

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE QUÍMICA

ANA BEATRIZ PEREIRA CORTE

**TROUBLESHOOTING EM HPLC, UMA ABORDAGEM SOBRE PROBLEMAS
COMUNS VIVENCIADOS NO LABORATÓRIO**

São Carlos - SP

2021

ANA BEATRIZ PEREIRA CORTE

**TROUBLESHOOTING EM HPLC, UMA ABORDAGEM SOBRE PROBLEMAS
COMUNS VIVENCIADOS NO LABORATÓRIO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Química da Universidade Federal de São
Carlos, para obtenção do grau de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

São Carlos - SP

2021



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 6/2021/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA BEATRIZ PEREIRA CORTE

TROUBLESHOOTING EM HPLC, UMA ABORDAGEM SOBRE PROBLEMAS COMUNS VIVENCIADOS NO LABORATÓRIO

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 26 de junho de 2021

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro
Membro da Banca 1	M.Sc. Welma Beatriz Costa
Membro da Banca 2	Pro. Dr. Bruno Sérgio do Amaral



Documento assinado eletronicamente por **Caio Marcio Paranhos da Silva**, Professor(a), em 29/06/2021, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **0430758** e o código CRC **4F4BE896**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.012569/2021-99

SEI nº 0430758

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Dedico este trabalho aos meus pais Ana Paula e Luiz por todo amor, apoio, incentivo, amizade e incansável esforço para me ver feliz durante toda a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me amparado e me guiado durante todo meu caminho até aqui.

Agradeço imensamente aos meus pais Ana Paula e Luiz por terem, desde o começo, respeitado, apoiado e encorajado minhas escolhas. Por terem estado ao meu lado com tanto amor e carinho, sempre me aconselhando e me incentivando a crescer cada vez mais.

Agradeço a toda minha grande e querida família, aos meus amados bisavós, avós, tios, tias, primos, primas e irmão, que sempre foram tão importantes pra mim.

Agradeço à minha amiga Tuane que é minha irmã de alma e me acompanha independentemente de onde eu esteja.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha formação, em especial à Josi e ao Hassan que estiveram comigo durante a fase dos vestibulares e que tanto me ensinaram e vibraram junto comigo.

Agradeço ao Giovanni que foi meu companheiro durante todo o ano de cursinho, que sempre me apoiou, incentivou e não me deixou abaixar a cabeça quando as coisas não davam certo.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro por ter aceitado me orientar e ter apoiado minhas ideias para o trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Sergio do Amaral e à M.Sc. Welma Beatriz Costa por terem aceitado prontamente participar da banca examinadora.

Agradeço ao Miller Rufino por compartilhar seus conhecimentos e ter estado comigo desde o começo do desenvolvimento do TCC, me ajudando a organizar as ideias e a colocá-las no papel.

Agradeço aos meus melhores amigos Victória e Rafael, que se fizeram presentes em todos os momentos de alegrias e de apuros, sempre me acolhendo e comemorando comigo.

Agradeço aos meus veteranos, Arrocha, Belém, Bruno e Marcelo que sempre estiveram dispostos a me ajudar e ensinar. Agradeço em especial ao Cássio que esteve comigo desde os primeiros dias de aula e segue até os últimos me ajudando, incentivando e, principalmente, apoiando nos momentos de dificuldade no curso.

Agradeço às minhas amigas de curso Ju, Nádia, Yara, Júlia e Patrícia pela grande amizade, momentos de risada, pelas festas e pelos desabafos. Agradeço em especial à Pri pelos momentos de diversão, reflexões sobre a vida e por compartilharmos a vontade de ser pessoas melhores. Agradeço ao meu amigo Antonio por toda ajuda com as disciplinas, todo apoio e toda paciência em me ajudar a estudar durante o curso.

Agradeço com muito carinho a toda equipe do Handebol UFSCar que fez da minha passagem pela faculdade algo muito mais leve e divertido. Agradeço especialmente às “véias” que me proporcionaram tantos momentos felizes, pelos pensamentos “fora da caixa” e visões de mundo e da vida tão importantes. Agradeço ao bondinho (Ari, Jéssica, Manu e Pola) pelas viagens de jogo, pela amizade, companheirismo, bons momentos, risadas e por serem minha família em São Carlos. Agradeço à Turssi por ter estado ao meu lado nos momentos difíceis, ter me ajudado a enfrentar os problemas, ter me proporcionado tantos momentos de risada e descontração, sempre ter acreditado que tudo daria certo e ter me feito acreditar nisso também.

Agradeço a toda equipe da Nature Lab, com quem convivo desde 2018, por todos ensinamentos, experiências e momentos de descontração proporcionados. Agradeço em especial à Bia que me ajuda, me ensina e me incentiva a melhorar todos os dias e à Marília pelas oportunidades.

Por fim agradeço a todos os colegas que fizeram parte da minha trajetória nesses anos.

“Se partires um dia rumo a Ítaca
faz votos de que o caminho seja longo,
repleto de aventuras, repleto de saber.
Nem os Lestrigões nem os Ciclopes
nem o colérico Posídon te intimidem;
eles no teu caminho jamais encontrarás
se altivo for teu pensamento, se sutil
emoção teu corpo e teu espírito tocar.
Nem Lestrigões nem os Ciclopes
nem o bravo Posídon hás de ver,
se tu mesmo não o levars dentro da alma,
se tua alma não os puser diante de ti.
Faz votos de que o caminho seja longo.
Numerosas serão as manhãs de verão nas quais,
com que prazer, com que alegria,
tu hás de entrar pela primeira vez um porto
para correr as lojas dos fenícios
e belas mercancias adquirir:
madrepérolas, corais, âmbar, ébanos,
e perfumes sensuais de toda espécie,
quando houver, de aromas deleitosos.
A muitas cidades do Egito peregrina
para aprender, para aprender dos doutos.
Tem todo o tempo Ítaca na mente.
Estás predestinado a ali chegar.
Mas não apresses a viagem nunca.
Melhor muitos anos levars de jornada
e fundeares na ilha, velho enfim,
rico de quanto ganhaste no caminho,
sem esperar riquezas que Ítaca te desse.
Uma bela viagem deu-te Ítaca.
Sem ela não te ponhas a caminho.
Mais do que isso, não lhe cumpre dar-te.
Ítaca não te iluiu, se a achas pobre.
Tu te tornaste sábio, um homem de experiência,
e agora sabes o que significam Ítacas.”

Konstantinos Kaváfis

(tradução de José Paulo Paes)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tripé base da cromatografia líquida	13
Figura 2: Sistema de HPLC.....	14
Figura 3: Distribuição dos componentes da amostra entre a fase estacionária por ação da fase móvel	14
Figura 4: Informações gerais de um cromatograma.....	15
Figura 5: HPLC	18
Figura 6: "Troubleshooting tree"	19
Figura 7: Esquema de identificação e resolução para problema com assimetria do pico	22
Figura 8: Esquema de identificação e resolução para problema com a área do pico	23
Figura 9: Esquema de identificação e resolução para problema com ausência de pico/fluxo	24
Figura 10: Esquema de identificação e resolução para problema com oscilação da linha de base e ausência do pico de interesse.....	25
Figura 11:Esquema de identificação e resolução para problema de alta pressão na coluna.....	26
Figure 12:Esquema de identificação e resolução para pressão baixa	27
Figura 13: Esquema de identificação e resolução para problema de variação do tempo de retenção	28
Figure 14: Esquema de identificação e resolução para variação do tempo de retenção (maior a cada injeção).....	29
Figura 15: Esquema de identificação e resolução para problema com ruído na linha de base	30
Figura 16: Formatos incorretos de picos e suas possíveis causas	31
Figura 17: Diferentes formas de picos cromatográficos. (A) Pico gaussiano ideal, (B) Pico com cauda, (C) Pico com cauda severa, (D) Pico alargado, (E) Pico com fronting	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Problemas em HPLC e suas possíveis causas	20
---	----

RESUMO

A técnica de cromatografia líquida, por meio de um mecanismo de separação, faz com que análises para detectar e quantificar determinadas substâncias em uma dada amostra possam ser realizadas. Em um processo migratório diferencial, os componentes da amostra interagem de diferentes formas com uma fase móvel e uma fase estacionária até serem detectados. Na cromatografia líquida de alta eficiência, essas análises são feitas pelo equipamento HPLC (High Performance Liquid Chromatography), que tem seu sistema composto basicamente por bomba de solvente, injetor de amostra, coluna e detector. Para identificar e solucionar os problemas corriqueiros apresentados no equipamento foi desenvolvida a técnica de troubleshooting. A “Troubleshooting tree”, uma espécie de guia de resolução de problemas, foi publicada pelos pesquisadores Snyder e Dolan com objetivo de facilitar a identificação de problemas no equipamento. Muitos problemas comuns como oscilação de pressão, variação de tempo de retenção, variação de área, alteração no formato do pico e vazamento no sistema puderam ser mais facilmente identificados e resolvidos seguindo o método proposto pela “Troubleshooting tree”.

