

Pharmaceutical Technology®

Brasil



Edição

5.13



► O papel da ciência analítica na implantação da qualidade desde a concepção

pag. 20

► Determinação de limites de resíduos visíveis em superfície de equipamento de uma fábrica farmacêutica

pag. 6

Katrin Töppner, Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37079 Göttingen; Dr. Dirk Hansen, Phenomenex Ltd, 63741 Aschaffenburg e Dr. Elmar Herbig, Sartorius AG, 37075 Göttingen, E-mail: elmar.herbig@sartorius.com.

Tradução deste artigo por:
Carlos Augusto Scarton – Sartorius do Brasil Ltda

► Katrin Töppner, Dirk Hansen, Elmar Herbig

Água ultrapura para análise em HPLC



HPLC é um método analítico para a separação, identificação e quantificação de substâncias por cromatografia líquida. Os primórdios da HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta pressão), data do início dos anos 60. Graças ao aperfeiçoamento dos materiais para as colunas e dos equipamentos, por volta dos anos 70, a técnica começou a ser conhecida como *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência) [1].

No método de HPLC a mistura a ser separada é bombeada, com o auxílio de um solvente (meio de eluição) ou uma mistura de solventes (eluente / fase móvel); e através de um injetor e uma bomba para a coluna de separação, que é geralmente um tubo de aço inoxidável preenchido com a chamada fase estacionária (ver Figura 1). A fase estacionária consiste tipicamente em partículas porosas de sílica gel ou polímero cuja superfície foi tratada de forma a promover ligações químicas.

Estas ligações são responsáveis pela interação seletiva dos analitos na fase estacionária, que são necessários para se obter uma separação cromatográfica efetiva. Como mecanismos de separação, dependendo da amostra e da fase estacionária podem ser consideradas por exemplo: absorção pelas forças de Van der Waals, troca iônica, exclusão de íons e outros.

Na separação, as substâncias da amostra são retidas no material da coluna em função de suas afinidades por durante diferentes períodos de tempo e, por conseguinte, saem da coluna depois de diferentes tempos. O detector registra então a saída de cada um dos componentes da amostra, e essas informações são enviadas e processadas em um computador. O resultado é um cromatograma (Figura 1).

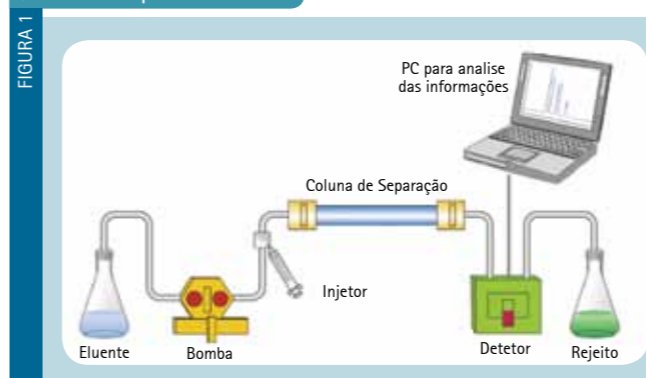
O número de picos corresponde à quantidade de componentes da amostra separadas e a área superficial é proporcional à sua quantidade (Kromias 2000 [1]).

A análise de açúcar é uma aplicação típica em HPLC. Esta análise foi conduzida sob vários ensaios para caracterizar a qualidade das membranas. Por um lado, o ensaio visou verificar o empobrecimento de açúcares testados em membranas e por outro, verificar a atividade de membranas imobilizadoras de enzimas. No ensaio foram analisados os seguintes açúcares: rafinose, glucose e frutose.

Para a detecção específica dos açúcares podem ser utilizados métodos enzimáticos (ex. método GOD / POD para a determinação de glucose [2]), ou métodos espectroscópicos (ex. Determinação de frutose de acordo Dische & Borenfreund [3]).

Hoje em dia, em analítica moderna, os açúcares são geralmente determinados utilizando cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estes procedimentos são aplicáveis principalmente em misturas onde é necessário separar os vários açúcares [4].

