

Ajuste físico del volumen de retraso del gradiente como herramienta para la transferencia exitosa de métodos de HPLC

Autores: Tibor Muellner y Holger Franz,
Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemania

Palabras clave: transferencia de métodos,
volumen de retraso del gradiente,
GDV ajustable, dispositivo de medición,
volumen inactivo, kit de transferencia
del método, cumplimiento regulatorio

Introducción

La transferencia de los métodos cromatográficos de un instrumento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) antiguo a uno más nuevo, o bien la transferencia de métodos entre instrumentos de diferentes proveedores, son tareas desafiantes para muchos profesionales que practican la HPLC. Las diferencias entre los diseños de los equipos pueden afectar los resultados cromatográficos, como el modo del termostato del termostatizador, el precalentador de eluyente y, en especial para los métodos con gradiente, los volúmenes del instrumento según los definen las tecnologías de las bombas utilizadas, los diseños de los inyectores automáticos y la cañería del sistema¹.

Usualmente, las agencias regulatorias limitan las herramientas y las posibilidades de un usuario de mitigar el impacto de las diferencias de instrumentos en métodos de cromatografía validados.

Por ejemplo, el capítulo <621> de la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP, por sus siglas en inglés) menciona los cambios que permiten aplicar a un método sin la necesidad de revalidarlo y, por lo general, se usa como referencia para los grados de libertad durante la transferencia de un método de HPLC². Otros cambios que comprenden configuraciones del sistema específicas (como el termostato de aire forzado en comparación con el de aire estático en el horno de una columna) o cambios mecánicos de un instrumento (como el cambio de un precalentador de columna pasivo por uno activo) por lo general se consideran aceptables, siempre que el instrumento se califique utilizando una configuración dada.

En el caso de los métodos de HPLC de gradiente, el volumen de retraso del gradiente del instrumento (GDV, por sus siglas en inglés) tiene un papel fundamental para lograr una transferencia exitosa del método. El GDV está definido como el volumen desde el punto de mezcla de los eluyentes hasta la entrada de la columna¹. Los cambios al GDV o a la longitud del segmento isocrático están explícitamente permitidos según el capítulo <621> de la USP. Por lo tanto, dichos cambios son herramientas populares para la transferencia exitosa del método. No obstante, los cambios en el segmento isocrático no son aplicables en todos los niveles, ya que están limitados a las aplicaciones en las que se indica un segmento isocrático². La compensación a base de software de las diferencias en el GDV, por lo general mediante un cambio de tiempo del evento de inyección o una alteración del perfil del gradiente, puede alertar a las autoridades regulatorias.

Estrategias de ajuste del volumen de retraso del gradiente

Cambios manuales del volumen de retraso del gradiente

Las estrategias comunes para aplicar cambios en el GDV de un sistema consisten en agregar componentes de gran volumen en la trayectoria del flujo, en otras palabras: colocar mezcladores o capilares de gran volumen entre la bomba y el inyector automático. Aunque por lo general estos cambios ayudan a imitar al instrumento fuente, las desventajas son que los mezcladores y los capilares tienen volúmenes fijos y, como consecuencia, no permiten una configuración exacta del GDV. Especialmente en entornos regulados, estos cambios en el equipo requieren una (re)calificación del instrumento nuevo, por lo que los cambios frecuentes del sistema resultan poco prácticos. Como consecuencia, esto significa que por lo general, la configuración de un sistema está limitada por una configuración fija.

Intercambio de trayectorias de flujo con diferentes volúmenes de retraso del gradiente

Muchos productos comerciales intentan soslayar esta limitación al proporcionar dos trayectorias de flujo por separado; una que proporciona un GDV bajo para las respuestas de gradiente cortas requeridas por aplicaciones que usan columnas de HPLC de calibre angosto y otra que proporciona un GDV alto dedicada a ofrecer compatibilidad con los métodos o instrumentos de HPLC existentes. Como consecuencia, con estos productos, el usuario puede intercambiar entre rendimiento completo y compatibilidad con los métodos existentes. Las desventajas de este enfoque son las siguientes:

1. el esfuerzo por proporcionar un GDV mínimo puede causar un rendimiento de mezcla más bajo;
2. ambas trayectorias de flujo son estáticas y no pueden ajustarse más;
3. el instrumento se optimiza para métodos de transferencia existentes de un tipo de sistema fuente único solamente.

