Cromatografia líquida capilar: 2. Alargamento das bandas por efeitos extracoluna

Lincoln Coutinho, Fernando Mauro Lanças*

*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo
Cep 13560-970, São Carlos, SP, Brasil
e-mail: flancas@iqsc.usp.br*

Resumo

O alargamento da banda é um fator altamente indesejável em todas as técnicas cromatográficas, uma vez que diminui a eficiência da coluna (menor número de pratos, N) e deteriora a resolução (menor Rs). Este efeito é particularmente crítico na cromatografia líquida capilar (c-LC) devido aos pequenos volumes da instrumentação, conexões, colunas, etc., empregados na técnica. Como parte de uma série de artigos a respeito da c-LC, neste trabalho serão abordados os principais fatores que ocasionam o alargamento das bandas cromatográficas em c-LC, assim como a maneira de evitá-lo.

Palavras-chave

Cromatografia líquida capilar; alargamento de bandas; fatores extra coluna; micro LC; LC capilar.

Capillary liquid chromatography: 2. Band broadening due to extracolumn effects

Abstract

Band broadening is one of the major factors to be avoided in chromatographic techniques, once it decreases the column efficiency (the number of plates, N) and deteriorates the Resolution (Rs). This effect is particularly critical in capillary liquid chromatography due to the very low volumes, instrumentation, connections and columns employed in this technique. As a part in a series of papers dealing with c-LC, this work describes the major factors responsible for band broadening in chromatography, as well as the ways to minimize it.

Keywords

Capillary liquid chromatography; band broadening; extracolumn effects; micro-LC; capillary LC.

1 Introdução

Os primeiros trabalhos relacionados à utilização de colunas capilares na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) surgiram no final da década de 60, praticamente ao mesmo tempo que o surgimento da própria HPLC. Apesar de seu início promissor, o desenvolvimento da cromatografia líquida capilar (c-LC) foi bastante lento ao longo dos últimos 40 anos e, até o presente, não alcançou ampla difusão, fazendo com que as colunas de 4,6 mm de diâmetro interno ainda permaneçam como padrão comercial. Um dos principais motivos que levaram a este lento avanço, e a consequente padronização das colunas de 4,6 mm, está diretamente relacionado a um grande, e lamentável, equívoco ocorrido no início do desenvolvimento das colunas de HPLC.

As primeiras colunas desenvolvidas para a versão instrumental da cromatografia líquida possuíam entre 1,6-3,0 mm de diâmetro interno (d.i.) x 50-100 cm de comprimento e eram geralmente empacotadas com partículas de 30 µm recobertas com uma fase estacionária pelicular. No entanto, logo após a introdução das primeiras fases estacionárias compostas de micropartículas porosas de 5-10 µm, foi observado que as antigas colunas – agora empacotadas com a nova fase estacionária – diferentemente do esperado, possuíam menor eficiência quando comparadas com colunas de diâmetro interno maiores (5-6 mm) empacotadas também com o novo material. Esta observação fez com que grande parte dos cromatografistas acreditasse, erroneamente, que colunas de pequeno diâmetro interno possuíam intrinsecamente eficiências menores que as de grande diâmetro interno, fazendo assim com que estas se tornassem o novo padrão a partir de então^[1].

Na realidade, a menor eficiência obtida pelas colunas de pequeno diâmetro interno não estava relacionada à sua dimensão, mas sim ao excessivo alargamento de banda ocorrido tanto dentro da coluna – devido à limitada tecnologia de empacotamento existente na época – quanto fora da coluna – devido à utilização de detectores inadequados aos picos estreitos eluídos pelas novas colunas^[1], uma vez que estas podiam atingir até 10.000 pratos, fornecendo assim picos 10 vezes mais estreitos que aqueles fornecidos pelas primeiras colunas empacotadas com partículas de 30 µm, que possuíam em torno de 500 pratos^[1].

Deste modo, quando surgiram as primeiras fases estacionárias porosas de 5-10 µm, havia a necessidade de se redesenhar grande parte do equipamento cromatográfico (incluindo os detectores) para que se adaptasse às novas colunas, no entanto, ocorreu o inverso, as novas colunas tiveram seu diâmetro interno aumentado para que se adaptassem aos antigos equipamentos^[2].

Este equívoco na interpretação da origem da baixa eficiência obtida pelas colunas capilares, que acabou resultando no abandono de seu uso, ilustra muito bem a importância que o conhecimento dos aspectos teóricos referentes à miniaturização das colunas cromatográficas pode ter para o cromatografista e para a técnica em si.

Assim como ocorreu 40 anos atrás, atualmente o alargamento de banda extracolumna ainda vem sendo considerado um dos maiores desafios da miniaturização da cromatografia líquida (LC)^[3-8], uma vez que possui grandes implicações no desenvolvimento de sistemas instrumentais de alta eficiência destinados à escala capilar.

