

FARMACOPEIA MERCOSUL: MÉTODO GERAL PARA CROMATOGRAFIA

TENDO EM VISTA: O Tratado de Assunção, o Protocolo de Ouro Preto e as Resoluções N° 31/11 e 22/14 do Grupo Mercado Comum.

CONSIDERANDO:

Que a Farmacopeia MERCOSUL tem como objetivo estabelecer requisitos mínimos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde, especialmente dos medicamentos, apoiando as ações de regulação sanitária e promovendo o desenvolvimento técnico, científico e tecnológico regional.

Que as especificações farmacopeicas estabelecem, por meio de monografias, requisitos mínimos para o controle de segurança e qualidade dos insumos, especialidades farmacêuticas, plantas medicinais e derivados produzidos ou utilizados nos Estados Partes.

Que as especificações farmacopeicas são utilizadas como parâmetro para as ações de vigilância sanitária, incluindo o registro de medicamentos, inspeções e análises laboratoriais.

Que a Farmacopeia MERCOSUL e a produção de padrões próprios de qualidade favorecem o desenvolvimento científico e tecnológico dos Estados Partes, contribuindo para a diminuição da dependência de fornecedores estrangeiros e promovendo a indústria regional.

Que a Farmacopeia MERCOSUL deve ser primordialmente sanitária, com foco na saúde pública, e apresentar uma metodologia analítica acessível aos Estados Partes, buscando seu reconhecimento e respeitabilidade internacional.

Que o diálogo regulatório e a integração entre os Estados Partes promovem o acesso da população a medicamentos com maior qualidade e segurança.

Que o Acordo N° 08/11 da Reunião de Ministros de Saúde do MERCOSUL constitui um marco de referência para a Farmacopeia MERCOSUL.

Que a Resolução GMC N 23/14 “Ajustes das condições cromatográficas no sistemas isocráticos da cromatografia líquida de alta eficiência” forma parte da presente resolução.

**O GRUPO MERCADO COMUM
RESOLVE:**

Art. 1° - Aprovar, no marco do estabelecido na Resolução GMC N° 22/14, a monografia “Farmacopeia MERCOSUL: Método Geral para Cromatografia”, que consta como Anexo e faz parte da presente Resolução.

Art. 2º - Os Estados Partes indicarão, no âmbito do SGT Nº 11, os organismos nacionais competentes para a implementação da presente Resolução.

Art. 3º - Esta Resolução deverá ser incorporada ao ordenamento jurídico dos Estados Partes antes de...

XLIII SGT Nº 11 – Brasília, 10/IV/15.

ANEXO

CROMATOGRAFIA

DEFINIÇÕES E INTERPRETAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Cromatograma: Um cromatograma é uma representação gráfica (ou outra) da resposta do detector à concentração de analito no efluente ou outra quantidade utilizada como uma medida de concentração no efluente em função do volume de efluente ou do tempo. Na cromatografia planar pode ser utilizado o termo cromatograma para se referir ao papel ou a camada com as zonas separadas.

A Figura 1 representa uma separação cromatográfica típica de duas substâncias, 1 e 2. t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção respectivos; e h é a altura, $h/2$ é a metade da altura, e $W_{h/2}$ é a largura à metade da altura, para o pico. W_1 e W_2 são as larguras dos picos 1 e 2, respectivamente, na linha de base. Os picos de ar são uma característica dos cromatogramas a gás e correspondem à frente da fase móvel na cromatografia a líquido. O tempo de retenção destes picos de ar ou componentes não retidos é denominado t_M . (NOTA: empregar as mesmas unidades de medida nas diferentes determinações).

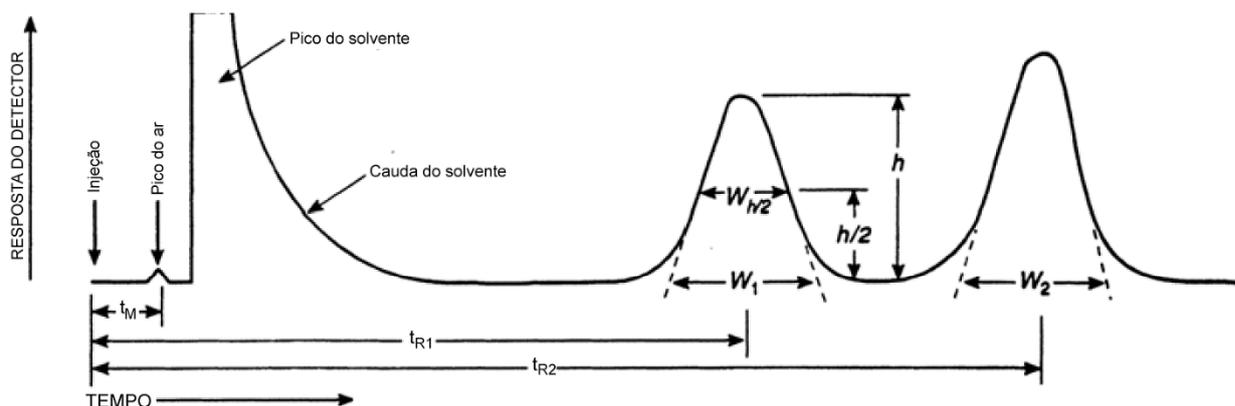


Figura 1. Separação cromatográfica de duas substâncias

Pico: o pico é a porção do cromatograma que registra a resposta do detector quando um componente individual elui da coluna. O pico pode ser definido pela sua área, ou pela sua altura e a largura do pico à sua meia altura, ou pela sua altura e a largura na linha de base. Se a separação é incompleta, pode-se registrar a eluição de dois ou mais componentes como um pico não resolvido.

