

TESTES DE AVALIAÇÃO DE COLUNAS CAPILARES PARA CROMATOGRAFIA COM FASE GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO<sup>1</sup>

Jari N. Cardoso e Francisco Radler de Aquino Neto

*Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
21910 – Rio de Janeiro (RJ)*

## RESUMO

Descreve-se um teste de avaliação, de fácil implementação, desenvolvido por Grob para o controle de qualidade de colunas capilares durante o fabrico ou no monitoramento periódico de desempenho com o uso no laboratório. O ensaio permite, num único cromatograma de fácil interpretação, a obtenção de informações sobre adsorção, eficiência de separação, características ácido-base e espessura do filme de fase estacionária.

## ABSTRACT

A practical performance test, developed by Grob, is described for quality control of capillary gas chromatographic columns during manufacture or subsequent routine use in the laboratory. The test offers in a single chromatogram, of easy interpretation, information on the following characteristics of a column: adsorption, separation efficiency, acid-base behaviour and film thickness.

## INTRODUÇÃO

As colunas capilares empregadas atualmente em cromatografia com fase gasosa de alta resolução possuem características de inércia e eficiência verdadeiramente excepcionais<sup>1,2</sup>.

Contudo, dada a reduzida quantidade de fase estacionária presente, essas características podem ser rapidamente afetadas mesmo por pequenas quantidades de impurezas presentes na amostra ou no gás carreador. Evidentemente, quaisquer alterações de desempenho em relação as especificações só poderão ser percebidas (pelo menos a tempo de uma ação corretiva<sup>3</sup>) através da realização de testes periódicos. Tais testes de desempenho de colunas capilares envolvem sempre a injeção de uma mistura de padrões, convenientemente selecionados, e interpretação do cromatograma obtido. Diferenças existem, contudo, quanto a composição da mistura-teste e as condições experimentais de avaliação<sup>4,5,6,7</sup>. Idealmente, deseja-se obter com um único ensaio todas as informações de interesse na avaliação de uma coluna e na decisão quanto a sua melhor aplicabilidade (características de adsorção, eficiência de separação, comportamento ácido-base e espessura de filme líquido).

Atualmente já existem testes de desempenho que se aproximam bastante deste comportamento ideal, de modo

que na discussão seguinte, em vez de uma revisão exaustiva da literatura, procurar-se-á oferecer sugestões concretas, de fácil implementação, extraídas notadamente da metodologia desenvolvida por Grob<sup>6,7</sup>. Tais ensaios vem sendo utilizados rotineiramente em nosso laboratório há 2 anos, no controle de fabricação de colunas capilares e na avaliação periódica de seu desempenho.

## DISCUSSÃO

A composição da mistura teste é dada na Tabela I, e inclui componentes ácidos, básicos, neutros, hidroxilados e carbonilados convenientemente selecionados de modo a permitir avaliar a interação da coluna com diferentes classes funcionais. As condições cromatográficas de fluxo e temperatura para a realização do teste, bem como um roteiro experimental detalhado, é fornecido no Apêndice. As ordens de eluição dos componentes da mistura-teste em diferentes fases estacionárias são dadas nas Tabelas IIa e b.

A utilização do teste se torna mais clara com o exemplo da Figura 1. Os picos referentes aos dois alcanos (C<sub>10</sub> e C<sub>11</sub>) e aos três ésteres são tomados como referência no traçado da "linha de 100%" (linha tracejada na Fig. 1),

<sup>1</sup> Trabalho realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), convênio nº 42.84.0269/1984-5 com o IQ/UFRJ.