Palavras-chave: Cromatografia líquida, HPLC, troubleshooting, “troubleshooting tree”.

ABSTRACT

The technique of liquid chromatography, by means of a separation mechanism, makes it possible to perform analyses to detect and quantify certain substances in a given sample. In a differential migration process, sample components interact in different ways with a mobile phase and a stationary phase until they are detected. In high performance liquid chromatography, these analyses are performed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) equipment, whose system is basically composed of a solvent pump, sample injector, column, and detector. To identify and solve the common problems presented by the equipment, a troubleshooting technique was developed. The "Troubleshooting tree", a kind of troubleshooting guide, was published by researchers Snyder and Dolan with the objective of facilitating the identification of equipment problems. Many common problems such as pressure oscillation, retention time variation, area variation, peak shape change, and system leakage could be more easily identified and solved by following the method proposed by the "Troubleshooting tree".

Key-words: Liquid chromatography. HPLC. Troubleshooting. "Troubleshooting tree".

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Cromatografia Líquida	13
1.2 Componentes básicos do HPLC	15
1.3 Troubleshooting	18
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 MATERIAIS	21
3.2 MÉTODO	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1 Pico assimétrico	22
4.2 Área do pico muito menor do que o esperado	23
4.3 Ausência de pico/fluxo	24
4.4 Linha de base oscilante e ausência do pico de interesse	25
4.5 Pressão alta na coluna, acima ou no limite da pressão limite do equipamento .	26
4.6 Pressão baixa	27
4.7 Sensor do compartimento da coluna sinalizando vazamento	27
4.8 Variação do tempo de retenção (maior a cada injeção)	28
4.9 Ruído na linha de base	29
4.10 Formatos incorretos do pico	31
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A detecção e quantificação de determinadas substâncias em uma dada amostra, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou em diagnósticos toxicológicos, são análises de grande importância e bastante presentes na sociedade há algum tempo. A técnica de cromatografia líquida, por meio de um mecanismo físico-químico de separação, faz com que essas análises possam ser desenvolvidas.

Cromatografia é um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de um processo migratório diferencial desses componentes entre duas fases, sendo uma móvel e a outra estacionária. Esse processo se dá pela passagem da fase móvel ao longo da fase estacionária de forma a distribuir os componentes da mistura entre as duas fases. O grau de interação desses componentes com a fase estacionária determina o quanto eles ficarão retidos nessa fase, resultando em um processo migratório diferencial (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Historicamente, a cromatografia teve origem por volta de 1900 e ficou conhecida em 1906 através da publicação de artigos relacionados aos trabalhos feitos pelo botânico russo Mikhail Semyonovich Tswett. Em um estudo sobre os pigmentos das plantas, Tswett realizou experimentos nos quais utilizou uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel a fim de separar clorofila e carotenoides. Como resultado dessas experiências ele obteve as fases da mistura separadas na coluna em faixas coloridas, o que deu origem ao termo cromatografia, do grego, chrom (cor) e "graphe" (escrever) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Anos mais tarde, na década 1930, a técnica da cromatografia foi aperfeiçoada e rendeu 3 prêmios Nobel. Em 1960 houve o surgimento da cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Em 2000 foi criada a Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês, Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC) (Pacheco; Borguini; Santiago; Nascimento; Godoy, 2015).

Para que a análise de uma amostra por HPLC seja bem sucedida, todos os módulos devem funcionar corretamente e as especificações do método desenvolvido devem ser cumpridas. Existem alguns problemas, de ocorrência considerada comum, que prejudicam o processo da análise nesse equipamento. Oscilação de pressão, variação de tempo de retenção, variação de área, alteração no formato do pico e vazamento no sistema, são exemplos dos problemas mais comuns observados quando se realiza uma análise. É de suma importância saber reconhecer e identificar a origem desses problemas bem como as estratégias para resolvê-los (Dolan; Snyder, 1989).

1.1 Cromatografia Líquida

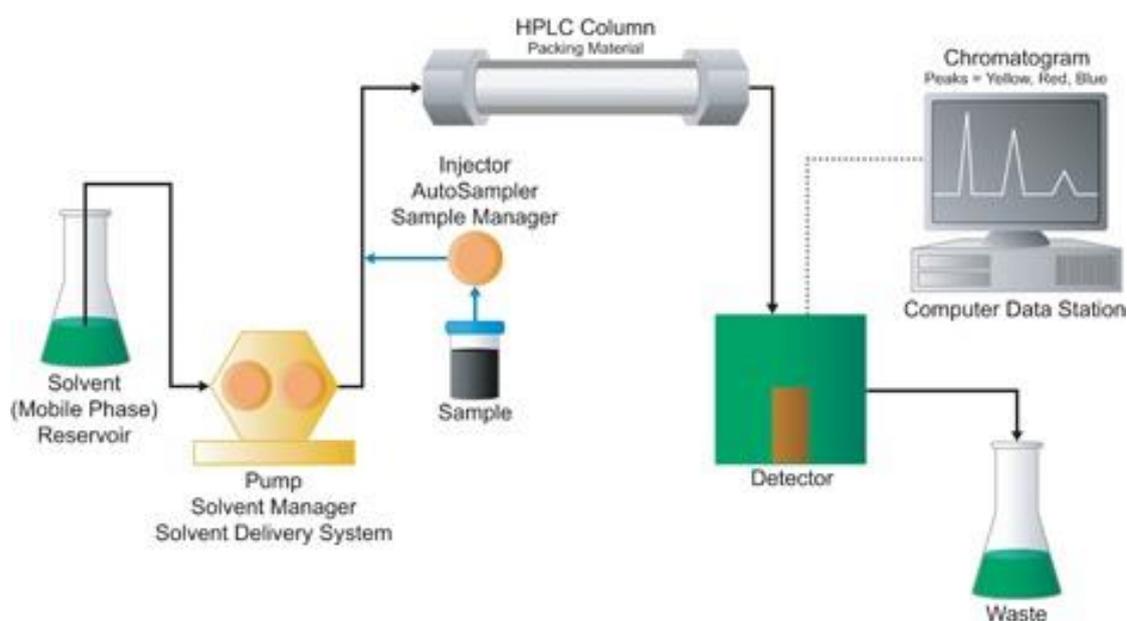
Cromatografia líquida é um processo físico-químico de separação dos componentes de uma mistura no qual a fase móvel está no estado líquido. A fase móvel (líquido) passa ao longo da fase estacionária (sólido) de forma a distribuir os componentes da mistura entre as duas fases em um processo migratório. A base desse processo é a interação entre o soluto, a fase móvel e a fase estacionária, como está representado na Figura 1. O analito de interesse vai ser distribuído entre as duas fases. O grau de interação dos componentes da amostra com cada uma das fases vai definir o grau de separação dos compostos da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 1 - Tripé base da cromatografia líquida



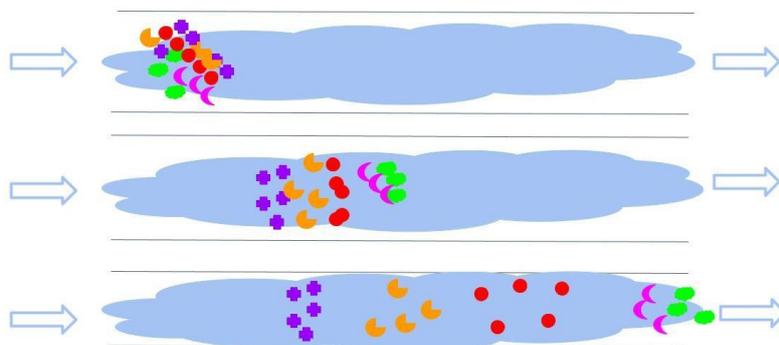
Fonte: Elaborada pela autora

A Figura 2 apresenta a estrutura de um equipamento moderno de cromatografia.

