

FARMACOPEIA MERCOSUL: 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. 1º - Aprovar, no marco do estabelecido na Resolução GMC N° 22/14, o método geral “Farmacopeia MERCOSUL: 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).

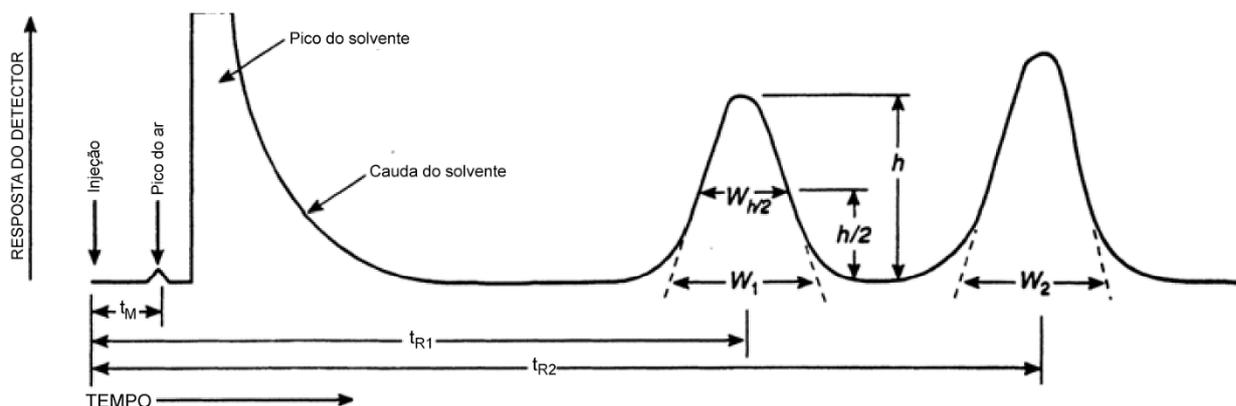


Figura 1. Separação cromatográfica de duas substâncias

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.

$$p/v = H_p/H_v$$

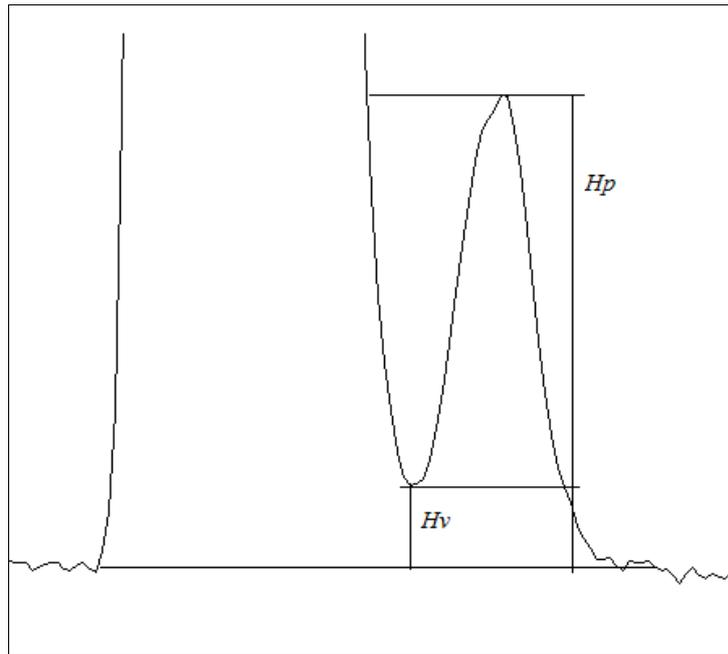


Figura 2. Determinação da relação pico/vale.

Retardo Relativo (R_{ret}): 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.

