

## CGAR.9. LACUNAS DE RETENÇÃO EM CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO

Francisco R. de Aquino Neto e Jari N. Cardoso

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Ilha do Fundão - Centro de Tecnologia - Bloco A - Salas 603/607 - 21945 - Rio de Janeiro - RJ.

Recebido em 26/8/91; cópia revisada em 25/11/91.

The use of retention gaps in high-resolution gas chromatography (HRGC) is mandatory to extend the useful lifetime of the columns, notably in the analysis of samples containing involatile residues. In the case of on-column and splitless injections, the lack of a retention gap reduces severely, in most cases, the resolving power, disabling several chromatographic effects which ensure focusing. Additionally, knowledge of the role of retention gaps in the chromatographic process, allows full use of special techniques, such as introduction of large volumes (>100 $\mu$ l) and the coupling of high-performance liquid chromatography (HPLC) to HRGC.

**Keywords:** Retention gap, high-resolution gas chromatography, pre-column, solvent effects

## 1. INTRODUÇÃO

Após uma década da proposição do uso de lacunas de retenção (vide infra) em cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) pela "Escola" européia de cromatografia<sup>1,2</sup>, ainda há vários setores da química analítica que desconhecem sua importância, em especial aqueles associados a "Escola" americana. No Brasil seu uso consciente ainda é incipiente, representando, no nosso entender, uma das causas para a lenta disseminação da CGAR no País.

A ausência do uso da lacuna de retenção, introduz variações em injeções sem divisão de fluxo e na coluna, que prejudicam as aplicações voltadas a análise de traços, entre outras, além de reduzirem a vida útil das colunas capilares (extremamente caras no País). Esses fatores tem sido determinantes na resistência dos pesquisadores, analistas, gerentes de P&D e de controle de qualidade, em abandonar a cromatografia gasosa convencional (CG) em benefício da CGAR. Esse hiato se origina também no desconhecimento (ou incredulidade) de que essa evolução poderia ser feita a um custo reduzido pela adaptação da instrumentação existente (p.ex. ref. 3) e de que os custos envolvidos seriam rapidamente cobertos pelo ganho em capacidade de separação e redução no tempo de análise (em muitos casos, 10 a 15 vezes menor!).

Para quebrar essa resistência, uma "cruzada" vem sendo desenvolvida a partir do início da década de 80 (através de diversos cursos por todo o País e reforçada por uma série de publicações "didáticas" iniciada em 1984 com prosseguimento através de sete artigos subsequentes<sup>4-11</sup>).

O presente trabalho pretende, portanto, dar seqüência à esta série, introduzindo o conceito de lacuna de retenção, descrever sua preparação, seu uso e sua recuperação, com o propósito de facilitar sua absorção pela comunidade de cromatografia.

Embora o conjunto de conceitos associado às lacunas de retenção seja hoje muito extenso e viabilize inúmeras técnicas especiais (p. ex., injeção de grandes volumes, 100-150 $\mu$ l<sup>12-13</sup>, de amostra, acloppamento direto de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) à CGAR<sup>12-14</sup>), no presente caso serão abordados apenas os elementos necessários ao seu emprego para lidar com certas particularidades de injeção de amostra da CGAR frente a CG convencional, garantindo ao usuário que a sua evolução para a CGAR se dê sem percalços, notadamente em desempenho e redução no custo operacional.

## 2. DEFINIÇÃO

Do inglês "retention gap" a "lacuna de retenção"<sup>15</sup> foi proposta por Grob Jr. em 1981<sup>1,2</sup> como solução para os inúmeros problemas associados às modalidades de injeção sem divisão de fluxo<sup>11,16</sup> e na coluna a frio<sup>11,12</sup>. A compreensão de sua participação no processo cromatográfico foi estabelecida<sup>12</sup> e continua sendo exaustivamente estudada.

Como o próprio nome indica, a lacuna de retenção nada mais é do que um trecho de coluna capilar sem fase estacionária, portanto sem retenção cromatográfica, disposto no início da coluna propriamente dita.

