

Colunas e acessórios LC

Documento de recursos técnicos

Índice

Seleção de colunas LC	03
<hr/>	
Seleção de colunas HPLC pelas especificações da Farmacopeia dos Estados Unidos	08
<hr/>	
Fases HPLC	12
<hr/>	
Seleção de colunas HPLC por fabricante	14
<hr/>	
Princípios de uma LC rápida	19
<hr/>	
Informações técnicas de LC	21
<hr/>	
Reagentes de derivatização para HPLC	31
<hr/>	

Seleção de colunas para cromatografia líquida (LC)

As informações na seção a seguir o ajudarão a tomar uma decisão fundamentada sobre a coluna apropriada de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para sua aplicação, com base no uso de fase estacionária, propriedades do analito, requisitos de LC-MS ou especificações da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP). Você também encontrará uma tabela útil de fases da Thermo Scientific com especificações, bem como alternativas recomendadas da Thermo Scientific para outras colunas populares.

Consulte a Ilustração Avançada para Usuário (AUG) na página correspondente do produto (ilustrado à direita) para obter ajuda e informações sobre a seleção de colunas de uso geral.

A AUG mostrará a hidrofobicidade, que fornece a retenção relativa na coluna. Geralmente, quanto maior a hidrofobicidade, maior a retenção de compostos neutros e maior o conteúdo orgânico na fase móvel. Um valor mais baixo indica a necessidade de fases móveis aquosas maiores para alcançar retenção e resolução comparáveis. A faixa de pH recomendada para a coluna é ilustrada, fora da qual a vida útil da coluna diminuirá.

O tamanho do poro é mostrado, com colunas com tamanhos de poro maiores sendo mais aplicáveis a analitos maiores como proteínas ou peptídeos. A porcentagem de carga de carbono está relacionada à hidrofobicidade. Abaixo do ícone, você verá os tamanhos de partículas disponíveis, assim como o código USP. Essas imagens são projetadas para permitir que você compare rapidamente as principais características de várias fases estacionárias, permitindo que você escolha rapidamente a fase estacionária mais apropriada para sua análise.

Para obter ajuda adicional na seleção de colunas, aproveite nossa experiência para ajudá-lo a fazer a melhor escolha para sua aplicação.

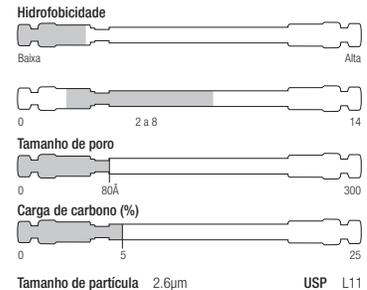


Ilustração Avançada para Usuário (AUG)

Fases comuns de HPLC e seus usos

Nome comum	Nome alternativo	Grupo funcional	Fase normal	Fase reversa	Troca iônica	HILIC	Aplicação
Sílica	Sílica	-OH	•			•	Compostos orgânicos apolares e moderadamente polares
C1	SAS	-(CH ₃) ₃		•			Menor retenção de todas as fases ligadas a grupos alquil para solutos apolares. Normalmente usada para compostos moderadamente polares e multifuncionais
C4	Butil	-C ₄ H ₉		•			Retenção menor do que C8, C18. Separação de peptídeos e proteínas
C8	MOS	-C ₈ H ₁₇		•			Menos retentiva do que C18, normalmente usada para pequenos peptídeos e proteínas, produtos farmacêuticos, esteroides, amostras ambientais
C18	ODS	-C ₁₈ H ₃₇		•			Maior retenção entre as fases ligadas a alquil. Amplamente utilizada para produtos farmacêuticos, esteroides, ácidos graxos, ftalatos, ambientais etc.
Ciano	CPS, CN	-(CH ₂) ₃ CN	•	•			Seletividade única para compostos polares, mais adequada do que a base de sílica para separações de gradiente de fase normal. Quando usada em fase reversa, a seletividade é diferente daquela das fases C8 e C18. Útil para uma ampla gama de aplicações farmacêuticas e para misturas de solutos muito diferentes.
Amino	APS	-(CH ₂) ₃ NH ₂	•	•	•	•	HILIC: Análise de carboidratos e outros compostos polares. Troca aniônica fraca: ânions e ácidos orgânicos. Fase normal: seletividade alternativa à sílica. Boa para aromáticos.
Bifenil	Grupo funcional: -(C6H4)C6H5			•			A química do bifenil oferece seletividade complementar a uma coluna C18 e a capacidade de resolver compostos isoméricos, como drogas de abuso e esteroides.
Fenil		-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₅		•			Compostos aromáticos e compostos moderadamente polares
Pentafluor-fenil	PFP	-C ₆ F ₅		•			Seletividade e retenção extras para compostos halogenados, polares e isômeros.
Diol		-(CH ₂) ₂₀ CH ₂ (CH ₂ OH) ₂	•	•		•	Fase reversa: Proteínas, peptídeos Fase normal: Seletividade semelhante à sílica, mas menos polar
SCX	Trocador catiônico forte	-RSO ₃ H-			•		Bases orgânicas
SAX	Trocador aniônico forte	-RN+(CH ₃) ₃			•		Ácidos orgânicos, nucleotídeos e nucleosídeos
AX	Trocador aniônico polietileneimina (PEI)	-(CH ₂ CH ₂ NH-) _n			•		Ácidos orgânicos, nucleotídeos e oligonucleotídeos
Carbono grafitico poroso	PGC	100% carbono	•	•			Particularmente útil para a separação de compostos altamente polares que são difíceis de reter usando colunas convencionais à base de sílica e separação de compostos estruturalmente semelhantes (por exemplo, isômeros, diastereoisômeros)

Seleção da fase estacionária da coluna HPLC

Antes de iniciar uma nova análise, considere as propriedades físicas e químicas do(s) analito(s), o modo de análise e como o(s) analito(s) irão interagir com a superfície da fase cromatográfica. Para ajudar na seleção da coluna, o guia a seguir pode ser útil.

Apolar

Solubilidade do analito	Propriedades químicas do analito		Modo de separação	Fase recomendada
Solventes polares	Ácido	$pK_a > 2$	Troca aniônica / Modo misto de fase reversa	Acclaim™ Modo Misto WAX-1 da Thermo Scientific™
				Acclaim™ Trinity P1 da Thermo Scientific™
	Neutro	Apolar	Fase reversa	Accucore™ C18 da Thermo Scientific™
				Accucore™ RP-MS da Thermo Scientific™
				Accucore™ C8 da Thermo Scientific™
				Accucore™ C30 da Thermo Scientific™
				Accucore™ Fenil-Hexil da Thermo Scientific™
				Acclaim™ 120 C18 da Thermo Scientific™
				Acclaim™ 120 C8 da Thermo Scientific™
				Acclaim™ C30 da Thermo Scientific™
				Acclaim™ Fenil-1 da Thermo Scientific™
				Hypersil GOLD™ da Thermo Scientific™
Hypersil GOLD™ C8 da Thermo Scientific™				
Hypersil GOLD™ C4 da Thermo Scientific™				
Synchronis™ C18 da Thermo Scientific™				
Synchronis™ C8 da Thermo Scientific™				
Moderadamente polar	Moderadamente polar	Fase reversa	Accucore™ aQ da Thermo Scientific™	
			Accucore™ Polar Premium da Thermo Scientific™	
			Accucore™ PFP da Thermo Scientific™	
			Accucore™ Fenil-X da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ PolarAdvantage da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ PolarAdvantage II da Thermo Scientific™	
			Hypersil GOLD™ aQ da Thermo Scientific™	
			Hypersil GOLD™ PFP da Thermo Scientific™	
			Hypersil GOLD™ Fenil da Thermo Scientific™	
			Synchronis™ aQ da Thermo Scientific™	
Synchronis™ Fenil da Thermo Scientific™				
Básico	$pK_a < 10$	Fase reversa	Accucore™ C18 da Thermo Scientific™	
			Accucore™ RP-MS da Thermo Scientific™	
			Accucore™ C8 da Thermo Scientific™	
			Accucore™ C30 da Thermo Scientific™	
			Accucore™ Fenil-Hexil da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ 120 C18 da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ 120 C8 da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ C30 da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ Fenil-1 da Thermo Scientific™	
			Hypersil GOLD™ da Thermo Scientific™	
			Hypersil GOLD™ C8 da Thermo Scientific™	
		Hypersil GOLD™ C4 da Thermo Scientific™		
Synchronis™ C18 da Thermo Scientific™				
Synchronis™ C8 da Thermo Scientific™				
Troca catiônica / Modo misto de fase reversa	Acclaim™ Modo Misto WCX-1 da Thermo Scientific™			
Acclaim™ Trinity P1 da Thermo Scientific™				

Seleção da fase estacionária da coluna HPLC (continuação)

Polar

Solubilidade do analito	Propriedades químicas do analito		Modo de separação	Fase recomendada
Solventes polares	Ácido	$pK_a < 2$	Efeito da retenção polar no grafite	Hypercarb™ da Thermo Scientific™
			Troca aniônica	Hypersil GOLD™ AX da Thermo Scientific™
				Hypersil GOLD™ SAX da Thermo Scientific™
				Accucore™ Ureia-HILIC da Thermo Scientific™
			HILIC	Accucore™ 150-Amida-HILIC da Thermo Scientific™
				Acclaim™ HILIC-10 da Thermo Scientific™
		Synchronis™ HILIC da Thermo Scientific™		
	Neutro		Efeito da retenção polar no grafite	Hypercarb™ da Thermo Scientific™
				Accucore™ HILIC da Thermo Scientific™
				Acclaim™ Modo Misto HILIC-1 da Thermo Scientific™
				Acclaim™ Modo Misto WAX-1 da Thermo Scientific™
			HILIC	Acclaim™ Modo Misto WCX-1 da Thermo Scientific™
			Acclaim™ Trinity P1 da Thermo Scientific™	
	Hypersil GOLD™ Amino da Thermo Scientific™			
	Hypersil GOLD™ HILIC da Thermo Scientific™			
	Synchronis™ Amino da Thermo Scientific™			
	Synchronis™ HILIC da Thermo Scientific™			
Básico	$pK_b > 10$	Efeito da retenção polar no grafite	Hypercarb™ da Thermo Scientific™	
		Troca catiônica	Acclaim™ Modo Misto WCX-1 da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ Trinity P1 da Thermo Scientific™	
			Accucore™ Ureia-HILIC da Thermo Scientific™	
		HILIC	Accucore™ 150-Amida-HILIC da Thermo Scientific™	
			Acclaim™ HILIC-10 da Thermo Scientific™	
	Synchronis™ HILIC da Thermo Scientific™			
Solventes apolares		Fase normal		Hypersil GOLD™ Amino da Thermo Scientific™
				Hypersil GOLD™ CN da Thermo Scientific™
				Hypersil GOLD™ Sílica da Thermo Scientific™
				Synchronis™ Amino da Thermo Scientific™
			Synchronis™ Sílica da Thermo Scientific™	

A tabela acima recomenda colunas para a separação de analitos com moléculas pequenas.

Seleção de formato da coluna para LC de baixo fluxo

O portfólio da Thermo Scientific oferece uma ampla gama de designs de coluna e fases estacionárias otimizadas para aplicações de LC de baixo fluxo. Use a tabela a seguir para ajudar você a escolher o formato da coluna para melhor atender às suas necessidades de aplicação. Uma variedade de configurações de hardware de coluna HPLC estão disponíveis, projetadas para fornecer resultados superiores para alta velocidade, alta sensibilidade, alta eficiência e conveniência. Uma ampla gama de fases estacionárias de partículas e monolíticas permite escolhas para uma seletividade otimizada.

Seleção de hardware da coluna para baixo fluxo

Aplicação LC-MS	Design do hardware da coluna	Descrição
Análise com alto rendimento	Colunas Javelin HTS	Colunas de conexão direta Design fino, 20 mm de comprimento, 1 mm a 4,6 mm ID
Análise com alta sensibilidade	Colunas Acclaim PepMap nano, capilares e micro	Colunas, nano, capilares e micro 0,075 mm a 1 mm ID; o formato nano Viper de 50 a 250 mm de comprimento oferece conexão livre de volume morto manual a 1.000 bar
Análise proteômica	Colunas EASY-Spray	Design combinado de coluna/emissor com conexão nanoViper. Colunas de sílica flexíveis aquecidas de 50 µm e 75 µm ID; 150 a 500 mm de comprimento
	Colunas Acclaim PepMap nano, colunas Accucore nano, nanoViper	O nanoViper oferece conexão livre de volume morto manual a 1000 bar Colunas de sílica flexíveis de 50 µm e 75 µm ID; 150 a 500 mm de comprimento Coluna Trap 20 mm x 100 µm ID
	Colunas Acclaim PepMap nano, clássica	Colunas de sílica flexíveis de 50 µm e 75 µm ID; 150 a 500 mm de comprimento Coluna Trap 20 mm x 100 µm ID
	Coluna EASY	Colunas de sílica flexíveis 100 mm x 75 µm Coluna Trap 20 mm x 100 µm ID

Várias colunas HPLC, ao longo desta seção LC, também podem ser usadas para aplicação em LC-MS. As taxas de fluxo típicas e a compatibilidade da fonte de MS para essas colunas são mostradas na tabela da próxima página



Seleção da coluna para LC de baixo fluxo (continuação)

Seleção de colunas preparadas para aplicações de LC de baixo fluxo

Peso molecular do analito	Polaridade da amostra	Ionização da interface	Sensibilidade relativa	ID da coluna (mm)	Taxa de fluxo (µL/min)	Hardware da coluna
< 1000 Da	Baixa	APCI	Baixa	4.6, 4.0, 3.0	2000 – 200	Javelin HTS, Analítico
			Alta	2.1, 1.0	200 – 50	Analítico, Javelin HTS
	Média	APCI	Baixa	4.6, 4.0, 3.0	2000 – 200	Javelin HTS, Analítico
			Alta	2.1, 1.0	200 – 50	Analítico, Javelin HTS
		ESI	Baixa	2.1, 1.0	200 – 50	Analítico, Javelin HTS
			Alta	1.0 – 0.3 0.2 – 0.05	50 – 5 2 – 0.2	Acclaim PepMap (RSLC) capilares e micro Coluna EASY-Spray, coluna EASY, Acclaim PepMap (RSLC) nano, Accucore nano
	Alta (ou ionizável)	ESI	Baixa	2.1, 1.0	200 – 50	Analítico, Javelin HTS
			Alta	1.0 – 0.3 0.2 – 0.05	50 – 5 2 – 0.2	Acclaim PepMap (RSLC) capilares e micro Coluna EASY-Spray, coluna EASY, Acclaim PepMap (RSLC) nano, Accucore nano
		ESI	Baixa	2.1, 1.0	200 – 50	Analítico, Javelin HTS
			Alta	1.0 – 0.3 0.2 – 0.05	50 – 5 2 – 0.2	Acclaim PepMap (RSLC) capilares e micro Coluna EASY-Spray, coluna EASY, Acclaim PepMap (RSLC) nano, Accucore nano
	> 1000 Da	ESI	Baixa	2.1, 1.0	200 – 50	Analítico, Javelin HTS
			Alta	1.0 – 0.3 0.2 – 0.05	50 – 5 2 – 0.2	Acclaim PepMap (RSLC) capilares e micro Coluna EASY-Spray, coluna EASY, Acclaim PepMap (RSLC) nano, Accucore nano

Colunas Monolith para LC-MS

Peso molecular do analito	ID da coluna (mm)	Taxa de fluxo (µL/min)	Hardware da coluna
> 1000 Da	1.0	40 – 200	ProSwift Monolith

O ProSwift também está disponível em IDs maiores para aplicações de alto rendimento.