► Estrutura típica de um HPLC



Na HPLC, tal como descrito aqui, o líquido deve ser particularmente puro, tanto física como quimicamente, ele não deve conter quaisquer substâncias ou partículas em suspensão nem substâncias dissolvidas que podem ser separados na coluna provocando assim a emissão de um sinal. A qualidade do solvente é muito importante no que diz respeito à confiabilidade da análise HPLC. A presença de vestígios de impurezas na eluição em gradiente pode causar o aparecimento de "picos fantasma". Estes traços de substâncias se acumulam na coluna durante toda a análise e se liberam na próxima mudança de eluição. A água utilizada como reagente deve ser livre de germes. Para isso podem ser adicionadas substâncias (ex. sais de cobre, azida de sódio) que previnem o aparecimento de bactérias ou algas no reagente [5]. Neste sentido, é necessário levar em consideração as recomendações do fabricante da coluna, já que o uso de aditivos incorretos podem causar danos irreversíveis na coluna de separação.

Água desmineralizada ou destilada contém quantidades consideráveis de substâncias orgânicas que podem causar picos fantasmas [5]. Um líquido com impurezas pode causar deposições na fase estacionária, que resultam em entupimento, que produz um aumento de pressão e se manifesta na variação do tempo de retenção das amostras.

A água com qualidade requerida para análise, especialmente a utilizada em HPLC, pode ser adquirida como reagente disponível por vários fabricantes ou produzida no próprio laboratório nas quantidades necessárias, utilizando um sistema de purificação de água tal como arium® pro VF.

O que se segue descreve ensaios para a separação de misturas de açúcares em que a água ultrapura foi usada como fase móvel (fluido), produzida no purificador arium® pro VF.

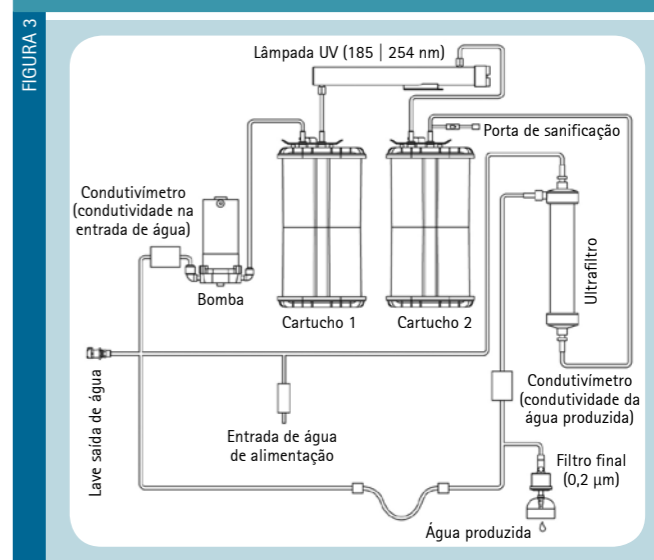
► Descrição do sistema de água ultrapura arium® pro VF



FIGURA 2: Sistema de água ultrapura arium® pro VF (Foto: Sartorius)

Sistema arium® pro VF (Figura 2) foi construído para produzir água ultrapura a partir de água potável pré tratada, removendo as impurezas ainda presentes na água de alimentação. A produção de água ultrapura requer recirculação da mesma água continuamente no

► Representação esquemática do fluxograma do sistema de água ultrapura arium® pro VF. Para obter uma imagem mais clara não incluímos as válvulas de controle.



sistema com um fluxo constante de água, o que é conseguido por bombeamento com controle da pressão. A condutividade da água é medida na entrada de água de alimentação e na água produzida (saída de água).

O arium® pro VF utilizado nas pesquisas descritas aqui, utiliza dois cartuchos diferentes. Esses cartuchos são preenchidos com carvão ativado especial e resinas de troca iônica em leito misto para fornecer água de elevada pureza com um baixo teor de TOC. Possui também uma lâmpada de UV integrada com comprimentos de onda de 185 nm e 254 nm, que atuam como um oxidante e eliminador de microrganismos.

O sistema arium® pro VF também inclui um módulo de ultrafiltração que é usado como filtro de fluxo cruzado. A membrana de ultrafiltração utilizada retém microrganismos, colóides, endotoxinas, RNA e DNA.

Na saída de água está instalado um filtro final de 0,2 micron, que serve para remover partículas e bactérias durante a dispensação de água ultrapura produzida.

O processo de purificação de água do purificador é mostrado na Figura 3 (Fluxograma arium® pro VF).

