraso do gradiente delta [µL], t_1 = tempo de retenção do pico A no sistema-fonte [min], t_2 = tempo de retenção do pico A no sistema-alvo [min], F = fluxo [µL/min]

b. ou aumentar o volume em um processo iterativo até que a melhor sobreposição do tempo de retenção seja alcançada.⁴

Essas alterações estão em conformidade, pois todos os tópicos a seguir são válidos:

- Métodos compendiais não regulam volumes do sistema.
- A configuração fluidica do sistema HPLC não está sendo submetida a uma alteração manual.
- As configurações de parâmetro do instrumento são totalmente rastreáveis na trilha de auditoria do sistema de dados cromatográficos.

Aspectos de conformidade

USP

Na transferência do método para a seção de HPLC do capítulo geral <621> na USP41, modificações do método são toleradas com limitações. Para o volume de atraso do gradiente (denominado volume de permanência na USP), afirma-se que: "Se ajustes forem necessários, a alteração do conteúdo da coluna (mantendo a mesma química), a duração de um intervalo isocrático inicial (quando prescrito) e/ou ajustes de volume de atraso do gradiente são permitidos."² Isso significa que alterações do volume de atraso do gradiente feitas por meio do kit de transferência do método são explicitamente aprovadas como uma ferramenta adequada para a transferência do método.

Farmacopeia europeia

A Farmacopeia europeia, em geral, prefere uma abordagem de design diferente, enquanto em que: "As monografias preferivelmente incluem uma etapa isocrática antes do início do programa do gradiente para que uma adaptação possa ser feita aos timepoints do gradiente para levar em conta as diferenças no volume de permanência entre o sistema usado para desenvolvimento do método e o sistema de fato utilizado. É de responsabilidade do usuário adaptar a duração da etapa isocrática para o equipamento analítico utilizado."⁵ Embora a adaptação do volume de atraso do gradiente não seja explicitamente mencionada como uma ferramenta, o efeito, isto é, a duração da janela isocrática inicial, é ativamente incentivado como um parâmetro alterável. No entanto, uma abordagem baseada em alterar a duração da etapa isocrática frequentemente não reflete as possíveis diferenças cromatográficas em decorrência de GDV físico diferente, por exemplo, efeitos de mistura. Portanto, se possível, o ajuste físico do GDV deve ser preferível.

Farmacopeia japonesa

A Farmacopeia japonesa pode ser considerada liberal com relação à alteração das condições de operação. Uma ampla variedade de parâmetros "[...] pode ser modificada dentro das faixas nas quais o sistema de cromatografia líquida utilizado está em conformidade com os requisitos de adequação do sistema."⁶ Portanto, adaptar o GDV de um sistema pode ser recomendado como uma ferramenta adequada para a transferência simples do método.

Qualificação do Kit de Transferência do Método

A qualificação do instrumento normalmente segue uma abordagem holística, testando se um sistema HPLC funciona adequadamente. Com o CDS Chromeleon, as sequências de teste exigidas são geradas automaticamente, considerando a configuração utilizada do instrumento.

Se o kit de transferência do método estiver instalado e configurado, o CDS Chromeleon realiza o teste do gradiente da bomba duas vezes. Com esse teste, garante-se que a via de fluxo com e sem um loop adicional seja totalmente funcional. Testes de qualificação adicionais além da bomba não são exigidos, pois o kit de transferência do método não afeta o coletor de amostras automático, o compartimento da coluna ou o desempenho do detector. Para mais detalhes, consulte *Thermo Scientific Chromeleon – Operational Qualification/ Performance Qualification for HPLC Instruments – Operating Instructions (Thermo Scientific Chromeleon – Qualificação Operacional/Qualificação de Desempenho para Instrumentos de HPLC – Instruções de Operação)*.⁷

Resumo

- O volume de atraso do gradiente (GDV) é um dos parâmetros mais essenciais durante a transferência do método.
- Em ambientes regulamentados, alterações manuais e não auditáveis da fluidez do sistema HPLC não costumam exigir uma revalidação do instrumento.
- O Sistema HPLC Vanquish Core da Thermo Scientific oferece uma solução única para suportar a transferência do método de instrumentos de HPLC convencionais. O coletor de amostras automático do sistema HPLC Vanquish Core pode ajustar livremente o GDV com até 230 µL adicionais. O Kit de Transferência do Método (P/N 6036.2100) opcional permite ampliar essa faixa do volume de atraso do gradiente para até 430 µL, para ajudar a transferir métodos até mesmo de instrumento de HPLC com design legado com GDV extensivo.
- A integração simples no CDS Chromeleon e SII para Xcalibur oferece configurações em total conformidade, pois o volume de atraso do gradiente é um parâmetro do método registrado na trilha de auditoria.

Referências

1. Paul, C.; Grubner, M. et al. Guia 72711 da Thermo Scientific: An instrument parameter guide for successful (U)HPLC method transfer, 2018. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/wp-72711-lc-methodtransferguide-wp72711-en.pdf>
2. The United States Pharmacopeial Convention, Capítulo <621>, Farmacopeia dos Estados Unidos 41.
3. Grubner, M. Nota de Aplicação 73309 da Thermo Scientific: Straightforward transfer of an EP method for chlorhexidine impurity analysis from an Agilent 1260 Infinity LC system to a Vanquish Core HPLC system
4. Franz, H., Wachinger, T., Schmidt, C.: DE Patent DE102015112900B4, Method of transferring a method from an initial system to a target system in liquid chromatography, 2015, Alemanha.
5. Capítulo 2.2.46, Farmacopeia europeia 7.0
6. Capítulo 2.01.7, Farmacopeia japonesa, 17ª Edição.
7. Thermo Scientific, Chromeleon Operational Qualification/Performance Qualification for HPLC instruments – Operating Instructions – Revisão 9.5, 2020.

Saiba mais em thermofisher.com/vanquishcore

Apenas para pesquisa. Não deve ser usado em procedimentos de diagnóstico. © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos os direitos reservados. Agilent é uma marca comercial registrada da Agilent Technologies, Inc. Todas as outras marcas comerciais são propriedades da Thermo Fisher Scientific e suas subsidiárias. Estas informações são apresentadas como um exemplo da capacidade dos produtos da Thermo Fisher Scientific Inc. Não são destinadas ao incentivo do uso desses produtos de quaisquer maneiras que possam violar os direitos de propriedade intelectual de outros. Especificações, termos e preços estão sujeitos a alterações. Nem todos os produtos estão disponíveis em todos os países. Entre em contato com seu representante de vendas local para mais detalhes. **TN90655 -PT-BR 0222M**