



Corina Rafaela Tavares Reina

## A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Isabel Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Corina Rafaela Tavares Reina

# A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Isabel Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Nenhum saber é saber completo”

Galileu Galilei

Eu, Corina Rafaela Tavares Reina, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010148039, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2015.

---

(Corina Rafaela Tavares Reina)

---

(A Orientadora: Prof. Dra. Isabel Barbosa)

---

(A aluna: Corina Reina)

## **Agradecimentos**

É com muita alegria e satisfação que agradeço a todos os intervenientes que contribuíram para que este trabalho se realizasse:

À minha tutora de monografia, Professora Doutora Isabel Barbosa, por toda a atenção, disponibilidade e auxílio.

A todos os colaboradores do laboratório de controlo de qualidade, pela ajuda e oportunidade.

À minha família, pelo apoio ao longo de todo este tempo.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelos conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

A Coimbra por todas as experiências que me tornaram na pessoa que sou.

## Índice

Abreviaturas.....	7
Resumo .....	8
Abstract .....	8
A Cromatografia .....	9
Classificação da Cromatografia Líquida.....	10
A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	11
A Fase Estacionária.....	11
A Fase Móvel .....	12
Eluição Isocrática e Eluição em gradiente .....	12
O Sistema de HPLC.....	13
Validação do Método Analítico .....	14
Exatidão .....	14
Precisão.....	14
Linearidade.....	15
LOD/LOQ.....	15
Estabilidade.....	15
Robustez.....	15
O método analítico em rotina.....	16
Adequabilidade do Sistema.....	18
Calibração e Quantificação .....	20
UHPLC: o lado verde da Cromatografia Líquida .....	21
Vantagens, Desvantagens e Desafios da UHPLC .....	22
Problemas associados a análises cromatográficas .....	24
Prevenir problemas com a fase móvel.....	24
Isolar problemas da bomba .....	24
Injetor e solventes injetados.....	24
Proteção da coluna .....	25

A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico	
Resolver problemas no detetor.....	25
Importância da HPLC para o Farmacêutico .....	26
O extenso papel da HPLC na descoberta de substâncias.....	26
O papel da HPLC na determinação de impurezas.....	27
A transferência do método analítico para o Controlo de Qualidade.....	27
Conclusão.....	28
Bibliografia .....	29



**Abreviaturas**

HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*

LC – *Liquid Chromatography*

TLC – *Thin-Layer Chromatography*

CEC – *Capillary Electrochromatography*

SEC – *Size-Exclusion Chromatography*

IEX – *Ion-Exchange*

RP – *Reverse Phase*

NP – *Normal Phase*

API – *Active Pharmaceutical Ingredient*

EUA – *Estados Unidos da América*

HUPLC – *Ultra High Pressure Líquida Cromatography*

UPLC – *Ultra Pressure Líquida Cromatography*

ICH – *International Conference on Harmonisation*

USP – *United States Pharmacopeial Convention*

FDA – *Food and Drug Administration*

RSD – *Relative Standard Deviation*

LOD – *Limit of Detection*

LOQ – *Limit of Quantitation*

### **Resumo**

A Cromatografia Líquida é, sem dúvida, uma técnica analítica largamente utilizada nos laboratórios em todo o mundo, quer a nível da investigação, quer a nível da indústria farmacêutica. A investigação da HPLC é aquela que mais desenvolvimentos tem demonstrado ao longo do tempo, constituindo uma das técnicas mais requeridas para análises farmacêuticas em indústria. Com todas as suas vertentes, incluindo a UHPLC, esta técnica apresenta grande segurança nos seus resultados e torna-se rentável para quem a utiliza.

Desta forma, apresentarei uma introdução com os fundamentos teóricos desta técnica, incluindo a sua classificação. De seguida, irei abordar a UHPLC como uma vertente atualizada da HPLC, apresentando as suas vantagens e desvantagens. Finalmente, mas não menos importante irei abordar alguns exemplos de problemas associados à prática destas análises e a importância destas técnicas para o farmacêutico.

### **Abstract**

The Liquid Chromatography is, certainly, a widely used technique on the laboratories around the world, both in research, as well as in the pharmaceutical industry. The HPLC is the technique that has undergone more improvements over time and it is one of the most required technique for analysis in pharmaceutical industry. With all its aspects, including UHPLC, this technique has reliable results and it is profitable to those who use it.

I will present an introduction to the theoretical fundamentals of this technique, including its classification. Then I will approach the UHPLC as a current aspect of HPLC, with its advantages and disadvantages. Last but not least, I will address some examples of problems associated with the practice of these analyzes and the importance of these techniques to the pharmacist.

## A Cromatografia

Mikhail Tsweet, um botânico russo, usou pela primeira vez a cromatografia em 1906, quando separou pigmentos de plantas, como a clorofila e xantofila que são substâncias coloridas. A técnica foi, então, denominada usando os termos gregos “chroma” (cor) e “graphein” (escrever). “A cromatografia é uma técnica que separa componentes de uma mistura dependendo da diferença de tempo que cada um deles leva a viajar através de uma fase estacionária, quando é transportado por uma fase móvel.” Dependendo da fase móvel usada estaremos a utilizar cromatografia gasosa, líquida ou de fluido supercrítico (Mcpolin, 2009). A fase estacionária é fixada numa coluna ou numa superfície plana. A coluna consiste num tubo oco revestido internamente com um material adequado e que é usado na HPLC. A cromatografia em superfície plana denomina-se TLC (Thin Layer Chromatography) (Mcpolin, 2009).

Figure 1 Representation of the separation of two components, A and B

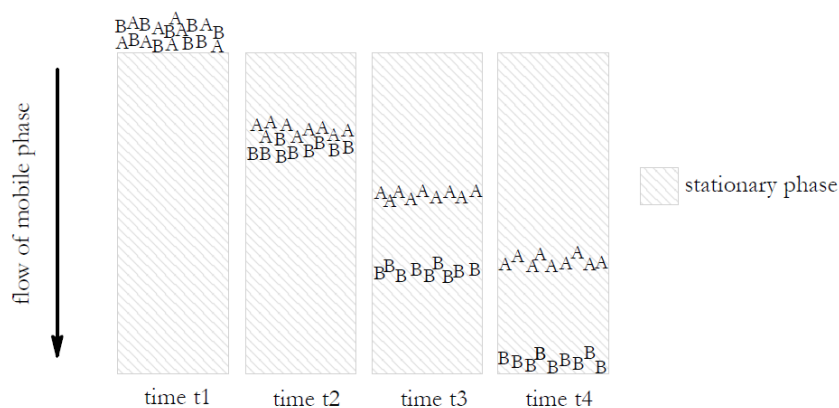


Figura 1 - Separação Cromatográfica de dois componentes (Mcpolin, 2009).

