

CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA - IV REGIÃO (SP)



facebook.com/crqiv



twitter.com/crqiv



Minicursos 2012

Princípios e Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Ministrante: Guilherme Julião Zocolo

Doutor em Química Analítica - Unesp/Araraquara

Contatos: gjzocolo1@gmail.com

Apoio



Araraquara, 15 de setembro de 2012

Observação: A versão original desta apresentação, com slides coloridos, no formato PDF, está disponível na seção downloads do site do CRQ-IV (www.crq4.org.br)



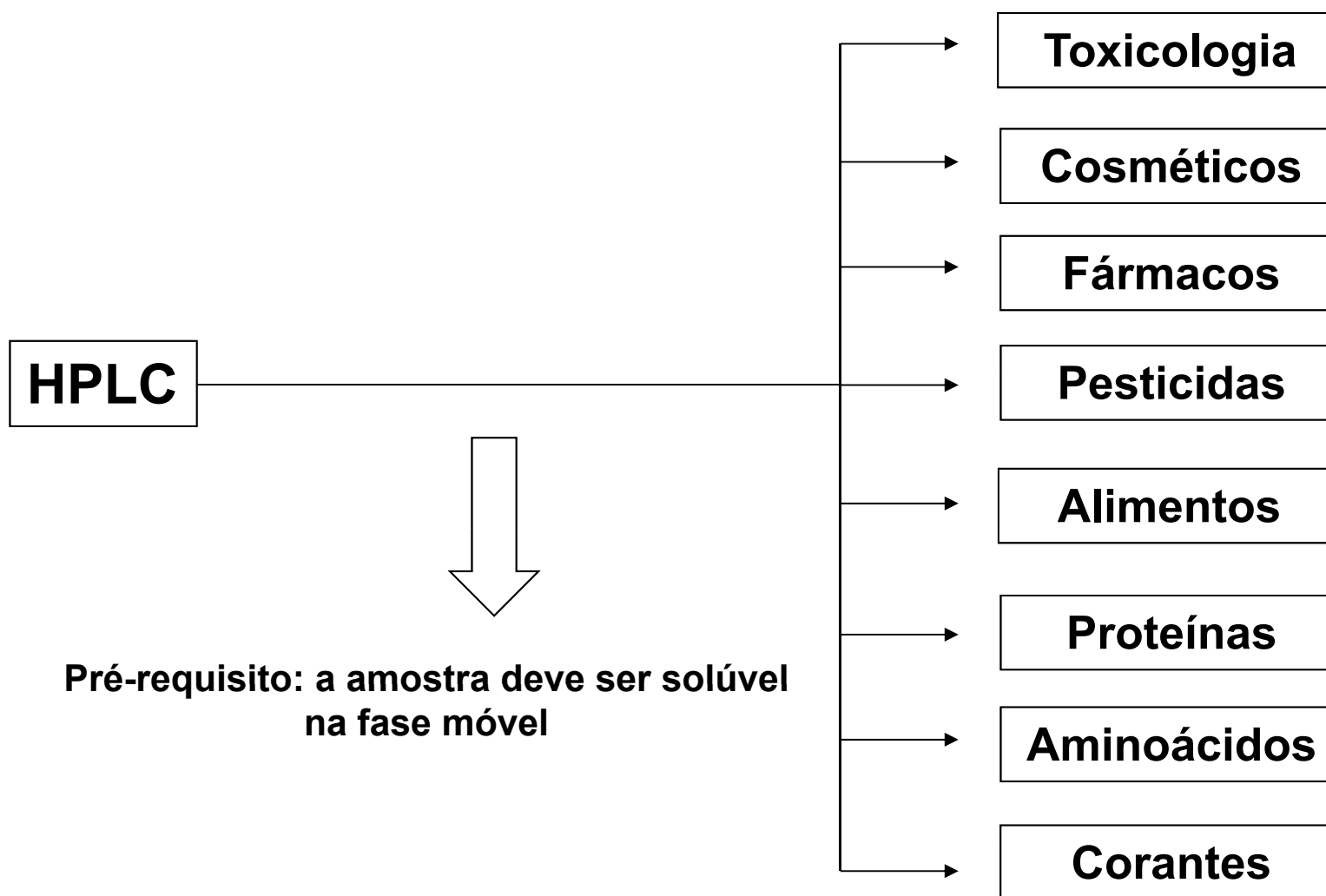
M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2

Princípios e Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Dr. Guilherme Julião Zocolo
E-mail: gjzocolo1@gmail.com

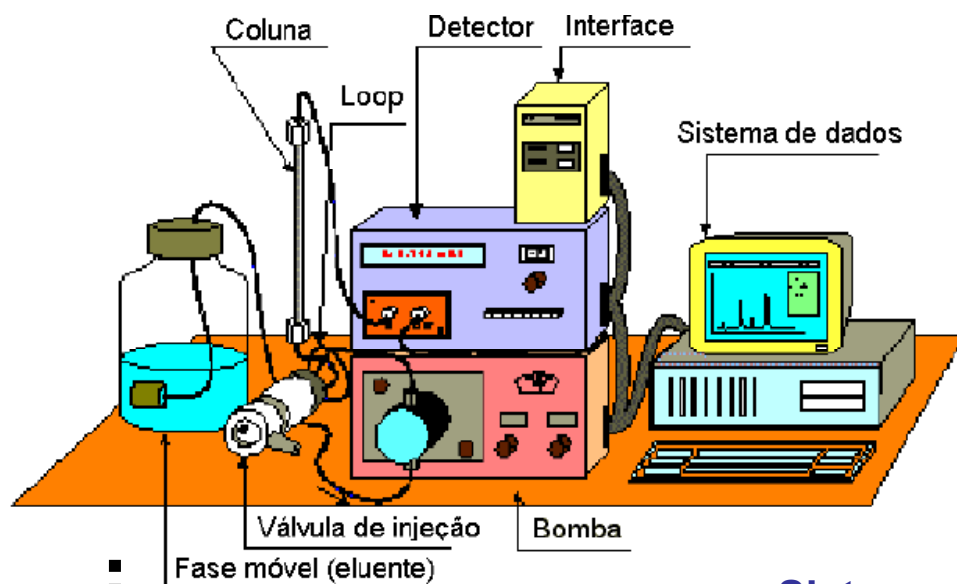


Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

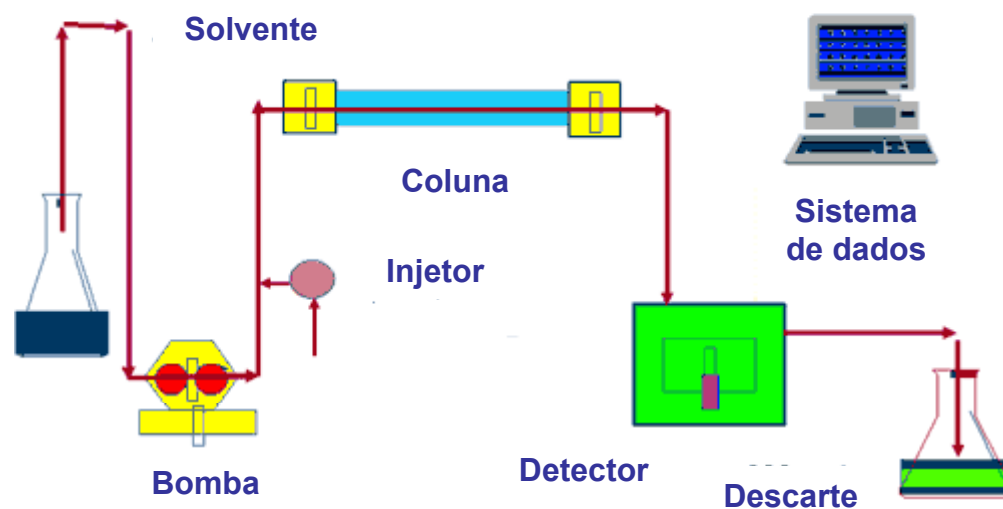




Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)



Sistema de HPLC





Histórico

Mikhael Semenovitch Tswett (1906)

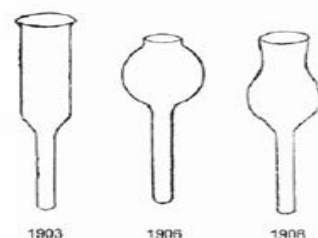


Figura 2 Ilustração original da evolução das colunas inicialmente usadas por M.S. Tswett (adaptado de 2).



Figura 3 M.S. Tswett junto da sua unidade cromatográfica em 1910 (adaptado de 3).

GRUPO CROMATOGRÁFIA

Mikhail S. Tswett:
Um legado para a cromatografia moderna

J. M. F. NOGUEIRA*

QUÍMICA 100 JAN | MAR 06

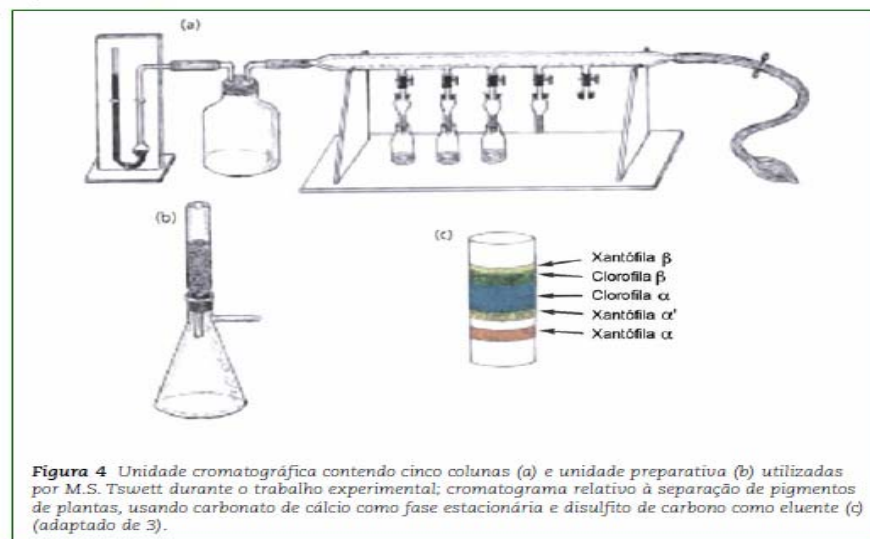


Figura 4 Unidade cromatográfica contendo cinco colunas (a) e unidade preparativa (b) utilizadas por M.S. Tswett durante o trabalho experimental; cromatograma relativo à separação de pigmentos de plantas, usando carbonato de cálcio como fase estacionária e dissulfeto de carbono como eluente (c) (adaptado de 3).



Mikhael Semenovitch Tswett (1906)

“Cromatografia”

“Cromatograma”

“Método cromatográfico”

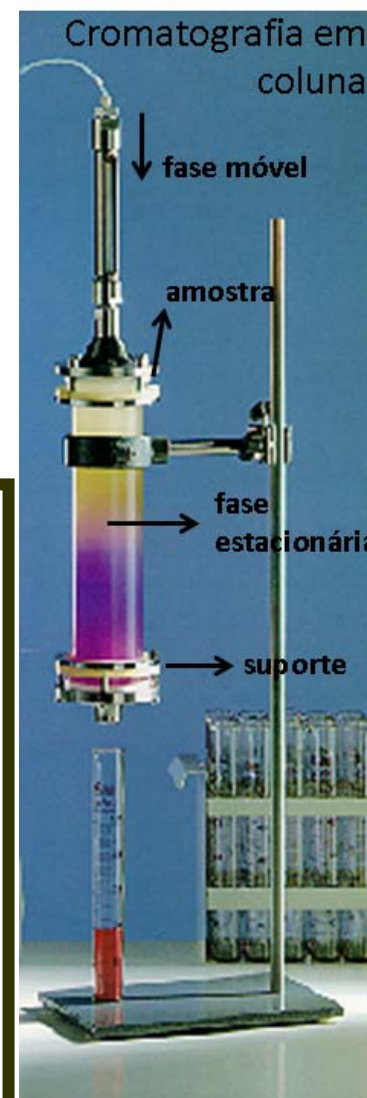


Mikhail Semenovich
Tswett
(1872-1919)

Tswett, M.S. *Ber. Deutsch Bot. Ges.*, **24** (1906)

Método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, que envolve a distribuição diferencial destes em um sistema heterogêneo bifásico:

- 1 - FASE ESTACIONÁRIA;**
- 2 - FASE MÓVEL.**





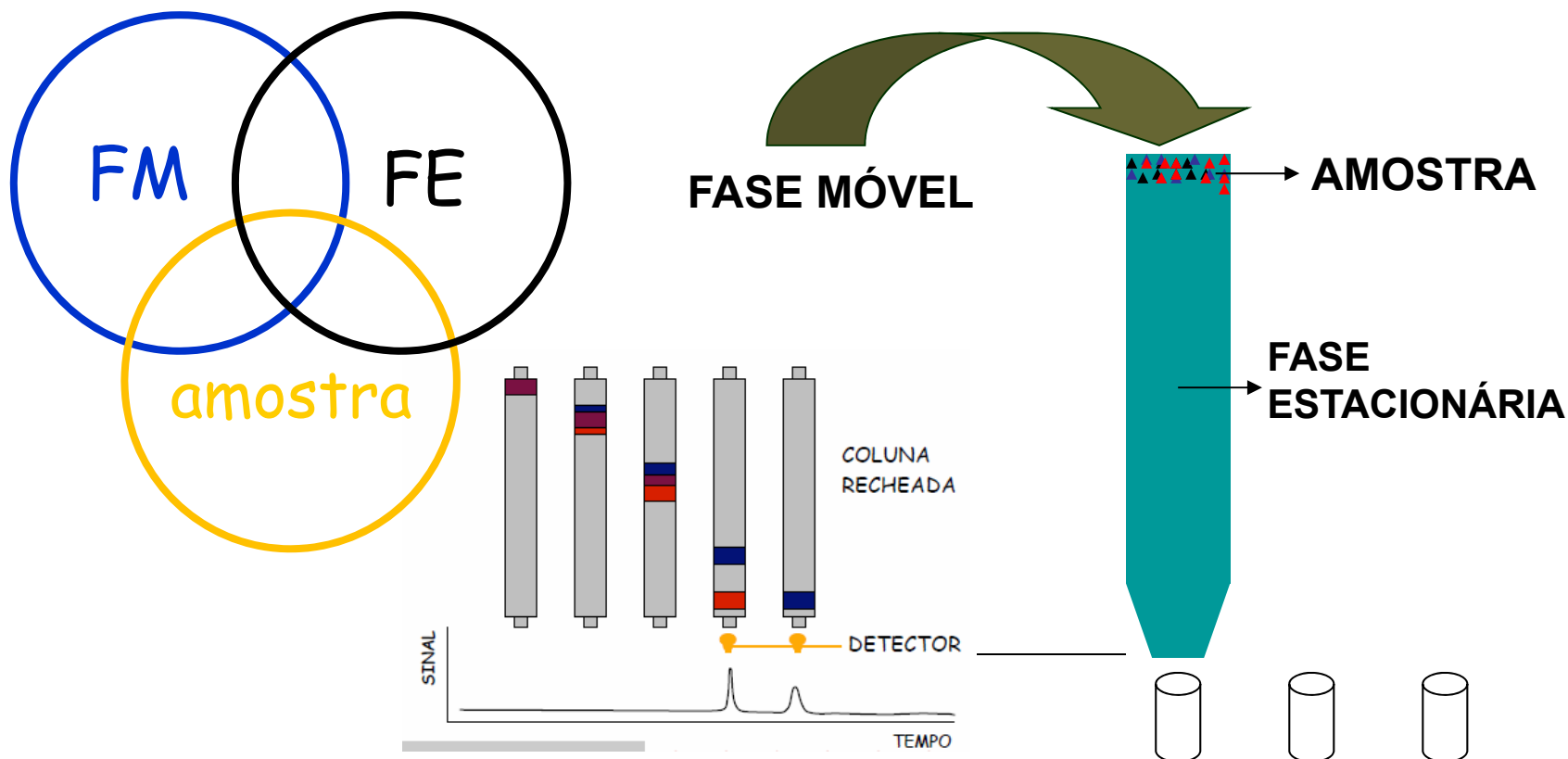
Evolução das Técnicas Cromatográficas

- 1906** **Tswett** – CROMATOGRRAFIA EM COLUNA (CC)
extratos vegetais; coluna c/ CaCO_3 ; éter de petróleo
- 1938** **Izmailov e Shraiber** – CROMATOGRRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD, TLC)
extratos vegetais; placa de vidro c/ alumina
- ERA da “Cromatografia Moderna”:** Prêmios Nobel – 1937, 1938, 1939.
- 1941** **Martin e Synge** – CROMATOGRRAFIA GASOSA (CG, GC)
- 1952** **Martin e James** – CROMATOGRRAFIA GASOSA (CG, GC)
- Décadas de 1960/1970**
Karr, Jentoft, Gouwn, Huber, Hulsman, Snyder e Kirkiland –
CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE, HPLC)



Mecanismo de separação cromatográfica

A separação cromatográfica é obtida a partir de interações diferenciadas entre os **analitos componentes da mistura**, **fase estacionária** e **fase móvel**.

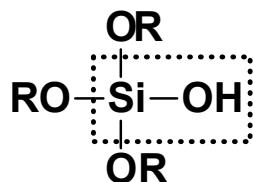




CROMATOGRAFIA: CLASSIFICAÇÃO PELA POLARIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA

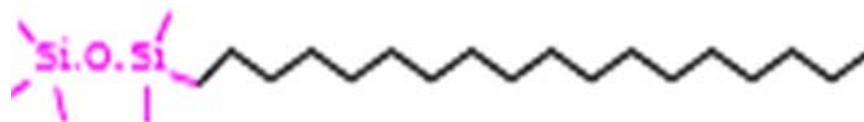
Cromatografia em **FASE NORMAL**: fase estacionária polar.

Ex.: sílica gel

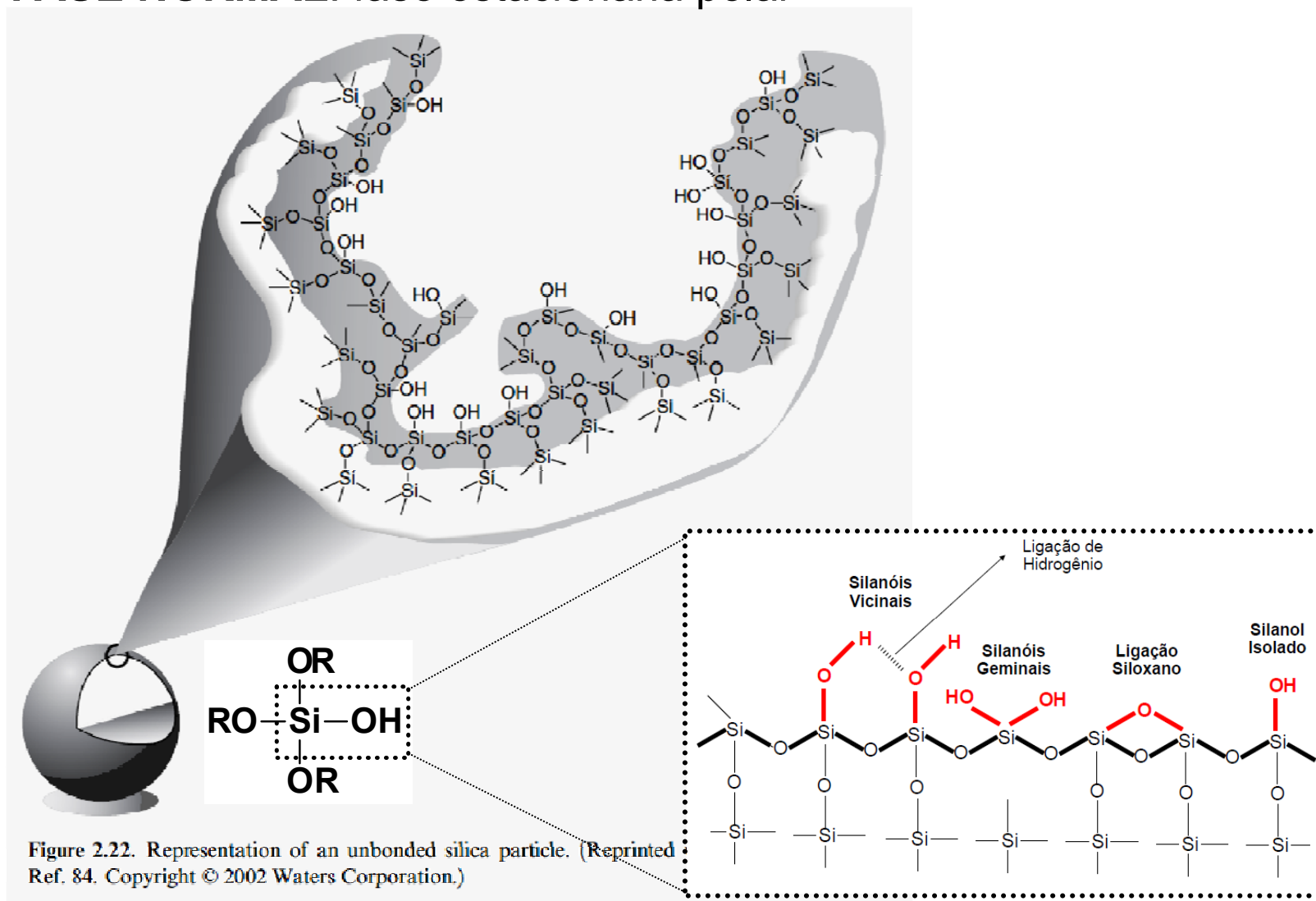


Cromatografia em **FASE REVERSA**: fase estacionária de baixa polaridade.

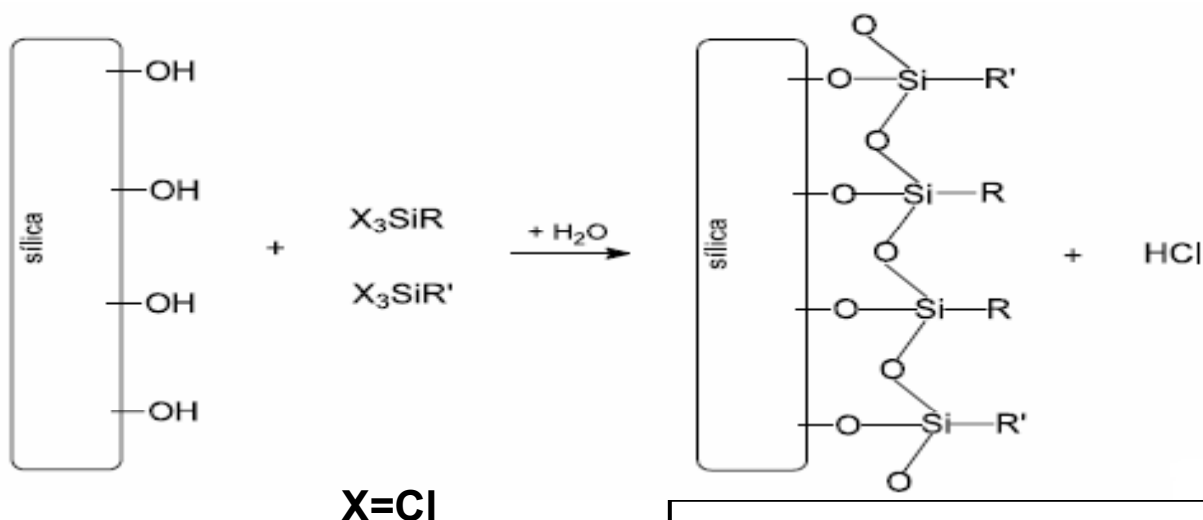
Ex. sílica de fase ligada C18



FASE NORMAL: fase estacionária polar

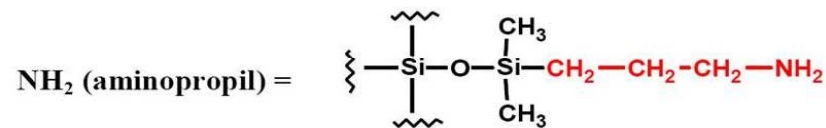
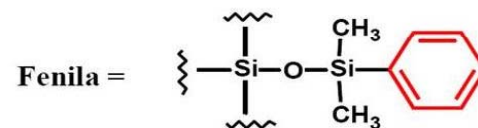
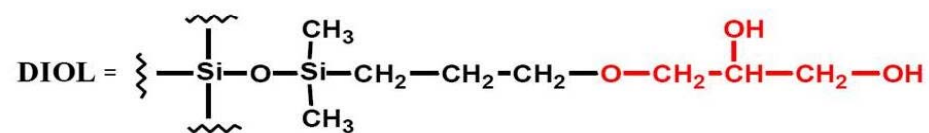
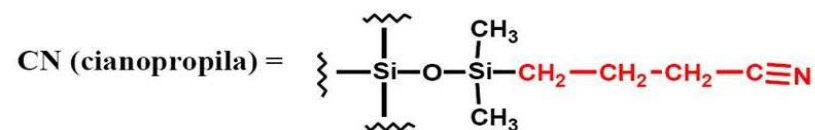


FASE NORMAL: fase estacionária polar



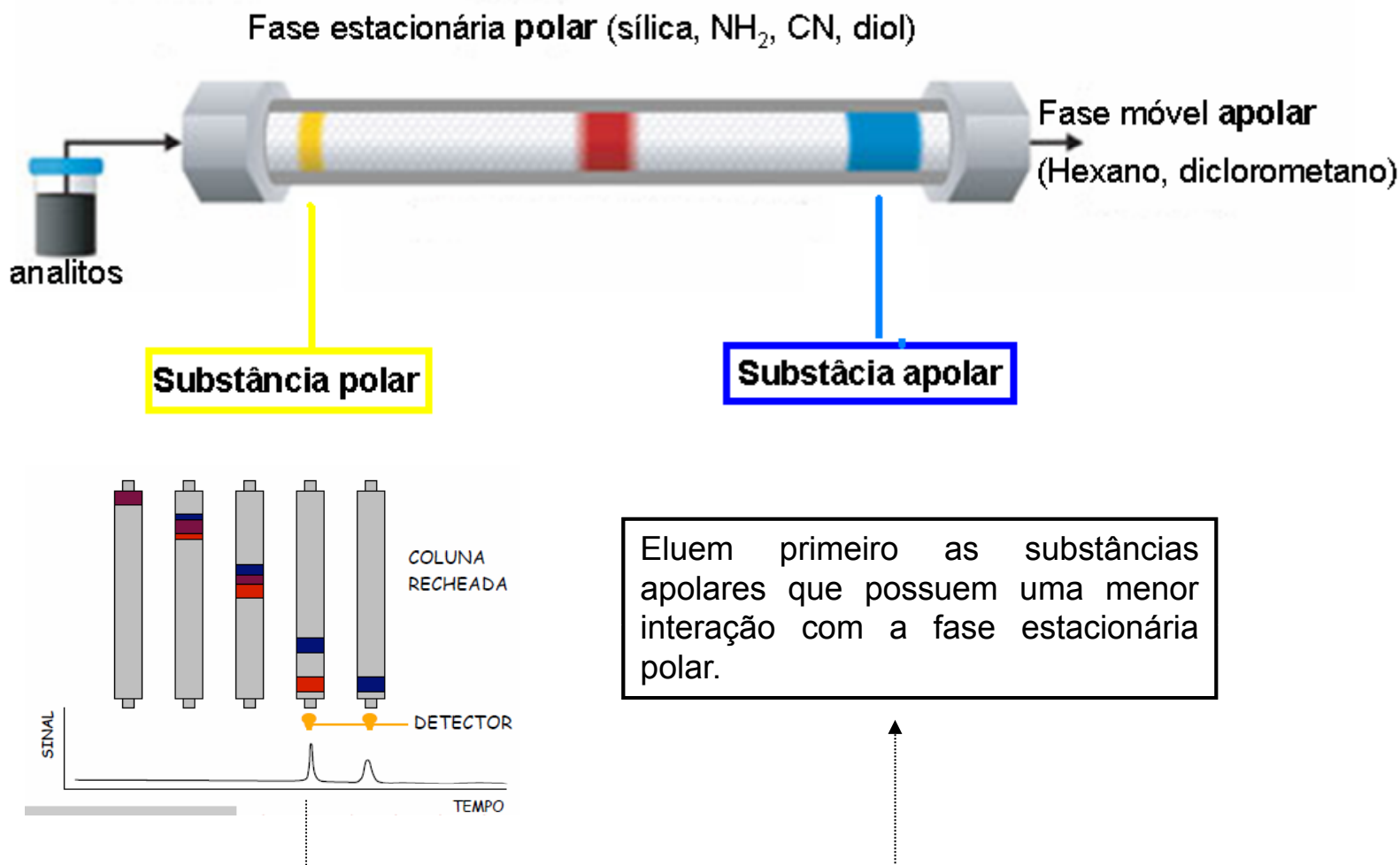
→ Quando se utiliza silica-gel derivatizada com grupos polares (**fenila, ciano, amino, diol**), tais fases estacionárias podem ser utilizadas tanto para cromatografia em modo normal (fase estacionária polar à eluente apolar) ou em fase reversa (fase estacionária apolar à eluente polar).

R' = CN, Diol, Fenila, NH₂





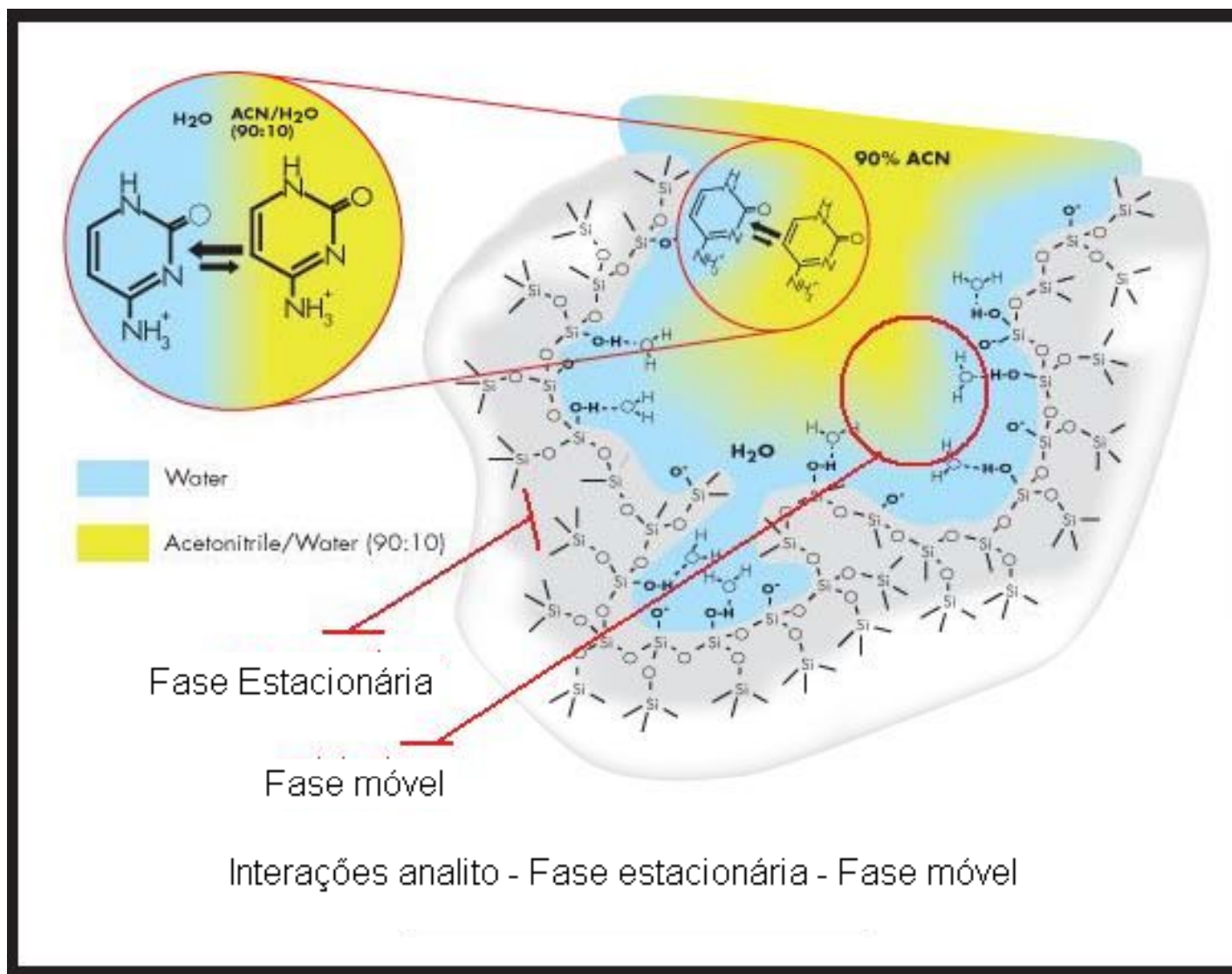
FASE NORMAL: fase estacionária polar



Aplicável a análise de substâncias insolúveis em água: óleos, gorduras, lipídios. Destaca-se na separação de isômeros.

