

Fundamentos de
CROMATOGRAFIA



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Reitor

ANTONIO JOSÉ DE ALMEIDA MEIRELLES

Coordenadora Geral da Universidade

MARIA LUIZA MORETTI



Conselho Editorial

Presidente

EDWIGES MARIA MORATO

ALEXANDRE DA SILVA SIMÕES – CARLOS RAUL ETULAIN
CICERO ROMÃO RESENDE DE ARAUJO – DIRCE DJANIRA PACHECO E ZAN
IARA BELELI – IARA LIS SCHIAVINATTO – MARCO AURÉLIO CREMASCO
PEDRO CUNHA DE HOLANDA – SÁVIO MACHADO CAVALCANTE

Carol H. Collins
Gilberto L. Braga
Pierina S. Bonato
(Orgs.)

Fundamentos de
CROMATOGRAFIA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO
SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UNICAMP
DIVISÃO DE TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

F962 Fundamentos de cromatografia / organizadores: Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. – Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

1. Análise cromatográfica. 2. Cromatografia líquida. 3. Cromatografia de gás.
I. Carol Hollingworth Collins. II. Gilberto Leite Braga. III. Pierina Sueli Bonato.
IV. Título.

CDD 544.92

544.924

ISBN 85-268-0704-8

544.926

Índice para catálogo sistemático:

1. Análise cromatográfica	544.92
2. Cromatografia líquida	544.924
3. Cromatografia de gás	544.926

Copyright © by Organizadores
Copyright © 2006 by Editora da Unicamp

7ª reimpressão, 2022

Opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas
neste livro são de responsabilidade dos autores e não
necessariamente refletem a visão da Editora da Unicamp.

Direitos reservados e protegidos pela lei 9.610 de 19.2.1998.
É proibida a reprodução total ou parcial sem autorização,
por escrito, dos detentores dos direitos.

Impresso no Brasil.
Foi feito o depósito legal.

Direitos reservados a

Editora da Unicamp
Rua Sérgio Buarque de Holanda, 421 – 3º andar
Campus Unicamp
CEP 13083-859 – Campinas – SP – Brasil
Tel./Fax: (19) 3521-7718 / 7728
www.editoraunicamp.com.br – vendas@editora.unicamp.br

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
I – PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA (CAROL H. COLLINS)	
1 Introdução	17
2 Aspectos da história da cromatografia	18
3 As classificações da cromatografia.....	22
4 Alguns termos técnicos	30
5 Referências bibliográficas	42
II – CROMATOGRAFIA EM PAPEL (GILBERTO LEITE BRAGA)	
1 Introdução	47
2 Definições e termos usados na cromatografia em papel	51
3 Considerações sobre a cromatografia em papel.....	52
3.1 Papel	53
3.2 Fase móvel.....	55
3.3 Efeitos da temperatura	56
4 Cromatografia em papel com fase normal e com fase reversa.....	57
4.1 Cromatografia em papel com fase normal	57
4.2 Cromatografia em papel com fase reversa.....	57
5 Técnica da cromatografia em papel	58
5.1 A amostra	58
5.2 Aplicação da amostra	58
6 Métodos para detectar as substâncias separadas	59
6.1 Métodos químicos	60
6.2 Métodos físicos.....	60
6.3 Métodos biológicos e enzimáticos.....	61
7 Análise qualitativa	62

8	Análise quantitativa.....	62
8.1	Diretamente sobre o papel.....	62
8.2	Extração da substância.....	63
9	Aplicações da cromatografia em papel.....	64
10	Referências bibliográficas.....	65

III – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (JOÃO LUÍS CALLEGARI LOPES)

1	Introdução.....	67
2	Os adsorventes.....	68
2.1	Sílica (SiO ₂).....	68
2.2	Alumina (Al ₂ O ₃).....	69
2.3	Terra diatomácea.....	69
2.4	Celulose.....	70
2.5	Poliamida.....	70
2.6	Outros.....	71
3	Técnicas gerais.....	72
3.1	Preparação de placas.....	72
3.2	Ativação das placas.....	74
3.3	Seleção da fase móvel.....	75
3.4	Aplicação das amostras nas cromatoplasas.....	76
3.5	Formas de desenvolvimento.....	77
3.6	Revelação dos cromatogramas.....	80
3.7	Documentação.....	82
4	Análise quantitativa.....	82
5	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência.....	83
6	Aplicações da cromatografia em camada delgada.....	85
7	Referências bibliográficas.....	85