A figura 1 representa um processo de separação de uma mistura dos componentes A e B que são introduzidos numa fase móvel e eluem com o mesmo fluxo. No tempo t1 eles encontram a fase estacionária e aderem a esta. Dependendo da afinidade para a fase móvel ou para a fase estacionária, os componentes vão migrando ou não. A substância A tem maior afinidade para a fase estacionária do que a B e, por isso migra mais lentamente começando a separar-se no tempo t2. No t3 elas estão separadas, mas são arrastadas até ao t4, atingindo o tempo de retenção da substância B, ou seja, o tempo necessário para que a substância B saia da coluna (Mcpolin, 2009).

O tempo de residência médio na fase estacionária depende da energia de interação entre as moléculas e o material da fase estacionária. Para moléculas com energias de interação baixas, a superfície da fase estacionária pela qual vão migrar deve ser maior para possibilitar a formação de um maior número de interações e facilitar a separação (Kazakevich, 2007).

### **Classificação da Cromatografia Líquida**

A Cromatografia pode classificar-se como Cromatografia de coluna e Cromatografia Planar (Fig. 2). A Cromatografia de Coluna pode ser dividida em dois grupos tendo em conta a natureza do transporte da fase móvel através da fase estacionária, a Cromatografia Líquida e a Cromatografia Gasosa. Na Cromatografia Planar, também designada “Thin-layer Chromatography, TLC”, Cromatografia em Camada Fina, a fase móvel é transportada através de forças com base na capilaridade. Além disto, existe também a Electro cromatografia Capilar (“Capillary Electrochromatography”, CEC) que usa um fluxo eletro osmótico para que a fase móvel seja transportada (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

A cromatografia líquido-líquido existiu nos anos 70 mas foi maioritariamente substituída pela cromatografia líquida com fases estacionárias ligáveis quimicamente. Recentemente, a cromatografia líquido-líquido ressurgiu na forma de cromatografia contracorrente com duas fases líquidas imiscíveis com diferentes densidades. A outra forma de LC é a cromatografia Líquido-Sólido (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

A LC pode ser muito diversificada de acordo com o tipo de interações que o analito estabelece com a fase estacionária e da polaridade da fase móvel e estacionária. Desde a sua invenção, esta técnica foi usada com adsorventes altamente polares ( $\text{CaCO}_3$ , Sílica) com uma fase móvel não polar – “Normal Phase Chromatography”(NP). Em 1964, Horvath introduziu uma fase estacionária quimicamente modificada onde os grupos polares foram protegidos e cobertos com carbono e depois ligados a cadeias alquilo. Assim, a polaridade relativa da fase móvel e da fase estacionária aparecem invertidas, dando origem à Cromatografia de Fase Inversa - “Reversed-phase liquid chromatography” (RP) (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

O terceiro modo de cromatografia “Ion-Exchange Chromatography” (IEX) é baseado em interações iónicas do analito com a fase estacionária. Aqui a separação é feita com base nas diferentes afinidades dos analitos iónicos para a superfície da fase estacionária.

A Cromatografia por Exclusão de Tamanho (“Size-Exclusion Chromatography” - SEC), está associada à inexistência de interações com a fase estacionária. Aqui o eluente é selecionado de forma a suprimir qualquer interação possível do analito com a superfície da fase estacionária e a separação das moléculas do analito são feitas com base nas suas dimensões físicas. Quanto maiores forem as moléculas do analito, menor a possibilidade destas penetrarem nos poros do material de empacotamento e conseqüentemente mais rapidamente se irão mover ao longo da coluna (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

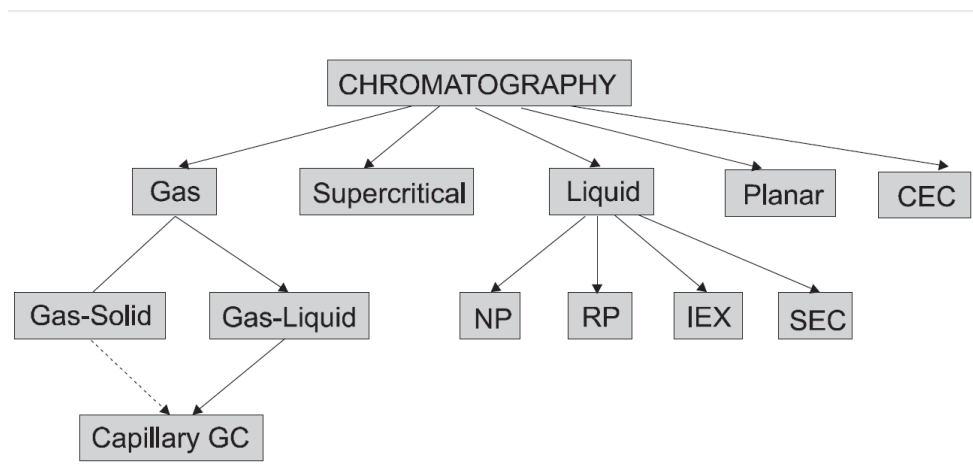


Figura 2 - Classificação dos tipos de Cromatografia (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

### A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após a descoberta de Tswet, a cromatografia foi usada por mais de 50 anos mas, apenas nos anos 1960, Horvath, professor na Universidade de Yale, decidiu usar pequenas esferas de vidro com uma superfície porosa para facilitar a transferência de massa entre a fase líquida e a superfície das esferas. As colunas empacotadas com estas esferas apresentaram elevada resistência ao fluxo do líquido, sendo necessário aumentar a pressão do sistema. Quando o tamanho de partícula atingiu diâmetros entre 3 e 10 $\mu$ m, esta tecnologia exigiu equipamentos sofisticados resistentes a elevadas pressões, nascendo assim a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Esta tecnologia contrasta com a tecnologia usada nas colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade (Hayes *et al.*, 2014; Kazakevich e Lobrutto, 2007).

