

ANÁLISE INSTRUMENTAL

CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA (TEORIA)

(3ª PARTE)

- **Prof. Dr. Antônio Aarão Serra**
- **Profa. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

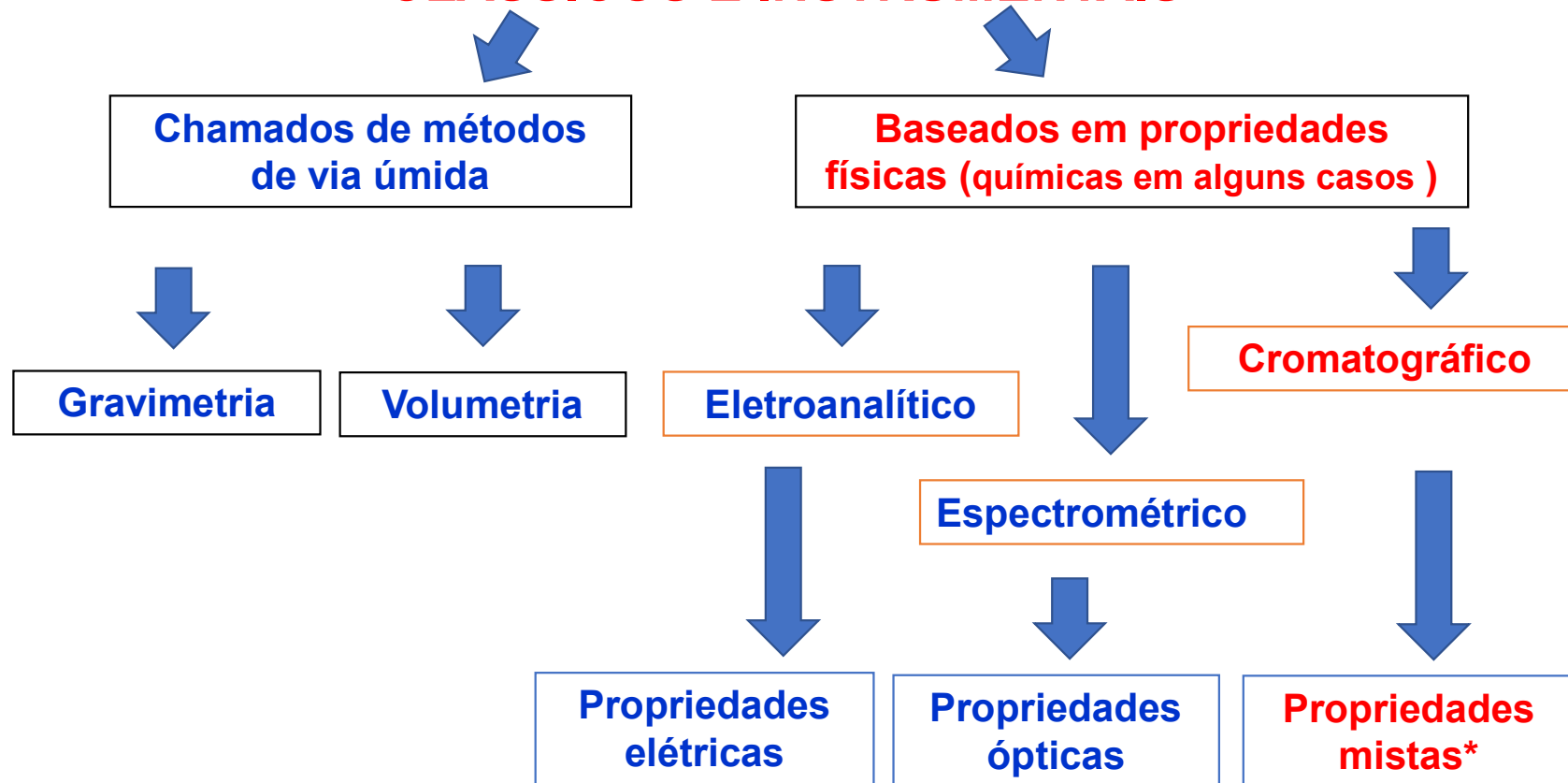
- **PLANO DE AULA:**
 - **(1ª PARTE) INTRODUÇÃO**
 - **(1ª PARTE) CROMATOGRAFIA PLANAR**
 - **(1ª PARTE) CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA**

 - **(2ª PARTE) CROMATOGRAFIA A GÁS (CG)**

 - **(3ª PARTE) CROMATOCRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) OU (HPLC)**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS E INSTRUMENTAIS



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

OBJETIVO

- **Separar os componentes de uma mistura;**
- **Purificar um composto;**
- **Isolar um composto;**
- **Quantificar e Qualificar**
- **Auxiliar na identificação de um composto.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

APLICAÇÃO

- **Agricultura (Pecuária, Veterinária)**
- **Alimentícia**
- **Cosméticos (Higiene, Perfumes)**
- **Farmacêutica (Farmacos)**
- **Medicina (Hospitais e Clínicas)**
- **Meio Ambiente (Resíduos, Águas)**
- **Petroquímica (Derivados)**
- **Embalagens**
- **Mineração**
- **Produtos Naturais (fragâncias, essências, princípios ativos)**
- **Química (matéria-prima, catalisadores, aditivos)**
- **Entre outros**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

DEFINIÇÃO - PRINCÍPIOS

DEFINIÇÃO:

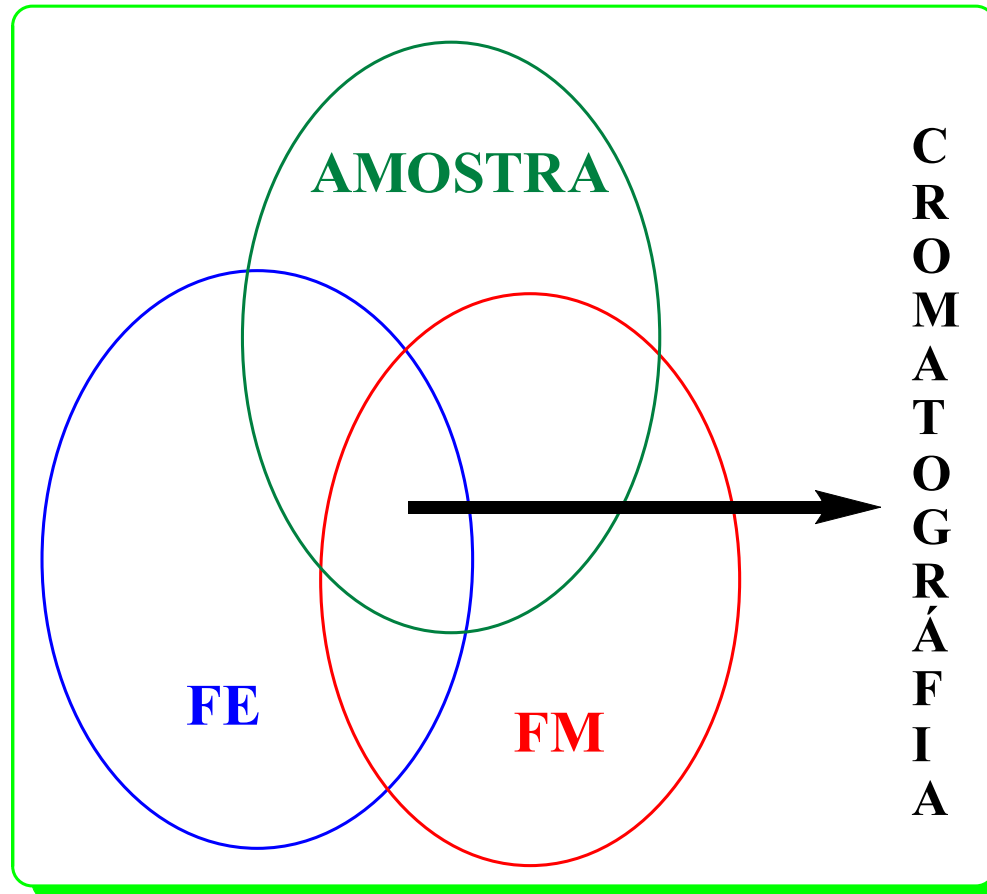
Cromatografia é um método físico-químico de separação de misturas, identificação e quantificação de seus componentes.

PRINCIPIO BÁSICOS:

A separação cromatográfica é realizada a partir de interações diferenciadas entre os analitos componentes da mistura, fase estacionária (FE) e fase móvel (FM).

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

MECANISMO DE SEPARAÇÃO



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

FORÇAS INTERIÔNICAS QUE ATUAM NA CROMATOLOGÁFIA

- **As principais forças elementares que agem sobre as moléculas são de cinco tipos:**
- **1) Forças de dispersão de London ou forças e de Van der Waals;**
- **2) Interações de dipolo induzido;**
- **3) Ligações de hidrogênio;**
- **4) Interações dielétricas;**
- **5) Interações eletrostáticas e coulombianas.**
- **Outra forças: Capilaridade, Gravidade e Pressão**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

• DE ACORDO COM O SISTEMA CROMATOGRÁFICO

• Coluna

- Cromatografia Líquida
- Cromatografia Gasosa
- Cromatografia Supercrítica

• Planar

- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)
- Cromatografia em Papel (CP)
- Centrífuga (Chromatotron®)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- **DE ACORDO COM A FASE MÓVEL**
 - **Utilização de Gás**
 - Cromatografia Gasosa (CG)
 - Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR)
 - **Utilização de Líquido**
 - Cromatografia Líquida Clássica (CLC)
 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
 - **Utilização de Gás Pressurizado**
 - Cromatografia Supercrítica (CSC)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- **DE ACORDO COM A FASE ESTACIONÁRIA**
 - Líquida
 - Sólida
 - Quimicamente Ligadas
- **DE ACORDO COM O MODO DE SEPARAÇÃO**
 - Por Adsorção
 - Por Partição
 - Por Troca Iônica
 - Por Exclusão
 - Por Afinidade

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

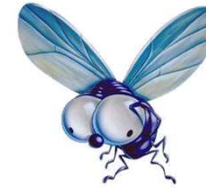
ANALOGIA (FASE ESTACIONÁRIA E ANALÍTO)

O processo cromatográfico pode ser comparado a um grupo de abelhas e moscas sobrevoando uma certa região.

Ao passarem por uma flor, espera-se algum efeito sobre as moscas e abelhas.



Fase estacionária



Analitos

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

ANALOGIA (FASE ESTACIONÁRIA E ANALÍTO)

Para uma mesma mistura, a simples troca da fase estacionária pode ser suficiente para alterar completamente a ordem de eluição de componentes da mistura.



