	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

OBJETIVO

Padronizar a identificação, utilização, limpeza, verificação de performance e descarte de Colunas Cromatográficas.

PROCEDIMENTO

1.0 Responsabilidades

1.1 Colaboradores do setor de Controle de Qualidade:

1.1.1 Seguir de acordo com o procedimento a fim de evitar acidentes;

1.1.2 Realizar a identificação, limpeza, verificação de performance e descarte das colunas corretamente.

1.2 Supervisores:

1.2.1 Orientar e verificar se a utilização está sendo realizada de acordo com o procedimento.

2.0 Identificação de Colunas Cromatográficas

2.1 Antes de utilizar uma coluna, realizar a identificação da mesma, seguindo os passos abaixo:

2.1.1 Identificação do setor: Exemplo: Controle de Qualidade – CQ;

2.1.2 Identificação do tipo da coluna:

2.1.2.1 Para colunas de cromatografia a Líquido: Utilizar sigla do tipo da fase estacionária. Exemplos: C18; C8; PH; CN; SI, SCX;

2.1.2.2 Para colunas de cromatografia a Gás: Devido a diversas denominações entre os fabricantes deve-se utilizar a classificação de colunas USP. Exemplos: G2; G27; G43;


2.1.3 Separar os itens por traço “ – ”;

2.1.4 Identificação numérica deve ser sequencial, em ordem crescente do tipo de coluna:

Exemplos: CQ-C18-001; CQ-C18-002; CQ-C18-003;

2.1.5 Identificar também em planilha eletrônica.

2.1.5.1 A identificação da coluna é feita através de etiqueta que consta a data de ativação, a análise para a qual foi dedicada, o número e a versão da metodologia, e ou produto ou alguma observação, conforme o modelo da Figura 1:

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

CQ - AM - 0011	07/09/2017
DOS - MMP00056 V. 19	
CLORIDRATO DE METFORMINA	

Figura 1: Modelo da Etiqueta da Coluna

2.2 A coluna pode ser dedicada por produto.

2.3 Caso não haja dedicação da coluna, a mesma é identificada como Multipropósito.

2.4 O uso da identificação como “Multipropósito” deve ser exclusivo, utilizado apenas em casos especiais ou para rededicação de colunas.

3.0 Cuidados com Colunas e Pré-Colunas de Cromatografia Líquida

3.1 Separar a coluna, o aparato e a pré-coluna correspondente a coluna a ser utilizada.

3.2 Verificar na coluna qual o sentido correto para colocá-la no equipamento (as colunas quando não tem setas indicativas, são colocadas no sentido em que está descrito em sua etiqueta de identificação).

3.3 Na entrada da coluna é conectado o aparato com a pré-coluna correspondente.

3.4 Após o uso da pré-coluna, caso esta não seja utilizada posteriormente, pode ser guardada em frascos identificados com o tipo de pré-coluna, imersos em solução 50% Água Purificada 50% Acetonitrila ou 50 % Água Purificada 50 % Metanol.

3.5 Pré-coluna suja ou contaminada deve ter sua FE trocada ou ser descartada e substituída por uma nova do mesmo tipo.

3.6 A coluna deve ser manuseada de acordo com as recomendações do fabricante, colisões devem ser evitadas e observar atentamente para as faixas de pH de trabalho de cada coluna.

3.7 Após o uso, a coluna deve ser limpa e mantida com solvente adequado de armazenamento.


3.8 Evitar queda da coluna, pois pode danificar seu empacotamento interno.

3.9 A temperatura durante o processo de limpeza contribui para uma limpeza mais efetiva. Verificar a especificação de cada coluna.

3.10 Em colunas Ciano (CN), observar se a coluna está preenchida com empacotamento em Fase Normal (polar) ou Fase Reversa (apolar).

3.11 Em sistemas de Fase Normal, não é permitido passar Água Purificada pelo sistema ou pela coluna, fluir Isopropanol por todos os canais em fluxo alto por três minutos antes de conectar a coluna no sistema.

3.12 Cálculo do Volume Interno da Coluna: $V_{\text{Coluna}} = \pi \cdot r^2 \cdot L$; onde $\pi = 3,14$; r = raio da coluna em cm e L = comprimento da coluna em cm).

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

4.0 Ativação de Colunas Novas de Cromatografia Líquida

4.1 A coluna deverá ser ativada pela primeira vez com a fase móvel adequada e se possível com pré-coluna equivalente e gradiente de fluxo conforme as Tabelas 1 ou 2.