IV – CROMATOGRAFIA POR ADSORÇÃO (WALTER VICHENEWSKI)

1	Introdução.....	87
2	A coluna.....	87
3	Adsorventes.....	88
4	Os processos de adsorção em coluna.....	90
5	Preparação dos adsorventes.....	90
6	Reações na coluna.....	92
7	Escolha de eluentes.....	92
8	Enchimento da coluna e aplicação da amostra.....	93
9	Eluição e localização dos compostos eluídos.....	94
10	Cromatografia em coluna seca.....	98

11	Aplicações da cromatografia por adsorção	100
12	Referências bibliográficas	100

V – CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA (AUGUSTO CÉSAR C. SPADARO)

1	Introdução	103
2	O mecanismo de cromatografia por troca iônica	104
3	A matriz	106
3.1	Trocadores inorgânicos naturais	107
3.2	Trocadores inorgânicos sintéticos	107
3.3	Trocadores com matriz orgânica natural	108
3.4	Trocadores orgânicos sintéticos	111
3.5	Matrizes utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência	114
3.6	Trocadores iônicos líquidos	115
4	Os grupos trocadores	115
5	Propriedades de trocadores iônicos	120
5.1	Capacidade	120
5.2	Seletividade	121
6	Fatores que influenciam a cromatografia por troca iônica	123
6.1	A escolha do trocador iônico	123
6.2	A seleção da fase móvel	124
6.3	A amostra	126
7	Eluição em cromatografia por troca iônica	126
8	Aplicações	129
9	Referências bibliográficas	136

VI – CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO (ZULEIKA ROTHSCHILD)

1	Introdução	139
2	Conceitos que caracterizam a cromatografia por exclusão	141
2.1	Fases	141
2.2	Eluição	142
2.3	Espalhamento da zona e resolução	145
2.4	Outros conceitos muito usados em cromatografia por exclusão	148
3	Recheios usados em cromatografia por exclusão	149
3.1	Características da fase estacionária	149
3.2	Natureza química do gel	150
3.3	Natureza física do gel	151
3.4	Tipos de gel	151
4	Equipamento para cromatografia por exclusão	158
4.1	Coluna cromatográfica	158

4.2	Controle da vazão da fase móvel.....	158
4.3	Registro das curvas de eluição.....	159
5	Parâmetros experimentais em cromatografia por exclusão.....	159
5.1	Tipo de gel.....	160
5.2	Tamanho da coluna.....	162
5.3	Tamanho da amostra.....	163
5.4	Vazão da fase móvel.....	163
5.5	Tratamento da coluna.....	164
6	Aplicações da cromatografia por exclusão.....	165
7	Referências bibliográficas.....	166
VII – CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE (AUGUSTO CÉSAR C. SPADARO E MARIA JOSÉ VIEIRA FONSECA)		
1	Introdução.....	167
2	Princípio do método.....	168
3	Seleção do suporte insolúvel ou matriz.....	170
3.1	Matriz de agarose.....	171
3.2	Matriz de celulose.....	171
3.3	Matriz de dextrana.....	172
3.4	Matriz de poliacrilamida.....	172
3.5	Matriz de trisacril.....	172
3.6	Outras matrizes orgânicas.....	173
3.7	Matrizes inorgânicas.....	174
4	Preparação de fases estacionárias seletivas.....	175
4.1	Métodos de ativação de matrizes hidroxílicas.....	176
4.2	Ativação de matrizes não-hidroxílicas.....	180
4.3	Acoplamento do ligante à matriz ativada.....	181
5	Metodologia operacional.....	183
5.1	Preparação da coluna.....	183
5.2	Dimensões da coluna.....	184
5.3	Determinação da capacidade.....	184
5.4	A preparação da amostra.....	185
5.5	O efeito de vazão e temperatura.....	185
5.6	Métodos de eluição.....	186
5.7	Exemplos de resinas por bioafinidade disponíveis comercialmente.....	191
6	Aplicações da cromatografia por bioafinidade.....	195
6.1	Purificação de macromoléculas por cromatografia por bioafinidade.....	195
6.2	Purificação de pequenas moléculas.....	199
6.3	Interações biomoleculares.....	200
7	Referências bibliográficas.....	200

