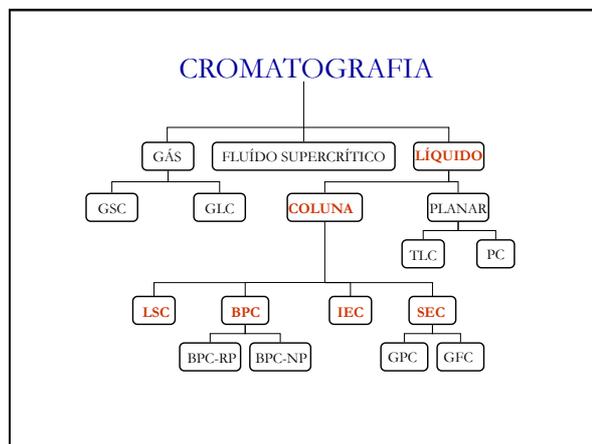


Introdução à Cromatografia Líquida Moderna



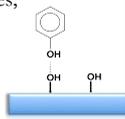
CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO (LSC)

Princípio: Adsorção de analitos sobre a superfície polar, fracamente ácida, geralmente da sílica gel.

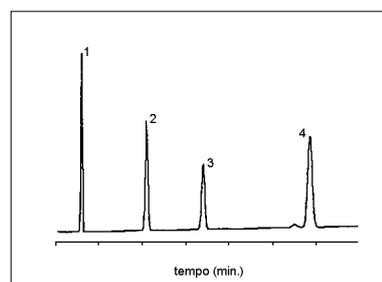
FE: Sílica gel (pH 2-8); Alumina (pH 2-12).

FM: Solventes não polares como o hexano, CHCl₃ (raramente água).

Aplicações: Amostras não polares e semi-polares; solúveis em hexano; isômeros posicionais.



Exemplo - Adsorção



Separação de Isômeros

1. Anisol
2. 3-Nitroanisol
3. 4-Nitroanisol
4. 2-Nitroanisol

CROMATOGRAFIA EM FASE LIGADA (BPC)

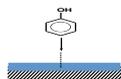
Fase normal (N.P.) e Fase Reversa (R.P)

Princípio: R.P. – Cadeia principal hidrofóbica do analito sofre partições entre superfícies hidrofóbicas e metanol (não água).

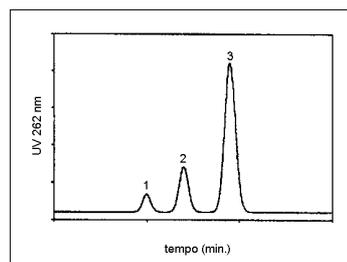
FE: Superfícies hidrofóbicas na sílica gel – R.P.-18, RP-8, ODS.

FM: Metanol ou acetonitrila e água.

Aplicações: Maioria dos compostos solúveis em água e metanol: proteínas, peptídeos, açúcares, ácidos graxos, fármacos.



Exemplo - Partição



Analgésicos

1. Ácido acetilsalicílico
2. Acetaminofeno
3. Fenacetina

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (IEC)

Princípio: Adsorção reversível de íons na FE contendo grupos funcionais de carga oposta.

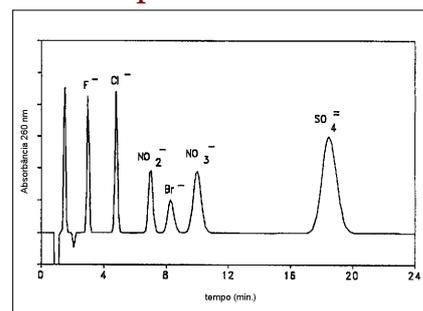
FE: Para cátions – SO_3^- , CO_2^-
Para ânions – NR_4^+ , NR_3^+

FM: Tampão aquoso com pH e com a força iônica cuidadosamente controlados.

Aplicações: Todos compostos iônicos comuns, ânions, cátions, açúcares, ácidos carboxílicos, aminas, etc.



Exemplo - Troca Iônica



CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (SEC)

Princípio: Poros internos da FE. excluem analitos solvatados baseado no volume hidrodinâmico. V_R é correlacionado à Massa Molecular (M W) pela curva de calibração.

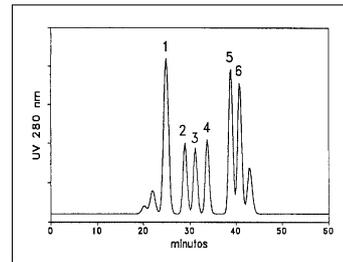
FE: Estireno - 8% DVB com diâmetro do poro de 80, 100, 150, 300, 500 ou 1000 Å .

