

O Renascimento das partículas superficialmente porosas (“core shell particles”) em HPLC

Fernando M. Lanças

*Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos
13560-970 São Carlos (SP)*

Resumo

Neste trabalho são discutidas as principais características das partículas superficialmente porosas (também denominadas de “core shell particles” ou porous shell particles”) e seu uso em HPLC. Dentre as principais vantagens geralmente atribuídas a estas partículas, uma das principais é a preparação de colunas com elevada eficiência e que permitem análises rápidas. As colunas feitas com partículas superficialmente porosas são comparadas com aquelas equivalentes empacotadas com partículas totalmente porosas. Outra vantagem marcante seria a geração de pressões muito mais baixas, o que permite o uso de equipamentos convencionais para separações rápidas. Aplicações destas colunas são também discutidas.

Abstract

In this work the main characteristics of superficially porous particles (also termed core shell particles and sometimes porous shell particles) and their use in HPLC is discussed. Amongst the major advantages usually attributed to these particles one of the salient ones is the preparation of highly efficient columns, which allows high speed separations. The superficially porous column characteristics are compared with those of the equivalent totally porous particles. Another advantage of the former is the lower backpressure generated at high flow rates, thus allowing the use of conventional HPLC systems for fast analysis. Applications of these columns are also discussed.

Palavras-chave

Fases estacionárias; núcleo fundido; partículas superficialmente porosas.

Keywords

Stationary phases; fused core; superficially porous particles; core shell particles.

1 Histórico

1.1. Os pioneiros do desenvolvimento de micropartículas para a cromatografia Líquida Moderna (HPLC)

Durante vários anos, partículas *totalmente porosas* de tamanhos relativamente grandes foram amplamente utilizadas em cromatografia líquida de baixa pressão. Apesar de apresentarem boa capacidade (ou seja, permitirem a separação de quantidades relativamente grandes de amostras), apresentavam duas limitações importantes: baixa eficiência (número de pratos) e análises lentas. Esse último fato deve-se, principalmente, à existência de poros relativamente profundos nessas partículas, através dos quais os analitos presentes na amostra difundem para dentro e para fora, lentamente. Fato similar ocorreu com as partículas poliméricas porosas empregadas como empacotamento para troca iônica empregadas nos primeiros analisadores automáticos de aminoácidos, os verdadeiros percursores dos equipamentos modernos para cromatografia líquida. Estes materiais apresentavam baixa resistência mecânica e não suportavam pressões acima de moderadas.

Tal situação começou a mudar somente por volta de 1967, quando Czaba Horvath desenvolveu os primeiros *materiais peliculares* para troca iônica (1), introduzindo os modernos materiais de empacotamento, os quais possibilitaram o desenvolvimento da HPLC. Esses materiais consistiam em contas de vidro revestidas com uma camada fina de um polímero orgânico. A parte central rígida (“core”) permitia operações a pressões elevadas para a época, mas a eficiência das colunas estava bastante aquém do desejado devido às propriedades ruins de transferência de massa da fase estacionária.

Apenas dois anos depois, em 1969, Kirkland publicou um trabalho pioneiro que descrevia o desenvolvimento de *partículas superficialmente porosas*, as quais apresentam melhores propriedades de transferência de massa (2). Esses novos materiais de empacotamento foram também denominados, na época, de empacotamento poroso ou contas com camadas porosas (“*porous layer beads*”). As

partículas apresentavam diâmetro médio entre 30 e 55 μm , consistindo em um núcleo feito com conta de vidro ao qual uma camada intermediária de sílica ou alumina, de espessura entre 1 e 3 μm , era fundida. Esses novos materiais foram amplamente utilizados em praticamente todas as formas de cromatografia líquida, da troca iônica à fase reversa. Por possuírem um volume de poro muito menor, permitiam a difusão rápida dos analíticos para dentro e para fora da fase estacionária.

A Figura 1 apresenta uma fotografia dos pioneiros do desenvolvimento de micropartículas para HPLC: Czaba **Horvath** e Jack **Kirkland**.