Fase estacionária

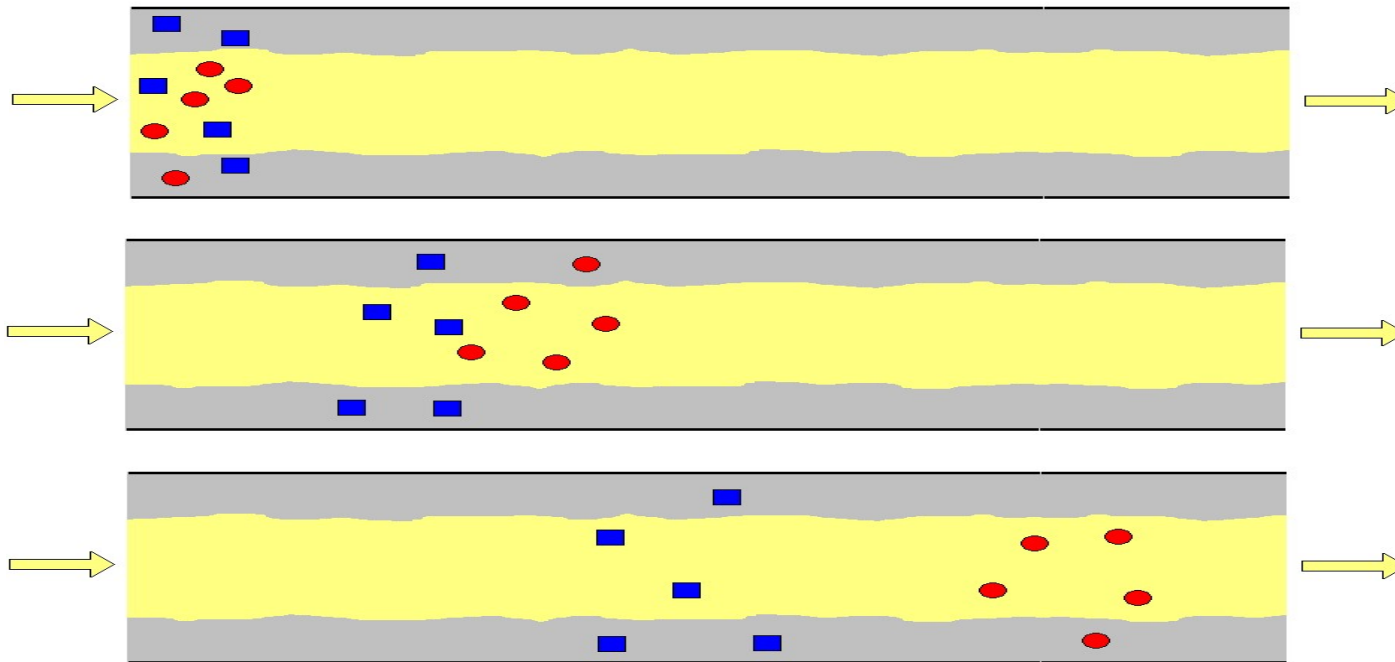


Analitos

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

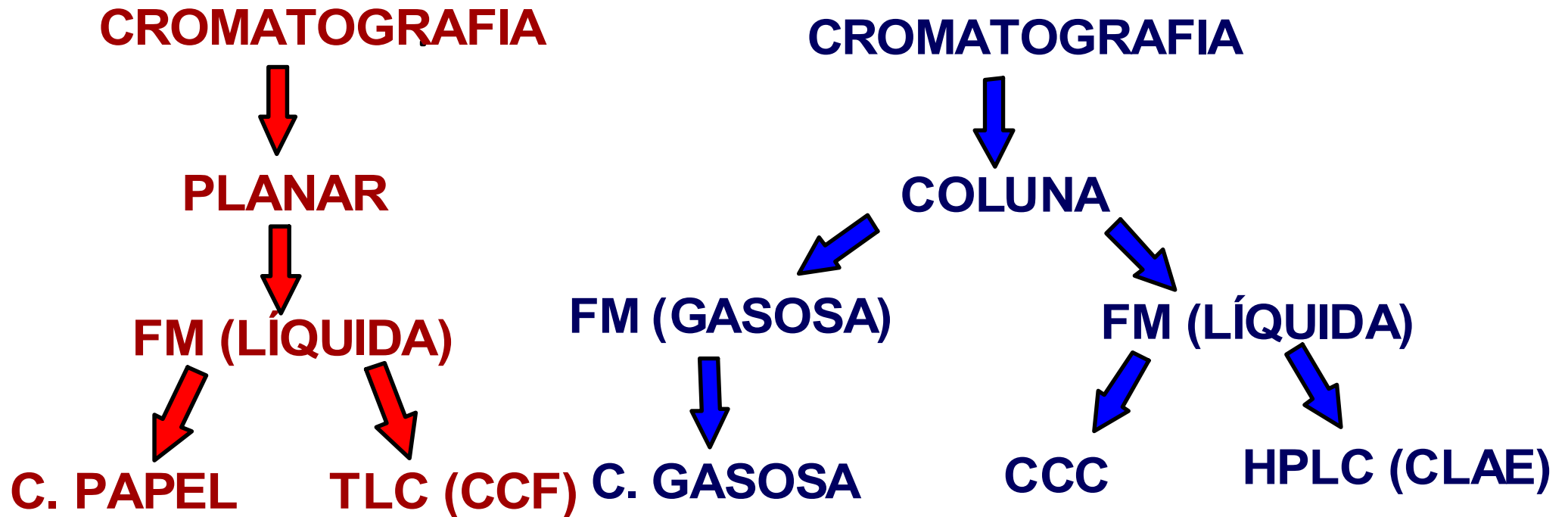
PRINCÍPIO BÁSICO (FASE MOVEL /ESTACIONÁRIA)

Separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes com uma **FASE ESTACIONÁRIA** (líquido ou sólido) e uma **FASE MÓVEL** (líquido ou gás).



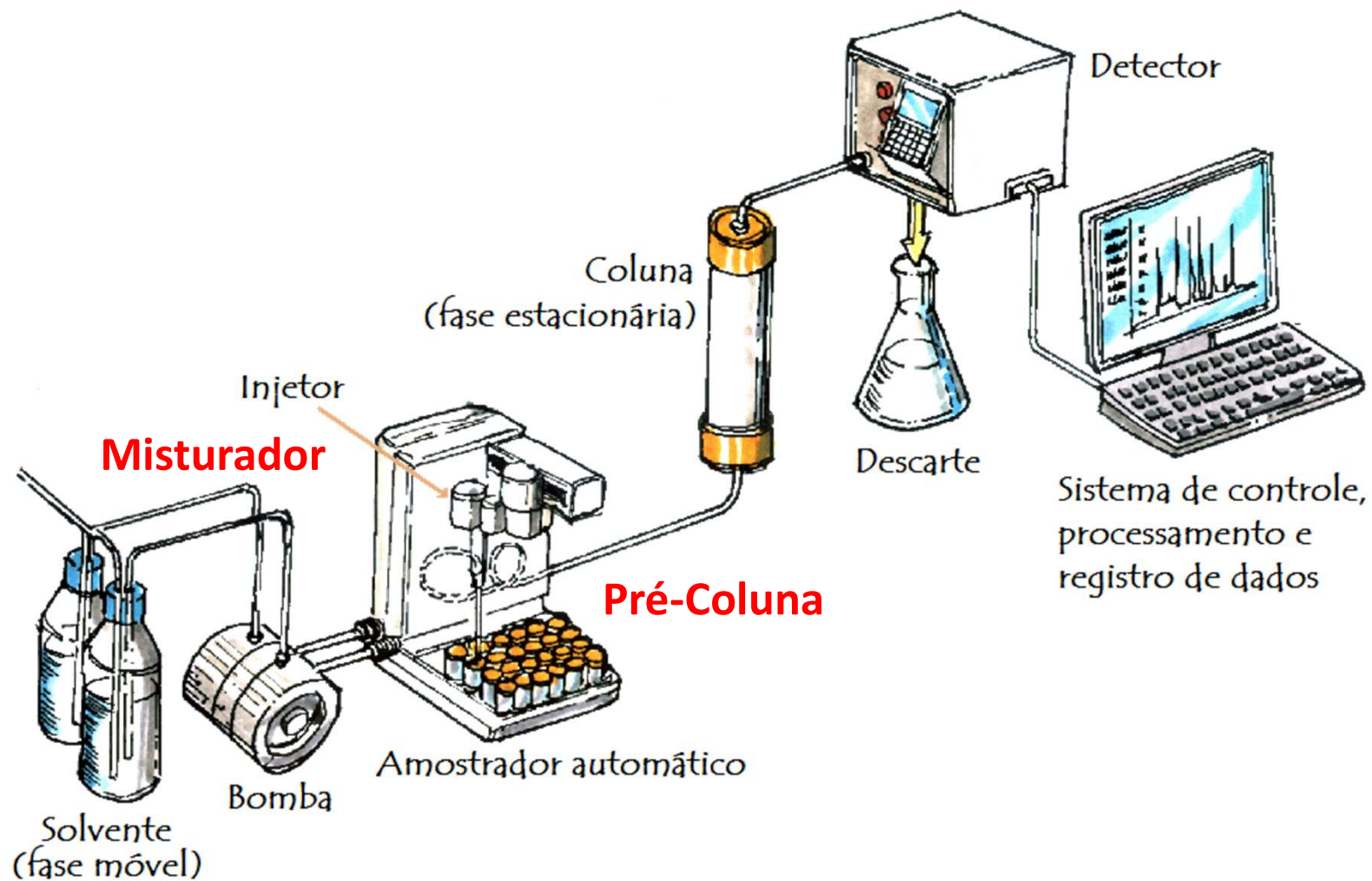
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

PRINCIPAIS TIPOS DE CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

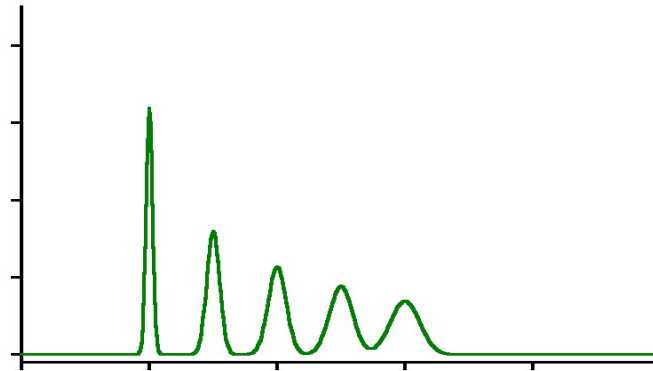
CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

APLICABILIDADE

Quais misturas podem ser separadas por CLAE ?

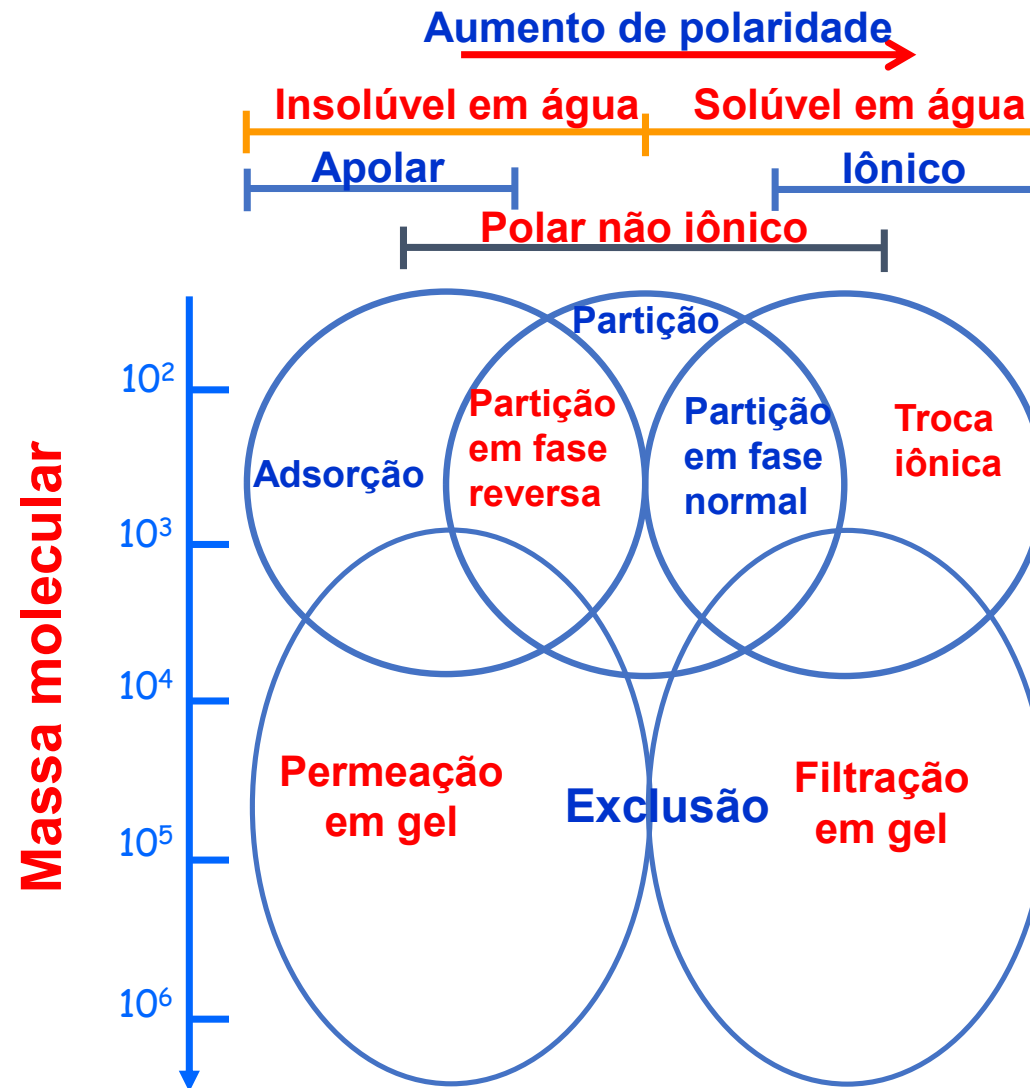


Qualquer substância que poder ser “arrastada” por um fluxo de líquido. Desde que ela se dissolva total ou pelo menos parcialmente nesse líquido.

- Líquidos e sólidos, iônicos ou covalentes com massa molar de 32 até 4.000.000.

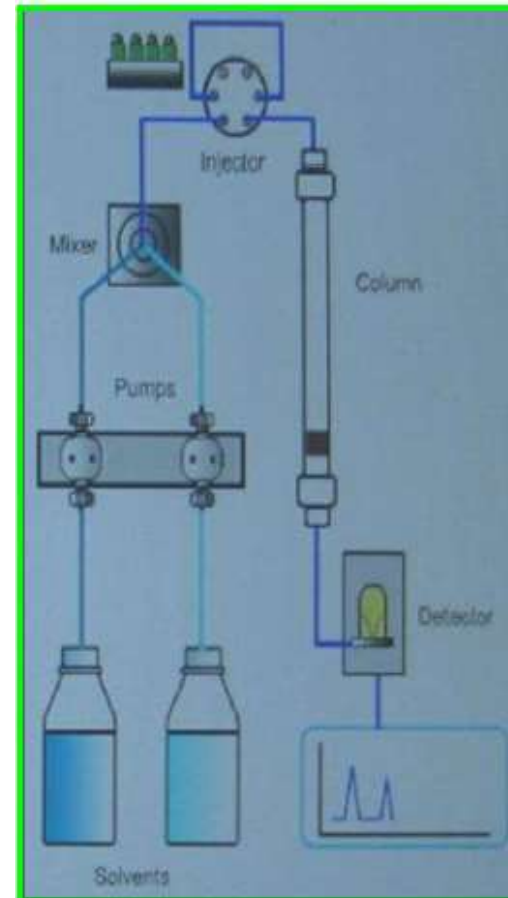
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