Volumen de retraso del gradiente de ajuste libre

Los sistemas de HPLC Thermo Scientific™ Vanquish™ Core utilizan un dispositivo de medición, en el inyector automático de muestras, para aspirar la muestra antes de la inyección. El dispositivo de medición es parte de la trayectoria de flujo y contribuye al GDV del sistema de HPCL. Sin embargo, el volumen que pasa por el dispositivo de medición puede ser alterado por el movimiento de un pistón, por lo que puede cambiar el GDV total del sistema de HPCL.

Este volumen eliminado se llama volumen inactivo. El volumen inactivo puede disminuirse con un comando de software en un volumen bajo para que imite al sistema con un GDV pequeño (Figura 1 a la izquierda), o bien aumentarse a un volumen alto para simular al sistema con un GDV grande. El volumen inactivo establecido y el volumen de inyección son independientes; es decir, cualquier combinación de ellos es posible. El seguimiento de auditoría de software del Sistema de datos de cromatografía (CDS, por sus siglas en inglés) Thermo Scientific™ Chromeleon™ (versión 7.2.10 MUa y superior) rastrea la configuración del volumen inactivo, por lo que puede auditarse en su totalidad. Esta funcionalidad también puede auditarse por el software SSI (Integración de instrumento estándar, SII, por sus siglas en inglés) de Thermo Scientific™ para el software Thermo Scientific™ Xcalibur™ (versión 1.6).

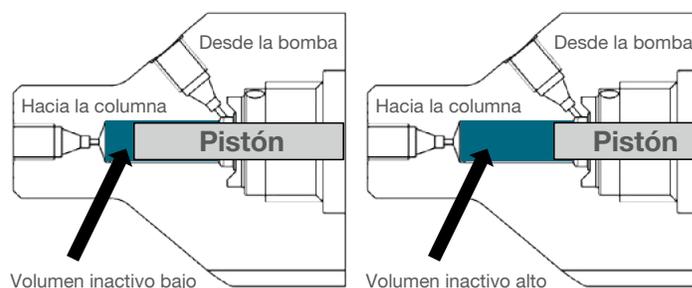


Figura 1. Efecto de la posición del pistón del dispositivo de medición en el volumen de retraso del gradiente. La geometría está diseñada a fin de asegurar que, independientemente de la posición del pistón, se elimine todo el volumen inactivo. En otras palabras, la geometría previene que ocurran estancamientos en todas las posiciones del pistón (volúmenes inactivos) y caudales.

Debido a que el sistema Vanquish Core tiene un GDV más bajo que la mayoría de los sistemas de HPLC de rutina, que por lo general tienen un GDV en el rango de 1,1 a 1,4 ml (en las bombas de mezcla de baja presión), la configuración del volumen inactivo de hasta 230 μ L por lo general resulta suficiente para compensar las diferencias de GDV. En la Figura 2, se muestra un ejemplo típico en el que la configuración del volumen inactivo se utilizó para transferir un método para impurezas en clorhexidina de un sistema de LC Agilent 1260 Infinity a un sistema de HPLC Vanquish Core. Al adaptar el volumen inactivo, se puede mejorar ampliamente la coincidencia de los tiempos de retención. Para obtener más detalles de este ejemplo de transferencia de método, consulte la Nota de aplicación 73309: Straightforward transfer of an EP method for chlorhexidine impurity analysis from an Agilent 1260 Infinity LC system to a Vanquish Core HPLC system³ (Transferencia directa de un método de EP para el análisis de impurezas de clorhexidina de un sistema de LC Agilent 1260 Infinity a un sistema de HPLC Vanquish Core).