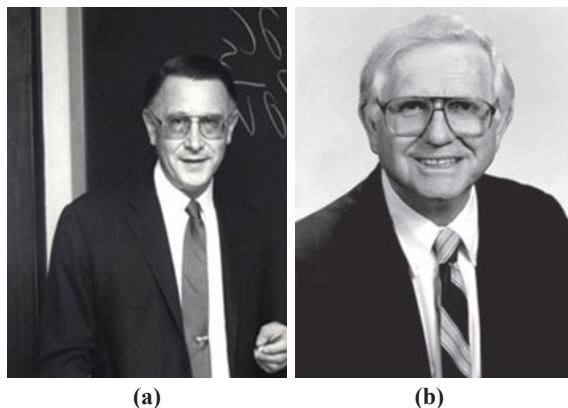


Figura 1. Pioneiros do desenvolvimento de micropartículas para HPLC. (a) Czaba Horváth; (b) Jack Kirkland.

1.2. O declínio do emprego das partículas superficialmente porosas em HPLC

O desenvolvimento da teoria da cromatografia líquida moderna por diferentes pesquisadores (3) rapidamente demonstrou que a eficiência em cromatografia líquida era governada principalmente pelo tamanho e uniformidade das partículas da fase estacionária: quanto menores e mais uniformes, mais eficientes seriam as colunas. Apesar do grande esforço empregado na tentativa de desenvolver partículas superficialmente porosas com tamanho pequeno, as dificuldades técnicas da década de 70 não permitiram grandes avanços nesta direção. Assim, com o desenvolvimento de *micropartículas totalmente porosas* com diâmetros inferiores a 10 μm

fez com que o uso das partículas superficialmente porosas ficasse relegado ao empacotamento de pré-colunas e cartuchos para extração em fase sólida. As partículas totalmente porosas eram preparadas

em tamanhos bastante menores e com faixas mais estreitas de distribuição do que as superficialmente porosas sintetizadas na época (Figura 2).

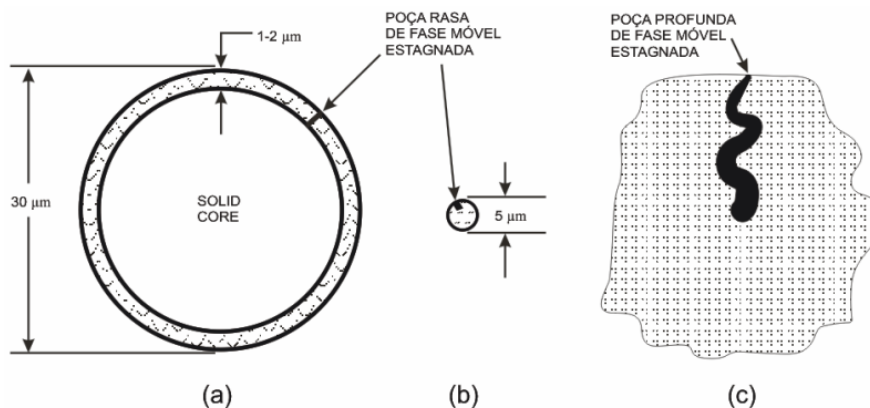


Figura 2. Tipos de partículas utilizadas na preparação de colunas no início da HPLC; (a) partículas superficialmente porosas, de grande diâmetro interno (usualmente entre 40 e 60 µm); (b) partículas totalmente porosas de diâmetro interno pequeno (usualmente inferior a 10 µm); (c) detalhe dos poros profundos das partículas totalmente porosas. Modificado de Poole, C.F. e Poole, S.K., “Chromatography Today”, Elsevier, Holanda, 1995.

Sendo mecanicamente robustas, não requeriam o uso de um núcleo e mantinham a característica da difusão rápida, característica dos materiais peliculares (4). Comparadas com as superficialmente porosas da época, as colunas preparadas com os novos materiais totalmente porosos apresentavam maior

capacidade (quantidade de amostra a ser injetada), menor tempo de separação e, principalmente, maior eficiência (número de pratos, N). A Tabela 1 compara algumas das principais características das partículas superficialmente porosas e das totalmente porosas.

Tabela 1. Características das partículas totalmente porosas e superficialmente porosas empregadas no início de HPLC.

