

Estratégias para diminuição do tempo de análise em Cromatografia Líquida Moderna



Fernando M. Lanças
Editor

Fernando M. Lanças

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
13560-970 – São Carlos (SP)
Brasil
flancas@iqsc.usp.br

Resumo

A diminuição do tempo de análise em cromatografia líquida (LC) é uma demanda permanente das indústrias, setores da academia e órgãos reguladores. Alguns procedimentos clássicos permitem atender este objetivo, porém quase sempre ocorrem às custas de uma acentuada deterioração da eficiência do processo de separação. Neste trabalho são apresentados quatro enfoques distintos – alguns dos quais podem ser combinados – para diminuir o tempo de análise sem que ocorram perdas acentuadas no poder de separação.

Abstract

Decreasing the analysis time is a permanent task in LC coming from industries, academia and regulatory agencies. Although some classical approaches have been used for this purpose, they occur at the expenses of the separation efficiency. In this work we present four different approaches – some of them being able to be combined – to decrease the analysis time without compromising the quality of the separation process.

Palavras-chave

Cromatografia Líquida a Pressões Elevadas (U-HPLC); diminuição do tamanho das partículas; aumento da temperatura; separações ultra-rápidas; colunas superficialmente porosas; colunas monolíticas.

Keywords

Ultra-High Pressure Liquid Chromatography (U-HPLC); decreasing particle sizes; increasing the column temperature; high-speed separations; superficially porous columns; monolithic columns.

1. Introdução

A demanda por separações cada vez mais rápidas, vindas dos setores industrial, acadêmico e regulatório, tem estimulado os pesquisadores a desenvolverem alternativas práticas para atender essas necessidades, sem que haja compromisso da qualidade da separação. Certamente a maneira mais simples para se atingir separações rápidas é a diminuição do comprimento (L) da coluna, uma vez que o tempo de retenção é diretamente proporcional a L , de acordo com:

$$t_R = \frac{L}{\mu} (1+k) \quad (\text{eq.1})$$

onde:

t_R = tempo de retenção;
 L = comprimento da coluna;
 μ = velocidade linear média da fase móvel;
 k = fator de retenção.

Entretanto, a simples diminuição do comprimento da coluna traz uma perda considerável na qualidade da separação, uma vez que o número de pratos, N (que mede a eficiência de uma coluna cromatográfica) diminui com a diminuição de L de acordo com:

$$N = \frac{L}{H} \quad (\text{eq. 2})$$

na qual:

N = número de pratos;
 L = comprimento da coluna;
 H = altura de um prato.

Uma vez que o tempo de retenção, t_R , de um analito depende do tempo que ele passa na coluna, quanto menor L menor será t_R (Eq.1). Como consequência dessa relação, menor será o tempo de análise. Desta forma, cria-se um dilema em relação ao comprimento da coluna, mantidas todas as outras variáveis: quanto menor L mais rápida será a análise ($< t_R$), porém, com menor eficiência (N). Na análise de amostras simples, contendo poucos compostos, este fator poderá não ser relevante; porém para misturas complexas a perda de eficiência poderá comprometer a análise.

2. Estratégias para diminuir o tempo de análise, mantendo a eficiência da separação

Dentre as estratégias empregadas para se obter uma diminuição do tempo de análise sem perda de eficiência, as principais são:

- aumento da velocidade linear média da fase móvel;
- diminuição no tamanho das partículas da fase estacionária;
- aumento na temperatura da coluna;
- aumento na permeabilidade da coluna.

A modificação nesses fatores e a implicação no tempo de análise e na eficiência da separação serão analisados individualmente a seguir.

