



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

Consulta Pública nº 1.250, de 2 de maio de 2024

D.O.U de 6/05/2024

A GERENTE DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA, no exercício da competência que lhe foi delegada por meio do Despacho 77, de 10 de agosto de 2022, aliado ao art. 187, III, do Regimento Interno aprovado pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve submeter à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo, em Anexo.

Art. 1º Fica estabelecido o prazo de 60 (sessenta) dias para envio de comentários e sugestões ao texto do método geral 5.2.17 Cromatografia, conforme Anexo.

Parágrafo único. O prazo de que trata este artigo terá início 7 (sete) dias após a data de publicação desta Consulta Pública no Diário Oficial da União.

Art. 2º A proposta de ato normativo estará disponível na íntegra no portal da Anvisa na internet e as sugestões deverão ser enviadas eletronicamente por meio do preenchimento de formulário eletrônico específico, disponível no endereço: <https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/696267?lang=pt-BR>

§1º Com exceção dos dados pessoais informados pelos participantes, todas as contribuições recebidas são consideradas públicas e de livre acesso aos interessados, conforme previsto na Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011 e estarão disponíveis após o encerramento da consulta pública, em sua página específica, no campo “Documentos Relacionados”.

§2º Ao término do preenchimento e envio do formulário eletrônico será disponibilizado número de identificação do participante (ID) que poderá ser utilizado pelo usuário para localizar a sua própria contribuição, sendo dispensado o envio postal ou protocolo presencial de documentos em meio físico junto à Agência.

§3º Em caso de limitação de acesso do cidadão a recursos informatizados será permitido o envio e recebimento de sugestões por escrito, em meio físico, durante o prazo de consulta, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Coordenação da Farmacopeia – Cofar, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

§4º Excepcionalmente, contribuições internacionais poderão ser encaminhadas em meio físico, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Assessoria de Assuntos Internacionais – AINTE, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária promoverá a análise das contribuições e, ao final, publicará o resultado da consulta pública no portal da Agência.

Parágrafo único. A Agência poderá, conforme necessidade e razões de conveniência e oportunidade, articular-se com órgãos e entidades envolvidos com o assunto, bem como aqueles que tenham manifestado interesse na matéria, para subsidiar posteriores discussões técnicas e a deliberação final da Diretoria Colegiada.

GRAZIELA COSTA ARAUJO

ANEXO

PROPOSTA EM CONSULTA PÚBLICA

Processo nº: 25351.930989/2022-42

Assunto: Proposta de revisão do método geral 5.2.17 Cromatografia.

Agenda Regulatória 2024-2025: Tema nº 5.5 Atualização periódica dos compêndios da Farmacopeia Brasileira (FB)

Área responsável: Coordenação da Farmacopeia – Cofar

Diretor Relator: Rômison Rodrigues Mota

5.2.17 CROMATOGRAFIA

INTRODUÇÃO

As técnicas de separação cromatográficas compreendem métodos de separação nos quais os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária e a outra se move em uma direção definida. A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido adsorvido ou quimicamente ligado a um suporte sólido ou um gel. A fase estacionária pode preencher uma coluna, ser espalhada como uma camada ou distribuída como um filme. A fase móvel pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico. O princípio de separação pode ser baseado em adsorção, distribuição de massa (partição), troca iônica, exclusão, entre outros. Este capítulo contém definições e cálculos de parâmetros cromatográficos comuns às várias técnicas cromatográficas e requisitos gerais aplicados a testes de adequabilidade do sistema.

DEFINIÇÕES

A adequabilidade do sistema e os critérios de aceitação nas monografias foram estabelecidos segundo os parâmetros definidos a seguir. Determinados parâmetros, como relação sinal/ruído e resolução, podem ser calculados por meio de *softwares* fornecidos pelo fabricante do equipamento. É responsabilidade do usuário garantir que os métodos de cálculo utilizados pelo *software* sejam equivalentes aos requisitos da Farmacopeia e fazer as devidas correções, se necessárias.

Altura do prato (H) ou altura equivalente a um prato teórico (HETP)

Razão entre o comprimento da coluna (L), em micrômetros, e o número de pratos (N).

$$H = L/N$$

Altura reduzida dos pratos (h)

Razão entre a altura dos pratos (H), em micrômetros, e o diâmetro da partícula (d_p) em micrômetros:

$$h = H/d_p$$

Constante de distribuição (K_0)

Na cromatografia de exclusão por tamanho, as características de eluição de um componente em uma determinada coluna podem ser dadas pela constante de distribuição (também conhecida como coeficiente de distribuição), que é calculada usando a seguinte equação:

$$K_0 = (t_R - t_0)/(t_t - t_0)$$

em que,

t_R = tempo de retenção;
 t_0 = tempo de retenção de um composto não retido; e
 t_i = tempo total de corrida.

Cromatograma

Um cromatograma é uma representação gráfica, ou outra forma de representação, da resposta do detector à concentração dos analitos na fase móvel ou outra quantidade utilizada como medida da concentração em função do volume da fase móvel ou do tempo.

Está representado, na **Figura 1**, um cromatograma típico com separação de duas substâncias, 1 e 2.

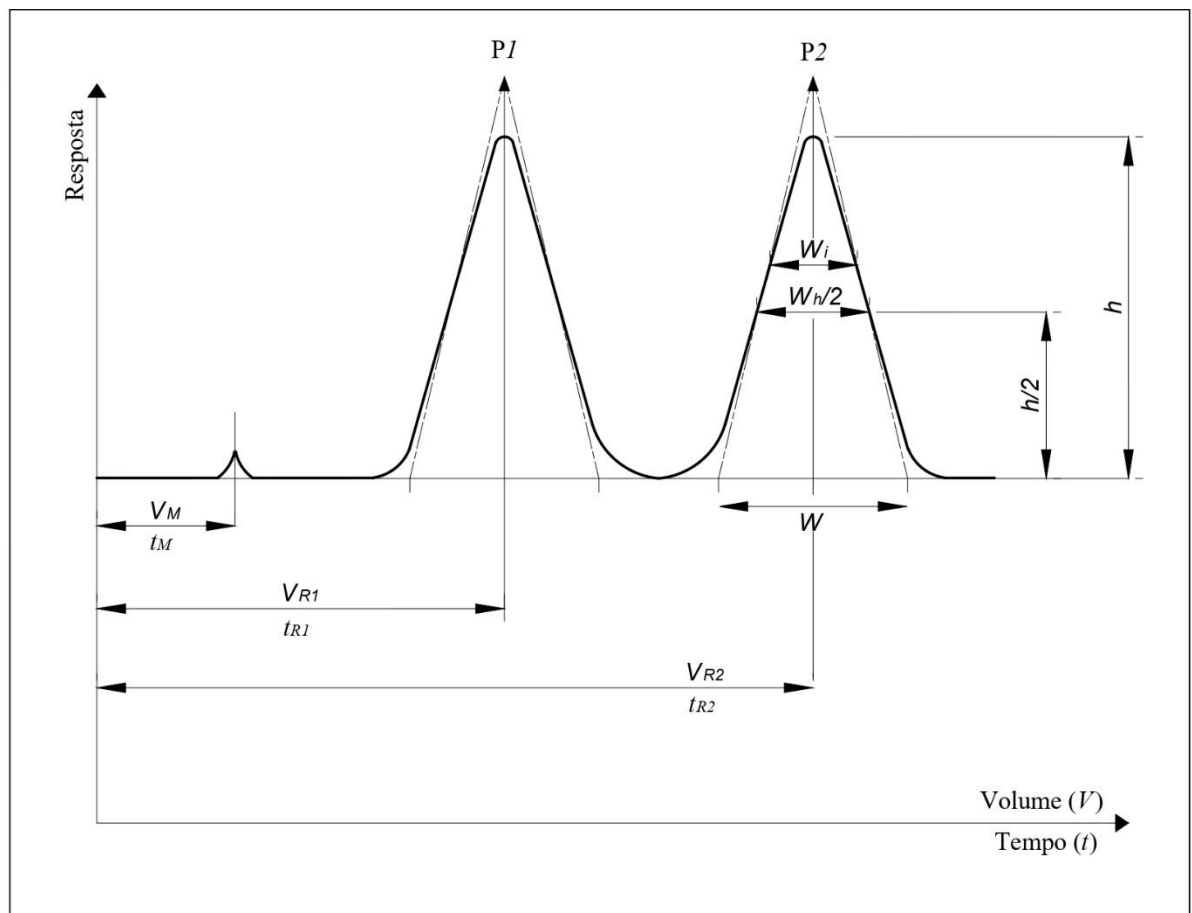


Figura 1 – Separação cromatográfica de duas substâncias.

P1 = pico cromatográfico 1

P2 = pico cromatográfico 2

t_M = tempo morto

V_M = volume morto

t_{R1} = tempo de retenção da substância 1

V_{R1} = volume de retenção da substância 1

t_{R2} = tempo de retenção da substância 2

V_{R2} = volume de retenção da substância 2

h = altura do pico cromatográfico

$h/2$ = meia altura do pico cromatográfico

W = largura do pico na linha de base, obtida pelo método da triangulação que consiste em traçar linhas perpendiculares ao sinal cromatográfico, utilizando a base do triângulo isósceles.

W_i = largura do pico no ponto de inflexão
 $W_{h/2}$ = largura a meia altura do pico cromatográfico

Fator de retardo (R_F)

O fator de retardo, também denominado fator de retenção utilizado em cromatografia em camada delgada, é a razão da distância do ponto de aplicação até o centro da mancha e a distância simultaneamente percorrida pela fase móvel a partir do ponto de aplicação.

$$R_F = \frac{\text{distância atingida pela mancha a partir da origem}}{\text{distância percorrida pelo solvente desde a origem}}$$

Fator de retenção (k)

O fator de retenção, também denominado fator de capacidade (k), é definido como:

$$k = \frac{\text{quantidade de substância na fase estacionária}}{\text{quantidade de substância na fase móvel}} = K_C \times V_S / V_M$$

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:

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

em que,

K_C = constante de distribuição (também conhecido como coeficiente de distribuição no equilíbrio);

V_S = volume da fase estacionária;

V_M = volume da fase móvel;

t_R = tempo de retenção do componente de interesse; e

t_M = tempo morto.

Fator de separação (α)

O fator de separação, ou fator de seletividade, é a retenção relativa calculada para dois picos adjacentes. Por convenção, o valor do fator de separação sempre é > 1 :

$$\alpha = k_2 / k_1$$

em que k_1 e k_2 são os fatores de retenção do primeiro e do segundo pico, respectivamente.

Fator de simetria (A_S)

O fator de simetria de um pico, também denominado fator de assimetria ou fator de cauda, (Figura 3) é calculado por:

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

em que,

$W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% da altura; e

f é a distância da perpendicular ao ponto máximo do pico até a sua borda inicial, medindo a distância em um ponto definido a 5% da altura a partir da linha de base.

Um valor de A_S de 1,0 representa simetria. Quando $A_S > 1,0$, o pico é caudal. Quando $A_S < 1,0$, o pico é frontal.

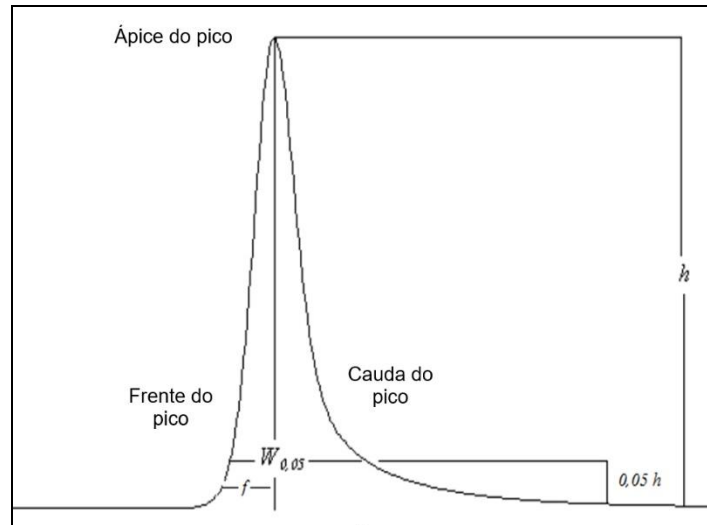


Figura 2 - Pico cromatográfico assimétrico.

Número de pratos teóricos (N)

Número indicativo do desempenho ou medida de eficiência da coluna. Só pode ser calculado a partir de dados obtidos em condições isotérmicas, isocráticas ou isodensas, em função da técnica utilizada. Para os picos gaussianos (simétricos), pode ser calculado pela seguinte equação, com t_R e W expressos na mesma unidade:

◇

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

em que,

t_R é o tempo de retenção da substância; e
 W é a largura do pico na sua base.

O valor de N depende da substância analisada, bem como das condições operacionais, tais como a velocidade do fluxo e a temperatura da fase móvel ou do gás de arraste, a qualidade do material da fase estacionária, a uniformidade do empacotamento, e, para colunas capilares, a espessura da película da fase estacionária, o diâmetro interno e o comprimento da coluna.

Quando se utiliza integração automática dos picos, pode ser conveniente determinar o número de pratos teóricos pela equação, com t_R e $W_{h/2}$ expressos na mesma unidade:

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

em que,

t_R é o tempo de retenção da substância; e
 $W_{h/2}$ é a largura à meia-altura do pico cromatográfico.

Pico

Parte do cromatograma que registra a resposta do detector quando um ou mais componentes eluem da coluna. A resposta do pico pode ser representada pela sua área ou altura. *Se a

separação é incompleta, pode-se registrar a eluição de dois ou mais componentes como um pico não resolvido.