► Materiais e métodos

A análise das amostras foi realizada em um HPLC Agilent 1200 Series (Figura 4 e Tabela 1), utilizando uma coluna de HPLC "Rezex RNM Carbohidratos Na+8%" da empresa Phenomenex [6]. A coluna utilizada é preenchida com um copolímero reticulado de estireno e divinilbenzeno modificado com grupos de sulfato de sódio. Este material se beneficia do mecanismo de exclusão de íons. Isto significa que os analitos se separam



FIGURA 4: Equipamento HPLC Agilent 1200 series (foto Sartorius)

Equipamentos e materiais utilizados

Equipamento	Empresa	Referência
Bomba binária	Agilent	G1312A
Desgaseificador	Agilent	G1379B
Extrator de amostras ALS	Agilent	G1329A
Forno de colunas TCC	Agilent	G1316A
Detetor de RI RID	Agilent	G1362A
Coluna	Phenomenex	00H-0136-KO Rezex RNM Carbohydrate Na+ 8%

em função de diferentes interações iônicas. Devido aos grupos de sulfonatos na superfície do material, os poros têm uma carga negativa. Isto faz com que as moléculas carregadas negativamente não possam penetrar nos poros do material acelerando a eluição. Esta exclusão se baseia no equilíbrio de íons nas membranas de Gibbs-Donnan. Os analitos que podem penetrar nos poros se separam da fase estacionária por diferenças estéricas assim como interações hidrofóbicas e polares com os grupos funcionais. Para obter informações detalhadas sobre o mecanismo de separação, ver [7].

Os tempos de retenção dos diferentes açúcares foram determinados pelo registro do sinal de índice de refração (RI). O sinal RI é indicado por um número adimensional nRIU (nano Unidade de índice de refração) e constitui a diferença entre o índice de refração da amostra na célula de amostra e a fase móvel na célula de referência.

Como fase móvel foi utilizada água ultrapura produzida com o arium® pro VF. Para efetuar a desgaseificação necessária para HPLC a água ultrapura foi filtrada a vácuo através de suporte Sartolab BT 500 com 0,2 microns (Sartorius Sartolab BT 180C5).

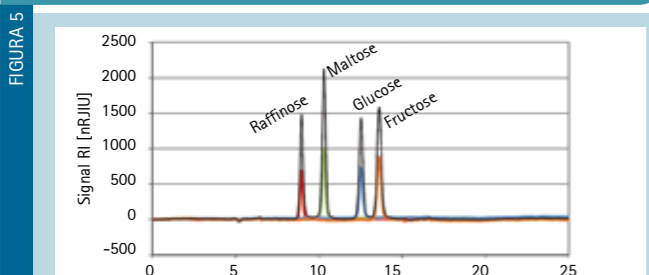
Execução da análise em HPLC

No preparo para a análise, a coluna Rezex foi aquecida a 75°C no forno de coluna e lavou-se durante a noite, com 0,6 ml/min de água produzida com o Arium® Pro VF. A unidade óptica do detetor de RI foi aquecida a 35°C. As amostras a serem analisadas foram preparadas com água ultrapura produzida pelo arium® pro VF e submetidas a pré-filtragem através do filtro de seringa de 0,2 µm (Sartorius Minisart® RC4 17822).

Método HPLC

Parâmetros		
Fluxo	[ml/min]	0,6
Tempo	[min]	25
Pressão máxima	[bares]	70
Temperatura do forno de colunas	[°C]	75
Temperatura do detetor RI	[°C]	35
Volume injetado	[µl]	2

Separção de açúcares injetados individualmente e uma mistura de açúcares através de RNM Rezex Carbohidratos coluna Na + 8% com água ultrapura arium® pro VF.



As análises de HPLC das amostras foram realizadas dentro dos parâmetros do método de HPLC [6] (Tabela 2).

Resultados

Para determinar os tempos de retenção de cada um dos açúcares (Tabela 3) foram preparados e injetados individualmente (Figura 5). Como os açúcares sofrem várias interações diferentes na fase estacionária, foram registrados com o detetor de RI tempos de retenção específicos para cada açúcar depois de passar através da coluna.

Depois de determinar os diversos açúcares foi preparado e separado uma mistura de açúcares (Figura 5).

Os diferentes açúcares foram separados uns dos outros. Os picos de diferentes tempos de retenção podem ser atribuídos aos açúcares previamente determinados individualmente.