TIPOS E APLICAÇÕES DA HPLC



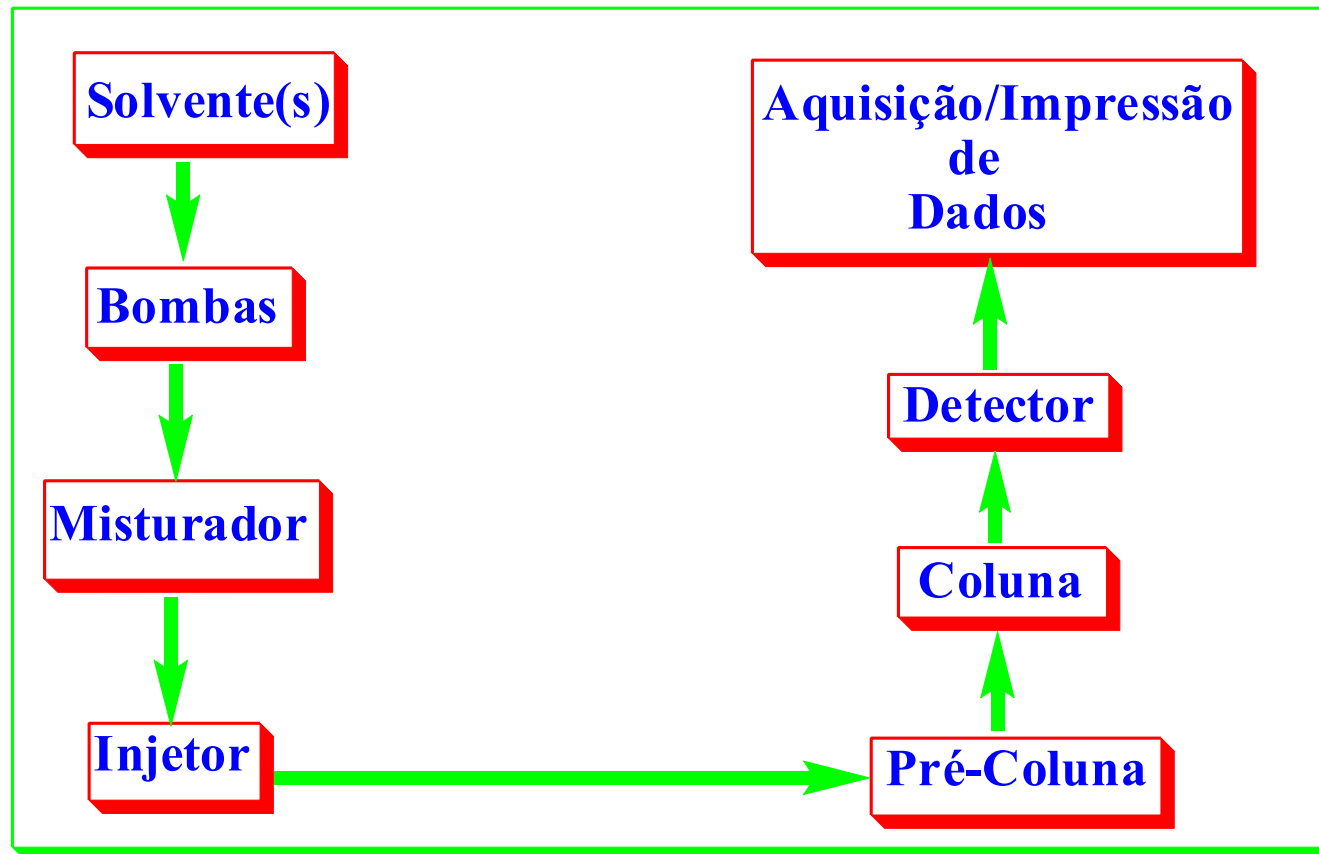
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- HPLC



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

Diagrama de blocos HPLC



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**

- **1. Sistema de solventes**
- **2. Bombas**
- **3. Misturador**
- **4. Injetor/Sistema de Injeção**
- **5. Pré-Coluna**
- **6. Coluna**
- **7. Detector**
- **8. Tratamento de Dados/Impressão**
- **9. Análise de Cromatograma**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

1-SISTEMAS DE SOLVENTES

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **1. Sistema de solventes (FASE MÓVEL):**
 - Puro
 - Misturas (dois ou mais solventes)
- **Solventes mais utilizados:**
 - Água, acetonitrila, metanol, THF, hexano, etanol.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **FASE MÓVEL: Solventes**
- **CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DA FASE MÓVEL:**
 - **Degaseificada:** (garante a reprodutibilidade de vazão e estabilidade da base);
 - **Alto grau de pureza ou fácil purificação;**
 - **Dissolver a amostra sem decompor;**
 - **Não decompor ou dissolver a fase estacionária.**
 - **Baixa viscosidade;**
 - **Compatível com o detector;**
 - **Polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **FASE MÓVEL:**
- **MÉTODOS DE DEGASEIFICAÇÃO:**
- **Ultrassom:** Muito lento, pouco eficiente, requer agitação, em geral o pior método quando usado sozinho.
- **Vácuo + ultrassom:** Rápido, eficiente, refazer a cada 12 hrs.
- **Purga com Hélio:** Contínuo, hélio é razoavelmente caro, leva a aumento de vazamentos, maior custo operacional.
- **Degaseificador on-line:** Contínuo, remove o ar logo antes de entrar na bomba, investimento alto inicial (melhor opção a longo prazo).

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

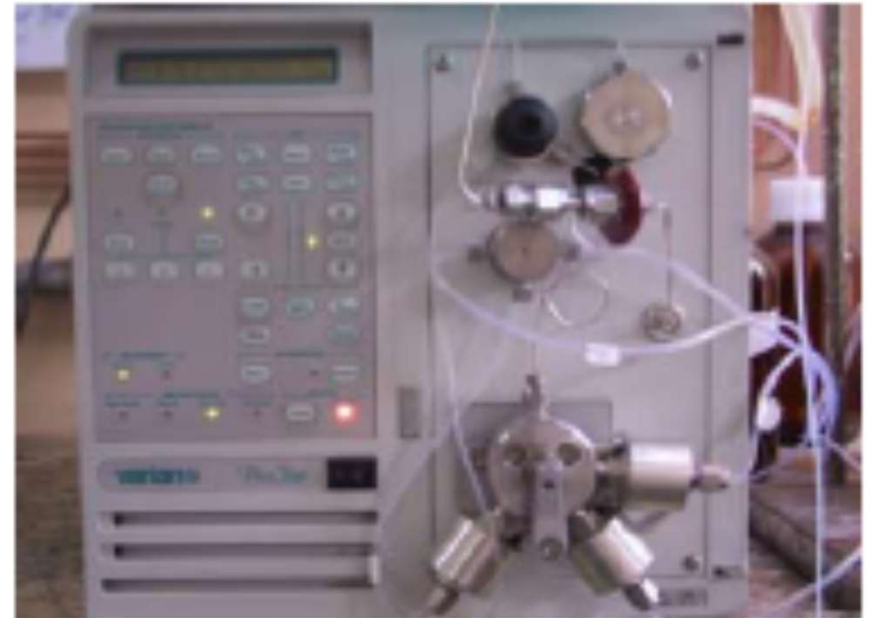
2-BOMBAS

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **2. BOMBAS: (Duplos Pistões)**
 - Podem ser (bombas isocráticas, binárias e quaternária).
 - **Pressão elevada até 6000psi (~400Bar)**
 - **Vazão contínua sem pulsos (ou, se pulsando, com amortecedor de pulsos)**
 - **Fluxo 0,1 a 10mL/minuto (Aplicações analítica)**
 - **Controle de vazão e reprodutibilidade melhor que 1 %**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **2. BOMBAS: 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.**



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

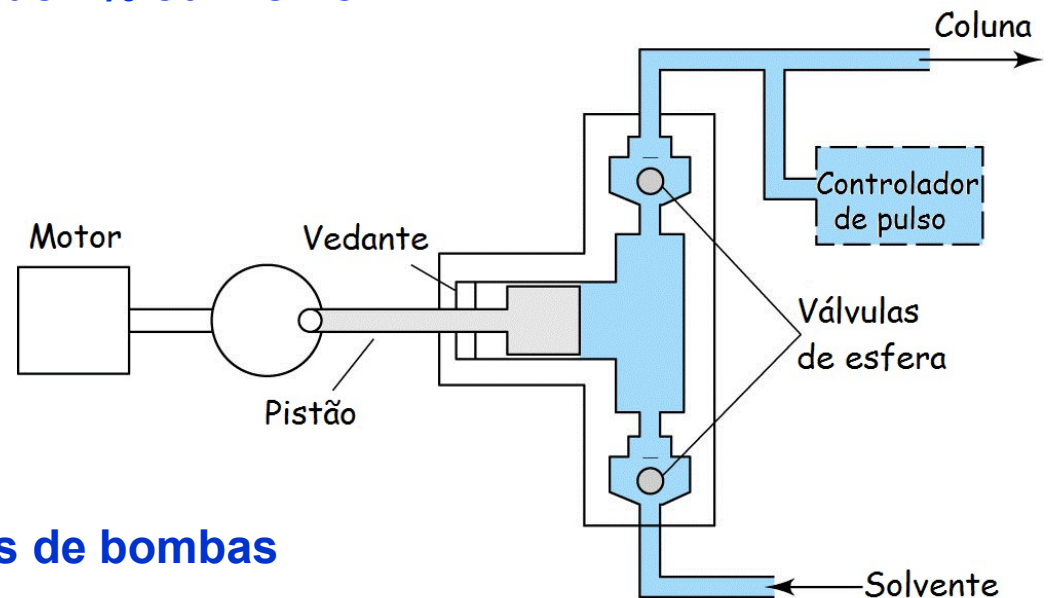
- PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC
- 2. BOMBAS: CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS:
 - - Composição da FM e fluxo precisos e exatos
 - - **Vazão contínua e livre de pulsações**
 - - Resposta rápida a alterações no fluxo e composição da FM – *gradiente de eluição!!*
 - - **Pressão máxima: 700 atm (10.000 psi)**
 - - Maior parte construída em aço inox 316; outros materiais: titânio, *peek, teflon*
 - - **Inércia química a solventes comuns**
 - - **Manutenção simples**
 - - **Reservatório de solvente ilimitado**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

REQUISITOS DOS SISTEMAS DE BOMBEAMENTO

- 1 – Geração de pressões até 6.000 psi
- 2 – Saída com ausência de pulsos
- 3- Velocidades de fluxo de 0,1 a 10 mL/min
- 4 – Controle e reprodutibilidade de fluxo de 1% ou melhor
- 5 – Componentes resistentes à corrosão

Bomba recíproca (também são chamadas de bombas de pistão ou de diafragma)



© 2007 Thomson Higher Education

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

3-MISTURADOR

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **3. MISTURADOR OU CÂMARA DE MISTURA:** (misturas de solventes).
- **ELUIÇÕES DA FM PODEM SER:**
 - **Eluição isocrática:** Composição de FM é constante (**Capaz de separar um número limitado de analitos**). **Um único solvente.**
 - **Eluição de gradiente:** Composição da FM varia ao longo da análise (**Separação de amostras complexas**). **Vários solventes.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

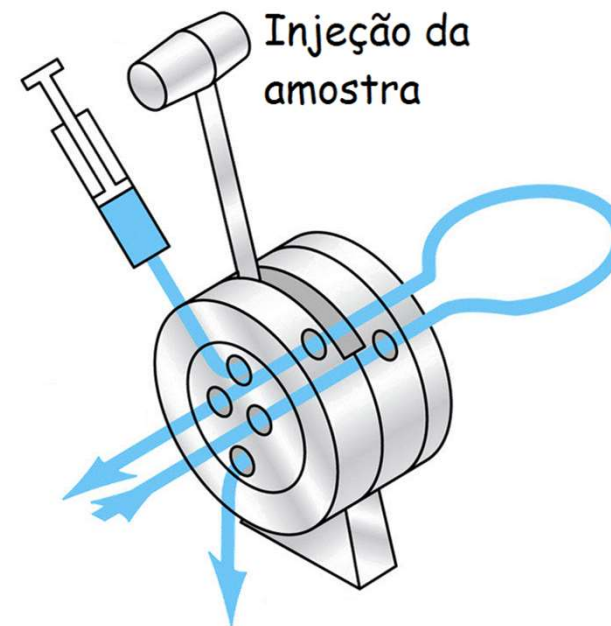
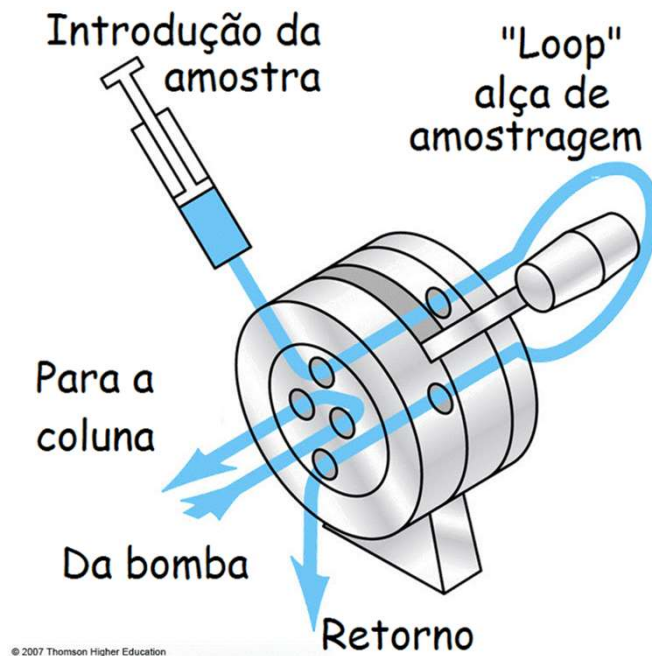
4-INJETORES/SISTEMA DE INJEÇÃO

