

# Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida

## Parte 1



Álvaro José dos Santos Neto  
Editor

### Álvaro José dos Santos Neto

Universidade Federal de Alfenas  
Departamento de Ciências Exatas  
37130-000 – Alfenas (MG)  
Brasil  
alvaro.santosneto@unifal-mg.edu.br

### Resumo

Na última edição dessa coluna, foi feita uma introdução à técnica de *Troubleshooting* e, em seguida, aspectos relacionados à instrumentação em cromatografia, pertinentes à resolução de problemas, foram apresentados. Nesta presente edição, será iniciada a discussão sobre os problemas que resultam em picos distorcidos em cromatografia líquida. Distorções tais como caudas, frentes, alargamentos e picos duplos ou com ombros podem ocorrer por diversos motivos e um detalhamento desse assunto serve de subsídio ao usuário da técnica, na busca pela solução desse tipo de problema. Diferentemente do discutido no artigo anterior, em que se abordaram alguns cuidados na prevenção de problemas físicos com a mecânica do equipamento, nesse artigo (e em suas continuações) serão focados assuntos que se relacionam também com aspectos químicos da separação. As ocorrências mais comuns relacionadas ao aparecimento de picos distorcidos serão brevemente estudadas e exemplificadas para uma melhor compreensão, bem como estratégias para superação desses problemas serão apresentadas.

#### Palavras-chave

assimetria; picos com cauda; picos com frente; picos distorcidos; CLAE; cromatografia líquida

### Abstract

The latest edition of this column introduced the concepts of the *Troubleshooting* technique and discussed instrumental aspects related with problem solving in chromatography. In this current edition peak shape problems occurring in liquid chromatography will start to be addressed. Peak distortions like tailing, fronting, widening, and double peaks or peaks with shoulders may occur due to several reasons and this matter needs to be detailed to provide chromatographic users with background to solve these problems. Differently of the discussion in the latest article, in which the focus concerned with the care in preventing physical problems with instrument mechanics, in this article (and in its sequences) subjects related with chemical aspects of the separation will also be treated. The most common contributions to peak distortion will be briefly studied and exemplified for a better understanding, and strategies to overcome these problems will be presented as well.

#### Keywords

asymmetry; peak tailing; peak fronting; peak distortions; HPLC; liquid chromatography

No último artigo dessa coluna, tratou-se de uma introdução aos procedimentos relacionados à identificação e resolução de problemas em cromatografia (*Troubleshooting* em cromatografia). Adicionalmente, foram expostos aspectos básicos de instrumentação para a compreensão do funcionamento do sistema de cromatografia líquida e o entendimento dos problemas mais comuns apresentados por ele. Esse último assunto aplicava-se em sobremaneira ao entendimento de problemas físicos, relacionados principalmente com a mecânica do sistema de cromatografia líquida.

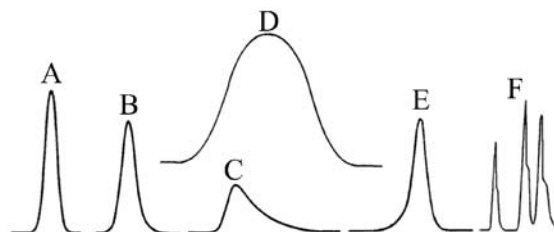
Neste número atual, serão iniciadas discussões que, adicionalmente, abordarão aspectos químicos envolvidos na separação cromatográfica em HPLC. Os problemas que dependem de uma interpretação química do sistema são, a princípio, um pouco mais difíceis de resolver, pois demandam um maior conhecimento teórico sobre o assunto. Todavia, boa parte do público que trabalha com cromatografia possui formação básica com fundamentos de química, o que torna mais facilitada essa compreensão.

Quando se trata de problemas relacionados com a forma dos picos cromatográficos, a principal implicação que se tem em mente é a separação cromatográfica. Ou seja, o prejuízo à resolução cromatográfica que poderá ocorrer em função da deterioração do aspecto gaussiano que idealmente uma banda cromatográfica deveria aparentar. Em tempo, banda cromatográfica pode ser considerada a distribuição espacial contínua que é formada pelos espécimes que constituem o pico cromatográfico, em outras palavras, é o envelope que contém os analitos e que se deslocam através do sistema cromatográfico em direção ao detector. Idealmente, essa banda tem distribuição tal que garante o formato de um pico agudo e simétrico. Dessa forma, ao se abordar esse assunto, o foco recai sobre o aspecto visual apresentado pelo **cromatograma**.

