

$$\frac{(D_V)_1}{(D_V)_2} = \sqrt{\frac{M_2}{M_1}} \sqrt{\frac{\left(\frac{2}{1+\gamma_1}\right)^{\frac{\gamma_1+1}{\gamma_1-1}}}{\left(\frac{2}{1+\gamma_2}\right)^{\frac{\gamma_2+1}{\gamma_2-1}}} \quad (12)$$

A título de exemplo, podemos calcular a reta de padronização do capilar da Tabela I, no caso onde o gás empregado não seria mais o N_2 , e sim o O_2 .

Operando as substituições necessárias na equação (12) vem:

$$(D_V)_{O_2} = 0,94 (D_V)_{N_2} \quad (13)$$

e para fins de verificar a validade deste procedimento, efetuamos a padronização experimental do capilar usando o gás O_2 . Os resultados figuram na Tabela II e na figura 3.

Tabela II – Fluxo de O_2 em função da pressão de P_{O_2} experimental e calculado.

Pressão D_V – (N_2)	D_V cal. (O_2)	D_V exper. (O_2)	% Erro
kg/cm ²	cm ³ /min	cm ³ /min	
1,0	388	358	2
2,0	605	556	2
3,0	814	750	2
4,0	1.019	953	1
5,0	1.233	1.149	1

Para se ter uma idéia da dimensão da seção do estrangulamento do capilar, aplica-se a equação 11 com as devidas substituições:

$$A = 2,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

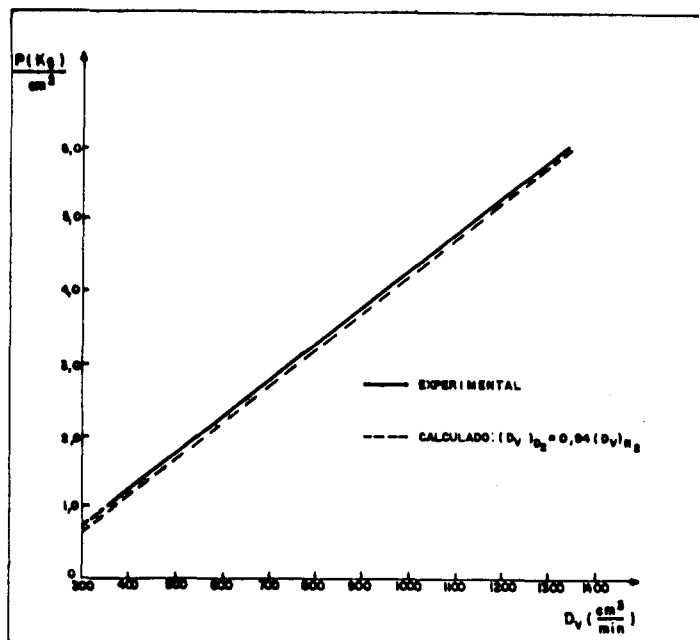


Fig. 3 – Comparação das Curvas de Calibração experimental e calculada para O_2 .

* Os autores agradecem o auxílio concedido pelo CNPq.

Referências Bibliográficas

1. M. Barrère, A. Jaumotte, B. F. de Veubeke e J. Vandekerckhove, "Rocket Propulsion", Elsevier Publishing Company, (1960).
2. Sir J. Jeans, "An Introduction to the Kinetic theory of Gases", Cambridge University Press, (1962).
3. S. Glasstone, "Textbook of physical chemistry", Macmillan and Co. Limited, 2nd Edition (1964).

ARTIGO

A OTIMIZAÇÃO DA RESOLUÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – (CLAE)

José F. Manfredi

Carol H. Collins e Antonio L. P. Valente

Instituto de Química

Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal 6154

13100 Campinas: SP

Recebido em 15/04/83

1 – INTRODUÇÃO

"Independentemente do mecanismo de separação, o que mais interessa ao cromatografista é separar, isto é, resolver a sua amostra."