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 é alcançada a separação completa entre dois picos na linha de base. Está representada, na **Figura 3**, uma separação incompleta de duas substâncias, onde H_p é a altura do pico menor acima 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.

$$p/v = H_p/H_v$$

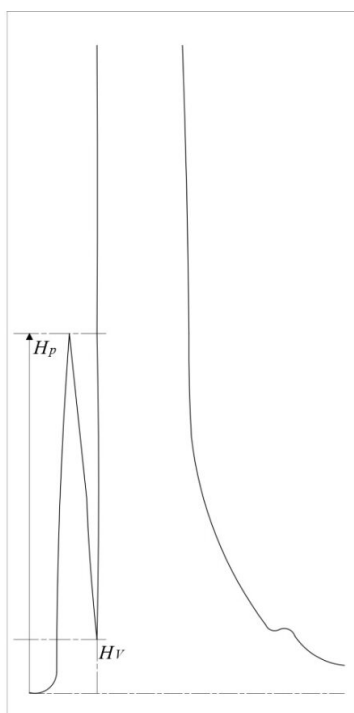


Figura 3 – Determinação da relação pico/vale.

Relação sinal/ruído (S/R)

O ruído da linha de base influencia a precisão e exatidão da quantificação. A relação sinal-ruído é calculada usando a seguinte equação:

$$S/R = 2H/h$$

em que,

H = altura do pico correspondente à substância analisada, no cromatograma obtido com a solução referência, medida da perpendicular ao ponto máximo do pico até a linha de base extrapolada do sinal, considerada dentro de uma distância que corresponda a 20 vezes a largura à meia altura do pico referente ao componente em questão; e

h = intervalo do ruído em um cromatograma obtido após a injeção de uma amostra branco, observado a uma distância igual a 20 vezes a largura à meia altura do pico no cromatograma obtido com a solução referência e, se possível, situada igualmente em torno do local onde se encontraria este pico.

Se não for possível obter uma linha de base de 20 vezes a largura à meia altura devido a picos de solventes ou reagentes, ou provenientes da fase móvel ou da matriz da amostra, ou devido

à programação de temperatura na cromatografia gasosa, é permitida uma linha de base de pelo menos 5 vezes a largura à meia altura.

Repetibilidade do sistema

A repetibilidade da resposta é expressa como um desvio padrão relativo (%RSD) estimado a partir de uma série consecutiva de medições para, no mínimo, três injeções ou aplicações de uma solução de referência e é calculada usando a seguinte equação:

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

em que,

y_i = valores individuais expressos como área do pico, altura do pico ou razão de áreas pelo método de padronização interna;

\bar{y} = média dos valores individuais; e

n = número de valores individuais.

Resolução (R_S)

A resolução é a separação de dois componentes em uma mistura, calculada por:

◇

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

em que,

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 obtidas extrapolando os lados relativamente retos dos picos até a linha de base.

Quando é utilizada integração automática, pode ser conveniente determinar a resolução por meio da equação:◇

$$R_S = 1,18(t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h/2_1} + W_{h/2_2})$$

em que,

t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos dois componentes; e

$W_{h/2_1}$ e $W_{h/2_2}$ são as larguras correspondentes às bases dos picos obtidas a meia altura do pico cromatográfico.

Na cromatografia quantitativa de camada delgada, usando densitometria, as distâncias de migração são usadas ao invés dos tempos de retenção e a resolução entre picos de dois componentes pode ser calculada usando a seguinte equação:

$$R_S = 1,18\alpha (R_{F2} - R_{F1}) / (W_{h/2_1} + W_{h/2_2})$$

$$R_{F2} > R_{F1}$$

R_{F1} , R_{F2} = fatores de retardo dos picos;

$W_{h/2_1}$ e $W_{h/2_2}$ = larguras do pico a meia altura; e

α = distância de migração da frente do solvente.

Retardo relativo (R_{rel})

Também denominado retenção relativa utilizada em cromatografia em camada delgada, é a razão entre a distância percorrida pelo analito (b) e a distância percorrida simultaneamente por um componente de referência (c) (**Figura 4**), sendo utilizado na cromatografia planar.

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

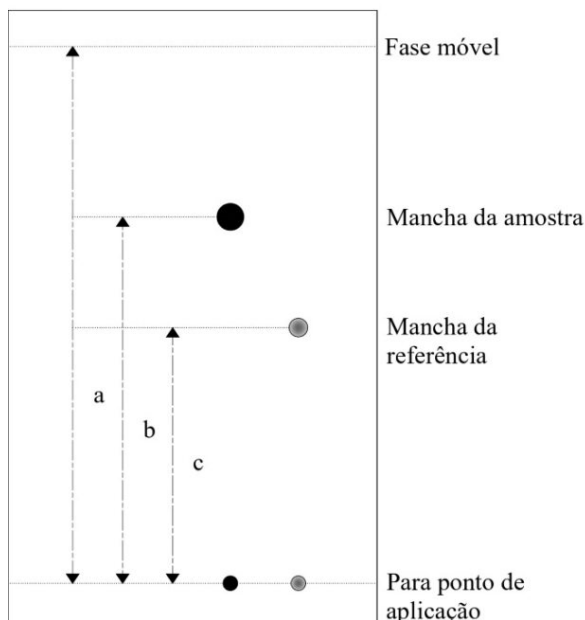


Figura 4 – Cromatografia planar típica (Cromatografia em camada delgada ou em papel).
Legenda: a = distância de migração da fase móvel; b = distância de migração da substância analisada; c = distância de migração do componente de referência.

Retenção relativa (r)

É a razão entre o tempo de retenção ajustado de um componente e o de outro utilizado como referência obtido em condições idênticas:

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

em que,

t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos dois componentes; e t_M é o tempo morto, todos determinados em condições experimentais idênticas na mesma coluna.

Tempo de retenção (t_R)

Tempo transcorrido entre a injeção da amostra e a obtenção da resposta máxima na zona de eluição do pico.

Tempo de retenção relativo (RRT)

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

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

Tempo de retenção de um composto não retido (t_o)

Na cromatografia de exclusão por tamanho, o tempo de retenção de um componente cujas moléculas são maiores do que os maiores poros do gel (**Figura 5**).

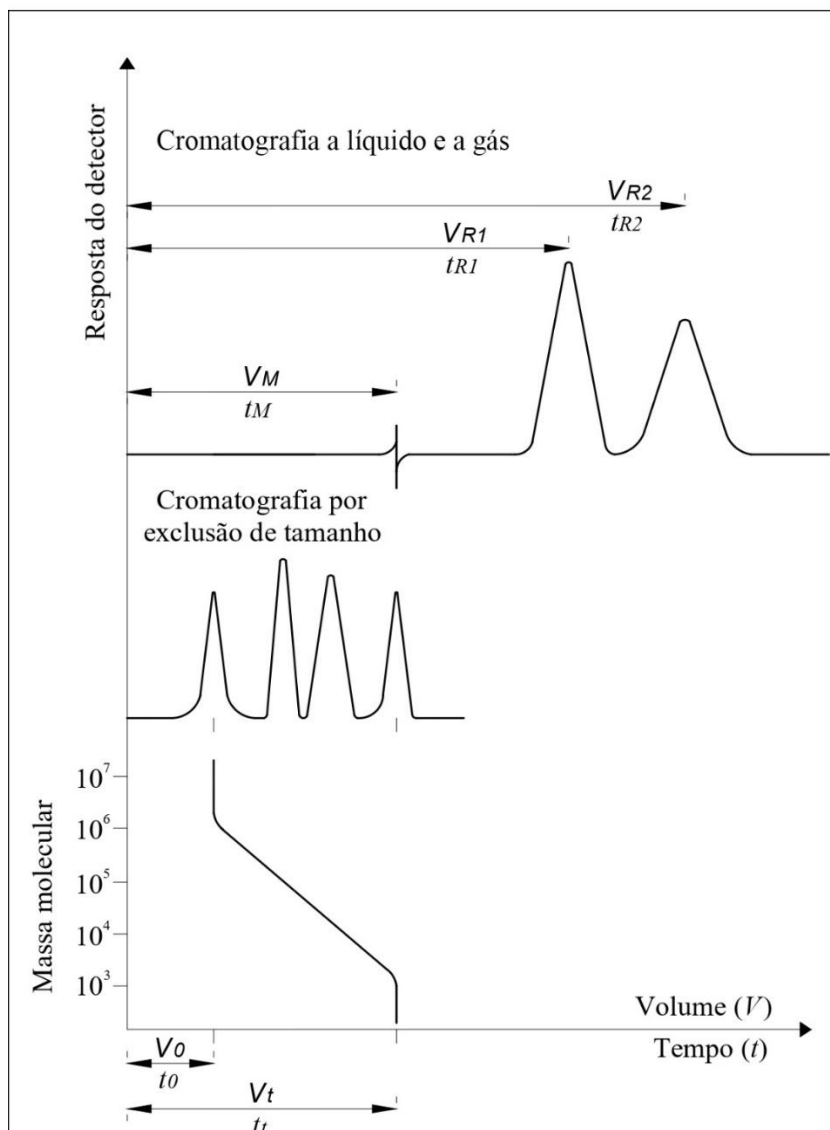


Figura 5 – Parâmetros de retenção típicos para as técnicas de cromatografia a líquido, a gás e por exclusão de tamanho.

Tempo total da fase móvel (t_t)

Na cromatografia de exclusão por tamanho, o tempo total da fase móvel é o tempo de retenção de um componente cujas moléculas são menores que os menores poros do gel.

Tempo morto (t_M)

Tempo necessário para a eluição de um componente não retido (ver a **Figura 5**, mostrado como um pico de ar ou de componente não retido).

Na cromatografia de exclusão por tamanho, o termo tempo de retenção de um composto não retido (t_0) é usado.

Volume morto (V_M)

Volume de fase móvel necessário para eluir um componente não retido. Pode ser calculado a partir do tempo morto (t_M) e do fluxo (F) em mL/min, usando a seguinte fórmula:

$$V_M = t_M \times F$$

Na cromatografia de exclusão por tamanho, se utiliza o símbolo V_0 e t_0 .

Volume de retenção de um composto não retido (V_0)

Na cromatografia de exclusão por tamanho, volume de retenção de um componente cujas moléculas são maiores que os maiores poros do gel. Pode ser calculado a partir do tempo de retenção de um composto não retido (t_0) e a taxa de fluxo (F) em mililitros por minuto usando a seguinte equação:

$$V_0 = t_0 \times F$$

Volume de permanência (D)

Também denominado volume de demora (*Dwell volume*) em eluição por gradiente, corresponde ao volume entre o ponto em que os solventes se misturam e a entrada da coluna. O volume de permanência de um sistema cromatográfico pode ser determinado realizando-se o seguinte procedimento:

Fase móvel

Fase móvel A: Água

Fase móvel B: 0,1% v/v solução de acetona em água

| Tempo (min) | Fase Móvel A (% v/v) | Fase Móvel B (% v/v) |
|-------------|----------------------|----------------------|
| 0-20 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 20-30 | 0 | 100 |

Taxa de fluxo: definido para obter contrapressão suficiente (por exemplo, 2 mL/min).

Detecção: espectrofotômetro a 265 nm.

Determine o tempo ($t_{0,5}$) em minutos quando a absorvância aumentou 50 por cento (Figura 2).

$$D = (t_{0,5} - 0,5 \cdot t_G) \cdot F = t_D \cdot F$$

em que,

$t_D = t_{0,5} - 0,5 \cdot t_G$, em minutos;

t_G = tempo de gradiente pré-definido (= 20 min); e

F = fluxo, em mililitros por minuto.

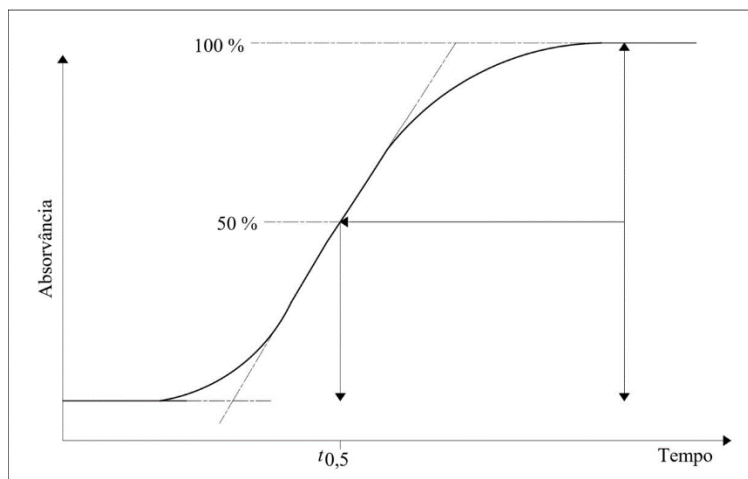


Figura 6 – Método gráfico para determinação do volume de permanência.

Observação: quando aplicável, esta medição é realizada com o amostrador automático na posição de injeção para incluir o volume da alça (*loop*) de injeção no volume de permanência.

Volume de retenção (V_R)

Volume de fase móvel necessário para a eluição de um composto. Pode ser calculado a partir do tempo de retenção (t_R) e do fluxo (F) em mL/min, usando a seguinte fórmula:

$$V_R = t_R \cdot F$$

Volume total da fase móvel (V_t)

Na cromatografia de exclusão por tamanho, o volume total da fase móvel é o volume de retenção de um componente cujas moléculas são menores que os menores poros do gel. Pode ser calculado a partir do tempo total da fase móvel e do fluxo (F), em mililitros por minuto, usando a seguinte equação:

$$V_t = t_t \cdot F$$

ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

Nota: a presente seção abrange apenas a cromatografia a líquido e a cromatografia a gás.

