

Transferencia de un método de LC de farmacopea para el análisis de impurezas de clorhexidina de un sistema de HPLC Waters Alliance a uno Vanquish Core

Autor: Maria Grübner

Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemania

Palabras clave: método de transferencia de HPLC, sistema de HPLC Vanquish Core, sistema de HPLC Waters Alliance, clorhexidina, Farmacopea Europea

Beneficios de la aplicación

- Transferencia sencilla de un método de HPLC basado en EP de un sistema de HPLC Waters™ Alliance™ a uno Thermo Scientific™ Vanquish™ Core.
- Se obtienen resultados cromatográficos con ambos sistemas, pero se proporciona una resolución y una repetibilidad del sistema mejor con el HPLC Vanquish Core.

Objetivo

Demostrar la transferencia de métodos de HPLC analíticos de un sistema LC Waters Alliance a uno Vanquish Core.



Introducción

La transferencia de un instrumento a otro de métodos de cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés) es una tarea difícil a la que se enfrentan la mayoría de los laboratorios analíticos en diferentes situaciones. Por ejemplo, una aplicación establecida debe ejecutarse en varios instrumentos dentro de un laboratorio para distribuir las elevadas cargas de trabajo. Por otro lado, las transferencias dentro del laboratorio se realizan entre laboratorios con métodos en desarrollo y en implementación, es decir, desde laboratorios de investigación y desarrollo (R&D, por sus siglas en inglés) a laboratorios de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés), o bien, cuando se externalizan tareas, por ejemplo, a laboratorios tercerizados¹.

En ambos casos, los instrumentos de los laboratorios que transfieren y reciben pueden ser equivalentes o diferentes tanto en el proveedor como en la configuración. Un tercer escenario es el reemplazo de los instrumentos existentes con tecnología moderna. En cualquier caso, una transferencia solo se considera efectiva si se obtienen resultados equivalentes. El éxito y el esfuerzo que requiere dicha transferencia dependen de varios factores. La robustez del método que se transferirá así como las desviaciones instrumentales de los sistemas involucrados tienen un papel importante.¹ Algunas características técnicas de un sistema, como el volumen de retraso del gradiente (GDV), el modo de mezcla de la bomba, el comportamiento hidrodinámico y las opciones de termostato de la columna y el eluyente pueden afectar los resultados críticos, como la resolución pico y los tiempos de retención.²⁻⁴ Los requisitos del cromatógrafo respecto del resultado analítico y los límites definidos de las desviaciones aceptables del sistema original determinan la complejidad del trabajo de transferencia. Además, por lo general se aceptan modificaciones muy limitadas de los parámetros del método durante la transferencia para prevenir la necesidad de una revalidación que demanda mucho tiempo.

En este experimento, se transfiere el método de HPLC para el análisis de impurezas de digluconato de clorhexidina presente en la Farmacopea Europea⁵ (EP, por sus siglas en inglés) de un sistema de HPLC Waters Alliance a uno Thermo Scientific Vanquish Core. La clorhexidina es un antiséptico y desinfectante común, que se encuentra dentro de la Lista de Medicamentos Esenciales Modelo de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶. Se encuentra

disponible como medicamento sin receta y se usa ampliamente en la medicina e higiene dental, por ejemplo, en enjuagues bucales y para la desinfección de la piel.

La columna Thermo Scientific™ Hypersil™ GOLD seleccionada cumple con los requisitos de una columna de sílice con entrada recubierta de la monografía necesaria para el método EP. Aunque cumplimos con la monografía de la EP, por lo general, las siguientes discusiones también son válidas para el método de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés)⁷, como el método analítico, es decir, la columna y el gradiente, son idénticos.

Experimental

Reactivos y materiales

- Agua desionizada, con resistividad de 18,2 MΩ·cm o mayor
- Acetonitrilo Fisher Scientific™ Optima™, grado LC/MS (P/N A955-212)
- Ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) Thermo Scientific™ Pierce™, grado LC-MS (P/N 85183)
- Estándar preferido de la EP: Clorhexidina para la idoneidad del sistema CRS lote 2, código de catálogo Y0001545⁸

Preparación de la muestra

De acuerdo con la monografía, 5 mg del estándar de referencia, contenido clorhexidina y varias impurezas, se disolvieron en 1 ml de fase móvil A (consultar debajo).