## 3. CONSTITUIÇÃO

O segmento de tubo capilar, preparado com os mesmos cuidados de uma coluna de alta resolução, pode ser solidário à coluna (lacuna permanente) ou ser a ela conectado (lacuna descartável, item 6). Neste caso, pode-se adaptar lacunas com características físicas e químicas diferentes da coluna, além da possibilidade de remoção facilitar as operações de limpeza e substituição.

É possível preparar lacunas de retenção de vidro, estirando e tratando quimicamente os capilares através da mesma seqüência de etapas envolvidas na confecção de capilares para recobrimento (colunas capilares), a saber:

- Capilar de vidro DURAN-50 (Schott-Ruhrglas GMBH, RFA; representante no Brasil, VIDROLEX, Ind. Com. Vid. Lab. Ltda., São Paulo, SP): lixívia do capilar selado preenchido com HCl 20% a 170°C por 12h, seguida de *rinsagem* com 2 volumes de solução de HCl 0.5% e desidratação do capilar sob vácuo nas duas extremidades do capilar por 2h a 300°C. Desativa-se por sinalização com hexametildissilazano (HMDS)/difeniltetrametildissilazano/DFTMDS) 1:1 (preenche-se 7 espiras com a solução, sela-se o capilar e aquece-se por 12h a 400°C). Lava-se o capilar com hexano, metanol e éter etílico.

- Capilar de sílica fundida (p. ex. Hewlett-Packard, Supelco, Chrompack, SGE, etc.): purga-se o capilar a 180°C por 15 min sob fluxo de H<sub>2</sub>. Passa-se uma solução de HMDS:DFTMDS: 1:1, sob nitrogênio. Após a saída da solução, sela-se o capilar e aquece-se a 300°C por 30 min. Quebram-se as extremidades e lava-se com dois volumes de coluna de metanol, diclorometano e pentano.

Mais cômoda é, contudo, a sua aquisição comercial, em sílica fundida já silanizada, o que lhe confere grande flexibilidade e maior facilidade de manuseio (instalação, remoção). Quase todos os fabricantes de colunas capilares oferecem a opção de compra do capilar vazio ("uncoated") que pode ser cortado em comprimentos convenientes para servir como lacuna de retenção. Nesse caso, contudo, é necessário o uso de um conector para acoplar a lacuna à coluna cromatográfica propriamente dita. Evidentemente, a conexão não deve introduzir qualquer atividade química (sítios ativos) ou volume morto ao sistema cromatográfico, o que impõe limites severos aos materiais e projetos dos conectores a serem empregados (veja item 6).

#### 4. APLICABILIDADE

Além de evitar a possível decomposição térmica da fase estacionária no bloco aquecido do injetor e impedir que a condensação de amostra no início da coluna (caso de injeções sem divisão de fluxo ou na coluna a frio, por exemplo) permaneça a fase não imobilizada (razão pela qual sempre foi prática corrente lavar o trecho inicial da coluna para remover a fase<sup>17,18</sup>), a lacuna de retenção é, também, essencial para:

- Garantir a resolução cromatográfica nas injeções sem divisão de fluxo e na coluna a frio, viabilizando o efeito de solvente<sup>11,12</sup>;
- Resguardar a fase estacionária de impurezas, atuando como "pré-coluna" assegurando retenção de solutos de baixa volatilidade presentes, em especial, na matriz de amostras complexas;
- Facilitar ações de recuperação das características de sistemas contaminados por amostras "sujas", prolongando a vida útil das colunas capilares;
- Viabilizar a introdução de grandes volumes de amostra (até 500ul) em colunas capilares superiores, inclusive, aos empregados na CG convencional (max. 10-20ul);
- Permitir o acoplamento direto CLAE-CGAR;
- Facilitar o uso de injetores automáticos para injeção no interior da lacuna ("cold on-column");
- Permitir a introdução de volumes razoáveis de amostra em colunas de pequeno diâmetro ("narrow bore", D.I. < 0,2mm; empregando lacunas de maior D.I.)<sup>19</sup>.

