

Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida

Parte 2



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

Nesta edição continuamos 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 da solução desse tipo de problema. Assim como no artigo anterior, neste artigo são focados assuntos que se relacionam não apenas com aspectos físicos, mas 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 as estratégias para superação desses problemas serão apresentadas.

Palavras-chave

Assimetria; picos com cauda; picos com frente, picos distorcidos; CLAE; cromatografia

Abstract

This edition continues discussions about peak shape problems occurring in liquid chromatography. 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. Following the last article, this one brings not only physical but also chemical aspects related with separation. 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.

Em nosso último artigo, fez-se uma introdução aos principais problemas que recaem sobre a aparência de um cromatograma. Em seguida, as ocorrências mais comuns relacionadas a esses problemas foram listadas e começaram a ser discutidas. O “Uso de coluna defeituosa” e o “Uso de solvente com força inadequada para a amostra” foram discutidos em seções do último artigo publicado. A lista com essas ocorrências é repetida abaixo:

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.

Neste presente artigo, dar-se-á sequência a essas discussões, a partir do terceiro tópico da lista acima.

3. Sobrecarga de amostra introduzida na coluna

Problemas com sobrecarga de amostra introduzida na coluna são mais relacionados ao emprego da cromatografia em escala semipreparativa, entretanto, esses problemas também podem ocorrer em escala analítica, quando se trabalha com amostras muito concentradas. Uma sobrecarga de amostra pode ser suspeita quando alguns picos do cromatograma (geralmente os mais intensos) começam a se apresentar alargados e com cauda. Outro indício geralmente observado, conforme cromatograma esquemático na Figura 1, é a diminuição do tempo de retenção dos picos sobrecarregados. Alterações no cromatograma devido a sobrecarga começam a ocorrer quando a quantidade da massa do(s) analito(s) (um ou mais) ultrapassa a capacidade linear da coluna (ou, mais apropriadamente, da fase estacionária encontrada dentro da coluna). Essa capacidade linear pode ser descrita de maneira simplificada como a capacidade que a fase estacionária apresenta de interagir uniformemente com diferentes quantidades de analito introduzidas na coluna. Obviamente, estudos mais elaborados, baseados em cálculos de isotermas e

linearizações por meio de modelos matemáticos trazem uma interpretação físico-química desses fenômenos, porém vão além do escopo deste artigo. Em síntese, na sobrecarga, maior quantidade de analito está presente na coluna do que sítios de interação estão disponíveis; dessa forma, enquanto uma parte dos “espécimes” dos analitos interage normalmente com a fase estacionária, outra parte é eluída adiante sem encontrar sítios de retenção equivalentes.

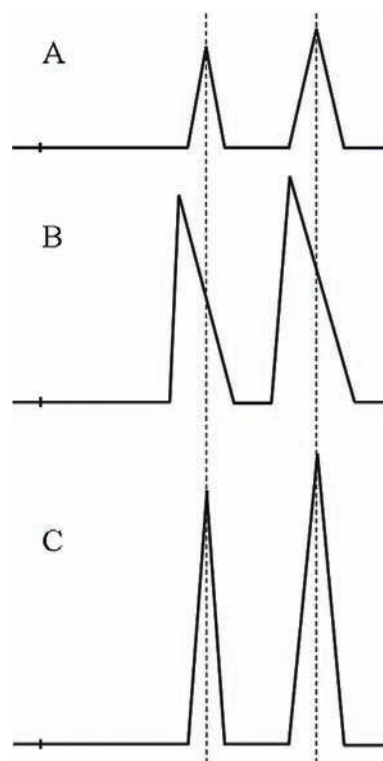


Figura 1. Cromatograma esquemático ilustrando sobrecarga de amostra introduzida na coluna, resultando em picos alargados, com caudas e menos retidos. (A) Quantidade normal de amostra, (B) Sobrecarga de amostra devido a alta concentração, (C) Amostra diluída analisada com proporcional aumento da sensibilidade do detector.

