

Calificación de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A utilizado en la industria biotecnológica

Qualification of an Agilent Technologies 7890A gas chromatograph used in the biotechnology industry

Ing. Alberto Álvarez González, MSc. Yanet Támbara Hernández, MSc. Félix Álvarez Gil, Dr.C. Vladimir A. Besada Pérez, Dr.C. Luis Javier González López

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la producción de medicamentos se rige por estrictas normas internacionales que garantizan la reproducibilidad y consistencia de los resultados obtenidos. La calificación de los instrumentos utilizados en los procesos productivos, así como en la caracterización de los productos y su control de calidad, constituye un requisito previo a la validación de cualquier técnica analítica que haga uso de estos. Una de las técnicas instrumentales utilizada en la industria biotecnológica es la cromatografía de gases.

Objetivo: desarrollar y ejecutar un protocolo que permita la calificación de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A.

Métodos: se empleó un patrón de cafeína pura para análisis y se utilizó una columna HP-5 de 30 m × 0,32 mm d.i. y 0,33 μm espesor de película, en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama. Los diferentes módulos involucrados en el análisis (inyector, columna, horno y detector) se evaluaron a través de un diseño experimental que calcula varios parámetros.

Resultados: se obtuvieron pruebas documentadas que demuestran que cada uno de los parámetros estudiados (linealidad del inyector, precisión del inyector, arrastre del inyector, precisión del flujo, exactitud del flujo, linealidad del detector, exactitud del detector, ruido del detector, deriva del detector) cumple con los criterios de aceptación establecidos.

Conclusiones: el protocolo desarrollado permite la calificación de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A y puede ser extrapolado a otros modelos.

Palabras clave: calificación, cromatógrafo de gases, análisis instrumental, Agilent Technologies 7890A.

ABSTRACT

Introduction: the drug manufacture is governed by strict international standards that guarantee reproducibility and consistency of results. The qualification of the instruments used in the productive processes, as well as in the characterization of products and their quality control are prerequisites to the validation of any analytical technique using them. One of the instrumental techniques used in the biotechnical industry is Gas Chromatography.

Objective: to develop and to perform a protocol that allows the qualification of an Agilent Technologies 7890A Gas Chromatograph.

Methods: a standard of pure caffeine was used for analysis in addition to a HP-5 30 m × 0,32 mm d.i. and 0,33 µm thick film column was used in a Gas Chromatograph coupled with a Flame Ionization Detector. For the testing of the different modules involved in the analysis (injector, column, oven and detector), an experimental design was made to estimate several parameters.

Results: the obtained documented tests proved that each of the studied parameters (injector linearity, injector precision, injector dragging, flow precision, flow accuracy, detector linearity, detector accuracy, detector noise and detector drift) met the set acceptance criteria.

Conclusions: the final protocol allows the qualification of an Agilent Technologies 7890A Gas Chromatograph and it can be extrapolated to other models.

Keywords: qualification, Gas Chromatograph, instrumental analysis, Agilent Technologies 7890A.

INTRODUCCIÓN

En la Industria Biotecnológica es obligatorio el cumplimiento de las buenas prácticas (BP), lo cual asegura la consistencia de las especificaciones de calidad de las producciones. Las BP se insertan en todo el proceso de obtención, desarrollo y comercialización de un producto o medicamento. Tanto ellas como las normas ISO 9000 o las ISO 17025, para los laboratorios de ensayo, exigen que los equipos empleados dentro de un proceso productivo o analítico estén calificados. Este es un requisito indispensable para la validación de las técnicas analíticas que hacen uso de estos.