**TABELA I**  
Composição da mistura-teste (Mistura Grob<sup>6,7</sup>)\*a

Componente	Abreviação	Concentração (mg/L)	Indicação
Decano	10	28,3	Referência (100%)
Undecano <sup>a</sup>	11	28,7	Referência (100%)
1-Octanol	ol	35,5	Atividade <sup>+</sup> , ponte de H
2,3-Butanodiol	D	53	Atividade <sup>++</sup> , ponte de H
Nonanal <sup>a</sup>	al	40	Atividade
Ácido 2-etil-hexanoico	S	38	Basicidade <sup>++</sup>
2,6-Dimetil-anilina	A	32	Acidez <sup>+</sup>
2,6-Dimetil-fenol	P	32	Basicidade <sup>+</sup>
Diciclo-hexilamina	am	31,3	Acidez <sup>++</sup>
Decanoato de metila	E <sub>10</sub>	42,3	TZ <sup>b</sup> , referência (100%)
Undecanoato de metila	E <sub>11</sub>	41,9	TZ, referência (100%)
Dodecanoato de metila	E <sub>12</sub>	41,3	TZ, df <sup>c</sup> , referência (100%)

a) Uma mistura alternativa não contém 11 e al, contendo dodecano, 12<sup>6</sup>.

b) TZ = n<sup>o</sup> de separação (Trennzahl).

c) df = espessura do filme de fase.

+ = padrão menos reativo.

++ = padrão mais reativo.

\*) solvente hexano, detalhes de preparação na referência<sup>6</sup>.

já que estes compostos são quase sempre eluidos quantitativamente, sob forma de picos simétricos, de colunas capilares modernas de vidro ou sílica fundida. As quantidades dos outros componentes na mistura é tal que, na ausência de características ácido/base ou de adsorção da coluna, as suas respectivas alturas de pico tocam a linha de 100%. Torna-se assim extremamente fácil visualizar e "quantificar" propriedades da coluna como acidez/basicidade ou atividade/adsorvidade através do efeito sobre as alturas de pico dos compostos apropriados (a indicação fornecida por cada componente da mistura-teste é dada na Tabela I). A coluna cromatográfica da Figura 2, por exemplo, mostra características polares, ácidas e básicas fortes, evidenciadas pela redução dos picos do octanol (ol), 2,6-dimetilfenol (P) e 2,6-dimetilanilina (A), respectivamente.

A utilização de pares de compostos com a mesma finalidade (por exemplo, A/am, P/S, D/ol, Tabela I) visa introduzir na mistura dois referenciais de comparação suficientemente diferenciados e, com isso, estender a faixa de aplicação do teste a situações extremas. Na figura 1b, por exemplo, a presença de acidez residual na coluna não pode ser percebida pelo pico da anilina (A, 100%); seu efeito, contudo, é bastante claro no pico da di-ciclo-hexil-amina (am, 35%), padrão de basicidade mais acentuada. O mesmo critério é aplicável aos outros pares de compostos. Vale ressaltar que, em alguns casos específicos, a diminuição na altura de picos em cromatogramas da mistura-teste se deve a outros fatores que não os ob-

jetivados com o ensaio. Os exemplos mais conhecidos são os do ácido 2-etil-hexanoico (S) em fases apolares (ver, p.ex., Fig. 1) e o dos n-alcenos C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> em filmes delgados (<0,1µm) em fases polares (p.ex. poliglicóis). Nos dois casos, o problema é facilmente perceptível pela assimetria dos picos e se deve as insolubilidades desses compostos nas fases dentro das concentrações da mistura-teste<sup>7</sup>.

Note-se que diversas colunas, mesmo em estado de novas, não conseguiriam "nota dez" para todos os componentes da mistura-teste, o que não as desqualifica necessariamente para o uso diário. Uma coluna com centros ácidos pode ser perfeitamente adequada para a separação de alcanos, ésteres, aldeídos (cetonas), etc. Na verdade, a aparente "neutralidade" de algumas colunas resulta freqüentemente de quantidades equivalentes de centros ácidos e básicos, e não da ausência de centros reativos. Tais problemas não são, entretanto, muito preocupantes em aplicações não-específicas se os seus efeitos no cromatograma se fazem sentir, apenas nos picos dos indicadores mais sensíveis (D, S, am). É óbvio, contudo, que inércia é uma característica desejável e, quanto maior, menor será a degradação da fase estacionária durante o uso freqüente a temperaturas elevadas. Em outras palavras, maior é a vida da coluna. Inércia é também extremamente importante nas análises quantitativas, especialmente de traços, garantindo uma melhor repetibilidade dos resultados.

