



Propriedades de Coluna que Causam Impacto na Cromatografia Iônica

Autores

Carl Fisher e John Guajardo,
Thermo Fisher Scientific,
Sunnyvale, CA, EUA

Palavras-chave

Cromatografia de troca iônica,
arquitetura de fase estacionária,
funcionalização, capacidade da
coluna, coluna seletiva de hidróxido

Sumário executivo

Para a separação de espécies iônicas, a cromatografia de íons (IC), um tipo de cromatografia líquida (LC), é o método preferido. O componente mais crítico dessa técnica é a coluna de separação, que é escolhida com base em fatores que incluem os analitos específicos de interesse, o tipo de amostra e os níveis de detecção necessários. Este Boletim descreve os parâmetros da coluna que afetam a separação de espécies carregadas em solução usando cromatografia de troca iônica e as descobertas que continuaram redefinindo o que é possível fazer com um sistema de IC.

Papel das colunas na Cromatografia Iônica

As características de uma coluna de separação são uma das considerações mais essenciais para obter os melhores resultados com um sistema de IC (Figura 1). A coluna determina a qualidade de separação dos componentes iônicos de uma solução, o que é essencial para uma integração de pico confiável. Ela determina se os analitos serão apenas detectados vagamente ou quantificados na faixa de partes por bilhão (ppb).

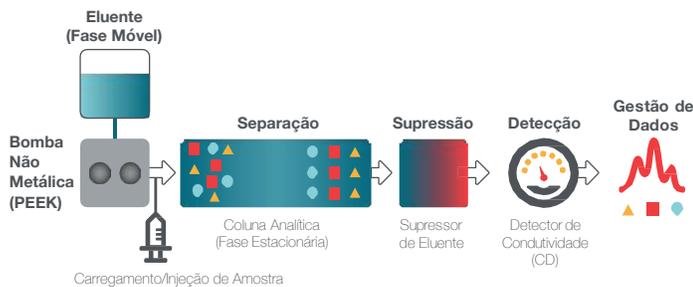


Figura 1. Diagrama esquemático de um sistema IC. Poliéteréter-cetona, PEEK.

A qualidade da separação é influenciada por diversos fatores e alguns podem variar por meio do ajuste dos parâmetros do método e outros que são fixados pelas propriedades da coluna. As condições cromatográficas sobre as quais o operador do sistema tem controle direto incluem concentração do eluente, vazão, temperatura e volume/concentração de carregamento de amostra. Como o IC é limitado a apenas alguns eluentes, a escolha de uma coluna com a seletividade correta é fundamental para obter a separação desejada, principalmente quando os analitos têm a mesma carga. A seleção inicial da coluna é o foco deste Boletim, e as características que serão discutidas são tamanho de partícula, área de superfície, química de superfície de resina e formato. A interação das variáveis do método de instrumento, juntamente com a fase estacionária da coluna selecionada, determina a qualidade da separação dos analitos, determinando, definitivamente, a qualidade dos dados cromatográficos obtidos e a quantificação que pode ser obtida.

Desenvolvimento de inicial de coluna IC

As primeiras separações de IC utilizaram um polímero (fase estacionária) levemente sulfonado ($R-SO_3^-$) de estireno-divinilbenzeno (DVB) para criar uma superfície de troca catiônica e ácido clorídrico diluído como eluente (fase móvel)¹, considerado melhor que materiais à base de sílica que costumavam ser usados em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) devido à sua estabilidade química superior. As primeiras fases estacionárias de troca iônica amplamente utilizadas foram criadas revestindo uma resina de estireno-DVB de superfície sulfonada com uma suspensão de resina de troca iônica coloidal ligada à superfície de troca catiônica.

