

Ferramentas Modernas em Cromatografia Líquida Aplicadas a Produtos de Degradação de Fármacos

Marina Ansolin

Especialista em Cromatografia Líquida

Waters

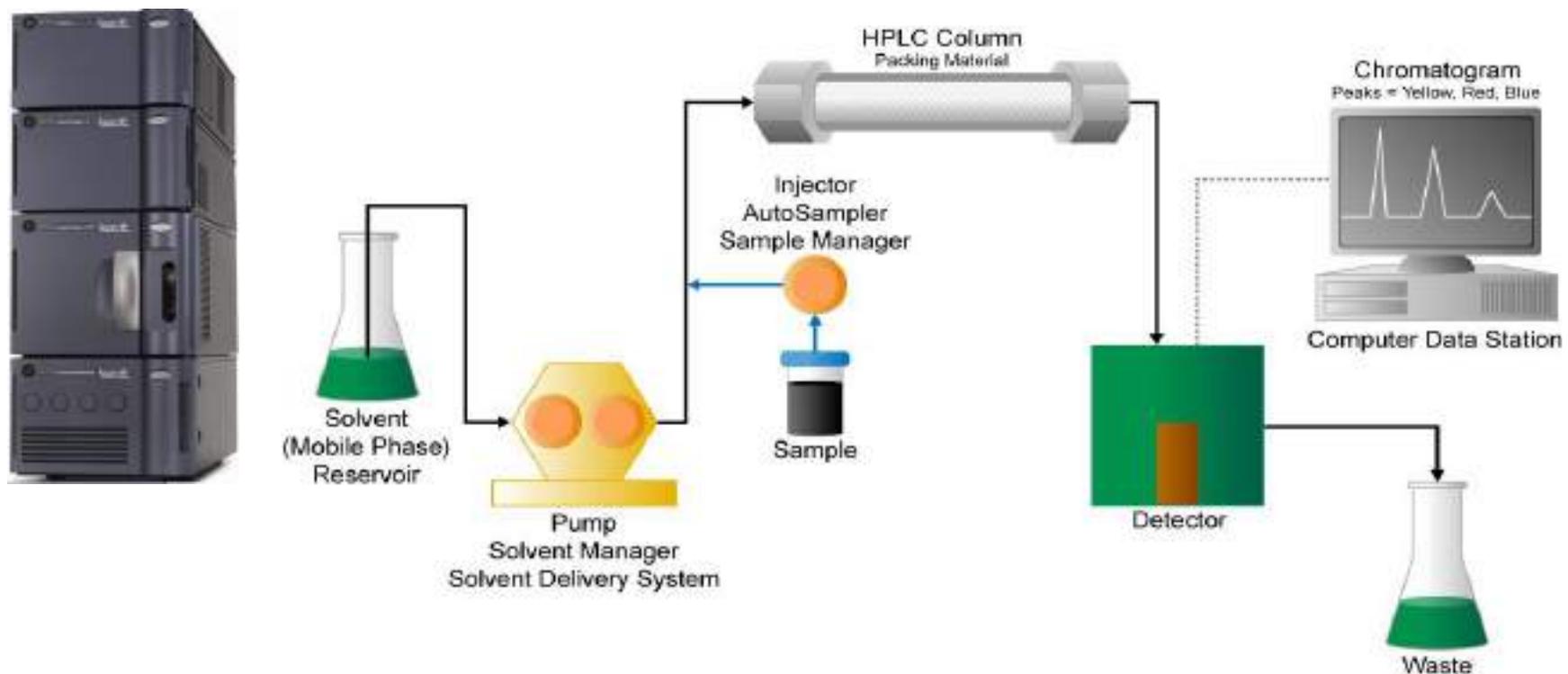
Conteúdo

- O que é cromatografia líquida?
- Aplicações
- Conceitos básicos
- HPLC → UHPLC → UPLC
- Aplicação

Cromatografia Líquida

Um processo físico de separação baseado na migração diferencial de diferentes analitos, presentes em uma mistura, entre duas fases, **a fase estacionária** (sólida) e a **fase móvel** (líquida)

IUPAC 1993



Aplicação cromatografia líquida

- Identificação e quantificação de compostos;
- Controle de qualidade;
- Identificação e quantificação de impurezas;
- Purificação de compostos;
- Estabilidade de produtos farmacêuticos
- Degradação de fármacos
-

Aplicação cromatografia líquida

- Estabilidade dos produtos farmacêuticos



 definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica, mantém dentro dos limites especificados durante a estocagem e uso.

Fatores ambientais como: temperatura, umidade e luz

Fatores relacionados ao próprio produto como:

propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, formula farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens

Aplicação cromatografia líquida

- Degradação de fármacos



RDC 58 de 20 de dezembro de 2013

Verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento.

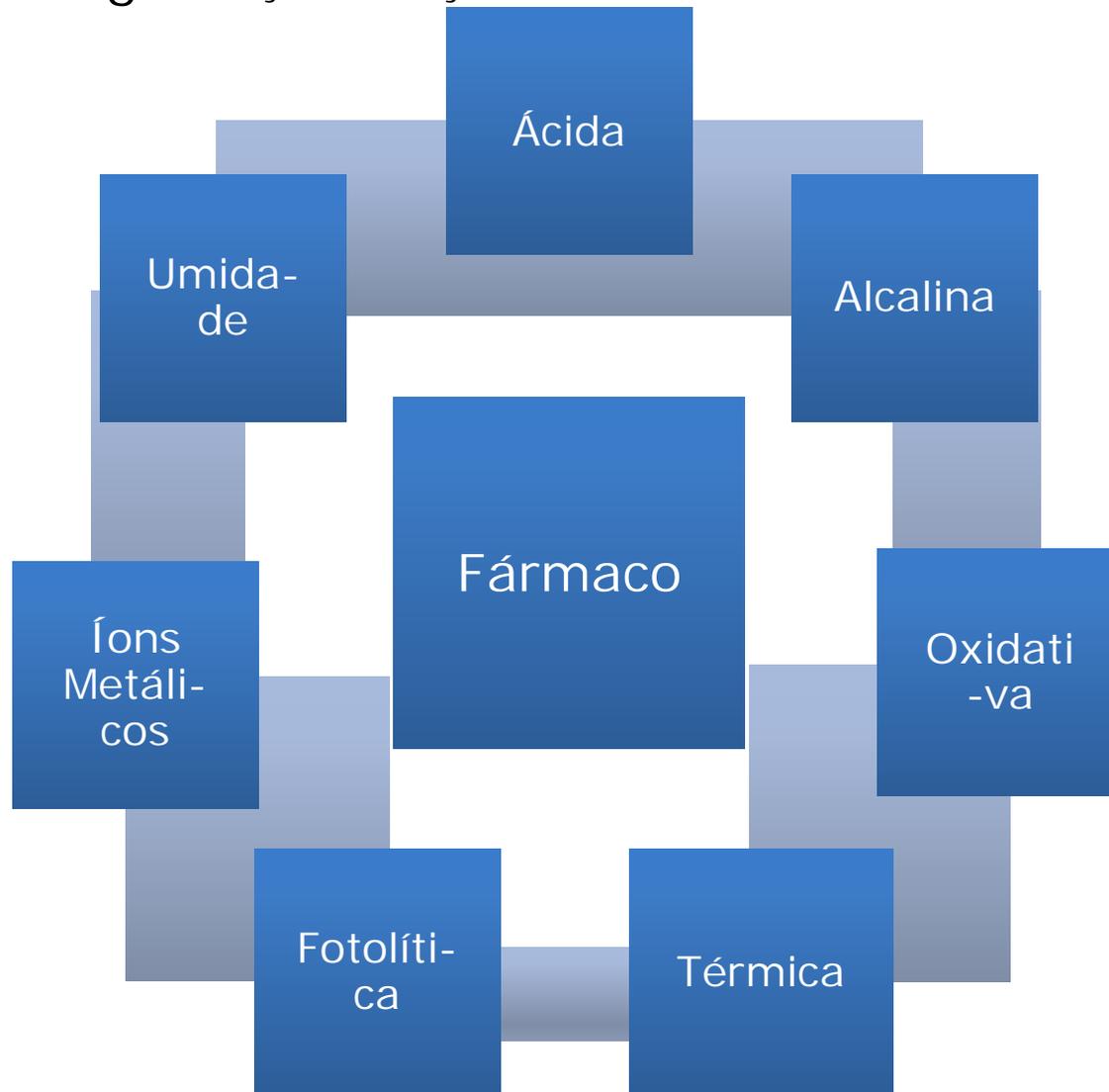
RDC 58 de 20 de dezembro de 2013

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

I - estudo de degradação forçada:

Degradação de fármacos

I - estudo de degradação forçada:



I - estudo de degradação forçada:

Os resultados dos ensaios servirão de suporte para o desenvolvimento e validação da metodologia de análise dos produtos de degradação formados e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento

Degradação de fármacos

- Artigo 9 A necessidade de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade do medicamento deverá ser avaliada com base nas informações

Degradação de fármacos

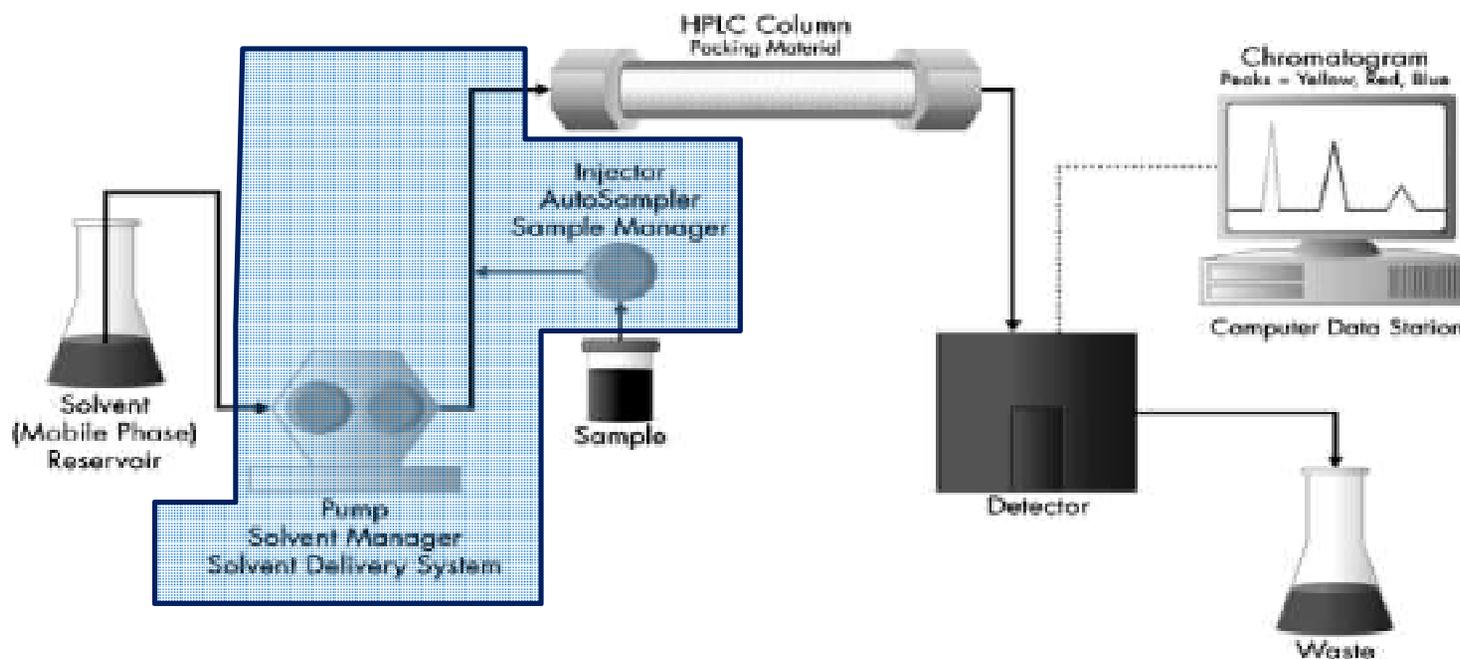
	Dosagem diária	Limites
■ Análise de qualidade em sistemas de distribuição	≤ 1 g	0,1 %
	> 1 g	0,05 %
■ Controle de qualidade	≤ 1 mg	1,0 % ou 5 µg ITD
	1 mg – 10 mg	0,5 % ou 20 µg ITD
	> 10 mg – 2 g	0,2 % ou 2 µg ITD
	> 2 g	0,10 %
■ Controle de qualidade	< 10 mg	1,0 % ou 50 µg ITD
	10 mg – 100 mg	0,5 % ou 200 µg ITD
	> 100 mg – 2 g	0,2 % ou 3 µg ITD
	> 2 g	0,15 %

REVISANDO ALGUNS CONCEITOS....

- Volume de sistema
- Volume extra coluna
- Volume morto
- Resolução
- Retenção
- Seletividade
- Eficiência
- Modos de separação

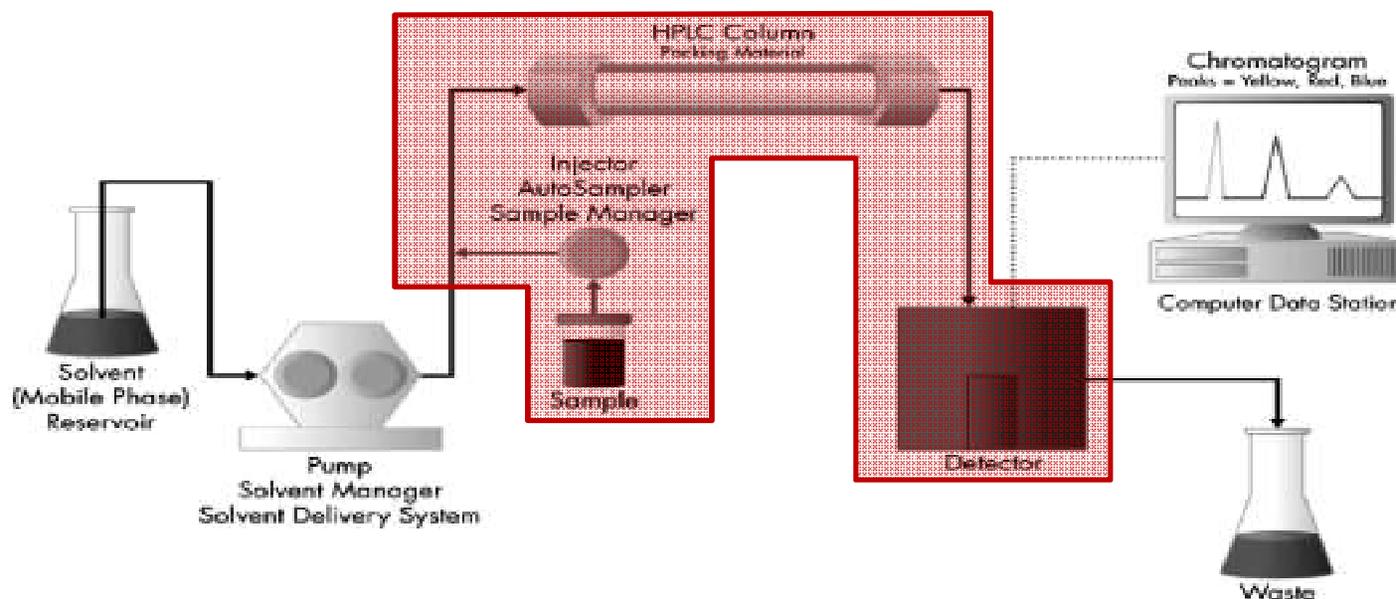
O termo V_D : volume do sistema (*dwelt*)

- **Volume de sistema (V_D , mL):** volume de tubulações entre a mistura inicial dos solventes da FM e a entrada da coluna
- **Relevância:** quanto maior, mais tempo a FM leva da bomba até a coluna.



