



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU**  
**ANÁLISE INSTRUMENTAL**

**OTIMIZAÇÃO DO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO EM**  
**CROMATOGRAFIA**

**LEONARDO DE SOUZA MEGLIORINI**

Toledo, PR

2019



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU**  
**ANÁLISE INSTRUMENTAL**

**OTIMIZAÇÃO DO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO EM**  
**CROMATOGRAFIA**

**Leonardo de Souza Megliorini**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação Lato Sensu em Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Toledo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental.

Orientador: Dr. Lincoln Figueira Marins Coutinho

Toledo, PR

2019

## TERMO DE APROVAÇÃO

### OTIMIZAÇÃO DO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO EM CROMATOGRAFIA

Por

**LEONARDO DE SOUZA MEGLIORINI**

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia onze de junho de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise Instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o ***trabalho Aprovado***.

---

Prof. Dr. LINCOLN FIGUEIRA MARTINS COUTINHO (Orientador)

---

Prof. Dr. DOUGLAS CARDOSO DRAGUNSKI (Membro – UNIOESTE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. CAROLINE MARIANA DE AGUIAR (Membro – UTFPR)

***\*A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da Especialização***

# OTIMIZAÇÃO DO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO EM CROMATOGRAFIA

## RESUMO

Na cromatografia, o cálculo de resolução é amplamente difundido e os resultados numéricos gerados são facilmente interpretados e associados ao grau de separação dos picos. Este cálculo pode ser realizado com diversas equações descritas na literatura. Entretanto, quase sempre as equações utilizadas são idealizadas para picos simétricos. Em análises cromatográficas geralmente os picos quantificados são bastante simétricos, mas com a necessidade de quantificação de impurezas em níveis extremamente baixos, o pico do componente majoritário é muito grande e assimétrico. Nesses casos, como o componente majoritário não é quantificado, algumas vezes a assimetria deste pico é negligenciada. O problema é que ao utilizar as equações convencionais de resolução entre impurezas e este pico majoritário assimétrico, os resultados geralmente são infiéis à real separação. Duas propostas de equações aplicáveis a picos simétricos e assimétricos são propostas e evidenciam resultados mais confiáveis para a resolução de picos assimétricos. São apresentados cromatogramas com resultados mais reais de resolução com as fórmulas propostas em relação às fórmulas convencionais. As duas equações propostas geram valores de resolução coerentes à separação dos picos simétricos e assimétricos, enquanto as equações convencionais geram valores incoerentes para picos assimétricos.

**Palavras-chave:** resolução; resolução cromatográfica; picos assimétricos.

# OPTIMIZATION OF THE RESOLUTION CALCULATION IN CHROMATOGRAPHY

## ABSTRACT

In chromatography, the resolution calculation is widely diffused and the numerical results generated are easily interpreted and associated with the separation degree of the peaks. This calculation can be performed with several equations described in the literature. However, almost always the equations used are idealized for symmetric peaks. In chromatographic analyzes generally the quantified peaks are quite symmetrical, but with the need to quantify impurities at extremely low levels, the peak of the major component is very large and asymmetrical. In these cases, since the major component is not quantified, sometimes the asymmetry of this peak is neglected. The problem is that by using the conventional equations of resolution between impurities and this asymmetric major peak, the results are generally unfaithful to the actual separation. Two proposed equations for symmetric and asymmetric peaks are proposed and show more reliable results for the resolution of asymmetric peaks. Chromatograms with more real resolution results with the formulas proposed are presented in relation to conventional formulas. The two proposed equations generate resolution values consistent with the separation of symmetric and asymmetric peaks, while conventional equations generate incoherent values for asymmetric peaks.

**Keywords:** resolution; chromatographic resolution; asymmetrical peaks.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
1 INTRODUÇÃO .....	5
1.1 CROMATOGRAFIA .....	6
1.2 FATOR DE SIMETRIA DO PICO .....	7
1.3 RESOLUÇÃO .....	9
1.3.1 Equação de Schoekamers <i>et al</i> para resolução de picos simétricos com grande diferença de área.....	12
1.3.2 Equação de Schoekamers <i>et al</i> para resolução de picos não simétricos....	13
2 METODOLOGIA.....	14
2.1 COMPROVAÇÃO MATEMÁTICA DOS PROBLEMAS DO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO ENVOLVENDO PICOS ASSIMÉTRICOS .....	14
2.2 DEMONSTRAÇÃO DE QUE NÃO HÁ IMPACTO NO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO PARA PICOS SIMÉTRICOS .....	14
2.3 DEMONSTRAÇÃO DO IMPÁCTO NO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO PARA PICOS ASSIMÉTRICOS.....	14
2.4 PROPOSTAS PARA O CÁLCULO DE RESOLUÇÃO.....	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1 CROMATOGRAMA SIMULADO ENVOLVENDO PICOS SIMÉTRICOS E ASSIMÉTRICOS.....	16
3.2 CROMATOGRAMA REAL ENVOLVENDO PICOS SIMÉTRICOS E ASSIMÉTRICOS.....	19
4 CONCLUSÕES .....	28
5 REFERÊNCIAS.....	29

# 1 INTRODUÇÃO

A cromatografia, como técnica instrumental analítica, utiliza-se de detectores que possuem a função de registrar o sinal analítico ao longo do tempo gerando o que é conhecido como cromatograma. Em tal cromatograma, idealmente, cada pico representa um componente da mistura analisada. Para avaliar a eficiência da separação entre dois picos a forma mais difundida é a partir do cálculo de resolução ( $R_s$ ). Existem diferentes equações descritas para fim de cálculo de resolução cromatográfica, mas as equações geralmente utilizadas pressupõem picos com formato gaussiano, minimamente totalmente simétricos.(IUPAC, 2014)(CHROMACADEMY, 2014)

Com a evolução das técnicas instrumentais, aumentou também a importância da quantificação de impurezas em níveis cada vez menores. Com isso, muitas análises cromatográficas utilizam soluções teste em concentrações elevadas. Desta forma, o sinal analítico das impurezas a serem quantificadas apresentam intensidade quantificável, porém o sinal do componente principal pode ser demasiadamente grande. Assim, o pico referente à substância majoritária muitas vezes se apresenta deformado, assimétrico e/ou acima do limite máximo quantificável do detector. Apesar disso, muitas vezes as características do pico principal são negligenciáveis, já que os picos de interesse nesse caso são os das impurezas presentes com boa simetria. Logo, para muitas avaliações o formato do pico principal se torna irrelevante quando as análises se destinam à quantificação de impurezas. (KUMAR; XAVIER; RAMYA, 2019),(SOMAN; QIU; CHAN, 2008)(ICH, 2017)

Durante a validação de um método analítico deve ser demonstrada a seletividade do método. Para isso uma das principais avaliações é a resolução entre os picos separados pelo método. Ao avaliar a resolução entre o pico do componente principal e uma impureza se torna primordial a averiguação da simetria destes picos. Neste momento deve ser avaliado se os cálculos de resolução utilizados pressupondo picos minimamente simétricos são aplicáveis aos picos presentes no cromatograma. (FDA, 2015), (ANVISA, 2017) (ANVISA, 2015a),

Muitos resultados gerados pelas indústrias são reportados sem a consideração da correlação entre o cálculo de resolução e o formato dos picos. Uma questão agravante é o fato de que há programas de aquisição e tratamento de dados cromatográficos só possuem equações de resolução pressupondo picos simétricos. Nestes casos, mesmo que seja constatada a falta de simetria para um pico, a resolução calculada irá considerar o pico simétrico.