Esta frase admite várias interpretações e, certamente, terá na sua segunda parte uma concordância geral entre os químicos: o objetivo maior tem de ser a separação, pois só depois disto é que se pode iniciar a interpretação de um cromatograma. Quanto à primeira afirmação da frase acima, ela pode despertar a simpatia de alguns, pelo seu conteúdo "prático", pois de nada adianta conhecer teorias sofisticadas sobre mecanismos de separação se não se consegue um bom cromatograma. Desconhecer, contudo, a teoria da cromatografia, pode conduzir ao empirismo inconseqüente de testar diversas colunas, sem qualquer base para a escolha, "até que uma dê certo". Ao contrário de demonstrar capacidade de trabalho, testes intermináveis e desorientados representam gasto de tempo, reagentes e equipamento de custo elevadíssimo, bem como um desgaste progressivo do prestígio do cromatografista.

Com o propósito de evitar trabalho e despesas desnecessárias, o cromatografista deve ter noção dos parâmetros experimentais que lhe fornecem indicações sobre quais os fatores que ele deve considerar, bem como a ordem em que eles devem ser tratados de forma a otimizar a separação. Este é o objetivo deste artigo.

2 - O QUE É RESOLUÇÃO

A resolução depende, dentre outros fatores, da eficiência e da seletividade da coluna. A eficiência, por sua vez, relaciona-se com o número de pratos teóricos, e pode ser caracterizada pela largura dos picos obtidos. A seletividade depende das composições das fases móvel e estacionária, caracterizando-se pela separação entre os picos. A resolução obtida num cromatograma advém de um compromisso entre esses fatores, como pode ser visto na fig. 1. Assim, má eficiência e seletividade sempre acarretarão má resolução (fig. 1A), pois bandas muito largas e mal separadas tendem a se superpor. Também é possível baixa seletividade com boa eficiência (fig. 1B). Noutros casos, a seletividade é boa, compensando a má eficiência (fig. 1C). O caso ideal (fig. 1D) é boa resolução como resultado de boas eficiência e seletividade.

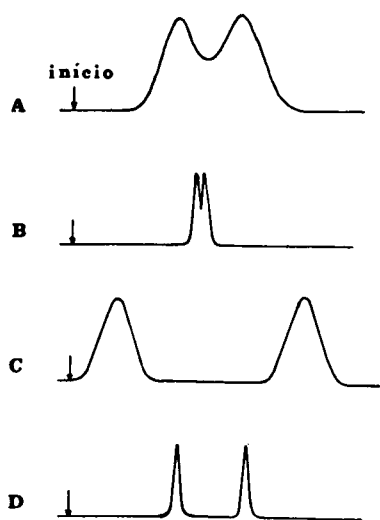


Fig. 1 - Como a Eficiência e a Seletividade da coluna afetam a Resolução. A) Resolução pobre por causa de má Eficiência e Seletividade. B) Má Resolução por causa da má Seletividade, contudo a Eficiência é boa. C) Boa Resolução devido à boa Seletividade, apesar de baixa Eficiência. D) Boa Resolução como resultado de boas Seletividade e Eficiência.

3 - AVALIAÇÃO DA RESOLUÇÃO

Uma vez conhecido o conceito operacional da Resolução, pode-se passar a uma definição formal e matemática do parâmetro. Existem duas abordagens que devem ser consideradas, dependendo do enfoque: a prática, que permite calcular e quantificar a Resolução a partir de dados registrados num cromatograma, e a teórica, que relaciona a Resolução com seus fatores contribuintes.

Em termos práticos, pode-se definir Resolução pela relação:

$$R_s = \frac{\text{distância entre os centros de duas bandas adjacente}}{\text{média das larguras das bases das duas bandas}} \quad \text{ou}$$

$$R_s = \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad (\text{eq. 1})$$

conforme ilustrado na fig. 2, onde t_{R_1} e t_{R_2} são os tempos de retenção de duas espécies, isto é, o tempo que decorre entre a injeção da amostra e o aparecimento dos máximos dos picos. W_1 e W_2 são as larguras das bases dos picos, entendidas como as bases dos triângulos formados pelas tangentes ao lado dos picos com a linha de base do cromatograma.

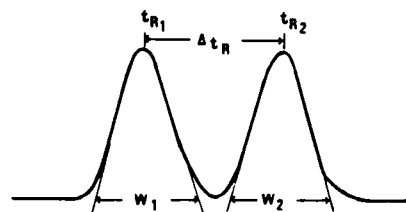


Fig. 2 - A definição de Resolução (vide eq. 1).