Fonte: Waters corporation

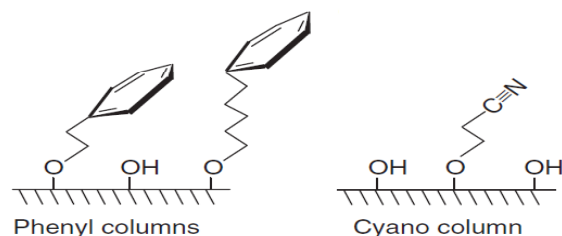
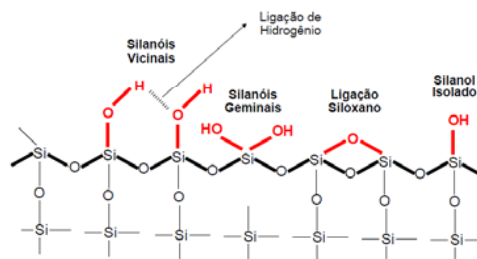
Mecanismo de separação cromatográfica



Fonte: Adaptado de Waters corporation



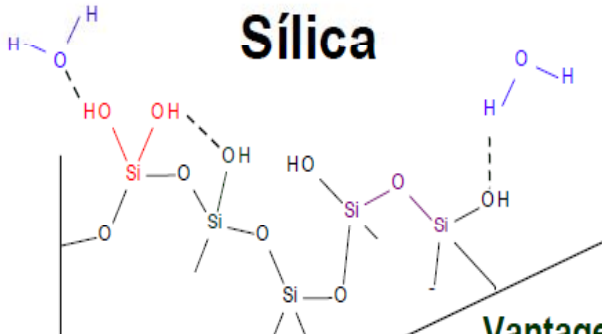
Características das FASES NORMAIS



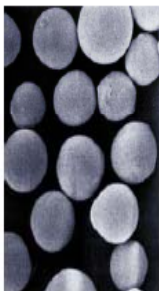
Vantagens	Desvantagens
1. Versatilidade na mudança de seletividade alterando as fases móveis e estacionárias	1. Amostras iônicas são de difícil separação e são mais viáveis de se separar por fase reversa
2. Colunas estáveis quando se utiliza solventes não aquosos	2. Controle da força de eluição menos previsível e mais demorado que em fase reversa
3. Uma grande variedade de substâncias orgânicas são mais solúveis nos solventes usados em fase normal (útil em LC preparativa)	3. Pior resolução
4. Decréscimo de pressão menor devido à baixa viscosidade dos solventes	4. Ponto de ebulição reduzido pode gerar bolhas
5. Útil para amostras que possam se decompor em soluções aquosas.	5. Alto custo dos solventes orgânicos

Fonte: Adaptado de CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA - HPLC/CLAE. LANÇAS, FERNANDO MAURO

Sílica



Partículas




Esféricas Irregulares
Diâmetro: 3 a 200 μm
Poro: 60 a 120Å

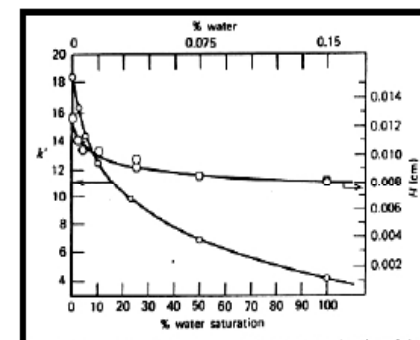
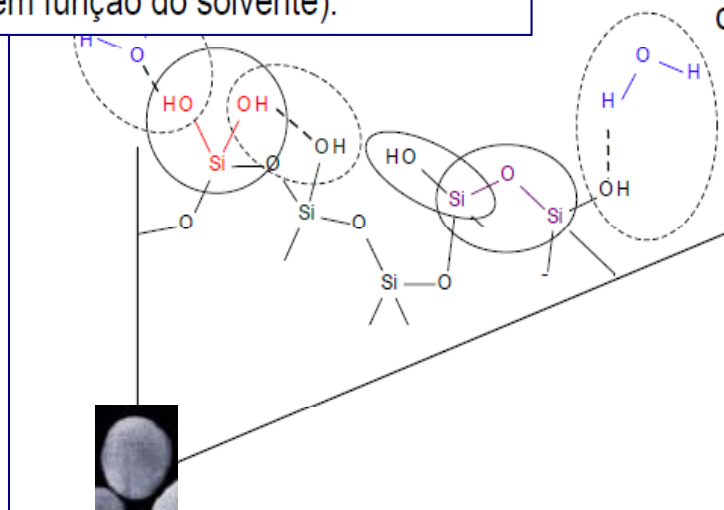
Vantagens:

- Elevada resistência mecânica
- Grande porosidade e área superficial
- Gel duro (intumescimento não varia em função do solvente).

Ganhos e Perdas em FASE NORMAL

Desvantagens:

- Difícil controle da atividade de água
- Forte adsorção de substâncias polares
- Forte adsorção de substâncias básicas
- Limite operacional de pH (2 a 8)
- Sítios com energia de adsorção diferentes.



Influência do teor de água da FM sobre a eficiência (H) e retenção (k').

FE: Sílica FM: DCM
Amostra: Fenilpropanol

CAVALHEIRO, A.J. (IQ-UNESP)



Fases móveis em Fase Normal

Força de Eluição

Baixa (solvente A) → Hexano

Média → Clorofórmio, acetonitrila, tetrahydrofurano

Forte (solvente B) → Isopropanol, metanol

Retenção aumenta com aumento da polaridade dos solutos.

Agentes de supressão iônica melhoram a resolução cromatográfica

Picos assimétricos { Ácido acético ou fórmico para **ácidos**.
Amônia ou trietilamina para **bases**.



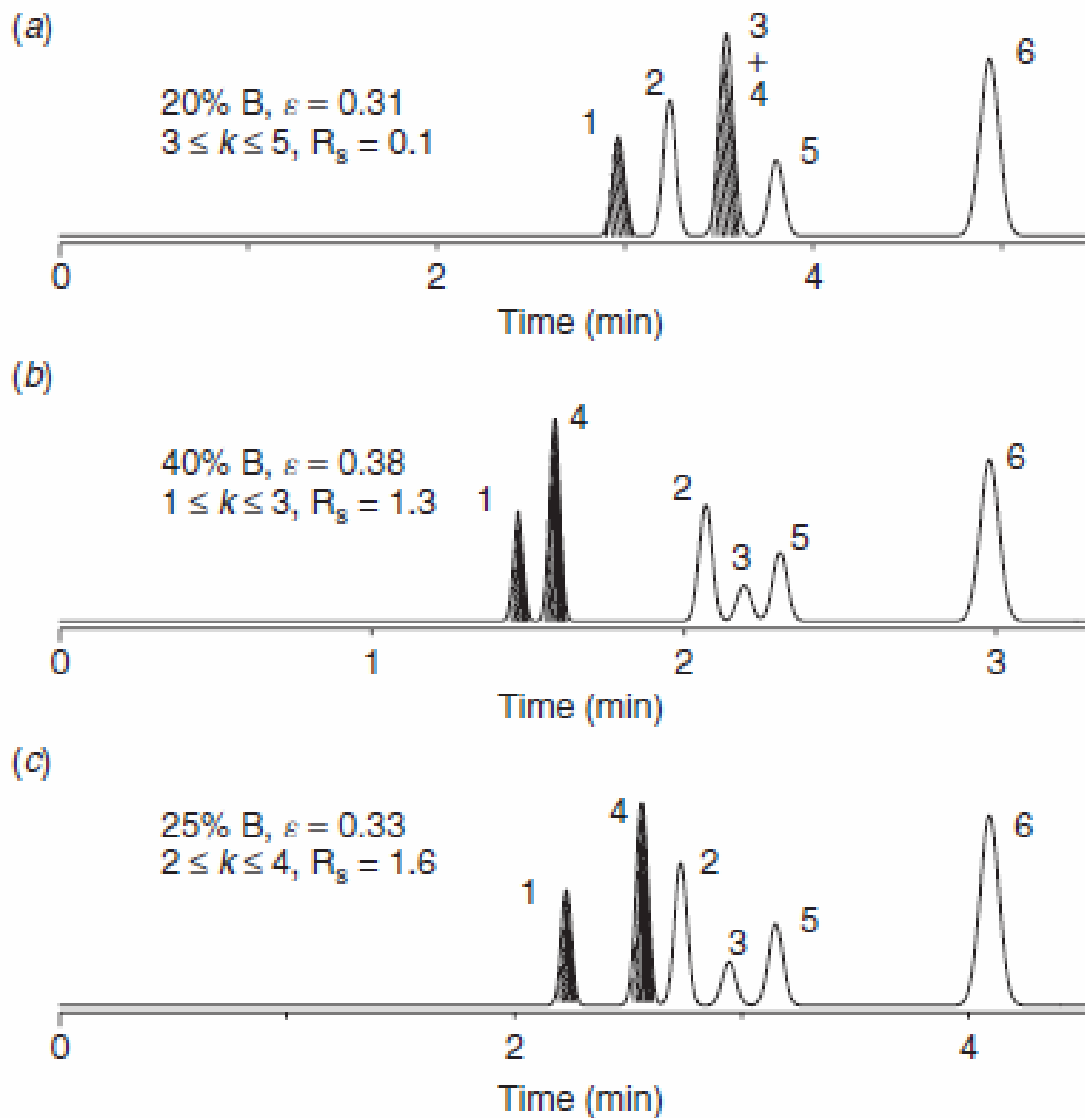
EFEITOS DA FASE MÓVEL EM FASE NORMAL

- ▶ Solvente fraco (A): não-polar
 - ▶ Solvente forte (B): polar
- } → $0,5 < k < 20$
- ▶ Seletividade (α) é fortemente influenciada pela proporção do solvente B utilizado na fase móvel.
 - ▶ Seletividade (α) é **ainda mais** fortemente influenciada pelo **tipo do solvente B** utilizado na fase móvel.
 - ▶ F.E.s (poder de retenção): sílica > amino > diol > ciano
 - ▶ F.E.s (poder de separação): ciano > sílica > diol > amino

Fonte: Adaptado de CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA - HPLC/CLAE. LANÇAS, FERNANDO MAURO



Efeitos da variação de solvente POLAR na separação cromatográfica



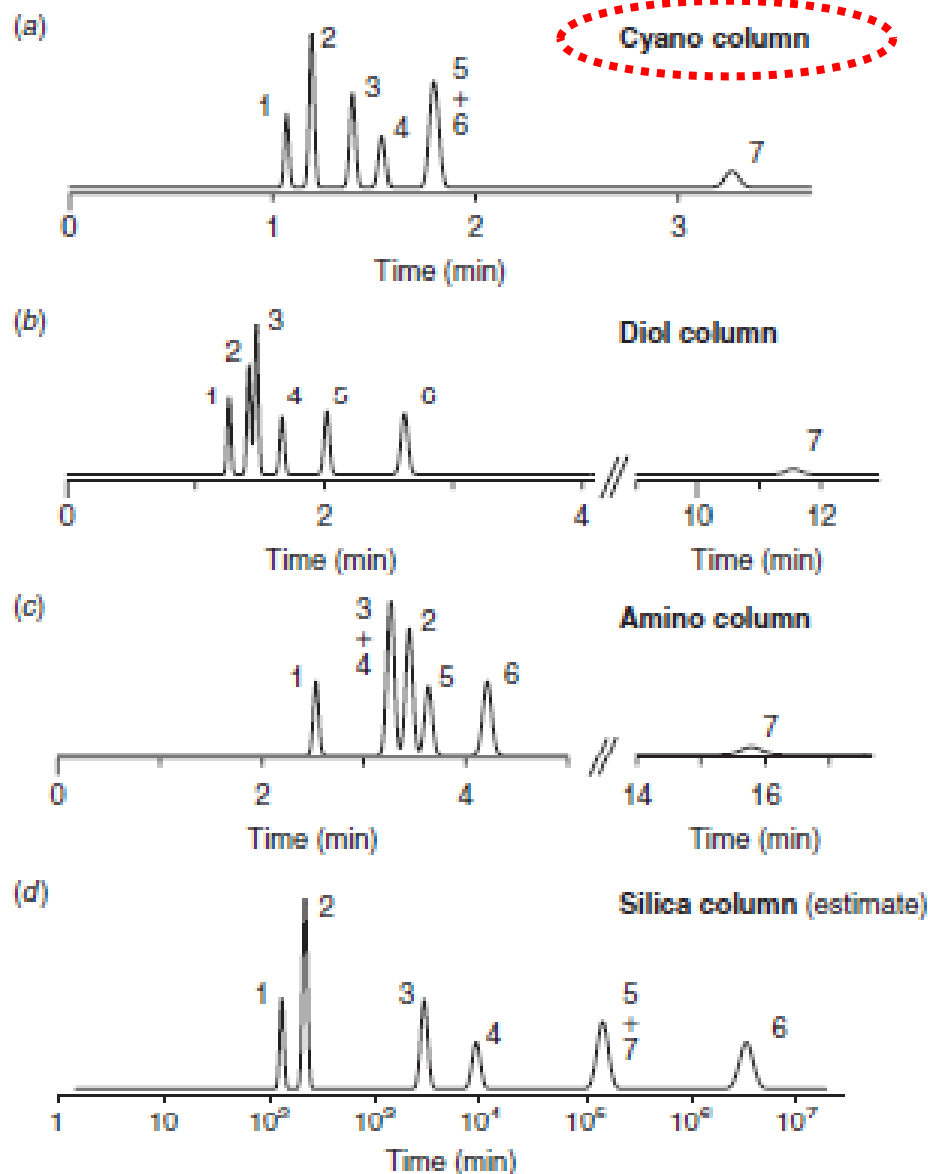
Substâncias analisadas

- 1 - 2-aminonaphthalene;
- 2, 2,6-dimethylquinoline;
- 3, 2,4-dimethylquinoline;
- 4, 4-nitrophenol;
- 5, quinoline;
- 6, isoquinoline.

Condições
cromatográficas
B: Acetato de etila
A Ciclohexano
Coluna de sílica
150x4,6 mmx5 μm
Vazão de 2 mL min⁻¹



Desenvolvimento de método em **FASE NORMAL**



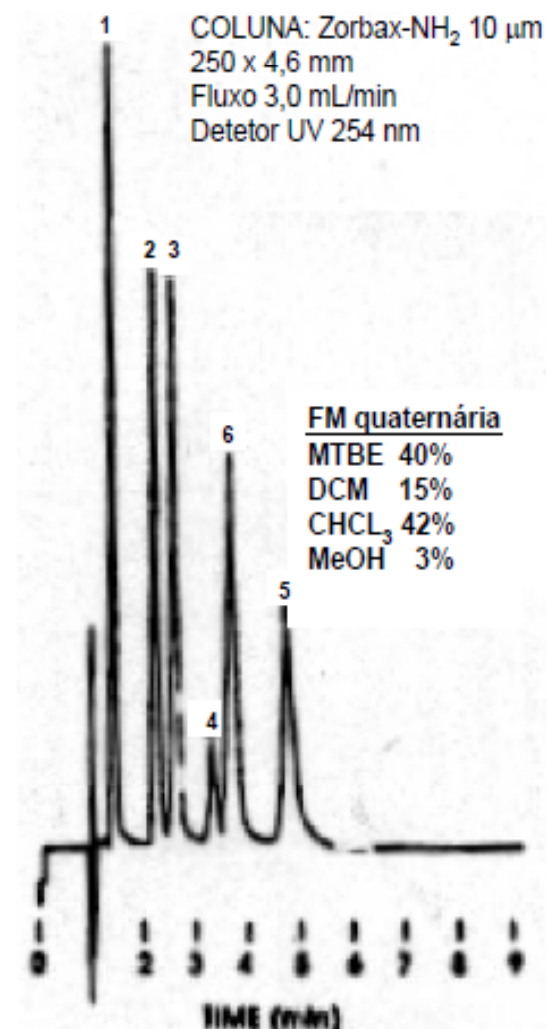
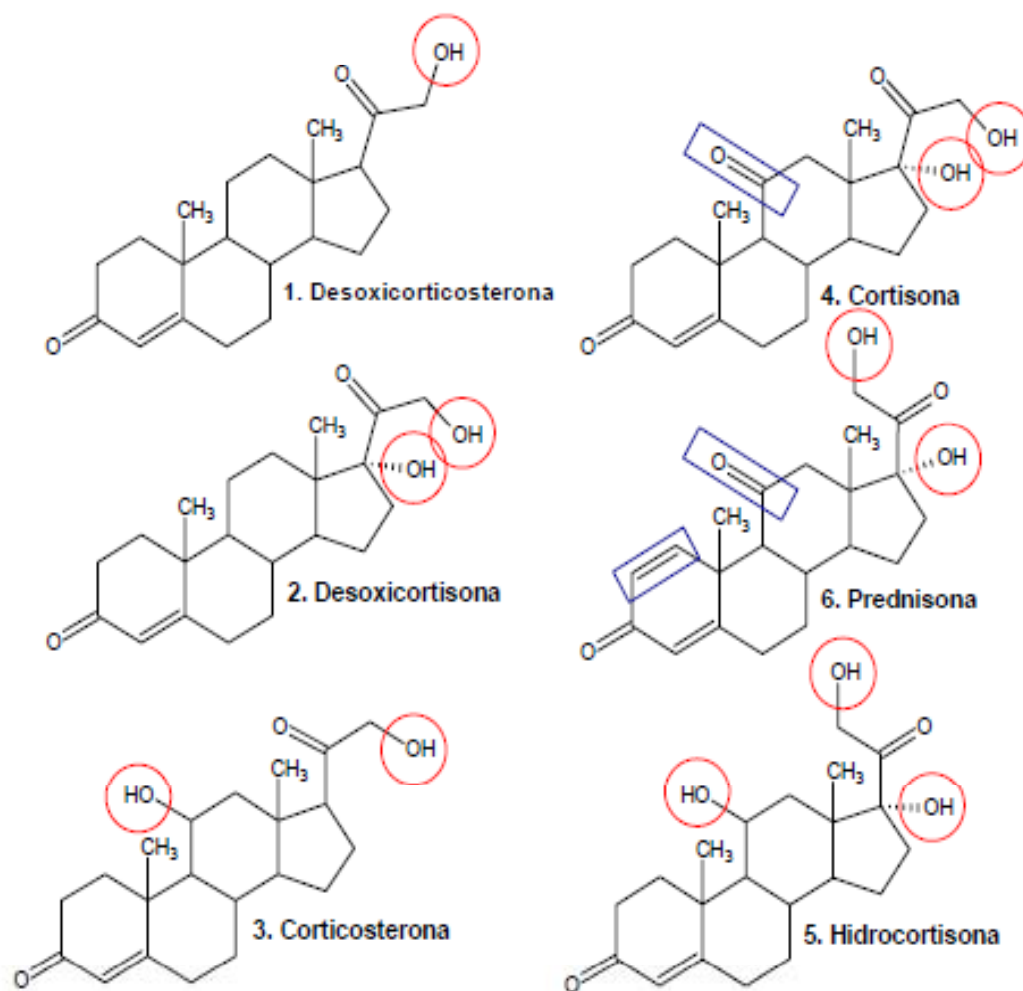
Estratégias

- Coluna *Ciano* (solvente A: hexano; solvente B: propanol).
- Verifique a presença de cauda nos picos.
- Mudar a proporção do solvente B; substituindo o tipo de solvente B (diclorometano, ACN) e sua proporção. Em **último caso**, substitua o tipo de coluna (diol, amino, sílica).
- Otimize as condições da coluna (L; diametro da partícula e vazão da fase móvel.)



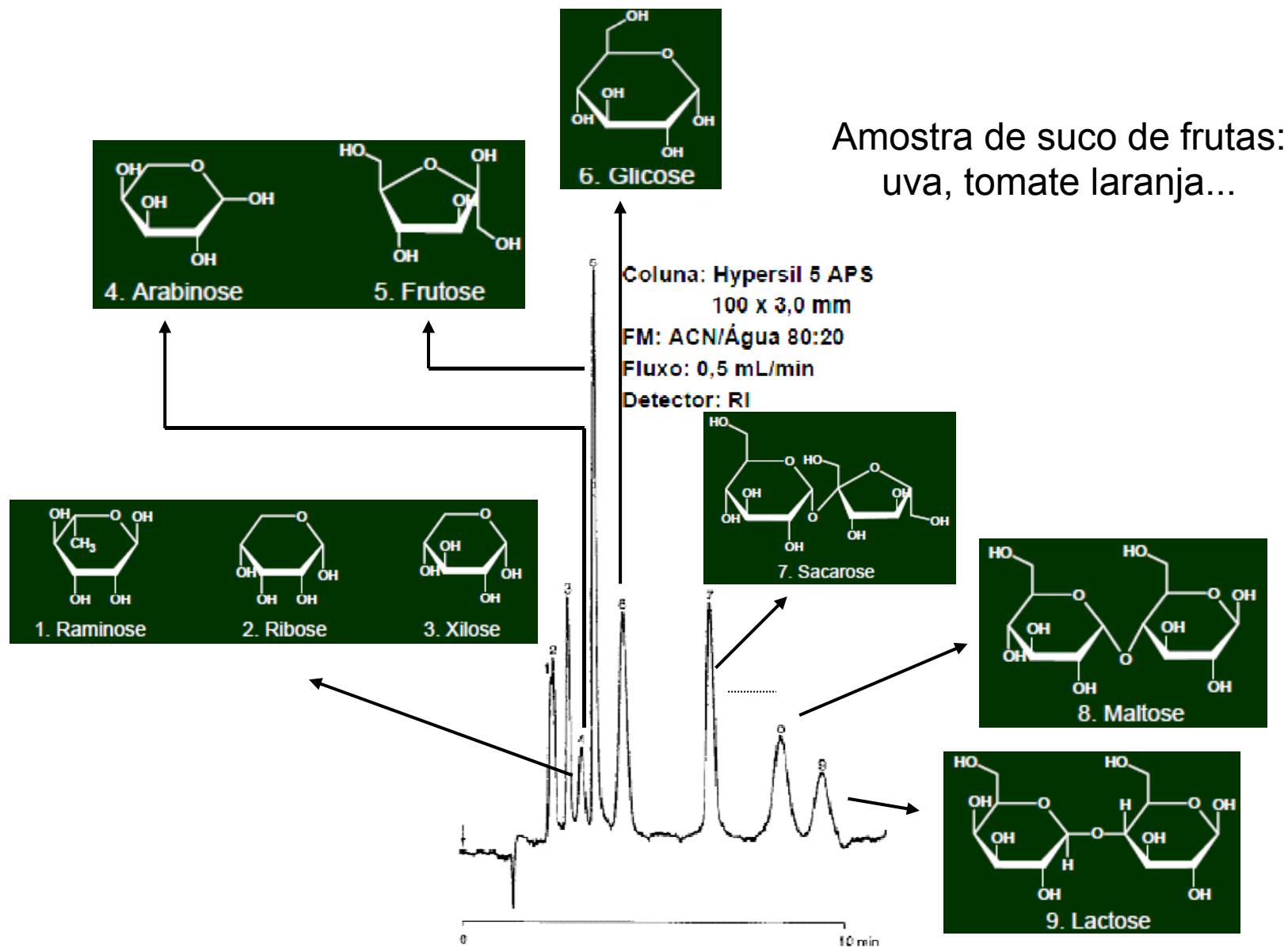
Fase ligada amino (NH_2)

Análise de esteróides em sangue





Fase ligada amino (NH_2)



FASE REVERSA

Fase estacionária de baixa polaridade – C2, C4, C8, C18.

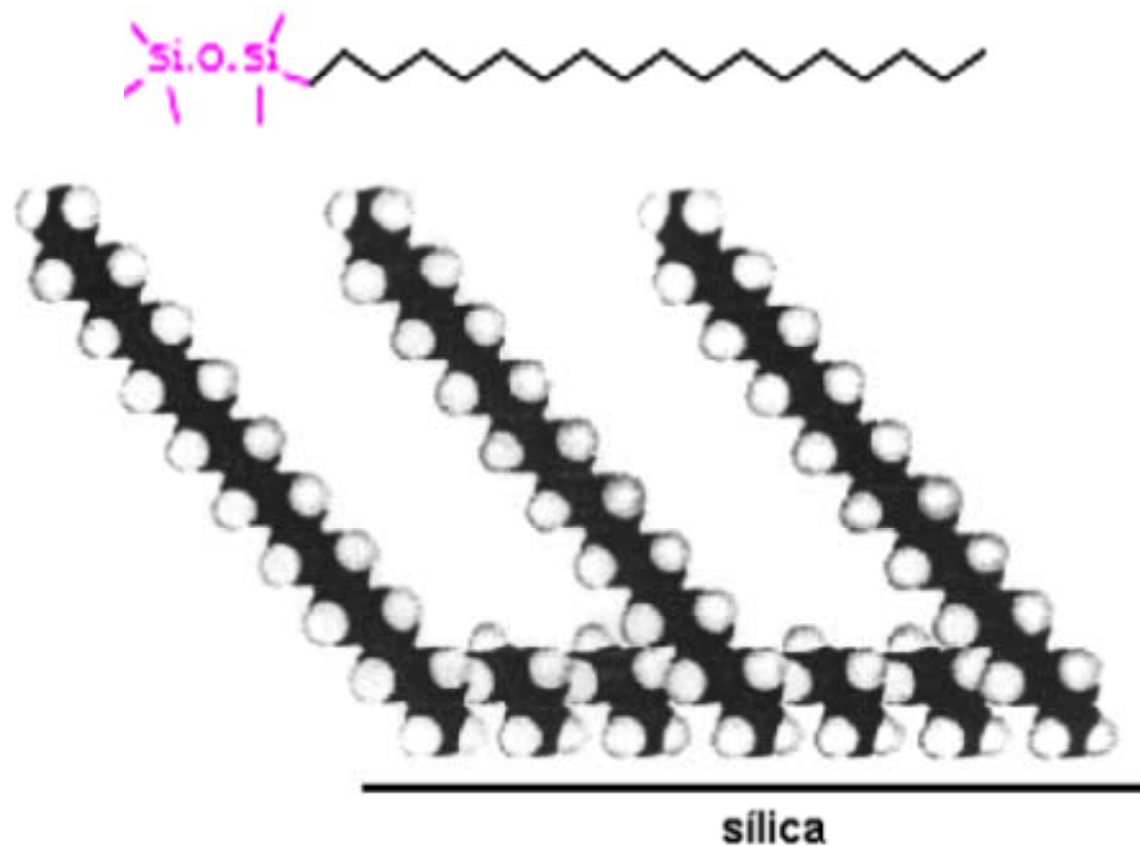
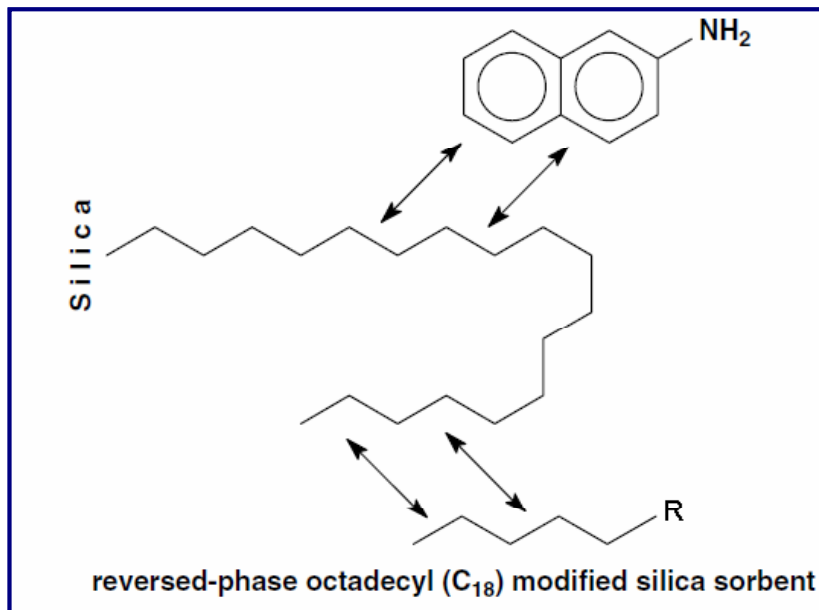


Figura 3. Representação esquemática da fase estacionária obtida pela polimerização horizontal de uma mistura de organossilanos com cadeias alifáticas C-1 e C-18⁵⁸



Mecanismo de Interação em Fase Reversa

CLAE C18: adsorção do analito na fase estacionária



**Interações ANALITO X FE e FM X FM
(em ordem decrescente de intensidade):**

Van der Waals

Dipolo – dipolo

Dipolo – dipolo induzido

Dipolo induzido – dipolo induzido

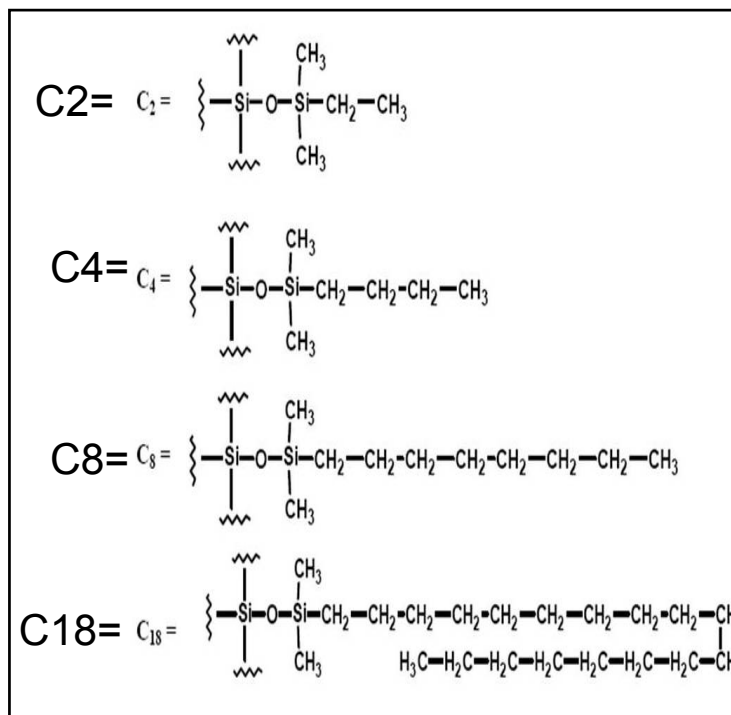
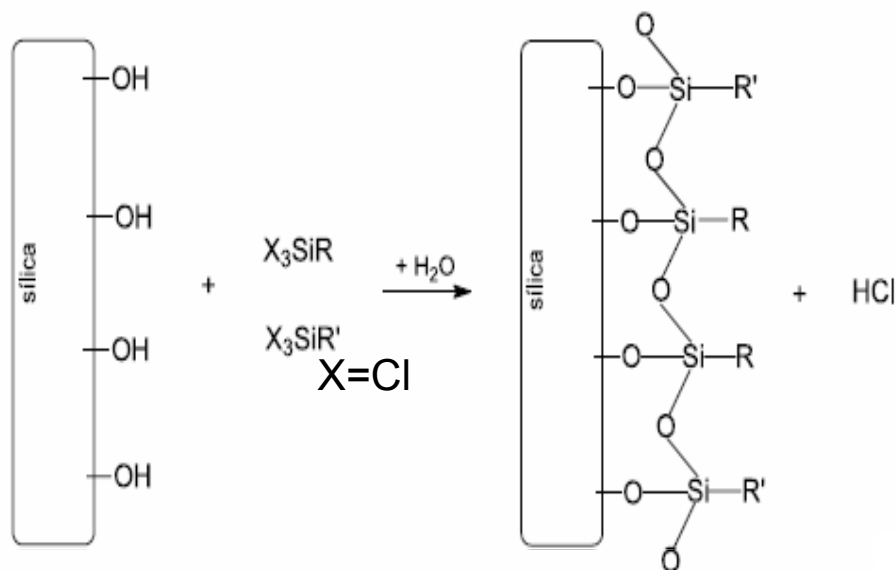
Interações residuais: pte. H



FASE REVERSA:

Fase estacionária de baixa polaridade – **C2, C4, C8, C18**

R' = C2, C4, C8 E C18



Modo de HPLC mais utilizado (~80%): compostos não iônicos, compostos polares a mediamente apolares.