### A Fase Estacionária


A HPLC é caracterizada pela utilização de uma fase estacionária em forma de coluna, normalmente feita de aço inoxidável, com um enchimento de partículas de tamanho muito reduzido (Mcpolin, 2009).

A polaridade da fase estacionária irá definir o tipo de cromatografia a realizar, ou seja, se a fase estacionária for polar, sendo a fase móvel apolar, a cromatografia define-se como Cromatografia de Fase Normal, em que as forças de atração existentes são maioritariamente dipolo-dipolo e ligações de hidrogénio. Se pelo contrário se verificar tratar-se de uma Cromatografia de Fase Inversa, em que as interações presentes são hidrofóbicas, teremos a fase estacionária apolar e a fase móvel polar (Mcpolin, 2009).

As colunas de HPLC normalmente são descritas com base no seu empacotamento, no tamanho da partícula e do poro, na altura e no diâmetro (Mcpolin, 2009).

### A Fase Móvel

A fase móvel em HPLC é uma fase líquida que flui através da fase estacionária transportando o analito. A sua composição depende da fase estacionária e da natureza dos compostos a ser analisados. Os solventes mais utilizados em HPLC são listados na figura 2 por ordem crescente de polaridade. Estes solventes compõem uma mistura que é a fase móvel de modo a ajustarem a sua polaridade. Esta mistura normalmente é binária mas também pode ser constituída por três solventes, dependendo da escolha durante o processo de desenvolvimento do método. Entre as propriedades dos solventes encontra-se a capacidade para interagir com a fase estacionária e com o analito, a sua disponibilidade com elevada pureza, não ser dispendioso, ser seguro para o uso de rotina e ser compatível com o sistema de HPLC (Mcpolin, 2009).



n-hexane  
methylene chloride  
chloroform  
methyl-t-butyl ether  
tetrahydrofuran (THF)  
isopropanol (IPA)  
acetonitrile (MeCN or ACN)  
methanol (MeOH)  
water

Figura 3 - Solventes de Fase Móvel (Mcpolin, 2009).

### Eluição Isocrática e Eluição em gradiente

A eluição isocrática consiste na utilização de uma mesma fase móvel durante toda a análise cromatográfica. Por outro lado, a eluição por gradiente utiliza os mesmos solventes como fase móvel mas com variação na concentração ou da composição da fase móvel ao longo da análise. Normalmente é utilizada com amostras complexas, quando não é possível obter todos os componentes separados usando apenas um solvente nas condições isocráticas.

Tradicionalmente, a separação isocrática é considerada como mais reprodutível do que a separação por gradiente. De facto, a constante composição do eluente significa um equilíbrio nas condições da coluna e da velocidade da fase móvel. As interações analito-eluente e analito-fase estacionária também são constantes e isto torna este tipo de separação mais previsível, embora o número de compostos que são separados não seja elevado. A capacidade de gerar picos é baixa e quanto mais tempo os componentes forem retidos na coluna, mais amplo é o pico resultante.

A separação em gradiente aumenta significativamente o poder de separação devido ao aumento da eficiência aparente, diminuindo a largura dos picos. Quanto mais acentuado for o gradiente, maior é o desequilíbrio entre as condições de separação e a reprodutibilidade destes métodos. Muitos dos equipamentos de HPLC modernos conseguem reproduzir um perfil de gradiente com elevada exatidão, mas com uma variação

permanente da composição do eluente, levando à diminuição do tempo de vida da coluna (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

### **O Sistema de HPLC**

O sistema típico de um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) consiste num (Kazakevich e Lobrutto, 2007):

- Reservatório de Solventes: armazenamento de solventes para alimentar o sistema. Pode ser equipado com um sistema de degaseificação e com filtros especiais para isolar o solvente da influência ambiental;
- Bomba: permite um fluxo contínuo e constante da fase móvel através do sistema. As mais recentes bombas permitem misturar os diferentes solventes provenientes de diferentes reservatórios;
- Injetor: Permite a introdução da mistura de analitos no fluxo da fase móvel antes de entrarem na coluna. Os injetores mais modernos são automáticos e podem ser programados para injetar diferentes volumes de amostra;
- Coluna: É o coração do sistema de HPLC. É o lugar onde a fase móvel entra em contacto com a fase estacionária levando à separação dos analitos da mistura;
- Detetor: Dispositivo que procede ao registo das propriedades físicas ou químicas do analito na coluna. Os detetores mais usados em análises farmacêuticas são o de Ultravioleta (UV), que permite monitorizar e registar a absorvância UV contínua num intervalo ou num comprimento de onda;
- Sistema de aquisição e controlo de dados: Sistema computadorizado que controla todos os parâmetros do HPLC (composição do eluente, temperatura, sequência de injeção, etc.) e adquire dados provenientes do detetor.

### **Validação do Método Analítico**

O método analítico é um procedimento laboratorial que tem como objetivo determinar uma característica de uma matéria-prima, de uma substância ou de um produto acabado. A validação do processo analítico consiste no processo de demonstração de que esse método é confiável e adequado ao seu propósito. Todos os métodos utilizados durante a formulação e o desenvolvimento de uma substância necessitam ser validados. Embora os requisitos de validação estejam claramente documentados pelas entidades reguladora como, a ICH, USP e FDA, a validação é aberta a interpretação. Normalmente esta validação do método é iniciada antes da fase IIa do processo de desenvolvimento do novo fármaco e é completada após esta fase.

A validação de um método de HPLC é focada nos testes de identificação, ensaios de quantificação e testes de controlo de substâncias relacionadas e ensaios quantitativos do princípio ativo nas matérias-primas e no produto final. Os métodos que vêm descritos na farmacopeia não necessitam ser validados mas devem ser verificados, uma vez que os materiais e equipamentos usados dificilmente serão iguais. A validação do método analítico é estabelecida através da evidência documentada que demonstra a exatidão, precisão, linearidade, seletividade e robustez de um método que irá ser utilizado na rotina.

Exatidão: Este teste tem como objetivo demonstrar o grau de concordância entre o valor encontrado e o valor teoricamente aceitável. A exatidão deve ser determinada recorrendo a um mínimo de nove determinações com três concentrações diferentes.

