

■ S. Cavalli, S. Travaini

Più produttività con l'Hplc Dual-Gradient Summit

L'uso del riequilibrio off-line della colonna e della logica di completamento automatico dell'analisi per incrementare la produttività senza alterare i metodi analitici validati.

Gli esperti di cromatografia hanno sviluppato numerose strategie per aumentare la produttività analitica in Hplc. La migliorata tecnologia delle colonne, l'uso di colonne più corte impaccate con particelle di silice più piccole o elevate temperature possono, per esempio, aumentare l'efficienza di separazione e produrre eluizioni più rapide. Ma apportano cambiamenti fondamentali nella metodologia. E lo sforzo richiesto per sviluppare e convalidare un nuovo metodo e creare documentazione riveduta (SOP, ecc.) spesso non controbilancia il beneficio apportato da una migliorata efficienza. Nello sviluppare i suoi più recenti moduli Hplc, Dionex ha prestato attenzione nel fornire una maggiore produttività senza cambi nella tecnologia. Per esempio, una nuova pompa a doppio gradiente è stata utilizzata in combinazione con un sistema di commutazione avanzato di colonne e documentazione automatizzata della colonna. Configurazione utilizzata per eseguire un metodo analitico sia in gradiente standard sia in parallelo con un metodo di riequilibrio della

colonna usando percorsi di flusso alternati. In aggiunta all'uso di percorsi alternati, la maggiore produttività è stata ottenuta grazie a nuove routine del software utili per determinare il completamento con successo dell'analisi e terminare anticipatamente la stessa.

RIDURRE I TEMPI DI ANALISI

Accorciare i tempi dell'analisi Hplc aumenta la produttività di un sistema e abbassa i costi per analisi. Negli anni recenti i ricercatori hanno sviluppato numerose strategie per accelerare le analisi in Hplc. Le strategie più ampiamente discusse sono l'uso di colonne più corte impaccate con materiale di impiccamento costituiti da particelle più piccole; colonne

monolitiche in combinazione con flussi più elevati; temperature più alte. Sfortunatamente queste strategie hanno uno svantaggio comune: richiedono il nuovo sviluppo di metodi esistenti. In un ambiente regolamentato questo significa anche la riconvalida di metodi, la revisione della documentazione corrispondente e il riaddestramento degli utilizzatori. Il carico di lavoro collegato a tali compiti è spesso superiore ai benefici e ciò ostacola la sua implementazione. È quindi preferibile una strategia che lasci intatte le variabili chiave del metodo. Ecco una strategia che permette di accorciare tempi di analisi fino al 70%: i parametri fondamentali del metodo, come la colonna, gli eluenti, la pendenza del gradiente, la temperatura e la lunghezza d'onda

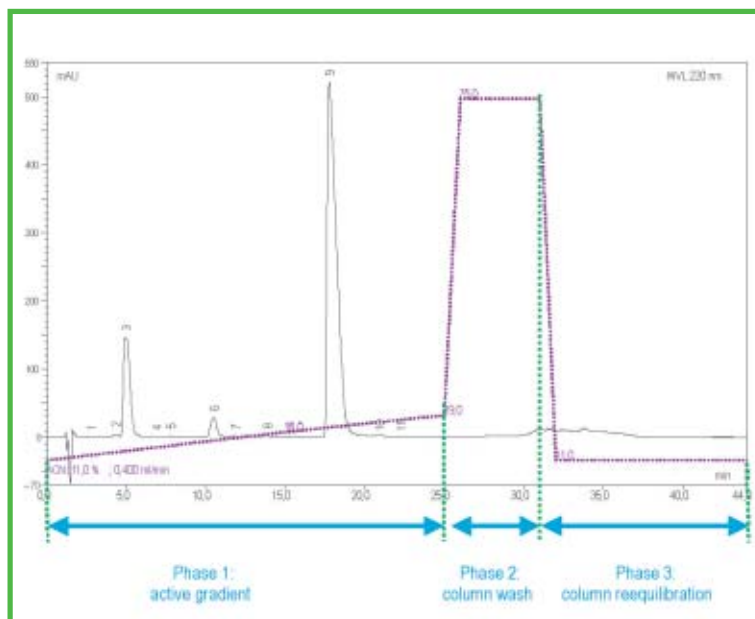


Figura 1. Una tipica analisi in gradiente può essere divisa in tre fasi. Solo la prima fase serve per la separazione e l'eluizione del campione.

del rivelatore, rimangono inalterati. Analisi più corte sono ottenute con l'uso di una operatività in tandem con doppia colonna, che prevede il ricondizionamento della colonna off-line. Questo processo viene realizzato in combinazione con algoritmi innovativi del software per il controllo del sistema e il termine anticipato, campione-specifico, dell'analisi. Il sistema considerato è progettato per applicazioni standard Hplc e tecniche cromatografiche avanzate. L'operatività in tandem è completamente supportata dal sistema.