Os vários componentes do equipamento utilizado devem ser qualificados e capazes de atingir o desempenho necessário para a realização do teste ou ensaio.

Os testes de adequabilidade do sistema representam uma parte integrante do procedimento analítico e são utilizados para garantir o desempenho adequado do sistema cromatográfico. Os parâmetros que podem ser empregados na avaliação do desempenho do sistema cromatográfico são: número de pratos da coluna, fator de retenção (razão de distribuição de massa), repetibilidade do sistema, relação sinal-ruído, resolução (relação pico-vale) e fator de simetria.

Quando indicado na monografia individual, no caso de perfis cromatográficos complexos (por exemplo, para produtos biotecnológicos/biológicos), a comparação visual dos perfis pode ser utilizada como um teste de adequabilidade do sistema.

Os fatores que podem afetar o comportamento cromatográfico incluem:

– composição e temperatura da fase móvel;

- força iônica e pH do componente aquoso da fase móvel;
- fluxo, dimensões da coluna, temperatura e pressão da coluna;
- características da fase estacionária, incluindo o tipo de suporte cromatográfico (a base de partículas ou monolítico), a dimensão das partículas ou poros, a porosidade, a área de superfície específica; e
- fase reversa e outras modificações da superfície das fases estacionárias, extensão da modificação química (capeamento – do inglês *end-capping*, carga de carbono, entre outros).

Quando os tempos de retenção e as retenções relativas são fornecidas em monografias, estes são geralmente apenas para fins informativos. Não há critérios de aceitação aplicados a retenções relativas.

A conformidade com os critérios de adequabilidade do sistema é necessária durante todo o procedimento cromatográfico. Nenhuma análise de amostra é aceitável, a menos que a adequabilidade do sistema tenha sido demonstrada.

Além de quaisquer outros critérios de adequabilidade do sistema indicados na monografia individual, os seguintes requisitos devem ser cumpridos. Quando requisitos específicos são indicados na monografia individual, eles substituem os requisitos mencionados no presente capítulo.

Repetibilidade do sistema – ensaio de uma substância ativa ou de um excipiente

Em um ensaio de uma substância ativa ou de um excipiente, em que o teor esperado é de 100% para uma substância pura e não é especificado qualquer requisito de repetibilidade do sistema, o desvio-padrão relativo máximo admissível (DPR_{max}) é calculado a partir dos resultados de uma série de injeções da solução de referência ($n = 3$ a 6). O desvio padrão relativo máximo permitido da resposta de pico não deve exceder o valor apropriado indicado na **Tabela 1**.

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

em que,

K = constante (0,349), obtida a partir da expressão $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,n-1}}{\sqrt{6}}$ em que $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ representa a porcentagem necessária de desvio padrão relativo determinado em 6 injeções para $B = 1,0$;
 B = limite superior indicado na definição da monografia individual menos 100 por cento;
 n = número de injeções replicadas da solução de referência ($3 \leq n \leq 6$); e
 $t_{90\%,n-1} = t$ de Student no nível de probabilidade de 90% (bicaudal) com $n - 1$ graus de liberdade.

Tabela 1 – Desvio padrão relativo máximo permitido (ensaio)

| B (%) | Número n de injeções individuais | | | |
|---------|---------------------------------------------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | Desvio padrão relativo máximo permitido (%) | | | |
| 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 |

Sensibilidade do sistema

A relação sinal-ruído é usada para definir a sensibilidade do sistema. O limite de quantificação (correspondente a uma relação sinal-ruído de 10) é igual ou inferior ao limite de notificação (*reporting threshold*).

*A relação sinal-ruído pode ser determinada através da injeção de uma solução da substância a ser examinada na concentração correspondente ao limite de notificação (por exemplo, 0,05%).

Alternativamente, utilizar a solução de referência usada para a quantificação de impurezas não especificadas (por exemplo, 0,10% da concentração da solução amostra) e extrapolar a área do pico principal para o limite de notificação (por exemplo, metade da área de pico obtida com a solução de referência a 0,10%).

Simetria de pico

O fator de simetria (fator de cauda) do pico utilizado para a quantificação em um teste ou ensaio é de 0,8 a 1,8, exceto se outro valor for indicado na monografia individual.

AJUSTE DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A extensão em que os vários parâmetros de um ensaio cromatográfico podem ser ajustados, sem modificar fundamentalmente os procedimentos analíticos farmacopeicos, são enumerados a seguir. Alterações adicionais àquelas indicadas requerem a revalidação do procedimento.

Múltiplos ajustes podem ter um efeito cumulativo no desempenho do sistema e devem ser devidamente avaliados, principalmente quando o padrão de separação é descrito como um perfil. Nesses casos, é necessário realizar uma avaliação de risco.

Quaisquer ajustes devem ser efetuados com base no procedimento farmacopeico.

Se forem efetuados ajustes a um procedimento farmacopeico, podem ser necessários testes de verificação adicionais. Para verificar a adequação do procedimento farmacopeico ajustado, é necessário avaliar as características de desempenho analítico relevantes e potencialmente afetadas pela alteração.

Quando um procedimento analítico farmacopeico for ajustado de acordo com os requisitos a seguir, não são recomendados novos ajustes sem uma revalidação adequada.

A conformidade com os critérios de adequabilidade do sistema é necessária para verificar se as condições para o desempenho satisfatório do teste ou ensaio são alcançadas.

O ajuste das condições quando em uso de eluição em modo gradiente (CLAE) ou de programação de temperatura (CG) é mais crítico do que a eluição isocrática (CLAE) ou isotérmica (CG), uma vez que estes ajustes podem deslocar a retenção de alguns picos para uma etapa diferente do gradiente ou para diferentes temperaturas de eluição, podendo causar coeluição, parcial ou completa, ou inversão de picos adjacentes, levando assim ao mascaramento ou atribuição incorreta dos mesmos, ou ainda a uma mudança tal que a eluição ocorra além do tempo de eluição descrito.

Os ajustes de alguns parâmetros são claramente definidos na monografia para garantir a adequabilidade do sistema.

Cromatografia em camada delgada

Composição da fase móvel: a quantidade dos solventes minoritários pode ser ajustada em $\pm 30\%$ em termos relativos ou $\pm 2\%$ em termos absolutos, o que for maior; nenhum outro componente pode ser alterado em mais de 10% em termos absolutos. Um componente minoritário compreende quantidade menor ou igual a $(100/n)\%$, sendo n o número total de componentes da fase móvel. Para um componente minoritário a 10% da fase móvel, um ajuste relativo de 30% permite um intervalo de 7-13%, enquanto um ajuste absoluto de 2% permite um intervalo de 8-12%, sendo o valor relativo, portanto, o maior; para um componente minoritário a 5% da fase móvel, um ajuste relativo de 30% permite um intervalo de 3,5-6,5%, enquanto um ajuste absoluto de 2% permite um intervalo de 3-7%, sendo o valor absoluto o maior neste caso.

pH do componente aquoso da fase móvel: $\pm 0,2$ unidades de pH, exceto se indicado de outra forma na monografia individual.

Concentração de sais no tampão de uma fase móvel: $\pm 10\%$.

Volume de aplicação: 10-20 % do volume descrito, se usar placas de tamanho de partícula fina (2-10 μm).

Cromatografia a líquido: eluição isocrática

Parâmetros da coluna e fluxo

Fase estacionária: não é permitido a alteração da identidade do substituinte da fase ligada (por exemplo, substituição de C18 por C8). Outras características físico-químicas da fase estacionária (suporte cromatográfico, modificação da superfície e extensão da modificação química) devem ser semelhantes. É permitida a alteração de colunas de partículas totalmente porosas (TPP, do inglês *totally porous particle*) para colunas de partículas superficialmente porosas (SPP, do inglês *superficially porous particle*), desde que os requisitos acima mencionados sejam cumpridos.

Dimensões da coluna (dimensão das partículas, comprimento): a dimensão das partículas e/ou o comprimento da coluna podem ser alterados desde que a relação entre o comprimento da coluna (L) e a dimensão da partícula (dp) permaneça constante ou na faixa de -25% a $+50\%$ da relação L/dp descrita. Para a aplicação do ajuste do tamanho das partículas de partículas totalmente porosas (TPP) para partículas superficialmente porosas (SPP), outras combinações de L e dp podem ser usadas desde que o número de pratos (N) esteja dentro de -25% a $+50\%$ em relação à coluna descrita.

Estas alterações são aceitáveis desde que os requisitos de adequabilidade do sistema sejam cumpridos e a seletividade e a ordem de eluição dos picos analisados sejam equivalentes.

Dimensões da coluna (diâmetro interno): o diâmetro interno da coluna pode ser ajustado desde que não ocorra alteração da dimensão das partículas e/ou do comprimento da coluna.

É necessário cautela quando os ajustes resultarem em volumes de pico menores devido a um tamanho de partícula menor ou a um diâmetro interno menor. Esta situação pode exigir ajustes para minimizar o alargamento da banda extra-coluna devido a fatores tais como conexões de instrumentos, volume de células do detector, taxa de amostragem e volume de injeção.

O fluxo deve ser ajustado quando o tamanho da partícula é alterado, visto que colunas de partículas menores exigem velocidades lineares mais altas para o mesmo desempenho, conforme pode ser verificado pela redução da altura dos pratos. O fluxo deve ser ajustado no caso de alterações no diâmetro da coluna e no tamanho das partículas usando a seguinte equação:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

em que,

| | | |
|--------|---|-------------------------------------------------------------------|
| F_1 | = | fluxo indicado na monografia, em mililitros por minuto; |
| F_2 | = | fluxo ajustado, em mililitros por minuto; |
| dc_1 | = | diâmetro interno da coluna indicado na monografia, em milímetros; |
| dc_2 | = | diâmetro interno da coluna utilizada, em milímetros; |
| dp_1 | = | dimensão das partículas indicada na monografia, em micrômetros; e |
| dp_2 | = | dimensão das partículas da coluna utilizada, em micrômetros. |

Quando for efetuada uma alteração de diâmetro de partículas $\geq 3 \mu\text{m}$ para diâmetro de partículas $< 3 \mu\text{m}$ na eluição isocrática, pode justificar-se um aumento adicional da velocidade linear (ajustando-se o fluxo), desde que o desempenho da coluna não diminua mais de 20%. Da mesma forma, quando uma mudança é feita de partículas $< 3 \mu\text{m}$ para partículas $\geq 3 \mu\text{m}$, uma redução adicional da velocidade linear (fluxo) pode ser justificada para evitar uma redução no desempenho da coluna maior que 20%.

Após um ajuste devido a uma mudança nas dimensões da coluna, é permitida uma alteração adicional no fluxo de $\pm 50\%$.

Temperatura da coluna: $\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$, se for especificada a temperatura de análise, exceto se indicado de outra forma na monografia individual.

Podem ser necessários ajustes adicionais nas condições do procedimento analítico (fase móvel, temperatura, pH, entre outros), dentro das faixas permitidas descritas em *Adequabilidade do sistema e Ajuste das condições cromatográficas*.

Fase móvel

Composição: a quantidade dos solventes minoritários pode ser ajustada em $\pm 30\%$ em termos relativos (ver exemplo em CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA); nenhum componente pode ser alterado em mais de 10% em termos absolutos. Um componente minoritário compreende quantidade menor a $(100/n)\%$, sendo n o número total de componentes da fase móvel.

pH do componente aquoso da fase móvel: $\pm 0,2$ unidades de pH, exceto se indicado de outra forma na monografia individual.

Concentração de sais no tampão de uma fase móvel: $\pm 10\%$.

Fluxo: na ausência de alteração das dimensões das colunas, é permitido um ajuste do fluxo em $\pm 50\%$.

Comprimento de onda do detector: nenhum ajuste permitido.

Volume de injeção: quando as dimensões da coluna são alteradas, pode ser utilizada a seguinte equação para ajustar o volume de injeção:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

em que,

V_{inj1} = volume de injeção indicado na monografia, em microlitros;

V_{inj2} = volume de injeção ajustado, em microlitros;

L_1 = comprimento da coluna indicado na monografia, em milímetros;

L_2 = comprimento da coluna a ser utilizada, em milímetros;

dc_1 = diâmetro interno da coluna indicado na monografia, em milímetros; e

dc_2 = diâmetro interno da coluna a ser utilizada, em milímetros.

Esta equação pode não ser aplicável a alterações de colunas TPP para colunas SPP.

O volume de injeção pode ser alterado, mesmo na ausência de qualquer alteração da dimensão da coluna, desde que os critérios de adequabilidade do sistema permaneçam dentro dos limites de aceitabilidade estabelecidos. É necessário dar especial atenção ao limite de detecção e repetibilidade da(s) resposta(s) de pico(s) a ser(em) determinado(s) quando o volume de injeção é diminuído. É permitido um aumento desde que, principalmente, a linearidade e a resolução entre os picos a serem determinados permaneçam satisfatórias.

Cromatografia a líquido: eluição em modo gradiente

O ajuste das condições cromatográficas para sistemas de gradiente requer maior cuidado do que para sistemas isocráticos.