Instrumentación y condiciones de HPLC

Los instrumentos y las condiciones de HPLC utilizados en este estudio se encuentran enumerados en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Instrumentos

Cuaternario Alliance		Cuaternario Vanquish Core
Base del sistema		Base del sistema Vanquish Core (P/N VC-S01-A-02)
Almacenamiento de solvente	Kit de bandeja de frascos	Bastidor de solventes (P/N 6036.1350)
Bomba		Bomba cuaternaria C (P/N VC-P20-A-01)
Muestreador	Módulo de separación 2695 (sin precalentador de fase móvil)	Muestreador CT split (P/N VC-A12-A-02)
Termostatizador		Termostatizador C (P/N VC-C10-A-03) (precalentador pasivo P/N 6732.0170 incluido en el kit se envió del sistema base)
Detector	Detector de matriz de fotodiodo 2996	Detector de matriz de diodo CG (P/N VC-D11-A-01)
Celda de flujo	Estándar (10 mm)	Estándar (10 mm, 11 µL, P/N 6077.0250)
Accesorio del sistema		Kit de transferencia del método Vanquish (P/N 6036.2100)

Tabla 2. Condiciones de HPLC

Parámetro	Valor
Columna	Hypersil GOLD, 4,6 x 250 mm, 5 µm, 175 Å (P/N 25005-254630)
Fase móvil	A: 0,1 % TFA en agua/acetonitrilo (80/20; v/v) B: 0,1 % TFA en agua/acetonitrilo (10/90; v/v)
Caudal	1 ml/min*
Gradiente	0 min – 0 % B, 2 min – 0 % B, 32 min – 20 % B, 37 min – 20 % B, 47 min – 30 % B, 54 min – 30 % B, 55 min – 0 % B, 62 min – 0 % B
Temperatura de la columna	30 °C (aire estático)
Temperatura del inyector automático	8 °C
Detección	
Longitud de onda	254 nm
Ancho de banda	6 nm
índice de recopilación de datos	5 Hz
Respuesta del filtro/ tiempo de respuesta	1 s
Volumen de inyección	10 µl
Lavado de aguja	Desactivado

*Alliance: Volumen de descarga = 50 µL, según se recomienda para los caudales de 0,531–1,230 ml/min

Procesamiento de datos y software

Se utilizó el software del sistema de datos de cromatografía Thermo Scientific™ Chromeleon™ versión 7.3 para la adquisición y el análisis de datos.

Resultados y discusión

Para una mejor comparabilidad, los siguientes experimentos se realizaron con la misma columna, alícuotas de la misma muestra y el mismo lote de fase móvil a fin de excluir los efectos no instrumentales de la transferencia. Se ejecutaron siete inyecciones consecutivas con cada sistema. La Figura 1 muestra la comparación de ambos instrumentos bajo las condiciones detalladas en la monografía EP.

El cromatograma se genera sobre el tiempo de ejecución total con picos de clorhexidina, impurezas especificadas y eventos no especificados en el folleto de la Prueba de Idoneidad del Sistema (SST, por su sigla en inglés)⁹.

Para mayor claridad, el foco se encuentra en todos los picos que exceden el área del pico mínima de 0,3 mAU·min.

Se generaron cromatogramas similares mediante los instrumentos de HPLC Alliance y Vanquish Core. Para todos los picos, los tiempos de retención absolutos tuvieron una diferencia menor al 4 % entre los sistemas. En la Tabla 3, se proporciona un resumen de los tiempos de retención relativos, obtenidos experimentalmente y aquellos provenientes de la EP. Ambos instrumentos se encuentran muy alineados entre sí así como con los objetivos de la EP. Se observa una buena alineación de las áreas pico relativas relacionadas con el pico principal en la Figura 2. Sin embargo, los valores de resolución obtenidos con el sistema de HPLC Vanquish Core por lo general son mejores que los obtenidos con el sistema Alliance; esto puede deberse principalmente a los picos más angostos gracias a un volumen de dispersión del sistema más bajo del sistema de HPLC Vanquish Core.