3. Aumento na velocidade linear média da fase móvel

A equação de van Deemter¹, desenvolvida originalmente para cromatografia gasosa (GC) e posteriormente adaptada para cromatografia líquida (LC) e outras técnicas de separação, relaciona a eficiência de uma coluna (medida pela altura de um prato, H ou HETP) com a velocidade linear média da fase móvel (μ). Apesar das inúmeras variações da equação e das mudanças no formato da figura gerada em função delas, o gráfico de van Deemter tem sido amplamente utilizado na otimização das condições experimentais em LC, inclusive para avaliação da qualidade de colunas. O gráfico gerado da equação, composta de três termos a serem otimizados², mostra a existência de uma região de compromisso entre μ e H , denominada de velocidade linear média ótima (μ_{opt}), na qual H atinge um valor mínimo (H_{min}), e onde a eficiência (N) é máxima. Para partículas da fase estacionária com tamanho maior do que $5 \mu\text{m}$, o aumento de μ geralmente acarreta um aumento de H (diminuição de N), enquanto que, para partículas menores que este valor, um aumento em μ provoca pouca variação em H .

A Figura 1 ilustra esta comparação sendo que a parte superior da figura mostra o gráfico obtido para diversas fases estacionárias com partículas de diâmetro superior a 5μ (parte a da figura) enquanto que a parte (b) ilustra o resultado para partículas menores. Observa-se que para partículas menores do que $3,5 \mu\text{m}$, H (ou HETP) torna-se praticamente independente de μ , ou seja, neste caso é possível trabalhar com velocidades lineares (proporcionais aos fluxos ou vazões da fase móvel) bastante acima da teoricamente ideal, sem perda da eficiência da coluna (N). Esta é uma das principais razões da popularização do emprego de partículas cada vez menores em LC: diminuir o tempo de análise sem perda da eficiência da separação.

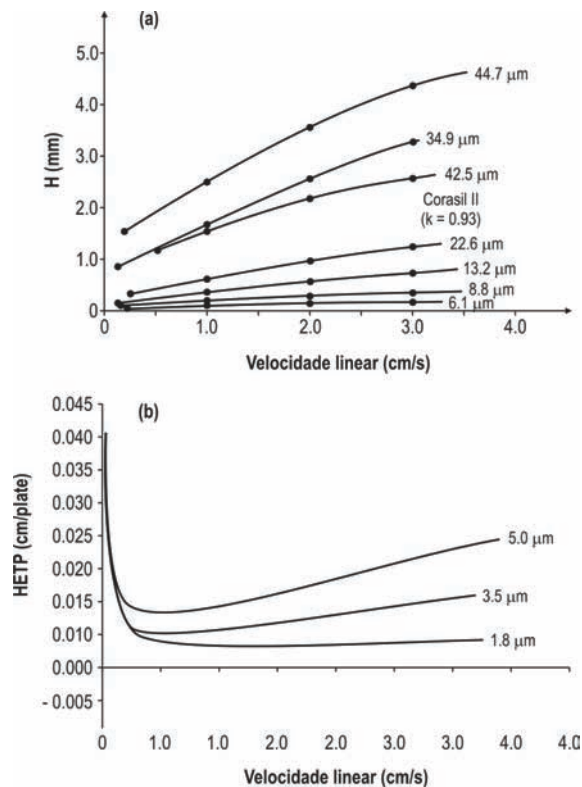


Figura 1. Variação do valor de H (inverso do número de pratos N), em função da velocidade linear média da fase móvel, para diversas fases estacionárias com partículas de diferentes tamanhos. (a) partículas com diâmetro superior a $5 \mu\text{m}$; (b) partículas com diâmetro inferior a $5 \mu\text{m}$.

4. Diminuição no tamanho das partículas da fase estacionária

Mantendo-se os demais parâmetros constantes, o tempo de retenção em cromatografia líquida depende linearmente do tamanho das partículas da fase estacionária (dp), de acordo com a Equação 3:

$$t_R = \frac{(1+k)Nh}{Dm\mu} \cdot dp^2 \quad (\text{eq.3})$$

onde:

t_R = tempo de retenção;

k = fator de retenção;

N = número de pratos;

h = altura de um prato;

Dm = difusão do analito na fase móvel;

dp = diâmetro médio das partículas da fase estacionária.

De acordo com a Eq. 3, o tempo de retenção de um analito e, portanto, o tempo de análise, varia com o quadrado do tamanho das partículas. Assim, uma

pequena diminuição em dp ocasionará uma acentuada diminuição no tempo de retenção. Por exemplo, um analito que apresente tempo de retenção igual a 25 minutos em uma coluna contendo partículas de 5 microns, terá tempo de retenção de apenas 3,4 minutos em uma coluna contendo partículas de 1,7 microns, mantidas as demais condições.

