

Aferrarse al poder de la tecnología core-shell para mejorar antiguos métodos validados de HPLC según las guías aceptables de la USP

Autor invitado: Dr. Jeff Layne

Hola a todos. Espero que hayan disfrutado mis dos últimas series, **“Jeff Tries Cannabis”** y **“Los efectos de cambiar el diámetro interno de la columna en aplicaciones de LC-MS”**. Ahora quiero comenzar una nueva conversación sobre un aspecto del análisis en HPLC muchas veces ignorado: Métodos para control de calidad. Específicamente, métodos que fueron validados usando criterios USP. Seamos honestos. Cuando las personas piensan en actividades divertidas y emocionantes, llevar a cabo métodos de control de calidad, probablemente, estén en los últimos puestos de la lista. Y no carece de motivo: puede ser algo rutinario y repetitivo, y en particular para nada intelectualmente atractivo. (Confesión: Yo analicé los mismos esteroides orales durante casi dos años, así que cuando se trata de actividades aburridas y repetitivas, hablo desde mi propia experiencia).

Pero me encuentro aquí para decirles que no tiene que ser aburrido. Analizar métodos de control de calidad puede ser muy divertido y, si consideramos los ajustes permitidos que se pueden hacer dentro de las guías aceptables de la USP, hasta puede ser gratificante. Y la razón principal es que, con las especificaciones que la **USP determina en el capítulo general <621>**, ustedes también pueden hacer ciertos ajustes razonables a los métodos USP para mejorar su rendimiento o productividad SIN la necesidad de pasar por todo un

proceso de revalidación. Esto significa que finalmente pueden tomar un método antiguo que usa una columna de 10 µm con partícula C18 de sílica irregular y llevarlo a siglo XXI sin necesidad de pasar por el tedioso, desgastante y costoso proceso de revalidación.

“¿Por qué tomarse la molestia? ¿Cuál es el beneficio?”

Bueno, además de evitar análisis de rutina aburridos, si aplican estas recomendaciones descritas en el capítulo <621>, pueden tomar métodos viejos desarrollados en columnas de LC con tecnología obsoleta y llevarlos a la actualidad con las últimas mejoras en tecnología para columnas de LC. En términos prácticos, esto puede traducirse en análisis cromatográficos completamente optimizados y de mayor productividad gracias a tiempos más cortos.

“¿Capítulo <621>? No me resulta familiar”.

Los ajustes permitidos en métodos validados se propusieron por primera vez en el **capítulo general <621> de la USP** en 1999, y ha sufrido pocas revisiones desde entonces. Básicamente, el capítulo <621> define una serie de ajustes que podrían hacerse a un método, como la longitud y tamaño de partículas de una columna, o incluso la composición de la fase móvil, SIN tener que someterlo a una revalidación completa. Las revisiones posteriores del capítulo <621> en 2007 y 2014 perfeccionaron estos cambios permitidos y los pusieron en armonía con los ajustes indicados en la Farmacopea europea. Es importante

destacar que estos ajustes permitidos solo aplican a los métodos monográficos de la USP que son ISOCRÁTICOS, y que cualquier cambio en las dimensiones de la columna en métodos gradientes requerirá una revalidación completa. Para una revisión profunda del capítulo <621> y sus implicaciones prácticas, por favor, visitar este enlace <http://www.phenomenex.com/usp> (también dará acceso al artículo de nuestro blog).

“Pero yo no tengo un sistema UHPLC/UPLC®, Jeff”.

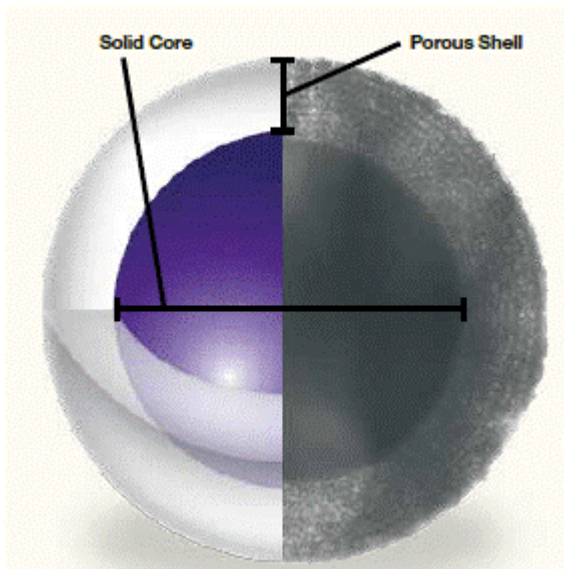
No es necesario. Eso es lo mejor. Al aprovechar las ventajas de las **partículas core-shell para HPLC**, se pueden obtener los beneficios de rendimiento de un relleno sub-2 µm para UHPLC en los sistemas HPLC convencionales!