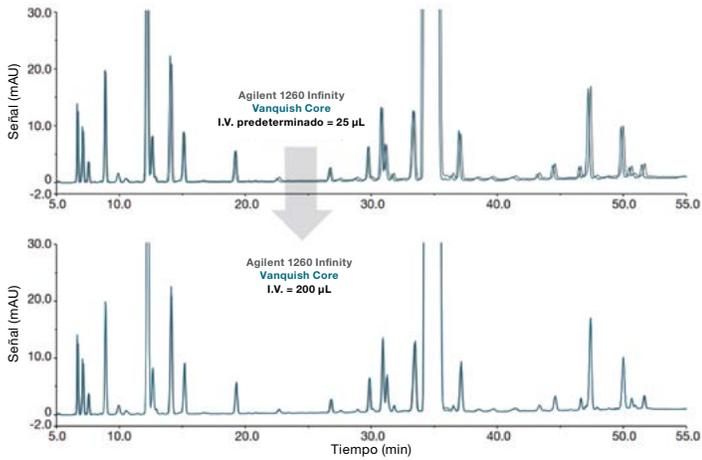


Figura 2. Transferencia de ejemplo entre un sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity Series a un sistema de HPLC Vanquish Core de un método que determina las impurezas en clorhexidina. Se puede lograr una superposición excelente de los resultados al aumentar 175 µL el GDV del sistema. Reproducido de la Nota de aplicación 73309: Straightforward transfer of an EP method for chlorhexidine impurity analysis from an Agilent 1260 Infinity LC system to a Vanquish Core HPLC system³ (Transferencia directa de un método de EP para el análisis de impurezas de clorhexidina de un sistema de LC Agilent 1260 Infinity a un sistema de HPLC Vanquish Core).

Para extender la flexibilidad del GDV aún más, se encuentra disponible un Kit de transferencia del método (P/N 6036.2100) para los sistemas de HPLC Vanquish Core. Consiste de una válvula interruptora de 6 puertos y 2 posiciones y un circuito de 200 µL que se puede insertar a la trayectoria del flujo. La configuración de fluidos se muestra en la Figura 3. Apagar el interruptor permite aumentar el volumen de retraso del gradiente 200 µL adicionales. Dado que este volumen adicional se coloca antes del punto de inyección, la dispersión del sistema no se ve impactada.

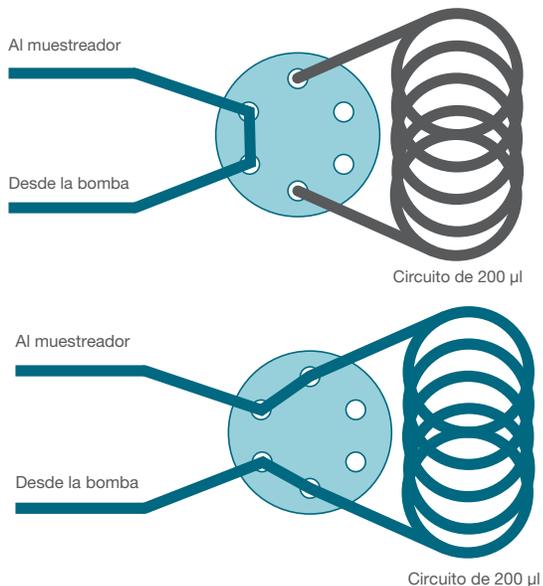


Figura 3. Volumen de retraso del gradiente adicional intercambiable. En la posición de derivación, el flujo de la bomba se conecta directamente al muestreador, análogo a un instrumento sin el kit de transferencia de método instalado (arriba). Cuando se intercambia la válvula, el circuito forma parte de la trayectoria del flujo, lo que agrega el volumen del circuito al volumen de retraso del gradiente general del sistema (abajo).