Se os dois picos adjacentes têm larguras de bases similares, usa-se simplificar a equação 1 para:

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{W_2} \quad (\text{eq. 2})$$

Na prática, as equações 1 e 2 permitem apenas *avaliar* a Resolução, uma vez que t_R , W_1 e W_2 só podem ser medidos aproximadamente, pelas razões que se seguem:

1. A definição de R_s é limitada por natureza, pois só é válida para picos adjacentes cujas larguras de bases não sejam muito diferentes, caso contrário a média das larguras deixa de ser significativa.
2. Frequentemente os picos reais não são uniformes como os da fig. 2, o que pode dificultar, ou impedir, a medida da largura da base, como ocorre com os picos da fig. 3.

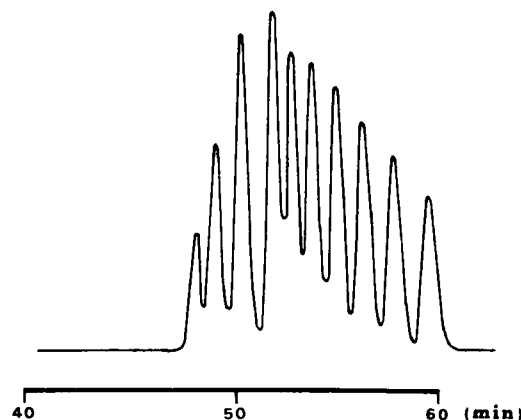


Fig. 3 - Cromatograma com picos com linha de base indefinida². Amostra: hidrocarbonetos C-12 a C-36; coluna: 4 x PLgel 10 um, 60 cm; eluente: THP; fluxo: 1 ml/min.

3. Em muitos casos, a superposição de picos pode resultar em erros na localização dos t_R reais, como mostrado na fig. 4.

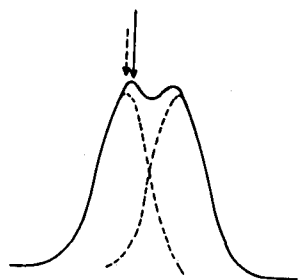


Fig. 4 – Erros possíveis na localização do Tempo de Retenção (seta tracejada = posição real do máximo do pico; seta cheia = posição aparente).

4 – USO DA RESOLUÇÃO

Quando o intuito de uma análise não é o estudo das características de um sistema cromatográfico, mas simplesmente otimizar separações, existem formas bastante práticas para se usar e avaliar R_s , como segue:

1. No caso de dois componentes em proporções equimolares, se seus picos *fossem* triangulares, $R_s = 1$ significaria 100% de separação (fig. 5).

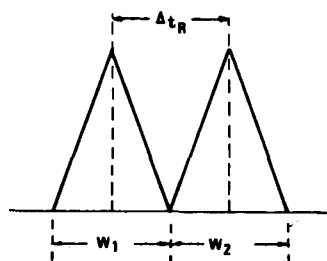


Fig. 5 – Resolução de picos triangulares; haveria 100% de separação para $R_s = 1$.

Os picos perfeitos têm forma gaussiana e, com $R_s = 1$, existe uma pequena superposição das bandas – 2% de uma superpõe-se à outra (fig. 6)¹.

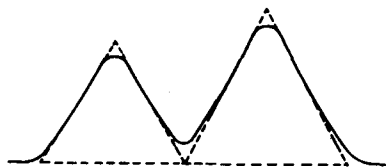


Fig. 6 – A separação de picos *ideais* com $R_s = 1,0$ (há 2% de sobreposição).

Portanto, na prática admite-se 100% de separação para picos adjacentes de áreas iguais quando $R_s = 1,5$. Por outro lado, o mínimo admissível para R_s é 0,8.

3. A Resolução de um cromatograma complexo (fig. 7) pode ser definida de duas maneiras: a) para o cromatograma total: calcula-se R_s para os picos menos separados; b) para um pico determinado: calcula-se R_s tomando-se por base o pico considerado e seu adjacente mais próximo.