Entretanto, a redução apenas no tamanho das partículas, sem mudanças no comprimento da coluna trará como principal consequência um aumento considerável na pressão do sistema, pois:

$$\Delta P = \frac{\phi L \eta}{100 dp} \quad (\text{eq. 4})$$

onde:

ΔP = variação da pressão na coluna (diferença entre a pressão de entrada e de saída)

η = viscosidade da fase móvel

dp = diâmetro médio das partículas

Portanto, uma diminuição no tamanho das partículas, mantidas as demais características da coluna, acarretará um aumento na pressão do sistema, podendo tornar a mudança impraticável se o cromatógrafo não for adequado ao uso em pressões mais elevadas.

Este enfoque não é novo, havendo sido amplamente explorado no passado e motivo de várias revisões e tutoriais, tais como o livro *Introduction to High-Speed Liquid Chromatography*³ publicado em 1981 (há 28 anos!). Nesse trabalho, os autores discutem em detalhes o fato de que para se obter maior velocidade na análise em LC não basta apenas diminuir o tamanho das partículas, sendo necessário uma adaptação do instrumento como um todo. Assim, apresentam e discutem as mudanças necessárias em toda a instrumentação, incluindo o volume do injetor, cela de detecção, tempo de resposta do detector, sistemas rápidos para aquisição de dados e, obviamente, uma coluna apropriada a este enfoque.

A Figura 2 ilustra um exemplo de aplicação desse enfoque para a separação de alquil parabéns em loção de bebê em menos de 30 segundos de análise.

Apesar de algumas publicações na época a este respeito, este trabalho não produziu grande impacto na indústria de cromatógrafos líquidos. Uma proposta mais radical para diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária visando o desenvolvimento de análises mais rápidas, sem perda na eficiência, veio de um conjunto de trabalhos publicados pelo grupo de J. Jorgenson⁴⁻⁷. Estudos fundamentais sobre a qualidade

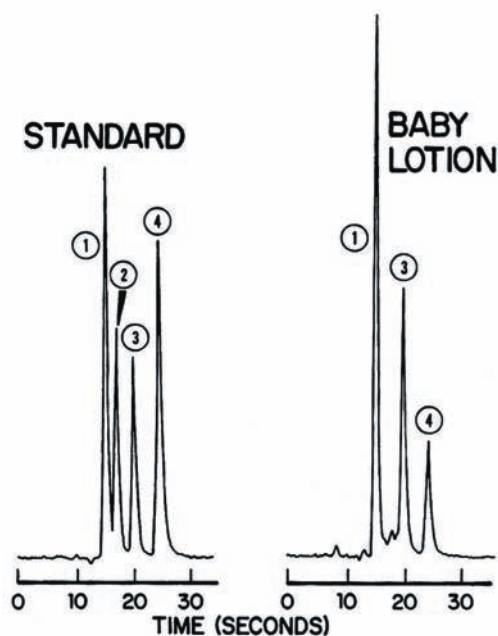


Figura 2. Análise de parabéns em loção para bebê. Coluna: L = 100 mm; d.i. = 4,6 mm; dp = 3 μ m; C-18. Fase móvel: ACN:H₂O (65:35) a 5 mL/min. Pi = 5.000 psi; T= 45°C; UV-VIS a 254 nm. Amostra: 1 μ L. Picos: 1 = metil parabén; 2 = etil parabén; 3 = n-propil parabén; 4 = n-butil parabén. Modificado da ref 3, publicada em 1981.

das colunas empacotadas com partículas de diâmetro inferior ao convencionalmente utilizado até o final da década passada (5 μ m) permitiram o estabelecimento das necessidades instrumentais para o uso destas colunas. Foram estudadas colunas contendo partículas de diâmetros bastante pequenos, até mesmo inferiores a 1 μ m, resultando em eficiências muito elevadas com tempos de análise bastante curtos (Figura 3).