Precisão: A precisão providencia a indicação de erros aleatórios e pode ser discriminada em repetibilidade e precisão intermédia. Este teste apenas deve ser realizado quando o método analítico estiver finalizado. A repetibilidade envolve a repetição da análise pelo mesmo analista. A validação da precisão de um método analítico ocorre em três etapas:

- Repetibilidade de injeção: são feitas múltiplas injeções de uma preparação de amostra num determinado dia. Os critérios são analisados com base no RSD entre as áreas dos picos;
- Repetibilidade da análise: são analisadas múltiplas injeções de múltiplas preparações de amostras pelo mesmo analista no mesmo dia;
- Precisão intermédia: realizada por analistas distintos, com diferentes equipamentos e em dia diferentes para determinar a variabilidade da análise. É utilizado o coeficiente de variação ou o RSD para avaliar estes resultados. Este



## A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico

teste pode dar indicação de possíveis problemas durante a transferência do método.

Linearidade: O objetivo deste teste é demonstrar que o equipamento exibe uma resposta linear e diretamente proporcional na gama de concentrações a analisar. Devem ser usadas cinco concentrações diferentes dentro desta gama. O objetivo é obter o menor limite de degradação e o mais elevado nível de ativo.

LOD/LOQ: O limite de deteção (LOD) é definido como a mais baixa concentração de analito que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais. Por outro lado o limite de quantificação é definido como a mais baixa concentração numa amostra, que pode ser medida com um nível aceitável de exatidão e precisão. Para a realização deste teste é necessária a preparação de várias diluições da amostra para posterior análise. Em termos de análise cromatográfica, o LOD corresponde a um pico com relação sinal-ruído de 3:1 e o limite de quantificação (LOQ) corresponde a um pico com relação sinal-ruído de 10:1.

Estabilidade: O objetivo deste teste é demonstrar que a amostra e a solução referência, preparadas de acordo com o método, são estáveis no tempo de análise. Para realizar este ensaio aconselha-se a análise da mesma solução no início do ensaio, algumas horas depois e no final do ensaio.

Robustez: A robustez é um grau de reprodutibilidade obtido pela análise das mesmas amostras em diferentes laboratórios, diferentes equipamentos e dias diferentes. Determina a imparcialidade do método em relação a questões ambientais e operacionais (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

### O método analítico em rotina

O desenvolvimento e validação de um método analítico em HPLC é um passo crucial para a utilização desta técnica em análises de rotina, uma vez que determina como é utilizado cada elemento do sistema, dando a informação necessária ao analista (Mcpolin, 2009).

Para a realização de uma análise de HPLC é necessário preparar os instrumentos e as soluções teste para seguir o método analítico.

- Passo 1 – Colher os materiais necessários: Antes de iniciar uma análise deve estudar-se o método analítico e prever quais os materiais necessários para que na altura estejam todos disponíveis. Entre eles podem estar a coluna, os solventes e reagentes da fase móvel, solventes para a preparação do padrão e da amostra, instrumentos analíticos tais como balança e medidor de pH, a amostra e o padrão, material de vidro e o sistema de HPLC operacional. No que diz respeito à coluna a utilizar, esta não deve ser diferente da mencionada no método analítico sem que seja realizada a devida validação. Em análises de rotina normalmente é utilizada uma coluna para cada método, uma vez que irá ser exposta à mesma fase móvel, reduzindo o risco de alterações que podem afetar a análise (Mcpolin, 2009).
- Passo 2 – Gravar a análise: Quando a análise é realizada em ambiente de GMP/GLP é essencial fazer o seu registo em tempo real. Atualmente este registo tem por base sistemas informáticos que conseguem traçar em tempo real o cromatograma da respetiva análise (Mcpolin, 2009).
- Passo 3 – Preparação da Fase Móvel
  - Na cromatografia de fase normal utilizam-se solventes menos polares. A quantidade de água na fase móvel deve ser medida com exatidão de modo a obter resultados reprodutíveis. Na cromatografia de fase reversa são utilizadas fases móveis aquosas, com ou sem modificadores orgânicos. As componentes das fases móveis são normalmente filtradas para remover partículas de tamanho superior a 0,45 µm. As fases móveis com vários componentes podem ser preparadas previamente ou podem ser usados os recipientes originais de cada um dos componentes para alimentar o sistema através das válvulas da bomba, misturando os componentes na proporção desejada. Os solventes utilizados devem ser isentos de estabilizadores e transparentes no comprimento de onda utilizado pelo detetor de ultravioleta (Skoog, Holler e Nieman, 2002).

## A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico

- Se for necessário fazer o acerto do pH, este deve ser feito apenas na componente aquosa da fase móvel e não na mistura (Skoog, Holler e Nieman, 2002).
- Se forem utilizados tampões, deve fazer-se a lavagem adequada do sistema com mistura de água e do componente orgânico numa proporção de 95:5 de modo a impedir a cristalização de sais após a realização do ensaio (Skoog, Holler e Nieman, 2002).
- Passo 4 – Preparação do sistema de HPLC: Lavagem da bomba e do injetor, conectar e lavar a coluna, ligar o sistema e proceder ao seu equilíbrio.
- Passo 5 – Preparação da Solução Teste: preparação da amostra e enchimentos dos *vials*.
- Passo 6 – Programar as injeções e o método de doseamento e iniciar a corrida cromatográfica. O método de doseamento a usar pode ser diferente conforme se trate de amostras com concentração próxima à concentração teórica ou não. Caso se trate de uma amostra com concentração próxima da concentração teórica deve ser realizada a técnica de doseamento com padrão a 100%, em que é preparado um padrão e injetado 5 vezes no início da análise e duas vezes a cada quatro horas de análise de amostras. Este padrão permite verificar se houve alterações cromatográfica ao longo da análise ou degradação do padrão que possa colocar em causa a quantificação da amostra. Por outro lado, se a concentração da amostra divergir da concentração do padrão, deve ser usada a técnica de doseamento recorrendo a reta de calibração. Nesta técnica são preparados três padrões, com concentrações de 80%, 100% e 120% que serão injetadas para a construção de uma reta de calibração. Estes padrões serão injetados a cada 4 horas e no final da análise das amostras para garantir a estabilidade da substância.
- Passo 7 – Gerar resultados analíticos: Integração, teste da adequabilidade do sistema, calibração e quantificação.
- Passo 8 – Limpeza do Sistema.