Parâmetros da coluna e fluxo

Fase estacionária: não são permitidas mudanças na identidade do substituinte da fase ligada (por exemplo de C18 para C8). Outras características físico-químicas da fase estacionária (suporte cromatográfico, modificação da superfície e extensão da modificação química) devem ser similares. A alteração de colunas com partículas totalmente porosas (TPP) para partículas superficialmente porosas (SPP) é permitida, desde que os requisitos mencionados acima sejam satisfeitos.

Dimensões da coluna (tamanho de partícula, comprimento): o tamanho de partícula e/ou comprimento da coluna podem ser modificados desde que a razão entre o comprimento da coluna (L) e o tamanho de partícula (dp) permaneça constante ou na faixa entre -25% a +50% da razão L/dp indicada. Para a aplicação de ajustes de tamanho de partícula TPP para SPP, outras combinações de L e dp podem ser utilizadas, desde que a razão $(t_R/W_{1/2})^2$ esteja dentro de -25% a +50% em relação aos valores obtidos com a coluna recomendada para cada pico utilizado para avaliar a adequabilidade do sistema, conforme descrito neste capítulo e na monografia individual. As mudanças são aceitáveis desde que os requisitos de adequabilidade do sistema sejam satisfeitos e que a seletividade e ordem de eluição dos picos analisados sejam equivalentes.

Dimensões da coluna (diâmetro interno): na ausência de uma mudança no tamanho de partícula e/ou comprimento da coluna, o diâmetro interno da coluna pode ser ajustado. É necessário cautela quando os ajustes resultarem em menores volumes de pico devido a um tamanho de partícula menor ou diâmetro interno menor. Esta situação pode exigir ajustes para minimizar o alargamento da banda extra-coluna devido a fatores tais como conexões de instrumentos, volume de células do detector, taxa de amostragem e volume de injeção. Quando o tamanho de partícula for modificado, torna-se necessário ajuste do fluxo, uma vez que colunas com partículas menores requerem velocidades lineares maiores para o mesmo desempenho (conforme medido pela altura de prato reduzida). O fluxo é ajustado para mudanças no diâmetro da coluna e tamanho de partícula utilizando a seguinte equação:

$$F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$$

em que,

F_1 = fluxo indicado na monografia, em mililitros por minuto;

F_2 = fluxo ajustado, em mililitros por minuto;

dc_1 = diâmetro interno da coluna indicada na monografia, em milímetros;

dc_2 = diâmetro interno da coluna a ser utilizada, em milímetros;

dp_1 = tamanho de partícula da coluna indicada na monografia, em micrômetros; e

dp_2 = tamanho de partícula da coluna a ser utilizada, em micrômetros.

Uma mudança nas dimensões da coluna e, portanto, no volume da coluna, impacta o volume do gradiente, que controla a seletividade. Os gradientes são ajustados ao volume da coluna alterando o volume do gradiente em proporção ao volume da coluna. Isto se aplica a cada volume do segmento do gradiente. Uma vez que o volume do gradiente é o tempo do gradiente (t_G) multiplicado pelo fluxo (F), o tempo do gradiente para cada segmento deve ser ajustado para manter uma razão constante entre o volume do gradiente e o volume da coluna (expresso como $L \times dc_2$). Assim, o novo tempo do gradiente (t_{G2}) pode ser calculado a partir do tempo do gradiente original (t_{G1}), os fluxos e as dimensões da coluna segundo a equação:

$$t_{G2} = t_{G1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

Assim, a mudança nas condições da eluição por gradiente requer três passos:

(1) ajustar o comprimento da coluna e tamanho de partícula de acordo com a razão L/dp ;

(2) ajustar o fluxo para mudanças no tamanho de partícula e diâmetro da coluna; e

(3) ajustar o tempo de gradiente de cada segmento para mudanças no comprimento da coluna, diâmetro da coluna e fluxo da fase móvel.

O exemplo abaixo ilustra este processo.

Tabela 2 – Exemplo de ajustes para cromatografia a líquido – eluição em modo gradiente.

| Variável | Condições Originais | Condições Ajustadas | Comentário |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|--------------------|
| Comprimento da coluna (L), em mm. | 150 | 100 | Escolha do usuário |
| Diâmetro da coluna (dc) em mm | 4,6 | 2,1 | Escolha do usuário |
| Tamanho de partícula (dp) em μm . | 5 | 3 | Escolha do usuário |
| L/dp | 30,0 | 33,3 | (1) |
| Fluxo (F) em mL/min | 2,0 | 0,7 | (2) |
| Fator de ajuste do gradiente (t_{G2}/t_{G1}) | | 0,4 | (3) |
| Condições do Gradiente | | | |
| B (%) | Tempo (min) | Tempo (min) | |
| 30 | 0 | 0 | |
| 30 | 3 | $(3 \times 0,4) = 1,2$ | |
| 70 | 13 | $[1,2 + (10 \times 0,4)] = 5,2$ | |
| 30 | 16 | $[5,2 + (3 \times 0,4)] = 6,4$ | |
| (1) Aumento de 11%, dentro do limite de -25% a + 50% para L/dp | | | |
| (2) Calculado usando $F_2 = F_1 \times \frac{dc_2^2 \times dp_1}{dc_1^2 \times dp_2}$ | | | |
| (3) Calculado usando $t_{G2} = t_{G1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$ | | | |

Temperatura da coluna: ± 5 °C quando a temperatura da coluna tiver sido especificada, exceto se indicado de outra forma na monografia individual.

Ajustes adicionais nas condições do procedimento analítico (fase móvel, temperatura, pH, entre outros) podem ser necessários dentro dos limites permitidos descritos neste capítulo em *Adequabilidade do Sistema e Ajuste das Condições Cromatográficas*.

Fase móvel

Composição/gradiente: ajustes da composição da fase móvel e do gradiente são aceitáveis desde que:

- os requisitos para *Adequabilidade do Sistema* sejam satisfeitos;
- o(s) pico(s) principal(is) elua(m) dentro de $\pm 15\%$ do(s) tempo(s) de retenção obtido(s) com as condições originais. Este requisito não se aplica quando as dimensões da coluna são modificadas;
- a composição da fase móvel e do gradiente sejam tais que os primeiros picos fiquem suficientemente retidos e os últimos picos sejam eluídos;
- pH do componente aquoso da fase móvel: $\pm 0,2$ unidades de pH, exceto se indicado de outra forma na monografia individual;
- Concentração de sais no componente tampão da fase móvel: $\pm 10\%$; e

Quando a conformidade com os requisitos de adequabilidade do sistema não puder ser alcançada, é recomendado reconsiderar o volume de permanência ou alterar a coluna.

Volume de permanência (Dwell time)

A configuração do equipamento empregado pode alterar significativamente a resolução, o tempo de retenção e retenções relativas descritas. Caso isso ocorra, pode ser devido a mudanças no volume de permanência. As monografias frequentemente incluem um passo isocrático antes do início da programação do gradiente. Desta forma, uma adaptação pode ser introduzida aos pontos do gradiente para acomodar diferenças no tempo de permanência entre o sistema utilizado para desenvolvimento do procedimento analítico e o sistema a ser utilizado. É responsabilidade do usuário adaptar a duração do passo isocrático de acordo com o equipamento analítico a ser utilizado. Se o volume de permanência utilizado durante a elaboração da monografia for informado, os pontos no tempo (t), em minutos, especificados na tabela de gradiente, podem ser substituídos pelos pontos nos tempos adaptados (t_c), em minutos, calculados segundo a seguinte equação:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

em que,

D = volume de permanência (*Dwell time*), em mililitros;

D_0 = volume de permanência utilizado no desenvolvimento do procedimento analítico, em mililitros; e

F = fluxo, em mililitros por minuto.

O passo isocrático introduzido para este propósito pode ser omitido se dados de validação para a aplicação do procedimento analítico sem este passo estiverem disponíveis.

Comprimento de onda do detector: nenhum ajuste é permitido.

Volume de injeção: quando as dimensões da coluna são modificadas, a seguinte equação pode ser usada para ajustar o volume de injeção:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{L_2 \times dc_2^2}{L_1 \times dc_1^2}$$

em que,

V_{inj1} = volume de injeção indicado na monografia, em microlitros;

V_{inj2} = volume de injeção ajustado, em microlitros;

L_1 = comprimento da coluna indicado na monografia, em milímetros;

L_2 = comprimento da coluna a ser utilizada, em milímetros;

dc_1 = diâmetro interno da coluna indicado na monografia, em milímetros; e

dc_2 = diâmetro interno da coluna a ser utilizada, em milímetros.

Esta equação pode não ser aplicável a alterações de colunas TPP para SPP. Mesmo na ausência de quaisquer alterações nas dimensões da coluna, o volume de injeção pode ser modificado, desde que os critérios de adequabilidade do sistema permaneçam dentro dos seus limites de aceitabilidade estabelecidos.

Quando o volume de injeção for diminuído, atenção especial deve ser dada ao limite de detecção e repetibilidade da(s) resposta(s) do(s) pico(s) a ser(em) determinado(s). Um aumento é permitido desde que, em particular, a linearidade e a resolução do(s) pico(s) a ser(em) determinado(s) permaneçam satisfatórias.

Cromatografia a gás

Parâmetros da coluna

Fase estacionária:

- tamanho de partícula: redução máxima de 50%. Nenhum aumento é permitido (colunas empacotadas); e
- espessura do filme de fase estacionária: – 50% a +100% (colunas capilares).

Dimensões da coluna:

- comprimento: – 70% a + 100%; e
- diâmetro interno: $\pm 50\%$.

Temperatura da coluna: $\pm 10\%$.

Programação de temperatura: ajustes da temperatura são permitidos como descrito em *Temperatura da coluna*; ajuste de rampas de aquecimento e tempos de espera (*hold times*) de até $\pm 20\%$ são permitidos.

Fluxo: $\pm 50\%$.

As mudanças acima são aceitas desde que os requisitos de adequabilidade do sistema sejam satisfeitos e que a seletividade e ordem de eluição dos picos analisados sejam equivalentes.

Volume de injeção e razão de divisão (split ratio): podem ser modificados desde que os critérios de adequabilidade do sistema permaneçam dentro dos limites de aceitabilidade estabelecidos. Quando o volume de injeção for diminuído ou a razão de divisão for aumentada, atenção especial deve ser dada ao limite de detecção e repetibilidade da resposta do(s) pico(s) a serem determinados. Um aumento do volume de injeção ou uma diminuição na razão de divisão são permitidos desde que, em particular, a linearidade e a resolução do(s) pico(s) a ser(em) determinado(s) permaneça(m) satisfatória(s).

Temperatura da porta de injeção e temperatura da linha de transferência em condições de cromatografia a gás em espaço confinado estático (static headspace): $\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$, desde que não ocorra decomposição ou condensação.

QUANTIFICAÇÃO

As seguintes abordagens para quantificação podem ser usadas em métodos gerais ou monografias:

Método com padronização externa

Usando uma curva de calibração

Soluções padrão com quantidades crescentes do padrão de referência da substância a ser analisada são preparadas em uma faixa que demonstre resposta linear, e um volume fixo dessas soluções padrão é injetado. Com os cromatogramas obtidos, uma curva de calibração é preparada plotando as áreas ou alturas dos picos nas ordenadas versus a concentração do padrão de referência da substância a ser analisada nas abcissas. A equação da curva de calibração é geralmente obtida por regressão linear. Em seguida, uma solução amostra é preparada de acordo com o procedimento especificado na monografia individual. A análise cromatográfica é realizada nas mesmas condições operacionais da preparação da curva de calibração. A área do pico ou a altura do pico do analito é determinada e a sua concentração é calculada a partir da equação da curva de calibração.

Usando ponto único de calibração

Geralmente, em monografias individuais é preconizado o preparo de uma solução padrão com concentração dentro da faixa linear da curva de calibração e uma solução amostra com concentração próxima àquela da solução padrão. A análise cromatográfica é realizada sob as mesmas condições para determinar a concentração do analito, comparando as respostas obtidas.

Neste método, todos os procedimentos, como a injeção, devem ser realizados em condições constantes.

◊Nos casos em que a padronização externa é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$C_a = C_p(R_a/R_p)$$

em que,

C_a = concentração da solução amostra;

C_p = concentração da solução padrão;

R_a = resposta (área ou altura do pico) da solução amostra; e

R_p = resposta (área ou altura do pico) da solução padrão.◊

Método com padronização interna

Usando uma curva de calibração

No método com padronização interna, o padrão interno a ser utilizado deve ser um composto estável que apresente um tempo de retenção próximo àquele do analito e cujo pico seja bem separado de todos os outros picos do cromatograma. São preparadas várias soluções padrão contendo uma quantidade fixa do padrão interno e quantidades crescentes do padrão de referência da substância a ser analisada. Com base nos cromatogramas obtidos por injeção de um volume fixo das soluções padrão individuais, é calculada a razão entre a área ou a altura do pico do analito em relação ao padrão interno. É preparada uma curva de calibração plotando as razões calculadas na ordenada, e na abcissa a quantidade do padrão de referência da substância a ser analisada ou a razão da quantidade da substância química de referência para aquela do padrão interno.

A equação da curva de calibração é geralmente obtida por regressão linear. Em seguida, uma solução amostra contendo o analito e o padrão interno na mesma quantidade das soluções padrão utilizadas na curva de calibração é preparada conforme procedimento especificado na monografia individual. A análise cromatográfica é realizada nas mesmas condições operacionais da preparação da curva de calibração. A relação entre a área ou altura do pico do analito em relação ao padrão interno é calculada e a quantidade do analito é obtida por interpolação ou calculada pela equação da curva de calibração.