Essas colunas costumavam utilizar eluentes à base de fenato, mas uma fase móvel à base de hidróxido era uma opção mais atraente devido ao baixo nível de fundo possível e ao potencial de uso em eluição de gradiente. No entanto, a baixa força de eluição de eluentes de hidróxido significava que eram necessárias altas concentrações para deslocar todos os analitos aniônicos que estavam ligados à resina. Isso exigia a regeneração fora de linha frequente de supressores de leito compactado que estavam em uso no momento, causando um gargalo na taxa de transferência. Outra preocupação envolvendo o uso de eluentes à base de hidróxido preparados manualmente era a incapacidade de eliminar impurezas de carbonato, que por si só têm um forte potencial de deslocamento de analito, criando um perfil de eluição imprevisível. Ao testar eluentes à base de carbonato, seu forte potencial de eluição significava que era possível usar concentrações mais baixas e, portanto, exigindo menos regenerações de supressores. Essa relativa facilidade de uso resultou na adoção e produção em massa de colunas com separações de pico otimizadas para uso com eluentes de carbonato. À medida que a tecnologia de supressor amadurecia até o ponto em que a regeneração fora de linha não ser mais necessária e a capacidade de supressão adequada ficou disponível, eluentes à base de hidróxido se tornaram uma fase móvel muito mais favorável devido à sua capacidade de serem suprimidos em água. Esse é o cenário ideal para medições de condutividade, produzindo a melhor relação sinal/ruído para atingir os limites mais baixos de detecção com detecção de condutividade (CD). Com o desenvolvimento da geração de eluentes eletrolíticos (IC Sem Reagente, RFIC), a produção sob demanda de eluentes à base de hidróxido a partir de água desionizada significava que a contaminação por carbonatos deixou de ser um problema. Outro benefício é que gradientes altamente reprodutíveis, que focam em picos para produzir uma maior capacidade de pico cromatográfico, podem ser produzidos sem a necessidade de uma bomba de proporção.

Obtendo maior eficiência: Tamanho de partícula de resina

As primeiras resinas utilizadas para IC tinham aproximadamente 35 µm de diâmetro. As partículas de fase estacionária de IC modernas da Thermo Scientific possuem tamanhos variáveis de aproximadamente 9 a 4 µm. O desenvolvimento de partículas de tamanho menor em colunas de HPLC e IC se deve ao aumento da eficiência de coluna obtida e pela extensão da faixa de taxas de fluxo nas quais isso se mantém, oferecendo mais flexibilidade aos usuários na otimização de seu método. O que isso representa para a cromatografia são picos mais altos e mais estreitos, com melhor separação, resolvendo analitos altamente eluentes que antes não podiam ser distinguidos e facilitando a integração de picos, o que leva a uma quantificação mais precisa.³

Uma consequência do desenvolvimento de partículas de tamanho cada vez menor é a necessidade de desenvolver, paralelamente, uma instrumentação capaz de lidar com as contrapressões mais altas que surgirem. IC de Alta Pressão Thermo Scientific™ Dionex™ (HPIC) Sistemas atendem a esse desafio com bombas, válvulas e insumos capazes de tolerar contrapressões de até 5000 psi, permitindo que os usuários aproveitem o potencial de uma coluna ao máximo. Enquanto alguns fornecedores reduzem o comprimento da coluna para obter tempos de operação mais curtos, a Thermo Scientific combina uma coluna mais curta com resinas de partículas menores para não apenas obter tempos de execução mais curtos, mas também para manter a eficiência e a resolução cromatográfica (Figura 2).