Diversos órgãos regulamentadores determinam como imprescindível a avaliação da resolução, mas a mesma importância não é dada aos fatores que podem impactar nos resultados de resolução incoerentes. Em alguns casos alguns dos fatores são elencados, mas sem justificativa ou opções de contorno dos impactos gerados pelo cálculo inconsistente. (FDA, 2015), (ANVISA, 2017), (ANVISA, 2015a)

No Brasil, o Guia nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015 expõe o entendimento da ANVISA para o melhor atendimento da RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Neste guia há a recomendação de avaliar alguns parâmetros cromatográficos durante o estudo do perfil de degradação de uma substância. Dentre os parâmetros são citados a resolução e a assimetria. Não constam especificações para tais parâmetros e geralmente a assimetria do pico não é considerada na avaliação da resolução entre os picos. (ANVISA, 2015b), (ANVISA, 2015a)

Nesse contexto, dependendo da equação adotada, o resultado do cálculo de resolução pode ser um valor que não representa a real separação entre dois picos, podendo superestimar ou subestimar a separação obtida pelo método.

A resolução cromatográfica é um dos parâmetros mais relevantes. Entretanto, pouco, se discute sobre a aplicabilidade da forma convencional de calcular a resolução cromatográfica. Desta forma, não raro os resultados de resolução são inconsistentes com o real grau de separação entre os picos cromatográficos.

Nas últimas décadas houve grande evolução nos sistemas cromatográficos que permitiram um avanço no tocante à quantificação de impurezas. Em tais aplicações geralmente os cromatogramas possuem picos de magnitudes e simetrias muito diferentes, tornando de extrema importância a consideração do perfil cromatográfico quando se calcula a resolução entre picos.(ICH, 2017)(ICH, 2006a)(ICH, 2006b)

Esse trabalho tem por objetivo demonstrar casos em que o cálculo de resolução mais difundido não é aplicável, comprovando matematicamente e propondo alternativas mais fiéis para calcular a resolução cromatográfica.

## **1.1 CROMATOGRAFIA**

A cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase



estacionária e outra denominada fase móvel, composta por um fluido que percola através da fase estacionária. A técnica explora diferentes propriedades das diferentes substâncias em uma mistura, como polaridade, hidrofobicidade, carga, tamanho de partícula e interações intermoleculares.(LANÇAS, 2018) (TSWETT, 1903)(ETTRE, 2003)

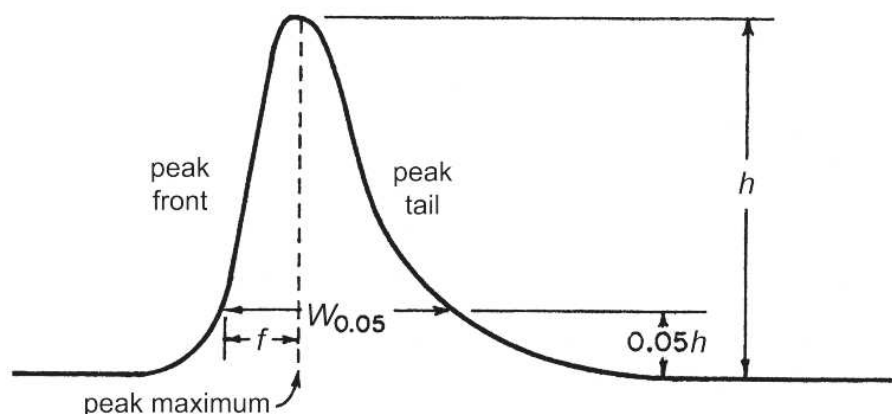
O desenvolvimento da técnica é atribuído ao botânico Mikhael Tswett por realizar a separação de pigmentos presentes em extratos de plantas no início do século XX. Para isso ele utilizou um tubo recheado com carbonato de cálcio. Apesar de outros pesquisadores realizarem experimentos semelhantes, Tswett foi o primeiro a interpretar e compreender o processo cromatográfico da forma que é entendido hoje para então descrever o fenômeno responsável pelo movimento das zonas coloridas dentro do tubo de vidro.(LANÇAS, 2018) (TSWETT, 1903)(ETTRE, 2003)

Após uma mistura ser separada, geralmente as substâncias passam por um detector que gera um sinal analítico para cada componente. Nesta técnica o resultado da análise é um cromatograma, no qual os sinais analíticos dos analitos passando pela cela de detecção são representados por picos. A eficiência da separação entre os picos está relacionada com a confiabilidade da medida. Esta separação permite avaliar se cada pico está sofrendo interferência por outros picos adjacentes. Para avaliar o grau de separação entre dois picos comumente utilizasse a resolução entre dois picos.

## **1.2 FATORES DE SIMETRIA E DE ASSIMETRIA DO PICO**

A falta de simetria de um pico pode destruir a separação dele em relação a outro pico, reduzindo a seletividade do método, além de diminuir a sensibilidade quando o pico fica baixo e largo.(DOLAN, 2004)

O fator de simetria ( $A_s$ ) de um pico também é conhecido como fator de cauda. Para compreensão deste parâmetro deve ser considerada a Figura 1:



**Figura 1** - Pico cromatográfico assimétrico.(USP 41-NF 36, 2018)

Na figura apresentada o pico possui altura  $h$ . A 5% da altura do pico (ou seja, a  $0,05h$ ) a largura medida é  $W_{0,05}$  e a porção inicial do pico é  $f$  (*front*). (USP 41-NF 36, 2018)

Pela definição da United States Pharmacopeia (USP) e de diversas outras referências o fator de simetria pode ser calculado da seguinte forma: (LANÇAS, 2018)(USP 41-NF 36, 2018)(SNYDER *et al*, 1988)

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad \text{Equação 1}$$

Quanto maior este valor, mais cauda tem o pico. Por isso também é chamado de fator de cauda. Um fator de simetria igual a 1 indica um pico perfeitamente simétrico, enquanto valores menores que 1 indicam picos assimétricos.

Comumente utilizado, existe também o fator de assimetria ( $A_{as}$ ), com o mesmo propósito do Fator de Simetria ( $A_s$ ): quantificar o quanto um pico é simétrico. O Fator de Assimetria é definido pela seguinte equação: (LANÇAS, 2018)(USP 41-NF 36, 2018)

$$A_{as} = \frac{(W_{0,10} - f_{0,10})}{f_{0,10}} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação  $w_{0,10}$  é a largura do pico a medida a 10% da altura do mesmo e  $f_{0,10}$  é o intervalo de tempo entre o início do pico e seu tempo de retenção, também medido a 10% da altura do pico. Os resultados gerados pelo fator de simetria e de assimetria são um pouco

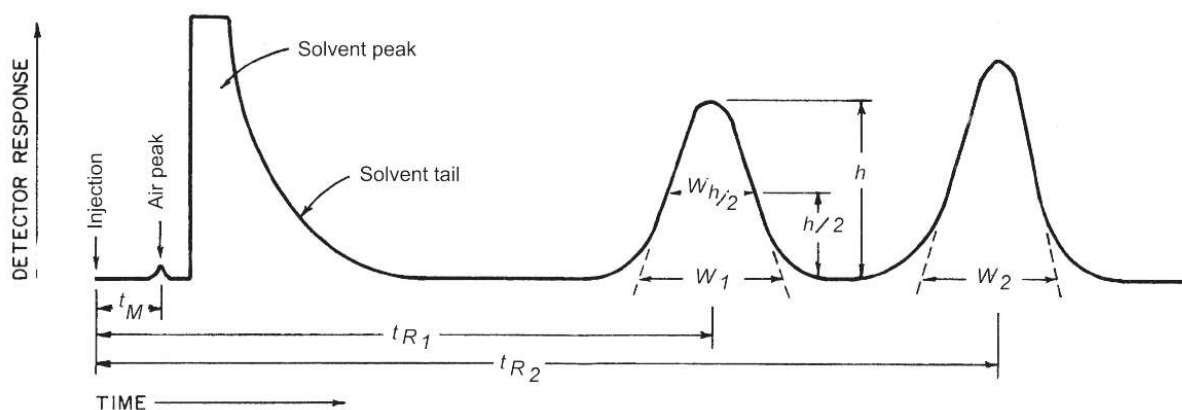
diferentes quando o pico é pouco simétrico. Contudo, a USP propõe na nota número 2 do capítulo 621 que sempre seja utilizado o fator de simetria ( $A_s$ ). (USP 41-NF 36, 2018)

