

QUI 102

Metodologia Analítica

1º semestre 2011

Profa. Maria Auxiliadora Costa Matos

Prática:

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, ÁCIDO SALICÍLICO,
PARACETAMOL E CAFEÍNA EM MEDICAMENTOS POR HPLC

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, ÁCIDO SALICÍLICO, PARACETAMOL E CAFEÍNA EM MEDICAMENTOS POR HPLC

Cromatografia

- ◆ Método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são distribuídos entre duas fases. Uma estacionária e de grande área (fase estacionária) e a outra um fluído insolúvel que percola na primeira fase (fase móvel).
- ◆ Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais dos componentes.

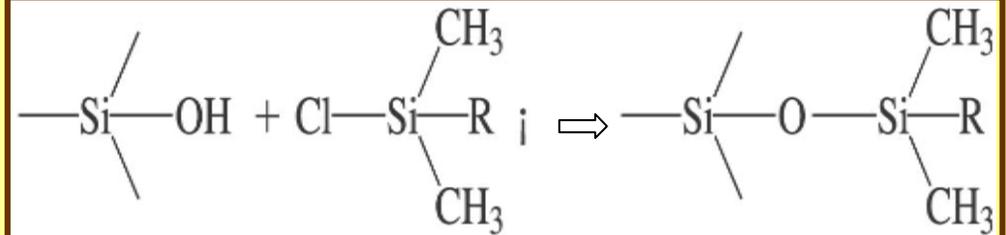
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

- ◆ Emprega uma **fase móvel (FM)** líquida e uma **fase estacionária (FE)** muito finamente dividida 3 a 10 μm em colunas fechadas e com diâmetros internos normalmente de 4 a 6 mm. Para se obter vazões satisfatórias o líquido deve ser pressurizado a altas pressões.
- ◆ Os constituintes da amostra são separados por distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária.

Cromatografia líquida com fase ligada à sílica

♦ A FE é retida na sílica por meio de ligação química. É o método mais utilizado, pois apresenta maior estabilidade da coluna.

Reação de um organoclorosilano com grupos hidroxilas formados na superfície das partículas de sílica, formando um organosilano.



Natureza dos grupos funcionais da fase estacionária (R)

FASE NORMAL

FE polar e FM relativamente não-polar

FASE REVERSA

FE não-polar e FM relativamente polar
Ex. Coluna C-8 (grupos octil [-C₈H₁₇])



Colunas de Fase Reversa (RPC):

eficientes,
estáveis
reprodutível,
detecção muitas vezes é mais fácil.

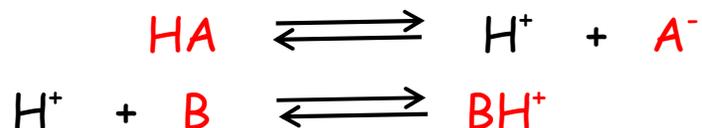
SEPARAÇÃO POR FASE REVERSA

- ◆ Coeficiente de partição entre a fase móvel líquida (polar) e a fase estacionária hidrofóbica (apolar).
- ◆ A retenção de compostos hidrofóbicos será maior.
- ◆ Na separação por fase reversa, o aumento na porcentagem de solvente orgânico na fase móvel diminui o tempo de retenção dos compostos, mas geralmente ocasiona co-eluição, ou sobreposição de bandas

SEPARAÇÃO DE "AMOSTRAS IONICAS" POR FASE REVERSA

"Amostras Iônicas" Misturas contendo um ou mais compostos orgânicos ionizados ou ionizáveis