Volume de Residência (D): O volume de residência (também conhecido como volume de demora em eluição a gradiente) é o volume entre o ponto em que os solventes se misturam e a entrada da coluna.

Tempo Morto (t_M): O tempo morto é o tempo necessário para a eluição de um componente não retido (ver a Figura 1, mostrado como um pico de ar ou de componente não retido, com a escala da linha de base em minutos).

Volume Morto (V_M): O volume morto é o volume de fase móvel necessário para eluir um componente não retido. Pode ser calculado a partir do tempo morto e a velocidade de fluxo, F , em mL/min:

$$V_M = t_M \times F$$

Na cromatografia de exclusão por tamanho, se utiliza o símbolo V_O .

Tempo de Retenção (t_R): Em cromatografia líquida e cromatografia a gás, o tempo de retenção, t_R , é definido como o tempo transcorrido entre a injeção da amostra e a aparição da resposta máxima. Pode-se utilizar t_R como um parâmetro para identificação. Os tempos de retenção cromatográficos são característicos dos compostos que representam, mas não são únicos. A coincidência dos tempos de retenção de uma amostra e de uma substância de referência pode ser utilizada como um critério parcial na construção de um perfil de identidade, mas é insuficiente por si mesma para estabelecer a identidade. Os tempos de retenção absolutos de um composto podem variar de um cromatograma para o seguinte.

Volume de retenção (V_R): é o volume de fase móvel necessário para a eluição de um componente. Pode ser calculado a partir do tempo de retenção e da velocidade do fluxo em ml/min:

$$V_R = t_R \times F$$

Número de Pratos Teóricos (N): é uma medida de eficiência da coluna. Para os picos gaussianos, pode ser calculado pela equação:

$$N = 16(t_R/W)^2$$

onde t_R é o tempo de retenção da substância e W é a largura do pico na sua base, que se obtém extrapolando os dados relativamente retos do pico até a linha de base. O valor de N depende da substância cromatografada bem como das condições operacionais, tais como a velocidade do fluxo e a temperatura da fase móvel ou gás de arraste, a qualidade do enchimento, a uniformidade do enchimento dentro da coluna, e, para colunas capilares, a espessura da película da fase estacionária, o diâmetro interno e o comprimento da coluna.

Quando se utiliza integradores eletrônicos, pode ser conveniente determinar o número de pratos teóricos pela equação:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

onde $W_{h/2}$ é a largura a meia altura do pico. No entanto, em caso de discrepâncias, só se deve utilizar a equação baseada na largura do pico na linha de base.

Relação Pico/Vale (p/v): A relação pico/vale pode ser empregada como um critério de adequabilidade do sistema em um ensaio de substâncias relacionadas quando não se busca a separação entre dois picos na linha de base. A Figura 2 representa uma separação incompleta de duas substâncias, onde H_p é a altura do pico menor por cima da linha de base extrapolada, e H_v é a altura no ponto mais baixo da curva que separa os picos menor e maior acima da linha de base extrapolada.

$$p/v = H_p/H_v$$

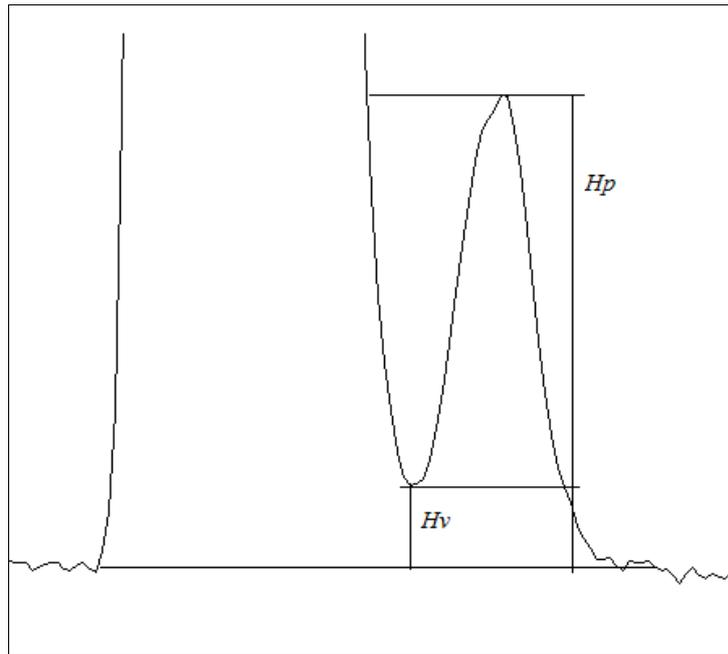


Figura 2. Determinação da relação pico/vale.

