



Picos duplos em HPLC

Várias vezes recebemos contactos relativos solicitando apoio para solucionar a existência de “duplos picos” em HPLC. Resumidamente, passemos aos factos:

As Causas:

As causas geralmente residem no facto do pH da fase móvel situar-se demasiado próximo do pKa dum grupo funcional do(s) composto(s) ou, também, uma concentração de tampão demasiado baixa. É possível - embora menos provável - uma obstrução por partículas presentes na matriz ou volumes mortos dentro da coluna, causados pela dissolução da própria fase estacionária.

As Soluções:

Antes de mais, ajuste o pH da fase móvel para um valor, pelo menos, inferior em 2 unidades ao pKa do do composto mais ácido ou 2 unidades acima do pKa do composto mais básico. Por sua vez, a concentração do tampão deve ser tal que garanta um pH efectivamente constante ao longo de toda a coluna e que “forneça” iões suficientes para neutralizar as moléculas do composto (cerca de 10 vezes a soma da concentração máxima de todos os compostos presentes na amostra será suficiente). É óbvio que uma adequada filtração das amostras e a utilização de pré-colunas previne quaisquer obstruções por partículas presentes na matriz, pelo que recomendamos vivamente o seu extensivo uso. Por último, substituir a coluna - volumes mortos ou “canais” dentro da coluna não são “reparáveis” por nenhum processo de limpeza ou regeneração. No entanto, se tal se repete frequentemente, considere uma revisão do método utilizado, alterando o pH da fase móvel ou o tipo de partícula utilizado.

Bons cromatogramas!