Snyder *et al* (1997) apresentam uma comparação entre os resultados do fator de assimetria do pico e fator de simetria do pico, em diferentes condições cromatográficas, chamados de *peak asymmetry factor* e de *peak tailing factor*, respectivamente. Os resultados numéricos para um pico simétrico são iguais, mas para um pico assimétrico são numericamente diferentes. Segundo os autores, um resultado de até 1,2 para o fator de assimetria ( $A_{as}$ ) pode ser considerado aceitável. Por outro lado, o *Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods* (1994), do FDA, recomenda um fator de cauda ( $A_s$ ) de no máximo 2. (SNYDER *et al*, 1988)(DOLAN, 2002)(FDA, 2015)

As especificações máximas de fator de simetria ou fator de assimetria tem grandes impactos no cálculo de diversos parâmetros cromatográficos, em especial, na resolução cromatográfica.

### 1.3 RESOLUÇÃO

Em cromatografia o cálculo de resolução pode ser representado de forma simples pela distância entre os picos dividida pela largura média dos picos. A figura abaixo mostra as dimensões consideradas no cálculo de resolução. (USP 41-NF 36, 2018)



**Figura 2** – Cromatograma da separação de dois picos. (USP 41-NF 36, 2018)

O cálculo de resolução mais simples está representado na equação 3, a seguir. Neste caso, normalmente a largura do pico na base é dada pela interseção da linha de base e as retas

tangentes aos pontos de inflexão em ambos os lados do pico, como foi representado na Figura 2.(CHROMACADEMY, 2014)(LANÇAS, 2018)(USP 41-NF 36, 2018)

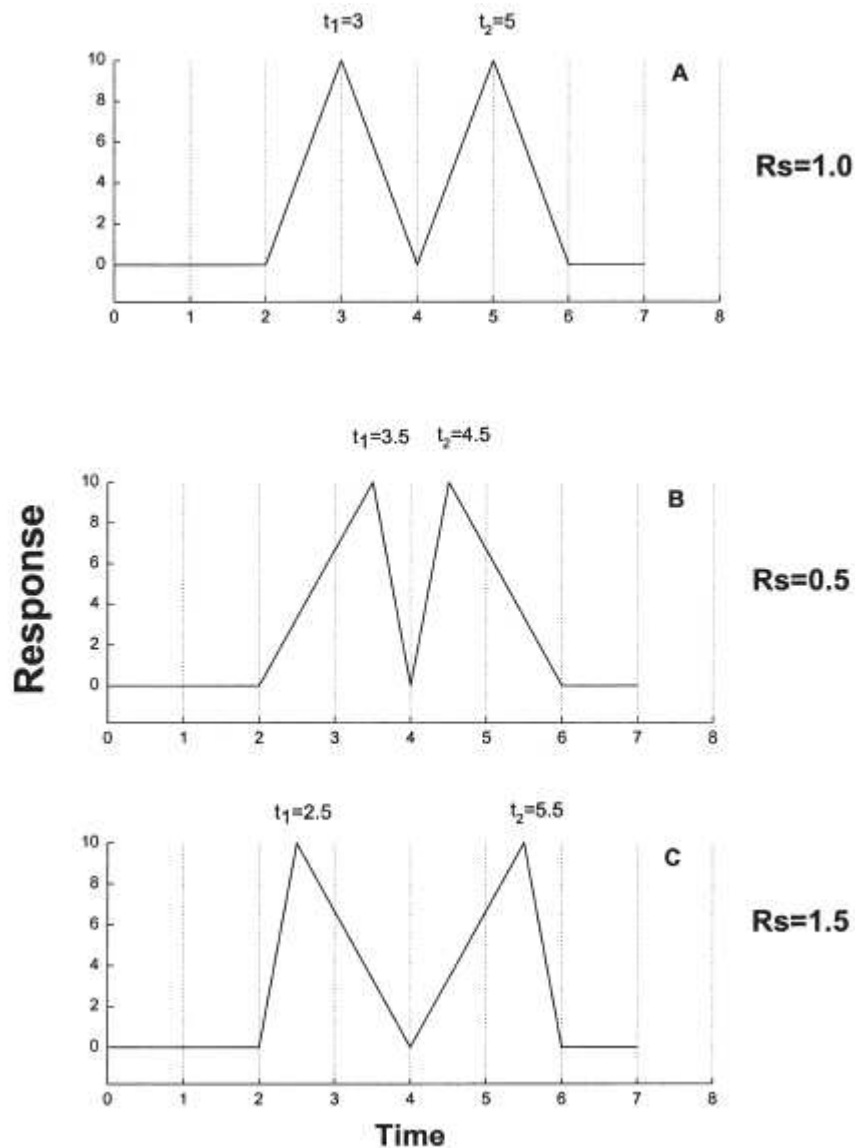
$$R_s = 2 \frac{(t_{R2}-t_{R1})}{(W_1+W_2)} \quad \text{Equação 3}$$

Como pode ser verificado na Figura 2,  $t_{R2}$  e  $t_{R1}$  são respectivamente os tempos de retenção dos picos 2 e 1, enquanto  $w_1$  e  $w_2$  são respectivamente as larguras na base dos picos 1 e 2. Nesta equação a diferença entre os tempos de retenção é determinada pelos ápices dos picos. Deste modo, um par de picos pode ter diferentes resultados de resolução somente pelo formato dos picos. O cálculo seguindo essa fórmula é destinado a picos simétricos e, quando aplicado a picos não simétricos, seus resultados podem não ser confiáveis. (USP 41-NF 36, 2018)(DOLAN, 2002)(COLLINS *et al*, 2006)

Picos mal resolvidos não podem ser medidos em suas bases e, mesmo quando estão bem resolvidos, pode ser difícil determinar onde um pico realmente começa ou termina. Alternativamente a resolução pode ser calculada utilizando as larguras dos picos a meia altura (na metade da altura do pico). Para cromatogramas gerados a partir de softwares de aquisição de dados é mais indicado calcular a resolução a partir da fórmula apresentada na equação 4.

$$R_s = \frac{2}{1,7} \frac{(t_{R2}-t_{R1})}{(W_{h/2\ 1}+W_{h/2\ 2})} \quad \text{Equação 4}$$

Exemplificando o impacto somente da simetria dos picos, um par de picos pode ser avaliado em diferentes situações de simetria dos picos. A figura abaixo mostra 3 pares de picos com mesma separação visual utilizados por Song e Wong. Em cada caso somente o formato dos picos muda e o impacto na resolução é evidente.(SONG; WANG, 2003)



**Figura 3** – Simulação de picos com mesma separação e diferentes simetrias.(SONG; WANG, 2003)

Como pode ser observado, os picos simulados podem gerar resultados diferentes quando apresentam diferentes simetrias. Este cálculo é idealizado para picos simétricos, sendo considerado correto o resultado de resolução igual a 1.

