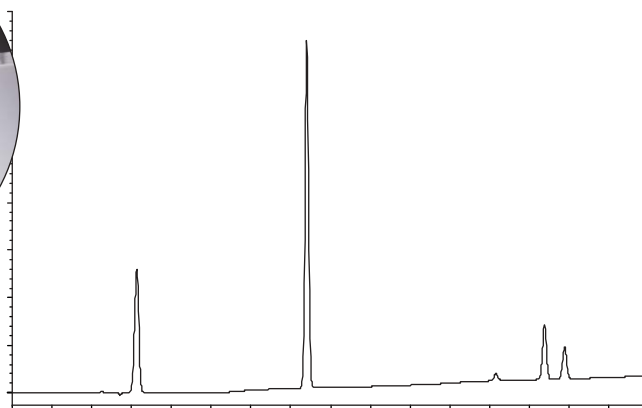


Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno usando o Agilent 1120 Compact LC

Nota de aplicação

Angelika Gratzfeld-Huesgen
Patrik Hoerth
Daniel Thielsch



Resumo

O Agilent 1120 Compact LC é um sistema ideal para cromatografia líquida convencional em escala analítica. É um LC projetado para facilidade de uso, desempenho e confiabilidade. É ideal para análise de medicamentos, devido a sua capacidade de conseguir tempos de retenção e áreas de pico muito precisos e baixos limites de detecção dos compostos analisados. Nesta Nota de Aplicação, os dados apresentados demonstram:

- Excelente precisão de tempo de retenção, menor que 0,07% RSD
- Excelente precisão de área, menor que 1,0% RSD para picos separados na linha de base
- Excelente linearidade com coeficiente de correlação menor do que 0,9999
- Limite de detecção (LOD) de 13 a 298 pg para todos os compostos analisados

Equipamento Agilent:

1120 Compact LC
Software EZChrom Elite Compact
Coluna TC-C18(2)

Área de aplicação:

Análise farmacêutica QA/QC



Agilent Technologies

Introdução

Para a análise rotineira de compostos farmacêuticos e impurezas em QA/QC, é importante usar sistemas LC com alta acurácia, precisão e robustez. O LC 1120 Compact da Agilent foi baseado em uma plataforma robusta capaz de fornecer dados de qualidade. Isso faz dele uma alternativa ideal para análises de rotina de QA/QC de compostos farmacêuticos. Neste estudo, foram avaliadas a precisão, a linearidade e os limites de detecção (LOD) de vários compostos farmacêuticos.

Experimental

Equipamento

- Agilent 1120 Compact LC com bomba gradiente com degaseificador integrado, amostrador automático com bandeja de frascos, forno de coluna e detector de comprimento de onda variável, ver figura 1
- Agilent TC-C18(2), alta carga de carbono, coluna de 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm
- Software Agilent EZChrom Elite Compact

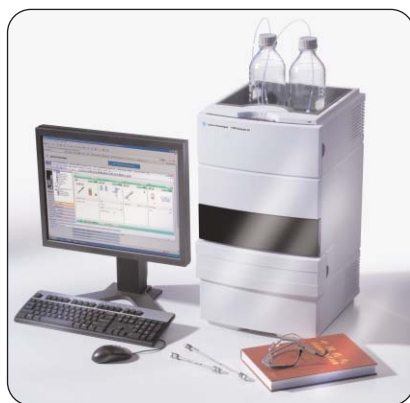


Figura 1
Agilent 1120 Compact LC

Condições cromatográficas

- Fase móvel:
A: Água + 0,05% TFA
B: ACN + 0,045% TFA
- Gradiente:
0 min, 25% B;
1 min, 25% B;
4 min, 60% B;
7 min, 70% B
- Taxa de fluxo: 1,5 mL/min
- Volume de injeção: 3 μL
- Temperatura da coluna: 40°C
- Comprimento de onda de detecção: 230 nm
Largura de pico: > 0,05 min
- Tempo de execução: 8 min
- Tempo posterior: 2 min

Resultados e discussão

Os compostos escolhidos para a avaliação da precisão, linearidade e LOD foram paracetamol, Ibuprofeno e diclofenaco. O ácido benzóico foi usado como padrão interno (ISTD). A Tabela 1 relaciona os níveis de concentração usados. O método cromatográfico foi definido de forma que todos os compostos fossem separados na linha de base. O paracetamol apresentou uma dificuldade específica, porque ele é eluído da coluna da fase C-18 quase sem nenhuma retenção. As condições iniciais foram então selecionadas de forma que o paracetamol mostrasse pelo menos alguma retenção na coluna selecionada.