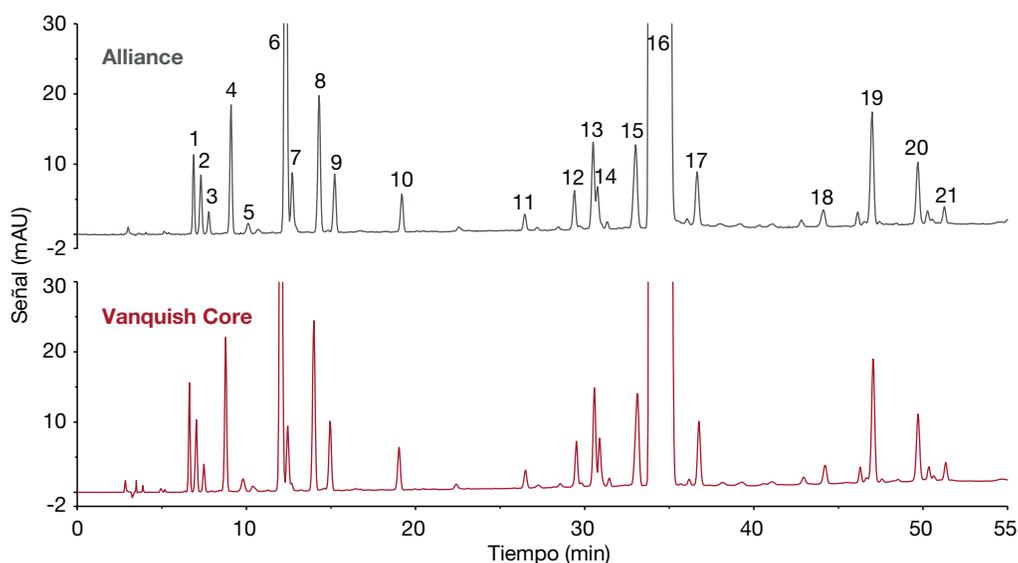


Figura 1. Transferencia de un sistema de HPLC Alliance a uno Vanquish Core de acuerdo con la monografía de la EP para el gluconato de clorhexidina; asignación de pico de acuerdo con la designación de impurezas en la monografía de la EP y el folleto estándar^{5,9}

Tabla 3. Tiempos de retención relativa relacionados con el pico principal según se establece en la monografía de la EP y según el promedio de los cromatogramas de Alliance y Vanquish Core (Figura 1).

Pico n.º	Compuesto	Monografía de la EP	Alliance	Vanquish Core
1	Desconocido 1		0,20	0,20
2	Impureza L	0,23	0,22	0,21
3	Impureza Q	0,24	0,23	0,22
4	Impureza G	0,25	0,27	0,26
5	Desconocido 2		0,30	0,29
6	Impureza N	0,35	0,36	0,36
7	Impureza B	0,36	0,38	0,37
8	Impureza F	0,50	0,42	0,41
9	Desconocido 3		0,45	0,44
10	Impureza A	0,60	0,57	0,56
11	Desconocido 4		0,78	0,78
12	Impureza H	0,85	0,87	0,87
13	Impureza O	0,90	0,90	0,90
14	Impureza I	0,91	0,91	0,91
15	Impureza J	0,96	0,97	0,98
16	Clorhexidina	1,00	1,00	1,00
17	Desconocido 5		1,08	1,08
18	Desconocido 6		1,30	1,31
19	Impureza K	1,40	1,39	1,39
20	Desconocido 7		1,47	1,47
21	Desconocido 8		1,51	1,52