É importante mencionar que a capacidade linear de uma coluna vai depender das características intrínsecas e extrínsecas a ela, as quais vão, desde as dimensões da coluna e densidade de empacotamento, o tipo de fase estacionária, sua carga de fase ligada (quando for o caso), o tamanho das partículas e dos poros, a eficiência da coluna, o tipo de fase móvel, o tipo de analito etc. Apenas para ilustrar essa dependência, apresenta-se a seguinte equação que descreve a quantidade de amostra que pode ser inserida em uma coluna cilíndrica de fluxo axial.¹

$$M_i = A_m \sqrt{n} (v_m + K v_s) \quad (\text{eq.1})$$

Onde, M_i é a massa que pode ser introduzida na coluna, A_m é uma constante para a massa da amostra, n é a eficiência da coluna, v_m é o volume de fase móvel por prato, v_s é o volume de fase estacionária por prato, e K é o coeficiente de partição entre as duas fases. Conforme pode ser observado, a massa que pode ser injetada depende de diversas características da fase móvel, fase estacionária e do próprio analito. Considerando-se uma coluna de 250 x 4,6 mm recheada com partículas convencionais de ODS, para alguns analitos a limite de saturação pode chegar até a 1 mg do composto; porém, em regra, não se espera muito mais do que 100 µg para saturação dos compostos em uma coluna desse tipo, sendo que alguns analitos podem ser saturados em níveis bem inferiores, da ordem de 1 a 5 µg. Dada a variabilidade entre as colunas, analitos e métodos deve-se prestar especial atenção à possibilidade de sobrecarga de amostra quando se trabalha com introdução de quantidades relativamente grandes de analito na coluna cromatográfica. Evidentemente, colunas maiores e de maior diâmetro interno apresentam maior capacidade de amostra, enquanto colunas mais delgadas do tipo *microbore*, capilar ou de nanoHPLC apresentam capacidades bem menores do que aquelas inferidas acima. A Figura 2 ilustra o efeito da sobrecarga de amostra para dois compostos diferentes, bem como a diferença no comportamento de saturação entre ambos (maior saturação da butirofenona).

Quando se trabalha com métodos que envolvem a calibração com concentrações crescentes do analito fica bastante fácil a observação do fenômeno de saturação, pois distorções tais quais aquelas apresentadas na Figura 1 começam a se tornarem proeminentes conforme há o aumento da concentração da amostra. Nesse caso, no desenvolvimento do método deve ser observada a concentração máxima com que se podem realizar as análises sem o aparecimento de distorções. No caso de amostras com concentrações mais altas dos analitos (capazes de gerar saturação), essas devem ser diluídas em proporções apropriadas, geralmente com a própria fase móvel utilizada no início da corrida cromatográfica.

Um cuidado adicional que deve ser mencionado é a observação da capacidade de extração do método de preparo de amostras empregado, quando for o caso do seu uso. Em maneira análoga à coluna cromatográfica, cartuchos de SPE também podem apresentar saturação, bem como outras técnicas de preparo de amostras. Nesse caso, uma diluição prévia da amostra, com a própria matriz (branco) ou com outra solução apropriada, deve ser introduzida e avaliada no desenvolvimento do método. A Figura 3 ilustra o intervalo de linearidade e a sua perda devido à saturação do material de extração preenchido em uma microcoluna do tipo RAM-SPE para análise *online* acoplada à cromatografia líquida.²

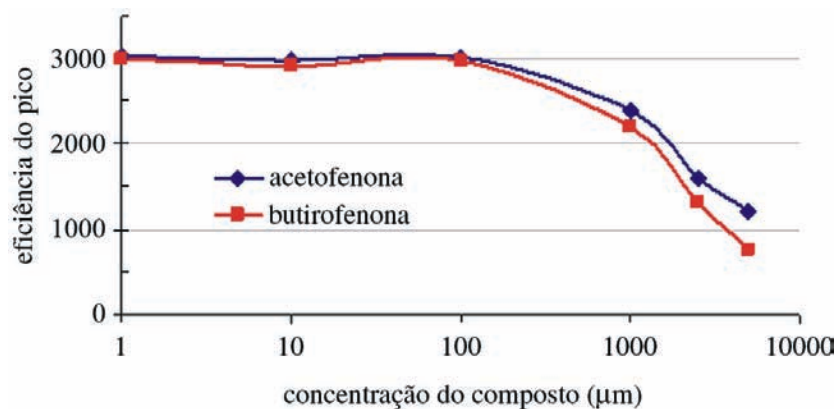


Figura 2. Curva da capacidade de carregamento (*loading capacity*) dos compostos acetofenona e butirofenona em uma coluna do tipo Nucleodur[®] 100-20 C₁₈ ec. Fase móvel: acetonitrila:água (80:20, v/v), vazão de 1,0 ml/min, temperatura de 25 °C, detecção UV.