Os problemas mais comuns que recaem sobre a aparência do cromatograma são:

- a- bandas assimétricas ou com outras anomalias;
- b- bandas anormalmente alargadas;
- c- picos adicionais àqueles normalmente esperados para a amostra;
- d- picos negativos;
- e- variação no tempo de retenção de um composto, de uma amostra para outra, sem relação com problemas mecânicos do cromatógrafo;
- f- reações químicas durante a separação resultando em anormalidades.

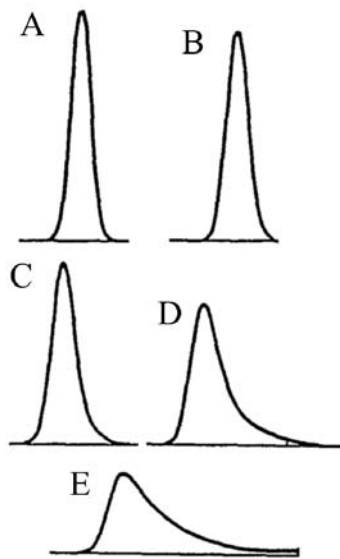
A Figura 1 apresenta algumas das distorções que podem ocorrer em picos cromatográficos. Cada tipo de distorção pode apresentar diversas causas, porém, o mais importante é uma análise detalhada do problema para encontrar, de uma maneira mais rápida, uma resolução.



**Figura 1.** Diferentes formas de picos cromatográficos. (A) Pico gaussiano ideal, (B) Pico com cauda, (C) Pico com cauda severa, (D) Pico alargado, (E) Pico com frente, e (F) Conjunto de picos com ombro. Adaptado da referência 1.

Primeiramente, tem-se um questionamento: **Por que os picos distorcidos são um problema?** Dentre as principais razões, podem-se destacar a dificuldade na quantificação, a perda da resolução cromatográfica e, algumas vezes, a dificuldade no entendimento dos múltiplos mecanismos que podem estar contribuindo para a separação. Picos distorcidos podem causar dificuldade para o perfeito reconhecimento pelo software que faz a aquisição dos dados, aumentando a imprecisão do método; além disso, as alterações na integração dos picos, ao longo de diferentes concentrações, podem impactar sobre a exatidão das determinações. Picos alargados implicam diretamente sobre a resolução cromatográfica, uma vez que a capacidade de picos da separação torna-se comprometida. Adicionalmente, um pico intenso e com grande cauda pode encobrir por completo um pico mais retido e de menor intensidade, adjacente a ele. Muitas vezes, os fenômenos que causam caudas nos picos cromatográficos estão relacionados à existência de mais do que um mecanismo de separação concomitante. Essa situação torna mais difícil a otimização da separação, e aumenta a variabilidade de perfis de separação cromatografados por diferentes colunas de uma mesma classe ou tipo (por exemplo, colunas de octadecilsilica – ODS de diferentes fabricantes). O cálculo do fator de assimetria dos picos é interessante para o diagnóstico de picos com cauda ou frente, enquanto outros problemas com o perfil cromatográfico são mais facilmente visualizáveis. Uma coluna nova, de boa qualidade, montada em um sistema adequado, garante, para compostos com bom comportamento cromatográfico,

picos estreitos e perfeitamente simétricos. Na rotina, a observação de picos perfeitos é mais difícil e muitos métodos cromatográficos apresentam picos ligeiramente distorcidos, sem, contudo, impedir a sua aplicabilidade. Em testes com padrões e sob condições controladas, o fator de assimetria para colunas novas costuma ficar entre 0,9 e 1,1; aceitando-se, geralmente, um fator de até 1,2. Em situações de trabalho, costumam-se ter outros comprometimentos com a metodologia e o tipo de analito, assim, picos com fator de assimetria de até 1,5 geralmente são aceitos. Valores superiores a esse trazem consigo outros comprometimentos e devem, na maior parte dos casos, ser corrigidos ou evitados. A Figura 2 apresenta uma comparação entre diferentes fatores de assimetria para um pico cromatográfico.



**Figura 2.** Caudas apresentadas por picos com diferentes fatores de assimetria. Picos com fatores de assimetria iguais a (A) 1,00; (B) 1,05; (C) 1,20; (D) 2,00; (E) 4,00. Adaptado da referência 1.

O caminho mais direto para a resolução do problema apresentado pelo cromatograma é o isolamento da causa, seguido de sua eliminação. Como destacado no último artigo, aqui vale a regra de se fazer um teste por vez. Várias mudanças aleatórias no sistema, método, ou ambos, podem resolver o problema, contudo sem indicar a sua causa, podendo essa tornar-se recorrente em trabalhos posteriores. Logicamente, em momentos de pressão pelo cumprimento de prazo estipulado para entrega de um projeto, esse tipo de procedimento pode ser inviável.