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

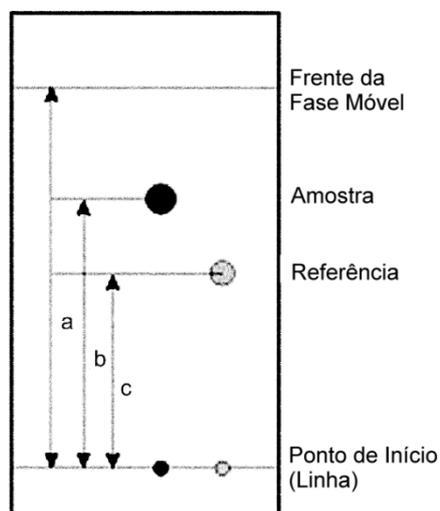


Figura 3. Cromatografia planar típica.

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.

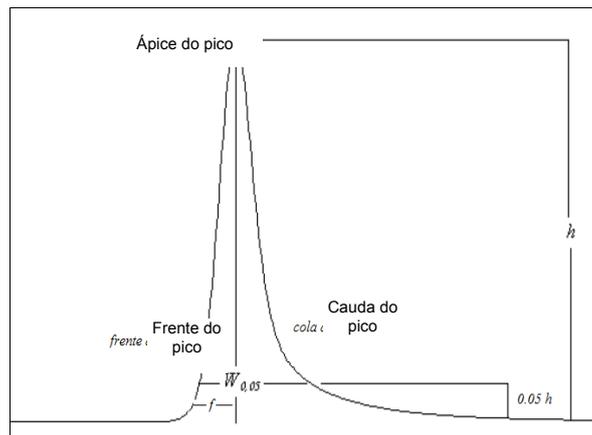


Figura 4. Pico cromatográfico assimétrico.

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,: 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) ou bandas de 10 a 20 mm x 1 – 2 mm (5 a 10 mm x 0,5 a 1 mm nas de CCDAE) 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 (CCD) ou 3 mm (CCDAE) 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) entre os centros das manchas ou 4 mm (2 mm nas de CCDAE) 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 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).

CROMATOGRAFIA A GÁS

Cromatografia a gás (CG) é uma técnica de separação cromatográfica baseada na diferença de distribuição espécies de uma mistura entre duas fases não miscíveis, na qual a fase móvel é um gás de arraste que se move através da fase estacionária contida em uma coluna. CG está baseada no mecanismo de adsorção, distribuição ou partição de massa ou exclusão por tamanho. É aplicada a substâncias e seus derivados que se volatilizam sob as temperaturas empregadas, e é utilizada para identificação, teste de pureza e determinação quantitativa.

A cromatografia gasosa de espaço confinado (*headspace*) é uma técnica particularmente adequada para a separação e determinação de compostos voláteis presentes em amostras sólidas e líquidas. Este método está baseado na análise de uma fase gasosa em equilíbrio com uma fase sólida ou líquida.

Podem ser usados os seguintes sistemas:

Cromatografia gás-líquido: a fase estacionária pode estar contida em colunas empacotadas ou capilares. Nas colunas empacotadas, a fase líquida é colocada sobre um suporte sólido finamente dividido e inerte em uma coluna de 1 a 3 m de comprimento e de 2 a 4 mm de diâmetro interno. Os suportes mais comumente empregados são terra de diatomáceas, polímeros porosos e carvão grafitizado. Nas colunas capilares, não contendo Suporte, a fase líquida é depositada na superfície interna da coluna ou pode unir-se quimicamente a ela.

Cromatografia gás-sólido: é usado como fase estacionária alumina, sílica, carbono ou resinas porosas poliaromáticas.

Aparato: consta de um reservatório de gás de arraste constituído por um gás comprimido, como por exemplo: hélio, nitrogênio, hidrogênio, argônio ou misturas (como por exemplo, 95 % de argônio e 5 % de metano) segundo o tipo de detector e coluna empregados.

Injetores

Um sistema de injeção constituído por uma seringa ou um injetor automático.

Os injetores podem ser: Injetores de fluxo dividido: são injetores capazes de dividir a amostra em duas frações, uma pequena que entra na coluna e outra maior que é descartada. Também podem ser usado em modo normal sem descartar qualquer porção da amostra para a análise de traços ou componentes minoritários.