Seleção de colunas HPLC pelas especificações* da Farmacopeia dos E.U.A

Código USP	Descrição	Fase recomendada
L1	Octadecil silano quimicamente ligado a micropartículas de sílica porosa ou não porosa ou de cerâmica, 1,5 a 10 µm de diâmetro, ou uma haste monolítica	Acclaim 120 C18
		Acclaim RSLC C18
		Accucore C18
		Accucore aQ
		Accucore 150-C18
		Accucore XL C18
		AQUASIL C18
		BetaBasic 18
		BetaMax Neutral
		BETASIL C18
		BioBasic 18
		Hyperprep HS C18
		Hypersil 100 C18
		Hypersil BDS C18
		Hypersil GOLD
		Hypersil GOLD aQ
		Hypersil-ODS
		Hypersil ODS-2
		Hypersil Green PAH
		HyPURITY AQUASTAR
HyPURITY C18		
Synchronis C18		
Synchronis aQ		
L3	Partículas de sílica porosa, 1,5 a 10 µm de diâmetro, ou uma haste de sílica monolítica	Accucore HILIC
		BETASIL Sílica 100
		Deltabond Sílica
		Hypersil GOLD Sílica
		Hypersil Sílica
		Hyperprep HS Sílica
		Synchronis Sílica
L7	Octilsilano quimicamente ligado a partículas de sílica totalmente ou superficialmente porosa, de 1,5 a 10 µm de diâmetro, ou uma haste de sílica monolítica	Acclaim 120 C8
		Accucore C8
		Accucore XL C8
		BetaBasic 8
		BETASIL C8
		BioBasic 8
		Hypersil BDS C8
		Hypersil GOLD C8
		Hypersil MOS
		Hypersil MOS-2
		Hypersil HS C8
		HyPurity C8
		L8
Hypersil GOLD Amino		
Synchronis Amino		

Seleção de colunas HPLC pelas especificações* da Farmacopeia dos E.U.A (continuação)

Código USP	Descrição	Fase recomendada
L10	Grupos nitrila quimicamente ligados a partículas de sílica porosa, 1,5 a 10 µm de diâmetro, ou uma haste de sílica monolítica	BetaBasic CN
		BETASIL CN
		BioBasic CN
		DELTABOND CIANO
		Hypersil BDS CN
		Hypersil CPS
		Hypersil CPS-2
		Hyperprep GOLD CN
L11	Grupos fenil quimicamente ligados a partículas de sílica porosa, 1,5 a 10 µm de diâmetro, ou uma haste de sílica monolítica	HyPURITY CN
		Accucore Fenil-Hexil
		Accucore Bifenilo
		BetaBasic Fenil
		BETASIL Fenil
		BETASIL Fenil-Hexil
		BioBasic Fenil
		Hypersil BDS Fenil
		Hypersil GOLD Fenil
		Hypersil Fenil
Hypersil Fenil-2		
Synchronis Fenil		
L13	Trimetilsilano quimicamente ligado a partículas de sílica porosa, 3 a 10 µm de diâmetro	BETASIL C1
		Hypersil SAS (C1)
L14	Sílica gel com um revestimento de troca aniônica de amônio quaternário fortemente ligado quimicamente, 5 a 10 µm de diâmetro	Hypersil GOLD SAX
		Hypersil SAX
		Retenção SAX (cartucho SEP)
L15	Hexilsilano quimicamente ligado a partículas de sílica completamente porosa, 3 a 10 µm de diâmetro	BETASIL C6
L17	Resina de troca catiônica forte consistindo de copolímero de estireno-divinilbenzeno reticulado sulfonado na forma de hidrogênio, 6 a 12 µm de diâmetro	HyperREZ XP Carboidrato H
		HyperREZ XP Ácidos Orgânicos
L19	Resina de troca catiônica forte consistindo de copolímero de estireno-divinilbenzeno reticulado sulfonado na forma de cálcio, 5 a 15 µm de diâmetro	HyperREZ XP Carboidrato Ca
		HyperREZ XP Álcoois de Açúcar
L20	Grupos dihidroxipropano quimicamente ligados a partículas de sílica porosa ou híbridas, 1,5 a 10 µm de diâmetro, ou uma haste de sílica monolítica	BETASIL Diol
L21	Um copolímero de estireno-divinilbenzeno rígido e esférico, com 3 a 30 µm de diâmetro	HyperREZ XP RP 100
		MABPac RP
L22	Uma resina de troca catiônica feita de gel de poliestireno poroso com grupos de ácido sulfônico, 5 a 15 µm de diâmetro	HyperREZ XP SCX
L25	Embalagem com capacidade para separar compostos com peso molecular na faixa de 100-5000 (conforme determinado pelo óxido de polietileno), aplicada a polímeros solúveis em água neutros, aniônicos e catiônicos. Uma base de resina de polimetacrilato, reticulada com éter poli-hidroxilado (a superfície continha alguns grupos funcionais de carboxila residuais) foi considerada adequada	HyperGel AP

Seleção de colunas HPLC pelas especificações* da Farmacopeia dos E.U.A (continuação)

Código USP	Descrição	Fase recomendada
L26	Butil silano quimicamente ligado a partículas de sílica completamente ou superficialmente porosa, 1,5 a 10 µm de diâmetro	Accucore 150-C4 BetaBasic 4 BioBasic 4 Hyperprep PEP 300 C4 Hypersil GOLD C4 HyPURITY C4
L27	Partículas de sílica porosa, 30 a 50 µm de diâmetro	Hyperprep Sílica
L33	Embalagem com capacidade para separar dextranos por tamanho molecular em uma faixa de 4.000 a 500.000 Da. É esférico, à base de sílica e processado para fornecer estabilidade de pH	BioBasic SEC 120 BioBasic SEC 300 BioBasic SEC 1000
L34	Resina de troca catiônica forte consistindo de copolímero de estireno-divinilbenzeno reticulado sulfonado na forma de chumbo, 7 a 9 µm de diâmetro	HyperREZ XP Carboidrato Pb
L38	Um empacotamento de exclusão de tamanho à base de metacrilato para amostras hidrossolúveis	Acclaim SEC-300 Acclaim SEC-1000
L40	Partículas de sílica porosa revestidas com tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose, 3 µm a 20 µm de diâmetro	Hypersil Chiral OT
L43	Grupos pentafluorfenil quimicamente ligados a partículas de sílica por um espaçador de propil, 1,5 a 10 µm de diâmetro	Accucore PFP Hypersil GOLD PFP
L46	Substrato de poliestireno/divinilbenzeno aglomerado com esferas de látex funcionalizadas com amina quaternária, cerca de 9 µm a 11 µm de diâmetro	OmniPac PAX 100
L50	Resina multifuncional com retenção de fase reversa e funcionalidades de troca aniônica forte. A resina consiste em etilvinilbenzeno, 55% reticulado com copolímero de divinilbenzeno, 3 a 15 µm de diâmetro e uma área de superfície superior a 350 m ² por g. O substrato é revestido com partículas de látex funcionalizadas com amônio quaternário consistindo de estireno reticulado com divinilbenzeno	OmniPac PAX-500
L51	Partículas de sílica porosa e esféricas revestidas com tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose, de 3 a 10 µm de diâmetro	Hypersil Chiral AT
L52	Uma resina de troca catiônica forte feita de sílica porosa com grupos sulfopropil ou sulfoetil, 1 a 10 µm de diâmetro	BioBasic SCX
L58	Resina de troca catiônica forte consistindo de copolímero de estireno-divinilbenzeno reticulado sulfonado na forma de sódio, 6 a 30 µm de diâmetro	HyperREZ Carboidrato XP Na
L59	Embalagem para separações por exclusão de tamanho de proteínas (separação por peso molecular) na faixa de 5 a 7.000 kDa. A embalagem é de sílica esférica, 1,5 a 10 µm, ou embalagem híbrida com um revestimento hidrofílico	MabPac SEC-1
L60	Gel de sílica poroso e esférico, de 10 µm ou menos de diâmetro, a superfície do qual foi covalentemente modificada com grupos alquil amida e capeada	Acclaim Polar Advantage Acclaim Polar Advantage II (PA2) Accucore Polar Premium HyPURITY ADVANCE Prism RP Prism RPN

Seleção de colunas HPLC pelas especificações* da Farmacopeia dos E.U.A (continuação)

Código USP	Descrição	Fase recomendada
L62	Fase ligada por silano C30 em uma sílica esférica completamente porosa, de 3 a 15 µm de diâmetro	Acclaim C30 Accucore C30
L78	Um ligante de silano que consiste em grupos funcionais de fase reversa (uma cadeia alquil maior que C8) e de troca aniônica (grupos amino primários, secundários ou terciários) quimicamente ligados a micropartículas porosas, não porosas ou de cerâmica, 1,0 a 50 µm de diâmetro ou uma haste monolítica	Acclaim Modo Misto WAX-1 Acclaim Tensioativo Plus
L80	Partículas de sílica porosa e esférica revestidas com tris (4-metilbenzoato) de celulose, com 5 a 20 µm de diâmetro	Hypersil Chiral JT
L89	Embalagem com capacidade para separar compostos com peso molecular na faixa de 100 a 3000 (conforme determinado pelo óxido de polietileno), aplicada a polímeros hidrossolúveis neutros e aniônicos. Uma base de resina de polimetacrilato, reticulada com éter polihidroxilato (a superfície contém alguns grupos funcionais catiônicos residuais)	Acclaim SEC-300
L96	Sílica totalmente ou superficialmente porosa ligada por fase reversa com cadeia de alquil, projetada para reter compostos hidrofílicos e outros compostos polares ao usar fases móveis altamente aquosas, incluindo 100% aquosa, 1,5 µm a 10 µm de diâmetro	Acclaim C30 Accucore C30 Hypersil GOLD aQ Synchronis aQ
L109	Partículas esféricas de carbono grafitico poroso, 3 a 30 µm de diâmetro	Hypercarb
L111	Poliamina quimicamente ligada a partículas esféricas de sílica porosa, 5 µm de diâmetro	Hypersil GOLD AX
L116	Substrato de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno sulfonado aglomerado com microesferas de metacrilato derivado de glicidil funcionalizado com amina quaternária hidrofílica, aproximadamente 2 a 50 µm de diâmetro	Dionex DNAPac PA100
L##	(Polietileno Glicol 3350, Aquagel OH 40) - Embalagem com capacidade para separar compostos com uma faixa de peso molecular de 10.000 a 200.000 g/mol (conforme determinado pelo óxido de polietileno), aplicada a polímeros hidrossolúveis neutros, aniônicos e catiônicos, composto de um material macroporoso rígido com uma superfície hidrofílica	Acclaim SEC-300 Acclaim SEC-1000

Fases HPLC

As tabelas abaixo listam os sorventes para HPLC da Thermo Scientific oferecidos para separações de moléculas pequenas. Consulte também a Ilustração Avançada para Usuário (AUG) para cada fase do HPLC no Catálogo de Consumíveis para Cromatografia.

Fase	Tipo de partícula	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho de poro (Å)	Área de superfície nominal (m ² /g)	% de carbono	Capeamento	Código USP	Código da fase
Fases Acclaim								
120 C18	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	18	Sim	L1	–
300 C18	Sílica esférica completamente porosa	3	300	100	8	Sim	L1	–
120 C8	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	11	Sim	L7	–
Fenil-1	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	13	Sim	L11	–
C30	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	200	200	13	Proprietário	L62	–
PA	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	16	Sim	L60	–
PA II	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	16	Sim	L60	–
HILIC-10	Sílica esférica completamente porosa	3	120	300	8	Sim	–	–
Trinity P1	Híbrido de sílica e nano polímero	3	300	100	–	Proprietário	–	–
Trinity P2	Híbrido de sílica e nano polímero	3	300	100	–	Proprietário	–	–
Trinity Q1	Híbrido de sílica e nano polímero	3	300	100	–	Proprietário	–	–
Modo Misto HILIC-1	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	–	Proprietário	–	–
Modo Misto WAX-1	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	–	Proprietário	L78	–
Modo Misto WCX-1	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	–	Proprietário	L85	–
Ácido orgânico	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	–	Sim	–	–
Tensioativo	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	–	Sim	–	–
Tensioativo Plus	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	300	–	Sim	–	–
Explosivos	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	–	Sim	–	–
Carbamato	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	–	Sim	–	–
Carbonila C18	Sílica esférica completamente porosa	2,2, 3, 5	120	300	–	Sim	–	–
SEC	Esférico, resina	5, 7	300	1000	–	–	–	–
AmG C18	Sílica esférica completamente porosa	3µm	300	120	–	Sim	–	–
Fases Chiral								
Fases Accucore								
RP-MS	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	7	Sim	–	176
C18	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	9	Sim	L1	171
C8	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	5	Sim	L7	172
aQ	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	9	Polar	L1	173
Polar Premium	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	150	90	8	Sim	L60	280
Fenil-Hexil	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	5	Sim	L11	179
Bifenil	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	5	Sim	L11	178
Fenil-X	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	6	Sim	–	279
PFP	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	5	Sim	L43	174
C30	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	150	90	5	Sim	L62	278
HILIC	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	–	–	L3	175
Ureia-HILIC	Sílica esférica de núcleo sólido	2,6	80	130	–	–	–	277
Fases Accucore XL								
C18	Sílica esférica de núcleo sólido	4	80	90	7	Sim	L1	741
C8	Sílica esférica de núcleo sólido	4	80	90	4	Sim	L7	742
Fase Hypercarb								
Hypercarb	Carbono grafitico poroso esférico	3, 5	250	120	100	–	–	350

Fases HPLC (continuação)