Fluxo	Tempo
0,1 mL/min	0 até 3 minutos
0,1 mL/min até 1,0 mL/min	de 3 minutos até 30 minutos
1,0 mL/min	de 30 minutos até 60 minutos

Tabela 1: Tabela de fluxo e gradiente para colunas de HPLC

Fluxo	Tempo
0,1 mL/min	0 até 3 minutos
0,1 mL/min até 0,4 mL/min	de 3 minutos até 15 minutos
0,4 mL/min	de 15 minutos até 30 minutos

Tabela 2: Tabela de fluxo e gradiente para colunas de UPLC

4.2 Tabela indicativa da fase móvel de ativação de cada tipo de coluna:

Tipo de Coluna	Fase Móvel de Ativação
Fase Reversa	95% Acetonitrila - 5% Água Purificada
Troca Iônica	95% Metanol – 5% Água Purificada
Fase Normal	100% Isopropanol ou Hexano
Outros	Verificar informações do Fabricante

Tabela 3: Fase móvel de acordo com o tipo da coluna


5.0 Limpeza e Armazenamento de Coluna de Cromatografia Líquida

5.1 Após o término da análise, limpar a coluna com solvente adequado conforme indicado na tabela abaixo.

5.2 Guardar sempre a coluna com as extremidades fechadas e com o seu respectivo solvente de armazenamento.

5.3 Não há restrições em fluir mais volume que o necessário.

5.4 Tabela indicativa da fase móvel de limpeza de cada tipo de coluna.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

Tipo de Coluna	Propósito	Solvente	Vol da Coluna
Fase Reversa	Para remoção de sal	5% Acetonitrila ou Metanol: 95% Água Purificada	10
	Solvente de armazenamento	90% Acetonitrila ou Metanol + 10% Água Purificada	
Fase Normal	Para Limpeza	100% Clorofórmio	10
	Solvente de Armazenamento	100% Isopropanol ou Hexano	
Troca Iônica	Para limpeza	100 % Água Purificada	10
	Solvente de armazenamento	100 % Metanol	

Tabela 4: Solvente de limpeza e armazenamento

6.0 Reativação de Coluna de Cromatografia Líquida

6.1 Em análises de rotina, a coluna deve ser reativada caso não esteja em uso. A reativação da coluna deve ser feita conforme o tipo de sílica e solventes conforme a Tabela 5.

Tipo de Coluna	Solvente	Vol. da coluna
Fase Reversa	95% Acetonitrila ou Metanol + 5% Água Purificada	10
Fase Normal	100% Isopropanol ou Hexano	10
Troca Iônica	95% Metanol: 5% Água Purificada	10
Outros	Verificar informações do Fabricante	

Tabela 5: Fase móvel de reativação


7.0 Análise de Performance de Coluna de Cromatografia Líquida

7.1 O teste de performance pode ser realizado para averiguar a eficiência da coluna.

7.2 A verificação da performance poderá ser realizada quando a coluna for ativada pela primeira vez, ou quando a análise apresentar cromatogramas com parâmetros não satisfatórios.

7.3 Técnica – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por absorção molecular na região do ultravioleta (HPLC/UV).

7.3.1 Nota: Para colunas de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), verificar informações do fabricante.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

7.4 Fase Móvel:

Tipo de Coluna	Fase Móvel
Fase Reversa	60% a 30% ACN 40% a 70% H ₂ O
Troca Iônica	(NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,15M pH = 6,0
Fase Normal	5% Isopropanol 95% Hexano
Outros	Verificar informações do Fabricante

Tabela 6: Fase móvel

7.5 Solução de Performance:

Tipo de Coluna	Solução de Performance
Fase Reversa	Metilparabeno 30 µg/mL Propilparabeno 30 µg/mL Butilparabeno 30 µg/mL
Troca Iônica	Uracila 30 µg/mL Citosina 50 µg/mL
Fase Normal	Tolueno 25 µL/mL Benzofenona 25 µg/mL
Outros	Verificar informações do Fabricante

Tabela 7: Soluções de performance

7.6 Sistema Cromatográfico:

7.6.1 Fluxo: 1,0 mL/minuto;

7.6.2 Detector: UV 254 nm;

7.6.3 Volume injetado: 10 µL;

7.6.4 Forno: Desligado;

7.6.5 Tempo de corrida: 15 minutos;


7.7 Soluções Analíticas:

7.7.1 Solução Performance Fase Reversa:

7.7.1.1 Pesar 30 mg de Metilparabeno, 30 mg de Propilparabeno e 30 mg de Butilparabeno;

7.7.1.2 Transferir para um balão volumétrico de 100 mL;

7.7.1.3 Adicionar cerca de 50 mL de Acetonitrila e levar a ultrassom até completa solubilização;

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

7.7.1.4 Resfriar em temperatura ambiente;

7.7.1.5 Completar o volume com Água Purificada e Transferir 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL;

7.7.1.6 Completar o volume com Água Purificada. Homogeneizar e filtrar em filtro com membrana de PVDF 0,45 µm. [Metilparabeno] = 30 µg/mL; [Propilparabeno] = 30 µg/mL; [Butilparabeno] = 30 µg/mL.