- Injetores de purga e forno: são equipados com um dispositivo pelo qual as substâncias voláteis da solução são capturadas num forno de baixa temperatura. Uma vez que a retenção das substâncias é completada, são liberadas para o gás de arraste mediante o aquecimento rápido do forno, o qual possui um dispositivo programável de temperatura.
- Injetores espaço confinado (*headspace*): possuem um sistema de temperatura programável. As amostras líquidas ou sólidas são colocados nos

frascos perfeitamente fechados e são aquecidas durante um período de tempo fixo, o que permite que os componentes voláteis da amostra alcancem um equilíbrio entre as fases não gasosa e gasosa (espaço livre superior do frasco). Uma vez estabelecido o equilíbrio, o injetor introduz automaticamente uma quantidade determinada do espaço superior livre do frasco no cromatógrafo a gás.

Colunas

As colunas podem ser capilares ou empacotadas.

- As colunas capilares, geralmente fabricadas com sílica fundida, possuem um diâmetro interno de 0,10 a 0,53 mm (estas últimas também chamadas macrocapilares) e 5 a 60 m de comprimento. A espessura da fase estacionária, que a vezes se unem quimicamente à superfície interna, é de 0,1 a 5,0 μm . Valores perto dos limite superiores são utilizados em fases estacionárias não-polares.
- As colunas empacotadas, de vidro ou metal, possuem um diâmetro interno de 2 a 4 mm e um comprimento de 1 a 3 m. As fases estacionárias consistem, geralmente, em polímeros porosos ou suportes sólidos impregnados com a fase líquida chegando a, aproximadamente, 5% (p/p). Para compostos de baixo peso molecular como a água, são utilizadas colunas de alta capacidade, com uma fase líquida chegando a 20% (p/p) aproximadamente.

Fase móvel

O tempo de retenção e a eficiência dependem da temperatura, o gás de arraste e seu fluxo. O tempo de retenção é também diretamente proporcional ao comprimento da coluna, enquanto que a resolução é proporcional à raiz quadrada do comprimento da coluna. Para as colunas empacotadas, o fluxo do gás de arraste se expressa geralmente em mL por minuto à pressão atmosférica e temperatura ambiente, e medida na saída do detector com um fluxómetro enquanto a coluna está na temperatura de trabalho. Para um fluxo determinado, a velocidade linear através de uma coluna empacotada é inversamente proporcional ao quadrado do diâmetro da coluna. Para as colunas capilares habitualmente é utilizado velocidade linear ao invés de fluxo.

A menos que se especifique de outro modo na monografia individual, são geralmente utilizados os gases de arrastes hélio ou nitrogênio para colunas empacotadas, enquanto que os gases nitrogênio, hélio e hidrogênio são utilizados em colunas capilares.

Detectores

Selecionar um detector de acordo com as características da amostra. O detector deve manter-se a uma temperatura superior a da coluna para impedir a condensação das substâncias eluídas. Para as análises quantitativas os detectores deve fornecer uma resposta que deveria ser diretamente proporcional à quantidade da substância presente no detector para um intervalo amplo de concentrações. O detector mais comumente utilizado é o de ionização de chama, mas são

empregados também o de condutividade térmica, captura de elétrons, nitrogênio-fósforo e espectrometria de massa.