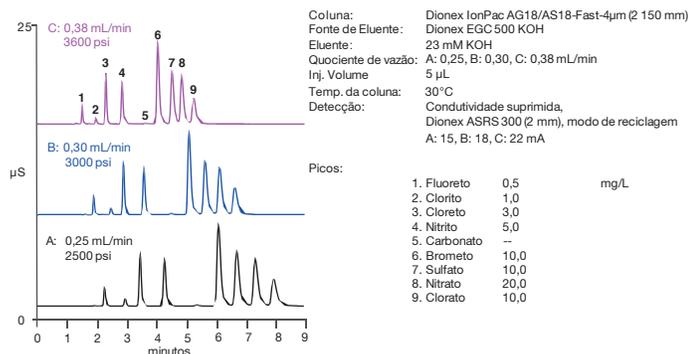
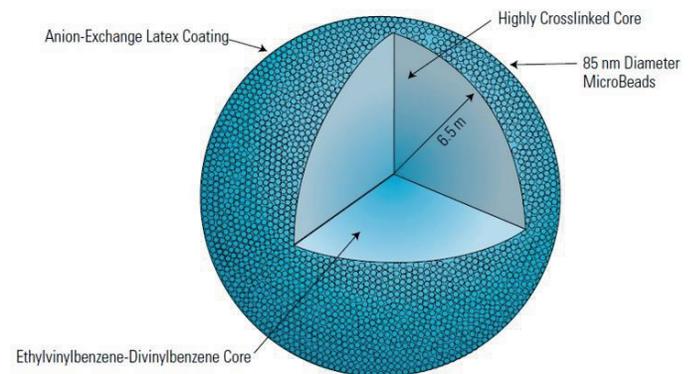


Figura 2. Redução no tempo de execução utilizando taxas de fluxo mais altas em combinação com uma coluna de partículas de resina de comprimento reduzido de 4 µm.

Aumento da capacidade da coluna: porosidade da resina

As partículas iniciais de poliestireno-DVB utilizadas para IC não eram porosas e resultavam em colunas com capacidade relativamente baixa. Para lidar com altas concentrações de analitos, melhorar a resolução de íons de retenção fraca, analisar amostras com alta força iônica e carregar um volume de amostra mais alto sem sobrecarregar e alargar o pico, é preciso uma coluna de alta capacidade. Para atingir esse objetivo, as resinas foram projetadas com quantidades de porosidade variáveis, permitindo que uma área superficial por partícula maior fosse exposta à fase móvel, proporcionando mais oportunidades para os analitos de amostra se ligarem à superfície, aumentando a capacidade. Isso é exemplificado pela troca da resina de núcleo utilizada para partículas AS11-HC Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ de microporosas como na AS11 Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ (<10 Å poros, Figura 3A) para supermacroporosas (2000 Å poros, Figura 3B). Os poros maiores apresentam mais superfície para a aglomeração (fixação) de partículas de látex (resina Thermo Scientific™ Dionex™ MicroBead™ de 80 nm), aumentando a capacidade da coluna de 45 µeq para 290 µeq (>500%) para uma coluna de 4 × 250 mm.

A. Partícula de resina AS11 Dionex IonPac



B. Partícula de resina AS11 -HC Dionex IonPac

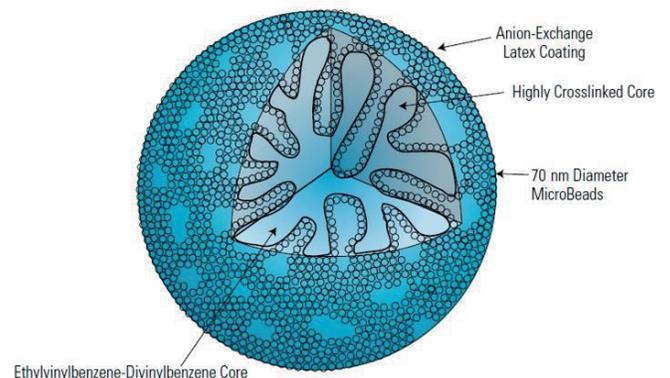


Imagem 3. Comparação de estruturas de partículas de resina Dionex IonPac AS11 e AS11-HC.

Alterando a seletividade: Modificação da superfície da resina

A superfície dos polímeros orgânicos utilizados em resinas de troca aniônica pode ser funcionalizada (isto é, alterar suas propriedades) por meio de processo em duas etapas: 1) adição de um grupo clorometil ao esqueleto da resina aromática, seguido por 2) aminação com uma amina terciária. Para resinas de troca catiônica, a funcionalização consiste principalmente em sulfonação da superfície via reação com ácido sulfúrico concentrado ou carboxilação via reação com ácido carboxílico (consulte a referência 4 para uma revisão abrangente).