Entretanto, e como discutido anteriormente, pressões muito elevadas são atingidas com o uso de partículas de diâmetros inferiores a 3 μ m. Essa nova linha de investigação em HPLC, utilizando partículas de diâmetro inferior a 3 microns, a pressões elevadas (usualmente superiores a 10.000 psi), recebeu o nome genérico de U-HPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)⁴.

O emprego de partículas de diâmetro médio inferior a 5 μ m tem ocorrido tanto para colunas de diâmetro interno convencional (1,0 – 4,6 mm) quanto para colunas capilares (0,1 – 0,5 mm) ou nano (< 0,1mm). As vantagens obtidas com a diminuição do diâmetro interno das colunas foi motivo de trabalho recente publicado neste periódico⁸.

A combinação entre partículas de diâmetro pequeno empacotadas em tubos também de diâmetro interno pequeno, conduz a colunas bastante eficientes (Figura 3), e com pequeno consumo de fase móvel e estacionária, além de facilitar o acoplamento com outras técnicas como a espectrometria de massas⁹.

Entretanto, e a despeito da versatilidade deste enfoque, o emprego de partículas muito pequenas acarreta necessidade de equipamento especial. A Waters foi a primeira empresa a comercializar uma solução completa na qual a diminuição no comprimento da coluna foi acompanhada por uma diminuição significativa no diâmetro das partículas (do padrão 5 μ m para 1,7 μ m). O conceito, que envolveu modificações significativas também na instrumentação, foi denominado UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)¹⁰. Várias outras empresas produzem sistemas similares no momento, com diferentes nomes e siglas tais como: Ultra-Fast HPLC (UFLC); U-HPLC; High-Speed LC (HSLC) e vários outros. A maioria desses sistemas opera em pressões de até 15.000 psi.

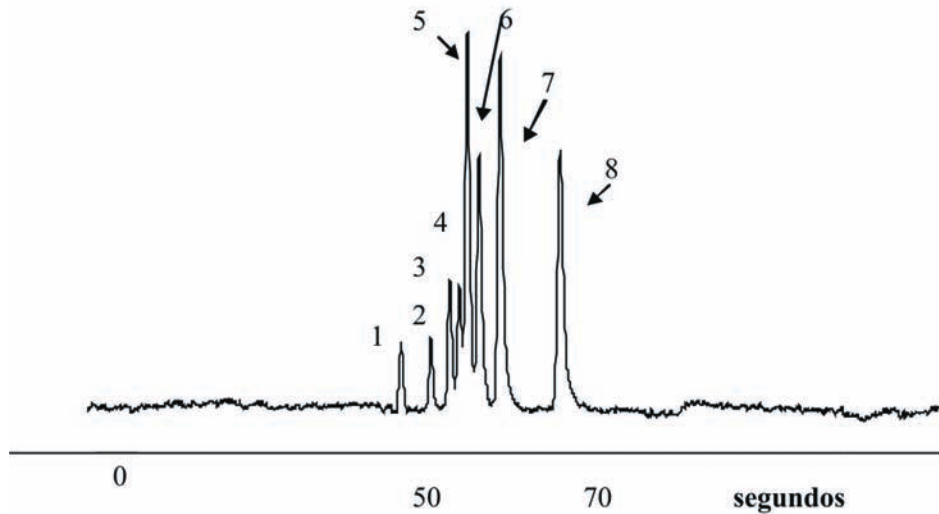


Figura 3. Separação rápida de uma mistura de fármacos através de UHPLC. Coluna: 14.5 cm × 50 mm i.d. capilar de sílica fundida; Fase estacionária: 1.0 µm polybutadiene-encapsulated nonporous zirconia; pressão de entrada 22.000 psi, detecção 100 °C; 215 nm UV. Fase móvel: água (40 mM NaH₂PO₄, pH = 7.0)/ acetonitrilo (68:22, v/v). (1) uracil; (2) clorazepate; (3) flunitrozepam; (4) clonazepam; (5) chlordiazepoxide; (6) oxazepam; (7) clorazepate; (8) diazepam.