Deste modo, provavelmente o aspecto teórico mais importante que um bom cromatografista deve dominar, para que finalmente as colunas capilares na LC possam produzir implicações similares às aquelas introduzidas pelas colunas

capilares na GC, seja o completo entendimento dos processos envolvidos no alargamento de banda extracoluna.

Este trabalho, como parte de uma série de artigos a respeito da cromatografia líquida capilar (c-LC), tem como objetivo discutir os principais processos de dispersão relacionados ao alargamento de banda extracoluna, assim como seu significado prático.

2 Largura do pico cromatográfico

Sob condições ideais, quando uma pequena quantidade de amostra é introduzida em um sistema cromatográfico na forma de uma pequena zona retangular, os picos eluídos desse sistema idealmente possuirão uma distribuição gaussiana descrita pela Equação 1:

$$y = \frac{A}{\sigma_{obs} \sqrt{2\pi}} \exp \left[\frac{-(t - t_r)^2}{2\sigma_{obs}^2} \right] \quad (1)$$

onde A é a área do pico, σ_{obs} o desvio padrão do pico observado a partir do cromatograma, t o tempo e t_r o tempo de retenção do pico.

Como descrito pela Equação 1, um pico gaussiano é matematicamente caracterizado pela sua área, tempo de retenção, e desvio padrão. Esta caracterização em função do desvio padrão ao invés da largura do pico, como é corriqueiramente feita pelos cromatografistas, vem do fato de que, matematicamente, a largura de base de uma curva gaussiana é infinita, uma vez que tal curva é assintótica, tocando assim a linha de base somente em valores de t infinitos.

Deste modo, para caracterizarmos um pico cromatográfico em função da sua largura de base, torna-se necessária a estipulação de um método para definirmos como tal largura será obtida. Atualmente, é comum considerar que a largura de um pico cromatográfico gaussiano

será aquela definida pela intersecção das tangentes do ponto de inflexão do pico com a linha de base. Graficamente, isto equivale ao valor de 4 desvios padrão, como mostrado na Figura 1.

Utilizando tal critério, podemos reescrever a Equação 1, agora em função da largura de base, da seguinte forma:

$$y = \frac{4A}{w\sqrt{2\pi}} \exp \left[\frac{-8(t - t_r)^2}{w^2} \right] \quad (2)$$

onde w é a largura de base do pico obtida pela intersecção das linhas tangentes aos pontos de inflexão com a linha de base.

Uma vez que a largura de um pico cromatográfico gaussiano está diretamente relacionada ao seu desvio padrão, poderíamos utilizar tal valor como um bom parâmetro para a avaliação do alargamento de banda. No entanto, em várias situações, torna-se mais vantajoso (devido à sua propriedade aditiva) a utilização do valor do quadrado do desvio padrão (isto é, a variância) para tal propósito. A relação entre a eficiência de uma separação cromatográfica (em termos da altura de um prato) e o alargamento da banda cromatográfica (em termos da variância) é dada pela Equação 3:

Figura 1 Pico cromatográfico com distribuição gaussiana.

$$H = \frac{\sigma_{obs}^2}{L} \quad (3)$$

onde H é a altura equivalente de um prato, σ_{obs}^2 é a variância do pico observada a partir do registro do cromatograma, e L o comprimento da coluna.

3 Fontes de alargamento de banda

Idealmente, o alargamento da banda cromatográfica deveria depender somente dos processos de dispersão relacionados à coluna^[9], ou seja:

$$\sigma_{obs}^2 = \sigma_{col}^2 \quad (4)$$

onde σ_{col}^2 é a contribuição da coluna para a variância total observada a partir do cromatograma.

No entanto, na prática, é verificado que tanto a coluna quanto o equipamento influenciam na largura do pico. Desta forma, a variância do pico pode ser mais bem expressada pela seguinte equação:

$$\sigma_{obs}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{ex}^2 \quad (5)$$

onde σ_{ex}^2 é a contribuição de todas as fontes de dispersão extracoluna para o alargamento total do pico.

3.1 Processos de dispersão intracoluna – σ_{col}^2

Saito et al.^[1] foram os primeiros pesquisadores a estudarem a contribuição dos diferentes processos de dispersão ocorridos dentro de uma coluna empacotada para o alargamento total da banda. Tais autores postularam a existência de basicamente quatro processos de dispersão que influenciam de forma significativa a variância final da banda cromatográfica. Estes processos foram designados pelos autores como:

- Dispersão devido aos múltiplos caminhos;

- Dispersão devido à difusão longitudinal;
- Dispersão devido à resistência à transferência de massa na fase móvel;
- Dispersão devido à resistência à transferência de massa na fase estacionária.