Fase	Tipo de partícula	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho de poro (Å)	Área de superfície nominal (m ² /g)	% de carbono	Capecimento	Código USP	Código da fase
Fases Hypersil								
ODS (C18)	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	170	10	Sim	L1	301
ODS-2 (C18)	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	80	220	11	Sim	L1	316
MOS (C8)	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	170	6,5	Não	L7	302
MOS-2 (C8)	Sílica esférica completamente porosa	5	120	170	6,5	Sim	L7	303
SAS (C1)	Sílica esférica completamente porosa	5	120	170	2,5	Sim	L13	305
Fenil	Sílica esférica completamente porosa	5	120	170	5	Não	L11	309
Fenil-2	Sílica esférica completamente porosa	5	120	170	5	Sim	L11	319
CPS	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	170	4	Não	L10	308
CPS-2	Sílica esférica completamente porosa	5	120	170	4	Sim	L10	318
APS-2	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	170	1,9	Não	L8	307
Sílica	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	170	-	-	L3	300
SAX	Sílica esférica completamente porosa	5	120	170	2,5	Sim	L14	341
Fases Hypersil BDS								
C18	Sílica esférica completamente porosa	2,4, 3, 5	130	170	11	Sim	L1	281
C8	Sílica esférica completamente porosa	2,4, 3, 5	130	170	7	Sim	L7	282
Fenil	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	130	170	5	Sim	L11	289
Ciano	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	130	170	4	Sim	L10	288
Fases Hypersil GOLD								
seletividade C18	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5, 12	175	220	10	Sim	L1	250
C8	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	8	Sim	L7	252
C4	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	5	Sim	L26	255
aQ	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	12	Polar	L1	253
PFP	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	8	Sim	L43	254
Fenil	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	8,5	Sim	L11	259
CN (Ciano)	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	4	Sim	L10	258
Amino	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	2	Sim	L8	257
AX	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	6	Não	-	261
SAX	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	2,5	Sim	L14	263
Sílica	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	-	-	L3	251
HILIC	Sílica esférica completamente porosa	1,9, 3, 5	175	220	6	Não	-	265
Fase Hypersil Green								
PAH	Sílica esférica completamente porosa	3, 5	120	170	13,5	Sim	-	311
Fases Hypersil PREP								
BDS C18	Base desativada de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	145	185	11	Sim	L1	
BDS C8	Base desativada de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	145	185	7	Sim	L7	
ODS	Base de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	130	195	10	Sim	L1	
BDS Si	Base desativada de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	145	185	-	Não	L3	
Si	Base de sílica esférica completamente porosa	5	130	195	-	Não	L3	
BDS Fenil	Base desativada de sílica esférica completamente porosa	5	145	185	5	Sim	L11	
Fases Hypersil PREP HS								
C18	Sílica ultrapura esférica completamente porosa	3, 5, 10	100	350	15	sim	L1	
C8	Sílica ultrapura esférica completamente porosa	3, 5, 10	100	350	7	Sim	L7	
Si	Sílica ultrapura esférica completamente porosa	5	100	350	-	Não	L3	
Fenil	Sílica ultrapura esférica completamente porosa	5	100	350	9	Sim	L11	
Fases Hypersil Chiral								
JT	Base de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	1000	30	N/A	Não	L80	
AT	Base de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	1000	30	N/A	Não	L51	
OT	Base de sílica esférica completamente porosa	3, 5, 10	1000	30	N/A	Não	L40	
Fases Synchronis								
C18	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	16	Sim	L1	971
C8	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	10	Sim	L7	972
aQ	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	19	Polar	L1	973
Fenil	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	11	Sim	L11	979
Amino	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	4	Sim	L8	977
Sílica	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	-	-	L3	970
HILIC	Sílica esférica completamente porosa	1,7, 3, 5	100	320	5	-	-	975

Seleção de colunas HPLC por fabricante

Para encontrar uma alternativa adequada da Thermo Scientific para colunas de outro fabricante, consulte o guia de seleção abaixo. As fases alternativas da Thermo Scientific são selecionadas com base em uma combinação de semelhanças físicas e químicas, assim como no modo de retenção. Não é garantido que essas alternativas forneçam a mesma retenção ou seletividade, mas devem ser adequadamente semelhantes em caráter para permitir que uma separação semelhante ou melhorada seja alcançada com alguma otimização do método. O usuário deve consultar as informações individuais de cada fase para garantir que as

características da alternativa correspondam aos requisitos de sua separação.

A tabela a seguir não está completa em termos de fabricante ou produtos oferecidos. Embora todos os esforços sejam feitos para garantir que as informações do produto fornecidas sejam as mais precisas possível, alguns erros podem ocorrer na compilação e transcrição. Não nos responsabilizamos pelo uso das seguintes informações.

Fase	Fabricante	Tamanho de poro (Å)	Área (m ² /g)	% de carbono	Alternativa recomendada da Thermo Scientific
ACE C18	AGIR	100	300	15,5	Sincronis C18
ACE C8	AGIR	100	300	9	Sincronis C8
ACE Fenil	AGIR	100	300	9,5	Sincronis Fenil
ACE AQ	AGIR	100	300	14	Sincronis aQ
ACE C18-300	AGIR	300	100	9	BioBasic 18
ACE C8-300	AGIR	300	100	5	BioBasic 8
ACE C4-300	AGIR	300	100	2,6	BioBasic 4
ACQUITY UPLC™ BEH HILIC	Waters	130	185	–	Hypersil GOLD Sílica (1,9 µm)
ACQUITY UPLC HSS C18	Waters	100	230	15	Hypersil GOLD (1,9 µm)
ACQUITY UPLC BEH C18	Waters	130	185	18	Hypersil GOLD (1,9 µm)
ACQUITY UPLC BEH C8	Waters	130	185	13	Hypersil GOLD C8 (1,9 µm)
ACQUITY UPLC BEH Fenil	Waters	130	185	15	Hypersil GOLD Fenil (1,9 µm)
ACQUITY UPLC HSS T3	Waters	100	230	11	Hypersil GOLD aQ (1,9 µm)
Aeris PEPTÍDEO XB-C18	Phenomenex	100	200	–	Accucore 150-C18
Aeris WIDEPORÉ XB-C18	Phenomenex	200	25	–	Accucore 150-C18
Aeris WIDEPORÉ XB-C8	Phenomenex	200	25	–	Accucore 150-C4
Aeris WIDEPORÉ XB-C4	Phenomenex	200	25	–	Accucore 150-C4
Alltima™ HP C18	Grace	190	200	12	Hypersil GOLD
Alltima HP C18 AQ	Grace	100	450	20	Hypersil GOLD aQ
Alltima HP C18 HiLoad	Grace	100	450	24	Sincronis C18
Alltima HP C8	Grace	190	200	8	Hypersil GOLD C8
Alltima HP CN	Grace	190	200	4	Hypersil GOLD CN
Alltima HP Sílica	Grace	190	200	–	Hypersil GOLD Sílica
Aminex™ HPX42C	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carboidrato Ca ²⁺
Aminex HPX72S	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carboidrato H ⁺
Aminex HPX87C	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carboidrato Ca ²⁺
Aminex HPX87H	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carboidrato H ⁺
Aminex HPX87N	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carboidrato Na ⁺
Aminex HPX87P	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carboidrato Pb ²⁺
AQUA™ C18	Phenomenex	125	320	15	Hypersil GOLD aQ
Ascentis™ C18	Supelco	100	450	25	Sincronis C18
Ascentis C8	Supelco	100	450	15	Sincronis C8
Ascentis Express C18	Supelco	90	150	–	Accucore C18
Ascentis Express C8	Supelco	90	150	–	Accucore C8
Ascentis Express F5	Supelco	90	150	–	Accucore PFP
Ascentis Express HILIC	Supelco	90	150	–	Accucore HILIC
Ascentis Express Fenil-Hexil	Supelco	90	150	–	Accucore Fenil-Hexil
Ascentis Express RP-Amida	Supelco	90	150	–	Accucore Polar Premium
Ascentis Express Peptídeo ES-C18	Supelco	160	80	–	Accucore 150-C18
Ascentis Fenil	Supelco	100	450	19	Sincronis Fenil

Seleção de colunas HPLC por fabricante (continuação)

Fase	Fabricante	Tamanho de poro (Å)	Área (m ² /g)	% de carbono	Alternativa recomendada da Thermo Scientific
Atlantis™ dC18	Waters	100	330	12	Acclaim Polar Advantage II
Atlantis T3	Waters	100	300	14	Hypersil GOLD
Atlantis HILIC Sílica	Waters	100	300	–	Hypersil GOLD Sílica
Atlantis dC18	Waters	100	330	12	Hypersil GOLD aQ
Capcell Core C18	Shiseido	90	150	7	Accucore C18
Capcell Pak C18 AQ	Shiseido	120	300	11	Acclaim Polar Advantage II
Cortecs C18	Waters	90	100	6,6	Accucore C18
Cortecs C18+	Waters	90	100	5,7	Accucore Polar Premium
Cortecs HILIC	Waters	90	100	–	Accucore HILIC
Discovery™ BIO Wide Pore C18	Supelco	300	–	–	BioBasic 18
Discovery BIO Wide Pore C8	Supelco	300	–	–	BioBasic 8
Discovery C18	Supelco	180	200	14	Hypersil GOLD
Discovery C8	Supelco	180	200	–	Hypersil GOLD C8
Discovery Ciano	Supelco	180	200	–	Hypersil GOLD CN
Gemini™ C18	Phenomenex	110	375	14	Hypersil GOLD
Halo C18	AMT	90	150	–	Accucore C18
Halo C8	AMT	90	150	–	Accucore C8
Halo HILIC	AMT	90	150	–	Accucore HILIC
Halo PFP	AMT	90	150	–	Accucore PFP
Halo Fenil-Hexil	AMT	90	150	–	Accucore Fenil-Hexil
Halo RP-Amida	AMT	90	150	–	Accucore Polar Premium
HALO Peptídeo ES-C18	AMT	160	80	–	Accucore 150-C18
Inertsil™ C4	GL Sciences	150	320	8	Hypersil GOLD C4
Inertsil C8	GL Sciences	150	320	11	Syncronis C8
Inertsil ODS3V	GL Sciences	100	450	15	Syncronis C18
Inertsil Fenil	GL Sciences	150	320	10	Syncronis Fenil
Inertsil Sílica	GL Sciences	150	320	–	Syncronis Sílica
J'Sphere M80	YMC	80	–	14	Acclaim Polar Advantage II
Jupiter™ C18	Phenomenex	300	170	13	BioBasic 18
Jupiter C4	Phenomenex	300	170	5	BioBasic C4
Kinetex C18	Phenomenex	100	–	12	Accucore C18
Kinetex C8	Phenomenex	100	–	10	Accucore C8
Kinetex HILIC	Phenomenex	100	–	–	Accucore HILIC
Kinetex PFP	Phenomenex	100	–	9	Accucore PFP
Kinetex Fenil-Hexil	Phenomenex	100	–	–	Accucore Fenil-Hexil
Kinetex XB-C18	Phenomenex	100	–	12	Accucore C18
Kromasil C18	Akzo-Nobel	100	340	19	Syncronis C18
Kromasil C4	Akzo-Nobel	100	340	8	Hypersil GOLD C4
Kromasil Sílica	Akzo-Nobel	100	340	–	Syncronis Sílica
LiChrospher™ CN	Merck	100	350	7	Hypersil GOLD CN
LiChrospher Diol	Merck	100	350	–	BETASIL Diol
LiChrospher NH ₂	Merck	100	350	5	Syncronis Amino
LiChrospher RP 18	Merck	100	350	21	Syncronis C18
LiChrospher RP-18e	Merck	100	350	22	Syncronis C18
LiChrospher RP-8	Merck	100	350	13	Syncronis C8
LiChrospher RP-8e	Merck	100	350	13	Syncronis C8
Luna™ C18 (2)	Phenomenex	100	400	18	Syncronis C18
Luna C8 (2)	Phenomenex	100	400	14	Syncronis C8
Luna CN	Phenomenex	100	400	–	Hypersil GOLD CN
Luna HILIC	Phenomenex	200	200	5,7	BETASIL Diol
Luna NH ₂	Phenomenex	100	400	10	Syncronis Amino
Luna PFP (2)	Phenomenex	100	400	5,7	Hypersil GOLD PFP

Seleção de colunas HPLC por fabricante (continuação)