Uma abordagem racional para tratar de picos distorcidos pode passar por algumas etapas.

Primeiramente, sugere-se testar uma das possíveis causas dentre aquelas que serão listadas a seguir, de acordo com as características do problema.

O padrão apresentado pelo cromatograma problemático também é um indicativo do tipo de causa e deve ser observado. Observam-se, por exemplo, os seguintes questionamentos. Todos os picos do cromatograma apresentam-se com as mesmas deformidades? Todos eles estão alargados, com cauda, frente ou duplicados? Apenas alguns picos apresentam alterações? A que compostos eles correspondem? Quais as características químicas desses compostos? O formato anômalo dos picos é o mesmo para diferentes concentrações do analito de interesse? E para diferentes diluições da amostra ou volumes de injeção?

Alguns dos questionamentos acima remetem aos aspectos químicos da separação. Sempre é importante ter-se em mente o tipo de separação cromatográfica utilizada (fase reversa, fase normal, troca iônica, pareamento iônico, exclusão por tamanho etc.), as características da amostra e do seu preparo, a composição da fase móvel, bem como a sua implicação no estado de ionização dos compostos presentes na amostra e da própria fase estacionária ou suporte cromatográfico.

Tendo-se isolado uma suspeita para o problema, deve-se tratá-lo conforme as descrições que serão feitas a seguir. É importante verificar se a solução encontrada para o problema realmente faz sentido, ou se ela é apenas um paliativo. Em alguns casos, a simples troca da coluna aparentemente resolve o problema, porém, se a chave da questão estiver na fase móvel (por exemplo, por causar deterioração precoce da coluna), o problema com a separação será recorrente.

Algumas das ocorrências mais comuns relacionadas a problemas com o cromatograma são listadas a seguir e serão mais detalhadamente discutidas em seções separadas:

- 1- Uso de coluna defeituosa;
- 2- Uso de solvente com força inadequada para a amostra;
- 3- Sobrecarga de amostra introduzida na coluna;
- 4- Ocorrência de efeitos extracoluna;
- 5- Ocorrências causadoras de frente na banda cromatográfica;
- 6- Existência de sítios mais fortemente retentivos;
- 7- Existência de sítios secundários de retenção;
- 8- Tamponamento inadequado da fase móvel;
- 9- Outros efeitos relacionados a distorções;
- 10- Ocorrência de pseudodistorções.

Na busca por uma dessas ocorrências, os indícios apresentados pelo cromatograma e pelo método fazem parte do processo investigativo e permitem, dependendo da situação, direcionar o foco para alguns dos itens listados, descartando-se outros. Esse direcionamento ocorre com base na compreensão de cada um dos problemas que serão discutidos a seguir.

## 1. Uso de coluna defeituosa

O termo coluna defeituosa, nesse caso, tem como significado a existência de algum problema nas características do fluxo através dela. Esses problemas podem ser divididos em dois tipos: existência de espaços vazios no leito cromatográfico (chamado de *void*, em inglês) ou bloqueios parciais do fluxo na entrada da coluna (geralmente na frita de entrada). As causas para esses problemas serão discutidas a seguir. Outros aspectos relacionados com a coluna e que também causam distorções nos picos serão discutidos posteriormente, tais como presença de sítios ativos, contaminações da coluna, incompatibilidade com a escala do sistema cromatográfico, pequeno número de pratos etc.

O surgimento de espaços vazios no interior da coluna, geralmente na sua entrada, está relacionado principalmente com duas causas. Uma delas é a compactação do material de empacotamento da coluna. A outra é a solubilização do material de empacotamento com sua consequente lixiviação. Atualmente, a primeira causa é bem pouco comum dado o estágio de evolução do preparo das colunas cromatográficas. Essa compactação costumava ocorrer devido ao rearranjo das partículas de empacotamento no interior da coluna, após a coluna ser preparada, fechada e colocada para uso. Nesse caso, com o uso, ocorria um rearranjo das partículas e consequente formação de um espaço vazio no leito cromatográfico. Esse tipo de espaço formado pode ocorrer no início do leito, ou ainda caminhos preferenciais vazios podem ser formados ao longo dele. Atualmente, esse tipo de problema reserva-se basicamente àqueles que, por algum motivo, preparam as colunas cromatográficas no próprio laboratório e que incorrem em alguma falha nesse procedimento. A segunda causa é a mais usual no dias de hoje e deve-se ao emprego de uma fase móvel que leve à solubilização das partículas de empacotamento. Esse é um problema mais comum em caso de materiais de empacotamento a base de sílica. As partículas de sílica quando expostas a soluções levemente alcalinas sofrem solubilização, dependendo do tipo de material empregado não se