Cromatografia de Fase Reversa (FR)*

FE menos polar que FM.

Coluna Fase Reversa C18:

Aplicação quase universal

(~ 70% das aplicações na literatura)

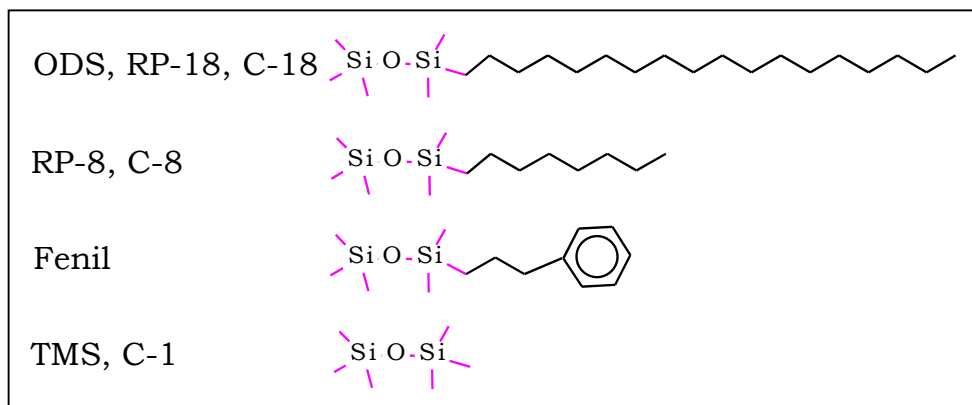
Permite análise desde substâncias hidrossolúveis e/ou iônicas até substâncias lipofílicas.

***Vantagens:**

- Equilíbrio mais rápido
- Menor adsorção irreversível
- Água não influi na reprodutibilidade
- Sítios de adsorção mais homogêneos
- Eluição em gradiente facilitada



Cromatografia de Fase Reversa (FR)

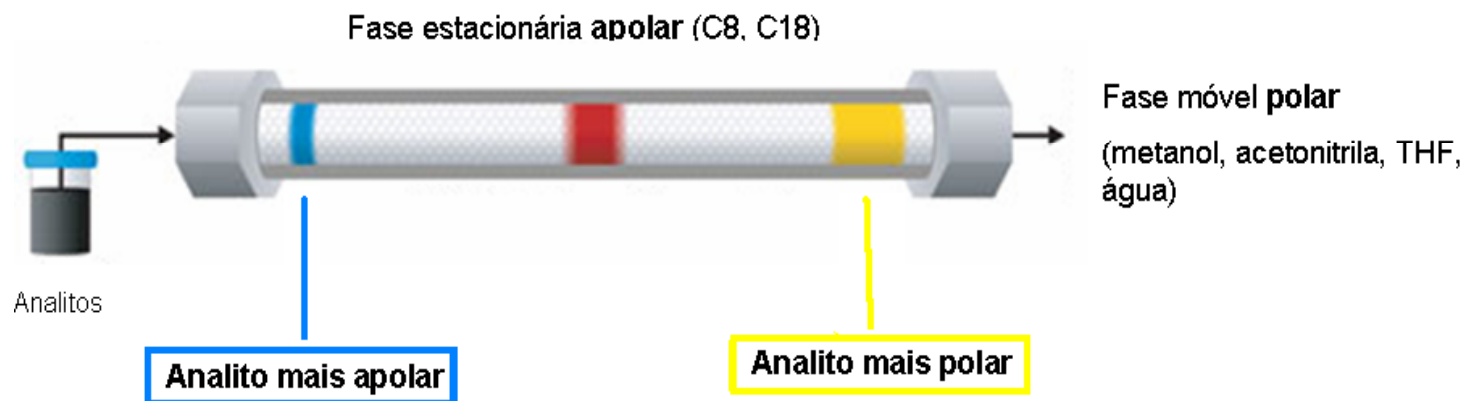


SOLVENTES MAIS COMUNS:

- Água
- Acetonitrila (ACN)
- MeOH
- Tetraidrofurano (THF)

ORDEM DE ELUIÇÃO (crescente)

POLAR → APOLAR





Cromatografia de Fase Reversa (FR)

FE menos polar que FM.

Fraco (solvente A) → Água

Forte (solvente B) → Metanol, Acetonitrila, Tetrahydrofurano

Nomograma

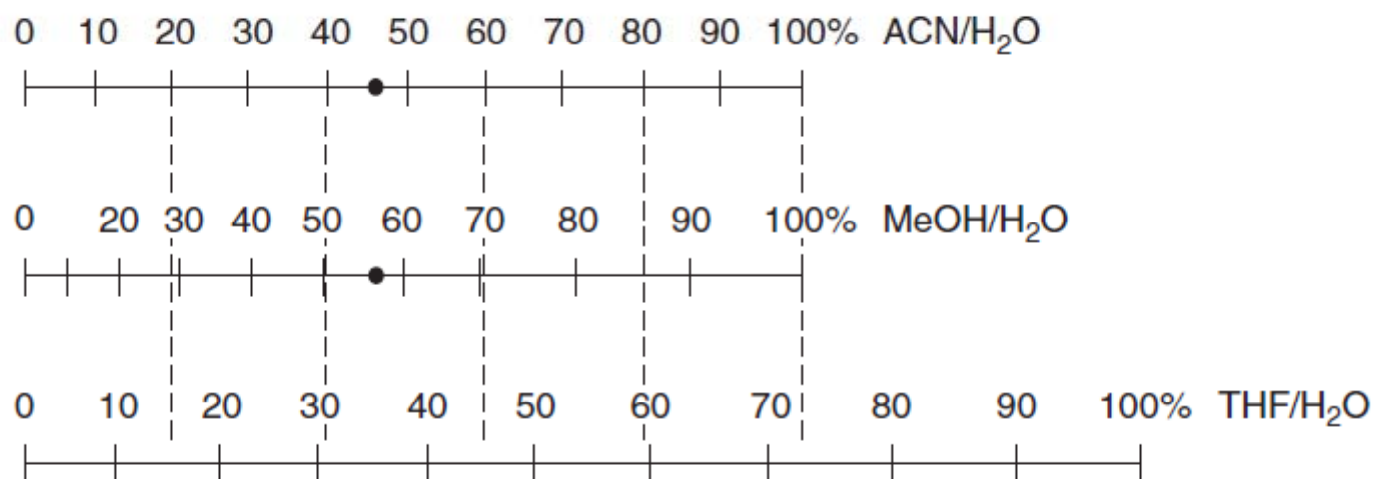


Figure 6.11 Solvent-strength nomograph for reversed-phase HPLC (adapted from [28]). Two mobile phases of equal strength (46% ACN and 57% MeOH) marked by •, as an example.

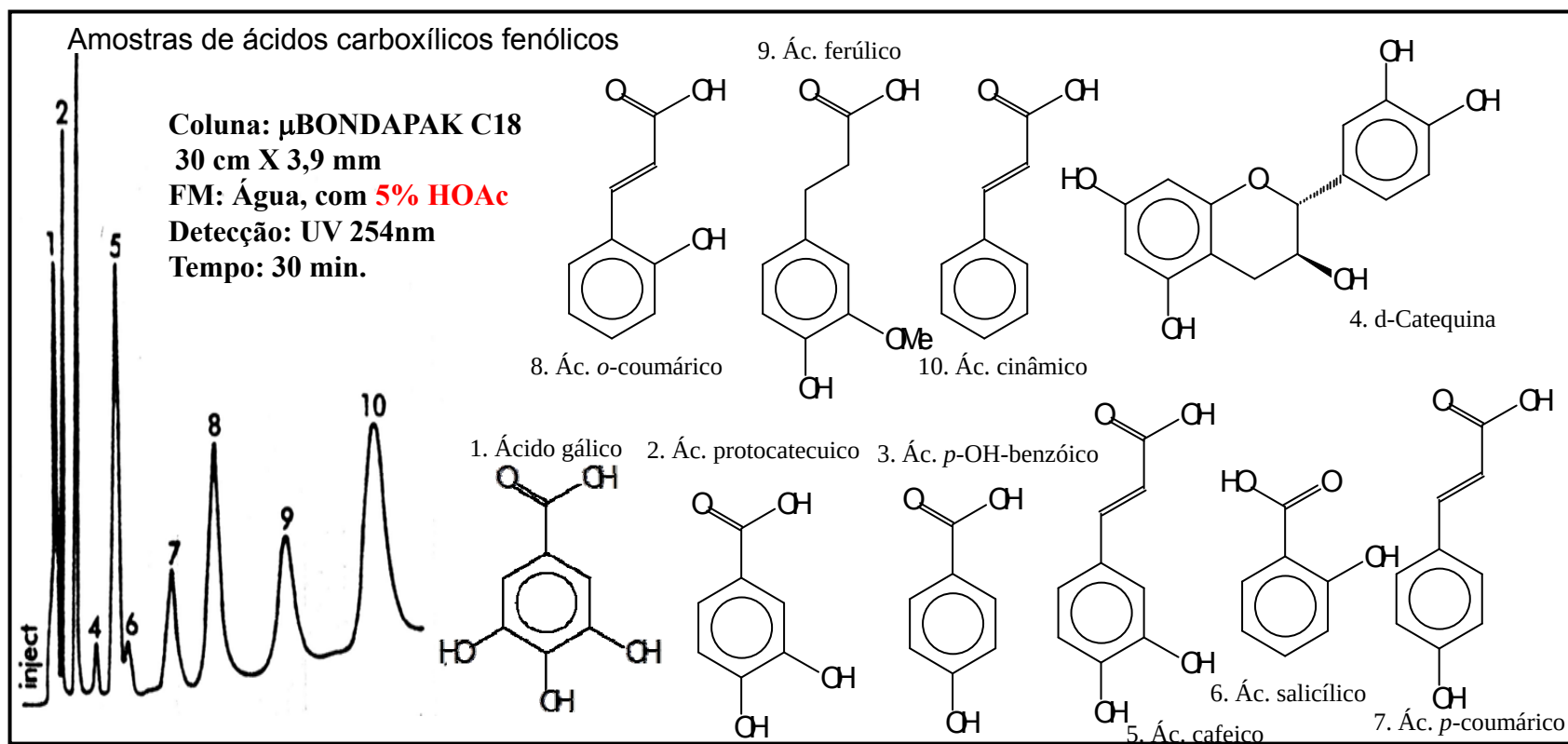


Agentes de supressão iônica melhoram a resolução cromatográfica



Picos assimétricos

Ácido acético ou fórmico para **ácidos**.
triethylamina para **bases**.





Aplicação: antidepressivos tricíclicos

FASE REVERSA (C18)

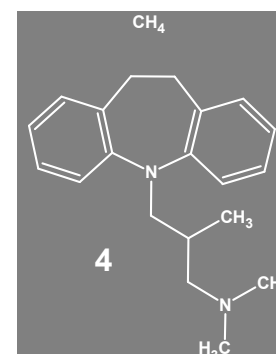
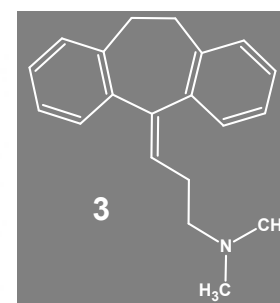
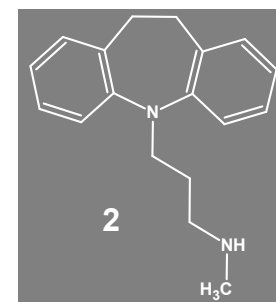
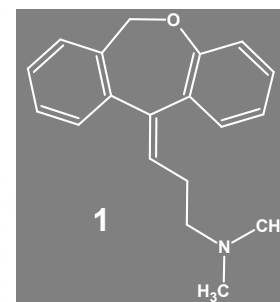
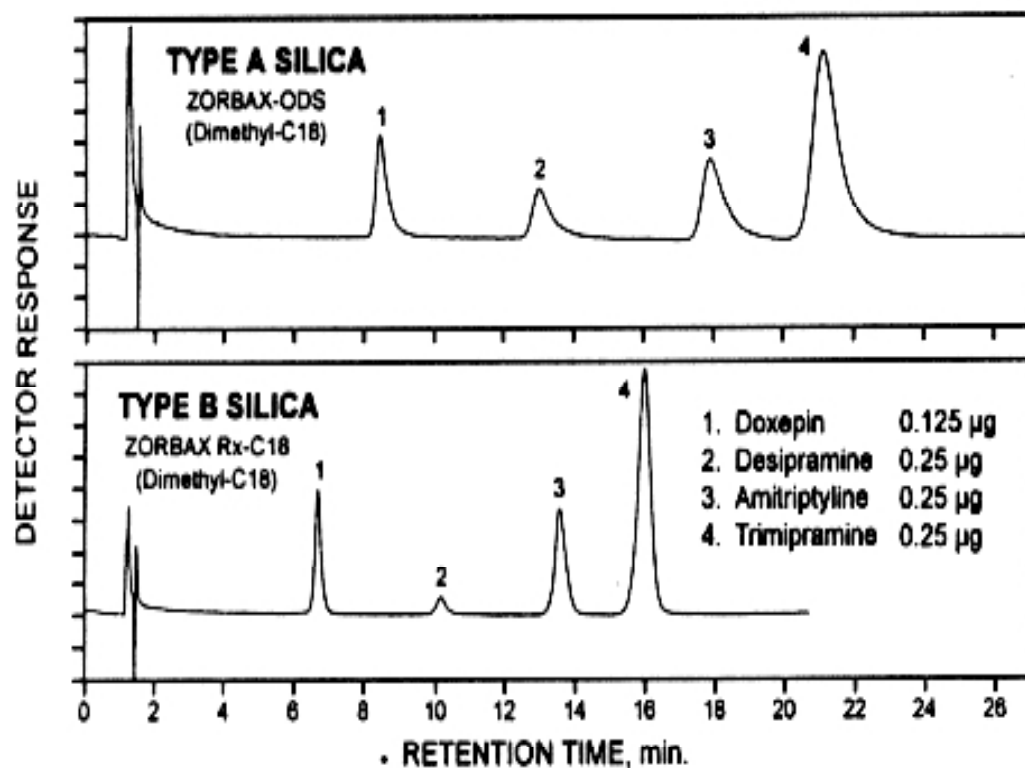
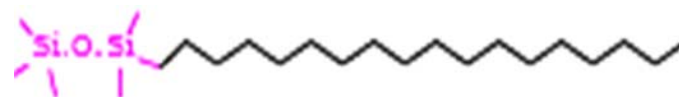
Coluna: Zorbax ODS 5 μ m, 150 x 0,46 mm

FM: ACN/Tampão 30:70 + 0,2% TEA e 0,2% TFA

Tampão Fosfato 25 mM pH 2,5

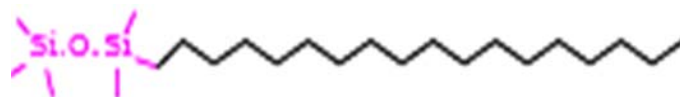
Fluxo: 1,0 mL/min

Detector: UV

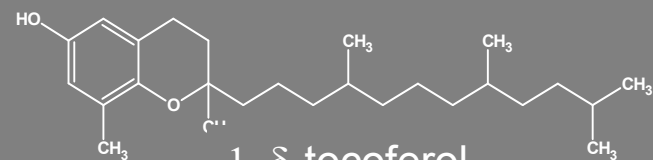
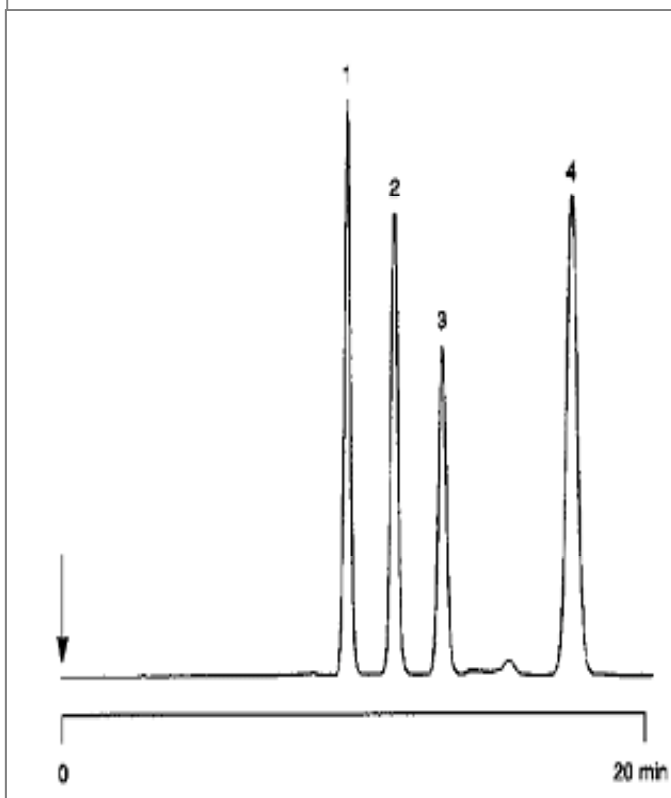




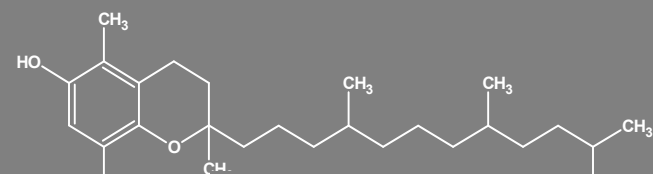
Aplicação: análise de tocoferóis – FASE REVERSA (C18)



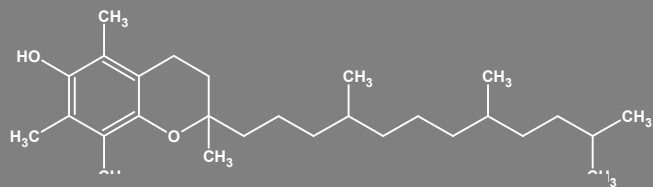
Coluna: Inertisil ODS 250 x 4,6 mm
FM: MeOH a 1,0 mL/min
Detector: UV (λ_e : 295 nm)



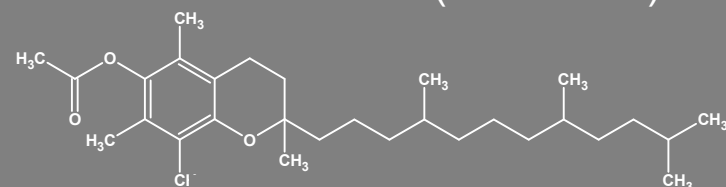
1. δ -tocopherol



2. β -tocopherol



3. α -tocopherol (vitamina E)



4. Vitamina E - acetato



Aplicações das Principais Fases Estacionárias

C ₄ -Butil	Separação de Peptídeos e proteínas
C ₈ -Octil	Solutos pouco ou altamente polares (peptídeos pequenos, proteínas, esteróides, nucleosídeos, fármacos polares , etc...)
C ₁₈ -Octadecil	Solutos apolares ou moderadamente polares, ácidos graxos, glicerídeos, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, estéres, vitaminas solúveis, aminoácidos, fármacos , etc...
-C ₆ H ₅ Fenil	Compostos moderadamente polares
-CN Ciano ou Nitrila	FN :comportamento semelhante à sílica FR : seletividade diferente de C ₈ , C ₁₈ , ou fenil
-NH ₂ Amina	FN : compostos polares (anilinas substituídas, ésteres, pesticidas, etc.) FR :carboidratos



FASE ESTACIONÁRIA (Normais e Reversas)

COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

- **tubo**: aço inoxidável 316 tratado; contém FE

* colunas capilares e nano: tubos de sílica fundida



→ Coluna guarda (*pré-coluna*): C18 (5 μ m)

→ Coluna analítica:
C-18 250 x 4,6mm x 5 μ m

→ Coluna semi-preparativa:
C-18 250 x 21,2mm x 10 μ m





COLONAS CROMATOGRÁFICAS

Descrição	Dimensão	Fluxo típico
Open tubular LC	$d_i < 25 \mu\text{m}$	$< 25 \text{ nL/min}$
Nanobore	$25 \mu\text{m} \leq d_i \leq 100 \mu\text{m}$	$25 - 4000 \text{ nL/min}$
Capillary	$100 \mu\text{m} \leq d_i \leq \text{mm}$	$0,4 - 200 \mu\text{L/min}$
Microbore	$1 \text{ mm} \leq d_i \leq 2,1 \text{ mm}$	$50 - 1000 \mu\text{L/min}$
Narrow (small)-bore	$2,1 \text{ mm} \leq d_i \leq 4 \text{ mm}$	$0,3 - 3,0 \text{ mL/min}$
Normal-bore	$4 \text{ mm} \leq d_i \leq 5 \text{ mm}$	$1,0 - 10 \text{ mL/min}$
Semipreparativa	$5 \text{ mm} \leq d_i \leq 10 \text{ mm}$	$5,0 - 40 \text{ mL/min}$
Preparativa	$d_i > 10 \text{ mm}$	$> 20 \text{ mL/min}$

Tabela IX-9 – Classificação das colunas de separação

Nome preferido	Comprimento (cm)	Diâmetro interno (mm)	Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Tamanho de partícula (μm)
Colunas rápidas	3-10	2-6	1.000-5.000	3
Convencional ou analítica	5-30	2-6	1.000-3.000	3; 5; 10
<i>Small bore</i> ou <i>microbore</i>	10-100	1-2	5-200	1; 3; 5
Capilar recheada	20-200	0,1-0,5	0,1-20	1; 3
Capilar semipermeável	100-10.000	0,02-0,1	0,1-2	1; 3
Capilar aberto ou tubo aberto	100-10.000	0,01-0,075	0,05-2	a
Preparativa	≥ 20	≥ 10	≥ 1.000	>10

a: Filme líquido ligado nas paredes.

CAVALHEIRO, A.J. (IQ-UNESP)



CUIDADOS COM A COLUNA - CLAE

1. Manter a coluna sempre tampada
2. Evitar choques de pressão, térmicos e mecânicos
3. Usar pré-coluna (guard column)
4. Usar solventes ultrafiltrados
5. Pré-tratamento das amostras deve considerar eliminação de partículas e de impurezas que possam ficar adsorvidas
6. Obedecer faixa de pH em que a FE é estável ($2 < \text{pH} < 8$)
7. Eliminar sais, tampões e aditivos de FM antes de armazenar coluna
8. Fazer diagnóstico periódico (N, Simetria e k')

Limpeza

Sílica: Hexanos $\rightarrow$ DCM $\rightarrow$ AcOEt $\rightarrow$ DCM $\rightarrow$ Hexanos (20 V_m de cada)

Fase reversa: MeOH ou ACN 100% $\rightarrow$ DCM $\rightarrow$ MeOH ou ACN 100%

Fluxo: 1 a 2 mL/min

Cavalheiro, A. J. IQ-UNESP



PRÉ-COLUNA (*guard column*)

Instalada entre o injetor e a coluna, com cerca de 2 cm de compr., tem a função de:

1. Remover partículas;
2. Remover substâncias que teriam forte interação com a coluna;
3. Remover substâncias que possam precipitar quando em contato com FM e FE.
4. Resumindo, aumentar o tempo de vida das colunas.

As pré-coluna devem ser substituídas regularmente.

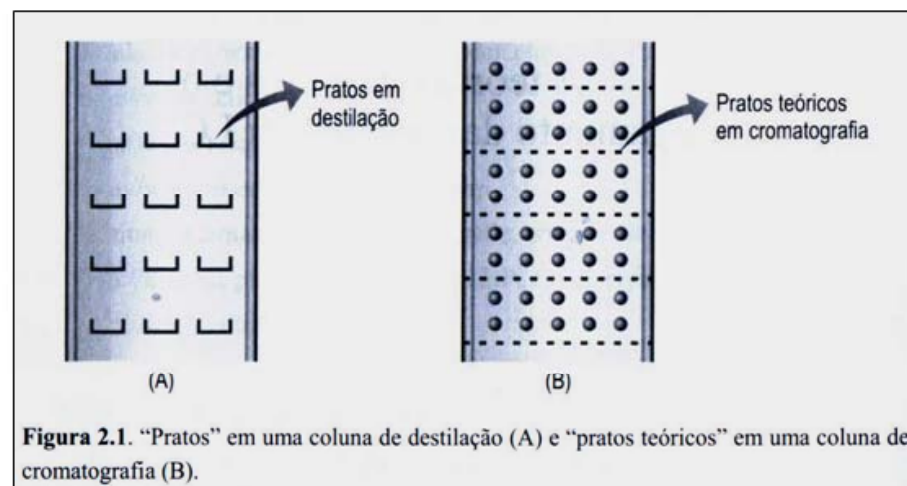


Otimização dos parâmetros envolvidos na separação cromatográfica

PRATOS TEÓRICOS

Conceito baseado na analogia entre CROMATOGRAFIA, DESTILAÇÃO e EXTRAÇÃO COM SOLVENTES.

*Martin; Synge. *Biochem. J.*, 75, 1538, 1941.



**COLUNA
CROMATOGRÁFICA**



vários estágios de extração líq.-líq.
ou de pratos teóricos (destilação)

PRATO TEÓRICO: segmento da coluna onde se atinge um equilíbrio termodinâmico entre FM, FE e analito.



NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS E ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO TEÓRICO

Número de **Pratos Teóricos** expressa **Eficiência** em Cromatografia.

> nº de pratos teóricos $\Rightarrow$ > eficiência da coluna

Altura Equivalente a um Prato Teórico (H)

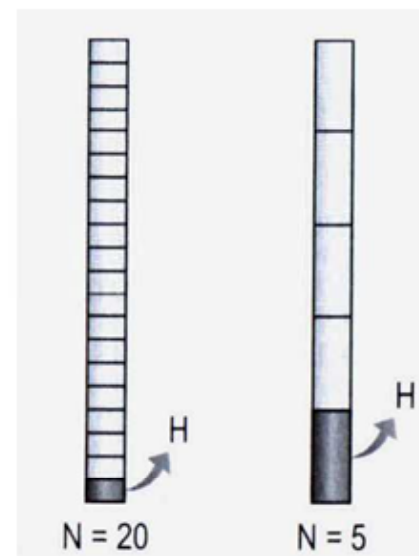
(Height Equivalent to a Theoretical Plate - HEPT)

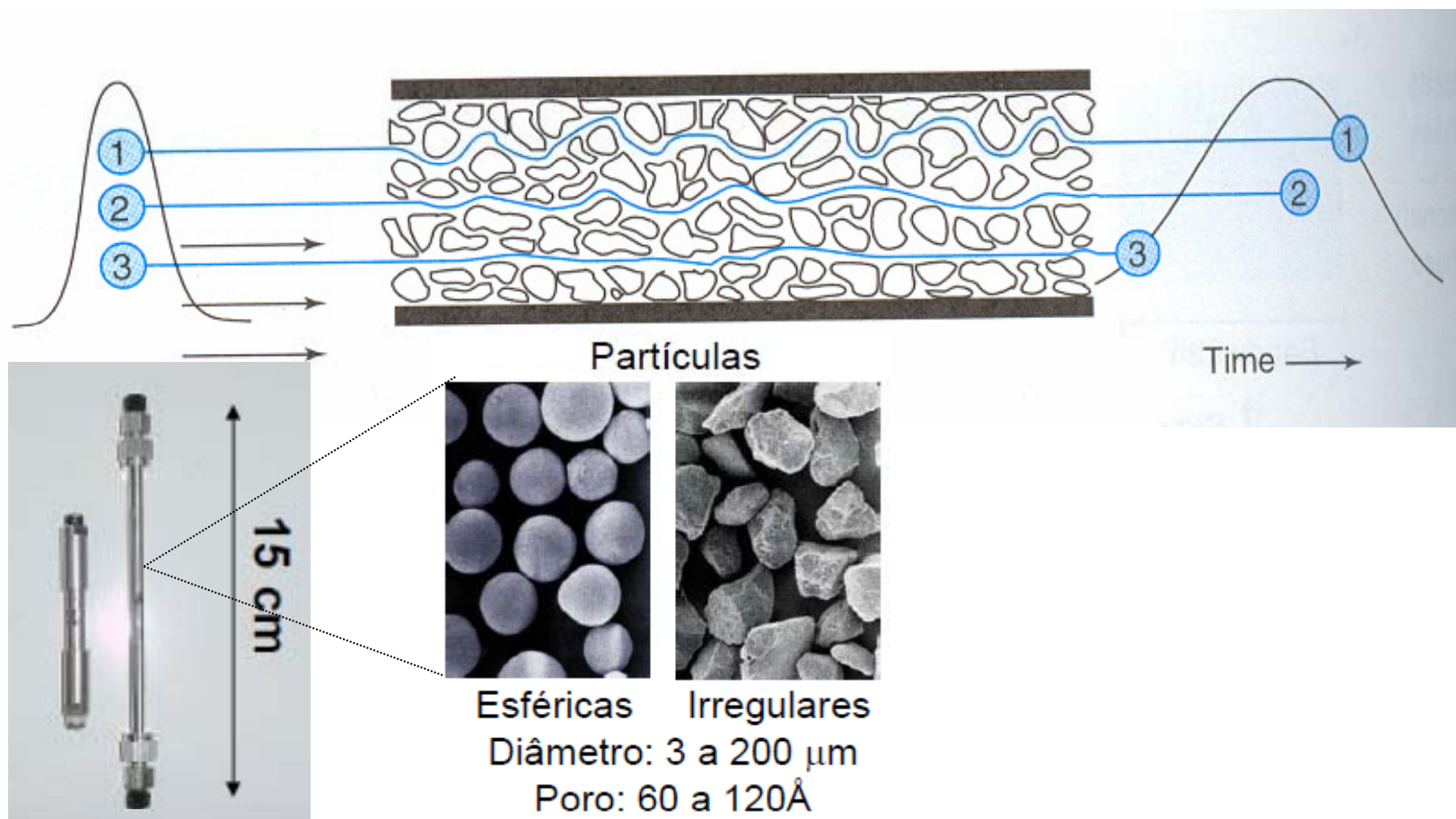
$$H = \frac{L}{N}$$

L : comprimento da coluna

N : nº de pratos teóricos

$$< H \Rightarrow > N$$





Column Length[mm]	Number of Theoretical Plates		
	Particle Size		
	5 μm	3 μm	2 μm
150	80,000	120,000	190,000
100	67,000	80,000	160,000
50	33,000	40,000	80,000