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **4. INJETOR: SISTEMA DE INJEÇÃO:** Não se deve injetar um volume maior que 1% do volume da coluna vazia.
- $V_{\text{max}} (\mu\text{L}) = \pi (\text{raio})^2 (\text{Comprimento})(0,01)$
- **Onde:** d = diâmetro em mm e L = comprimento da coluna em cm.
- **INJEÇÃO MANUAL (Septo - Limitado a 1600psi)**
- - As amostras são introduzidas com seringas.
- - Após virar a alça, a amostra é carregada pela fase móvel até o início da coluna.
- - **AMOSTRADOR AUTOMÁTICO :**
- **1. Mede o volume correto para injeção.**
- **2. Injeta a amostra.**
- **3. Prepara o injetor para uma próxima amostra.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

SISTEMAS DE INJEÇÃO DE AMOSTRAS



Suportam pressões de até 7.000 psi

Volumes típicos: 5 a 500 μL

Microamostragem: 0,5 a 5 μL

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

5-PRÉ - COLUNAS

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **5. PRÉ-COLUNAS:**
 - Localizada entre o injetor e a coluna
 - Colunas de 2 a 5 cm, i.d igual ao da coluna.
 - Mesma FE da coluna de separação.
 - Custo reduzido
 - Aumenta a vida útil da coluna
 - Remove partículas e contaminantes do solvente.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

COLUNAS/PRÉ-COLUNA



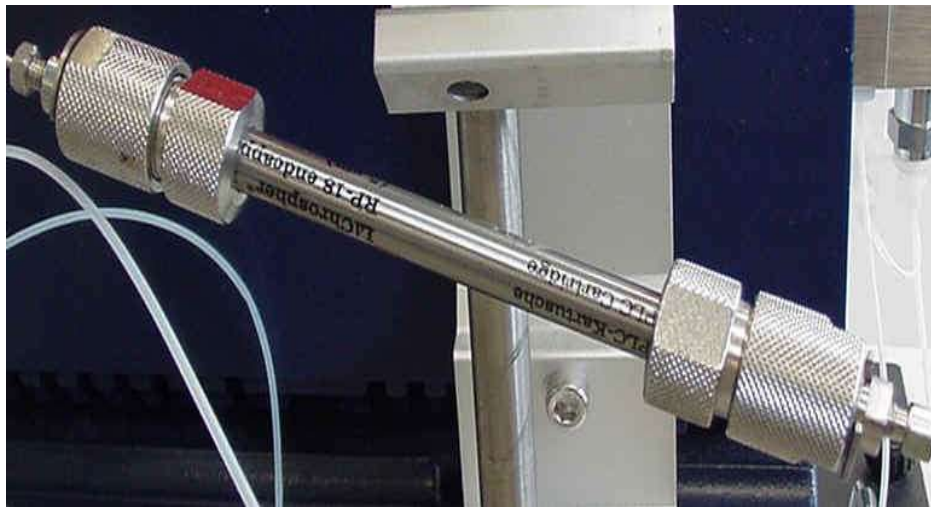
Pré-coluna



- Remoção de material particulado
- Contaminantes do solvente
- Contaminantes da amostra
- Saturar a FM com a FE

Aumenta a vida útil da coluna

COLUNAS TÍPICAS



- **Material:** aço inox
- **Comprimento:** 10 a 30 cm
- **Diâmetro:** 4 a 10 mm
- **FE:** Partículas de 5 a 10 mm
- **Eficiência:** 40 mil a 60 mil pratos/metro

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

6-COLUNAS

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC
- 6. COLUNAS:
- COLUNAS CROMATOGRÁFICAS (<30cm)



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC
- **6. COLUNAS:**
- Colunas de aço padrões



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

COLONAS

As colunas geralmente são construídas de aço inox, embora tubos de vidro com paredes resistentes sejam encontrados ocasionalmente. No entanto, estes últimos são restritos a pressões mais baixas do que 600 psi.



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **6. COLUNAS:**
- **Condicionamento da Coluna**
 - **Necessário para que haja um perfeito equilíbrio da FM e da FE.**
 - **Coluna nova: 4 - 8 horas (estabilização)**
 - **Coluna parada há alguns dias: 2 horas**
 - **Coluna de uso diário: 15 minutos.**
- **OBS.: Lembre-se: a coluna deve ser guardada em solvente orgânico.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**
- **6. COLUNAS:**
- ****Geralmente trabalha a temperatura ambiente ou ligeiramente acima desta.**
- **Maiores temperaturas maior degradação da coluna.**
- **Para quantificação temperatura deve variar de mais ou menos 1° C.**
- **OBS.: Lembre-se: a coluna deve ser guardada em solvente.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**

- **6. COLUNAS:**

FN & FR

- **Colunas Fase Normal**

- **FE não polar/FM polar – Solute mais polar elui primeiro.**

- **Colunas fase Reversa**

- **FE polar/FM não polar – Solute menos polar elui primeiro. (Mais Utilizada > 70% das aplicações)**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

FASE MÓVEL

Solvente puros ou misturas de solventes de acordo com a polaridade requerida na separação.

- **Eluição isocrática:**

- Quando a separação é feita utilizando um único solvente de composição constante.

- **Eluição com gradiente:**

- São utilizados dois ou três sistemas de solventes que diferem bastante entre si em polaridade.

- Depois que a eluição começa, a razão entre os solventes é variada de modo programado, de forma contínua ou em passos.

A eluição com gradiente produz efeitos similares aos produzidos pela programação de temperatura na CG.

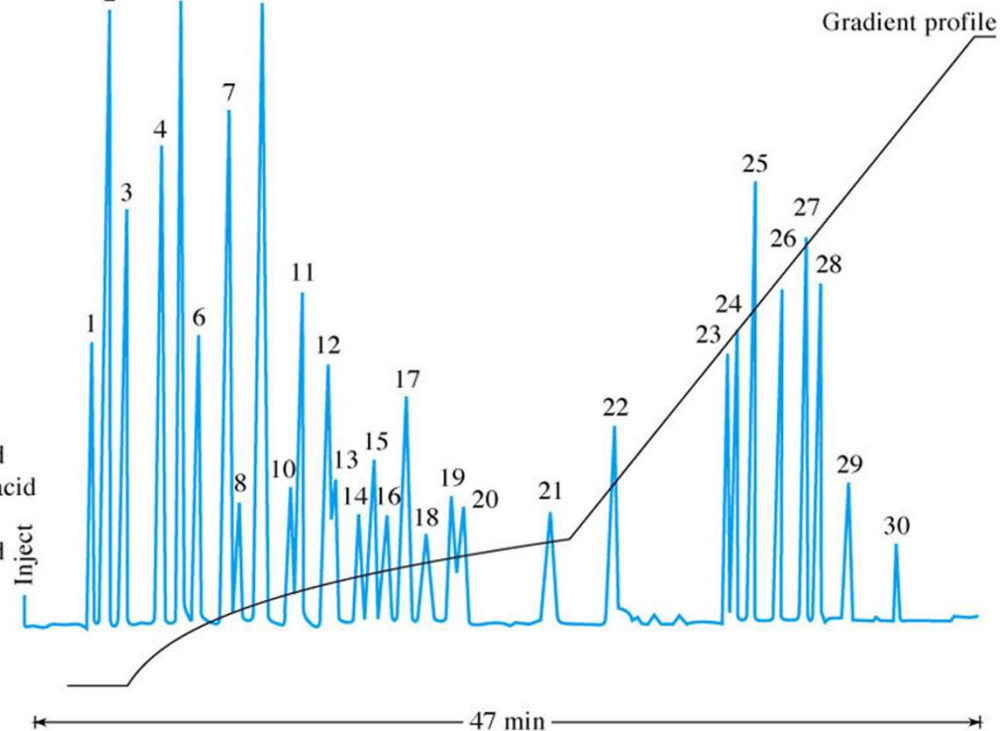
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

ELUIÇÃO COM GRADIENTE

Coluna C₁₈, 5 mm,
fase reversa

Detector
fluorescência:
Excitação. 334 nm
Emissão 425 nm

1. Phosphoserine
2. Aspartic acid
3. Glutamic acid
4. α -Amino adipic acid
5. Asparagine
6. Serine
7. Glutamine
8. Histidine
9. Glycine
10. Threonine
11. Citrulline
12. 1-Methylhistidine
13. 3-Methylhistidine
14. Arginine
15. β -Alanine
16. Alanine
17. Taurine
18. Anserine
19. β -Aminobutyric acid
20. β -Aminoisobutyric acid
21. Tyrosine
22. α -Aminobutyric acid
23. Methionine
24. Valine
25. Tryptophan
26. Phenylalanine
27. Isoleucine
28. Leucine
29. δ -Hydroxylysine
30. Lysine



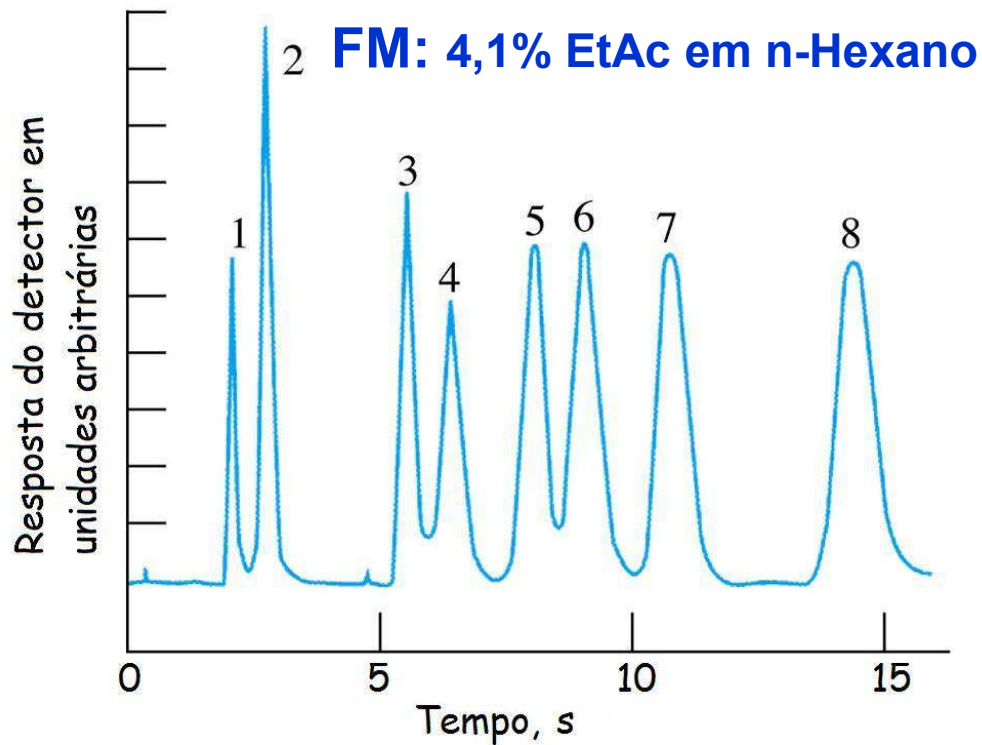
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

SEPARAÇÃO ISOCRÁTICA DE ALTA VELOCIDADE

Coluna de alta
velocidade e
alta eficiência

- 4 cm de comprimento
- 0,4 cm d.i.
- FE: spherisorb 3 mm

100.000 pratos/metro



1- p-xileno

2- anisol

3- acetato de benzila

4- dioctil-ftalato

5- dipentil-ftalato

6- dibutil-ftalato

7- dipropil-ftalato

8- dietil-ftalato

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

FASE ESTACIONÁRIA

Basicamente são dois tipos de FE:

- **PELICULAR:**

- **Consiste de leitos de polímero ou vidro não-poroso, esférico, com diâmetros típicos da ordem de 30 a 40 mm, recoberto com uma camada fina e porosa de:**

- **Sílica**
- **Alumina**
- **Resina de poliestireno-divinil-benzeno**
- **Resina trocadora de íons**

- **PARTÍCULA POROSA:**

- **Consiste de micropartículas porosas com diâmetros de 3 a 10 mm. As partículas são constituídas dos mesmos materiais do recobrimento pelicular.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

7-DETECTOR

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC**

- **7. DETECTOR**

- **DETECTORES MAIS USADOS EM HPLC:**

- **1. UV/Vis**

- **2. Índice de Refração**

- **3. Fluorescência**

- **4. Condutividade**

- **5. Arranjo de diodos**

- **6. Eletroquímica**

- **7. Massa**

- **8. IV**

- **As características desejáveis para os detectores para CLAE não são diferentes daquelas para CG.**

- **EXISTEM DOIS TIPOS DE DETECTORES PRINCIPAIS:**

- **Propriedades universais (índice de refração, densidade ou constante dielétrica).**

- **Propriedades do soluto (absorbância, fluorescência, etc).**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **7. DETECTOR: (Cont.)**
- **CARACTERÍSTICAS IDEIAIS DE UM DETECTOR:**
 - Sensibilidade e seletividade adequada
 - **Ampla faixa linear**
 - Baixo volume interno (Vol. grande alargamento)
 - **Resposta Rápida**
 - **Similaridade de resposta para todos os solutos.**
 - Detector lento (pico baixo, largo e com calda longa).
 - **Boa estabilidade e reprodutibilidade (confiabilidade)**
 - Não destruir a amostra para (coletar o eluato)
 - **Resposta linear para solutos que se estenda por várias ordens de grandeza.**
 - Tempo de resposta curto e independente da vazão.
 - Fácil de operar e fazer manutenção

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **7. DETECTOR: (Cont.)**
- **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 a seletividade:**
 - **Detectores universais**
 - **Detectores seletivos**
 - **Detectores específicos**

