

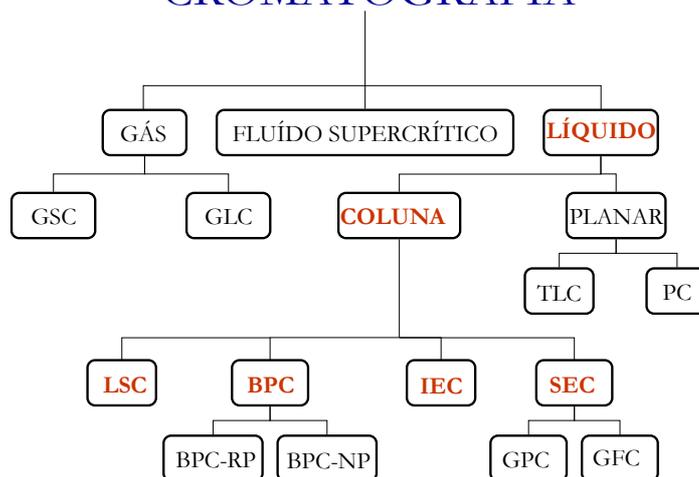
# Análise Instrumental II

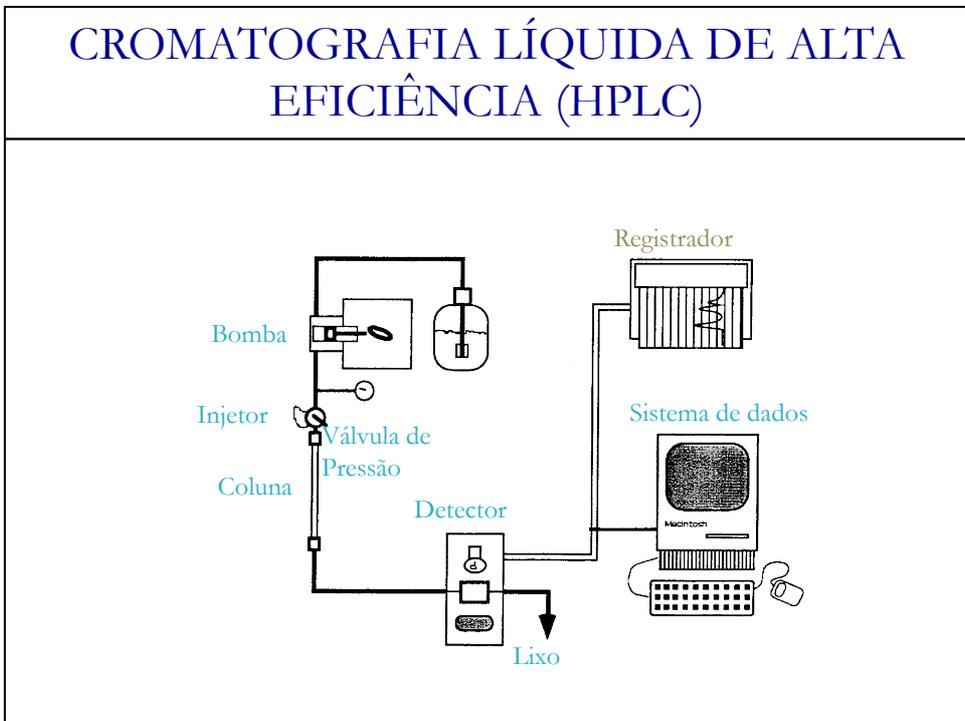
2016

## HPLC

*Prof. Fernando M. Lanças*

### CROMATOGRAFIA



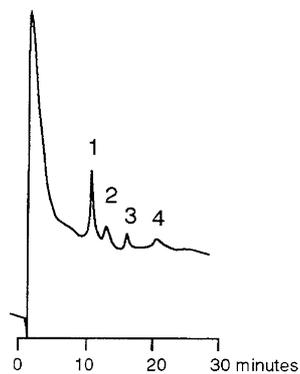


## VANTAGENS DA HPLC

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

## ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR HPLC (ppb)

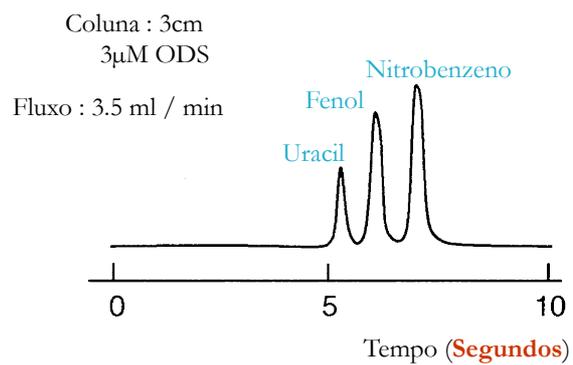