7.7.2 Solução Performance Toca Iônica:

7.7.2.1 Pesar 30 mg de Uracila e 50mg de Citosina e transferir para um balão volumétrico de 100 mL;

7.7.2.2 Adicionar cerca de 50 mL de Água Purificada e levar a ultrassom até completa solubilização;

7.7.2.3 Resfriar em temperatura ambiente, completar volume com Água Purificada; Transferir 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL;

7.7.2.4 Completar volume com Água Purificada, Homogeneizar e filtrar em filtro com membrana de PVDF 0,45 µm. [Uracila] = 30 µg/mL; [Citosina] = 50 µg/mL.

7.7.3 Solução Performance Fase Normal:

7.7.3.1 Pesar 25 mg de Benzofenona e transferir para um balão volumétrico de 100 mL;

7.7.3.2 Adicionar cerca de 50 mL de Hexano e levar a ultrassom até completa solubilização;

7.7.3.3 Resfriar em temperatura ambiente e adicionar 25 mL de Tolueno;

7.7.3.4 Completar volume com Hexano e Transferir 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL;

7.7.3.5 Completar volume com Hexano, homogeneizar e filtrar em filtro com membrana de PTFE 0,45 µm. [Benzofenona] = 25 µg/mL; [Tolueno] = 25µL/mL.

7.8 Procedimento:

7.8.1 Após estabilização do sistema cromatográfico conforme o manual MBPC.01.01, injetar a solução Performance no cromatógrafo.


7.8.2 Verificar os picos através do cromatograma aceitando-se os valores de parâmetros cromatográficos conforme a Tabela 8.

Fator de Simetria	0,8 a 2,0 para todos os picos
Pratos Teóricos	> 2000 para o último pico
Resolução	> 1,5 entre todos os picos

Tabela 8: Parâmetros cromatográficos

7.8.3 Se necessário, admite-se ajustes na concentração da fase móvel.

7.8.4 Após a performance da coluna, caso haja uso de tampão com sólidos dissolvidos em fase móvel para colunas que operam em fase reversa, ou troca iônica, fluir 10 vezes o volume da coluna com solução de limpeza (composta por 95% de Água Purificada e 5% metanol). Este procedimento evitará possíveis precipitações.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

8.0 Cuidados com Colunas de Cromatografia Gasosa

8.1 Encaixando a Coluna:

8.1.1 Colocar a coluna no suporte da coluna do forno do GC. Certificar de que a tubulação da coluna não toque nas laterais do forno.

8.1.2 Desenrolar a coluna o suficiente para obter uma seção de tubulação suavemente curva conectada à entrada. Evite curvas apertadas, pois isso estressa a tubulação e pode causar quebra. Certifique-se de que as marcas de coluna, arestas agudas ou outros itens não se esfreguem na coluna. A distância ideal de inserção da coluna na entrada depende do tipo de entrada.

8.1.3 Colocar a porca e o ferrolho da coluna em uma extremidade da coluna. Não há frente ou verso da coluna; no entanto, os postes da gaiola geralmente apontam para a porta do forno.

8.1.4 Cortar a extremidade da coluna após a colocação da porca e do ferrolho. Segurar a seção da coluna a ser cortada contra um dedo. Em um movimento, riscar a parte externa da coluna usando uma ferramenta de corte adequada. Não cortar completamente a tubulação. Segurar a coluna em cada lado da marca de escrita e inclinar para longe da marca. Inspeccionar a extremidade da coluna com uma lupa. Certificar de que o corte esteja em ângulo reto com a parede da tubulação e livre de lascas, rebarbas ou áreas irregulares. Recortar, se necessário.

8.1.5 Com a coluna na posição correta, apertar com os dedos a porca da coluna. Usar uma chave para apertar mais ½ volta. Se a coluna puder ser movida na conexão, apertar mais ¼ de volta. Uma com vazamentos causará danos rápidos e permanentes na coluna. Não mova a coluna enquanto aperta a porca.