#### 5. CARACTERÍSTICAS VS. DESEMPENHO

Para executar as funções descritas acima, a lacuna de retenção deve ser capaz de receber toda a amostra em estado líquido, acomodando-a segundo um filme cuja extensão não possa atingir a coluna propriamente dita (região com fase estacionária; figura 1). No caso da injeção na coluna a frio a amostra é depositada na coluna em fase líquida; na injeção sem divisão de fluxo, ela deve ser integralmente condensada na lacuna<sup>11</sup>.

A extensão da região encharcada da lacuna e seu escoamento como filme líquido, será função das variáveis que afetam a condensação/volatilização da amostra e estabilização/fixação do filme líquido formado. O quadro 1 reúne os parâmetros usuais de operação com lacunas de retenção.

Para a introdução de grandes volumes de amostra e acoplamentos CLAE-CGAR, costuma-se empregar lacunas de até 50m. Contrariamente a experiência (típica na CG convencional) do efeito deletério de fatores extra-coluna (introdução de volumes vazios) no alargamento de picos, em tais casos, a presença de lacunas de retenção não significa que haverá alargamento da banda inicial de amostra. Ou seja, mesmo 50m de tubo capilar vazio no início da coluna, praticamente não afetam a resolução em CGAR<sup>19</sup>.

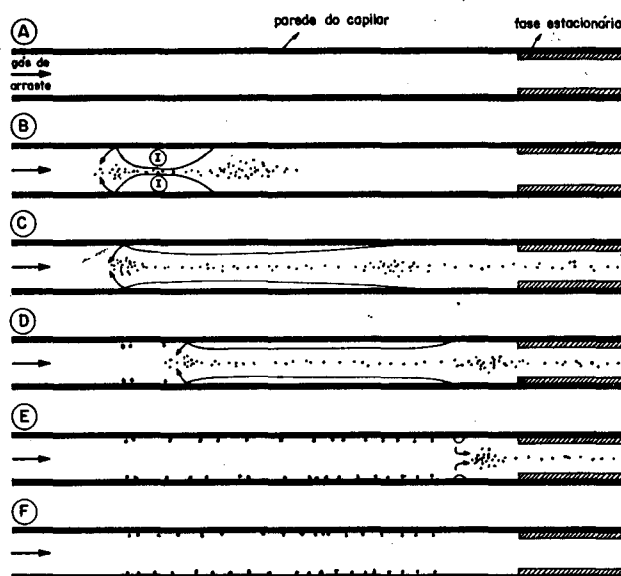


Figura 1. Aspecto da região encharcada pela amostra no início da coluna e etapas do seu deslocamento e vaporização durante os instantes iniciais da análise cromatográfica.

- Detalhe da lacuna de retenção antes da introdução de amostra;
- "Onda" de amostra líquida depositada no início da coluna (I) e a saturação do gás de arraste pelo solvente na parte posterior da região encharcada (II);
- "Onda" de amostra espalhada pelo cisalhamento do fluxo de gás de arraste;
- O espalhamento resulta num filme de espessura estável que se desloca lentamente pela lacuna (a velocidade de deslocamento depende da afinidade do solvente pela superfície interna do capilar. O gás de arraste "seca" rapidamente a parte posterior do filme líquido (região encharcada) e se satura de vapor dos componentes voláteis, carreando-os através do capilar.
- Em condições adequadas a amostra é integralmente vaporizada antes que a região encharcada atinja a fase estacionária;
- Ficam retidos ao longo da lacuna os componentes não voláteis da matriz da amostra.

N.B.: A relevância desse processo para os mecanismos de focalização da banda inicial de amostra será motivo de outra publicação.