Fase	Fabricante	Tamanho de poro (Å)	Área (m ² /g)	% de carbono	Alternativa recomendada da Thermo Scientific
Luna SCX	Phenomenex	100	400	–	BioBasic SCX
Luna Sílica (2)	Phenomenex	100	400	–	Syncronis Sílica
μBondapak™ C18	Waters	125	330	10	Hypersil GOLD
μBondapak CN	Waters	125	330	–	Hypersil GOLD CN
μBondapak NH ₂	Waters	125	330	4	Hypersil APS-2
μBondapak Fenil	Waters	125	330	–	Hypersil GOLD Fenil
Nova-Pak™ (HR) C18	Waters	60	120	7	Hypersil GOLD
Nova-Pak C8	Waters	60	120	–	Hypersil GOLD C8
Nova-Pak CN	Waters	60	120	–	Hypersil GOLD CN
Nova-Pak Fenil	Waters	60	120	5	Hypersil GOLD Fenil
Nova-Pak Sílica	Waters	60	120	–	Hypersil GOLD Sílica
NUCLEODUR™ C18 EC	Macherey-Nagel	110	340	18	Syncronis C18
NUCLEODUR C18 Gravity	Macherey-Nagel	110	340	18	Syncronis C18
NUCLEODUR CN	Macherey-Nagel	110	340	7	Hypersil GOLD CN
NUCLEODUR Pyramid	Macherey-Nagel	110	340	14	Syncronis aQ
Nucleoshell™ RP 18	Macherey-Nagel	90	130	7,5	Accucore C18
Nucleoshell Fenil-Hexil	Macherey-Nagel	90	130	4,5	Accucore Fenil-Hexil
Nucleoshell PFP	Macherey-Nagel	90	130	3	Accucore PFP
Nucleosil™ 100 C18	Macherey-Nagel	100	350	17	Syncronis C18
Nucleosil 100 C18 AB	Macherey-Nagel	100	350	24	Syncronis C18
Nucleosil 100 C ₆ H ₅	Macherey-Nagel	100	350	–	Syncronis Fenil
Nucleosil 100 C8	Macherey-Nagel	100	350	9	Syncronis C8
Nucleosil 100 CN	Macherey-Nagel	100	350	–	Hypersil GOLD CN
Nucleosil 100 N(CH ₃) ₂	Macherey-Nagel	100	350	–	Hypersil SAX
Nucleosil 100 NH ₂	Macherey-Nagel	100	350	4	Syncronis Amino
Nucleosil 100 OH	Macherey-Nagel	100	350	–	BETASIL Diol
Nucleosil 100 SA	Macherey-Nagel	100	350	7	BioBasic SCX
Nucleosil 100 SB	Macherey-Nagel	100	350	10	Hypersil GOLD SAX
Nucleosil 300 C18	Macherey-Nagel	300	100	7	BioBasic 18
Nucleosil 300 C4	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic 4
Nucleosil 300 C ₆ H ₅	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic Fenil
Nucleosil 300 C8	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic 8
Nucleosil 300 CN	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic CN
Pinnacle™ C1	Restek	120	170	2	Hypersil SAS
Pinnacle C18	Restek	120	170	10	Hypersil GOLD
Pinnacle C4	Restek	120	170	4	Hypersil GOLD C4
Pinnacle CN	Restek	120	170	5	Hypersil GOLD CN
Pinnacle DB C18	Restek	140	–	11	Hypersil GOLD
Pinnacle DB C18 1,9 μm	Restek	140	–	11	Hypersil GOLD (1,9 μm)
Pinnacle DB C8	Restek	140	–	6	Hypersil GOLD C8
Pinnacle DB Ciano	Restek	140	–	4	Hypersil GOLD CN
Pinnacle DB Fenil	Restek	140	–	5	Hypersil GOLD Fenil
Pinnacle IBD	Restek	120	170	–	Hypersil GOLD
Pinnacle NH ₂	Restek	120	170	2	Hypersil GOLD Amino
Pinnacle Fenil	Restek	120	170	5	Hypersil GOLD Fenil
Pinnacle SAX	Restek	120	170	3	Hypersil GOLD SAX
Pinnacle Sílica	Restek	120	170	–	Hypersil GOLD Sílica
Pinnacle Ultra C18	Restek	100	–	20	Syncronis C18
Pinnacle Wide Pore C4	Restek	300	–	2	BioBasic 4
Poroshell™ 120 EC-C18	Agilent	120	120	8	Accucore C18
Poroshell 120 EC-C8	Agilent	120	120	5	Accucore C8
Poroshell 120 SB-C18	Agilent	120	120	7,5	Accucore C18
Poroshell 120 SB-Aq	Agilent	120	130	–	Accucore aQ

Seleção de colunas HPLC por fabricante (continuação)

Fase	Fabricante	Tamanho de poro (Å)	Área (m ² /g)	% de carbono	Alternativa recomendada da Thermo Scientific
Poroshell 120 Fenil-Hexil	Agilent	120	130	9	Accucore Fenil-Hexil
Poroshell 120 Bonus-RP	Agilent	120	130	9,5	Accucore Polar Premium
Poroshell SB-C18	Agilent	300	45	2,8	Accucore 150-C18
Poroshell Extend-C18	Agilent	300	45	4	Accucore 150-C18
Poroshell 300 SB-C8	Agilent	300	45	1,5	Accucore 150-C4
Poroshell 300 SB-C3	Agilent	300	45	1,1	Accucore 150-C4
Primesep™	SielC	–	–	–	Colunas Acclaim Modo Misto
Prodigy™ C8	Phenomenex	150	310	13	Sincronis C8
Prodigy ODS2	Phenomenex	150	310	18	Sincronis C18
Prodigy ODS-3	Phenomenex	100	450	16	Sincronis C18
Prodigy ODS-3V	Phenomenex	100	450	16	Hypersil GOLD
Prodigy Fenil-3	Phenomenex	100	450	10	Sincronis Fenil
Purospher™ RP-18	Merck	60	500	–	Hypersil GOLD
Purospher STAR-8e	Merck	120	300	–	Hypersil GOLD C8
Purospher STAR RP-18e	Merck	120	300	–	Hypersil GOLD
Waters™ Spherisorb™ C1	Waters	80	200	2	Hypersil SAS
Waters Spherisorb C6	Waters	80	200	5	BETASIL C6
Waters Spherisorb C8	Waters	80	200	6	Hypersil GOLD C8
Waters Spherisorb CN	Waters	80	200	3	Hypersil GOLD CN
Waters Spherisorb NH ₂	Waters	80	200	2	Hypersil APS-2
Waters Spherisorb ODS1	Waters	80	200	6	Hypersil GOLD
Waters Spherisorb ODS2	Waters	80	200	12	Hypersil GOLD
Waters Spherisorb ODSB	Waters	80	200	12	Hypersil GOLD
Waters Spherisorb Fenil	Waters	80	200	3	Hypersil GOLD Fenil
Waters Spherisorb SAX	Waters	80	200	–	Hypersil SAX
Waters Spherisorb SCX	Waters	80	200	–	BioBasic SCX
Waters Spherisorb W (sílica)	Waters	80	200	–	Hypersil GOLD Sílica
SunFire™ C18	Waters	90	340	16	Sincronis C18
SunFire C8	Waters	90	340	16	Sincronis C8
SunShell™ C18	ChromaNik	90	150	7	Accucore C18
SunShell C8	ChromaNik	90	150	4,5	Accucore C8
SunShell PFP	ChromaNik	90	150	4,5	Accucore PFP
Supelcosil™ LC-1	Supelco	120	170	–	Hypersil SAS
Supelcosil LC-18	Supelco	120	170	11	Hypersil GOLD
Supelcosil LC-18DB	Supelco	120	170	11	Hypersil GOLD
Supelcosil LC-8	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD C8
Supelcosil LC-CN	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD CN
Supelcosil LC-NH ₂	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD Amino
Supelcosil LC-Si	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD Sílica
Sy mmetry™ C18	Waters	100	335	19	Sincronis C18
Sy mmetry C8	Waters	100	335	12	Sincronis C8
Synergi™ Hydro-RP	Phenomenex	80	475	19	Sincronis aQ
TSKgel™ G2000SW (incl XL)	Tosoh	125	–	–	BioBasic SEC 120
TSKgel Octil-80TS	Tosoh	80	200	11	Hypersil GOLD C8
TSKgel ODS-120A	Tosoh	120	200	22	Hypersil GOLD
TSKgel ODS-120T	Tosoh	120	200	22	Sincronis C18
TSKgel ODS-80TM	Tosoh	80	200	15	Hypersil GOLD
TSKgel Super Octil	Tosoh	110	–	5	Hypersil GOLD C8
TSKgel Super ODS	Tosoh	110	–	8	Hypersil GOLD
TSKgel Super Fenil	Tosoh	110	–	3	Hypersil GOLD Fenil

Seleção de colunas HPLC por fabricante (continuação)

Fase	Fabricante	Tamanho de poro (Å)	Área (m ² /g)	% de carbono	Alternativa recomendada da Thermo Scientific
TSKgel SuperSW3000	Tosoh	250	–	–	BioBasic SEC 300
Vydac™ 201SP C18	Grace	90	–	–	Hypersil GOLD
Vydac 201SP Selectapore 90M C18	Grace	90	250	–	Hypersil GOLD
Vydac 201TP C18	Grace	300	–	–	BioBasic 18
Vydac 202TP C18	Grace	300	–	–	BioBasic 18
Vydac 208TP C8	Grace	300	–	–	BioBasic 8
Vydac 214TP	Grace	300	–	–	BioBasic 4
Vydac 218TP	Grace	300	–	–	BioBasic 18
Vydac 218WP Selectapore 300M C18	Grace	300	70	–	BioBasic 18
XBridge™ C18	Waters	–	–	–	Hypersil GOLD
XBridge C8	Waters	–	–	–	Hypersil GOLD C8
XBridge HILIC	Waters	130	185	–	Hypersil GOLD Sílica
XBridge Fenil	Waters	–	–	–	Hypersil GOLD Fenil
XTerra™ MS C18	Waters	125	180	16	Hypersil GOLD
XTerra MS C8	Waters	125	180	12	Hypersil GOLD C8
YMCbasic™	YMC	–	–	–	Hypersil GOLD C8
YMC-Pack™ C4	YMC	120	300	7	HyPURITY C4
YMC-Pack C8	YMC	120	300	10	Acclaim C8
YMC-Pack CN	YMC	120	300	7	Hypersil GOLD CN
YMC-Pack Diol	YMC	120	300	–	BETASIL Diol
YMC-Pack NH ₂	YMC	120	–	–	Hypersil GOLD Amino
YMC-Pack ODS AQ	YMC	120	300	16	Synchronis aQ
YMC-Pack ODS-A	YMC	120	300	17	Synchronis C18
YMC-Pack ODS-A	YMC	300	150	6	BioBasic 18
YMC-Pack Fenil	YMC	120	300	9	Synchronis Fenil
YMC-Pack Pro C18	YMC	120	350	16	Synchronis C18
YMC-Pack Sílica	YMC	120	–	–	Synchronis Sílica
YMC-Pack TMS (C1)	YMC	120	300	4	BETASIL C1
Zorbax™ Eclipse XDB C18	Agilent	80	180	10	Hypersil GOLD
Zorbax Eclipse XDB C8	Agilent	80	180	8	Hypersil GOLD C8
Zorbax Eclipse XDB Fenil	Agilent	80	180	8	Hypersil GOLD Fenil
Zorbax Eclipse Plus C18	Agilent	95	160	8	Hypersil GOLD
Zorbax Eclipse Plus C8	Agilent	95	160	6	Hypersil GOLD C8
Zorbax RRHT Eclipse Plus C18	Agilent	95	160	8	Hypersil GOLD (1,9 µm)
Zorbax RRHT Eclipse Plus C8	Agilent	95	160	6	Hypersil GOLD C8 (1,9 µm)
Zorbax RRHT Eclipse XDB-C18	Agilent	80	180	10	Hypersil GOLD (1,9 µm)
Zorbax RRHT Eclipse XDB-C8	Agilent	80	180	7,5	Hypersil GOLD C8 (1,9 µm)
Zorbax RRHT SB-CN	Agilent	80	180	4	Hypersil GOLD CN (1,9 µm)
Zorbax SB Aq	Agilent	80	180	–	Hypersil GOLD aQ
Zorbax SB C18	Agilent	80	180	10	Hypersil GOLD
Zorbax SB C18	Agilent	300	45	3	BioBasic 18
Zorbax SB C8	Agilent	80	180	6	Hypersil GOLD C8
Zorbax SB C8	Agilent	300	45	2	BioBasic 8
Zorbax SB CN	Agilent	80	180	4	Hypersil GOLD CN
Zorbax SB Fenil	Agilent	80	180	6	Hypersil GOLD Fenil

Princípios de uma LC rápida

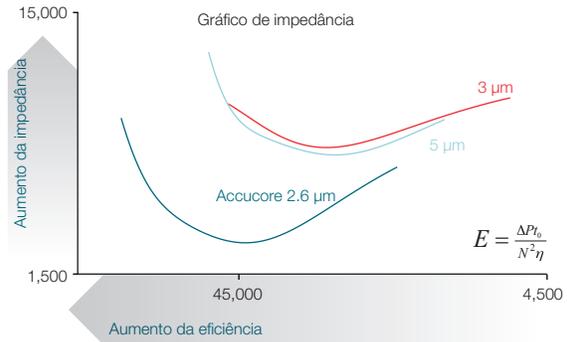
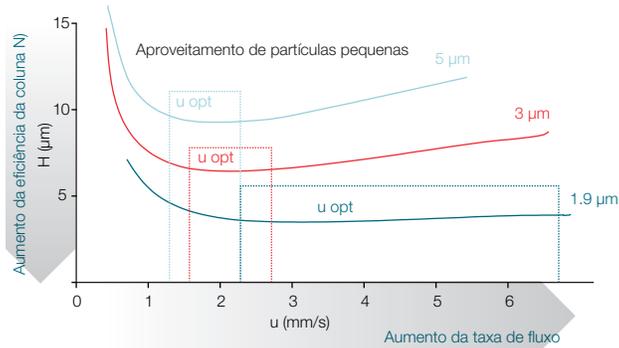
Efeito do tamanho e tipo da partícula

Está bem estabelecido que as colunas preparadas com partículas de diâmetro menor geram eficiências mais altas em uma faixa mais ampla de taxas de fluxo do que as colunas de partículas maiores, conforme mostrado no gráfico abaixo.

Uma alternativa às partículas de diâmetro pequeno é a Tecnologia de Núcleo Aprimorado usada nas colunas de HPLC Accucore. Conforme mostrado no gráfico de impedância abaixo, as colunas Accucore geram eficiências mais altas em tempos mais curtos do que colunas preparadas com partículas de 5 µm ou 3 µm e o fazem com baixas contrapressões.

$$E = \frac{\Delta P t_0}{N^2 \eta}$$

- E Impedância
- ΔP Contrapressão
- t₀ Tempo de retenção de pico não retido
- N Eficiência
- η Viscosidade da fase móvel



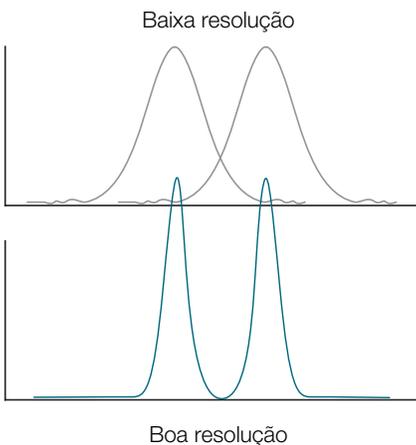
Velocidade e resolução

A equação geral de resolução cromatográfica mostra que a resolução é diretamente proporcional à eficiência. Altas eficiências em uma faixa mais ampla de velocidades lineares indicam que colunas mais curtas e/ou taxas de fluxo mais rápidas podem ser usadas para aumentar a velocidade das separações sem sacrificar a resolução.

A equação de resolução também mostra que uma ampla gama de diferentes fases ligadas, cada uma oferecendo uma seletividade diferente, é uma maneira útil de melhorar a resolução.