Enquanto as primeiras fases estacionárias consistiam em polímero poliestireno-divinilbenzeno (PS/DVB) levemente sulfonado ($R-SO_3^-$), as propriedades de superfície de resinas de IC utilizadas hoje são modificadas por meio de diversas estratégias que incluem encapsulamento, enxerto polimérico, derivatização química, crescimento em etapa e aglomeração (Figura 4). A forma precisa de sintetizar e funcionalizar a fase estacionária permite que a seletividade de cada resina seja sintonizada com precisão para atender a requisitos de aplicação específicos.

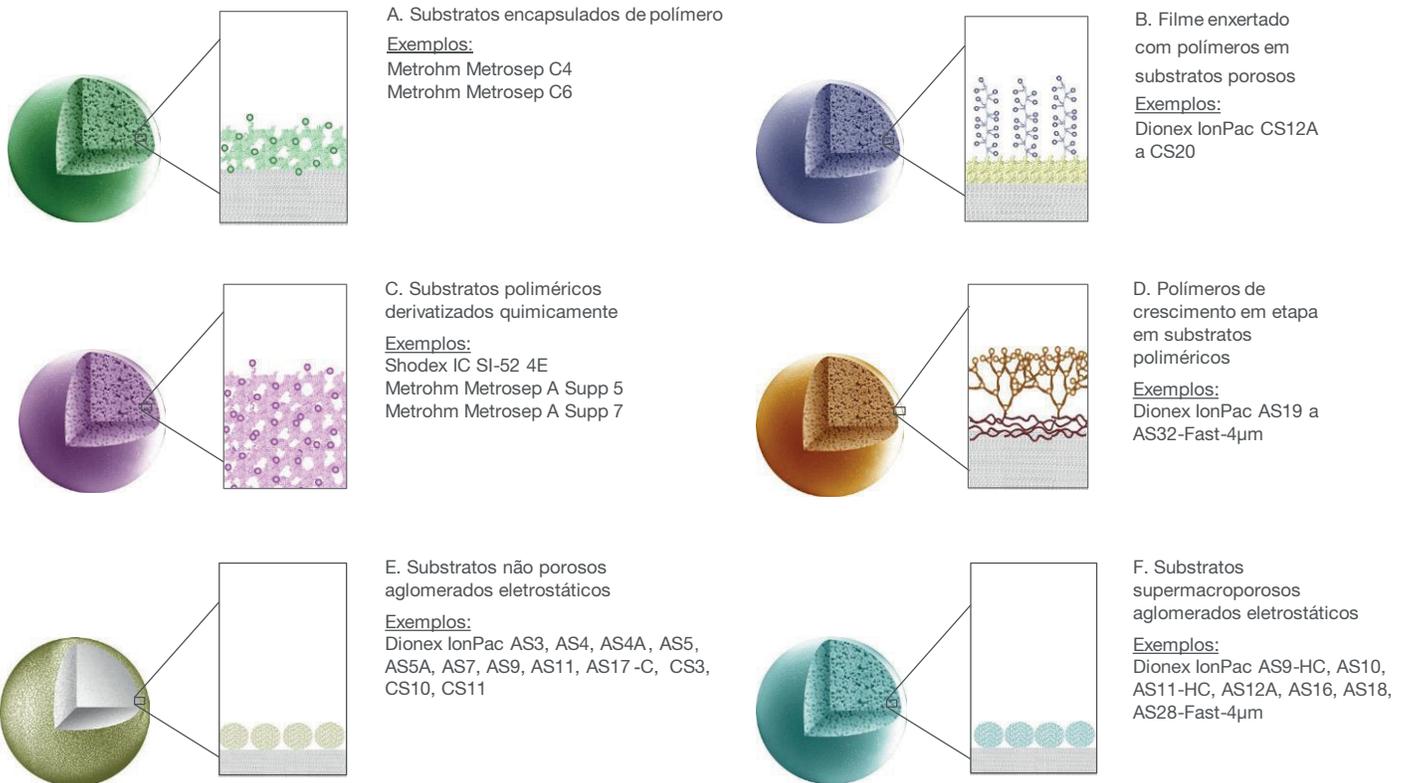


Figura 4: Arquiteturas de fase estacionária de coluna de IC usadas com frequência.