Em cromatografia sempre há a busca por picos simétricos. Desta forma, em muitos casos este cálculo é aplicável, porém, nas últimas décadas os desafios em cromatografia envolvem a quantificação de impurezas em níveis extremamente baixos. Assim, muitas vezes um cromatograma possui um pico principal referente a mais de 90% da composição da mistura, enquanto algumas impurezas podem ser controladas na ordem de  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ , como no caso de

impurezas genotóxicas. Nesses casos, muitas vezes o pico do componente principal se apresenta demasiadamente grande e assimétrico, enquanto as impurezas se apresentam em concentrações quantificáveis e como picos simétricos. Esse cenário leva a uma primeira avaliação que demonstra a irrelevância da intensidade e da forma do pico principal, já que este não é quantificado por este método, mas sim as impurezas. Porém, durante a avaliação da seletividade do método, um dos parâmetros cromatográficos avaliados é a resolução entre picos. Desta forma, uma visão mais cuidadosa demonstra que, apesar de o pico principal não ser quantificado, ele será utilizado para avaliar a resolução e sua assimetria não pode ser negligenciada.(ANVISA, 2017)(ANVISA, 2015a)(ICH, 2017) (SCHOENMAKERS *et al*, 1988)(SNYDER *et al*, 1987)

Como em cromatografia buscam-se picos estreitos e finos, essa questão muitas vezes foi deixada de lado ou subestimada. Para melhorar a simetria do pico principal, uma solução teste menos concentrada poderia resolver o problema, mas para análise de impurezas, diminuir a concentração pode significar perder a sensibilidade. Visto isso, algumas vezes não há como melhorar a simetria do pico principal. Fazendo-se necessária uma abordagem considerando a assimetria de tal pico, apesar de ele não ser o analito de interesse do método em questão.(ANVISA, 2015b)(SNYDER *et al*, 1987)

Outro ponto importante é que o cálculo de resolução comumente utilizado não apresenta resultados factíveis quando dois picos simétricos, porém com áreas muito diferentes.(SCHOENMAKERS *et al*, 1988)

Schoenkamers *et al* (1988) propõe uma alternativa, tanto para o cálculo de resolução quando os picos são simétricos e muito diferentes em termos de área, quanto para o caso em que um pico é assimétrico.(SCHOENMAKERS *et al*, 1988)

### 1.3.1 Equação de Schoekamers *et al* para resolução de picos simétricos com grande diferença de área.

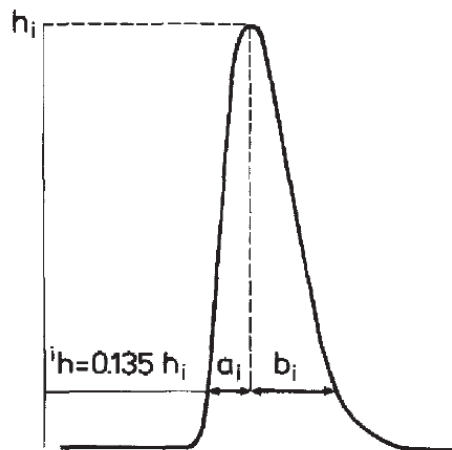
$$R_{s,ji} = \frac{(t_j - t_i)\sqrt{N}}{2t_i + t_j \sqrt{4 + 2 \ln(h_i/h_j)}} \quad \text{Equação 5}$$

Na qual,  $N$  é o número de pratos teóricos do componente  $i$ , que é igual ao número de pratos teóricos do componente  $j$ . O tempo de retenção do primeiro componente ( $i$ ) é  $t_i$  e o tempo de retenção do segundo componente ( $j$ ) é  $t_j$ .  $h_i$  e  $h_j$  são as alturas dos picos  $i$  e  $j$ , respectivamente.

### 1.3.2 Equação de Schoekamers *et al* para resolução de picos não simétricos.

$$R_s = \frac{(t_j - t_i)}{b_i + a_j} \quad \text{Equação 6}$$

Para esse cálculo o pico assimétrico é dividido em duas partes na posição do ápice do pico. A porção inicial do pico tem largura  $a$ , quando medida a 13,5% da altura do pico. A porção final do pico tem largura  $b$ , quando medida a 13,5% da altura do pico. A figura a seguir mostra melhor essa divisão.



**Figura 4** – Divisão das duas regiões de um pico assimétrico. A região frontal (a) e a região caudal (b).

Essa abordagem é bastante interessante por considerar somente o lado do pico que está próximo do outro pico, considerando a distância entre a região caudal do primeiro pico e a região frontal do segundo pico. O que pode ter dificultado a difusão deste modelo é o fato de o cálculo ser realizado a 13,5% da altura dos picos. Desta forma, este e outros modelos gerados ao longo do tempo necessitam de novos valores de referência que representem a separação dos picos. Não há constatação do motivo para as equações propostas não vigorarem, mas o fato é que não foram capazes de substituir a simplicidade já arraigada dos valores de referência largamente estabelecidos.

A fim de contornar de forma simples os problemas aqui discutidos, uma nova abordagem será apresentada.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 COMPROVAÇÃO MATEMÁTICA DOS PROBLEMAS DO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO ENVOLVENDO PICOS ASSIMÉTRICOS

O estudo inicialmente foi feito com cromatograma simulado para utilizar picos com formatos, posições e larguras bem definidas, simplificando assim a utilização das equações, a compreensão dos problemas abordados e a constatação de que os problemas podem ser contornados. Os resultados obtidos para picos simétricos e assimétricos são demonstrados e comparados. Posteriormente também foram comparados resultados utilizando cromatogramas reais.

### 2.2 DEMONSTRAÇÃO DE QUE NÃO HÁ IMPACTO NO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO PARA PICOS SIMÉTRICOS

A comprovação de que a proposta não impacta nos picos simétricos é feita comparando os resultados com as fórmulas propostas e diferentes equações quando os picos são simétricos.

### 2.3 DEMONSTRAÇÃO DO IMPACTO NO CÁLCULO DE RESOLUÇÃO PARA PICOS ASSIMÉTRICOS

A comprovação é realizada demonstrando picos notoriamente separados ou notoriamente coeluído. Com isso as incoerências dos resultados envolvendo picos assimétricos serão constatadas.

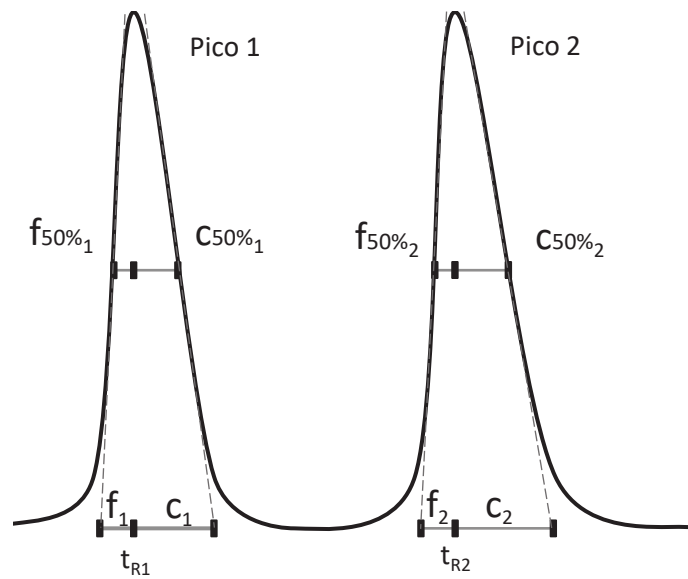
### 2.4 PROPOSTAS PARA O CÁLCULO DE RESOLUÇÃO

As propostas seguem os mesmos parâmetros dos cálculos de resolução clássicos, apresentados nas equações 3 e 4. Porém, as propostas utilizam somente os lados relevante de cada pico, que realmente pode afetar a resolução.