Os efeitos das impurezas ou, neste caso, dos sais foram qualificados pela injeção de água e tampão de fosfato tripotássio (Figura 6).

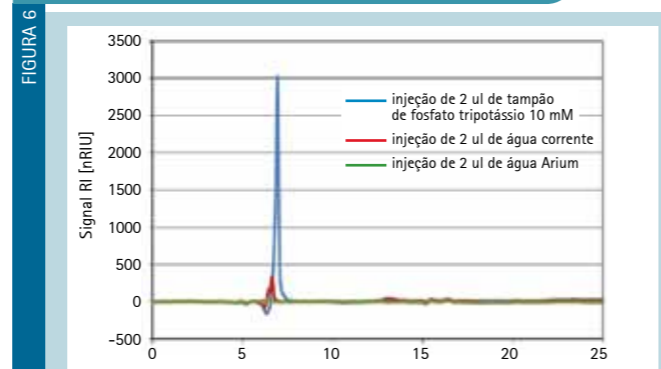
Uma injeção de água corrente (condutividade 265 µS/cm) e de tampão de fosfato tripotássio (condutividade 1700 µS/cm) mostram sinais claros e podem, portanto, serem inequivocamente reconhecidas como uma impureza. Especialmente os íons de carga múltipla da água corrente podem facilmente se ligar aos grupos sulfonados. Os equilíbrios dissociativos modificados por eles podem também influenciar o tempo de retenção dos açúcares correspondentes. Para uma análise segura por HPLC com tempos de retenção estáveis e para evitar o aparecimento de picos fantasmas, é necessário que a fase móvel não apresente sais ou qualquer outra impureza. A água Arium utilizada neste caso tem uma condutividade de 0,055 µS/cm e é praticamente isenta de impurezas problemáticas, o que resulta em uma linha de base linear, sem picos (linha de base verde Figura 6).

A pressão da coluna foi mantida durante os ciclos com valor constante de 23 bares. Isto mostra que não houve deposição sobre a coluna. Ciclos de ensaio em branco no início e no final não mostrou nenhuma mudança, isto é, não houve nenhuma impureza na fase móvel.

Tempos de retenção de açúcares na coluna Rezex RNM Carbohydrate Na+ 8 %

Açúcar		Tempo de retenção [min]
Rafinose	Fluka 83400	8,96
Maltose	SIGMA M5885	10,30
Glucose	ROTH 6887.1	12,53
Frutose	SIGMA F0127	13,62

Cromatogramas tampão fosfato tripotássio, água corrente e água produzida em arium® pro VF.



Para determinar a reprodutibilidade e limite de detecção foram analisados séries de padrão com diferentes concentrações. No exemplo foi usada rafinose. Foram registrados os tempos de retenção e as áreas dos picos, representados na tabela (Tabela 4).

Os tempos de retenção constantes repetidamente obtidos mostram uma boa reprodutibilidade. A série Padrão de Rafinose mostra um desenvolvimento linear em uma concentração de 0,015 mg/ml (Figura 7).

A criação de uma reta padrão a partir das áreas dos picos permite a quantificação de amostras, neste caso da rafinose, com uma concentração desconhecida.

Conclusão

Os exemplos mostram que a água produzida com o sistema de purificação arium® pro VF pode ser utilizada, sem qualquer problema na análise de açúcar como fase móvel em análises por HPLC.

A fase móvel não influencia as interações da amostra com a fase estacionária, uma vez que a água ultrapura produzida com uma condutividade de 0,055 µS/cm pode ser considerada praticamente livre de impurezas. O aparecimento de picos fantasma não ocorre devido a não presença de sais [5]. Além disso, os ensaios permitem concluir que não ocorrem deposições na fase estacionária devido às impurezas, pois não foi observado aumento da pressão ou aumento do tempo de corrida das amostras.