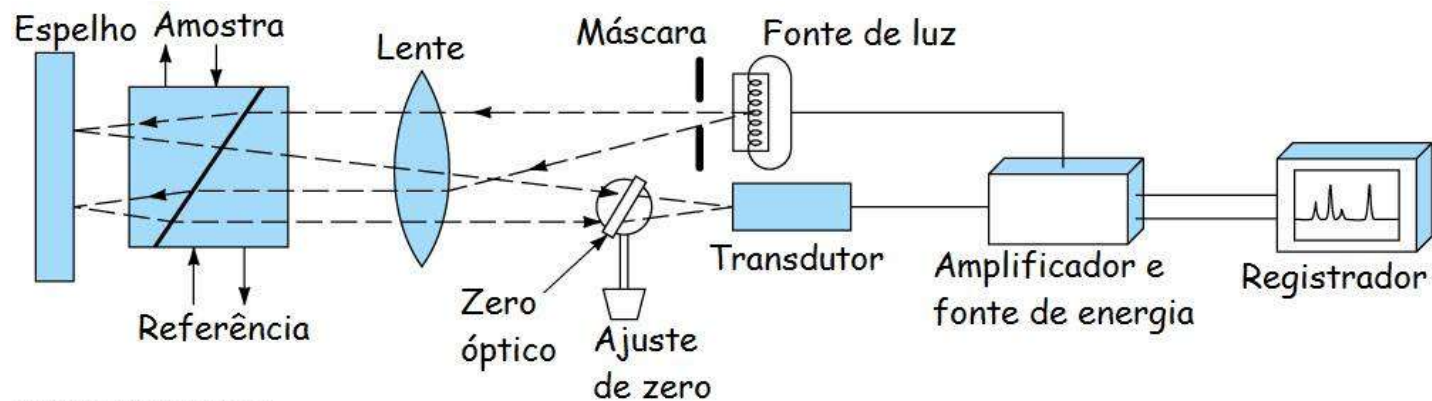
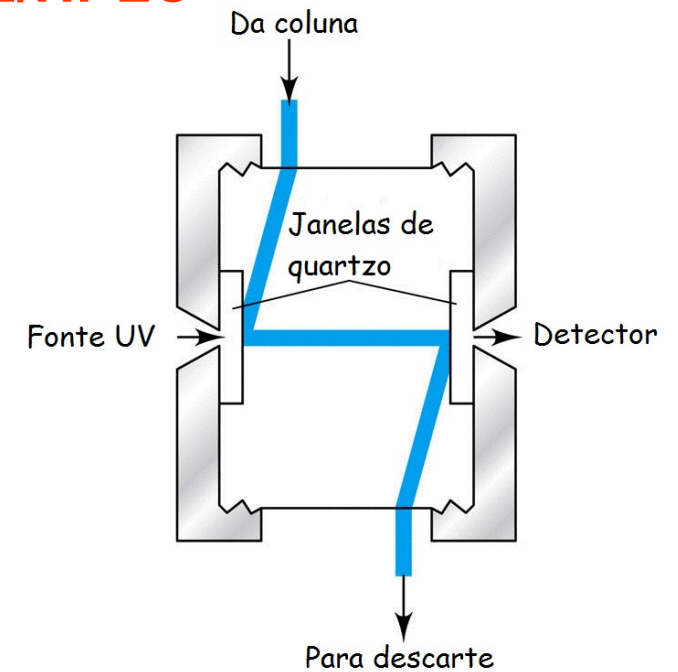
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **7. DETECTOR: (Cont.)**
- **CLASSIFICAÇÃO**
- **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).

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

DETECTORES

- **Absorbância**
 - UV/Vis – Sens.: 10^{-9} g/mL – Faixa Linear: 10^5
 - IV
- **Fluorescência:** 10^{-9} a 10^{-12} g/mL – Faixa Linear: 10^3
- **Índice de refração (universal) –**
Sens.: 10^{-7} g/mL – Faixa Linear: 10^4



© 2007 Thomson Higher Education

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

DETECTORES

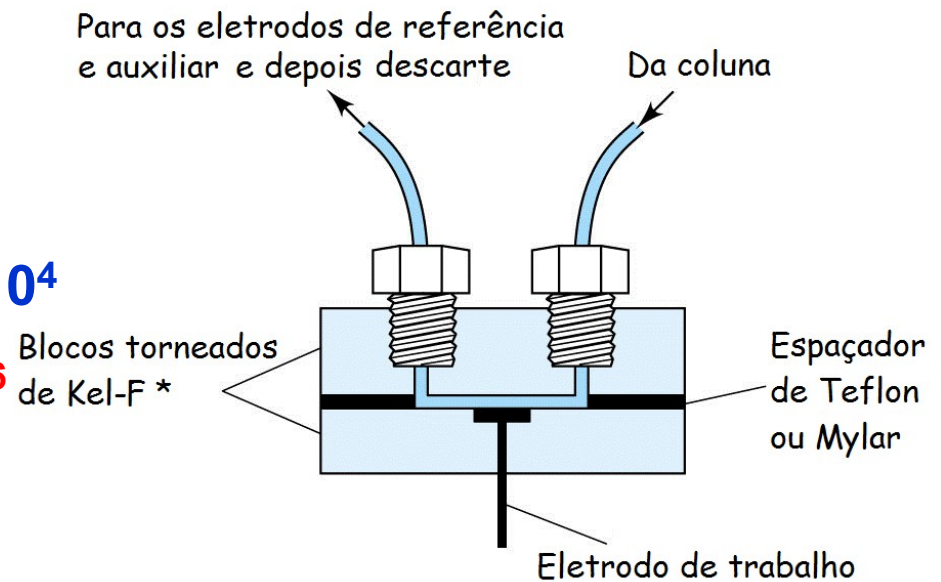
• **Eletroquímicos:** existem vários tipos disponíveis atualmente. Embora não sejam tão explorados quanto os detectores ópticos, eles apresentam algumas vantagens como alta sensibilidade, simplicidade e ampla aplicabilidade.

• **Amperométricos**

• **Coulométricos**

• **Condutométricos** – S: 10^{-8} g/mL – FL: 10^4

• **Polarográficos** – S: 10^{-12} g/mL – FL: 10^6



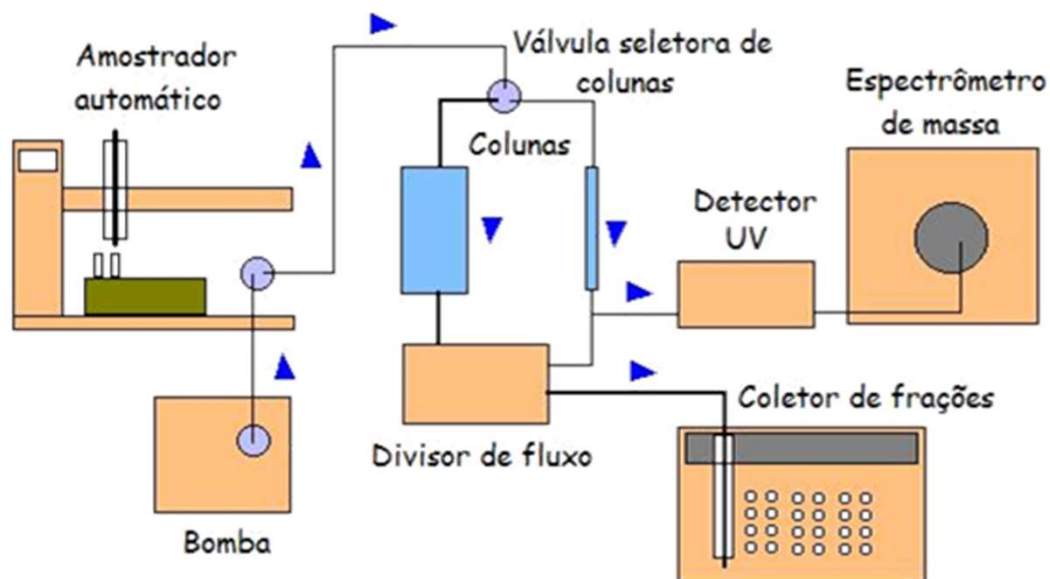
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

DETECTORES

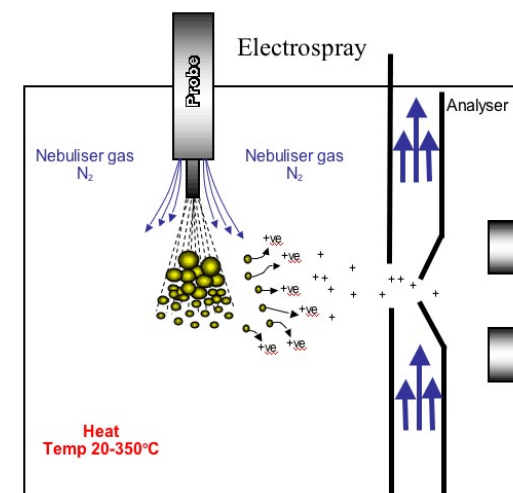
• ESPECTROMETRIA DE MASSA – UNIVERSAL

• Assim como na CG-EM, o acoplamento de um espectrômetro de massa potencializa a técnica de separação e quantificação.

• Um grande problema é o descompasso entre os volumes relativamente grandes de solventes na CL e os requisitos de vácuo na EM.



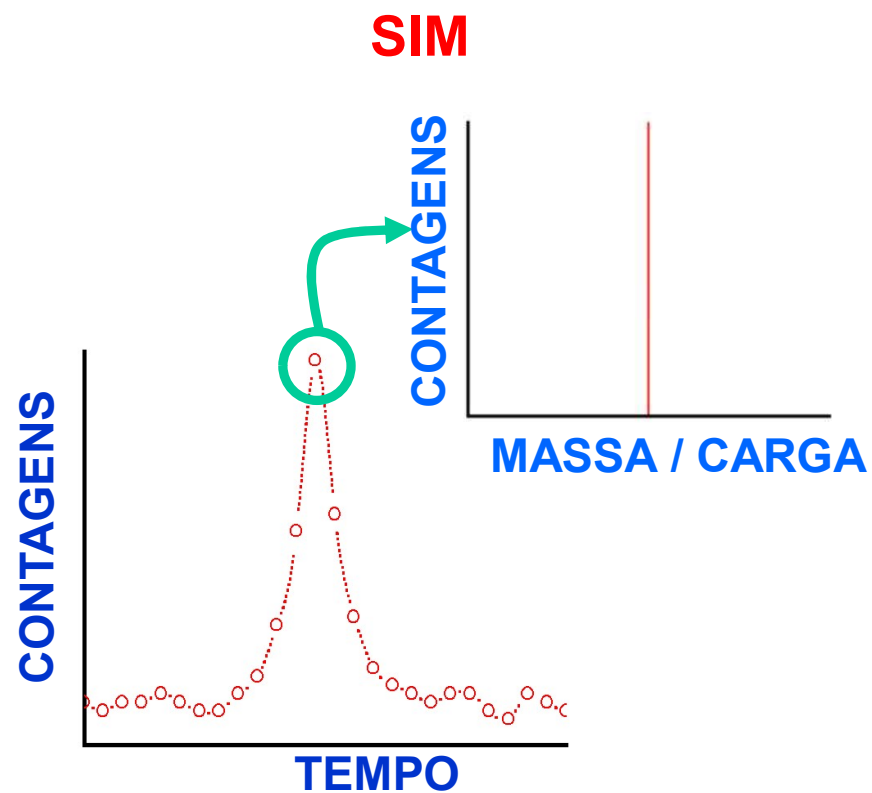
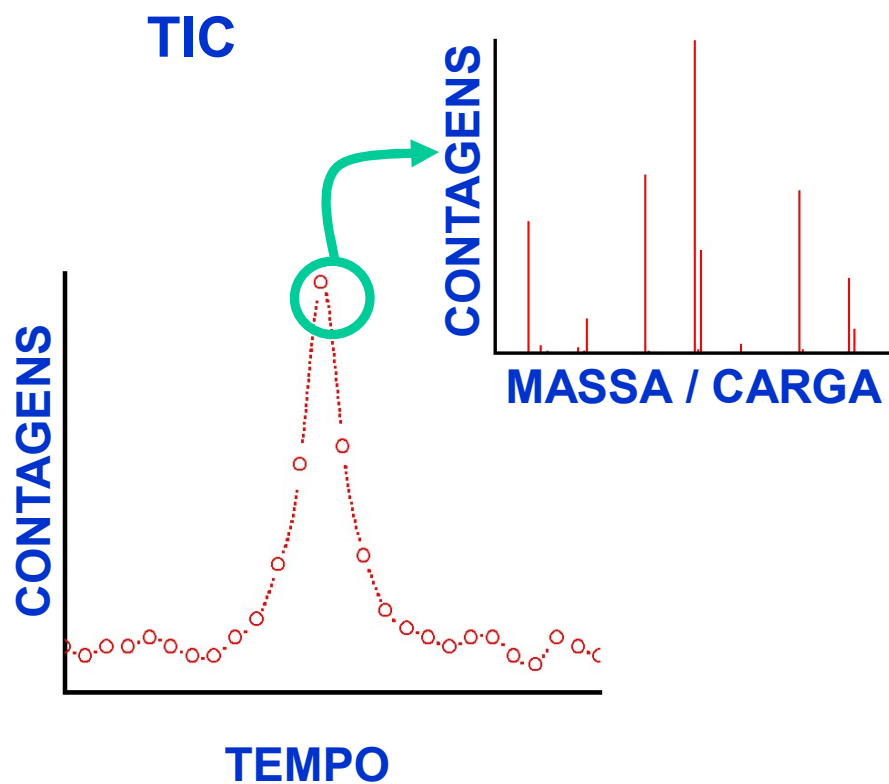
Interface CL/EM