Segundo estes autores, todos estes processos seriam aleatórios e essencialmente independentes entre si fornecendo, assim, contribuições individuais para a variância da banda cromatográfica que, quando somadas, produziriam a variância final da banda^[10], ou seja:

$$\sigma_{col}^2 = \sigma_{mc}^2 + \sigma_{dl}^2 + \sigma_{rm}^2 + \sigma_{rs}^2 \quad (6)$$

onde σ_{mc}^2 , σ_{dl}^2 , σ_{rm}^2 e σ_{rs}^2 representam as contribuições da dispersão causada pelos múltiplos caminhos, difusão longitudinal, resistência à transferência de massa na fase móvel e resistência à transferência de massa na fase estacionária, respectivamente.

3.2 Processos de dispersão extracoluna – σ_{ex}^2

Semelhantemente ao feito de Saito et al.^[1] para os processos de dispersão intracoluna, um grande número de pesquisadores vem propondo e desenvolvendo vários métodos e equações específicas para estimar as contribuições das diversas fontes de dispersão extracoluna^[11-22]. A seguir discutiremos as suas cinco principais fontes, a citar:

- Dispersão devido ao volume de amostragem (σ_{inj}^2);
- Dispersão ocorrida nas tubulações (σ_{tub}^2);
- Dispersão devido aos processos de mistura e difusão ocorridas nas conexões (σ_{md}^2);
- Dispersão devido ao volume da cela de detecção (σ_{det}^2);

- Dispersão devido à constante de tempo do detector (σ_{ct}^2).

Semelhantemente ao alargamento de banda intracolumna, o alargamento de banda extracolumna é expresso como a soma de todas as contribuições individuais, como mostrada pela Equação 7.

$$\sigma_{ex}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{tub}^2 + \sigma_{md}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{ct}^2 \quad (7)$$

O completo entendimento da origem e da magnitude destes diferentes processos de alargamento extracolumna é de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas cromatográficos capilares de alta eficiência e, uma vez que – por motivos óbvios – tais processos de dispersão sempre estarão presentes em maior ou menor grau^[23], a principal preocupação no desenvolvimento de equipamentos dedicados a c-LC é o quanto esses efeitos podem influenciar a separação.

Atualmente há um consenso de que a variância proporcionada pelos processos de dispersão extracolumna não deve superar 10% da contribuição da coluna, ou seja:

$$\sigma_{ex}^2 \leq 0,10\sigma_{col}^2 \quad (8)$$

A Equação 8 ainda pode ser escrita, em termos dos parâmetros cromatográficos, da seguinte forma:

$$\sigma_{ex}^2 \leq 0,10 \frac{\pi^2 r^4 L^2 \varepsilon^2 (1+k)^2}{N} \quad (9)$$

onde σ_{ex}^2 possui unidades de volume, r , L e ε são respectivamente o raio, comprimento e permeabilidade da coluna, enquanto N e k são respectivamente o número de pratos e o fator de retenção para um dado composto.

A Tabela 1 mostra os valores máximos tolerados para a variância extracolumna para diversos picos com diferentes fatores de retenção em sete diferentes colunas, calculadas a partir da Equação 9.

A partir dos valores da Tabela 1, podemos observar que uma coluna com diâmetro interno de 250 μm admitirá uma variância extracolumna máxima cerca de 115.000 vezes menor que aquela admitida para uma coluna convencional de 4,6 mm de diâmetro interno. Esta observação demonstra claramente a importância que a redução de todas as fontes de dispersão extracolumna possui para a c-LC.

Apesar da Equação 9 ser muito útil no cálculo do máximo alargamento de banda extracolumna tolerado para um sistema em particular, ela não fornece nenhuma informação sobre as máximas contribuições individuais de cada fonte de alargamento. Para tal, podemos utilizar a Equação 10:

Tabela 1 Valores máximos tolerados para a variância extracolumna (σ_{ex}^2) calculados a partir da Equação 9*.

D.I. [†] da coluna	Fator de retenção (k)				
	0	2	6	10	20
4,6 mm	20,3 μL^2	183 μL^2	995 μL^2	2.456 μL^2	8.952 μL^2
1,0 mm	0,05 μL^2	0,41 μL^2	2,22 μL^2	5,49 μL^2	20,0 μL^2
250 μm	177 nL ²	1.594 nL ²	8.678 nL ²	21.429 nL ²	78.103 nL ²
100 μm	4,53 nL ²	40,8 nL ²	222 nL ²	549 nL ²	1999 nL ²
50 μm	0,28 nL ²	2,55 nL ²	13,9 nL ²	34,3 nL ²	125 nL ²
20 μm	0,01 nL ²	0,07 nL ²	0,36 nL ²	0,88 nL ²	3,20 nL ²
10 μm	453 pL ²	4.080 pL ²	22.216 pL ²	54.859 pL ²	199.943 pL ²

* $L = 0,15 \text{ m}$; $\varepsilon = 0,7$; $N = 15.000$. [†] Diâmetro interno.

$$\sigma_x^2 = \theta_x \sigma_{ex}^2 \quad (10)$$

onde σ_x^2 é a contribuição individual para alargamento de banda proporcionado pela fonte de dispersão x e θ_x a fração do máximo alargamento de banda extracolumna (σ_{ex}^2) tolerado para tal fonte de dispersão, sendo que a somatória de todas as frações individuais deverá ser sempre igual a 1, ou seja:

$$\sum \theta_x = \theta_{inj} + \theta_{tub} + \theta_{md} + \theta_{det} + \theta_{ct} = 1 \quad (11)$$