**Primeira proposta:** 
$$R = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(c_1 + f_2)}$$
 Equação 7

**Segunda proposta:** 
$$R = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{1,7 (c_{50\%1} + f_{50\%2})}$$
 Equação 8





**Figura 5** – Representação de dois picos adjacentes com a divisão da frente do pico e da cauda.

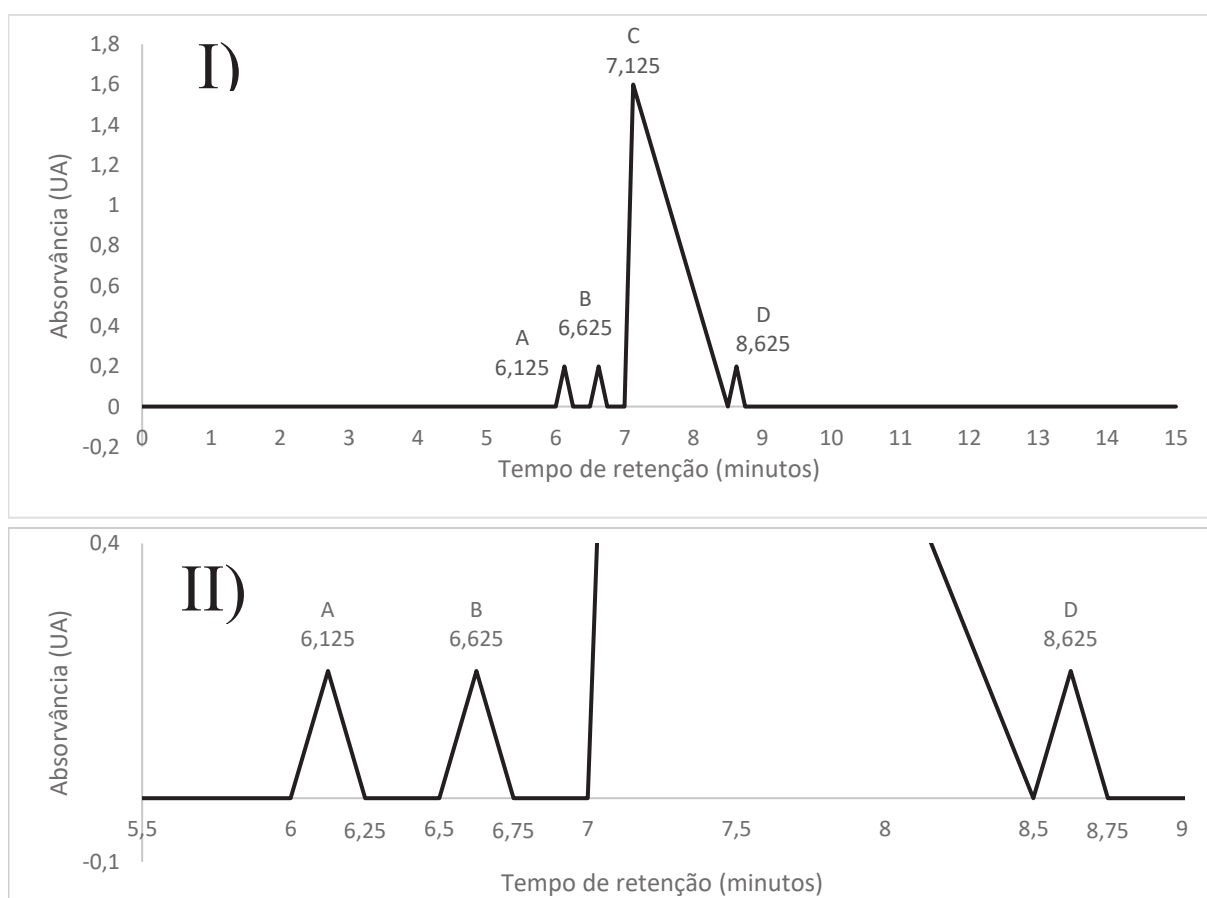
Nas equações  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  são respectivamente o tempo de retenção do pico 1 e do pico 2. As letras  $f$  e  $c$  são respectivamente a frente e a cauda do pico na base, a partir das tangentes dos pontos de inflexão, enquanto  $f_{50\%}$  e  $c_{50\%}$  são respectivamente a frente e a cauda do pico medidos a 50% da altura do pico. Os índices 1 e 2 indicam respectivamente os picos 1 e 2.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados gerados com os cromatogramas simulados e com o cromatograma real foram avaliados e comparados. As equações convencionais e as equações propostas foram utilizadas e os resultados são apresentados a seguir.

#### 3.1 CROMATOGRAMA SIMULADO ENVOLVENDO PICOS SIMÉTRICOS E ASSIMÉTRICOS

Utilizando um cromatograma simulado buscou-se simplificar os cálculos e o entendimento do que se discute.



**Figura 6** – I) Cromatograma simulado com picos simétricos e um pico majoritário assimétrico. II) Ampliação do cromatograma.

O cromatograma apresentado na Figura 6 simula uma análise de quantificação de impurezas, no qual os picos referentes às impurezas A, B e D são pequenos, bem definidos e com boa simetria (neste caso perfeitamente simétricos). Já o pico C representa o componente principal da amostra, com uma intensidade extremamente alta com fator de simetria igual a 6 e fator de assimetria de 11.

Dois picos separados até a linha de base são picos com boa separação. Desta forma, pode-se dizer que nenhum dos picos a seguir está coeluinto. A distância entre os picos A e B é a mesma que entre os picos B e C. Logo, os dois casos possuem a mesma resolução teórica. Pode-se perceber também que a resolução entre os picos D e C é menor que a resolução entre os picos C e B. Os dados cromatográficos estão presentes na Tabela 1 que segue.

**Tabela 1** – Dados cromatográficos do cromatograma apresentado na figura 6.

<b>Altura da medição</b>	<b>Dados cromatográficos</b>	<b>A (min)</b>	<b>B (min)</b>	<b>C (min)</b>	<b>D (min)</b>
-	Tempo de retenção	6,125	6,625	7,125	8,625
na base	Tempo inicial	6,000	6,500	7,000	8,500
	Tempo final	6,250	6,750	8,500	8,750
	Largura	0,250	0,250	1,500	0,250
5% da altura	Tempo inicial	6,00625	6,50625	7,00625	8,50625
	Tempo final	6,24375	6,74375	8,43125	8,74375
	Largura	0,23750	0,23750	1,42500	0,23750
10% da altura	Tempo inicial	6,0125	6,5125	7,0125	8,5125
	Tempo final	6,2375	6,7375	8,3625	8,7375
	Largura	0,2250	0,2250	1,3500	0,2250
50% da altura	Tempo inicial	6,0625	6,5625	7,0625	8,5625
	Tempo final	6,1875	6,6875	7,8125	8,6875
	Largura	0,1250	0,1250	0,7500	0,1250

A partir dos dados apresentados na tabela acima, foram calculadas as simetrias dos picos e a resolução entre os mesmos. A resolução foi calculada utilizando as fórmulas convencionais e as duas propostas. Os resultados são apresentados na Tabela 2:

**Tabela 2** – Comparação dos resultados de resolução.

<b>Parâmetro (min)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Fator de simetria (5%)	1	1	6	1
Fator de assimetria (10%)	1	1	11	1
Resolução na base (convencional)	-	2	0,571429	1,714286
Resolução a 50% (convencional)	-	2,352941	0,672269	2,016807
Resolução na base (PROPOSTA 1)	-	2	2	1
Resolução a 50% (PROPOSTA 2)	-	2,352941	2,352941	1,176471