Retardo Relativo (R_{ret}): O retardo relativo é o quociente da distância (b) percorrida pelo analito e a distância (c) percorrida simultaneamente por um composto de referência (ver a Figura 3) e é utilizado na cromatografia planar.

$$R_{ret} = b / c$$

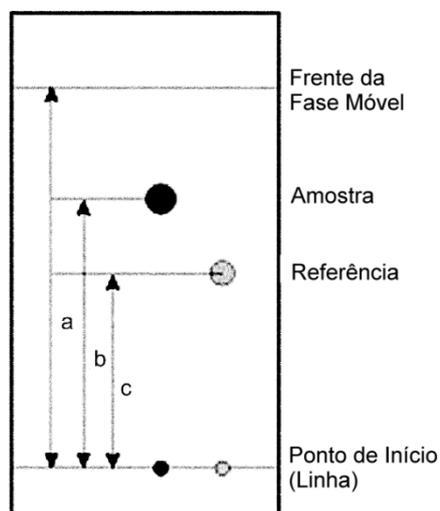


Figura 3. Cromatografia planar típica.

Retenção relativa (r): É o quociente entre o tempo de retenção ajustado de um componente e o de outro utilizado como referência obtido em condições idênticas:

$$r = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M)$$

onde t_{R2} é o tempo de retenção medido desde a injeção do composto de interesse; t_{R1} é o tempo de retenção medido desde a injeção do composto utilizado como

referência; e t_M é o tempo morto, todos determinados em condições experimentais idênticas na mesma coluna.

Tempo de retenção relativo (RRT): Também conhecido como tempo relativo não ajustado, é a relação entre os tempos de retenção de um pico (t_{R2}) em relação a outro (t_{R1}) em um mesmo cromatograma.

$$RRT = t_{R2}/t_{R1}$$

O símbolo r_G também é utilizado para designar os valores de retenção relativa não ajustados.

Fator de Retardo (RF): O fator de retardo é o quociente entre a distância (b) percorrida pelo centro da mancha e a distância (a) percorrida simultaneamente pela fase móvel e é utilizada em cromatografia plana. Utilizando os símbolos da Figura 3:

$$RF = b/a$$

Fator de Retenção (k): O fator de retenção também é conhecido como fator de capacidade (k'). É definido como:

$$k = \frac{\text{quantidade de substância na fase estacionária}}{\text{quantidade de substância na fase móvel}}$$

ou

$$k = \frac{\text{tempo da substância na fase estacionária}}{\text{tempo da substância na fase móvel}}$$

O fator de retenção de um componente pode ser determinado a partir do cromatograma:

$$k = (t_R - t_M)/t_M$$

Resolução (R_S): A resolução é a separação de dois componentes em uma mistura, calculada por:

$$R_S = 2 (t_{R2} - t_{R1})/(W_1 + W_2)$$

onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos dois componentes; e W_2 e W_1 são as larguras correspondentes às bases dos picos obtidos extrapolando os lados relativamente retos dos picos até a linha de base.

Quando são utilizados integradores eletrônicos, pode ser conveniente determinar a resolução através da equação:

$$R_S = 1,18 (t_{R2} - t_{R1})/(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})$$

Fator de Separação (α): o fator de separação é a retenção relativa calculada para dois picos adjacentes (por convenção, o valor do fator de separação sempre é > 1):

$$\alpha = k_2 / k_1$$

Fator de Simetria (T): o fator de simetria (também conhecido como fator de assimetria ou fator de cauda) de um pico (ver a Figura 4) é calculado por:

$$T = W_{0,05}/2f$$

onde $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância do máximo do pico até a borda inicial do pico, medindo a distância em um ponto definido a 5% da altura a partir da linha de base.

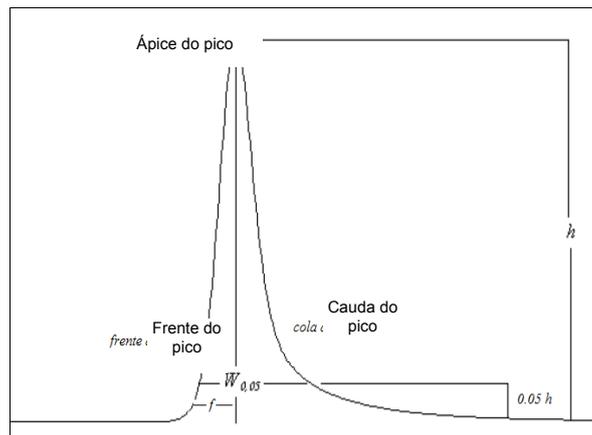


Figura 4. Pico cromatográfico assimétrico.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

O mecanismo predominante na cromatografia em papel é a partição, e isto se deve ao fato de que o papel possui um conteúdo natural de água que pode ser considerada como fase estacionária. No entanto, na prática, as separações frequentemente são o resultado da combinação de efeitos de adsorção e partição.

Fase estacionária: A fase estacionária é uma folha de papel de textura e espessura adequados. O desenvolvimento pode ser ascendente, em cujo caso o solvente se desloca para cima mediante forças de capilaridade, ou descendente, em cujo caso o fluxo do solvente é produzido por ação da força da gravidade. A orientação das fibras do papel em relação ao fluxo do solvente deve ser mantida constante em uma série de cromatogramas.