Este enfoque tem se mostrado bastante atrativo para a obtenção de análises mais rápidas, sem perdas significativas de eficiência. Entretanto, requer um equipamento novo, dimensionado para trabalhar com pressões mais elevadas, ou pelo menos adaptações significativas em sistemas existentes (algumas empresas vendem “kits” para adaptação de um sistema para outro). A próxima década dirá se este é o melhor dos enfoques para este objetivo.

5. Programação de temperatura em cromatografia líquida

O controle da temperatura da coluna em LC passou a ocorrer principalmente após o desenvolvimento das fases reversas (inicialmente C-18 e C-8). Uma vez que o mecanismo predominante neste tipo de separação é a partição, que depende da solubilidade relativa do analito entre duas fases (e esta depende da temperatura), maior atenção passou a ser dada a este parâmetro de forma a se obter melhor reprodução dos tempos de retenção. Ainda assim, uma temperatura – geralmente próxima da ambiente – era fixada e mantida durante toda a análise; raramente

temperaturas mais elevadas eram utilizadas, ainda que isso aumentasse a solubilidade do analito na fase móvel e, como consequência, diminuísse o tempo de análise.

Apesar de amplamente utilizada em cromatografia gasosa¹¹, a programação de temperatura da coluna (modificação da temperatura durante uma análise) ainda não atingiu popularidade em LC. Uma das principais razões é o fato de a HPLC ter historicamente surgido para analisar compostos que não apresentavam estabilidade térmica (ou volatilidade) adequada para sua determinação via GC. Adicionalmente, as colunas de grande diâmetro interno (superior ou igual a 4 mm), feitas de metal, utilizadas na época, possuíam paredes muito grossas que dificultavam a transferência de calor através delas. O surgimento de colunas capilares de sílica fundida em LC mudou este panorama e mostrou as vantagens do uso de programação de temperatura em LC. Em geral, o aumento da temperatura da coluna auxilia na transferência do analito da fase estacionária para a fase móvel, diminuindo significativamente o tempo de análise e aumentando a eficiência das colunas e a sensibilidade da detecção pelo estreitamento das bandas cromatográficas^{12,13}.

6. Aumento na permeabilidade da coluna

Devido às elevadas pressões necessárias para se utilizar as colunas contendo partículas menores, e a consequente necessidade de se adquirir novos equipamentos mais apropriados para tal, um grande esforço tem sido concentrado no desenvolvimento de colunas contendo fases estacionárias com maior permeabilidade. Aumentando a permeabilidade, pode-se empregar colunas mais longas (maior L) com fluxos ou vazões da fase móvel maiores. Isso resulta em análises mais rápidas, porém com menor exigência em relação aos equipamentos, especialmente as bombas. Em outras palavras, estas colunas podem ser utilizadas em qualquer cromatógrafo líquido.

Os dois enfoques atualmente melhor sucedidos para aumento da permeabilidade são o uso de colunas monolíticas e colunas superficialmente porosas.

6.1. Colunas monolíticas

Em vez de utilizar partículas de pequeno diâmetro, como as descritas anteriormente, as colunas monolíticas são feitas de uma única peça de sílica monolítica. Essas colunas são biporosas: apresentam *macroporos* (usualmente ao redor de 2 μm de diâmetro) que permitem o uso de fluxos maiores com baixas pressões; e *mesoporos* (cerca de 13 nm) que fornecem uma grande área superficial para manter a eficiência¹⁴.

As colunas monolíticas existem tanto em dimensões convencionais (diâmetro interno 1,0-4,6mm) quanto capilares (d.i. < 0,5mm) podendo, também, ser preparadas com diferentes polímeros. Enquanto que as colunas monolíticas de sílica têm sido empregadas na determinação de analitos pequenos, a maior aplicação das colunas poliméricas tem sido na análise de macromoléculas de interesse biológico, tais como polipeptídeos e proteínas. Um grande número de excelentes revisões foi publicado nos últimos anos destacando as vantagens e detalhes de preparação das colunas monolíticas¹⁵⁻¹⁹.