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(a - 1)}{a} \sqrt{N} \frac{k'}{1 + k'}$$

- a Seletividade
- N Eficiência
- k' Fator de capacidade



Capacidade de pico

Como alternativa para acelerar a análise, a excelente resolução oferecida por colunas de alta eficiência também pode ser usada para melhorar separações complexas por meio de um aumento na capacidade de pico: o número de picos que podem ser separados em um determinado tempo de gradiente.

$$n_c = 1 + \left(\frac{t_g}{W} \right)$$

- n_c Capacidade de pico
- t_g Tempo de gradiente
- W Largura do pico (10% da altura)

Sensibilidade

De acordo com a fórmula mostrada abaixo, a sensibilidade é aumentada em separações de alta eficiência ao aumentar a concentração do pico e, portanto, a relação sinal/ruído do detector.

$$c_{max} = \frac{\sqrt{N} V_i}{L d_c^2 (1 + k')}$$

- c_{max} Concentração no pico máximo
- N Eficiência
- V_i Volume de injeção
- L Comprimento da coluna
- d_c Diâmetro interno da coluna
- k' Fator de capacidade

Miniaturização

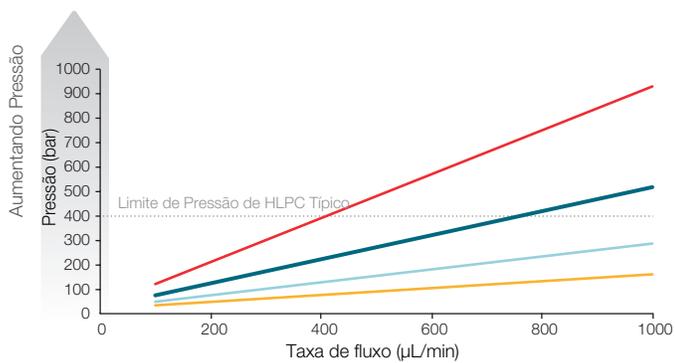
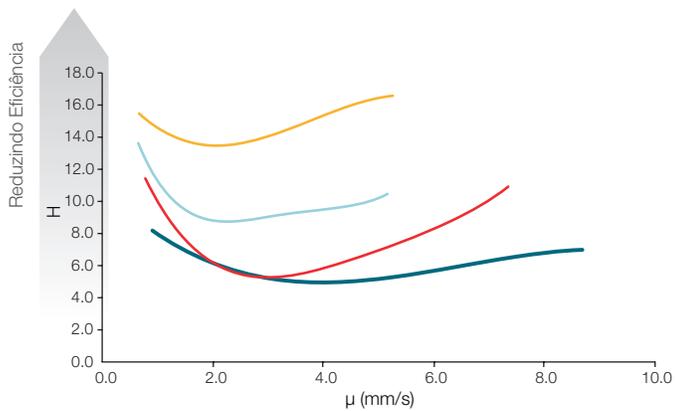
A fórmula de sensibilidade também mostra que a concentração de pico pode ser aumentada com o uso de colunas mais curtas e, mais importante, com diâmetros internos de coluna mais estreitos.

Ao transferir um método para uma coluna com geometria diferente, ajustes devem ser feitos para os seguintes parâmetros:

- taxa de fluxo
- volume de injeção
- perfil de gradiente

Otimização

Para preservar a alta eficiência e, portanto, a resolução e a sensibilidade, o sistema HPLC em uso deve ser otimizado para reduzir quaisquer causas potenciais de alargamento de pico.



Condições e faixas ideais para colunas de HPLC Accucore 2,6 μm

ID da coluna (mm)	Taxa de fluxo ideal	Volume de inj. máximo	Faixa de contrapressão	Faixa de temperatura
2,1	400 μL/min	1 μL	1.000 bar	70°C
3,0	800 μL/min	3 μL	1.000 bar	70°C
4,6	1800 μL/min	5 μL	1.000 bar	70°C



Informações técnicas de LC

Transferência de método para colunas Accucore 2,6 µm

Contendo partículas de núcleo sólido, que são projetadas para um diâmetro de 2,6 µm e uma distribuição de tamanho de partícula muito estreita, as colunas de HPLC Accucore permitem a separação de alta velocidade e alta resolução, com contrapressões significativamente mais baixas do que aquelas associadas a partículas totalmente porosas abaixo de 2 µm.

Ao transferir métodos de HPLC convencional para uma coluna de núcleo sólido, várias abordagens podem ser adotadas, dependendo das necessidades analíticas. Se as dimensões da coluna forem mantidas e as características, design e diâmetro da partícula forem alteradas, então uma melhoria na eficiência e, portanto, na sensibilidade, resolução e capacidade de pico é obtida. Uma segunda abordagem é alterar não apenas as características das partículas, mas também as dimensões da coluna, o que tem a vantagem de reduzir ainda mais o tempo de análise e aumentar a sensibilidade.

A compreensão de alguns cálculos práticos pode ajudar a alcançar a escala correta e manter um perfil de ensaio consistente entre o método original e o transferido. Uma abordagem idêntica pode ser usada ao transferir uma análise de HPLC convencional para um método UHPLC usando colunas preparadas com partículas completamente porosas abaixo de 2 µm, como Hypersil GOLD 1,9 µm e Synchronis 1,7 µm.

Existem três considerações principais ao transferir um método para uma coluna mais curta usando partículas diferentes: escalonamento da taxa de fluxo, ajuste do volume de injeção e ajuste do perfil do gradiente. Elas são discutidas mais detalhadamente abaixo.*

1. Escalonar a taxa de fluxo

Para manter uma separação equivalente ao transferir um método, é importante manter a velocidade linear constante entre o método original e o novo. A velocidade linear está relacionada à taxa de fluxo, ao diâmetro interno da coluna e ao tamanho da partícula. Uma equação simples pode ser derivada para calcular a taxa de fluxo (F_2) necessária para o novo método. Isso é mostrado abaixo, normalizado para tamanho de partícula.

$$F_2 = F_1 \times (d_{c2}^2 / d_{c1}^2) \times (d_{p1} / d_{p2})$$

F_1 – taxa de fluxo original (mL/min)

d_{c1} – diâmetro interno da coluna original (mm)

d_{p1} – tamanho de partícula da coluna original (µm)

d_{c2} – diâmetro interno da coluna nova (mm)

d_{p2} – tamanho de partícula da coluna nova (µm)

2. Ajustar o volume de injeção

Como os métodos baseados em núcleo sólido sub-3 µm são mais frequentemente transferidos para colunas de volume menor, o mesmo volume de injeção ocupará uma proporção maior da nova coluna, possivelmente levando ao alargamento da banda ou potencialmente sobrecarregando a coluna. Portanto, é importante reduzir o volume de injeção para corresponder à mudança no volume da coluna. Novamente, uma equação simples pode ser usada para calcular o volume de injeção (V_{i2}) necessário para o novo método.

$$V_{i2} = V_{i1} \times (d_{c2}^2 \times L_2 / d_{c1}^2 \times L_1)$$

V_{i1} – volume de injeção original (µL)

d_{c1} – diâmetro interno da coluna original (mm)

L_1 – comprimento da coluna original (mm)

V_{i2} – volume de injeção novo (µL)

d_{c2} – diâmetro interno da coluna nova (mm)

L_2 – comprimento da coluna nova (mm)

3. Ajustar o perfil de gradiente

A transferência geométrica do gradiente requer o cálculo do número de volumes de coluna da fase móvel em cada segmento (intervalo de tempo) do gradiente no método original para garantir que o novo gradiente calculado ocorra sobre o mesmo número de volumes de coluna, para a nova coluna.

O seguinte cálculo deve ser realizado para cada segmento de tempo do gradiente, incluindo o reequilíbrio da coluna. Ele leva em consideração o volume vazio de cada coluna (V_c , cálculo descrito abaixo), a taxa de fluxo no método original e a taxa de fluxo no novo método (calculada na etapa 1 acima) e o segmento de tempo no método original.

$$t_{g2} = t_{g1} \times (V_{c2} / V_{c1}) \times (F_1 / F_2)$$

t_{g1} – Segmento de tempo no gradiente original (min)

t_{g2} – Segmento de tempo no gradiente novo (min)

V_{c1} – Volume vazio da coluna original (mL)

V_{c2} – Volume vazio da coluna nova (mL)

F_1 – Taxa de fluxo original (mL/min)

F_2 – Taxa de fluxo nova (mL/min)

O volume vazio da coluna é o volume que não é ocupado pela fase estacionária (aproximadamente 68% do volume da coluna):

$$V_c = 0,68 \times p \times r^2 \times L$$

V_c – volume da coluna (mL)

L – comprimento da coluna (cm)

r – raio da coluna (cm)

Um exemplo de um método transferido seguindo as etapas 1 a 3 acima é ilustrado na tabela a seguir:

Coluna: Completamente porosa 5 µm, 150 x 4,6 mm		Coluna: Accucore RP-MS 2,6 µm, 100 x 2,1 mm		Coluna: Accucore RP-MS 2,6 µm, 50 x 2,1 mm	
Taxa de fluxo (mL/min)	1,00	Taxa de fluxo (mL/min)	0,4	Taxa de fluxo (mL/min)	0,4
Volume de inj. (µL)	1	Volume de inj. (µL)	1,4	Volume de inj. (µL)	0,7
Tempo de gradiente (min)	%B	Tempo de gradiente (min)	%B	Tempo de gradiente (min)	%B
0,0	35,0	0,0	35,0	0,0	35,0
10,0	60,0	3,5	60,0	1,7	60,0
11,0	35,0	3,8	35,0	1,9	35,0
17,0	35,0	6,0	35,0	3,0	35,0
Contrapressão	59	Contrapressão	218	Contrapressão	120
Resolução	2,6	Resolução	2,5	Resolução	1,5
Tempo de funcionamento (minutos)	17,0	Tempo de funcionamento (minutos)	6,0	Tempo de funcionamento (minutos)	3,0
Solvente usado (mL)	17	Solvente usado (mL)	2,4	Solvente usado (mL)	1,2

Condições de transferência do método de HPLC (150 x 4,6 mm, colunas de 5 µm) para Accucore (100 x 2,1 mm, 2,6 µm e 50 x 2,1 mm, colunas de 2,6 µm).

Considerações do sistema

Para obter os melhores dados usando cromatografia rápida, é fundamental que o sistema do instrumento de LC seja otimizado para operar sob essas condições. Todos os componentes do sistema para o ensaio devem ser considerados. O volume do sistema (ID e comprimento da tubulação de conexão, volume de injeção, volume da célula de fluxo em UV) deve ser minimizado, a constante de tempo do detector e a taxa de amostragem precisam ser cuidadosamente selecionadas, e ao executar gradientes rápidos o volume de permanência da bomba deve ser mínimo.

Minimizando o volume do sistema

O excesso de volume do sistema dá origem ao alargamento da banda, o que tem um efeito prejudicial no desempenho cromatográfico. Isso pode surgir na coluna, no coletor de amostras automático, na tubulação que conecta a coluna ao injetor e ao detector e na célula de fluxo do detector. Os efeitos adicionais de coluna tornam-se mais significativos para separações em escala reduzida por causa dos volumes de coluna menores e para picos menos retidos que têm um volume de pico mais baixo, tornando ainda mais crítico minimizar a dispersão de coluna extra.

Taxa de amostragem do detector

Com partículas de 1,9 µm, os parâmetros operacionais podem ser otimizados para fornecer análises rápidas. Isso resulta em picos cromatográficos estreitos que podem ser da ordem de 1-2 segundos ou menos em largura. É importante fazer a varredura do detector (seja UV ou MS) rápido o suficiente para obter a definição de pico ideal, caso contrário, a resolução, a eficiência e a precisão analítica serão comprometidas.

Volume de permanência

O volume de permanência da bomba de HPLC é particularmente importante ao executar aplicações de alta velocidade usando gradientes rápidos, típicos de separações de alto rendimento em colunas preparadas com pequenas partículas. Isso ocorre porque o volume de permanência da bomba afeta o tempo que leva para o gradiente atingir o topo da coluna. Se considerarmos um método que usa uma vazão de 0,4 mL/min e um gradiente rápido de 1 minuto, o gradiente teórico atinge a coluna imediatamente. Uma bomba com um volume de permanência de 65 µL colocará o gradiente na coluna em 9,75 segundos. Uma bomba quaternária tradicional com um volume de permanência de 800 µL levará 2 minutos para levar o gradiente à coluna. Para a execução de gradientes rápidos, isso é muito lento e pode ser necessário introduzir um intervalo isocrático no final do gradiente para permitir a eluição dos analitos.



Reduzindo a escala do método

Razões para reduzir a escala de um método HPLC ou LC-MS

Existem aplicações em que é desejável reduzir a escala de um método sem transferir o método para UHPLC. Essas razões podem ser:

- maximizar a sensibilidade quando quantidades pequenas de amostras estão disponíveis
- tornar a taxa de fluxo compatível com a técnica de ionização na detecção por MS
- reduzir custos ao diminuir o consumo de solventes

Transferir método para uma coluna mais estreita

Reduzir a escala da separação reduzindo o diâmetro interno da coluna pode ser necessário ao transferir um método de detecção UV para MS, ou quando apenas quantidades muito pequenas de amostras estão disponíveis, como na descoberta de fármacos ou proteômica. No primeiro caso, a técnica de ionização ou design da fonte determina a melhor faixa para a taxa de fluxo (veja a tabela acima) e em último caso, a sensibilidade do método é maximizada porque os solutos eluem em bandas cromatográficas mais concentradas.

Se todos os outros parâmetros do método (comprimento de coluna e tamanho de partícula, química da coluna, composição da fase móvel, faixa e tempo do gradiente, temperatura de separação) não forem alterados, a mudança para uma coluna mais estreita requer apenas ajuste na taxa de fluxo.

$$F_2 = F_1 \times (d_{c2}/d_{c1})^2$$

F_1 – taxa de fluxo original (a ser reduzida)

F_2 – nova taxa de fluxo

d_{c1} – diâmetro interno da coluna original

d_{c2} – diâmetro interno da coluna nova

Isto é aplicável para métodos isocráticos e de gradiente. O novo método deve produzir um cromatograma com uma resolução e tempo de funcionamento idênticos. Se mudanças pequenas no tempo de retenção e resolução forem observadas, elas são geralmente causadas pelo volume de permanência do sistema (discutido abaixo).

Taxas de fluxo típicas para colunas analíticas, de calibre estreito, capilar e nanocalibre (partículas de 5 µm)

ID da coluna (mm)	Faixa da taxa de fluxo (µL/min)	Taxa de fluxo ideal ¹ (µL/min)	Volume de injeção recomendado ² (µL)	Fonte API
4,6	1.000 a 1.500	1250	30	APCI ou ESI de alto fluxo
3,0	400 – 600	500	10	APCI ou ESI de alto fluxo
2,1	200 – 300	250	5	APCI ou Micro-ESI
1,0	40 – 60	50	1	Micro-ESI
0,5	10 – 25	12	0,35	Micro-ESI
0,32	4 – 10	5	0,15	Micro-ESI
0,18	1 – 3	2	0,05	Micro-ESI
0,1	0,4 – 1	0,5	0,015	Nanospray
0,075	0,2 – 0,5	0,3	0,01	Nanospray

1. Recomendado para boa eficiência e pressão moderada. Taxas de fluxo mais altas podem levar a vazios de coluna. Taxas de fluxo mais baixas são recomendadas para lavar a base da coluna ou trocar os solventes.