IN TANDEM PER TEMPI ANALITICI INFERIORI

L'operatività con doppia colonna in tandem e rigenerazione off-line della colonna è una tecnica cromatografia che può accorciare significativamente i tempi analitici. Aggiungendo solo pochi componenti hardware, che

aumentano il costo di un sistema Hplc di meno del 20%, gli utilizzatori possono disporre di una tecnica che accorcia i tempi di analisi fino al 40%, con un contemporaneo aumento della produttività vicino al 70%. Per capire come funziona questa operatività con due colonne in tandem, esaminiamo una tipica corsa in gradiente. La figura 1 mostra un campione proveniente da un'analisi di controllo qualità farmaceutico. Il metodo analitico eluisce gli analiti con un gradiente da 0 a 25 min, poi aumenta il %B per lavare la colonna e alla fine ripristina il %B alle condizioni iniziali per riequilibrare la colonna. Possiamo quindi dividere il ciclo analitico in tre fasi: fase attiva del gradiente; fase di lavaggio della colonna; fase di riequilibrio della colonna.

Se esaminiamo più da vicino queste tre fasi possiamo osservare che il nostro sistema separa gli analiti e raccoglie tutti i dati di una qualche rilevanza durante la fase 1. Le fasi 2 e 3 sono richieste solo per il ricondizionamento della colonna e non forniscono alcuna informazione rilevante riguardo il nostro campione. Perciò solo la fase 1 è produttiva. Possiamo eliminare le fasi 2 e 3 dal ciclo analitico e aumentare la produttività del nostro sistema? Sì. Infatti possiamo ricondizionare la colonna off-line e iniettare il campione successivo su una seconda colonna. Questo modo operativo viene definito operatività con doppia colonna in tandem con

ricondizionamento della colonna off-line o semplicemente operatività in tandem. Modalità che richiede una configurazione strumentale come quella mostrata in figura 2.

Paragonata a un sistema Hplc standard, questa configurazione comprende una seconda pompa, una valvola di commutazione della colonna e una seconda colonna. Con questi moduli la configurazione fornisce due percorsi indipendenti del flusso uno per l'analisi (blu) e uno per il ricondizionamento della colonna (rosso). Le due colonne sono commutate tra i due percorsi del flusso e questa impostazione permette di massimizzare la produttività dei componenti principali del sistema (pompa a gradiente, autocampionatore e rivelatore) eliminando il tempo che questi componenti rimangono in attesa durante il ricondizionamento della colonna.

Torniamo al nostro esempio di applicazione per vedere come si possano analizzare i campioni con operatività in tandem. La figura 3 A mostra lo stesso campione di un controllo qualità farmaceutico che è mostrato in figura 1, questa volta con l'asse y leggermente contratto per un migliore paragone con la figura sottostante. La durata dell'analisi in questo esempio è di 44 min senza operatività in tandem. La figura 3 B mostra lo stesso campione processato con l'operatività in tandem. L'acquisizione dei dati è fermata dopo la parte attiva del gradiente (25 min) poi si imposta il %B per ritornare alle condizioni iniziali (11%) e si lava l'eluento residuo dai tubi tra la pompa e la valvola di commutazione. Dopo un minuto si commuta la valvola e si inietta il campione successivo nella seconda colonna che è stata equilibrata con la pompa di ricondizionamento. Usando questa tecnica possiamo ridurre il tempo analitico a 26 min. Abbiamo perciò accorciato il tempo analitico di 18 min (44-26 min) o del 41% fatto che aumenta la produttività del nostro sistema del 69%. Per sistemi relativamente costosi, come potrebbe essere un sistema LC/MS, l'operatività in tandem ha più senso che per sistemi economici. Aggiungendo componenti di costo relativamente basso è possibile aumentare la produttività e il ritorno dell'investimento del sistema MS in maniera significativa.

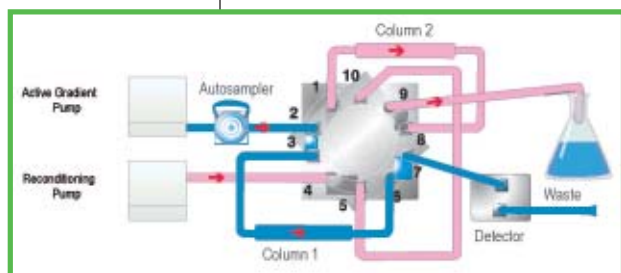


Figura 2. Configurazione del sistema per l'operatività con doppia colonna in tandem e ricondizionamento della colonna off-line.