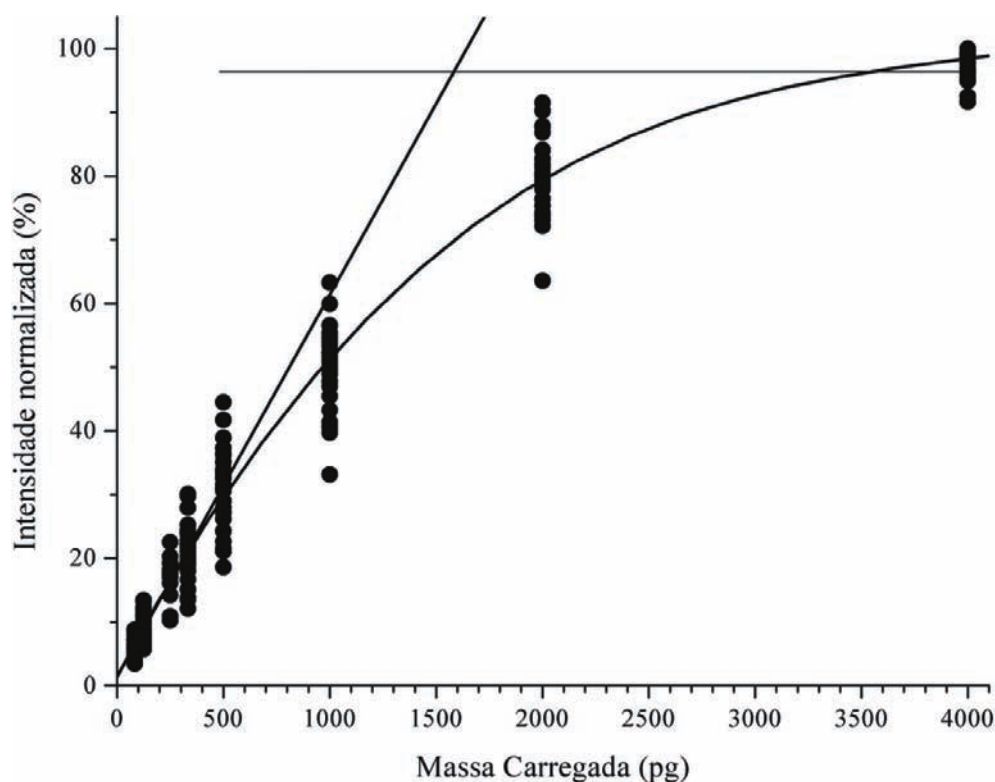


Figura 3. Avaliação da capacidade de carregamento (*loading capacity*) de uma coluna RAM-SPE (1 cm de comprimento). Gráfico normalizado da tendência linear e máximo de carregamento proveniente da injeção simultânea de 11 fármacos em quantidades crescentes de massa. Para maiores detalhes vide referência 2.

Outro caso de problemas com a aparência do cromatograma também causado por sobrecarga do sistema cromatográfico ocorre quando há saturação do sistema de detecção. Essa saturação pode ocorrer tanto com detectores ópticos (UV-Vis e fluorescência, por exemplo) quanto com detectores de outros tipos. Detectores UV costumam ser lineares até aproximadamente 1 unidade de absorvância; todavia em medidas feitas em regiões laterais das bandas dos espectros ou em comprimentos de onda mais curtos o detector pode apresentar resposta não linear mesmo dentro dessa faixa. O principal sintoma de uma resposta não linear do detector é o aparecimento de picos achatados no seu topo (Figura 4). Isso ocorre porque a maior saturação se dá predominantemente na região mais concentrada do pico, ou seja, na região central onde os analitos estão menos dispersos e difundidos na fase móvel. Deve-se observar que os picos não ficam mais largos do que o normal, porém eles perdem o aspecto gaussiano devido a um desproporcional achatamento do seu topo. Ademais, é importante a diferenciação entre a saturação do

detector e a existência de dois compostos em coeluição parcial. Compostos parcialmente coeluídos também podem apresentar-se no formato de um pico achatado, porém nessa situação a diluição da amostra injetada não melhora o perfil, tal qual ocorre quando o problema é a saturação.