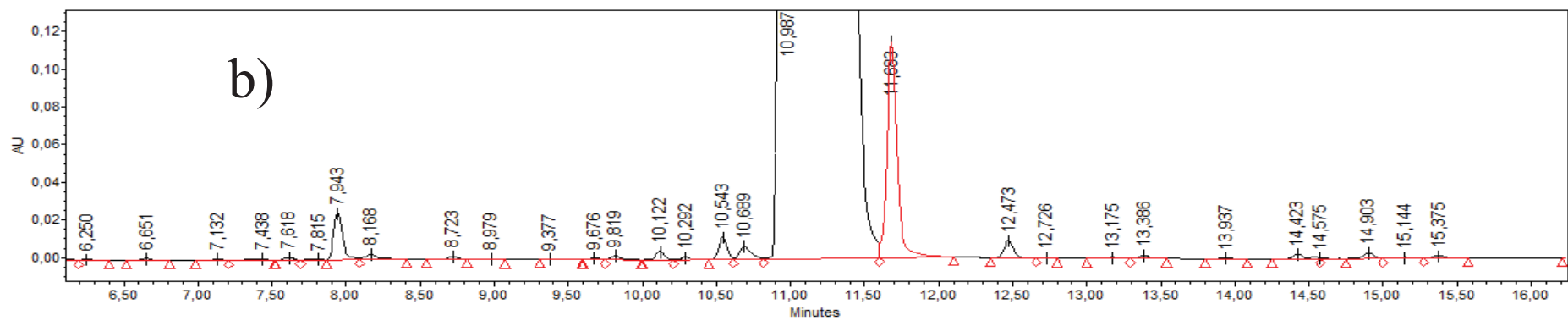
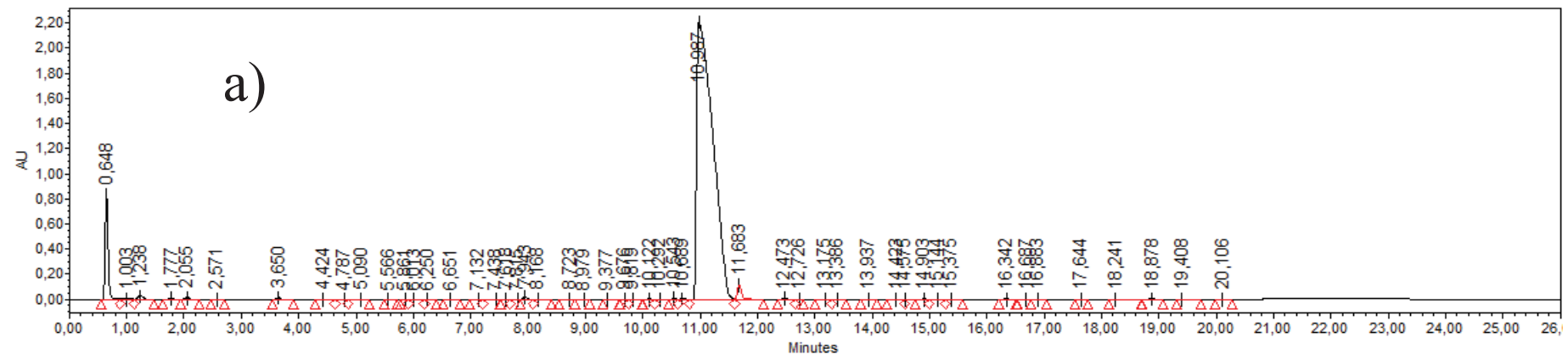
Pode ser observado que para dois picos simétricos (A e B) o resultado de resolução utilizando as fórmulas propostas são idênticos aos resultados utilizando as fórmulas convencionais, mostrando que não há prejuízos em utilizar as equações propostas no lugar das convencionais.

Quando um dos picos é assimétrico (C) e o outro é simétrico (B), essa assimetria de um dos picos já gera distorções nos resultados dos cálculos de resolução convencionais, com resultados de 0,57 e 0,67, que podem ser considerados não coerentes já que a separação entre os picos C e B é evidente e igual à separação dos picos B e A. Já os resultados obtidos pelas fórmulas propostas para os picos C e B são idênticos aos obtidos para os picos B e A, como esperado. Nesse sentido as equações propostas demonstram-se muito mais fiéis que as convencionalmente utilizadas.

Ao avaliar a separação entre um pico simétrico (D) e um pico assimétrico (C) pode-se perceber que a resolução deve ser inferior à resolução entre os picos C e B, mas os resultados dos cálculos convencionais expressam valores de resolução maior para o par de picos D e C em comparação aos picos C e B. Esses resultados mostram que quando há um pico assimétrico os resultados de resolução apresentam resultados incoerentes na diferenciação do grau de separação dos picos. Entretanto, quanto utilizam-se as fórmulas propostas os resultados se mostram muito mais coerentes com a real separação dos picos. Isso ocorre porque os resultados de resolução pelas fórmulas propostas consideram apenas os lados dos picos que são relevantes para o cálculo de resolução dos pares de picos em questão. Com base nisso, as propostas de cálculo de resolução se mostram aplicáveis para picos assimétricos.

### **3.2 CROMATOGRAMA REAL ENVOLVENDO PICOS SIMÉTRICOS E ASSIMÉTRICOS**

Utilizando um cromatograma real, buscou-se evidenciar os resultados incoerentes obtidos pelo software Empower<sup>®</sup> 3, da Waters Corporation. Aqui, o software não tem qualquer influência nos resultados incoerentes, já que os cálculos utilizados por ele são baseados na teoria vigente de cromatografia e os mesmos cálculos são utilizados por praticamente qualquer software cromatográfico. O problema é o fato de o cálculo mais utilizado e difundido para resolução em cromatografia pressupõe picos simétricos.



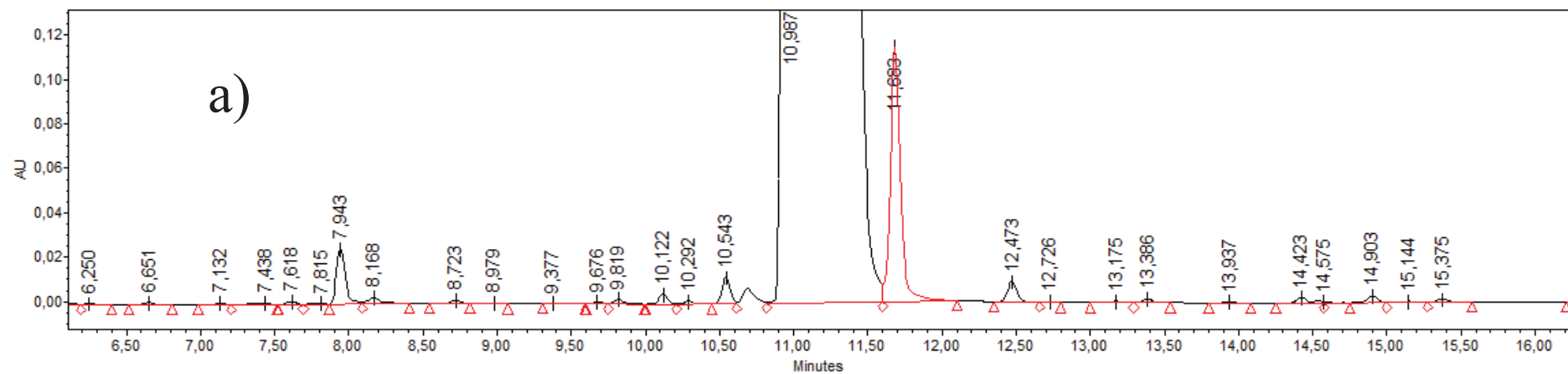
c)

E	Retention Time (min)	Symmetry Factor	Width @ 50%	Width @ Tangent (USP Resolution)	USP Resolution (HH)	USP Resolution
29	10,543		0,0614880	0,1061631	2,4604704	2,4038436
30	10,689		0,0771925	0,1550121	1,2431254	1,1187844
31	10,987	3,3864619	0,3279676	0,5603851	0,8668674	0,8321088
32	11,683		0,0687419	0,1217546	2,0716439	2,0420314

Figura 7 – a) Cromatograma real com contendo pico assimétrico. b) Ampliação do cromatograma. c) dados cromatográficos.