Usando ponto único de calibração

Geralmente, em monografias individuais, é preconizado o preparo de uma solução padrão com concentração dentro da faixa linear da curva de calibração e uma solução amostra com concentração próxima àquela da solução padrão, ambas contendo uma quantidade fixa de padrão interno. A análise cromatográfica é realizada sob as mesmas condições para determinar a quantidade do composto a ser analisado, comparando as razões obtidas.

◊Nos casos em que a padronização interna é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$C_a = C_p(R_a/R_{ai})/(R_p/R_{pi})$$

em que,

R_{ai} = resposta (área ou altura do pico) do padrão interno na solução amostra;

R_{pi} = resposta (área ou altura do pico) do padrão interno na solução padrão.

R_a = resposta (área ou altura do pico) da solução amostra; e

R_p = resposta (área ou altura do pico) da solução padrão.◊

Procedimento de normalização

Desde que a linearidade da resposta dos picos tenha sido demonstrada, as monografias individuais podem preconizar o cálculo do teor percentual de um componente da substância a ser examinada pela determinação da área do pico correspondente como uma porcentagem da área total de todos os picos. Devem ser excluídos picos referentes a solventes ou reagentes, decorrentes da fase móvel ou da matriz da amostra, e aqueles que tenham resposta igual ou abaixo do limite de exclusão do equipamento (*disregard limit*) ou do limite de notificação para a impureza (*reporting threshold*).

CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

Resposta do detector

A sensibilidade do detector é o sinal de saída por unidade de concentração ou unidade de massa de uma substância na fase móvel que passa pelo detector. O fator de resposta relativo do detector, comumente referido apenas como fator de resposta, expressa a sensibilidade do detector para uma determinada substância em relação a uma substância padrão. O fator de correção é o inverso do fator de resposta.

Em ensaios para substâncias relacionadas, quaisquer fatores de correção indicados na monografia são aplicados (isto é, quando o fator de resposta está fora do intervalo 0,8 a 1,2).

Picos interferentes

Picos referentes a solventes e reagentes ou provenientes da fase móvel ou da matriz da amostra devem ser desconsiderados.

Integração de picos

A integração da área do pico de qualquer impureza que não esteja completamente separada do pico principal é preferencialmente realizada pela técnica de integração denominada deslize tangencial (*tangential skim*).

Limite de notificação

Quando o ensaio de substâncias relacionadas preconiza um limite para o total de impurezas ou uma determinação quantitativa de uma impureza, é importante selecionar um limite de notificação apropriado para a impureza (*reporting threshold*) e definir condições apropriadas para a integração das áreas dos picos.

Em tais ensaios, o limite de notificação, ou seja, o limite acima do qual um pico é registrado, é geralmente 0,05%.

5.2.17.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste em um sistema cromatográfico no qual a separação dos componentes de uma mistura ocorre através da migração diferencial sobre uma fase estacionária composta por uma fina camada de adsorvente aplicado sobre um suporte plano (cromatoplaca), o qual pode ser constituído de diversos materiais como vidro, alumínio ou poliéster. A fase móvel por sua vez é constituída por diversas misturas de solventes e permanece no interior de um recipiente ou cuba de material transparente e inerte, geralmente vidro, permanecendo vedada, onde se deposita a cromatoplaca em posição vertical sob uma atmosfera saturada da fase móvel.

EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS

Os equipamentos utilizados para a cromatografia em camada delgada consistem em: placa, cuba ou câmara de eluição, fase estacionária, fase móvel e sistema revelador. Os tamanhos das placas usualmente utilizadas são de: 20 cm x 20 cm; 10 cm x 20 cm; 10 cm x 10 cm; 5 cm x 10 cm.

Fases estacionárias (adsorventes)

Sílica – É o adsorvente mais amplamente utilizado na CCD. É amorfo e poroso, sendo usado também na cromatografia em coluna. Entretanto, a partícula da sílica utilizada em CCD é menor. A sílica é preparada por polimerização espontânea e desidratação do ácido silícico. As substâncias são adsorvidas pela sílica via ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo. Uma sílica de condição satisfatória é aquela com 11 a 12% de água em peso. Este nível de umidade é alcançado quando a sílica está em equilíbrio com o ar, a uma umidade relativa de 50% e uma temperatura de 20 °C.

As sílicas comerciais possuem tamanhos de poros variáveis, entre 40 e 150 Ångstrons (Å). Os tamanhos de partículas variam de 5 a 40 µm, com média de 10 a 15 µm, dependendo do fabricante.

Reduzindo-se o tamanho da partícula, aumenta-se a eficiência da sílica. Partículas de tamanho de 5 a 6 µm são utilizadas para preparar placas de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE). Os tamanhos de poros afetam a seletividade e, portanto, podem ser utilizados para modular as taxas de migração e resolução dos componentes das amostras.

Os tamanhos dos poros das sílicas mais comuns encontradas comercialmente são de 40, 60, 80 e 100 Å, sendo a sílica com poro de 60 Å a mais versátil e amplamente utilizada. As sílicas são utilizadas para a separação de compostos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcaloides, terpenoides e esteroides, por meio do mecanismo de adsorção.

Alumina – Depois da sílica, é o adsorvente mais utilizado. As propriedades físicas da alumina são similares àquelas da sílica em termos de tamanho de partícula, diâmetro médio do poro e superfície. São disponíveis comercialmente alumina ácida (pH 4,0 a 4,5), neutra (pH 7,0 a 8,0) e básica (pH 9,0 a 10,0). Assim como a sílica, a alumina separa os componentes das amostras por polaridade, por meio de ligações de hidrogênio, interação ácido-base de Lewis ou interações dipolo-dipolo. A seletividade da alumina na CCD de adsorção é similar à sílica-gel, sendo a alumina um adsorvente melhor que a sílica para a separação de substâncias ácidas lipofílicas. A alumina de caráter ácido atrai fortemente substâncias básicas, enquanto a alumina de caráter básico atrai mais fortemente substâncias ácidas. A alumina retém substâncias aromáticas mais fortemente que a sílica-gel, porém tem o inconveniente de promover a catálise de algumas reações de substâncias lábeis. A alumina é empregada na separação de vitaminas lipossolúveis, alcaloides, certos antibióticos e hidrocarbonetos policíclicos.

Kieselguhr - É a terra diatomácea termicamente tratada, de granulação de 5 a 40 µm. Seu principal constituinte é dióxido de silício (SiO₂), sendo que uma variedade de outros compostos inorgânicos também estão presentes. Os tamanhos dos poros são muito variáveis e suas características a tornam adequada para a separação de açúcares, aminoácidos e outras substâncias polares similares.

Celulose - É um polissacarídeo altamente polimerizado constituído por monômeros de glicose. A presença de grande número de grupos hidroxila livre permite ligações de hidrogênio com líquidos de baixa massa molecular como água e álcoois. A celulose é, portanto, adequada para a separação de substâncias hidrofílicas, tais como carboidratos e aminoácidos.

Poliâmida - Em contraste com a celulose, a poliâmida é uma resina sintética. Dois tipos de poliâmida são utilizados: poliâmida 6 e poliâmida 11. A poliâmida 6 tem origem a partir da aminopolicaprolactama, enquanto a poliâmida 11 é preparada a partir do ácido poliaminoundecanóico. Poliâmidas são utilizadas para a separação de compostos polares que são capazes de interagir com o grupo amida por ligações de hidrogênio. Dentre eles estão aminoácidos e derivados, benzodiazepínicos, ácidos carboxílicos, ciclodextrinas, ácidos graxos, flavonoides e conservantes.

Silicato de magnésio – É um adsorvente utilizado para a separação de açúcares, antraquinonas, flavonas, glicosídeos, esteroides, lipídeos, vitaminas, carbazois e acetato de hidrocortisona, entre outras substâncias.

Reveladores e métodos de detecção

Após o desenvolvimento da cromatografia e a evaporação dos solventes, procede-se ao método de revelação das manchas, que pode ser físico ou químico. Como método físico, a luz ultravioleta (UV) é comumente empregada no caso de substâncias que se tornam fluorescentes quando excitadas por luz UV ou visível (usualmente lâmpadas com emissão de radiação de 254 ou 366 nm). Os métodos químicos compreendem a utilização de reagentes cromógenos. Há uma ampla lista de reveladores apropriados para cada grupo de substâncias.

Interpretação

A posição final de cada mancha é designada pelo fator de retardo (R_f). Após a revelação da cromatoplaca, mede-se a distância atingida por cada mancha a partir da origem. Essa distância é uma fração da distância total percorrida pelo solvente na fase estacionária.

5.2.17.2 CROMATOGRAFIA EM PAPEL

A cromatografia em papel (CP) é uma técnica de separação cromatográfica na qual a separação dos componentes de uma mistura ocorre através da migração diferencial sobre a superfície do papel cromatográfico (fase estacionária). A separação dos componentes ocorre devido ao mecanismo de partição entre a mistura e o conteúdo intrínseco de água no papel, ou a inibição seletiva do componente hidrofílico da fase móvel pelas fibras do papel. A fase móvel, por sua vez, é constituída por um solvente ou misturas de solventes que permanecem no interior de um recipiente ou cuba de material transparente e inerte, geralmente vidro, permanecendo vedada, onde se posiciona o papel cromatográfico em posição vertical, sob uma atmosfera saturada de fase móvel.

O cromatograma é desenvolvido pela passagem lenta da fase móvel sobre a camada de papel. O desenvolvimento pode ser ascendente, no caso de solvente carregado para cima através de forças capilares, ou descendente, no caso em que o fluxo do solvente é auxiliado pela força da gravidade.

Este método é útil para separar substâncias polares, como açúcares e aminoácidos. Possui a limitação da aplicação de pequena quantidade da mistura por vez. Deve-se trabalhar nas condições mais próximas possíveis, de qualidade e quantidade, entre padrão e amostra, usando-se o mesmo papel, fase móvel, temperatura, etc.

EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTOS

Os equipamentos utilizados para a cromatografia em papel consistem em: cuba ou câmara de eluição, fase estacionária, fase móvel e sistema revelador. A cuba deve ser provida de bordas e tampa esmerilhadas e de dimensões adequadas para conter o papel cromatográfico.

Para cromatografia descendente, utilizar cuba com tampa provida de orifício central, fechado por rolha de vidro ou outro material inerte. Na parte superior da cuba, há uma cubeta suspensa, que contém dispositivo para prender o papel (geralmente haste ou bastão de vidro). De cada lado da cubeta há guias de vidro, que sustentam o papel, de modo a não tocar nas paredes da cuba cromatográfica. A largura do papel cromatográfico não pode ser superior àquela da cubeta suspensa e a altura deve ser aproximadamente igual à altura da câmara cromatográfica.

Para cromatografia ascendente, na parte superior da cuba há dispositivo que permite sustentar o papel cromatográfico e que pode descer sem abrir a câmara cromatográfica. A largura do papel cromatográfico não pode ser superior à da cuba.

O papel para cromatografia deve ser cortado no sentido das fibras em tiras de comprimento variável e largura de, no mínimo, 2,5 cm. Existem diversos tipos de papel para cromatografia com finalidades diferentes, por exemplo, para separação de substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas, orgânicas ou inorgânicas, anfóteras ou com muitas hidroxilas, entre outras.

As soluções devem ser aplicadas na forma de manchas circulares (utilizam-se tubos capilares ou micropipetas), contendo de 1 a 20 μg da amostra, sobre a linha traçada com lápis. Dependendo da largura do papel, pode-se colocar apenas uma alíquota do padrão ou da amostra, centralizando-se esta aplicação na linha de partida. No caso da possibilidade de colocar-se mais de uma alíquota no ponto de partida, deixa-se 2 cm de distância das bordas laterais e um intervalo entre os pontos de aplicação de 3 cm. Se cada mancha produzida for maior que 6 a 10 mm, pode-se aplicar a amostra em porções, deixando-se evaporar o solvente antes de aplicar a porção seguinte.

O nível da fase móvel deve ficar abaixo do ponto de partida da substância, devendo, sempre, haver uma boa vedação da cuba cromatográfica para que ela se mantenha saturada. No final da corrida, esperar secar o papel e submetê-lo a processo de revelação.

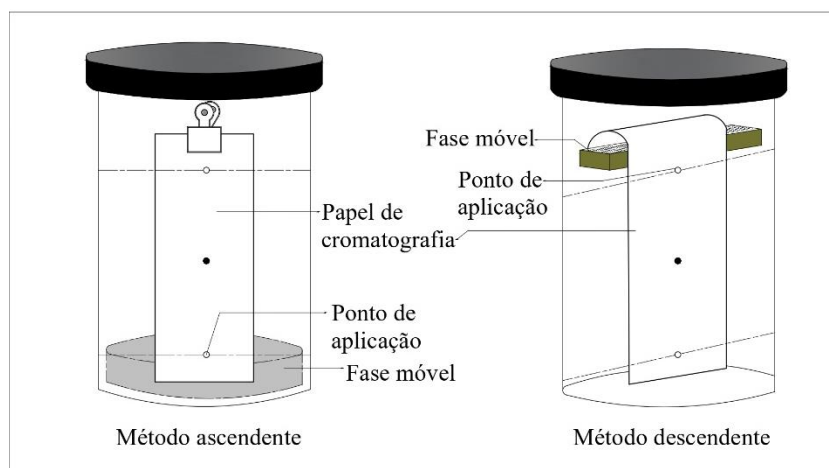


Figura 1 - Diferentes tipos de cromatografia em papel de acordo com as técnicas de desenvolvimento.

CROMATOGRAFIA ASCENDENTE

A forma mais simples da cromatografia em papel é a cromatografia ascendente, que utiliza uma tira de papel de comprimento e largura variáveis, em função das dimensões da cuba cromatográfica a ser utilizada.