El ajuste del GDV mediante el volumen inactivo del dispositivo de medición del sistema Vanquish Core ahora puede combinarse con el intercambio del circuito hacia la trayectoria del flujo. La combinación de las dos funciones permite un ajuste de un paso de 1 µL del GDV del sistema en un rango de 430 µL que disminuye a 25 µL y aumenta el GDV del sistema 405 µL en comparación con la configuración predeterminada. Esta combinación se logra al ajustar el volumen inactivo del dispositivo de medición, el circuito de 200 µL o una combinación de los dos. Este concepto también se visualiza en la Figura 4.

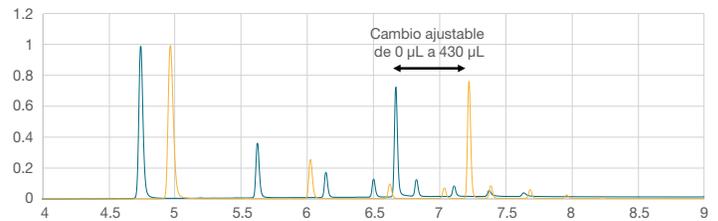


Figura 4. Impacto de GDV diferentes en una separación de gradiente utilizando el sistema de HPLC Vanquish Core. Se puede lograr el GDV más bajo con una configuración del volumen inactivo de 0 µL mientras se cambia el circuito de transferencia del método hacia afuera de la trayectoria del flujo. Se puede implementar el GDV más alto con una configuración del volumen inactivo de 230 µL y alternando simultáneamente el circuito de entrada a la trayectoria del flujo, el ajuste del GDV es posible en pasos de 1 µL a un rango de 430 µL.

Facilidad de uso e implementación de software

En cualquier momento en que se instale el Kit de transferencia de método Vanquish (P/N 6038.2100), el GDV del sistema se puede influenciar utilizando el circuito, el dispositivo de medición o ambos. Para instalar el kit, se debe ajustar en la configuración del instrumento del CDS Chromeleon (versión 7.2.10 MUa o posterior), como se muestra en la Figura 5.

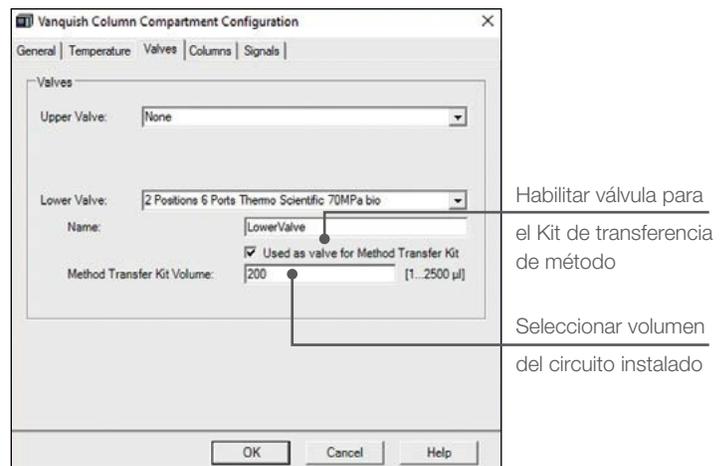


Figura 5. Pantalla de configuración del instrumento del CDS Chromeleon 7.3 que permite la configuración del kit del método de transferencia y la definición del volumen del circuito. 200 µL es el volumen del circuito proporcionado con el kit de transferencia del método, también se pueden ingresar otros volúmenes para los circuitos personalizados.

El volumen del circuito que se envía con el kit de transferencia de método es de 200 µL. En la configuración del instrumento del software Chromeleon, también es posible definir un volumen diferente, por ejemplo, para un circuito personalizado.