La cromatografía de gases constituye una poderosa herramienta en este tipo de industria, dentro del análisis instrumental, con numerosas aplicaciones entre las que se encuentran: el análisis de pureza de disolventes; el seguimiento de metabolitos en fermentaciones; la cuantificación de uno o más componentes dentro de una mezcla, la cuantificación de residuales volátiles. Los cromatógrafos de gases no se califican a través de filtros u otros elementos mecánicos. Los órganos de verificación y acreditación no realizan esta actividad como parte de sus protocolos

generales de calificación de instrumentos de medición. Por ello, de manera bastante generalizada la calificación de estos equipos la llevan a cabo los propios usuarios.¹⁻³

En la calificación de un equipo se exigen tres aspectos fundamentales: la calificación de la instalación, de la operación y de desempeño, en este orden.⁴⁻⁹ Cada una de ellas es requisito previo a la siguiente y en todas se exige la verificación documentada de las acciones realizadas. La calificación de la instalación (CI) debe mostrar que el equipamiento está instalado y cumple con el diseño aprobado, las recomendaciones del productor y/o los requerimientos de uso. La calificación de la operación (CO), por su parte, debe indicar que tanto el equipamiento como los sistemas auxiliares se comportan de la forma esperada dentro de los límites y tolerancias previstos por sus suministradores y conforme a las especificaciones de diseño del productor. Por último, la calificación de desempeño (CD) debe demostrar que el equipamiento opera de manera efectiva y reproducible dentro de especificaciones y parámetros definidos.

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollar y ejecutar un protocolo que permitiera, de forma semejante a como se realiza internacionalmente, realizar la calificación de desempeño de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A.

MÉTODOS

La calificación de desempeño se realiza utilizando un compuesto puro con buenas condiciones cromatográficas, o sea, que tenga un tiempo de retención relativamente corto y que sea barato para que no se encarezca demasiado el procedimiento. Por ello, en este trabajo, se empleó un patrón de cafeína pura para análisis (99,5 %, Sigma, Código de Producto C0750) y se utilizó una columna HP-5 de 30 m × 0,32 mm d.i. y 0,33 μm espesor de película, en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama. Se prepararon disoluciones de cafeína en metanol (puro para análisis) a seis concentraciones: 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200 y 1 mg/mL.

La calificación de los cromatógrafos de gases pone a prueba los diferentes módulos que se encuentran involucrados en el análisis; los cuales son: el puerto donde se inyectan las muestras (inyector), la columna, el horno y el detector; en este caso particular un detector de ionización de llama (FID; por sus siglas en inglés). Los mismos fueron evaluados a través de un diseño experimental que calcula varios parámetros:⁹ la exactitud del flujo (EF); la linealidad del inyector (LI); la precisión del inyector (PI); la precisión del flujo (PF); el arrastre del inyector (AI), o sea, cuanto pudiera aportar una inyección previa a una medición posterior; la Linealidad del detector (LD) y la exactitud del detector (ED). Además el ruido del detector (RD) y la deriva del detector (DD). En la tabla 1 se muestran los volúmenes de inyección y la concentración de la disolución de cafeína utilizada para cada inyección.

El procesamiento estadístico fue realizado utilizando el programa Excel, este brinda todas las opciones estadísticas necesarias. Las condiciones instrumentales utilizadas se muestran en el cuadro.

Tabla 1. Volúmenes de inyección y concentraciones de las disoluciones de cafeína utilizadas para la evaluación de los diferentes parámetros cromatográficos

No. inyección	Volumen inyectado [μL]	Concentración de disolución de cafeína
1	0,2	0,050 mg/mL
2	0,2	0,050 mg/mL
3	0,2	0,050 mg/mL
4	1	0,050 mg/mL
5	1	0,050 mg/mL
6	1	0,050 mg/mL
7	1	0,050 mg/mL
8	1	0,050 mg/mL
9	1	0,050 mg/mL
10	2	0,050 mg/mL
11	2	0,050 mg/mL
12	2	0,050 mg/mL
13	3	0,050 mg/mL
14	3	0,050 mg/mL
15	3	0,050 mg/mL
16	4	0,050 mg/mL
17	4	0,050 mg/mL
18	4	0,050 mg/mL
19	1	1 mg/mL
20	1	Metanol puro
21	1	0,010 mg/mL
22	1	0,010 mg/mL
23	1	0,010 mg/mL
24	1	0,025 mg/mL
25	1	0,025 mg/mL
26	1	0,025 mg/mL
27	1	0,050 mg/mL
28	1	0,050 mg/mL
29	1	0,050 mg/mL
30	1	0,100 mg/mL
31	1	0,100 mg/mL
32	1	0,100 mg/mL
33	1	0,200 mg/mL
34	1	0,200 mg/mL
35	1	0,200 mg/mL
36	0	-