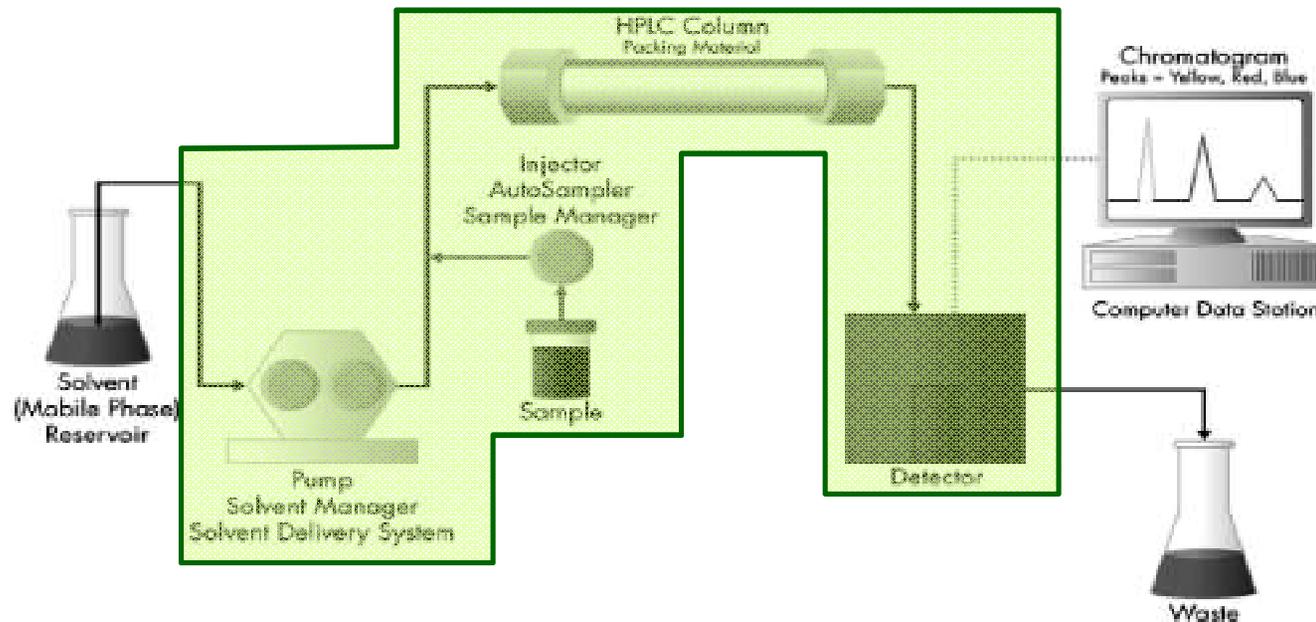
O termo V_E : volume extra-coluna

- **Volume extra-coluna (V_E , μL):** volume de tubulações entre injetor e coluna, entre coluna e detector e dentro do detector.
- **Relevância:** quanto maior, maior o espalhamento de bandas.



O termo V_0 : volume-morto da coluna

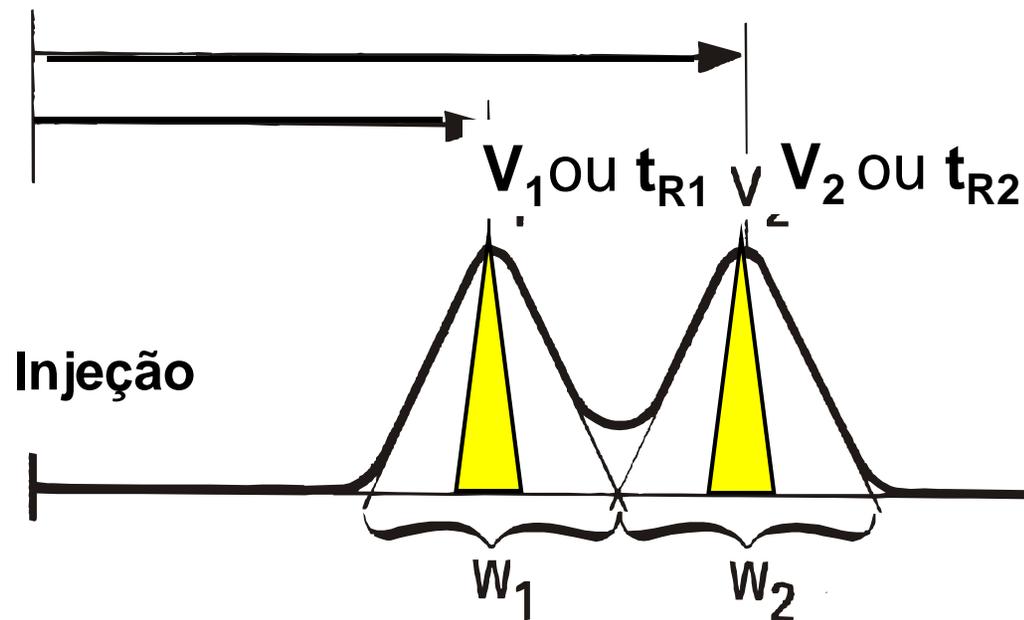
- **Volume-morto (V_0 , μL):** volume mínimo que a bomba precisa bombear para que o solvente que saiu chegue ao detector.
- Equivale ao tempo de retenção (volume) de um pico não-retido.



O termo R: resolução

- **R (resolução):** grau de separação entre dois picos.

Medidas em cm, min ou mL



V (volume de eluição):
Volume de fase móvel bombeado através do sistema desde o ponto de injeção até a saída do ápice do pico (**independe do fluxo**).

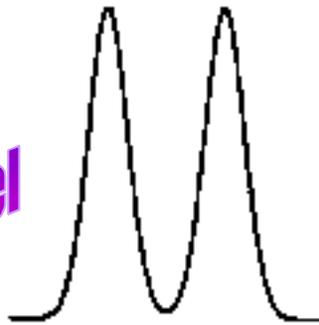
t_R (tempo de retenção):
Tempo corrido entre o ponto de injeção até a saída do ápice do pico (**depende do fluxo**)

$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

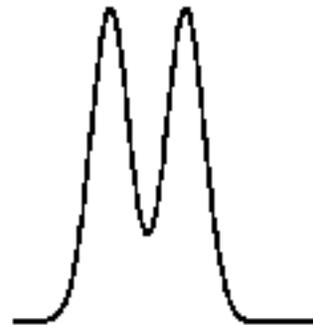
Resolução (R)

- R = Resolução A = Relação de áreas

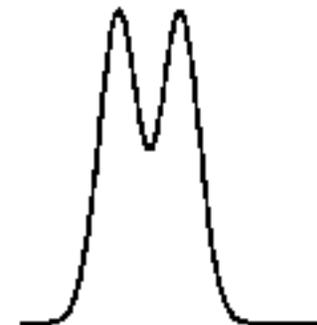
*Mínima
desejável*



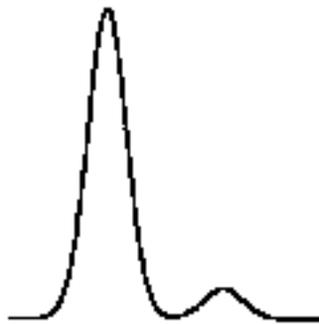
R = 1.5, A = 1:1



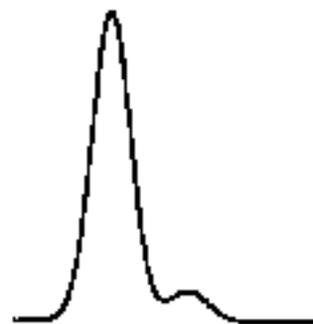
R = 1.0, A = 1:1



R = 0.8, A = 1:1



R = 1.5, A = 10:1



R = 1.0, A = 10:1



R = 0.8, A = 10:1

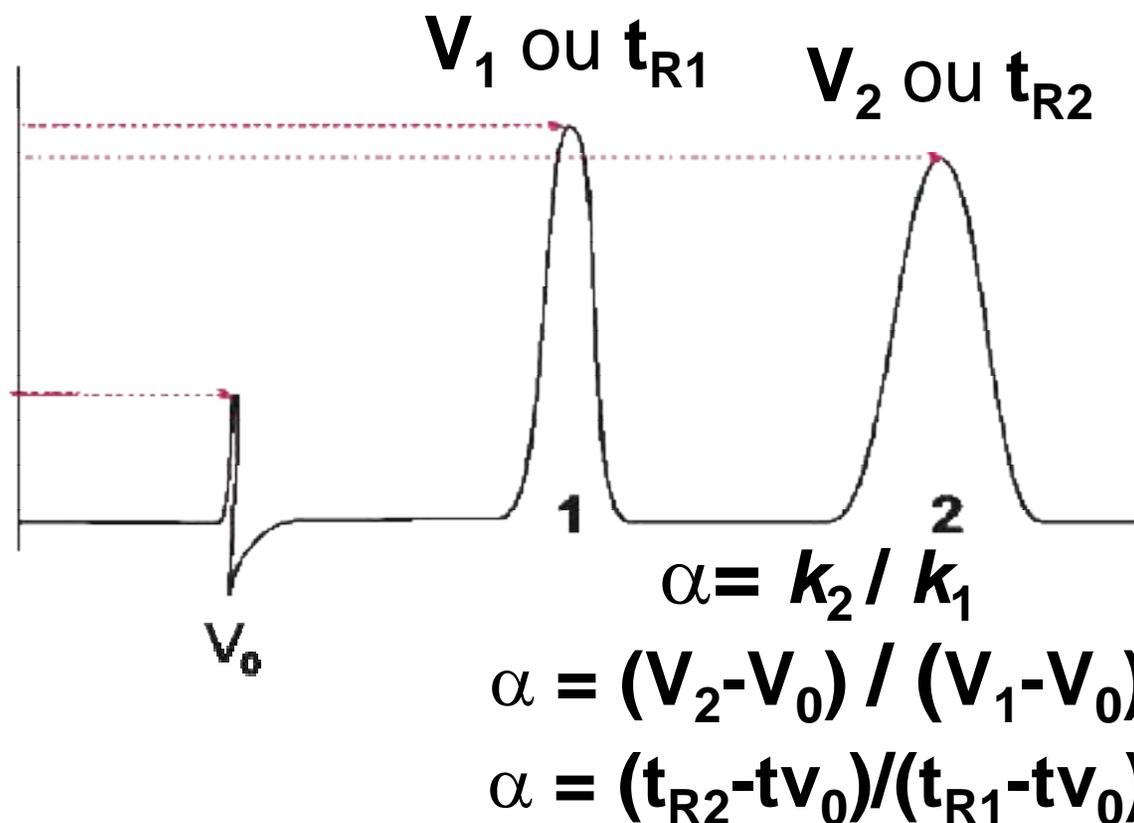
Retenção (k')

A retenção é o grau de interação da amostra com a fase móvel e a fase estacionária

- Retenção é afetada / controlada por:
 - Polaridade da fase móvel; isto é pela % dos componentes da fase
 - Polaridade da fase estacionária
 - Temperatura da coluna (forno)
 - $\Delta 1^{\circ}\text{C} = \text{mudança de } 1\text{-}5\% \text{ em } k'$

O termo α : seletividade

- α (**seletividade**): a capacidade do sistema químico (FE e FM) de diferenciar entre componentes de interesse.
- Afetado pela natureza da FE e da FM (inclusive pH).

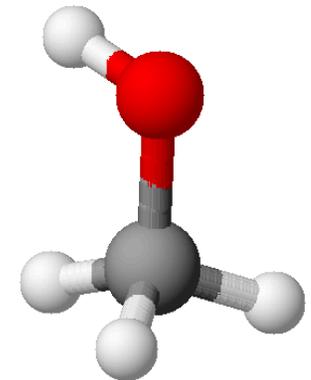


O termo α : seletividade



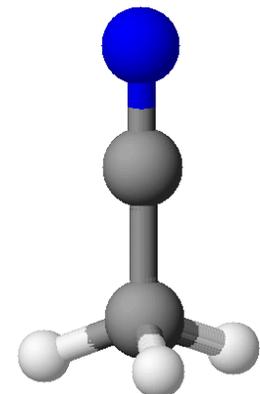
■ Metanol (MeOH)

- Solvente prótico (doador de ligação de hidrogênio)
- Solvente de eluição **fraco** (comparado com ACN)
- Mais viscoso que a ACN (maior pressão)



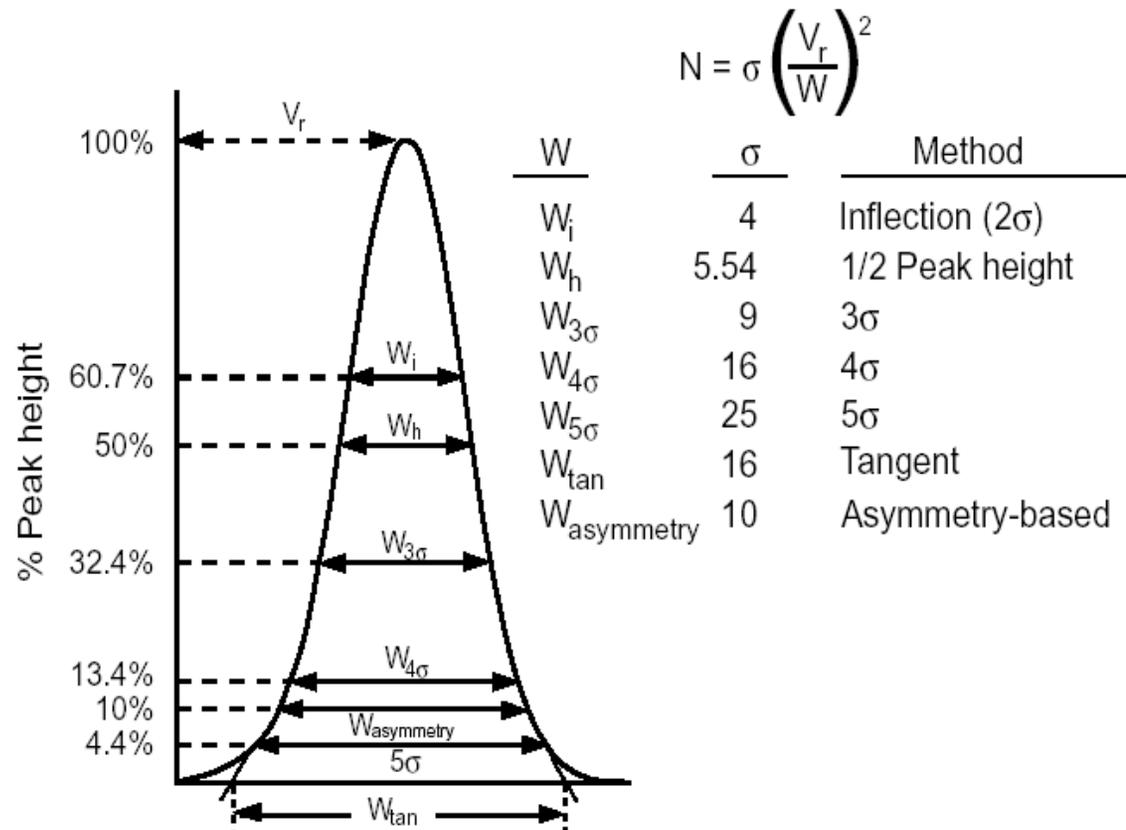
■ Acetonitrila (ACN)

