

Cromatografia a líquido

Cromatografia - Princípio Básico

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

Cromatografia a gás

separação

- interação com a FE
- volatilidade
 - estrutura química
 - temperatura

Cromatografia a gás

reservatório de gás

controle de pressão

injetor

fornos

coluna

D

detector

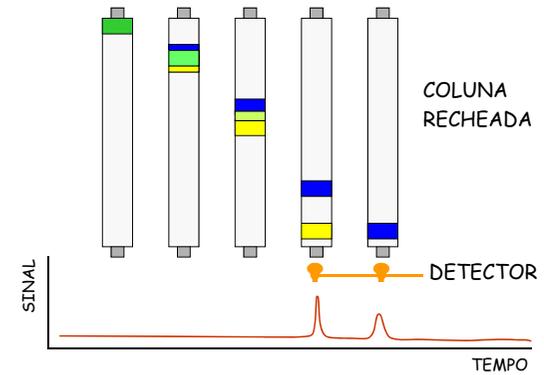
amplificador

registorador ou computador

Cromatografia líquida em coluna

- Clássica** {
- colunas de vidro
 - pressão atmosférica
 - ação da gravidade

Cromatografia a líquido clássica

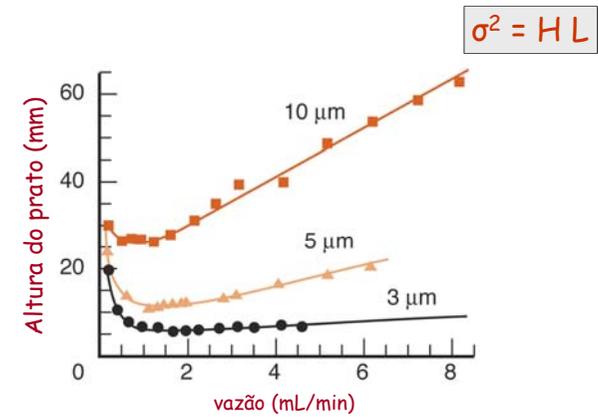


Cromatografia líquida em coluna

- Clássica** {
- colunas de vidro
 - pressão atmosférica
 - ação da gravidade

- Alta eficiência
HPLC - CLAE** {
- colunas metálicas
 - alta pressão
 - bombas de propulsão

