

CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA TEMPERATURA: A NOVA FRONTEIRA E SUA APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE COMPOSTOS DE ALTA MASSA MOLECULAR

Alberto dos Santos Pereira*, Edson Ferreira da Silva e Francisco Radler de Aquino Neto

LADETEC - Instituto de Química - Departamento de Química Orgânica - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Tecnologia - Bloco A - 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 8/12/95; aceito em 10/5/96

HIGH TEMPERATURE GAS CHROMATOGRAPHY: THE NEW FRONTIER AND ITS APPLICATION IN ANALYSIS OF HIGH MOLECULAR MASS COMPOUNDS. High Temperature High Resolution Gas Chromatography (HT-HRGC): A new analytical border line and its application to the analysis of high molecular mass compounds is presented, as well as the capillary columns types, sample introduction techniques and their use for the analysis of high molecular mass compounds. Applications such as in analysis of β -cyclodextrin derivatives and high molecular mass hydrocarbons are also presented.

Keywords: HT-HRGC; on-column; capillary columns; β -cyclodextrin; paraffin.

INTRODUÇÃO

Em 1983 foram publicados os primeiros trabalhos¹ tratando da imobilização de fases (tipo polisiloxanas com terminação OH). Esses trabalhos são os precursores da Cromatografia Gasosa de Alta Temperatura (temperatura máxima de utilização igual ou maior que 370°C), já que ao promover a imobilização dessas fases, forma-se uma ligação entre a hidroxila da fase estacionária e o silanol do suporte, propiciando assim uma maior estabilidade térmica da mesma.

Em 1985 com a sistematização do conhecimento (por W. Blum²), foram obtidas colunas de alta temperatura, cujo limite máximo chegava à 400°C. Abriu-se a porta de uma nova era para a cromatografia gasosa, devido a possibilidade de analisar compostos de alta massa molecular e de alto ponto de ebulição. Vários métodos começaram, então, a ser desenvolvidos para análise de compostos de alta massa molecular (acima de 600 u). Atualmente, já foram analisados compostos com massa molecular em torno de 2000 u, como é o caso de derivados de β -ciclodextrinas^{3,4} (figura 1), os quais vem sendo utilizados como fase estacionária quiral em cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR)⁵, na resolução de moléculas de grande importância, como por exemplo: precursores quirais, intermediários na síntese de compostos com atividade biológica, estereodiferenciação simultânea de vários compostos flavorizantes

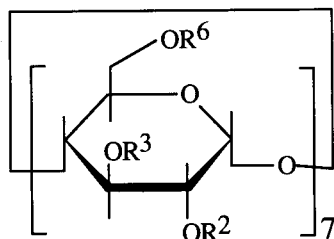


Figura 1. Estrutura de alguns derivados de β -ciclodextrinas. 2,3,6-tri-O-metil- β -CD: $R^2=R^3=R^6$ =metil; 2,3-di-O-metil-6-O-dimetil-terc-butil-silano- β -CD: $R^2=R^3$ =metil; R^6 =dimetil-terc-butil-silano; 2,3-di-O-acetil-6-O-dimetil-terc-butil-silano- β -CD: $R^2=R^3$ =acetil; R^6 =dimetil-terc-butil-silano.

quirais possuindo funcionalidades diversificadas, determinação da composição enantiomérica de constituintes quirais nos óleos essenciais, resolução de alguns PCBs, etc...⁵ Muitos dos derivados de ciclodextrinas descritos na literatura são misturas complexas, visto que um grande número de isômeros de posição na estrutura das ciclodextrinas são possíveis. Sendo assim, o controle do grau de substituição das hidroxilas se faz necessário, para garantir a qualidade das colunas.

Principalmente na área de geoquímica orgânica, vários métodos analíticos foram desenvolvidos, para a análise de compostos com mais de 40 átomos de carbono e principalmente de biomarcadores de alta massa molecular, que são de extrema importância para a prospecção e exploração de petróleo⁶⁻¹⁰.

A utilização de várias fases de alta temperatura, no seu limite máximo de temperatura, ainda não é possível, devido a "baixa" resistência térmica dos materiais utilizados como suporte para deposição dessas fases, ou do material (poliimida) utilizado no revestimento dos capilares de sílica fundida.

TIPOS DE COLUNA

a) Materiais

Existem quatro tipos de materiais utilizados para confeccionar colunas capilares de alta temperatura:

- i) Vidro (borossilicato).
- ii) Sílica fundida revestida com polimida de alta temperatura.
- iii) Sílica fundida revestida com alumínio.
- iv) Metal revestido internamente com sílica fundida.

