

QFL 1313 – Química Analítica III

Ciclo II

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

FASE REVERSA E TROCA IÔNICA

Renan Vitek

Renan.vitek@usp.br

NOVEMBRO / 2020

Definição de Cromatografia

CROMATOLOGRAFIA = método físico de separação no qual os constituintes de uma amostra a serem separados são distribuídos entre 2 fases.

Fase estacionária: geralmente de grande área, sólida ou líquida, responsável por reter os analitos (diferentes mecanismos)

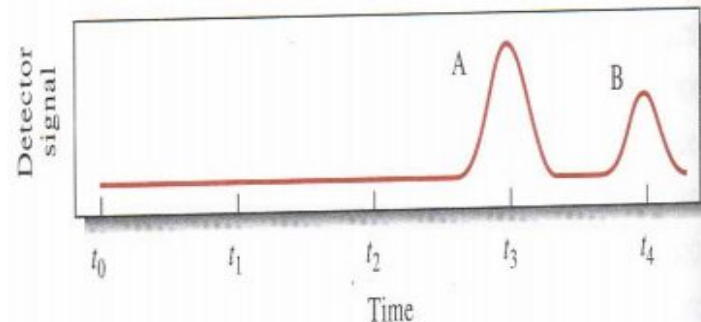
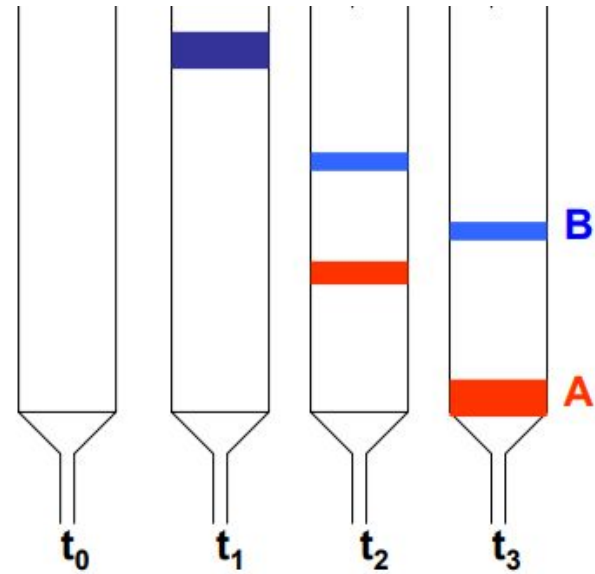
Fase móvel: um fluido insolúvel que percola através da fase estacionária. Pode ser de forma isocrática ou de gradiente.

Objetivo: Isolar o analito dos interferentes numa amostra, de forma que a informação analítica quantitativa sobre uma mistura complexa possa ser obtida.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Distribuição dos componentes em duas fases se dá pela **Eluição** da fase móvel pela coluna.

Através da seleção da otimização da Eluição nós obtemos a **Resolução** que mede a separação entre dois picos.

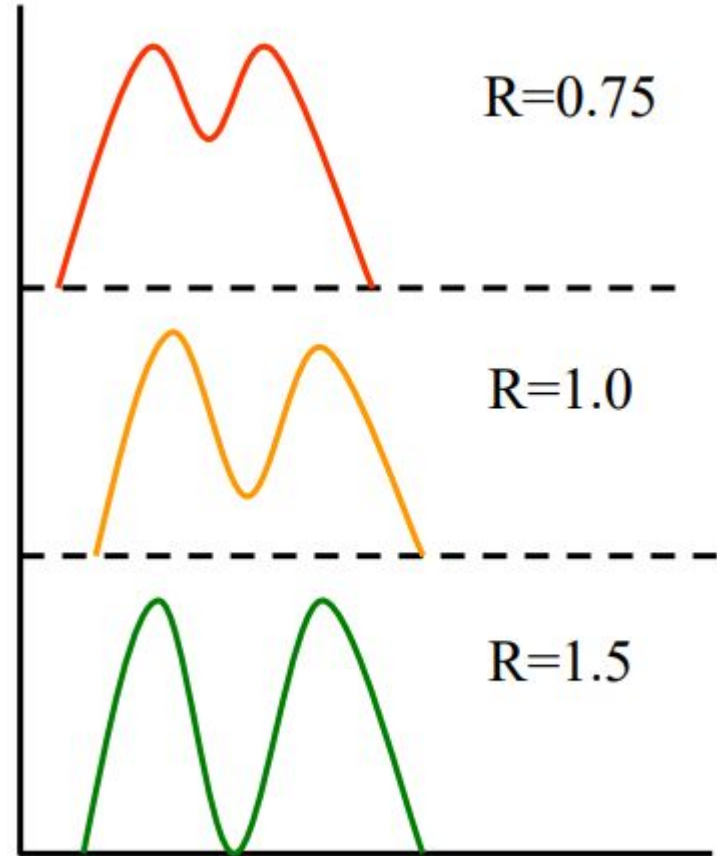


Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A **resolução** descreve a habilidade de uma coluna em separar os picos de interesse.

A resolução leva em consideração a eficiência (N), seletividade (α) e retenção (k).

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Na escolha da fase móvel devemos:

-Alto grau de pureza

-Força do solvente

-Polaridade

-Modo de eluição

-Fluxo da F.M.

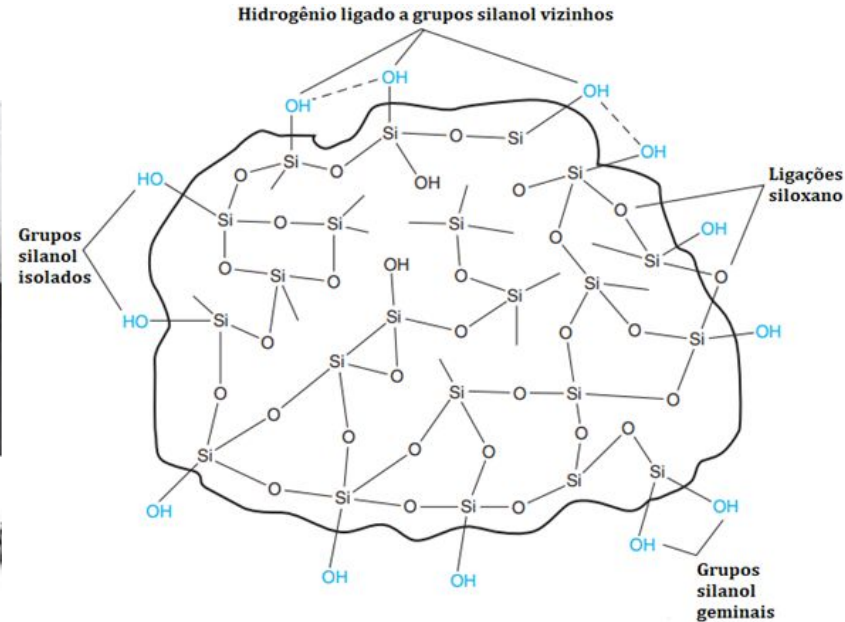
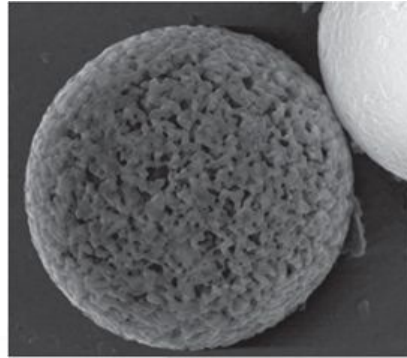
-Resolução de picos

Polaridade ou Força: determina por quanto tempo os eluentes são retidos (TR).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Colunas e Pré-Colunas

Suporte mais comum:
partículas microporosas
de sílica (permeável ao
solvente) que podem ser
funcionalizadas