#### 6. ADAPTAÇÃO

Há várias formas de se conectar a lacuna de retenção à coluna capilar<sup>12</sup> e uma discussão mais detalhada fugiria ao escopo do presente trabalho. Pela simplicidade de uso e baixo custo, recomendaríamos o sistema de conexão sob pressão (tipo "press-fit") que necessita de um contato sílica fundida-vidro. Basta que se transforme a extremidade cilíndrica de um capilar de vidro em cônica, aquecendo-se o capilar em chama, ao mesmo tempo que se introduz um bastão de grafite (ponta para lapiseira) que teve sua extremidade tornada cônica com auxílio de uma lixa bem fina. Assim, um capilar de sílica é pressionado para o interior do cone do capilar de vidro e a camada protetora de poliimida (do capilar de sílica) serve de vedação. Para se conectar capilares de vidro emprega-se um pequeno trecho de capilar de sílica e, inversamente para conectar capilares de sílica emprega-se um pequeno trecho de capilar de vidro dotado de conicidade em ambos os lados (esse adaptador também pode ser adquirido nos fornecedores tradicionais de material para cromatografia). Uma segurança maior para a conexão é obtida preenchendo com poliimida líquida o espaço entre os capilares após sua união. O aquecimento a 160°C por 5 min sem passagem de gás de arraste, cura a poliimida pura, a qual enrijecendo, evita que o atrito

## QUADRO 1

### Parâmetros usuais para operação de lacunas de retenção (Baseado em 11, 12, 24, 25)

#### A. Encharcamento e o comprimento da lacuna.

1. Comprimento da região encharcada por 5 ul de solvente, à temperatura ambiente, para capilares de vidro ou sílica fundida de D.I. 0,32mm, com ou sem tratamento interno (exceto nos casos indicados):

n-hexano < 30cm

éter etílico < 30cm

acetona < 30cm (sílica fundida, S.F., tratada com HMDS, 250cm)

benzeno < 35cm (S.F. com HMDS, 400cm; S.F. não tratada, 60cm)

diclorometano < 30cm (S.F. com HMDS, 400cm; S.F. não tratada, 400cm)

metanol < 45cm (S.F. com HMDS, 500cm)

2. Idem por 50ul de solvente:

solventes comuns 15-20m

metanol e água 40m

3. Para pequenos volumes (até 2 ul) emprega-se, inicialmente, lacunas com 3m de comprimento, o que permite algumas quebras da extremidade sem necessidade de troca de lacuna.

B. No caso de amostras com matriz não volátil, usualmente a lacuna deve ser lavada após o acúmulo de aproximadamente 10ug de matriz.

C. Caso a lacuna deva atuar na focalização da banda inicial de amostra (injeções sem divisão de fluxo e na coluna a frio, envolvendo o efeito de solvente), a temperatura inicial da análise deve situar-se a 10-20°C abaixo do ponto de ebulição do solvente.

D. O tratamento de desativação deixa um filme residual na lacuna, em geral de aproximadamente 3nm de espessura. No caso de lacunas longas e injeção de grandes volumes (>30ul) é importante para evitar perda excessiva de resolução, que a espessura do filme da coluna seja de no mínimo 0,25um.

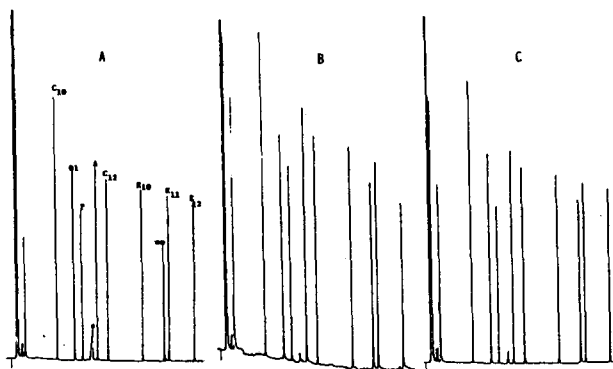


Figura 2. Teste de Grob de coluna capilar de fase SE-54 imobilizada, 20m; 0,3mm D.I.; 0,25um.