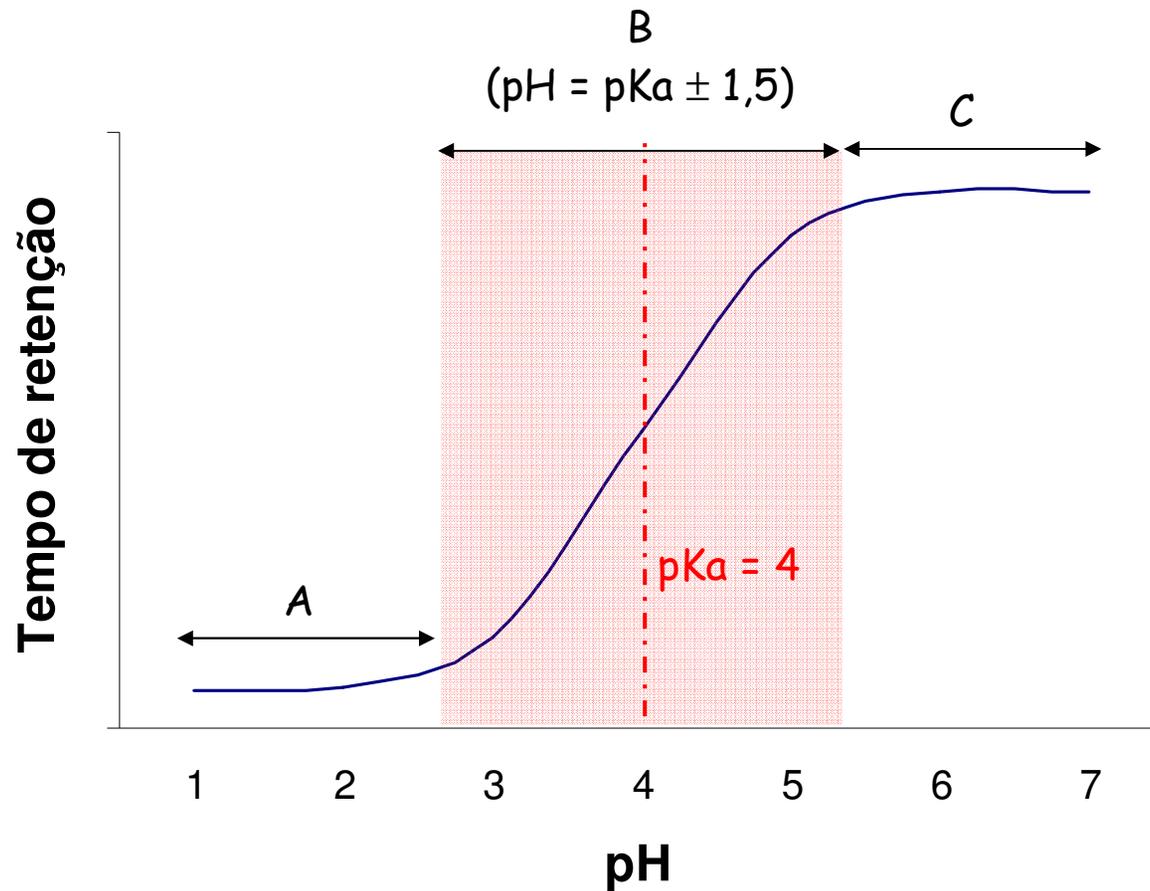
- ◆ Quando um ácido (HA) ou uma base (B), não carregados, sofre ionização forma-se uma espécie muito menos hidrofóbica - mais hidrofílica.



Hidrofóbico
(Maior Retenção)

Hidrofílico
(Menor Retenção)

Influencia do pH no Tempo de Retenção



Evitar valores de pH no intervalo $\text{pKa} \pm 1,5$ (região B)

Valores pKa dos Analitos

ácido acetilsalicílico	ácido salicílico	paracetamol
pKa = 3,49	pKa ₁ = 2,972 pKa ₂ = 13,7	pKa = 9,5

Proposta Fase Móvel:

Mmistura de H₃PO₄ e acetonitrila (ACN)
Mistura de H₃PO₄ e metanol } pH ?

Parâmetro Otimizado: pH

	Limitação
coluna RP (C8 Zorbax eclipse XDB)	2 < pH < 8
ácido acetilsalicílico	pH < 2 ou pH > 5
ácido salicílico	pH < 1,5 ou pH > 14
paracetamol	pH < 8 ou pH > 11
Condição selecionada:	pH = 2,5

Equipamento: HPLC Agilent 1100 serie com injetor manual com alça de amostragem de 20 μ L, sistema desgaseificador, bomba quaternária, detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de onda, software Agilent Chemstation LC Systems.

Coluna: C8 Zorbax eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 μ m de diâmetro de partícula)

Purga dos solventes: 30 mL (15 min no fluxo de 3 mL/min)

Condicionamento da coluna: composição inicial da FM - Sol. H₃PO₄ pH 2,5/ACN (82:18)

Editar o método: Gradiente, 1 ml/min, sol. H₃PO₄ pH 2,5/ACN (82:18) de 0 a 2,9 min, sol. H₃PO₄ pH 2,5/ACN (60:40) de 4,0 a 12 min. Tempo para estabilizar condição inicial FM: 2 min.