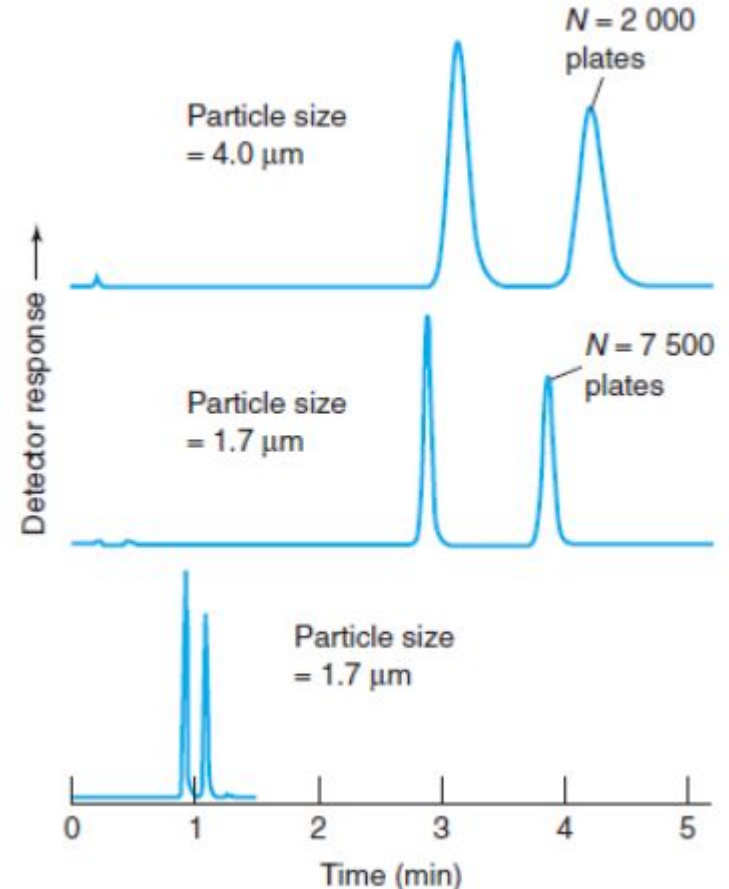
Diâmetro: 2 - 5 mm
Comprimento: 50 - 300 mm
Partículas: 1,5 - 5 μ m

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Sob condições ótimas de trabalho, a resolução aumenta com a diminuição das partículas da FE.

A diminuição do tamanho das partículas permite que o soluto se difunda em uma menor distância para se estabelecer o equilíbrio entre as fases (FE e FM).

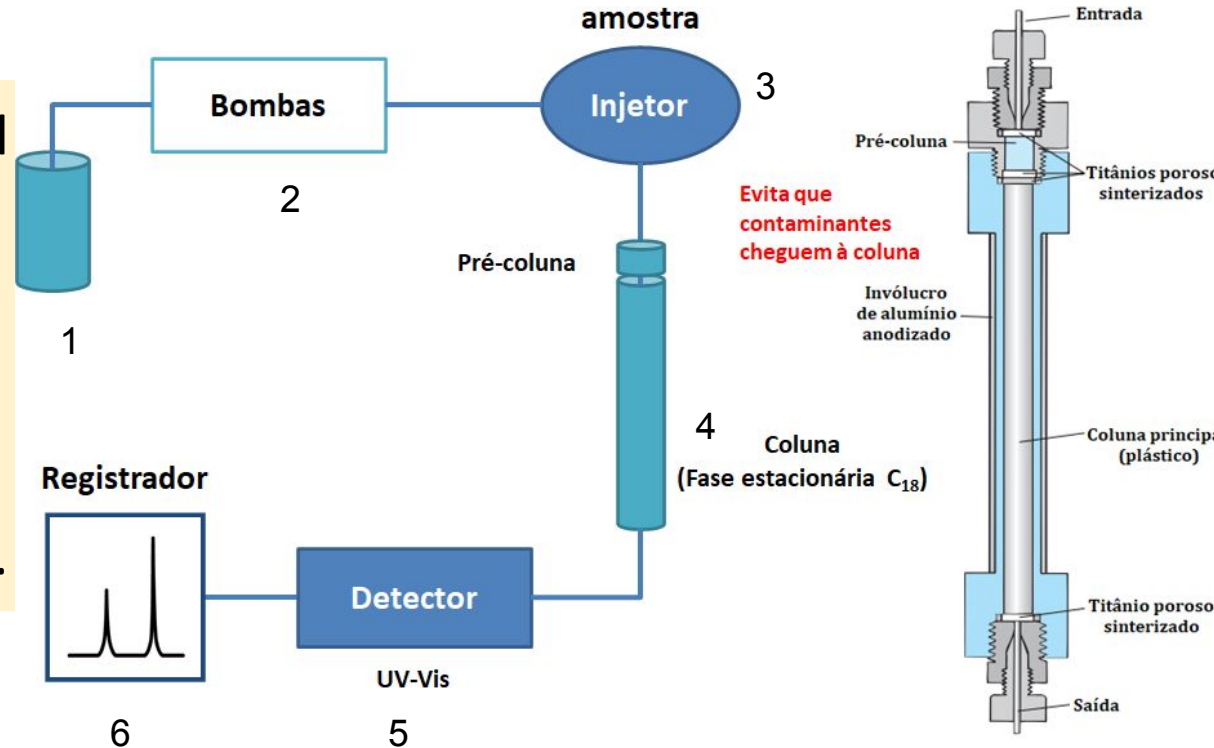
Faz-se necessário uma maior pressão devido à resistência ao fluxo do solvente.



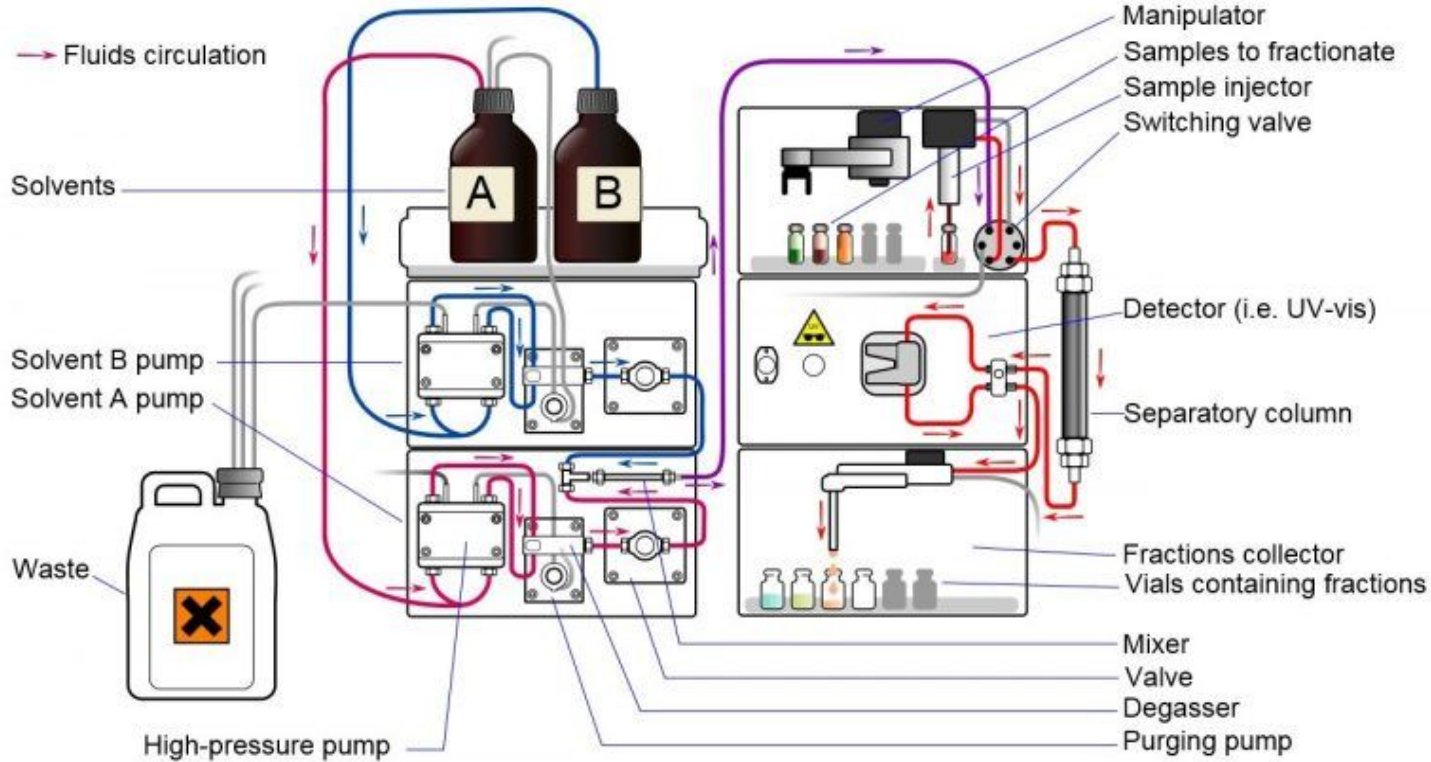
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O HPLC

- 1- Reservatório de fase móvel
- 2- Sistema de bombeamento
- 3- Sistema de injeção
- 4- Sistema analítico: coluna
- 5- Sistema de detecção
- 6- Sistema de controle, aquisição e registro de dados.