- Solvente aprótico (aceptor de ligação de hidrogênio)
- Solvente de eluição **forte** (comparado com MeOH)
- Menor viscosidade que o MeOH (menor pressão)



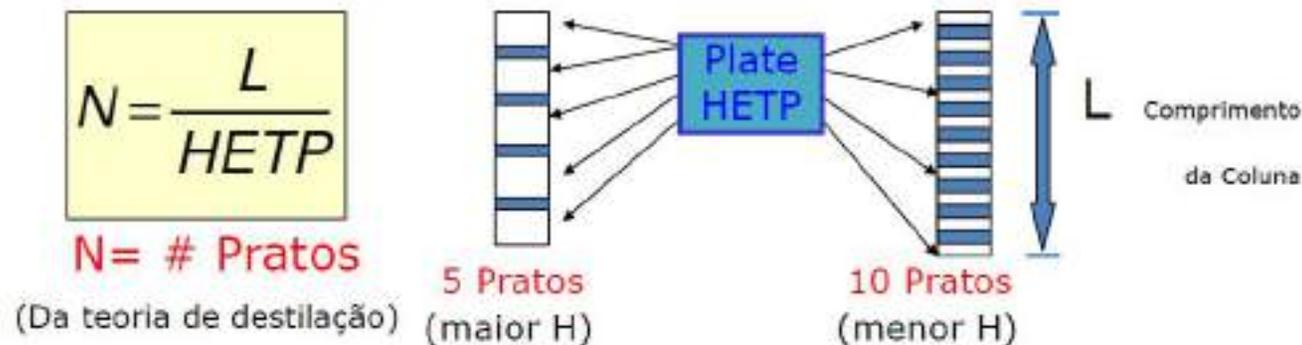
O termo N: eficiência

- **N (eficiência ou número de pratos teóricos):** medida de quanto o sistema cromatográfico está espalhando a banda (alargando o pico) do componente durante a corrida.



O termo N: eficiência

- Também é uma medida da qualidade da coluna, expressa em pratos teóricos (**HETP**, *Height Equivalent Theoretical Plate*, da teoria da destilação).
- Os pratos teóricos (**HETP**) são proporcionais ao número de eventos de separação que podem ocorrer em uma coluna.



- Quanto menor a altura do prato teórico (**HETP**), mais pratos há em um comprimento **L** e mais eventos de separação ocorrem.

O termo N: eficiência

- **Equação de Van Deemter:** relaciona a **altura do prato teórico (HETP)** com a **velocidade linear da FM (u)** e o **diâmetro da partícula da FE (dp)**.

$$\text{HETP} = A \cdot dp + \frac{B}{u} + C \cdot (dp)^2 \cdot u$$

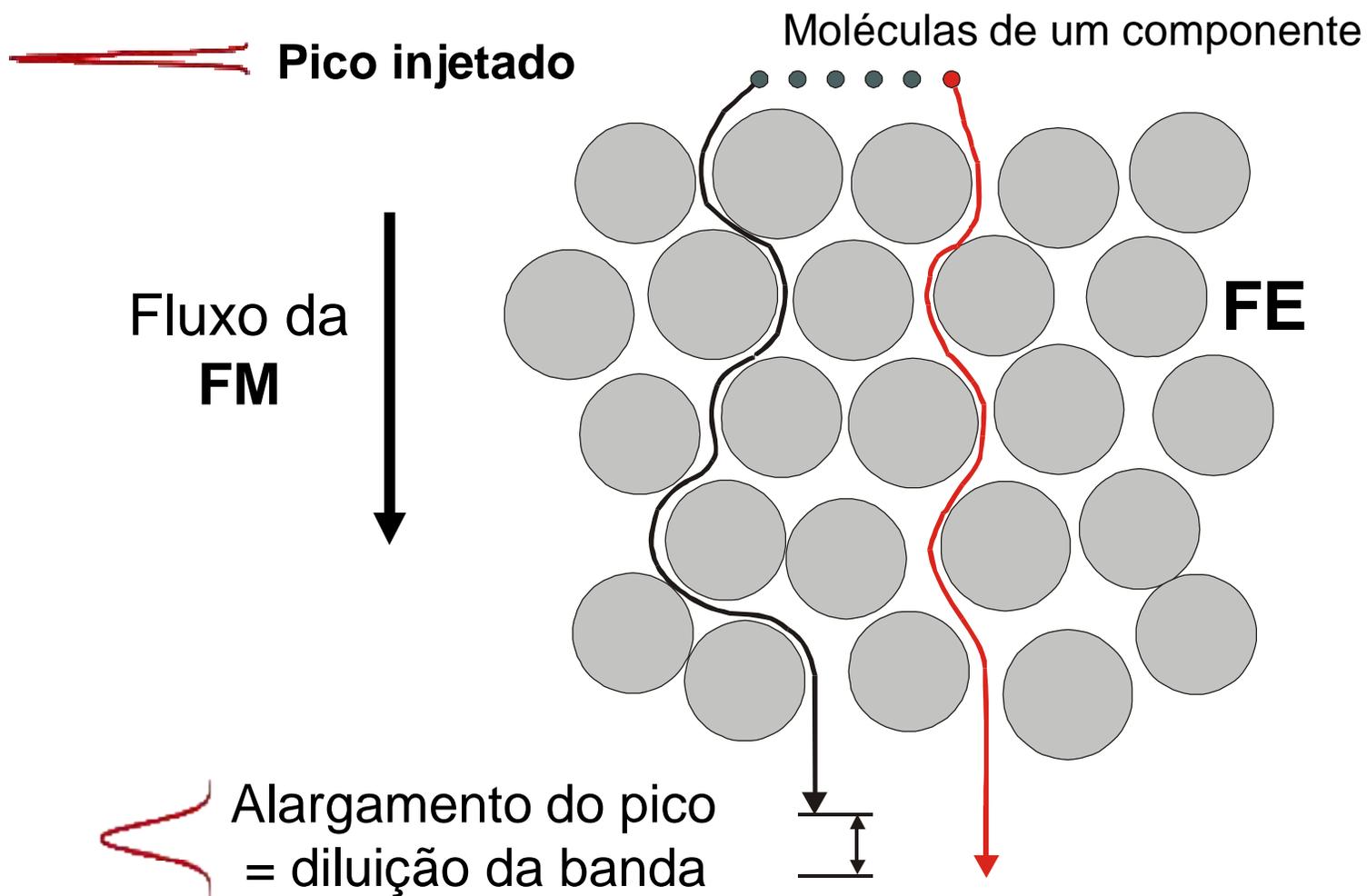
Difusão de Eddy
(caminhos preferenciais ao redor dos poros na FE)

Difusão axial
(difusão do soluto em um solvente)

Transferência de massa
(interação com interior dos poros na FE)

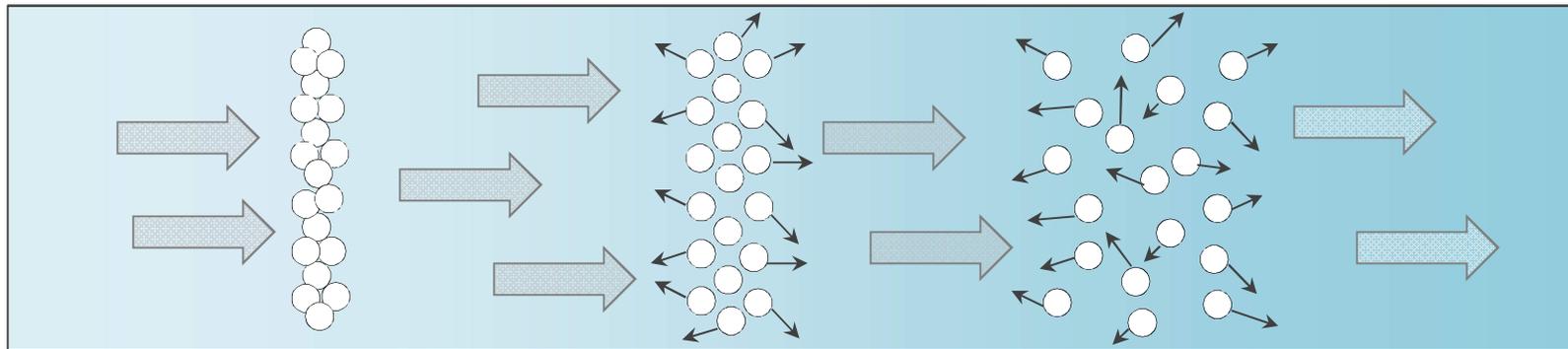
Equação de Van Deemter

- **A difusão de Eddy:** caminhos diferenciais na fase estacionária

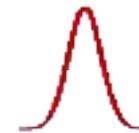


Equação de Van Deemter

- **A difusão axial:** difusão natural de soluto em um solvente



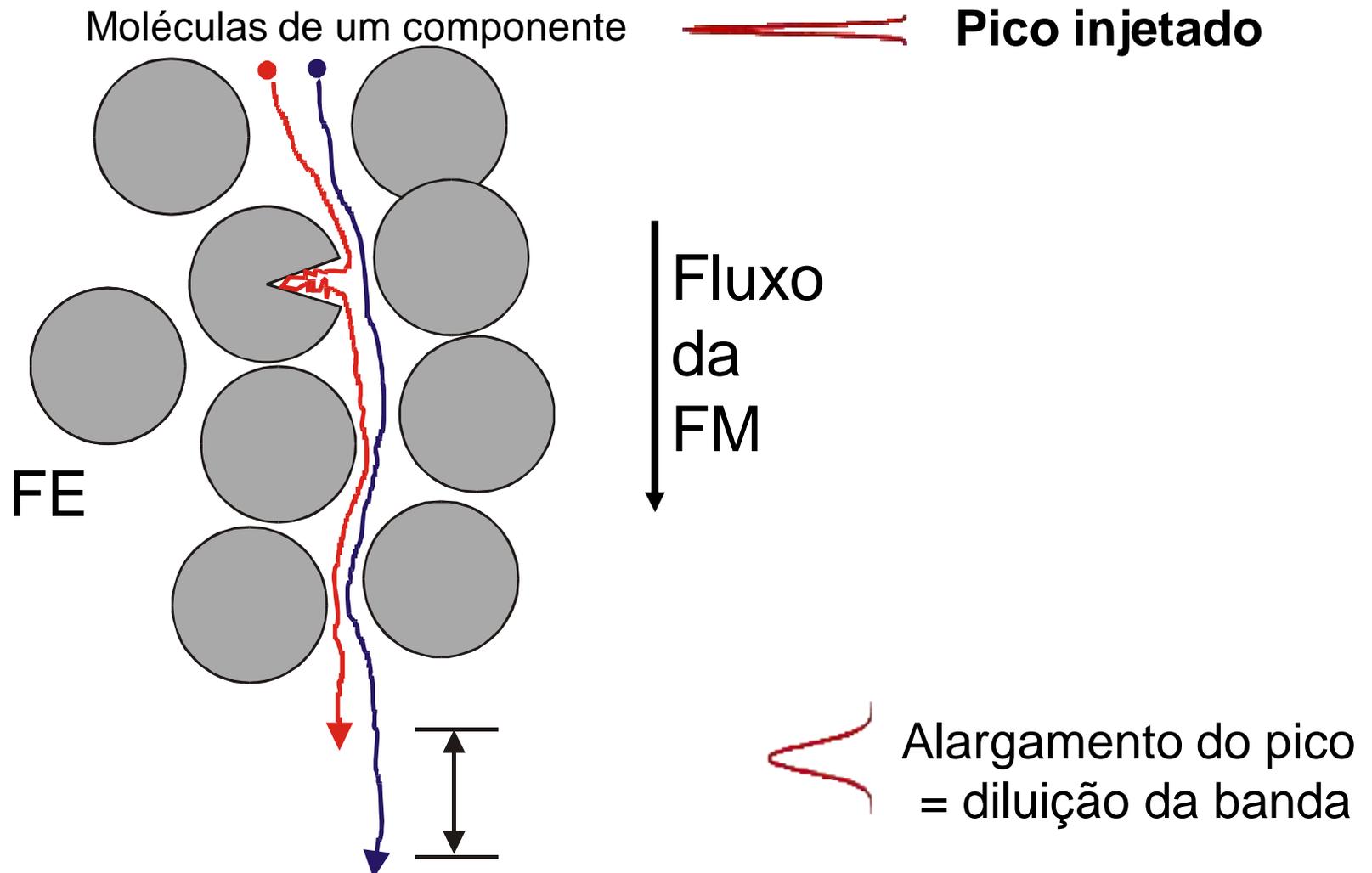
Pico injetado



Alargamento do pico
= diluição da banda

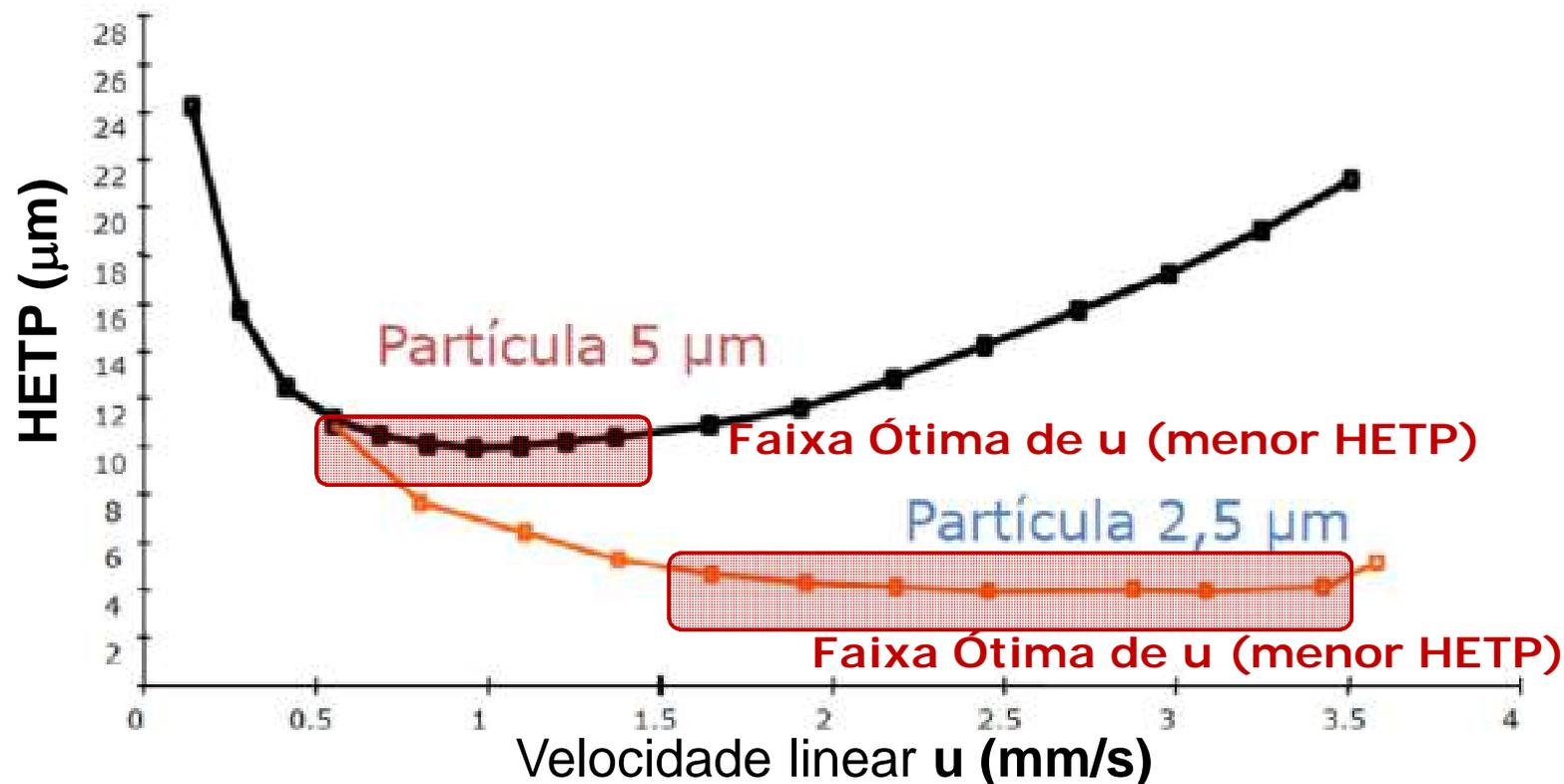
Equação de Van Deemter

- **A transferência de massa:** permeação dentro dos poros



Curva de Van Deemter

- Se plotamos **HETP** *versus* **u** para diferentes tamanhos de partícula, temos:

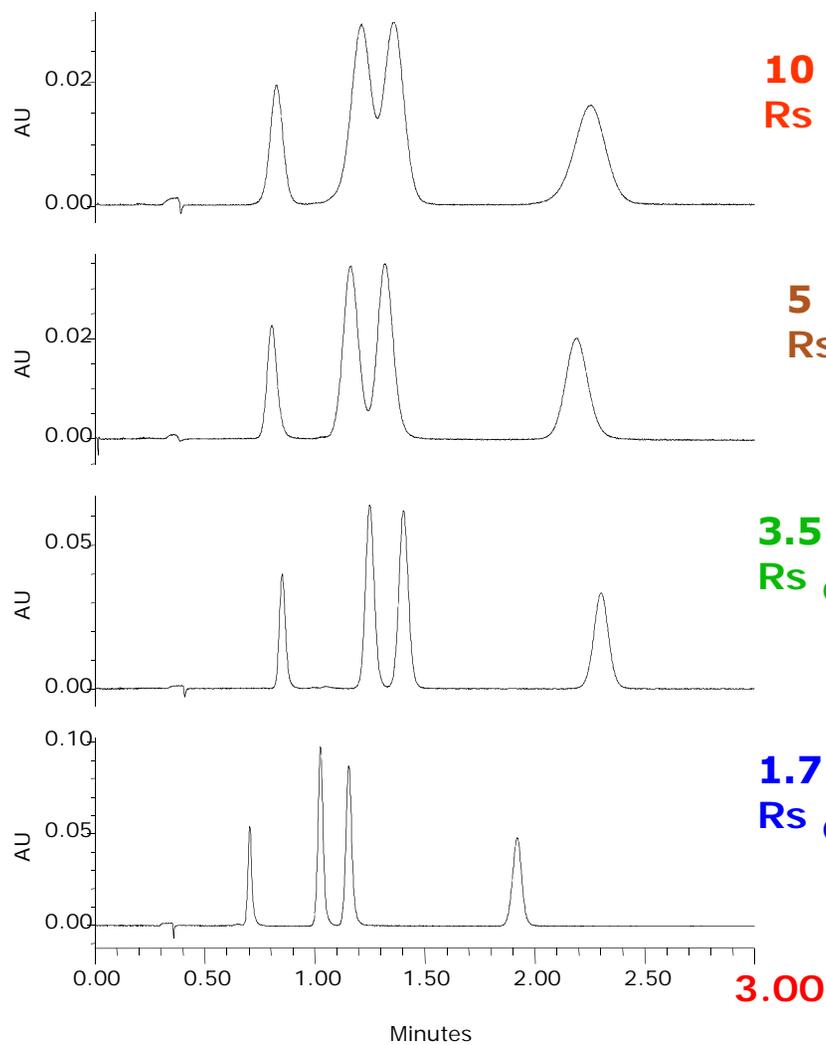


- O valor de **u** é equivalente a **vazão (mL/min)** para um certo diâmetro de coluna.

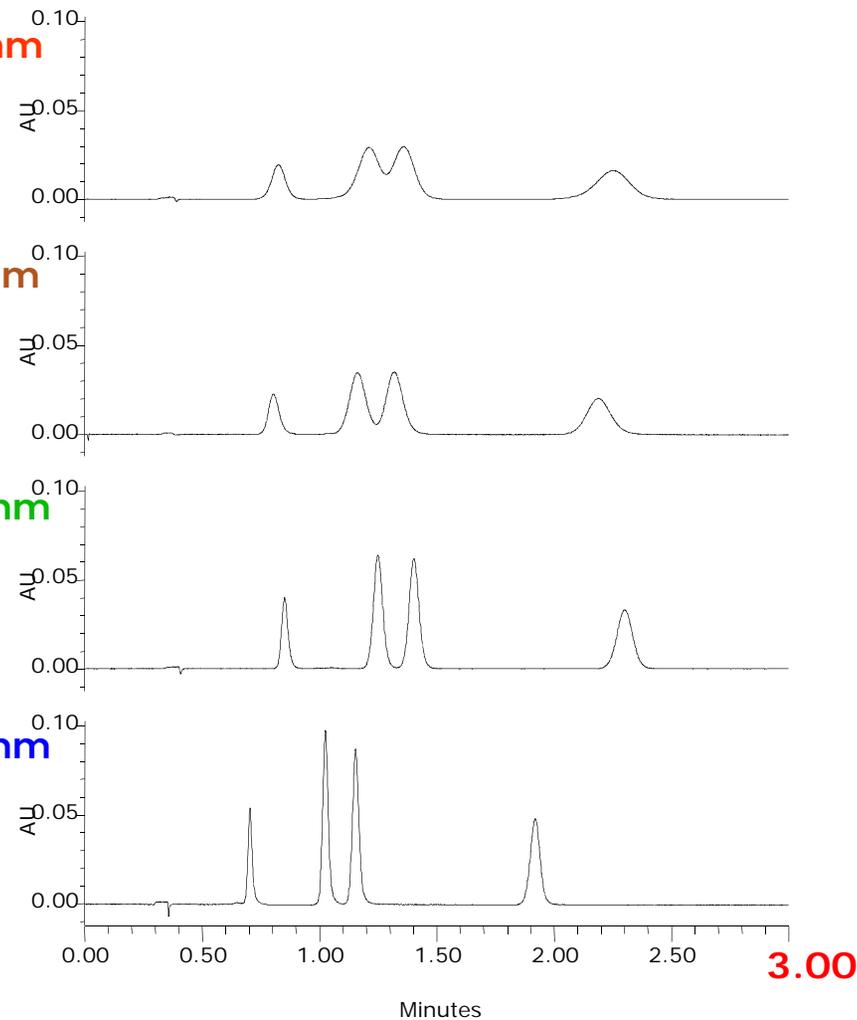
Eficiência (N)

- A eficiência é afetada / controlada por fatores físicos como:
 - Temperatura
 - Forma e tamanho da partícula de recheio

Eficiência (N): Tamanho da Partícula



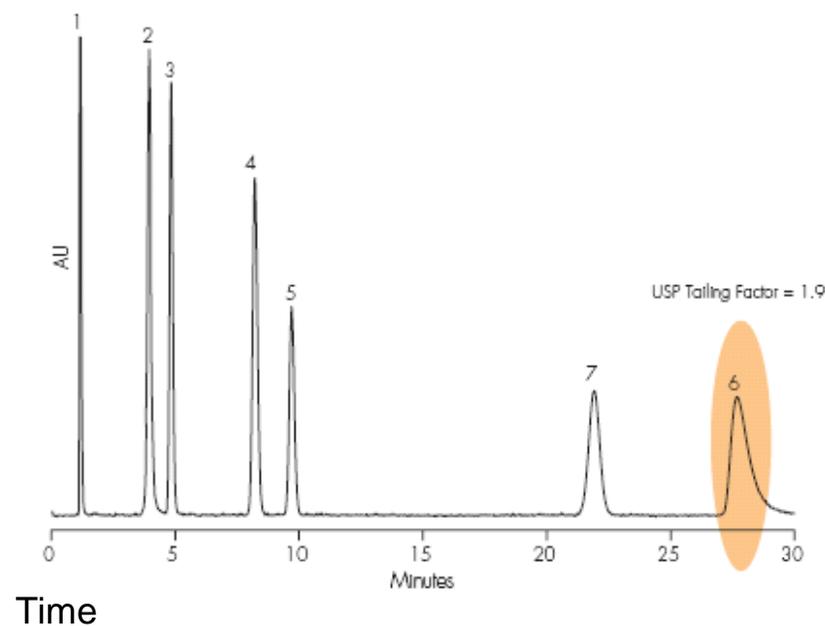
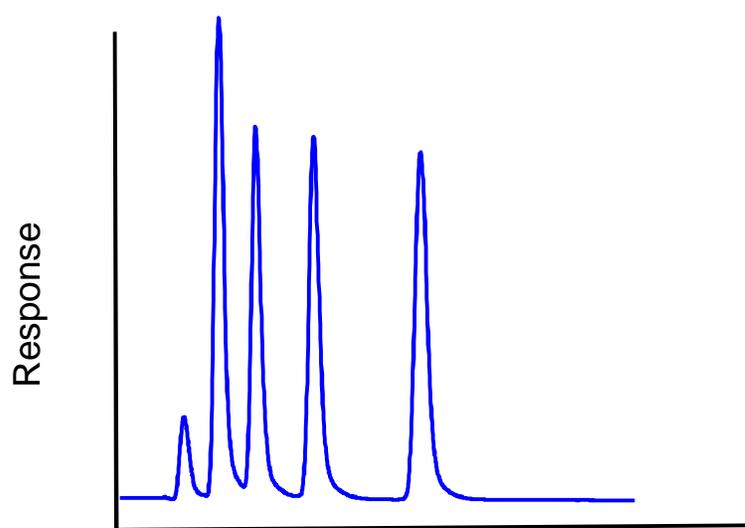
Set to same scale



- A eficiência é afetada / controlada por fatores físicos como:
 - Temperatura
 - Forma e tamanho da partícula de recheio
 - Comprimento da coluna
 - Fluxo
 - Volume e massa de amostra injetada

Eluição Isocrática

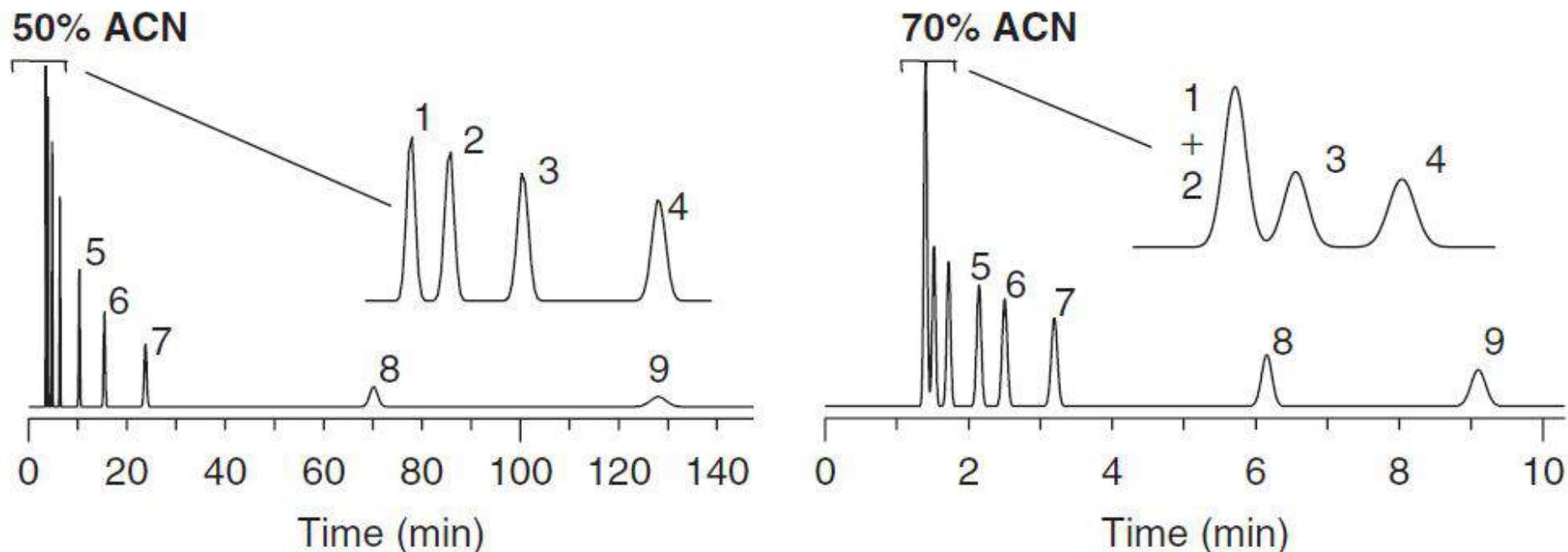
- **FM de composição constante.** Pode ser pré-misturada ou preparada por uma bomba binária ou quaternária.



- **Picos que eluem mais tarde ($> t_R$) são largos:** difusão ao longo da coluna
- Diferentes misturas necessárias para otimizar a separação.
- Linha base mais estável e sem flutuações.

Eluição Gradiente

- Grandes diferenças de k impossibilitam a separação por um sistema isocrático.



- Separação de herbicidas com FM H₂O/ACN, FE C₁₈ 4.6 x 150 mm, 5 μm, 2 mL/min

Categorias de Separação LC

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

HPLC

UHPLC

UPLC

Como essas categorias são diferenciadas??

Aumento da resolução cromatográfica

Redução do tempo de análise

Aumento da sensibilidade do método

Definição das categorias em LC

HPLC

Dispersão > 30 μL

UHPLC

Dispersão 12 - 30 μL

UPLC

Dispersão < 12 μL

Aumento na flexibilidade e caracterização da amostra

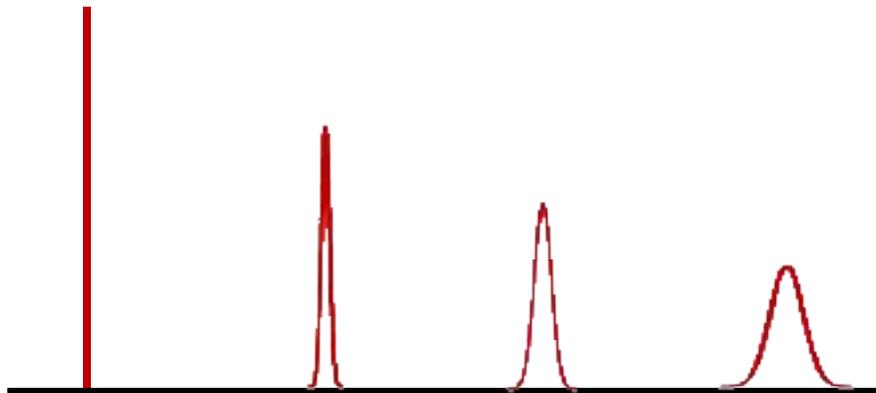
O que diferencia os sistemas?