Diferentes aplicações das colunas monolíticas foram recentemente descritas na literatura, incluindo a análise de fenóis, DNA, PAHs, IgG, enzimas, amins, cloranfenicol, e várias outras classes de analitos²⁰.

6.2. Colunas superficialmente porosas

As partículas empregadas no início da cromatografia líquida usualmente apresentavam tamanho médio igual ou superior a 40 μm e estrutura totalmente porosa. Uma das principais características desse tipo de material era sua grande área superficial que permitia o uso de grandes quantidades de amostra (elevada capacidade). Entretanto, a existência de macroporos faz com que as moléculas permaneçam diferentes tempos para difundir dentro e fora dos poros, ocasionando alargamento das bandas e diminuição na eficiência das colunas²¹.

Um dos principais avanços na direção da solução deste problema foi o trabalho pioneiro de Horvath e Lipsky, nos anos 60²². Estes autores recobriram esferas não porosas (“*shell cores*”) tais como pequenas contas (esferas) de vidro com uma película de material sólido poroso. Nesse tipo de material as moléculas da amostra migram através desta camada relativamente fina, resultando em picos mais estreitos do que aqueles obtidos empregando partículas totalmente porosas. Esse tipo de material foi denominado de *pelicular* (devido à película colocada na superfície) ou *superficialmente porosas* (devido às características da película).

A Figura 4 ilustra a estrutura dos materiais totalmente porosos (esquerda) e peliculares ou superficialmente porosos (direita) desenvolvidos no início da cromatografia líquida moderna.

Apesar de algumas tentativas para preparação de partículas superficialmente porosas ou peliculares com tamanho menor, a primeira demonstração prática desta possibilidade ocorreu no início desta década²³. Partículas de 5,0 μm de diâmetro total – incluindo uma camada porosa de 0,25 μm de espessura – contendo poros de 30,0 nm foram produzidas e empregadas na separação de várias moléculas, aproveitando as pequenas distâncias de difusão de solutos de baixa difusividade. Mais recentemente, Kirkland²⁴ desenvolveu partículas de C-8 e C-18 com diâmetro total de 2,7 μm com uma camada porosa de 0,5 μm de espessura, contendo poros de 90 Å.

A Figura 5 ilustra uma comparação entre o caminho de difusão de uma analito em uma partícula convencional totalmente porosa de $d_p = 3 \mu\text{m}$ e uma partícula do tipo superficialmente porosa com uma camada de 0,5 μm .

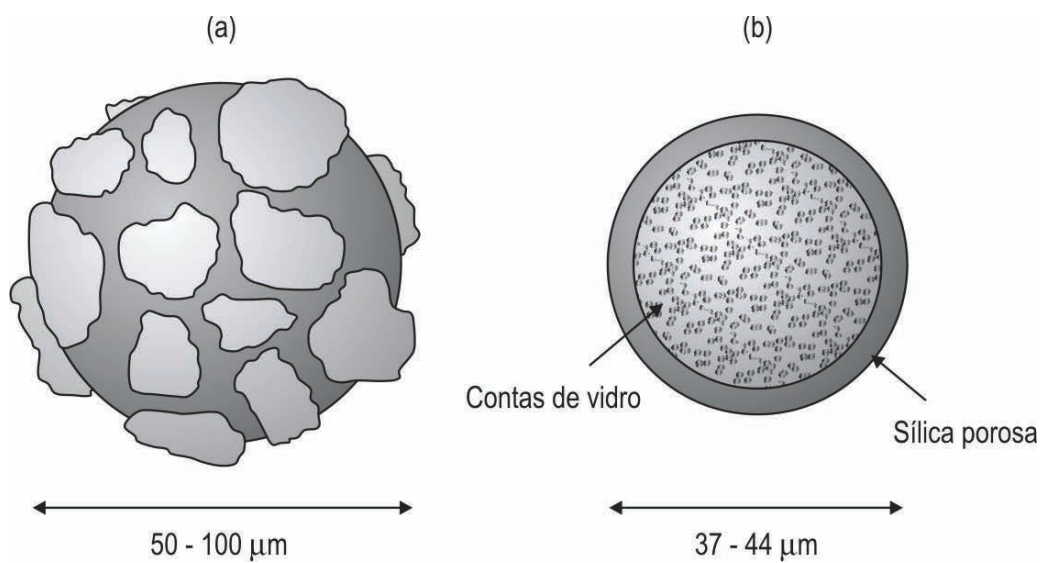


Figura 4. Estrutura dos materiais empregados no início da LC moderna. (a) partículas totalmente porosas; (b) partículas superficialmente porosas ou peliculares.