Comparando-se apenas as temperaturas limites de utilização desses materiais, as colunas de sílica revestidas com alumínio e as de metal, levam uma grande vantagem, já que a suas temperaturas limite são 500°C, a do vidro 450°C e a da sílica revestida com polimida (400-420°C).

Mas infelizmente, as colunas de sílica revestidas com alumínio, depois de algumas análises começam a apresentar fissuras, principalmente nas conexões, ficando frágeis a esforços mecânicos.

Um problema semelhante é apresentado pelas colunas de sílica revestidas com polimida, que depois de algumas análises acima de 380°C, começam a apresentar perda dessa camada, em alguns pontos, fazendo com que a coluna fique extremamente frágil.

Atualmente o melhor material a ser utilizado para a confecção de colunas capilares de alta temperatura ainda é o borossilicato, que pode ser utilizado até 450°C, sem grandes problemas. Acima de 420°C, por um período prolongado (≥ 30 minutos), começa-se a observar pequenas deformações no seu formato, mas que não alteram sua eficiência de separação¹⁰.

O grande problema que os usuários de colunas de vidro enfrentam é quando necessitam fazer uma conexão com um capilar de sílica fundida^{11,12}, utilizar uma lacuna de retenção¹³, ou fazer um acoplamento com um espectrômetro de massas. Mesmo utilizando polímidas de alta temperatura para fazer a conexão, a utilização de temperatura final acima de 380°C facilita o aparecimento de minúsculos vazamentos, que prejudicam enormemente as análises, principalmente na cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada a espectrometria de massas (CGAR-AT-EM); em especial pela entrada do ar aspirado pelo vácuo que eleva os sinais de O₂, N₂ e CO₂ no "background" do espectro de massas.

Atualmente as esperanças de que se possa aumentar a temperatura limite máxima das análises estão depositadas nas colunas de metal revestidas internamente com sílica, mas ainda não existem dados concretos sobre seu comportamento, com o uso prolongado a temperaturas acima de 400°C.

b) Características de colunas para CGAR-AT

As colunas utilizadas para a CGAR-AT são de tamanho reduzido, menor ou igual a 10 metros, com filme delgado em torno de 0,1 μm e diâmetro interno em torno de 0,3 mm.

Pode-se também empregar diâmetro interno reduzido (p. ex., 0,1 mm), mesmo com o inconveniente de trabalhar com soluções bem diluídas, para não saturar a coluna. Por outro lado, esse tipo de coluna admite velocidades do gás de arraste bem maiores do que com as colunas de d.i. 0,2-0,3 mm.

Nas colunas com d.i. igual a 0,1 mm, a diminuição da quantidade de pratos teóricos, com o aumento da velocidade linear do gás de arraste, é bem menor do que nas colunas de d.i. 0,2-0,3 mm¹⁴. Além disso nas colunas de d.i. igual a 0,1 mm o número de pratos teóricos é muito maior do que numa coluna de características iguais mas de d.i. igual a 0,3 mm.

Com o aumento da velocidade linear do gás de arraste em colunas de menor d.i., poderemos realizar uma análise num menor tempo, sem comprometer a eficiência de separação^{14, 15}.

TÉCNICAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRA

Devido ao objetivo da CGAR-AT ser a análise de compostos de alta massa molecular e, conseqüentemente, de alto ponto de ebulição, não podemos utilizar o injetor "clássico", tipo com e sem divisão de fluxo ("split/splitless"), devido ao efeito da discriminação dos compostos de elevado ponto de ebulição. Esse efeito pode ser notado já a partir do docosano, C₂₂.

Para a CGAR-AT podem ser utilizados dois tipos de injeção: na coluna a frio ("cold on-column") ou injeção por vaporização com programação de temperatura ("PTV").