Formatos de coluna

As colunas de separação estão disponíveis em vários formatos que variam de acordo com o diâmetro interno (DI) e o comprimento. O diâmetro de coluna utilizado é determinado principalmente pelas propriedades do sistema cromatográfico, a sensibilidade necessária e o volume da amostra (Tabela 1). A maioria dos sistemas IC padrão é capaz de operar com colunas analíticas (4 mm de DI) e microbore (2 mm de DI). No entanto, os sistemas de HPIC Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-4000 e Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000 são os únicos sistemas de IC atualmente disponíveis capazes de operar com colunas capilares (0,4 mm de DI). As bombas utilizadas em ambos os sistemas informam as vazões na faixa de microlitros por minuto de maneira confiável e precisa. Elas possuem componentes como supressores, geradores de eluentes, conjuntos de

desgaseificação e dispositivos de remoção de carbonatos projetados especificamente para vazões e volumes capilares. Os baixos volumes de amostra e o consumo de eluentes de IC capilar resultam em requisitos mínimos de descarte de resíduos e permitem que o sistema opere continuamente. Consequentemente, esses sistemas estão sempre prontos para trabalhar em amostras, porque não há necessidade de um equilíbrio extenso antes do início de uma operação, o que é necessário em sistemas de furos padrão que costumam ser colocados no modo de espera para economizar eluentes e reduzir resíduos. Há mais de 30 colunas de troca aniônica e catiônica capilares Thermo Scientific, muitas delas com tamanho de partícula de 4 µm (Tabela 2).

Tabela 1. Comparação de parâmetros para formatos de coluna de IC.

	Analítico	Microfuro	Capilar
DI da coluna (mm)	4	2	0,4
Vazão (mL/min)	1.0	0,25	0,01
Volume de Injeção (µL)	10	2,5	0,1
Consumo de Eluentes/Resíduos gerados (L/mês)	43,2	10,8	0,432
Mais adequado para	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimentos estabelecidos com requisitos específicos que não podem ser facilmente alterados 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicações padrão • Redução do consumo de eluentes e geração de resíduos • Determinações de baixo nível 	<ul style="list-style-type: none"> • Amostra/consumo de eluente; e geração de resíduos mínimos • "Sempre pronto", tempo de resposta minimizado • Aplicações de rotina

Tabela 2. Comparação de tipos de resina de coluna de IC de vários fornecedores.

		Fornecedor A	Fornecedor B	Thermo Scientific
Tamanho da Partícula	≤ 4 µm	-	1	10
	5-12 µm	14	11	40
Colunas Capilares (0,4 mm de DI)		-	-	31
Colunas de Ânions (Tipo de Eluente)	Carbonato	8	6	11
	Hidróxido	-	-	24
	Outros	-	2	-
Colunas de Cátions		6	4	15
Colunas Totais		14	12	50

Uma história de inovação

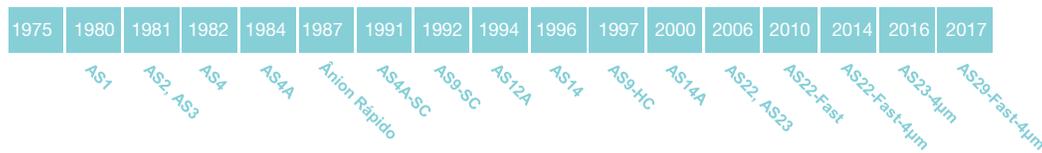
Desde a primeira “Coluna Separadora de Ânions” até a coluna AS32-Fast-4µm Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ atual, a Thermo Fisher Scientific tem se dedicado a desenvolver continuamente novas colunas para atender às necessidades em constante mudança de nossos clientes, que enfrentam novos desafios analíticos todos os dias (Figuras 5 e 6, referência 5).