VIII – CROMATOGRAFIA GASOSA (PIERINA SUELI BONATO)

1	Introdução	203
2	Técnicas usadas em cromatografia gasosa	205
3	Eficiência	207
4	Equipamento para cromatografia gasosa	213
4.1	Fonte do gás de arraste	213
4.2	Controladores de vazão e de pressão.....	214
4.3	Sistema de injeção da amostra.....	214
4.4	Coluna cromatográfica.....	219
4.5	Sistemas de detecção.....	223
4.6	Sistema de registro e tratamento de dados	231
4.7	Controle de temperatura da coluna, injetor e detector	232
5	Fases estacionárias para cromatografia gasosa	232
5.1	Fase estacionária sólida.....	232
5.2	Fase estacionária líquida.....	235
5.3	Fase estacionária imobilizada.....	242
5.4	Fase estacionária quiral.....	242
6	Derivação	244
7	Seleção das condições cromatográficas e otimização da análise	246
7.1	Fase estacionária	247
7.2	Diâmetro interno.....	247
7.3	Comprimento	247
7.4	Espessura do filme da fase estacionária	248
7.5	Tipo e vazão do gás de arraste	250
7.6	Temperatura da coluna	250
8	Análise qualitativa	251
9	Análise quantitativa.....	256
10	Aplicações.....	262
11	Referências bibliográficas	270

IX – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (ISABEL CRISTINA SALES FONTES JARDIM, CAROL H. COLLINS E LUIZ FERNANDO LOPES GUIMARÃES)

1	Princípios de cromatografia líquida de alta eficiência	273
1.1	Cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência.....	275
1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa	277
2	As técnicas da cromatografia líquida de alta eficiência	280
2.1	Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção	280
2.2	Cromatografia líquido-líquido ou por partição.....	282
2.3	Cromatografia líquida com fase ligada.....	283

2.4	Cromatografia líquida quirál	284
2.5	Cromatografia por troca iônica	287
2.6	Cromatografia por bioafinidade	287
2.7	Cromatografia por exclusão	287
3	Fases móveis usadas em cromatografia líquida de alta eficiência.....	289
3.1	Conceitos gerais.....	289
3.2	Critérios a serem considerados na seleção da fase móvel.....	289
3.3	Preparação da fase móvel	296
3.4	Solução-tampão	298
4	Eluição em cromatografia líquida de alta eficiência.....	301
5	Características das partículas usadas em cromatografia líquida de alta eficiência	303
6	Características das fases estacionárias usadas em cromatografia líquida de alta eficiência....	308
6.1	Fases estacionárias para cromatografia líquido-sólido.....	308
6.2	Fases estacionárias para cromatografia líquido-líquido	312
6.3	Fases estacionárias para cromatografia líquida de fase quimicamente ligada.....	314
6.4	Fases estacionárias quirais.....	325
6.5	Fases estacionárias para cromatografia por bioafinidade	329
6.6	Fases estacionárias para amostras iônicas: supressão iônica, par iônico, troca iônica	330
6.7	Fases estacionárias para cromatografia por exclusão	338
7	Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência	343
7.1	Reservatórios da fase móvel	345
7.2	Bombas de alta pressão	347
7.3	Programadores de fase móvel.....	354
7.4	Medidores e controladores de pressão.....	356
7.5	Sistemas de injeção da amostra.....	357
7.6	Colunas	360
7.7	Detectores	367
7.8	Registro dos dados	387
8	Desenvolvendo uma separação.....	388
9	Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência	392
10	Referências bibliográficas	397
X – PRÁTICAS DE LABORATÓRIO		
1	Cromatografia em papel	399
1.1	Separação de ânions.....	399
1.2	Separação de cátions	401
2	Cromatografia em camada delgada	402
2.1	Separação de derivados cumarínicos	402
2.2	Separação de nitrofenóis	403