Cuadro. Condiciones instrumentales utilizadas para la calificación del desempeño del cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A

Cromatógrafo de gases	Agilent Technologies 7890A
Columna	J&W; HP-5 (5 % metil-siloxano)
Dimensiones	30m x 0,32 mm d.i, 0,33 µm espesor de película
Temperatura de la columna	Inicial: 180°C; final: 280°C; rampa de temperatura del horno: 8°C/min
Velocidad de flujo del gas portador (hidrógeno)	1 mL/min
Duración del análisis	12,5 min
Inyector	Split/splitless (con/sin división), split 1:2
Temperatura del inyector	250 °C
Detector	Ionización de llama (FID)
Temperatura del detector	280 °C
Velocidad de flujo del aire	350 mL/min (FID)
Velocidad de flujo del hidrógeno	35 mL/min (FID)
Procesamiento de datos	Agilent ChemStation Rev B.04.02 SP1 [208]

RESULTADOS

Linealidad del inyector (LI): a partir de los datos obtenidos de las inyecciones 1-18 (tabla 1) asumiendo que el área del pico cromatográfico es proporcional al volumen real inyectado, se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados tomando como variable independiente el volumen inyectado y como variable dependiente el área del pico cromatográfico de cafeína obtenido. Para cada volumen de inyección se tomó la media de las áreas obtenidas como valor a introducir en la regresión. El coeficiente de determinación (r^2) de esta recta se utilizó como criterio en la evaluación de los resultados. Se realizaron cinco inyecciones del volumen 1 µL, esto se debe a que este es el volumen más utilizado en el trabajo diario y, por lo tanto, el que más debe ser estudiado. El criterio de aceptación de resultados fue: r^2 0,995 (Fig. 1).

Precisión del inyector (PI): a partir de los datos obtenidos de las inyecciones 4-9 (tabla 1), se evaluó la precisión del inyector mediante el cálculo del coeficiente de variación de las áreas de los picos cromatográficos de cafeína obtenidos para las 6 réplicas del volumen de inyección de 1 µL. El criterio de aceptación de resultados fue: PI % < 4%.

$$PI = \frac{SD}{Media} * 100$$

Arrastre del inyector (AI): a partir de los datos obtenidos de las inyecciones 1-20 (tabla 1), se evaluó el arrastre del inyector mediante el cálculo del porcentaje que representa el área de la cafeína obtenida en la inyección 21 (1 mL de metanol puro) sobre el área en la inyección anterior (1 µL disolución de cafeína a 1 µg/mL). El criterio de aceptación de resultados fue: AI % < 0,1.