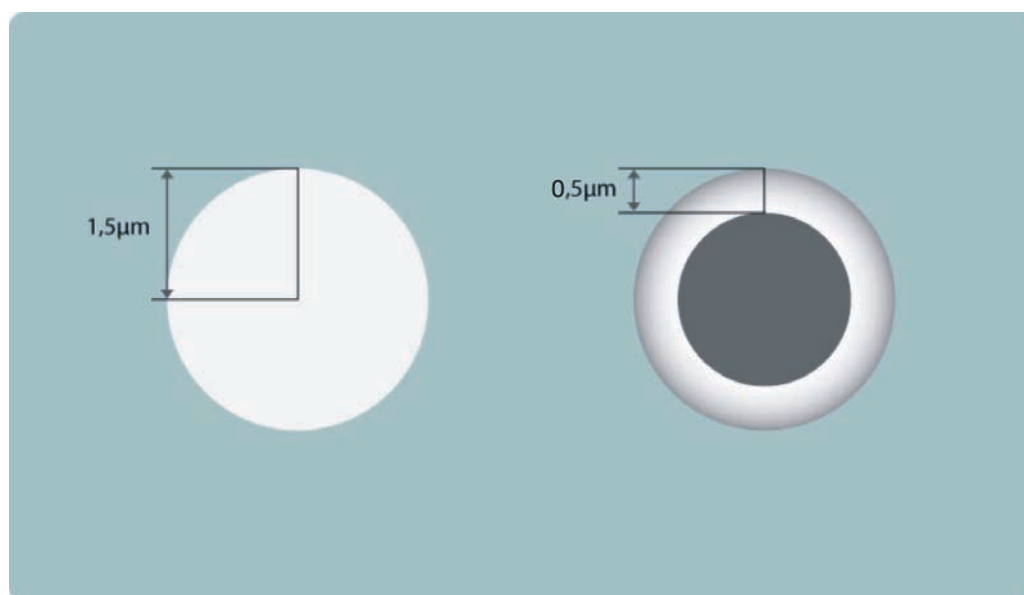


Figura 5. Comparação entre o caminho disponível para difusão em uma partícula totalmente porosa (esquerda; 1,5 μm) e superficialmente porosa (direita; 0,5 μm).

A diminuição do caminho de difusão das partículas superficialmente porosas acarreta uma diminuição da dispersão axial e, como consequência, uma diminuição no alargamento das bandas, efeitos esses mais marcantes na separação de moléculas maiores e quando fluxos mais rápidos são empregados.

As colunas superficialmente porosas (“*shell particle columns*”) têm sido comparadas com as colunas monolíticas para se obter análises mais rápidas sem modificações no instrumentos, uma vez que não produzem pressões elevadas.

As principais aplicações das colunas do tipo superficialmente porosas (ainda poucas até o presente) utilizam quase que exclusivamente fases do tipo C-18, apesar de outras fases já estarem disponíveis comercialmente²⁵⁻²⁷. Apesar do grande potencial dessas colunas, mais aplicações ainda precisam ser desenvolvidas para uma melhor avaliação de sua aplicabilidade em análises rápidas. Do ponto de vista teórico, essas partículas podem apresentar um poder de separação (pratos teóricos) pelo menos 50% maior do que as partículas totalmente porosas equivalentes, porém operando em pressões substancialmente mais baixas.