El Editor de método del instrumento Chromeleon proporciona un acceso fácil para ajustar el GDV como un parámetro de método común, como, por ejemplo, la temperatura de muestra del termostatazador. Esto permite configurar el GDV dentro de un método del instrumento y, por lo tanto, de forma individual para una secuencia o incluso una muestra específica. La Figura 6 muestra capturas de pantalla del Editor de método del instrumento Chromeleon (arriba) y el Asistente del método del instrumento (abajo) para ilustrar lo mencionado. El seguimiento de auditoría del CDS Chromeleon rastrea la configuración de la válvula de posición y del volumen inactivo, por lo que esos parámetros pueden auditarse en cualquier momento.

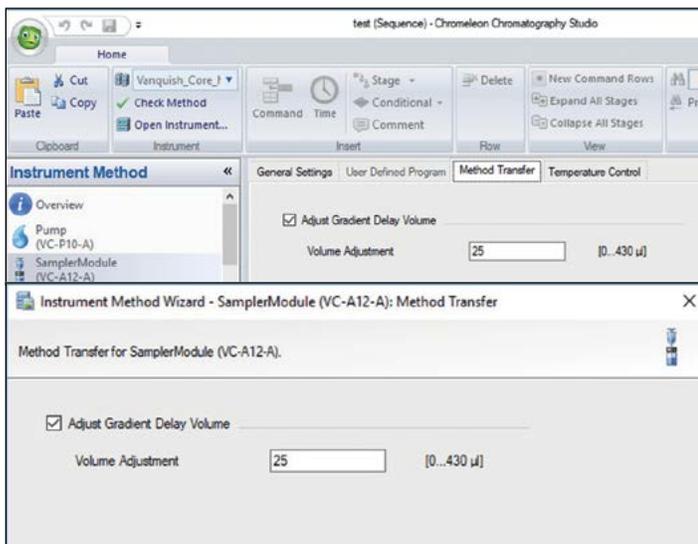


Figura 6. Editor del método del instrumento Chromeleon (arriba) y Asistente del método del instrumento (abajo), que permiten un ajuste del volumen de retraso del gradiente del sistema durante la edición y la creación del método.

Limitaciones del uso del volumen del gradiente para la transferencia de método

Para un método de HPLC de gradiente dado, un cambio en el GDV o la longitud del segmento isocrático al comienzo del método puede influenciar los tiempos de retención en todo el cromatograma de manera inconsistente. Los picos de elución durante el segmento isocrático o cerca de él se someten a un mecanismo de elución isocrático parcial o total. Por lo general, sus tiempos de retención no se ven afectados por los cambios del GDV, o bien se ven levemente afectados. Por lo general, los picos eluidos completamente por el impacto del gradiente muestran una desviación de acuerdo con la diferencia del GDV. En un cromatograma, ambos efectos pueden influenciar la resolución cromatográfica.

Para ilustrar este efecto, es mejor prever un compuesto no retenido y uno fuertemente retenido durante la elución del gradiente por pasos, como se muestra en la figura 7. Un compuesto no retenido siempre se eluye al mismo tiempo, independientemente de un cambio del paso del gradiente debido a diferentes volúmenes de retraso del gradiente. No obstante, un pico fuertemente retenido no se eluirá hasta que el gradiente alcance al analito en la columna, casi independientemente de la longitud absoluta del segmento isocrático anterior al paso del gradiente. En el último caso, cualquier aumento del GDV se traducirá directamente en un cambio del tiempo de retención.