- Detector de ionização de chama: possui um intervalo linear, amplo e é sensível à maioria dos compostos orgânicos. A resposta dos detectores depende da estrutura e da concentração do composto e do fluxo do gás de combustão, do ar, do gás de compensação e do gás de arraste.
- Detector de condutividade térmica: possuem um fio a uma determinada temperatura, colocado na corrente de gás arraste. Mede-se a diferença da condutividade térmica entre o gás de arraste junto com a amostra e o gás de arraste apenas ao atravessar o detector. Este detector responde na forma uniforme às substâncias voláteis sem considerar sua estrutura, entretanto, são considerados menos sensíveis que o detector de ionização de chama.
- Detector de ionização de chama alcalina: também chamado NP ou detector nitrogênio-fósforo, contém uma fonte termoiônica, com um sal metal-álcali ou um elemento de vidro contendo rubídio ou outro metal, que produz a ionização de compostos com nitrogênio e fósforo orgânicos. É um detector seletivo que apresenta baixa resposta para hidrocarbonetos.
- Detector de captura de elétrons: contém uma fonte de radiação ionizante. Exibem uma resposta extremamente alta a compostos halogenados e grupo nitro, mas pouca resposta a hidrocarbonetos. A sensibilidade aumenta com o número e o peso atômico de átomos de halogênio.
- Detector de espectrometria de massa: baseia-se na separação dos fragmentos iônicos do analito obtidos pela razão massa/carga. É um detector sensível e seletivo para a maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos.

Registrador:

O registrador recebe o sinal do detector e calcula as respostas dos picos e armazena os dados informativos do cromatograma com seus parâmetros e os picos. Os dados obtidos e armazenados podem ser reprocessados, com alterações na integração e outras variáveis de cálculo que seja necessário.

Procedimento:

Estabilizar a coluna, o injetor e o detector para as temperaturas e o fluxo do gás de arraste especificados na monografia, até obter uma linha de base estável. Preparar as soluções padrão e amostra como descrito. As soluções devem estar livres de partículas sólidas.

Muitos fármacos são moléculas polares reativas. Nesse caso, pode ser necessária a transformação em derivados menos polares e mais voláteis por tratamento destes fármacos com reagentes adequados.

Adequar o sistema de acordo com as considerações gerais do presente capítulo e especificado na monografia correspondente.

Injetar separadamente as soluções padrão e amostra, registrar os cromatogramas e medir as respostas dos picos conforme especificado na monografia correspondente.

Uma fonte importante de erro é a não reprodutibilidade na quantidade de amostra injetada, em particular quando realizam injeções manuais com uma seringa. Para reduzir esta variabilidade, adiciona-se um padrão interno, composto que não interfere no cromatograma, na mesma concentração nas soluções amostra e padrão. O cociente entre a resposta da substância ensaiada e a resposta do padrão interno é comparado de um cromatograma para outro. O padrão interno deve ser submetido a todo o processo de preparação da amostra, para controlar também outros aspectos da análise quantitativa. Os injetores automáticos melhoram a reprodutibilidade das injeções e reduzem a necessidade de padrão interno. A partir dos resultados obtidos calcular a quantidade da ou das substâncias analisadas.

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 exhaustiva (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 correspondente, 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

	Número de Injeções Individuais			
	3	4	5	6
B (%)	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.

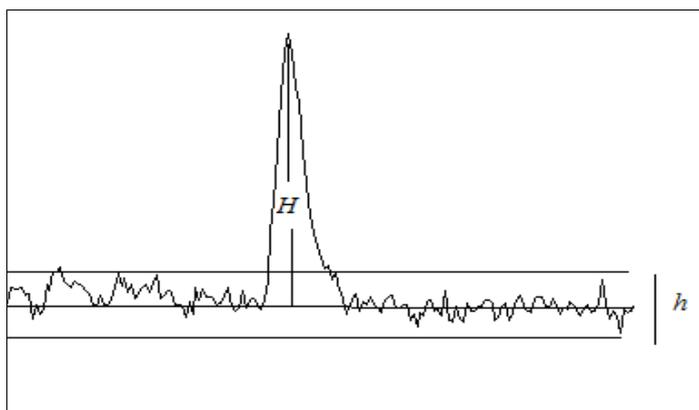


Figura 5. Ruído e pico cromatográfico, componentes da relação S/N

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.

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 para identificação

Caso seja necessário, a monografia individual indicará um critério de resolução entre as manchas de Rf 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 Rf 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.