FM: Bom solvente para polímeros, frequentemente Tolueno ou THE.

Aplicações: Polímeros orgânicos, poliestireno, polietileno, metacrilatos.



Exemplo - Exclusão



Proteínas

1. Ferritina
2. Aldolasa
3. Seroalbúmina
4. Ovoalbúmina
5. Quimotripsionógeno A
6. Citocromo C

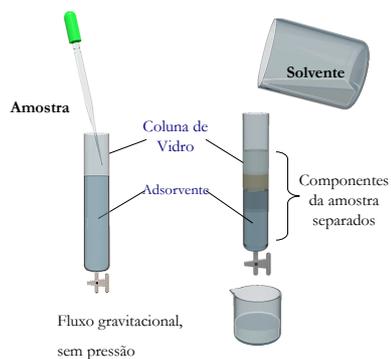
Absorção / Adsorção



Absorção / Dessorção



Esquema de uma COLUNA CLÁSSICA de LC



Cromatografia Clássica em Coluna

VANTAGENS

- Baixo Custo
- Simples
- Bom Método Preparativo

LIMITAÇÕES

- Lento
- Baixa Resolução
- Quantificação Difícil

HPLC Fundamentos

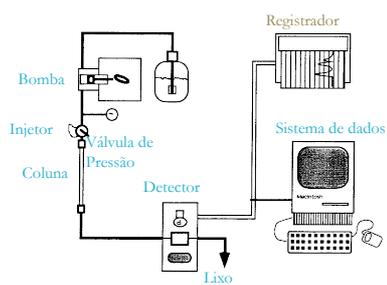
Prof. Dr. Fernando M. Lanças

Universidade de São Paulo - USP
Instituto de Química de São Carlos - IQSC

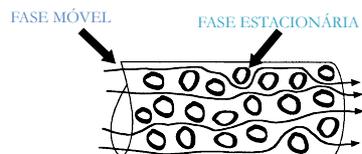
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)



COLUNA PARA HPLC



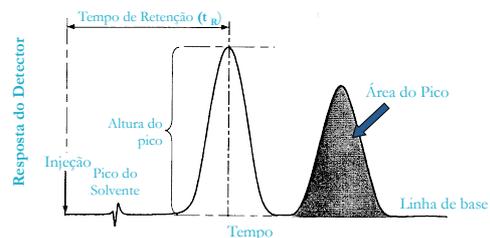
FASES ESTACIONÁRIAS

- Silica gel - **LSC**
- RP-18 - **BPC**
- Styragel - **SEC**

Esquema de uma coluna de HPLC



CROMATOGRAMA TÍPICO

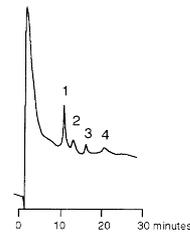


VANTAGENS DA HPLC

- Velocidade - Minutos
- Alta **Resolução**
- Alta **Precisão e Exatidão**
- Alta **Sensibilidade** : 10^{-9} pra 10^{-12} g
- Sistemas Automáticos

ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR HPLC (ppb)

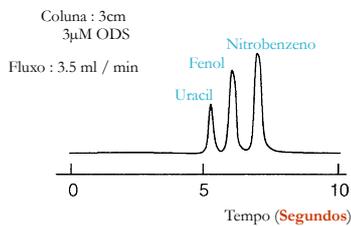
Aflatoxinas em pasta de amendoim; Detecção por Florescência.



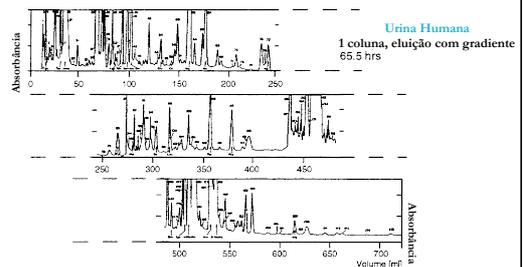
1. Aflatoxina B₁ 5ppb
2. Aflatoxina G₁ 1ppb
3. Aflatoxina B₂ 3ppb
4. Aflatoxina G₂ 1ppb

ANÁLISE RÁPIDA POR HPLC

(Pequenas Partículas, Coluna Curta, Fluxo Rápido)

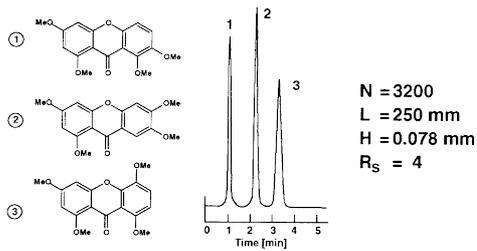


ALTA RESOLUÇÃO



SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DA URINA POR CROMATOGRÁFICA DE TROCA IÔNICA
PB. Hamilton, "Handbook of Biochemistry", CRC Press, Cleveland, 1968.