7. Conclusões

No presente artigo quatro enfoques distintos – alguns dos quais complementares – para se efetuarem análises mais rápidas em LC, sem perda apreciável da eficiência de separação foram descritos. A diminuição do tamanho das partículas efetivamente permite ambos, porém se não associada a outras providências como, por exemplo, aumento da permeabilidade da coluna, acarretará um aumento bastante apreciável da pressão no sistema (como no caso da UPLC, por exemplo). Nesse caso, mudanças na instrumentação serão necessárias para se atingir o objetivo de análises rápidas com eficiência. A programação de temperatura da coluna é outro enfoque que permite acelerar uma análise sem perda da eficiência. Porém, requer o uso de um forno adequado para programação de temperatura em LC ou micro-LC. Outra solução que tem despertado interesse recente é o aumento na permeabilidade da coluna com o emprego de novas formas de preparo das fases estacionárias. As colunas monolíticas foram desenvolvidas há mais tempo, e possuem mais aplicações, publicações e empresas que as comercializam. Por outro lado, as denominadas colunas superficialmente porosas têm ganho

popularidade nos últimos três anos, já sendo disponibilizadas comercialmente por várias empresas.

Qualquer que seja a opção para se obterem análises mais rápidas, e as quatro mais populares foram discutidas criticamente neste artigo, não há dúvida de que esta será uma ênfase a ser seguida na próxima década que se iniciará dentro de poucos meses.

8. Referencias

1. J.J. van Deemter, F.Zviderweg, A. Klinkenberg, Chem. Eng. Sci. 5,271 (1956).
2. F.M. Lanças, „*Cromatografia Líquida Moderna*“, Ed. Átomo, pg. 143 (2009).
3. J.L.Dicesare, M.W.Dong, L.S.Ette, “*Introduction to High-Speed Liquid Chromatography*”, Perkin-Elmer, 1981.
4. J.E.MacNair, K.C.Lewis, J.W.Jorgenson, Anal.Chem. 69,983 (1997).
5. J.E.MacNair, K.D.Patel, J.W.Jorgenson, Anal.Chem. 71,700 (1999).
6. J.W.Thompson, J.S.Mellors, J.W. Eschelbach, J.W. Jorgenson, LCGC (supl.) April 2006, 16.
7. J.W. Eschelbach, J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 78,1697(2006).
8. F.M. Lanças, *Scientia Chromatographica* 1(3) 51-60 (2009).
9. A.J. Santos-Neto, K.E. Markides, P.J.R.Sjoberg, J. Bergamist, F.M. Lanças, Anal. Chem. 79, 6359-6367 (2007).
10. M.E. Swartz, LCGC special issue May 2005, pg.8.
11. F.M. Lanças, “*Cromatografia em Fase Gasosa*”, Acta (1993).
12. F.M. Lanças, *Scientia Chromatographica* 1(1) 51-60 (2009).
13. F.M.Lanças, “*Temperature-Programmed Capillary Liquid Chromatography*”; Palestra apresentada no 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Dresden (Germany), 2009.
14. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J. High Resol. Chromatogr. 23, 93-99 (2000).
15. F. Svec, J. Sep. Sci. 28,729-745(2005).
16. F. Svec, G.C.Huber, Anal.Chem. 78,2100-2107(2006).

17. G. Guiochon, J. Chromatogr.A 1168,101-168(2007).
18. J. Urban, P. Jandera, J.Sep.Sci. 31,2521-2540(2008).
19. O. Nunez, K. Nakanishi, T.Tanaka, J.Chromatogr. A 1191, 231-252(2008).
20. I. Ali, F.E.O. Suliman, H.Y.Aboul-Enein, LCGC (supl.) 27,22-33(2009).
21. F.M. Lanças, “Cromatografia Líquida Moderna”, Editora Átomo, pg. 139 (2009).
22. C.S.Horvath, S.R.Lipsky, Nature (London) 322, 748-749 (1966).
23. J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, G.S. Engel, J. Chromatogr. A 890, 3-13 (2000).
24. J.J. Kirkland, T.J. Langlois, J.J. DeStefano, Am. Lab. 39 18-21 (2007).
25. J.J. DeStefano, T.J. Langlois, J. Chromatogr.Sci. 46, 254-260 (2008).
26. F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr.A 1176, 107-122 (2007).
27. F. Gritti, G. Guiochon, J. Chromatogr.A 1216, 63-78 (2009).