Diâmetro de partícula x H



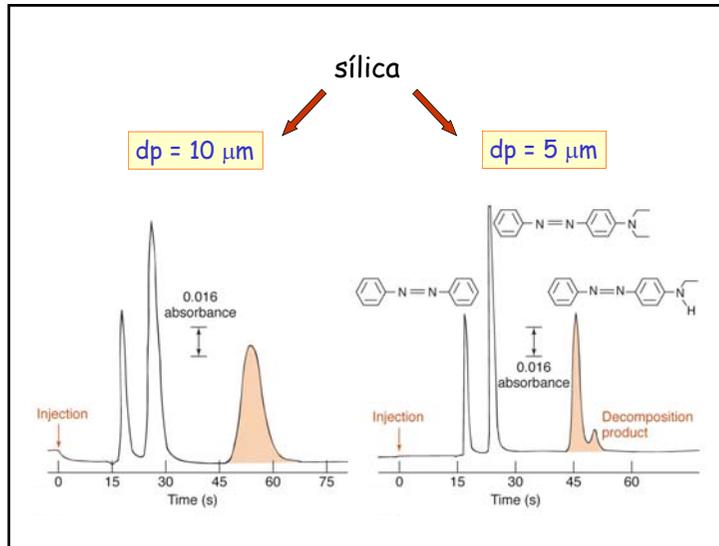


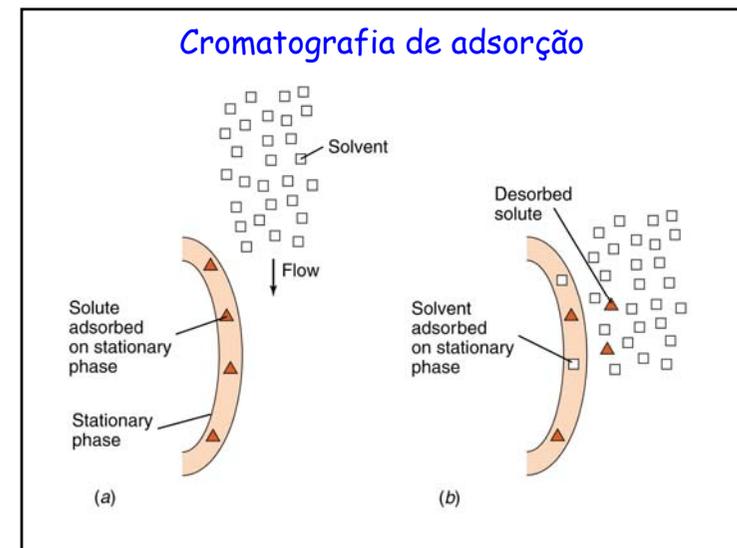
Table 25-1 Performance as a function of particle diameter

Particle size d_p (μm)	Retention time (min)	Plate number (N)	Required pressure (bar)
5.0	30	25 000	19
3.0	18	42 000	87
1.5	9	83 000	700
1.0	6	125 000	2 300

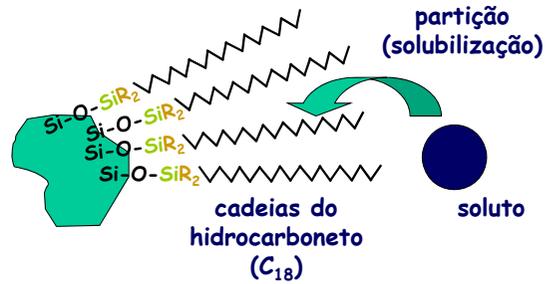
Theoretical performance of 33- μm -diameter \times 25-cm-long capillary for minimum plate height for solute with capacity factor $k' = 2$ and diffusion coefficient = 6.7×10^{-10} m²/s in water-acetonitrile eluent.

SOURCE: J. E. MacNair, K. D. Patel, and J. W. Jorgenson, "Ultra-high-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography with 1.0- μm Particles," *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 700.

- ### Modalidades
- ⇒ Cromatografia de partição
 - ⇒ Cromatografia de adsorção (cromatografia líquido-sólido)
 - ⇒ Cromatografia de troca iônica
 - ⇒ Cromatografia de exclusão por tamanho
 - ⇒ Cromatografia de bioafinidade