“¿Cuál es esta tecnología core-shell de la que hablas?”

Me alegra que lo preguntes. A diferencia de las partículas para LC basadas en sílica, las partículas core-shell están formadas por un núcleo sólido de sílica impermeable rodeado por una capa de sílica totalmente porosa (**Figura 1**). Sin ir a una explicación técnica y detallada de las bases del rendimiento de la tecnología core-shell (la cual se puede encontrar en <http://www.phenomenex.com/kinetex>), el mensaje práctico es que, debido a la morfología core-shell única, las columnas empacadas con partículas core-shell brindarán una eficacia significativamente mayor en comparación con las totalmente porosas de

tamaño de partícula equivalente. Una mayor eficacia se traducirá en mejor resolución y picos más altos (sensibilidad). Con esa mejora en la resolución, se puede optar por una columna más corta y/o con mayores flujos (dentro de los ajustes permitidos) para reducir drásticamente los tiempos de análisis comparados con el método original, y sin perder los requisitos de idoneidad inicial del sistema. ¿No suena divertido?

Figura 1. Las partículas de sílica están formadas por una capa de sílica totalmente porosa que rodea un núcleo interior impermeable.



“Mmmm. Suena bien, pero mi jefe querrá ver algunos datos antes de meternos en algo como esto”.

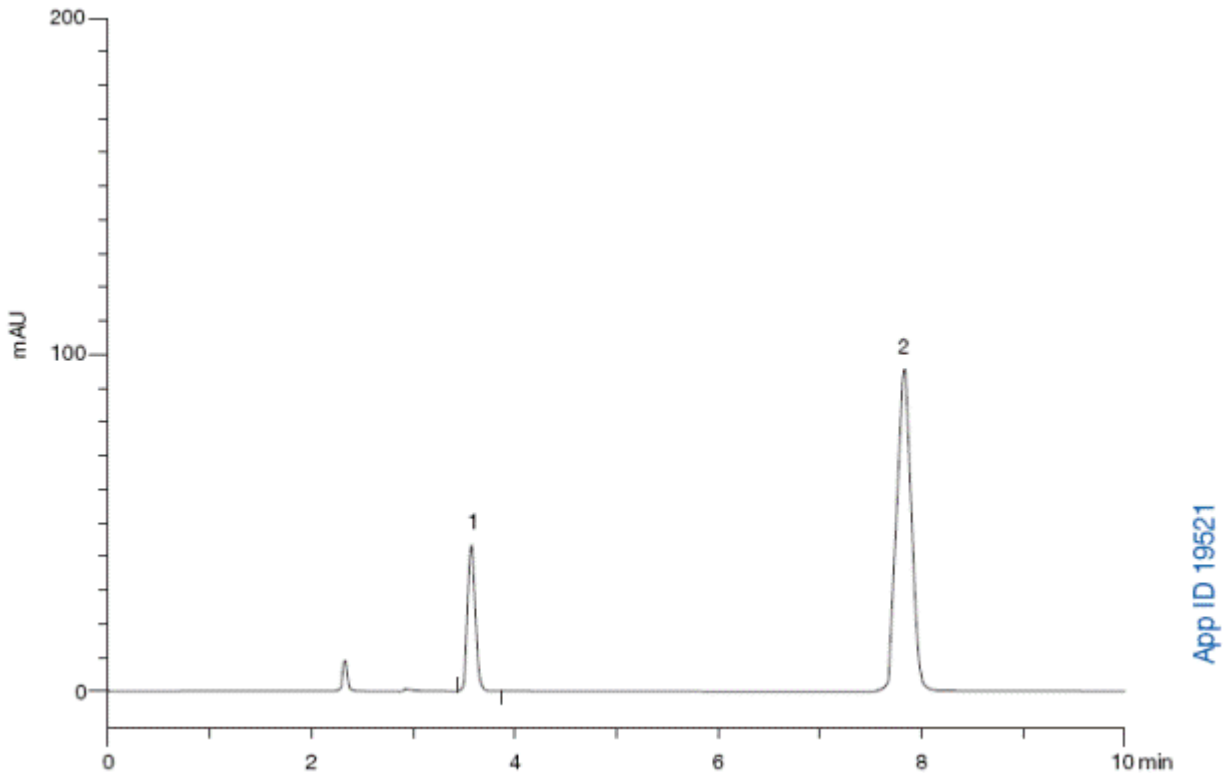
Estaría loco si no lo hiciera. Así que veamos algunos ejemplos, comenzando por el método

USP para propranolol.