TABELA IIa

Ordem de eluição dos componentes da mistura-teste em diferentes fases estacionárias<sup>6</sup>

Fase (0,15 $\mu$ m)	Seqüência de Eluição (T eluição E <sub>12</sub> , °C)*												
	Capilar tratado com BaCO <sub>3</sub>												
EMULPHOR	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	am	A	E <sub>11</sub>	P	E <sub>12</sub>	S	(1259)
OS 124	10	D	11	ol	al	P	A	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	(1309)
OV-1	D	10	ol	al	11	P	A	S	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	(1189)
OV-17	D	10	11	al	ol	P	A	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	(1279)
OV-61	Ver Tabela IIb												
OV-73	Ver Tabela IIb												
OV-225	10	11	D	al	ol	E <sub>10</sub>	P	A	am	S	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	(1179)
PG-400	11	al	E <sub>10</sub>	ol	am	D	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	A	P	S	—	(1039)
PG-600	11	al	E <sub>10</sub>	ol	am	D	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	A	P	S	—	(1079)
PG-1000	10	11	al	ol	E <sub>10</sub>	D	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	A	P	S	(1089)
PG-2000	10	11	al	ol	E <sub>10</sub>	D	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	A	P	S	(1109)
PG-4000	10	11	al	ol	D	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	A	P	S	(1109)
PLURONIC-61	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	A	am	P	E <sub>11</sub>	S	E <sub>12</sub>	(1359)
PLURONIC-101	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	A	am	P	E <sub>11</sub>	S	E <sub>12</sub>	(1349)
PLURONIC-121	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	A	am	P	E <sub>11</sub>	S	E <sub>12</sub>	(1329)
PLURONIC-L 64	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	am	A	E <sub>11</sub>	P	E <sub>12</sub>	S	(1249)
PLURONIC-F 68	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	A	E <sub>12</sub>	P	S	(1189)
SE-30	Ver Tabela IIb												
SE-52	D	10	ol	11	al	P	A	S	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	(1229)
SE-54	Ver Tabela IIb												
SP-2125	D	10	11	ol	al	P	A	S	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	(1249)
SP-2300	10	11	D	ol	al	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	P	A	E <sub>12</sub>	—	(1189)
SP-2510	10	11	D	al	ol	E <sub>10</sub>	A	P	E <sub>11</sub>	S	E <sub>12</sub>	—	(1149)
UCON HB 5100	10	11	al	D	ol	E <sub>10</sub>	am	A	E <sub>11</sub>	P	E <sub>12</sub>	S	(1279)

TABELA IIb

Ordem de eluição dos componentes da mistura-teste em diferentes fases estacionárias<sup>7</sup>.

Fase (0,15 $\mu$ m)	Seqüência de Eluição (T eluição E <sub>12</sub> , °C)*													
	Capilar persilanizado													
QV-1	D	10	ol	P	A	S	12	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	—	(1169)
OV-17	D	10	11	ol	al	S	P	A	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	(1249)
OV-61	D	10	11	ol	al	S	P	A	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	(1239)
OV-73	D	10	ol	11	al	P	S	A	12	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	(1189)
OV-225	10	11	D	al	ol	E <sub>10</sub>	S	P	A	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	(1209)
SE-30	D	10	ol	P	A	S	12	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	—	(1169)
SE-52	D	10	ol	P	S	A	12	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	—	(1189)
SE-54	D	10	ol	P	S	A	12	E <sub>10</sub>	am	E <sub>11</sub>	E <sub>12</sub>	—	—	(1189)

\* Para significado das abreviações veja Tabela I.