3.3 Dispersão devido à introdução da amostra

O alargamento de banda proporcionado pelo processo de introdução da amostra tem origem em basicamente duas fontes distintas. A primeira fonte é inerente a todos os sistemas de introdução de amostras e, desta forma, infelizmente não pode ser evitada. Tal fonte de dispersão resulta da natureza finita do volume da amostra introduzida no sistema e é diretamente proporcional a ele. Desta forma, esta fonte de alargamento de banda é independente do tipo de sistema de introdução da amostra.

Por sua vez, a segunda fonte de alargamento de banda está diretamente relacionada ao perfil com o qual a amostra é introduzida no sistema cromatográfico, sendo dependente do tipo de sistema de introdução da amostra, do *design* utilizado pela válvula, do diâmetro interno da alça de amostragem (independente se é externa ou interna), velocidade de comutação da posição *Load* para a *Inject*, entre muitos outros fatores.

A contribuição de ambas as fontes para o alargamento de banda pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{V_{inj}^2}{K^2} \quad (12)$$

onde V_{inj} é o volume de injeção e K é uma constante que caracteriza o perfil com o qual a amostra é introduzida no sistema cromatográfico. Para

um perfil perfeitamente retangular, gaussiano e exponencial, K^2 assume os valores 12, 36 e 1, respectivamente.

A Tabela 2 mostra os volumes máximos de injeção calculados com cinco valores de θ_{inj} para picos com diferentes fatores de retenção (k) em colunas de diversos diâmetros internos. Tais valores foram calculados considerando um perfil de injeção perfeitamente retangular ($K^2 = 12$). No entanto, na prática dificilmente tal perfil será atingido utilizando as válvulas atualmente disponíveis no mercado. Desse modo, os volumes de injeção não devem ultrapassar dois terços dos valores tabelados (a não ser nos casos nos quais se utilizam algum tipo de pré-concentração *on-line* como, por exemplo, a focalização *on-column* ou *column-switching*).

É importante salientar que um processo ideal de injeção deve introduzir rapidamente uma quantidade de amostra pequena o suficiente para não proporcionar um excessivo alargamento de banda, mas, ao mesmo tempo, grande o suficiente para permitir a detecção de todos os seus constituintes, mesmo em concentrações muito baixas. Deste modo, existe um compromisso entre eficiência de separação e sensibilidade de detecção que, em escalas capilares, ganha importância ainda maior que em escala convencional^[1], uma vez que as celas de detecção dos métodos óticos desenvolvidas para a escala capilar obviamente possuem caminhos óticos muito menores que as desenvolvidas para a escala convencional.

Um meio de se contornar tal paradigma pode ser atingido minimizando todas as outras fontes de dispersão, fazendo com que seus respectivos θ 's tendam a zero, o que, consequentemente, resultaria em valores elevados para θ_{inj} , permitindo, assim, a utilização de grandes volumes de injeção sem que a eficiência da separação seja significativamente prejudicada.

Tabela 2 Volume máximo de injeção.

D.I. coluna	k	$\sigma_{inj}^2 = \theta_{inj} \sigma_{ex}^2$				
		$\theta_{inj}=1$	$\theta_{inj}=0,75$	$\theta_{inj}=0,5\%$	$\theta_{inj}=0,25$	$\theta_{inj}=0,1$
4,6 mm	0	15,61 μ L	13,52 μ L	11,04 μ L	7,80 μ L	4,94 μ L
	2	46,82 μ L	40,55 μ L	33,11 μ L	23,41 μ L	14,81 μ L
	10	171,69 μ L	148,68 μ L	121,40 μ L	85,84 μ L	54,29 μ L
1,0 mm	0	0,74 μ L	0,64 μ L	0,52 μ L	0,37 μ L	0,23 μ L
	2	2,21 μ L	1,92 μ L	1,56 μ L	1,11 μ L	0,70 μ L
	10	8,11 μ L	7,03 μ L	5,74 μ L	4,06 μ L	2,57 μ L
250 μ m	0	46,10 nL	39,92 nL	32,60 nL	23,05 nL	14,58 nL
	2	138,30 nL	119,77 nL	97,79 nL	69,15 nL	43,73 nL
	10	507,10 nL	439,16 nL	358,58 nL	253,55 nL	160,36 nL
100 μ m	0	7,38 nL	6,39 nL	5,22 nL	3,69 nL	2,33 nL
	2	22,13 nL	19,16 nL	15,65 nL	11,06 nL	7,00 nL
	10	81,14 nL	70,27 nL	57,37 nL	40,57 nL	25,66 nL
50 μ m	0	1,84 nL	1,60 nL	1,30 nL	0,92 nL	0,58 nL
	2	5,53 nL	4,79 nL	3,91 nL	2,77 nL	1,75 nL
	10	20,28 nL	17,57 nL	14,34 nL	10,14 nL	6,41 nL
20 μ m	0	295,04 pL	255,51 pL	208,63 pL	147,52 pL	93,30 pL
	2	885,13 pL	766,54 pL	625,88 pL	442,56 pL	279,90 pL
	10	3245,46 pL	2810,65 pL	2294,89 pL	1622,73 pL	1026,31 pL
10 μ m	0	73,76 pL	63,88 pL	52,16 pL	36,88 pL	23,33 pL
	2	221,28 pL	191,64 pL	156,47 pL	110,64 pL	69,98 pL
	10	811,37 pL	702,66 pL	573,72 pL	405,68 pL	256,58 pL