Na presença de um pico assimétrico, o cálculo de resolução apresenta o mesmo perfil apresentado no cromatograma simulado, com resultados incoerentes de resolução. Na Figura 7 apresentada a resolução do pico marcado em vermelho com tempo de retenção em 11,683 minutos apresenta valor superior a 2. Porém, pode ser percebido visualmente que este pico está mal resolvido em relação ao pico assimétrico em tempo de retenção igual a 10,987 minutos. O pico em 10,689 minutos possui uma separação em relação ao pico principal visivelmente superior ao pico em 11,683 minutos, mas o valor de resolução incoerentemente é inferior a 1.

A resolução entre o pico em 10,689 minutos e o pico em 10,543 minutos está sendo calculada com valor pouco superior a 1. Em seguida, o pico em 10,689 minutos foi ignorado do cromatograma para tornar mais evidente os problemas gerados e a falta de confiabilidade do cálculo de resolução quando envolve picos assimétricos. Os resultados estão na Figura 8.



b)

E	Retention Time (min)	Symmetry Factor	Width @ 50%	Width @ Tangent (USP Resolution)	USP Resolution (HH)	USP Resolution
28	10,292		0,0588083	0,1025320	1,6805243	1,6334484
29	10,543		0,0614880	0,1061631	2,4604704	2,4038436
30	10,987	3,3864619	0,3279676	0,5603851	1,3444851	1,3314670
31	11,683		0,0687419	0,1217546	2,0716439	2,0420314

Figura 8 – a) Cromatograma real ampliado com contendo pico assimétrico e exclusão do pico em 10,689 minutos. b) Parâmetros cromatográficos obtidos.

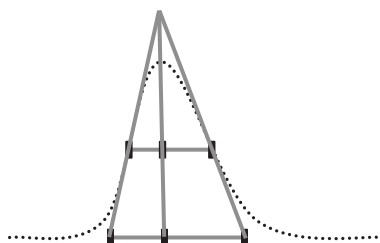


Na nova condição, com a ausência do pico em 10,689 minutos, fica mais evidente que o pico que elui à direita (11,683) do pico majoritário visualmente possui uma pior separação quando comparado ao pico que elui à esquerda (10,689). Entretanto, o cálculo de resolução continua demonstrando o oposto, com resolução superior a 2,0 para o pico em 11,683 e aproximadamente 1,2 para o pico em 10,543 minutos, reafirmando que os cálculos de resolução convencional têm enormes problemas quando existem picos assimétricos, necessitando de uma correção.

Em seguida, o cromatograma foi utilizado para aplicar as equações propostas para o cálculo de resolução. Os valores de frente e cauda do pico não são calculados pelo software quando as medidas são feitas a 50% da altura do pico ou na base pela extrapolação das retas tangentes aos pontos de inflexão. Por isso, esses valores foram determinados utilizando o tempo de retenção do pico juntamente com os tempos de início e fim do pico, medidos a 50% da altura do pico e na base pela extrapolação da reta tangente aos pontos de inflexão do pico.

Para determinação dos tempos inicial e final do pico a 50% da altura, mediu-se valor do tempo em cada lado na altura de 50% da altura total do pico.

Para determinação dos tempos inicial e final na base pela extrapolação das tangentes dos pontos de inflexão primeiramente o ponto de inflexão foi aproximado para os pontos a 50% da altura. Em posse dos valores dos tempos inicial e final à meia altura, largura do pico à meia altura, largura do pico na base por interseção das retas tangentes aos pontos de inflexão e tempo de retenção do pico, por semelhança de triângulos, os tempos inicial e final na base extrapolados pelas retas tangentes foram calculados. A Figura 9 representa a relação de triângulos utilizada no pico.



**Figura 9** – Representação de um pico sobreposto a triângulos tangentes.

Caso o software reportasse os dados, não seria necessário utilizar as aproximações matemáticas. Como as larguras dos picos foram reportadas pelo software, estes dados foram utilizados para verificar se os cálculos de frente e cauda do pico foram confiáveis. Para isso, a soma da frente e da cauda do pico (calculadas) foram confirmadas como iguais à largura do pico reportada pelo software, tanto a 50% da altura quanto na base pela interseção das retas tangentes aos pontos de inflexão considerados.

Tanto quando medido a 50% da altura do pico, quanto medido na base pela extrapolação da reta tangente, a medida da frente do pico foi considerada a diferença entre o tempo de retenção e o tempo inicial do pico, enquanto a medida da cauda do pico foi considerada a diferença entre o tempo final e o tempo de retenção do pico.

**Frente do pico ( $f_{50\%}$ ):**  $f_{50\%} = (t_R - t_{i50\%})$  Equação 9

**Cauda do pico ( $c_{50\%}$ ):**  $c_{50\%} = (t_{f50\%} - t_R)$  Equação 10

**Frente do pico ( $f_{tg\ base}$ ):**  $f_{tg\ base} = (t_R - t_{i50\%})$  Equação 11

**Cauda do pico ( $c_{tg\ base}$ ):**  $c_{tg\ base} = (t_{f_{tg\ base}} - t_R)$  Equação 12

Nas Equações 9 a 12,  $f$  e  $c$  são respectivamente a frente e a cauda do pico;  $t_R$  é o tempo de retenção do pico;  $t_i$  e  $t_f$  são respectivamente os tempos inicial e final do pico; o índice 50% indica a medição feita a 50% da altura do pico e o índice  $tg\ base$  indica a medição feita na base pela extrapolação da reta tangente ao ponto de inflexão.

A seguir, os dados do cromatograma da Figura 7, obtidos diretamente pelo software, sem exclusão de picos, são reapresentados na Figura 10 para comparação com os resultados obtidos pelas equações propostas nas Tabelas 3 e 4, a seguir.

E	Retention Time (min)	Symmetry Factor	Width @ 50%	Width @ Tangent (USP Resolution)	USP Resolution (HH)	USP Resolution
29	10,543		0,0614880	0,1061631	2,4604704	2,4038436
30	10,689		0,0771925	0,1550121	1,2431254	1,1187844
31	10,987	3,3864619	0,3279676	0,5603851	0,8668674	0,8321088
32	11,683		0,0687419	0,1217546	2,0716439	2,0420314

**Figura 10** – Dados cromatográficos obtidos no cromatograma estudado contendo um pico principal assimétrico.

**Tabela 3** – Dados cromatográficos calculados e resultado de resolução pela proposta 1 (tangente na base).

Pico	Tempo de retenção	Tempo inicial (tangente na base)	Tempo final (tangente na base)	Frente do pico (tangente na base)	Cauda do pico (tangente na base)	Resolução Proposta 1 (tangente na base)
Pico 1	10,689	10,6203	10,77532	0,068695697	0,086316403	-
Pico assimétrico	10,987	10,89729	11,45768	0,089706979	0,470678121	1,692957
pico 2	11,683	11,62499	11,74675	0,058009032	0,063745568	1,316469

**Tabela 4** – Dados cromatográficos calculados e resultado de resolução pela proposta 2 (a 50% da altura).

Pico	Tempo de retenção	Tempo inicial (a 50%)	Tempo final (a 50%)	Frente (a 50%)	Cauda (a 50%)	Resolução Proposta 2 (a 50%)
Pico 1	10,689	10,65479	10,73198	0,034208882	0,042983588	-
Pico assimétrico	10,987	10,9345	11,26247	0,052501365	0,275466235	1,83583
pico 2	11,683	11,65025	11,71899	0,032751539	0,035990351	1,32832

Tanto os resultados obtidos pela proposta 1 quanto pela proposta 2 são mais coerentes do que os resultados de resolução gerados pelas equações convencionais da figura 1. Para o pico que elui após o composto majoritário as duas propostas (1 e 2) geraram resultados de resolução praticamente idênticos, com valor de 1,3. Considerando que o par de picos está visivelmente mal resolvido, uma resolução menor que 1,5 é coerente.