EQUAÇÃO DE van DEEMTER E SUAS MODIFICAÇÕES

Equação original de van Deemter:

$$H = A + B/\bar{\mu} + C \cdot \bar{\mu}$$

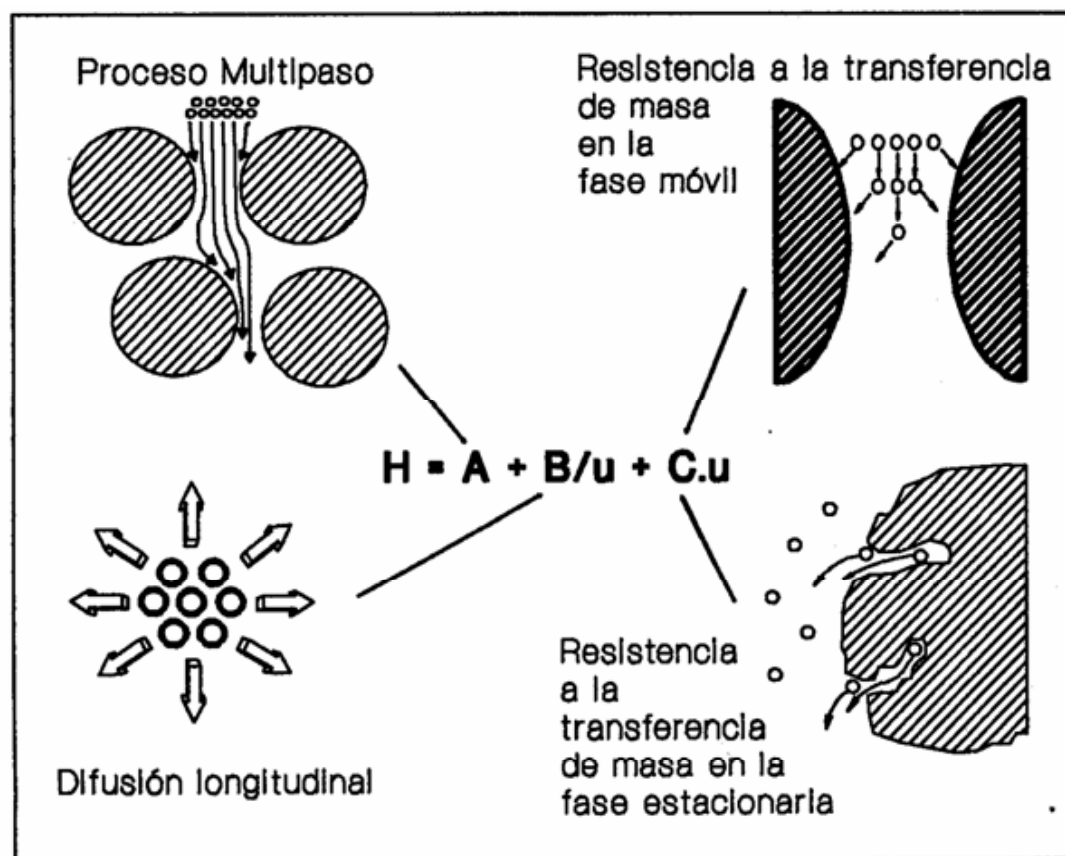
H: altura equivalente a 1 prato teórico

A: termo para difusão turbulenta

B: termo para difusão longitudinal

C: termo para transferência de massa

$\bar{\mu}$: velocidade linear média da FM



Equação de van Deemter estendida (Cromatografia Líquida):

$$H = A + B/\bar{\mu} + (C_{fe} + C_{fm}) \cdot \bar{\mu}$$

$$H = 2 \cdot \lambda \cdot d_p + \frac{2 \cdot \psi \cdot D_M}{\bar{\mu}} + \frac{q \cdot k \cdot d_f^2}{(1+k)^2 \cdot D_s} \cdot \bar{\mu} + \frac{w \cdot d_p^2}{D_M} \cdot \bar{\mu}$$

H: altura equivalente a 1 prato teórico

λ : fator de empacotamento determinado pelas características do leito cromatográfico

d_p : diâmetro médio das partículas

ψ : fator de obstrução (devido ao fluxo irregular no leito)

D_M : coeficiente de difusão do soluto na FM

$\bar{\mu}$: velocidade linear média da FM

q : fator de configuração determinado pela natureza da FE

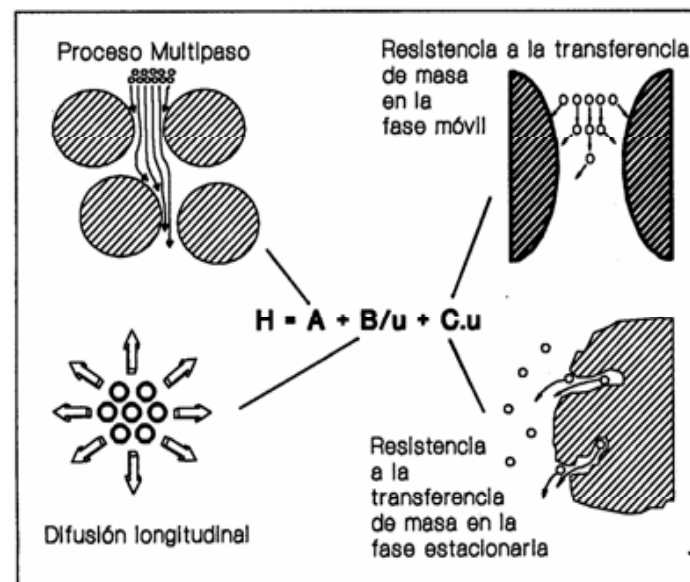
k : fator de retenção

d_f : profundidade do líquido de recobrimento

D_s : coeficiente de difusão do soluto na FE

w : fator de determinado pela natureza do empacotamento

d_p : diâmetro médio das partículas



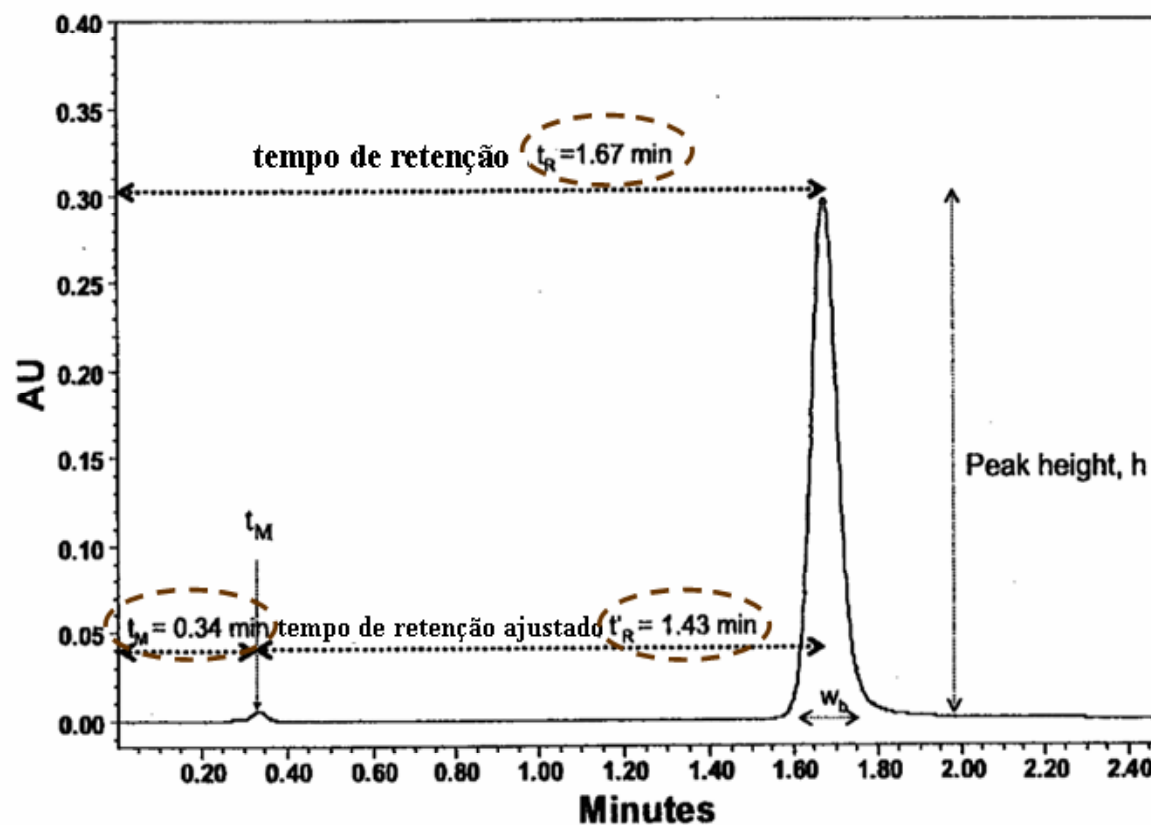


Tempo de retenção e tempo de retenção ajustado

t_M (t_0) – **tempo morto**: tempo em que elui 1 componente que não interage com a FE

t_R – **tempo de retenção**: tempo necessário para eluir uma substância de um determinado sistema cromatográfico (máximo do pico cromatográfico).

t_R' – **tempo de retenção ajustado**: $t_R' = t_R - t_M$





Fluxo (F_c ou F): vazão da FM, geralmente em mL/min.

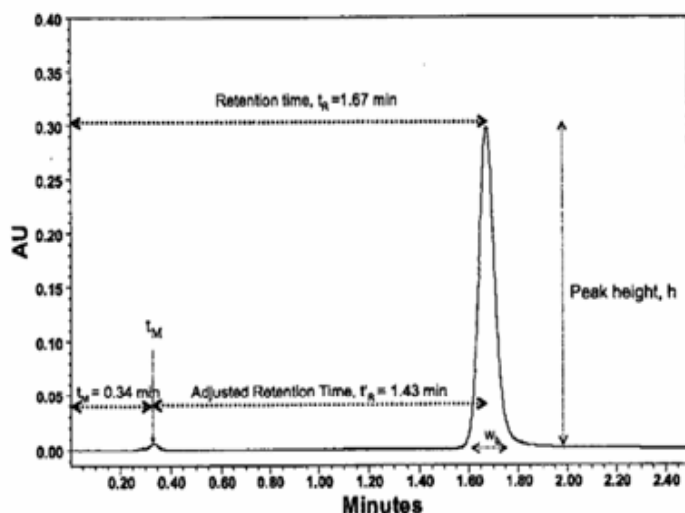
Volume morto (V_M): volume de FM necessário para preencher todos os interstícios e poros da FE; ou volume de FM necessário para eluir uma substância que não interage com a FE.

$$V_M = t_M \cdot F_c \text{ ou } V_M = 0,65 \cdot V_{\text{coluna}} \text{ ou } V_M = 0,65 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot L \text{ ou } V_M = 0,5 \cdot d^2 \cdot L$$

(r : raio interno; d : diâmetro interno; L : comprimento)

Volume de retenção (V_R): volume de FM necessário para eluir uma substância de um determinado sistema cromatográfico.

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (V_R' = t_R' \cdot F_c)$$





Fator de retenção (k)

relação de partição/ relação de retenção/ fator de capacidade (k')

- razão de distribuição do analito entre FE e FM.
- > k, > afinidade pela FE.
- posição de 1 pico no cromatograma depende da vazão (fluxo) e do **fator de retenção**.

$$k = \frac{m_e}{m_m} = \frac{K}{\beta}$$

m_e : massa do analito na FE

m_m : massa do analito na FM

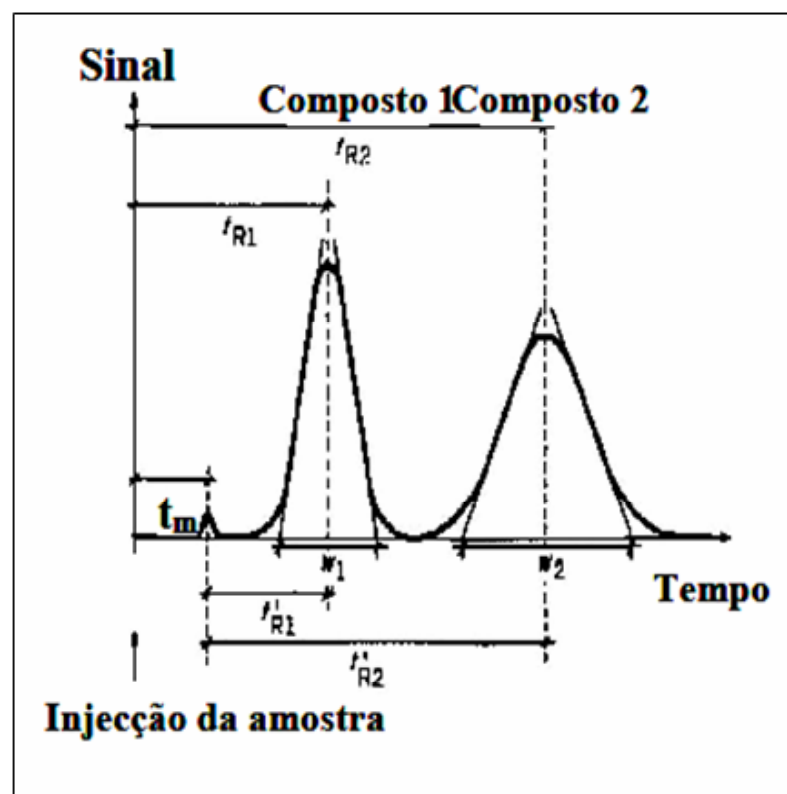
K: coeficiente de distribuição

$\beta = V_{FM} / V_{FE}$

$$t_R = t_M + t_M \cdot k$$

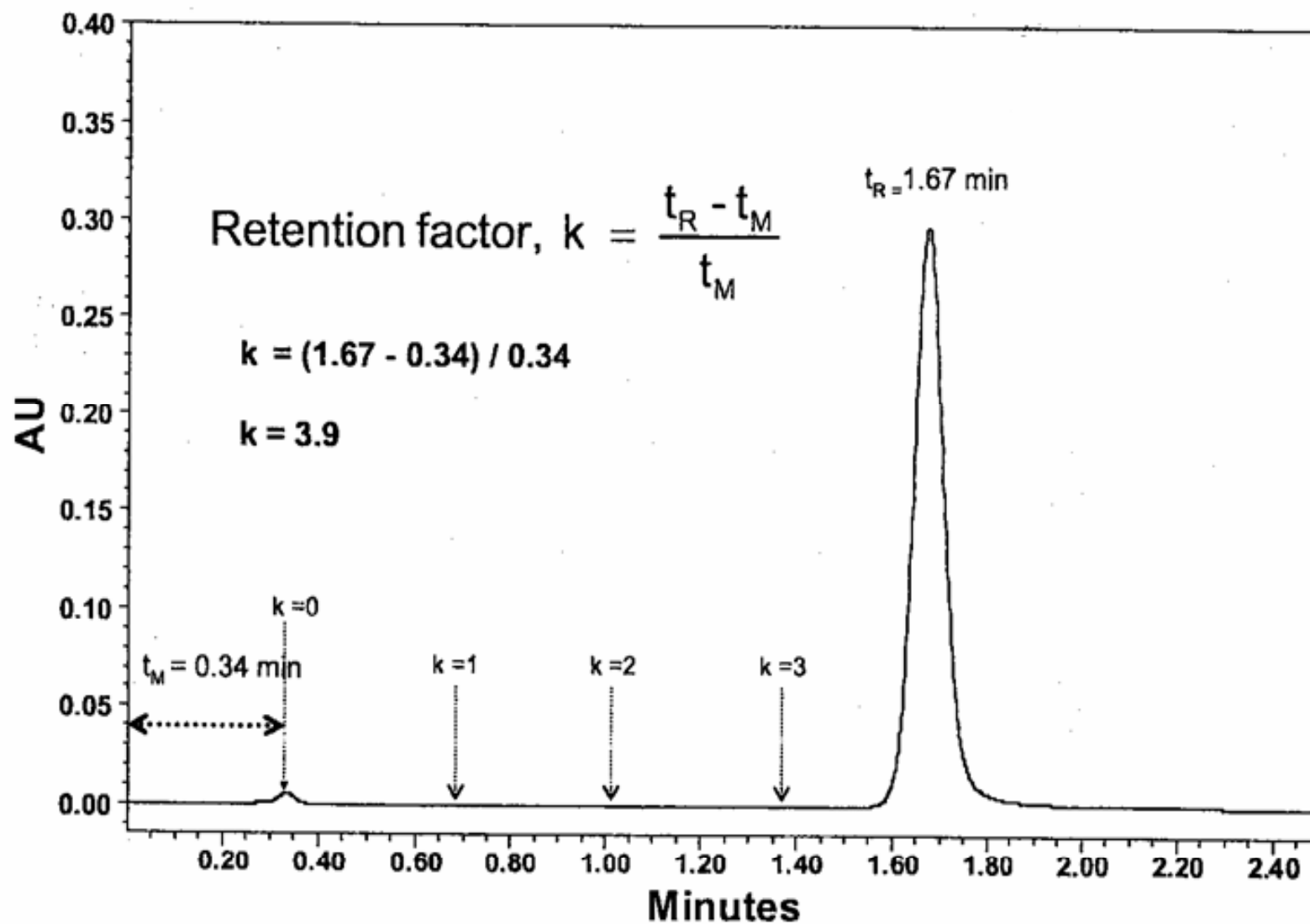
$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$> k \Rightarrow > t_R$$





CÁLCULO DO FATOR DE RETENÇÃO (k)



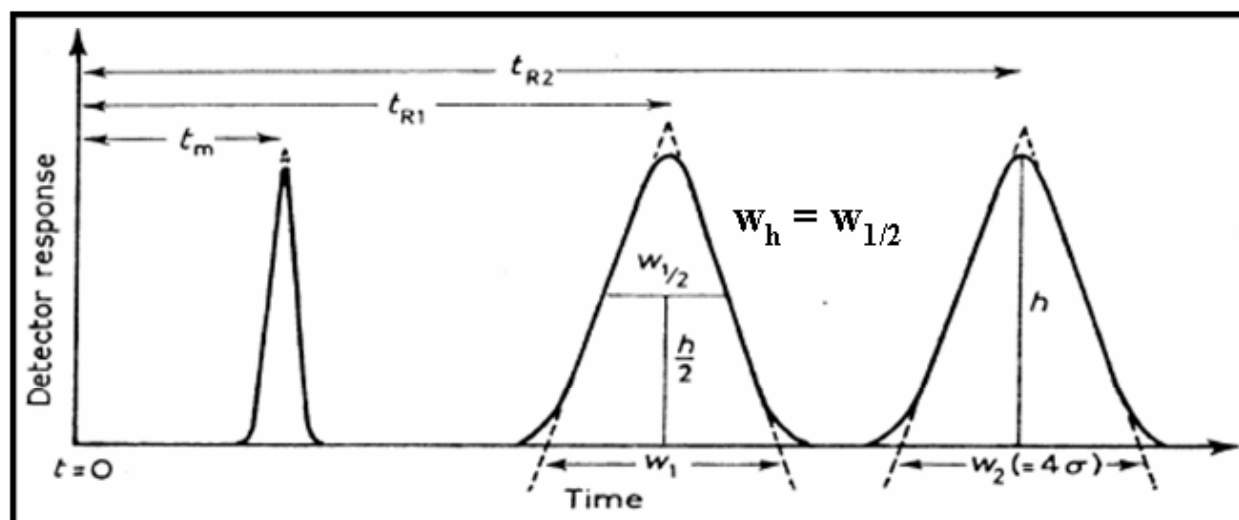


Eficiência da coluna (N)

- relação entre tempo de permanência do analito na coluna e alargamento de bandas.
- determinada pelo **número de pratos teóricos (N)**.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

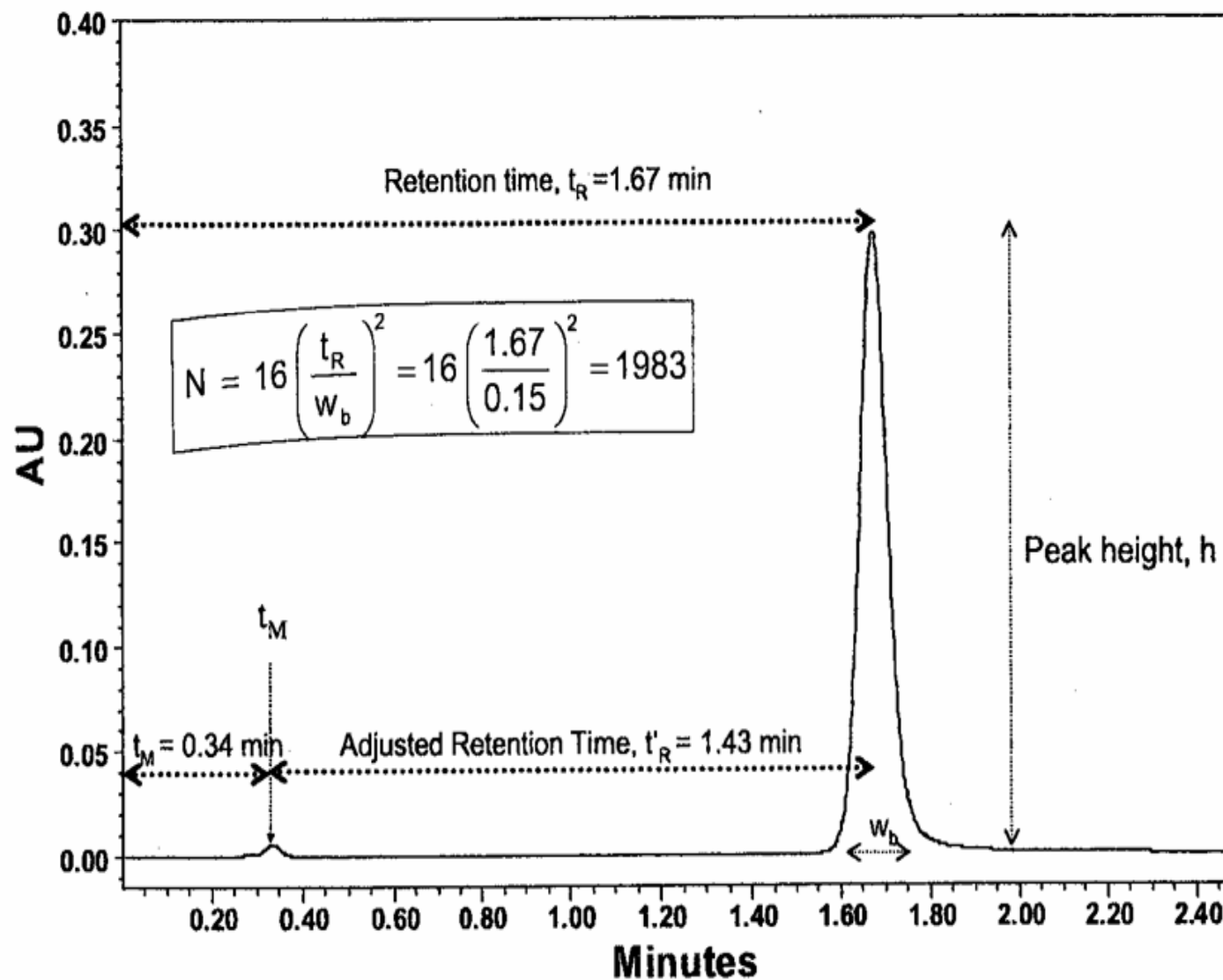
$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$



- **número de pratos teóricos efetivos (N_{ef})**: substitui-se t_R por t_R'



CÁLCULO DA EFICIÊNCIA (N)





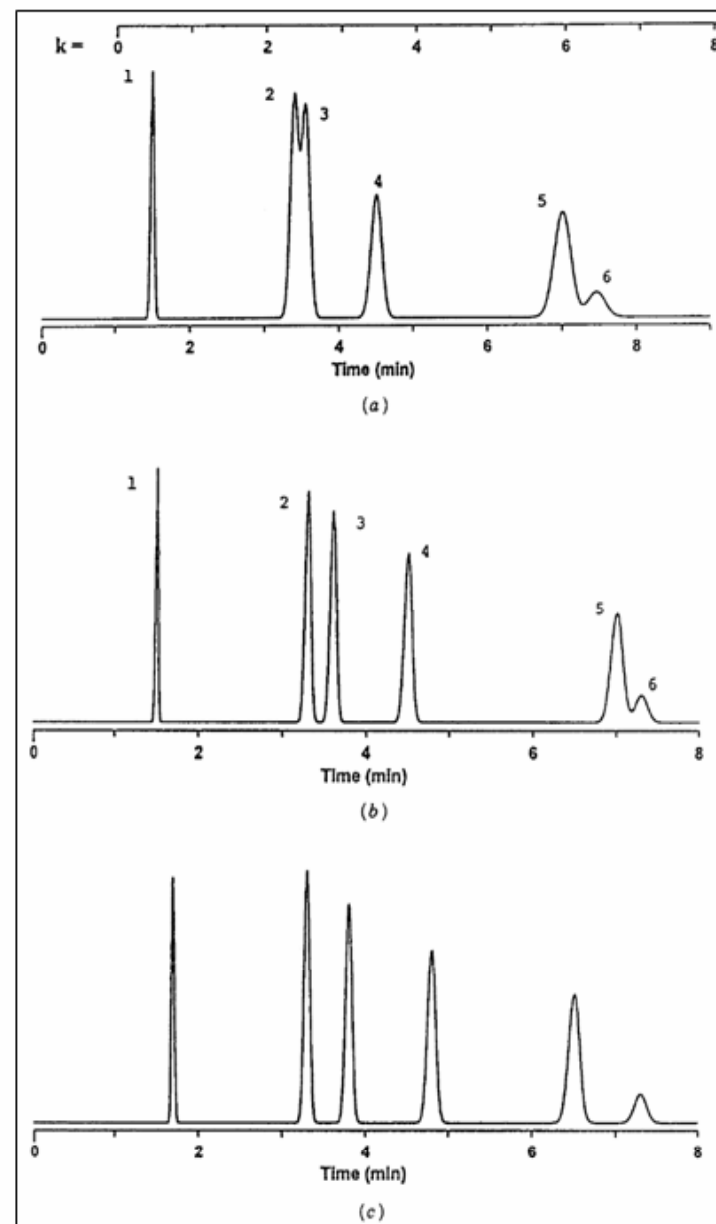
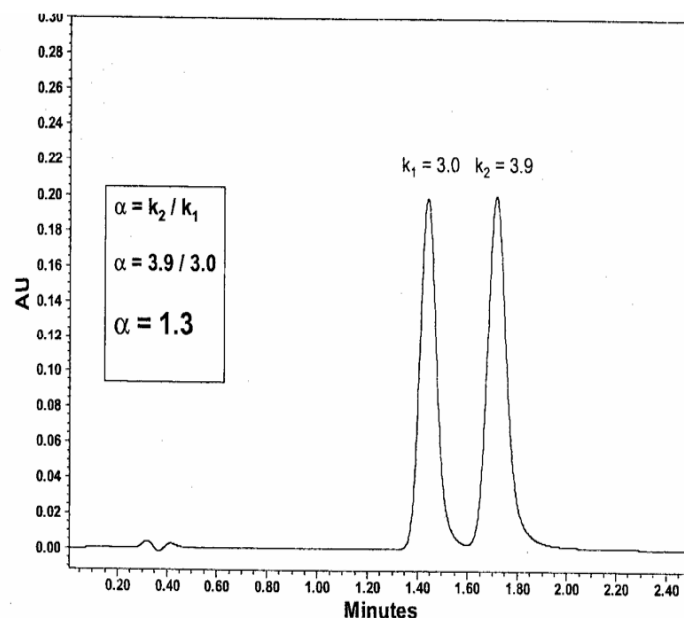
Retenção Relativa ou Fator de Separação (α) Seletividade

- razão entre fatores de retenção de 2 analitos.