El método USP para propranolol requiere de una columna L7 (C8), con diámetro de partículas de 5 µm y dimensiones 250 x 4,6 mm (**Figura 2**). Los requisitos de idoneidad del sistema indican una resolución no inferior a 2,0 entre propranolol y procainamida, y un factor de tailing de no más de 3,0. Las condiciones de la fase móvil están detalladas al pie de la **Figura 2**. En la **Figura 2** se muestra un cromatograma representativo siguiendo exactamente las condiciones de la USP, usando una **columna Luna 5 µm C8(2)**. El método cumple con todos los requisitos de idoneidad del sistema, y el tiempo de elución del último pico es de alrededor de 8 minutos.

Figura 2. Ensayo USP para propranolol usando una columna L7 250 x 4,6 mm.

Column: Luna 5 µm C8(2)
Dimensions: 250 x 4.6 mm
Part No.: 00G-4249-E0
Mobile Phase: 0.5 g SDS in 18 mL of 150 mM Phosphoric acid,
90 mL Acetonitrile, 90 mL Methanol diluted to 250 mL with water
Flow Rate: 1.5 mL/min
Temperature: 25 °C
Detection: UV @ 290 nm
Backpressure: 186 bar
Sample: 1. Procainamide
2. Propranolol



Entonces, ¿cómo podemos utilizar la tecnología core-shell para mejorar este método dentro de las guías aceptables del capítulo <621> de la USP?

Bueno, para métodos isocráticos, si queremos reducir los tiempos de análisis, una manera es simplemente usando una columna más corta. En condiciones isocráticas, el tiempo de retención es directamente proporcional a la longitud de la columna, si mantenemos iguales todos los demás factores. Por lo tanto, si reducimos la longitud de la columna a la mitad, deberíamos reducir el tiempo de análisis a la mitad. El problema es que, si reducimos la longitud de la columna, también reducimos nuestra eficacia, ya que también es directamente proporcional a la longitud de la columna. Y cuando reducimos eficacia,

perdemos resolución entre picos. Entonces, si deseamos reducir el tiempo de análisis sin sacrificar demasiado la resolución, podemos lograrlo usando una columna más corta empacada con rellenos mucho más eficientes. ¿Y cómo obtenemos rellenos más eficientes? Pasando a tamaños de partículas más pequeños y/o usando rellenos tecnología core-shell.

¿Pero cuánto tenemos PERMITIDO cambiar la longitud y tamaño de partícula de la columna?