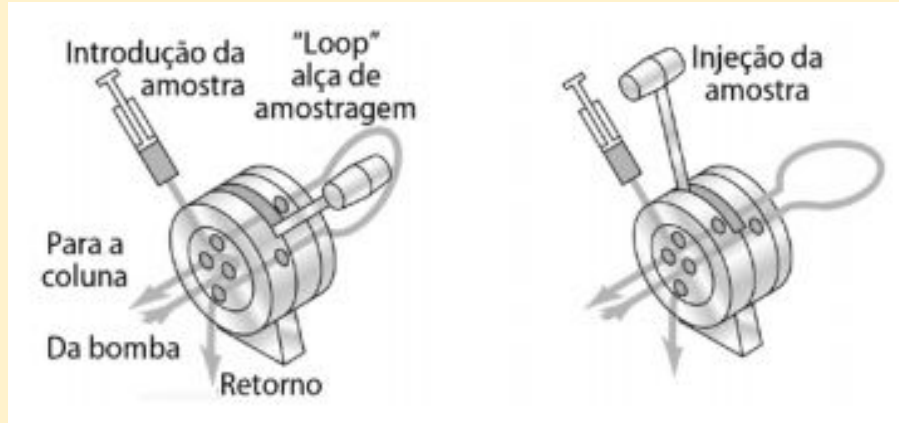
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



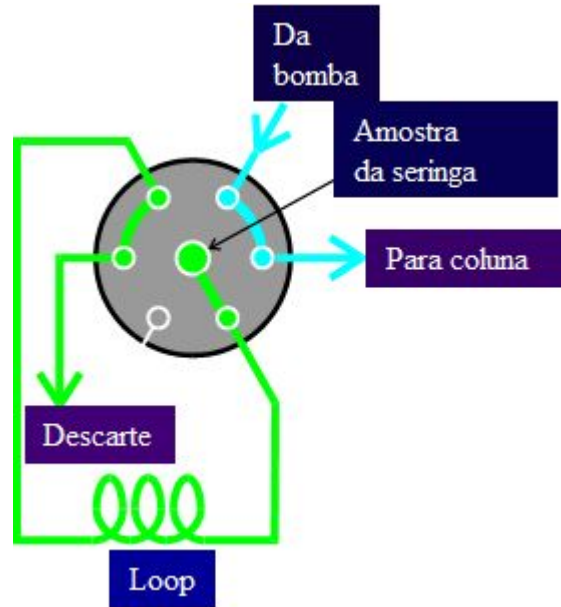
Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

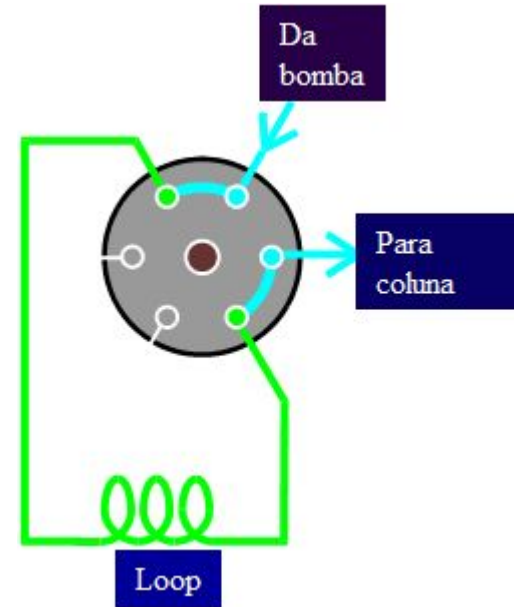
A amostra, introduzida na válvula mediante seringa, deve encher o espaço interno da porção do tubo capilar de aço, a alça de amostragem (carga). Normalmente o volume contido na alça é de 1 a 100 μL . A amostra é injetada na coluna, ao girar a válvula para que a posição de entrada e saída mude (injeção na coluna).



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



Carregar



Injetar



Loop: 5 - 20 μL

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Detectores

Se a amostra pode ser analisada por HPLC (consulte a literatura).

Seletivos: UV fixo e variável, fluorescência.

Universais: IR e MS.

UV, fluorescência e MS podem utilizar eluição gradiente, o IR não.

UV-Vis é a primeira escolha.

MS – é a melhor escolha.

Fluorescência – apenas se houver o conhecimento prévio de que é apropriado para a amostra.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Assista ao vídeo...

O Equipamento:

https://www.youtube.com/watch?v=fOL6yhGT1hA&list=PLT1ngvXX0ToZinlvNc9LEJgpvZn8_YO42&index=2

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Fase Normal

Fase estacionária: POLAR
Fase móvel: MENOS POLAR



Fase Reversa

Fase estacionária: APOLAR
Fase móvel: MAIS POLAR

Fases polares comuns

R = $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Amino
R = $(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$	Ciano
R = $(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	Diol

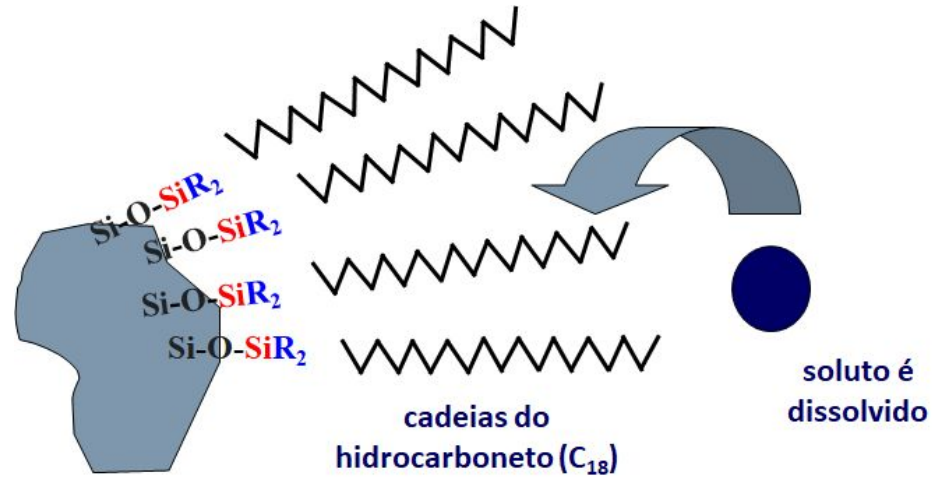
Fases apolares comuns

R = $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	Octadecil
R = $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	Octil
R = $(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$	Fenil

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Fase reversa

Fase Móvel: ACN, MeOH,
Água (tamp.) e THF



A força eluente aumenta com a adição de um solvente menos polar.
Fase estacionária: *Octadecil: C₁₈ é uma cadeia de hidrocarboneto com 18 carbonos sendo um dos mais APOLARES*
Na fase reversa, o componente MAIS polar elui primeiro.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Reflexão 1

Considerando o cromatograma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa hipotético abaixo apresentado. Proponha uma estratégia para reduzir o tempo de retenção (t_r) do composto 3 sem alterar o t_r dos demais compostos.