Um exemplo de desenvolvimento de coluna motivado pelas necessidades dos clientes é a recém-lançada AS31 Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™. Uma das limitações da análise de ácidos haloacéticos (HAAs em água potável pelo método U.S. EPA 5576 é o tempo de análise de aproximadamente uma hora por amostra. Isso limita o número de amostras que podem ser analisadas em um dia, aumentando o custo por amostra. Os clientes expressaram o desejo de um método mais econômico.

Para atender a essa necessidade, a química de coluna foi modificada para alterar a ordem de eluição dos constituintes da amostra, de modo que os componentes residuais ou para o espectrômetro de massa de detecção pudessem ser agrupados de forma mais eficiente. O resultado líquido foi uma redução de 39% no tempo de operação geral, levando a uma redução significativa no custo por amostra e no tempo decorrido.⁷

Outro exemplo de modificações em fase sólida que resultaram em maior facilidade de uso é a otimização das propriedades da superfície da resina de coluna Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS17 para não exigir o uso de um modificador de eluente orgânico para resolver aminas e alcanolaminas.⁸ Além de facilitar a preparação manual de eluentes, agora é possível utilizar um sistema RFIC, que simplifica ainda mais a operação, obtendo resultados precisos e reproduzíveis.

Colunas à Base de Carbonato



Colunas Seletivas de Hidróxido

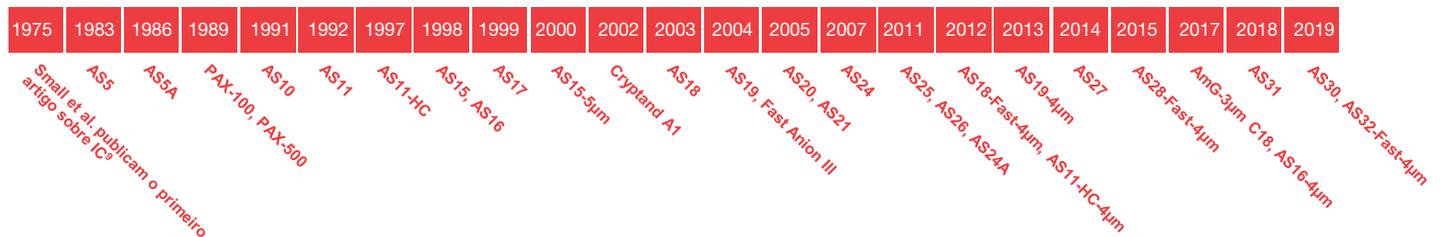


Figura 5. Linha do tempo do desenvolvimento da coluna de IC de troca aniônica Thermo Scientific Dionex.

Colunas de Cátions

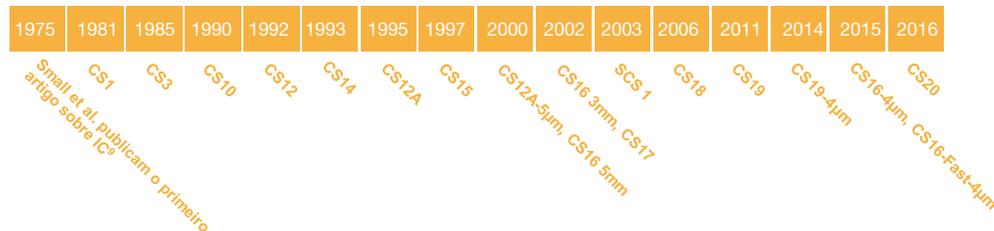
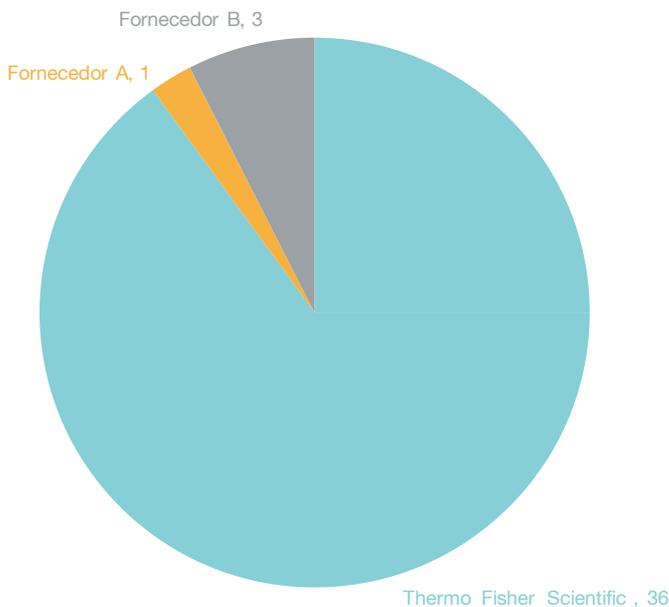