Propriedade	superficialmente porosas	totalmente porosas
Tamanho médio de partícula (µm)	30 - 40	3 - 10
Comprimento típico das colunas (cm)	50 - 100	10 - 30
Diâmetro típico da coluna (mm)	2	20
Queda de pressão (psi/cm)	10 - 15	400 - 600
Área superficial (m ² /g)	2	2 - 5

No final da década de 80, uma variação do empacotamento pelicular foi desenvolvida (5) na forma de *micropartículas não porosas*, com diâmetro típico entre 1 e 3 μm . A principal aplicação e enfoque desse material foi na separação de biopolímeros, devido à sua elevada resistência mecânica, aliada a uma melhora nas propriedades de transferência de massa. Isso ocorre principalmente devido à eliminação do processo lento de difusão dos biopolímeros que nos poros dos materiais convencionais de empacotamento acontecia até então. As principais desvantagens desse tipo de empacotamento são a baixa capacidade e área superficial, além do fato de que, devido ao uso de partículas de diâmetro muito menor que as anteriormente descritas (tipicamente 1,5 μm), a queda de pressão das colunas era muito elevada, fazendo com que apenas colunas curtas fossem empregadas na prática.

1.3. O renascimento das partículas superficialmente porosas em HPLC

O início do século XXI foi marcado por intensa pesquisa que visava a diminuição do tempo de análise em HPLC (6), sem perdas significativas no poder de separação. Assim, durante o início da presente década, existiam basicamente dois tipos de materiais de empacotamento baseados em sílica e comercializados para HPLC: (a) partículas totalmente porosas de tamanho médio, entre 3 μm e 10 μm ; (b) partículas porosas ou não porosas de tamanho médio inferior ou em torno de 2 μm .

As partículas totalmente porosas, e amplamente utilizadas em HPLC nesse período, mostraram-se uma excelente opção para a análise de biomoléculas, especialmente proteínas e ácidos nucleicos. Infelizmente, as limitações de transferência de massa, que ocasionavam longos tempos para que as macromoléculas possam atravessar a estrutura porosa para interagir com o interior da fase estacionária, acarretam limitações na velocidade de análise dela. Uma alternativa para tentar contornar tal limitação de transferência de massa tem sido o uso de partículas totalmente porosas de tamanho bastante reduzido, usualmente inferior a 2 μm (sub-2 μm). Entretanto, devido ao aumento na

velocidade de eluição dos compostos, os picos se tornam bastante mais estreitos, requerendo equipamentos especiais de maneira a otimizar o uso de partículas tão pequenas. A utilização dessas partículas em equipamentos convencionais tem resultado em picos bastante largos, eliminando as potenciais vantagens da técnica. Outro aspecto importante do uso de partículas pequenas é o aumento considerável da pressão (acima de 10.000 psi), usualmente superior à pressão limite dos equipamentos “convencionais” de HPLC atualmente no mercado (7). Esse fato deu origem ao desenvolvimento da *U-HPLC* (Ultra- High Performance Liquid Chromatography ou Ultra High Pressure Liquid Chromatography - Cromatografia Líquida de Desempenho Ultraelevado ou Cromatografia Líquida a Pressões Ultraelevadas).

A U-HPLC utiliza partículas de fase estacionária de diâmetro inferior a 2 μm , de maneira a melhorar a eficiência em relação às colunas convencionais de HPLC. Isso pode ser obtido por meio de dois enfoques: uma eficiência maior (maior número de pratos) e uma maior resolução, ou em análises rápidas com a mesma resolução (ou uma mistura dos benefícios dos dois enfoques) (8). Um método U-HPLC poderá facilmente economizar até 75% do tempo de análise quando comparado com a mesma situação analítica em que se emprega uma coluna convencional de HPLC de seletividade similar (2,3). Entretanto, para que tais objetivos sejam atingidos, um novo equipamento dimensionado para as condições U-HPLC precisa ser adquirido ou, pelo menos menos, efetuarem-se “adaptações” expressivas em equipamentos de HPLC convencional para que as vantagens da U-HPLC possam ser alcançadas.

Uma nova alternativa para contornar as limitações apresentadas pelas outras opções foi proposta em 2000 por Kirkland (11). Revitalizando o preparo de colunas superficialmente porosas, agora com tecnologia apropriada para o preparo de partículas menores e com tamanhos mais uniformes e reprodutíveis, Kirkland demonstrou o preparo de partículas com diâmetro total entre 3 e 6 μm , contendo um núcleo (“*core*”) de sílica revestido com uma camada porosa (“*porous shell*”), com espessura entre 0,1 e 1 μm e diâmetro de poros em torno de 30 nm (Figura 3). Os resultados