* $K^2 = 12$; $L = 0,15$ m; $\varepsilon = 0,7$; $N = 15.000$.

Atualmente, válvulas de até 4 nL podem ser encontradas comercialmente, no entanto, caso se necessite de volumes de injeção menores que aqueles fornecidos por tais válvulas, pode-se ainda empregar diversas técnicas alternativas de injeção descritas na literatura^[24-27], as quais serão discutidas detalhadamente em outra parte desta série de artigos.

3.4 Dispersão ocorrida nas tubulações

Junto com os processos de mistura e dispersão (conhecidos também como câmara de mistura e câmara de dispersão), o processo de

dispersão ocorrido nas tubulações é uma das três maiores fontes de alargamento de banda extra-coluna.

O processo de dispersão ocorrido dentro das tubulações normalmente utilizadas entre o injetor e a coluna e entre a coluna e o detector, resulta do perfil parabólico da velocidade com a qual a fase móvel flui através dela^[28,29] (Figura 2). Este fenômeno conhecido como *fluxo de Poiseuille* é matematicamente descrito pela equação de Hagen-Poiseuille:

$$u(r) = \frac{\Delta P}{4\eta L} (r_0^2 - r^2) \quad (13)$$

onde $u(r)$ é a velocidade linear em função da distância r a partir do centro do tubo, r_0 é o raio interno do tubo, L o comprimento, ΔP a diferença de pressão entre os dois extremos do tubo e η a viscosidade dinâmica da fase móvel.

Devido ao perfil não linear da velocidade, as moléculas dos analitos próximas ao centro do tubo fluirão mais rapidamente que aquelas próximas à parede, provocando, assim, a dispersão da banda cromatográfica como ilustrado na Figura 2.

A partir da Equação 13 também podemos verificar que as moléculas dos analitos próximas ao centro do tubo ($r = 0$) fluirão com a máxima velocidade permitida, enquanto as moléculas próximas à parede ($r = r_0$) permanecerão paradas indefinidamente, caso não exista nenhum mecanismo de transferência de massa radial.

Figura 2 Velocidades da fase móvel em função da distância do centro do tubo. a) Perfil ideal, resultante da passagem de um fluido através de um tubo em velocidade uniforme, sem alargamento da banda; b) Perfil resultante do alargamento da banda devido ao perfil não linear da velocidade ocasionado pela viscosidade do fluido e forças de fricção.

Sob condições de fluxo laminar, o único mecanismo de transferência de massa radial existente dentro do tubo é a difusão molecular^[1]. Deste modo, qualquer meio que promova uma maior difusão das espécies também proporcionará uma diminuição do alargamento do pico. Diversas geometrias de tubulações (espiraladas, torcidas, em forma de serpentina, com seção transversal ovalada, etc.) já foram propostas visando aumentar tal difusão radial. No entanto, apesar de tais geometrias terem aumentado significativamente a difusão das espécies dentro do tubo (proporcionando assim uma menor dispersão) tais tubulações não são utilizadas com muita frequência.

O efeito da dispersão devido ao perfil da velocidade da fase móvel é pouco pronunciado na cromatografia gasosa, uma vez que a grande difusibilidade dos gases possibilita uma rápida difusão radial que, em parte, compensa a não linearidade do perfil de velocidade^[30]. No entanto, a difusibilidade dos líquidos é cerca de 5 ordens de grandeza menor que as dos gases o que, conseqüentemente, promove uma dispersão proporcionalmente maior.

Se considerarmos uma tubulação como sendo uma coluna tubular aberta que não retém de nenhuma forma os analitos, poderemos estimar a contribuição da dispersão da banda cromatográfica devido ao fluxo de Poiseuille a partir da equação de Taylor-Golay^[11] para um pico não retido:

$$H_{(comp)} = \frac{2D_m}{u} + \frac{r^2 u}{24D_m} \quad (14)$$

onde $H_{(comp)}$ é a altura de um prato em unidades de comprimento, D_m é o coeficiente de difusão molecular do analito na fase móvel, r o raio interno da tubulação e u a velocidade média linear da fase móvel.