Aparato: O equipamento essencial para a cromatografia em papel compreende uma câmara hermética para permitir a saturação com os vapores da fase móvel (geralmente construída de vidro, aço inoxidável ou porcelana) provida de entradas para se adicionar o solvente e uma grade de material resistente à corrosão, aproximadamente 5 cm mais curta que a altura interior da câmara.

A grade serve como suporte para a cuba do solvente e para as varas anti-sifão que, por sua vez, sustentam as folhas cromatográficas. O fundo da câmara deverá estar coberto com a mistura de solventes ou fase móvel indicada. A saturação da câmara com o vapor do solvente é facilitada pelo revestimento das paredes do interior com um papel umedecido com a fase móvel indicada.

Aplicação: Dissolver a substância ou substâncias em ensaio em um solvente adequado. Aplicar volumes apropriados das soluções que contenham entre 1 e 20 µg da substância ou substâncias, em pontos de 3 a 8 mm de diâmetro e com uma separação de não menos de 3 cm.

Quando o volume da amostra é grande, aplicar em várias doses sucessivas de pequeno volume sobre a mesma superfície, secando depois de cada aplicação, para manter pequeno o diâmetro da mancha. Em algumas ocasiões é necessário aplicação da amostra em forma de banda ao longo da linha de origem.

Procedimento para Cromatografia Descendente em Papel

- (1) Fixar a folha cromatográfica no aparato, utilizando a varinha anti-sifão para sustentar o final superior da folha na cubeta do solvente [NOTA – assegurar que a porção da folha que se dobra por baixo da varinha esteja suspensa livremente na câmara sem tocar na grade ou nas paredes da câmara ou no líquido que está no interior da câmara.]
- (2) A câmara é fechada para permitir o equilíbrio (saturação) e do papel com o vapor do solvente. Se for necessário, liberar qualquer excesso de pressão.
- (3) Após o equilíbrio, a fase móvel previamente preparada é introduzida na cuba através da entrada.
- (4) Fechar a entrada da câmara e deixar que a fase móvel se desloque para baixo na distância desejada sobre o papel.
- (5) Retirar a folha da câmara, marcar rapidamente a localização da fase móvel e secar a folha.
- (6) Observar o cromatograma e medir diretamente ou após a revelação apropriada a localização das manchas.

Procedimento para Cromatografia Ascendente em Papel

- (1) Adicionar a fase móvel na câmara.
- (2) A câmara é fechada para permitir seu equilíbrio (saturação) e do papel com o vapor do solvente. Se for necessário, liberar qualquer excesso de pressão.
- (3) Submergir a borda inferior da fase estacionária na fase móvel para permitir que a fase móvel suba pela folha cromatográfica por capilaridade, evitando que a linha de aplicação fique submersa.
- (4) Quando a fase móvel tiver alcançado a altura desejada, abrir a câmara, retirar a folha, marcar rapidamente a localização da frente da fase móvel, e secar a folha.
- (5) Observar o cromatograma e medir diretamente ou após a revelação apropriada para a localização das manchas.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada, CCD, (habitualmente denominada TLC por sua sigla em inglês) é comumente empregada para a separação e identificação de substâncias. O mecanismo de separação predominante é a adsorção, mas

dependendo do adsorvente empregado, pode-se observar também fenômenos de partição.

Esta técnica apresenta várias vantagens sobre a cromatografia em papel, tais como: pode-se empregar maiores quantidades de amostra; o tempo necessário é menor e portanto os riscos de alteração da amostra por oxidação ou por ação dos solventes diminuem e permitem o uso de adsorventes minerais o que torna possível o emprego de reveladores agressivos, como por exemplo, ácido sulfúrico.

Fase Estacionária: A fase estacionária é uma camada relativamente delgada e uniforme de material seco e reduzido a pó fino que é aplicado sobre uma lâmina ou placa de vidro, plástico ou metal (geralmente conhecida como placa). A fase estacionária para CCD tem um tamanho médio de partícula de 10 a 15 μm , e a CCD de alta resolução tem um tamanho médio de partícula de 5 μm . Pode-se utilizar placas disponíveis comercialmente com uma zona pré-adsorvente se estiver especificada na monografia. A amostra é aplicada na região pré-adsorvente e se desenvolve em forma de bandas estreitas e definidas na interface entre o pré-adsorvente e o sorvente. As separações realizadas podem estar baseadas na adsorção, na partição ou uma combinação de ambos os efeitos, segundo o tipo específico da fase estacionária.

Silica gel

A sílica é preparada por polimerização espontânea e desidratação do ácido silícico. As sílicas comerciais possuem tamanho de poro variável entre 40 e 150 Å. Os tamanhos de partículas variam entre 5 e 40 μm dependendo do fabricante. É comumente utilizada para a separação de compostos lipofílicos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcaloides, terpenos e esteroides.