recomenda o emprego de fase móvel com pH superior a 8,0. Algumas fases estacionárias a base de sílica possuem um alto grau de recobrimento de sua superfície tornando-a mais inerte, ainda assim, deve-se atentar aos limites de alcalinidade da fase móvel que são recomendados pelo fabricante. A solubilização, por tratar-se de um fenômeno regido pelo equilíbrio químico, tende a iniciar-se pelo topo da coluna. A solubilização das porções iniciais da coluna, de certa forma, satura a fase móvel mantendo o restante do leito cromatográfico menos susceptível a solubilização. Por esse motivo, o espaço vazio causado pela solubilização da fase estacionária tende a localizar-se no início da coluna. Um procedimento de prevenção é a utilização de pré-coluna, a qual é sacrificada para evitar a solubilização do material da coluna analítica, muito mais cara. Note-se que o aparecimento de espaços vazios na pré-coluna também levará às mesmas distorções nos picos cromatográficos.

A existência desses espaços vazios faz com que algumas moléculas injetadas viagem através da coluna mais rapidamente, enquanto muitas outras interagem normalmente com o leito cromatográfico e são mais retidas. Esse efeito resulta geralmente na formação de uma frente que antecede o pico cromatográfico.

É importante ressaltar que as distorções causadas por espaços vazios ou obstruções da entrada da coluna afetam similarmente todos os picos do cromatograma, uma vez que as anomalias causadas ao fluxo atingem todas as substâncias da mistura, em conjunto, antes que elas sejam separadas através da coluna.

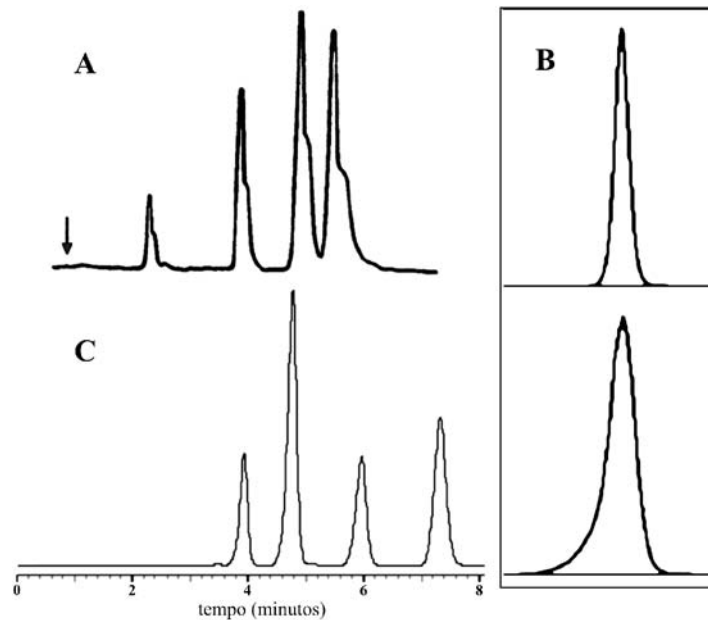
A Figura 3 apresenta cromatogramas com picos típicos de situações em que a coluna apresenta espaços vazios ou obstruções na sua entrada.

Enquanto a formação de espaços vazios na coluna é um tanto rara e o aparecimento de frentes pouco frequente, problemas com a obstrução parcial de fritas, levando a picos com cauda, são muito mais comuns. Um procedimento de prevenção que já foi mencionado anteriormente nessa coluna é a utilização de filtros de linha entre o sistema de injeção e a coluna cromatográfica. Infelizmente, esse procedimento não é tão adotado pelos usuários.

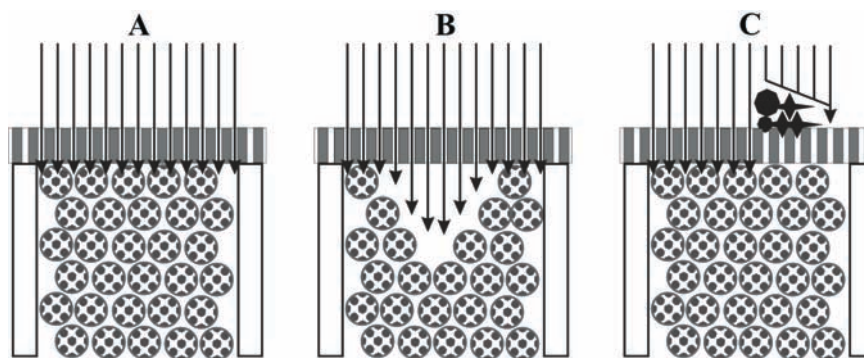
Com o uso da coluna, especialmente para amostras complexas contendo material particulado, algumas partículas podem depositar-se na frita de entrada, causando uma obstrução parcial. Convém mencionar que não necessariamente o material obstrutor provém de um particulado insolúvel, algumas vezes a amostra é adequadamente filtrada ou centrifugada; porém, ao entrar em contato com a fase móvel, sofre degeneração e pode depositar-se ao longo do caminho.