$> \alpha$, melhor a separação

$$\alpha = \frac{t_{R(b)}}{t_{R(a)}} = \frac{k_b}{k_a}$$

CÁLCULO DO FATOR DE SEPARAÇÃO (α)





Equação de Purnell: A Equação Fundamental da Resolução em HPLC

Resolução (R_s)

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{(k'_2 + 1)}$$

EFICIÊNCIA

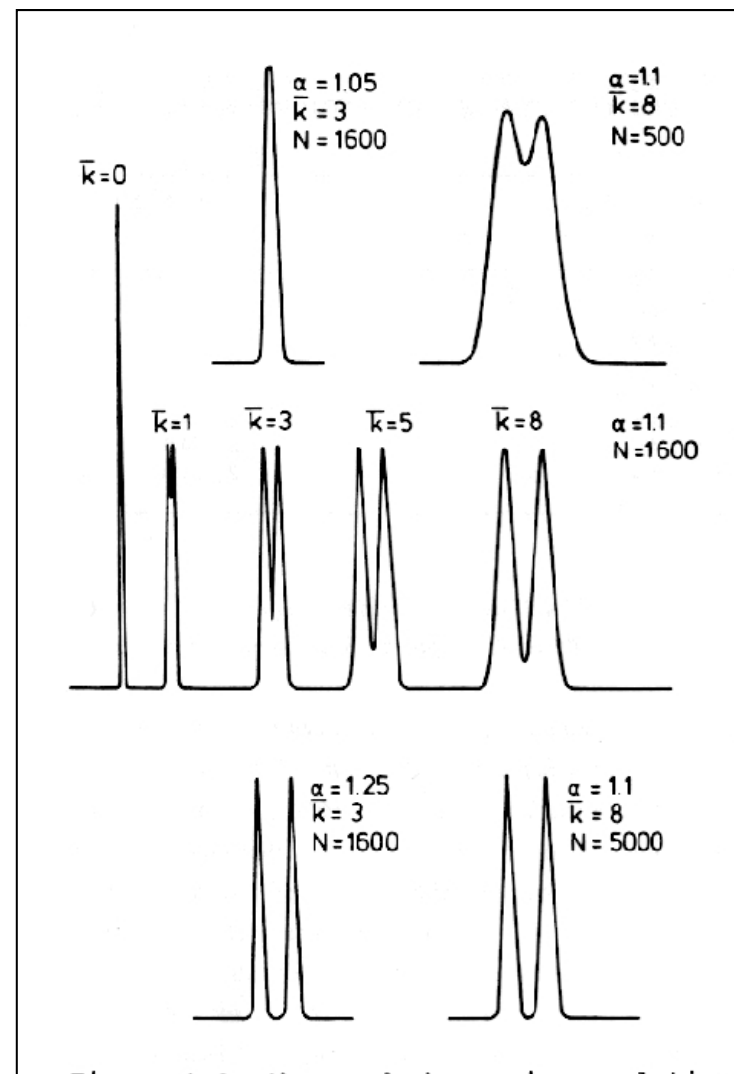
Depende da
configuração
do sistema

FATORES FÍSICOS

SELETIVIDADE

RETENÇÃO

FATORES QUÍMICOS



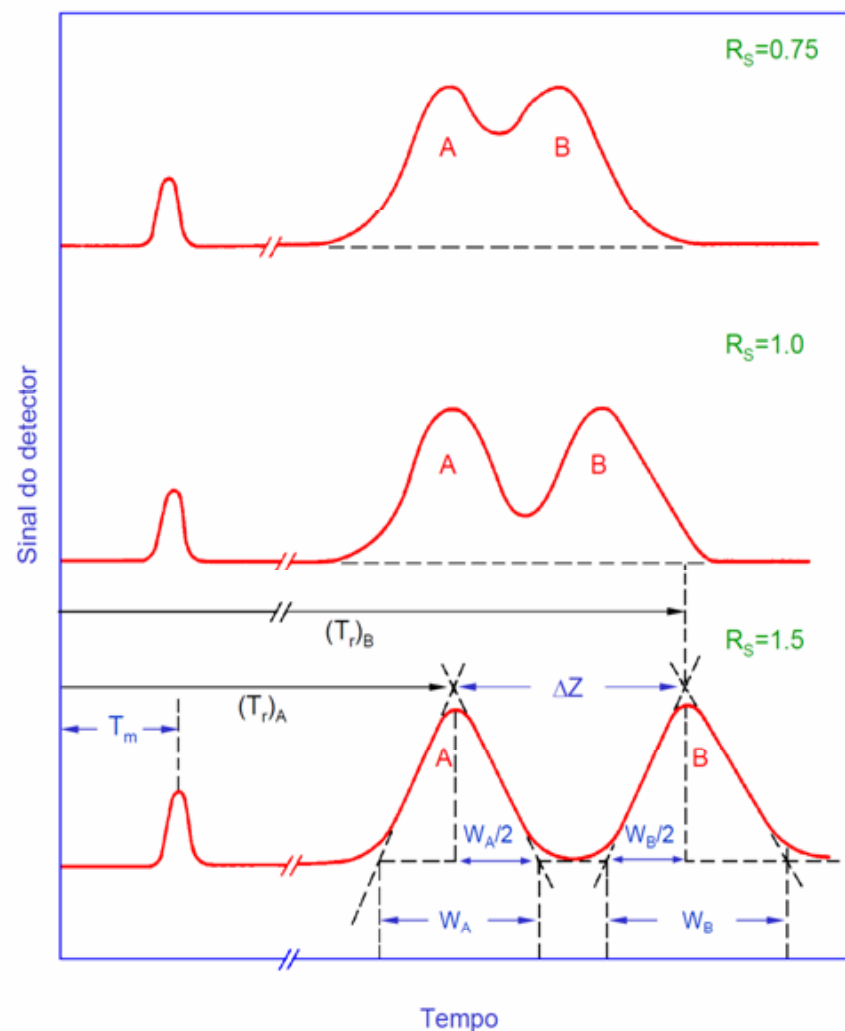


Resolução (R_s)

- indica a qualidade da separação entre duas bandas cromatográficas.
- Resolução completa: $R_s > 1,25$ (ou 1,5).

$$R_s = 2 \cdot \frac{(tr_2 - tr_1)}{(w_1 + w_2)}$$

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



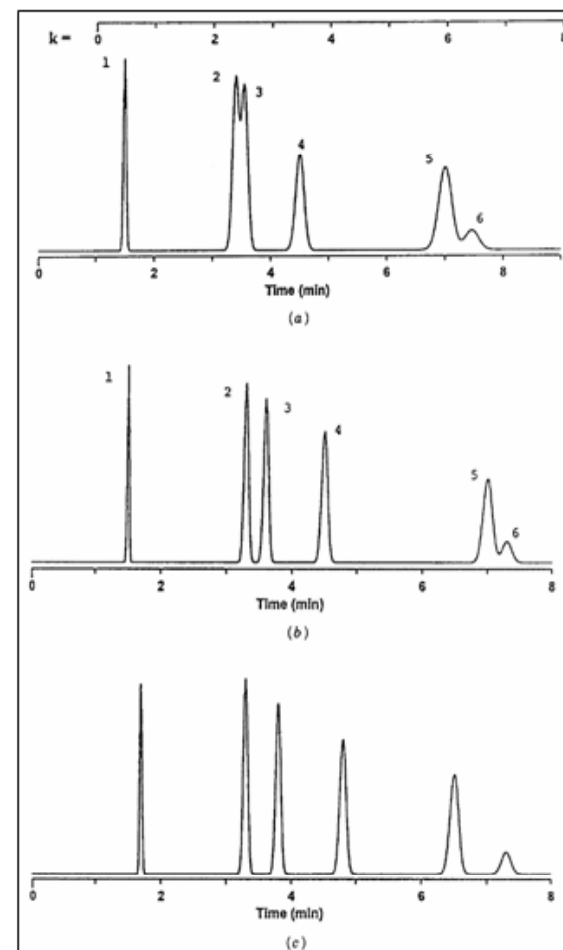
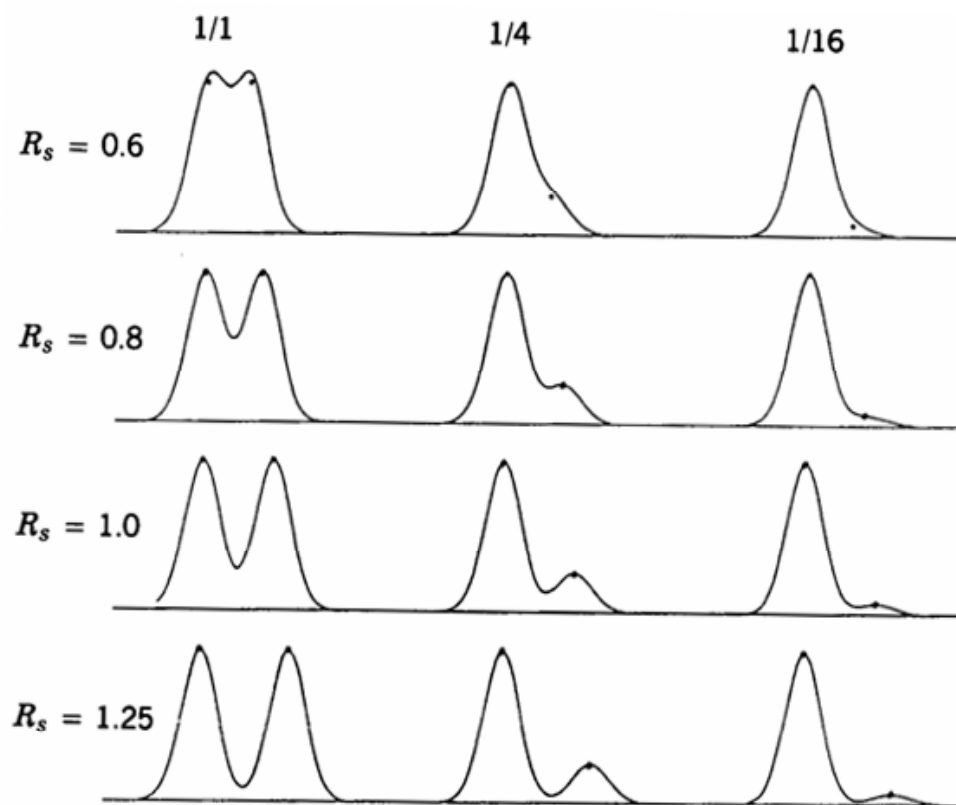


MEDIDAS DE R_s A PARTIR DE CROMATOGRAMAS

2. Comparação com Curvas de Resolução Padrão

- comparação visual.
- considera-se pares de bandas com proporções semelhantes de altura ou área.

Curvas de Resolução Padrão





RESOLUÇÃO COMO FUNÇÃO DAS CONDIÇÕES - N , k e α

Algumas condições que afetam k e α :

1. Composição da FM
2. Composição da FE
3. Temperatura

Algumas condições que afetam N :

1. Fluxo ou vazão (F)
2. Comprimento da coluna (L)
3. Tamanho da partícula

→ inicialmente, alteram-se as condições que afetam k e α .

Resolução (R_s)

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{(k'_2 + 1)}$$





Força de Eluição e efeito sobre k e R_s

- 2 componentes que eluem próximos a t_0 : $k \approx 0$ e $R_s \approx 0$.
- VARIAÇÃO NA FORÇA DE ELUIÇÃO DA FM = VARIAÇÃO DE k

- valor ideal de k : $0,5 < k < 20$

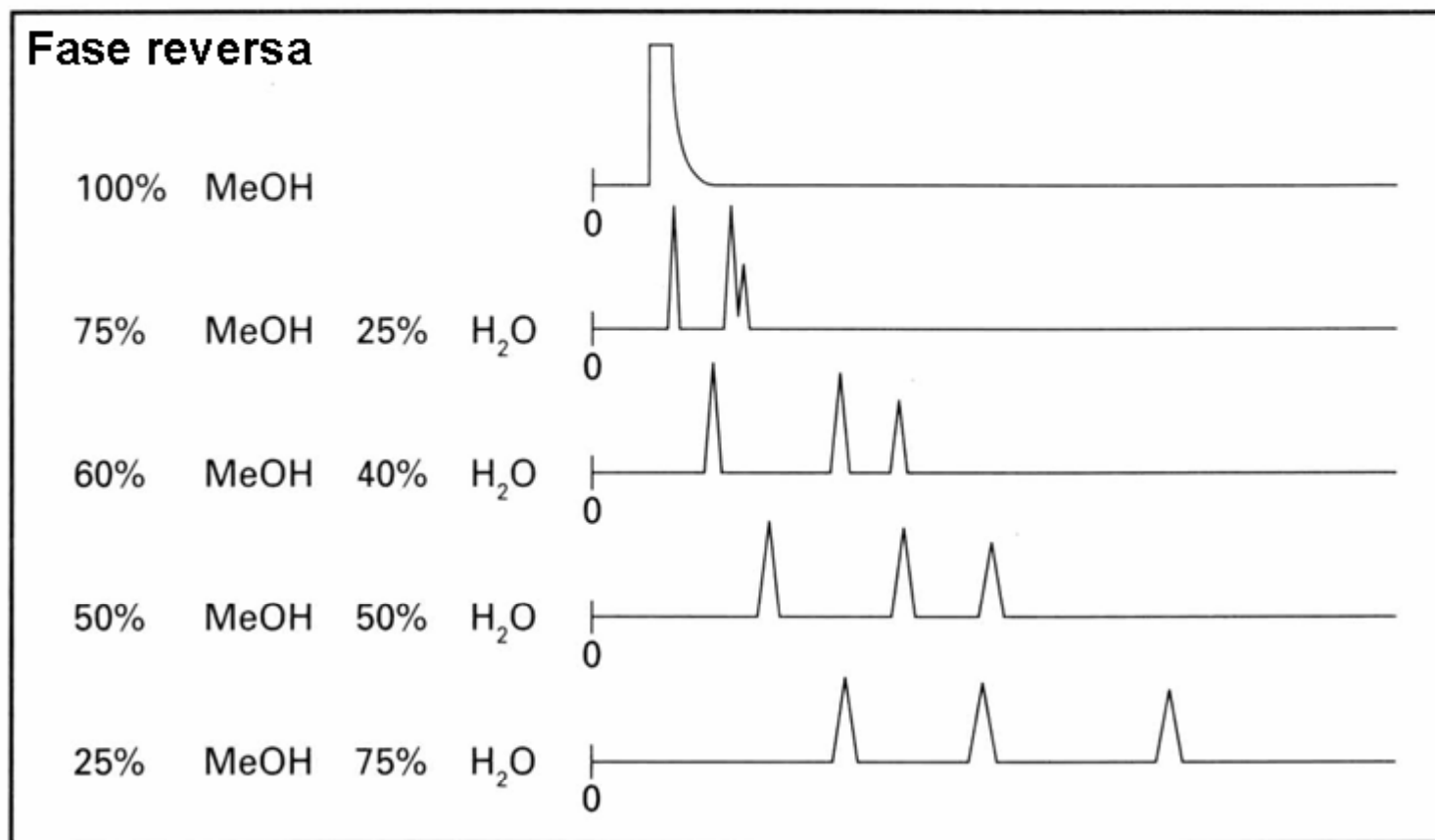
$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

TABLE 2.1 Controlling Sample Retention by Changing Solvent Strength

HPLC Method	How Solvent Strength Is Usually Varied ^a
Reversed phase	Water (A) plus organic solvent (B) (e.g., water–acetonitrile); increase in % B decreases k .
Normal phase	Nonpolar organic solvent (A) plus polar organic solvent (B) (e.g., hexane–propanol); increase in % B decreases k .



Força de Eluição e efeito sobre k e R_s



Efeito da concentração de metanol no tempo de retenção de compostos analisados



Efeito da seletividade (α) sobre R_s

1. Mudanças na FM

- alteração da força de eluição (ϵ): aumenta-se ou diminui-se a proporção do solvente com maior força de eluição.
- alteração da seletividade: troca por solvente com força de eluição semelhante

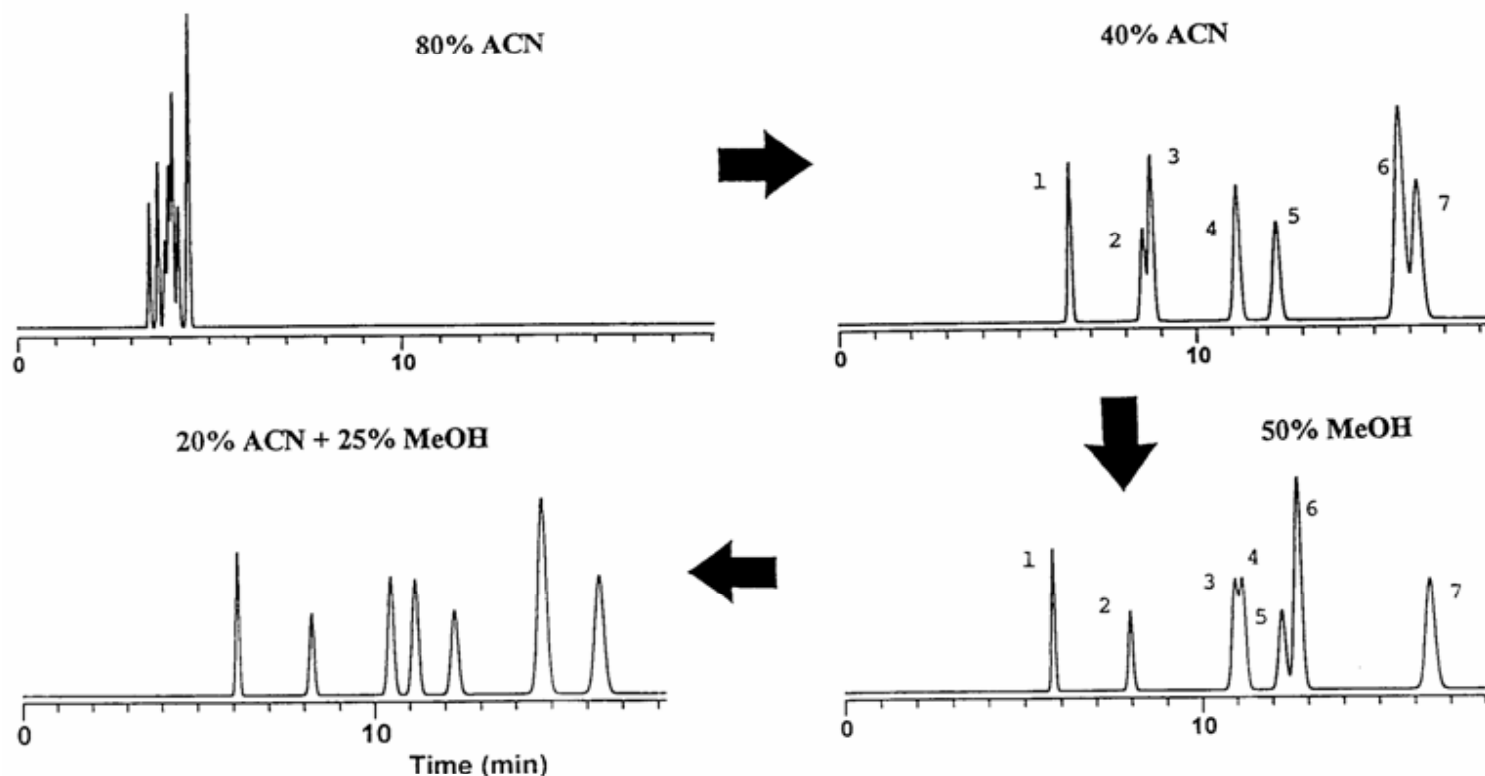


FIGURE 2.8 Hypothetical series of method-development experiments, beginning with a strong mobile phase of 80% acetonitrile–water (80% ACN). MeOH refers to methanol. See the text for details.

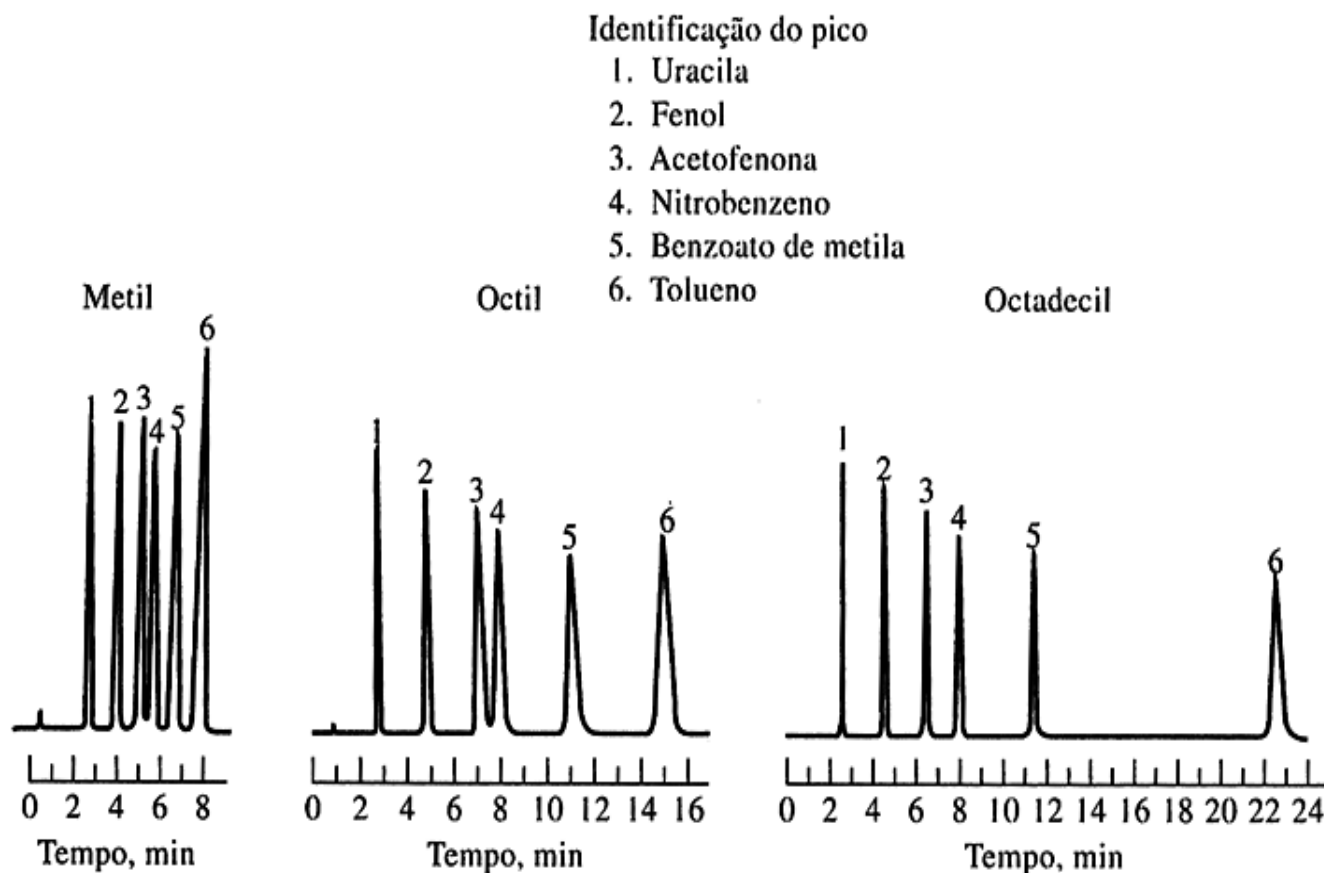


Efeito da Seletividade (α) sobre R_s

2. Mudanças na FE

- geralmente acompanhada por mudanças na FM

Ex. $FE_{\text{inicial}} = \text{Metil}$; $FE_{\text{alternativas}} = \text{C8, C18}$

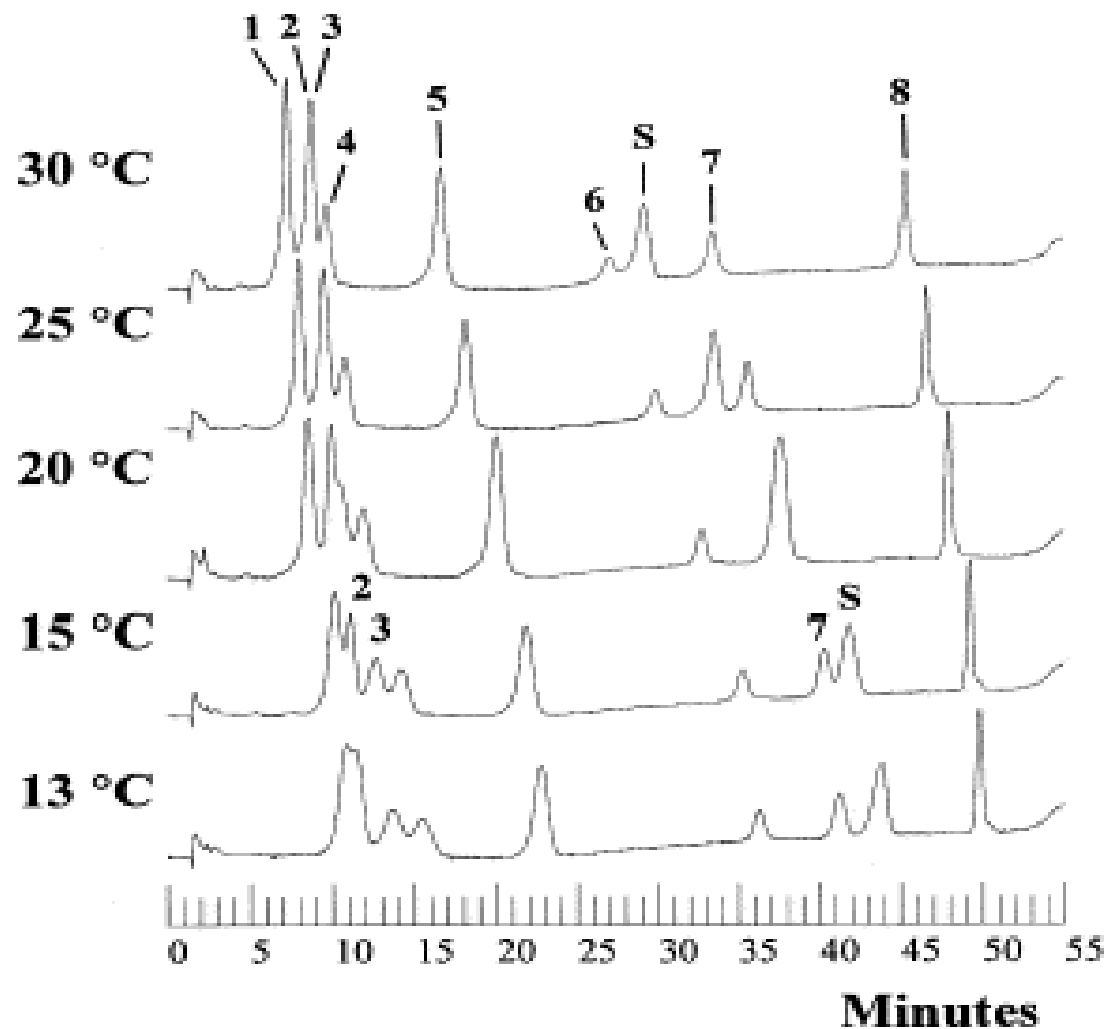




Efeito da Seletividade (α) sobre R_s

3. Mudanças na temperatura

$\uparrow 1^\circ\text{C} \Rightarrow \downarrow k \text{ de } 1\text{-}2\% \Rightarrow \uparrow \alpha$





Efeito da Eficiência (N) sobre R_s

O número de pratos teóricos (N) aumenta com os seguintes fatores:

1. Colunas bem empacotadas
2. Colunas com maior comprimento (L)
3. Fluxos menores
4. Menor tamanho de partículas da FE
5. Menor viscosidade da FM e menor temperatura
6. Amostra contendo moléculas pequenas
7. Efeitos extra-coluna mínimos

Efeitos do injetor ou *autosampler*

Efeitos dos tubos conectores

Efeitos da cela do detector

Efeitos que produzem
alargamento de picos
extra-coluna

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$



Volume de Injeção x Máxima Resolução

➤ Para evitar a saturação dos sítios de interação da coluna, o que pode causar uma piora na resolução cromatográfica, não se deve injetar um volume maior que 1% do volume da coluna vazia.

➤ Cálculo do volume máximo

$$V_{\text{máximo}} (\mu\text{L}) = \pi (\text{raio})^2 (\text{comprimento}) (0,01)$$

Dimensão da coluna	$V_{\text{máximo}}$ de injeção
7,8 mm x 30 cm	140 μL
3,9 mm x 30 cm	35 μL
3,9 mm x 15 cm	18 μL
4,6 mm x 10 cm	16 μL

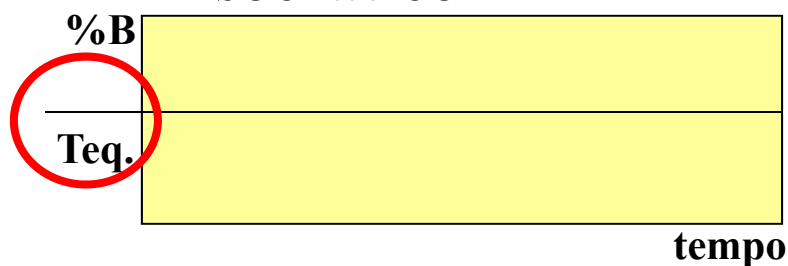
$d \times L$, onde d =diâmetro em mm e L =comprimento da coluna em cm



Otimização Cromatográfica

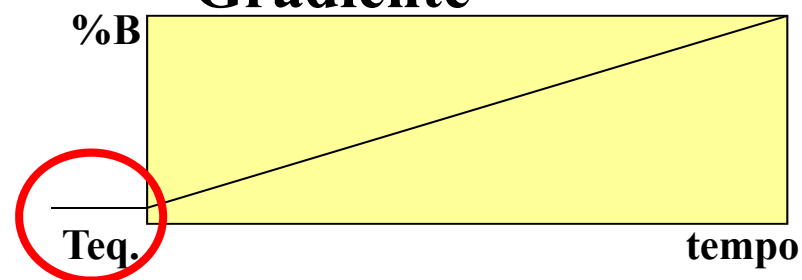
Modos de eluição em Cromatografia Líquida

Isocrático



$$k' = (t_R - t_m)/t_m$$
$$\downarrow \%B \Rightarrow \uparrow k'$$
$$\uparrow k' \Rightarrow \uparrow t_R$$
$$\uparrow t_R \Rightarrow \uparrow W \text{ e } \downarrow \text{Int.}$$

Gradiente



$$k^* = (20.F)/(V_m \cdot \%/\text{min})$$
$$\downarrow \%/\text{min} \Rightarrow \uparrow k^*$$
$$\uparrow k^* \Rightarrow \uparrow t_R$$
$$\uparrow t_R \Rightarrow \uparrow W \text{ e } \downarrow \text{Int.}$$



Otimização Cromatográfica

Modo Isocrático ou Gradiente?

Gradiente exploratório utilizado para testes iniciais:

Coluna RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 mm

Gradiente Linear: 5 a 100 % de ACN, 60'

Fluxo: 2,0 mL/min.

**Amostra: < 50 uL; 50-100 mg
(0,5 - 1 mg/mL)**

➤ **Modo Isocrático possível**
 $\Delta tr/tg < 0,25$ $1 < k' < 10$

$\Delta tr/tg < 0,40$ $0,5 < k' < 20$

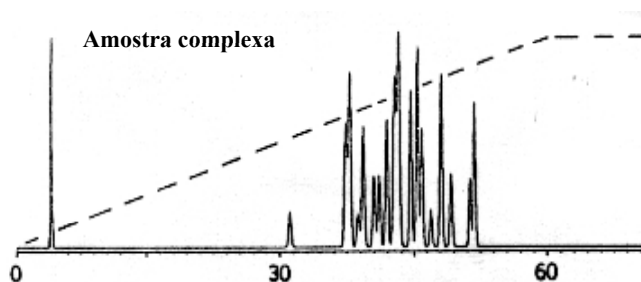
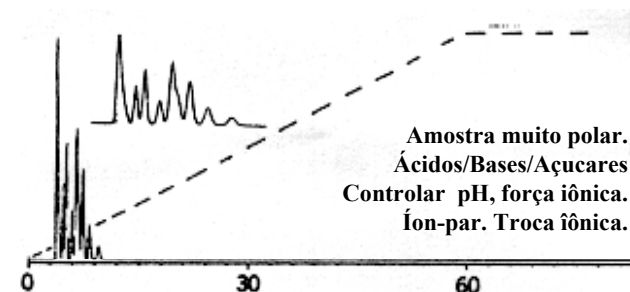
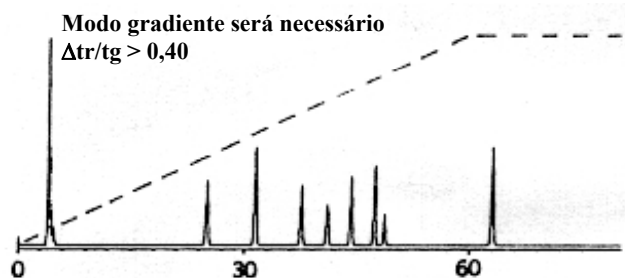
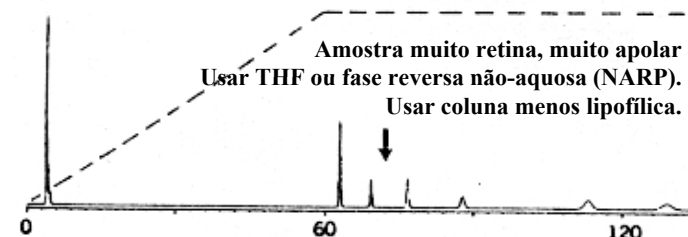
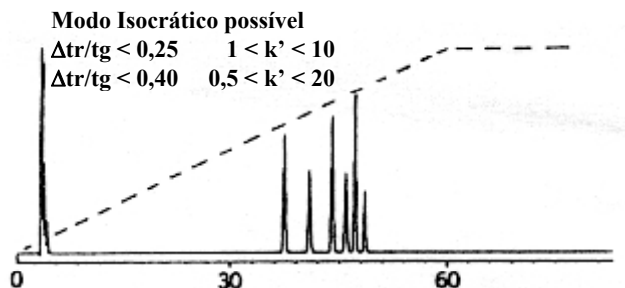
➤ **Modo gradiente será necessário se:**

$\Delta tr/tg > 0,40$

**Onde Δtr = tr do último pico - tr do primeiro pico
/tg = tempo total de gradiente exploratório**



FASE REVERSA C-18 - AVALIAÇÃO DA AMOSTRA GRADIENTE EXPLORATÓRIO



Coluna RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m
Gradiente Linear: 5 a 100 % de ACN, 60'
Fluxo: 2,0 mL/min.
Detetor: DAD ou 254 nm
Amostra: < 50 μ L; 50-100 μ g
(0,5 - 1 mg/mL)

CAVALHEIRO, A.J. (IQ-UNESP)

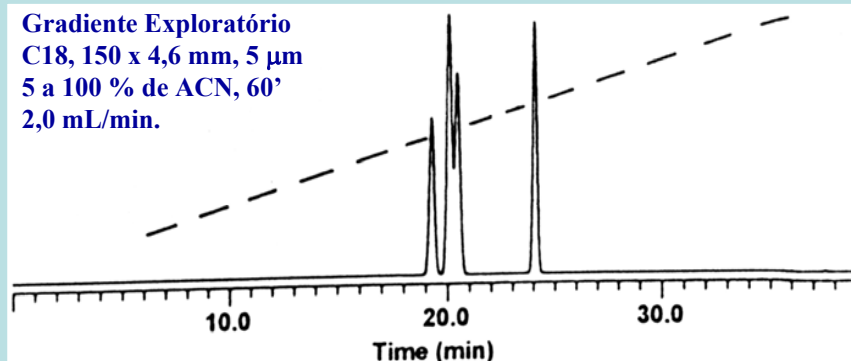


Amostra fácil – modo isocrático possível

$\Delta t_R/t_G = (24 - 19)/60 = 0,083 \Rightarrow < 0,25$

$t_{Rp} = 19 \text{ min.} \quad t_{Ru} = 24 \text{ min.}$

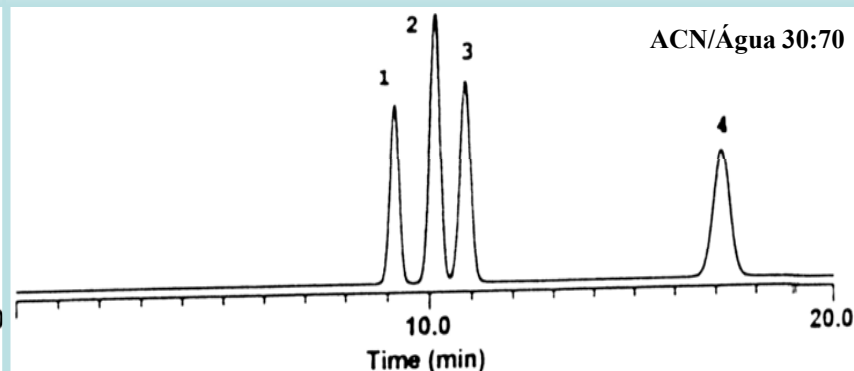
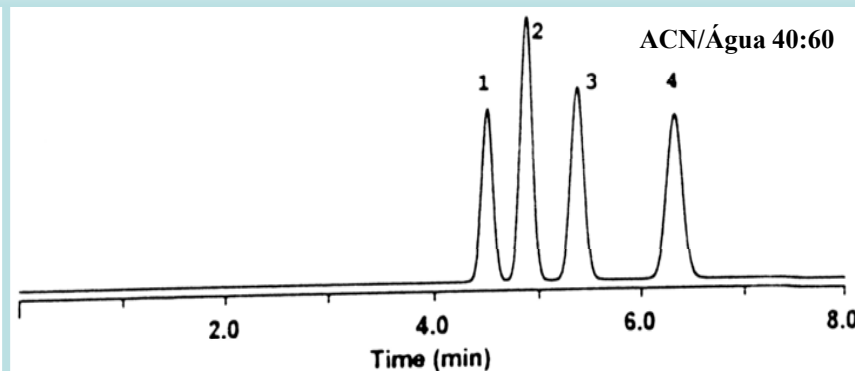
Gradiente Exploratório
C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm
5 a 100 % de ACN, 60'
2,0 mL/min.