## Adequabilidade do Sistema

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante do método e asseguram a performance adequada do sistema cromatográfico. Os parâmetros normalmente utilizados para avaliar a performance da coluna são (Europe, 2004):

- Retenção:

O tempo ao qual cada pico da substância de interesse elui deve ser constante – Tempo de Retenção ( $t_R$ ), que corresponde à posição do máximo do pico no cromatograma. Um desvio no tempo de retenção pode indicar a existência de um problema com o sistema. As farmacopeias permitem algumas alterações nas condições cromatográficas para ajustar o tempo de retenção.

- Razão de Distribuição de Massa ou Fator de Capacidade ou Fator de Retenção (k):

$$k = \frac{V_s}{V_m} \times K_C,$$

em que:

$V_s$  = Volume da fase estacionária;  $V_m$  = Volume da fase estacionária e  $K_C$  = Coeficiente de Distribuição em equilíbrio (constante de distribuição).

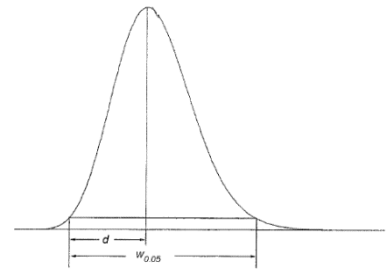
- Fator de Simetria ( $A_s$ ) ou *tailing*:

Um fator de simetria de 1,0 corresponde a uma simetria ideal e pode ser calculado através da

fórmula:  $A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$ , onde

$w_{0,05}$  = largura do pico a um vigésimo da sua altura

$d$  = distância entre a perpendicular à linha de base tirada no máximo do pico a um vigésimo da sua altura.



- Eficiência Aparente:

É calculada através do Número de Pratos Teóricos (N) da coluna, através da fórmula:

$$N = 5.54 \times \left( \frac{t_R}{wh} \right)^2,$$

onde  $t_R$  é o tempo de retenção e o  $wh$  é a largura do pico a meia altura.

- Resolução:

Expressa o grau de separação entre dois picos e pode ser calculada pela expressão:

$$R = \frac{1.18 (tr2 - tr1)}{wh1 + wh2},$$

onde  $tr1$  e  $tr2$  correspondem a tempos de retenção de dois picos e  $wh1$  e  $wh2$  a larguras dos picos a meia altura.

## A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico

- Razão Sinal/Ruído (S/N):

Este parâmetro influencia a precisão da quantificação e é calculado através da equação:  $S/N = \frac{2H}{h}$ ,

onde  $H$  = altura do pico do analito, medida do máximo do pico à linha de base extrapolada do sinal observado numa distância 20 vezes igual à largura a meio do pico; e  $h$  = altura da gama do ruído da linha de base obtida na injeção de um branco e medida numa distância 20 vezes igual à largura a meio do pico do analito.

- Repetibilidade:

É expressa como uma percentagem estimada do RSD de uma série de medidas e é calculado pela expressão:

$$RSD = \frac{100}{ym} \sqrt{\frac{\sum(y-ym)^2}{n-1}}, \text{ onde}$$

$y$  = valores individuais expressos como áreas ou alturas do pico;

$ym$  = média dos valores obtidos

$n$  = número de valores individuais.

O comportamento cromatográfico pode ser influenciado por fatores como a composição, força iónica, temperatura e pH da fase móvel, fluxo, comprimento da coluna, a sua temperatura e pressão, características da fase estacionária como tamanho da partícula, porosidade, tipo de partículas, área de superfície específica e extensão das modificações químicas (Skoog, Holler e Nieman, 2002).

Salvo indicação em contrário, os sistemas devem cumprir os seguintes requisitos:

- O fator de simetria do pico principal deve variar entre 0,8 e 1,5;
- No ensaio de composto relacionados, o limite de deteção do pico é inferior à especificação definida para as impurezas e o limite de quantificação é igual ou inferior à mesma;
- O desvio padrão relativo máximo permitido para injeções repetidas da solução padrão estão descritos na tabela seguinte (Europe, 2004).

B (%)	Número de injeções			
	3	4	5	6
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

## Calibração e Quantificação

As calibrações mais usadas em análises farmacêuticas com HPLC são a do padrão externo e a do padrão interno (Mcpolin, 2009).

**Padrão Externo:** É o tipo de calibração mais confiável e consiste na preparação de um padrão de concentração conhecida que é analisado ao lado das amostras. A resposta ao padrão é comparada com a da amostra e assim pode ser determinada a concentração da amostra. Quando é usado este tipo de calibração deve ter-se em atenção que será necessário a utilização de um padrão de referência de pureza conhecida ou até mesmo um padrão de referência certificado e que a amostra deve ter uma concentração similar à do padrão. Além disso, o detetor deve apresentar uma resposta linear na gama de concentrações espetável.

**Padrão Interno:** Este tipo de calibração requer a preparação de uma solução padrão externa e inclui a adição de uma concentração constante de um segundo composto a cada amostra. A concentração da amostra é diretamente proporcional ao *ratio* do analito com o padrão interno. Este padrão deve ser analisado cromatograficamente de forma individual e deve ser estável na solução amostra. Esta técnica é usada na cromatografia para corrigir diferenças no procedimento de extração da amostra e para matrizes complexas como amostras biológicas e formulações complexas como óleos ou pomadas.

**Calibração com um Ponto:** Durante a validação do método analítico de HPLC, a linearidade do método deve ser estabelecida recorrendo a uma gama de concentrações adequadas que devem ser analisadas e os resultados são submetido a uma regressão linear gerando uma equação do tipo  $y=mx+b$  onde  $y$  é a resposta do detetor,  $x$  é a concentração e  $m$  e  $c$  são constantes. Devido às pequenas diferenças no sistema e à resposta do detetor, esta calibração não pode ser usada para análises subsequentes. O padrão precisa ser injetado ao mesmo tempo que as amostras para a análise ser realizada.

### **UHPLC: o lado verde da Cromatografia Líquida**

A HPLC é uma das técnicas mais usadas e aconselhadas nas análises de controlo de qualidade de fármacos. No entanto, ao ser comparada com outras técnicas, esta apresenta tempos de análises mais longos e uma maior quantidade de solventes orgânicos usados. A UHPLC (“Ultra High Pressure Liquid Chromatography”) é uma boa alternativa, uma vez que reduz o consumo de solventes orgânicos e o tempo de análise (Cielecka-Piontek *et al.*, 2013).