Uma obstrução parcial na entrada da coluna faz com que, enquanto a maior parte da amostra siga seu caminho normal, uma certa porção seja atrasada por deparar-se com um obstáculo. Essa porção que se atrasa, geralmente, é registrada como uma cauda no pico cromatográfico. Dependendo da extensão dessa obstrução os picos cromatográficos podem chegar a formar ombros, ou mesmo serem parcialmente

divididos. É comum que uma coluna ao começar a apresentar esse tipo de problema evolua de pequenas caudas nas primeiras ocorrências até mesmo a picos duplicados, depois de muitas outras injeções. A Figura 4 esquematiza as alterações no fluxo ocasionadas pelo aparecimento de espaços no início do leito cromatográfico ou obstruções na frita de entrada da coluna.



**Figura 3.** Cromatogramas com caudas e frentes causados por obstruções ou espaços vazios no início da coluna. (A) Cromatograma com ombros em todos os picos, típico de coluna com obstrução na sua entrada (Adaptado da referência 2). (B) Comparação entre um pico simétrico (superior) e um pico com frente (inferior) causado por espaço vazio (*void*) na entrada da coluna (Adaptado da referência 3). (C) Cromatograma de uma mistura de quatro PAH obtido com uma coluna C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) que apresentou deficiência no seu processo de empacotamento, provavelmente com a presença de alguns espaços vazios, observe os picos ligeiramente distorcidos.



**Figura 4.** Esquema da entrada da coluna. (A) Frita desobstruída e fluxo de entrada homogêneo. (B) Presença de espaço vazio na entrada da coluna, levando a um caminho preferencial. (C) Presença de obstrução na entrada da coluna, causando desvio em parte do fluxo.

Algumas vezes, a obstrução da coluna também pode ser notada devido a um aumento da pressão no sistema cromatográfico. Uma das formas de se tentar solucionar esse tipo de problema é a inversão da coluna, seguida de lavagem com fase móvel por aproximadamente 30 minutos. Durante esse tempo é aconselhado que a saída da fase móvel seja direcionada diretamente para o descarte, de maneira a evitar que eventualmente o material particulado retido seja direcionado para o detector. A seguir, conecta-se a coluna, ainda invertida ao detector e faz-se uma injeção. Um cromatograma normal confirma problemas na entrada da coluna. Algumas pessoas chegam a recomendar que, nesse caso, a coluna possa ser usada nesse mesmo sentido, enquanto outras recomendam que ela seja voltada à posição original. No caso de colunas com partículas de 3  $\mu\text{m}$  ou menores, faz-se importante observar as características das fritas de entrada e saída para verificar se as colunas podem ser invertidas e mesmo permanecer nessa posição. Um caso conhecido é o de colunas com partículas de 3  $\mu\text{m}$  que, para evitar uma obstrução facilitada da entrada, usa fritas de 2  $\mu\text{m}$ . Contudo, para evitar a perda progressiva de partículas que pode acontecer através desse tipo de frita, usam fritas de 0,5  $\mu\text{m}$  na saída. É sabido que essas colunas podem ser invertidas por curtos espaços de tempo, porém tão logo o problema seja resolvido devem ser retornadas ao sentido normal, sob o risco de haver perda do material da coluna. No caso de dúvida sobre a possibilidade de se inverter a coluna cromatográfica, o fabricante da coluna deve ser consultado. Uma observação final é que, algumas vezes, após o problema de obstrução aparentemente ser resolvido, o retorno da coluna a posição normal e a realização de algumas novas injeções faz com que o problema retorne. Imagina-se, nesse caso, que o material obstrutivo é momentaneamente deslocado no interior das porosidades da frita, mas que ele volta a se assentar depois do retorno à posição original e de novas injeções da amostra.

Há algum tempo, uma situação como essa poderia ser resolvida pela simples substituição da frita de entrada. De fato, colunas antigas chegavam a ser vendidas com fritas sobressalentes. Todavia, a tecnologia atual de produção de colunas faz com que o leito cromatográfico de muitas delas apresente certa compressão no interior da coluna. Assim, uma eventual abertura da coluna levaria à extrusão de parte do material de empacotamento, levando à perda da coluna. Esse procedimento de substituição de fritas, ou mesmo a sua retirada para uma lavagem mais drástica, pode ser considerado atualmente como uma última tentativa e

ainda assim, nos casos que a substituição da coluna seja muito difícil ou apresente um custo muito alto.