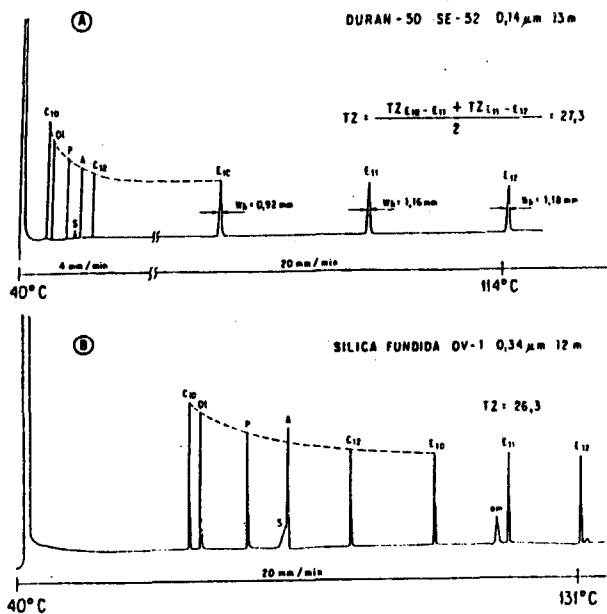


Fig. 1 - Cromatogramas da mistura teste de Grob em colunas capilares de vidro e de sílica fundida. Condições de cromatografia no apêndice; significado dos símbolos na Tabela I.

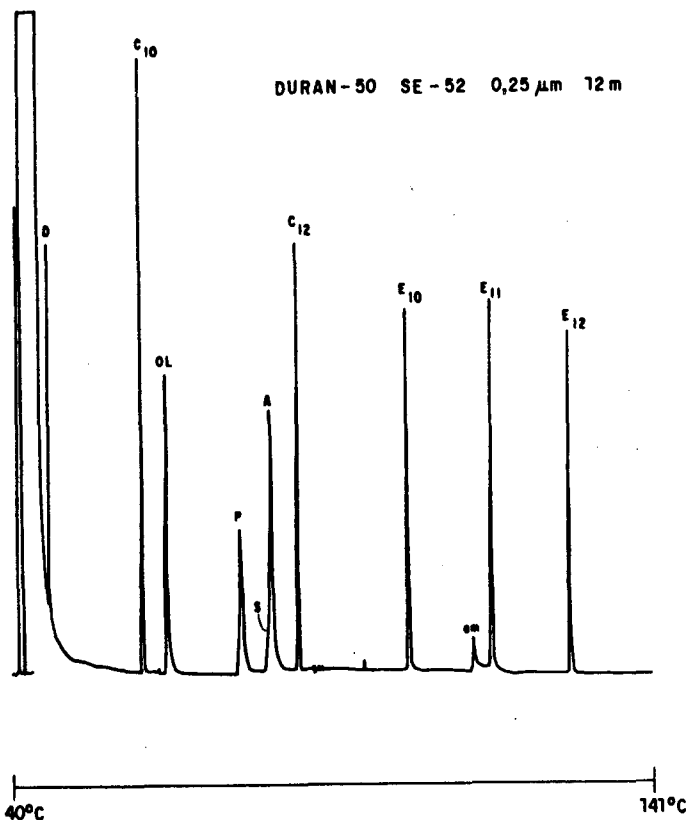


Fig. 2 - Cromatograma da mistura teste de Grob, ilustrando uma coluna com centros ativos. Condições de cromatografia no apêndice; significado dos símbolos na Tabela I.