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

DETECTORES

• ESPECTROMETRIA DE MASSA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

8-TRATAMENTO DE DADOS/IMPRESSÃO

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

PRINCIPAIS PARTES DE UM HPLC

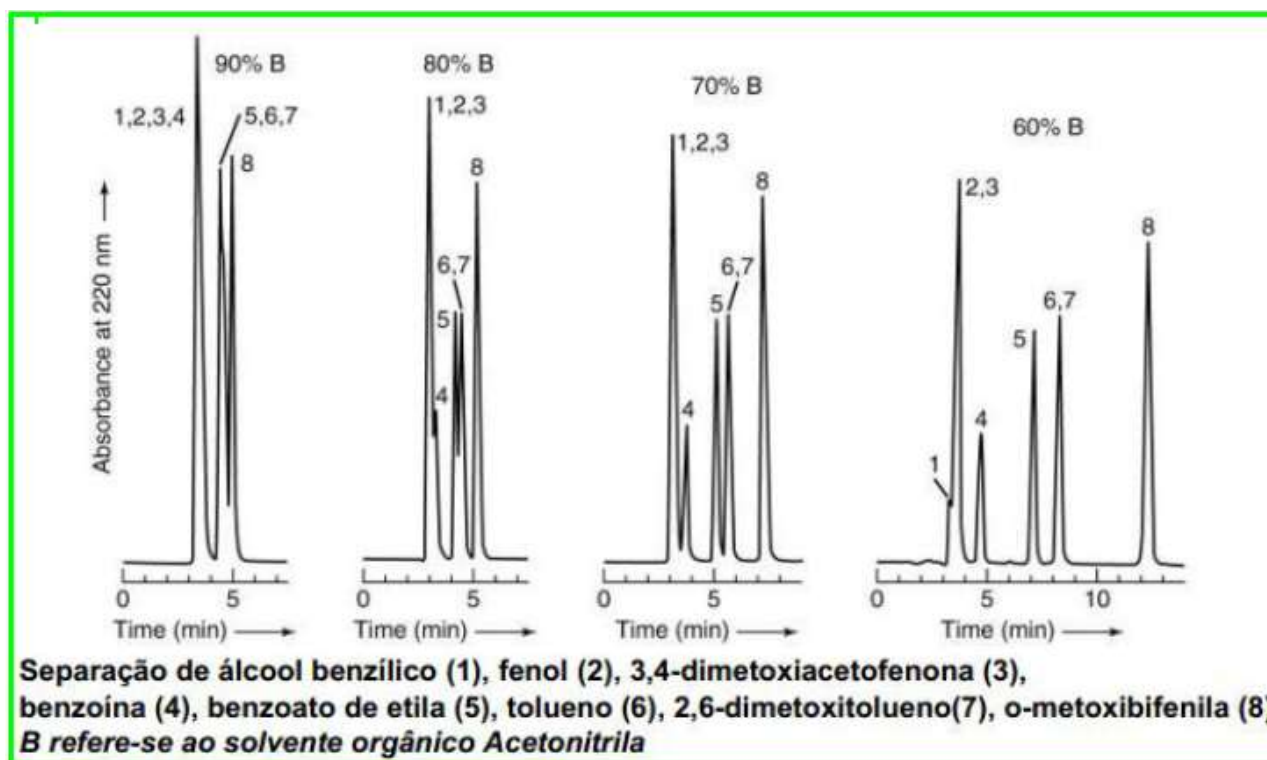
- **8. Tratamento de dados/Impressão**
- **Cromatograma**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

9-ANÁLISE DE CROMATOGRAMA

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- CROMATOGRAMA:



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

DETALHAMENTO

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

CG & CLAE

- **Ao contrário da CG, onde a FM se comporta como um gás ideal e não contribui para o processo de separação, a FM líquida da CLAE interage tanto quanto a FE com os componentes da amostra.**
- **Isto torna o desenvolvimento dos métodos em CLAE um tanto mais complexo que na CG.**

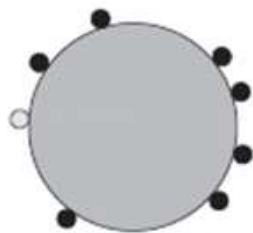
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

TIPOS DE CLAE

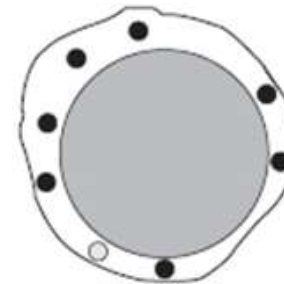
PARTIÇÃO: (líquido-líquido / fase ligada)

A diferença entre elas consiste em como a FE é mantida nas partículas do suporte do empacotamento: (Adsorção / ligação química)

Dois tipos de eluição podem ser distinguidos: Fase normal (FN) e Fase reversa (FR).



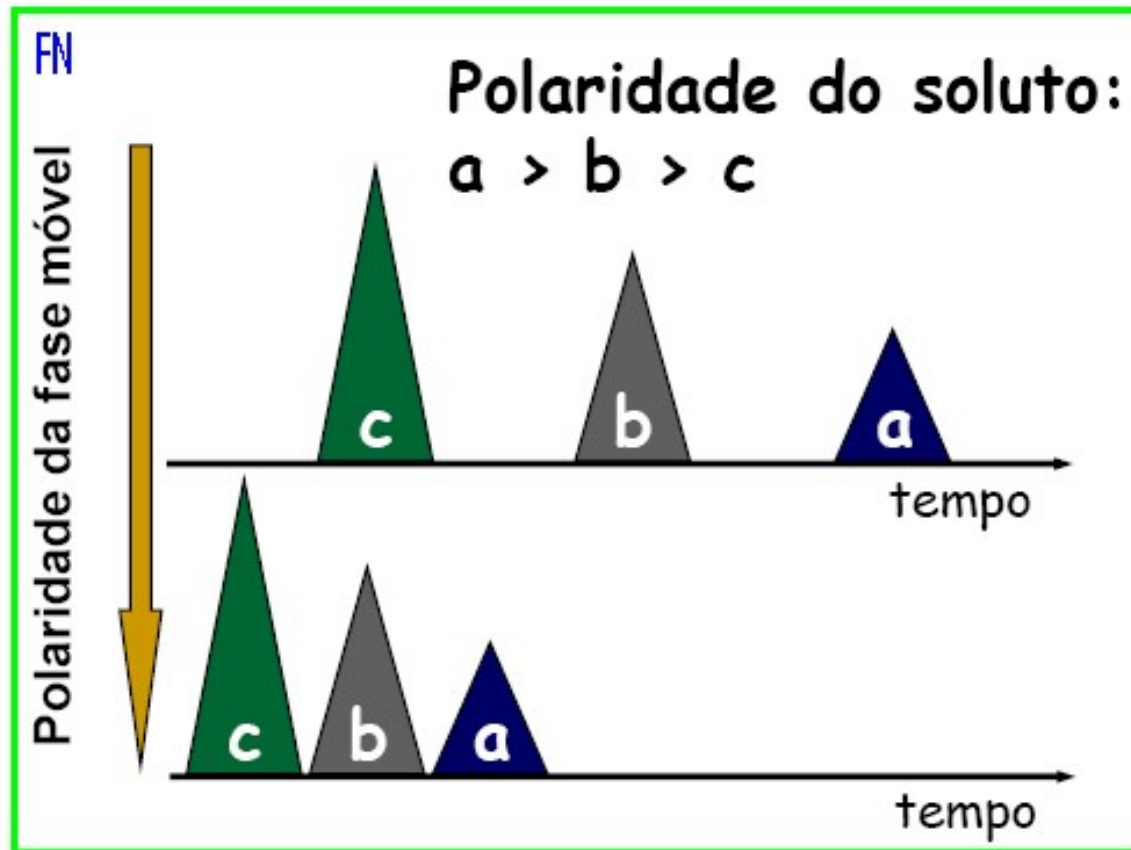
ADSORÇÃO



PARTIÇÃO

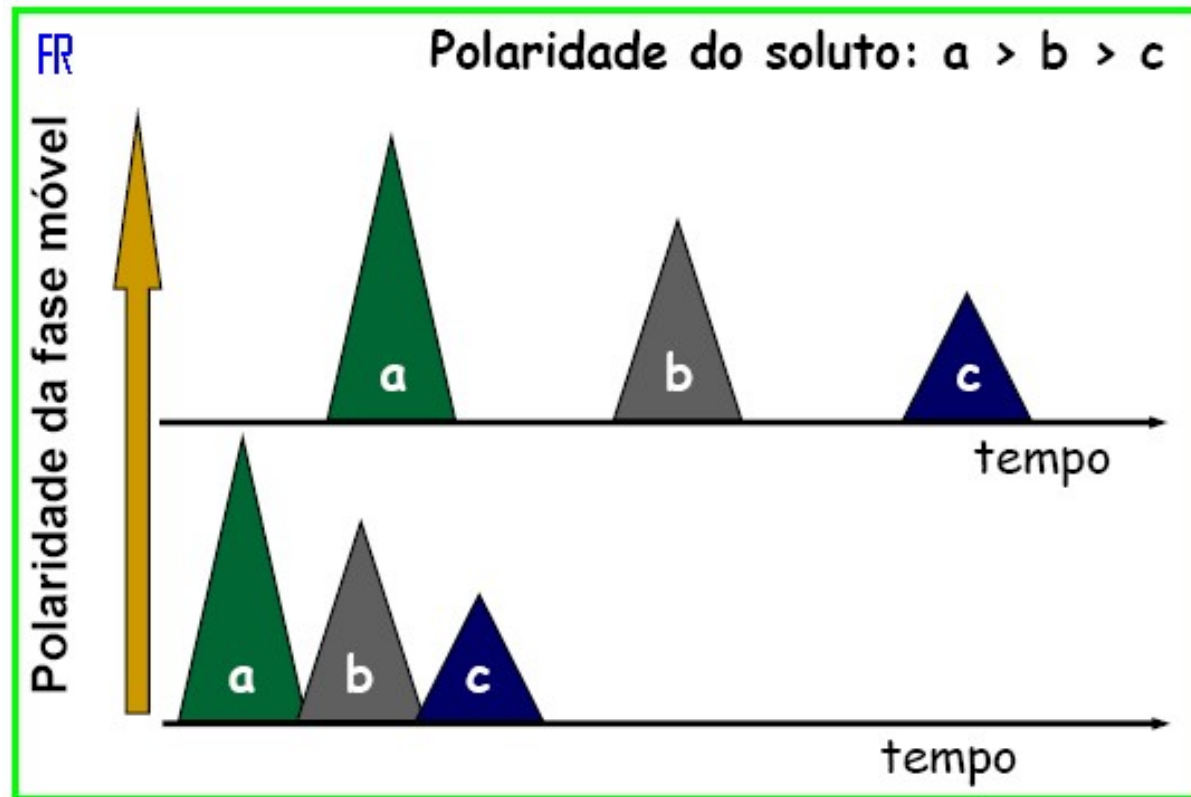
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- FASE NORMAL: ANÁLISE



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- FASE REVERSA: ANÁLISE



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

TIPOS DE CLAE

Fase normal:

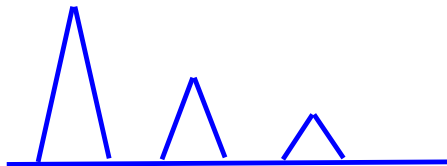
FE de natureza fortemente polar

FM apolar (ex. hexano ou éter isopropílico)

O componente menos polar é eluído primeiro por ser o mais solúvel na fase móvel.

O aumento da polaridade da FM diminui o tempo de eluição.

Baixa polaridade FM



Média polaridade FM



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

TIPOS DE CLAE

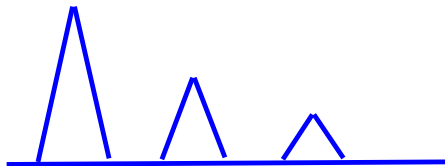
Fase reversa:

FE de natureza apolar (ex. hidrocarbonetos)

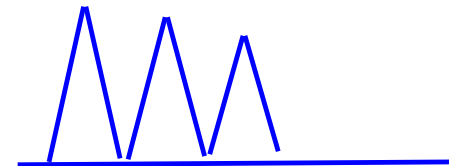
FM polar (ex. água, metanol ou acetonitrila)

O componente mais polar aparece primeiro e a diminuição da polaridade da FM diminui o tempo de eluição.