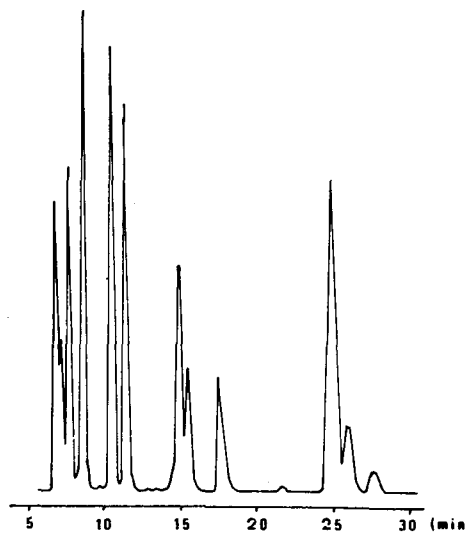


Fig. 7 – Cromatograma com diferentes Resoluções³. Amostra: filtrado da fermentação de carboidratos; coluna: HPX – 87 H (Bio-Rad), 30 cm x 0,8 cm; eluente: H_2SO_4 0,01N; fluxo: 0,6 ml/min.; detector: refractômetro.

4. Pelo fato dos picos reais terem formas que podem ser muito diferentes de triângulos ou gaussianas, a estimativa de R_s pela eq. 1 pode fornecer valores bastante inadequados.

Um trabalho publicado por L. R. Snyder⁴ permite contornar essa dificuldade. Nesse trabalho existem várias curvas-padrão, como a da fig. 8. A idéia é que uma delas seja similar a um cromatograma obtido, o que permite avaliar o significado do mesmo.

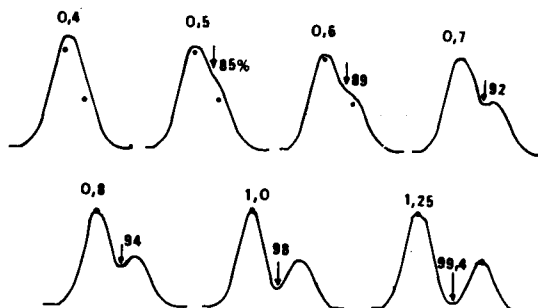


Fig. 8 – Curvas de resolução padrão⁴ para duas espécies com razão 2/1 de quantidades e R_s entre 0,4 e 1,25. As pintas indicam as posições dos máximos dos picos e as setas as porcentagens de separação, do pico maior, conseguidas com os diferentes R_s .

Para se usar essas curvas, como exemplificado a seguir, é necessário observar as seguintes peculiaridades:

- que a razão entre as áreas dos picos é 2:1 – existem outras curvas, para outras razões⁴.
- as pintas pretas, que indicam as posições reais dos máximos dos picos;
- a relação entre o valor de Rs e o formato do cromatograma;
- os valores acima das pequenas setas indicam a composição da primeira banda, quando separada no ponto indicado pela seta.

O cromatograma da fig. 9 ilustra o uso das curvas-padrão da fig. 8.

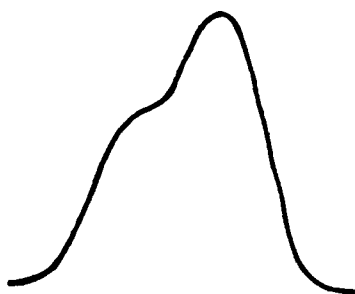


Fig. 9 – Pico de difícil interpretação por causa do formato irregular (ver texto para explicação de possíveis interpretações).

Este cromatograma sugere várias dúvidas: 1) ele tem *um* ou *dois* picos? 2) se são *dois* picos, como separar cada uma das espécies com boa pureza?

A resposta à primeira pergunta pode ser obtida diretamente da comparação das figuras 8 e 9: o cromatograma da fig. 9 é o inverso da terceira curva da fig. 8, de forma que ele poderia ser o cromatograma de duas espécies mal resolvidas, com $R_s = 0,6$. Portanto, devem ser alteradas as condições do sistema cromatográfico, de forma a melhorar R_s , separando os picos para ser conseguida maior pureza das espécies separadas.

5 – A RESOLUÇÃO, A EFICIÊNCIA E A SELETIVIDADE

Otimizar a Resolução de um método cromatográfico é uma tarefa que depende da experiência do cromatografista, pois, freqüentemente, é preciso que se tenha uma visão muito ampla da técnica, de modo a que se possa prever todas as implicações resultantes da alteração de uma condição.