Cromatografia de partição



adsorção do soluto - silanóis residuais

Cromatografia líquida em coluna

FASE NORMAL ⇒ fase estacionária polar
fase móvel apolar

FASE REVERSA ⇒ fase estacionária apolar
fase móvel polar

Ordem de polaridade

hidrocarbonetos

éteres

ésteres

cetonas

aldeídos

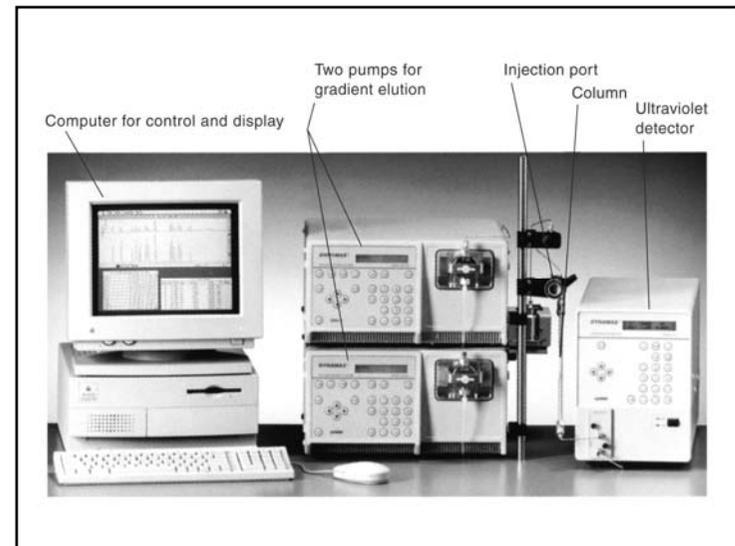
amidas

aminas

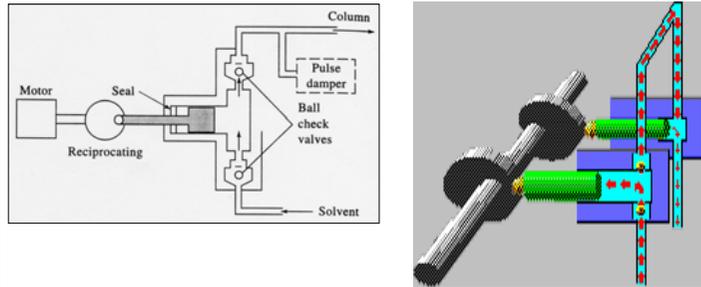
álcoois

ácidos

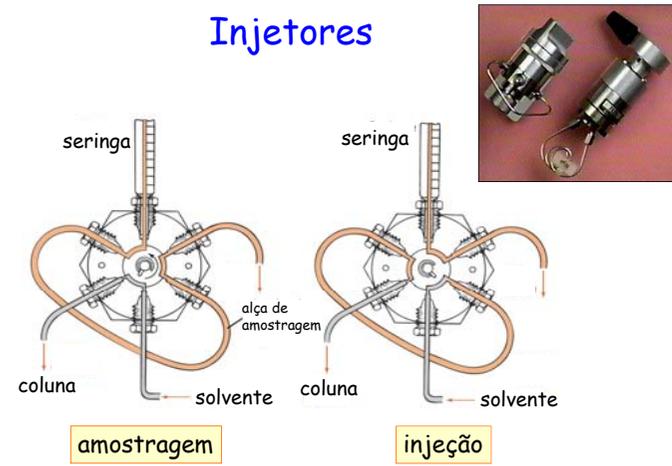
água



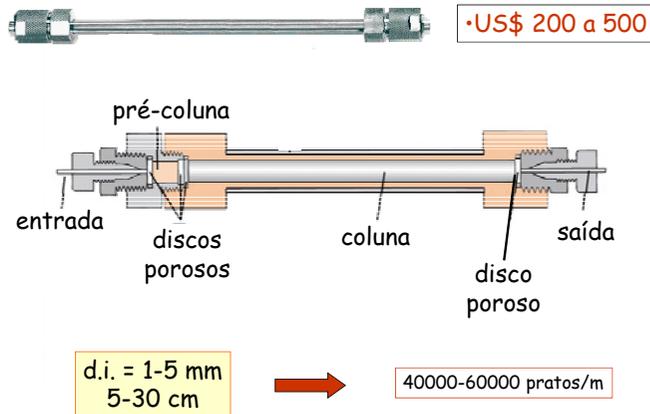
Bomba recíproca



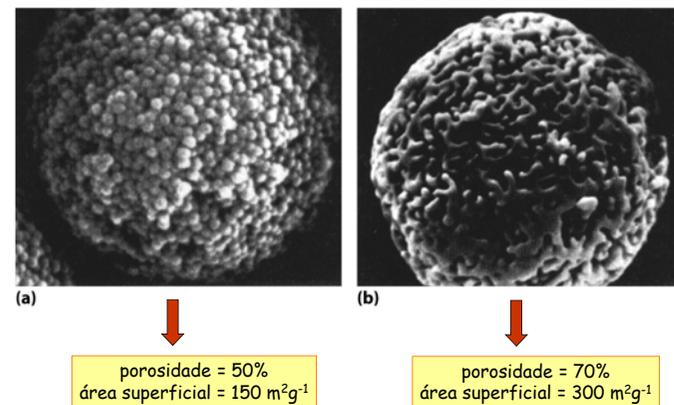
Injetores



Coluna



Partículas de sílica



Sílica microporosa

Hydrogen bonded vicinal silanol groups

pH < 8,0

Isolated silanol groups

Geminal silanol groups

Siloxane bonds

8 μmol Si-OH por m²

$$\text{Si-OH} + \text{Cl-Si(CH}_3)_2\text{-R} \rightarrow \text{Si-O-Si(CH}_3)_2\text{-R} + \text{HCl}$$