8.1.6 Ferrolhos, especialmente aqueles feitos de grafite, mudam de forma ligeiramente após o aquecimento. Se a coluna foi instalada enquanto a entrada e o detector estavam frios, reapertar as conexões. Também é uma boa prática certificar-se de que as porcas da coluna estejam apertadas após o condicionamento da coluna.

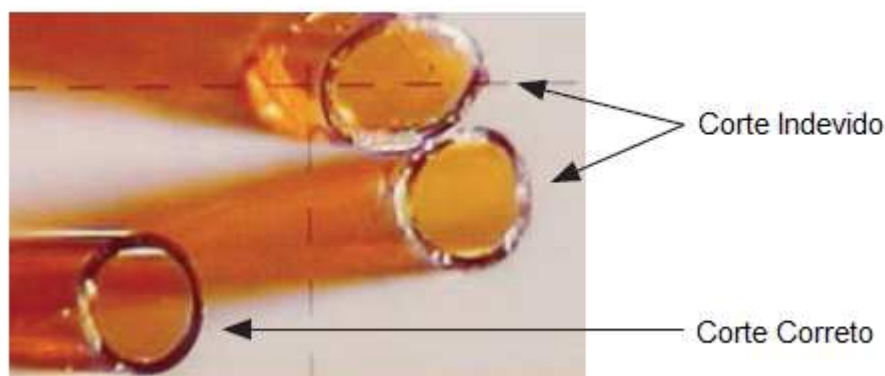



Figura 2: Corte adequado de coluna

8.2 Condicionamento de Coluna:

8.2.1 O aquecimento de uma coluna sem fluxo de gás de arraste ou enquanto o oxigênio estiver

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

presente na corrente de gás de arraste danifica a coluna rapidamente e permanentemente.

8.2.2 Purgar a coluna com gás arraste por +/- 15 minutos. Aquecer a coluna até o limite de temperatura superior. Não exceda o limite superior da coluna ou o dano será permanente.

8.2.3 Depois que a coluna atingir a temperatura de condicionamento, observar a linha de base. Ela subirá por 5 a 30 minutos, depois cairá por mais 30 a 90 minutos.

8.2.4 Uma linha de base plana deve ser obtida entre 1 a 3 horas após atingir a temperatura de condicionamento. Se a linha de base não estabilizar após 2 a 3 horas ou não permanecer constante, interromper o processo de condicionamento. Uma linha de base instável pode ser causada por um vazamento na linha de gás de arraste ou na área de entrada ou por contaminação do sistema. Corrigir o problema antes de continuar.

8.2.5 Fases estacionárias polares e filmes espessos geralmente requerem tempos mais longos para se estabilizar do que as fases não polares e filmes mais finos. Outras colunas podem exigir procedimentos de condicionamento especiais. Consulte manual de informações da coluna para o procedimento apropriado.

8.3 Armazenamento da Coluna:

8.3.1 Sele as extremidades da coluna com o septo GC e retorne a caixa original.

8.3.2 Após a reinstalação, corte as extremidades da coluna para garantir que não haja peças pequenas de septo que foram deixados na coluna.

9.0 Rededicação de Colunas

9.1 Caso haja necessidade de rededicar uma coluna para ser utilizada em outro produto, a mesma deve ser rededicada para multipropósito. Para isso, deve ser mantido apenas o código de identificação da coluna para sua rastreabilidade.

10.0 Descarte de Colunas

10.1 Caso a coluna não apresentar parâmetros satisfatórios, descartá-la conforme o procedimento MA.01.02.

11.0 Referências Bibliográficas


11.1 Instruções Básicas para Efetuar Análises. *Class-VP*, Shimadzu. Água Branca – SP, 2004.

Certificate of analysis – LiChroCART 125-4 HPLC-Cartridge. Merck, Darmstadt - Alemanha, 2003.

11.2 Manual de Instruções do HPLC Shimadzu.

11.3 *Bulletin* 826B, HPLC *Troubleshooting Guide*- Sigma-Aldrich Co. 1997.
http://www.labplus.co.kr/catalog/detailed_pages/4497.pdf.

11.4 *Successful HPLC; Troubleshooting Guide – Version 1.1*. Thermo Electron Corporation.
<http://www.kobis.si/material/HPLCTroubleshooting.pdf>.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

11.5 Regenerating or Cleaning Your HPLC Columns.

<http://4chrom.com/index.asp?PageAction=Custom&ID=26>.

10.6 Bulletin 781E; How to Protect Your HPLC Column and Prolong Its Life. SUPELCO.

11.7 HPLC Column Care. <http://www.nestgrp.com/pdf/colcare.pdf> and

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Datasheet/11626.Par.0001.File.tmp/11626.pdf>.