<u>Gradiente:</u>	<i>tempo</i>	<i>H₃PO₄ pH 2,5 (%)</i>	<i>ACN (%)</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>P Max (Bar)</i>
	0	82	18	1	150
	2,9	82	18	1	150
	4,0	60	40		

Tempo de análise: 9 min

Tempo de espera: 2 min

Detecção UV: A (_207_) B (_210_) C (_228_) D (_273_) E (_276_)

3. PROCEDIMENTO

Soluções disponíveis:

3.1 Solução H₃PO₄ pH 2,5

3.3 a) Soluções padrões de ácido acetilsalicílico 5,09 mg/L, ácido salicílico 5,03mg/L, paracetamol 5,06mg/L e cafeína 2,55 mg/L

3.2. Solução para diluição dos padrões e amostra - sol. H₃PO₄ pH 2,5/ACN (80:20)

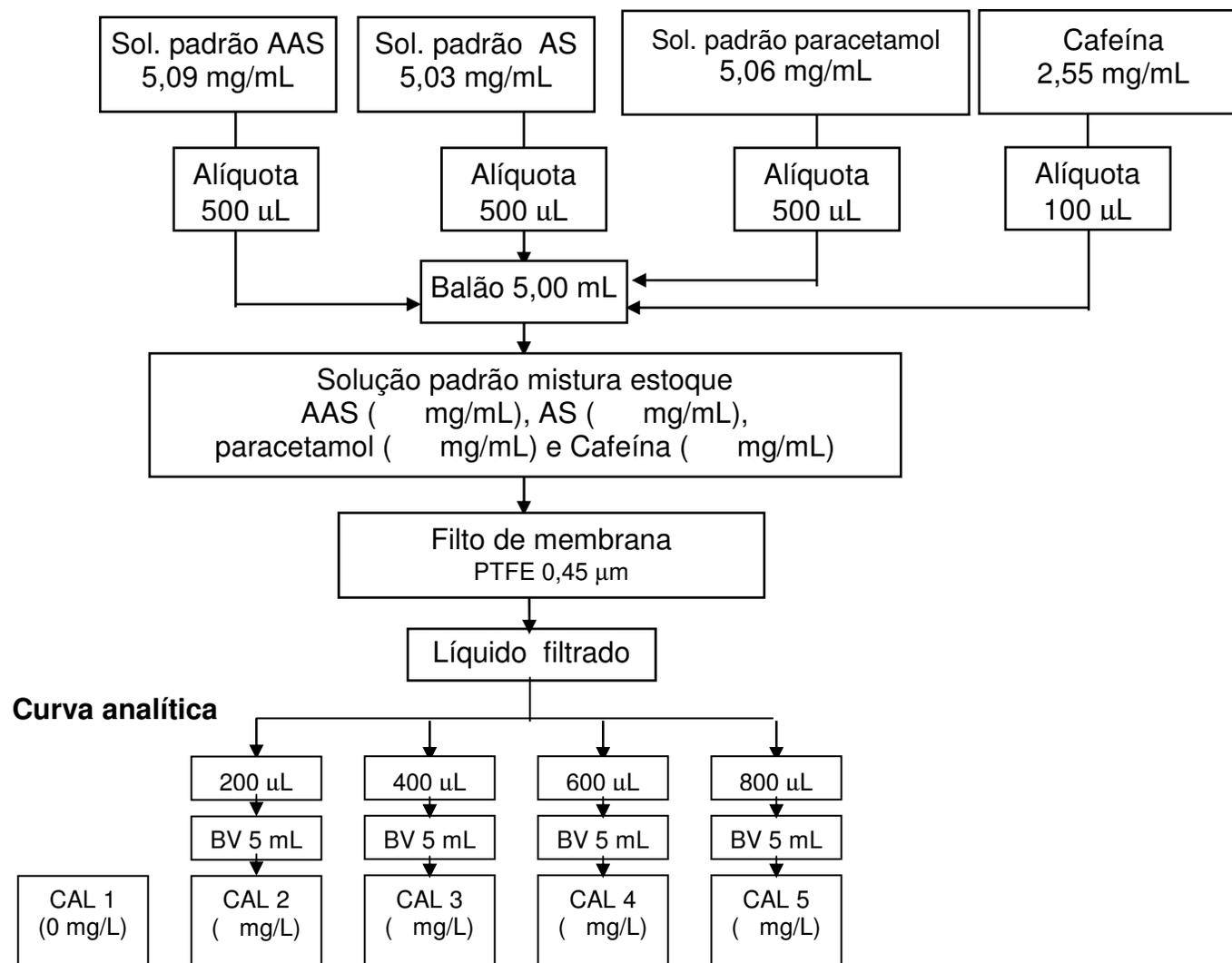
Misture 160 mL da solução de H₃PO₄ pH 2,5 com 40 mL de acetonitrila grau HPLC. Utilize esta solução para preparar as soluções padrões e amostras. Transfira uma alíquota desta solução para um microtubos previamente rotulados com CAL 1 (nível da curva analítica)