Sílica → cromatografia de adsorção

Sílica modificada → cromatografia de partição líquido-líquido

$$\text{Si-OH} + \text{Cl-Si(CH}_3)_2\text{-R} \rightarrow \text{Si-O-Si(CH}_3)_2\text{-R} + \text{HCl}$$

fases polares

- R = (CH₂)₃NH₂ (amino)
- R = (CH₂)₃CN (ciano)
- R = (CH₂)₂OCH₂CH(OH)CH₂OH (diol)

fases apolares

- R = (CH₂)₁₇CH₃ (octadecil)
- R = (CH₂)₇CH₃ (octil)
- R = (CH₂)₃C₆H₅ (fenil)

Fase móvel

- ↑ pureza ⇒ ↑ custo
- ⇒ remoção de gases dissolvidos
- ⇒ não decompor ou dissolver a FE { pré-coluna fase ligada
- ⇒ ter baixa viscosidade
- ⇒ compatibilidade com o detector
- ⇒ polaridade adequada
- ⇒ aditivos { trietilamina (aminas)
acetato de amonio (ácidos)

Cromatografia de fase normal

- FE polares - sílica; água e trietilenoglicol adsorvidos sobre sílica ou alumina; líquido polar quimicamente ligado à sílica
- FM apolares - hexano ou éter isopropílico

componente menos polar elui primeiro

Polaridade do soluto: a > b > c

Cromatografia de fase reversa

- FE polares - hidrocarbonetos (C_8 , C_{18}) quimicamente ligados à sílica
- FM polares - água, metanol, acetonitrila

componente mais polar elui primeiro

Polaridade do soluto:
 $a > b > c$

Força eluente

Table 25-2 Eluotropic series and ultraviolet cutoff wavelengths of solvents for adsorption chromatography on silica

Solvent	Eluent strength (ϵ°)	Ultraviolet cutoff (nm)
Pentane	0.00	190
Hexane	0.01	195
Heptane	0.01	200
Trichlorotrifluoroethane	0.02	231
Toluene	0.22	284
Chloroform	0.26	245
Dichloromethane	0.30	233
Diethyl ether	0.43	215
Ethyl acetate	0.48	256
Methyl <i>t</i> -butyl ether	0.48	210
Dioxane	0.51	215
Acetonitrile	0.52	190
Acetone	0.53	330
Tetrahydrofuran	0.53	212
2-Propanol	0.60	205
Methanol	0.70	205

The ultraviolet cutoff for water is 190 nm.
SOURCES: L. R. Snyder, in *High-Performance Liquid Chromatography* (C. Horváth, ed.), Vol. 3 (New York: Academic Press, 1983); *Burdick & Jackson Solvent Guide*, 3rd ed. (Muskegon, MI: Burdick & Jackson Laboratories, 1990).

Força eluente

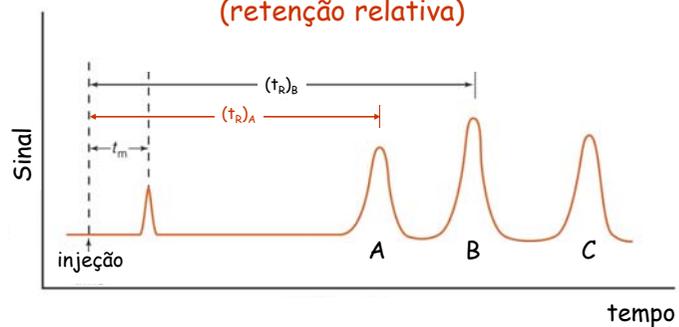
Exercício

↑ força do eluente

↑ fator de separação (α)