- **Dispersão** – Ampliação de uma banda cromatográfica devido a efeitos sobre a **coluna** (difusão e cinética de transferência de massa que são ambos dependentes do tamanho da partícula e da velocidade linear) e os **efeitos de sistema** (tubulação de diâmetro interno (ID) e comprimento, conexões, os volumes de célula de fluxo detector, etc .)

Redução da dispersão = Redução do espalhamento das moléculas

Espalhamento de bandas cromatográficas

Banda cromatográfica utópica
Ausência de espalhamento



Espalhamento aceitável
Situação realística desejada
Largura do pico controlada
Bom formato de pico e separação

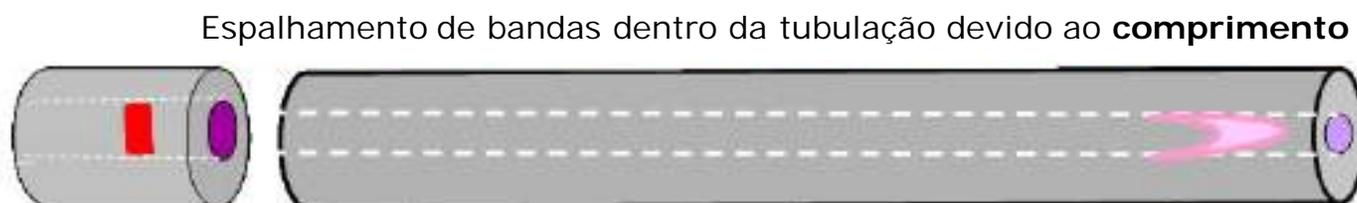
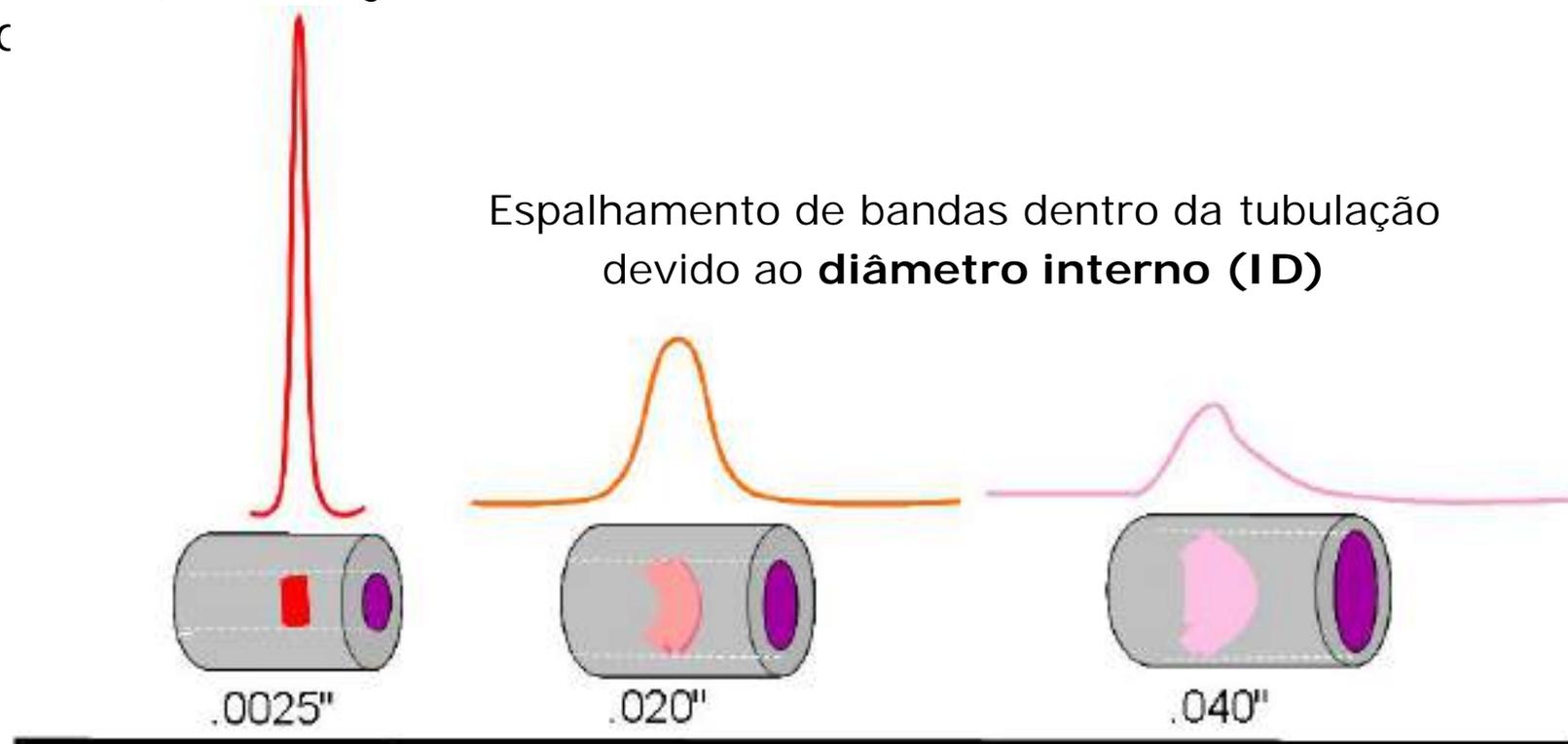


Espalhamento excessivo
Situação realística indesejada
Largura do pico excessiva
Péssimo formato de pico e separação



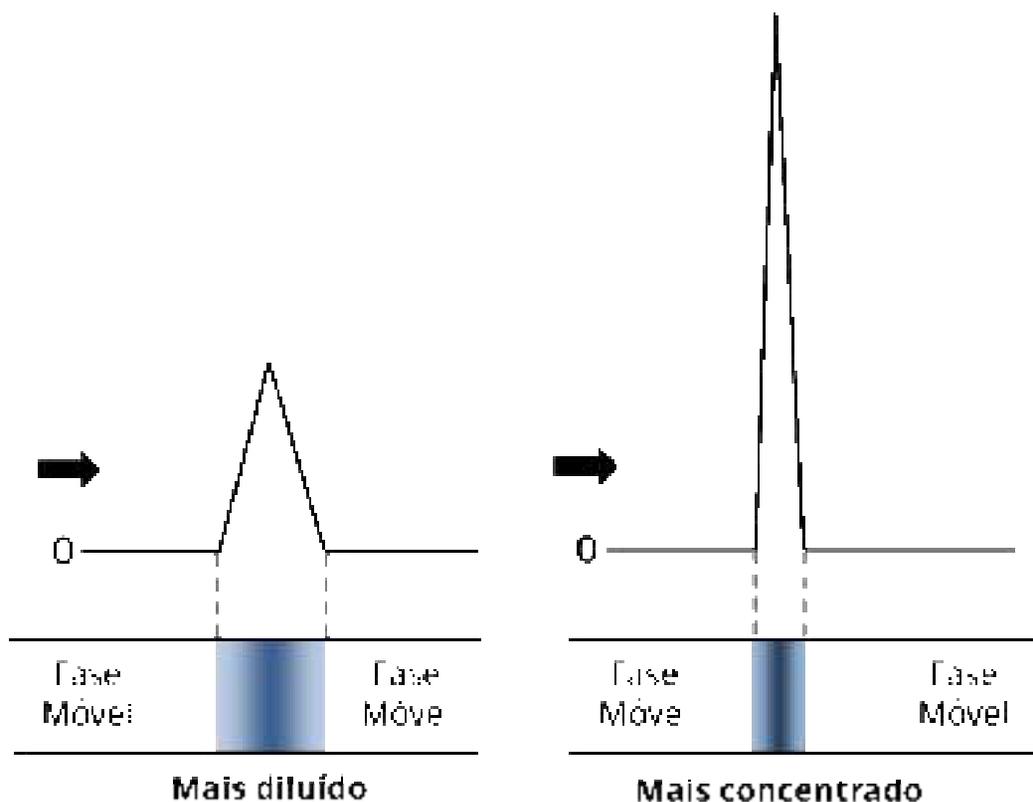
Por que ocorre o espalhamento de bandas?

- Processos de espalhamento **extra-coluna**: difusão devido à tubulações (injetor → coluna, coluna → detector, dentro do c



Benefícios do menor espalhamento

- Quais as vantagens de se ter menor espalhamento?

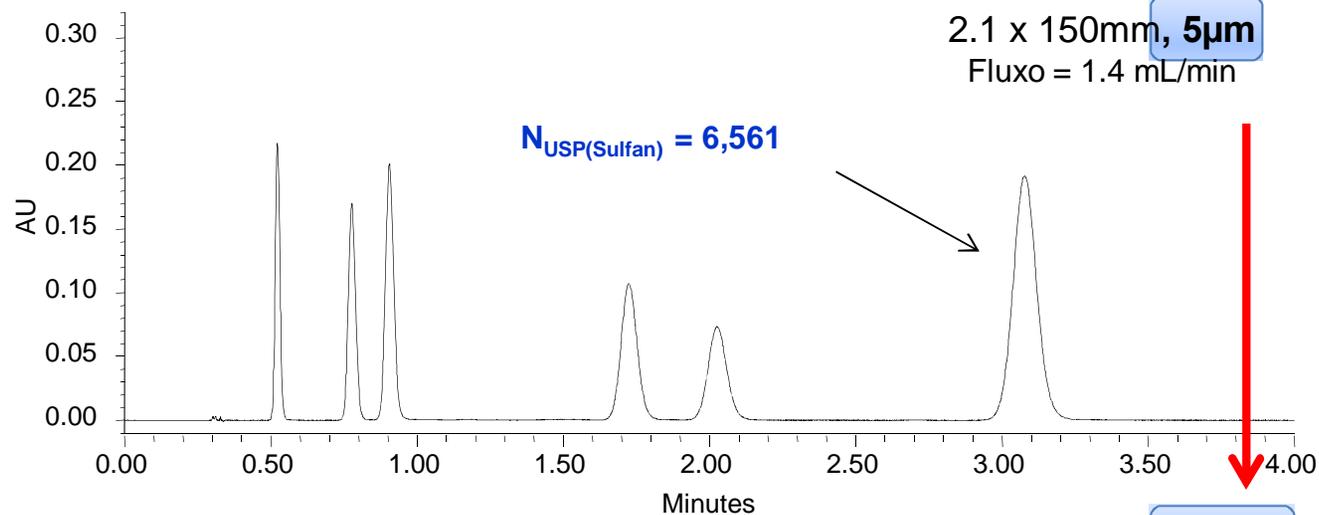


MENOR espalhamento fornece...

- **MELHOR** formato de pico
- **MAIOR** sensibilidade
- **MAIOR** resolução

Sistema ACQUITY UPC²: Aproveitando o poder das pequenas partículas

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™



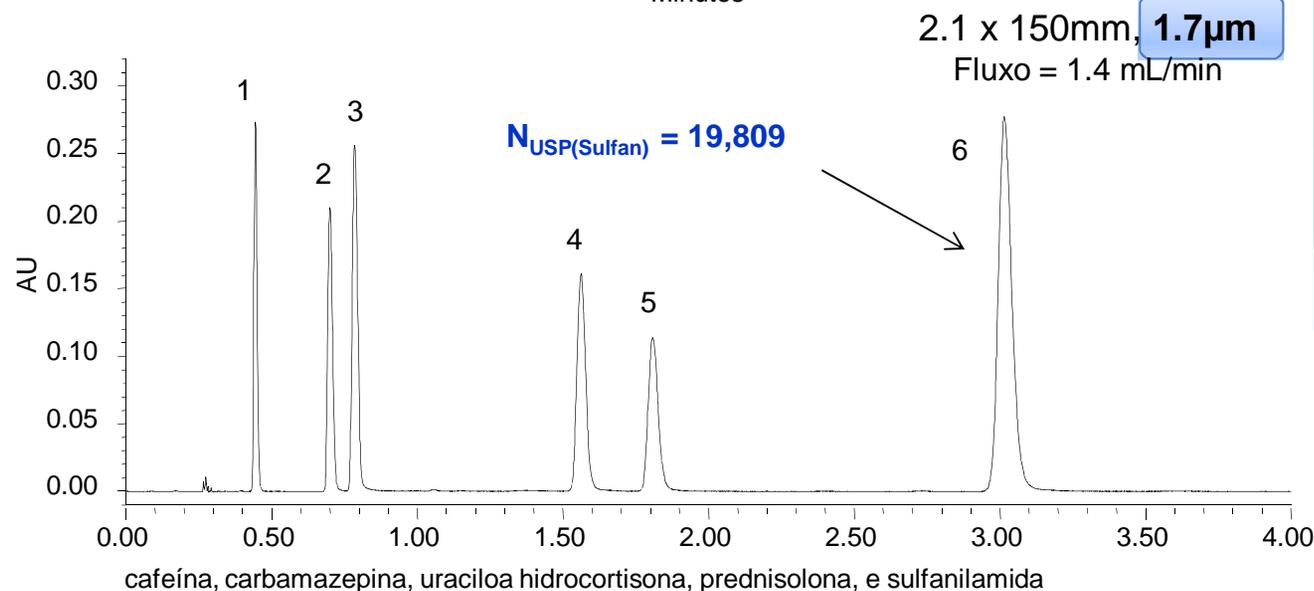
Baixa dispersão
UPC² Sistema
permite a utilização
de colunas com
partículas pequenas