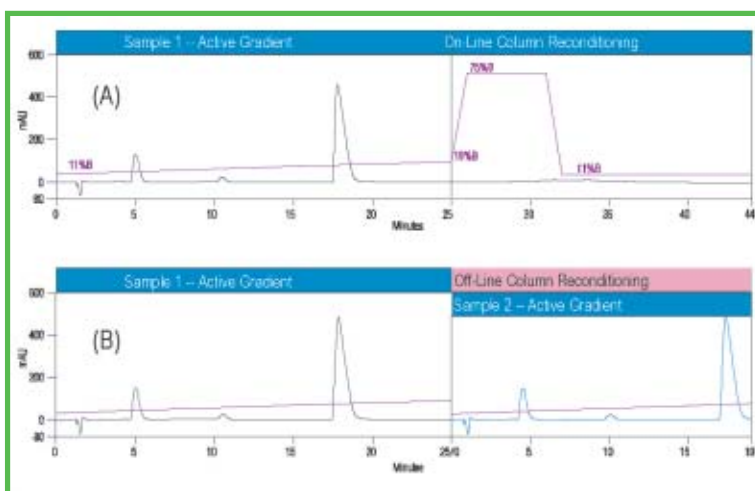


Figura 3. (A) Analisi con sistema Hplc standard; (B) Analisi con sistema Hplc equipaggiato per l'operatività con doppia colonna in tandem e ricondizionamento della colonna off-line.

PREPARAZIONE DEL SISTEMA HPLC

Come mostrato in figura 2 l'operatività in tandem richiede una seconda pompa Hplc, 1 o 2 valvole di commutazione e una seconda colonna. Richiede anche un sistema di gestione dei dati cromatografici in grado di controllare tutti i componenti e di documentare il processo. La seconda pompa può essere isocratica con una valvola aggiuntiva di selezione del solvente o a gradiente.

Saranno necessarie almeno due miscele eluenti, la prima per il lavaggio della colonna e la seconda per ricondizionare la colonna alle condizioni iniziali. Una pompa isocratica con un selettore di solvente lavora egregiamente nella maggior parte dei casi, ma ha anche significative limitazioni: si può commutare solo tra il 100% dell'eluente di lavaggio e il 100% dell'eluente di riequilibrio.

Una pompa a gradiente permette una maggiore flessibilità e un cambio graduale dell'eluente. Prima di acquistare una pompa a gradiente bisogna però assicurarsi che il sistema di gestione dei dati cromatografici possa controllare due gradienti in parallelo (e la maggior parte non lo permette). Per commutare tra due percorsi del flusso la più adatta è una valvola ad alta pressione a 10 porte con 2 posizioni. La seconda colonna deve essere di dimensioni e materiale di impiccamento identici alla prima colonna, idealmente entrambe le colonne dovrebbero essere impaccate a partire dallo stesso lotto di materiale. In ogni caso si può valutare la precisione dei criteri chiave di prestazione della colonna iniettando lo stesso campione alternativamente sulle due colonne. Solo dopo aver provato che entrambe le colonne si comportano in maniera uguale è giustificabile basare una calibrazione degli standard su entrambe le colonne. Idealmente il sistema di gestione dati può fornire test automatizzati di adeguatezza del sistema che possono aiutare per questo scopo.

IL SISTEMA HPLC DUAL-GRADIENT SUMMIT

Il sistema Hplc Dual-Gradient Summit è progettato per tutte le applicazioni standard Hplc e le tecniche cromatografiche avanzate (come l'opera-



Figura 4. Sistema Summit Dual-Gradient Hplc.

mano, controllo completo di tutti i componenti mediante software, singola interfaccia grafica per l'utente per un'operatività più facile, connessioni idrauliche ottimizzate per il minimo ritardo del gradiente, minima dispersione e massime prestazioni. Logica Automated Run Completion (ARC™) per tempi analitici ancora più corti.