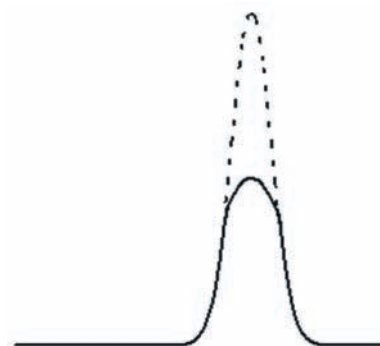


Figura 4. Esquema de pico achatado, típico de saturação do sinal traduzido pelo detector. OBS: o grau de achatamento depende da falta de linearidade/saturação do detector.

Dentre outros detectores, na atualidade, faz-se importante o cuidado com o acoplamento LC-MS (ou LC-MS/MS). Nesses detectores, a saturação pode ocorrer tanto na interface de ionização quanto no analisador, ou ainda no detector dos íons (multiplicadora de elétrons, por exemplo). A ionização por *electrospray* é uma das mais sensíveis à alta concentração de espécies ionizadas na solução. Nesse tipo de interface, a presença de muitos íons leva à chamada supressão da ionização, uma das principais fontes de erros devido a um preparo de amostra ineficiente. O próprio analisador de massas, em alguns casos, pode causar problemas de saturação. É reconhecido o fato de que analisadores do tipo *ion trap* quando preenchidos com quantidade excessiva de íons apresentam o efeito de espaço-carga (*space-charge effect*), nesse caso há repulsão e perda de íons de mesma carga quando confinados em número excessivo no pequeno espaço do analisador *ion trap*. O principal problema no detector de íons é a saturação da multiplicadora de elétrons, nesse caso, a partir de certo nível da contagem de íons, ela deixa de ter um aumento proporcional à densidade de íons que chega para detecção. O comportamento não linear do detector é facilmente diagnosticado pelo gráfico de calibração, pois a falta de linearidade também se reflete nas respostas analíticas das concentrações mais altas.

4. Ocorrência de efeitos extracoluna

Nos últimos anos, a cromatografia líquida tem presenciado a introdução de novas colunas, mais curtas, finas e preenchidas com partículas menores. Essas novas colunas têm sido utilizadas no máximo do seu desempenho porque também houve o desenvolvimento de instrumentos de HPLC capazes de atingir pressões mais altas em sistemas com pequeno volume extracoluna. Geralmente, esses sistemas são comercializados com a sigla UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) quanto atingem pressões da ordem de 1000 bar ou superiores, ou ainda com a nome de “fast HPLC” quando trabalhando com pressões inferiores a essas. Em português, usam-se, respectivamente, os termos Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e Cromatografia Rápida.

O uso dessas colunas é desejado porque com elas são obtidas separações com picos mais estreitos e altos (incrementando a sensibilidade), além de análises mais rápidas e com economia de solventes. Por outro lado, essas colunas demandam um melhor

desempenho do sistema cromatográfico. Esse melhor desempenho, além da capacidade de fornecer altas pressões, inclui, também, a necessidade por um reduzido volume morto extracoluna. Durante anos, o uso de colunas com comprimento entre 150 e 250 mm, com diâmetro interno de 4,6 mm e usando partículas de 5 µm ou maiores, tornou as separações cromatográficas praticamente imunes às falhas na configuração e dimensionamento das tubulações e demais dispositivos do sistema cromatográfico. Todavia, a introdução de novas colunas, principalmente para serem usadas em sistemas já implantados no laboratório, pode levar a sérios problemas relacionados ao alargamento dos picos cromatográficos e consequente perda de resolução, quando um excesso de volume extracoluna estiver presente. Nesse caso, a combinação crítica é o excesso de volume morto – de sistemas mais antigos e mal dimensionados – com o uso de colunas mais exigentes – ou seja, mais modernas e eficientes.

Diante do exposto, uma melhor compreensão do efeito do excesso de volume extracoluna se faz importante ainda nos dias de hoje. Para isso devemos ter o entendimento de que a separação cromatográfica ocorre com base em um processo físico-químico que leva à dispersão dos analitos introduzidos no sistema, ou seja, leva ao alargamento da banda que atravessa o sistema, do injetor até o detector.