Os resultados do injetor com programação de temperatura são muito superiores ao injetor "clássico", diminuindo enormemente o efeito da discriminação. Mas, esse ainda apresenta resultados inferiores ao do injetor na coluna a frio, principalmente, em relação a sua reprodutibilidade, a complexibilidade de seu sistema e a interferência de contaminantes provenientes do septo⁴. A técnica de injeção na coluna a frio, é a melhor técnica de introdução de compostos com alto ponto de ebulição, tendo em vista possuir uma inércia química alta, pois a amostra é depositada na própria coluna capilar, além de ser um sistema simples, sem componentes elétricos ou eletrônicos, sem septo (no caso do modelo da Carlo Erba, que ainda é o melhor modelo de injetor, no mercado, tipo "on-column")¹⁶⁻¹⁹.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Um problema secundário, mas não de menor importância, da CGAR-AT, é a preparação das amostras, devido aos componentes de interesse normalmente terem baixa solubilidade. Certas amostras de hidrocarbonetos de alta massa molecular, como por exemplo os poliwaxes 500, 655 e 1000 (séries homologas de n-alcenos pares; C₂₆ a C₆₆, C₃₀ a C₈₀ e C₄₀ a C₁₀₀, respectivamente; Petrolite Specialty polymers, Tulsa USA), só se solubilizam totalmente com disulfeto de carbono (CS₂) a quente¹¹.

Nos casos do material a ser analisado ser proveniente de matrizes naturais, necessita-se que tenha um cuidado especial na extração do material orgânico, para que já na preparação da amostra, não exista a discriminação dos componentes de interesse.

EXPERIMENTAL

Foram utilizados para a análise o Injetor Carlo Erba "na coluna a frio", cromatógrafo HP5890 e Integrador HP3396-II.

i) Condições para CGAR, da análise de poliwax 500 e 655

Temperatura inicial 40°C, taxa de aquecimento 20°C/min, temperatura final 320°C, e isoterma final de 60 minutos, detector por ionização em chama e temperatura do detector 330°C. Coluna de vidro (borossilicato), com fase SE-54 (1% vinil, 5% fenil-metilsilicônio), com comprimento de 20 metros e diâmetro interno 0,3 mm e 0,30 μm de espessura de filme.

ii) Condições para CGAR-AT, da análise de poliwax 500 e 655

Temperatura inicial 40°C, taxa de aquecimento 20°C/min, temperatura final 400°C, e isoterma final de 30 minutos, detector por ionização em chama e temperatura do detector 400°C. Coluna de DB1-HT (100% dimetil polisiloxana), com comprimento de 8 metros, diâmetro interno 0,25 mm e 0,10 μm de espessura de filme.

iii) Condições para CGAR-AT, da análise de fração pesada de petróleo

Temperatura inicial 40°C/0,50 min, taxa de aquecimento 20°C/min até 320°C, taxa de aquecimento de 10°C/min, temperatura final 400°C, e isoterma final de 5 minutos, detector por ionização em chama e temperatura do detector 400°C. Coluna de Silaren-30 (30% fenil, 30% silil-difenileno-éter, 40% metil polisiloxana), com comprimento de 3 metros, diâmetro interno 0,25 mm e 0,10 μm de espessura de filme.

iv) Condições para CGAR-AT, da análise de derivados de β -ciclodextrinas (figura 1)

a) análise dos derivados 2,3,6-tri-O-metil, e do 2,3-di-O-metil-6-O-dimetil-terc-butil-silano:

Temperatura inicial 40°C, taxa de aquecimento 20°C/min, até 320°C, taxa de aquecimento 10°C/min, temperatura final 400°C; detector por ionização em chama e temperatura do detector 400°C. Coluna de Silaren-30 (30% fenil, 30% silil-difenileno-éter, 40% metil polisiloxana), com comprimento de 3 metros, diâmetro interno 0,25 mm e 0,10 μm de espessura de filme.

b) análise do derivado 2,3-di-O-acetil-6-O-dimetil-terc-butil-silano:

Temperatura inicial 80°C/0,50 min, taxa de aquecimento 20°C/min, até 320°C, taxa de aquecimento 10°C/min., temperatura final 400°C, detector por ionização em chama e temperatura do detector 400°C. Coluna de Silaren-30 (30% fenil, 30% silil-difenileno-éter, 40% metil polisiloxana), com comprimento de 3 metros, diâmetro interno 0,25 mm e 0,10 μm de espessura de filme.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

i) Comparação entre CGAR e CGAR-AT; análise de alcanos de alta massa molecular

A aplicação da CGAR-AT, na análise de amostras de poliwxes 500 e 655, utilizando uma coluna de DB1-HT, é comparada com a análise dessas amostras em CGAR, onde utilizou-se uma coluna com fase SE-54.

Através das análises dos poliwx pode-se observar claramente a vantagem da análise em CGAR-AT, sobre a análise em CGAR, tendo em vista o tempo de análise na CGAR-AT, ser muito menor. Além do fato que na análise do poliwx 655 em CGAR, só ser possível visualizar até C₄₈ (figura 2) e na CGAR-AT pode-se claramente visualizar até C₁₀₀ (massa molecular ~ 1404 u, figura 3).