Aflatoxinas em pasta de amendoim; Detecção por Florescência.



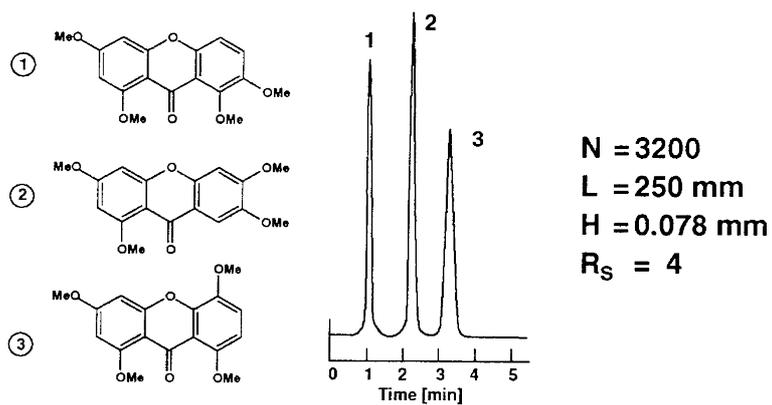
1. Aflatoxina B<sub>1</sub> 5ppb
2. Aflatoxina G<sub>1</sub> 1ppb
3. Aflatoxina B<sub>2</sub> 3ppb
4. Aflatoxina G<sub>2</sub> 1ppb

## ANÁLISE RÁPIDA POR HPLC

(Pequenas Partículas, Coluna Curta, Fluxo Rápido)



## ALTA RESOLUÇÃO



“HPLC of Naturally Occuring 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