a) Coluna sem lacuna; atenuação x 6.

b) Coluna conectada a lacuna; conexão defeituosa (sítios de adsorção presente); atenuação x 4; observe-se que o alargamento e adsorção parcial irreversível de todos os componentes, levou a utilização de uma atenuação 100 vezes menor! Fica evidente (observe a linha de base) a menor relação sinal/ruído.

c) Coluna conectada a lacuna; conexão correta; atenuação x 6.

entre a boca do capilar de vidro e o capilar de sílica termine por seccioná-lo. No caso de poliimidadas contendo solvente, faz-se o aquecimento de 60° a 120°C a 10°C/min, sem gás de arraste, prosseguindo-se a programação de temperatura já com gás de arraste, até a temperatura máxima de trabalho da coluna.

É essencial testar a coluna com a lacuna conectada, de modo a verificar se a conexão apresenta atividade ou volume morto.

## 7. TESTE DA CONEXÃO

As lacunas de retenção (nada mais do que capilares desativados) podem ser avaliadas adaptando-se-as a saída de uma coluna capilar previamente testada pelo teste de Grob<sup>7</sup>. A comparação entre o resultado dos dois testes fornece um perfil da atividade da lacuna e qualidade da conexão. Outras formas de testá-las foram descritas<sup>12,22</sup>, em especial para caracterização da retenção residual da lacuna<sup>12,23</sup>. Esse parâmetro é importante para caracterizar a extensão da lacuna que será molhada por unidade (de volume) de determinado solvente (veja Quadro 1), determinando, portanto, seu comprimento ideal para uma determinada aplicação.

Usualmente, testa-se diretamente a lacuna já conectada ao início da coluna a ser utilizada, inferindo-se diretamente as características da lacuna e da conexão. Por exemplo, a figura 2 mostra um teste típico de uma coluna sem lacuna, com lacuna e conexão defeituosa e com lacuna e conexão adequada.

## 8. EXEMPLO DE APLICAÇÃO DE LACUNA NO RESGUARDO DA COLUNA CAPILAR

A perda de resolução em CGAR pode se dar rapidamente caso as amostras contenham quantidades apreciáveis de matriz não-volátil<sup>24,25</sup>. A figura 3 ilustra o teste de Grob efetuado em uma coluna nova, após 75 injeções de amostras biológicas (sem purificação) e após remoção e recuperação da lacuna por lavagens sucessivas com hexano, diclorometano e acetona<sup>26,27</sup>.

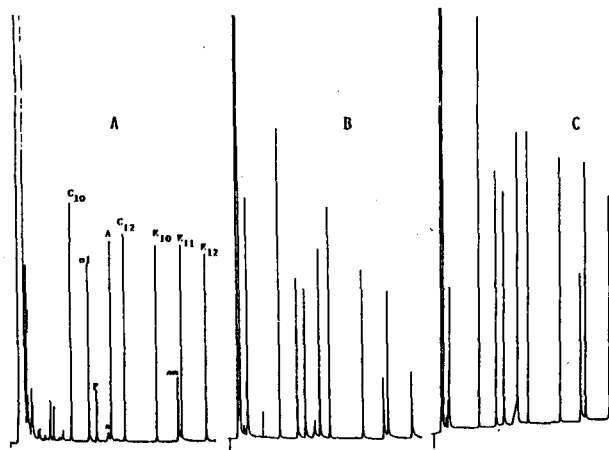


Figura 3. Teste de Grob de coluna capilar de fase SE-54 imobilizada, 20m; 0,3mm D.I.; 0,25um.

a) Coluna nova;

b) Após ter sido utilizada em 75 análises, por injeção sem divisão de fluxo de extratos de urina, para caracterização de resíduos de anabolizantes;

c) Após recuperação por lavagem com hexano, diclorometano e hexano.