A identificação dos hidrocarbonetos foi realizada através da utilização do padrão de tetracontano (n-C₄₀) (Aldrich, USA), que foi analisado nas mesmas condições, além do fato que os poliwx são uma série homóloga de n-alcanos pares. Essa

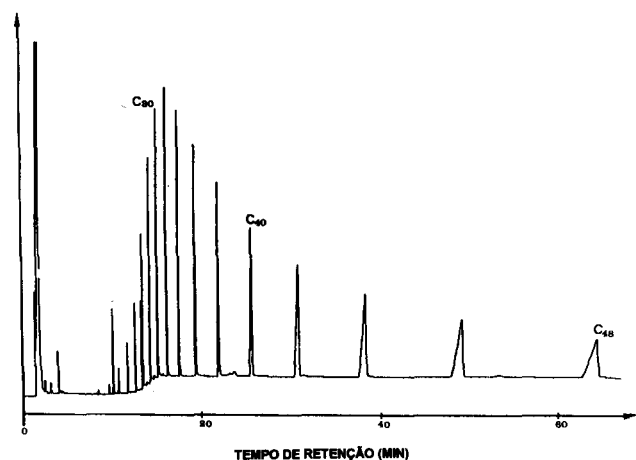


Figura 2. Cromatograma de poliwx 655 em CGAR.

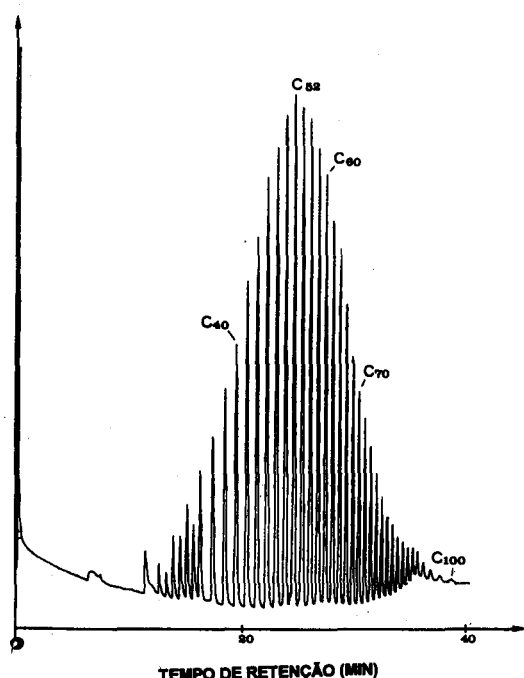


Figura 3. Cromatograma de poliwx 655 em CGAR-AT.

análise encontra aplicação em frações pesadas de petróleo (figura 4)²¹, bem como na química de produtos naturais²².

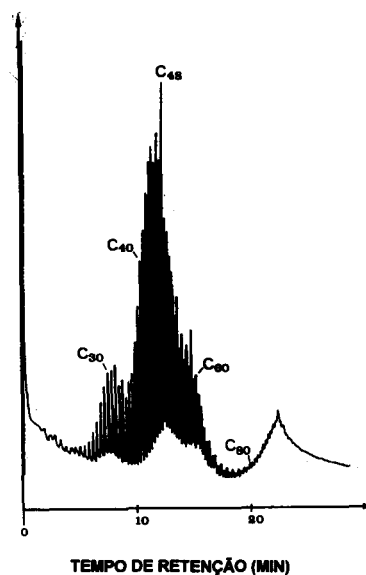


Figura 4. Cromatograma de uma fração pesada de petróleo.

ii) Análise de derivados de β -ciclodextrinas por CGAR-AT

Foram analisadas, a 2,3,6-tri-O-metil- β -CD, a 2,3-di-O-metil-6-O-dimetil-terc-butil-silil-CD e a 2,3-di-O-acetil-6-O-dimetil-terc-butil-silil-CD, conforme mostra a figura 5, demonstrando as vantagens dessa técnica para o monitoramento da síntese dos derivados de ciclodextrinas por CGAR-AT. A análise direta desses compostos evita o inconveniente de executar essa análise via produtos de reação de clivagem dos derivados de β -ciclodextrina²²⁻²³. Permite, também sua análise por CGAR-AT acoplada a espectrometria de massas²³. Os índices de Kovats foram determinados através da análise do poliwx 655, nas mesmas condições de análise dos derivados de β -ciclodextrinas (tabela 1).