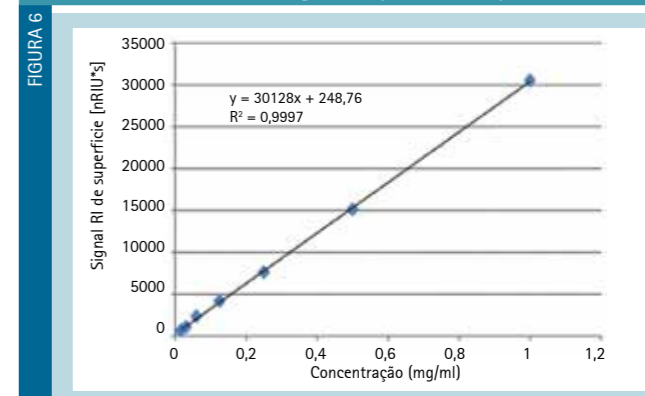
Assim, a água ultrapura produzida continuamente pelo sistema de purificação arium® pro VF, é uma alternativa econômica em comparação a água ultrapura comercializada como reagente e usada para produzir soluções de elevada pureza para a técnica de análise de HPLC, assim como utilizada em análise de alimentos, pesquisa ambiental e médica, química e bioquímica e nos controles de processo na indústria farmacêutica e de biotecnologia.

Os trabalhos aqui executados e a experiência positiva resultante sobre a capacidade de água ultrapura arium® pro VF como fase móvel em HPLC, provam que em futuro próximo se amplie para outras técnicas de separação, como por exemplo em cromatografia de fase reversa, cromatografia de exclusão molecular ou UHPLC ■

Reprodutibilidade dos tempos de retenção e a determinação do limite de detecção no exemplo de um conjunto padrão de rafinose

Concentração [mg/ml]	Tempo de retenção [min]	Superfície do pico [nRIU*s]
0	-	-
0,015	8,96	603
0,03	8,96	1088
0,06	8,96	2327
0,125	8,96	4178
0,25	8,96	7607
0,5	8,96	15097
1	8,96	30495

Série Padrão para rafinose (valores na Tabela 4) analisada em coluna RNM Carbohidratos Na + 8% com água ultrapura arium® pro VF



Bibliografia

- Kromidas, Stavros: HPLC für Neueinsteiger, aus dem Internet, ©by Novia GmbH, (2000)
- Hans Ulrich Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse Band II, Verlag Chemie, Seite 1179, 1180 (1970)
- Dische, Z. and Borenfreund, E.: A New Spectrophotometric Method for the Detection of Keto Sugars and Trioses, J. Biol. Chem. 192, 583-587, (1951)
- Süsswaren, Heft 10, Seite 7, LCI-Focus, (2006)
- Gottwald, W.: RP-HPLC für Anwender. Reihe: Die Praxis der instrumentellen Analytik, Herausgeber Gruber, U. und Klein, W., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Seite 7-8 (1993)
- Chromatography Product Guide 12/13, Phenomenex, pages 232-233, (2012)
- WeiB, Joachim: Ionenchromatographie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Kapitel 5, Seiten 349 ff. (2001)

Agradecimentos: Queremos agradecer a empresa Phenomenex, Aschaffenburg por colocar à nossa disposição a coluna Rezex RNM Carbohydrate.

IDENOR INGENIERIA

TECNOLOGIA EM ÁGUAS

Mais de 30 anos de experiência

em projetos, fabricação, instalação, manutenção e validação de sistemas de obtenção de água para a indústria farmacêutica

Plantas para a obtenção de água USP
Plantas Potabilizadoras
Osmose Reserva
Eletrólise Contínua (EDI)
Desmineralizadores

Equipamentos de Radiação UV
Ozonizadores
Filtros de Profundidade Automáticos
Ablandadores Automáticos
Ultrafiltração Retrolavável

Filtração por Bolsa Nano e Ultrafiltração

REPRESENTANTE IDENOR BRASIL
Aquasses Ass., em Sist. Água Ltda.

Rua Raul Pompéia, 905 - Sala 142
Cep.: 05025-010 - Sao Paulo - SP - Brasil
Tel.: (5511) 3871-0074 - Cel.: (5511) 9658-3083 - Nextel: 54*335*1590
dinizaugusto@terra.com.br / idenor.brasil@hotmail.com

IDENOR INGENIERIA S.R.L.

Calle 14 (ex Espora) Nº 4017, (B1672AU) Villa Lynch,
Partido de San Martín, Pcia. de Bs. As. Argentina
Tel/Fax: (+54 11) 4724-0707 líneas rotativas
idenor@idenor.com.ar - www.idenoringenieria.com



IDENOR
INGENIERIA

TECNOLOGIA EN AGUAS