Utilizando a seguinte relação:

$$H_{(comp)} = \frac{\sigma_{tub}^2}{L} \frac{1}{(\pi r^2)^2} \quad (15)$$

onde σ_{tub}^2 é a variância em unidades de volume, podemos reescrever a Equação 14 em termos da variância proporcionada pela dispersão devido ao fluxo de Poiseuille (em unidade de volume) da seguinte forma:

$$\sigma_{tub}^2 = \frac{2D_m \pi^2 r^4 L}{u} + \frac{\pi^2 r^6 L u}{24D_m} \quad (16)$$

ou em termos do fluxo volumétrico:

$$\sigma_{tub}^2 = \frac{2D_m \pi^3 r^6 L}{F} + \frac{\pi^4 r^4 L F}{24D_m} \quad (17)$$

Uma vez que o coeficiente de difusão dos líquidos é muito pequeno (na ordem de $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), assim como o raio interno das colunas capilares (na ordem de 10^{-2} cm^2), o primeiro termo das Equações 16 e 17 pode ser negligenciado quando aplicado na cromatografia líquida capilar. Desta forma, a contribuição para a variância total do pico, devido aos processos de dispersão ocorridos dentro das tubulações, pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$\sigma_{tub}^2 = \frac{\pi r^4 L F}{24D_m} \quad (18)$$

A partir da Equação 18, podemos observar que a variância proporcionada pelo fluxo de Poiseuille é proporcional à quarta potência do raio do tubo. Deste modo, pode-se concluir que a redução do diâmetro interno do tubo é o meio mais efetivo de se reduzir o alargamento de banda causado pelas tubulações. No entanto, a pressão do sistema cromatográfico é inversamente proporcional ao quadrado do raio do tubo, como descrito pela seguinte equação:

$$\Delta P = \frac{8\eta L u}{r^2} \quad (19)$$

Deste modo, o diâmetro interno mínimo que uma tubulação utilizada em um sistema cromatográfico capilar de alta eficiência poderá possuir é limitado pela pressão que a própria tubulação proporcionará no sistema cromatográfico, impossibilitando assim a utilização de tubulações de diâmetro interno muito reduzido.

Semelhantemente ao cálculo do volume máximo tolerado para a injeção, a Tabela 3 mostra o comprimento máximo tolerado para as tubulações utilizadas em 5 diferentes colunas.

3.5 Processos de difusão e mistura (câmaras de difusão e de mistura)

O alargamento da banda cromatográfica resultante dos efeitos da câmara de mistura e da câmara de difusão está inerentemente relacionado às conexões entre duas tubulações (tanto de mesmo diâmetro interno, quanto de diâmetros diferente) através de uma cavidade (ou câmara), como mostrado na Figura 3.

O efeito da câmara de difusão é muito similar à dispersão devido ao fluxo de Poiseuille, no entanto, com um perfil de velocidade do fluxo muito mais complexo e dependente da geometria das tubulações e do volume morto associado à câmara que conecta as duas tubulações. Desta forma, a contribuição dos efeitos da câmara de difusão para o alargamento do pico geralmente não pode ser calculada.

Sternberg^[11] demonstrou que o comportamento das câmaras de difusão e de mistura é funcionalmente muito similar, sendo a primeira controlada pela constante de tempo da difusão do soluto e a segunda controlada pelo fluxo da fase móvel. A constante de tempo do decaimento da concentração de um soluto da amostra, devido aos efeitos da câmara de difusão, é inversamente

Tabela 3 Comprimento máximo (cm) tolerado para as tubulações utilizadas com colunas de 5 diferentes diâmetros internos para um pico pouco retido*.

D.I. coluna	Fluxo volumétrico [†]	D.I. tubo	$\sigma_{tub}^2 = \theta_{tub} \sigma_{ex}^2$				
			$\theta_{tub}=1$	$\theta_{tub}=0,75$	$\theta_{tub}=0,5$	$\theta_{tub}=0,25$	$\theta_{tub}=0,1$
4,6 mm	1,0 mL/min	1,0 mm	0,13	0,10	0,07	0,03	0,01
		250 μ m	34,3	25,7	17,2	8,58	3,43
		100 μ m	1340	1005	670	335	134
1,0 mm	47 μ L/min	250 μ m	1,63	1,22	0,81	0,41	0,16
		100 μ m	63,7	47,8	31,8	15,9	6,37
		50 μ m	1019	764	509	255	102
250 μ m	3 μ L/min	100 μ m	3,90	2,92	1,95	0,97	0,39
		50 μ m	62,3	46,8	31,2	15,6	6,23
		25 μ m	998	748	499	249	99,8
100 μ m	473 nL/min	50 μ m	10,2	7,64	5,09	2,6	1,02
		25 μ m	163	122	81,5	40,8	16,3
		10 μ m	6367	4775	3184	1592	637
50 μ m	118 nL/min	25 μ m	40,6	30,4	20,3	10,1	4,06
		10 μ m	1585	1189	793	396	159
		5 μ m	25360	19020	12680	6340	2536
20 μ m	18 nL/min	10 μ m	266	200	133	66,5	26,6
		5 μ m	4256	3192	2128	1064	426
		2 μ m	166253	124690	83127	41563	16625
10 μ m	5 nL/min	10 μ m	59,9	44,9	29,9	15,0	5,99
		5 μ m	958	718	479	239	95,8
		2 μ m	37407	28055	18703	9352	3741

* $k = 2$; $L = 0,15$ m; $\varepsilon = 0,7$; $N = 15.000$; $D_m = 10^{-5}$. [†] $u = 1,0$ mm/s.