Um outro conjunto de informações fornecido pelo teste se refere a determinação do número de separação (TZ) e da espessura do filme líquido (df). Estes dois parâmetros são determinados por intermédio dos picos dos ésteres: E<sub>10</sub>, E<sub>11</sub> e E<sub>12</sub>. TZ é calculado a partir da relação:

$$TZ = \frac{\Delta tR}{W_1 A + W_2 B} - 1,$$

onde ΔtR expressa a diferença de retenção entre dois picos consecutivos dos ésteres, e W<sub>1</sub> A(B), as laguras a meia altura dos dois picos (A e B) considerados.

Em geral, calculam-se dois conjuntos de valores para TZ (pares E<sub>10</sub>/E<sub>11</sub> e E<sub>11</sub>/E<sub>12</sub>) e tira-se a média (Fig. 1). Alguns valores típicos do TZ para colunas capilares (diferentes fases e dimensões) são dados na Tabela III. A espessura do filme (df) é definida, uma vez registrada a temperatura de eluição do éster E<sub>12</sub> (Fig. 1), por intermédio da Tabela II e do nomograma da Figura 3. Essas determinações são extremamente úteis, não apenas ao fabricante, mas no acompanhamento periódico pelo usuário, de processos como: contaminação das extremidades, oxidação da fase, redistribuição do filme dentro do capilar, perda de fase (sangramento) etc., viabilizando muitas vezes uma ação corretiva específica a tempo de reverter ou interromper a deterioração e conseqüente perda da coluna capilar<sup>3</sup>.

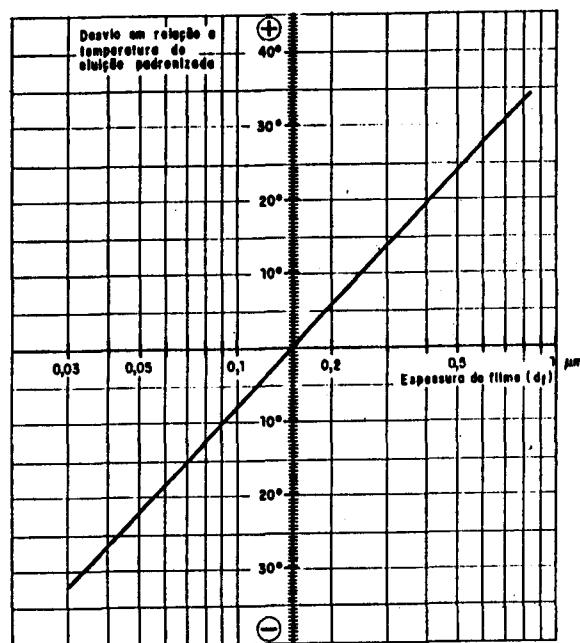


Fig. 3 - Nomograma para determinação de espessura do filme de fase estacionária empregando a temperatura de eluição do dodecanoato de metila (E<sub>12</sub>); veja o texto.

TABELA III

Valores típicos de TZ<sup>b</sup> para diversos tipos de colunas capilares.

Fase Estacionária	Comprimento (m)	Diâmetro Interno (mm)	Espessura do filme (µm)	TZ/m <sup>a,b</sup>
Metilsilicones	até 20	0,3	0,10 a 0,5	1,4 a 1,8 <sup>c,d</sup>
	25	0,2	0,10	1,1 <sup>c</sup>
	45-50	0,2	0,10	0,9 <sup>c</sup>
	até 20	0,2	0,025	2 a 2,2 <sup>d</sup>
	25	0,2	0,025	1,7 <sup>d</sup>
	45-50	0,2	0,025	1,3 a 1,6 <sup>d</sup>
Silar 7-CP	47	0,3	—	0,68 <sup>d</sup>
Silar 10-CP	20	0,3	0,25	0,56 <sup>a</sup>
Carbowax 20M	15-20	0,3	0,25 a 0,5	1 a 1,4 <sup>a</sup>
OV-17	20	0,3	0,20	1
OV-225	20	0,3	0,15	0,75 a 0,9
Dexsil 300	10-15	0,3	0,15 a 0,25	1,3 a 1,6

a) Valores muito dependentes do tratamento da superfície do capilar antes da deposição da fase estacionária.

b) Números de separação, TZ, obtidos segundo o procedimento de Grob; veja o texto.

c) Valores obtidos em nossos laboratórios.

d) Valores da literatura<sup>8,9,10,11</sup>.

