

Validação, Verificação e Transferência de Métodos Analíticos

Rafael Finocchiaro Maranhão

SCD Executive - United States Pharmacopeia



Last Update: April 2022

USP Subject Matter Expert

Course ID: CM-1225-04

Disclaimer



Because USP text and publications may have legal implications in the U.S. and elsewhere, their language must stand on its own. The USP shall not provide an official ex post facto interpretation to one party, thereby placing other parties without that interpretation at a possible disadvantage. The requirements shall be uniformly and equally available to all parties.

In addition, USP shall not provide an official opinion as to whether a particular article does or does not comply with compendial requirements, except as part of an established USP verification or other conformity assessment program that is conducted separately from and independent of USP's standard-setting activities.

Certain commercial equipment, instruments or materials may be identified in this presentation to specify adequately the experimental procedure. Such identification does not imply approval, endorsement, or certification by USP of a particular brand or product, nor does it imply that the equipment, instrument or material is necessarily the best available for the purpose or that any other brand or product was judged to be unsatisfactory or inadequate.

This course material is USP Property. Duplication or distribution without USP's written permission is prohibited.

USP has tried to ensure the proper use and attribution of outside material included in these slides. If, inadvertently, an error or omission has occurred, please bring it to our attention. We will in good faith correct any error or omission that is brought to our attention. You may email us at: legal@usp.org.

Instructor Name



USP Affiliation: USP Subject Matter Expert – USP Education
Title: SCD Executive
Company: United States Pharmacopeia
Education: BSc, MSc, Specialist

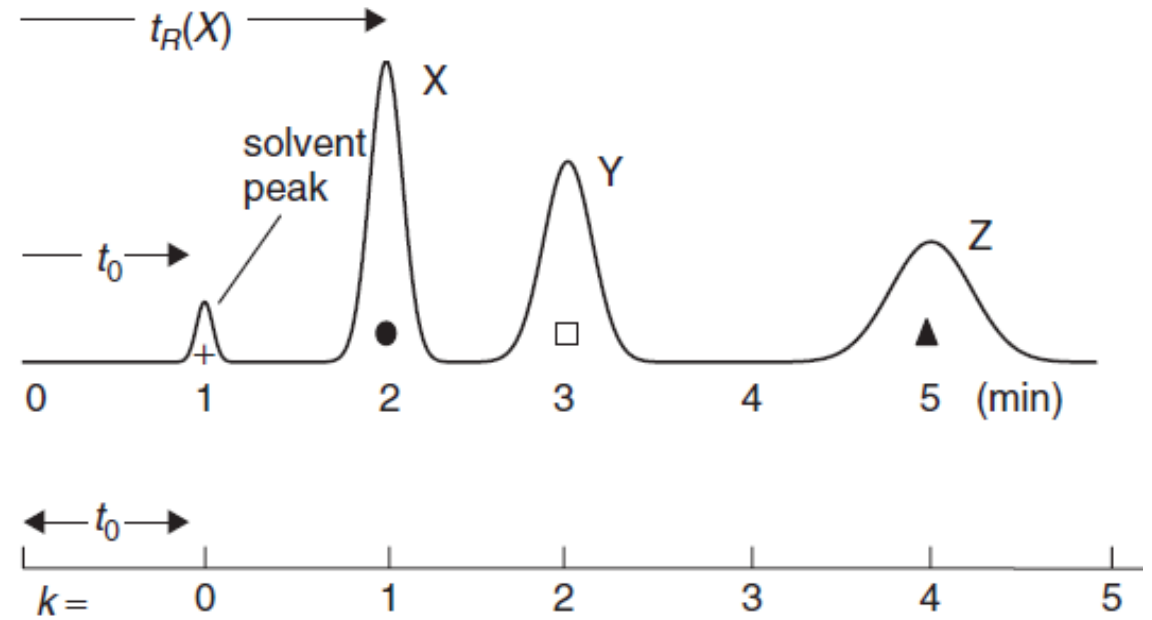
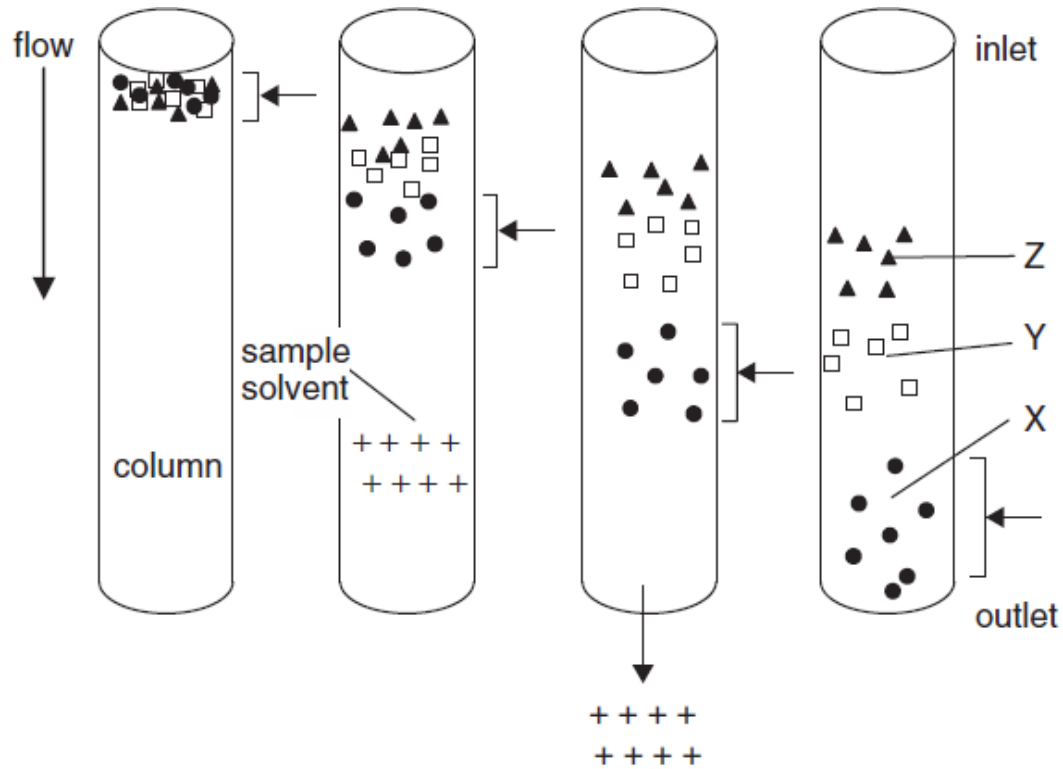
Biochemical Technician from ETECAP, Bachelor in Pharmacy-Biochemistry and Master in Chemical Technology from the University of São Paulo, and Specialist in Sustainability from Fundação Getulio Vargas. He has more than 20 years of experience in pharmaceutical research, production and analysis, working with quality management, analytical development, pharmaceutical product development, characterization, production of Reference Standards, technical support for Industry, Regulatory Agencies and stakeholder.

Since 2008 at USP, he has worked in the Reference Standards Laboratory, analytical development, compendial monograph modernization and Reference Standards planning, evaluation and production. He currently works with Technical Support and Customer Engagement, promotion and communication on USP products, services and solutions for the manufacture and analysis of medicines, foods and dietary supplements, as well as initiatives and projects focused on operational efficiency, sustainability and innovation.