3 X eficiência

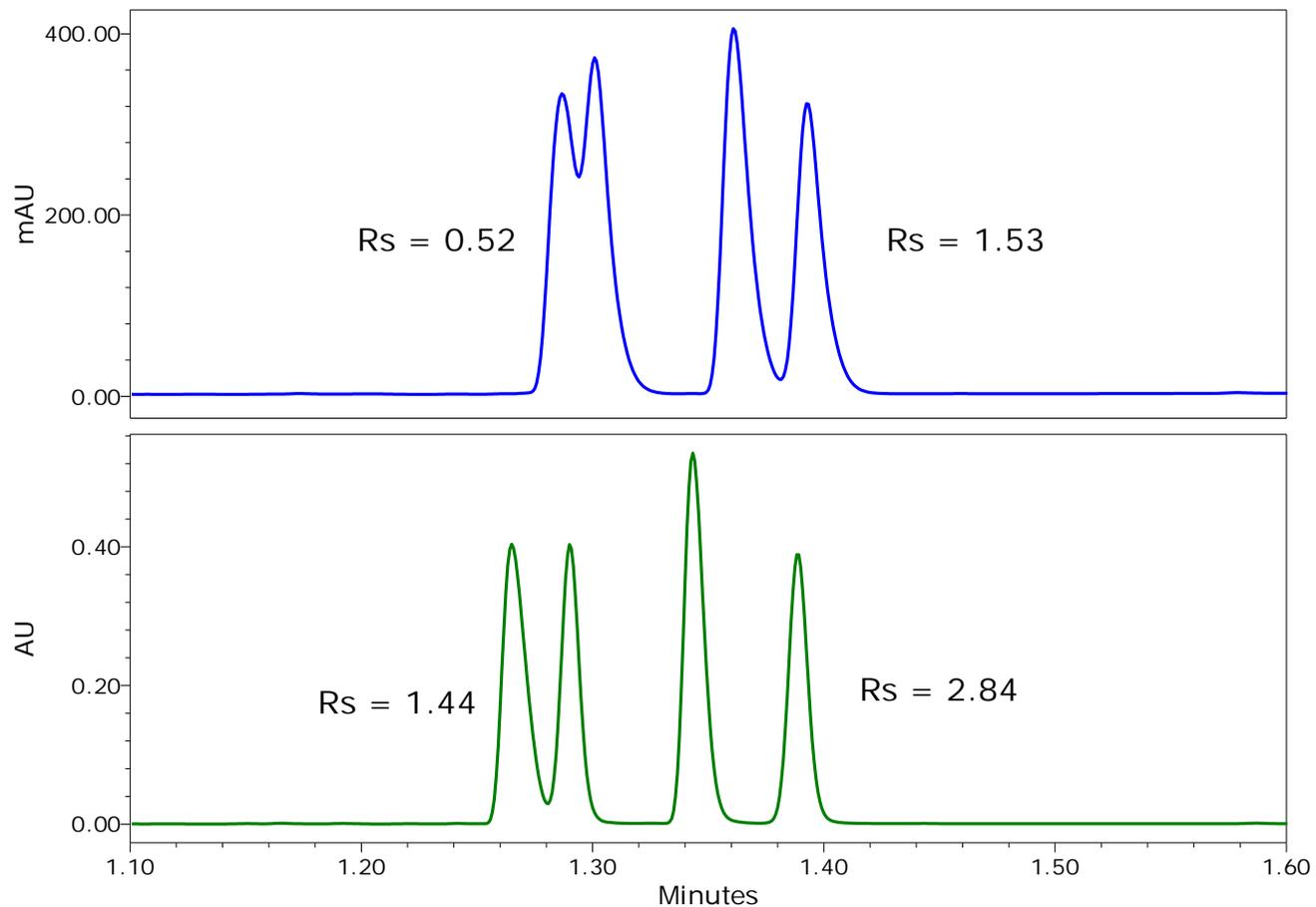
1.7 X sensibilidade

1.7 X resolução



Impacto da dispersão do sistema em análises cromatográficas

Mesma coluna cromatográfica: diferentes sistemas



Elevada
disperção

Baixa
disperção

Definição das categoriais em LC

HPLC

Dispersão > 30 μ L

Colunas aceitáveis:

- 3.0 – 4.6 mm ID
- 3 - 10 μ m partículas

Ótimo:

- 4.6 mm ID, 5 μ m

Pressão de operação:

- < 6,000 PSI

UHPLC

Dispersão 12 - 30 μ L

Colunas aceitáveis:

- 2.1 - 4.6 mm ID
- 1.7 - 5 μ m partículas

Ótimo:

- 3.0 mm ID, 2.x μ m

Pressão de operação:

- 6,000 – 15,000 PSI

UPLC

Dispersão < 12 μ L

Colunas aceitáveis:

- 1.0 - 4.6 mm ID
- 1.6 - 5 μ m partículas

Ótimo:

- 2.1 mm ID, 1.7 μ m

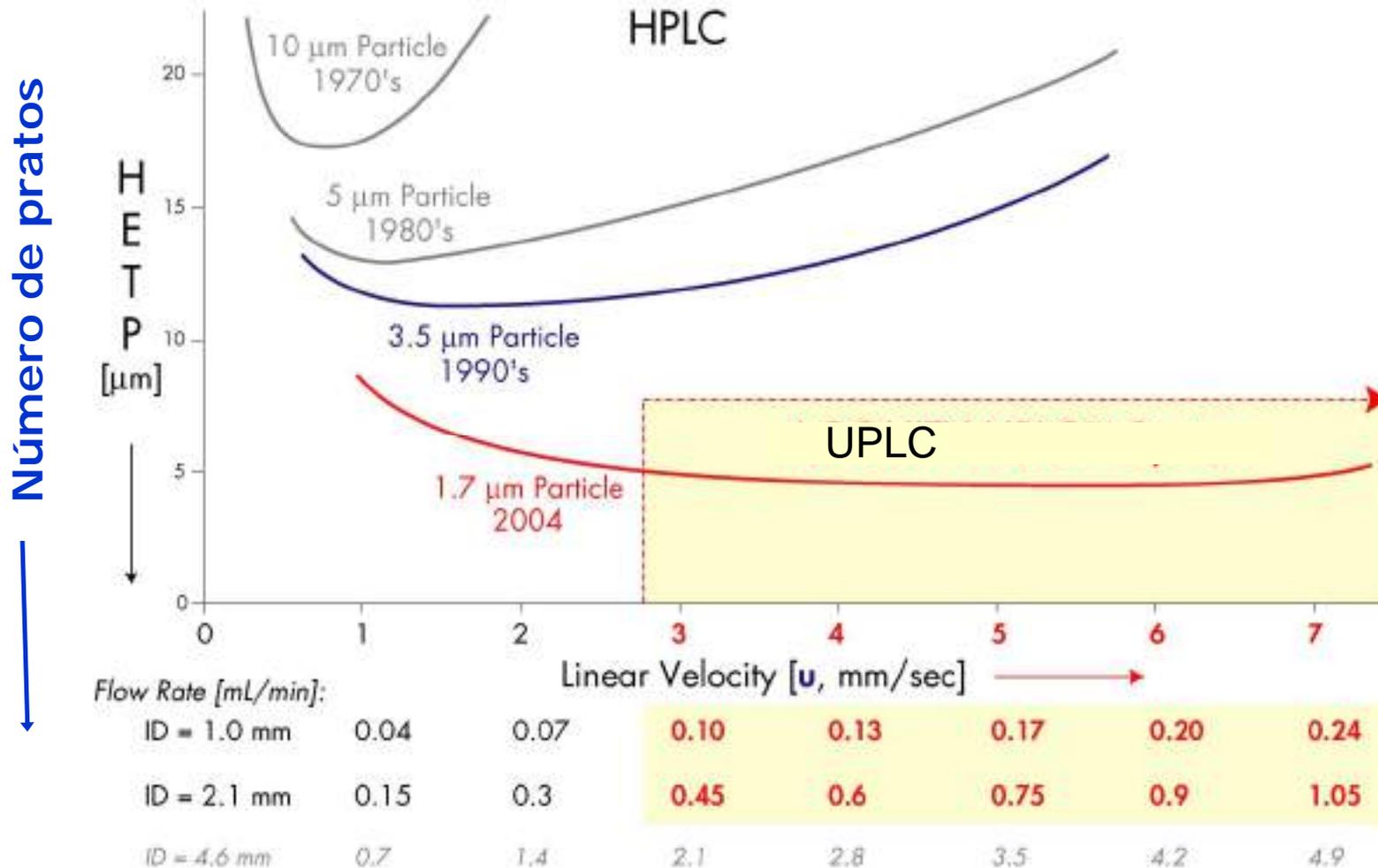
Pressão de operação:

- 9,000 – 15,000 PSI

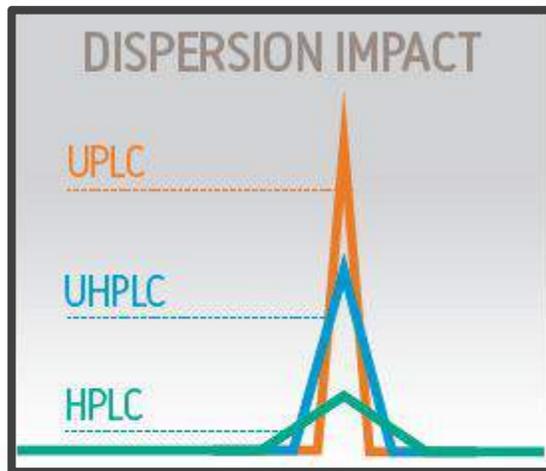
Aumento na flexibilidade e caracterização da amostra

Número de pratos

Efeito do tamanho da partícula e do fluxo

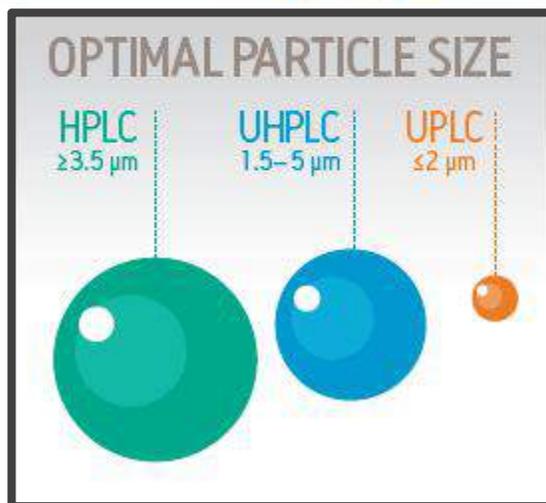
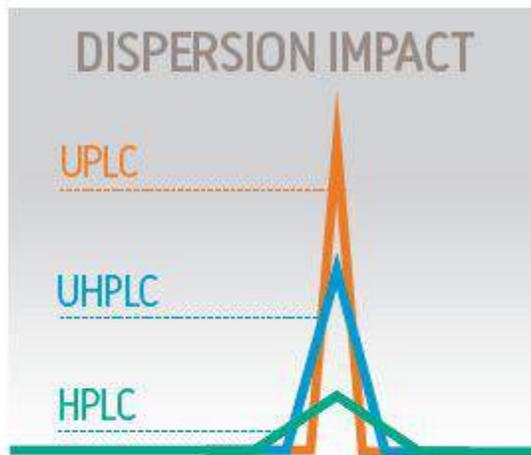


Escolha do melhor sistema



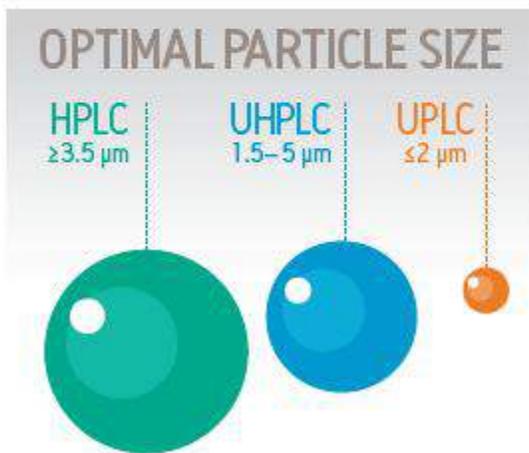
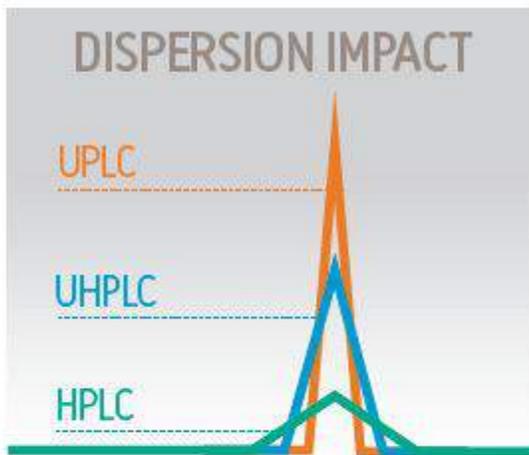
Impacto do aumento da dispersão em um pico cromatográfico

Escolha do melhor sistema

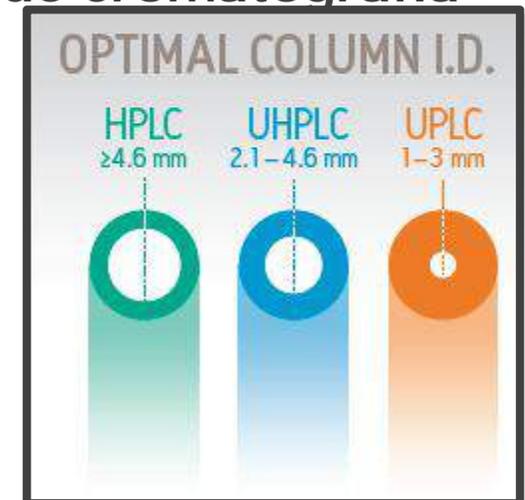


Seleção do tamanho
apropriado da partícula
baseada na complexidade da
separação

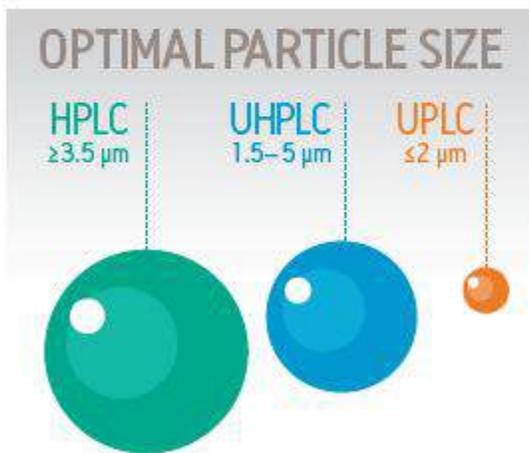
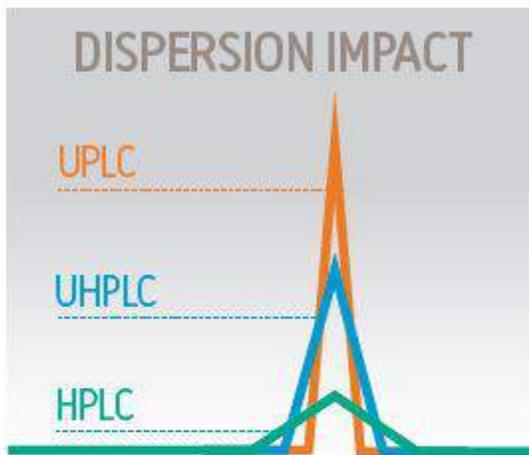
Escolha do melhor sistema



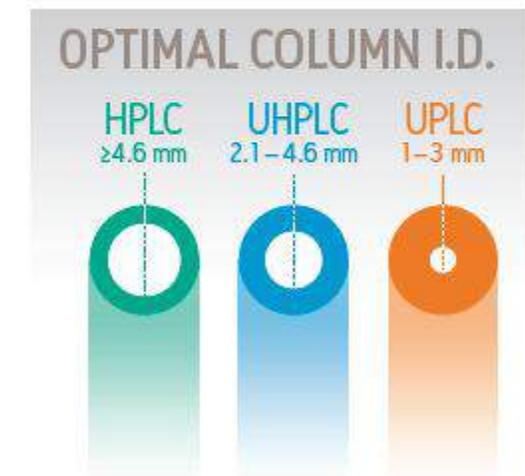
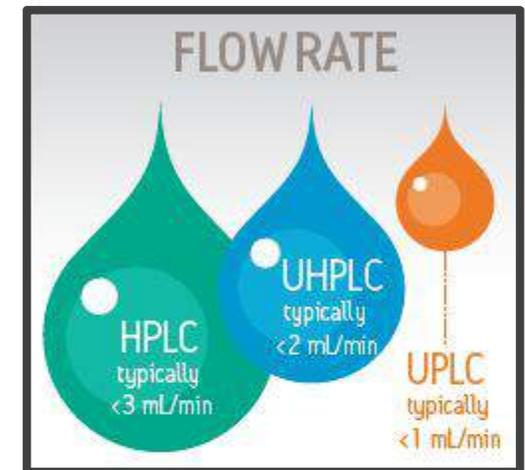
Emparelhar o tamanho de partícula com o ID coluna que melhor corresponde à dispersão do seu sistema de cromatografia