ALTA RESOLUÇÃO



"HPLC of Naturally Occurring Xanthones". K. Hostetman & H.M. Mcair
J. Chromatogr. **116** (1976) 201.

LIMITAÇÕES DA HPLC

- Equipamento de custo relativamente **Elevado**
- Experiência : 6-12 meses
- Detector não Universal/Sensível
- Materiais de **Custo Elevado**
- Requer Espectroscopia para confirmação

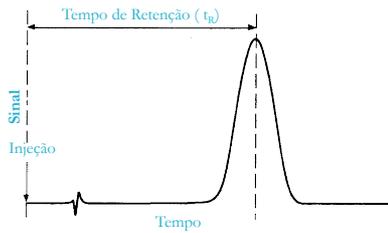
VERSÁTILIDADE DA HPLC

Vitaminas
Aminas
Seras
Pesticidas
Flavonóides
Nucleotídeos
Esteróides
Sabores
Polímeros
Amino Ácidos
Açúcares
Proteínas
Ácidos Graxos
Plastificantes
Hidrocarbonetos
Drogas
Anti-oxidantes
Aditivos Alimentares

HPLC - VANTAGENS

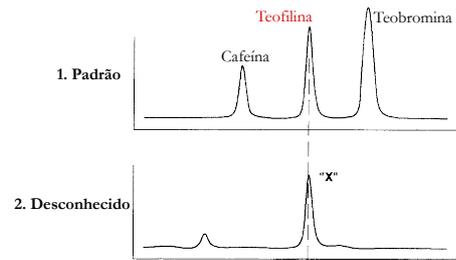
1. Rápida – Usar colunas curtas e partículas pequenas.
2. Alta Resolução – **N** elevado, várias formas de aumentar α , muitos tipos de coluna.
3. Versátil – Se você pode dissolver a amostra, HPLC!
4. Boa Análise Quantitativa - ~1 - 2% RSD.
5. Escala Preparativa Fácil – Colunas grandes, mais amostras, coletores de **frações**.

ANÁLISE QUALITATIVA (1)



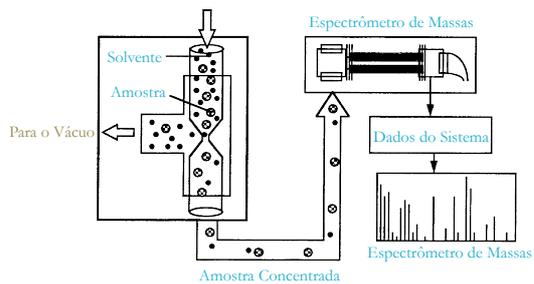
- Técnicas auxiliares (MS, IR, UV-VIS, NMR) proporcionam identificação mais positiva

ANÁLISE QUALITATIVA (2)

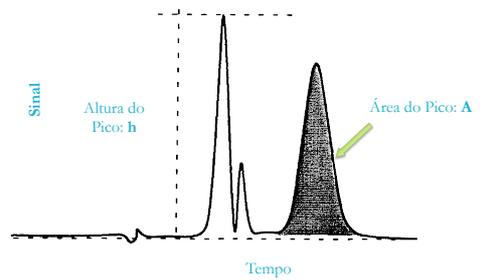


$t_R(\text{teofilina}) = t_R(\text{X}) \Rightarrow$ portanto, é sugerido ser a teofilina.
Para confirmação positiva, LC-MS(MS).

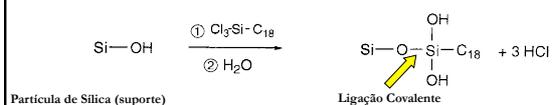
LC - Espectrometria de Massas



ANÁLISE QUANTITATIVA



Síntese de Fases Quimicamente Ligadas (BP)



• Ligação covalente da fase estacionária fornece uma *fase quimicamente ligada* mais estável termicamente e hidroliticamente

HPLC EM FASE LIGADA

FASE NORMAL

- Adsorbente Polar: -CN, -NH₂,...
- Solventes não Polares: iso-octano, cloro de metileno
- Amostras não polares e semi-polares