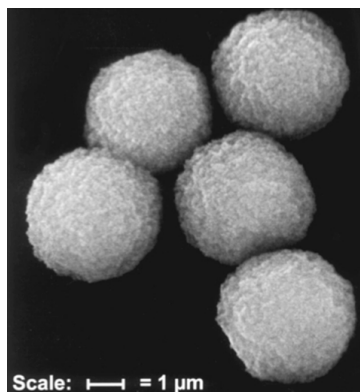


Figura 3. Fotomicrografia (SEM – Scanning electron microscopy) de partículas superficialmente porosas.

obtidos neste trabalho demonstraram que as colunas preparadas apresentavam eficiência similar àquelas equivalentes preparadas com partículas totalmente porosas, porém com um tempo de análise bastante inferior para macromoléculas em razão da diminuição do tempo de transferência de massa devido à camada mais fina sobre o núcleo, quando se comparam às totalmente porosas. Posteriormente (12), Kirkland descreveu o preparo de partículas superficialmente porosas com diâmetro total de 2,7 μm, contendo uma camada porosa de 0,5 μm de espessura, com poros de diâmetro igual a 90 Angstroms (Figura 4). Apesar de a camada superficial

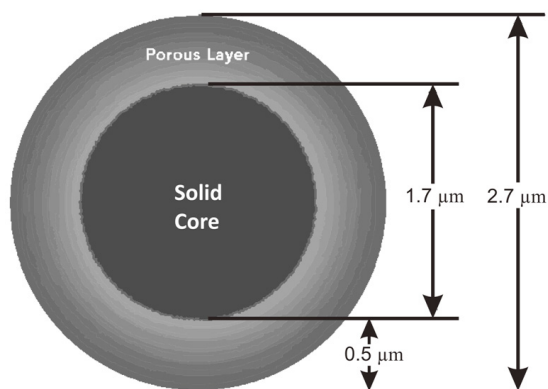


Figura 4. Esquema de uma partícula de núcleo fundido (“fused core”) ou superficialmente porosa.

porosa ser relativamente fina, ela representa mais de 70% do volume total da partícula, aumentando assim a capacidade (quantidade de amostra que ela suporta) em relação aos problemas iniciais apresentados por esse tipo de fase estacionária.

Atualmente, as principais empresas que produzem colunas empacotadas com partículas superficialmente porosas são: Advanced Material Technology, Wilmington, USA (Halo); Supelco, Bellefonte, USA (Express); Agilent, Technologies, Palo Alto, USA (Poroshell) e Phenomenex, Torrance, USA (Kinetex). Vários distribuidores internacionais comercializam essas colunas, e diversas empresas da área têm apresentado trabalhos em congressos internacionais sugerindo que, em breve, deverão também comercializá-las.

2 Características das partículas superficialmente porosas em HPLC

As separações ultrarrápidas obtidas com o uso das colunas superficialmente porosas não são obtidas exclusivamente devido ao tamanho relativamente pequeno das partículas (tipicamente inferior a 3 μm, já incluída a camada porosa, Figura 5) mas, principalmente, devido às características típicas do material. As partículas são preparadas a partir de sílica tipo B, a qual é sintetizada por um processo sol-gel, o qual permite melhor controle do tamanho e uniformidade das partículas, e da presença de traços de metais, os quais podem ocasionar problemas especialmente na análise de compostos polares. Posteriormente, a densidade das partículas de sílica é aumentada e então elas são fundidas à camada porosa, resultando em um material único para HPLC. A Tabela 2 apresenta algumas das principais características das partículas superficialmente porosas empregadas em HPLC.

A dependência da eficiência de uma coluna expressa como a altura equivalente a um prato (H) em velocidade linear (μ) da fase móvel é dada pela equação de van Deemter (3):

$$H = A + B/\mu + C\mu$$

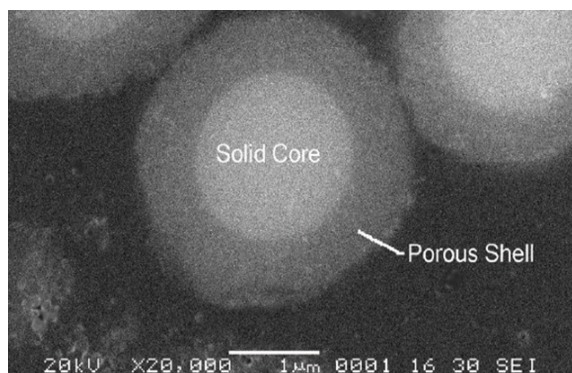


Figura 5. Fotomicrografia de um corte de partículas superficialmente porosas, ilustrando o núcleo (“solid core”) e a superfície constituída de uma camada porosa (“porous shell”).