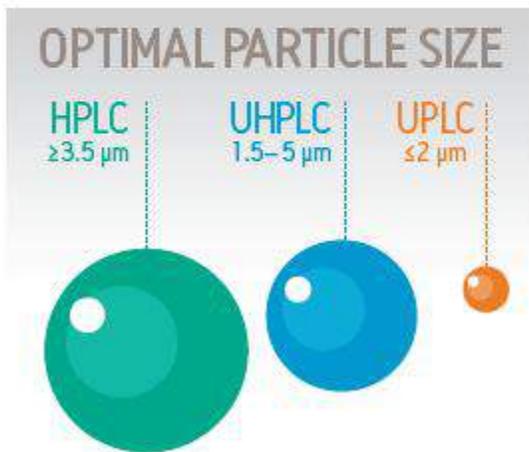
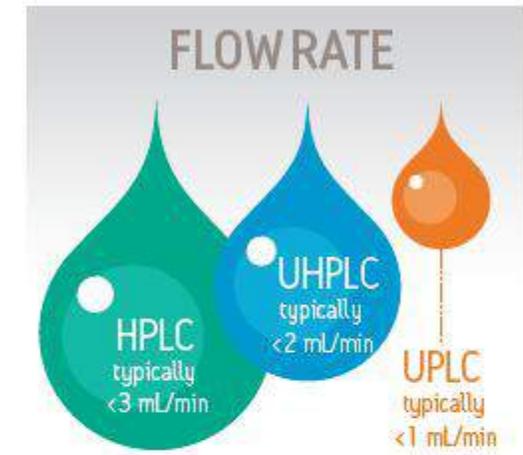
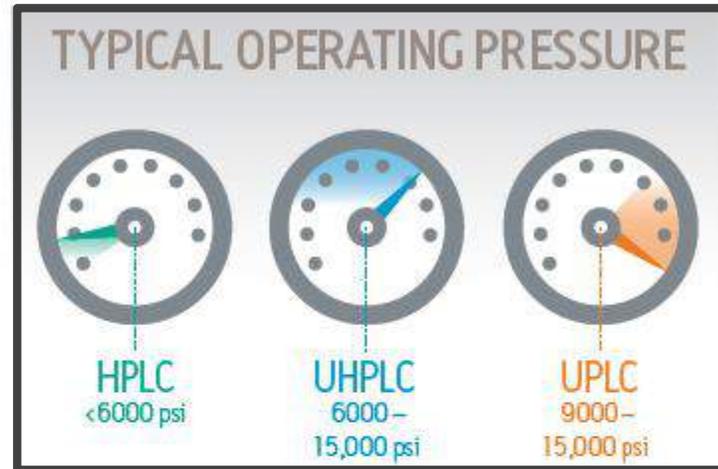
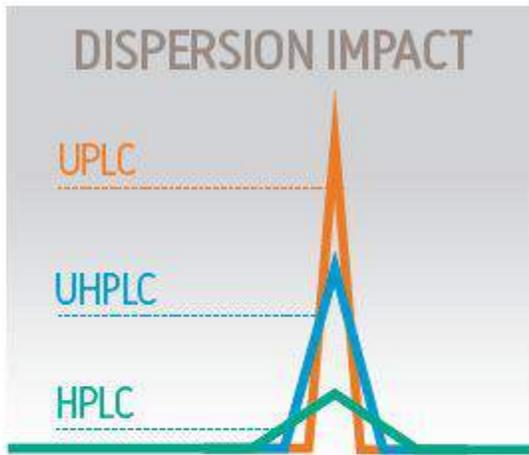
Escolha do melhor sistema



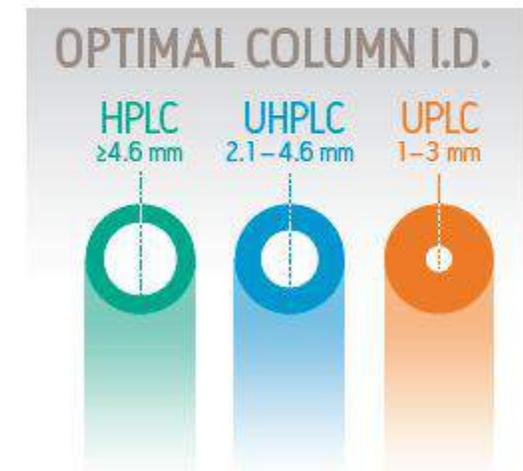
Seleção um fluxo que proporcione velocidade linear ideal para maximizar a eficiência das características da coluna (van Deemter)



Escolha do melhor sistema



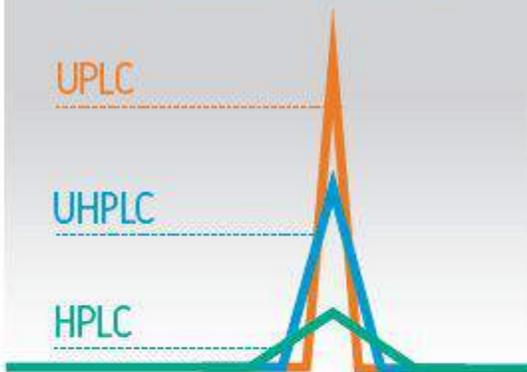
O sistema deve ser capaz de funcionar a pressões típicas de volta associados com a coluna seleccionada



Escolha do melhor sistema

O custo relativo por análise diminui quando migramos de HPLC para UHPLC para UPLC devido ao curto tempo de análise e baixo fluxo de análise

DISPERSION IMPACT



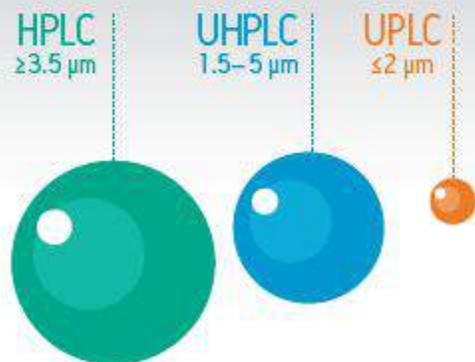
TYPICAL OPERATING PRESSURE



FLOW RATE



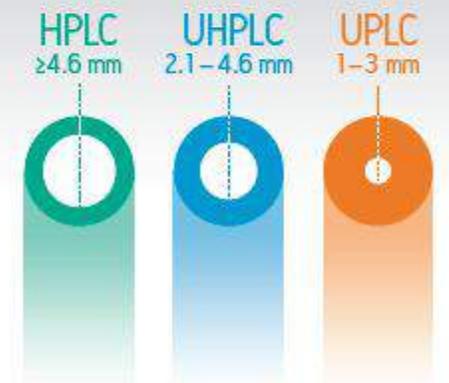
OPTIMAL PARTICLE SIZE



COST PER SAMPLE

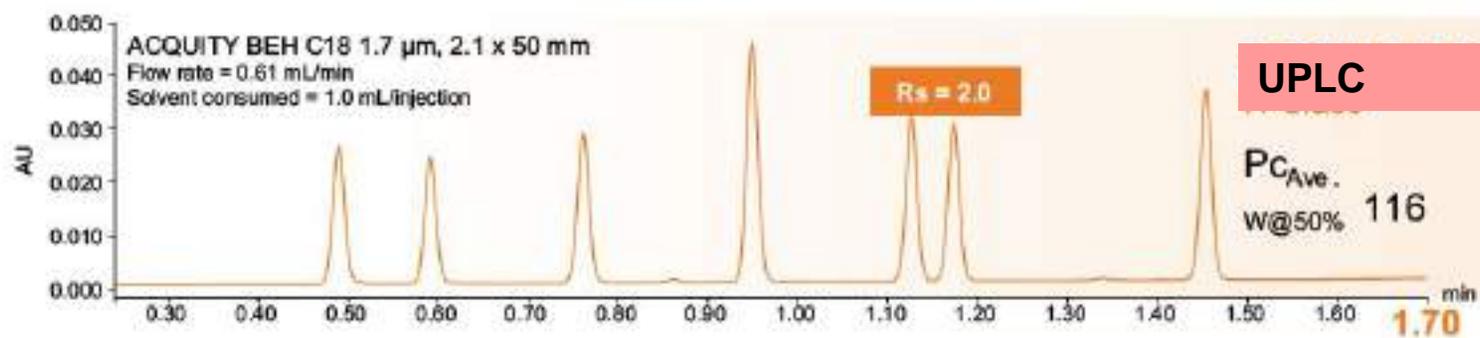
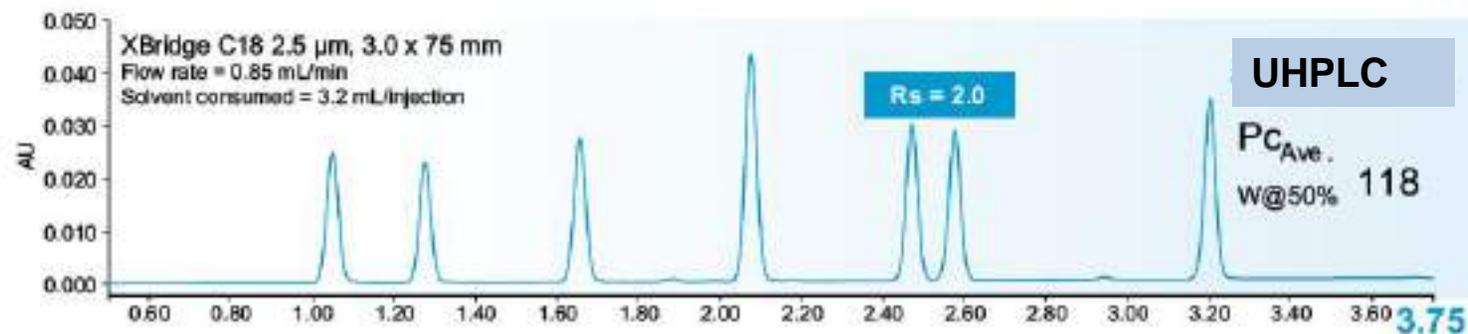
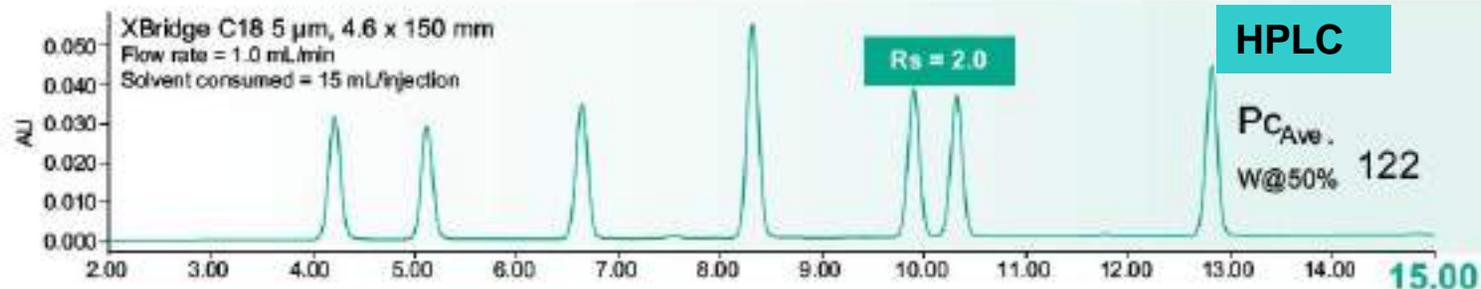


OPTIMAL COLUMN I.D.



Mesmo sistema de coluna = Melhor performace cromatográfica

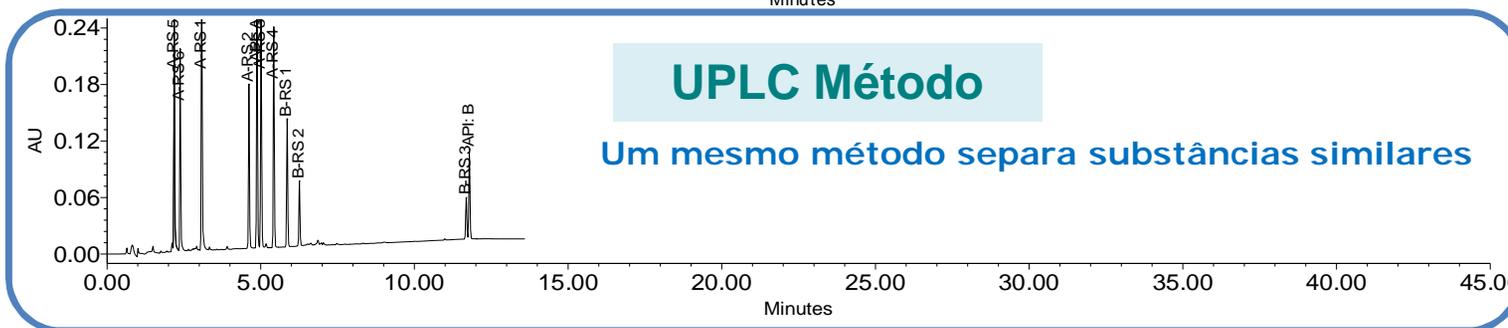
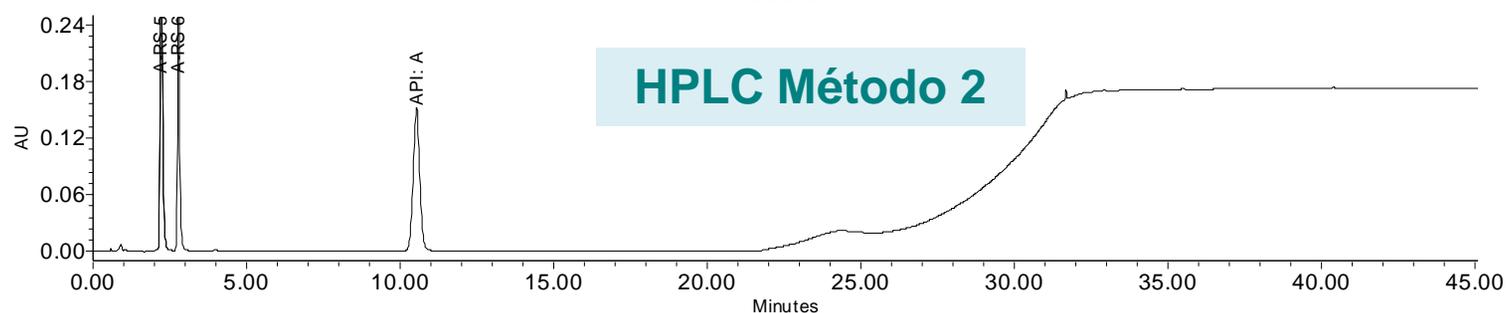
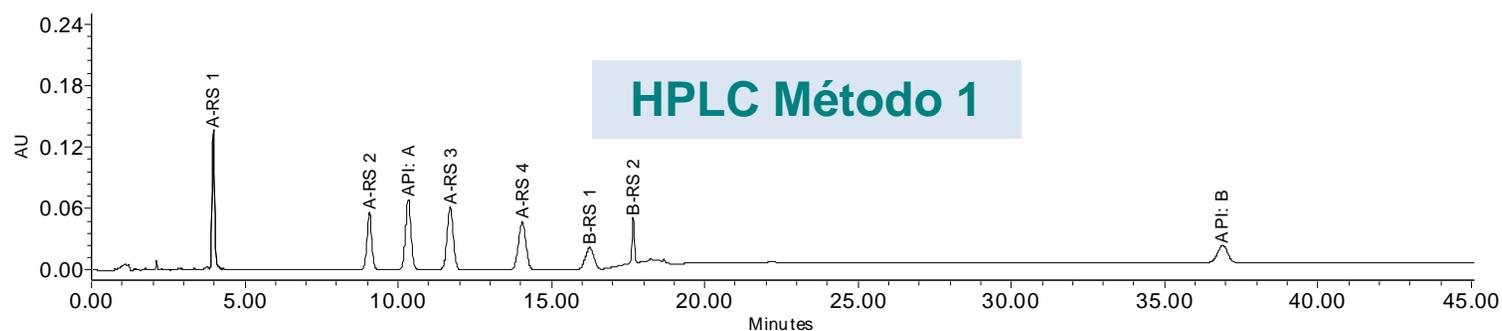
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™