## Apêndice

## Procedimento para o "Teste de Grob"

1. Com a coluna condicionada previamente e adaptada a um injetor com "split" e detector de ionização por chama, resfrie o forno a uma temperatura  $\leq 40^{\circ}\text{C}$ . Isto é especialmente relevante no caso de filmes delgados.
2. Ajuste a pressão de entrada e a razão de "split" (ou a vazão do gás carreador) de modo a obter para o metano um tempo de retenção equivalente a 2 s/m ( $\pm 5\%$ ) com gás carreador hidrogênio e 3,5 s/m ( $\pm 5\%$ ) com hélio. Não dispondo de  $\text{CH}_4$  puro, pôde-se utilizar gás combustível.
3. A programação de temperatura, em função do comprimento da coluna, é obtida por inter ou extrapolação, a partir dos seguintes valores de referência: coluna com 10m,  $5,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  com hidrogênio,  $2,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  com hélio; coluna com 50m,  $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  com hidrogênio,  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  com hélio.
4. Injete a mistura padrão (ver tabela I) em condições tais que cerca de 2ng de cada componente penetrem na coluna (p.ex., 1µl com razão de "split" entre 1:20 a 1:50, dependendo da estrutura do injetor).
5. Imediatamente após a injeção, aqueça o forno a  $40^{\circ}\text{C}$  (para filmes muito delgados a  $30^{\circ}\text{C}$ ) e inicie a programação de temperatura.
6. Na faixa provável de saída de  $E_{12}$  (na maioria das colunas,  $110-140^{\circ}\text{C}$ ) faça duas anotações, no papel de registro, da temperatura medida naqueles instantes.
7. Ao final da cromatografia, inter- ou extrapole a temperatura de eluição de  $E_{12}$ .

8. Desenhe a linha dos 100%; i.e., a curva que passa pelo máximo dos picos dos dois n-alcenos e dos três ésteres.
9. Expresse a altura dos picos remanescentes como uma percentagem da distância entre a linha base e a linha dos 100%.
10. Determine TZ como uma média aritmética entre os valores obtidos para  $E_{10}/E_{11}$  e  $E_{11}/E_{12}$  (ver, por exemplo, Figura 3).
11. Determine a espessura do filme comparando a temperatura determinada na etapa (7) com os valores de referência da Tabela II. A diferença encontrada (positiva (+) ou negativa (-)) permite o cálculo da espessura do filme com o auxílio do nomograma da Figura 3.

## REFERÊNCIAS:

- 1 F.R. Aquino Neto e J.N. Cardoso. CG.1. Cromatografia com fase gasosa de alta resolução (CGAR) em colunas capilares de vidro e sílica fundida. *Química Nova*. Enviado para publicação.
- 2 F.R. Aquino Neto e J.N. Cardoso. CG.2. Cromatografia com fase gasosa em colunas capilares vs. empacotadas; uma apreciação crítica. *Rev. Quím. Ind.* 53 (628): 20-24, 1984.
- 3 J.N. Cardoso e F.R. Aquino Neto. CG.5. Recuperação de colunas capilares de vidro ou sílica fundida. *Rev. Quím. Ind.* 54 (634): 14-17, 1985.
- 4 G. Schonburg e H. Husmann. Preparation performance and special applications of glass capillary columns *J. Chromatogr.* 99: 63-79, 1974.
- 5 S.P. Cram, F.J. Yang e A.C. Brown III. Characterization of high performance glass capillary gas chromatography