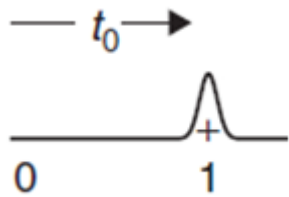
Verificação de Sistemas Cromatográficos



Teoria da Cromatografia Líquida

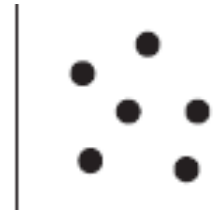


Teoria da Cromatografia Líquida



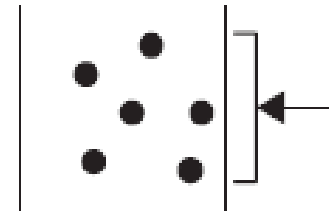
Tempo morto

Tempo de eluição de um composto não-retido



Banda

Volume que abrange o conjunto de moléculas de um composto



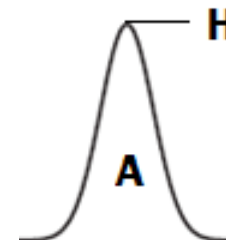
Largura da banda

Largura do volume de moléculas de um composto



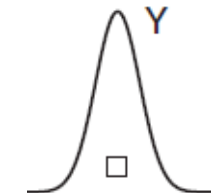
Tempo de retenção

Tempo em que elui a maior parte do conjunto de moléculas de um composto



Tamanho do pico

Medida proporcional à quantidade do composto eluído, em altura ou área

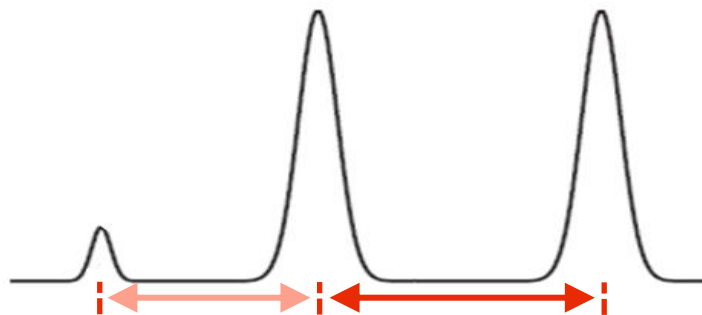


Pico

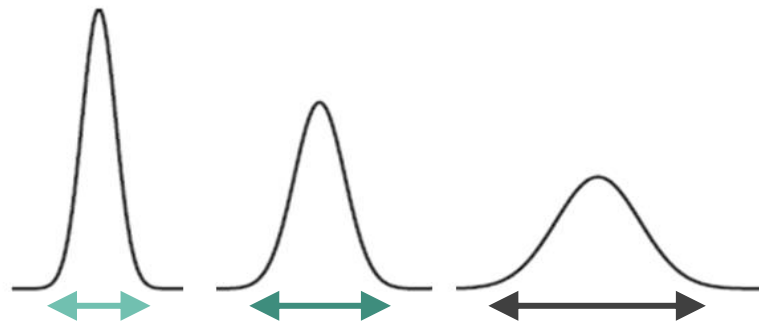
Registro da eluição do conjunto de moléculas de um composto

Dois comportamentos são responsáveis pelo processo de separação:

Migração diferencial



Espalhamento molecular



A Resolução entre 2 picos é expressa por:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left[\frac{k}{(1+k)} \right] \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i}$$

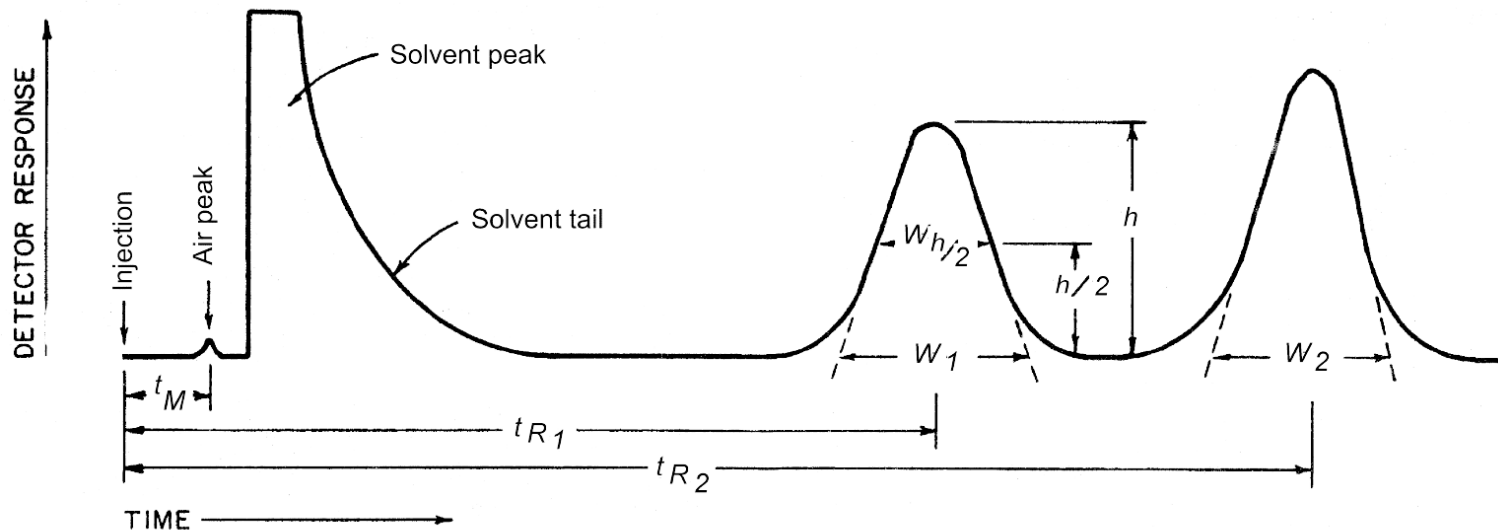
$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Sendo:

k = fator de retenção do pico menos retido
 i, j = picos adjacentes na ordem de eluição

Cromatograma

CURRENTLY OFFICIAL
✓ Official as of 1-Aug-2017



Sendo:

t_M = hold-up time (tempo de eluição de um composto não-retido)

t_{Ri} = tempo de retenção do pico i

W_i = largura do pico i (projeção à linha de base)



$W_{h/2}$ = largura do pico à meia altura

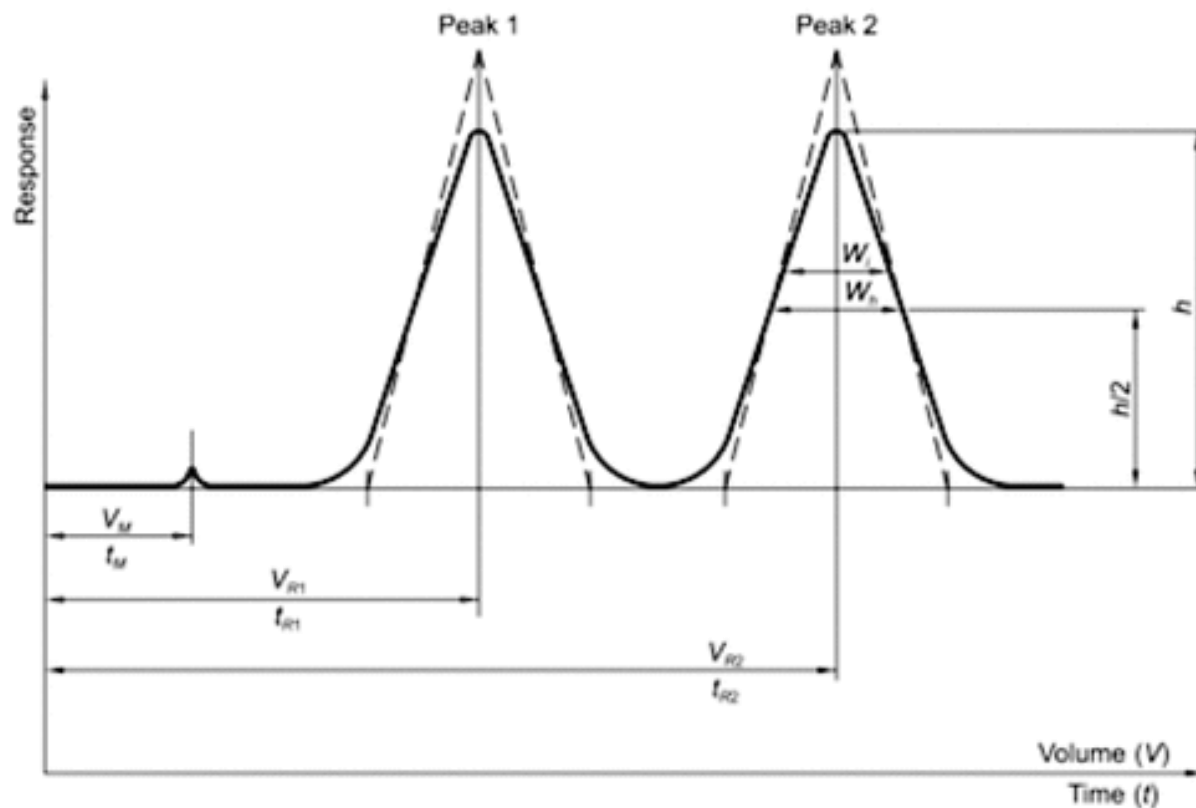
h = altura do pico

$h/2$ = altura do pico à meia altura

Cromatograma

NOT YET OFFICIAL

  To be Official on 1-Dec-2022



Sendo:

t_M = hold-up time (tempo de eluição de um composto não-retido)