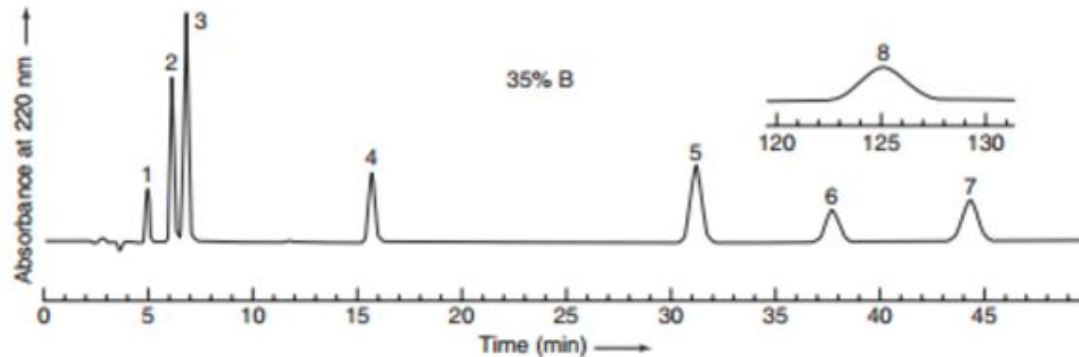
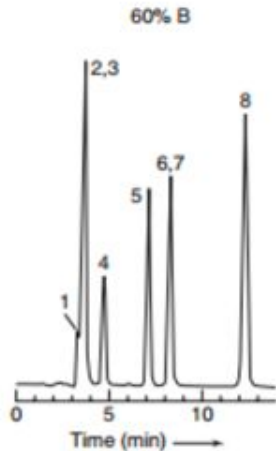


Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

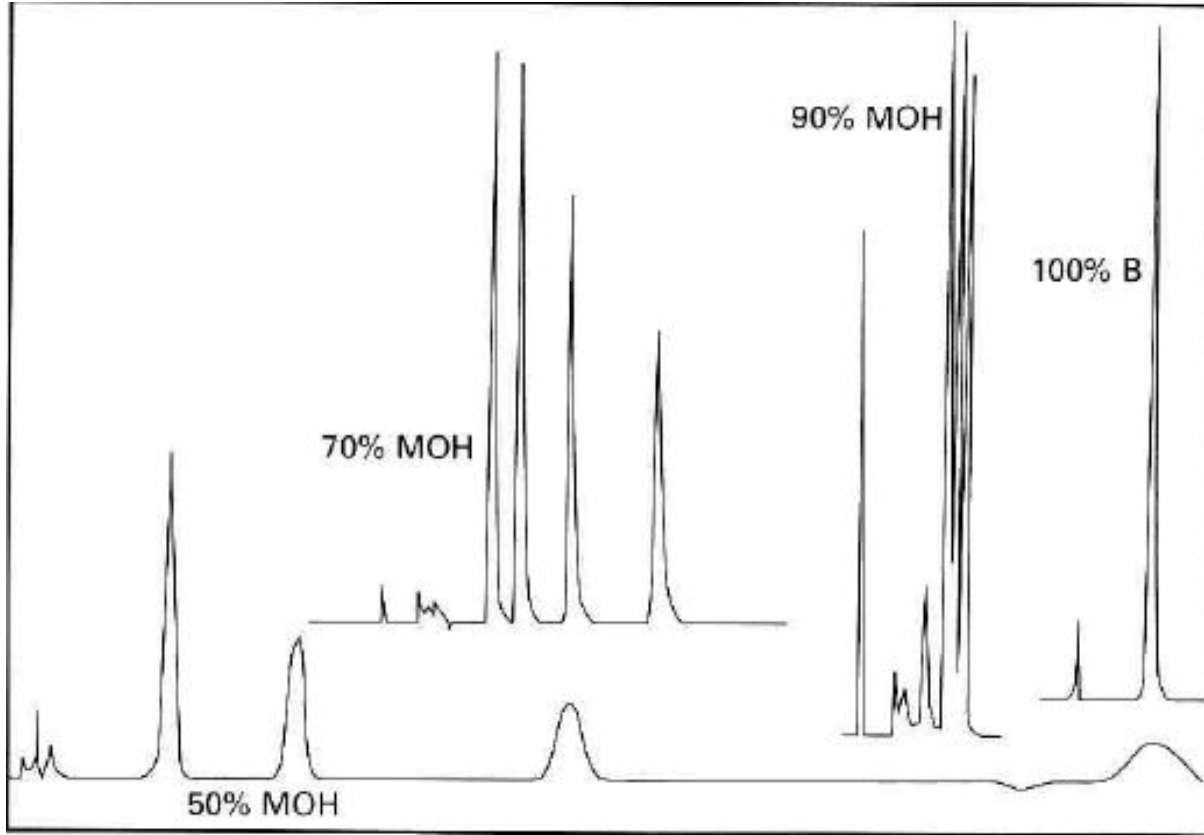
Eluição Isocrática: feita com um único solvente (ou mistura), a fase móvel permanece **CONSTANTE** na análise

Acetonitrila 60% x Acetonitrila 35% → Redução da força do eluente com um solvente mais polar.

Exemplo ⇒



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



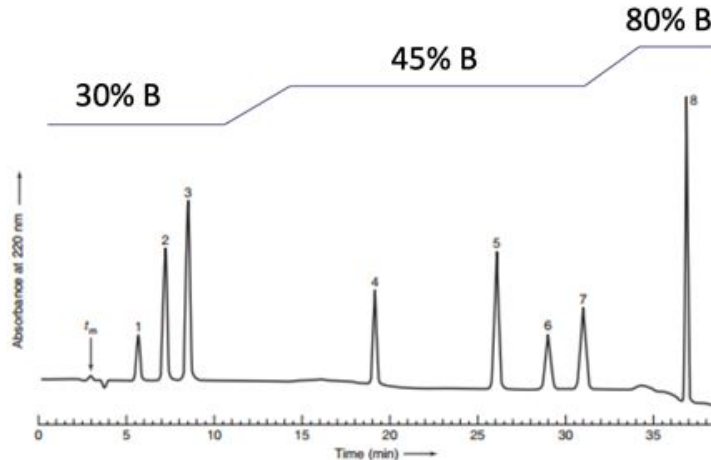
Ao variar a polaridade da fase móvel, varia o fator de retenção consequentemente a seletividade na separação.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Eluição por Gradiente: a composição da fase móvel **se ALTERA** durante a corrida cromatográfica, criando um gradiente

A força eluente aumenta com um solvente mais polar.

Exemplo ⇒



→
aumento a força do eluente
(solvente mais polar)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Determinação de um analito

A amostra é solúvel?

É possível analisá-la por HPLC?

Se sim, qual o detector?

Qual o modo da coluna?

Qual a coluna? FE, comp., diâmetro, etc.

FM? Polaridade, pH, força iônica.

Validação do Método:

Definir os parâmetros da validação

- Exatidão e precisão

- Sensibilidade

- LD e LQ

- Linearidade

- Recuperação

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Assista ao vídeo...

A quantificação:

<https://www.youtube.com/watch?v=KghpMM88AaQ&list=PLT1ngvXX0Tob90K4pGny61EOG8ZRU-qAd&index=5>

Determinação de cafeína e paracetamol por HPLC

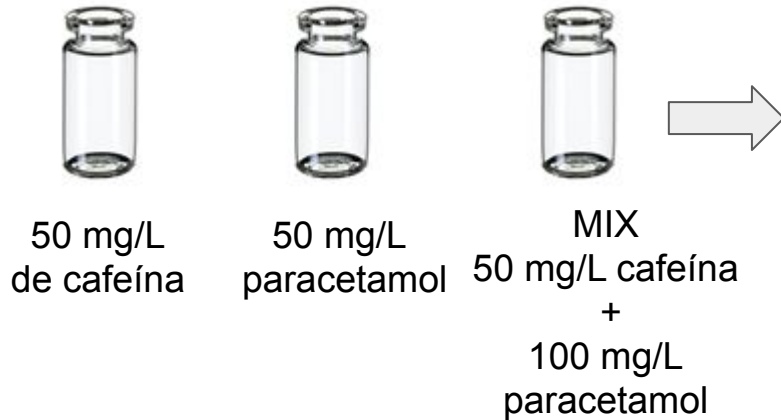
Cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10A.