2. Estimativas baseadas em perda insignificante de eficiência e eluição isocrática com solvente de amostra idêntico à fase móvel. Volumes maiores podem ser introduzidos em condições de gradiente ou usando um solvente de amostra mais fraco.

Transferir método para uma coluna mais curta

Na eluição de gradiente, a maneira mais simples de reduzir o tempo de ciclo do método é reduzir o comprimento da coluna. Se todos os outros parâmetros do método (ID da coluna e tamanho de partícula, química da coluna, composição da fase móvel, faixa do gradiente, taxa de fluxo, temperatura de separação) não forem alterados, o único requisito é alterar o tempo do gradiente usando a equação abaixo, onde o tempo do gradiente é reduzido pelo mesmo fator que a redução no volume da coluna.

$$t_{g1}/V_{c1} = t_{g2}/V_{c2}$$

t_{g1} – tempo do gradiente no método original (min)

t_{g2} – tempo do gradiente no método novo (min)

V_{c1} – volume da coluna original (mL)

V_{c2} – volume da coluna nova (mL)

O volume da coluna V_c (mL) pode ser estimado usando:

$$V_c = 0,68 \times p \times r^2 \times L$$

V_c – volume da coluna (mL)

L – comprimento da coluna (cm)

r – raio da coluna (cm)

Volume de permanência

O volume de permanência é tão importante para a redução da escala de um método quanto para a transferência do método para UHPLC. O efeito do volume de permanência da separação é mais significativo quando colunas estreitas são usadas em taxas de fluxo baixas. Por exemplo, se o sistema tem um volume de permanência de 2,0 mL e um ID de coluna de 4,6 mm é executado a 1 mL/min, leva 2 minutos para o gradiente atingir o topo da coluna, no entanto, se uma coluna de 2,1 mm de ID de coluna for usada com uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, levará 5 minutos para que o gradiente alcance a coluna. Em separações de gradiente de alto rendimento usando pequenos volumes de coluna, o volume de permanência causa um aumento no tempo de funcionamento e um tempo de reequilíbrio maior entre execuções.

Diversas abordagens podem ser usadas para minimizar esses efeitos:

- selecionar uma bomba com um pequeno volume de atraso do gradiente (por exemplo, o sistema Accela de LC de alta velocidade da Thermo Scientific possui um volume de atraso de apenas 65 µL);
- atrasar a injeção da amostra até que o gradiente chegue no topo da coluna;
- aumentar a taxa de fluxo da bomba e dividir o fluxo antes da coluna.

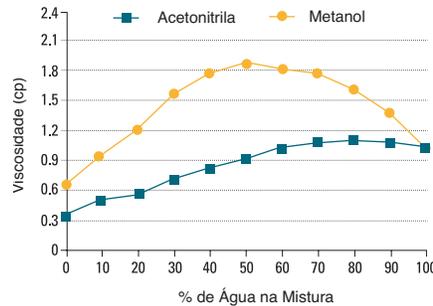
Aumentando a escala do método

Razões para aumentar a escala de um método HPLC

- Aumentar a capacidade do método
- Isolamento e purificação de compostos alvo
- Aumentar o rendimento da amostra

Os métodos analíticos podem exigir aumento da escala até tamanhos preparativos para isolar e purificar compostos de misturas. Ao escolher a melhor coluna e material de embalagem para sua aplicação preparativa, considere a seletividade e capacidade de carga do meio, bem como as dimensões da coluna, para fornecer os resultados de que você precisa de forma mais rápida e econômica. Estabelecemos uma forte reputação para a fabricação e fornecimento de sílicas preparativas e fases ligadas de alta qualidade, projetadas para fornecer os mesmos níveis de desempenho e reprodutibilidade de nossas linhas populares de sílica analítica, como as fases Hypersil da Thermo Scientific.

Aumentar a escala é mais fácil quando se inicia a partir de uma coluna analítica com meios de partículas de tamanho menor, oferecendo a mesma seletividade que os meios preparativos com tamanhos de partículas maiores. As principais famílias de fases da Thermo Scientific são oferecidas em vários tamanhos para complementar as operações em escala de laboratório e facilitar o aumento da escala até a cromatografia preparativa. Colunas de reconhecimento, tipicamente de 250 x 4,6 mm embaladas com um meio de interesse também podem ser usadas para desenvolver a separação. Assim que o método for finalizado na coluna menor, um fator de escala pode ser aplicado.



A viscosidade da fase móvel muda com a composição

Aumentando a escala para uma coluna preparativa

A taxa de fluxo e a escala de carga da coluna são necessárias apenas ao alterar o diâmetro interno da coluna. O escalonamento das taxas de fluxo permite que os tempos de retenção de pico permaneçam relativamente constantes entre colunas com diâmetros internos. A taxa de fluxo de solvente típica através de uma coluna depende de seu diâmetro interno e do tamanho da partícula do material da embalagem da coluna. Este fator de escala também pode ser usado para estimar a capacidade de carga de uma determinada coluna. Assumindo que o comprimento da coluna é uma constante, o fator de escala pode ser calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Fator de Escala} = d_{c2}^2/d_{c1}^2$$

d_{c1} – diâmetro interno da coluna original (mm)
 d_{c2} – diâmetro interno da coluna nova (mm)

A capacidade de carga da coluna e a taxa de fluxo necessárias para as novas colunas de ID maiores podem ser calculadas usando este fator.

Contrapressão da coluna

A contrapressão de operação da coluna é afetada pelo comprimento da coluna, diâmetro interno, tamanho da partícula do meio, temperatura, propriedades do solvente e taxa de fluxo do solvente. Ela também pode ser afetada pelo uso de gradientes, onde a pressão pode variar com a composição do solvente. A contrapressão de operação típica para colunas ou cartuchos pode ser calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Pressão (atm)} = \frac{2.1 \times \Phi \times L \times h}{d_p^2 \times d^2}$$

Φ = impedância da coluna

(1000 para colunas de ID 4,6 mm)

L = comprimento da coluna (mm)

d_p = diâmetro da partícula (μm)

d = diâmetro da coluna (mm)

h = viscosidade da fase móvel (centipoises)

A viscosidade da fase móvel varia com a composição. Como exemplo, a figura acima mostra como a viscosidade da água varia com a adição de metanol ou acetonitrila. Essa variabilidade é um componente crítico na maximização do rendimento com relação à instrumentação de cromatografia que está sendo usada.

Selecionando o meio

A seleção de meio para sua separação preparativa é importante. Escolha meios que tenham uma distribuição estreita de tamanho de partícula que fornecerá colunas de alta eficiência com uma contrapressão baixa, uma vez que não há 'penalidades' para bloquear frits ou impedir o fluxo. As partículas uniformemente esféricas, com distribuição estreita de tamanho dos poros, aparentes nas colunas preparativas da Thermo Scientific, fornecem desempenho reproduzível e uma vida útil mais longa da coluna. O meio que está disponível em uma variedade de tamanhos de partícula oferece escolhas para aplicações de aumento de escala com seletividade controlada. Nós oferecemos uma variedade de escolhas para meio preparativo em diversos tamanhos de partículas para adequar o seu meio à sua aplicação.

Alta carga e alta retenção - HyperPrep HS

Materiais com maior área de superfície podem oferecer uma capacidade de carga maior. Este esforço para maximizar a área de superfície deve ser realizado de uma maneira considerada, particularmente no que diz respeito ao diâmetro e volume dos poros das partículas. Um volume de poros muito alto comprometerá a estabilidade e robustez da base e um diâmetro de poro muito pequeno irá influenciar a transferência de massa em detrimento da eficiência. A alta área de superfície fornece maior retenção de compostos polares. Uma alta carga de carbono fornece uma fase robusta e estável. Entre em contato com o Suporte Técnico para obter mais informações sobre as colunas e meios HyperPrep da Thermo Scientific.

Forma do pico - meio Hypersil GOLD

No HPLC analítico, o uso de embalagens baseadas em sílica altamente pura demonstrou melhorar a forma do pico. Nossos processos de fabricação altamente desenvolvidos e reproduzíveis garantem que nossa principal marca analítica de meio Hypersil GOLD também esteja disponível em uma variedade de tamanhos de partícula adequados para LC preparativa sem comprometer o desempenho.

Compostos polares e isômeros - Colunas Hypercarb, Hypersil GOLD aQ

Frequentemente, ao lidar com compostos muito polares, conseguir uma retenção suficiente pode ser um desafio. Podemos oferecer uma variedade de opções para superar esse problema comum: o capeamento polar na Hypersil GOLD aQ fornece um mecanismo de interação controlado pelo qual os compostos moderadamente polares podem ser retidos. Hypersil GOLD AX pode ser usada no modo HILIC para fornecer retenção de compostos polares. As colunas Hypercarb oferecem seletividade verdadeiramente ortogonal para C18 em LC de fase reversa e podem ser usadas para reter compostos altamente polares. As colunas Hypercarb também podem ser usadas para diferenciar entre compostos intimamente relacionados, incluindo isômeros geométricos e posicionais.

Peptídeos e proteínas - meios BioBasic e Hypersil

Quando se trata de análise de peptídeos, a seleção correta do material de embalagem torna-se cada vez mais importante. Ao decidir sobre o tamanho de poro do material de embalagem a ser usado na análise de uma mistura de polipeptídeos, o peso molecular e a hidrofobicidade dos peptídeos devem ser levados em consideração. Nossa variedade de ofertas de sílica permite que o cromatógrafo obtenha a melhor resolução usando materiais com diâmetros de poro na faixa de 100 a 300 Å. Uma regra geral é que os peptídeos hidrofílicos com um peso molecular inferior a 2.000 daltons podem ser analisados usando um meio com menor volume de poro, como o meio Hypersil GOLD. Acima desse peso molecular, o acesso a poros pequenos é restrito e separações tendem a ser ineficientes. Para peptídeos hidrofóbicos com peso molecular superior a 2.000, um meio de 300 Å, como o BioBasic da Thermo Scientific, é recomendada. Para a separação de peptídeos pequenos ou hidrofílicos, um material de 100 Å como o HyperPrep HS pode fornecer uma resolução melhor.



Definições e equações de HPLC

Contrapressão

A pressão necessária para bombear a fase móvel através da coluna. Ela é relacionada com a viscosidade da fase móvel (η), taxa de fluxo (F), comprimento (L) e diâmetro (d_p) da coluna e tamanho de partícula (d_c) pela seguinte equação:

$$\text{Queda da Pressão (psi)} = \frac{250 L \eta F}{d_p^2 d_c^2}$$

L = comprimento da coluna (cm)
 η = viscosidade
 F = taxa de fluxo (mL/min)
 d_p = diâmetro da partícula (μm)
 d_c = diâmetro interno da coluna (cm)

Fator de capacidade (k)

Expressão que mede o grau de retenção de um analito em relação a um pico não retido, onde t_R é o tempo de retenção para o pico da amostra e t_0 é o tempo de retenção para um pico não retido. Uma medição da capacidade ajudará a determinar se as mudanças de retenção são devidas à coluna (o fator de capacidade está mudando com as mudanças do tempo de retenção) ou ao sistema (o fator de capacidade permanece constante com as mudanças do tempo de retenção).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Eficiência (N)

Também é o número de placas teóricas. Uma medida da dispersão da banda de pico determinada por vários métodos, alguns dos quais são sensíveis à assimetria de pico. As mais comuns são mostradas aqui, com as mais sensíveis ao formato do pico mostradas primeiro:

5-Sigma $N = 25(t_R/W)^2$
 $W = \text{largura do pico } 4.4\%$
 altura do pico

4-Sigma $N = 16(t_R/W)^2$
ou $W = \text{largura tangencial do pico}$
ou

Tangencial 13.4% altura do pico

Meia-altura $N = 5,54(t_R/W)^2$
 $W = \text{largura do pico } 50\%$
 altura do pico

Volume de Eluição (V_R)

Refere-se ao volume de fase móvel necessário para eluir um soluto da coluna em concentração máxima (ápice).

$$V_R = F \cdot t_R$$

onde F é a taxa de fluxo em volume/tempo e t_R é o tempo de retenção do pico de interesse.

HETP

Altura equivalente à placa teórica. Uma aplicação da teoria da destilação: uma medida da eficiência de uma coluna. Para uma típica coluna de HPLC bem embalada com partículas de $5 \mu\text{m}$, os valores de HETP (ou H) estão geralmente entre 0,01 e 0,03 mm.

$$\text{HETP} = L/N$$

onde L é o comprimento da coluna em milímetros e N é o número de placas teóricas.

Velocidade Linear

A taxa de fluxo normalizada pela seção transversal da coluna. Isso afeta o desempenho da coluna e está diretamente relacionada à pressão da coluna. A velocidade linear é dada pela seguinte equação, onde L é o comprimento da coluna e t_0 é o tempo de ruptura de um pico não retido:

$$u = \frac{L}{t_0}$$

Resolução (R_s)

A habilidade de uma coluna de separar picos cromatográficos. A resolução pode ser aprimorada ao aumentar o comprimento da coluna, reduzir o tamanho da partícula, mudando a temperatura, mudando o eluente ou a fase estacionária.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{k}{1+k} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right)$$

Ela também pode ser expressa em termos da separação do ápice de dois picos dividido pela largura tangencial média dos picos:

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{0,5(W_1 + W_2)}$$

Seletividade (α)

Um fator termodinâmico que é uma medida da retenção relativa de duas substâncias, fixada por uma determinada fase estacionária e composição da fase móvel. Onde k_1 e k_2 são os fatores de capacidade respectivos.

$$a = \frac{k_2}{k_1}$$

Fator de distorção (T)

Uma medida da simetria de um pico, dada pela seguinte equação onde $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância da frente do pico ao ponto do ápice a 5% da altura. Idealmente, os picos devem ter forma gaussiana ou totalmente simétricos.

$$T = W_{0,05}/2f$$

Equação de Van Deemter

Uma equação usada para explicar o alargamento de banda na cromatografia. A equação representa a altura equivalente de uma placa teórica (H) e possui três termos. O termo A é usado para descrever a difusão turbulenta, que permite os diferentes caminhos que um soluto pode seguir ao passar sobre partículas de tamanhos diferentes.