V_M = hold-up volume (volume de fase móvel para obter t_M)

t_{Ri} = tempo de retenção do pico i

V_{Ri} = volume de retenção do pico i

W_i = largura do pico i (projeção à linha de base)

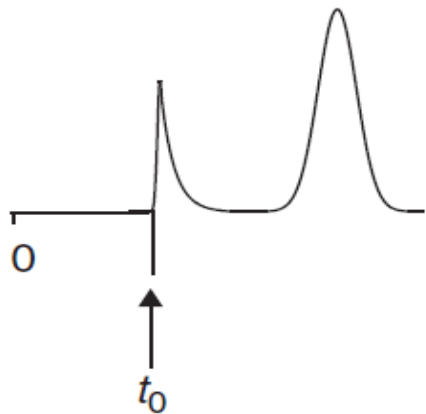
$W_{h/2}$ = largura do pico à meia altura

h = altura do pico

$h/2$ = altura do pico à meia altura

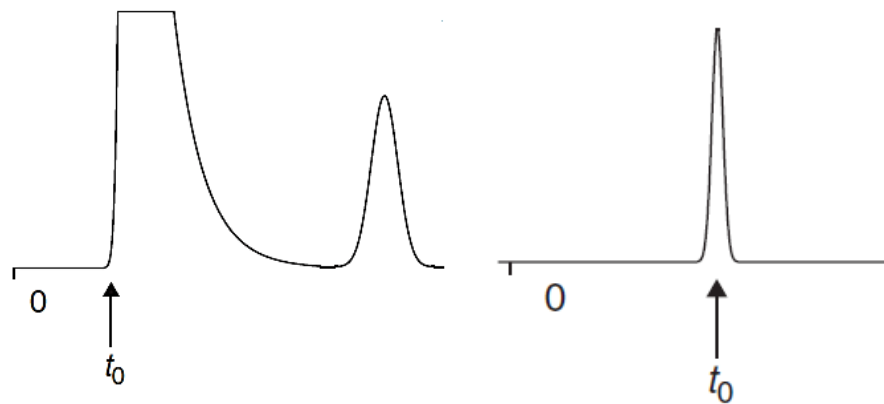
Tempo morto | Formas de determinar o t_0

Pelo solvente

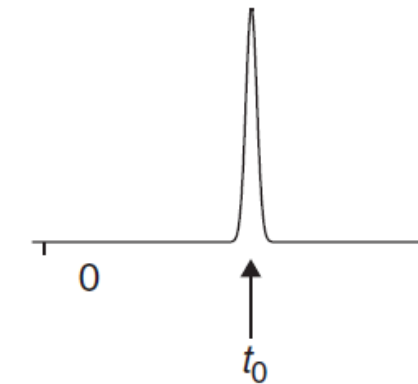


Primeiro distúrbio na linha de base, relativo à mudança no índice de refração da fase móvel pela diferença de composição do diluente

Pela eluição de compostos não-retidos



Alguns compostos não retidos da amostra



Injeção de um composto conhecido que não tenha retenção

Estimar pela equação

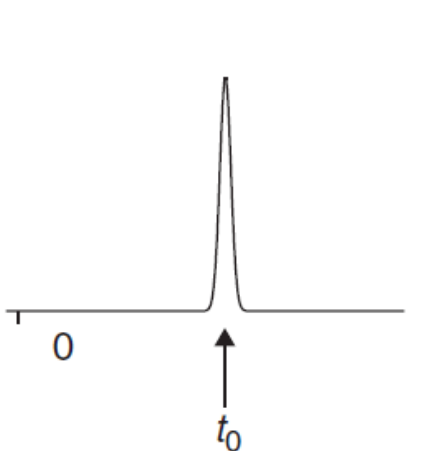
$$t_0 = 5 \times 10^{-4} \frac{(L \times d_c^2)}{F}$$

L = comprimento da coluna

d_c = diâmetro da coluna (mm)

F = vazão da fase móvel (mL/min)

Exemplos de compostos para determinar t_0



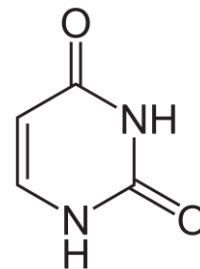
Injeção de um composto conhecido que não tenha retenção