Figura 2 - Sistema de HPLC

Fonte: (WATERS)

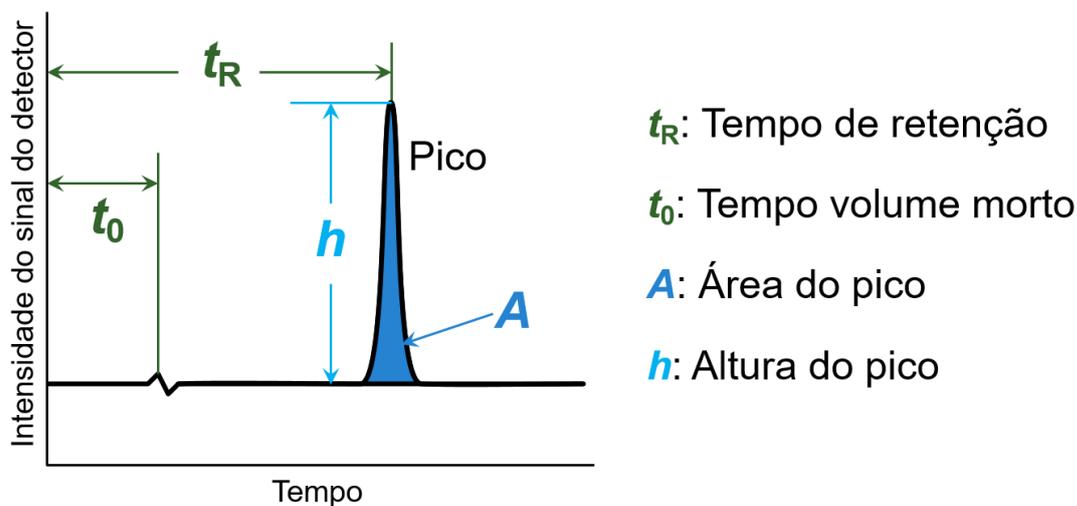
O funcionamento desse sistema se dá da seguinte forma: Por ação do injetor, a amostra de interesse entra no sistema previamente solubilizada, entra no sistema e é impulsionada pela bomba juntamente com solvente (fase móvel) até a coluna (fase estacionária) onde ocorre a separação das moléculas da amostra (Figura 3), fazendo com que elas cheguem em diferentes tempos ao detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 3 - Distribuição dos componentes da amostra entre a fase estacionária por ação da fase móvel

Fonte: Elaborada pela autora

Por fim, o sinal obtido no detector é transformado em um cromatograma pelo software do computador. A Figura 4 apresenta as características de um cromatograma, o qual se apresenta como um gráfico de intensidade de sinal do detector em função do tempo, e fornece informações como tempo de retenção, tempo de volume morto, área do pico e altura do pico. O tempo de retenção se refere ao tempo desde a injeção da amostra até o surgimento do topo do pico no cromatograma. Esse é o tempo que amostra leva até chegar ao detector. Tempo de volume morto é o tempo que o solvente e as substâncias não retidos na fase estacionária levam para chegar ao detector. A altura do pico está relacionada com a intensidade do sinal obtido pelo detector, e a área do pico é a área calculada abaixo de sua curva que é utilizada para quantificação das substâncias na amostra. É considerado um resultado confiável um pico simétrico e de formato gaussiano (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 4 - Informações gerais de um cromatograma



Fonte: Rufino, M.P., HPLC Prático e Definitivo. [online]

1.2 Componentes básicos do HPLC

O solvente se encontra no reservatório de fase móvel que é comumente de vidro. A captação de fase móvel se dá por meio de um filtro, podendo ser de aço inox, que atua de modo a reter partículas que podem obstruir os tubos

conectores ou contaminar a bomba. É importante garantir que antes da fase móvel entrar no sistema, sejam removidos dela possíveis gases que nela possam estar dissolvidos, pois esses gases podem formar bolhas nas tubulações do equipamento comprometendo o funcionamento da análise. A degaseificação da fase móvel pode ser feita, por exemplo, através de um banho de ultrassom e/ou através de um degaseificador, que é um módulo adicionado ao sistema (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

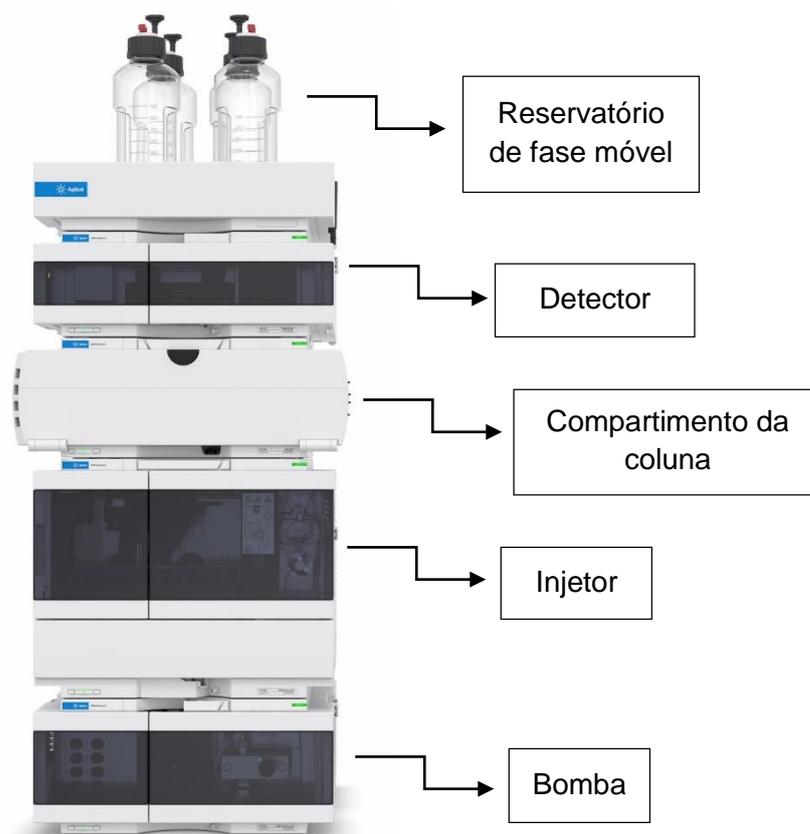
A bomba é responsável por fornecer um fluxo constante de solvente ao sistema fazendo com que a amostra percorra todo o caminho necessário. Ela possui alguns componentes considerados consumíveis que demandam manutenção e/ou troca periódica, como por exemplo a *check valve*, selos do pistão e pistão. O selo do pistão tem a função de vedação entre a parte interna e a parte externa da bomba para que se possa passar uma solução de limpeza do pistão. As *check valve* se encontram no cabeçote da bomba e têm a função de fazer um movimento de abrir e fechar para que se consiga manter um fluxo constante e em uma única direção no sistema. (COUTINHO, 2008). Outros componentes importantes da bomba são o *mixer* e a válvula binária/quaternária. O HPLC contém uma válvula binária ou quaternária responsável pela seleção dos solventes contidos em 2 ou 4 canas para uso. A válvula quaternária seleciona o solvente a ser utilizado e o mixer faz a mistura desses solventes que compõem a fase. Comumente são usados dois canais e cada um deles contém um solvente que compõem a fase móvel, dessa forma a função da válvula quaternária é selecionar os solventes e suas respectivas proporções (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O injetor é responsável pela introdução da amostra no sistema, ele contém uma válvula de injeção que conecta a bomba diretamente na coluna e possui dois modos de ação: o “carregar” e o “injetar”. O modo carregar é quando a amostra é carregada dentro da válvula de injeção e o injetar é quando a fase móvel é empurrada a amostra para dentro da coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A coluna cromatográfica é responsável pela separação dos componentes da amostra. Seu interior, chamado muitas vezes de recheio, é constituído por sílica ou material polimérico. O material que constitui a coluna é poroso e cada tipo de coluna pode variar em comprimento, diâmetro e tamanho dos poros. O recheio da coluna é a fase estacionária com quem a amostra vai interagir. O sistema pode operar em fase normal (fase estacionária polar e fase móvel apolar) ou fase reversa (fase estacionária apolar e fase móvel polar). A polaridade das fases deve ser oposta para que os componentes da amostra possam ter diferentes tipos de interação entre elas e assim serem separados e eluidos até o detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O detector tem como função expressar em forma de sinal elétrico a eluição de compostos em função do tempo. Vários são os tipos de detectores que existem para serem utilizados no HPLC. O detector mais comum é o UV-VIS, que faz uma relação entre a absorção de radiação por parte do analito, em determinado comprimento de onda, com a sua concentração. Esse comprimento de onda está contido dentro das regiões visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O sistema de dados é responsável pela tradução do sinal obtido no detector em cromatograma que, como já tido anteriormente, é um gráfico de intensidade do sinal do detector x tempo. A partir do cromatograma é possível fazer o tratamento dos dados e emitir o resultado da análise. A Figura 5 mostra um equipamento de HPLC comercial e seus respectivos módulos.