Esta tecnologia de HUPLC foi pela primeira vez demonstrada em 1997 no laboratório de James Jorgenson na Universidade do Norte de Carolina os EUA, usando uma coluna empacotada com partículas não porosas de sílica com 1,5 µm e uma pressão de 4100 bar, conseguindo mais de 200.000 pratos teóricos. Esta tecnologia foi largamente usada nos laboratórios de vários investigadores, no entanto, o desenvolvimento de partículas porosas com tamanho inferior a 2 µm e a comercialização dos primeiros equipamentos em 2004, foram passos importantes para a utilização desta técnica nas análises farmacêuticas (Kazakevich e Lobrutto, 2007). Foi nesta data que a Waters, empresa produtora de equipamentos de HPLC, lançou a UPLC, *Ultra Pressure Liquid Chromatography* como marca registada permitindo que a indústria farmacêutica adquirisse os seus produtos (baltussen EA, Noij THM, [s.d.]; Maldaner e Jardim, 2012).

A eficiência da determinação cromatográfica é influenciada pelo número de pratos teóricos da coluna. A relação entre a altura equivalente a um prato teórico (HETP) e a velocidade da fase móvel é descrita pela equação de Van Deemter:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu,$$

onde  $u$  corresponde à velocidade média da fase móvel e A, B e C são constantes que representam contribuições devidas à dispersão turbulenta das moléculas do soluto, à difusão molecular e à resistência à transferência de massa, respetivamente. Quando as partículas da coluna têm um tamanho reduzido e uniforme, a constante A é reduzida até ao seu mínimo, assim como a constante B e C quando o fluxo da fase móvel é alto (Kumar *et al.*, 2012; Universidade de Coimbra, 2007; Wu e Clausen, 2007).

A aplicação de fases estacionárias com tamanhos de partícula pequenos implica um aumento da pressão cromatográfica e contribui para que as constantes A, B e C sejam aproximadas do seu valor mínimo, contribuindo para que a HETP apenas dependa da velocidade da fase móvel. Para que isto ocorra é necessário usar elevadas temperaturas assim como colunas monolíticas. Por um lado, a elevação da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel, diminuindo a resistência à transferência de massa e aumentando a

velocidade de fluxo da fase móvel, sem que a pressão sofra alterações, por outro lado, as colunas monolíticas permitem uma elevada permeabilidade, uma vez que são constituídas por um material com estrutura sólida com canais relativamente grandes (Faria *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2012; Wu e Clausen, 2007).

### **Vantagens, Desvantagens e Desafios da UHPLC**

O menor tempo de corrida da UHPLC resulta na redução do volume de solventes orgânicos e do tempo geral da análise, sem prejudicar a sensibilidade e a resolução. Além disso, há uma economia de fase estacionária e de fase móvel, utilizam-se volumes de amostra menores e geram-se menores quantidades de resíduos. Por estes motivos esta técnica é considerada amiga do ambiente. Uma outra vantagem muito importante consiste na facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC (Maldaner, 2012).

Apesar disto, esta técnica apresenta também algumas desvantagens como é o caso do menor tempo de vida da coluna e a manutenção que exige devido às elevadas pressões a que está sujeita. Além disso, as fases com partículas com tamanho inferior a 1,7  $\mu\text{m}$  não são regeneráveis e têm um limite de uso (Kumar *et al.*, 2012). No entanto, as modificações requeridas para que um equipamento de UHPLC possa ser utilizado com elevado desempenho vão para além da capacidade de trabalhar a elevadas pressões. É necessário possuir também um sistema robusto de bombeamento, um sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de pequenos volumes, detetores com alta taxa de aquisição de dados e colunas apropriadas (Maldaner e Jardim, 2012).

Um dos desafios desta tecnologia pode prende-se com a redução do entupimento destes sistemas devido aos reduzidos diâmetros internos dos canais. Para evitar estas situações é necessário existirem cuidados de limpeza do sistema cromatográfico, com amostras e fases móveis filtradas para eliminar partículas com tamanho superior a 2  $\mu\text{m}$ , substituição diária das fases móveis para evitar o crescimento bacteriano, entre outros. Outro desafio importante passa pelos efeitos decorrentes do uso de pressões elevadas que podem alterar o volume molar das moléculas, que implica alterações de seletividade e de ordem de eluição dos compostos, ou na retenção cromatográfica provocando o deslocamento ou sobreposição de picos cromatográficos. Este facto deve ser tido em conta aquando da transferência do método de HPLC para UHPLC. O efeito do aquecimento por atrito é outro desafio que se deve ter em consideração aquando da transferência do método de HPLC para UHPLC, uma vez que pode ser significativo quando se opera com pressões elevadas e levando a alterações na retenção e na eficiência da análise (Guillarme e Veuthey; Maldaner e Jardim, 2012).



## A Aplicabilidade da UHPLC

Devido à sua boa sensibilidade e resolução, a UHPLC é aplicável para determinação de fármacos em matrizes biológicas ou bio farmacêuticas, tais como a análise em substâncias em granel e em produto final. Os métodos podem ser executados para grupos de fármacos com estrutura química similar e na presença de substâncias relacionadas, tais como impurezas e produtos de degradação. As aplicações mais comuns da UHPLC na análise farmacêutica nos últimos anos são:

- Estudos de Estabilidade dos API no granel e nas formas farmacêuticas, especialmente durante o desenvolvimento de métodos analíticos de *stability-indicating*;
- Perfis de impurezas;
- Estudos de dissolução.

Estas áreas de pesquisa requerem uma grande quantidade de API e, por isso, a UHPLC pode resolver os problemas de tempo excessivo e elevado consumo de solventes mantendo a resolução e sensibilidade adequadas (Cielecka-Piontek *et al.*, 2013).

Por outro lado, a UHPLC é também utilizada para ensaios proteómicos, em que se torna necessário identificar amostras complexas. Para isso, são utilizadas colunas com elevada eficiência e com alta capacidade de gerar picos combinadas com eluições em gradiente. No que diz respeito à separação de enantiómeros é necessária uma elevada seletividade e uma menor eficiência, no entanto a elevada eficiência da UHPLC promove a elevada capacidade de gerar picos o que é vantajoso para este tipo de separações cromatográficas. É ainda importante realçar o papel da UHPLC nas análises ambientais, como por exemplo na análise de pesticidas em águas, em que a elevada resolução, sensibilidade e velocidade são aspetos vantajosos desta técnica (Wu e Clausen, 2007).