La figura 4 mostra un sistema Hplc Dual-Gradient Summit pronto per l'operatività in tandem. La pompa Dual-Gradient P680 comprende due pompe a gradiente ternario a bassa pressione in singolo contenitore, con la possibilità di alimentare il gradiente attivo e il flusso di ricondizionamento. La pompa aggiuntiva non

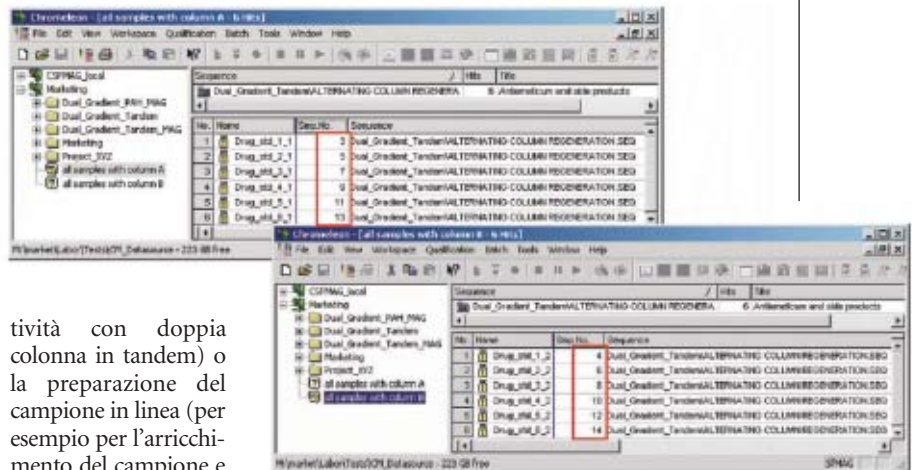


Figura 5. Il software Chromeleon tiene traccia di quale colonna sia stata usata per analizzare un campione. Questo controllo è possibile grazie al sistema di identificazione della colonna del TCC-100.

tività con doppia colonna in tandem) o la preparazione del campione in linea (per esempio per l'arricchimento del campione e l'eliminazione della matrice). Il sistema è anche adatto per la cromatografia bidimensionale (2D).

Il sistema Dual-Gradient (figura 4) comprende la pompa Dual-Gradient Hplc (P680 DGP), dove nella definizione pompa sono comprese, in un singolo contenitore, due pompe a gradiente ternario, un cestello per i solventi con degassaggio in linea incorporato a sei canali (SOR-100), un autocampionatore ASI 100 con termostatazione per campione opzionale, un compartimento colonne con valvola di commutazione incorporata (TCC-100) e una scelta completa di rivelatori, incluso un rivelatore MS a singolo quadrupolo. Numerosi sono i benefici apportati dall'operatività in tandem: maggiore produttività (tipicamente 50-70%), senza aumentare lo spazio necessario sul banco, funzionamento come soluzione chiavi in

richiede perciò né spazio sul banco né porta a un aumento dell'altezza del sistema. Il compartimento colonne incorpora una valvola di commutazione con dieci porte e due posizioni. Poiché la valvola si trova all'interno del compartimento anch'essa è completamente termostata. Il compartimento colonne è anche dotato di un sistema di identificazione della colonna, che permette al software di mantenere traccia di quale colonna sia stata usata per un determinato campione.

Il software Chromeleon® è il solo punto di controllo del sistema completo e mantiene traccia di tutte le informazioni significative nel suo audit trail. Non condivide le limitazioni di altri software nel controllare due pompe a gradiente indipendenti e identifica facilmente su quale colonna è in corso l'analisi di uno specifico campione. La funzione di query nel browser del software crea rapidamente una lista di campioni eseguiti per ciascuna colonna, vedi figura 5. I pannelli personalizzabili di controllo degli strumenti caratteristici di questo software, di cui un esempio è mostrato in figura 6, rendono facile operare il sistema da una singola schermata. La visualizzazione grafica dei componenti del sistema aiutano gli utenti meno esperti a familiarizzare con lo stesso.

GARANTIRE L'ADEGUATEZZA DEL SISTEMA

Il sistema Dual-Gradient Summit arriva con le routine controllate automaticamente dal software di Installation Qualification (IQ), Operational Qualification (OQ) e Performance Qualification (PQ). Inoltre il software Chromeleon fornisce test automatizzati di adeguatezza del sistema (system suitability). Usa questi test per controllare la precisione dei tempi di ritenzione e dell'area degli standard e definisce limiti per asimmetria del picco, efficienza di separazione o qualsiasi altra variabile legata alle prestazioni. Chromeleon poi monitorizza entrambe le colonne rispetto a questi limiti e si assicura che il sistema

rimanga adeguato per le analisi. La precisione dei tempi di ritenzione e delle aree dei picchi tra due colonne dipende principalmente dalla riproducibilità da colonna a colonna. Fortunatamente in questi ultimi anni i produttori di colonne hanno compiuto significativi progressi al riguardo, cosicché la riproducibilità da colonna a colonna non è più un problema. La figura 7 mostra il paragone tra iniezioni di standard in modalità convenzionale e modalità tandem. La precisione del tempo di ritenzione e dell'area differisce solo leggermente tra le due modalità. È giustificabile perciò calcolare la calibrazione sulla

base di standard eseguiti su entrambe le colonne.