## 9. CONCLUSÕES

O presente trabalho define a "lacuna de retenção", apresenta os métodos de sua preparação e conexão à coluna cromatográfica e descreve sua importância para a cromatografia ga-

sosa de alta resolução. São fornecidos os parâmetros usuais de operação da lacuna e apresentados alguns exemplos ilustrativos de sua função. A avaliação da qualidade de conexão entre a lacuna de retenção e a coluna cromatográfica é apresentada.

#### REFERÊNCIAS

1. Grob Jr., K.; *J. Chromatogr.* (1981), 213, 3.
2. Grob Jr., K.; *J. Chromatogr.* (1982), 237, 15.
3. Furtado, E.G.; Cardoso, J.N.; *J. Chromatogr.Sci.* (1984), 22, 163.
4. Aquino Neto, F.R.; Cardoso, J.N.; *Química Nova* (1985), 8, 272.
5. Aquino Neto, F.R.; Cardoso, J.N.; *Rev. Quím. Ind.* (1984), 53, 20.
6. Loureiro, M.R.B.; Aquino Neto, F.R.; *Química Nova* (1985), 8, 275.
7. Cardoso, J.N.; Aquino Neto, F.R.; *Química Nova* (1986), 9, 58.
8. Cardoso, J.N.; Aquino Neto, F.R.; *Rev. Quím. Ind.* (1985), 54, 14.
9. Aquino Neto, F.R.; Cardoso, J.N.; *Química Nova* (1988), 11, 275.
10. Aquino Neto, F.R.; *Rev. Quím. Ind.* (1989), 57, 26.
11. Cardoso, J.N.; Aquino Neto, F.R.; *Química Nova* (1989), 12, 13.
12. Grob Jr., K.; "On-column injection in capillary gas chromatography. Basic technique, retention gaps, solvent effect". Dr. Alfred Hüthig Verlag; Heidelberg (1987).
13. Grob Jr., K.; Karrer, G.; Riekkola, M.-L.; *J. Chromatogr. Rev.* (1985), 334, 129.
14. Munari, M.; Trisciani, A.; Mapelli, G.; Trestianu, S.; Grob Jr., K.; Colin, J.M.; *J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.* (1985), 8, 601.
15. Collins, C.H.; Aquino Neto, F.R.; Silva, J.R.P.; *Química Nova* (1988), 11, 443.
16. Grob Jr.; K.; "Classical split and splitless injection in capillary gas chromatography". Dr. Alfred Hüthig Verlag; Heidelberg (1986).
17. Grob, K.; Grob, G.; *J. Chromatogr.* (1976), 125, 471.
18. Grob, K.; "Making and Manipulating capillary columns for gas chromatography". Dr. Alfred Hüthig Verlag; Heidelberg (1986).
19. Grob Jr.; K.; *J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.* (1984), 7, 461.
20. Grob Jr., K.; Chilling, B.; *J. Chromatogr.* (1983), 301, 37.
21. Grob Jr., K.; Kuhn, S.; *J. Chromatogr.* (1984), 301, 1.
22. Grob Jr., K.; Grob, G.; *J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.* (1978), 1, 302.
23. Grob Jr., K.; Neukom, H.P.; *J. Chromatogr.* (1985), 323, 237.
24. Castro, I.M.; Aquino Neto, F.R.; *J. High Resol. Chromatogr.* (1990), 13, 302.
25. Stuckenbruck, P.; Aquino Neto, F.R.; *J. High. Resol. Chromatogr.* (1990), 13, 210.
26. Barbosa, S.D.C.T.; Aquino Neto, F.R.; Coelho, R.B.; "Avaliação do desempenho e recuperação de colunas capilares de alta resolução". III Jornada de Iniciação Científica. XXX Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, RJ, 1990.
27. Correa, S.M.A.; Barbosa, S.D.C.T.; Aquino Neto, F.R.; Coelho, R.B.; CGAR.10. Avaliação e recuperação de colunas capilares de alta resolução utilizadas na análise de frações derivadas de alcatrão vegetal. *Química Nova* (no prelo).