Para os resultados de resolução entre o pico principal assimétrico e o pico que elui diretamente antes do mesmo, as propostas 1 e 2 apresentaram resultados ligeiramente diferentes, sendo 1,7 para a proposta 1 e 1,8 para a proposta 2. A diferença pode ser atribuída à diferença que geralmente existe quando se calcula a resolução utilizando as larguras de picos a meia altura em relação a quando se utilizam as larguras de pico na base pela interseção da reta tangente aos pontos de inflexão extrapoladas até a linha de base. Outro fator que pode ter gerado essa pequena diferença foram as aproximações matemáticas para determinação da frente e da cauda dos picos na base pela interseção das retas tangentes. De qualquer forma os resultados foram praticamente iguais e muito mais coerentes que os resultados obtidos pelo software com as fórmulas convencionais.

Os resultados de resolução gerados de forma equivocada podem levar a crer que não há resolução satisfatória em um método que, na verdade, possui uma seletividade satisfatória, sendo capaz de separar bem os compostos. Por outro lado, um método com baixa seletividade pode possuir picos coeluinto e quando o cálculo de resolução é mal utilizado pode levar à falsa constatação de que o método tem seletividade satisfatória.

Ambas as equações propostas para cálculos de resolução se mostraram mais confiáveis do que as equações convencionais, quando picos assimétricos estão presentes. Para escolha de qual das duas é mais adequada para cada situação deve-se levar em consideração o perfil cromatográfico dos picos envolvidos no cálculo.

Quando um pico interferir na medição da largura do pico a 50% da altura, deve ser preferida a equação da proposta 1, onde utilizam-se os pontos de inflexão do pico e suas retas tangentes na interseção com a linha de base. Um exemplo desta situação é quando algum pico só está resolvido acima dos 50% da altura.

Quando houver alguma interferência no pico que prejudique a determinação de algum dos pontos de inflexão, a equação da proposta 2 deve ser priorizada, utilizando medições a 50%

da altura do pico. Alguns exemplos dessa situação são quando o pico apresenta alguma deformação, por baixa eficiência cromatográfica ou por alguma coeluição.

## 4 CONCLUSÕES

As duas equações propostas apresentaram resultados de resolução maior quando os picos estão mais bem resolvidos enquanto as equações convencionais geraram resultados incoerentes de resolução, com valores mais altos para picos menos resolvidos.

Para picos simétricos os resultados gerados com as propostas são iguais aos resultados gerados pelas equações convencionais, enquanto para picos assimétricos as propostas descritas neste trabalho são capazes de levar a resultados mais coerentes que os cálculos convencionais. Uma vez que os resultados gerados pelas equações propostas são muito mais condizentes com o grau de separação de dois picos. Deste modo os resultados numéricos de resolução continuam com mesma parametrização, tornando automática validade dos mesmos valores de referência já difundidos para a avaliação do grau de separação entre os picos.

Há indícios suficientes para se afirmar que o cálculo de resolução pode ser atualizado para tornar-se aplicável a picos assimétricos sem impactar em alterações no resultado para picos simétricos com as propostas descritas neste trabalho.

Como atualmente não são raros os casos em que o pico principal fica assimétrico para que sejam quantificadas as impurezas, seria prudente não negligenciar a possibilidade de um método cromatográfico possuir picos assimétricos sem prejuízo das quantificações.

## 5 REFERÊNCIAS

ANVISA. **Resolução de diretoria colegiada - RDC Nº 53**, 2015a. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0306\\_07\\_12\\_2004.pdf/95eac678-d441-4033-a5ab-f0276d56aaa6](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0306_07_12_2004.pdf/95eac678-d441-4033-a5ab-f0276d56aaa6)>

ANVISA. **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos - Guia Nº 04**, 2015b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degradação+e+m+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902>>

ANVISA. **Resolução de diretoria colegiada - RDC Nº 166**, 2017. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf)>

CAROL H. COLLINS; GILBERTO L. BRAGA; PIERINA S. BONATO. **Fundamentos de Cromatografia**. 2<sup>a</sup> ed. 2006.

CHROMACADEMY. **The Theory of HPLC: Chromatographic Parameters**. Crawford Scientific, p. 23, 2014.

DOLAN, J. **Peak Tailing and Resolution**. LCGC Europe, p. 4, 2002.

DOLAN, J. W. **LC troubleshooting - System Suitability**. LCGC North America, v. 22, p. 2-4, 2004.

ETTRE, L. S. M . S . **Tswett and the Invention of Chromatography**. LCGC North America, v. 21, n. 2003, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry**. Pharmaceutical Quality. **Anais** 2015. Disponível em: <<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>>

INTERNATIONAL CONCIL FOR HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **IMPURITIES IN NEW DRUG SUBSTANCES - Q3A(R2)**. 2006a

INTERNATIONAL CONCIL FOR HARMONIZATION OF TECHINICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS - Q3B(R2)**. 2006b

INTERNATIONAL CONCIL FOR HARMONIZATION OF TECHINICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **ASSESSMENT AND CONTROL OF DNA REACTIVE (MUTAGENIC) IMPURITIES IN PHARMACEUTICALS TO LIMIT POTENTIAL CARCINOGENIC RISK - M7(R1)**. 2017

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of Chemical Terminology - Gold Book**. 2014.

KUMAR, T.; XAVIER, N.; RAMYA, M. A **High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Genotoxic Impurity Hydroxylamine in Drug Substances**. Journal of Chromatographic Science, v. 57, n. 1, p. 63–70, 2019.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna - HPLC/CLAE**. 2<sup>a</sup> ed. 2016, 2018.

LLOYD R. SNYDER; JOSEPH J. KIRKLAND; JOSEPH L. GLAJCH. **Practical HPLC method development**. 1988.

SCHOENMAKERS, P. J.; STRASTERS, J. K.; BARTHA, Á. **Correction of the resolution function for non-ideal peaks**. Journal of Chromatography A, v. 458, n. C, p. 355–370, 1988.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; QUARRY, M. A. **High-performance liquid chromatographic method-development using computer simulation**. Trends in Analytical Chemistry, v. 6, n. 5, p. 106–111, 1987.

SOMAN, A.; QIU, Y.; CHAN, L. Q. **HPLC-UV method development and validation for the determination of low level formaldehyde in a drug substance**. Journal of Chromatographic Science, v. 46, n. 6, p. 461–465, 2008.

SONG, D.; WANG, J. **Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 32, n. 6, p. 1105–1112, 2003.



THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 41-NF 36. **General Chapter, <621>  
Chromatography**. 2018

TSWETT, M. S. **Naturatistes Varisovic**. *Trav. Sol.*, v. 14, 1903.