O valor do termo A, difusão longitudinal, reflete os múltiplos caminhos existentes dentro da coluna por onde as moléculas do analito poderão passar. O tamanho das partículas do empacotamento, a distribuição do tamanho delas, e a uniformidade

da cama empacotada são os principais fatores determinantes do valor de A. Devido à elevada densidade e à distribuição bastante estreita do tamanho das partículas de núcleo fundido, as colunas preparadas com elas podem ser empacotadas de forma tão ordenada que o valor do termo A será significativamente menor do que o tipicamente encontrado para colunas empacotadas com partículas totalmente porosas. Essa é uma das razões pelas quais as colunas superficialmente porosas ou de núcleo fundido apresentam número de pratos bastante maior do que seria esperado apenas pelo tamanho das partículas (12).

O termo C, relacionado à transferência de massa, reflete o tempo que o analito demora para difundir para dentro e para fora da fase estacionária. Este termo é relacionado à velocidade da fase móvel, uma vez que velocidades maiores interferem no equilíbrio entre o analito, a fase móvel e a fase estacionária. Quanto mais longo for o caminho que um analito tiver que trafegar dentro dos poros da fase

Tabela 2. Especificações típicas de uma coluna de HPLC atual contendo partículas do tipo “superficialmente porosas”.

Suporte da Fase Estacionária (núcleo ou fused core)	
tipo da sílica	“tipo B” ultra pura
núcleo	constituído de partículas sólidas de 1.7 µm com uma camada porosa de 0.5 µm na superfície
camada porosa	fundida na superfície
área superficial	150 m ² /grama
tamanho de poro	90 Å
Fase Ligada na superfície (camada porosa ou porous shell)	
Ligação química	tipo monomérica
Fase ligada	alta densidade
Capoteamento (“endcapping”)	maximizado
Cobertura C18	3.5 µmoles/m ²
Cobertura C8	3.7 µmoles/m ²
Faixa de pH	2 a 9
Pressão máxima	9,000 psi, 600 Bar

estacionária do suporte, mais impactante será o efeito da velocidade da fase móvel na eficiência da coluna. O caminho que um soluto tem que passar dentro das partículas do suporte da fase estacionária pode ser diminuído ao se reduzir o tamanho das partículas, o que geralmente é feito para cromatografia líquida ultrarrápida. Partículas de menor tamanho apresentam menores caminhos para difusão e, portanto, são menos afetadas por um aumento na velocidade da fase móvel (12). Em função de suas características intrínsecas, as colunas superficialmente porosas com uma camada de apenas 0,5 μm apresentam um caminho para transferência de massa de um terço quando comparadas com as totalmente porosas, resultando em colunas mais eficientes (Figura 6).

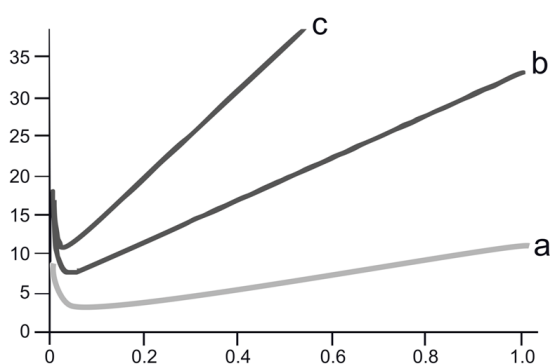


Figura 6. Gráfico de van Deemter comparando a eficiência entre colunas de HPLC. (a) 3,5 μm ; (b) superficialmente porosa (Figura 4); (c) 1,7 μm .

Com o aumento da massa molecular dos analitos, a velocidade de difusão diminui, tornando o efeito descrito ainda mais evidente. O resultado será uma coluna que pode atingir separações bastante rápidas (12,13), notadamente para analitos de massa molecular elevada. Guiochon (14) recentemente mostrou que apesar de, praticamente, nenhuma diferença ser observada entre o uso de colunas com partículas superficialmente porosas e totalmente porosas para a análise de moléculas pequenas, no caso de macromoléculas, uma cinética muito mais rápida e uma melhora marcante em fluxos mais elevados foram observados em favor das partículas superficialmente porosas.