Alúmina

O tamanho das partículas e o diâmetro médio dos poros são similares aos da sílica. Comercialmente estão disponíveis a alúmina ácida (pH 4,0 – 4,5), neutra (pH 7,0 – 8,0) e básica (pH 9,0 – 10,0). É comumente utilizada para a separação de vitaminas lipossolúveis, alcaloides, certos antibióticos e hidrocarbonetos policíclicos.

Kieselguhr

É uma terra de diatomáceas termicamente tratada, seu principal constituinte é o SiO_2 . O tamanho das partículas pode variar entre 5 e 40 μm . É comumente utilizada para a separação de açúcares, aminoácidos e outras substâncias polares similares.

Celulose

É um polissacarídeo altamente polimerizado por monômeros de celobiose. É comumente utilizada para a separação de substâncias hidrofílicas, tais como carboidratos e aminoácidos.

Poliamida

É uma resina sintética. São utilizados dois tipos de poliamidas (6 e 11). É comumente utilizada para a separação de compostos polares, tais como aminoácidos e derivados, benzodiazepínicos, ácidos carboxílicos, ciclodextrinas, ácidos graxos, flavonoides, conservantes e praguicidas.

Silicato de magnésio

É comumente utilizada para a separação de açúcares, antraquinonas, flavonas, glicosídeos, lipídeos esteróides, resíduos de praguicidas, vitaminas, carbazóis e acetato de hidrocortisona.

Aparato: Utilizar uma câmara cromatográfica de material inerte e transparente com as seguintes especificações: cuba de fundo plano ou cubas geminadas, uma tampa que feche hermeticamente e um tamanho adequado para as placas. Revestir no mínimo uma das paredes da câmara cromatográfica com papel de filtro. Adicionar uma quantidade suficiente de fase móvel à câmara cromatográfica de modo que proporcione, depois de impregnar o papel de filtro, um nível de profundidade apropriado à dimensão da placa utilizada. Fechar a câmara cromatográfica e deixar que se equilibre. [NOTA – A menos que se indique algo diferente, as separações são realizadas em uma câmara saturada.]

Detecção/Visualização: Frequentemente se utiliza uma fonte de luz ultravioleta (UV) adequada para observações sob a luz UV de comprimento de onda curta (254 nm) e longa (365 nm), bem como uma variedade de soluções reveladoras para a visualização das manchas.

Aplicação: Aplicar as soluções sobre a fase estacionária (placa), no volume estabelecido em porções suficientemente pequenas para se obter manchas circulares de 2 a 5 mm de diâmetro (1 a 2 mm nas de CCDAE/HPTLC) ou bandas de 10 a 20 mm x 1 – 2 mm (5 a 10 mm x 0,5 a 1 mm nas de CCDAE/HPTLC) a uma distância adequada da borda inferior e das bordas laterais da placa. [NOTA – durante o desenvolvimento, a posição de aplicação deve estar pelo menos a 5 mm (ou 3 mm nas de CCDAE/HPTLC) acima do nível da fase móvel]. Aplicar as soluções sobre uma linha paralela à borda inferior da placa com uma separação mínima de 10 mm (5 mm nas de CCDAE/HPTLC) entre os centros das manchas ou 4 mm (2 mm nas de CCDAE/HPTLC) entre as bordas das bandas. Deixar secar.

Procedimento

- (1) Colocar a placa na câmara, assegurando que as manchas ou bandas estejam acima da superfície da fase móvel.
- (2) Fechar a câmara e deixar que a fase móvel migre na placa até que a frente da fase móvel tenha percorrido 3/4 do comprimento da placa ou a distância indicada na monografia.
- (3) Retirar a placa, marcar rapidamente a frente da fase móvel com um lápis e deixar a placa secar.
- (4) Visualizar os cromatogramas conforme é indicado na monografia.
- (5) Determinar os valores do fator de retardo cromatográfico (R_f) para as manchas indicadas na monografia.

Pode-se realizar uma identificação presuntiva através da observação das manchas ou zonas com valores de R_f idênticos e de magnitude similar, obtidas cromatografando uma amostra desconhecida e um padrão na mesma placa. Uma comparação visual de tamanho ou intensidade das manchas ou zonas pode servir para uma estimativa semiquantitativa. As medidas quantitativas podem ser realizadas através da densitometria (medidas de absorvância ou fluorescência).

CROMATOGRAFÍA DE GASES

Cromatografía de gases (CG) es una técnica de separación cromatográfica basada en la diferencia de distribución de componentes de una mezcla entre dos fases no miscibles. En la cual la fase móvil es el gas transportador moviéndose a través de la fase estacionaria contenida en una columna. CG está basada en mecanismos de adsorción, distribución o partición de masa o exclusión por tamaño. Es aplicada a sustancias o sus derivados que se volatilizan a las temperaturas empleadas y es utilizada para identificación, ensayo de pureza y determinación cuantitativa.

La cromatografía gaseosa de espacio libre (*head-space*) es una técnica particularmente adecuada para la separación y determinación de compuestos volátiles presentes en muestras sólidas y líquidas. Este método está basado en el análisis de una fase gaseosa en equilibrio con una fase sólida o líquida.