Composto	Ibuprofeno ng/3 μL	Ácido benzóico ng/3 μL	Paracetamol ng/3 μL	Diclofenaco ng/3 μL
Nível 1	38,15	71,25	56,7	25,2
Nível 2	19,075	36,625	28,35	12,6
Nível 3	9,538	18,313	14,175	6,3
Nível 4	4,769	9,156	7,088	3,15
Nível 5	2,384	4,578	3,544	1,575
Nível 6	1,192	2,289	1,772	0,788
Nível 7	0,596	1,145	0,886	0,394

Tabela 1
Compostos de drogas e níveis de concentração.

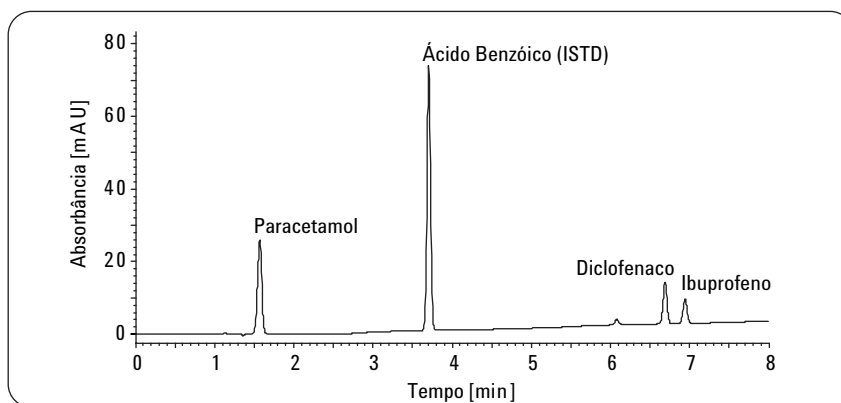


Figura 2
Análise de drogas farmacêuticas, mostrando resolução excelente.

Além disso, o objetivo do desenvolvimento de método era manter o tempo total de análise o mais breve possível. Foi possível limitar os tempos de execução e equilíbrio a 10 minutos (figura 2). A fase móvel continha ácido trifluoroacético como modificador. Ele influenciou positivamente a forma do pico e a retenção. O primeiro pico do gradiente a quatro minutos foi rápido o suficiente para manter o intervalo entre o primeiro e o segundo pico o menor possível.

Precisão

Analisar fármacos com detecção UV significa que a precisão dos tempos de retenção é de suma importância. Além disso, a precisão das áreas de pico deve ser menor que 1% na gama de baixos ng, para conformidade com regulamentações oficiais. A precisão dos tempos e áreas de retenção foi determinada com concentração de nível 2. Os resultados são exibidos na figura 3 e na tabela 2. Na figura 2, foram sobrepostas 10 execuções consecutivas.

Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado com base no cromatograma obtido no nível de concentração 7, ver tabela 3. Os limites de detecção para o ibuprofeno e o diclofenaco ficaram na faixa dos décimos e para o paracetamol e o ácido benzóico ficaram na faixa dos centésimos.

Linearidade

A linearidade foi testada com níveis de concentração de 1 a 7. A figura 4 mostra a linearidade do paracetamol como exemplo. Os resultados mostraram linearidade excelente em toda a gama de concentrações. A tabela 4 mostra os coeficientes de correlação de todos os compostos.