Figura 5 - Cromatógrafo líquido comercial

Fonte: (Agilent, adaptado)

1.3 Troubleshooting

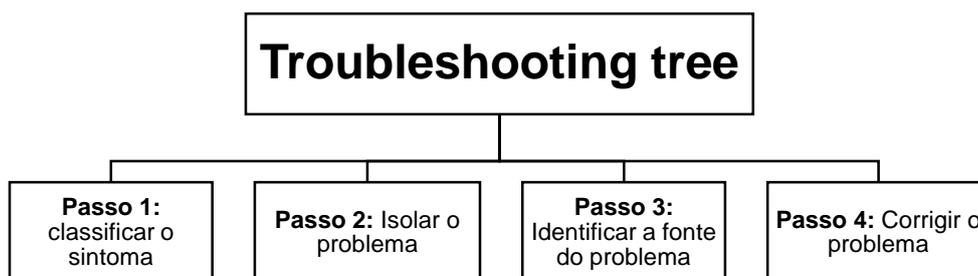
Todo profissional que trabalha com HPLC sabe o quanto é comum se deparar com problemas cotidianos no equipamento. Muitas vezes, devido à rotina acelerada dos laboratórios, não há tempo hábil para esperar a visita de um especialista que possa resolver as falhas apresentadas. Por esse motivo, cada vez mais se faz necessário um bom conhecimento, tanto sobre a teoria cromatográfica como sobre o funcionamento do equipamento, por parte do operador. Dessa forma os problemas cujas as soluções estejam ao alcance do operador podem ser solucionados por ele mesmo.

A técnica de troubleshooting tem como finalidade a identificação e resolução de problemas em HPLC. Os pesquisadores John W. Dolan e Lloyd R. Snyder publicaram um livro em 1989 sobre essa técnica baseando-se nos fundamentos da cromatografia líquida e no funcionamento geral de um HPLC. Esse livro serve como um guia bastante completo até os dias de hoje. Segundo

Dolan e Snyder, deve ser seguida uma lógica para a aplicação dessa técnica: identificar, isolar e corrigir o problema de modo a minimizar o tempo de inatividade do equipamento. Essa lógica está representada na Figura 7. É importante lembrar que antes de começar a tomar qualquer providência é necessário garantir que um problema realmente exista no sistema assegurando que ele ocorra pelo menos duas vezes. Confirmada a existência, o procedimento mencionado anteriormente pode ser feito e para facilitá-lo, o operador pode utilizar do livro do Dolan e do Snyder e dos manuais específicos do seu equipamento.

A Figura 6 representa, através de um fluxograma, a *Troubleshooting tree*, uma árvore guia de troubleshooting.

Figura 6 - "Troubleshooting tree"



Fonte: Elaborada pela autora

Juntamente com a árvore guia, alguns procedimentos podem auxiliar na boa execução da técnica de troubleshooting. Ter o hábito de seguir esses procedimentos facilita a investigação do problema apresentado e conseqüentemente a descoberta de uma solução para ele. O mais simples desses procedimentos é manter um registro das atividades do equipamento. Esses registros devem conter tanto dados de análise como, por exemplo, a pressão expressa no HPLC ao usar um determinado método, como peças que foram trocadas e até mesmo um breve resumo de como um determinado problema anterior foi identificado e resolvido. Por fim, a grande chave para a rápida correção das falhas do sistema é o isolamento lógico dos problemas. Por exemplo: A variação do tempo de retenção do analito e pressão no sistema abaixo do usualmente observado, pode ser facilmente relacionada a um

vazamento no sistema. A Tabela 1 correlaciona algumas situações problemas e suas respectivas causas.

Tabela 1: Problemas em HPLC e suas possíveis causas

(Continua)

	Problema relacionado	Possíveis causas
Pressão	Pressão alta	Fluxo, entupimento, coluna, filtro, sensor de pressão
	Pressão baixa	Fluxo, vazamento, sensor de pressão
	Ausência de pressão	Ausência de fluxo: bomba desligada, motor da bomba, pistão, purga aberta, vazamento em grade escala e ausência de solvente
	Oscilação de pressão	Vazamento, entupimento parcial e bolha
Cromatograma	Encaudamento de pico	pH incorreto da fase móvel, má conexão da coluna, fase móvel incorreta
	Pico com fronting	Saturação da coluna, solvente incompatível com a fase móvel, colapso da fase estacionária (pH incorreto, deterioração da sílica)
	Pico arredondado	Saturação da coluna/detector
	Pico alargado	Fluxo muito baixo, configuração errada do detector, vazamento
	Desvio da linha de base	Impureza do solvente, tempo incorreto de equilíbrio da coluna
	Variação de tempo de retenção	Alteração do fluxo, vazamento
		Entupimento dos filtros da tubulação da garrafa de solvente
Bomba	Selo do pistão	Vazamento no cabeçote ou oscilação de pressão
	Entupimento ou travamento da Check Valve	Oscilação de pressão muito alta
Injetor	Ausência de picos no cromatograma	Agulha entupida, ausência de solvente de limpeza
	Problema relacionado à reprodutibilidade dos resultados	Entupimento da agulha ou do rotor da válvula

Tabela 2: Problemas em HPLC e suas possíveis causas

(Conclusão)

Detector	Ruído na linha de base	Lâmpada do detector no final da vida útil
	Sem sinal	Configuração errada no software, lâmpada do detector

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é facilitar a execução do troubleshooting nos problemas mais corriqueiros durante o uso do HPLC, traçando um raciocínio lógico para identificação e solução das falhas apresentadas no equipamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

- Cromatógrafo marca Shimadzu, composto pelos módulos Bomba quaternária LC-10ATvp, Sistema de controle SCL-10Avp, Auto injetor SIL-10, Detector SPD-10Avp;
- Cromatógrafo marca Agilent, modelo 1260 Infinity composto pelos módulos Quaternary Pump – 1260 QUAT PUMP, Sample Introduction – 1260 ALS, Thermostat – 1290, Detector – 1260 DAD VL;
- Livro “*Troubleshooting LC systems – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separation*”.

3.2 MÉTODO

- O método utilizado foi a *Troubleshooting tree* descrita no livro “*Troubleshooting LC systems – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separation*”.

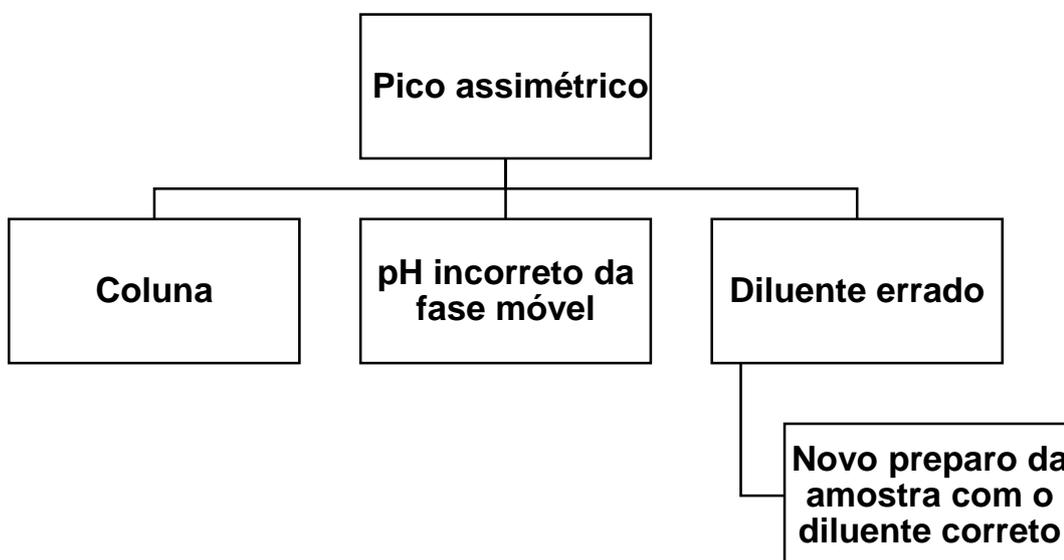
- As situações problemas citadas neste trabalho foram referentes à falhas ocorridas no HPLC enquanto eram realizadas nele análises de rotina de teor de determinados ativos em medicamentos.
- Cada situação problema se refere a uma análise com um método analítico diferente, cada um com uma fase móvel específica, alguns contendo solução tampão, e coluna operando sempre em fase reversa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados deste trabalho estão expressos na forma de fluxogramas, os quais contém um problema apresentado durante a análise por HPLC, algumas possíveis causas e como o problema foi resolvido. As figuras de 7 a 16 apresentam os fluxogramas utilizados.