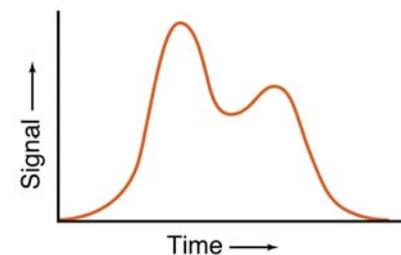
↑ N

Fator de separação (α) (retenção relativa)



$$\alpha = \frac{(t'_R)_B}{(t'_R)_A}$$

Exercício

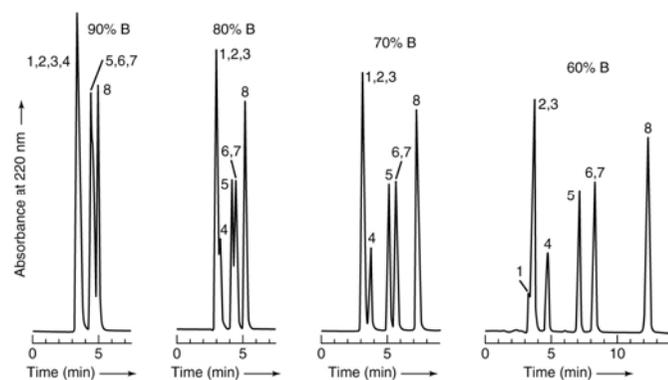


↑ força do solvente

↑ fator de separação (α)