$$AI = \frac{Área_{inyecc21}}{Área_{inyecc20}} * 100$$

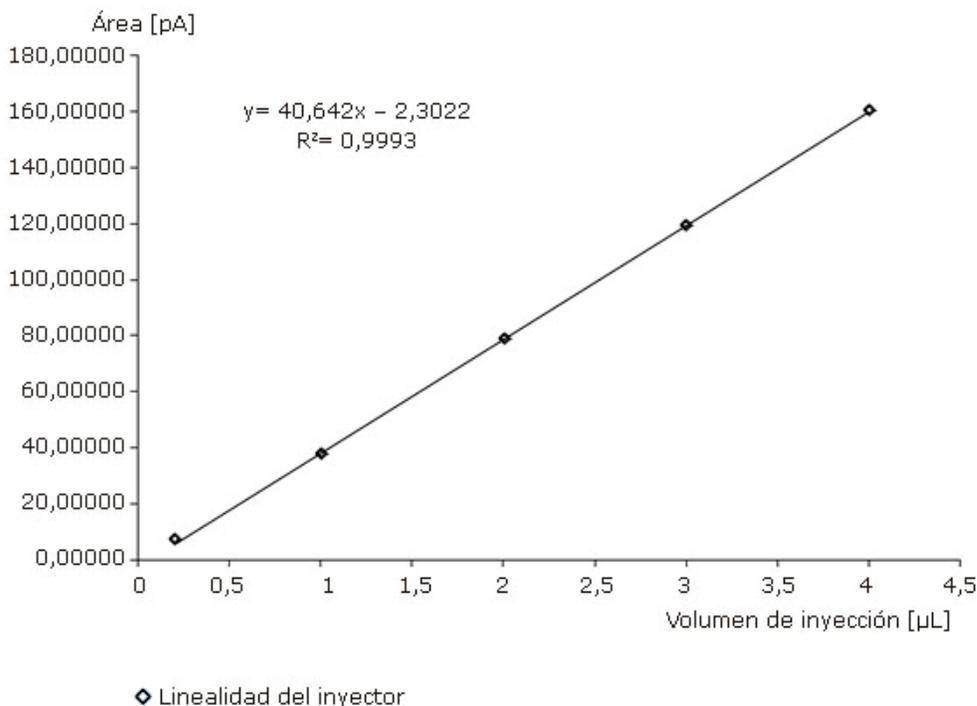


Fig. 1. Linealidad del inyector.

Precisión del flujo (PF): a partir de los datos obtenidos de las inyecciones 4-9 (tabla 1), se evaluó la precisión del flujo mediante el cálculo del coeficiente de variación de los tiempos de retención (T_r) de los picos cromatográficos de cafeína obtenidos para las 6 réplicas del volumen de inyección de 1 µL. El criterio de aceptación de resultados fue: PF % < 0,5.

$$PF = \frac{SD_{T_r}}{Media_{T_r}} * 100$$

Exactitud del flujo (EF): mediante el software, se fijó el flujo del gas portador a un valor que está dentro del rango 0-99,999 psi y se midió el flujo real con un flujómetro de burbuja a la salida de la columna. La exactitud del flujo se expresó como el error relativo que supone la relación entre el flujo medido con el flujómetro de burbuja (Agilent Technologies Certificado de Conformidad EN61010-1: 2010) y el designado mediante el software del equipo. El criterio de aceptación de resultados fue: EF > 95 %.

$$EF = \frac{f_{medido}}{f_{teclado}} * 100$$

Linealidad del detector (LD): a partir de los datos obtenidos en las inyecciones 21-35 (tabla 1), se inyectó el mismo volumen de concentraciones crecientes por triplicado. Se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados tomando como variable independiente la concentración de la disolución inyectada y como variable dependiente el área del pico cromatográfico de cafeína obtenido. El coeficiente de determinación (r^2) de esta recta se utilizó en la evaluación de resultados. El criterio de aceptación de resultados fue: $r^2 \geq 0,995$ (Fig. 2).