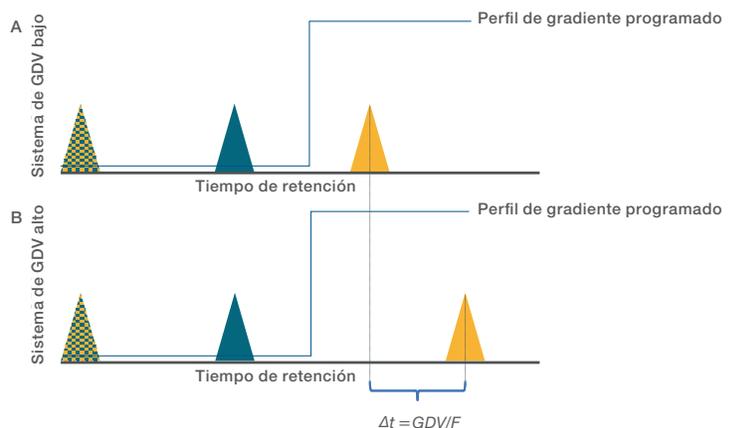


Figura 7. Impacto del GDV en los tiempos de elución de los picos no retenidos (azul) y de los fuertemente retenidos (naranja) durante un paso de elución del gradiente (A) para un sistema con un GDV bajo y (B) para un sistema con un GDV alto. El tiempo de retención del pico azul no se ve influenciado por el GDV, mientras que el pico naranja está directamente modificado por el retraso del gradiente (GDV=volumen de retraso del gradiente [ml], F=flujo [ml/min] y Δt =cambio del tiempo de retención [min]).

Lineamientos para configurar el GDV durante la transferencia del método

Si no hay información disponible acerca de la diferencia del GDV entre el sistema anterior y el nuevo, le recomendamos que lleve a cabo el siguiente procedimiento de transferencia de método:

- i) Replique el cromatograma en el sistema de HPLC Vanquish Core con una configuración del volumen inactivo de 0 µL y sin circuitos conectados, use la misma tabla y configuración de gradiente, como el índice de recopilación de datos y el filtro de señal de detección (por ejemplo, constante de tiempo), que se implementaron en el instrumento viejo.
- ii) Compare los resultados entre los sistemas anterior y nuevo.
- iii) En caso de un cambio en el tiempo de retención, identifique si se encuentra presente un cambio en torno a los tiempos de retención más tempranos en el sistema de HPLC Vanquish Core.
- iv) Ingrese un cambio de volumen en el Editor del método del instrumento Chromeleon (Figura 6) para compensar el cambio del tiempo de retención (en caso de no contar con un cambio totalmente consistente, puede centrarse en los picos de elución tardía) ya sea:

- a. calculando el volumen para compensar el cambio del tiempo de retención con esta ecuación simple:

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

ΔV = volumen de retraso del gradiente delta [µL], t_1 =tiempo de retención del pico A en el sistema fuente [min], t_2 =tiempo de retención del pico A en el sistema objetivo [min], F =flujo [µL/min]

- b. o aumentando el volumen en un proceso iterativo hasta que se logre la mejor superposición de los tiempos de retención.⁴

Estos cambios cumplen con los requisitos, ya que respetan los siguientes criterios:

- Los métodos farmacopéicos no regulan los volúmenes del sistema.
- La configuración de los fluidos del sistema de HPLC no está sometida a cambios manuales.
- La configuración de los parámetros del sistema es completamente rastreable en el seguimiento de auditoría del sistema de datos de cromatografía.

Aspectos relativos al cumplimiento

USP

En la transferencia de método para la sección de HPLC del capítulo general <621> en la USP41, las modificaciones del método se toleran dentro de los límites. Para el volumen de retraso del gradiente (llamado volumen del sistema en la USP) se establece que "si se deben realizar ajustes, se permiten ajustes en el cambio en el relleno de la columna (manteniendo

el mismo tipo de relleno), la duración de un segmento isocrático inicial (cuando se indica) y el volumen de retraso del gradiente".² Esto significa que los cambios en el volumen de retraso del gradiente según los realiza el kit de transferencia del método están explícitamente aprobados como una herramienta adecuada para la transferencia del método.