Figura 6. Linha do tempo do desenvolvimento da coluna de IC de troca catiônica Thermo Scientific Dionex.

O histórico de inovação da Thermo Fisher Scientific é exemplificado não apenas pela regularidade das introduções de novas colunas todos os anos, mas também pelo número de patentes emitidas para descobertas em tecnologia de colunas de IC, que é incomparável no setor (Figura 7).



* Baseado na ferramenta de busca de patentes Questel Orbit Intelligence.

Figura 7. Número de patentes de Coluna de IC emitidas; comparação por fornecedor*.

Resumo

A resposta contínua às necessidades dos clientes da Thermo Fisher Scientific levou à criação de um portfólio incomparável de colunas de IC que fornece soluções para enfrentar até os desafios cromatográficos mais exigentes.

Referências

1. Landmarks in the Evolution of Ion Chromatography, Hamish Small, *Advances in Ion Chromatography*, LCGC, 2013. p. 8-15.
2. Recent Developments in Ion-Exchange Columns for Ion Chromatography, Chris Pohl, *Advances in Ion Chromatography*, LCGC, 2013. p. 16-22.
3. Thermo Scientific White Paper 70631, "Benefits of Using 4 µm Particle-Size Columns", M. Verma e C. Tanner, 2013. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/wp-70631-4-micrometer-columns-wp70631-en.pdf>
4. Weiss, J. *Handbook of Ion Chromatography*; Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha, 2016; 3 vols.
5. Guia de Seleção de Colunas de IC Thermo Scientific Dionex IonPac, 2019. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/st-70588-ic-column-selection-guide-st70588-en.pdf>
6. Agência de Proteção Ambiental dos EUA, Método 557, Determinação de Ácidos Haloacéticos, Bromato e Dalapon em água potável por Espectrometria de Massa em Tandem de Ionização por Electropulverização de Cromatografia Iônica (IC-ESI-MS/MS), Rev. 1.0, 2009
7. White Paper Thermo Scientific 72958, "Fast determination of haloacetic acids in drinking water", 2019. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/wp-72958-haloacetic-acids-drinking-water-wp72958-en.pdf>
8. Thermo Scientific Application Update 155, "Determination of cations and amines in hydrogen peroxide by ion chromatography using a RFIC (reagent-free) system", Weerapong Worawirunwong, Sumate Peng Pumkiat e Jeff Rohrer, 2017. Disponível em: <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/au-155-ic-cations- amines-hydrogen-peroxide-au72541-en.pdf>
9. H. Small, T.S. Stevens e W.C. Bauman. *Anal. Chem.* 75, 1801-1809, 1975.

Saiba mais em [thermofisher.com/ICColumns](https://www.thermofisher.com/ICColumns)

Apenas para Uso em Pesquisas. Não deve ser usado em procedimentos diagnósticos. © 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. Essas informações são apresentadas como um exemplo dos recursos dos produtos Thermo Fisher Scientific. Não foi elaborado para incentivar o uso desses produtos de quaisquer formas que possam infringir os direitos de propriedade intelectual de terceiros. Especificações, prazos e preços estão sujeitos a alterações. Nem todos os produtos estão disponíveis em todos os países. Consulte seu representante de vendas local para mais detalhes. WP73104-PT-BR 0919C

ThermoFisher
SCIENTIFIC