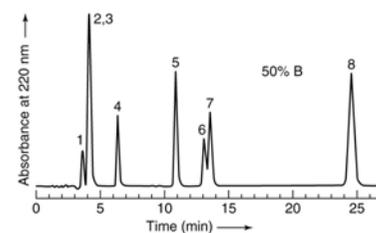
↑ N

Eluição isocrática



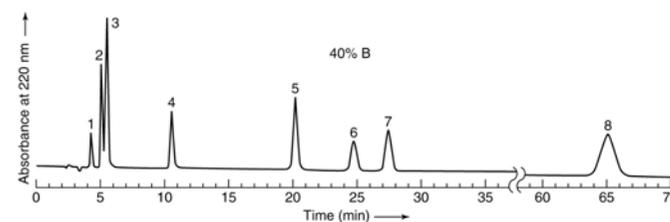
A=tampão aquoso
B=acetonitrila

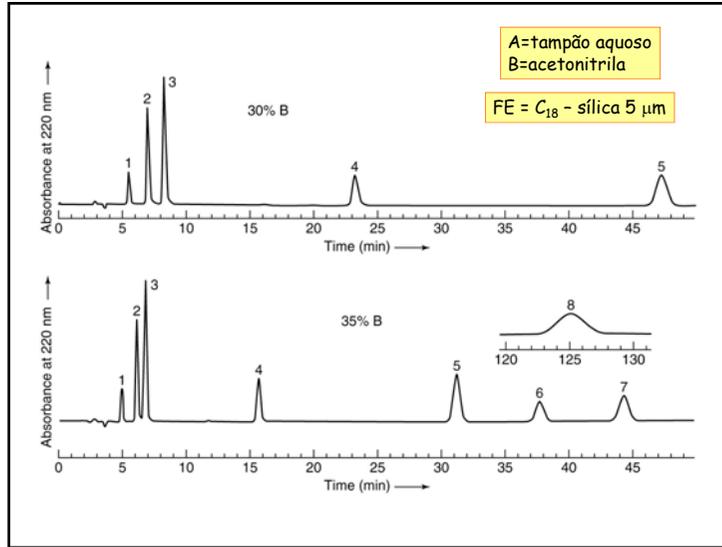
FE = C₁₈ - sílica 5 μm



A=tampão aquoso
B=acetonitrila

FE = C₁₈ - sílica 5 μm





Efeito da acidez

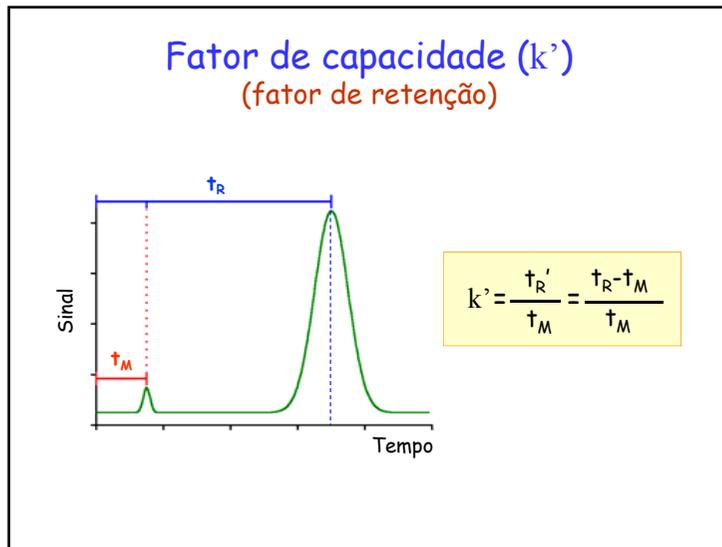
Fase reversa

Analito	pKa	k'		
		pH 3	pH 5	pH 7
acetofenona	—	4,21	4,28	4,37
ácido salicílico	2,97	2,97	0,65	0,62
nicotina	3,15	0,00	0,13	3,11
	7,85			