A equação 3 relaciona R_s com os seus parâmetros experimentais, sendo muito útil no seu controle. Os termos A, B e C desta equação são discutidos a seguir.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left(\frac{\alpha + 1}{\alpha} \right) \quad (\text{eq. 3})$$

A B C

Termo A: nele encontra-se o número de pratos teóricos, N, que é a medida de eficiência da coluna*. O valor de N, relativamente a uma dada espécie, pode ser avaliado pela expressão**:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (\text{eq. 4})$$

ou, por:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{eq. 5})$$

onde $W_{1/2}$ é a largura da banda a meia altura – que é útil quando o pico tem cauda, ou quando não há separação completa.

Teoricamente, todas as espécies de um cromatograma deveriam ter o mesmo valor de N, pois, ao migrarem toda a extensão da coluna, elas estariam sujeitas ao mesmo número de interações entre as fases móvel e estacionária. Na prática, contudo, os valores de N são *aproximadamente* iguais⁵.

O número de pratos teóricos relaciona-se com o comprimento da coluna, L, pela expressão:

$$N = \frac{L}{H} \quad (\text{eq. 6})$$

onde H é o parâmetro denominado Altura Equivalente a Um Prato Teórico, definido por Peters para as colunas contínuas de destilação⁶ e adaptado para a Cromatografia por Martin e Synge⁷.

O tratamento matemático que define H e o relaciona com N, t_R e W baseia-se em considerações estatísticas e está fora do propósito deste trabalho. Para as nossas finalidades, é suficiente admitir que é uma boa aproximação considerar H constante para um dado sistema cromatográfico⁷ e que dobrar o comprimento da coluna duplica N e aumenta a Eficiência do sistema.

Termo B: neste termo encontramos o Fator de Capacidade k' , indicado com o índice 2 (k'_2) na equação 3, por referir-se à segunda espécie do par tomado para cálculo de R_s . O Fator de Capacidade é definido como a razão entre o número de moles do soluto na FE e o seu número de moles na FM.

* Na realidade, N é a medida da Eficiência de todo o sistema cromatográfico, isto é, injetor-coluna-detector. Admitindo-se um sistema ideal, somente a coluna refletiria a Eficiência.

** A equação 4 (e também a equação 5) é válida para picos simétricos. Caso contrário é necessário verificar se estas equações podem ser usadas.

$$k' = \frac{n_E}{n_M} \quad (\text{eq. 7})$$

Na prática, k' é calculado a partir da relação:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{eq. 8})$$

onde t_M (também usa-se t_0) é o tempo que as moléculas levam para transitar pelos espaços vazios da coluna. Para medi-lo, injeta-se com a amostra uma espécie que não seja retida, e mede-se a distância entre o máximo de seu pico e o instante zero, isto é, o instante da injeção. O termo t'_R (igual a $t_R - t_M$) é comumente denominado Tempo de Retenção Ajustado, e é a medida do tempo que a substância fica retida (e interagindo) na FE. Em resumo, k' representa a razão entre o tempo que uma substância fica na FE e o tempo que ela fica na FM. Comparando-se duas espécies, a de maior k' é a que permanece mais tempo dentro da coluna, por ser melhor retida pela FE.

A forma do termo B da equação 3 implica numa relação pouco óbvia entre R_s e k' . A tabela 1 facilita esta análise e expõe, claramente, que é trabalho desnecessário tentar alterar as condições cromatográficas para atingir valores de k' superiores a 10.

Interdependência de k' e o termo B da Equação de Resolução (eq. 3)

k'	Termo B [$k'/1 + k'$]
0	0
1	0,50
2	0,67
5	0,83
10	0,91
∞	1,00

Termo C: neste termo aparece α , que é chamado de Fator de Seletividade, Fator de Separação, ou Retenção Relativa. Ele é definido por:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (\text{eq. 9})$$

Portanto, desde que exista *qualquer* Resolução, $\alpha > 1$. Substituindo k'_2 e k'_1 , de acordo com a equação B temos:

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} \quad (\text{eq. 10})$$

o que significa que α é uma medida da Seletividade do sistema cromatográfico, isto é, da propriedade da FE reter as espécies diferencialmente (*selecionar*, em outras palavras).

A equação 3 relaciona a Resolução com as condições de separação e é a chave para os estudos preliminares sobre quais parâmetros (N , k' , α) devem ser alterados para se melhorar a Resolução de um sistema cromatográfico e se otimizar uma separação.

Resumidamente, os efeitos de se alterarem N , k' e α estão representados na figura 10.