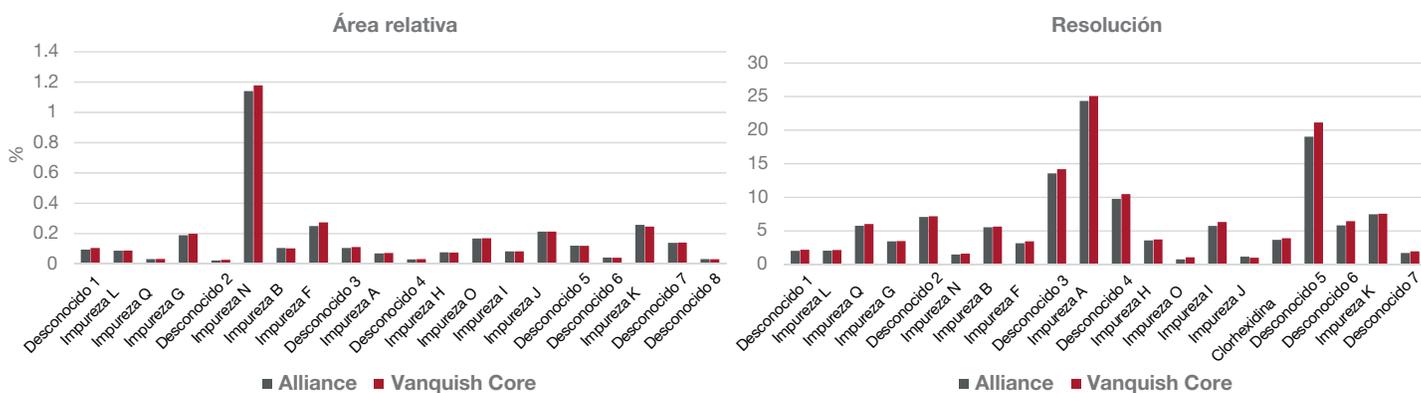


Figura 2. Resultados cromatográficos con los sistemas de HPLC Alliance y Vanquish Core bajo condiciones destacadas en la monografía de la EP (Figura 1)

Además, la repetibilidad de los tiempos de retención y las áreas de los picos, expresada como desviaciones estándares relativas (RSD, por sus siglas en inglés) sobre las siete inyecciones, se vieron ampliamente mejoradas por el sistema de HPLC Vanquish Core, como se muestra en la Figura 3. Las RSD de los tiempos de retención de todos los picos fueron del 0,04 % o menores con el sistema de HPLC Vanquish Core, mientras que se encontraron en un rango de hasta el 0,15 % con el sistema Alliance. El RSD para el área de los distintos picos fue de el 0,5 % o más bajo en el caso

del sistema de HPLC Vanquish Core, mientras que para el sistema Alliance fue entre el 0,6 % y el 2,8 %. Este efecto también se visualiza en la Figura 4.

Los criterios de idoneidad del sistema dado por la monografía de la EP, que requiere una resolución del par de impureza L y G de un mínimo de 3 y una relación pico-valle de la impureza B de un mínimo de 2, esto se cumplió fácilmente en ambos sistemas LC con una resolución de ~8 y con una relación pico-valle

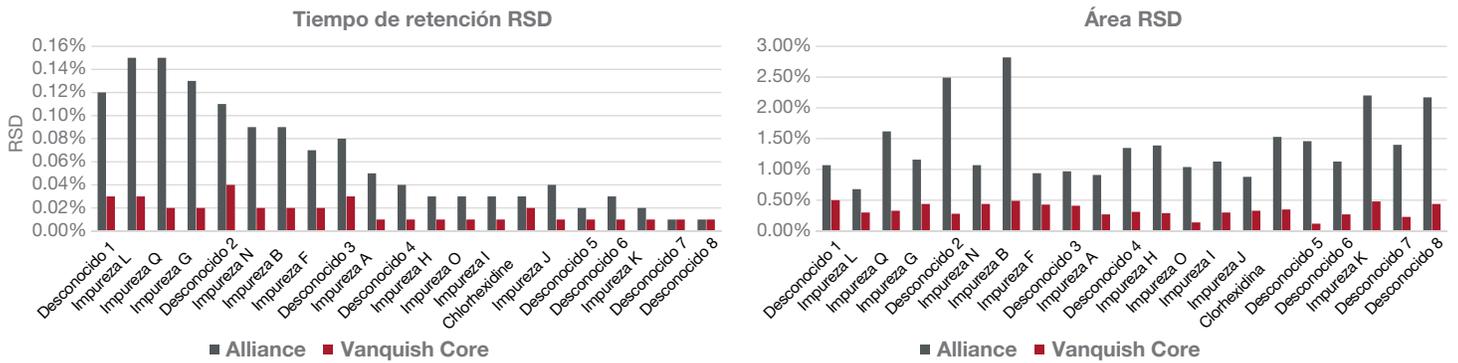


Figura 3. Desviaciones estándares relativas (RSD, por sus sigla en inglés) de los tiempos de retención y las áreas pico sobre siete inyecciones obtenidas por los sistemas de HPLC Vanquish Core Alliance