Pueden emplearse los siguientes sistemas:

Cromatografía gas-líquido: la fase estacionaria puede estar contenida en columnas rellenas o capilares. En las columnas rellenas, la fase líquida se deposita sobre un soporte sólido finamente dividido e inerte en una columna de 1 a 3 m de longitud y de 2 a 4 mm de diámetro interno. Los soportes más comúnmente empleados son tierra de diatomeas, polímeros porosos o carbono grafito. En las columnas capilares, que no contienen soporte, la fase líquida se deposita en la superficie interna de la columna o puede unirse químicamente a ella.

Cromatografía gas-sólido: se emplea como fase estacionaria alúmina, sílice, carbono o resinas porosas poliaromáticas.

Aparato - Consta de:

Un reservorio de gas transportador constituido por un gas comprimido, como por ej.: helio, nitrógeno, hidrógeno, argón o mezclas (como por ej., 95 % de argón y 5 % de metano) según el tipo de detector y columna empleados.

Inyectores

Un sistema de inyección constituido por una jeringa o un inyector automático.

Los inyectores pueden ser: Inyectores de caudal dividido: son inyectores capaces de dividir la muestra en dos fracciones, una pequeña que se introduce en la columna y una grande que se desecha. También pueden emplearse en modo normal sin desechar ninguna porción de la muestra para el análisis de trazas o componentes minoritarios.

- Inyectores de purga y trampa: están equipados con un dispositivo por el cual las sustancias volátiles de la solución se capturan en una trampa de baja temperatura. Una vez que se completa la retención de las sustancias, se liberan en el gas transportador mediante la calefacción rápida de la trampa, la cual posee un dispositivo programable de temperatura.

- Inyectores de espacio libre superior (*head-space*): poseen un sistema de temperatura programable. Las muestras líquidas o sólidas se colocan en envases perfectamente cerrados y se calientan durante un período de tiempo fijo, lo que permite que los componentes volátiles de la muestra alcancen un equilibrio entre las fases no gaseosa y gaseosa (espacio libre superior del envase). Una vez establecido el equilibrio, el inyector introduce automáticamente una cantidad determinada del espacio libre superior del envase en el cromatógrafo de gases.

Columnas

Las columnas pueden ser capilares o rellenas.

- Las columnas capilares, generalmente fabricadas con sílice fundida, poseen un diámetro interno de 0,10 a 0,53 mm (estas últimas también llamadas macrocapilares) y 5 a 60 m de longitud. El espesor de la fase estacionaria, que a veces se une químicamente a la superficie interna, es de 0,1 a 5,0 μm . Valores cercanos al límite superior son usados en fases estacionarias no polares.
- Las columnas rellenas, de vidrio o metal, poseen un diámetro interno de 2 a 4 mm y una longitud de 1 a 3 m. Las fases estacionarias consisten, generalmente, en polímeros porosos o soportes sólidos impregnados con la fase líquida llegando a, aproximadamente, 5% (p/p). Para compuestos de bajo peso molecular como el agua, son utilizadas columnas de alta capacidad, con una fase líquida llegando a 20% (p/p) aproximadamente.

Fase móvil

El tiempo de retención y la eficiencia dependen de la temperatura, del gas transportador y su flujo. El tiempo de retención es también directamente proporcional a la longitud de la columna, mientras que la resolución es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud de la columna. Para las columnas rellenas, el flujo del gas transportador se expresa generalmente en mL por minuto a presión atmosférica y temperatura ambiente y se mide a la salida del detector con un caudalímetro mientras la columna está a la temperatura de trabajo. Para un flujo determinado, la velocidad lineal a través de una columna rellena es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de la columna. Para las columnas capilares habitualmente se emplea velocidad lineal en lugar de flujo.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía individual, son generalmente empleados los gases transportadores helio o nitrógeno para columnas rellenas, mientras que los gases nitrógeno, helio e hidrogeno son utilizados en columnas capilares.

Detectores

Seleccionar un detector de acuerdo a las características de la muestra. El detector debe mantenerse a una temperatura superior a la de la columna para impedir la condensación de las sustancias eluidas. Para los análisis cuantitativos los detectores deben brindar una respuesta que debe ser directamente proporcional a la cantidad de la sustancia presente en el detector para un intervalo amplio de concentraciones. El detector más comúnmente empleado es el de ionización a la llama pero también son empleados el de conductividad térmica, captura electrónica, nitrógeno-fósforo y espectrometría de masa.

- Detector de ionización a la llama: posee un intervalo lineal, amplio y es sensible a la mayoría de los compuestos orgánicos. La respuesta de los detectores depende de la estructura y la concentración del compuesto y del flujo del gas de combustión, del aire, del gas de compensación y del gas transportador.
- Detector de conductividad térmica: posee un alambre a una temperatura determinada, colocado en la corriente del gas transportador. Mide la diferencia de conductividad térmica entre el gas transportador junto con la muestra y el gas transportador sólo cuando atraviesan el detector. Este detector responde en forma uniforme a las sustancias volátiles cualquiera sea su estructura, sin embargo, es considerablemente menos sensible que el detector de ionización a la llama.
- Detector de ionización a la llama alcalino: a veces llamado NP o detector de nitrógeno-fósforo, contiene una fuente termoiónica, constituida por una sal de un metal alcalino o un elemento de vidrio que contiene rubidio u otro metal, que produce la ionización de compuestos con nitrógeno y fósforo orgánicos. Es un detector selectivo que muestra poca respuesta a los hidrocarburos.
- Detector de captura electrónica: contiene una fuente de radiación ionizante. Presenta una respuesta sumamente alta con sustancias que contienen halógenos y grupos nitro pero pequeña con hidrocarburos. La sensibilidad aumenta con el número y peso atómico de los átomos de halógeno.
- Detector de espectrometría de masa: se fundamenta en la separación de los fragmentos iónicos obtenidos del analito según su relación masa/carga. Es detector sensible y selectivo a la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos.