4.1 Pico assimétrico

Figura 7 - Esquema de identificação e resolução para problema com assimetria do pico



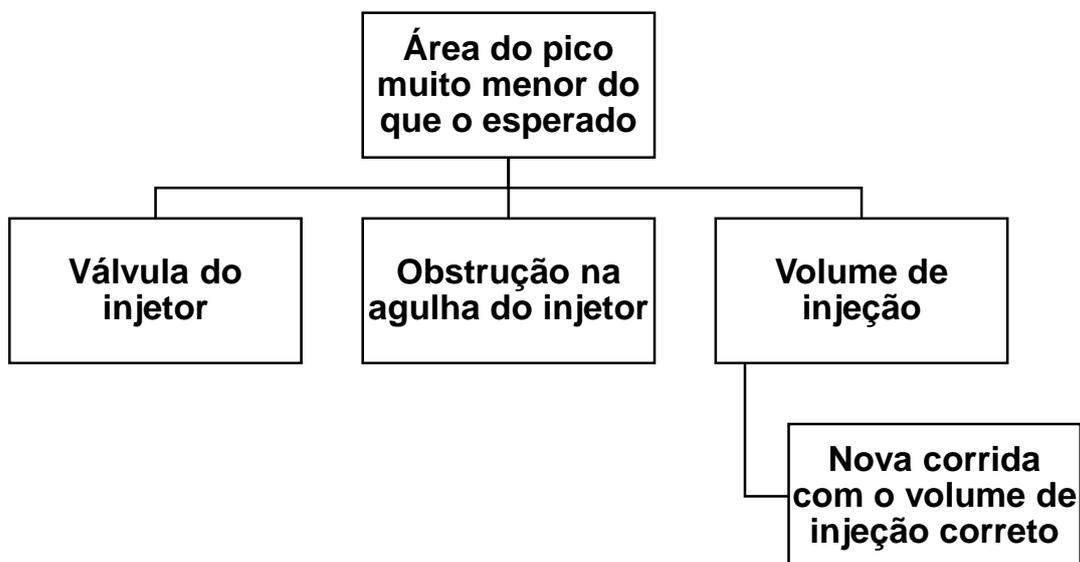
Fonte: Elaborada pela autora

Durante a análise foi observado que o pico estava deformado, apresentando cauda. A primeira atitude tomada foi trocar a coluna e repetir a injeção da amostra. Foram feitas 3 injeções e o problema se manteve. Uma

terceira coluna foi testada, repetindo mais 3 vezes a injeção da amostra e o problema permaneceu. Não havia vazamento aparente no sistema, nem variação do tempo de retenção e a pressão estava estável. Com essas observações foram descartadas as causas de ineficiência da coluna e um possível vazamento. Seguiu-se então para a conferência do método analítico. Ali foi encontrado o erro: o diluente da amostra estava errado. O diluente correto era água:dimetilsulfóxido (1:1) e o que estava sendo usado era dimetilsulfóxido 100%. Foi feito um novo preparo de amostra dessa vez utilizando o diluente correto e uma nova injeção. O pico voltou ao formato correto (simétrico) e o problema foi resolvido. A cauda foi formada no pico porque, ao colocar um diluente com força de eluição inadequada para aquele tipo de amostra, a interação do analito com a coluna mudou.

4.2 Área do pico muito menor do que o esperado

Figura 8 - Esquema de identificação e resolução para problema com a área do pico



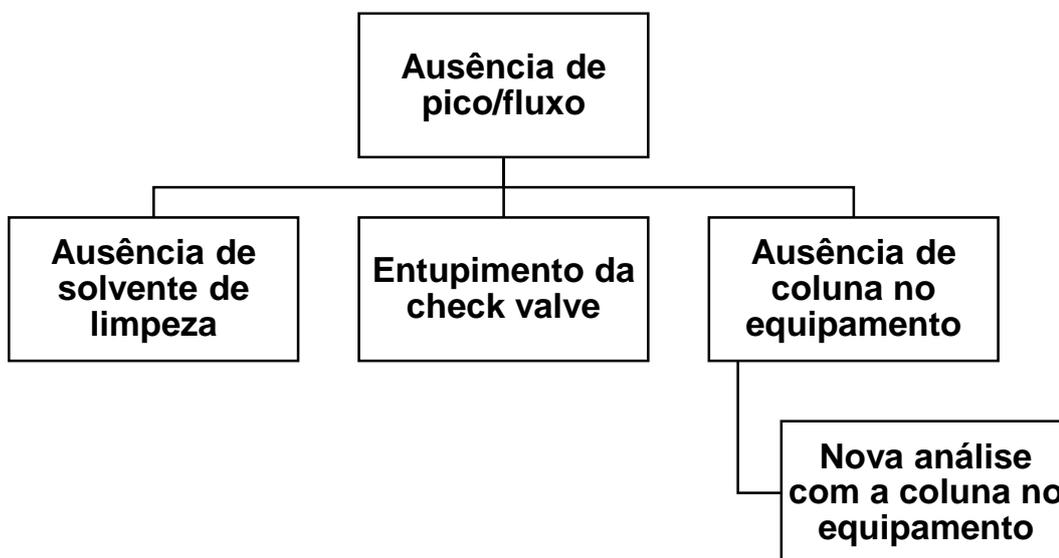
Fonte: Elaborada pela autora

Ao terminar as análises e começar o tratamento dos dados foi observado que a área do pico estava muito menor do que o esperado. Começou-se então a investigação para encontrar a causa do problema. Primeiramente foi checada a válvula do injetor que estava funcionando corretamente. Então essa causa foi descartada. Em seguida, foi cogitada uma possível obstrução da agulha do

injetor, essa causa também foi descartada depois de verificar que não havia obstrução. Por último, foi feita a conferência da configuração da lista de injeção onde foi encontrado o problema. O volume de injeção nas configurações de injeção do *batch* estava errado. O volume correto era 5 μL e o volume que foi colocado no *batch* foi 1 μL . Como o volume injetado era bem menor do que o volume proposto pelo método, a área do pico conseqüentemente seria bem menor do que a área esperada. Um novo batch foi montado, dessa vez com o volume de injeção correto, as injeções foram repetidas e o problema foi solucionado.

4.3 Ausência de pico/fluxo

Figura 9 - Esquema de identificação e resolução para problema com ausência de pico/fluxo



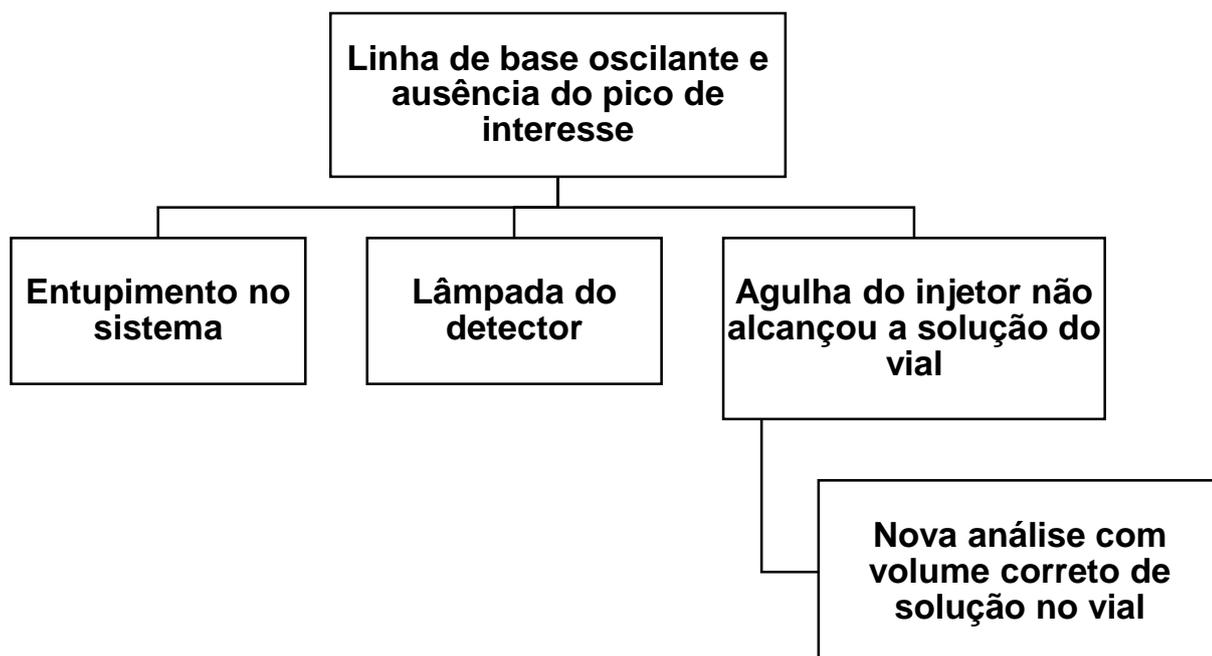
Fonte: Elaborada pela autora

Ao realizar a análise foi observado que nenhum pico foi expresso no cromatograma. Primeiramente foi checado se havia fluxo no sistema, depois se o solvente de limpeza estava devidamente colocado no sistema. Como estava tudo correto nessa parte, essa causa foi descartada. Em seguida foi verificado um possível entupimento da *check valve*. Para isso a tubulação da saída da *check valve* foi desconectada do equipamento. Como o fluxo estava passando normalmente, esse motivo também foi descartado. Partiu-se então para verificação no compartimento da coluna à procura de uma possível falha por lá. Então foi observado que o sistema estava sem coluna. Por falta de atenção do

operador, a coluna foi esquecida e sendo assim, realmente não teria como ser expresso nenhum pico no cromatograma. A coluna foi devidamente colocada e condicionada no equipamento, a análise foi repetida e o problema foi solucionado.