O termo B é para a contribuição causada pela difusão molecular ou difusão longitudinal do soluto ao passar pela coluna. O termo C é a contribuição da transferência de massa e permite a taxa finita de transferência do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. u é a velocidade linear da fase móvel ao passar pela coluna.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Selecionando o tampão certo

Uma lista parcial de tampões comuns e seus valores correspondentes de pH é mostrada na tabela de sistemas de tampões comuns. Talvez o tampão mais comum de HPLC seja alguma forma de ácido fosfórico. Lembre-se de que um verdadeiro tampão deve ter a capacidade de resistir à mudança de pH quando uma amostra é introduzida em um pH diferente, e que a capacidade do tampão é de 100% apenas no valor de pK do ácido ou da base. Em pH 4, o fosfato é um tampão fraco e mudaria rapidamente para um de seus valores de pK_a se uma amostra mais ácida ou básica fosse introduzida.

Como regra, deve-se trabalhar dentro de ± 1 unidade de pH do valor de pK_a do tampão para um bom controle de pH da fase móvel. As concentrações de tampão adequadas para HPLC tendem a estar no nível de 10 a 100 milimolar, dependendo do tamanho e da natureza da amostra, bem como do material de empacotamento da coluna. Fases baseadas em sílica altamente pura com ligações robustas como na faixa da Hypersil GOLD, são frequentemente mais compatíveis com tampões diluídos do que empacotamentos tradicionais.

Quando o controle em um pH mais baixo (2 a 3) é desejado, fosfato ou ácidos orgânicos mais fortes, como TFA ou ácido acético, são comumente usados. Se o controle em pH 4 a 5 for desejado, um tampão de ácido orgânico, como acetato ou citrato, deve ser considerado no lugar do fosfato.

A figura à direita mostra a importância de escolher o pH correto para uma separação. Mesmo pequenas mudanças no pH, sejam de erros de medição, complicações de mistura com a bomba ou adsorção de água atmosférica na fase móvel, podem alterar qualquer método se ele não for adequadamente tamponado.

Deve-se ter cuidado ao escolher uma mistura de tampão e modificador orgânico para garantir que uma solução dos dois não produza um sal sólido que possa causar bloqueios e contaminação do sistema.

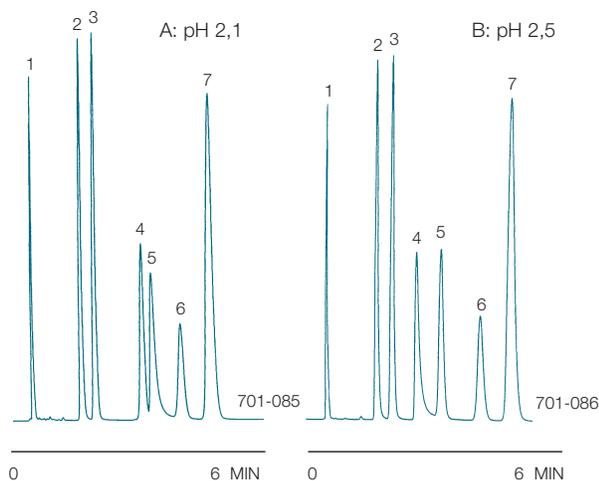
Os tampões devem sempre ser lavados da coluna analítica e do instrumento após o uso para evitar que os sais sejam depositados em frits delicados etc.

Seleção de tampão para LC-MS

A escolha do tampão é muito dependente do analito e dos instrumentos usados. De preferência, aplicações LC-MS devem usar um tampão volátil para não formar um depósito de contaminante na fonte. Ácidos inorgânicos, tampões não voláteis e reagentes com pares de íons devem ser evitados. Tampões típicos para LC/MS incluem:

Sistemas de tampões comuns

Tampão	pK _a	Faixa de pH útil	Compatível com MS	
TFA	0,30		Sim	
Fosfato	pK ₁	2,1	1,1 – 3,1	Não
	pK ₂	7,2	6,2 – 8,2	Não
	pK ₃	12,3	11,3 – 13,3	Não
Citrato	pK ₁	3,1	2,1 – 4,1	Não
	pK ₂	4,7	3,7 – 5,7	Não
	pK ₃	5,4	4,4 – 6,4	Não
Formato	3,8	2,8 – 4,8	Sim	
Acetato	4,8	3,8 – 5,8	Sim	
Tris Base (Trizma, THAM)	8,3	7,3 – 9,3	Sim	
Amônia	9,2	8,2 – 10,2	Sim	
Borato	9,2	8,2 – 10,2	Não	
Dietilamina	10,5	9,5 – 11,5	Sim	
Carbonato	pK ₁	6,4	5,4 – 7,4	Sim
	pK ₂	10,3	9,3 – 11,3	Sim
Trietanolamina	7,80		Sim	



BETASIL C18, 5 µm, 50 x 4,6 mm

Número da Peça: 70105-054630

Eluente: 50% ACN / 50% 25 mm KH₂PO₄ no pH indicado

Taxa de Fluxo: 0,8mL/min

Detector: UV @ 220nm

Amostra: 1. Uracila
2. Tolmetina
3. Naproxeno
4. Fenoprofeno
5. Diflunisal
6. Indometacina
7. Ibuprofeno

Efeitos de pequenas mudanças no pH na separação de compostos levemente ionizáveis

- acetato de amônio/formato/carbonato de hidrogênio (< 50 mm)
- ácido fórmico/acético (0,01 – 1% v/v)
- ácido trifluoroacético (< 0,1% v/v)
- trietilamina (< 0,1% v/v) e bases aquosas do tipo amônia
- TRIS
- BIS-TRIS propano

Observação: existem instrumentos LC-MS disponíveis, por exemplo o Surveyor MSQ LC-MS da Thermo Scientific, que incorpora um mecanismo de autolimpeza para reduzir o acúmulo de tampões inorgânicos na fonte durante o uso de rotina. Deve-se ter cuidado para não contaminar intencionalmente a fonte do instrumento, porque isso levará a dificuldades de operação.

Preparação de fases móveis

A preparação correta de solvente é muito importante. Ela pode economizar muito tempo gasto resolvendo problemas de picos falsos, ruído da linha de base etc.

Qualidade

Todos os reagentes e solventes devem ser da maior qualidade. Reagentes em nível de HPLC podem custar um pouco mais que reagentes de níveis menores, mas a diferença na pureza é marcante. Reagentes em nível de HPLC não contêm impurezas para produzir picos falsos em uma linha de base de cromatograma, enquanto reagentes de níveis menores contêm traços de impurezas, o que pode causar picos de linha de base falsos.

Certifique-se de que qualquer água usada na preparação do tampão seja da maior pureza. Água deionizada frequentemente contém níveis mínimos de compostos orgânicos e, portanto, não é recomendada para HPLC. Água ultrapura de HPLC (18 mW de resistividade) é gerada passando água deionizada por uma base de troca iônica. Instrumentos modernos de purificação de água usam esse mecanismo para produzir água na qualidade adequada em grandes volumes. De preferência, água em nível de HPLC pode ser comprada de fornecedores de solventes.

Importante: não armazene a água em nível de HPLC em recipientes de plástico. Aditivos no plástico podem lixiviar a água e contaminá-la. Sempre armazene a água em nível de HPLC em recipientes de vidro.

Tampões

Todos os tampões devem ser preparados no dia em que são necessários. Essa prática garante que o pH do tampão não seja afetado por armazenamento prolongado e que não tenha a presença de crescimento microbiano. Mudanças no pH e no crescimento microbiano afetarão a cromatografia.

Se soluções-tampão forem armazenadas, lembre-se de que elas possuem um tempo de vida finito. Consulte as monografias da farmacopeia ou similares para maiores informações sobre a validade de tampões.

Reagentes de tampões podem conter um agente estabilizador, por exemplo, metabisulfito de sódio. Esses agentes estabilizadores frequentemente afetam o comportamento ótico e cromatográfico de soluções-tampão, então, normalmente compensa comprar reagentes que não possuam estabilizador. Recipientes de reagentes sólidos são facilmente contaminados por usos repetidos. Por essa razão, recomendamos que reagentes sejam comprados em recipientes com baixo peso.

Filtração

De preferência, todos os solventes de HPLC devem ser filtrados em um filtro de 0,45 µm antes do uso. Isso remove qualquer material particulado que possa causar bloqueios. Após a filtração, os solventes devem ser armazenados em um reservatório coberto para prevenir recontaminação por poeira etc.

Filtrar solventes de HPLC beneficiará sua cromatografia e o desgaste do sistema de HPLC. Êmbolos de bomba, selos e válvulas de retenção terão melhor desempenho e suas vidas úteis serão maximizadas.

Desgaseificação

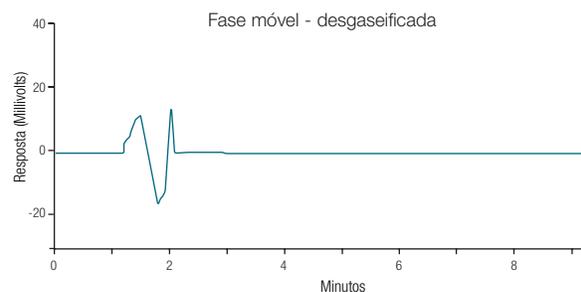
Antes da fase móvel recém-preparada ser bombeada no sistema do HPLC, ela deve ser desgaseificada completamente para remover todos os gases dissolvidos. Gases dissolvidos podem ser removidos da solução por:

- borbulhar com hélio
- sonicação
- filtração a vácuo

Se a fase móvel não for desgaseificada, bolhas de ar podem aparecer na pressão baixa da célula detetora, resultando em problemas na instabilidade do sistema, picos de linha de base falsos etc.

A forma mais eficiente de desgaseificação é borbulhando com hélio ou outro gás de baixa solubilidade. Se o método estiver disponível, recomendamos que a fase móvel seja continuamente desgaseificada em níveis baixos durante a análise. Isso inibirá a readsorção de gases durante a análise.

Observação: Certifique-se de que o reservatório do solvente possua uma saída de ar para a atmosfera para prevenir o aumento da pressão dentro do reservatório.



Ruído de linha de base do gás na fase móvel

Propriedades de solvente (contra sílica gel) e miscibilidade

Propriedades e Miscibilidade do Solvente

Força do Solvente	Índice de polaridade	Corte de UV (nm)	Índice refrativo	Viscosidade (cP, 20°C)	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (W/W%)	Solvente
0,01	0,1	215	1,391	0,50	99	0,0002	Iso-octeno
0,04	0,0	200	1,410	0,92	174	0,01	n-Decano
0,05	0,1	200	1,407	0,44	49	0,01	Ciclopenteno
0,1	1,0	220	1,402	0,45	78	0,11	1-Clorobuteno
0,21	2,1	220	1,397	0,64	142	0,19	Éter n-Butil
0,28	2,4	220	1,368	0,37	68	0,62	Éter isopropílico
0,42	3,1	233	1,424	0,44	40	1,6	Cloroeto de Metileno
0,43	4,2	334	1,396	0,51	117	-	Metil-Butil-Cetona
0,47	4,7	320	1,451	2,00	156	-	Ciclohexanona
0,55	5,5	210	1,402	1,72	125	Miscível	Metoxietanol
0,6	4,5	260	1,362	0,37	57	-	Acetato de Metila
0,64	6,0	380	1,344	0,67	101	2,1	Nitrometano
0,65	6,5	268	1,438	0,84	166	Miscível	N,N-Dimetilacetamida
0,69	6,0	265	1,447	1,65	182	-	N-Metilformamida
1,11	6,9	210	1,432	19,9	198	Miscível	Etilenoglicol
2	6,0	260	1,372	1,26	118	Miscível	Ácido Acético
0,56	5,1	330	1,359	0,36	56	Miscível	Acetona
0,65	5,8	190	1,344	0,38	82	Miscível	Acetonitrila
-	2,7	238	1,501	0,65	80	0,18	Benzeno
0,39	3,9	215	1,399	2,98	117	7,8	n-Butanol
-	4,0	254	1,394	0,73	126	0,43	Etanoato de Butila
-	1,6	263	1,460	0,97	77	0,08	Tetracloroeto de Carbono
0,4	4,1	245	1,446	0,57	61	0,815	Cloroformio
0,04	0,2	200	1,427	1,00	81	0,01	Ciclohexeno
-	3,5	228	1,445	0,79	83	0,81	1,2-Dicloroetano
-	3,1	233	1,424	0,44	40	1,3	Diclorometano
0,64	6,4	268	1,431	0,92	153	Miscível	N,N'-Dimetilformamida
0,62	7,2	268	1,478	2,24	189	Miscível	Dimetilsulfóxido
0,56	4,8	215	1,422	1,37	101	Miscível	Dioxano
0,88	4,3	210	1,361	1,20	79	Miscível	Etanol
0,58	4,4	256	1,372	0,45	77	8,7	Acetato de Etila
-	2,8	218	1,352	0,23	35	6,89	Éter Dietílico
0,01	0,1	200	1,388	0,40	98	0,0004	n-Heptano
0,01	0,1	200	1,375	0,31	69	0,0012	n-Hexano
0,95	5,1	205	1,329	0,55	65	Miscível	Metanol
0,35	2,5	210	1,369	0,27	55	4,8	Éter Metil-t-Butil
0,51	4,7	329	1,379	0,43	80	24	Metil-Etil-Cetona
-	0,0	190	1,358	0,23	36	0,004	Pentano
0,82	4,0	210	1,385	2,30	97	Miscível	n-Propanol
0,82	3,9	205	1,378	2,40	82	Miscível	Isopropanol
-	2,2	220	1,368	0,37	68	-	Éter Di-isopropílico
0,45	4,0	212	1,407	0,55	111	Miscível	Tetraidrofurano
0,29	2,4	284	1,496	0,59	111	0,05	Tolueno
-	1,0	273	1,477	0,57	87	0,11	Tricloroetileno
2	10,2	190	1,000	1,00	100	-	Água
0,26	2,5	288	1,506	0,81	144	0,018	o-Xileno

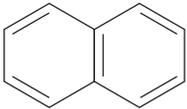
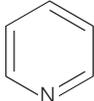
Dados provenientes de: CRC Handbook of Chemistry and Physics - 73ª Edição
 The Merck Index - 12ª Edição
 High Purity Solvent Guide, Burdick & Jackson Laboratories, Inc.
 The HPLC Solvent Guide, 2ª Edição, Paul C Sašek
 HPLC Columns, Theory, Technology & Practice, Uwe D Neue
 Fisher Solvent Table

Imiscível
 Os quadros sombreados como "imiscíveis" referem-se a misturas de solventes onde, em algumas proporções, duas fases serão produzidas

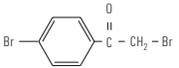
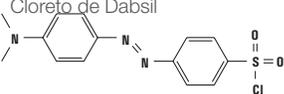
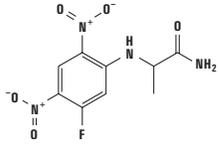
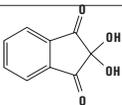
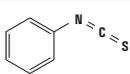
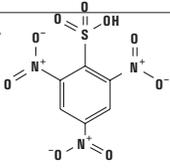
Xileno
Água
Tricloroetileno
Tolueno
Tetraidrofurano
Éter Di-isopropílico
Isopropanol
n-Propanol
Pentano
Metil-Etil-Cetona
Éter Metil-t-Butil
Metanol
Hexano
Heptano
Éter Dietílico
Acetato de Etila
Etanol
Dioxano
Dimetilsulfóxido
Dimetilformamida
Diclorometano
1,2-Dicloroetano
Ciclohexano
Cloroformio
Tetracloroeto de Carbono
Etanoato de Butila
n-Butanol
Benzeno
Acetonitrila
Acetona
Ácido Acético

Comprimentos de onda de detecção de cromóforo

Cromóforos são grupos que absorvem luz. Seus comportamentos são usados para a detecção de analitos. Eles possuem um ou mais comprimentos de onda para detecção, cada um com uma adsorvidade associada. A informação contida na tabela seguinte é destinada como um guia para cromóforos comuns. Não é uma lista extensa.