Eluição isocrática possível
 $1 < k' < 10$

$k'_u = 7 \Rightarrow \% \text{ ACN} = 1,7 \cdot t_{Ru} = 1,7 \cdot 24 = 40,8 \%$

$k'_u = 20 \Rightarrow \% \text{ ACN} = 1,7 \cdot t_{Ru} - 10 = 30,8 \%$

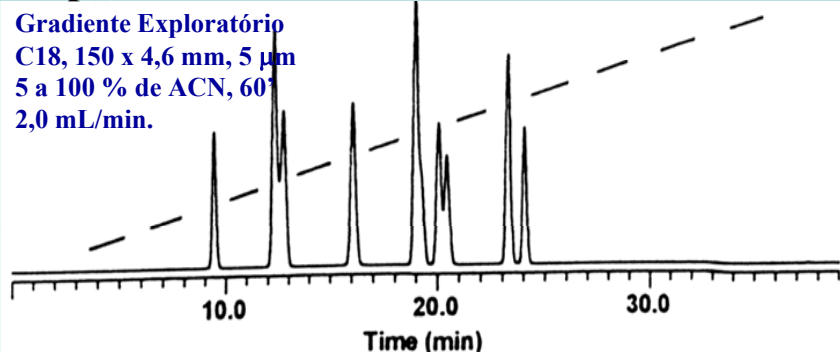




Amostra mais difícil – modo isocrático possível - I

$$\Delta t_R/t_G = (24 - 9,5)/60 = 0,24 \Rightarrow < 0,25$$

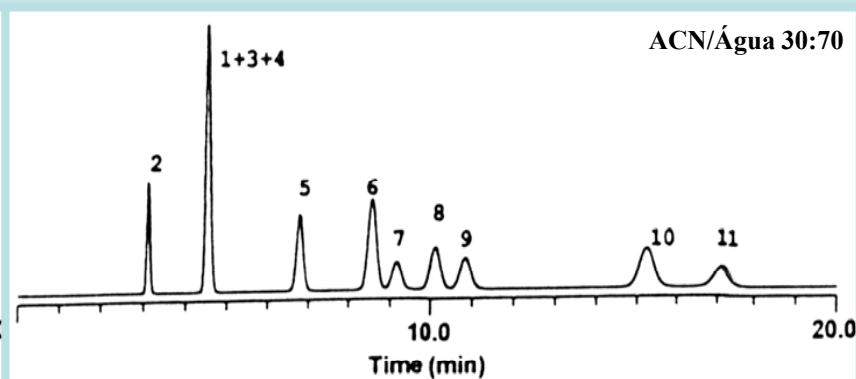
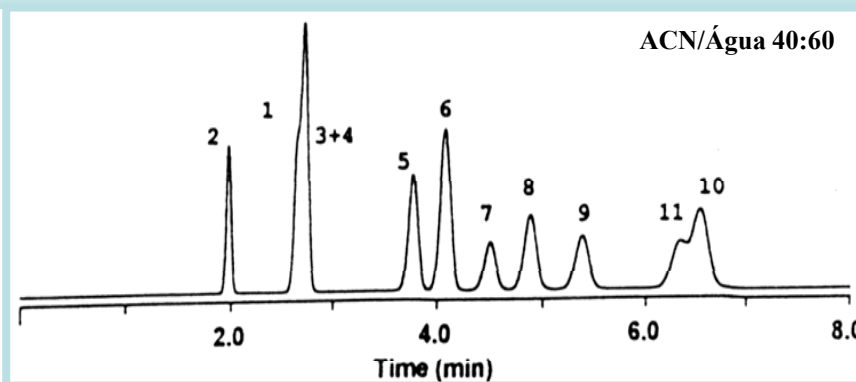
$t_{Rp} = 9,5 \text{ min.}$ $t_{Ru} = 24 \text{ min.}$



Eluição isocrática possível
 $1 < k' < 10$

$$k'_u = 7 \Rightarrow \% \text{ ACN} = 1,7 \cdot t_{Ru} = 1,7 \cdot 24 = 40,8 \%$$

$$k'_u = 20 \Rightarrow \% \text{ ACN} = 1,7 \cdot t_{Ru} - 10 = 30,8 \%$$

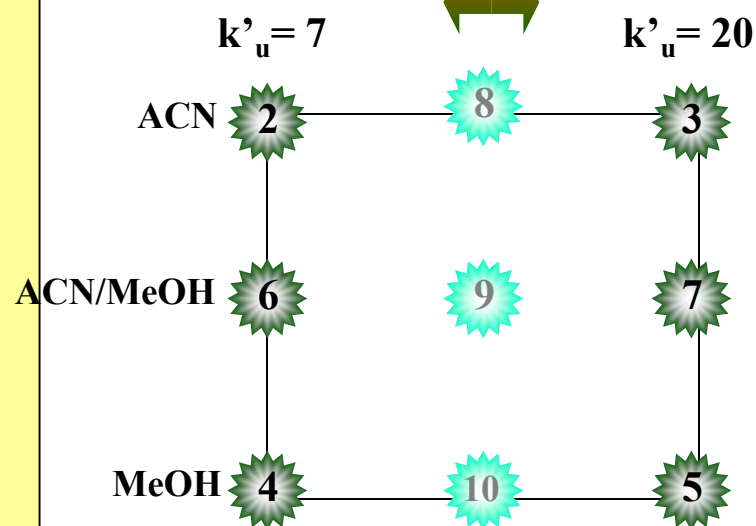




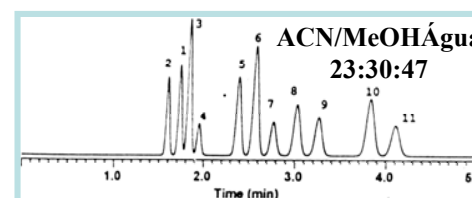
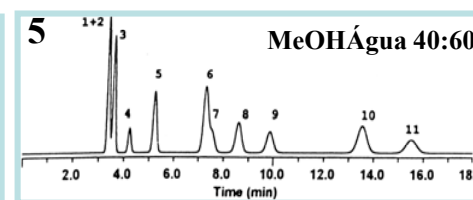
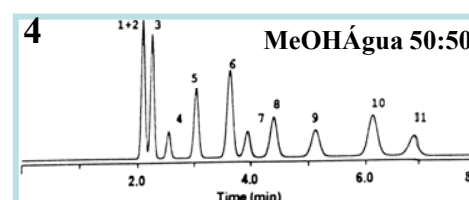
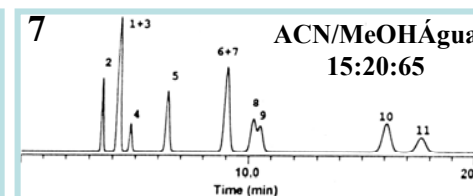
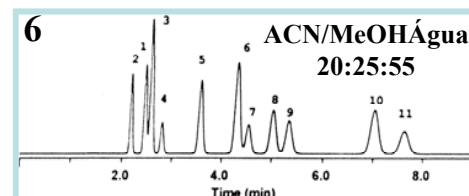
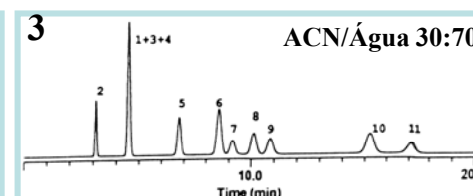
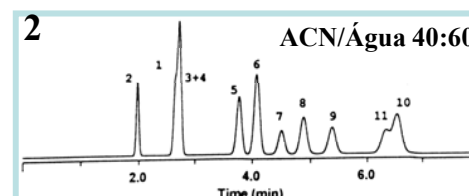
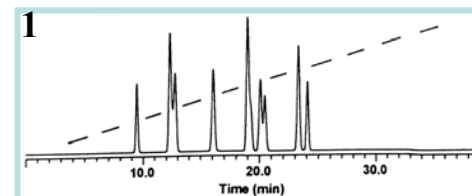
Amostra mais difícil – modo isocrático possível - II

Otimização da FM

1 Gradiente Exploratório



$$\% \text{MeOH} = 1,22 + 1,37(\% \text{ACN}) - 0,004(\% \text{ACN})^2$$

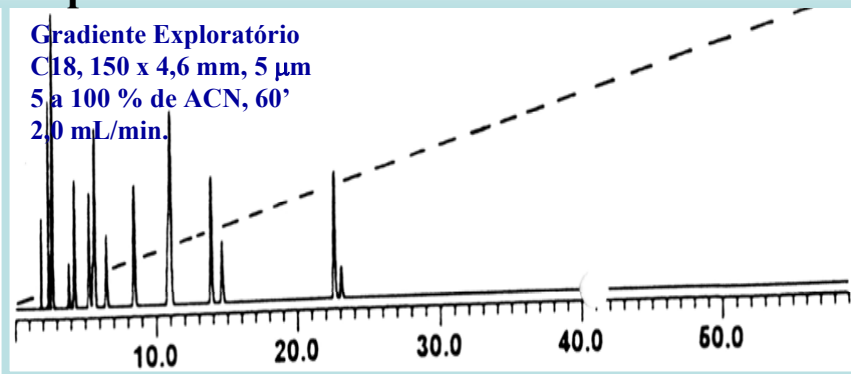




Amostra mais difícil – modo gradiente - I

$$\Delta t_R/t_G = (23 - 2)/60 = 0,35 \Rightarrow < 0,40$$

$$t_{Rp} = 2 \text{ min.} \quad t_{Ru} = 23 \text{ min.}$$



Eluição isocrática possível
 $0,5 < k' < 20$

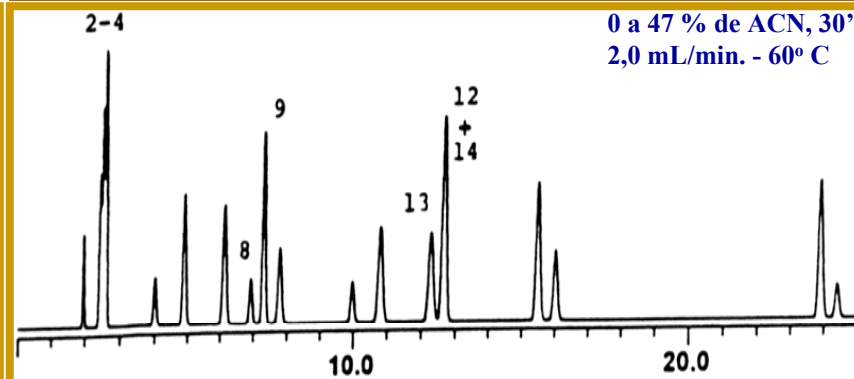
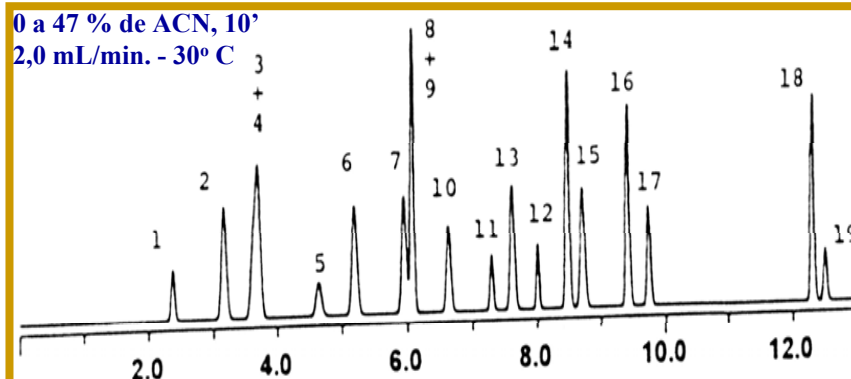
Modo gradiente

$$\%I_{ACN} = 1,65.t_{Rp} - 9 = 1,65.2 - 9 = -5,7 \Rightarrow 0\%$$

$$\%F_{ACN} = 1,65.t_{Rp} + 10,3 = 1,65.23 + 10 = 48\%$$

$$\%ACN/min = 48/10 = 4,8 \Rightarrow k^* \approx 20.F/(V_m.\%min) \approx 8,3$$

$$\%ACN/min = 48/30 = 1,6 \Rightarrow k^* \approx 20.F/(V_m.\%min) \approx 12,5$$

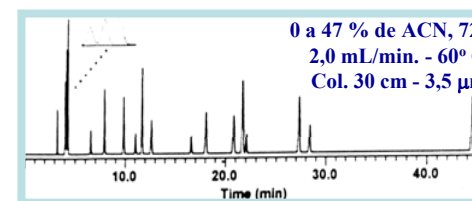
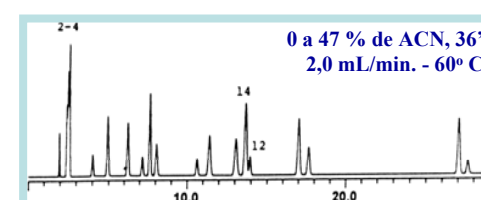
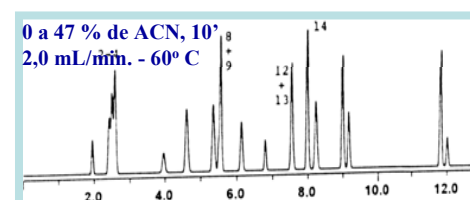
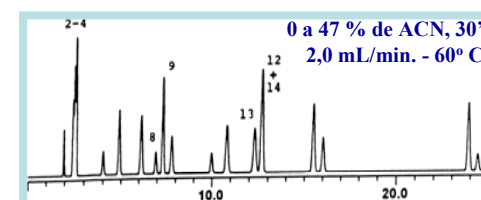
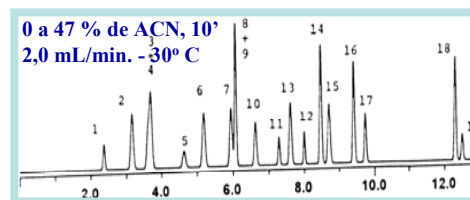
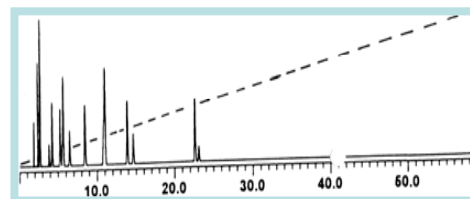
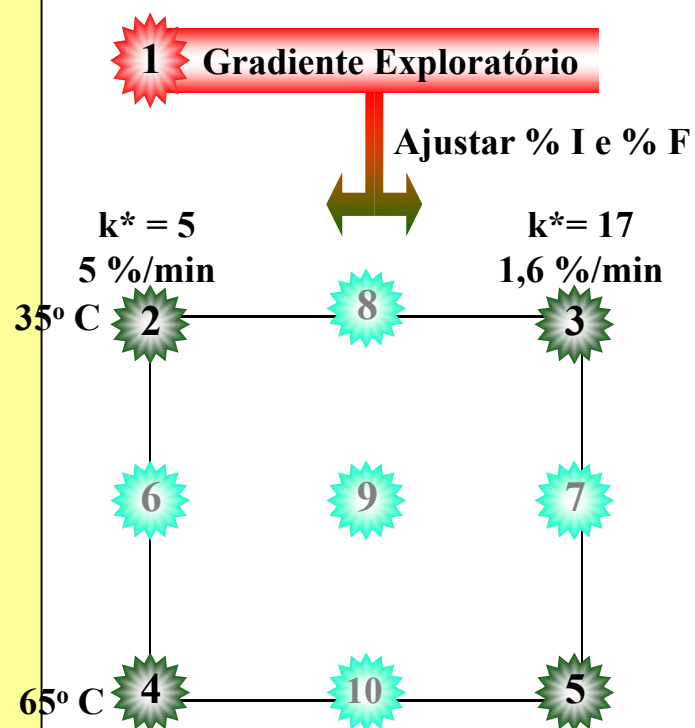


CAVALHEIRO, A.J. (IQ-UNESP)

Resolução insatisfatória



Amostra mais difícil – modo gradiente - II



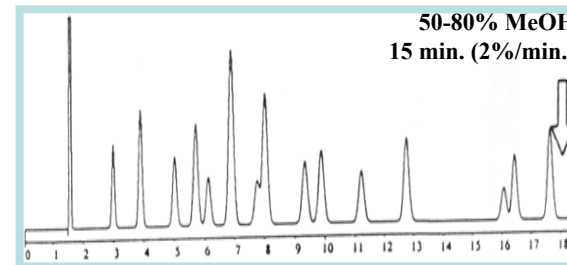
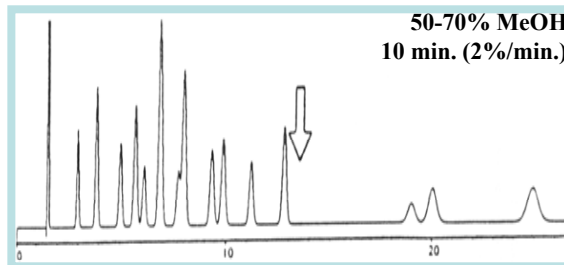
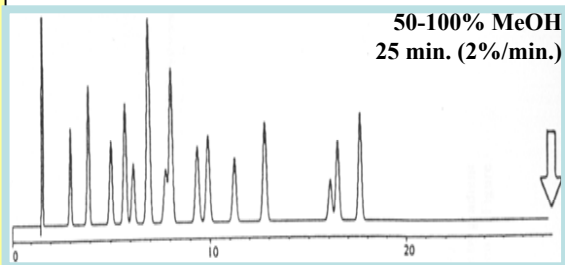
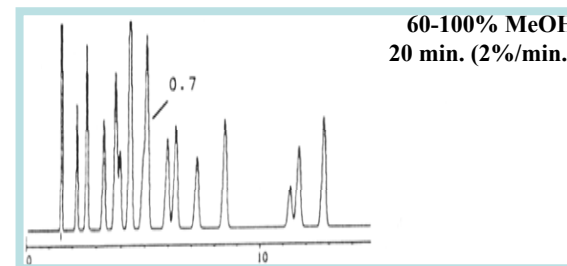
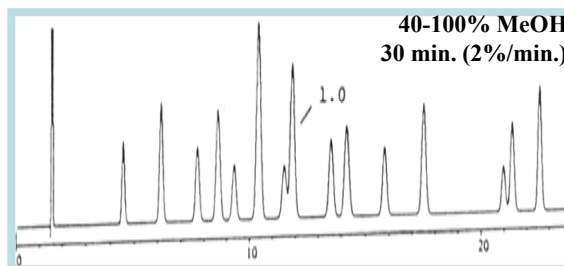
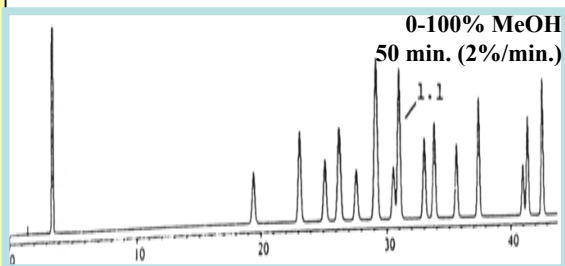


Gradiente - Otimização

1. Ajustar % Inicial e % Final de B
2. Otimizar k^* (considerar t_G)
3. Verificar influência do solvente B
4. Avaliar influência da temperatura
5. Ajustar configuração da coluna
6. Outras variáveis

Ajustar % Inicial e % Final de B

Mistura de Herbicidas: 9 feniluréias e 6 s-triazinas (*J. Chromat.*, 261:329 – 1983)

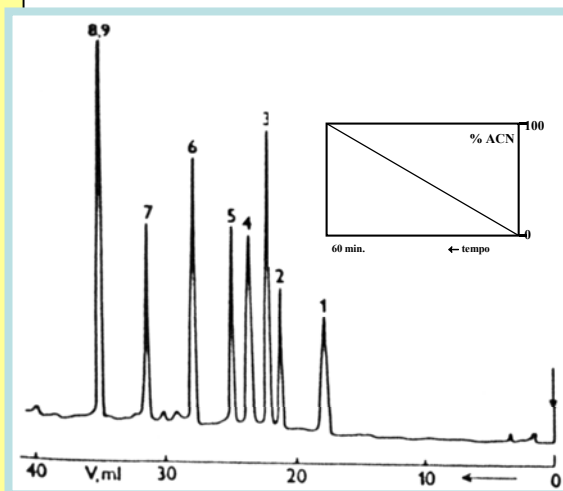




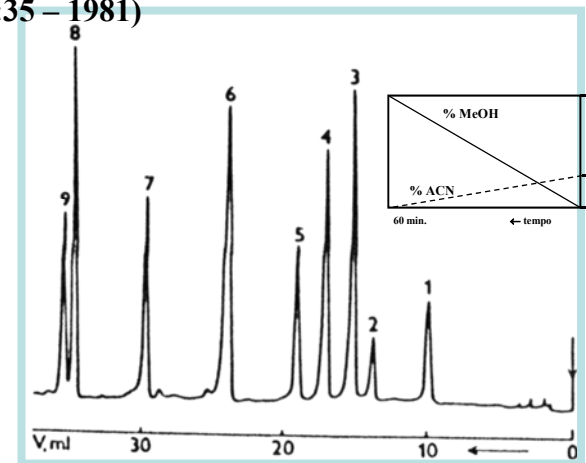
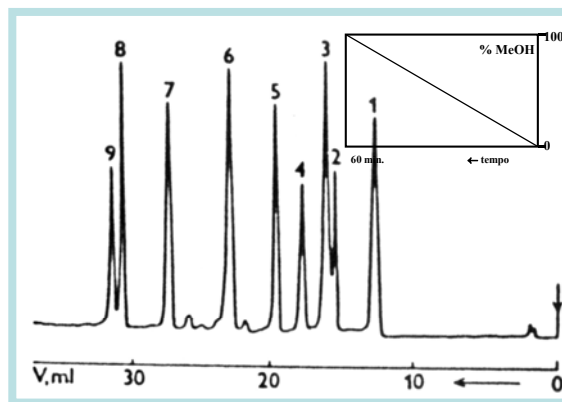
Gradiente - Otimização

1. Ajustar % Inicial e % Final de B
2. Otimizar k^* (considerar t_G)
3. **Verificar influência do solvente B**
4. Avaliar influência da temperatura
5. Ajustar configuração da coluna
6. Outras variáveis

Verificar influência do solvente B



Mistura de fenóis (*J. Chromatogr.*, 214:35 – 1981)



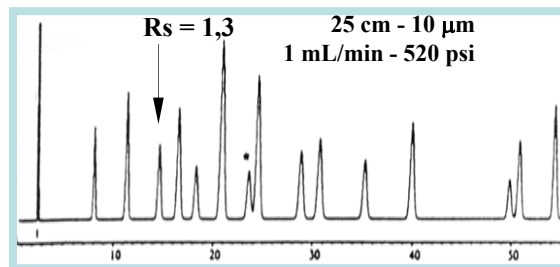
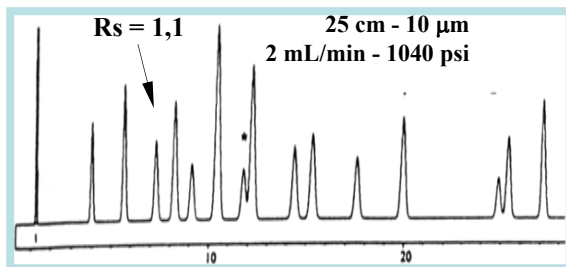
Col.: C18 - 10 μ m
30 x 0,42 cm
1 mL/min - t.a.



Gradiente - Otimização

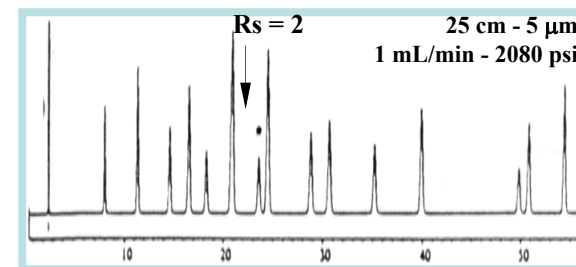
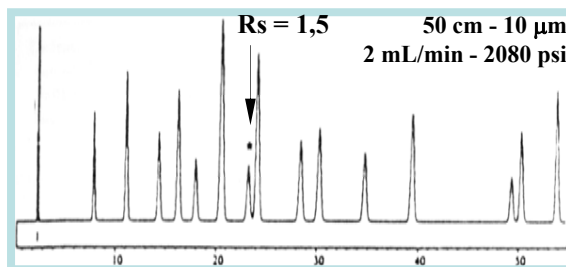
1. Ajustar % Inicial e % Final de B
2. Otimizar k^* (considerar t_G)
3. Verificar influência do solvente B
4. Avaliar influência da temperatura
5. **Ajustar configuração da coluna**

Ajustar configuração da coluna: comprimento, partícula, fluxo



Coluna C18 d.i. 0,46 cm
FM: 40 a 77% MeOH a 0,7%/min

Mistura de Herbicidas:
9 feniluréias e 6 s-triazinas
(*J. Chromat.* , 261:329 – 1983)





BOMBAS DE ALTA PRESSÃO

Permitem vencer a resistência à passagem da FM exercida pelas partículas da FE.

Função: proporcionar fluxo constante e reprodutível de FM a todo o sistema.

CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS:

- **composição da FM e fluxo precisos e exatos**
- vazão contínua e livre de pulsações
- resposta rápida a alterações no fluxo e composição da FM – *gradiente de eluição!!*
- pressão máxima: 700 atm (10.000 psi)
- maior parte construída em aço inox 316; outros materiais: titânio, *peek*, *teflon*
- inércia química a solventes comuns
- manutenção simples
- reservatório de solvente ilimitado





BOMBAS DE ALTA PRESSÃO

BOMBAS DE VOLUME (FLUXO) CONSTANTE

Bombas mais utilizadas em CLAE

Vantagem:

Capacidade de repetição dos volumes ou fluxos e, conseqüentemente, das áreas dos picos, mesmo com mudanças na viscosidade da FM ou bloqueio da coluna por partículas.

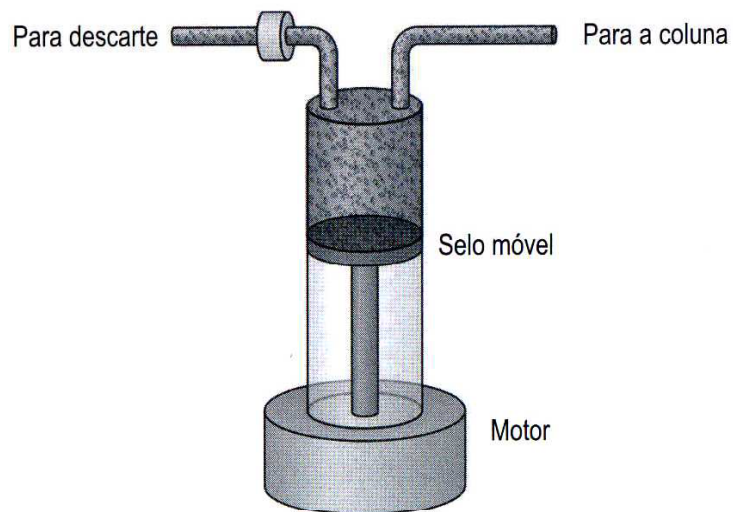


Figura 3.6. Esquema de uma bomba tipo seringa.