LOGICA AUTOMATED RUN COMPLETION (ARC)

Il software di controllo Chromeleon per il sistema Dual-Gradient usa normalmente uno schema fisso di alternanza. Alla fine del gradiente attivo, la pompa si resetta alla composizione di partenza, fluisce le linee dell'eluente, l'autocampionatore prepara il campione successivo, la valvola si commuta sulla colonna successiva e parte l'analisi seguente. L'analisi finisce a un tempo fisso determinato dalla fine del

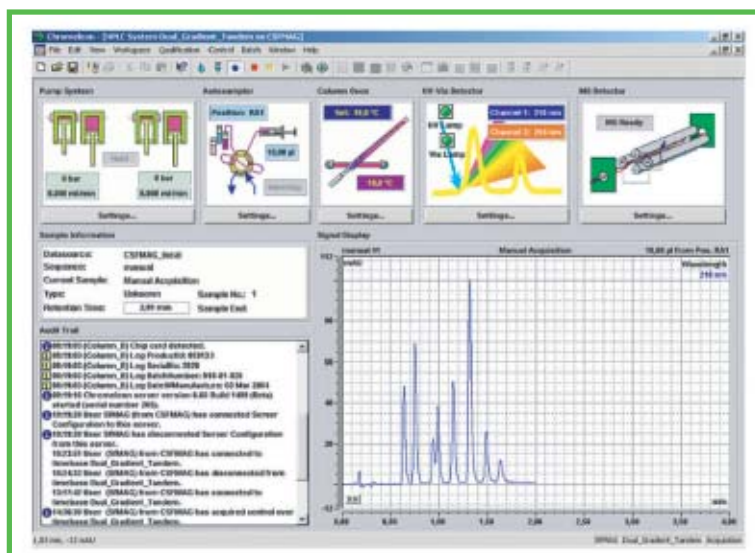


Figura 6. Pannello di controllo strumentale di Chromeleon per il sistema Summit Dual-Gradient.

Tutti componenti sono controllati all'interno di una singola schermata compresa la seconda pompa e tutte le valvole.

gradiente attivo. Con il termine dell'analisi determinato dal tempo, può rimanere un tempo di attesa non necessario dopo che è stato eluito l'ultimo picco che interessa.

Una strategia per avere un termine dell'analisi più flessibile utilizza la funzione 'trigger' di Chromeleon. I trigger permettono la definizione di comandi, che sono eseguiti solo se una condizione definita dall'utente diventa vera. I trigger possono essere usati per la rivelazione in tempo reale dei picchi e la conclusione automatica dell'analisi. Questa caratteristica viene definita logica Automated Run Completion (ARC). La logica ARC può fermare un'analisi appena dopo l'ultimo picco. Questo approccio accorcia i tempi analitici di un altro 10-30% in paragone al tempo finale fisso delle vostre analisi.

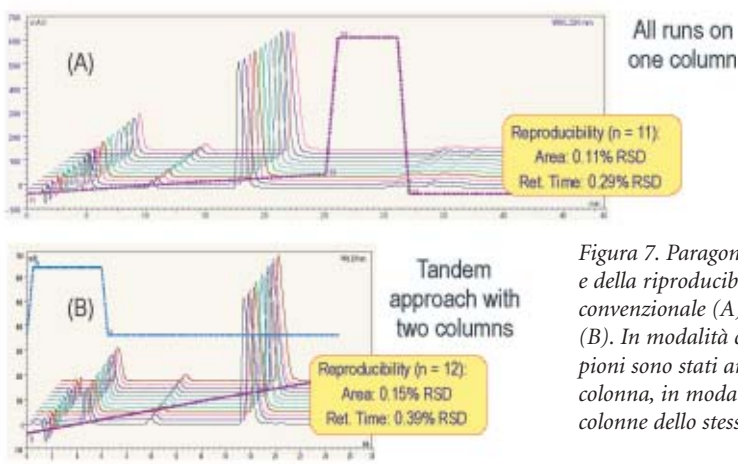


Figura 7. Paragone dei tempi di ritenzione e della riproducibilità dell'area in modalità convenzionale (A) e in modalità in tandem (B). In modalità convenzionale tutti i campioni sono stati analizzati su una singola colonna, in modalità in tandem con due colonne dello stesso tipo.