O fluxo ascendente da fase móvel sobre o papel cromatográfico é obtido pela ação da capilaridade.

Manipula-se o papel com cuidado e pelas pontas, e cortam-se tiras em tamanhos que possam ser contidos nas cubas. É importante cortar o papel seguindo o eixo das fibras, pois a celulose está orientada neste sentido, o que facilitará a passagem da fase móvel. Traçar linha fina com lápis a 3 cm da borda inferior do papel para aplicação das amostras e delimitação do ponto de partida.

Introduzir na câmara uma porção do eluente especificado na monografia, fechar a cuba e mantê-la em repouso por até 24 horas, ou de acordo com a monografia. Aplicar a amostra no papel introduzindo-o na cuba e deixar em repouso por uma hora e meia. Sem abrir a câmara, baixar o papel de modo a colocar sua extremidade inferior em contato com o eluente e desenvolver o cromatograma até a distância ou tempo indicados na monografia. Retirar o papel, marcar o percurso do eluente, assim como a linha de chegada da fase móvel (ou frente do solvente), geralmente distando 10 cm do ponto de partida, secar e visualizar da maneira indicada na monografia.

CROMATOGRAFIA DESCENDENTE

Nesta técnica cromatográfica, a fase móvel possui um fluxo descendente e conta com a ação da gravidade.

Assim como na cromatografia ascendente, é importante manipular o papel com cuidado, cortar as tiras em tamanhos que possam ser contidos nas cubas seguindo o eixo das fibras e traçar linha para aplicação das amostras a uma distância que garanta que a mesma fique poucos centímetros abaixo da vareta que prende o papel na cubeta do eluente.

Introduzir na câmara uma porção do eluente especificado na monografia, tampar e deixar em repouso por até 24 horas, ou de acordo com a monografia. Aplicar a amostra no papel, colocando-o adequadamente sobre as guias de maneira que a extremidade superior permaneça dentro da cubeta suspensa e prendê-lo com a vareta de vidro. Ao adicionar o papel na cuba é importante que não se deixe escapar os vapores da fase móvel, além de cuidar para que a amostra não entre em contato direto com o eluente, deixando que ascenda ou descenda pela superfície do papel, apenas por capilaridade. Fechar a cuba e deixar em repouso por uma hora e meia. Em seguida, através do orifício na tampa, introduzir o eluente na cubeta. Desenvolver o cromatograma até a distância ou tempo indicados, protegendo o papel da incidência de luz direta. Remover o papel, marcar o percurso da fase móvel, assim como marcar a linha de chegada da fase móvel (ou frente do solvente), geralmente distando 10 cm do ponto de partida, secar e visualizar da maneira indicada na monografia.

5.2.17.3 CROMATOGRAFIA EM COLUNA ABERTA

Cromatografia em coluna aberta (CCA) é um método cromatográfico de separação que desempenha um papel importante na purificação de substâncias na pesquisa, na operação de planta piloto e na produção de produtos farmacêuticos. É um método que pode ser utilizado, de maneira rápida e econômica, para a obtenção de substâncias com pureza elevada. Usualmente são utilizados adsorventes padronizados, pois fornecem um alto grau de confiabilidade do método, a transferência direta de escala de análise e um processamento otimizado. Os tipos de cromatografia em coluna aberta podem ser: por adsorção (líquido-sólido), por partição (líquido-líquido) ou por troca iônica.

EQUIPAMENTO

Os aparatos utilizados na cromatografia em coluna aberta consistem em: tubo cromatográfico cilíndrico de vidro (ou outro material inerte e transparente especificado na monografia individual), de comprimento e diâmetros variáveis e utilizado na posição vertical. Em sua parte inferior, há um estrangulamento (redução da passagem) onde usualmente existe uma torneira ou outro dispositivo para regulagem da vazão dos solventes utilizados para a eluição. Algumas colunas apresentam em sua base (parte inferior), um disco de vidro poroso, com a finalidade de evitar a saída da fase estacionária. As colunas têm dimensões variáveis, porém, as faixas mais comumente utilizadas são de 10 a 30 mm de diâmetro em seu corpo e de 3 a 6 mm na sua parte inferior, onde a torneira encontra-se acoplada. O comprimento do tubo é usualmente de 150 a 400 mm. Na parte superior da coluna pode haver uma dilatação de forma esférica, destinada a conter um maior volume de eluente, seguido de uma conexão esmerilhada, cilíndrica, que possibilita o encaixe de uma tampa cilíndrica de plástico, de vidro, aço inoxidável, alumínio ou outro material especificado na monografia individual.

PROCEDIMENTO

Cromatografia em coluna aberta por adsorção

Iniciar o preparo da coluna vedando a parte inferior da coluna, próxima à torneira, se necessário, com um pedaço de algodão ou lã de vidro a fim de impedir a passagem do material adsorvente e a entrada de ar, evitando a formação de bolhas. Preencher uniformemente a coluna (conforme altura especificada na monografia), com o material adsorvente (alumina ativada, sílica-gel, terra diatomácea, sílica calcinada, entre outros), previamente suspensa na fase móvel (sistema de solventes), realizando a retirada do excesso do eluente. Após a sedimentação do material adsorvente, aplicar a amostra ou mistura de substâncias previamente solubilizadas em uma pequena quantidade do eluente, no topo da coluna, até que permeie no material adsorvente. Uma pequena quantidade de solvente pode ser adicionada ao topo para ajudar a permeação das substâncias no material adsorvente, deixando-se, em seguida, eluir por ação da gravidade ou pela aplicação de ar comprimido para produzir uma

pressão positiva, ficando a mistura contida em uma estreita faixa horizontal no topo da coluna. A taxa de movimentação de uma substância é determinada ou afetada por diversas variáveis, incluindo a baixa ou alta interação das substâncias ao material adsorvente, o tamanho de partícula e a sua área superficial, a natureza e a polaridade do solvente, a pressão aplicada e a temperatura do sistema cromatográfico.

Um cromatograma de fluxo é obtido por um processo em que solventes percorrem a coluna, até que a substância seja carregada e separada na solução efluente, conhecida como eluato. O eluato é controlado, recolhendo-se frações conforme especificado na monografia e examinando-se cada fração por método adequado. A substância pode ser determinada no eluato por vários métodos: titulação, colorimetria, espectrometria ou ser isolada (purificada) quando da evaporação do solvente. A eficiência da separação pode ser aferida por cromatografia em camada delgada (CCD) de cada fração recolhida ao longo da corrida cromatográfica.

O eluente pode ser mantido fixo durante todo o processo (eluição em modo isocrático) ou pode-se aumentar gradativamente a polaridade do eluente, de forma a aumentar o poder de arraste de substâncias polares (eluição em modo gradiente).

Cromatografia em coluna aberta por partição

Na cromatografia em coluna aberta por partição, as substâncias a serem separadas são particionadas entre dois líquidos imiscíveis, um dos quais, a fase estacionária, é adsorvido em um suporte sólido ou quimicamente ligado a este, apresentando assim uma área de contato bastante ampla para o solvente circulante ou fase móvel. O elevado número de sucessivos contatos entre líquido-líquido permite uma separação efetiva, a qual não ocorre com a mesma eficiência através da extração líquido-líquido convencional.

O suporte sólido mais utilizado consiste em sílica para cromatografia, cujo tamanho de partícula deve ser adequado para a vazão apropriada do eluente. Na cromatografia de partição, a fase estacionária adsorvida é menos polar do que a fase móvel (fase reversa), e o adsorvente sólido torna-se apolar por tratamento com um agente silanizante (ex.: dimetiloctilclorosilano, dimetiloctadecilclorosilano, entre outros), para produzir uma sílica de fase reversa. Também podem ser utilizadas fases estacionárias poliméricas.

A amostra geralmente é inserida na coluna do sistema cromatográfico por partição de duas maneiras: (a) uma solução da amostra é adicionada a um pequeno volume da fase móvel e transferida para o topo da coluna; ou (b) uma solução da amostra é adicionada em um pequeno volume da fase estacionária, dispersada no suporte sólido e transferida para o topo da coluna, formando uma camada transversal sobre a fase estacionária.

A fase estacionária deve ser saturada com o solvente (fase móvel) antes do uso. No caso de cromatografia de partição líquido-líquido convencional, o grau de partição de um determinado composto entre as duas fases líquidas é expresso por meio de seu coeficiente de partição ou distribuição.

No caso de substâncias que se dissociam, pode-se controlar a distribuição ao modificar o pH, a constante dielétrica, a força iônica, entre outras propriedades das duas fases. A eluição seletiva dos componentes da mistura pode ser alcançada com a substituição da fase móvel por um eluente que proporcione um coeficiente de partição mais adequado.

Salvo disposição contrária da monografia individual, ensaios e testes empregando cromatografia de partição em coluna aberta são realizados em consonância com os métodos convencionais descritos a seguir.

Suporte sólido — Utilizar terra diatomácea purificada. Para cromatografia de partição em fase reversa, utilizar terra diatomácea cromatográfica ou outra especificada na monografia.

Fase estacionária — Utilizar o solvente ou solução especificados na monografia individual. Se for utilizada uma mistura de líquidos na fase estacionária, misturar antes de introduzir o suporte sólido.

Fase móvel — Utilizar o solvente ou solução especificados na monografia individual. Equilibrar a coluna com a fase móvel.

Cromatografia em coluna por troca iônica

Utilizar como fase estacionária resina de troca iônica. A troca de íons consiste em intercâmbio reversível de íons presentes na solução com íons do polímero resinoso. A escolha da resina, forte ou fraca, aniônica ou catiônica, dependerá em grande parte do pH no qual deverá ocorrer a troca iônica e da natureza dos íons (ânions ou cátions) a serem trocados. As resinas fortemente ácidas e ou fortemente básicas são convenientes para a maioria das aplicações analíticas. Emprega-se, na prática, grande excesso (200% a 300%) de resina sobre a quantidade da amostra estequiometricamente calculada; a capacidade das resinas varia de 2 mM/g a 5 mM/g peso seco.

Tratamento da resina e preparo da coluna - Suspender a resina de troca iônica em água e deixar em repouso por 24 horas. Introduzi-la em coluna adequada e, tratando-se de resina aniônica, convertê-la em básica passando pela coluna, solução de hidróxido de sódio SR, à velocidade de 3 mL/minuto, até que o eluato forneça reação negativa para íon cloreto. Passar, em seguida, água isenta de dióxido de carbono. Em caso de resina catiônica, a conversão para a forma ácida se dá pela passagem de ácido clorídrico SR pela coluna, seguida de lavagem com água isenta de dióxido de carbono até que o eluato forneça reação neutra.

Desenvolve-se coluna de troca iônica de maneira análoga àquela descrita para cromatografia de adsorção. Terminada a análise, regenera-se a resina lavando-a com hidróxido de sódio SR (colunas aniônicas) ou com ácido clorídrico SR (colunas catiônicas) e, em seguida, com água isenta de dióxido de carbono até que forneça reação neutra.

5.2.17.4 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, que pode ser um sólido adsorvente, uma fase estacionária quimicamente ligada a um suporte, uma resina ou outra fase estacionária apropriada, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho, imunoafinidade ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A CLAE apresenta vantagens sobre a cromatografia a gás para as análises de misturas de compostos orgânicos. Amostras de substâncias não voláteis e termolábeis são, preferencialmente, analisadas por CLAE. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição e deve ocorrer em tempo curto de análise. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel e da composição e área superficial da fase estacionária.

APARELHAGEM

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um *software*, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o detector, *softwares* são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise.

Os sistemas cromatográficos modernos consistem em bombas para pressurizar a fase móvel, controladas por *software*, que podem ser programadas para variar a relação de componentes da fase móvel, como é requerido para a cromatografia por gradiente de solvente, ou para misturar, de forma isocrática, a fase móvel (fases móveis com relação fixa de solventes).

Pressões operacionais de até 5800 psi (cerca de 400 bar) e fluxo de até 10 mL por minuto podem ser utilizadas. Pressões superiores ficam condicionadas à evolução do instrumental e são comuns quando fases estacionárias com partículas menores que 5 µm são utilizadas, como na técnica conhecida como cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE) que utiliza pressões da ordem de 10 000 psi (cerca de 700 bar).

Após dissolver a amostra na fase móvel ou em outro solvente adequado, a solução é injetada no sistema cromatográfico, de forma manual, utilizando seringa apropriada, ou por meio de um injetor ou amostrador automático. Este consiste em um carrossel ou bandeja, capaz de acomodar diversos frascos contendo as amostras. Alguns amostradores automáticos podem ser programados para injetar diferentes volumes de amostra, diversas quantidades de injeções, controlar o intervalo entre injeções e outras variáveis operacionais.

Quando se trabalha a altas pressões, uma válvula de injeção é essencial. Essa apresenta um sistema calibrado, com volume definido, denominado anel de injeção ou alça de amostragem, que será preenchido com a solução a ser analisada que, posteriormente, será transferida para a coluna.

Para a maioria das análises farmacêuticas, a separação é alcançada por partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre as fases móvel e estacionária. Sistemas que consistem em fases estacionárias a base de sílica polares e fases móveis apolares são definidos como *cromatografia em fase normal*, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados *cromatografia em fase reversa*. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel.