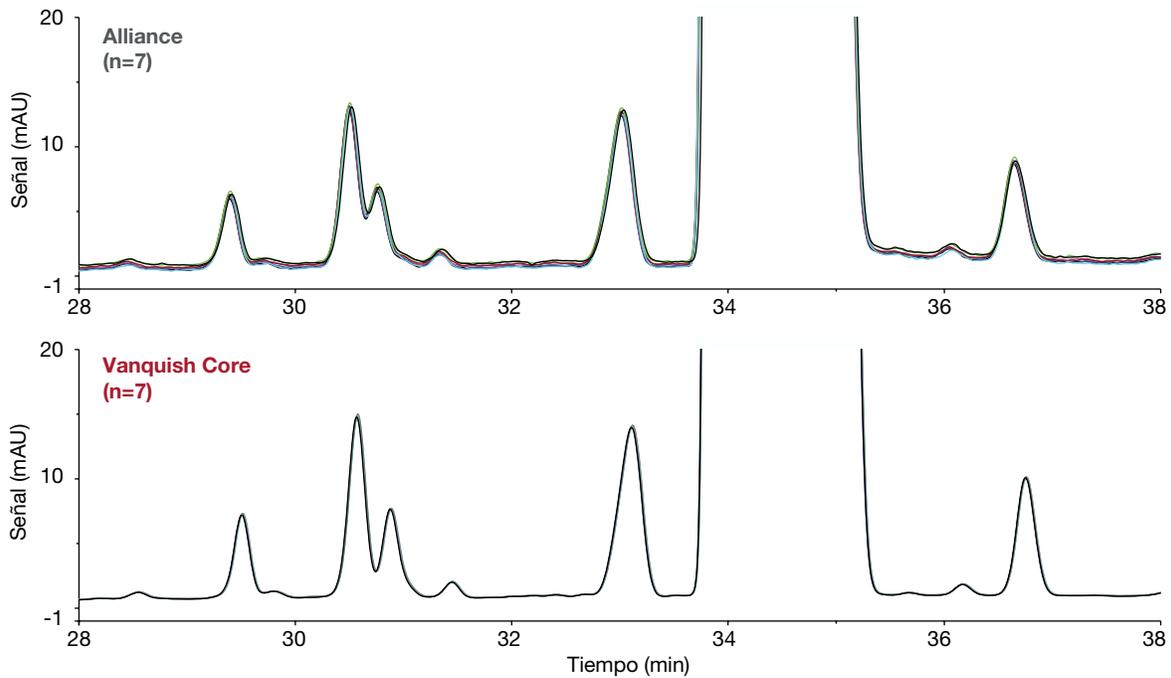


Figura 4. Recubrimiento de siete inyecciones por parte de los sistemas de HPLC Alliance y Vanquish Core, respectivamente, ampliado a un rango de tiempo alrededor del pico principal, destacando la precisión analítica mejorada del sistema de HPLC Vanquish Core

de >5 (Alliance) y de >7 (Vanquish Core). Por lo tanto, el método de EP fue reproducido con éxito con ambos sistemas sin adaptaciones de método ni de hardware.

Conclusión

- Se demostró la transferencia directa de un método EP para el análisis de impurezas de clorhexidina aplicado en un sistema de HPLC Waters Alliance a uno Thermo Scientific Vanquish Core.

- Los resultados cromatográficos equivalentes se proporcionaron ambos dos sistemas. Sin embargo, el sistema de HPLC Vanquish Core proporcionó una resolución del pico y una repetibilidad del sistema mucho mejor.

Referencias

1. Swartz, M. E.; Krull, I. Analytical Method Transfer; LCGC North America 2006, 24(11), 1204-1214, <http://www.chromatographyonline.com/analytical-method-transfer-1?rel=canonical%20> (accessed Oct. 29, 2019).
2. 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-method-transfer-guide-wp72711-en.pdf>
3. Grübner, M. Thermo Scientific Application Note 72939: Transfer of an EP method for mebendazole from a Waters Acquity UPLC system to a Vanquish Horizon UHPLC system, 2019. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-72939-uhplc-method-transfer-ep-mebendazole-an72939-en.pdf>
4. Grübner, M., Paul, C., Steiner F. Thermo Scientific Application Note 72717: Method transfer of a USP derived acetaminophen assay from an Agilent 1260 Infinity system to an UltiMate 3000 SD system and a Vanquish Flex UHPLC system, 2018. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-72717-lc-method-transfer-usp-acetaminophen-an72717-en.pdf>
5. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) Online, 10th edition 2018 (10.0), monograph 0658: Chlorhexidine digluconate solution
6. World Health Organization's Model List of Essential Medicines, 21th edition, June 2019, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf> (accessed October 24, 2019).
7. The United States Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia USP42-NF37, Chlorhexidine gluconate solution monograph, 2019.
8. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; European Pharmacopoeia (Ph. Eur.); 7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France).
9. Information Leaflet Ph. Eur. Reference Standard: Chlorhexidine for system suitability CRS batch 2; European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; European Pharmacopoeia (Ph. Eur.); 7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France).
10. 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.

Obtenga más información en thermofisher.com/vanquishcore