2.3	Separação de corantes	404
2.4	Separação de nitroanilinas	404
2.5	Separação de aminoácidos	405
3	Cromatografia por adsorção	405
3.1	Separação de fluoreno e fluorenona	405
3.2	Separação de extrato de espinafre	407
3.3	Separação de dicromato e permanganato	408
4	Cromatografia por troca iônica	409
4.1	Separação de cátions em resina de troca catiônica	409
4.2	Separação de cátions com resina de troca aniônica	411
5	Cromatografia por exclusão	413
5.1	Separação de albumina e azul de bromofenol	413
5.2	Verificação da redução de meta-hemoglobinas usando cromatografia por exclusão ...	415
6	Cromatografia por bioafinidade	416
6.1	Separação de hemoglobinas glicosiladas	416
7	Cromatografia gasosa	419
7.1	Otimização da análise e quantificação de uma mistura de hidrocarbonetos	419
7.2	Análise de diazepam em formulações farmacêuticas	420
7.3	Análise de cafeína em refrigerantes	422
8	Cromatografia líquida de alta eficiência	424
8.1	Análise de analgésicos	424
8.2	Determinação de cafeína em várias bebidas	426
8.3	Análise de alguns barbitúricos	428
 APÊNDICE		
1	Símbolos para cromatografia em coluna	431
2	Símbolos para cromatografia planar	433
3	Símbolos para cromatografia por exclusão	434
4	Propriedades de fases móveis usadas em cromatografia líquida	435
5	Comparação das malhas dos sólidos usados em cromatografia	437
 SOBRE OS AUTORES		
		439
 ÍNDICE REMISSIVO		
		445

APRESENTAÇÃO

Os diversos métodos de separação cromatográfica têm sido aplicados em milhares de laboratórios no mundo para decifrar os inúmeros e complexos problemas da química, da bioquímica, das ciências ambientais, da toxicologia etc., tanto no nível acadêmico e em pesquisa como nas aplicações industriais. Esses métodos cromatográficos variam desde os de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipulados por aqueles que não são peritos, até os de alta sofisticação, usados só por especialistas. Entre esses dois extremos, existem muitas variações de maior ou menor complexidade.

Para cada modalidade de cromatografia, estão disponíveis vários livros especializados, publicados em inglês ou outra língua estrangeira. Porém, são raros os livros em língua portuguesa que contenham as informações básicas, teóricas e práticas sobre essas técnicas de tão largo uso.

Na tentativa de evitar a dependência de livros em língua estrangeira, publicamos, em 1987, a primeira edição deste livro básico sobre técnicas cromatográficas, com o título de *Introdução a métodos cromatográficos*, que apresentou informações sobre as várias modalidades de cromatografia. O sucesso obtido motivou-nos a lançar uma nova edição, em 1990, revista e ampliada, tanto no que se refere ao conteúdo dos capítulos já existentes como a um novo capítulo, que descreve outra modalidade de cromatografia, a cromatografia por bioafinidade.

Ao longo de mais de dez anos desde essa revisão, a literatura especializada aumentou, sendo muito rica nesse tema,

tanto no que se refere à divulgação de novas técnicas, procedimentos e materiais como à divulgação de novas aplicações. Sendo assim, consideramos bastante oportuno realizar uma nova revisão, com um novo título, *Fundamentos de cromatografia*, procurando uma atualização mediante os constantes desenvolvimentos relatados na literatura, porém ainda mantendo o objetivo inicial de contar com uma obra que apresente informações básicas sobre as diversas modalidades de cromatografia.

Este livro continua sendo destinado ao uso, como texto, em cursos de graduação, ou como livro introdutório às técnicas de separação cromatográfica para pós-graduandos. Pode também servir como base para o pesquisador que pretende usar a cromatografia apenas como uma ferramenta em suas experiências, sem necessitar de uma base teórica profunda. Conseqüentemente, a obra não se destina a especialistas, nem é um compêndio que abrange referências a todos os novos desenvolvimentos nesse campo.