Pré-Coluna e Coluna: sílica RP18.

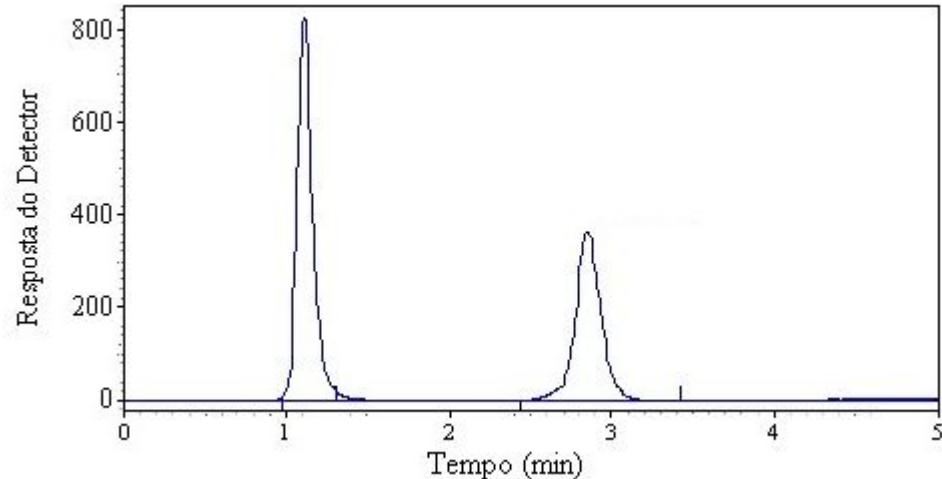
Fase móvel: Metanol:água (55:45, v/v) pH 2,5.

Detector: UV-vis, ajustado em 230 nm.

Seguir o procedimento descrito para ambientação da coluna.



Injetar 5 μ L da solução de CF
Injetar 5 μ L da mistura MIX



Determinação de cafeína e paracetamol por HPLC

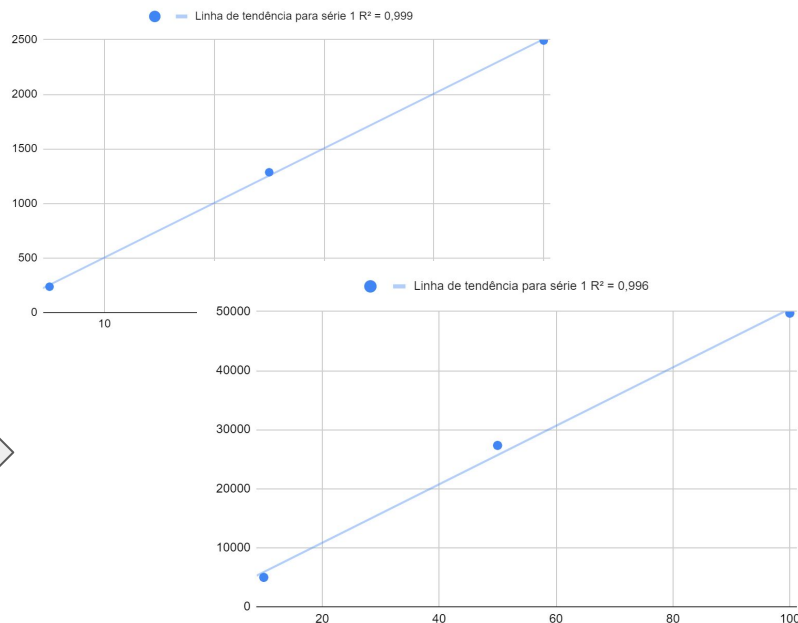
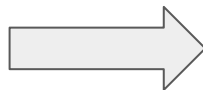
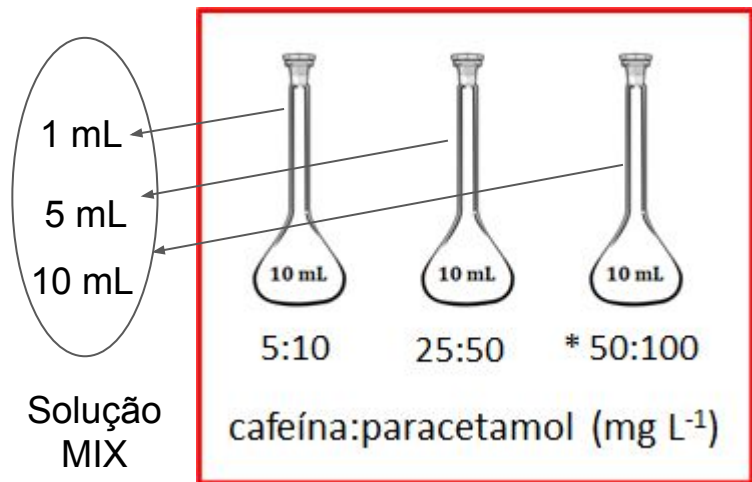
$$C1.V1 = C2.V2$$

50 mg/L . V1 = 5 mg/L . 10 mL
 V1 = 1 mL e diluir até 10 mL
 teremos 5 mg/L de cafeína

$$C1.V1 = C2.V2$$

100 mg/L . V1 = 10 mg/L . 10 mL
 V1 = 1 mL e diluir até 10 mL
 teremos 10 mg/L de paracetamol

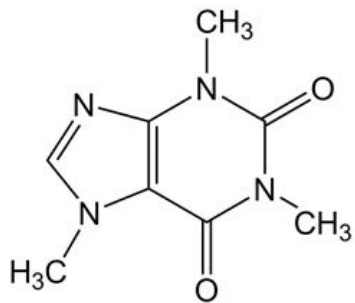
ou seja, é possível construir as soluções padrões a partir da solução MIX com o mesmo fator de diluição



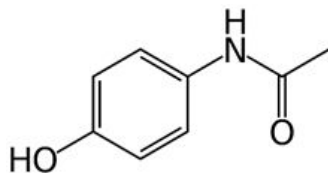
T. de Retenção	Analito	Curva Analítica		
		Concentração (mg/L)	Área	
?????	Cafeína	Cal 1	5 mg/L	236,819
		Cal 2	25 mg/L	1285,363
		Cal 3	50 mg/L	2492,575
?????	Paracetamol	Cal 1	10 mg/L	497,346
		Cal 2	50 mg/L	27232,761
		Cal 3	100 mg/L	49730,457

Determinação de cafeína e paracetamol por HPLC

Prática 01



Cafeína



Paracetamol



Preparo da amostra:



15 mg



30 mL
fase móvel



banho de ultrassom (15 min)

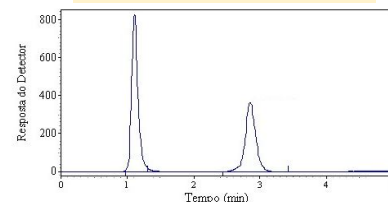


5 μ L



Filtrar e injetar

Resultados
A1= 2422,678
A2= 2078,145



Calcule as concentrações nos comprimidos e proponha qual dos picos é referente à cafeína e ao paracetamol?

Troca-Iônica

A separação ocorre devido a atração entre íons do soluto (analitos) e sítios carregados ligados à fase estacionária.

Trocadores aniônicos

grupos (+) ligados na fase estacionária atraem os ânions do soluto.