11.8 The Cleaning and Regeneration of Reversed-Phase HPLC Columns. Ronald E. Majors, Agilent Technologies, Wilmington Delaware, USA.

<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/262003/61538/article.pdf>.

11.9 Top 10 HPLC Column Myths; LCGC Europe, By: Ronald E. Majors. Jan/2007.

<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/Column+Watch/Top-10-HPLC-Column-Myths>.

11.10 HPLC Column Companion. <http://www.mac-mod.com>.

11.11 www.phenomenex.com (kelvinl@phenomenex.com).

11.12 Agilent J&W Capillary GC Column Installation Guide.

https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf


12.0 Documentos Relacionados

12.1 MA.01.02 (Descarte de Resíduos).

12.2 MBPC.01.01 (Manual de Boas Práticas em Cromatografia a Líquido).

ÁREAS ENVOLVIDAS

Conforme relatório emitido do Sistema Microsiga *Protheus*.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

Elaboração/Revisão:

Leandro Santolin	<i>Leandro Santolin</i>	20/06/18
Controle de Qualidade	Assinatura	Data

Rafael Saldanha Lopes	<i>Rafael Saldanha Lopes</i>	20/06/18
Controle de Qualidade	Assinatura	Data

Catia Dal Magro Moschetta	<i>Catia Moschetta</i>	20/06/18
Controle de Qualidade	Assinatura	Data

Revisão:

Grasiele Oliveira	<i>Grasiele Oliveira</i>	26.06.2018
Compliance Documental	Assinatura	Data

Aprovação:

Glauce Tatiane Mattes	<i>Glauce T. Mattes</i>	26.06.18
Supervisão Controle de Qualidade	Assinatura	Data

Angela Maria Capelin	<i>Angela M. Capelin</i>	26/06/18
Supervisão Controle de Qualidade	Assinatura	Data


Priscila Ibanez Simplicio	<i>Priscila I. Simplicio</i>	27/06/18
Supervisão Compliance Documental	Assinatura	Data

Treinamento em:

<i>Claudia Brito</i>	<i>Claudia Brito</i>	Início	Término
Compliance Documental	Assinatura	27/06/18	29.08.18


Vigência em:

<i>Grasiele Oliveira</i>	<i>Grasiele Oliveira</i>	29.08.2018
Compliance Documental	Assinatura	Data

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

Vencimento em:

<i>Graciele Oliveira</i>	<i>Graciele Oliveira</i>	<i>29.08.2021</i>
Compliance Documental	Assinatura	Data

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	CQ.02.02
	Colunas Cromatográficas	Versão: 05
		Emissão: 20/06/18

HISTÓRICO

(São mantidas apenas as 3 últimas versões)

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO
03	18/12/14	<ul style="list-style-type: none"> Adequação das informações nos itens: Identificação de uma Coluna Nova e Cuidados com Colunas e Pré-Colunas: Inclusão do item: Ativação de Colunas Novas
04	14/12/16	<ul style="list-style-type: none"> Revisão do procedimento em virtude do vencimento do mesmo. Adequações no item "Responsabilidade". Substituição da palavra "Líder de Equipe" por "Supervisores". Adequações no item "Identificação de uma Coluna Nova" Alteração na informação referente ao gradiente de fluxo de 1,0 mL/min de 30 minutos até 120 minutos para 30 minutos até 60 minutos, no item "Ativação de Colunas Novas". Alterações no item "Ativação de Colunas Novas". Exclusão do item "Análise de Performance". Alterações nos itens "Descarte da Coluna" e "Limpeza e Cuidados". Inclusão das áreas de distribuição "Controle de Qualidade: Físico-químico" e "Controle de Qualidade: Matéria-prima".
05	20/06/18	<ul style="list-style-type: none"> Exclusão das áreas envolvidas do corpo do procedimento. Adequação do nome e objetivo do procedimento. Inclusão de responsabilidade para colaboradores do Controle de Qualidade de identificação, verificação de performance e descarte das colunas. Inclusão dos itens "Cuidados com Colunas e Pré-Colunas de Cromatografia Líquida", "Cuidados com Colunas de Cromatografia Gasosa" e "Rededicação de Colunas". Adequação de responsabilidade para os colaboradores do Controle de Qualidade.

DOCUMENTO	REV	TITULO	COPIAS	DEPARTAMENTOS	COPIAS/DEPTO
CQ.02.02	005	COLUNAS CROMATOGRAFICAS	0003	00000000000110 - CQ - MATERIA-PRIMA 00000000000194 - CQ - INSTRUMENTAL 00000000000195 - CQ - FISICO QUIMICO	0001 0001 0001