O livro consiste de um capítulo sobre alguns princípios básicos de cromatografia, oito capítulos que descrevem as diferentes técnicas cromatográficas, um capítulo que reúne sugestões para experimentos na programação experimental das disciplinas de graduação, e apêndices com os símbolos recomendados para uso em cromatografia na língua portuguesa, além de outras informações relevantes.

Apesar de os capítulos terem sido escritos por autores diferentes, cada um descrevendo a sua especialidade, houve um esforço coletivo de uniformização do texto no que se refere aos termos e símbolos usados — em sua maioria, os recomendados pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), em 1993 (L. S. Ettre, *Pure Appl. Chem.*, 65, p.819). As unidades das quantidades físicas e símbolos adotados seguiram as indicações do Sistema Internacional de Unidades. Entretanto, os leitores que procurarem as referências citadas deverão estar alertas para o fato de que os símbolos e termos usados neste livro podem, em demais obras, ser substituídos por outros, visto que ainda não existe uniformidade nos símbolos e termos usados nas diferentes modalidades de cromatografia, nem entre autores oriundos das diversas partes do mundo.

Os organizadores e autores desta obra consideram que nela aplicaram o melhor de seus esforços. No entanto, agradeceriam não só sugestões como indicações de erros e/ou conceitos mal formulados. Além disso, agradecem aos que, direta ou indiretamente, colaboraram, com seu trabalho e entusiasmo, para que esta publicação se tornasse viável; em especial, à doutora Carla Beatriz Grespan Bottoli, pela dedicação no manuseio das novas figuras encontradas nesta edição.

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA

Carol H. Collins

1 INTRODUÇÃO

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes.

Existem várias formas de realizar o processo cromatográfico. Detalhes sobre algumas dessas formas serão assuntos dos capítulos a seguir, enquanto neste serão apresentados alguns dos conceitos mais gerais. Antes disso, será relatada uma breve revisão histórica do desenvolvimento das técnicas cromatográficas mais importantes.

2 ASPECTOS DA HISTÓRIA DA CROMATOGRAFIA

Os termos e expressões “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que, em 1906, os utilizou em dois trabalhos que descrevem suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas, nas quais usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os diferentes componentes com éter de petróleo. O nome deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrever), embora ele tenha explicitado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados.

Todavia, já nessa época os processos que utilizavam a migração diferencial eram bem conhecidos. Paralelamente aos desenvolvimentos de Tswett, Reed, na Inglaterra, e Day, nos Estados Unidos, aplicaram colunas contendo sólidos e misturas de solventes orgânicos para a separação de sais orgânicos e amostras de petróleo, respectivamente. Bem antes deles, Runge descrevera os “desenhos” feitos por misturas de sais e por tintas que foram colocadas no centro de um papel de filtro e depois espalhadas pela passagem de um solvente, enquanto Schoenbein fez experiências similares com tiras de papel mergulhadas em solventes. O uso de sólidos em camada delgada sobre vidro, no lugar de papel, para o desenvolvimento circular de misturas de sais inorgânicos, foi experimentado por Beyerinck em 1889.

Apesar dessas experiências, considerou-se que a época moderna da cromatografia começou na década de 1930, quando Kuhn e Lederer “redescobriram” e aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, repetindo as experiências de Tswett, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, usando uma coluna recheada com carbonato de cálcio pulverizado como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel.

Em 1941, Martin e Synge publicaram um trabalho importantíssimo no qual descreveram a cromatografia por partição (cromatografia líquido-líquido), aplicaram à cromatografia o conceito já bem conhecido em outros processos de separação, de altura equivalente a um prato, e anteciparam o

surgimento de duas técnicas cromatográficas pressurizadas, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência. Por esse trabalho, receberam, em 1952, o Prêmio Nobel. Martin também participou em outros desenvolvimentos importantes na história da cromatografia: com Consden e Gordon, reintroduziu a cromatografia em papel; com Howard, desenvolveu a cromatografia líquida, aplicando as chamadas “fases reversas”; e, com James, atualizou a cromatografia gás-líquido.