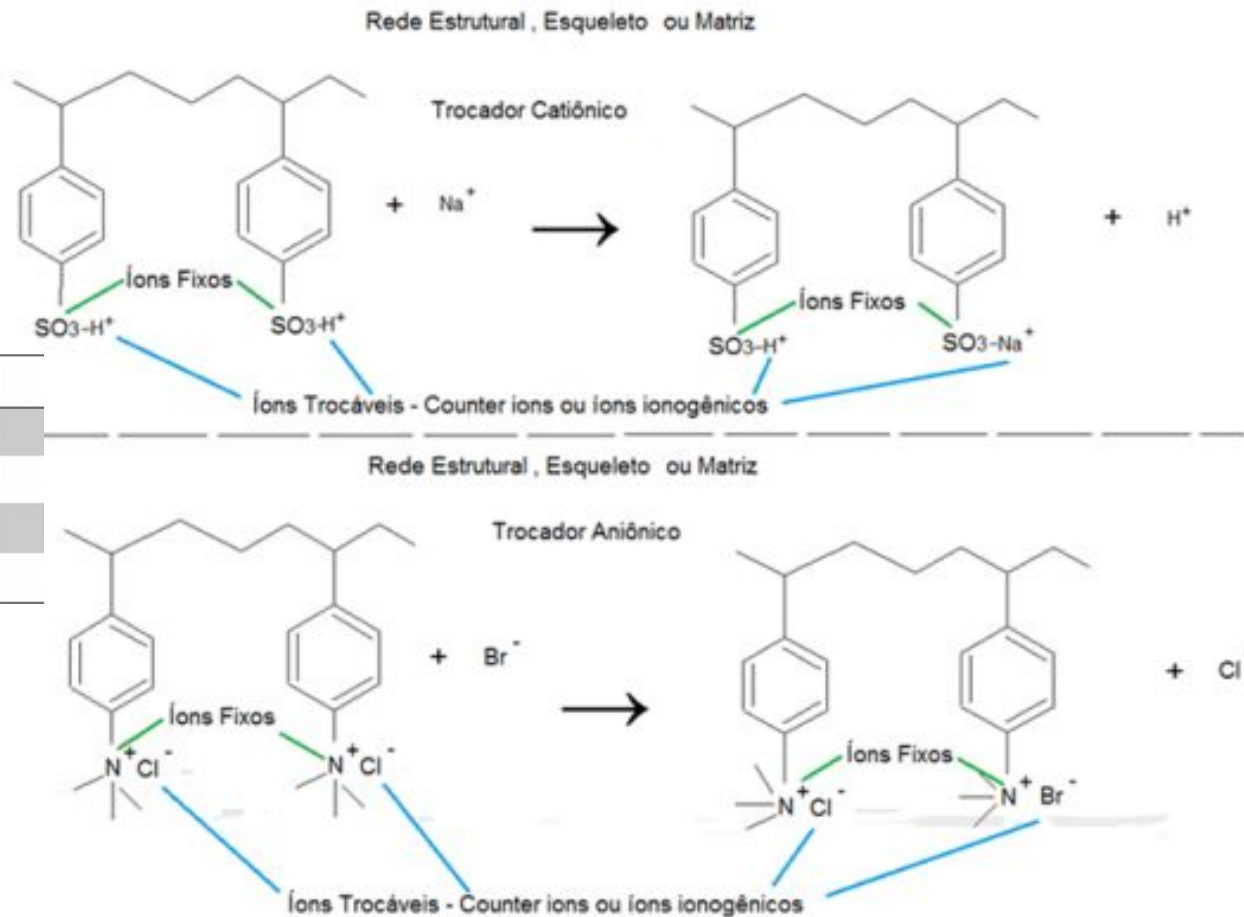
Trocadores catiônicos

grupos (-) ligados na fase estacionária atraem os cátions do soluto.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Troca-Iônica

Tipo de Trocador	Grupo Trocador Iônico	pH
Cátion Forte	Ácido Sulfônico	4 - 13
Cátion Fraco	Ácido Carboxílico	6 - 10
Ânion Forte	Amina Quaternária	2 - 12
Ânion Fraco	Amina Primária e Secundária	2 - 9



Determinação de ânions em amostra de gel dental

Cromatógrafo de íons Metrohm , bomba peristáltica para regeneração da coluna supressora e detector condutométrico

Pré-coluna: RP 2 e Coluna: Metrosep A SUPP 4

Solução de regeneração do supressor: H_2SO_4 100mM e H_2O deionizada.

Fase Móvel: Tampão 1,8mM Na_2CO_3 + 1,7mM NaHCO_3 , pH = 10,0.

Introduzir a amostra no Loop (20 μL)

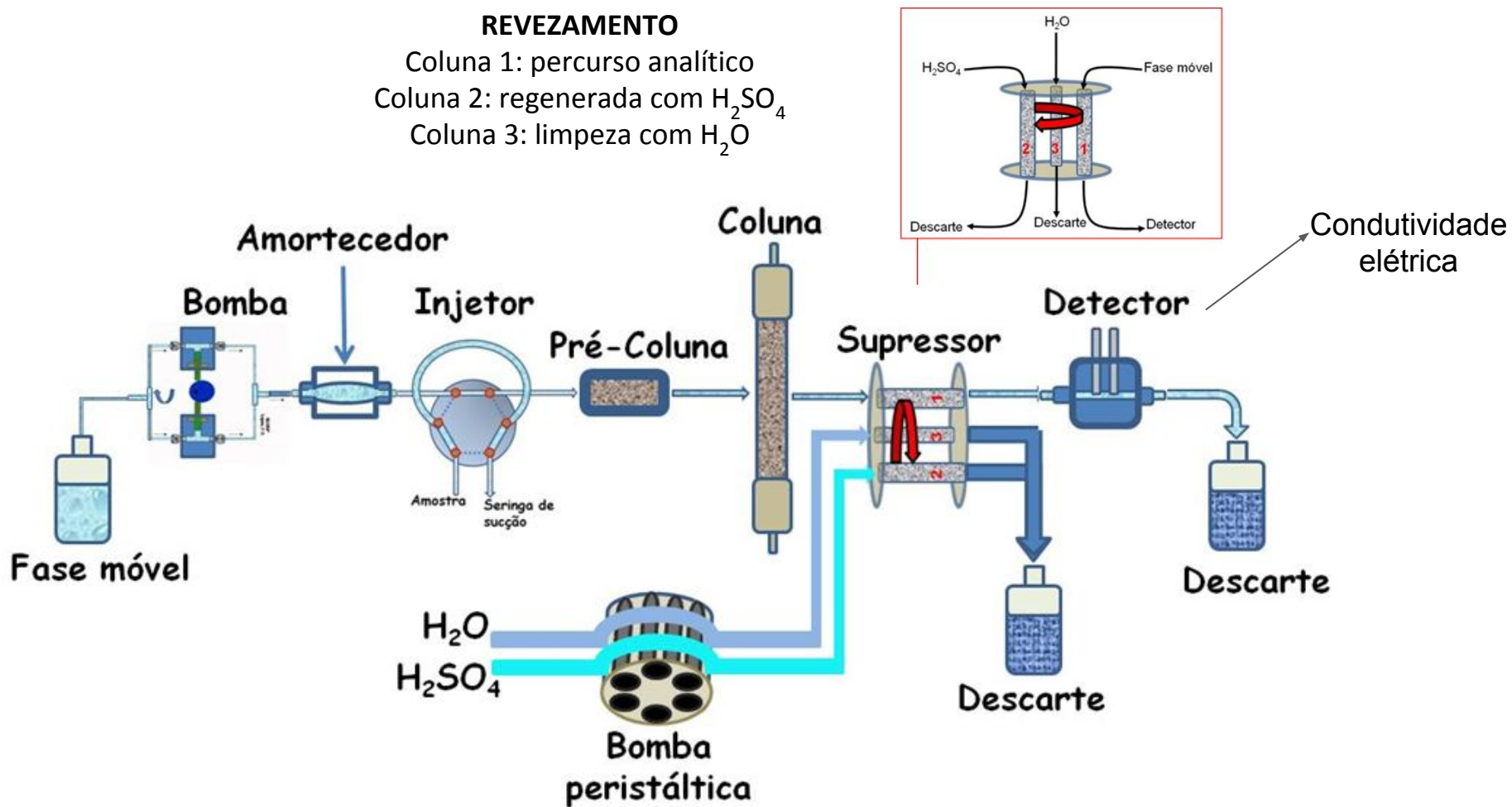
Coluna é composta por partículas de álcool polivinílico com grupos de amônio quaternário