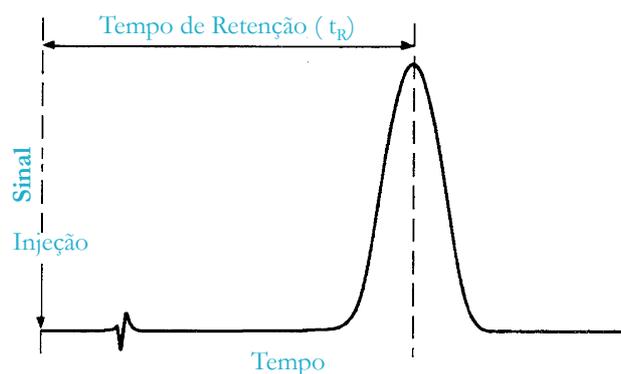
## VERSATILIDADE DA HPLC

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

## HPLC - VANTAGENS

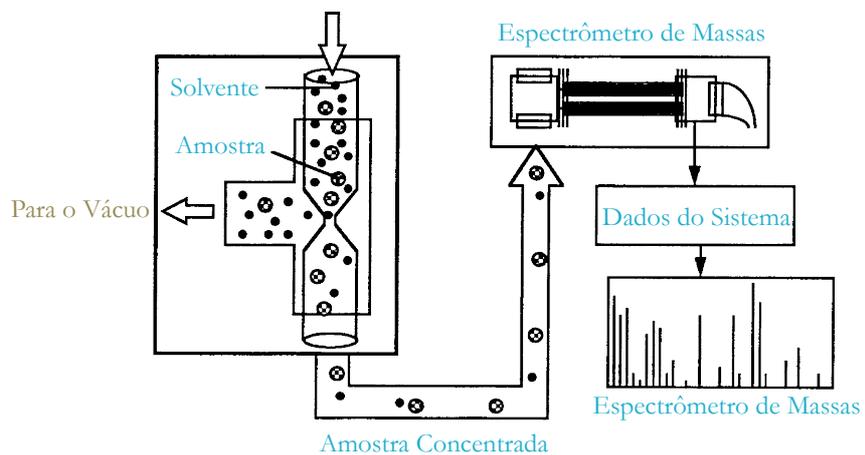
1. Rápida – Usar colunas curtas e partículas pequenas.
2. Alta Resolução –  $N$  elevado, várias formas de aumentar  $\alpha$ , muitos tipos de coluna.
3. Versátil – Se você pode dissolver a amostra, HPLC!
4. Boa Análise Quantitativa -  $\sim 1 - 2\%$  RSD.
5. Escala Preparativa Fácil – Colunas grandes,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

## ANÁLISE QUALITATIVA (1)

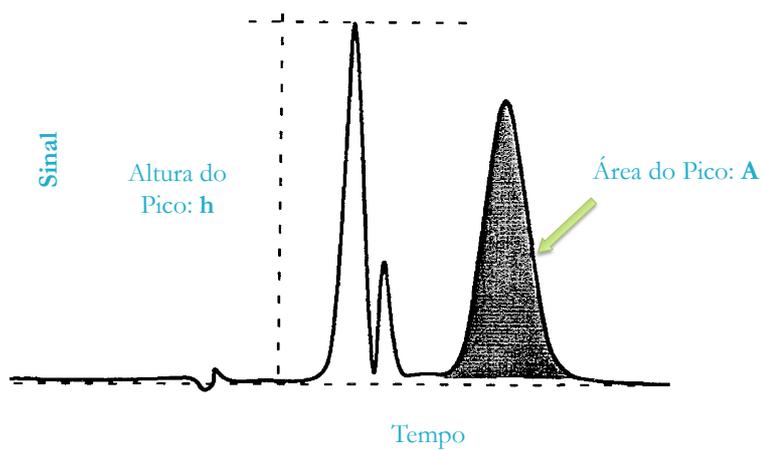


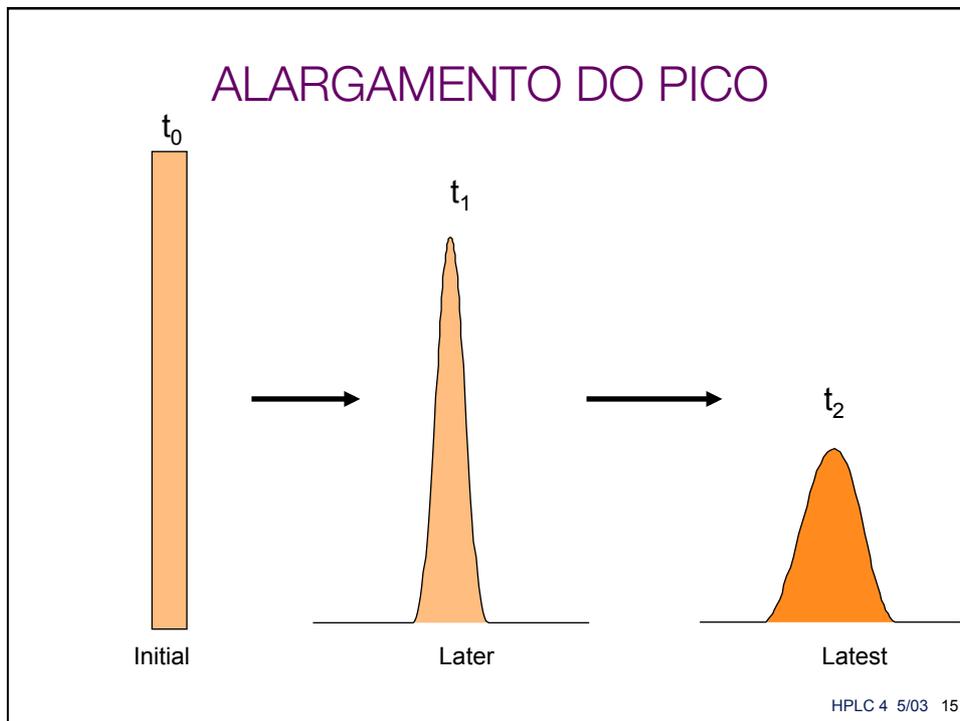
- *Técnicas auxiliares (MS, IR, UV-VIS, NMR) proporcionam identificação mais positiva*