### **Problemas associados a análises cromatográficas**

Embora os métodos analíticos de HPLC e HUPLC sejam validados, existem variações que podem levar a problemas na análise cromatográfica das amostras e/ou dos padrões.

No caso de ocorrer uma destas situações, o primeiro passo será definir o problema, recorrendo a tabelas disponibilizadas pela indústria fornecedora dos aparelhos, para depois encontrar a fonte e só mais tarde a respetiva solução.

**Prevenir problemas com a fase móvel** – Baixa sensibilidade e elevadas linhas de base, ruído ou picos indesejáveis nos cromatogramas são muitas vezes atribuídos à fase móvel. Os contaminantes na fase móvel são especialmente perturbadores na eluição por gradiente. A linha de base pode subir e picos não espectáveis podem aparecer à medida que o nível de componentes contaminantes aumentam. A água é uma fonte de contaminação muito comum nas análises em fase reversa e por isso deve ser usada apenas água ultrapura. Alguns tampões promovem o crescimento de bactérias ou algas e por isso essas soluções devem ser preparadas na altura da análise e filtradas antes de serem usadas, para remover partículas que poderão causar ruído na linha de base ou obstruir a coluna. Para prevenir o crescimento de microrganismos os tampões devem ser preparados com uma percentagem de solventes orgânicos como etanol ou acetonitrilo. Além disso, a fase móvel deve ser degaseificada para prevenir a entrada de bolhas no sistema. Reagentes iónicos devem ser usados com cuidado, uma vez que as concentrações e misturas com outros reagentes podem levar à precipitação de sais, como é o caso das elevadas concentrações de solventes orgânicos.

**Isolar problemas da bomba** – A bomba deve injetar um fluxo de solvente constante para a coluna sob influência de uma grande variedade de condições. Os problemas relacionados com o sistema de injeção são normalmente fáceis de detetar e corrigir. Os sinais mais comuns são tempos de retenção errados, linhas de base com ruído ou picos indesejáveis no cromatograma. Um sinal seguro de vazamento é a acumulação de sais na ligação da bomba à coluna.

**Injetor e solventes injetados** – O injetor introduz rapidamente a amostra no sistema com uma variação de fluxo mínima. Os problemas mecânicos que envolvem o injetor, tais como fugas e vedações gastas, são fáceis de detetar e resolver. Alterações da altura dos picos, picos divididos ou amplos podem ser causados pelo não preenchimento total do “loop”, incompatibilidades do solvente injetado com a fase móvel ou baixa solubilidade da amostra.

**Proteção da coluna** – É recomendado que todas as amostras sejam filtradas com filtros com diâmetros entre 0,45 $\mu$ m e 0,2 $\mu$ m para evitar problemas relacionados com a coluna. Filtros e protetores de coluna podem ser usados para evitar esses mesmos problemas, uma vez que previnem a acumulação de partículas e a retenção de compostos. O tempo de vida útil das colunas está dependente da fase móvel, uma vez que quando começa a ser contaminada com partículas, a pressão aumenta e os picos tornam-se amplos ou divididos. O problema normalmente associado às colunas são a deterioração que se manifesta com sinais como picos com formas não desejáveis, picos divididos, ombros, perda de resolução, tempos de retenção diminuídos e elevada pressão.

**Resolver problemas no detetor** – os problemas do detetor podem ser elétricos ou mecânicos/óticos. Na presença de problemas elétricos, deve ser contactado o fornecedor do instrumento. Os problemas mecânicos ou óticos podem ser rastreados pelo fluxo da célula. Estes normalmente causam picos indesejáveis ou ruído na linha de base nos cromatogramas ou baixa sensibilidade (Sigma Aldrich, 2009).

### **Importância da HPLC para o Farmacêutico**

A HPLC tem um papel muito importante para o Farmacêutico, principalmente na área da indústria farmacêutica e na área de investigação e desenvolvimento de novos fármacos. Como presenciei mais a área de indústria farmacêutica irei dedicar-me mais à análise da importância da HPLC para o Farmacêutico de Indústria.

A HPLC é uma ferramenta importante para a análise farmacêutica dos medicamentos, para a sua monitorização e para a segurança de qualidade. Permite separar, identificar e quantificar misturas complexas como são os extratos de plantas medicinais por exemplo. Esta separação ocorre a temperatura ambiente ou um pouco superior, logo, é adequada para trabalhar com componentes com estabilidade térmica limitada (Agilent, 2000).

### **O extenso papel da HPLC na descoberta de substâncias**

Tendo em consideração a indústria farmacêutica a probabilidade de desenvolvimento com sucesso de candidatos clínicos tem aumentado, pela otimização dos componentes do processo de descoberta – identificação do alvo terapêutico, desenho químico, síntese, análise e purificação do composto, registo, manutenção biológica e da ADME. Através da otimização de cada um destes passos é expectável que os problemas de desenvolvimento pré-clínico sejam reduzidos. O programa de descoberta de novas substâncias inicia-se com a escolha de uma área terapêutica e com a identificação de um alvo importante para o tratamento da doença. Numerosas técnicas avançadas como nano colunas HPLC/MS/MS, têm ajudado da identificação de alvos/proteínas. De seguida, torna-se necessário recorrer a bibliotecas para seleccionar os primeiros *hits/actives*. De acordo com a sua relação estrutura atividade, são gerados através de meios informáticos, dados em três dimensões de estruturas de proteínas adequadas ao alvo. Uma vez identificados os *hits*, é dado início ao processo de refinamento e otimização dos *leads*. A HPLC e LC/MS tem um papel fundamental nesta fase pois permite a purificação das substâncias (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

Após esta fase a HPLC é muito importante na pré-formulação das novas substâncias:

- Caracterização físico-química inicial com determinação do pKs, coeficientes de partição e distribuição, e solubilidade;
- Estabilidade química, seleção do sal mais adequado, polimorfismos (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

### **O papel da HPLC na determinação de impurezas**

Um dos papéis mais importantes da HPLC consiste na determinação de impurezas das substâncias ativas. Com esta técnica a preparação das amostras é facilitada, os erros associados são muito baixos e é possível usar a eluição em gradiente, a temperatura e os diferentes comprimentos de onda para retirar o máximo de informação relativamente às impurezas que podem apresentar-se sob formas muito distintas. Além disto, oferece a sensibilidade desejada para este tipo de análises e com um elevado nível de automação. A elevada variedade de fases estacionárias e modos de operação constitui outra vantagem da HPLC para a análise de fármacos (Nageswara Rao e Nagaraju, 2003).