- Chromatographia* 10 (8): 397-403, 1977.
- <sup>6</sup> K. Grob Jr., G. Grob e K. Grob. Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. *J. Chromatogr.* 156, 1-20 (1978).
- <sup>7</sup> K. Grob, G. Grob e K. Grob Jr. Testing capillary gas chromatographic columns. *J. Chromatogr.* 219, 13-20, 1981.
- <sup>8</sup> K. Grob e G. Grob. Capillary columns with very thick coatings *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Comm.* 6 (3): 133-139 (1983).
- <sup>9</sup> W.A. König e W. Günther. The use of glass capillary columns for the analysis of polar natural products. Em W. Bertsch *et al.*, eds. *Recent Advances in capillary gas chromatography* VII. Heidelberg, Dr. Alfred Hüthling Verlag, 1982. p. 361-374.
- <sup>10</sup> M.A. Moseley e E.D. Pellizzari. Development and evaluation of wall coated open tubular columns for GC analysis of individual polychlorinated biphenyl isomers. *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Comm.* 5 (8): 404-412 (1982).
- <sup>11</sup> M.A. Moseley e E.D. Pellizzari Polysiloxane deactivated fused silica capillaries containing immobilized phases. *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Comm.* 5 (9): 472-475 (1982).

## DIVULGAÇÃO

### A OBTENÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS POR CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Affonso do Prado Seabra

*Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais*  
 CSS - UFRJ - Bloco H - Cid. Universitária; 21941 - Rio de Janeiro (RJ)

Recebido em: 16/04/85

A imprensa leiga revela um apetite inesgotável pelos assuntos ligados à biotecnologia. É natural que o setor da reprodução humana (os chamados "bebês de proveta") receba a maior cobertura. No entanto, não faltam artigos sobre o impacto da biotecnologia sobre a agricultura. É a "segunda revolução verde". O campo de Fitoquímica não é de grande popularidade, no entanto os artigos aparecem e com uma dose exagerada de fantasia. A revista *SOUTH* (outubro, 1984) não se contenta em retirar da química extrativa alguns produtos nobres como a quinina, a morfina e o piretro, mas chega a anunciar a produção "in vitro", em larga escala, do cacau e da sacarose. Esses artigos procuram se revestir de credibilidade através da citação freqüente de declarações de cientistas. O que os jornalistas parecem ignorar é que muitos cientistas estão ligados a empresas e diretamente interessados na flutuação dos valores de suas ações.

A feitura de um trabalho de revisão bibliográfica deste campo encontra assim uma real dificuldade: grande volume do que está sendo feito não está sendo publicado. Dezenas de milhões de dólares estão sendo investidos nesta linha de trabalho através das novas "empresas de pesquisa" que funcionam voltadas para os pedidos de patentes e os segredos, sem que seus resultados aflorem nas revistas científicas. Apesar disso, suficiente trabalho aparece publicado para permitir uma avaliação da realidade e uma visão crítica sobre o noticiário fantasioso.

Para tal revisão bibliográfico foi necessário adotar um critério limitativo. Uma revisão do estudo fitoquímico de culturas de tecidos teria que abranger muitas centenas de

publicações. Procuramos abordar apenas os estudos que já partiam de um interesse específico bem definido. Desta forma, nosso levantamento não ultrapassou uma centena de publicações.

Organizamos a bibliografia agrupando os trabalhos conforme o produto de interesse. Um mesmo produto pode reunir variadas origens vegetais, como é o caso da escopolamina. Para efeito de discussão não obedecemos à mesma divisão. Procuramos abordar todo o conjunto de trabalhos sob alguns aspectos gerais que nos parecem de maior relevância.

#### 1 - DADOS ESTATÍSTICOS

Noventa e uma publicações examinadas podem ser agrupadas conforme os produtos visados:

ALCALÓIDES DO TROPANO	—	18
CATHARANTHUS	—	16
DIOSGENINA	—	8
DIGITALIS	—	6
GINSENG	—	5
ALCALÓIDES QUINAZOLIDÍNICOS	—	5
NICOTINA	—	4