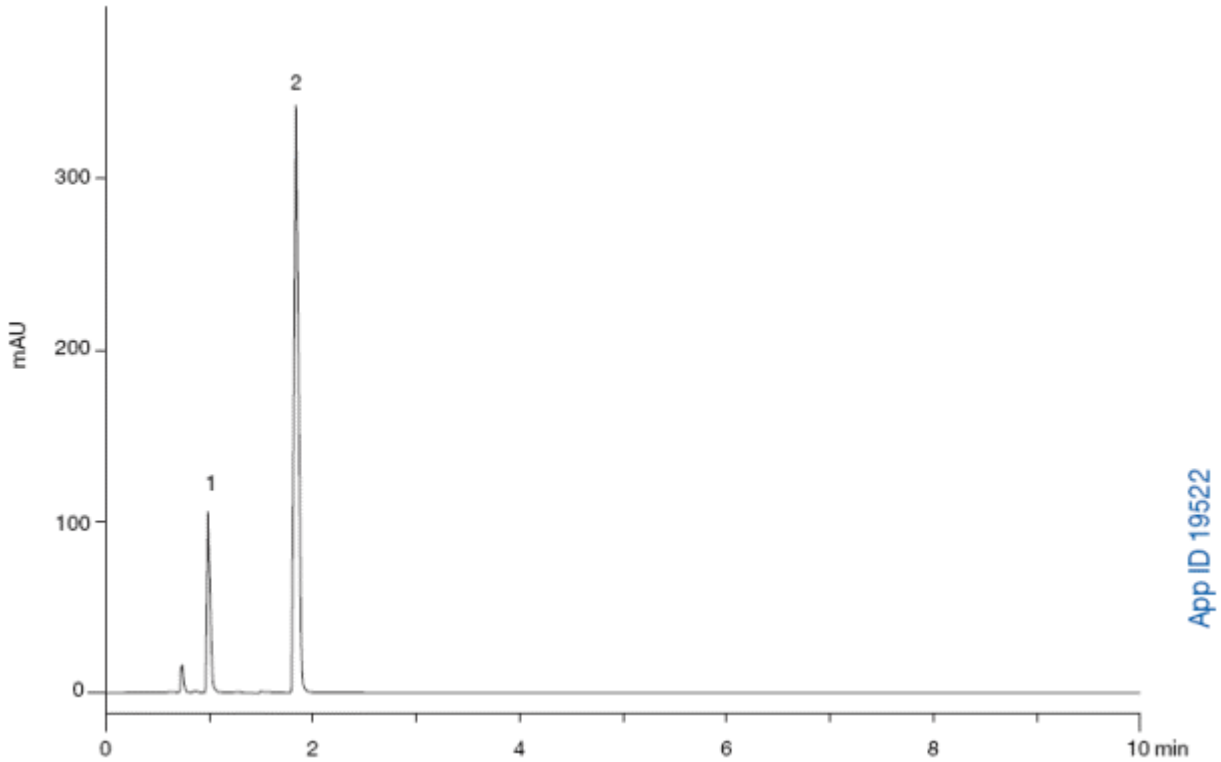
El capítulo <621> indica que los cambios en la longitud y tamaño de partícula de una columna se basan en una RELACIÓN entre longitud (L) diámetro de partículas (dp). Entonces, por ejemplo, una columna de 250 mm de largo empacada con relleno de 5 µm daría una relación L/dp de 50 000 ($250\,000\text{ um}/5\text{ um} = 50\,000$). El capítulo <621> indica que la relación L/dp para un método isocrático se puede ajustar en cualquier momento entre -25% y +50% del valor de relación inicial. Para nuestra columna de 5 µm 250 x 4,6 mm, el rango permitido de relación L/dp sería 37 500 - 75 000. Podemos hacer cualquier ajuste de longitud y tamaño de partícula siempre que la relación L/dp caiga dentro del rango permitido.

Entonces, vamos a usar una columna mucho más corta (100 x 4,6 mm) empacada con relleno core-shell de **2,6 µm Kinetex® C8**. La relación L/dp para esta columna es 38 462, que se encuentra dentro de nuestros valores de rango de L/dp ajustables. Cuando empleamos esa columna usando las mismas condiciones exactas que el método original, el cromatograma resultante se muestra en la **Figura 3**. Usando esta nueva columna, el

tiempo de retención para nuestro último pico se redujo de 8 minutos a 2 minutos, cuatro veces menos. Debido a la eficacia del relleno core-shell de la Kinetex, podemos mantener una resolución excelente ($R_s = 14,5$) incluso con esa columna más corta, y también cumplir fácilmente con los requisitos de idoneidad de nuestro sistema. Lo mejor de todo, logramos aumentar cuatro veces la productividad de la muestra simplemente cambiando nuestra columna de la original de 250 x 4,6 mm 5 μ m totalmente porosa a la Kinetex core-shell 100 x 4,6 mm, y sin necesidad de revalidación.

Figura 3. Ensayo USP modificado para propranolol usando una columna Kinetex 2,6 μ m C8 100 x 4,6 mm.

Column: Kinetex 2.6 μ m C8
Dimensions: 100 x 4.6 mm
Part No.: 00D-4497-E0
Mobile Phase: 0.5 g SDS in 18 mL of 150 mM Phosphoric acid,
90 mL Acetonitrile, 90 mL Methanol diluted to 250 mL with water
Flow Rate: 1.5 mL/min
Temperature: 25 °C
Detection: UV @ 290 nm
Backpressure: 348 bar
Sample: 1. Procainamide
2. Propranolol



Y ahí tenemos un ejemplo de cómo usando la tecnología core-shell podemos hacer que un método de control de calidad sea divertido y productivo. Este fue un ejemplo muy básico en el que simplemente cambiamos la longitud y el diámetro de partículas de la columna para un método de análisis de fármacos de rutina. En mi próximo artículo, veremos cómo aplicar estos mismos principios a un método más complejo de caracterización de impurezas.

¡A volver al laboratorio!

Haga clic aquí para más artículos en español:

<https://phenomenex.blog/category/global/spanish-translated-articles/>

Share with friends and coworkers:

- Click to email this to a friend (Opens in new window)
- Click to share on Twitter (Opens in new window)
- Click to share on Facebook (Opens in new window)
- Click to share on Pinterest (Opens in new window)
- Click to share on LinkedIn (Opens in new window)
- Click to share on Tumblr (Opens in new window)
- Click to share on Reddit (Opens in new window)