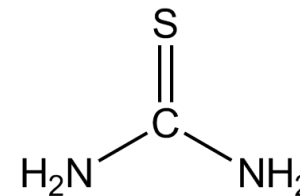
Fase reversa



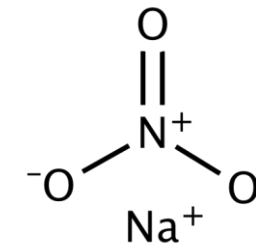
Fase normal



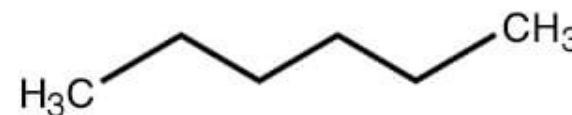
Uracil



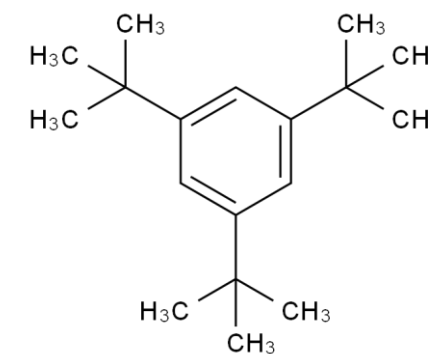
Tiouréia



Nitrato de sódio



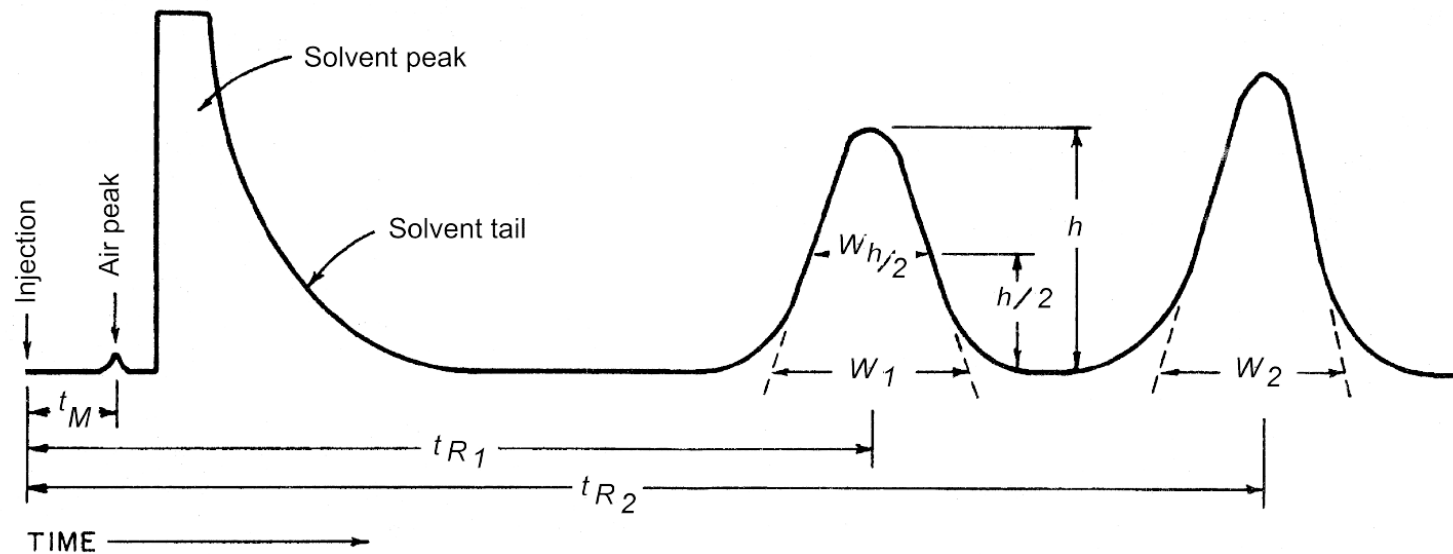
Hexano



1,3,5-Tri-tert-butil benzeno

Retenção Relativa (r)

A razão entre os tempos de retenção ajustados de um composto de interesse e de outro utilizado como referência.



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

Sendo:

t_M = tempo de eluição de um composto não-retido

t_{R2} = tempo de retenção do composto de interesse (min)

t_{R1} = tempo de retenção do composto de referência (min)

Tempo de Retenção Relativo (RRT)

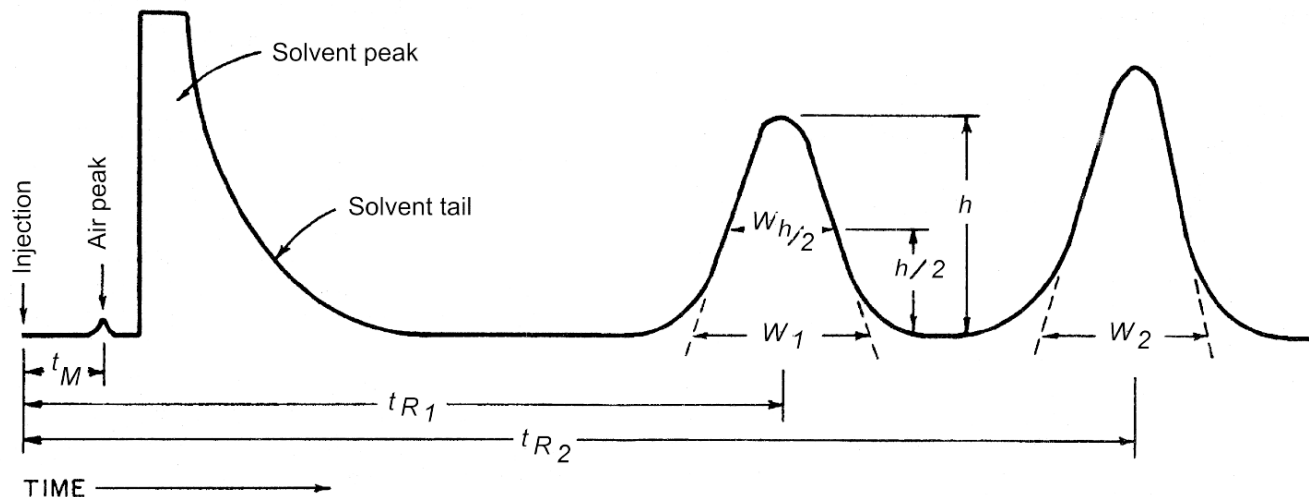
Conhecido também como “retenção relativa não ajustada”, é a relação entre o tempo de retenção do pico relativo ao composto de interesse e o tempo de retenção do pico de referência.

$$RRT = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Sendo:

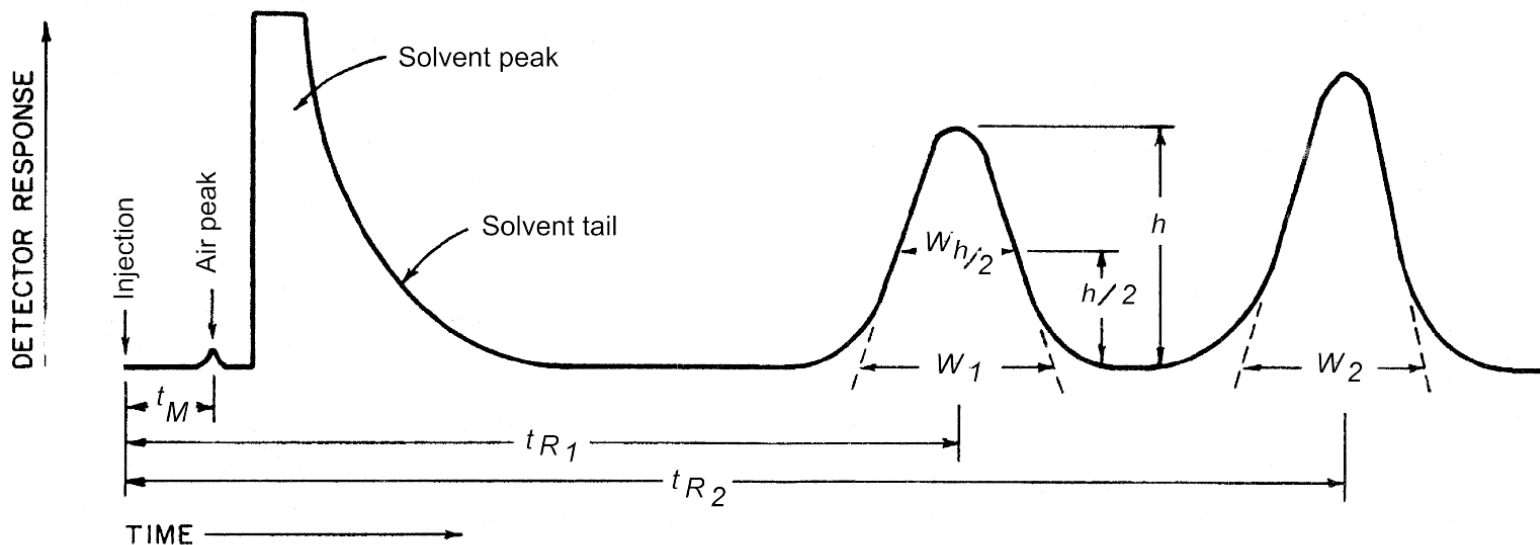
t_{R2} = tempo de retenção do composto de interesse (min)

t_{R1} = tempo de retenção do composto de referência (min)



Largura do pico (W) e Número de pratos (N)

CURRENTLY OFFICIAL
Official as of 1-Aug-2017



A habilidade da coluna em promover picos finos e uma boa separação é descrito como a “Eficiência da Coluna”, definida pelo número de pratos **N**.

N depende das condições de separação (tamanho e uniformidade das partículas da fase estacionária, temperatura e comprimento da coluna, a vazão e viscosidade da fase móvel, entre outras).