Note-se que as estruturas cíclicas das CD fazem com que as substâncias de massa molecular na faixa de 1400 a 2500 u, eluam abaixo do C₇₀ (massa molecular ~ 984 u).

As análises dos derivados de β -ciclodextrinas, por CGAR-AT, também nos fornecem como informação adicional, a "temperatura máxima" de trabalho como fase estacionária. Os valores de temperatura máxima de utilização desses derivados como fase estacionária é de aproximadamente 100 a 120°C abaixo da temperatura de eluição. Essa diferença de temperatura é mais do que suficiente para realizar um "Cold-Trap"¹⁹ permanente dos derivados na fase. Quando esses derivados são utilizados como fase quiral, eles estão dissolvidos em polisiloxanas, como a fase onde eles foram analisados (figura 5).

iii) O limite atual da CGAR-AT

Para a análise por CGAR-AT de hidrocarbonetos com muito mais de 100 átomos de carbono e outros compostos com pontos de ebulição equivalentes, será necessário o desenvolvimento de novos materiais para serem utilizados como suporte na confecção das colunas, além de novas fases estacionárias. A eluição desses compostos mesmo trabalhando com colunas de tamanho reduzido, ocorre acima de 400°C, inviabilizando sua análise com as colunas atuais. Outro problema, que os químicos ligados a CGAR-AT terão que enfrentar em um futuro próximo, será o desenvolvimento de novas técnicas de separação e introdução de amostra. A baixíssima solubilidade dessas

Tabela 1. Índice de Kovats e temperatura de eluição de derivados de β -ciclodextrinas, na coluna DB-5-HT, com 3 metros de comprimento.

Derivado	t _R (min)	Índice de Kovats	Temperatura de eluição (°C)
2,3,6-tri-O-metil- β -CD; MM* 1428 u	16,277	5479,6	337-338
2,3-di-O-metil-6-O-dimetil-terc-butil-silano- β -CD; MM 2128 u	17,683	6208,4	351-352
2,3-di-O-acetil-6-O-dimetil-terc-butil-silano- β -CD; MM 2520 u	19,146	6800,3	366-367
2,6-di-O-metil- β -CD; MM 1442 u	16,3-18,1	**	338-356

* MM - massa molecular

** Não foi determinado o índice de Kovats, para a 2,6-di-O-metil- β -CD, devido ao pico ser muito largo (sua faixa de I foi de 5480 até 6400).

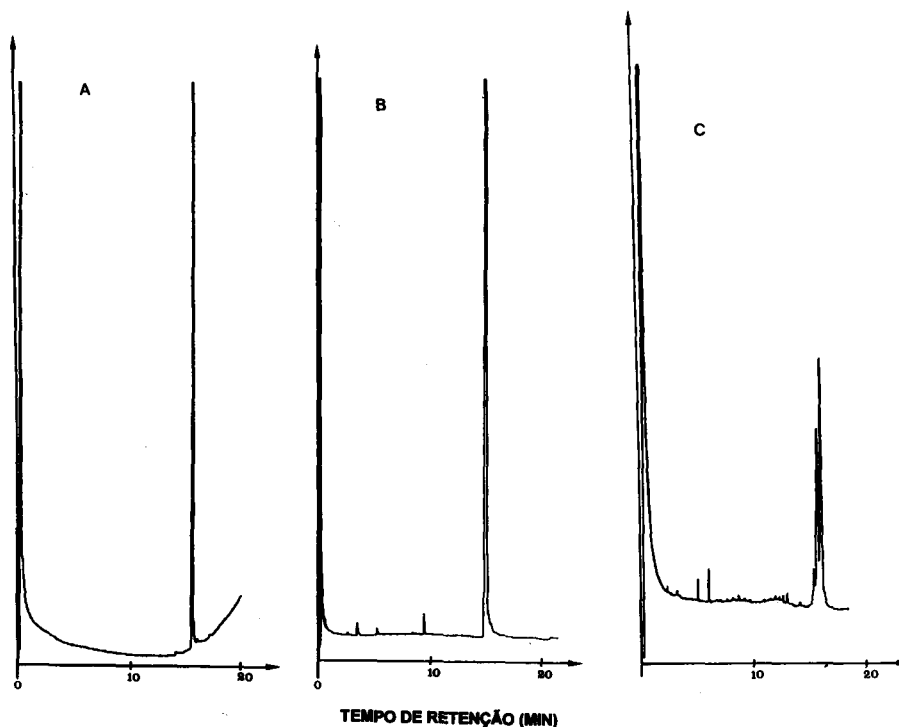


Figura 5. A) Cromatograma da 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina, em CGAR-AT. B) Cromatograma da 2,3-di-O-metil-6-O-dimetil-terc-butil-silil- β -ciclodextrina, em CGAR-AT. C) Cromatograma da 2,3-di-O-acetil-6-O-dimetil-terc-butil-silil- β -ciclodextrina, em CGAR-AT.

substâncias coloca restrições no seu isolamento, purificação e concentração, bem como na transferência para o sistema cromatográfico¹¹.