Atualmente, colunas com espaços vazios são consideradas condenadas e devem ser substituídas, apesar de ter-se notícia de que, antigamente, esses espaços eram preenchidos manualmente com uma fase estacionária similar e a coluna era retornada ao uso, em sentido oposto ao original. A mesma consideração é verdadeira para colunas irremediavelmente bloqueadas, as quais também devem ser substituídas.

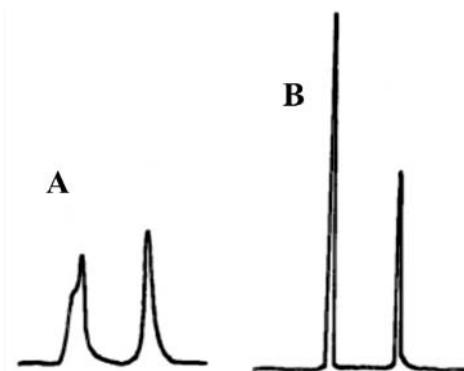
Colunas cromatográficas são e devem ser consideradas como consumíveis para a análise, ou seja, elas apresentam uma vida útil. Sugere-se que seja feito um controle do número de injeções que são realizadas em uma coluna, noticiando-se, assim, se ela precocemente apresentar problemas. No caso de problemas apresentados depois de poucas injeções de amostras, convém investigar-se o motivo de tal deterioração da coluna, do contrário, uma coluna substituída também poderá apresentar uma vida curta.

Concluindo, problemas na entrada da coluna podem causar picos divididos, duplicados ou ainda frentes ou caudas nos picos. Observe que esse perfil de distorção ocorre com todos os picos do cromatograma. Muitas vezes, esses problemas somente são resolvidos com a substituição da coluna e em uma fração dos casos a inversão da coluna (temporária ou permanente) pode prolongar o seu uso. Desde que a vida útil da coluna tenha sido razoável para o tipo de amostra e metodologia, a sua substituição de tempos em tempos é normal. Nessa situação não se precisa cogitar alterações no método, caso problemas de cauda ou frentes comecem a surgir ao fim da vida da coluna. Mesmo que uma coluna não tenha uma vida muito longa – por exemplo, 500 injeções, ou, em casos mais radicais, muito menos – deve-se considerar o seu custo ao fim do projeto. Principalmente em empresas cujo custo agregado à análise é alto, o valor da coluna representa uma fração muito pequena do valor da análise e a sua frequente substituição pode ser mais viável do que modificações demoradas no método, fato que causaria atrasos na execução dos projetos. Enfim, o cuidado básico de utilizar-se um filtro de linha de 0,5  $\mu\text{m}$  entre o injetor e a coluna, bem como a filtração ou centrifugação das amostras após o seu preparo para eliminação de material particulado minimiza problemas com obstrução da coluna, evitando picos com cauda. Por outro lado, a atenção às recomendações do fabricante sobre as limitações da coluna frente a solventes agressivos (especialmente aqueles com alto pH) evita que eventualmente o material de empacotamento seja dissolvido, criando-se espaços vazios no interior da coluna e causando picos com frentes.

## 2. Uso de solvente com força inadequada para a amostra

Recomenda-se que a amostra injetada esteja dissolvida na fase móvel que inicia a separação cromatográfica. Da mesma forma, ela deve ocupar um volume compatível com o tipo de coluna utilizada. Geralmente, um volume entre 10 e 25  $\mu\text{L}$  é o recomendado para colunas de 150 x 4,6 mm, recheadas com partículas de 5  $\mu\text{m}$ . Para colunas com diâmetros diferentes o ajuste deve levar em consideração a razão entre os quadrados dos diâmetros internos. É sabido também que colunas mais curtas ou com partículas menores tornam o sistema menos tolerante a grandes volumes de injeção. Dessa forma, é importante a atenção ao tipo e volume de solventes empregados na injeção das amostras em colunas de 50 x 2,1 mm, com partículas pequenas, muito comuns em aplicações com a espectrometria de massas. O maior problema no procedimento de injeção reside no uso de solventes mais fortes do que a própria fase móvel, e com volumes relativamente altos para essa composição da solução da amostra. Por outro lado, o uso de um solvente mais fraco – por exemplo, a água em separações de fase reversa – permite que volume muito maior seja injetado sem causar distorções dos picos cromatográficos. Esse é o procedimento adotado em métodos que fazem, no início da coluna, a pré-concentração ou focalização dos analitos injetados, estratégia bastante útil em cromatografia capilar ou nanocromatografia.