Sendo:

t_R = tempo de retenção do composto (min)



$W_{h/2}$ = largura do pico à meia altura

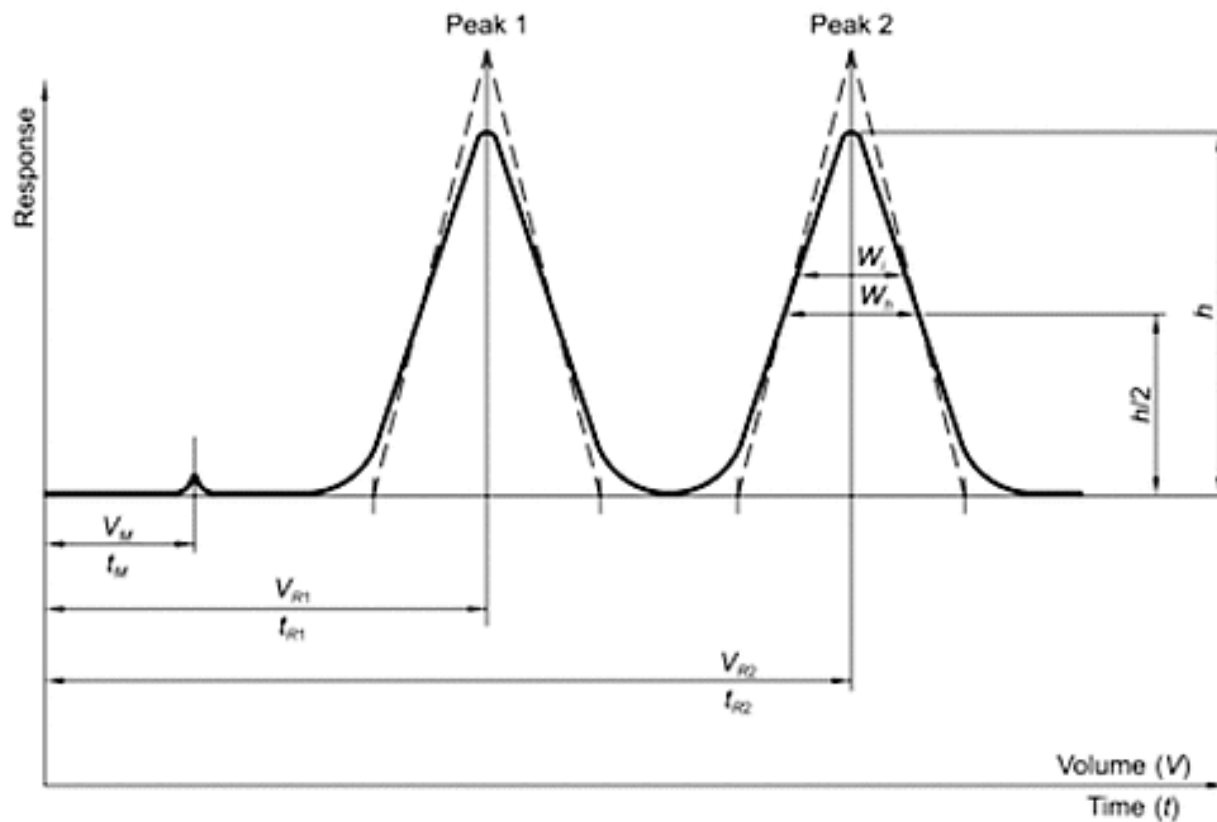
W = largura do pico (projeção à linha de base)

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

Largura do pico (W) e Número de pratos (N)

NOT YET OFFICIAL

  To be Official on 1-Dec-2022



$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

Sendo:

t_R = tempo de retenção do composto (min)

$W_{h/2}$ = largura do pico à meia altura

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

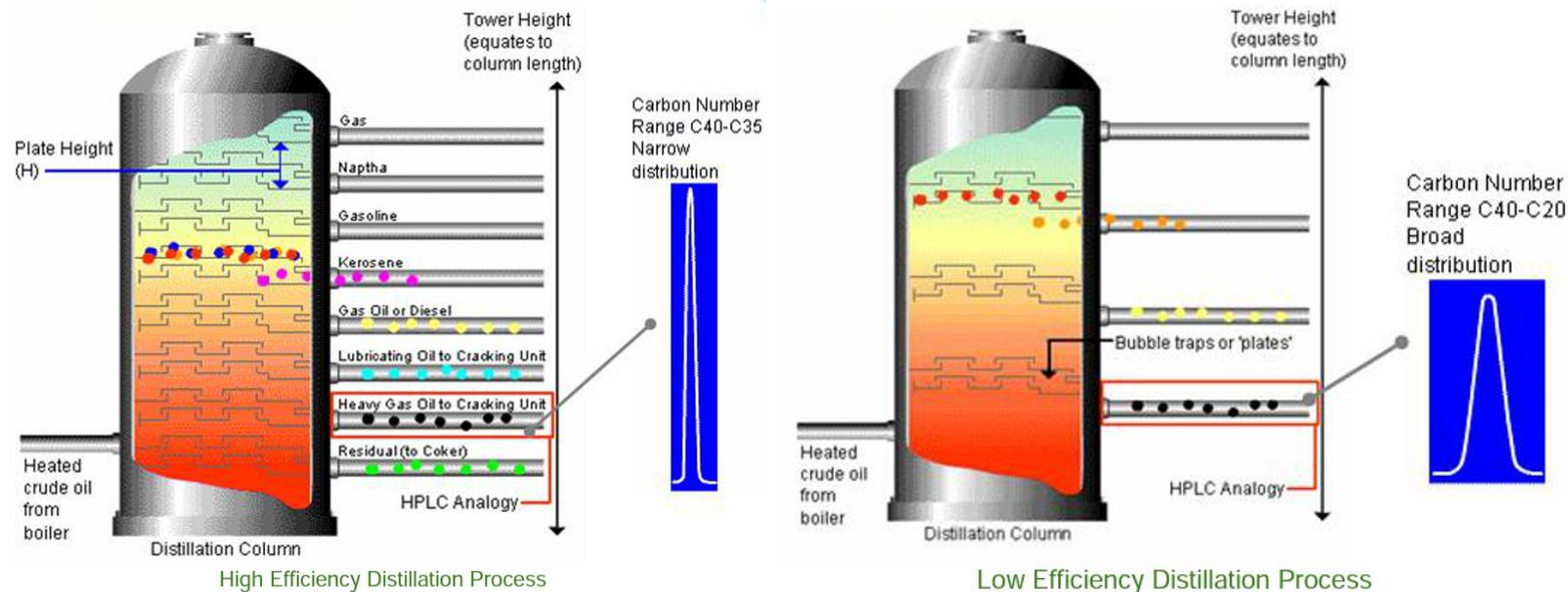
É a razão entre o comprimento da coluna cromatográfica (em μm) e o número de pratos:

$$H = \frac{L}{N}$$

Sendo:

L = comprimento da coluna cromatográfica (μm)

N = número de pratos



Ref: The Theory of HPLC - Chromatographic Parameters. LCGC. Crawford Scientific, 2021.

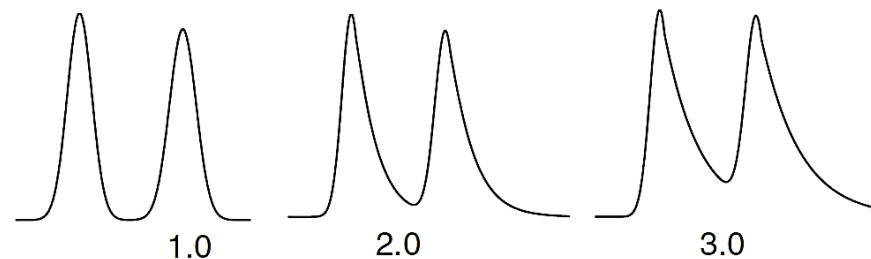
Fator de Simetria (A_s) ou Fator de cauda (*Tailing factor, T*)

Em condições ideais, devemos ter um pico na forma de uma distribuição gaussiana simétrica. A presença de assimetria pode prejudicar a separação.