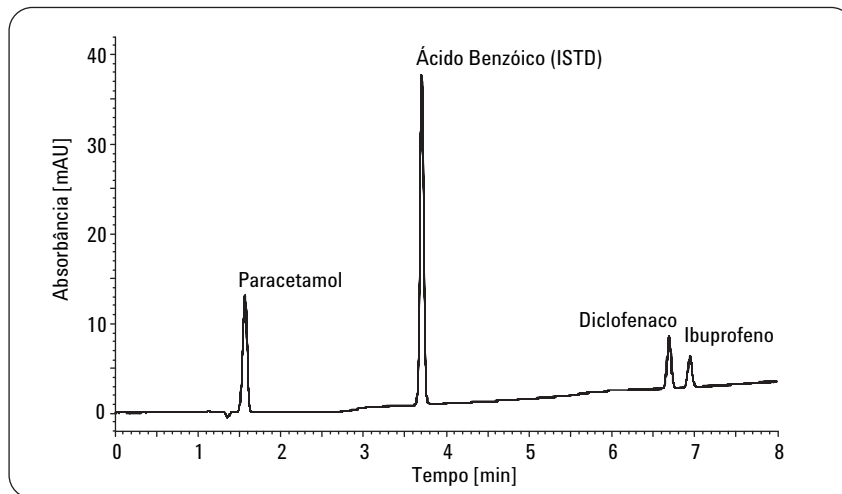


Figura 3
Precisão dos tempos e áreas de retenção, mostrando sobreposição de 10 execuções consecutivas.

	% RSD Tempos de retenção	% RSD Áreas
Paracetamol	0,060	0,297
Ácido benzóico	0,022	0,179
Diclofenaco	0,020	0,807
Ibuprofeno	0,016	0,962

Tabela 2
Precisão dos tempos e áreas de retenção para o nível de concentração 2.

	Quantidade injetada (injeção de 3 µL)	Calculada LOD [ng]
Paracetamol	0,394	0,013
Ácido benzóico	1,145	0,019
Diclofenaco	0,394	0,197
Ibuprofeno	0,596	0,298

Tabela 3
Limites de detecção.

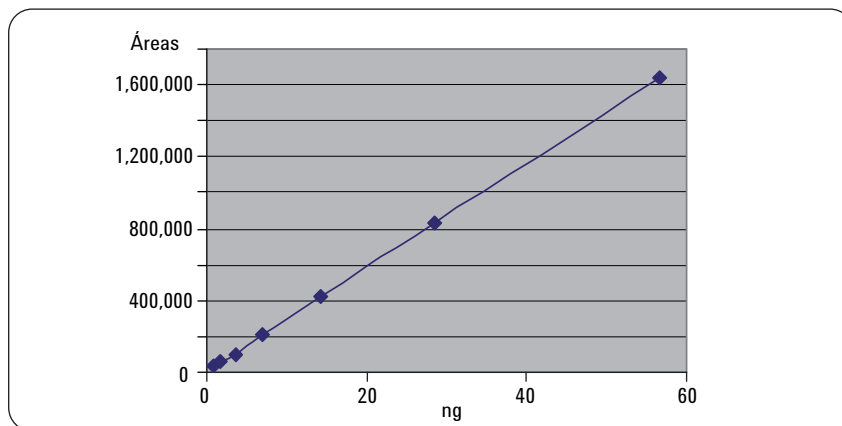


Figura 4
Linearidade do paracetamol de 0,886 a 56,7ng por injeção de 3 µL.

	Coefficiente de correlação
Paracetamol	0,999966
Ácido benzóico	0,999954
Diclofenaco	0,999975
Ibuprofeno	0,999910

Tabela 4
Coeficientes de correlação.

Resumo

O Agilent 1120 Compact LC foi usado para análise de compostos farmacêuticos. O instrumento foi capaz de analisar esses compostos com alta precisão em tempos e áreas de retenção. A precisão dos tempos de retenção foi menor que 0,07% RSD e menos de 1,0% RSD para áreas de picos separados na linha de base. Os limites de detecção ficaram entre 13 e 298 ng. Os resultados mostraram linearidade excelente na gama de concentrações testadas e o coeficiente de correlação ficou entre 0,999910 e 0,999975.

*Angelika Gratzfeld-Huesgen,
Patrik Hoerth e Daniel Thielsch
são Químicos de Aplicação da
Agilent Technologies, Waldbronn,
Alemanha.*

www.agilent.com/chem/1120:in

© 2007 Agilent Technologies Inc.

Publicado em Maio de 2008
Publicação número 5989-7457PTBR



Agilent Technologies