Farmacopea Europea

La Farmacopea Europea generalmente prefiere un enfoque de diseño distinto en lo que respecta a lo siguiente: "las monografías incluyen preferentemente un paso isocrático antes del comienzo del programa del gradiente a fin de que pueda hacerse una adaptación del momento de inicio del gradiente para que tomen en cuenta las diferencias del volumen del sistema entre el sistema que se usa para el desarrollo del método y el que se usa en realidad. El usuario tiene la responsabilidad de adaptar la longitud del paso isocrático al equipo analítico que se usa".⁵ Aunque no se menciona exactamente el volumen de retraso del gradiente como una herramienta, el efecto, es decir, la longitud de las ventanas isocráticas iniciales, está activamente incentivado como un parámetro que se puede cambiar. Sin embargo, un enfoque que se basa en la alteración de la longitud del paso isocrático por lo general no refleja las diferencias cromatográficas posibles debido al GDV físico distinto; por ejemplo, los efectos de la mezcla. Por ese motivo, si es posible, se prefiere el ajuste físico del GDV.

Farmacopea Japonesa

La Farmacopea Japonesa puede considerarse liberal respecto al cambio de las condiciones de operación. Un amplio rango de parámetros "[...] puede modificarse dentro de los rangos en los que el sistema de cromatografía líquida usado respete los requisitos de idoneidad del sistema".⁶ Por consiguiente, adaptar el GDV de un sistema puede recomendarse como una herramienta adecuada para una transferencia de método sencilla.

Calificación del kit de transferencia del método

La calificación del instrumento por lo general sigue un enfoque holístico, que prueba si un sistema de HPLC funciona según el diseño. Con el CDS Chromeleon las secuencias de prueba requeridas se generan automáticamente considerando la configuración del instrumento utilizada.

Si el kit de transferencia del método está instalado y configurado, el CDS Chromeleon realiza un duplicado de la prueba de gradiente de la bomba. Con esa prueba, se asegura que la trayectoria del flujo con y sin el circuito adicional sea completamente funcional. No se requieren otras pruebas de calificación adicionales además de la bomba, ya que el kit de transferencia del método no tiene influencia sobre inyector automático, el termostizador de columnas ni el rendimiento del detector. Para obtener más detalles, consulte *Thermo Scientific Chromeleon – Calificación operativa/Calificación del rendimiento de los instrumentos de HPLC – Instrucciones operativas*.⁷

Resumen

- El volumen de retraso del gradiente (GDV) es uno de los parámetros críticos durante la transferencia de método.
- En entornos regulados, los cambios manuales y no sujetos a auditoría de los flujos del sistema de HPLC requieren una revalidación del instrumento.
- El sistema de HPLC Thermo Scientific Vanquish Core proporciona una solución única para soportar la transferencia del método de instrumentos de HPLC convencionales. El inyector automático del sistema de HPLC Vanquish Core puede libremente ajustar el GDV hasta 230 μ L adicionales. El Kit de transferencia de método opcional (P/N 6036.2100) permite extender este rango hasta un volumen de retraso del gradiente de 430 μ L adicional para ayudar a que los métodos de transferencia se nivelen con los instrumentos de HPLC con diseños existentes y un extenso GDV.
- La integración sencilla con el SII del CDS Chromeleon para Xcalibur ofrece configuraciones que cumplen con los requisitos, ya que el volumen de retraso del gradiente es un parámetro del método que se registra en el seguimiento de auditoría.

Referencias

1. Paul, C.; Grübner, M. et al. Thermo Scientific White Paper 72711: An instrument parameter guide for successful (U)HPLC method transfer, 2018. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/wp-72711-lc-methodtransfer-guide-wp72711-en.pdf>
2. The United States Pharmacopeial Convention, Chapter <621>, United States Pharmacopeia 41.
3. Grübner, M. Thermo Scientific Application Note 73309: 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, Germany.
5. Chapter 2.2.46, European Pharmacopeia 7.0
6. Chapter 2.01.7, Japanese Pharmacopeia, 17th Edition.
7. Thermo Scientific, Chromeleon Operational Qualification/Performance Qualification for HPLC instruments – Operating Instructions – Revision 9.5, 2020.

Obtenga más información en [thermofisher.com/vanquishcore](https://www.thermofisher.com/vanquishcore)