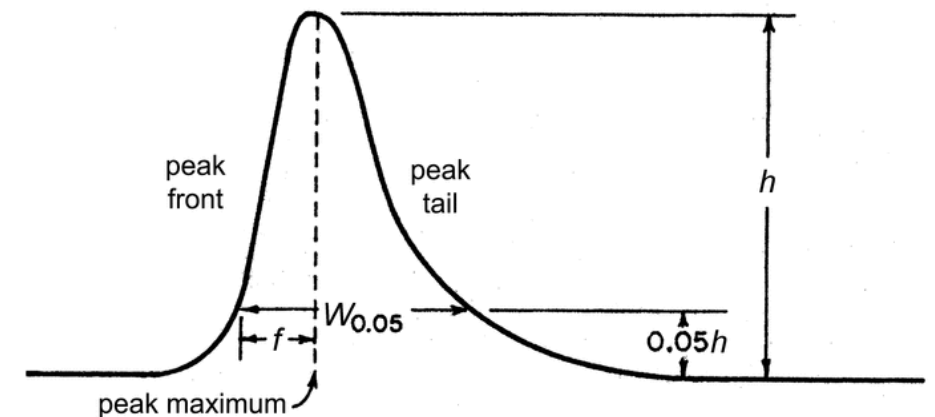
Fatores de Simetria (A_s) de até 1,2 tem efeito mínimo sobre a separação, a não ser quando se trata de um pico menor eluindo após o pico principal. $A_s > 2,0$ são absolutamente críticos.

$A_s < 1,0$ são menos frequentes, representando uma frente de pico dispersa. Porém, da mesma forma possuem efeito negativo na separação.

Picos assimétricos podem comprometer a separação e a quantificação



CURRENTLY OFFICIAL
Official as of 1-Aug-2017





$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Sendo:

$W_{0.05}$ = largura do pico à 5% da sua altura
 f = distância entre a linha de frente do pico à 5% da sua altura e o ápice do pico projetada à linha de base

Fator de Simetria (A_s) ou Fator de cauda (*Tailing factor, T*)

NOT YET OFFICIAL

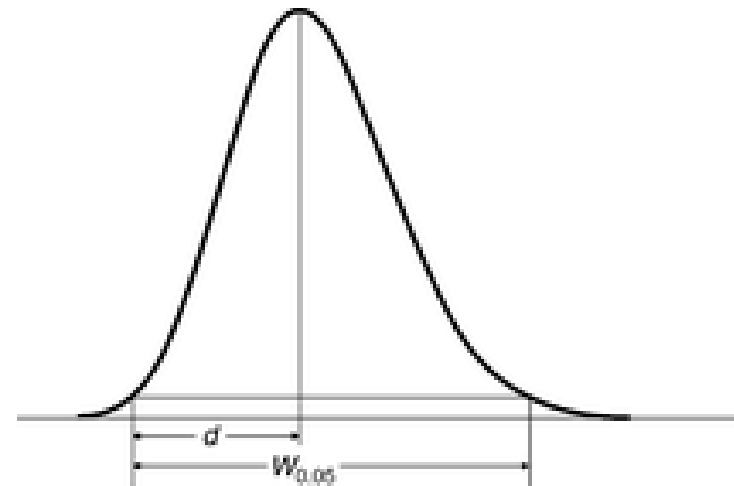
  To be Official on 1-Dec-2022

$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2d}$$

Sendo:

$W_{0.05}$ = largura do pico à 5% da sua altura

d = distância entre a linha de frente do pico à 5% da sua altura e o ápice do pico projetada à linha de base



- Salvo indicação em contrário, em um teste ou ensaio, o fator de simetria (fator de cauda) do pico usado para quantificação é 0,8 – 1,8.

Resolução entre picos (R_S)

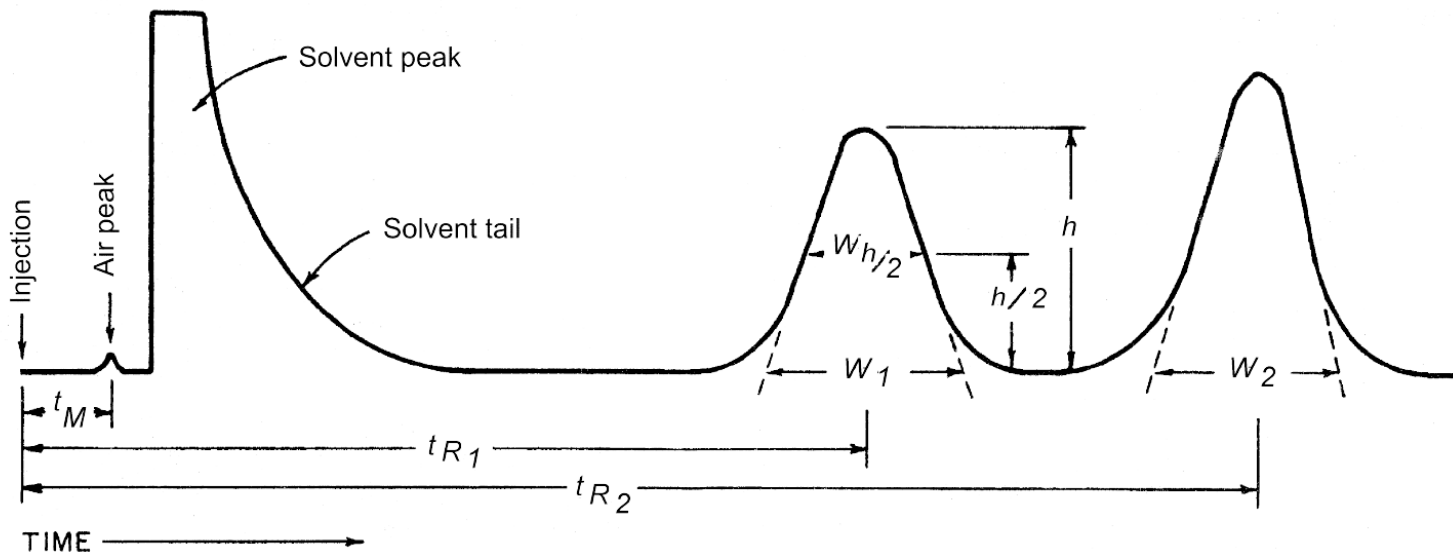
A forma mais eficiente de aumentar a resolução é aumentar o valor de α , que é a razão entre os fatores de retenção (k) dos compostos adjacentes.

Para a verificação do sistema, deve-se ter em mente o controle da resolução do par crítico da separação.

CURRENTLY OFFICIAL
Official as of 1-Aug-2017

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

$$R_S = 1.18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$



Sendo:

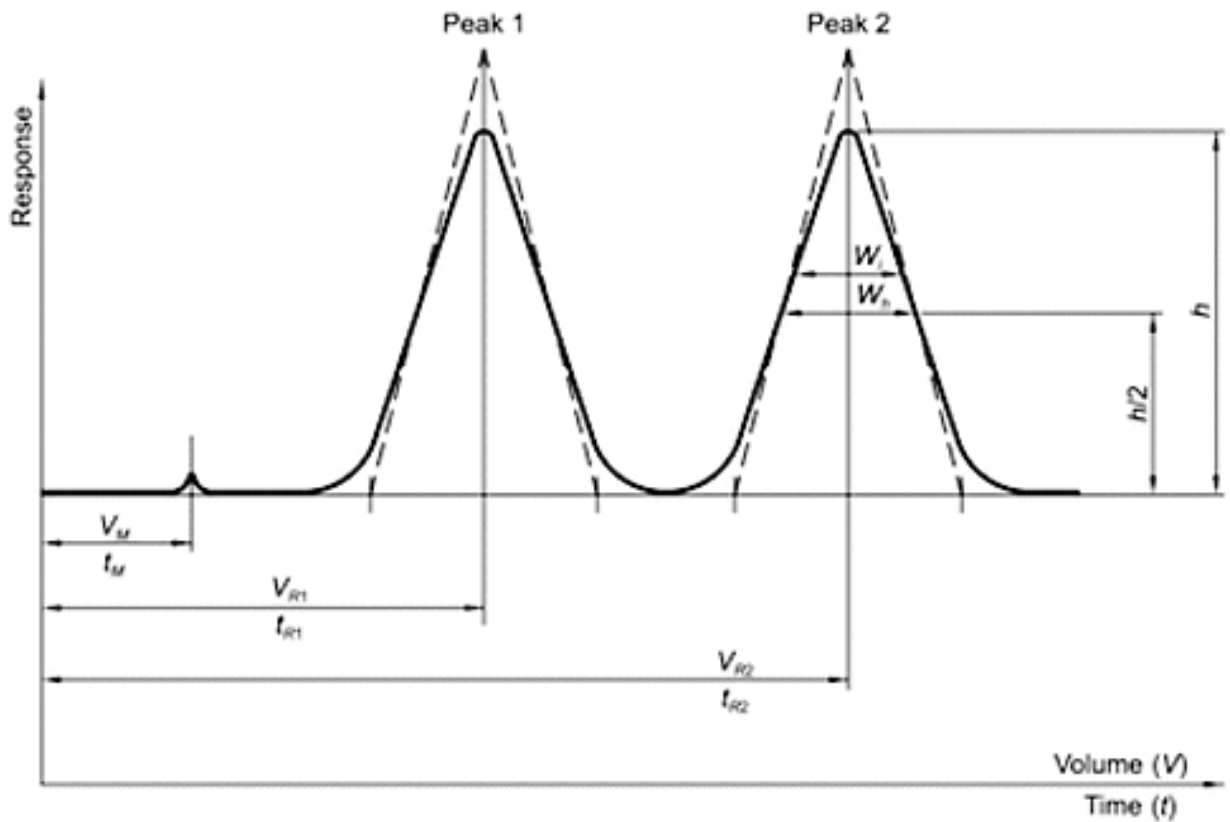
t_{Ri} = tempo de retenção do composto i (min)