O número aparente de pratos (N_a) expressa a eficiência do sistema cromatográfico, podendo ser descrito, em termos volumétricos, como:

$$N_a = \frac{V_R^2}{\sigma_{total}^2} \quad (\text{eq.2})$$

onde V_R é o volume de retenção do composto e σ_{total}^2 é a variância volumétrica total do pico eluído correspondente.

A variância volumétrica total expressa toda a perda de eficiência devido ao alargamento da banda através de um sistema cromatográfico. Essa perda total corresponde às contribuições de cada parte do sistema. Como as perdas individuais são consideradas independentes, a variância volumétrica total pode ser escrita como:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{coluna}^2 + \sum \sigma_{extracoluna}^2 \quad (\text{eq.3})$$

onde σ_{coluna}^2 é a variância devido ao alargamento da banda dentro coluna, e os termos $\sigma_{extracoluna}^2$ são relacionados com as diversas fontes de volume morto que alargam os picos fora da coluna. Obviamente esse cálculo também pode ser feito considerando as contribuições que cada parte envolvida na separação

apresenta sobre o volume total do pico cromatográfico ($V_{p_{total}}^2$), lembrando de considerar que os termos quadráticos é que são aditivos:

$$V_{p_{total}}^2 = V_{coluna}^2 + \sum V_{extracoluna}^2 \quad (\text{eq.4})$$

A diferença entre N e Na deve ser evidenciada. O número de pratos (N) descreve a eficiência da coluna, e só pode ser obtido se o alargamento extracoluna for eliminado. Assim, a eficiência da coluna pode ser descrita como:

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma_{coluna}^2} \quad (\text{eq.5})$$

Dentre os fatores que contribuem para o alargamento extracoluna do pico cromatográfico podem-se considerar a geometria e o volume do sistema de injeção e de detecção, os tubos e peças de conexão entre o sistema de injeção e a coluna e entre a coluna e o sistema de detecção, e a própria constante de aquisição empregada pelo detector (*time constant*).

$$\sigma_{extracoluna}^2 = \sigma_{injetor}^2 + \sigma_{conexões}^2 + \sigma_{tubos}^2 + \sigma_{detector}^2 + \sigma_{time_const}^2 \quad (\text{eq.6})$$

Dessa forma, uma adequada redução no volume de injeção, nas linhas de conexão, e no volume de detecção, entre outros, é requerida nos casos em que a própria contribuição da coluna ao alargamento é pequena (como é o caso das colunas modernas).

Para um mais completo entendimento dos fatores relacionados com o alargamento dos picos cromatográficos e o cálculo de eficiência, algumas fórmulas importantes são apresentadas e discutidas.^{3,4} A eficiência em LC é baseada no número de pratos (N), e esse está relacionado com h (altura reduzida do prato), como apresentado a seguir:

$$N = \frac{L_c}{hd_p} \quad (\text{eq.7})$$

onde L_c é o comprimento da coluna e d_p é o diâmetro da partícula. O volume morto da coluna (V_0) pode ser calculado como:

$$V_0 = \frac{d_c^2 \pi}{4} L_c \epsilon_{tot} \quad (\text{eq.8})$$

onde, d_c é o diâmetro interno da coluna e ϵ_{tot} é a porosidade total da coluna. A velocidade linear da fase móvel (u) e a vazão da coluna (F) podem ser definidas como a seguir:

$$u = \frac{vD_m}{d_p} \quad (\text{eq.9})$$

onde v é o termo reduzido chamado de velocidade reduzida e D_m é o coeficiente de difusão do analito na fase móvel.

$$F = \frac{ud_c^2 \pi \epsilon_{tot}}{4} \quad (\text{eq.10})$$

Dessa forma, o tempo de retenção de um composto não retido (t_0) pode ser calculado como $t_0 = L_c/u$, o tempo de retenção (t_R) de um analito com fator de retenção (k) como $t_R = (k \cdot t_0) + t_0$, e o volume de retenção (V_R) é o produto de F e t_R . A largura do pico (4σ) e o volume do pico (V_p) são apresentados nas equações a seguir:

$$4\sigma = 4 \frac{t_R}{\sqrt{N}} \quad (\text{eq.11})$$

$$V_p = 4\sigma F \quad (\text{eq.12})$$

Com o conhecimento dessas considerações iniciais é possível calcular o valor para o maior volume de injeção (V_i) que pode ser introduzido sem causar alargamento excessivo do pico cromatográfico. Esse valor é:

$$V_i = \theta V_R \frac{K}{\sqrt{N}} \quad (\text{eq.13})$$

onde, K é um parâmetro característico da qualidade da injeção e geralmente é assumido igual a 2,³ e θ^2 define a fração aceitável para o alargamento do pico. Por exemplo, 1% de alargamento ($\theta^2=0,01$) resulta em θ igual a 0,1. De maneira similar, o volume máximo aceitável de detecção (V_d) é:

$$V_d = \frac{\theta V_R}{\sqrt{N}} \quad (\text{eq.14})$$

e o comprimento para os tubos capilares de conexão é:

$$L_{cap} = \frac{384\theta^2 D_m V_R^2}{\pi N F d_{cap}^4} \quad (\text{eq.15})$$

Dessa forma, enquanto para colunas convencionais (250 x 4,6 mm, 5 μ m) algumas dezenas de microlitros de volume morto extracoluna não são um incômodo, para colunas modernas e mais eficientes alguns poucos microlitros podem significar a diferença entre o sucesso e o fracasso na separação de dois picos adjacentes.

Além das equações 13 e 14, uma regra empírica, geralmente um pouco mais permissiva, para a determinação do volume máximo a ser injetado ou utilizado no sistema de detecção afirma que esse não deve ultrapassar 15% do volume do pico em condições ideais de análise.

Em resumo, para a correção de problemas com volume morto extracoluna, deve-se promover a remoção de qualquer pedaço de tubo desnecessário no sistema cromatográfico, bem como substituir as conexões inapropriadas e os tubos longos e de maior diâmetro por outros mais curtos e estreitos. Um cuidado ao se fazer essa substituição é a utilização de filtros de linha de 0,5 μm de diâmetro interno, uma vez que tubos mais estreitos são facilmente entupidos. A escolha dos tubos dependerá do tipo de coluna a ser utilizada, sendo que, atualmente, tubos com diâmetro interno inferior a 20 μm podem ser encontrados em sistemas de nanoHPLC. Preferencialmente, tubos de pelo menos 178 μm (0,007") devem ser utilizados, quando os tubos mais estreitos não forem estritamente necessários, de modo a prevenir-se entupimentos. Outro ponto a ser checado na resolução desses problemas extracoluna é o excesso de volume de injeção e de detecção, para tal, as equações apresentadas ou a regra dos 15% são opções para se verificar possíveis implicações desses fatores. O excesso de volume de injeção pode ser corrigido diminuindo-se o volume injetado, ou estabelecendo-se um procedimento de focalização dos analitos no sistema cromatográfico; por outro lado, o excesso de volume de detecção deve ser resolvido pela substituição da célula de detecção por outra de menor volume, ou melhoria da geometria do sistema de detecção, seja ele qual for. Como pode ser observado pelas equações 13 e 14, os compostos mais retidos (com maior V_R) são mais tolerantes a presença de volume morto extracoluna, dessa forma, outra opção

para minimizar esses efeitos é o aumento da retenção dos compostos de interesse no interior da coluna cromatográfica.

Em outra oportunidade será apresentada a forma como a eficiência (N) e o total do volume extracoluna podem ser inferidos por meio dos dados de separação, bem como mais dados numéricos serão fornecidos para exemplificar os efeitos que causam o alargamento da banda cromatográfica fora da coluna de separação.

Como apresentado na introdução deste artigo, são vários os problemas causadores de distorções nos picos cromatográficos, esses problemas foram listados e estão sendo tratados, um a um.

Referências Bibliográficas

1. Scott, R.P.W., **Chromatography Books Series: Preparative Chromatography**. Disponível online: <<http://www.chromatography-online.org/Preparative/Loading-Capacity/rs2.html>>, Acesso em: 02 nov. 2009.
2. Santos-Neto, A.J. **Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada**. 2007. 216 f. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-15012008-114604/>> Acesso em: 02 nov. 2009.
3. Meyer, V.R. High-performance liquid chromatographic theory for the practitioner. **J. Chromatogr.**, v. 334, p. 197-209, 1985.
4. Kucera, P. **Microcolumn high-performance liquid chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 1984 (Journal of chromatography library 28)