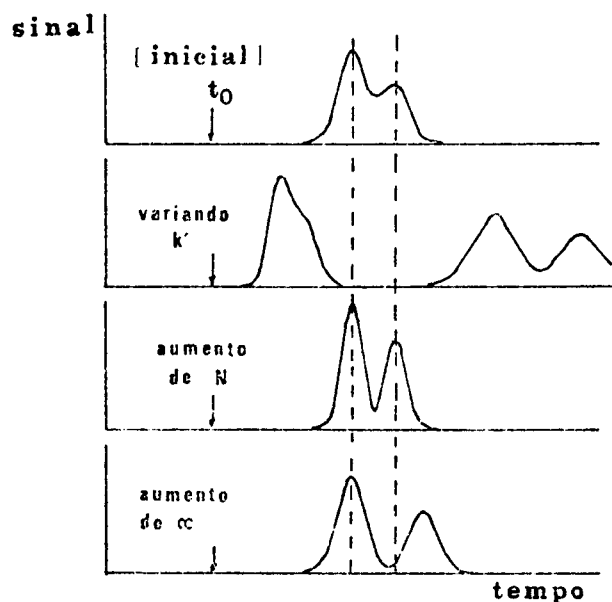


Fig. 10 – Como alterar k' , N ou α afeta a Resolução.

Como critério geral, deve-se procurar alterar k' , N e L nesta ordem, que é de dificuldade experimental crescente. Também como critério geral, qualquer alteração deve ser feita de forma a propiciar menor tempo de análise.

Na figura 11 estão resumidas as considerações acerca de como os termos da equação 3 podem ser variados *experimentalmente*.

OTIMIZAÇÃO DA RESOLUÇÃO (RESUMO)

CRITÉRIO

- 1ª TENTATIVA : ALTERAR k'
 2ª " : ALTERAR N
 3ª " : ALTERAR α

**BUSCAR SEMPRE O MENOR
 TEMPO DE ANÁLISE.**

Para aumentar k' : trocar a FE; alterar a Força do Solvente^a; usar eluição com gradiente^b; alterar a Razão das Fases^c.

- Solventes mais fracos possibilitam maior eficiência da FE.
- Quando alterar a Força do Solvente aumenta demais certos k' .
- $k' = K(V_E/V_M)$, onde K é o Coeficiente de Distribuição e V_E/V_M é a Razão das Fases, a qual é proporcional ao Diâmetro das Partículas (d_p), à Viscosidade da FM e à Superfície Específica do Suporte.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{k_2}{1+k_2} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right)$$

Varia-se N alterando-se: L^d ; P ou F^e ; d_p^f (tal alteração sempre reflete no tempo de análise — maior N , maior tempo).

d. $N = L/H$ e $H = \text{cte}$; assim $2L = 2N$.

e. Pressão (P) e Fluxo (F) são diretamente proporcionais.

f. Mudar d_p significa mudar o suporte — é o último recurso.

Se os solutos são de classes químicas diferentes, eles têm afinidades diferentes pela FE, logo pode ser útil alterar α , variando-se a FE, a composição da FM (alterar a mistura de solventes, o pH, etc), a temperatura, ou usando efeitos químicos especiais. Alterar α é muito eficiente^g, pois, se α aumenta, R_s aumenta, e o tempo de análise diminui.

g. Como exemplo, mantendo $R_s = 1,0$, se α passa de 1,05 para 1,1, N pode ser diminuído de 160.000 para 2.000; isto é, usa-se uma coluna menor e separa-se em menor tempo.

Fig. 11 — Otimização da Resolução: Resumo.

Referências Bibliográficas

- L.R. Snyder e J.J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, New York, 1979, p. 34.
- Applied Science Division, Catalog 22 — LC, 1980, p. 13.
- "The Liquid Chromatographer", Bio-Rad Laboratories, nº 7 EG, 1981, p. 4.
- L.R. Snyder, J. Chromatogr. Sci., 10 (1972) 200.
- E. Johnson and B. Stevenson "Basic Liquid Chromatography", 2ª Ed., Varian, Palo Alto, 1978, p. 23.
- W.A. Peters Jr., Ind. Eng. Chem. 14 (1922) 476.
- A.J.P. Martin e R.L.M. Synge, Biochem. J., 35 (1941) 1358.