Alta polaridade FM

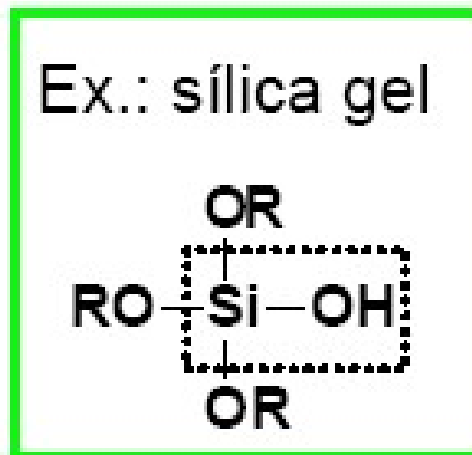


Média polaridade FM



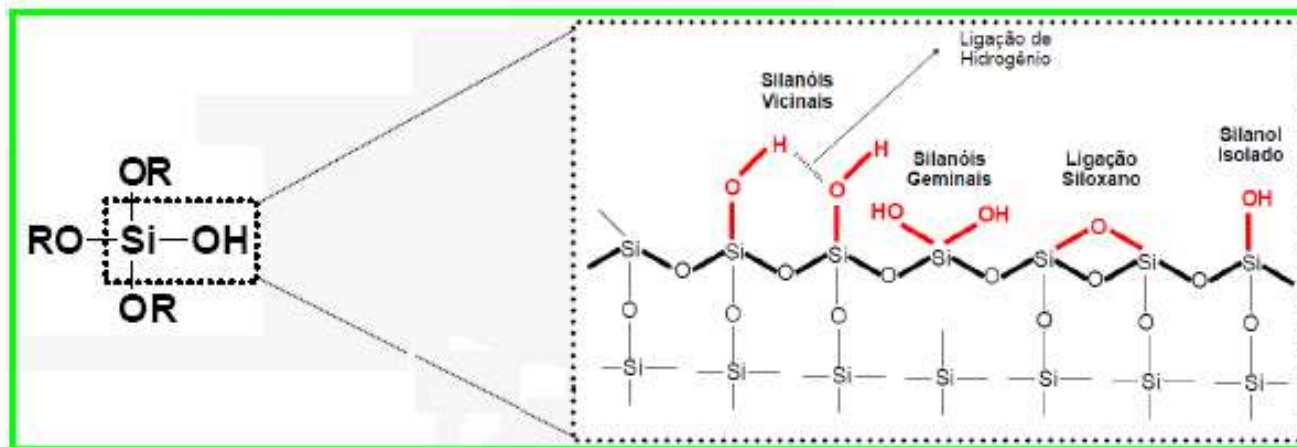
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- CLASSIFICAÇÃO PELA POLARIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA
- Cromatografia em FASE NORMAL: fase estacionária polar.



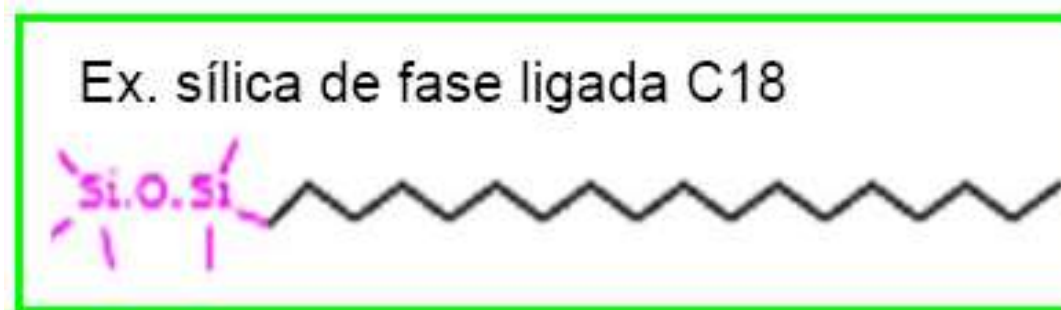
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- FASE ESTACIONÁRIA
- Desenho de uma partícula de sílica



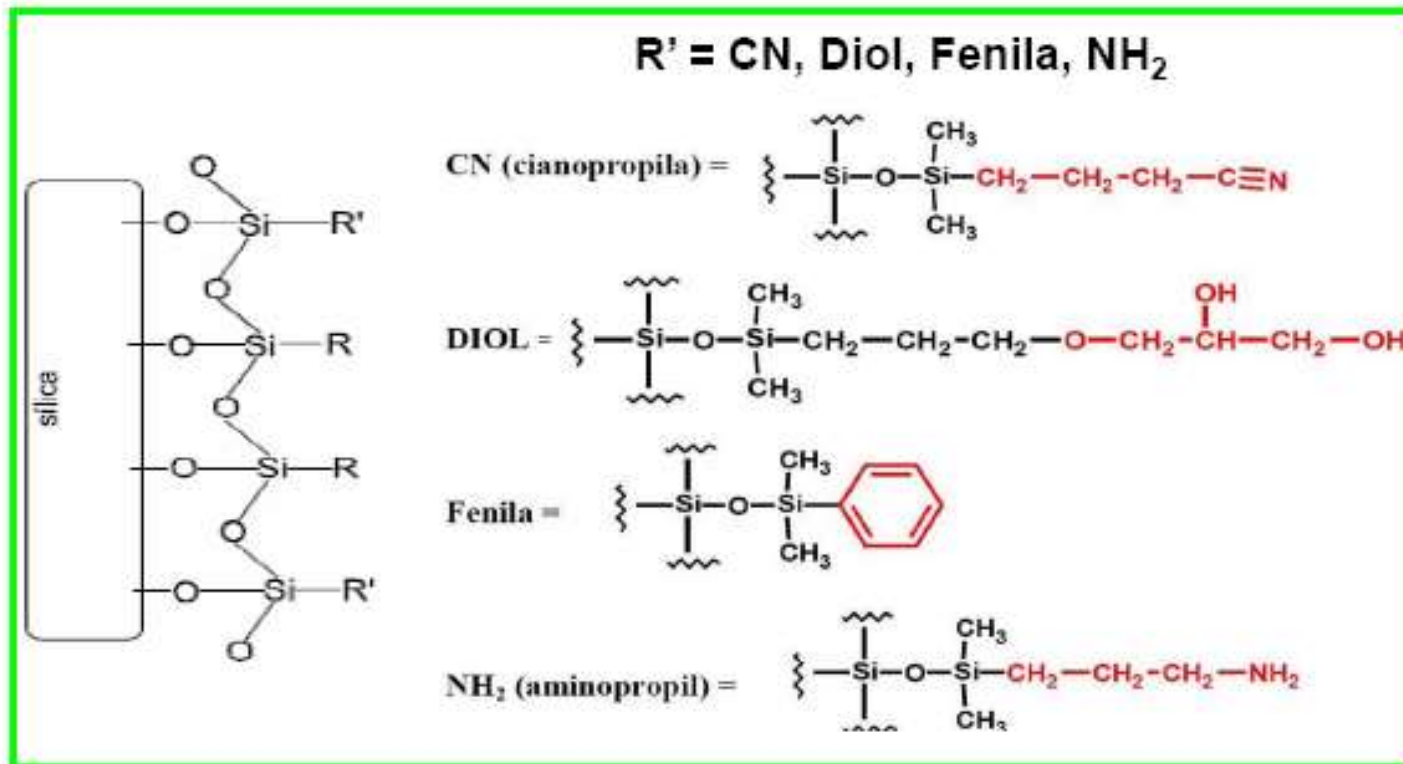
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- CLASSIFICAÇÃO PELA POLARIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA (Cont.)
- Cromatografia em FASE REVERSA: estacionária de baixa polaridade



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- FASE NORMAL: Fase estacionária polar
- Derivados de sílica gel (fenila, ciano, amino, diol)

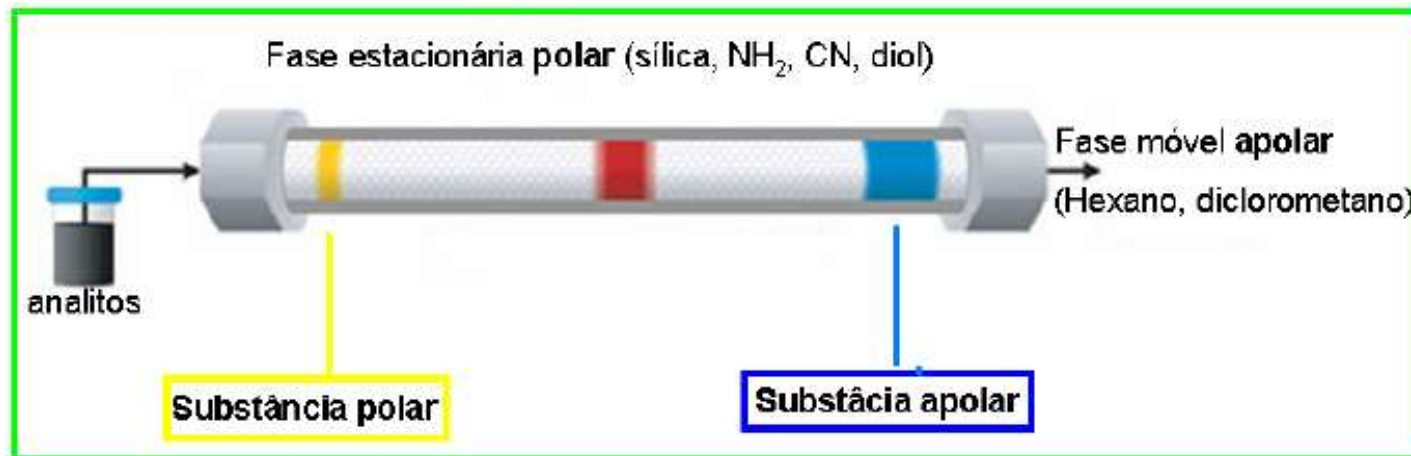


CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

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

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **FASE NORMAL:** Fase estacionária polar
- **Eluem primeiro as substâncias apolares** que possuem uma menor interação com a fase estacionária polar.



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

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **Características das FASES NORMAIS**

- **Vantagens:**

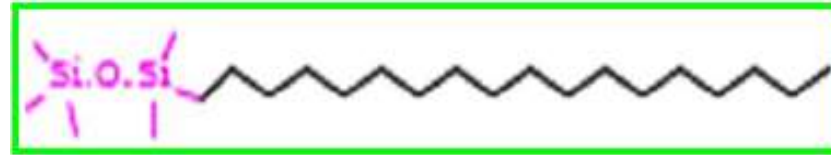
- 1. Versatilidade na mudança de seletividade alterando fases móveis e estacionárias;
- 2. Colunas estáveis quando se utiliza solventes não aquosos;
- 3. Uma grande variedade de substâncias orgânicas são mais solúveis nos solventes usados em fase normal (útil em LC preparativa);
- 4. Decréscimo de pressão menor devido à baixa viscosidade dos solventes;
- 5. Útil para amostras que possam se decompor em soluções aquosas.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

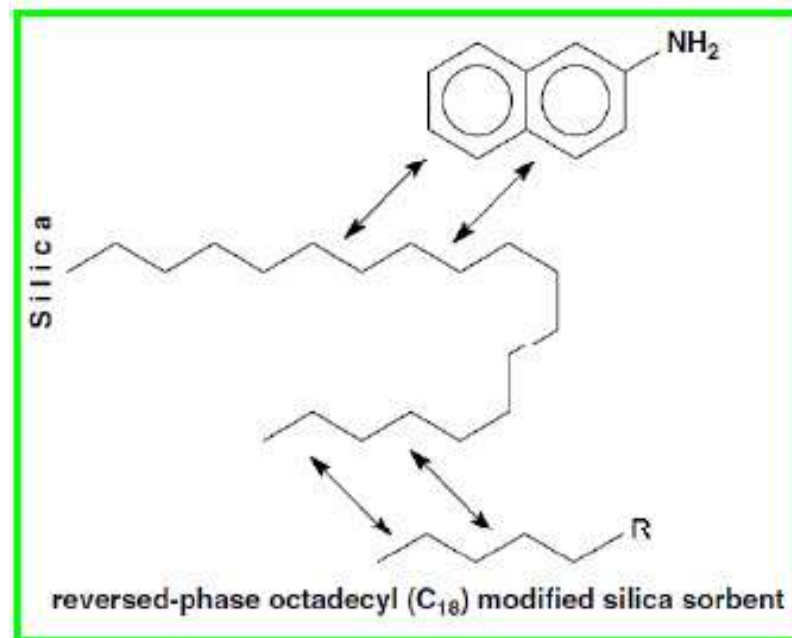
- **Características das FASES NORMAIS**
- **Desvantagens:**
 - 1. Amostras iônicas são de difícil separação e são mais viáveis de se separar por fase reversa;
 - 2. Controle da força de eluição menos previsível e mais demorado que em fase reversa;
 - 3. Pior resolução;
 - 4. Ponto de ebulição reduzido pode gerar bolhas;
 - 5. Alto custo dos solventes orgânicos.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- FASE REVERSA

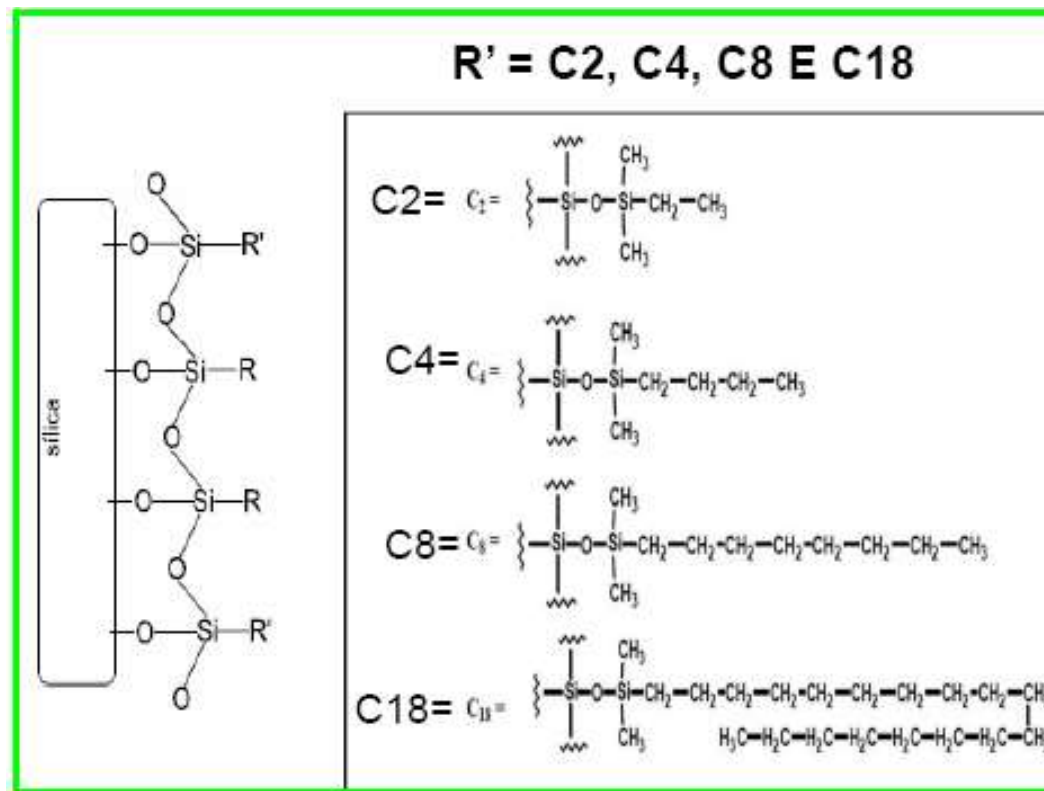


- Fase estacionária de baixa polaridade – C2, C4, C8, C18.