3 Aplicações das colunas contendo fase estacionária superficialmente porosa

Apesar de disponível comercialmente em pelo menos 4 tipos de empacotamento diferentes (C8, C18, Amida e HILIC), a grande maioria das aplicações das colunas contendo núcleo fundido (superficialmente porosas) publicadas até o momento utilizaram colunas do tipo C18. Os interessados no assunto devem consultar, pelos menos, as referências de 15 a 24.

4 Conclusões

No presente trabalho, as principais características das colunas denominadas superficialmente porosas ou com núcleo fundido são apresentadas e discutidas. Apesar de desenvolvidas originalmente há décadas, essas colunas apenas recentemente puderam ser preparadas na forma apropriada graças a novas tecnologias da última década. De acordo com os dados disponíveis na literatura, tanto em periódicos quanto nos folhetos de divulgação das empresas que comercializam essas colunas, elas apresentam, como principal característica, o fato de poderem gerar eficiências elevadas (grande número de pratos) em análises rápidas. Essas colunas seriam mais rápidas do que as totalmente porosas de 2,0 μm , porém operando com metade da pressão (apesar de apresentarem estabilidade até pressões elevadas – em alguns casos até 12.000 psi), o que permite o uso de equipamentos convencionais (25). Apresentando uma boa capacidade de carga, elas poderão, no futuro, tornar-se interessantes para separações semipreparativas e preparativas. Diante de um potencial tão promissor, valerá a pena acompanhar a trajetória dessas colunas e verificar se irão efetivamente ocupar um lugar de destaque na área de separações rápidas e eficientes em HPLC.

Referências Bibliográficas

1. Horvath, Cz., Preiss, B, Lipsky, S., Anal. Chem. 39, 1422 (1967).
2. Kirkland, J., J. Chromatogr. Sci. 7, 361(1969).

3. Lanças, F.M. “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”, Ed. Átomo, 2009.
4. Majors, R.E., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60,186(1977).
5. Giesche, H., Unger, K.K., Esser, U., Eray, B., Trudinger, U., Kinkel, J.N., J. Chromatogr. 465,39(1989).
6. Lanças, F.M., Sci. Chromatogr. 1, 39, (2009).
7. Lanças, F.M., Sci. Chromatogr. 1, 42 (2009).
8. Swartz, M.E. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 28, 1253–63. (2005)
9. Root, D. Techniques and Strategies for Transferring Methods from HPLC to UPLC. Waters Corp., Milford, MA, 720002520EN.
10. LoBrutto, R.; Makarov, A.; Jerkovich, A.; McGill, R.; Kazakevich, Y.; Vivilecchia, R. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 31, 2253–85. (2006).
11. Kirkland, J.J., Truszkowski, F.A., Dilks Jr., C.H., Engel, G.S., J. Chromatogr. A, 890, 3(2000).
12. Guide to ultra fast HPLC. Quick tips for converting conventional reversed phase HPLC separations to ultra fast separations. MAC-MOD Analytical Inc., 2007.
13. Ali, I., Gaitonde, V.D., Grahn, A., J. Chromatogr.Sci. 48, 386 (2010).
14. Cavazzini, A., Gritti, F., Kaczmarek, N., Marchetti, N., Guiochon, G., Anal.Chem. 79, 5972(2007).
15. McCalley, D.V., J. Chromatogr. A 1193,85 (2008).
16. Gritti, F., Guiochon, G., J. Chromatogr. A 1176, 107 (2007).
17. Marchetti, N., Guiochon, G., J. Chromatogr. A 1176, 206 (2007).
18. Marchetti, N., Cavazzini, A., Gritti, F., Guiochon, G. J. Chromatogr. A 1163, 203 (2007).
19. Gritti, F., Guiochon, G., J. Chromatogr. A 1216, 63 (2009).
20. Bayram-Hahn, Z., Grimes, B.A., Lind, A.M., Skudas, R., Unger, K.K., Galarneau, A., Iapichella, J., Fajula, F., J. Sep. Sci. 30, 3089 (2007).
21. Cunliffe, J.M., Maloney, T.D., J. Sep. Sci. 30, 3104 (2007).
22. Ali, I., Eldin, F., Suliman, O., Aboul-Enein, H.Y., LCGC (Special Issue), Apr 1 (2009).
23. Songa, W., Pabbisetty, D., Groebera, E.A., Steenwyka, R.C., Fast, D.M., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50, 491(2009).
24. Alexander, A.J., Ma, L., J. Chromatogr. A, 1216, 1338 (2009).
25. Chester, T., Am. Lab. 41, 11 (2009).