Registrador:

El registrador recibe la señal del detector y calcula las respuestas de los picos y almacena los datos informáticos del cromatograma con sus parámetros y los picos. Los datos obtenidos y almacenados pueden reprocesarse, con cambios en la integración y otras variables de cálculo según sea necesario.

Procedimiento –

Equilibrar la columna, el inyector y el detector a las temperaturas y el flujo del gas transportador especificados en la monografía, hasta obtener una línea de base estable. Preparar las soluciones estándar y muestra como se describen. Las soluciones deben estar libres de partículas sólidas.

Muchos fármacos son moléculas polares reactivas. En ese caso, puede ser necesaria la transformación en derivados menos polares y más volátiles por tratamiento de estos fármacos con reactivos apropiados.

Adecuar el sistema de acuerdo a las consideraciones generales de este capítulo y lo especificado en la monografía correspondiente.

Inyectar por separado las soluciones estándar y muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se especifica en la monografía correspondiente.

Una fuente importante de error es la de irreproducibilidad en la cantidad de muestra inyectada, en particular cuando se hacen inyecciones manuales con una jeringa. Para reducir esta variabilidad, se agrega un estándar interno, compuesto que no interfiere en el cromatograma, en la misma concentración en las soluciones muestra y estándar. El cociente entre la respuesta de la sustancia ensayada y la respuesta del estándar interno se compara de un cromatograma a otro. El estándar interno debe ser sometido a todo el proceso de preparación de la muestra, para controlar además otros aspectos del análisis cuantitativo. Los inyectores automáticos mejoran la reproducibilidad de las inyecciones y reducen la necesidad del estándar interno.

A partir de los resultados obtenidos calcular el contenido de la o las sustancias a ensayar.

ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

Adequabilidade do sistema em CLAE e CG

A verificação da adequabilidade do sistema é uma parte integrante dos métodos de cromatografia de líquidos e de gases. Estes ensaios são utilizados para verificar se o sistema cromatográfico é adequado para a análise que se pretende realizar.

Os ensaios estão baseados no conceito de que o equipamento, os sistemas eletrônicos, as operações analíticas e as amostras analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal.

Os parâmetros de adequabilidade do sistema são determinados para o pico da substância ensaiada, a menos que se especifique de outro modo na monografia correspondente.

Os fatores que podem afetar o comportamento cromatográfico incluem os seguintes:

- 1) Composição, força iônica, temperatura e pH aparente da fase móvel;
- 2) Velocidade de fluxo, dimensões da coluna, temperatura da coluna e pressão;
- 3) As características da fase estacionária, incluindo o tipo de suporte cromatográfico (baseado em partículas ou monolítico), tamanho das partículas, tamanho de poro e área específica;
- 4) Em fase reversa e outras modificações superficiais das fases estacionárias, o grau de modificação química (segundo se expressa através de cobertura

exaustiva (end-capping), carga de carbono etc.)

A resolução, R, é uma função da eficiência da coluna, N, e é especificada para assegurar que as substâncias que eluam muito próximas sejam separadas entre si e para assegurar que os padrões internos sejam separados das substâncias em análise. A eficiência da coluna também pode ser especificada como um requisito de adequabilidade do sistema, especialmente se existe apenas um pico de interesse no cromatograma, no entanto, o valor isolado de eficiência não pode assegurar a resolução para o sistema em estudo. A eficiência da coluna é uma medida da agudeza dos picos, importante para detectar componentes em baixa concentração.

As injeções repetidas de uma preparação padrão ou outras soluções padrões são comparadas entre si para determinar se cumprem os requisitos de precisão. A menos que se especifique de outro modo na monografia, para calcular o desvio padrão relativo, DPR, utilizam-se os dados de cinco injeções repetidas do padrão se o requisito for de 2,0% ou menor, e seis injeções repetidas se o requisito do desvio padrão relativo for maior que 2,0%. O desvio padrão relativo, DPR, é calculado segundo a seguinte fórmula:

$$DPR = \frac{100}{\bar{x}} \left(\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right)^{-1/2}$$

Para o doseamento em uma monografia de um fármaco onde o valor é 100% para a substância pura, e não se especifica um desvio padrão relativo máximo, se calcula o desvio padrão relativo máximo permitido para uma série de injeções da solução de referência como:

$$DPR = KB \frac{\sqrt{n}}{t_{90\%, n-1}}$$

onde K é uma constante (0,349), obtida a partir da expressão $K = (0,6/\sqrt{2}) \times (t_{90\%, 5/\sqrt{6}})$, em que $0,6/\sqrt{2}$ representa o desvio padrão relativo percentual depois de seis injeções para $B = 1,0$; B é o limite superior previsto na definição da monografia individual menos 100%; n é o número de injeções repetidas da solução de referência ($3 \leq n \leq 6$); e $t_{90\%, n-1}$ é o valor de t de Student a 90% de nível de probabilidade (duas caudas) com n -1 graus de liberdade.