BOMBAS DE ALTA PRESSÃO

BOMBAS DE VOLUME (FLUXO) CONSTANTE

BOMBA DO TIPO SERINGA

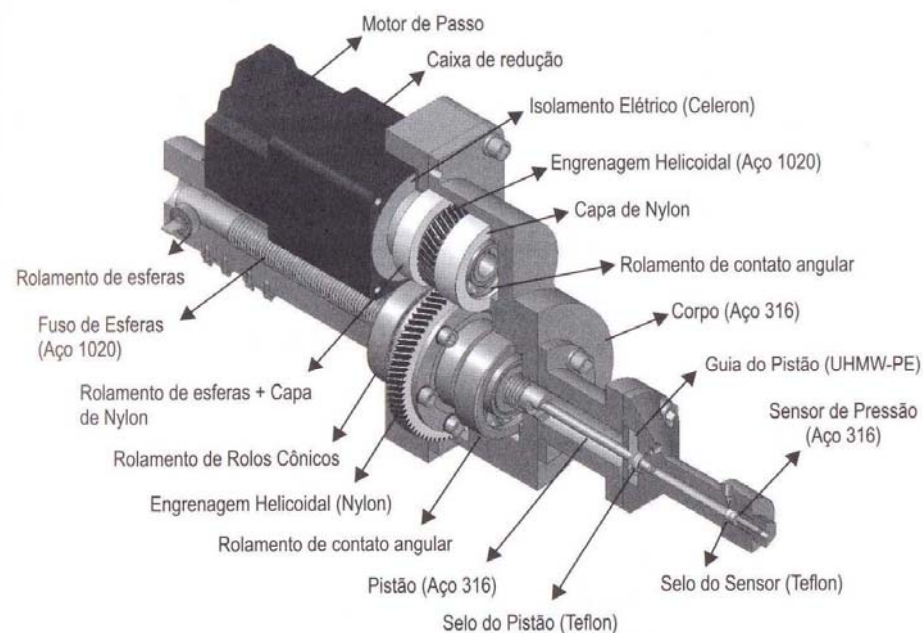
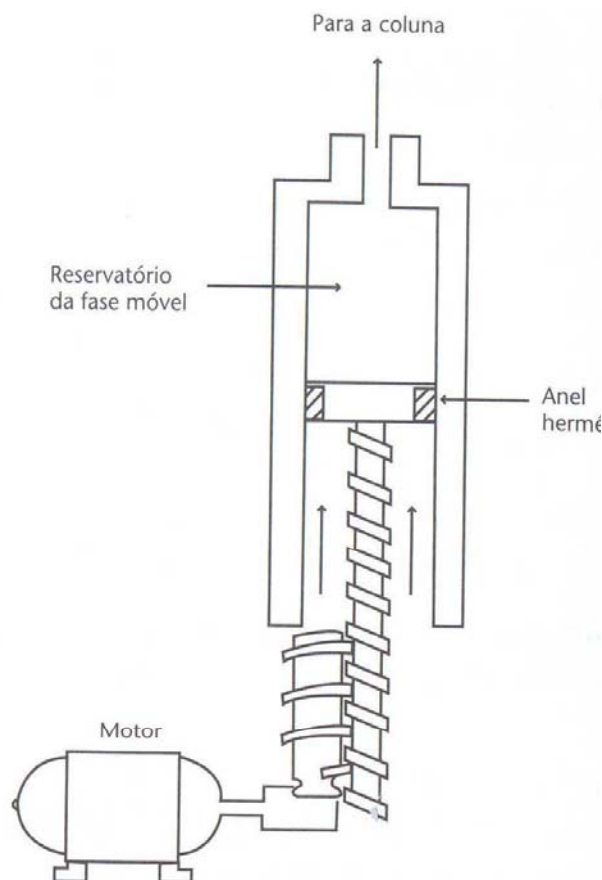


Figura 3.7. Ilustração de uma bomba do tipo seringa universal, com ampla faixa de fluxo (nL/min até mL/min), desenvolvida no laboratório do autor (L. Coutinho e F. M. Lanças, resultados não publicados, 2007).

FIGURA IX-22: Bomba do tipo seringa.
Collins; Braga; Bonato, 2006



BOMBAS DE ALTA PRESSÃO

BOMBAS DE VOLUME (FLUXO) CONSTANTE

BOMBA DO TIPO PISTÃO RECIPROCANTE OU ALTERNANTE

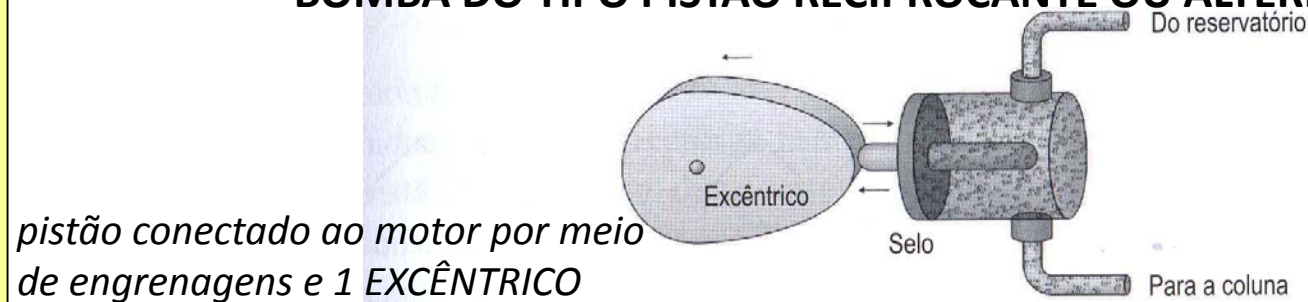


Figura 3.9. Bomba do tipo pistão recíprocante ou alternante.

- escoam volumes constantes de forma não contínua ou pulsante
- bomba mais empregada em CLAE atualmente
- adequada para pressões elevadas
- reservatório de FM: ilimitado
- movimentos do pistão na câmara geram PULSOS
- aplicações: CLAE analítica e preparativa

Lanças, 2009



SISTEMAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRAS (INJETORES)

INJETORES MANUAIS

- amostra deve ser aplicada na coluna pressurizada na forma de uma banda estreita
 - válvula de introdução de amostra mais comum: válvula de 6 pórticos (orifícios)
 - alça de amostragem *loop* para escala analítica (μL)
- diâmetro interno definem seu volume



loop para escala preparativa (mL)



http://www.restek.com/hplcsixport/6_Port_Injector_content.html



SISTEMAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRAS (INJETORES)

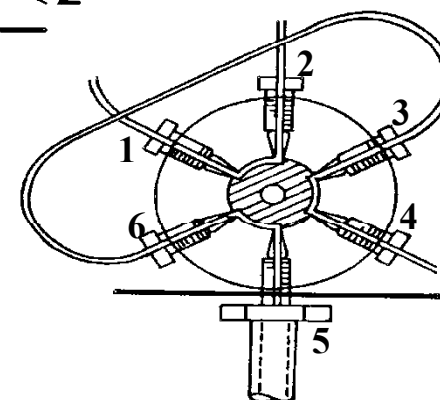
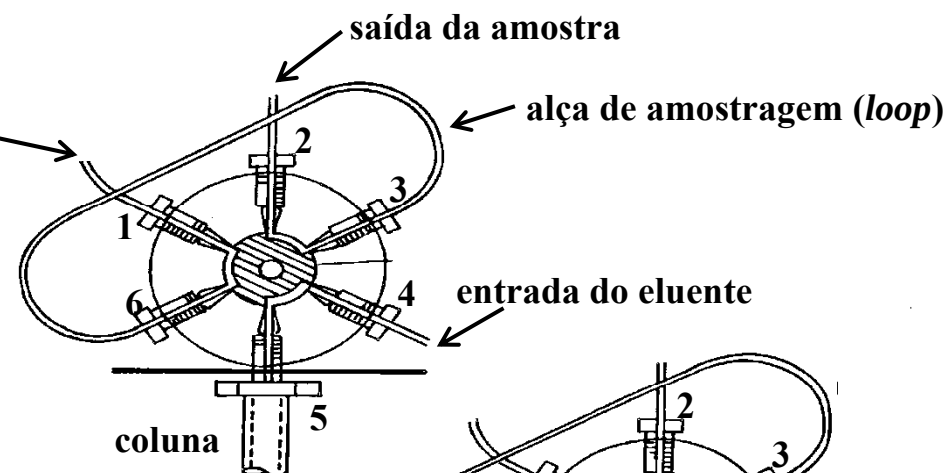
INJETORES MANUAIS

VISÃO ESQUEMÁTICA DO FUNCIONAMENTO DA VÁLVULA DE 6 PÓRTICOS

POSIÇÃO DE CARGA
LOAD



entrada da amostra



POSIÇÃO DE INJEÇÃO
INJECT



DETECTORES

Função do detector: identificar a presença de substâncias de interesse que estejam eluindo da coluna cromatográfica.

Característica desejáveis:

- alta sensibilidade e baixo limite de detecção
- ampla faixa de linearidade
- confiável e reprodutível
- fácil de operar e manter
- informação qualitativa e quantitativa
- não destruição do soluto
- insensibilidade a mudanças na FM e de T
- resposta rápida e linear a alterações das concentrações dos solutos
- baixo nível de ruído



CLASSIFICAÇÃO

De acordo com as propriedades medidas:

Detectores de propriedades do eluente: medem a variação de propriedades do eluente (ex. constante dielétrica)

Detectores de propriedades do analito: medem propriedade física ou química do analito (ex. fluorescência)

De acordo com o tipo de resposta:

Detectores sensíveis à concentração: resposta proporcional à concentração de um componente no eluente (ex. UV, fluorescência).

Detectores sensíveis ao fluxo de massa: resposta proporcional à quantidade de massa do componente da amostra que chega ao detector por unidade de tempo (ex. eletroquímico, espalhamento de luz).

De acordo com a seletividade:

Detectores universais

Detectores seletivos

Detectores específicos



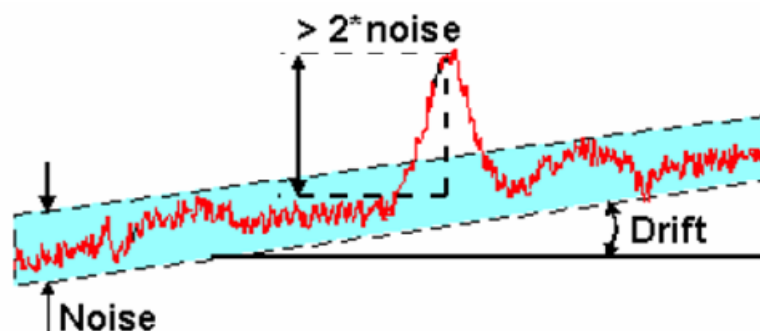
DETECTORES

DEFINIÇÕES IMPORTANTES

Ruído (*noise*, N): distúrbio da linha de base que não é relacionado ao soluto eluído; incerteza média da linha de base (Volts, amperes, AU).

Ruído curto ou de alta frequência (>1 Hz) = ruído eletrônico do detector, integrador e/ou do sistema de bombeamento

Ruído longo ou de baixa frequência (<1 Hz) = interferência externa ou sistema com problemas (FM mal misturada, variação na T, analitos de amostras anteriores com eluição tardia, lâmpada ruim)



Deriva (*drift*, D): inclinação média da linha de base expressa em volts, amperes ou AU por hora.

Causas: alterações na T, FM (gradiente), pressão na cela de detecção, etc



DETECTORES

DEFINIÇÕES IMPORTANTES

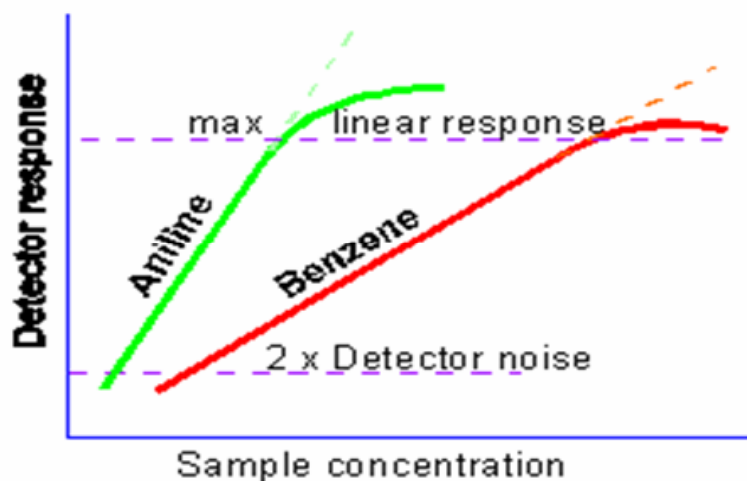
Resposta linear: intensidade do sinal é proporcional à concentração (ou fluxo de massas) do analito.

Faixa de linearidade: faixa de concentrações (ou de fluxo de massas) de um analito presente na FM para a qual a sensibilidade do detector é constante dentro de uma variação específica (ex. $\pm 5\%$).

Limite inferior de linearidade: quantidade mínima detectável

Limite superior de linearidade: quantidade que excede o valor da especificação (ex. $\pm 5\%$)

*quantidade = concentração ou fluxo de massas



QUANTIDADE MÍNIMA DETECTÁVEL (**D**):

- concentração ou fluxo de massas de 1 analito na FM que gera um sinal (**S**) no detector igual a 2x o nível do ruído (**N**).

$$D = 2 \cdot N / S$$



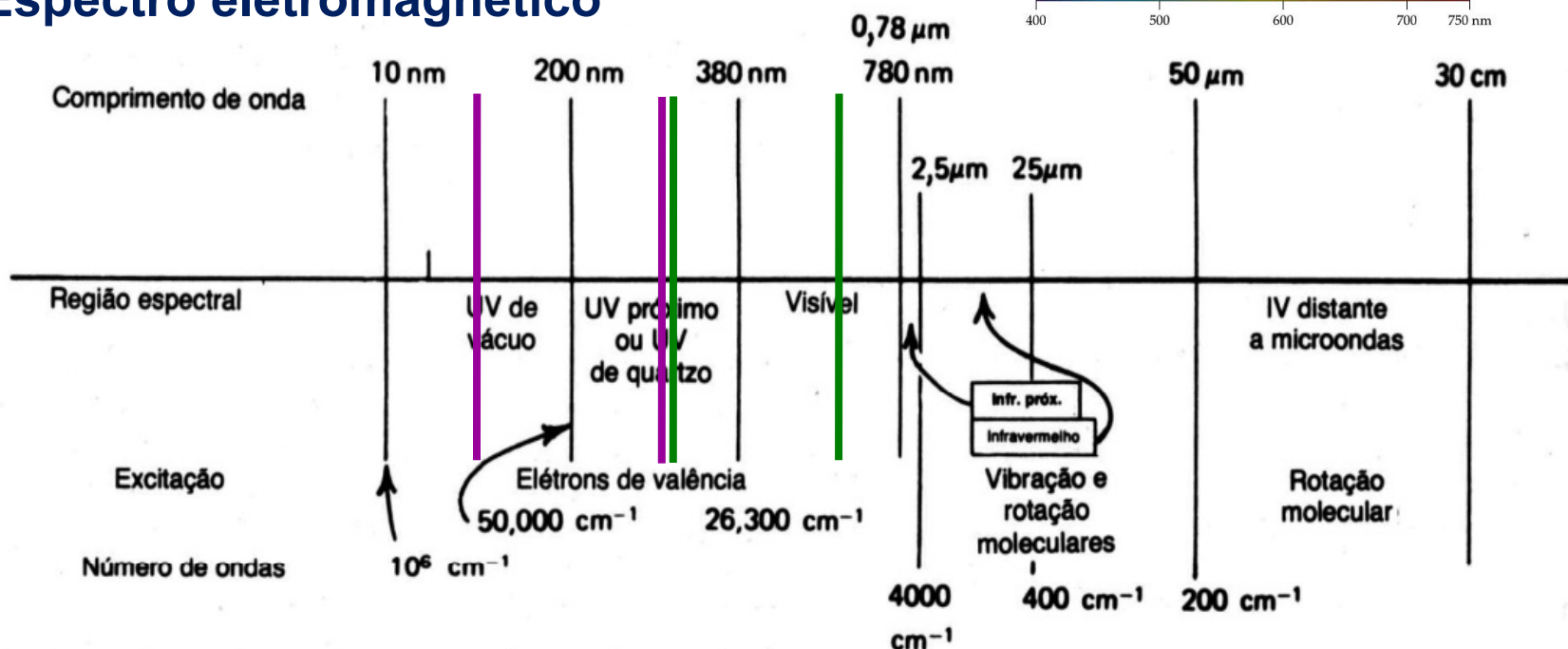
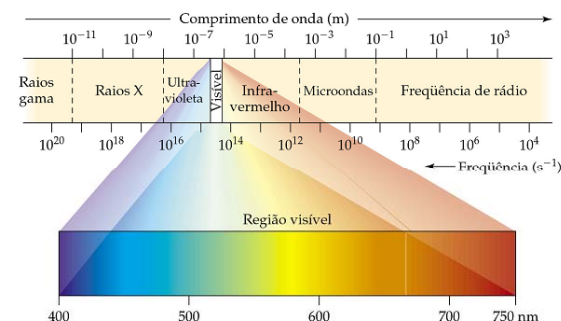
DETECTORES BASEADOS NA ABSORÇÃO DE LUZ UV/VIS

Faixas de λ utilizadas:

Ultravioleta: 190 - 400 nm

Visível: 400 - 800 nm

Espectro eletromagnético



DETECTORES

Tabla 29.2 Datos sobre la absorción de alquenos conjugados.

Compuesto	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon_{\max}$
1,3-Butadieno	217	21 000
<i>cis</i> -1,3-Pentadieno	223	22 600
<i>trans</i> -1,3-Pentadieno	223,5	23 000
2,3-Dimetil-1,3-butadieno	226	21 400
1,3-Ciclopentadieno	239	3 400
1,3-Ciclohexadieno	256	8 000
<i>cis</i> -C ₆ H ₅ CH = CHC ₆ H ₅	280	10 500
<i>trans</i> -C ₆ H ₅ CH = CHC ₆ H ₅	295	29 000
1,3,5-Hexatrieno	253	50 000

Lycopene $\lambda_{\max} = 474 \text{ nm}$

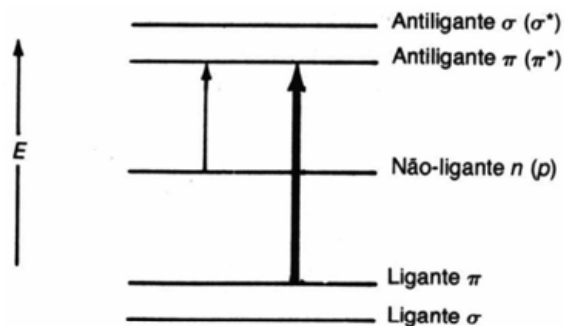
↑ número de ligações duplas, ↑ comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\max}$)

DETECTORES

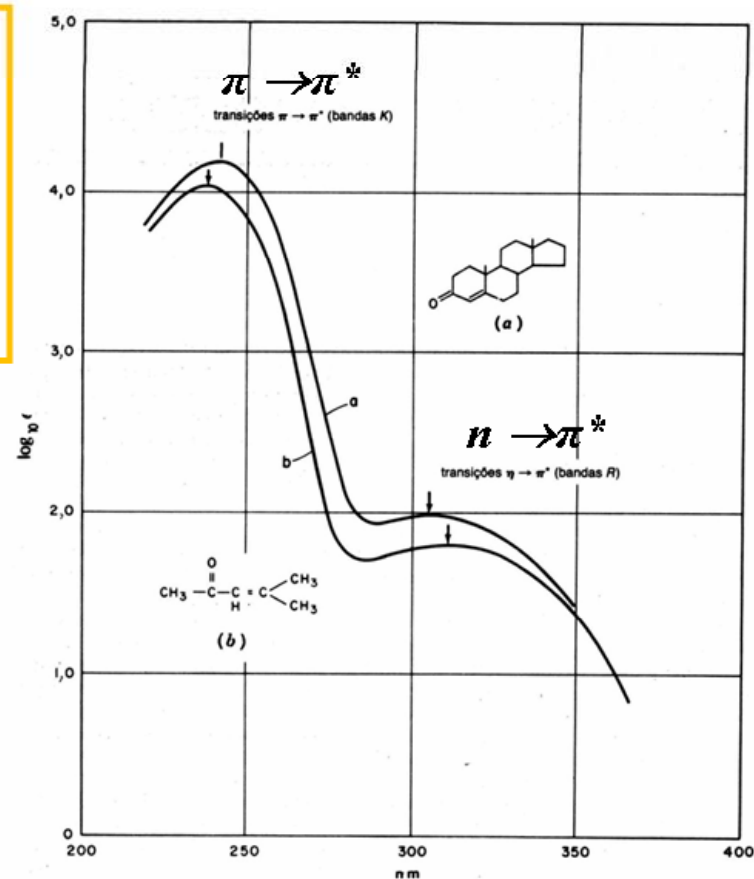
Espectrometria de Absorção no UV-Vis

Grupo cromóforo: unidade estrutural relacionada a transição eletrônica na Espectroscopia no UV-Vis, ou grupo insaturado covalente responsável pela absorção eletrônica.

Transições eletrônicas



Espectros no UV





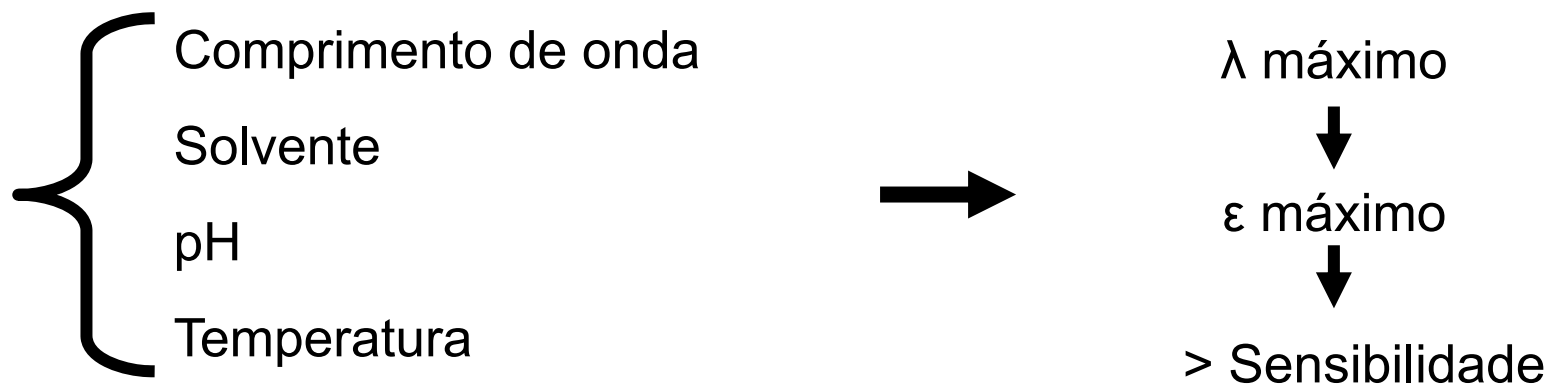
DETECTORES

LEI DE LAMBERT-BEER

$$A = \log\left(\frac{I_o}{I}\right) = \epsilon bc$$

Leitura = Unidade de Absorbância (UA)

1 UA = Depreciação da luz incidente em 90 %





DETECTOR NO UV/VIS DE COMPRIMENTO DE ONDA FIXO

- ⇒ Mede só um λ
- ⇒ Mudança de λ só com troca do filtro
- ⇒ Lâmpada de vapor de mercúrio
(253,7 nm - banda mais intensa)
- ⇒ Filtro mais comum - 254 nm
- ⇒ Onde a maioria (~60%) das substâncias orgânicas tem alguma absorção
- ⇒ Exige maior conhecimento prévio da amostra
- ⇒ Baratos



DETECTOR NO UV/VIS DE COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL

- ⇒ Permite selecionar λ (190 - 600 nm)
- ⇒ Possível mudar λ durante análise
- Otimização da sensibilidade
- ⇒ Possível optar por maior ou menor seletividade e sensibilidade
- ⇒ Operação muito fácil

Lâmpadas: deutério - UV
tungstênio - visível

DETECTOR NO UV/VIS COM ARRANJO DE FOTODIODOS (DAD)

- arranjo de diodos: série de fotodiodos posicionados lado a lado num cristal de silício de modo que cada λ difratado pela grade atinja um diodo.
- a absorbância de uma amostra pode ser determinada em todos os λ de modo simultâneo.

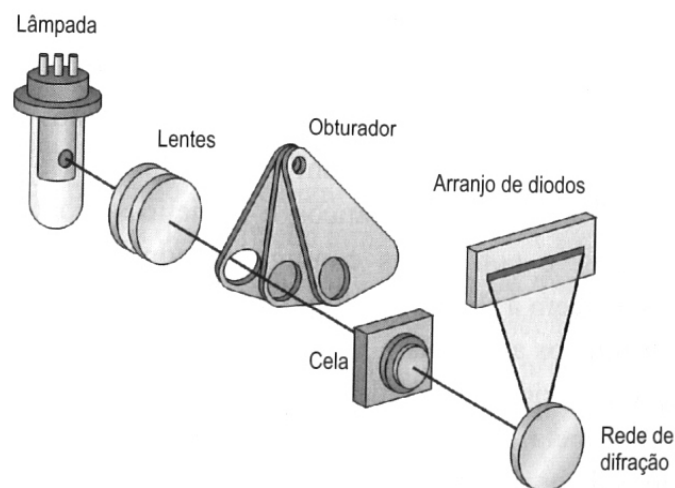
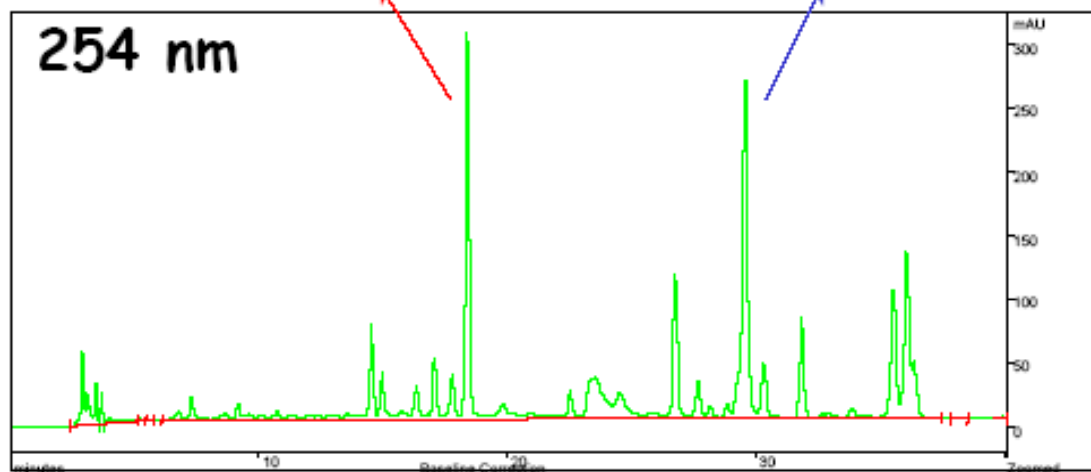
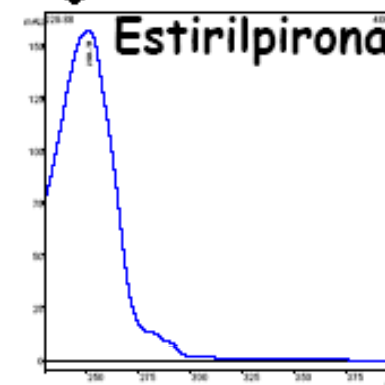
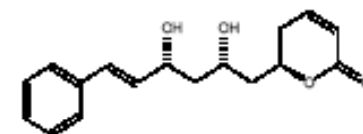
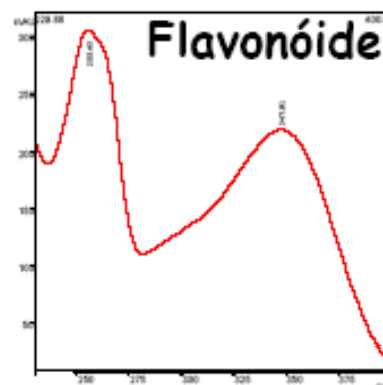
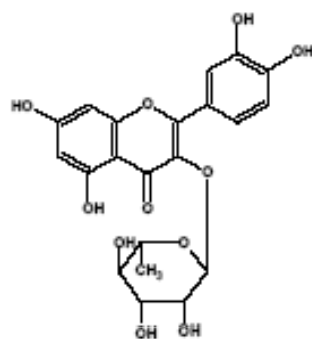


Figura 4.13. Esquema de um detector de comprimento de onda variável com arranjo de diodos (PDA).



DETETOR - UV/VIS - Arranjo de Diodos (DAD)

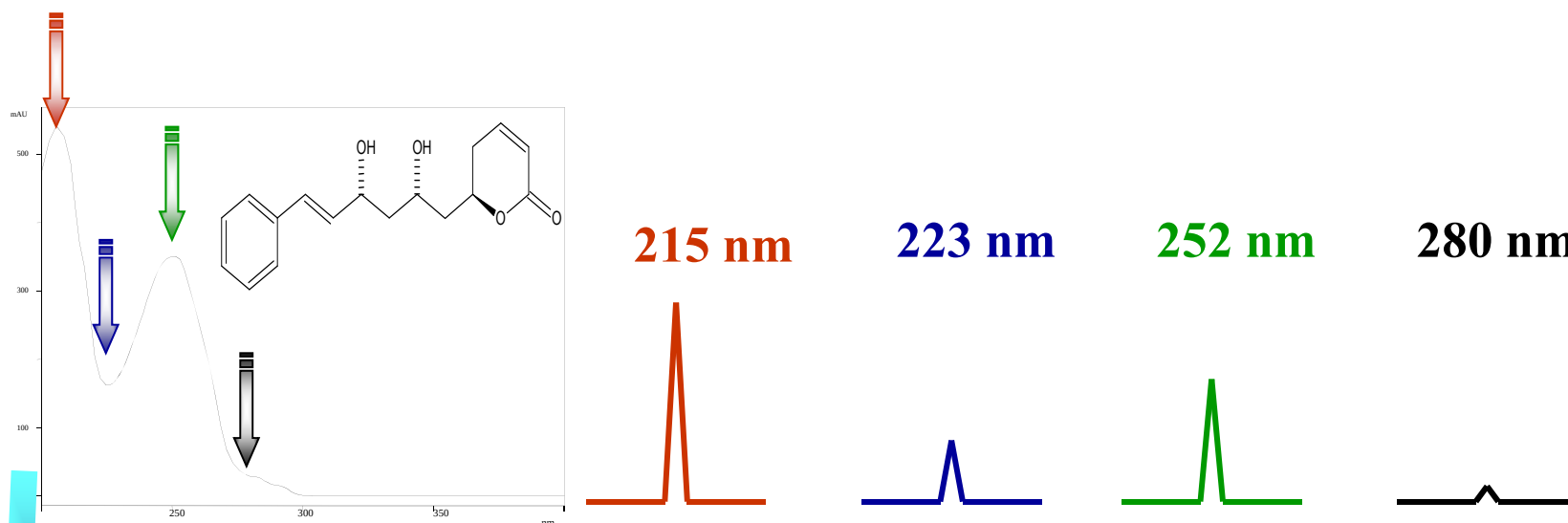
Informação Qualitativa
- Espectros de UV e/ou VIS





DETECTOR -UV/VIS

Qual o comprimento de onda ideal para a análise quantitativa ?



$$\lambda_{max} = > \epsilon = > \text{sensibilidade}$$



DETECTORES BASEADOS NO FENÔMENO DA FLUORESCÊNCIA

- mais sensível (10 a 1000 x mais sensível que UV)
- cerca de 15 % das substâncias orgânicas são fluorescentes
- específico e seletivo

Substâncias fluorescentes:

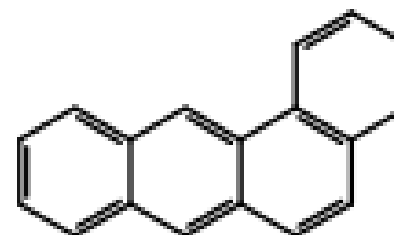
- moléculas com ligações duplas conjugadas e grupos aromáticos
- absorvem radiação de λ mais curto e emitem radiação de λ maior

Tabela 4.5. Fluorescência de derivados do benzeno.

Composto	$\lambda_{\text{excitação}}$	$\lambda_{\text{emissão}}$	I (relativa)*
Benzeno	270	310	100
Tolueno	270	320	170
Propilbenzeno	270	320	170
Fluorbenzeno	270	320	100
Clorobenzeno	275	345	80
Bromobenzeno	290	380	50
Iodobenzeno	nf	nf	nf
Fenol	285	365	180
Anilina	210	405	200

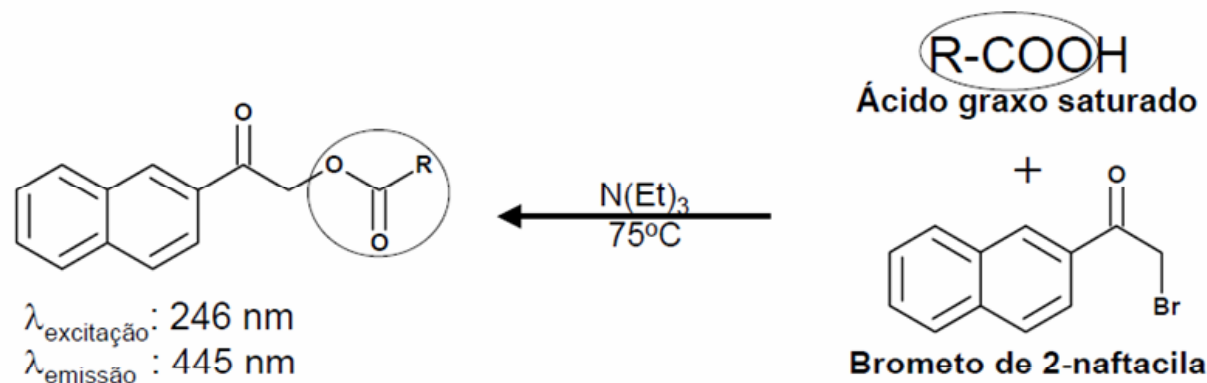
* Intensidade em relação ao benzeno, assumido como 100.