FASE REVERSA

- Adsorbente não Polar: RP-18 (ODS), RP-8 (Octil)
- Solventes Polares: água/ metanol, água/ acetonitrila
- Amostras polares e não polares

CONCLUSÕES

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES PARA CONSULTA

EMPACOTAMENTO DE COLUNA PARA HPLC (1)

FASE REVERSA (E PAREAMENTO DE ÍONS)

C-18 (Octadecil ou ODS)	Robusto; altamente retentivo; amplamente disponível
C-8 (Octilo-)	Similar ao C-18, ligeiramente menos retentivo
C-3, C-3	Menos retentivo, usado na maioria das vezes por peptídeo e proteínas
C-1 (Trimetil-silil, TMS)	O menos retentivo; menos estável
Fenil	Moderadamente retentivo, algumas diferenças na seletividade
CN (Ciano)	Moderadamente retentivo; usado em fase normal e reversa
NH ₂ - (Amino)	Retenção fraca; usado pelos carboidratos; menos estável
Poliestireno	Estável com fases móveis 1 < pH < 13; melhor forma de pico e vida longa da coluna para algumas separações

FASE NORMAL

CN- (Ciano)	Rugoso; bastante polar; utilização geral
OH- (Diol)	Mais polar que CN-
NH ₂ - (Amino)	Altamente polar; Menos estável
Silica	Bastante robusto; barato; menos conveniente para operar; usado em prep LC.

EMPACOTAMENTO DE COLUNA PARA HPLC (2)

EXCLUSÃO POR TAMANHO

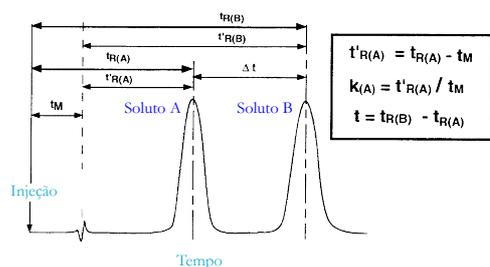
Silica	Muito Rugoso; adsorvivo
Silica Silanizada	Menos adsorvivo; compatibilidade alta com solvente; com solventes orgânicos
OH- (Diol)	Menos estável, usado em SEC (filtração de gel) aquoso
Poliestireno	Usado amplamente para SEC (GPC) orgânico; incompatível com solventes altamente polares

TROCA IÔNICA

Fase Ligada	Menos estável e reproduzível
Poliestireno	Menos eficiente; estável; mais reproduzível

L.S. Snyder, J.L. Glajch and J.J. Kirkland. "Practical HPLC Method Development". J. Wiley (1988) 80-105.

PARÂMETROS DE RETENÇÃO



EQUAÇÃO MESTRA DA RESOLUÇÃO

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

CAPACIDADE SELETIVIDADE EFICIÊNCIA

- A RESOLUÇÃO (R_s) É UMA FUNÇÃO DE TRÊS FATORES

TERMOS CROMATOGRÁFICOS

Símbolo e Nome Recomendado pela IUPAC*	Outros Símbolos e nomes em uso
K_C Constante de distribuição (para GLC)	K_D Coeficiente da Partição K_D Coeficiente da Distribuição
k Fator de Retenção	k Fator de Capacidade
N Número do Prato	n Número de Pratos Teóricos
H Altura do Prato	HETP altura Equivalente de um Prato Teórico
R Fator de Retardamento (em colunas)	R_k Razão de retenção
R_S Resolução do Pico	R Resolução do Pico
α Fator de Separação	α Seletividade; Eficiência do Solvente
t_R Tempo de Retenção	V_M Volume da Fase Móvel
V_R Volume de Retenção	V_G Volume da Fase Gasosa
V_M Volume Hold-Up	V_O Volume Morto

ALGUNS VALORES TÍPICOS PARA HPLC

ITEM	VALOR TÍPICO	FAIXA
Tamanho das Partículas	10 e 5 μm	3 e 10 μm
Tamanho dos Poros	80 e 100 Å	60 e 120 Å, até 4,000 Å
Dímetro Interno (id)	4,6 mm	2 - 5 mm
Comprimento (L)	15 e 25 cm	3 - 30 cm
Pressão	1500 psi	800 - 5000 psi
Fluxo Volumétrico	1 ml / min	0,5 - 2ml / min
Fluxo Linear	0,1 cm / sec	0,05 - 0,2 cm / sec
Volume		2 - 100 l
Concentração		1 ppm - 1 %
Volume da Cella		2 - 15 l até 200 l
Constante de tempo		25 msec - 1 sec