## LC - Espectrometria de Massas



## ANÁLISE QUANTITATIVA





### VAN DEEMTER EQUATION – 1956 (PACKED GC COLUMN)

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

3 fatores determinam a velocidade de alargamento da banda

HPLC 4 5/03 16

## van DEEMTER EQUATION (Modificada para HPLC)

$$HETP = H = A + \frac{B}{\bar{u}} + [C_S + C_M] \bar{u}$$

- 4 fontes independentes de alargamento da banda; **novo termo C**
- Minimizando cada termo, **Minimiza “H”**,  
**Maximiza a Eficiência**

HPLC 4 5/03 17

## HPLC – EDDY DIFFUSION

$$A = 2\lambda dp$$

- A chave é o uso de partículas menores, empacotadas de forma eficiente.
- 10 and 5 microns são comumente utilizadas.
- 3 microns disponível
  - U-HPLC ou UPLC : 1,7 a 1,8 microns

HPLC 4 5/03 18

## HPLC – LONGITUDIAL DIFFUSION

$$B/v = \frac{2\gamma D_{mobile}}{v}$$

- Fator pouco relevante em HPLC
- Difusão em líquidos é negligenciável

HPLC 4 5/03 19

## HPLC – MASS TRANSFER STATIONARY PHASE

$$C_s v = \frac{QRd_f^2 v}{D_{stat}}$$

- |                   |   |                                 |
|-------------------|---|---------------------------------|
| Q                 | = | Fator de Configuração           |
| R                 | = | Constante; f (K )               |
| d <sub>f</sub>    | = | Espessura da fase estacionária  |
| D <sub>stat</sub> | = | Coef. De difusão na fase estac. |
| v                 | = | Velocidade do fluxo (cm / sec ) |

**Chave: filme fino**

HPLC 4 5/03 20

## HPLC – MASS TRANSFER – MOBILE PHASE

$$C_m v = \frac{w d p^2 v}{D_{\text{mobile}}}$$

- |                   |   |                                      |
|-------------------|---|--------------------------------------|
| w                 | = | Coeficiente da coluna                |
| dp                | = | Diâmetro das partículas              |
| v                 | = | Velocidade do fluxo (cm / sec )      |
| D <sub>mob.</sub> | = | Coeficiente de Difusão na fase móvel |

**Chave: partículas pequenas**

HPLC 4 5/03 21

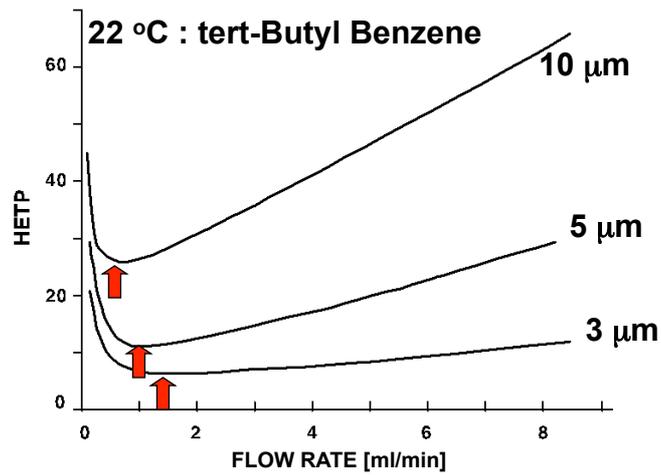
## EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER DETALHADA (HPLC)

$$H = (2\lambda dp) + \frac{2\gamma D_m}{v} + \frac{QRd_f^2 v}{D_s} + \frac{\omega dp^2 v}{D_m}$$