4.4 Linha de base oscilante e ausência do pico de interesse

Figura 10 - Esquema de identificação e resolução para problema com oscilação da linha de base e ausência do pico de interesse

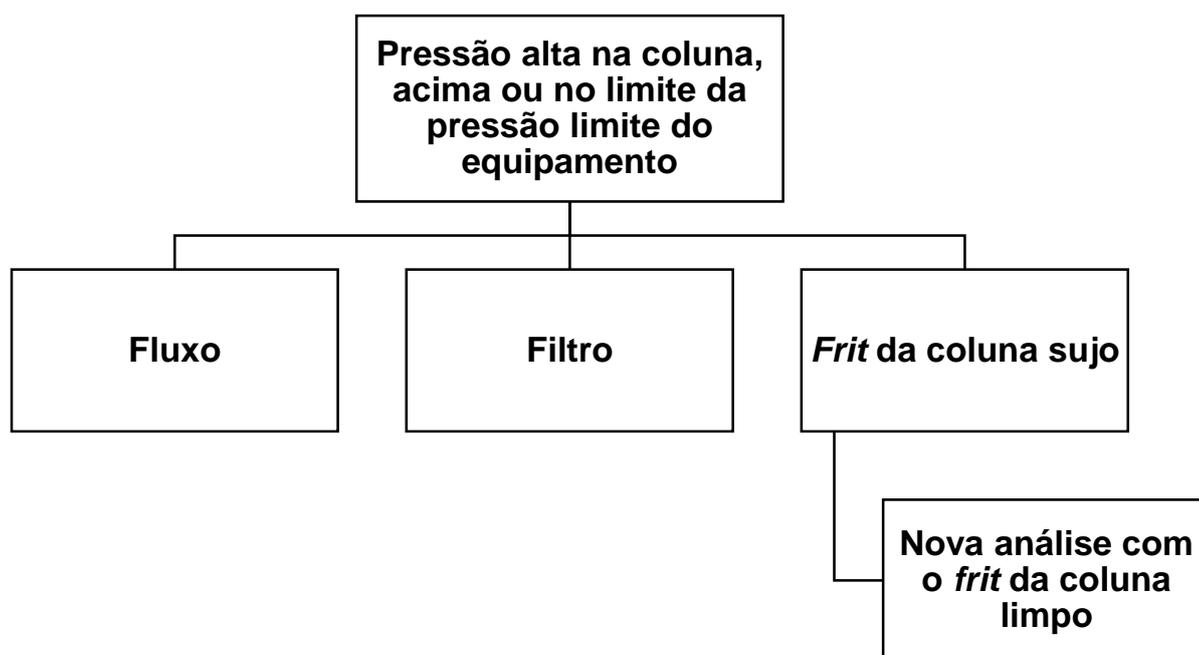


Fonte: Elaborada pela autora

Durante a análise foi observado que a linha de base apresentava oscilações e o pico de interesse não estava expresso no cromatograma. Primeiramente suspeitou-se de um possível entupimento no sistema, mas ao checá-lo foi confirmado que a fase móvel estava fluindo normalmente. A segunda suspeita foi a lâmpada do detector, que caso estivesse próxima ou acima da especificação do limite das horas úteis de funcionamento, poderia causar esse problema. As horas da lâmpada ainda estavam dentro da especificação, então essa causa foi descartada. Por fim foi observado que o volume de solução que havia no vial era inferior ao limite mínimo que a agulha do injetor alcançava. Por esse motivo, estava injetando ar no sistema, o que justifica a oscilação da linha de base e a ausência do pico de interesse. Para solucionar o problema foi colocado um *insert* dentro de um novo vial e a solução foi adicionada nesse *insert*. As injeções foram realizadas novamente e o problema foi resolvido.

4.5 Pressão alta na coluna, acima ou no limite da pressão limite do equipamento

Figura 11 - Esquema de identificação e resolução para problema de alta pressão na coluna



Fonte: elaborada pela autora

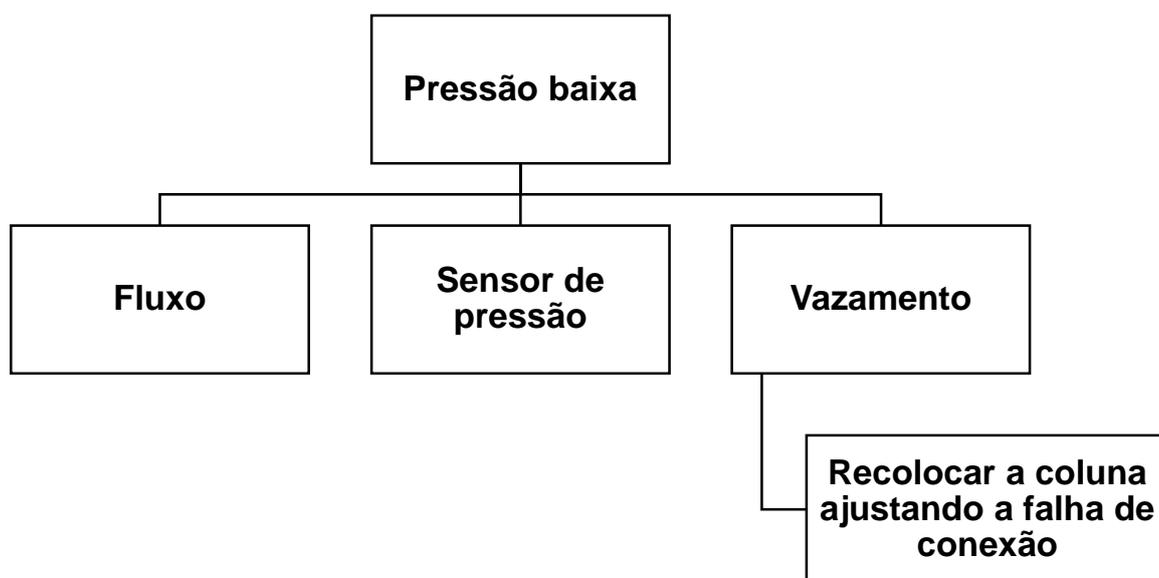
Uma determinada coluna, quando utilizada em um determinado método analítico, resultava em pressões muito altas no sistema, geralmente próximas à pressão limite do equipamento (400 kgf/cm²). Não era possível realizar a análise pois a pressão sempre ultrapassava o limite do sistema. Como investigação do problema foi verificado se o fluxo estava correto (se não estava acima do permitido para a coluna). Como não havia problema com o fluxo, essa causa foi descartada. Em seguida verificou-se os filtros de solvente e a limpeza deles foi devidamente feita. O problema ainda assim persistiu. A causa do problema foi encontrada no *frit* da coluna. Depois da limpeza padrão do *frit* com HNO₃ 10 % e H₂O, ela foi testada novamente no equipamento e foi possível utilizá-la sem maiores problemas no equipamento.

O *frit* da coluna funciona como uma espécie de filtro. No caso dele estar sujo, a função de filtro fica comprometida e os poros da coluna ficam de certa forma obstruídos. Com isso, há um aumento da pressão no sistema dificultando

a análise. Feita a limpeza do *frit*, a função de filtração voltou a ter sua eficiência, a pressão diminuiu e foi possível realizar o trabalho.