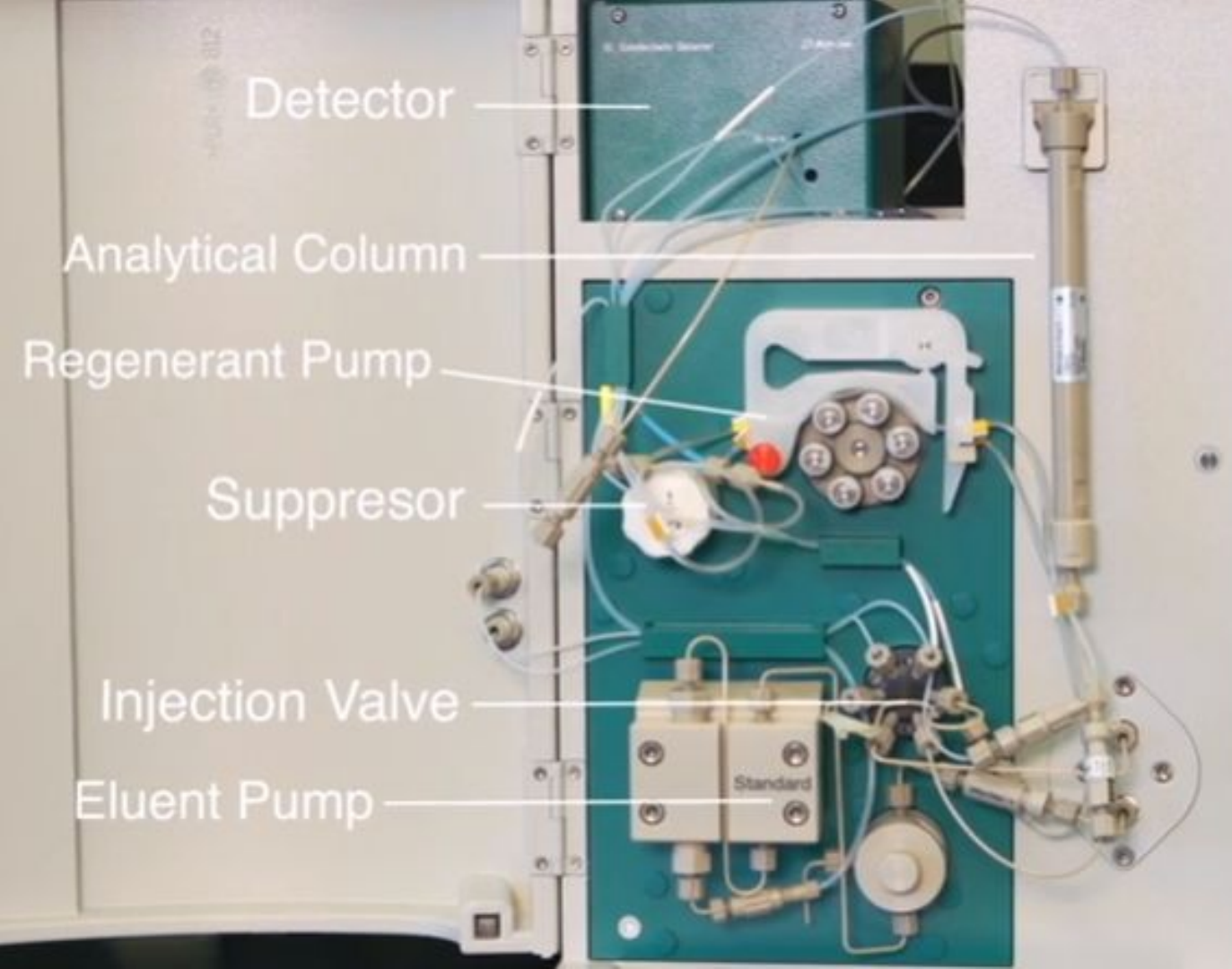
Cromatógrafo de íons Metrohm 761 Soft Drink

REVEZAMENTO

- Coluna 1: percurso analítico
- Coluna 2: regenerada com H_2SO_4
- Coluna 3: limpeza com H_2O



Supressor: colunas/resinas de troca iônica que removem eletrólitos indesejados antes da detecção.



Detector

Analytical Column

Regenerant Pump

Suppressor

Injection Valve

Eluent Pump

Assista o vídeo
[legendado](#)

<https://www.youtube.com/watch?v=zNFyxhcuB9A>

Determinação de ânions em amostra de gel dental

Preparo da solução padrão estoque

- Cloreto
- Fluoreto
- Brometo
- Acetato
- Sulfato
- Fosfato
- Nitrato



- 8 mg/mL

15 mg/mL



Mix de ânions



Injetar (20 μ L) da solução MIX e identificar os íons de acordo com a ordem de eluição.

A prática consiste em identificar os picos dos ânions nas amostras por comparação de tempos de retenção dos padrões.

Determinação de ânions em amostra de gel dental



0,12 g + 20 mL de H₂O



20 minutos

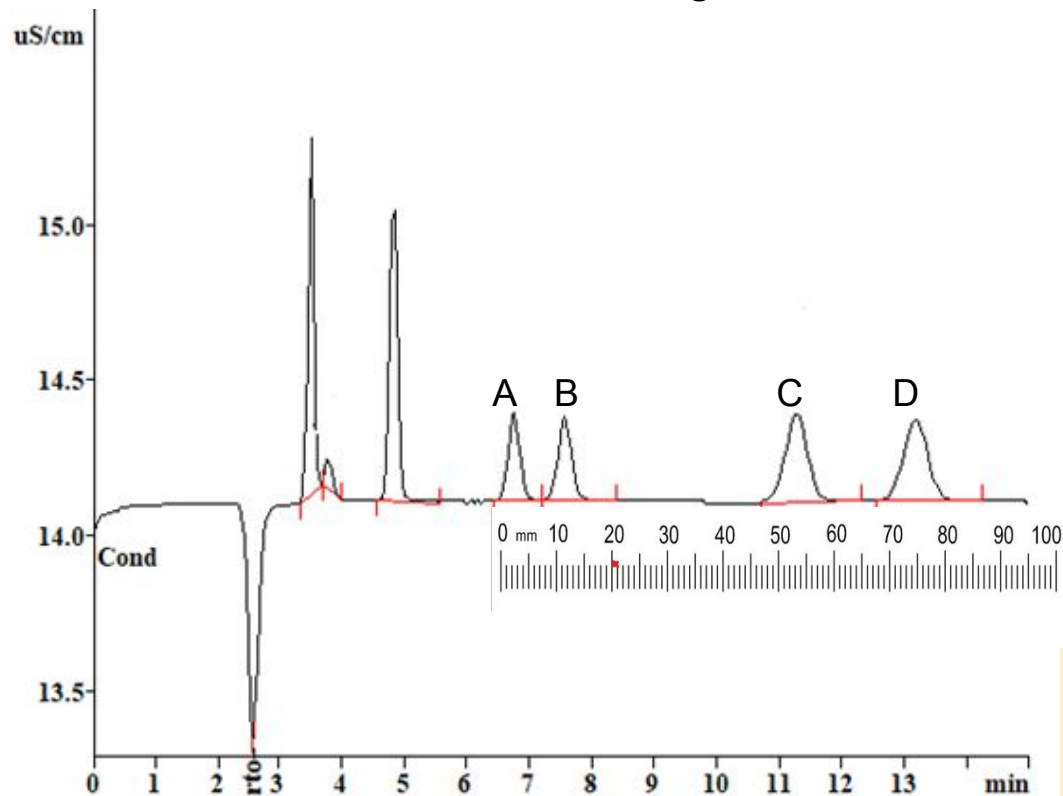


50 mL



Determinação de ânions em amostra de gel dental

Cromatograma e dados obtidos:



Quantitation method: Custom

No	Retention min.	Height uS/cm	Area uS/cm*sec.	Name
1	2.57	-0.00	-0.000	Tempo morto
2	3.50	1.16	7.913	Fluoreto
3	3.76	0.11	0.895	Acetato
4	4.82	0.98	9.013	Cloreto
5	6.74	0.29	3.805	Brometo
6	7.55	0.27	4.191	Nitrato
7	11.27	0.28	7.208	Fosfato
8	13.18	0.27	7.380	Sulfato

This report has been created by IC Net METROHM LTD

Calcule a resolução para os picos A e B e compare com C e D?