CONCLUSÕES

A utilização da CGAR-AT, é indispensável para a análise de compostos de alta massa molecular por cromatografia gasosa, bem como seu acoplamento a espectrometria de massas. Substâncias polifuncionais com massa molecular até 2520 u, foram analisadas.

Pode-se utilizar colunas de tamanho reduzido (em torno de 5 metros), na maioria dos casos, sem problemas de resolução.

O desenvolvimento de novas fases e suportes para essas colunas, é de suma importância para que a CGAR-AT continue desenvolvendo-se, aumentando assim, o seu universo de aplicações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Finep, CNPq, FUJB e UFRJ/SR-2, pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Lipski, S. R.; Mc Murray, W. J.; *J. Chromatogr.* **1983**, 279, 59.

- Blum, W.; *J. High Resol. Chromatogr., Chromatogr. Commun.* **1985**, 8, 718.
- Shomburg, G.; Häusig, U.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1989**, 12, 142.
- Pereira, A. S.; Silva, E. F.; Aquino Neto, F. R.; *Livro de Resumos da 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 1995*, QA-073.
- Silva, E. F.; Ramos, M. C. K. W.; Aquino Neto, F. R.; *Quím. Nova* **1996**, 19, 473.
- Del Rio, J. C.; Philp, R. P.; Allen, J.; *Org. Geochem.* **1992**, 18, 541.
- Del Rio, J. C.; Philp, R. P.; *Trends Anal. Chem.* **1992**, 11, 187.
- Azevedo, D. A.; Aquino Neto, F. R.; Simoneit, B. R. T.; *Proceedings of the 3rd Alago Meeting*, 1993, p 19.
- Azevedo, D. A.; Aquino Neto, F. R.; Simoneit, B. R. T.; *J. Mass Spectrom.* **1995**, 30, 247.
- Aquino Neto, F. R.; Cardoso, J. N.; Pereira, A. S.; Fernandes, M. C. Z.; Caetano, C. A.; Machado, A. L. C.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1994**, 17, 259.
- Rohwer, E. R.; Pretorius, V.; *J. High Resol. Chromatogr., Chromatogr. Commun.* **1987**, 10, 145.
- Grob, K.; Biedermann, M.; Bernath, K.; Neukon, H. P.; Galli, M.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1992**, 15, 613.
- Aquino Neto, F. R.; Cardoso, J. N.; *Quím. Nova* **1992**, 15, 224.

14. Damasceno, L. M. P.; Cardoso, J. N.; Coelho, R. B.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1992**, *15*, 256.
15. Grob, K.; Tschuor, R.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1990**, *13*, 193.
16. Wang, F. S.; Shanfield, H.; Zlatkis, A.; *J. High Resol. Chromatogr., Chromatogr. Commun.* **1983**, *6*, 471.
17. Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; *Quím. Nova* **1989**, *12*, 13.
18. Grob, K.; *Classical split and splitless injection in capillary gas chromatography; with some remarks on PTV injection*, Verlag, A. H., Ed.; Heidelberg, Basel, New York, 1993; p 547.
19. Grob Jr., K.; *On-column injection in capillary gas chromatography*; Verlag, A. H., Ed.; Heidelberg, Basel, New York, 1993; 1987; p 486.
20. Riehl, C. A. S.; Pinto, A. C.; Pereira, A. S.; Aquino Neto, F. R.; *Livro de Resumos da 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* 1994, PN-06.
21. Aquino Neto, F. R.; Cardoso, J. N.; Pereira, A. S.; Fernandes, M. C. Z.; *Proceedings of the 1st Int. Symp. on Colloid Chemistry in Oil Production: Asphatenes and Wax Deposition*, 1995, p 63.
22. Wenz, G.; Mischnick, P.; Krebber, R.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1990**, *13*, 724.
23. Pereira, A. S.; Silva, E. F.; Aquino Neto, F. R.; *J. Chromatogr.* (enviado).