4.6 Pressão baixa

Figura 12 - Esquema de identificação e resolução para pressão baixa

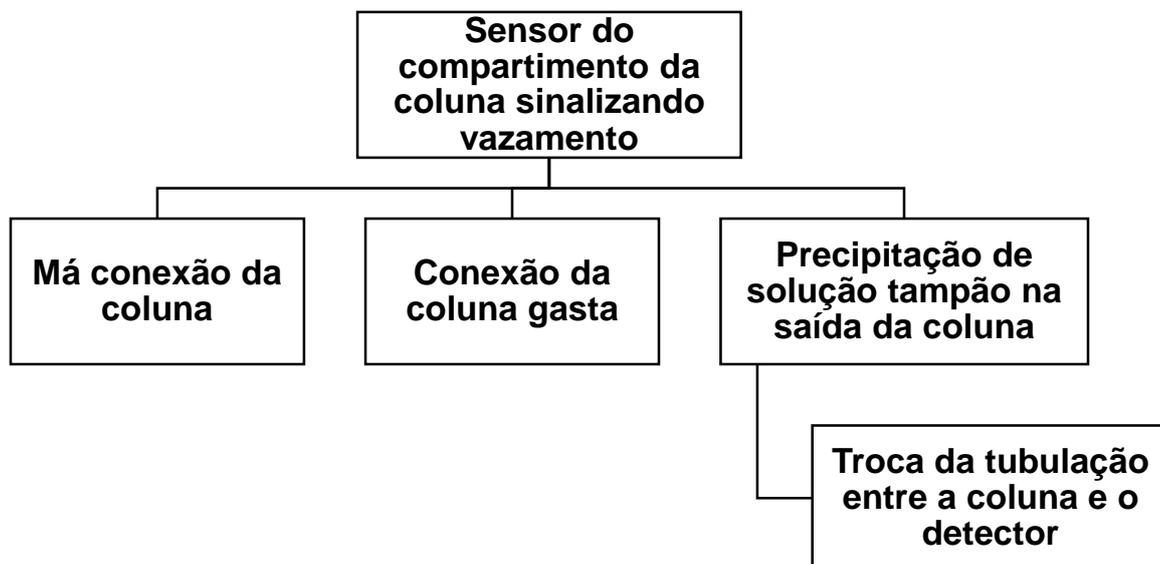


Fonte: Elaborada pela autora

Durante a análise percebeu-se que a pressão do equipamento estava abaixo do esperado para o método e a coluna em uso. A primeira coisa a ser verificada foi se o fluxo estava correto e, como estava, essa causa foi descartada. Suspeitou-se de problema com o sensor de pressão do equipamento, porém essa causa só poderia ser checada com a orientação e/ou manutenção por um técnico de serviços treinado a realizar procedimentos de manutenção no equipamento. Então foi checado o compartimento da coluna onde encontrou-se a falha. Havia um vazamento na entrada da coluna causado por uma má conexão quando esta foi colocada no equipamento. Para resolver o problema, a coluna foi retirada e recolocada em seu lugar, desta vez de maneira correta.

4.7 Sensor do compartimento da coluna sinalizando vazamento

Figura 13 - Esquema de identificação e resolução para problema de variação do tempo de retenção

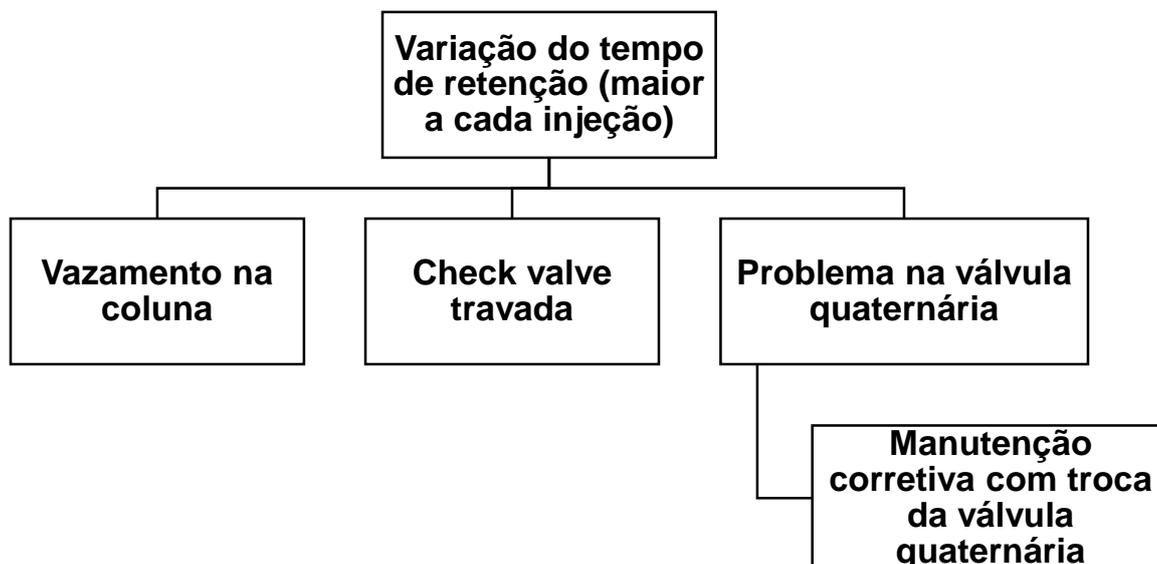


Fonte: Elaborada pela autora

Desde o começo houve dificuldade para a realização da análise pois o sensor do compartimento da coluna sinalizava vazamento. Foi então investigado então esse compartimento e observou-se um vazamento na saída da coluna. A conexão não estava gasta. A coluna foi tirada e colocada novamente de maneira correta. O vazamento persistiu. Suspeitou-se então de um possível entupimento da tubulação entre a coluna e o detector. Essa tubulação foi substituída por uma nova e o problema foi resolvido. Neste caso uma possível explicação é a precipitação de tampão na saída da coluna, o que causou entupimento na tubulação.

4.8 Variação do tempo de retenção (maior a cada injeção)

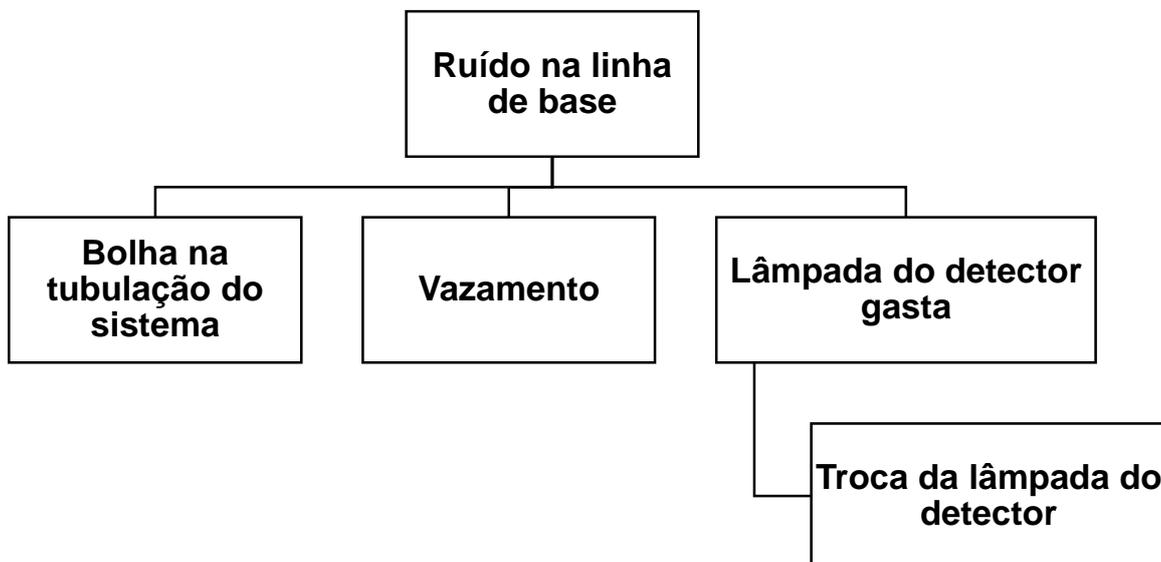
Figura 14 - Esquema de identificação e resolução para variação do tempo de retenção (maior a cada injeção)



Fonte: Elaborada pela autora

Durante a análise foi observado um grande aumento no tempo de retenção do composto (acima do valor referência obtido na validação). A cada injeção o tempo de retenção aumentava. Foi investigado primeiramente um possível vazamento na coluna, mas estava tudo certo. Não havia vazamento. Em seguida foi verificado se havia algum travamento na *check valve* e também não havia problema algum. Para a realização das análises no equipamento estavam sendo usadas as linhas de solvente C e D (num total de 4 linhas possíveis, A, B, C e D). Para esse método em específico utilizou-se as linhas B e D. Tendo em vista este problema, foi trocada a linha B pela linha C, sendo o problema resolvido. Logo essa falha foi relacionada à válvula quaternária (válvula responsável pela seleção dos solventes na hora da análise). Para solucionar esse problema foi necessária uma manutenção corretiva, executada por um técnico de empresa especializada, com troca da válvula quaternária.