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Grupo 1 - 6

Determinação da cafeína no café

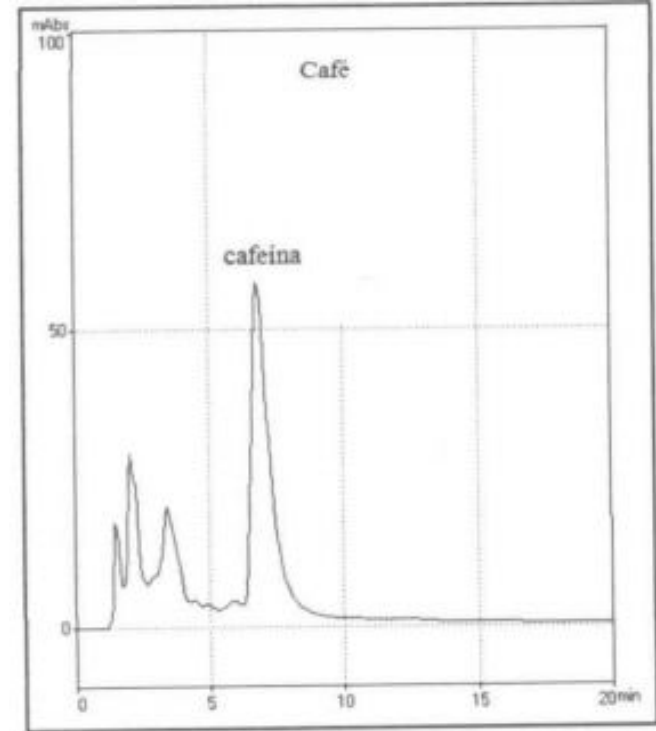
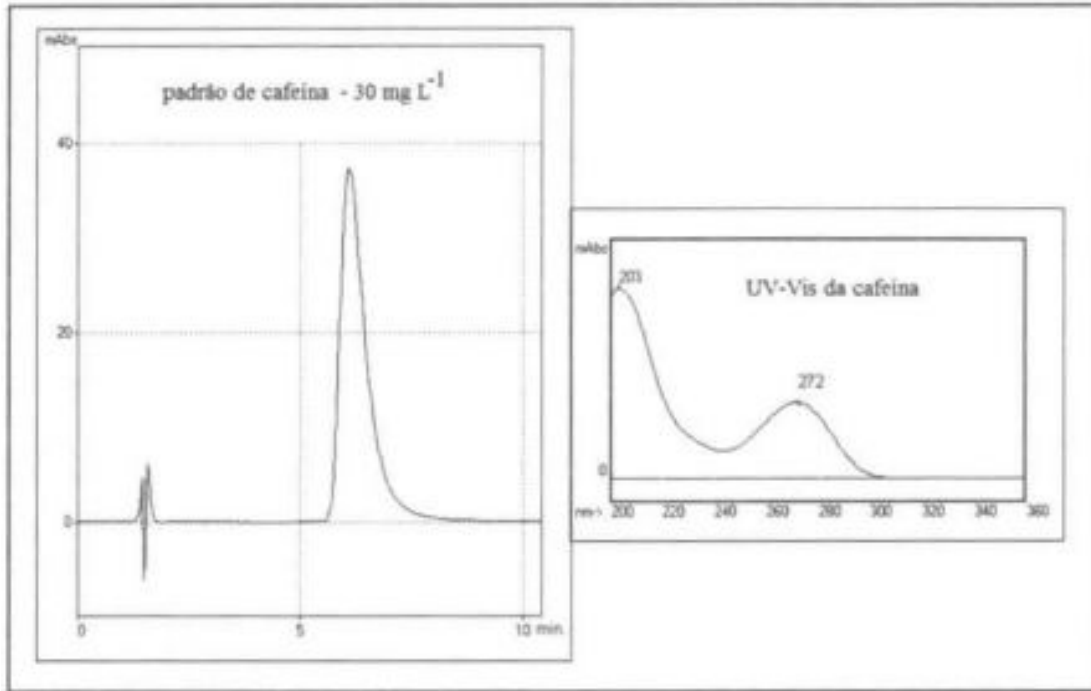
As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático, usando metanol:água com 0,05% de TFA em fluxo de 1 mL/min com um volume de injeção de 20 μ L (loop) . Detector arranjo de diodo com monitoramento em 272 nm. A coluna foi uma C18 .

A determinação quantitativa de cafeína foi feita pelo método de padrão externo. Para tal, uma curva analítica foi construída com as seguintes concentrações: 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 50 mg/L , utilizando-se metanol como solvente.

Concentração em mg/L	Área
1	40,338
5	236,819
10	497,346
15	732,626
20	1028,291
30	1500,055
50	2492,575
Amostra	1247,767

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Uma xícara de café coado foi preparada diluindo-se 3 colheres de pó em 600 mL de água fervente. O extrato foi diluído 25 vezes para que a concentração de cafeína ficasse dentro da faixa de linearidade da curva analítica. Determine a [] de cafeína no café?



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Grupo 7 - 12 Análise da Cloroquina e Hidroxicloroquina em leite.

Preparo da curva analítica

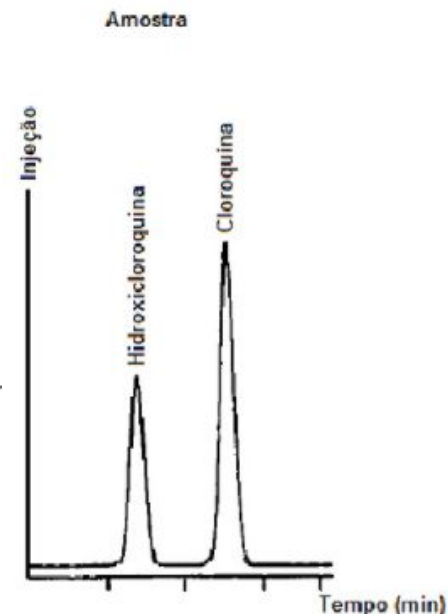
Alíquotas de 1 mL de leite foram enriquecidas com padrões de cloroquina e hidroxicloroquina nas concentrações especificadas na tabela a seguir. Posteriormente foram submetidas a extração com acetato de etila em meio básico. Volumes de 100 μL da fase orgânica foram coletados, evaporados até a secura, os resíduos foram dissolvidos em 100 μL da fase móvel e 20 μL foram injetados no sistema cromatográfico.

Amostra: Diversas alíquotas 1 mL de leite de diferentes fabricantes foram analisadas.

Análise cromatográfica: Coluna RP-18 (partículas 5 μm , 125 x 4,6 mm); fase móvel: água alcalinizada com trietilamina pH 7,5 : acetonitrila (80:20,v/v); vazão 1 mL/min; detecção em 320nm).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cloroquina		Hidroxicloroquina	
Concentração (µg/mL)	Altura (cm)	Concentração (µg/mL)	Altura (cm)
0,5	9	0,25	3
0,8	14	0,4	5
2,0	36	1,0	12
Amostra ?	27	Amostra ?	9



- Calcular a concentração de CQ e HCQ na amostra de leite
- Explicar a ordem de eluição (apresentar as estruturas).

Referências

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R.; Fundamentos de Química Analítica, 8 a ed., Thomson, São Paulo, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A; Princípios de Análise Instrumental, 5 a ed., Bookman, São Paulo, 2002.

HARRIS, D.C.; Análise Química Quantitativa, 6 a ed., Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2005.