$W_{i,h/2}$ = largura do pico i à meia altura

W_i = largura do pico (projeção à linha de base)

Resolução entre picos (R_S)

NOT YET OFFICIAL
To be Official on 1-Dec-2022



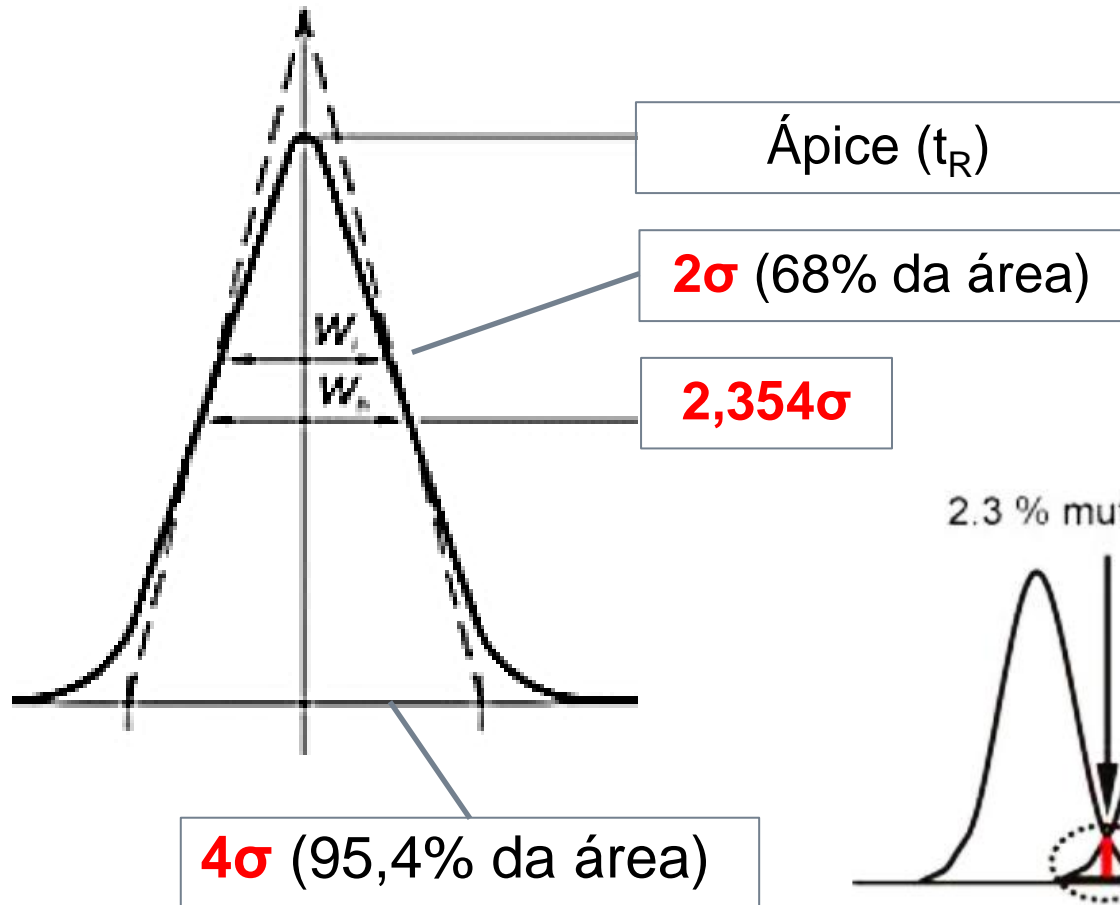
$$R_S = 1.18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

Sendo:

t_{Ri} = tempo de retenção do composto i (min)

$W_{i,h/2}$ = largura do pico i à meia altura

Resolução entre picos (R_S)

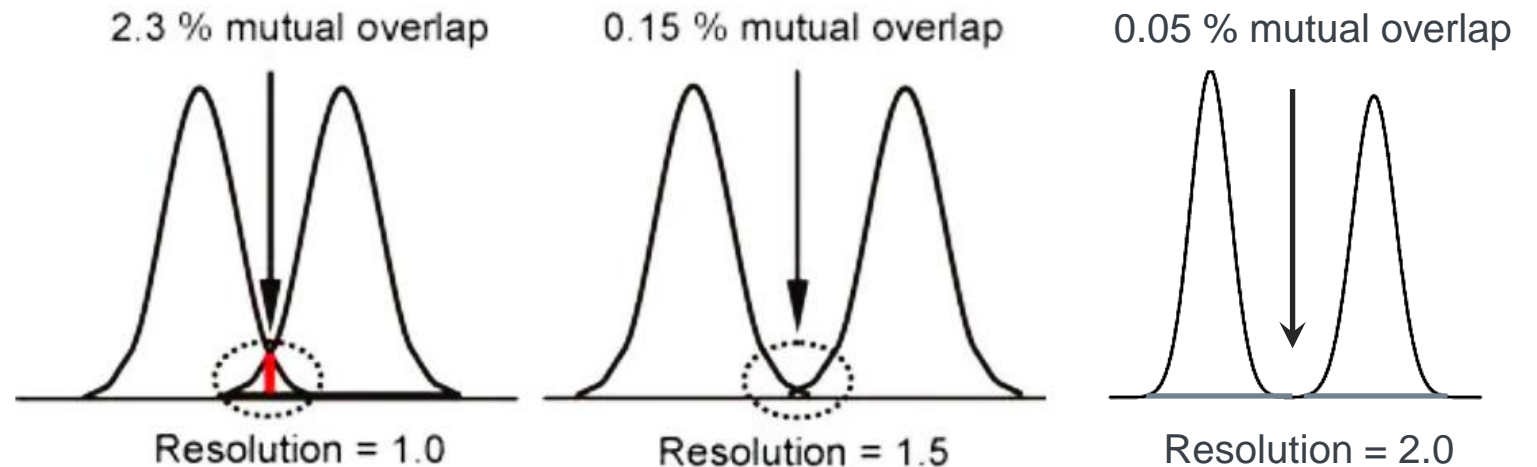


$$R_S = 1.18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

Sendo:

t_{Ri} = tempo de retenção do composto i (min)

$W_{i,h/2}$ = largura do pico i à meia altura



Razão pico-vale (p/v)