Nf = não fluoresce.

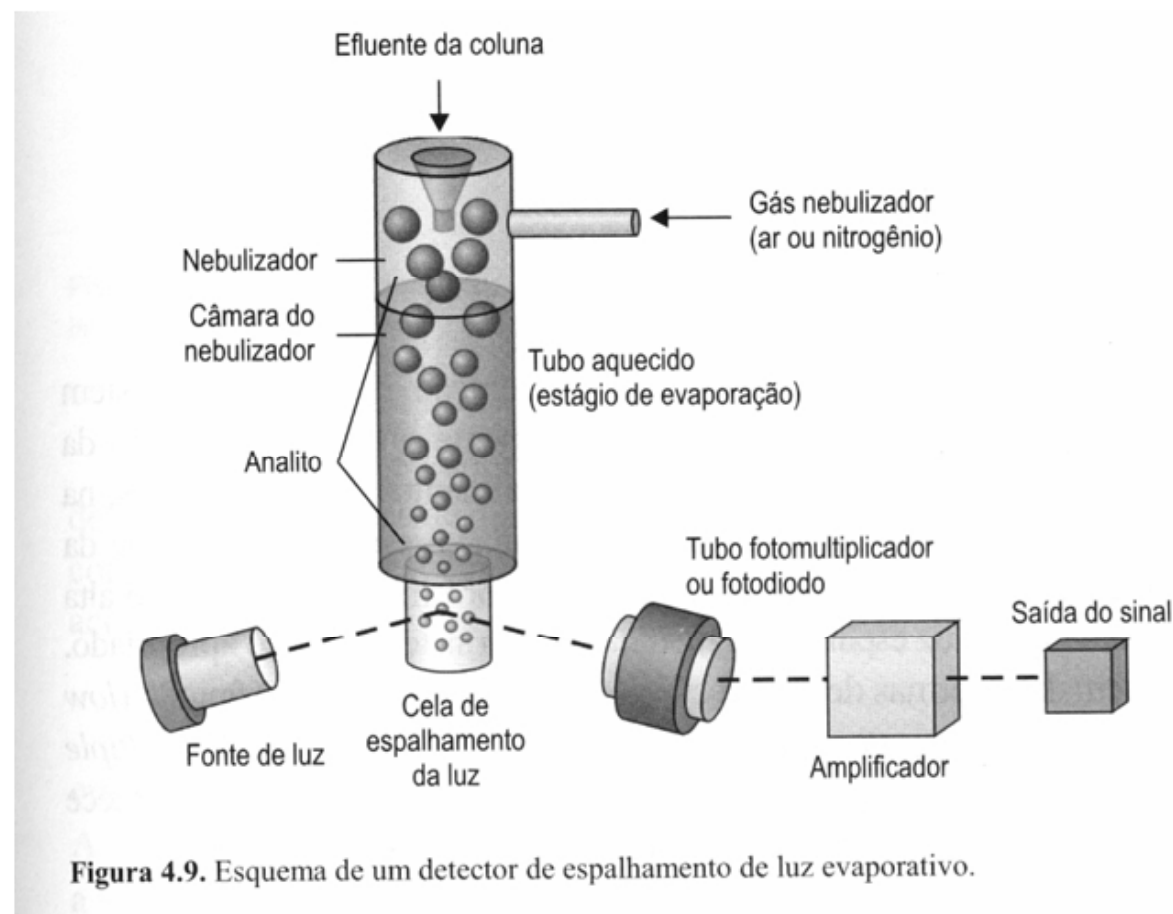




DETECTORES BASEADOS NO FENÔMENO DA FLUORESCÊNCIA - *DERIVATIZAÇÃO*



DETECTORES BASEADOS NO ESPALHAMENTO DA LUZ



Evaporative Light Scattering Detector - ELSD

DETECTORES BASEADOS NO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

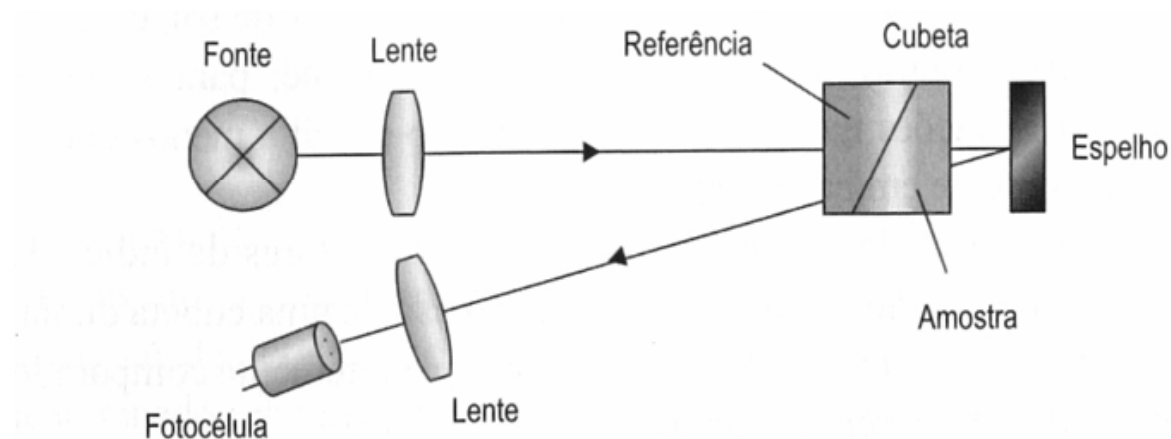
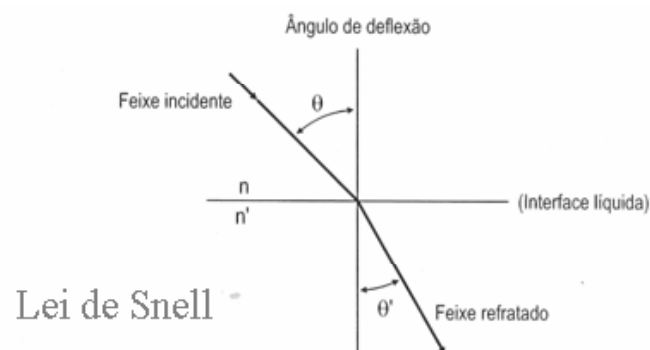


Figura 4.6. Esquema óptico de um detector de índice de refração baseado no desvio da luz



Lei de Snell

Figura 4.5. Representação esquemática do desvio da luz ao atravessar um meio com índice de refração n para outro meio n'.

Tabela 4.1. Índices de refração de alguns solventes comuns a 20° C.

Solvente	Índice de Refração
Acetona	1,36
Benzeno	1,50
Tetracloreto de carbono	1,46
Clorofórmio	1,45
Álcool etílico	1,36
Etileno glicol	1,43
Hexano	1,38
Tetraidrofurano	1,40
Tolueno	1,50
o-Diclorobenzeno	1,55
Água	1,33



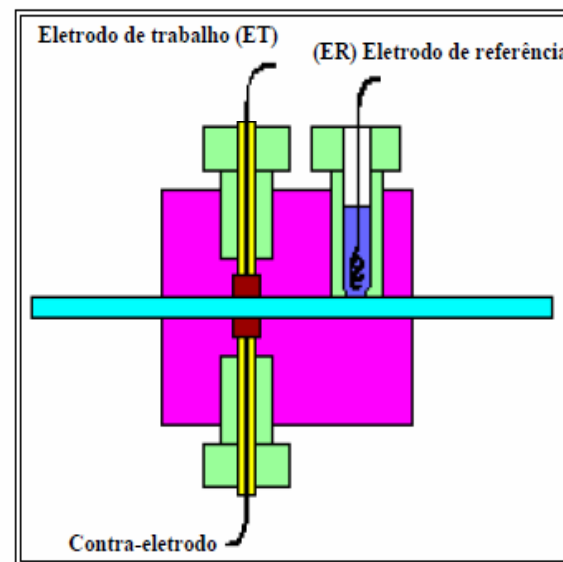
DETECTORES BASEADOS NO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

- ⇒ Mede a capacidade dos analitos em desviar e refletir um feixe de luz;
- ⇒ Detecção ocorre quando a luz é desviada em função da passagem de moléculas de analito pela cela do detetor, mudando o Índice de refração da FM.
- ⇒ Usa cela de referência com FM
- ⇒ Universal (desde que IR analito $\neq$ da FM)
- ⇒ Opera apenas no modo de eluição ISOCRÁTICO
- ⇒ Opera com qualquer solvente
- ⇒ Aplicação: Cromatografia preparativa ou na análise de substâncias sem cromóforos (aminas alifáticas, açúcares, álcoois alifáticos)
- ⇒ Muito sensível a variações de temperatura ($\pm 0,01^\circ \text{C}$)



DETECTORES ELETROQUÍMICOS

- ⇒ Seletividade e sensibilidade para substâncias que possam ser facilmente oxidadas ou reduzidas.
- ⇒ Mede a corrente gerada na oxidação/redução de analitos, num eletrodo adequado.
- ⇒ Requer FM condutora, com eletrólitos e ajuste de pH.
- ⇒ Presença de O_2 , contaminação por metais ou haletos na FM causam corrente de fundo e, assim, ruído e deriva na linha de base.
- ⇒ Sensibilidade a fenóis, nitrosaminas, catecolaminas, ácidos orgânicos: nanogramas.
- ⇒ Aplicação: monitoramento dessas substâncias em matrizes complexas: fluidos corpóreos, produtos naturais, etc.





Detector Eletroquímico

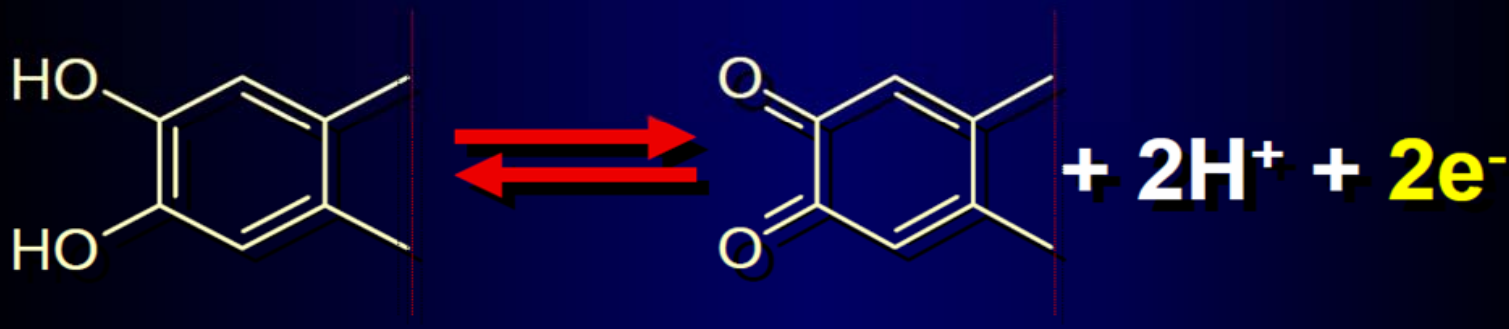
TABLE 3.8 Some Compound Types Sensed by the Electrochemical Detector^a

Oxidation	Reduction
Phenolics	Ketones
Oximes	Aldehydes
Dihydroxy	Oximes
Mercaptans	Conjugated acids
Peroxides	Conjugated esters
Hydroperoxides	Conjugated nitriles
Aromatic amines, diamines	Conjugated unsaturation
Purines	Activated halogens
Heterocyclic rings ^b	Aromatic halogens
	Nitro compounds
	Heterocyclic rings ^b

^a Compound types generally not sensed include ethers, aliphatic hydrocarbons, alcohols, and carboxylic acids.

^b Depending on structure.

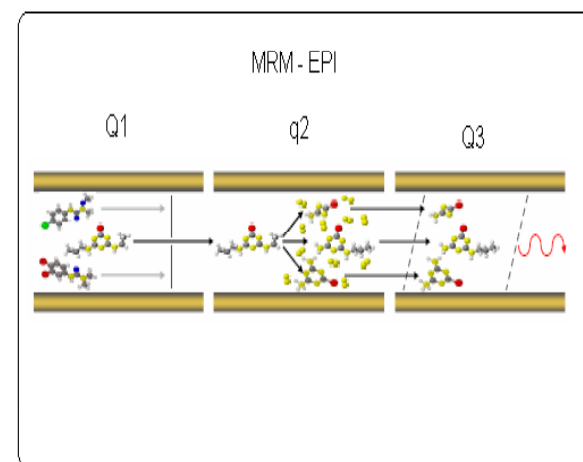
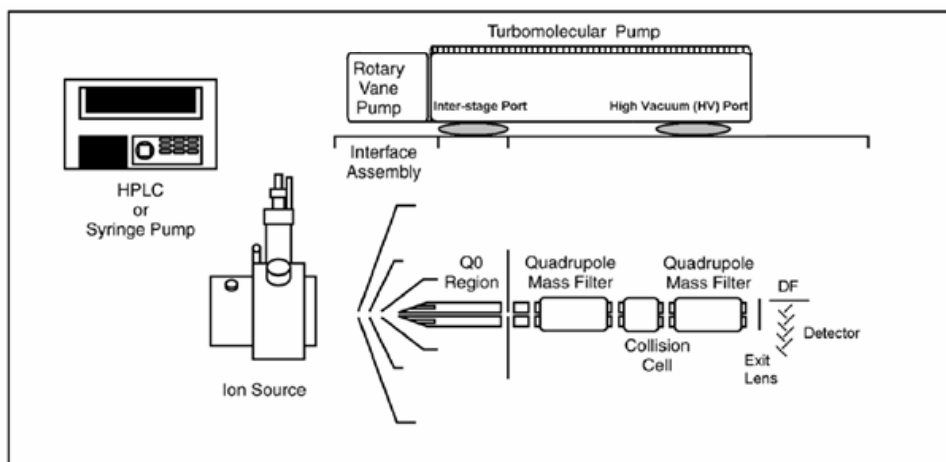
Reação eletroquímica para dióis aromáticos geminais



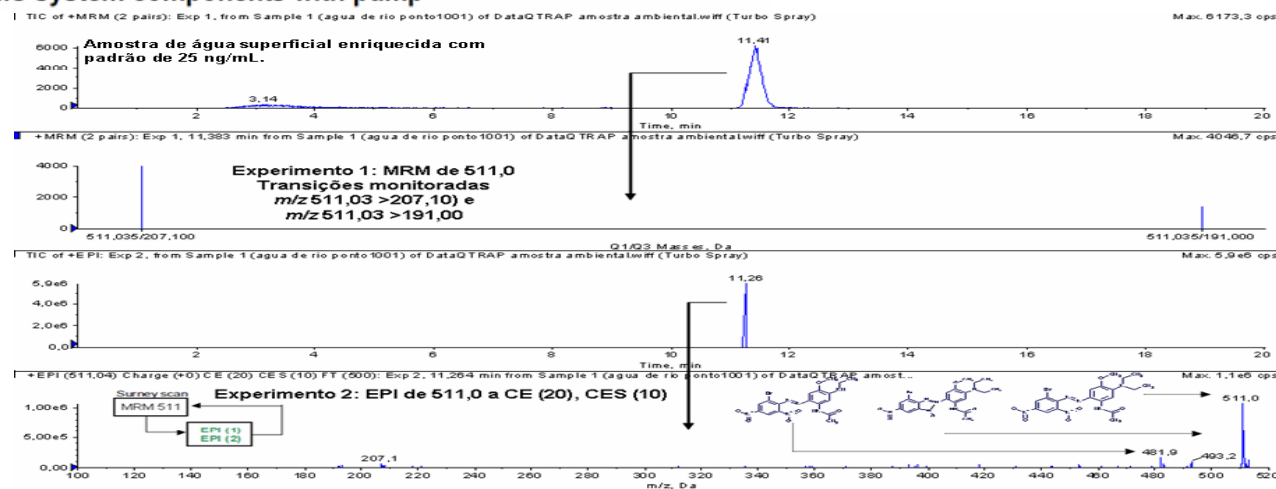


DETECTORES

Espectrômetros de massas (HPLC-MS/MS)



Q Trap LC/MS/MS system components with pump





DETECTORES

Comparação da resposta de alguns detectores

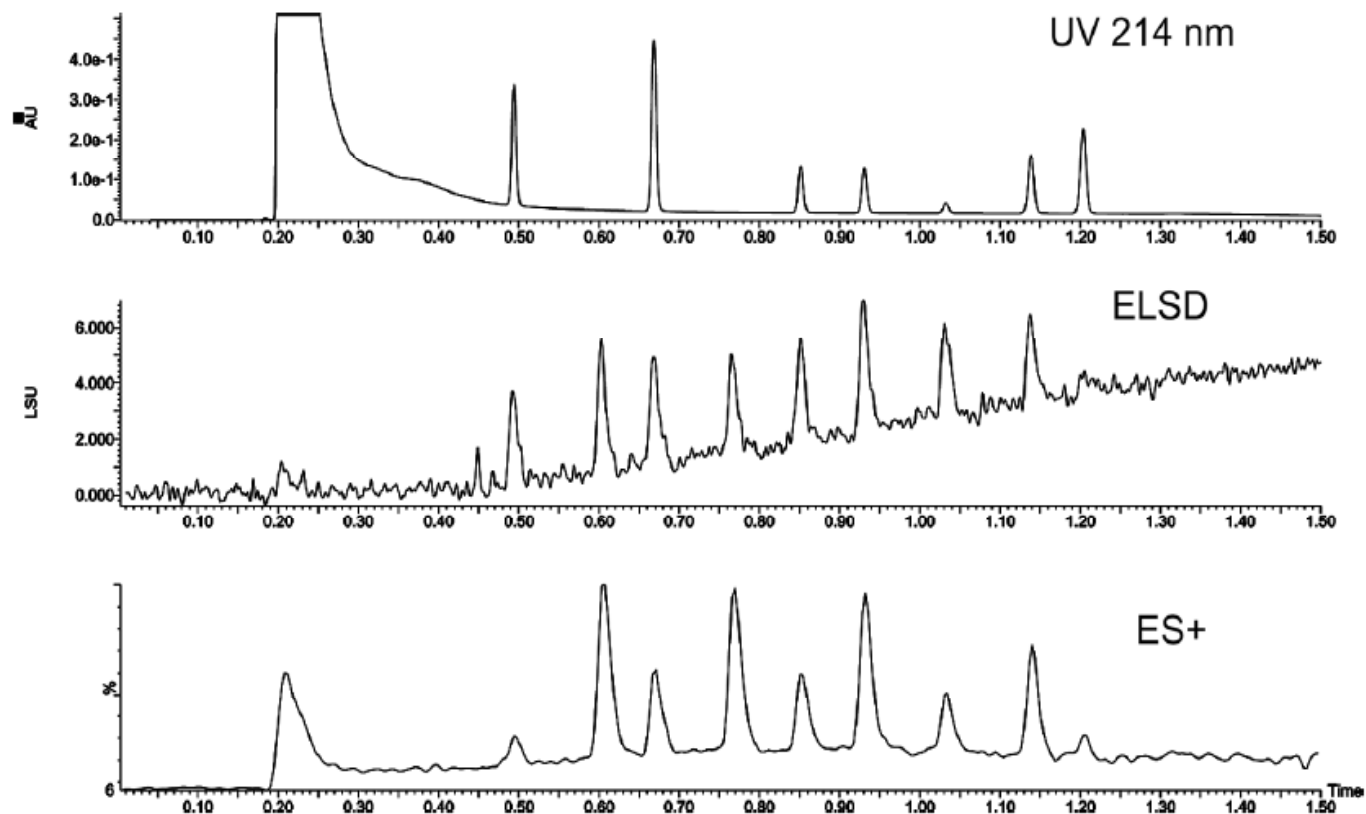


FIGURE 3 Example of orthogonal detection in UHPLC. The three detectors (UV @ 214 nm, ELSD, and MS with positive electrospray) provide complimentary information for the test mix sample. (Figure used with permission from Advanstar Communications/LCGC Magazine.)



Algumas Dicas

TAMPÕES EM CLAE

Solubilidade: sais inorgânicos são pouco solúveis em alta concentração de modificador orgânico.

Solubilidade: $\text{MeOH} > \text{ACN} > \text{THF}$.

Estabilidade: tampão volátil pode ser arrastados por He.
cloreto e citrato podem reagir com aço.

TFA e TEA degradam após longo armazenamento.

Tampão volátil: preferidos em cromatografia preparativa e com alguns detetores como EM e ELSD.

Ex.: carbonato, formiato, acetato de amônio e TFA.

Exemplos:

Tampão citrato: pH 2,1 a 6,4; mistura das soluções (A: ácido cítrico pH 2,5 e B: citrato trissódico pH 6,5) proporciona variação linear do pH nessa faixa, tornando-o muito conveniente para o desenvolvimento de método.

Tampão fosfato e tampão acetato: Se complementam, cobrindo a mesma faixa de pH do tampão citrato, mas com melhor performance no UV e menos corrosivos. São os mais utilizados.



Algumas Dicas TAMPÕES EM CLAE

Tampão	pK _a	Faixa	UV limite
Ácido Trifluoracético (TFA)	>> 2	1,5-2,5	210 nm (0,1%)
H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄ ou K ₂ HPO ₄	2,1 7,2 12,3	< 3,1 6,2-8,2 11,3-13,3	< 200 nm (0,1 %)
Ácido cítrico/K ₃ citrato	3,1 4,7 5,4	2,1-6,4	230 nm (10 mM)
Ácido fórmico/Formiato de K	3,8	2,8-4,8	210 nm (10 mM)
Ácido acético/Acetato de K	4,8	3,8-5,8	210 nm (10 mM)
KHCO ₃ ou K ₂ CO ₃ /Ácido acético	6,4 10,3	5,4-7,4 9,3-11,3	< 200 nm (10 mM)
Bis-tris propano.HCl/Bis-tris propano	6,8 9,0	5,8-7,8 8,0-10,0	215 nm (10 mM) 225 nm (10 mM)
Tris.HCl/Tris	8,3	7,3-9,3	205 nm (10 mM)
NH ₄ Cl/NH ₃	9,2	8,2-10,2	200 nm (10 mM)
1-Me-Piperidina.HCl/1-Me-Piperidina	10,1	9,1-11,1	215 nm (10 mM)
Et ₃ N.HCl/Et ₃ N	11,0	10,0-12,0	< 200 nm (10 mM)

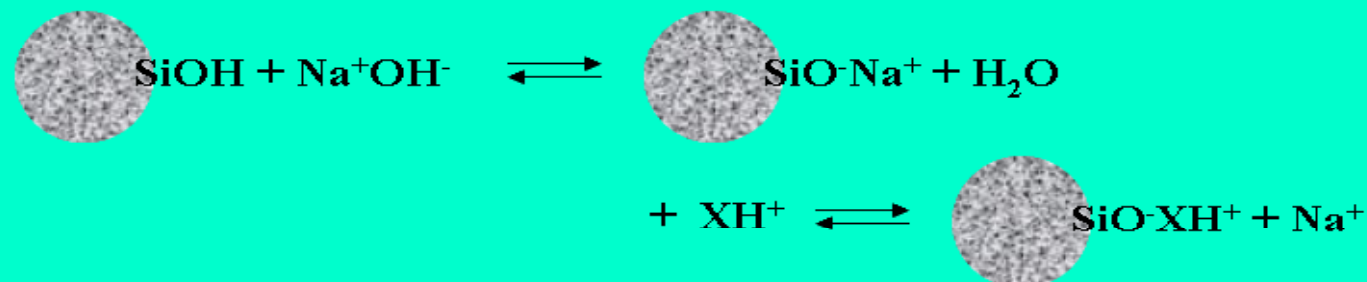


Algumas Dicas

Estabilidade de colunas de Sílica – Fase Ligada

pH > 8

Dissolução da sílica em fase aquosa.
Facilitada por temperatura, tipo de sal e conc. do tampão.
Fases ligadas de alta densidade e encapadas tem maior estabilidade em pH elevado.



pH < 2

Hidrólise ácida da fase ligada.
Quanto menor o pH, maior a velocidade de hidrólise.

**** Faixa ideal de trabalho: 2 < pH < 8**



Algumas Dicas

Fatores que afetam o tempo de vida da coluna, em $\text{pH} > 7$.

Aumentam tempo de vida da coluna	Diminuem tempo de vida da coluna
Reduzem velocidade de dissolução da sílica	Aumentam velocidade de dissolução da sílica
Temperatura baixa	Temperatura alta ($> 40^{\circ}\text{C}$)
Baixa conc. de sais inorgânicos p. ex.: Fosfato 10-25 mM	Alta conc. de sais inorgânicos p. ex.: Fosfato $> 100\text{ mM}$
% solv. Orgânico $> 50\%$	% solv. Orgânico $< 40\%$
Acetonitrila	Metanol

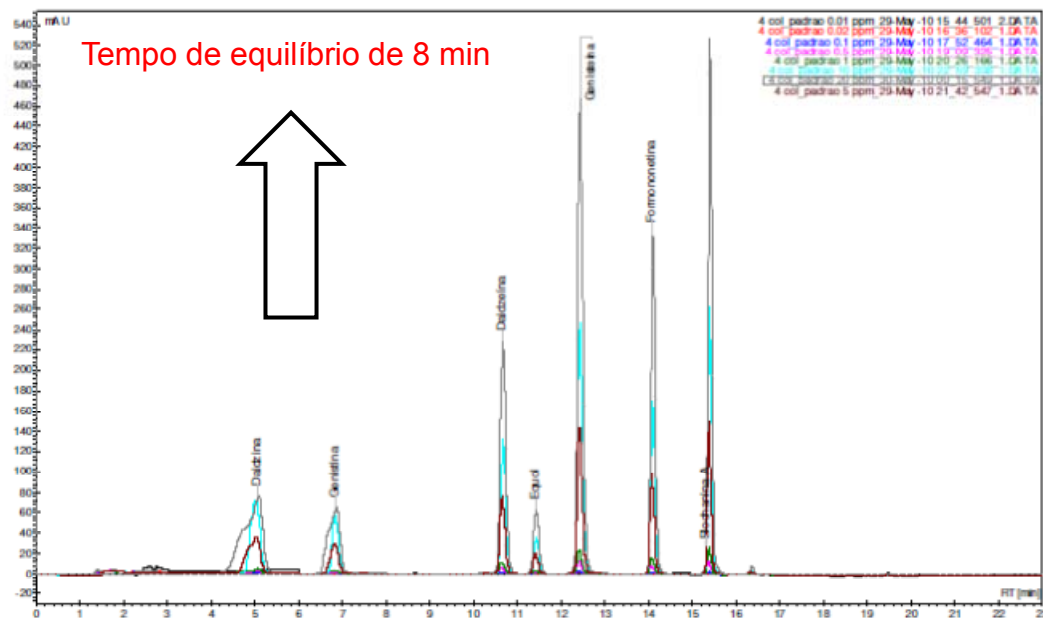
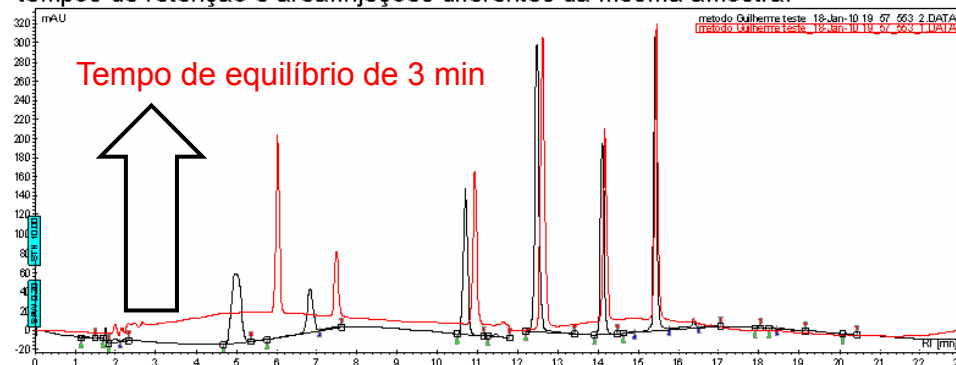


Algumas Dicas

Gradiente otimizado

Tempo (min)	% H ₂ O	% MeOH
0	70	30
15	35	65
17	0	100
20	70	30
25	70	30

Tempo de equilíbrio não adequado. Consequências: problemas relacionados aos tempos de retenção e área. Injeções diferentes da mesma amostra.



Fique atento ao tempo de equilíbrio da sua coluna

Ácido acético 0,1 % foi usado como supressor iônico



O que você não deve fazer em HPLC

- Lavar um sistema com tampão usando orgânico puro: precipitação.
- Injetar amostras que podem precipitar na fase móvel: testar miscibilidade.
- Usar HCl, H₂SO₄ ou CCl₃ degradado em sistema de aço inox: corrosão do sistema.
- Deixar a bomba trabalhar seca: danificação dos selos.
- Usar fita de Teflon para vedar conexões: sem efeito e pode causar entupimento.
- Deixar o sistema parado com fase móvel contendo tampão ou ácidos/bases fortes: cristalização = danificação dos selos da bomba, injetor, entupimento do detector.



Agradecimentos

- Ao Conselho Regional de Química - CRQ-IV
- Aos Participantes do Curso

Contato

Guilherme Julião Zocolo

E-mail: gjzocolo1@gmail.com

Quaisquer dúvidas estarei sempre a disposição

Princípios da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Dinâmica 1

1. O entendimento do processo cromatográfico e dos fatores de retenção (k'), seletividade (α) e eficiência (N) é fundamental para o desenvolvimento racional de um método cromatográfico. Assim sendo, **explicar objetivamente**:
 - a) O que é força de eluição e qual a sua influência na distribuição de cada componente de uma mistura de substâncias orgânicas entre as fases estacionária (FE) e móvel (FM);
 - b) O que é seletividade cromatográfica? Cite exemplos de solventes e adsorventes com seletividades diferentes.
 - c) O que é eficiência cromatográfica?
2. Quais as vantagens e desvantagens do uso dos modos de eluição isocrático e gradiente?
3. Para avaliar a qualidade de uma coluna de CLAE, quais parâmetros (cite pelo menos **três**) devem ser frequentemente monitorados e o que eles podem indicar?

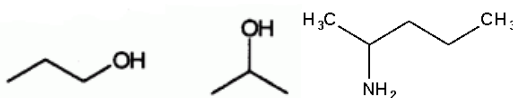
Princípios da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Dinâmica 2

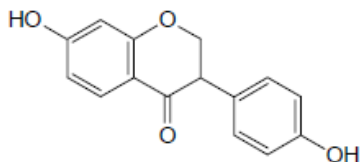
1. a. Qual a característica mais importante de um detetor em sistema de cromatografia líquida? Por que? Quais detetores satisfazem essa característica?

b. Considerando sensibilidade e seletividade, que detetores seriam mais indicados para análise quantitativa em CLAE das misturas abaixo:

- I. Álcoois e aminas saturados – indústria de alimentos.



- II. Antioxidantes polifenólicos – presente em medicamentos fitoterápicos.



- III. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – presentes na fuligem resultante da queima da cana-de-açúcar – amostra ambiental – concentrações na ordem de ng mL^{-1} (ppb)