Comparação entre métodos: HPLC - UPLC

Análise de substâncias correlatas

- HPLC
- UPLC



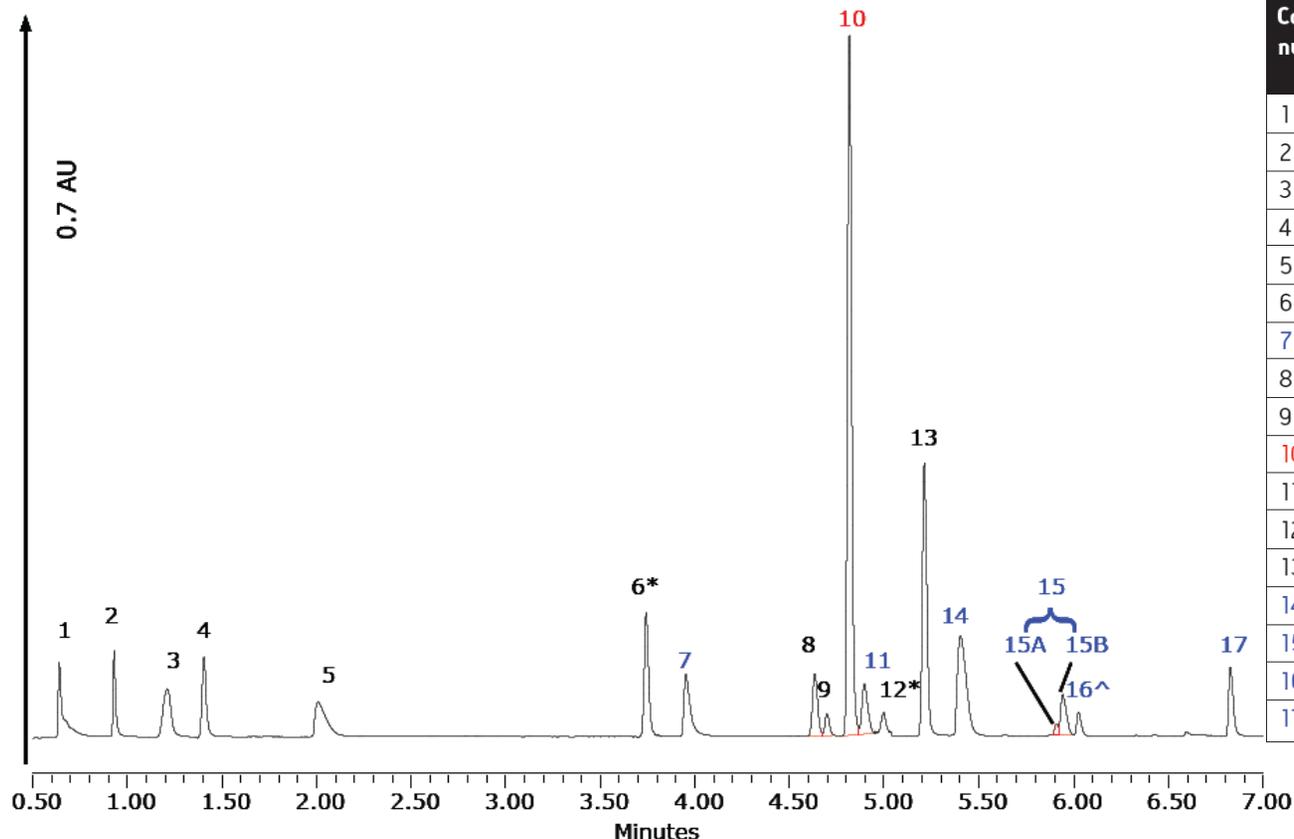
Separação de 10 vitaminas solúveis em água + cafeína + corantes

Condições: Análise em UPLC

Fluxo: 0,45 ml/min; Injeção 2 µL

Gradiente, FM A: água + 0,1 % ácido fórmico e FM B: metanol + 0,1 % ácido fórmico

Coluna HSS T3 (2,1x100 mm; 1,8 µm); Detecção UV



Compound number	Compound name	RT (min)	UV extracted wavelength (nm)
1	Thiamine (B1)	0.64	270
2	Ascorbic acid (C)	0.93	270
3	Nicotinic acid (B3-OH)	1.21	270
4	Nicotinamide (B3-NH ₂)	1.40	270
5	Pyridoxine (B6)	2.01	270
6	Calcium pantothenate (B5)	3.74	205
7	FD&C Yellow No. 5 (E102)	3.97	270
8	Cyanocobalamin (B12)	4.63	270
9	Folic acid (B9)	4.70	270
10	Caffeine	4.81	270
11	FD&C Yellow No. 6 (E110)	4.89	270
12	Biotin (B7)	4.99	205
13	Riboflavin (B2)	5.21	270
14	FD&C Red No. 40 (E129)	5.40	270
15	FD&C Green No. 3 (E143)	5.94	270
16	FD&C Blue No. 1 (E133)	6.02	630
17	FD&C Red No. 3 (E127)	6.83	270

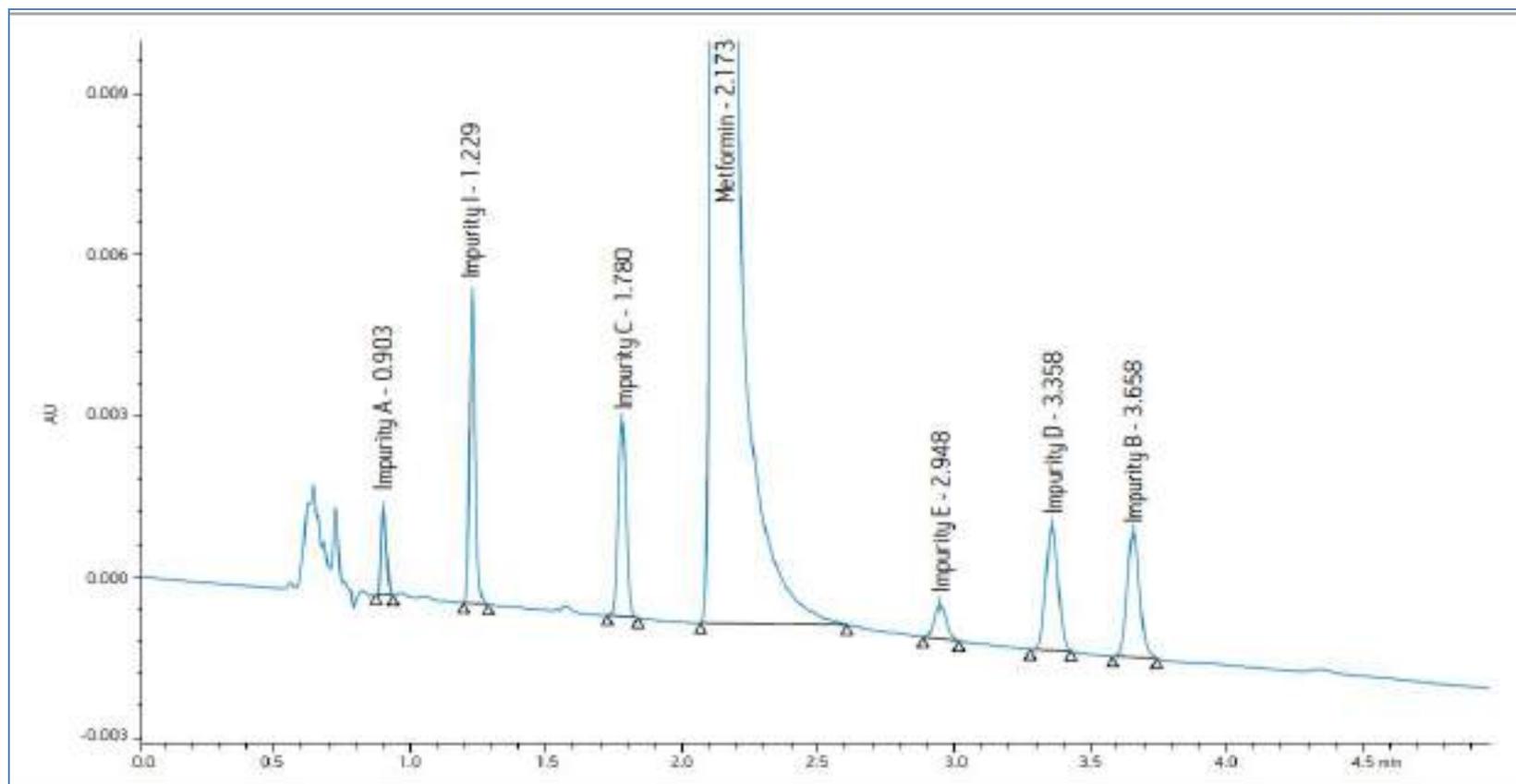
Análise de Impurezas da Metformina

Condições: Análise em UPLC

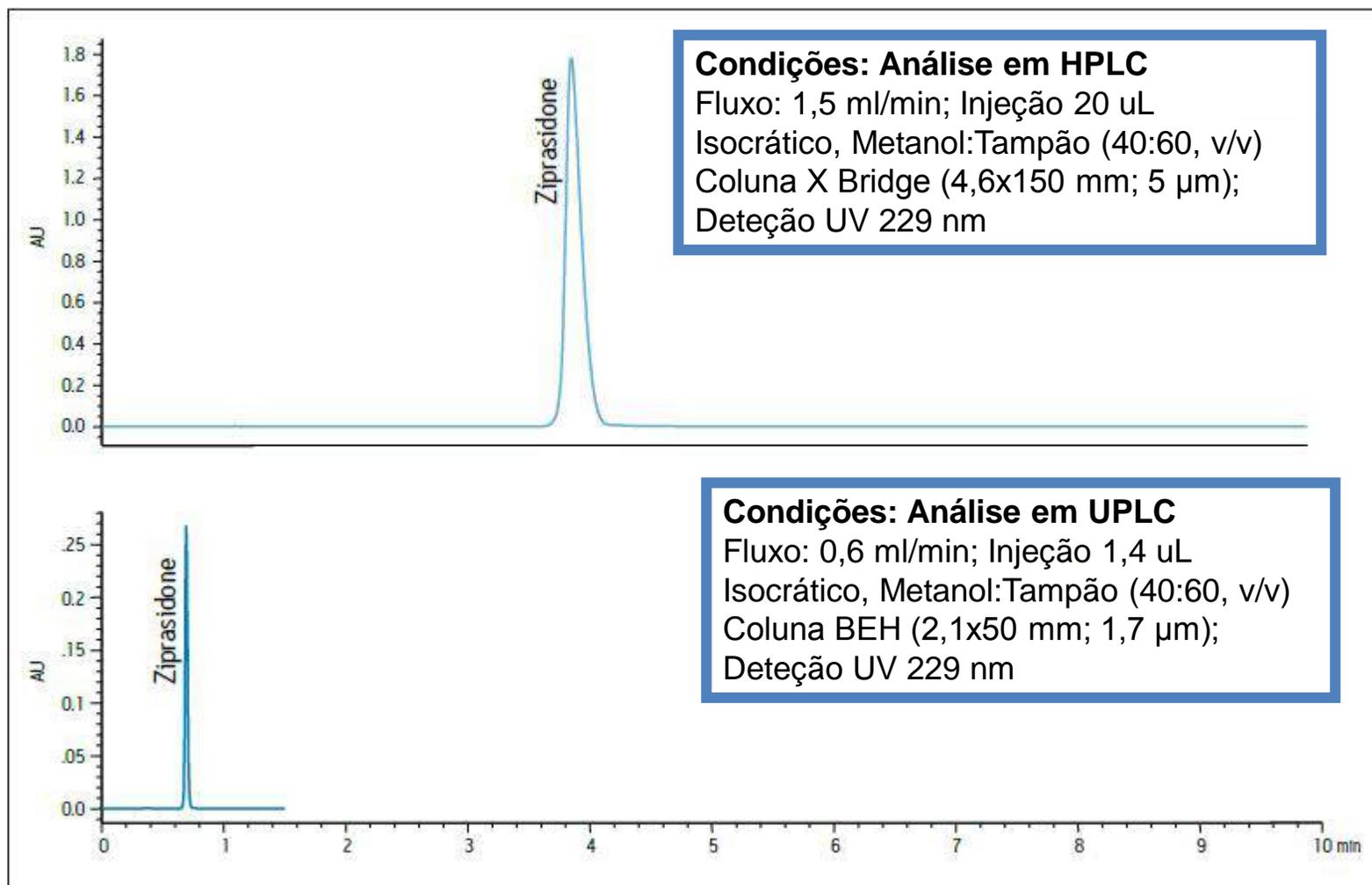
Fluxo: 0,5 ml/min; Injeção 1 uL

Isocrático, FM ACN:Fosfato de potássio 20 mM (80:20, v/v)

Coluna BEH Amida (2,1x150 mm; 1,7 µm); Deteção UV



Análise de Ziprasidona HCl Transferência HPLC - UPLC



Transferência ou Re-desenvolvimento do Método HPLC - UPLC?

- **Transferência do método:**
 - Utilização das informações do método do HPLC;
 - A disponibilidade de diferentes colunas para o UPLC permite manter a seletividade e o fator de capacidade do método do HPLC.

- **Quando há a necessidade de re-desenvolvimento do método?**
 - Diferenças de seletividade entre as colunas do HPLC e do UPLC dificultam a conversão do método;
 - Condições do método do HPLC não favoráveis podem ser eliminadas no re-desenvolvimento do método.
 - UPLC = menor tempo, menor custo, maior eficiência

Muito
Obrigada!!

marina_ansolin@waters.com