CC(=O)c1ccccc1

OC(=O)c1ccccc1O

CN1CCCC1c2cccnc2



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

Efeito da acidez

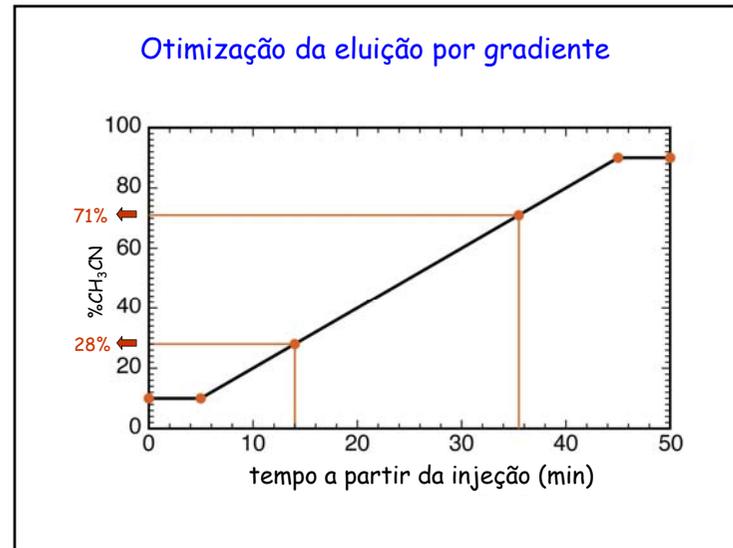
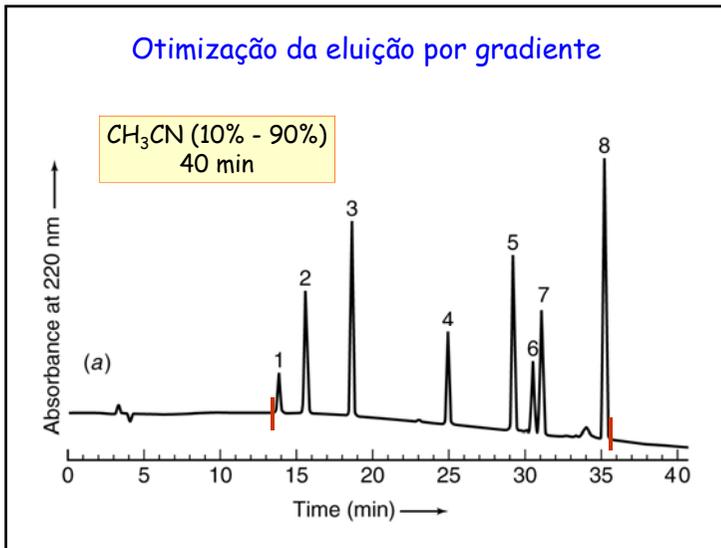
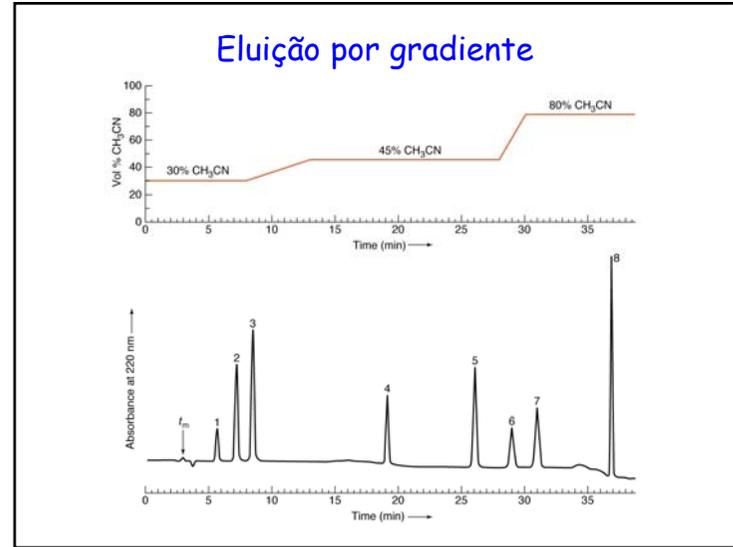
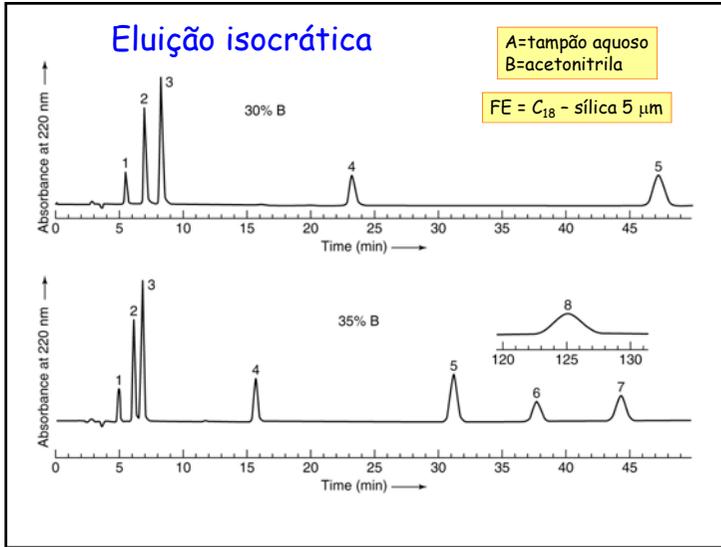
Fase reversa