A menos que se indique de outro modo, o desvio padrão relativo máximo permitido não excede o valor apropriado previsto na tabela de requisitos de repetibilidade. Este requisito não se aplica aos ensaios para substâncias relacionadas.

Requisitos para Desvio Padrão Relativo

B (%)	Número de Injeções Individuais			
	3	4	5	6
	DPR Máxima Permitida			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06

3,0	0,62	0,89	1,10	1,27
-----	------	------	------	------

É essencial que todos os procedimentos cromatográficos cumpram os critérios de adequabilidade do sistema. A verificação da adequabilidade do sistema deverá ser realizada com base na frequência de uso do método, a experiência com o sistema de cromatografia, etc.

O fator de assimetria, T , uma medida da simetria do pico, é 1 para os picos perfeitamente simétricos e seu valor aumenta à medida que a assimetria é mais pronunciada (ver Figura 4). Em alguns casos, podem ser observados valores menores que a unidade. Como consequência da assimetria do pico, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis.

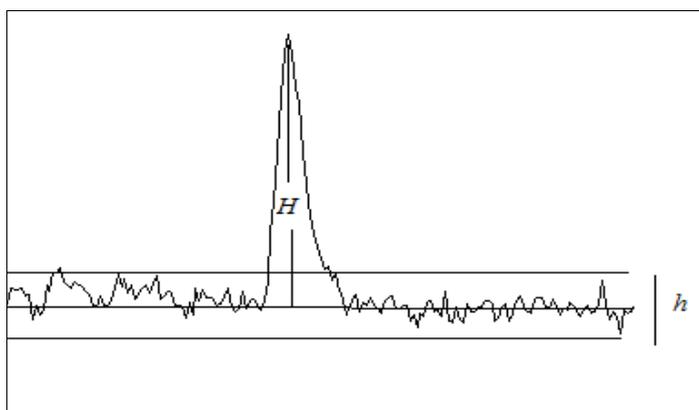


Figura 5. Ruído e pico cromatográfico, componentes da relação S/N

A relação sinal-ruído (S/N) é um parâmetro útil de adequabilidade do sistema. A S/N é calculada segundo a fórmula:

$$S/N = 2H/h$$

onde H é a altura do pico medido a partir do ápice do pico até a linha de base extrapolada sobre uma distância ≥ 5 vezes a largura do pico medida na metade da sua altura; e h é a diferença entre o valor de ruído maior e menor observados sobre uma distância ≥ 5 vezes a largura do pico medida na metade da sua altura e, se for possível, distribuída para ambos os lados do pico de interesse (ver a Figura 5).

Estes ensaios de adequabilidade do sistema são realizados coletando os dados a partir de injeções repetidas do padrão ou outras soluções como estiver especificado na monografia individual.

A especificação de parâmetros definidos em uma monografia não exclui o uso de outras condições de operação aptas. Os ajustes são permitidos unicamente quando: Se encontrem disponíveis padrões adequados (incluindo padrões de referência) para todos os compostos utilizados no ensaio de adequabilidade; estes padrões mostrem que os ajustes melhoraram a qualidade da cromatografia em relação aos requisitos de adequabilidade do sistema.

Não devem ser realizados ajustes nos parâmetros cromatográficos a fim de cumprir com os requisitos de adequabilidade do sistema para compensar falhas na coluna ou mal funcionamento do sistema.

Os ajustes das condições cromatográficas poderão ser realizados de acordo com la Res. GMC 23/14. Ajustes das condições cromatográficas em sistemas isocráticos de cromatografia a líquido de alta eficiência y posteriores actualizaciones.

Adequabilidade do sistema em Cromatografia em Camada Delgada

Os criterios de adequabilidade do sistema estão indicados nas monografias individuais para verificar que a separação e detecção necessárias nos ensaios de identificação, ensaios limites de substâncias relacionadas e/ou quantificação são alcançadas para um desempenho satisfatório.

Identificação

Verificação da capacidade de separação

Caso seja necessário, a monografia individual indicará um critério de resolução entre as manchas de R_f similares, a fim de garantir a identificação da substância sob ensaio.

Geralmente a verificação do poder de separação é conseguida através da utilização de reagentes que cumprem com as especificações descritas no capítulo de Reagentes, indicadores e soluções.

Ensaio de substâncias relacionadas

As manchas secundárias no cromatograma da solução amostra são visualmente comparadas com as manchas obtidas com as soluções de impurezas ou as manchas obtidas com a solução de referencia indicada na monografia individual.

Verificação do poder de separação

Quando necessário, a monografia individual indicará um critério de resolução entre as manchas de R_f similares.

Verificação do poder de detecção

O poder de detecção é adequado se a mancha ou a banda é nitidamente visível no cromatograma obtido com a solução de referencia mais diluída.