Figura 3 Conexões entre dois tubos através de uma câmara.

proporcional ao coeficiente de difusão molecular do soluto, enquanto que o efeito da câmara de mistura é inversamente proporcional ao fluxo.

Tanto o alargamento de banda causado pela câmara de difusão quanto o causado pela câmara de mistura são de natureza exponencial. Tal natureza é consideravelmente mais prejudicial ao sistema cromatográfico capilar que as fontes de alargamento de banda que possuem natureza gaussiana, pois aquela resulta em picos com caudas^[31].

Nos atuais sistemas de HPLC e c-LC, os fenômenos das câmaras de difusão e de mistura são combinados de uma forma complexa. No

caso particular da c-LC, na qual a velocidade da fase móvel que flui pelos tubos é geralmente mais baixa que aquelas utilizadas na HPLC convencional, os efeitos das câmaras de difusão e de mistura podem contribuir de forma mais significativa que na HPLC. Deste modo, é imprescindível para a c-LC que até mesmo os menores volumes mortos sejam completamente eliminados do sistema.

3.6 Dispersão no detector

O sistema eletrónico do detector também pode contribuir de forma significativa para o alargamento do pico. Isto se deve à velocidade finita com a qual o circuito eletrónico responde a uma variação do sinal proveniente do transdutor^[11,32-34]. Uma vez que grande parte do circuito elétrico é composta de resistores associados com capacitores (circuitos RC), como mostrado na Figura 4, tais circuitos responderão a um estímulo elétrico de forma exponencial.

O tempo de resposta de um circuito RC, é caracterizado pela sua *constante de tempo* τ , que representa o tempo necessário para que o sinal na saída do circuito (V_o) atinja aproximadamente 63% do sinal de entrada (V_i), como mostrado na Figura 5.

A contribuição da constante de tempo para a variância total do pico (em unidades de volume) é dada pela seguinte equação:

$$\sigma_{ct}^2 = F^2 \tau^2 \quad (20)$$

onde σ_{ct}^2 é a contribuição da constante de tempo do circuito eletrónico do detector para a variância total do pico.

Para calcularmos qual a constante de tempo máxima tolerada para um sistema de detecção, podemos utilizar a Equação 21:

$$\tau = \frac{\sqrt{\theta \cdot \sigma_{ex}^2}}{F} \quad (21)$$

Figura 4 Circuito RC.

Figura 5 Constante de tempo. (—) Sinal elétrico na entrada do circuito RC (V_i); (---) Sinal elétrico na saída do Circuito RC (V_o).

Figura 6 Efeito da constante de tempo em um pico com largura de 24 segundos.

Além da influência que a constante de tempo do detector tem no alargamento do pico, ela também pode influenciar de forma significativa na sua simetria, como pode ser visto na Figura 6.

4 Conclusão

O alargamento da banda é um fator altamente indesejável em cromatografia, uma vez que diminui a eficiência da coluna (menor N) e deteriora a resolução (menor R_s). Os principais fatores que ocasionam este alargamento podem ser resumidos em alargamento devido a fatores intrínsecos da coluna e a fatores extracoluna. No presente artigo, demonstraram-se os principais fatores extracoluna responsáveis pelo alargamento das bandas cromatográficas, assim como as maneiras de evitá-los. Apesar de o alargamento ser indesejável em qualquer técnica de separação, ele se torna particularmente crítico na cromatografia líquida capilar (c-LC) devido aos pequenos volumes inerentes à técnica.

Agradecimentos

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida a Lincoln Coutinho (processo N.º 04/09384-7), ao Instituto Internacional de Cromatografia pelas facilidades para o desenvolvimento deste trabalho e à FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro ao Laboratório CROMA.