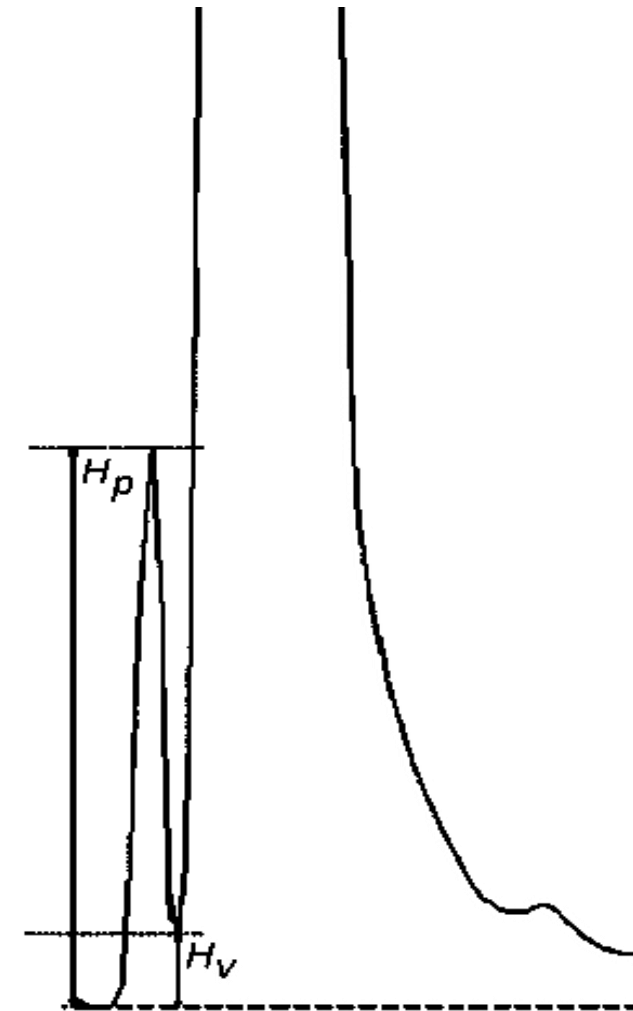
O p/v pode ser empregado como critério de adequabilidade do sistema em um teste para substâncias relacionadas quando a separação da linha de base entre dois picos não for alcançada (separação parcial) de duas substâncias.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

Sendo:

H_p = altura do pico menor

H_v = altura entre a linha de base e o vale entre os dois picos adjacentes (a menor altura da intersecção)



Relação sinal/ruído (S/N)

A relação sinal/ruído é um parâmetro útil para verificar a capacidade de detecção e adequabilidade do sistema, uma vez que o ruído pode afetar a precisão e exatidão do método.

Se possível, fazer esta medição ao redor do pico de interesse, para melhor representatividade.

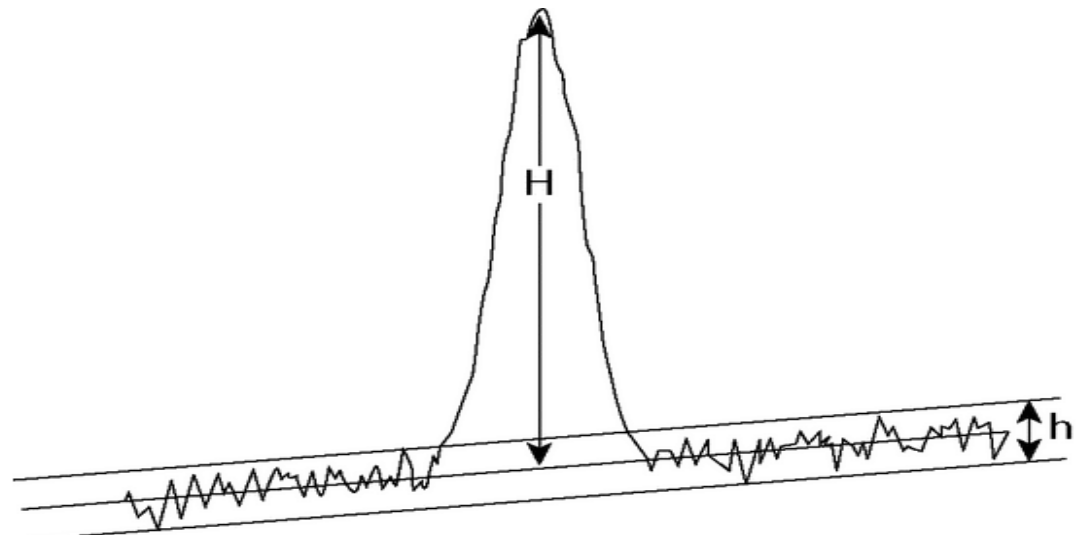
CURRENTLY OFFICIAL
✔ Official as of 1-Aug-2017

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

Sendo:

H = altura do pico (do ápice à linha de base)

h = amplitude do ruído no intervalo de no mínimo 5 vezes a largura à meia-altura do pico de interesse.



Relação sinal/ruído (S/N)

A relação sinal/ruído é um parâmetro útil para verificar a capacidade de detecção e adequabilidade do sistema, uma vez que o ruído pode afetar a precisão e exatidão do método.

Se possível, fazer esta medição ao redor do pico de interesse, para melhor representatividade.



$$S/N = \frac{2H}{h}$$

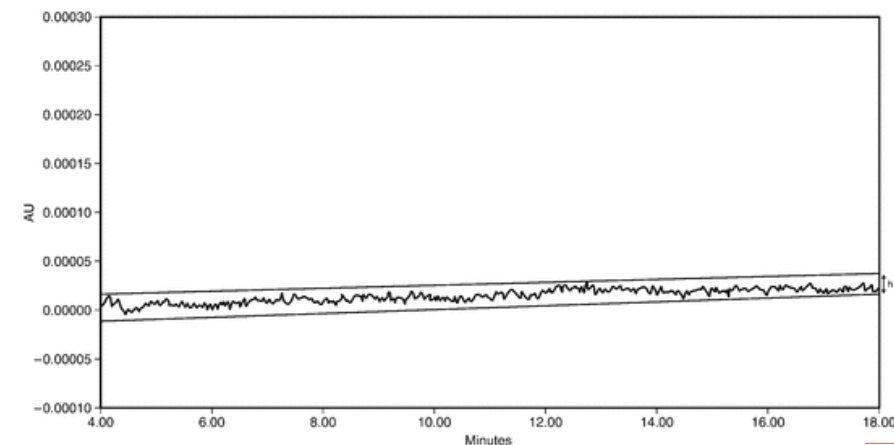
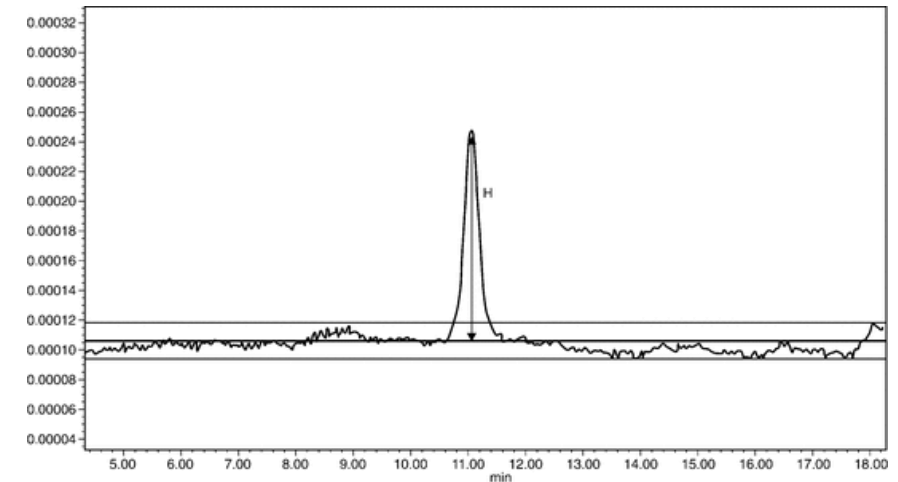
Sendo:

H = altura do pico (do ápice à linha de base)

h = amplitude do ruído (injeção do branco) no intervalo de no mínimo 20 vezes a largura à meia-altura do pico de interesse.

NOT YET OFFICIAL

  To be Official on 1-Dec-2022



Discussion



Empowering a healthy tomorrow

USP Education