A cromatografia gás-sólido foi descrita em 1941, por Hesse e colaboradores, que separaram dois ácidos graxos, no vapor a 100 °C, arrastando-os sobre sílica com um gás, dióxido de carbono, enquanto Cremer e Prior foram os primeiros a descrever um cromatógrafo a gás completo, utilizando hidrogênio como gás de arraste, sílica como fase estacionária e um catarômetro como detector.

A cromatografia gás-líquido foi relatada por Martin e James em 1952, e o uso de um detector por condutividade térmica, por Ray, em 1954. Um ano depois, os primeiros equipamentos foram colocados no mercado dos Estados Unidos e da Inglaterra. O desenvolvimento, quase simultâneo, do detector por ionização em chama, por Pretorius e colaboradores e por McWilliams e Dewar, em 1958, ampliou a detectabilidade do método cromatográfico, enquanto a introdução de colunas capilares por Golay, também em 1958, ampliou seus poderes analíticos a ponto de tornar a cromatografia gasosa o método analítico de separação e determinação mais usado no mundo.

A cromatografia em camada delgada foi reintroduzida em 1938, por Izmailov e Schraiber, para a análise de produtos farmacêuticos, mas não foi muito usada até o desenvolvimento, efetuado por Kirchner e colaboradores, do método de aderir o sólido ao suporte, e por Stahl, do método de preparar as placas com reprodutibilidade.

A cromatografia por troca iônica também teve seu início, na época moderna, nos anos 30, com a síntese, feita por Adams e Holmes, das primeiras resinas de troca iônica, baseadas em fenol e formaldeído, que permitem a troca de cátions. Posteriormente, resinas de poliacrilato ou poliestireno entre-

cruzado com divinilbenzeno, com substituintes sulfônicos e carboxílicos (para a troca de cátions) ou alquilaminos (para a troca de ânions), substituíram as resinas originais.

As resinas de poliestireno-divinilbenzeno com substituintes iônicos são muito aplicadas em bioquímica, e seu uso teve início com as experiências, efetuadas por Cohn, de separação de aminoácidos originados de proteína. A separação de aminoácidos foi aperfeiçoada por Moore e Stein, que posteriormente a mecanizaram, usando uma bomba peristáltica para empurrar a fase móvel e um fotômetro para a detecção, após uma reação pós-coluna para produzir os derivados com ninhidrina. Em 1959, esse sistema para a análise de aminoácidos foi modificado por Hamilton e Andrews, com a introdução de uma bomba semelhante a um pistão, similar às usadas ainda hoje em cromatografia líquida de alta eficiência.

Outros desenvolvimentos na década de 1960, por Karr e colaboradores, Jentoft e Gouw, Huber e Hulsman, Snyder, Kirkland e outros, aperfeiçoaram os sistemas de bombeamento e detecção de cromatografia líquida de alta eficiência, comprovando que o uso desses equipamentos, operado com fase móvel líquida sob pressão e com métodos de detecção sensíveis, possibilita análises de rapidez comparável àquela obtida em cromatografia gasosa, com resultados altamente satisfatórios.

Paralelamente, os enchimentos para a cromatografia líquida de alta eficiência foram sendo desenvolvidos, inicialmente os peliculares (partículas superficialmente porosas), por Halasz e Horvath, e, posteriormente, as partículas completamente porosas de diâmetro pequeno (10 μm , 5 μm e 3 μm), por Kirkland e outros. O desenvolvimento, por Nickless e colaboradores, de fases estacionárias contendo grupos alquilas quimicamente ligados ao suporte permitiu a aplicação da chamada “fase reversa” (fase estacionária apolar), ampliando as aplicações dessa técnica; enquanto a introdução de colunas de diâmetro interno menores (as “microbores” e as “capilares recheadas”), por Scott, por Ishii e por Novotny e seus colaboradores, viabilizou o uso de cromatografia líquida de alta eficiência para qualquer tipo de análise, quer orgânica quer inorgânica, em microescala.