A Figura 5 demonstra o efeito que uma injeção de solvente mais forte pode ter sobre a separação cromatográfica. No caso, um cromatograma obtido em fase reversa é completamente afetado pela injeção da amostra contida em 100% de acetonitrila.



**Figura 5.** Comparação entre (A) um cromatograma obtido para uma injeção de amostra dissolvida em 100% acetonitrila e (B) um cromatograma para a mesma amostra dissolvida na fase móvel constituída de acetonitrila:água (18:82). Adaptado da referência 4.

Por regra, toda vez que um solvente mais forte do que a fase móvel empregada no início da separação for utilizado na solubilização da amostra, o seu efeito sobre a aparência do cromatograma deve ser averiguado. Se ocorrer essa suspeita, o primeiro teste que pode ser realizado é a injeção de um volume menor de solução, algo em torno de 1/5 do volume inicial (essa estimativa se aplica se o volume previamente utilizado for equivalente ao volume usualmente recomendado para a coluna). Em casos de volumes maiores, a redução necessária também deve ser maior, de modo a equivaler a aproximadamente 1/5 do volume recomendado. Um ajuste que pode facilitar a comparação entre os cromatogramas é o ajuste das escalas de ambos para que sigam proporção inversa àquela da diluição. Com esse ajuste, caso o efeito do solvente da fase móvel não seja notado, ambos os cromatogramas terão a mesma aparência e reportarão picos com aproximadamente o mesmo tamanho. Em caso contrário, o cromatograma equivalente ao de maior volume apresentará distorções em relação ao outro. Um cromatograma adicional obtido pela injeção do dobro do volume desejado também auxilia na investigação, uma vez que um maior alargamento dos picos é um indício de que o volume injetado está em demasia. Nessa sequência de três volumes crescentes, se os dois primeiros volumes apresentarem perfis semelhantes e com picos mais estreitos do que o último, sabe-se que o volume desejado ainda é tolerado, mas que não deverá ser aumentado sob o risco de prejuízos na separação. Porém, se os picos do segundo cromatograma (aquele com o volume inicialmente desejado) apresentar picos com alargamento intermediário em relação aos cromatogramas de menor e maior volume, esse será um indicativo que efeitos deletérios ao desempenho da separação já estão presentes e, idealmente, precisam ser corrigidos.

Outro teste que auxilia nessa investigação é a diluição da amostra em um solvente mais fraco (água ou solução tampão, por exemplo, em caso de fase reversa), e consequente injeção de um volume maior. Nesse teste, uma parte da amostra pode ser dissolvida em quatro partes do solvente mais fraco e, então, um volume cinco vezes maior é injetado. Esse experimento é válido para aplicações que tenham, na sua fase móvel inicial, uma proporção solvente forte/solvente fraco de pelo menos 25-30%. Para aplicações com colunas de fase reversa do tipo AQ (colunas que suportam até 100% de água na fase móvel), por exemplo, esse procedimento pode não ser válido, pois há a possibilidade de, mesmo com a diluição, o solvente de constituição (da amostra)

permanecer mais forte do que aquele da fase móvel do início da separação. Nesse teste os cromatogramas são comparados e perfis similares presumem ausência de efeito deletério acarretado pela constituição da amostra. Se houver diferenças entre os cromatogramas, com melhor perfil para aquele em que ocorreu a diluição, essa etapa pode ser integrada à metodologia em desenvolvimento. Um entendimento importante nesse ponto é que, volumes muito grandes de injeção necessariamente precisam ser focalizados no início da coluna, se isso não ocorrer, outra fonte de alargamento será acarretada pelo efeito do grande volume do “plug” de amostra injetada. Portanto, sempre observe se o solvente de constituição da amostra, após a diluição, é suficientemente mais fraco do que aquele da própria fase móvel, para o caso do volume injetado ser muito grande.

Em última instância o solvente inicial de constituição da amostra pode ser completamente seco (geralmente utiliza-se um delicado fluxo de gás nitrogênio ou a centrifugação a vácuo, com ou sem aquecimento, dependendo da volatilidade e estabilidade térmica dos analitos). Após a secagem, a amostra é reconstituída no solvente mais fraco possível, sempre mais fraco do que a fase móvel. Idealmente, em fase reversa, utiliza-se a água ou uma solução tampão. Um cuidado adicional é observar a solubilidade da concentração dos analitos naquele tipo de solução. Nesse teste, como não está ocorrendo diluição da amostra, o volume injetado para fins de comparação deve ser idêntico àquele previamente injetado com o solvente original. Uma estratégia complementar, caso haja efeito de focalização pela menor força do novo solvente da amostra, é a injeção de volumes maiores da amostra, melhorando-se a detectabilidade obtida com o método em desenvolvimento.