3.3. Preparo das soluções padrões individuais e mistura estoque:

b) Soluções padrão individual (Tr)

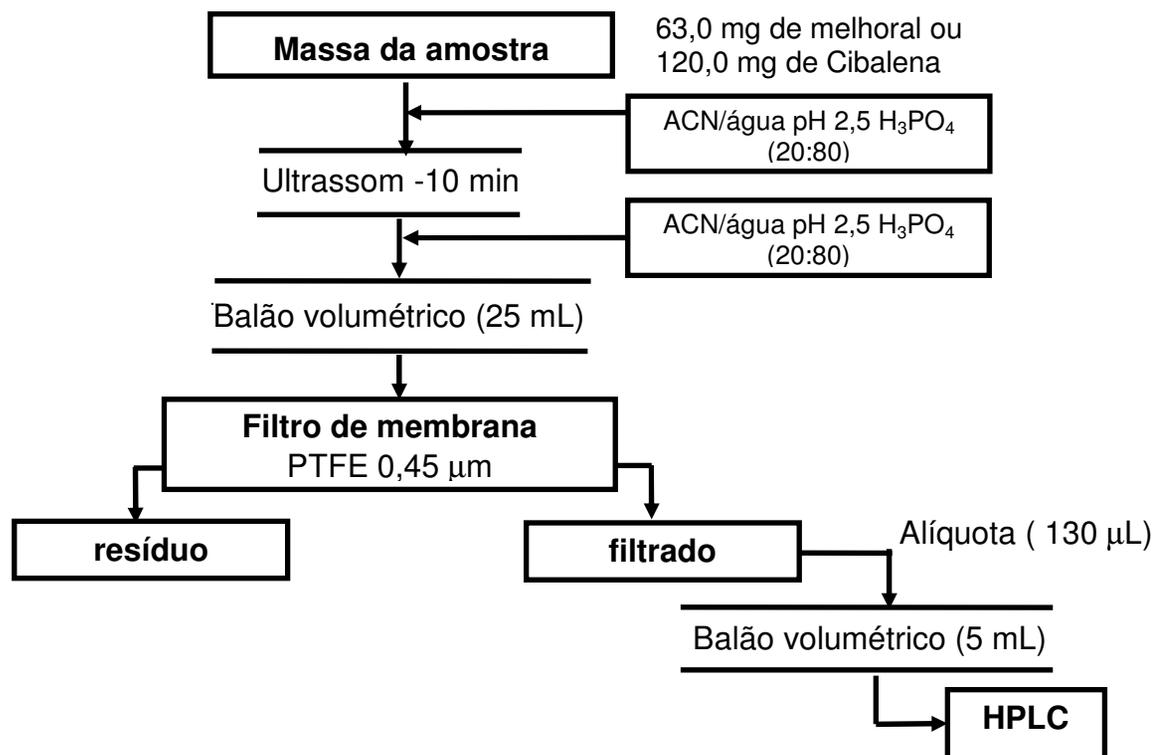
Transfira 50 µL de cada solução padrão (3.3 a) para um microtubo e acrescente cerca de 1400 µL da solução de diluição (item 3.2). Filtre cada uma das soluções preparadas em filtro de seringa com membrana de PTFE com 0,45 µm de porosidade.

c) Solução padrão mistura estoque e curva analítica:



3.4. Preparo da amostra:

Pese e triture um comprimido do medicamento (Melhoral ou Cibalena). Prepare a amostra em duplicata conforme o esquema:



- ◆ Injete as soluções padrões da curva analítica, as soluções padrões individuais para identificação dos picos no cromatograma e as amostras.
- ◆ Limpe o sistema com água (20 min com fluxo de 1 mL/min) e em seguida com ACN.
- ◆ Limpe a válvula de injeção, na posição "load", com água e metanol.

TRATAMENTO DOS DADOS

- ◆ Construa a curva analítica no software do HPLC e imprima os relatórios da curva analítica (Concentração mg/L X área mUA.s) e das análises das amostras de acordo com a diluição realizada, expressando a concentração em mg/g de comprimido.
- ◆ Elabore uma planilha do Excel para construção da curva analítica e tratamento dos dados das análises da amostra.
- ◆ Determine as concentrações dos analitos e o intervalo de confiança ($\alpha= 0,05$) na amostra do medicamento e compare o resultado obtido com valor do fabricante.