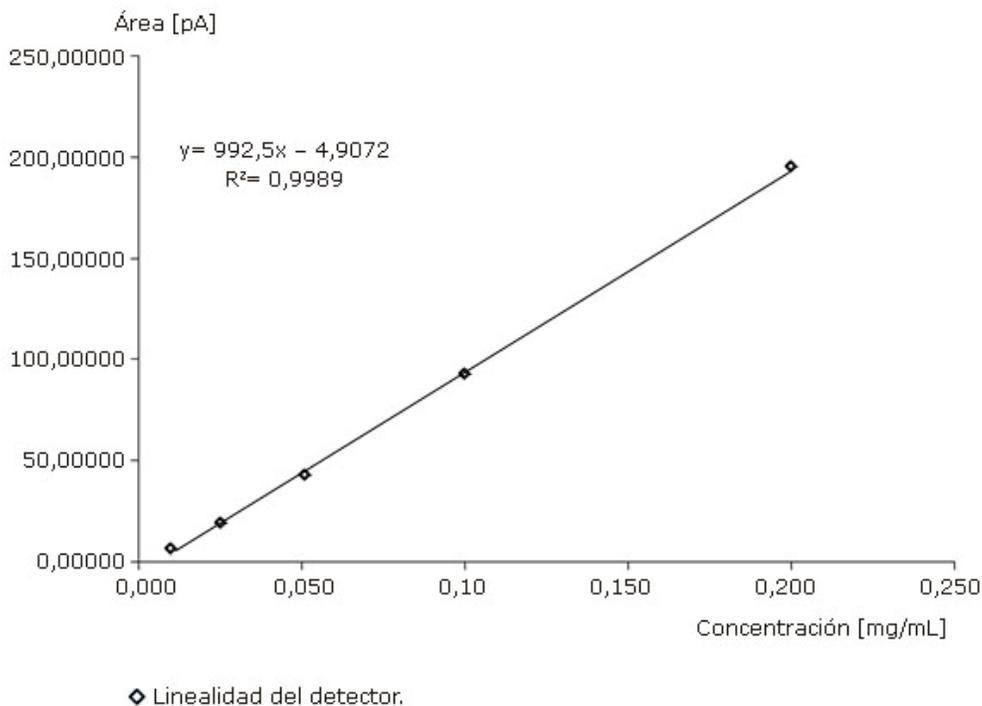


Fig. 2. Linealidad del detector.

Exactitud del detector (ED): a partir de los datos obtenidos para las seis inyecciones de la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ (inyecciones 4-9) (tabla 1), se evaluó la exactitud del detector mediante el cálculo del coeficiente de variación (DS/media, expresado en %) de las concentraciones calculadas para los picos cromatográficos de cafeína obtenidas a partir de la ecuación de la curva de calibración que se construye en el análisis de la Linealidad del inyector. El criterio de aceptación de resultados fue: $ED < 0,5$.

Ruido del detector (RD): en este caso, se mantuvo la temperatura final del horno durante 7,5 min, lo que permitió adquirir la señal durante 20 min en total. A partir de los datos obtenidos para la inyección 36 (tabla 1), se imprimió el cromatograma obtenido a una escala bastante ampliada para poder apreciar las fluctuaciones puntuales de la línea de base durante los 20 min monitoreados. Se dividió el cromatograma completo en 5 s de 4 min. Se trazaron, en cada uno de ellos, dos líneas paralelas que enmarcaban la anchura del ruido correspondiente. Se midió el valor en el punto medio de cada uno de los 5 segmentos y se determinó la media de los 5 valores (en unidades de respuesta, pA). El criterio de aceptación de resultados fue: $RD < 500$ pA (Fig. 3) (A).

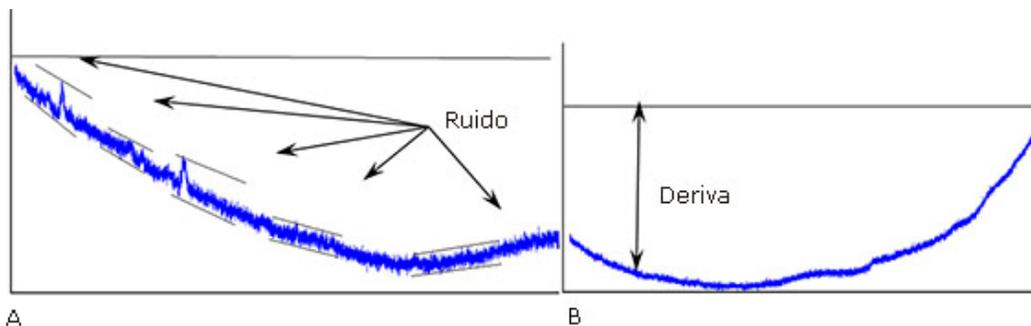


Fig. 3. Cálculo del ruido del detector (A) y la deriva (B).

Deriva del detector (DD): en este caso, se mantuvo la temperatura final del horno durante 7,5 min, lo que permitió adquirir la señal durante 20 min en total. A partir de los datos obtenidos para la inyección 36 (tabla 1), se imprimió el cromatograma resultante (blanco) a una escala bastante ampliada para poder apreciar toda la línea de base a lo largo de los 20 min monitorizados. Se midió la diferencia entre la respuesta media al final del cromatograma y al principio (en valores de respuesta, pA*s). Se calculó la magnitud correspondiente para expresar el valor por hora, es decir, se multiplicó por 3 el valor obtenido para 20 min del cromatograma. El criterio de aceptación de resultados fue: $|DD| < 1,000$ pA/h (Fig. 3) (B).

En la tabla 2, se resumen los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros estudiados y sus criterios de aceptación.