4.9 Ruído na linha de base

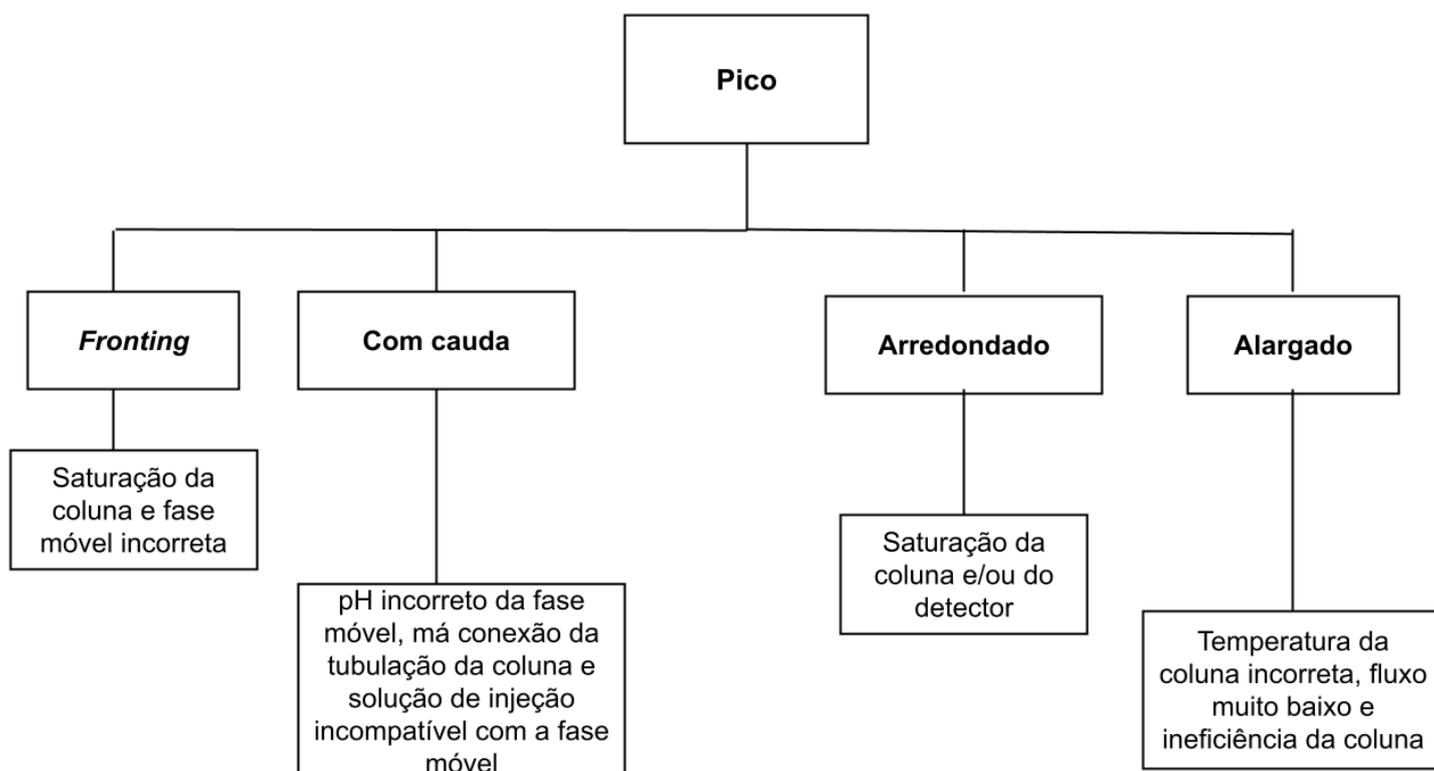
Figura 15 - Esquema de identificação e resolução para problema com ruído na linha de base

Fonte: Elaborada pela autora

Durante a análise foi observado que a linha de base estava irregular. A primeira atitude tomada foi interromper as análises, purgar todas as linhas de solvente e depois repetir a injeção. O problema persistiu. Foi checado então se havia algum vazamento no sistema e nenhum vazamento foi encontrado. Usou-se então o sistema de checagem do próprio software do equipamento que acusou a lâmpada do detector como o problema. As horas de vida útil da lâmpada já tinham chegado ao fim da especificação e por isso a linha de base estava oscilante.

4.10 Formatos incorretos do pico

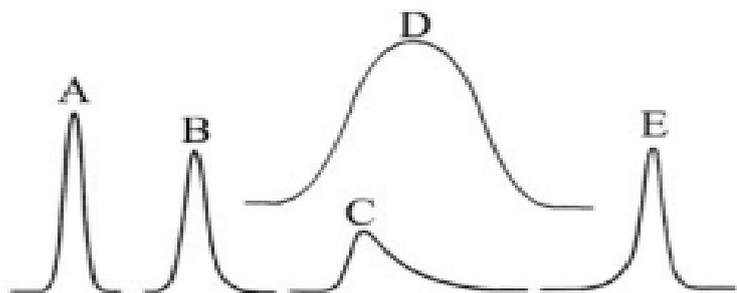
Figura 16 - Formatos incorretos de picos e suas possíveis causas



Fonte: Elaborada pela autora

A grande maioria dos problemas em HPLC, senão todos, resulta em uma deformação no formato do pico. O cromatograma processado expressa o resultado do processo de separação, por isso é compreensível que falhas que ocorram durante o processo interfiram no formato do pico. A Figura 16 ilustra resumidamente diferentes tipos de deformações de pico e algumas das suas possíveis causas. A Figura 17 ilustra o formato ideal de um pico cromatográfico e picos com as deformações citadas acima.

Figura 17 - Diferentes formas de picos cromatográficos. (A) Pico gaussiano ideal, (B) Pico com cauda, (C) Pico com cauda severa, (D) Pico alargado, (E) Pico com fronting



Fonte: Neto, 2019 adaptado

5 CONCLUSÃO

Utilizando o método *Troubleshooting tree* foi possível traçar um raciocínio lógico e facilitar a identificação e resolução dos problemas no uso cotidiano do HPLC. Foi possível também perceber que muitos dos problemas que ocorrem nesse equipamento possuem mais de uma causa e que uma falha no sistema pode gerar outras em sequência. A solução de problemas seguindo os passos da *troubleshooting tree* pode ser feita de uma forma mais rápida e assertiva colaborando para volta do funcionamento adequado de um sistema HPLC.

REFERÊNCIAS

Coluna HPLC: como evitar problemas nas suas análises, disponível em: <<https://www.dctech.com.br/coluna-hplc-como-evitar-problemas-nas-suas-analises/>>.

Acesso em 2 junho.2021

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Unicamp ed. Campinas, SP, 2006.

COUTINHO, L.F.M.; Desenvolvimento de Instrumentação Dedicada a Cromatografia Líquida Capilar (cLC), São Carlos, 2008.

Cromatografia líquida disponível em: <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/frankimica/Quimica%20Analitica%20Aplicada%20II/CL%20e%20HPLC.pdf>>.

Acesso em: 17 maio. 2021.

Diagnosing Chromatography Problems & Troubleshooting, disponível em: <<https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/knowledge-base/diagnosing-chromatography-problems-troubleshooting.html>>. Acesso em 13 maio.2021

Dolan, J.W. and Snyder, L.R. Troubleshooting LC systems – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separation. Totowa, New Jersey: Humana Press. (1989) 500p.

Pacheco, S.; Borguini, R. G.; Santiago, M. C. P. A.; Nascimento, L. S. M.; Godoy, R. L. O. História da Cromatografia Líquida. Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (4), 1225-1271.

How Does High Performance Liquid Chromatography Work?, disponível em: <https://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055>. Acesso em 17 maio.2021

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

HPLC Troubleshooting Guide disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/hplc-troubleshooting-guide>>. Acesso em: 3 maio. 2021.

Kashyap,R. , & Himanshu, P. (2020). Review on Common Observed HPLC Troubleshooting Problems. International Journal of Pharma Research and Health Sciences, 3195-202.

Mcnair, H., & Polite, L. N. (2007). 17 Troubleshooting in high performance liquid chromatography. HPLC Method Development for Pharmaceuticals, 459–477.

Neto, A.J.S. (2009). Problemas com os formatos dos picos em cromatografia líquida. Scientia Chromatographica, 69-77.

Preparative HPLC Systems, disponível em: <<https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography/hplc-systems/preparative-hplc-systems/1260-infinity-ii-analytical-scale-lc-purification-system>>.

Acesso em: 2 junho.2021

Princípios de Cromatografia, disponível em:

<http://professor.ufop.br/sites/default/files/mcoutrim/files/qui346_cromatografia_a_gas_10a_a_12a_aula_2016-1.pdf>.

Acesso em:17 maio.2021