As fases estacionárias utilizadas em *cromatografia em fase reversa* consistem, tipicamente, de uma molécula orgânica quimicamente ligada às partículas de sílica ou outros suportes, como grafita porosa. O diâmetro das partículas é de, normalmente, 3 µm a 10 µm. Quanto menor o diâmetro das partículas e a película que recobre o suporte, mais rápida e eficiente será a transferência das substâncias entre as fases estacionária e móvel. A polaridade da coluna depende dos grupos funcionais presentes, sendo os mais comuns os grupos apolares *octil*, *octadecil*, *fenil*, *cianopropil* e polar, *nitrila*. A proporção de grupos silanóis não ligados ao grupo funcional influencia, significativamente, na eficiência da separação cromatográfica e no formato do pico eluído. Comercialmente, estão disponíveis colunas cromatográficas com diferentes qualidades de fases estacionárias, inclusive aquelas com pequena proporção de grupos silanóis livres, denominadas *capeadas*. Geralmente, colunas de sílica em fase reversa apresentam vida útil na faixa de pH de 2 a 8, entretanto, colunas contendo grafita porosa ou materiais poliméricos, como o estireno-divinilbenzeno, são estáveis em uma faixa mais ampla de pH. De forma menos comum, podem ser utilizados líquidos, não ligados, como revestimento do suporte de sílica e, portanto, devem ser imiscíveis com a fase móvel. As colunas normalmente usadas para separações analíticas têm diâmetros internos de 1 mm a 5 mm. Essas podem ser aquecidas, proporcionando separações mais eficientes, mas só raramente são utilizadas temperaturas superiores a 60 °C, devido ao potencial de degradação da fase estacionária ou à volatilidade da fase móvel. A menos que especificado na monografia da substância a ser analisada, as colunas são utilizadas em temperatura ambiente.

Os detectores mais frequentemente utilizados em cromatografia a líquido de alta eficiência são os espectrofotométricos (UV-Vis), utilizados para detectar substâncias com grupamento cromóforo. Tais detectores consistem em uma célula de fluxo localizada após a coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta atravessa constantemente a célula de fluxo e é recebida no detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, tipicamente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Aqueles com comprimento de onda variável contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio de alta pressão, e um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática de um comprimento de onda selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Os

detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta ou visível é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus diferentes comprimentos de onda, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada ponto do pico registrado no cromatograma.

Os detectores de índice de refração medem a diferença entre o índice de refração da fase móvel pura e da fase móvel contendo a substância a ser analisada. São utilizados para detectar substâncias que não absorvem no ultravioleta ou visível, entretanto, são menos sensíveis que os detectores espectrofotométricos. Os detectores de índice de refração apresentam a desvantagem de serem sensíveis a pequenas mudanças da composição dos solventes da fase móvel, taxa de fluxo e temperatura.

Os detectores fluorimétricos são utilizados para detectar compostos com grupamento fluoróforo ou que podem ser convertidos em derivados fluorescentes, por transformação química ou adicionando reagentes fluorescentes a grupos funcionais específicos. Se a reação química é requerida, pode-se realizá-la no momento da preparação da amostra ou, alternativamente, o reagente pode ser introduzido na fase móvel, com a reação ocorrendo antes da detecção.

Os detectores potenciométricos, voltamétricos ou eletroquímicos são úteis para quantificação de substâncias que podem ser oxidadas ou reduzidas em um eletrodo. Esses detectores são altamente seletivos, sensíveis e seguros, mas requerem fases móveis livres de oxigênio e livres de íons de metais redutíveis. Uma bomba de fluxo contínuo deve ser utilizada, assegurando que o pH, a força iônica, e a temperatura da fase móvel permaneçam constantes. Detectores eletroquímicos com eletrodos específicos de carbono podem ser utilizados, vantajosamente, para quantificar substâncias facilmente oxidáveis em concentrações da ordem de nanogramas, como fenóis e catecóis.

Na detecção por espectrometria de massas (EM), mede-se a razão massa/carga (m/z) do íon precursor de uma substância. O íon precursor é gerado a partir da protonação da substância (modo positivo), da desprotonação (modo negativo) ou, ainda, da formação de íons aduto de sódio, potássio, formiato, entre outros. A combinação da espectrometria de massas com a cromatografia a líquido proporciona uma boa seletividade, uma vez que picos não resolvidos podem ser isolados monitorando-se um valor de razão massa/carga (m/z) selecionada. As fontes de ionização mais comumente empregadas no acoplamento CLAE-MS são as do tipo "ionização por *electrospray*" (ESI) e a "ionização química à pressão atmosférica" (APCI). Os espectrômetros de massas podem possuir apenas um analisador de massas, como um quadrupolo simples, ou sequencial, também referido como em *tandem*, (MS/MS), como um triplo quadrupolo, quando se associam dois analisadores de massas. Neste caso, é possível fragmentar o íon precursor em uma célula de colisão localizada antes do segundo analisador de massas. Dessa forma, o monitoramento das transições de massa (íon precursor → íon produto), geralmente específicas para cada analito, possibilita a análise com elevada seletividade, uma vez que é possível obter um cromatograma para cada transição de massa.

Os detectores de condutividade têm aplicação na cromatografia de troca iônica e medem a condutividade da fase móvel continuamente, que é modificada na presença de analitos na célula de fluxo.

Atualmente, sistemas de coleta de dados modernos estão disponíveis com as funções de receber e armazenar os sinais provenientes do detector e, posteriormente, proporcionar o manejo dessas informações, gerando os cromatogramas com os dados de área e altura do pico, identificação da amostra, métodos, entre outras. As informações também podem ser coletadas em sistemas simples de gravação de dados, como registradores, para a garantia da integridade dos dados gerados.

PROCEDIMENTO

O comprimento e o diâmetro interno da coluna, o tipo e o tamanho das partículas da fase estacionária, a temperatura de operação, a composição e a vazão da fase móvel e o tipo de detecção são descritos nas monografias individuais.

A composição da fase móvel tem influência significativa na eficiência cromatográfica e na separação das substâncias presentes na solução a ser analisada. Para uma análise quantitativa precisa, reagentes de elevado grau de pureza ou solventes orgânicos de pureza cromatográfica devem ser utilizados. A água, de qualidade adequada, deve apresentar baixa condutividade e baixa absorção no ultravioleta. Na cromatografia de partição, o coeficiente de partição e, conseqüentemente, a separação podem ser modificados pela adição de outro solvente à fase móvel. Na cromatografia de troca-iônica, a retenção das substâncias é afetada pelo pH, pela força iônica e por outras modificações na composição da fase móvel. A técnica de modificar continuamente a composição dos solventes da fase móvel durante a corrida cromatográfica é denominada de eluição em gradiente, e é aplicada para separar misturas complexas de substâncias com diferentes fatores de retenção. Entretanto, detectores que são sensíveis a modificações na composição da fase móvel, como os refratômetros, têm sua utilização limitada com a técnica de eluição em gradiente.

O detector deve apresentar uma ampla faixa linear e as substâncias a serem analisadas devem estar separadas de qualquer interferente. A faixa linear para uma substância é aquela na qual a resposta do detector é diretamente proporcional à sua concentração.

5.2.17.4.1 CROMATOGRAFIA DE ÍONS

A cromatografia de íons refere-se ao método de separação e determinação de íons utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Esta técnica é baseada em um processo de separação dos componentes da amostra entre duas fases: fase móvel e fase estacionária. O processo de separação é resultante de interações específicas entre as espécies presentes na amostra em ambas as fases. O mecanismo de interação com a fase estacionária é a troca iônica, onde as colunas utilizadas são constituídas por um grupo funcional carregado, geralmente SO_3^- , COO^- , NH_3^+ , NR_3^+ ligado a uma matriz polimérica, como sílica ou copolímero do tipo poliestireno-divinilbenzeno. A fase móvel também contém espécies iônicas, ocorrendo, desta forma, uma competição entre a distribuição das espécies presentes na amostra entre a fase móvel e a fase estacionária. Para cada íon, o processo de troca é caracterizado pelo equilíbrio de distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária.

Os trocadores utilizados podem ser classificados em fortes, médios e fracos, dependendo do grupo funcional ligado à matriz polimérica. Os trocadores iônicos fortes são aqueles que se ionizam completamente em uma ampla faixa de pH, como o grupo sulfônico e o amônio quaternário. O grau de dissociação dos trocadores iônicos fracos e médios é dependente do pH e, desta forma, a capacidade destes trocadores varia em função do pH. Pode-se citar como exemplo, o grupo ácido carboxílico e poliamina.

Esta técnica permite que a condutividade elétrica seja usada para a detecção e a determinação quantitativa dos íons em solução, após a separação. Geralmente, a cromatografia de íons com coluna de troca aniônica e detector por condutividade pode ser utilizada para a determinação dos íons F^- , Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , I^- , entre outros. Em virtude da condutividade elétrica ser uma propriedade comum a todas as espécies iônicas em solução, o detector por condutividade tem a capacidade de monitorar todas as espécies iônicas. Um dos problemas que podem ocorrer na utilização da condutividade elétrica para quantificar as espécies iônicas eluídas pode ser causado pela alta condutividade dos íons presentes na fase móvel, principalmente devido ao íon sódio, impossibilitando a quantificação de outros íons. Este problema é superado com o uso de um supressor do eluente, posicionado após a coluna de separação, onde ocorre a conversão dos íons do eluente em espécies que contribuam para uma condutância baixa ou nula. O ácido carbônico, resultante da troca catiônica, é fracamente dissociado, possuindo uma baixa condutividade (sinal de condutividade da linha base é menos significativo). Desta forma, a sensibilidade, para a determinação de ânions, pode ser aumentada significativamente, em um fator de 10 vezes ou superior, quando são utilizados supressores.

Um equipamento de cromatografia de íons consiste, basicamente, no mesmo sistema utilizado para CLAE. Este sistema consiste em uma bomba de alta propulsão, uma válvula de injeção com alça de amostragem adequada, coluna de separação (para a separação de ânions deve ser utilizada uma coluna de troca aniônica), uma pós-coluna, caso necessário, para conversão dos íons do eluente em espécies com menor condutividade e um detector de condutividade.

PROCEDIMENTO

Para operar o cromatógrafo de íons, recomenda-se seguir as instruções do fabricante. As determinações quantitativas são feitas por comparação com soluções de referência, contendo concentrações conhecidas do analito.

Fase móvel: preparar a fase móvel de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante da coluna de troca aniônica utilizada. Recomenda-se a utilização de fase móvel composta por uma mistura de carbonato e bicarbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$), na faixa de concentração de 1,0 a 4 mmol/L, dependendo da coluna utilizada. Utilizar a vazão da fase móvel recomendada pelo fabricante do equipamento e de acordo com as dimensões da coluna de troca iônica utilizada. Durante as análises utilizando a detecção por condutividade, regenerar a coluna de supressão química, conforme recomendação do fabricante. Recomenda-se a utilização de H_2SO_4 0,005 M e posterior lavagem com água purificada.

Calibração: preparar soluções de referência da substância a ser determinada, abrangendo a faixa de concentração recomendada pelo fabricante do equipamento para o analito em análise e injetar, separadamente, cada solução de referência no equipamento, utilizando alça de amostragem adequada. Recomenda-se o uso de alça de amostragem de 20 μL a 100 μL . Registrar os cromatogramas e integrar os sinais em área ou em altura do pico. Em seguida, traçar a curva de calibração. Preparar a solução da amostra conforme indicado na monografia, ajustando sua concentração para que esta fique situada dentro da faixa de concentração das soluções de referência. Injetar a amostra no cromatógrafo, registrar a leitura e repetir esta sequência três vezes, adotando a média das três leituras ou conforme especificado na monografia individual. Determinar a concentração do analito pela curva de calibração. Caso seja feita a determinação simultânea de vários ânions, podem ser feitas soluções de referência contendo todos os analitos.

5.2.17.5 CROMATOGRAFIA A GÁS

A cromatografia a gás (CG) é uma técnica de separação cromatográfica baseada na diferença de distribuição de 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. A CG é baseada no mecanismo de adsorção, distribuição de massa ou exclusão por tamanho. É aplicável às substâncias e seus derivados que se volatilizam nas temperaturas empregadas, e é utilizada para identificação, teste de pureza e determinação quantitativa.

Quando um constituinte vaporizado é conduzido pelo gás de arraste para dentro da coluna, ele é particionado entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária por um processo de distribuição contracorrente dinâmico, apresentando uma retenção maior ou menor devido a fenômenos de sorção e dessorção sobre a fase estacionária.

EQUIPAMENTO

O equipamento consiste em uma fonte de gás de arraste e um controlador de fluxo, uma câmara de injeção, uma coluna cromatográfica contida em um forno, um detector e um sistema de aquisição de dados (ou um integrador ou registrador). O gás de arraste passa pela coluna com fluxo e pressão controlados e segue diretamente para o detector.

O injetor, a coluna e o detector apresentam temperatura controlada. A cromatografia se realiza a temperatura constante ou se utilizando um programa de temperatura adequado. As substâncias a serem separadas por cromatografia, tanto em solução como gases, são injetadas, entrando em contato com o gás de arraste na câmara de injeção. Dependendo da configuração do equipamento, a mistura a ser analisada deve ser injetada diretamente na

coluna ou deve ser vaporizada na câmara de injeção e misturada no gás de arraste antes de entrar na coluna.

Uma vez na coluna, os constituintes da mistura são separados em função de seus diferentes índices de retenção linear, os quais são dependentes da pressão de vapor e do grau de interação com a fase estacionária. O índice de retenção, que define a resolução, o tempo de retenção e a eficiência da coluna em relação aos componentes da mistura, também é temperatura-dependente. O uso de programas de temperatura para o forno onde está a coluna apresenta uma vantagem na eficiência de separação dos compostos que se comportam diferentemente na pressão de vapor.