O problema da injeção de grandes volumes de amostra em solvente mais forte é explicado pela demora em o analito encontrar uma fase móvel mais fraca, que permita a sua interação com a coluna. Como o “plug” introduzido é muito grande, enquanto a sua periferia rapidamente é misturada com a fase móvel, permitindo uma interação com a fase estacionária, as suas porções mais internas permanecem mais tempo “banhadas” pelo solvente mais forte, sendo assim arrastadas mais rapidamente através da porção inicial da coluna. Dessa forma, ocorre uma dispersão anômala dos constituintes da amostra, podendo gerar frentes, caudas, picos alargado, com ombros ou até mesmo parcialmente duplicados. É interessante notar, para efeito de diagnóstico do problema, que todos os picos do cromatograma tendem a ser afetados, sendo que os

picos menos retidos costumam ser mais afetados do que os mais retidos. Isso se explica pelo fato dos compostos mais retidos iniciarem uma efetiva interação com a fase estacionária em condições menos diluídas da amostra na fase móvel, enquanto os compostos menos retidos demorarão mais para atingir um estágio de diluição que permita uma adequada interação com a coluna. Esse efeito pode ser visualizado comparando-se os dois picos da Figura 5A.

Usou-se no título dessa seção a descrição “solvente com força (de eluição) inadequada para a amostra” e não simplesmente “solvente inadequado para a amostra” justamente para evitar o englobamento de outro tipo de problema relacionado com o solvente, quer seja da amostra, ou mesmo da fase móvel. Há relatos na literatura reportando a instabilidade de alguns analitos frente a determinados solventes ou constituintes das soluções que podem conter a amostra, ou, ainda, compor a fase móvel. Obviamente, esse tipo de efeito dá-se pela instabilidade dos analitos em tal meio, geralmente levando à sua decomposição. Esse problema será tratado posteriormente, em seção apropriada.

Em resumo, em uma situação de injeção da amostra pode-se encontrar três situações. **(A)** Quando o solvente da amostra é mais fraco do que o da fase móvel. Nesse caso, o analito tende a ser focalizado no início da coluna e grandes volumes geralmente podem ser injetados. Uma regra empírica considera que com uma percentagem de solvente forte (da amostra) 10-20% inferior àquela do mesmo solvente na fase móvel já se garante uma boa focalização dos analitos menos retidos presentes na amostra. Por exemplo, para uma separação isocrática em fase reversa com fase móvel constituída de água:acetonitrila (50:50) (em que todos os analitos de interesse sejam retidos), considera-se que uma amostra contendo quantidades de acetonitrila inferiores a 30% causará focalização adequada dos analitos. **(B)** Quando a amostra apresenta-se dissolvida na própria fase móvel. Ainda há, nesse caso, certa tolerância ao volume de amostra injetado. Geralmente estima-se que um volume de até 15% do volume do pico menos retido, de interesse, possa ser injetado. Esse volume é facilmente aferido injetando-se uma pequena quantidade de amostra e multiplicando-se a largura desse pico pela vazão adotada para a fase móvel. Em situações práticas, esse volume pode ser aumentado, desde que, durante o desenvolvimento da metodologia, certifique-se que não haverá prejuízo para a separação. **(C)** Quando a amostra apresenta-se dissolvida em solução mais forte do que a da fase móvel. Essa é a situação crítica que deve ser evitada, pois apresenta maior risco para



deterioração do perfil cromatográfico de separação. Quando a situação não puder ser evitada, ou uma modificação do método de preparo da amostra não for viável, deve-se verificar se o volume injetado não é capaz de deteriorar a separação, inviabilizando a aplicação do método.

Como apresentado na introdução desse artigo, são vários os problemas causadores de distorções nos picos cromatográficos, esses problemas foram listados e começaram a ser tratados, um a um. Na próxima edição a discussão acerca desses problemas será continuada.

## Referências Bibliográficas

1. Dolan, J.W. and Snyder, L.R. Troubleshooting LC systems – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separation. Totowa, New Jersey: Humana Press. (1989) 500p.
2. Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. Introduction to modern liquid chromatography, 2 ed., New York: John Wiley & Sons. (1979) 863p.
3. R.D. Morrison and J.W. Dolan. LCGC North America, 23, 6 (2005).
4. T.-L. Ng and S. Ng. J. Chromatogr., 329, 13 (1985).