Cromóforo		λ_{max} (nm)	ϵ_{max} (L/m/cm)	
Acetilida	-C≡C-	175 – 180	6000	
Aldeído	-CHO	210	Forte	
		280 – 300	11 – 18	
Amina	-NH ₂	195	2800	
Azidin	> C=N-	190	5000	
Azo	-N=N-	285 – 400	3 – 25	
Benzeno		184	46700	
		202	6900	
		255	170	
Carboxila	-COOH	200 – 210	50 – 70	
Éster	-COOR	205	50	
Éter	-O-	185	1000	
Etileno	-C=C-	190	8000	
Cetona	> C=O	195	1000	
		270 – 285	18 – 30	
Naftalina		220	112000	
		275	175	
		312	5600	
Nitrato	-ONO ₂	270	12	
		-(C=C) ₂ acíclico	210 – 230	21000
		-(C=C) ₃	260	35000
		C=C-C=C	219	6500
		C=C-C=N	220	23000
		C=C-C=O	210 – 250	10.000 – 20.000
		C=C-NO ₂	300 – 350	Fraco
Nitrila	-C≡N	160	-	
		-ONO	220 – 230	1.000 a 2.000
			300 – 400	10
Nitro	-NO ₂	210	Forte	
Nitroso	-N=O	302	100	
Oxima	-NOH	190	5000	
Piridina		174	80000	
		195	6000	
		251	1700	
Sulfona	-SO ₂ -	180	Muito forte	
Sulfóxido	> S-O	210	1500	
Tioéter	-S-	194	4600	
		215	1600	
Tiol	-SH	195	1400	

Reagentes de derivatização para HPLC

Grupo funcional	Descrição	Deteção*	Comentários
Ácido carboxílico 	p-Bromofenacilato 	UV	Formulação de 1,0 mmol/ml de brometo de p-bromofenacil e 0,005 mmol/ml éter coroa em acetonitrila; pré-coluna; níveis de deteção de nanomols: $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}^{1-7}$
Amina primária 	Cloreto de Dabsil 	Vis	4-N, N-dimetilaminoazobenzeno-4'-cloreto de sulfonila (cloreto de dabsil); pré-coluna; níveis de deteção de nanomols: $\lambda_{\text{max}} = 436 \text{ nm}^{8-14}$
	FDAA, Reagente de Marfey 	UV	1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-amido de alanina (FDAA); pré-coluna; níveis de deteção de nanomols: $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$. Para separações quirais de aminoácidos. ^{15, 28-29}
	Ninidrina 	Vis	Pós-coluna; níveis de deteção de nanomols: $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}^{22}$
	PITC 	UV	Fenilisotiocianato (PITC); pré-coluna; níveis de deteção de picomols: $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}^{23-24}$
	TNBSA 	EC, UV	2,4,6-Trinitrobenzeno-ácido sulfônico (TNBSA); pré ou pós-coluna; níveis de deteção de nanomols com EC e UV, GC - 0,85 V; $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}^{25-26}$
Amina secundária 	Ninidrina (Ver estrutura acima)	Vis	Pós-coluna; níveis de deteção de nanomols: $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}^{22}$
	PITC (Ver estrutura acima)	UV	Fenilisotiocianato (PITC); pré-coluna; níveis de deteção de picomols: $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}^{23-24}$

*EC = eletroquímico; F = fluorescência; UV = ultravioleta; Vis = visível.

Referências

- Durst, H.D., et al. (1975). Anal. Chem. 47, 1797.
- Borch, R.F., et al. (1975). Anal. Chem. 47, 2437.
- Grushka, E., et al. (1975). J. Chromatogr. 112, 673.
- Fitzpatrick, F.A. (1976). Anal. Chem. 48, 499.
- Nagels, L., et al. (1980). J. Chromatogr. 190, 411.
- Ahmed, M.S., et al. (1980). J. Chromatogr. 192, 387.
- Pierce Technical Bulletin: Preparation of Phenacyl and p-Bromophenacyl Derivatives for HPLC.
- Stocchi, V., et al. (1985). J. Chromatogr. 349, 77-82.
- Chang, J.Y., et al. (1981). Biochem. J. 199, 547-555.
- Chang, J.Y., et al. (1982). Biochem. J. 203, 803-806.
- Vendrell, J., et al. (1986). J. Chromatogr. 358, 401-413.
- Chang, J.Y., et al. (1984). J. Chromatogr. 295, 193-200.
- Lin J.K., et al. (1980). Anal. Chem. 52, 630-635.
- Chang, J.Y., et al. (1981). FEBS Letters 132, 117-120.
- Marfey, P. (1984). Carlsberg Res. Co mm. 49, 591-596.
- Jones, B.N. and Gilligan, J.P. (1983). Amer. Biotech. Lab. 12, 46-51.
- Fiedler, H.P., et al. (1986). J. Chromatogr. 353, 201-206.
- Fried, V.A., et al. (1985). Anal. Biochem. 146, 271-276.
- Jones, B.N., et al. (1983). J. Chromatogr. 266, 471-482.
- Seaver, S.S., et al. (Set./Out. 1984). Biotechniques 254-260.
- Böhlen, P., et al. (1979). Anal. Biochem. 94, 313-321.
- Stein, W.H. and Moore, S. (1949). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bio. 14, 179.
- Heinrickson, R.L. and Meredith, S.C. (1984). Anal. Biochem. 137, 65-74.
- Scholze, H. (1985). J. Chromatogr. 350, 453-460.
- Caudill, W.L., et al. (1982). J. Chromatogr. 227, 331.
- Caudill, W.L., et al. (1982). Bioanalytical System's Current Separations 4(4), 59.
- Andrews, J.L., et al. (1982). Arch. Biochem. Biophys. 214, 386-396.
- Aberhart, D.J., et al. (1985). Anal. Biochem. 151, 88-91.
- Szokan, G., et al. (1988). J. Chromatogr. 444, 115-122.

Desenvolvimentos em análise de aminoácidos

Melhorias na análise de aminoácidos pela cromatografia de troca envolveram o sistema analítico, assim como a instrumentação. Sistemas foram desenvolvidos (variando o pH do tampão ou força iônica) que funcionam para deslocar os aminoácidos em bandas discretas. Os sistemas de tampão são compatíveis com análises de coluna única ou dupla de aminoácidos encontrados em hidrolisados de proteína ou fluidos fisiológicos. Sistemas de tampão são determinados pelo contração usado (sódio ou lítio) e pelo método de alterações de tampão introduzida na resina (mudanças de etapa ou eluição de gradiente).⁹⁻¹⁵ O componente de tamponamento mais usado normalmente, citrato, é adequado para soluções abaixo de pH 7.¹⁶ Tampões são preparados com ácido cítrico ou um sal alcalino.

Infelizmente, para trabalhos com alta sensibilidade, o ácido cítrico é um contribuinte significativo para a contaminação de aminoácidos. Portanto, para obter análises consistentes, é essencial o uso de reagentes de alta pureza na preparação do tampão.

Alternativas à troca iônica estão disponíveis para a separação de aminoácidos. Como a análise de aminoácidos é uma das ferramentas químicas básicas disponíveis para proteína, métodos mais rápidos e sensíveis para separação e quantificação são desejáveis.¹⁷ Diversos métodos de derivatização usando HPLC de fase reversa foram desenvolvidos.

Dois dos métodos mais amplamente utilizados envolve a formação de dansil¹⁸⁻¹⁹ ou o-ftalaldeído (OPA)²⁰⁻²⁴ derivados de aminoácidos antes da análise por HPLC. Os dois métodos oferecem uma sensibilidade maior e um tempo de análise menor que técnicas de derivação pós-coluna. Outros métodos incluem a derivatização quantitativa de aminoácidos com fenilisotiocianato (PITC) e a separação e quantificação dos derivados resultantes de feniltiocarbonila por HPLC. Esses derivados são suficientemente estáveis para eliminar a derivatização linear.



Preparo e hidrólise das amostras

A extração e purificação de proteínas desempenham um papel importante na determinação do conteúdo de aminoácidos. Esses métodos são baseados em uma ou mais de suas características físicas (por exemplo, solubilidade, tamanho molecular, carga, polaridade e interações específicas covalentes ou não covalentes).

As técnicas normalmente usadas para separar proteínas e peptídeos incluem:

- HPLC de fase reversa
- eletroforese em gel de poliacrilamida
- filtração de gel
- cromatografia de troca iônica
- cromatografia de afinidade
- a tabela abaixo oferece uma lista mais detalhada dos métodos para fracionar misturas peptídicas.²⁵

Hidrólise

A maioria das amostras de proteínas requer alguma forma de tratamento químico antes que seus aminoácidos estejam adequados para análise. Amostras de proteínas e peptídeos devem ser hidrolisadas para libertar os aminoácidos de suas ligações peptídicas. Ácidos (normalmente HCl) são os agentes mais usados para proteínas hidrolisantes.

Um processo simplificado de hidrólise envolve o refluxo da proteína com HCl em excesso, então removendo o ácido em excesso no vácuo.²⁶ A proteína liofilizada é então suspensa em 6 N HCl em fervura constante e introduzida no tubo de hidrólise. A amostra é congelada pela imersão do tubo em gelo seco e acetona. Antes de selar, o tubo é esvaziado para evitar a formação de ácido cisteico, sulfóxido de metionina e clorotirosina.²⁷

Esse processo minimiza a decomposição de S-carboximetilcisteína reduzida e analisa as proteínas S-carboximetiladas. A hidrólise é conduzida em 110°C (sendo a temperatura controlada com precisão) de 20 a 70 horas pelo método de Moore e Stein.²⁸ Após a hidrólise, HCl residual é removido em um evaporador rotativo. O resíduo é dissolvido em água e levado até o pH apropriado para a adição da coluna analisadora.²⁸

Métodos para fracionamento de misturas peptídicas.

Técnica	Propriedades das moléculas de peptídeos exploradas
Centrifugação	Solubilidade
Cromatografia de exclusão de tamanho	Tamanho
Cromatografia de troca iônica	Carga, com certa influência da polaridade
Eletroforese em papel	Carga e tamanho
Cromatografia em papel	Polaridade
Eletroforese de camada delgada	Carga e tamanho
Cromatografia de camada delgada	Polaridade
Eletroforese em gel de poliacrilamida	Carga e tamanho
Cromatografia líquida de alto desempenho	Polaridade
Cromatografia gasosa	Volatilidade de derivados
Extração contracorrente	Polaridade; algumas vezes de interações específicas
Cromatografia de afinidade	Interações específicas
Cromatografia covalente ou ligação irreversível	Formação de ligação dissulfeto; reatividade de homoserina lactona

Referências

1. Braconnot, H. (1820). *Ann. Chem. Phys.* 13, 113.
2. Mulder, G.J. (1848). *J. Prakt. Chem.* 38, 294.
3. Kjeldahl, J.G.C.T. (1883). *Z. Anal. Chem.* 22, 366.
4. Rattenbury, J.M. (1981). *Amino Acid Analysis*, Eallow Horwood, publisher, Chicester, England, Chapter 1.
5. Martin, A.J.P. and Synge, R.L.M. (1941). *Biochem. J.* 35, 1358.
6. Elsdon, S.R. and Synge, R.L.M. (1944). *Proc. Biochem. Soc.* IX.
7. Synge, R.L.M. (1944). *Biochem. J.* 38, 285.
8. Stein, W.H. and Moore, S. (1949). *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 14, 179.
9. Liao, T.H., et al. (1973). *Anal. Chem.* 45, 2286.
10. Hare, P.E. (1972). *Space Life Sciences* 3, 354.
11. Dus, K., et al. (1966). *Anal. Biochem.* 14, 41.
12. Thomson, A.R. and Miles, B.J. (1964). *Nature* 203, 483.
13. Robinson, G.W. (1975). *J. Chromatogr.* 3, 416.
14. Benson, J.V. (1972). *Anal. Biochem.* 50, 477.
15. Benson, J.V. and Patterson, J.A. (1965). *Anal. Chem.* 37, 1108.
16. Bates, R.G. and Pinching, G.D. (1949). *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 1274.
17. Jones, B.N. and Gilligan, J.P. (1983). *American Biotech. Lab. Dezembro*, 46-51.
18. Weidmeier, V.T., et al. (1982). *J. Chromatogr.* 231, 410-417.
19. DeJong, C., et al. (1982). *J. Chromatogr.* 241, 345-359.
20. Lindroth, P. and Mopper, K. (1979). *Anal. Chem.* 51, 1667-1674.
21. Jones, B.N., et al. (1981). *J. Liq. Chromatogr.* 4, 565-586.
22. Turnell, D.C. and Cooper, J.D.H. (1982). *Clin. Chem.* 28, 527-531.
23. Umagat, H., et al. (1982). *J. Chromatogr.* 241, 324-334.
24. Jones, B.N. and Gilligan, J.P. (1983). *J. Chromatogr.* 266, 471-482.
25. Allen, G. (1981). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, T.S. Work and R.H. Burdon, Eds., Elsevier/North-Holland, Biomedical Press.
26. Moore, S. and Stein, W.H. (1963). *Meth. Enzymol.* 6, 819.
27. Eveleigh, J.W. and Winter, G.D. (1970). *Protein Sequence Determination*, S.B. Needleman, Ed., Springer-Verlag, pp. 92-95.
28. Moore and Stein, op. cit.

Espera resultados reproduzíveis com preparação de amostras, colunas e frascos



Não encontrou o que você precisa? Teremos prazer em discutir seus requisitos específicos. Por favor, entre em contato com seu representante de venda local para pedidos personalizados.

Para mais informações, visite
thermofisher.com/lccolumns