Os compostos saem separados da coluna, passando por um detector, que fornece uma resposta relacionada à quantidade de cada composto presente. O tipo de detector a ser utilizado depende da natureza das substâncias a serem analisadas e é especificado em cada monografia. Os detectores são aquecidos para evitar a condensação dos compostos eluídos. A saída do detector é dada em função do tempo de retenção, gerando um cromatograma, que consiste em uma série de picos no eixo do tempo. Cada pico representa uma substância da mistura vaporizada, embora alguns picos possam sair sobrepostos. O tempo de eluição é característico de uma substância individual e a resposta do instrumento, medida como a área do pico ou a altura do pico, é função da quantidade da substância vaporizada presente na mistura injetada.

Injetores

Injeções diretas de soluções é o modo usual de injeção, a menos que seja indicado diferentemente na monografia. A injeção pode ser realizada diretamente na cabeça da coluna utilizando uma seringa ou uma válvula de injeção, ou em uma câmara de vaporização que pode estar equipada com um divisor de fluxo. A quantidade de amostra que pode ser injetada em uma coluna capilar sem saturá-la é menor quando comparada à quantidade que pode ser injetada em colunas empacotadas. Colunas capilares, portanto, frequentemente são utilizadas com injetores capazes de dividir a amostra em duas frações (modo *split*), uma menor, que entra na coluna, e outra maior, que é descartada. Esses injetores podem ser utilizados sem divisor de amostra (modo *splitless*) para análises de componentes em menor quantidade ou em traços.

As injeções da fase de vapor podem ser efetuadas por sistema de injeção em espaço confinado (*headspace*) estático ou dinâmico.

Sistema de injeção em espaço confinado dinâmico (*purge and trap*) inclui um dispositivo de concentração, por onde as substâncias voláteis da solução são arrastadas até uma coluna adsorvente, mantida a baixa temperatura, onde são adsorvidas. As substâncias retidas são então dessorvidas na fase móvel por aquecimento rápido da coluna adsorvente.

Sistema de injeção em espaço confinado estático inclui uma câmara de aquecimento das amostras, termostaticamente controlada, na qual se colocam frascos (*vials*) fechados onde amostras sólidas ou líquidas são colocadas por um período de tempo determinado, para possibilitar que os componentes voláteis das amostras atinjam o equilíbrio entre a fase não gasosa e a fase de vapor. Depois de estabelecido o equilíbrio, uma quantidade predeterminada do espaço confinado do frasco é injetada no cromatógrafo.

Fases estacionárias

As fases estacionárias estão contidas em colunas, que podem ser:

- uma coluna capilar de sílica fundida cuja parede está revestida com a fase estacionária;
- uma coluna empacotada com partículas inertes impregnadas com a fase estacionária;
- uma coluna empacotada com a fase estacionária sólida.

As colunas capilares, usualmente feitas de sílica fundida, possuem um diâmetro interno (\varnothing) de 0,10 mm a 0,53 mm e um comprimento de 5 m a 60 m. A fase líquida ou estacionária, que pode estar quimicamente ligada à superfície interna, é um filme de 0,1 μm a 5,0 μm de espessura, embora fases estacionárias não polares possam atingir espessuras superiores.

As colunas empacotadas, de vidro ou metálicas, possuem comprimento de 1 m a 3 m, com um diâmetro interno de 2 mm a 4 mm. As fases estacionárias consistem, geralmente, de polímeros porosos ou suportes sólidos impregnados com a fase líquida chegando a, aproximadamente, 5% (p/p). Colunas de alta capacidade, com a fase líquida chegando a, aproximadamente, 20% (p/p), são utilizadas para uma ampla faixa de substâncias e para a determinação de substâncias com baixa massa molecular, como a água. A capacidade requerida influencia a escolha do suporte sólido.

Os suportes para análise de compostos polares em colunas empacotadas com uma fase estacionária de baixa polaridade e baixa capacidade devem ser inertes para evitar um excessivo prolongamento dos picos. A reatividade dos materiais de suporte pode ser reduzida por silanização antes do preenchimento com a fase líquida. Geralmente se utiliza terra de diatomáceas lavadas com ácido e calcinadas. Os materiais estão disponíveis em diversos tamanhos de partícula, sendo as partículas mais comumente utilizadas de 150 μm a 180 μm (80 mesh a 100 mesh) e de 125 μm a 150 μm (100 mesh a 120 mesh).

Fases móveis

O suprimento do gás de arraste pode ser obtido a partir de um cilindro de alta pressão ou por um gerador de gás de alta pureza. Em ambos os casos, o gás passa por uma válvula de redução de pressão e o fluxo é medido para, então, entrar na câmara de injeção e na coluna. O tempo de retenção e a eficiência do pico dependem da qualidade do gás de arraste; o tempo de retenção é diretamente proporcional ao comprimento da coluna e a resolução é proporcional à raiz quadrada do comprimento da coluna. Para colunas empacotadas, a média de fluxo do gás carreador é usualmente expressa em mililitros por minuto, à pressão atmosférica e à temperatura ambiente. O fluxo médio é medido na saída do detector, ou com um dispositivo mecânico calibrado ou com um tubo de "borbulhamento", enquanto a coluna está na temperatura de funcionamento. A velocidade linear do gás de arraste através da coluna empacotada é inversamente proporcional à raiz quadrada do diâmetro interno da coluna para um dado volume de fluxo. Fluxos de 60 mL/minuto em uma coluna de 2 mm de diâmetro interno e de 15 mL/minuto em uma coluna de 1 mm de diâmetro interno, proporcionam velocidades lineares idênticas e, com isso, tempos de retenção similares. A menos que especificado na monografia, a média de fluxo para colunas empacotadas é de, aproximadamente, 30 a 60 mL/minuto. Para colunas capilares, a velocidade do fluxo linear é usualmente utilizada ao invés da média de fluxo. Isso é determinado a partir do comprimento da coluna e do tempo de retenção de uma amostra de metano diluída, utilizando um detector por ionização de chama. Operando a altas temperaturas, existe pressão de vapor suficiente para que ocorra uma gradual perda da fase líquida, um processo chamado sangramento.

Hélio ou nitrogênio são, geralmente, empregados como gases de arraste para colunas empacotadas, enquanto nitrogênio, hélio e hidrogênio são utilizados para colunas capilares.

Detectores

Detectores por ionização de chama são os mais utilizados, mas, dependendo da finalidade da análise, outros detectores podem ser empregados, incluindo: condutividade térmica, captura de elétrons, nitrogênio-fósforo, espectrometria de massas, espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier, entre outros. Para análises quantitativas, os detectores devem apresentar uma ampla faixa dinâmica linear: a resposta deve ser diretamente proporcional à quantidade de substância presente no detector em uma ampla faixa de concentrações. Detectores por ionização de chama apresentam uma ampla faixa linear e são sensíveis à maioria dos compostos. A resposta dos detectores depende da estrutura e da concentração da substância e da média de fluxo da combustão, do ar e do gás de arraste. A menos que especificado de forma diferente na monografia, detectores por ionização de chama operam

tanto com hélio quanto com nitrogênio como gás de arraste para colunas empacotadas, e com hélio ou hidrogênio para colunas capilares.

Os detectores por condutividade térmica empregam fio de metal aquecido localizado na corrente do gás de arraste. Quando um analito entra no detector com o gás de arraste, a diferença na condutividade térmica da corrente de gás de arraste (gás e componentes da amostra), relativo a um fluxo de referência do gás de arraste sem analito, é medido. Em geral, detectores por condutividade térmica respondem uniformemente a substâncias voláteis sem considerar sua estrutura; entretanto, são considerados menos sensíveis que o detector por ionização de chama.

Detectores por ionização de chama alcalina, também chamado NP ou detector nitrogênio-fósforo, contêm uma fonte termiônica, com um sal metal-álcali ou um elemento de vidro contendo rubídio ou outro metal, que resulta numa eficiente ionização de nitrogênio orgânico e substâncias contendo fósforo. É um detector seletivo que apresenta baixa resposta para hidrocarbonetos.

Detectores por captura de elétrons contêm uma fonte radioativa de radiação ionizante. Exibem uma resposta extremamente alta a compostos halogenados e a grupo nitro, mas pouca resposta a hidrocarbonetos. A sensibilidade aumenta com o número e a massa atômica de átomos de halogênio.

Dispositivos para tratamento de dados

Estações de tratamento de dados conectadas na saída dos detectores calculam a área e a altura dos picos, e apresentam os cromatogramas completos contendo os parâmetros da corrida e os dados dos picos. Os dados dos cromatogramas podem ser armazenados e reprocessados por integração eletrônica ou outro tipo de cálculo que seja necessário. Essas estações de tratamento de dados são utilizadas também para programar as corridas cromatográficas.

PROCEDIMENTO

Colunas empacotadas e capilares devem ser condicionadas antes do uso até que a linha de base esteja estável. Isso deve ser realizado operando a uma temperatura acima da especificada pelo método ou por repetidas injeções do composto ou da mistura a ser separada por cromatografia. O fabricante da coluna geralmente fornece instruções para o adequado procedimento de condicionamento da coluna. Em caso de polisiloxanos metil e fenil substituídos termicamente estáveis, uma sequência especial aumenta a eficiência e a inatividade: manter a coluna à temperatura de 250 °C por uma hora, com fluxo de gás hélio, para remover o oxigênio e solvente. Para o fluxo de hélio, aquecer até 340 °C por quatro horas, e então reduzir o aquecimento até temperatura de 250 °C, e condicionar com fluxo de hélio até a estabilidade da linha de base.

Após o procedimento de condicionamento, equilibrar a coluna, o injetor e o detector às temperaturas e fluxo dos gases especificados na monografia até a obtenção de uma linha de base estável. Preparar a(s) solução(ões) amostra e padrão como descrito. As soluções devem estar isentas de partículas sólidas.

Muitos fármacos são moléculas polares reativas. Nesse caso, pode ser necessária a conversão desses a derivados menos polares e mais voláteis, por tratamento dos grupos reativos com reagentes apropriados.

Os ensaios requerem comparação quantitativa de um cromatograma com outro. A maior fonte de erro é a falta de reprodutibilidade da quantidade de amostra injetada, notadamente quando injeções manuais são realizadas com o auxílio de uma seringa. Os efeitos de variabilidade podem ser minimizados pela adição de um padrão interno, uma substância não interferente adicionada na mesma concentração nas soluções amostra e padrão. A razão da resposta do pico do analito em relação à resposta do pico do padrão interno é comparada entre os cromatogramas da amostra e do padrão. Quando o padrão interno é quimicamente similar à

substância a ser analisada, existe também uma compensação para variações menores na coluna e nas características do detector. Em alguns casos, o padrão interno pode ser utilizado durante a preparação da amostra, antes da análise cromatográfica, para controlar outros aspectos quantitativos do ensaio. Injetores automáticos aumentam a reprodutibilidade das injeções das amostras e reduzem a necessidade de utilização de padrões internos.

5.2.17.5.1 CROMATOGRAFIA A GÁS EM ESPAÇO CONFINADO (*headspace*)

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

EQUIPAMENTO

O equipamento consta de um cromatógrafo a gás ao qual se adapta um dispositivo para a introdução da amostra, que pode estar conectado a um módulo de programação que controla automaticamente a pressão e a temperatura. Se for necessário, pode-se acoplar um dispositivo de eliminação de solventes. A amostra a ser analisada é introduzida em um frasco provido de um obturador adequado, que o fecha, e de um sistema de válvulas, que permite a entrada de um gás de arraste. O frasco é colocado em uma câmara termostaticada a determinada temperatura para a amostra ser examinada. A amostra é deixada nesta temperatura por tempo suficiente para permitir que se estabeleça o equilíbrio entre a fase sólida ou a fase líquida e a fase gasosa. O gás de arraste é introduzido no frasco e, depois de determinado tempo, uma válvula é aberta para permitir que o gás se expanda até a coluna cromatográfica, arrastando os componentes voláteis.

Ao invés de utilizar um cromatógrafo especialmente adaptado para a introdução das amostras, também podem-se utilizar seringas herméticas e um cromatógrafo convencional. Neste caso, o equilíbrio entre as duas fases é conduzido em uma câmara separada e a fase de vapor é transferida para a coluna, tomando as precauções necessárias para evitar qualquer modificação do equilíbrio.

PROCEDIMENTO

Ajustar as condições de trabalho do equipamento a fim de obter uma resposta satisfatória, utilizando as soluções de referência.

Calibração direta

Introduzir, separadamente, em frascos idênticos, a preparação a ser examinada e cada uma das soluções de referência, segundo as condições descritas na monografia e evitando o contato entre a amostra e o dispositivo de injeção. Fechar hermeticamente os frascos e introduzi-los na câmara termostaticada a temperatura e pressão descritas na monografia. Após se atingir o equilíbrio, proceder à análise cromatográfica nas condições descritas.

Adição de padrão

Adicionar volumes iguais das soluções a serem analisadas em uma série de frascos idênticos. Adicionar a todos os frascos, exceto a um deles, quantidades crescentes de uma solução do padrão de referência da substância a ser analisada de concentração conhecida. Deste modo, se obtém uma série de preparações contendo quantidades crescentes de determinada substância. Fechar hermeticamente os frascos e introduzi-los na câmara termostaticada, segundo condições de temperatura e pressão descritas na monografia. Após se alcançar o equilíbrio, proceder à análise cromatográfica nas condições descritas.