HPLC 4 5/03 22

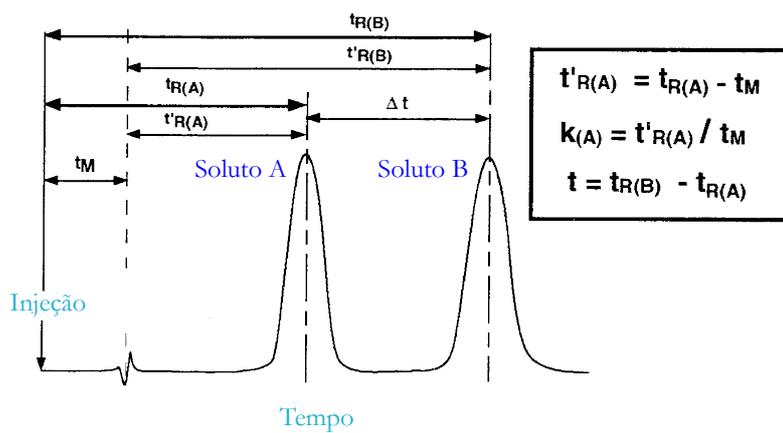
## ALARGAMENTO DA BANDA vs FLUXO

FUNÇÃO DO DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS



HPLC 4 5/03 23

## PARÂMETROS DE RETENÇÃO



HPLC 4 5/03 24

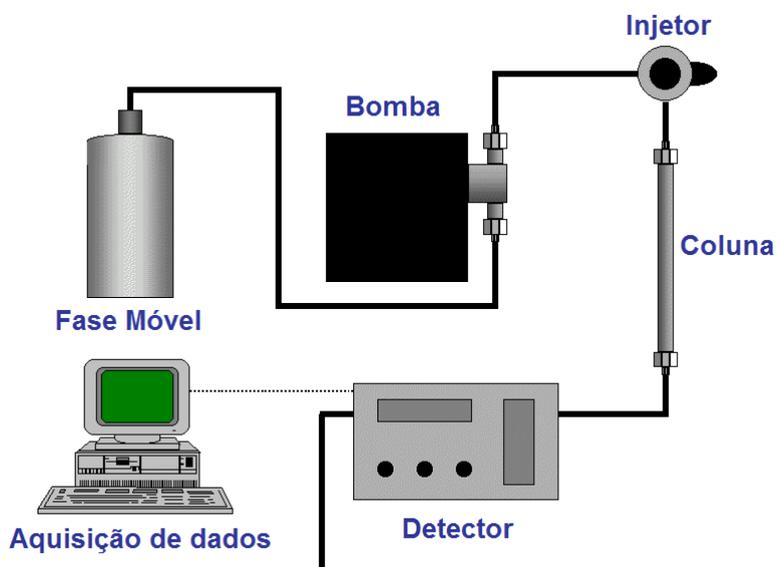
## EQUAÇÃO MESTRA DA RESOLUÇÃO

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

CAPACIDADE      SELETIVIDADE      EFICIÊNCIA

## Instrumentação

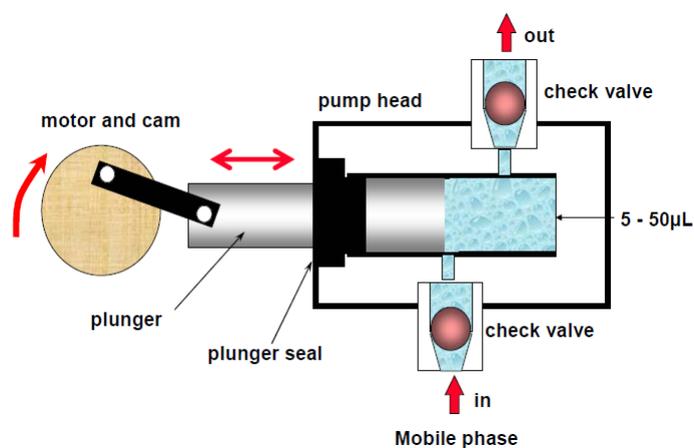
## Componentes de um sistema de HPLC



5/03 27

## BOMBAS DO TIPO RECIPROCANTES

- São utilizadas em 90% dos sistemas de HPLC. Consistem de uma pequena câmara na qual o solvente é bombeado por um movimento para trás e para frente de um pistão controlado por um motor.



HPLC 4 5/03 28



**Bombas de HPLC do tipo recíprocas  
(isocráticas, binárias ou quaternárias)**

HPLC 4 5/03 29

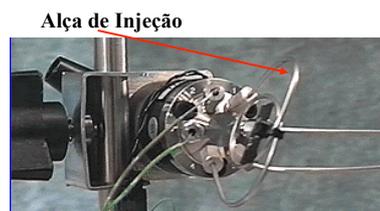
## Injetores Manuais



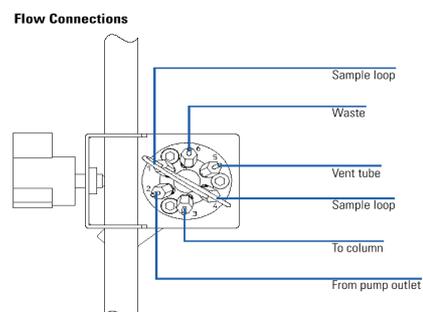
Vista frontal



Posição de injeção



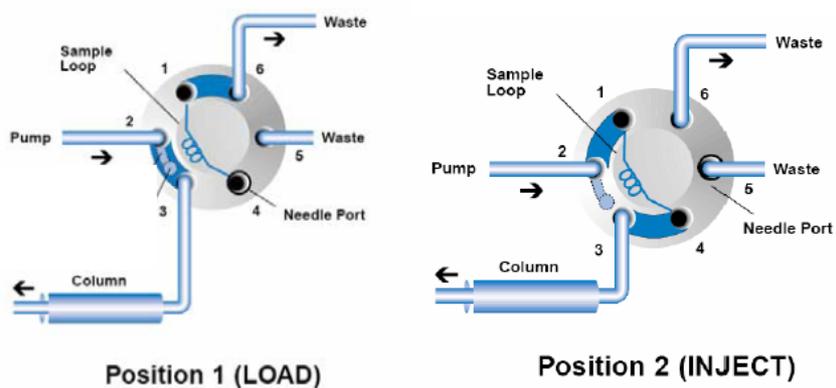
Vista traseira



30

## SISTEMAS DE INJEÇÃO DE AMOSTRAS

### VÁLVULA DE 6 PÓRTICOS



HPLC 4 5/03 31

### Esquema de uma coluna de HPLC



32

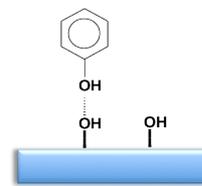
## CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO (LSC)

**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,  $\text{CHCl}_3$  (raramente água).

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



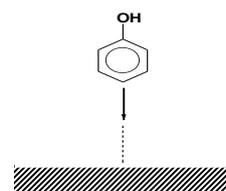
## FASES QUIMICAMENTE LIGADAS (Partição)

### FASE NORMAL

- Adsorvente Polar:  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,...
- Solventes não Polares: iso-octano, cloreto de metileno
- Amostras não polares e semi-polares

### FASE REVERSA

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



## CROMATOGRAFIA EM FASE LIGADA (BPC)

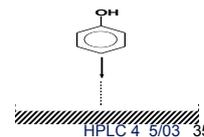
### Fase Reversa (R.P)

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

**FE:** Superfícies hidrofóbicas na silica 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.



### DETECTORES PARA HPLC



Detector UV

Detector MS



# Conclusões

HPLC 4 5/03 37