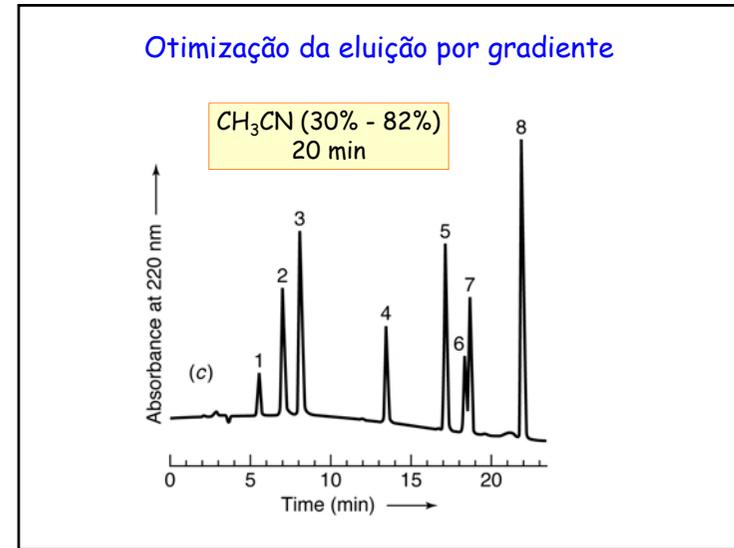
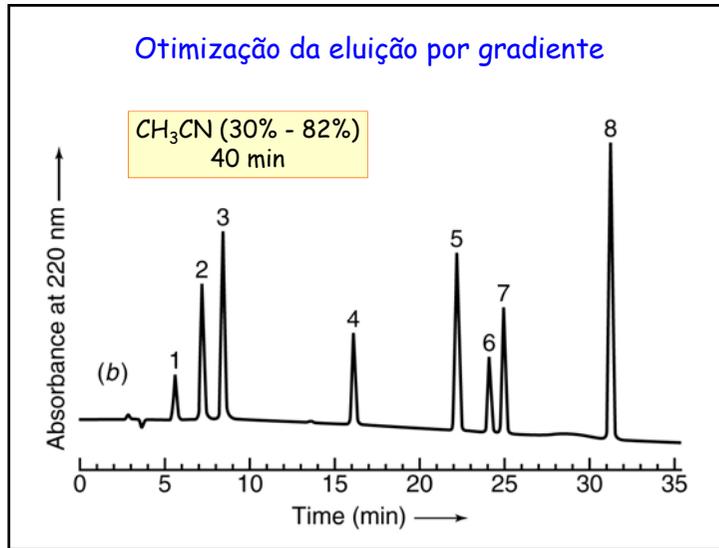
Analito	pKa	k'		
		pH 3	pH 5	pH 7
acetofenona	—	4,21	4,28	4,37
ácido salicílico	2,97	2,97	0,65	0,62
nicotina	3,15	0,00	0,13	3,11
	7,85			

CC(=O)c1ccccc1

OC(=O)c1ccccc1O

CN1CCCC1c2cccnc2





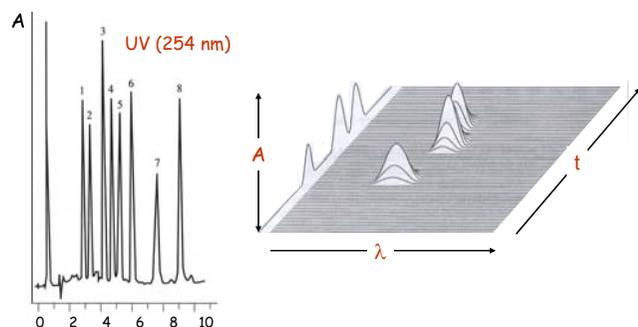
Detector ideal

- ↑ sensibilidade
- ✓ resposta rápida
- ↑ faixa de resposta (linear)
- ↓ dependência temperatura e vazão
- ✓ resposta independente da fase móvel
- ↓ alargamento do pico
- ✓ não destrutivo
- ✓ informações qualitativas sobre os analitos

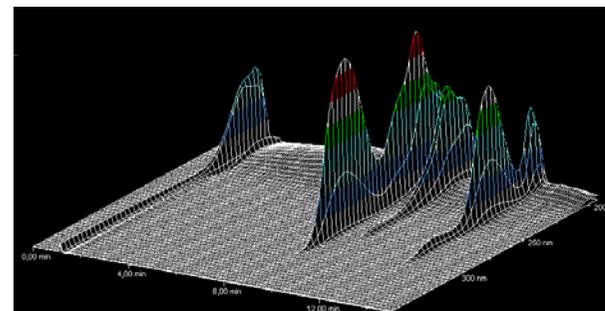
Detectores

- ✓ Ópticos
 - ⇒ (espectro)fotométricos
 - ⇒ índice de refração
 - ⇒ fluorimétricos
- ✓ Eletroquímicos
 - ⇒ condutométricos
 - ⇒ amperométricos
- ✓ Espectrometria de massas

Detectores espectrofotométricos



Detector por arranjo de diodos



Celas de medida