Referências

- 1 Saito M, Hibi K, Ishii D, Takeuchi T. In: Ishii D, editor. *Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography*. New York: VCH Publisher; 1988.
- 2 Knox JH. *Journal of Chromatographic Science* 1977; 15:352.
- 3 Ishii D, Asai K, Hibi K, Jonokuchi T, Nagaya M. A study of micro-high-performance liquid chromatography: I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1977; 144(2):157-68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)99351-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)99351-8)
- 4 Scott RPW, Simpson CF. *Journal of Chromatographic Science* 1982; 20:62.
- 5 Vonk N, Verstraeten WP, Marinissen JW. *Journal of Chromatographic Science* 1992; 30:296.
- 6 Chervet JP, Ursem M, Salzmann JP. Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 1996; 68:1507-12. <http://dx.doi.org/10.1021/ac9508964>
- 7 Heron S, Tchaplal A, Chervet JP. Influence of injection parameters on column performance in nanoscale high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 2000; 51:495-9. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02490492>
- 8 Beisler AT, Schaefer KE, Weber SG. Simple method for the quantitative examination of extra column band broadening in microchromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 2003; 986(2):247-51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02018-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02018-6)
- 9 Szumski M, Buszewski B. State of the Art in Miniaturized Separation Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2002; 32(1):1-46. <http://dx.doi.org/10.1080/10408340290765434>
- 10 Scott RPW. *Liquid Chromatography Column Theory*. New York: Wiley; 1992.
- 11 Sternberg JC. In: Giddings JC, Keller RA, editors. *Advances in Chromatography*. New York: Marcel Dekker; 1966. vol. 2, p. 205-270.
- 12 Martin M, Eon C, Guiochon G. Study of the pertinency of pressure in liquid chromatography: II. Problems in equipment design. *Journal of Chromatography A* 1975; 108(2):229-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)84666-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)84666-X)
- 13 Kirkland JJ, Yau WW, Stoklosa HJ, Dilks Junior CH. *Journal of Chromatographic Science* 1977; 15:303.
- 14 Reese CE, Scott RPW. *J. Chromatogr.* 1980; 18:479.
- 15 Lauer HH, Rozing GP. The selection of optimum conditions in HPLC. I. The determination of external band spreading in LC instruments. *Chromatographia* 1981; 14(11):641-7. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02291104>

- 16 DiCesare JL, Dong MW, Atwood JG. Very-high-speed liquid chromatography: II. Some instrumental factors influencing performance. *Journal of Chromatography A* 1981; 217:369-86. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88091-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88091-7)
- 17 Freebaim KW, Knox JH. Dispersion measurements on conventional and miniaturised HPLC systems. *Chromatographia* 1984; 19(1):37-47. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02687717>
- 18 Hupe KP, Jonker RJ, Rozing G. Determination of band-spreading effects in high-performance liquid chromatographic instruments. *Journal of Chromatography A* 1984; 285:253-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)87767-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87767-0)
- 19 Cohen KA, Stuart JD. *Journal of Chromatographic Science* 1987; 25:381.
- 20 Liu G, Svenson L, Djordjevic N, Erni F. Extra-column band broadening in high-temperature open-tubular liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1993; 633(1-2):25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83134-E](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(93)83134-E)
- 21 Bakalyar SR, Phipps C, Spuce B, Olsen K. Choosing sample volume to achieve maximum detection sensitivity and resolution with high-performance liquid chromatography columns of 1.0, 2.1 and 4.6 mm I.D. *Journal of Chromatography A* 1997; 762(1-2):167-85. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00851-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00851-5)
- 22 Prüß A, Kempter C, Gysler J, Jira T. Extracolumn band broadening in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2003; 1016(2):129-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01290-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01290-1)
- 23 Visser JPC. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999; 856(1-2):117-143. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00692-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00692-5)
- 24 Claessens HA, Burcinova A, Cramers CA, Mussche P, Van Tilburg CE. Evaluation of injection systems for open tubular liquid chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 1990; 2(3):132-37. <http://dx.doi.org/10.1002/mcs.1220020309>
- 25 Harvey MC, Stearns SD, Averette JP. *LC Liq. Chromatogr. HPLC Mag.* 1985; 3:5.
- 26 Jorgenson JW, Guthrie EJ. Liquid chromatography in open-tubular columns : Theory of column optimization with limited pressure and analysis time, and fabrication of chemically bonded reversed-phase columns on etched borosilicate glass capillaries *Journal of Chromatography A* 1983; 255:335-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88293-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88293-5)
- 27 Manz A, Simon W. Injectors for open-tubular column liquid chromatography with 106 theoretical plates at retention times in the minute range. *Journal of Chromatography A* 1987; 387:187-96. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94523-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94523-6)
- 28 Taylor G. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 1953; 219:186.
- 29 Taylor G. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 1954; 225:473.
- 30 Cazes J. *Chromatography Theory*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002.
- 31 Scott RPW, Kucera P. *Journal of Chromatographic Science* 1971; 9:641.
- 32 Schmauch L. J. Response Time and Flow Sensitivity of Detectors for Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* 1959; 31(2):225-30. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60146a021>
- 33 Vandenneuvel FA. Estimation and Correction of Post-Column Dead Volume Effect in Chromatography. *Analytical Chemistry* 1963; 35(9):1193-98. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60202a064>
- 34 McWilliam IG, Bolton HC. Instrumental peak distortion. I. Relaxation time effects. *Analytical Chemistry* 1969; 41(13):1755-62. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60282a001>

Recebido: 12/07/2011

Aceito: 26/07/2011