Tabla 2. Criterios de aceptación y resultados obtenidos en la calificación de desempeño del Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies 7890^a

No.	Pruebas	Criterio de aceptación	Resultados	Cumple/no cumple
1	Linealidad del inyector	LI > 0,995	LI = 0,9993	Cumple
2	Precisión del inyector	PI < 4 %	PI = 0,419 %	Cumple
3	Arrastre del inyector	AI < 0,1 %	AI = 0,092 %	Cumple
4	Precisión del flujo	PF ≤ 0,5 %	PF = 0,5 %	Cumple
5	Exactitud del flujo	EF > 95 %	EF = 100 %	Cumple
6	Linealidad del detector	LD > 0,995	LD = 0,9989	Cumple
7	Exactitud del detector	ED < 0,5 %	ED = 0,38 %	Cumple
8	Ruido del detector	RD < 500 pA	RD = 3,8 pA	Cumple
9	Deriva del detector	DD < 1000 pA/h	DD = 6,0 pA/h	Cumple

DISCUSIÓN

El desarrolló un protocolo cumple los requisitos establecidos internacionalmente para la Calificación de Desempeño de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A. Este protocolo puede ser generalizado fácilmente a otros modelos de cromatógrafos de gases.

Como puede apreciarse (tabla 2), todos los parámetros necesarios a evaluar cumplen con los criterios de aceptación establecidos para ello; por lo que se comprueba que todos los módulos del equipo cumplen con los estándares definidos por el fabricante y por estudios de intercomparación entre laboratorios para este modelo de instrumentos. Se determina que el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con el que se cuenta está calificado para brindar datos confiables en todos los protocolos de análisis en los cuales se utiliza.¹⁰⁻¹³

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Entidad Nacional Acreditadora de España (ENAC). LE485 y LE606. 2009.
2. Entidad Nacional Acreditadora de España (ENAC). G-ENAC-14. Ensayos de intercomparación. 2009.

3. Coombes P. Laboratory Systems Validation, Testing and Practice. USA: DHI Publishing, LTD, Raleigh; 2002.
4. Chan CC, Lam H, Lee YC, Chang XM. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Hoboken, USA: Wiley Interscience; 2004.
5. Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories Interpharm. Inform Healthcare. 2nd ed. New York: Laboratories Interpharm; 2007.
6. Huber L. Analytical Instrument Qualification and System Validation. Delaware, USA: Agilent Technologies; 2009.
7. United States Pharmacopeia Convention. Analytical Instrument Qualification. Chapter 1058. Rockville: Mack Printing; 2008.
8. Entidad Nacional Acreditadora de España (ENAC). G-ENAC-15. Directrices para el cumplimiento de las especificaciones. 2009.
9. Norma ICH Q2_R1 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Incorporated on 2005. [cited 2013 Aug 20]. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICHProducts/Guidelines/Products/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
10. USP 37 General Information/<1058> Analytical Instrument Qualification 1. [cited 2013 Aug 20]. Available from: <http://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1058.pdf>
11. Performance specification 9-Specifications and test procedures for gas chromatographic continuous emission monitoring systems in stationary sources. EPA, EE.UU., 2010. p. 1599-1602. [cited 2013 Aug 20]. Available from: <http://www.epa.gov/ttn/emc/perfspec/ps-9.pdf>
12. Analytical Instrument Qualification. Practical Approaches for USP General Chapter < 1058>. Compliance in the QC Laboratory. Berlin, Germany. 19-21 May 2014. [cited 2013 Aug 20]. Available from: http://www.gmp-compliance.org/daten/training/ECA_Analytical_Inst_Qual.pdf
13. Bansal SK, Layloff T, Bush ED, Hamilton M, Hankinson EA, Landy JS, et al. Qualification of analytical instruments for use in the pharmaceutical industry: A scientific approach. AAPS PharmSciTech. Mar 2004 [cited 2013 Aug 20];5(1):151-158. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784854/>

Recibido: 19 de julio de 2014.

Aprobado: 20 de agosto de 2014.

Alberto Álvarez González. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave. 31 e/158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. CP 10600, Apartado Postal 6162. Correo electrónico: alberto.alvarez@cigb.edu.cu