### **A transferência do método analítico para o Controlo de Qualidade**

A transferência do método analítico é o mecanismo pelo qual, o conhecimento adquirido no processo de descoberta de um novo ativo farmacêutico é transferido para a escala comercial. Esta transferência garante aos laboratórios a execução de análises de rotina, obtendo resultados aceitáveis e com capacidade de classificar a qualidade dos lotes comerciais de forma precisa e independente. A transferência do método analítico de HPLC é uma das mais importantes transferências entre o desenvolvimento do novo fármaco e a escala de produção e pode ocorrer no final da fase II dos ensaios clínicos ou durante a transição da fase II para a fase III. A transferência analítica pode ser realizada entre diferentes identidades mas a mais comum é a realizada entre a descoberta analítica e desenvolvimento para o laboratório de Controlo de Qualidade da organização comercial (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

As indústrias farmacêuticas que possuem os dois equipamentos, HPLC e UHPLC, vêm vantagem em ter um método aprovado pelas entidades reguladoras que possa ser usado pelos dois equipamentos. Para que isto aconteça, é necessário estudar as alterações a nível termodinâmico e dos efeitos da temperatura e da pressão e introduzi-las sem que seja necessário outro método ser aprovado pelas entidades reguladoras (Åsberg *et al.*, 2014, 2015).

### **Conclusão**

A cromatografia líquida é uma técnica muito importante no contexto farmacêutico, uma vez que é indispensável na análise desde as matérias-primas até à saída do medicamento no mercado, garantindo a sua qualidade. A cromatografia líquida de alta eficiência está presente durante este percurso e até após a libertação do medicamento para o mercado com a realização de estudos de estabilidade. É uma técnica que está envolvida na investigação e no desenvolvimento de novas moléculas, na sua caracterização para posterior formulação e na determinação das impurezas durante o controlo de qualidade dos fármacos produzidos. Na indústria farmacêutica é usada também, para identificar e quantificar o princípio ativo de cada medicamento que vai ser distribuído para o mercado.

A UHPLC sendo uma vertente da HPLC encontra-se em franco desenvolvimento e apresenta inúmeras vantagens para as análises de rotina, como pode constatar no laboratório de controlo de qualidade por onde passei.

A validação dos métodos é essencial e ao estarem validados as análises de HPLC tornam-se rotina e, sem grandes dificuldades. No entanto, existem sempre problemas associados o que implica que as pessoas que trabalhem com este tipo de equipamentos sejam capacitadas e aptas a resolver quer problemas técnicos como problemas relacionados com os resultados, como a interpretação, descobrir a causa e propor soluções.

Posso então concluir que a cromatografia líquida é uma ferramenta essencial para o farmacêutico e que deve ser estudada nas suas várias vertentes.

## Bibliografia

AGILENT, Technologies - Pharmaceutical Applications with HPLC. Solutions Guide. Germany. April (2000).

ÅSBERG, Dennis *et al.* - Method transfer from high-pressure liquid chromatography to ultra-high-pressure liquid chromatography . I . A thermodynamic perspective. 1362:2014) 206–217. doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.051.

ÅSBERG, Dennis *et al.* - Method transfer from high-pressure liquid chromatography to ultra-high-pressure liquid chromatography. II. Temperature and pressure effects. Journal of Chromatography A. . ISSN 00219673. 1401:2015) 52–59. doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.002.

BALTUSSEN EA, NOIJ THM, NOTOXBV - European Pharmaceutical Contractor. [s.d.] 36–40.

CIELECKA-PIONTEK, Judyta *et al.* - UHPLC: The greening face of liquid chromatography. Chromatographia. . ISSN 00095893. 76:21-22 (2013) 1429–1437. doi: 10.1007/s10337-013-2434-6.

EUROPE, Concil Of (ED.) - 2.2.46. Chromatographic Separation Techniques. Em European Pharmacopeia 5.0. 5. ed. p. 69–73.

FARIA, Anízio M. *et al.* - Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. Quimica Nova. . ISSN 01004042. 29:2 (2006) 300–309. doi: 10.1590/S0100-40422006000200022.

GUILLARME, Davy; VEUTHEY, Jean-luc - Guidelines for the use of UHPLC Instruments

HAYES, Richard *et al.* - Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. . ISSN 18733778. 1357:2014) 36–52. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.010.

KAZAKEVICH, Yuri; LOBRUTTO, Rosario - HPLC Theory and Practice [Em linha]  
Disponível em  
WWW:<URL:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>>. ISBN 9780471681625.

KUMAR, Ashok *et al.* - UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. . ISSN 00016837. 69:3 (2012) 371–380.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel C. S. F. - UHPLC- Uma abordagem atual: desenvolvimento e desafios recentes. Scientia Chromatographica. 4:3 (2012) 197–207.

MCPOLIN, B. Y. Oona - An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis. Mourné Training Services The. 44:0 (2009) 1–137.

NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V. - An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. . ISSN 07317085. 33:3 (2003) 335–377. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00293-0.

## A Cromatografia Líquida no Contexto Farmacêutico

SIGMA ALDRICH - HPLC Troubleshooting guide. 6628:800 (2009) 1–20. doi: 10.1016/B978-075066278-9/50009-3.

SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy - Princípios de análise instrumental. [S.l.] : Bookman, 2002. ISBN 9788573079760.

UNIVERSIDADE DE COIMBRA - Portal de Engenharia Química - Fundamentos [Em linha], atual. 2007. [Consult. 31 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:[http://labvirtual.eq.uc.pt/sitejoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=67&Itemid=143#1](http://labvirtual.eq.uc.pt/sitejoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=67&Itemid=143#1)>.

WU, Najun; CLAUSEN, Andrew M. - Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. Journal of Separation Science. . ISSN 16159306. 30:8 (2007) 1167–1182. doi: 10.1002/jssc.200700026.