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **FASE REVERSA:** Fase estacionária de baixa polaridade – **C2, C4, C8, C18**

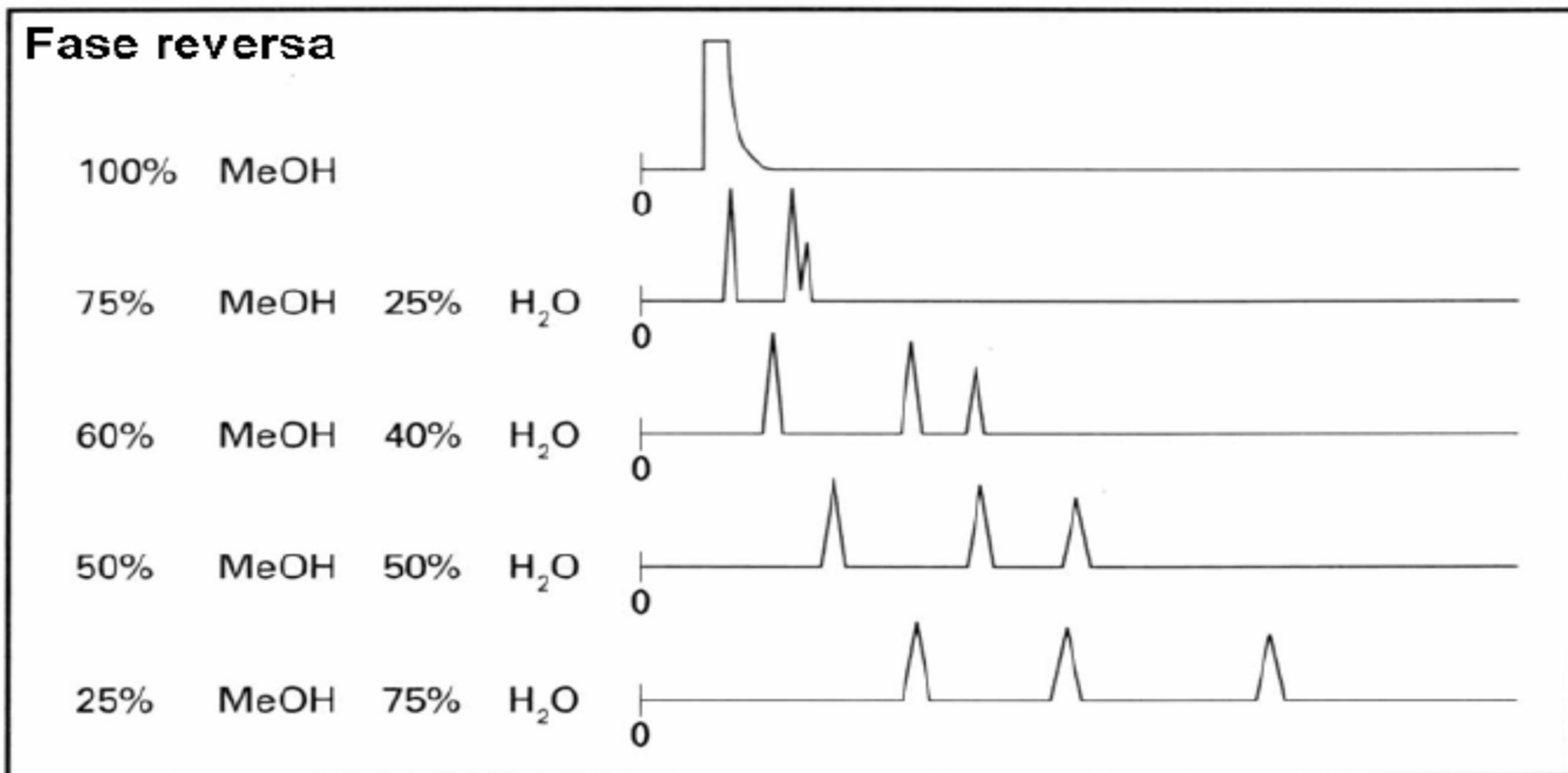


CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **Cromatografia de Fase Reversa (FR)*:**
- **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**

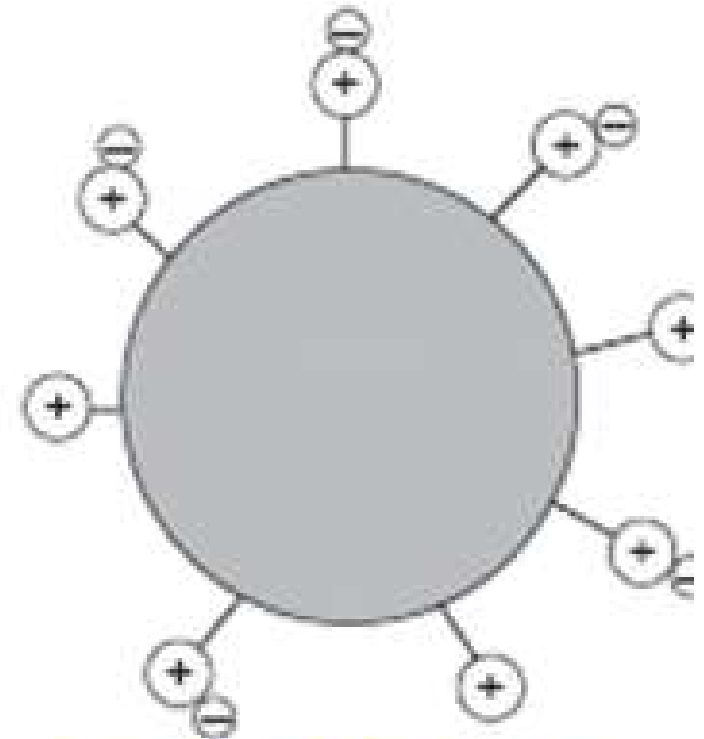
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE METANOL NO TEMPO DE RETENÇÃO



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **TIPOS DE CROMATOGRÁFIA:**
- **Iônica:** A fase estacionária é, normalmente, uma resina de poliestireno e divinilbenzeno, a qual são ligados grupos iônicos, como por exemplo,
 - $-SO_3^-$ trocadores fortes de cátion;
 - $-COO^-$ trocadores fracos de cátion;
 - $-NR_3^+$ trocadores fortes de ânions;
 - $-NH_2R^+$ trocadores fracos de ânions.
- Os grupos iônicos têm um contra-íon (com carga oposta) que pode ser deslocado pelos íons da fase móvel de carga similar a ele.



TROCA IÔNICA

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

- **TIPOS DE CROMATOGRÁFIA:**
- **Exclusão:** A separação é efetuada de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A coluna é recheada com matéria inerte cujos poros têm tamanho controlado. Onde, as moléculas menores penetram a maioria dos poros.



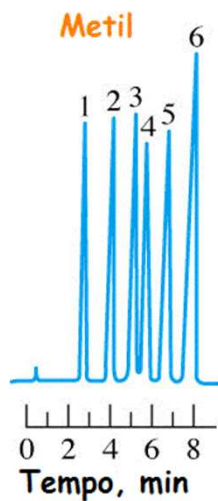
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

TIPOS DE CLAE

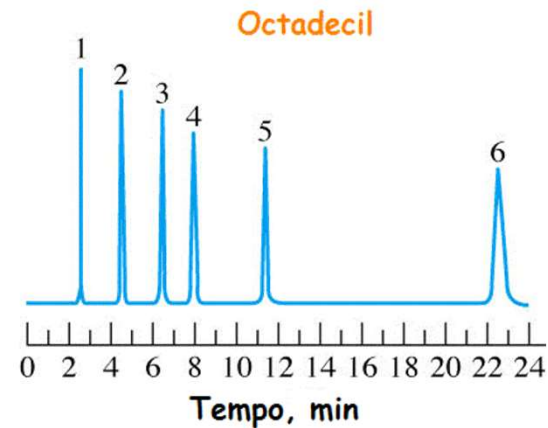
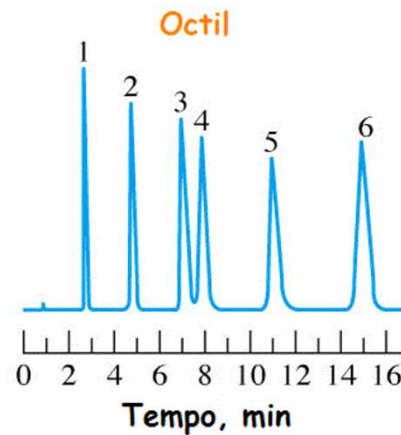
É provável que $\frac{3}{4}$ de toda a CLAE esteja baseada na fase reversa ligada, onde o grupo R do siloxano nesses recobrimentos é uma cadeia C₈ (n-octil) ou C₁₈ (n-octadecil)

Identificação do pico

1. Uracila
2. Fenol
3. Acetofenona
4. Nitrobenzeno
5. Benzoato de metila
6. Tolueno



© 2007 Thomson Higher Education



CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

TIPOS DE CLAE

Campo	Misturas típicas
Farmacêutico	Antibióticos, sedativos, esteróides, analgésicos
Bioquímico	Aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídios
Produtos alimentícios	Adoçantes artificiais, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Produtos químicos	Aromáticos condensados, surfactantes, propelentes, corantes industriais
Poluentes	Pesticidas, herbicidas, fenóis, PCB (bifenilas policloradas)
Química forense	Drogas tóxicas, venenos, álcool no sangue, narcóticos
Clínica médica	Ácidos de bÍlis, metabólitos de drogas, extratos de urina, estrógenos

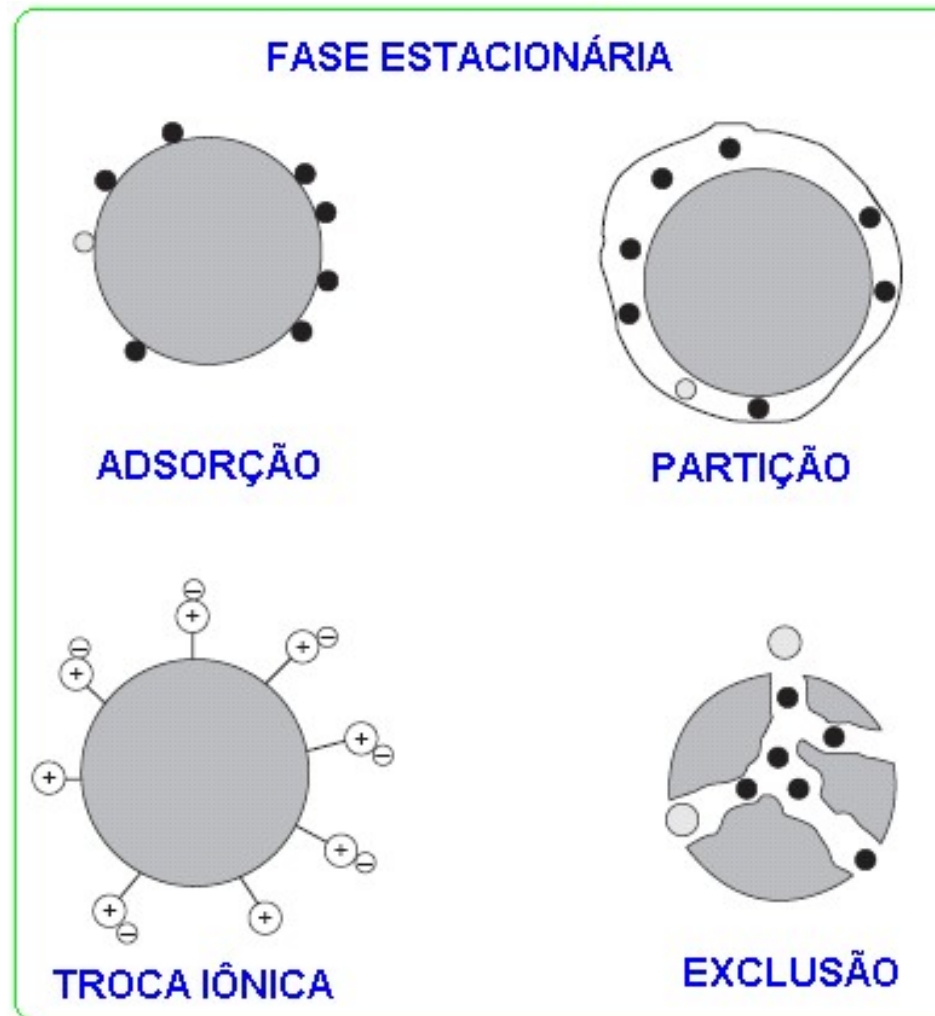
CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

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.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- LEMBRETE DAS FE.



Análise Instrumental

CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CLAE/HPLC

**FIM DA AULA DE CROMATOGRAFIA
(3ª PARTE)**