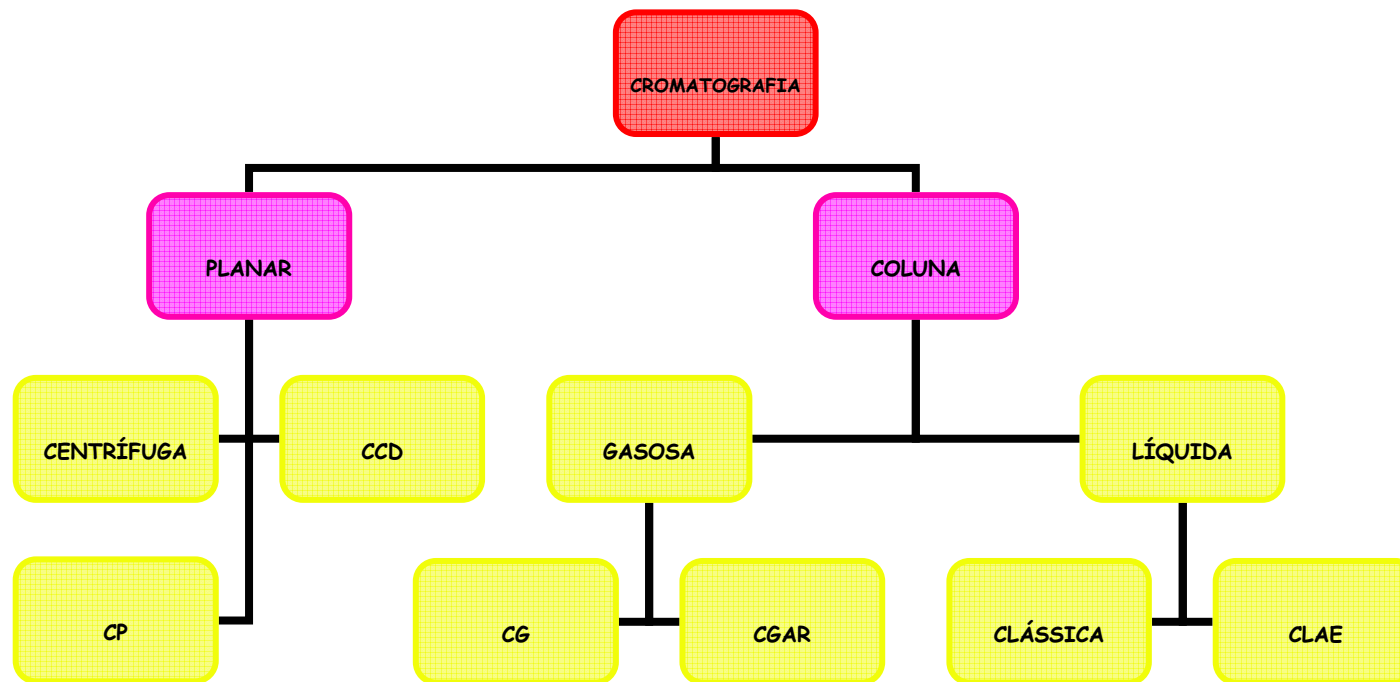


Métodos Cromatográficos

<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/CHROMO/chromintro.html>

<http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/gc/>

<http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/LC/>



Cromatografia

- Histórico

Michael Tswett (Цвет)- botânico russo 1906

- Etimologia

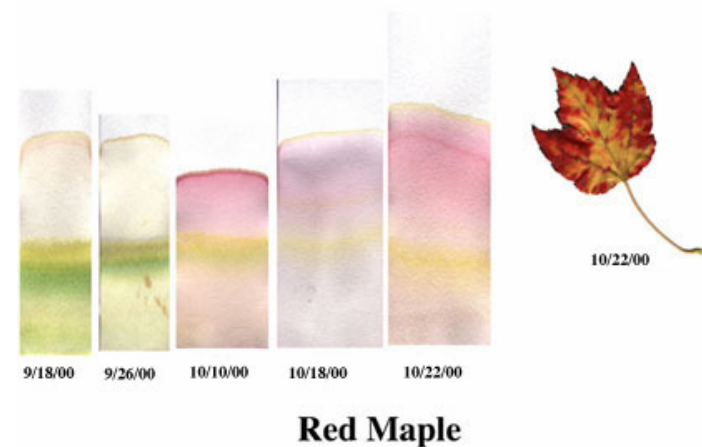
CHROMA = Cor

Graphain = escrever

Década de 30 – camada delgada

Década de 40 - pratos teóricos/impulso CG

Década de 60 – CLAE



http://members.shaw.ca/vict/chemistry_test3.htm

Cromatografia

- Definição

“É um processo pelo qual diferentes solutos são separados por uma dinâmica diferencial do processo migratório em um sistema contendo uma ou mais fases, das quais uma desloca-se continuamente em uma dada direção e no qual as substâncias exibem mobilidades distintas devido a diferenças de adsorção, partição, solubilidade, pressão de vapor, tamanho da molecular ou densidade de carga iônica.”

- Parâmetros em cromatografia:

Tempo de retenção (distância, volume, tempo de retenção corrigido)

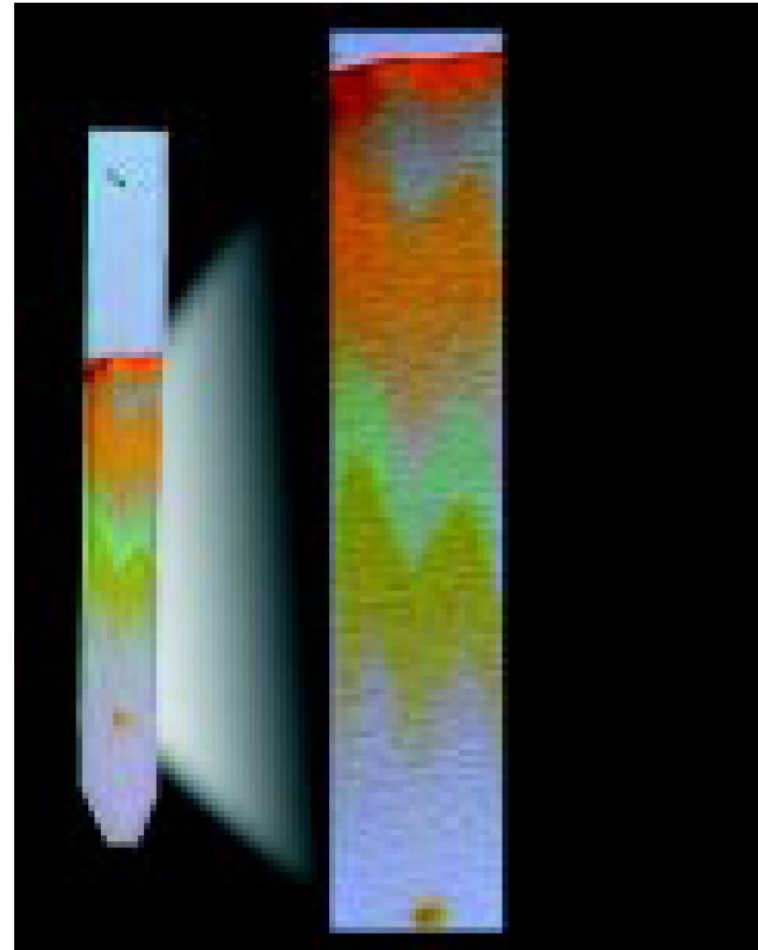
Resolução

Pratos teóricos

Altura equivalente a um prato teórico (HETP)

Definição

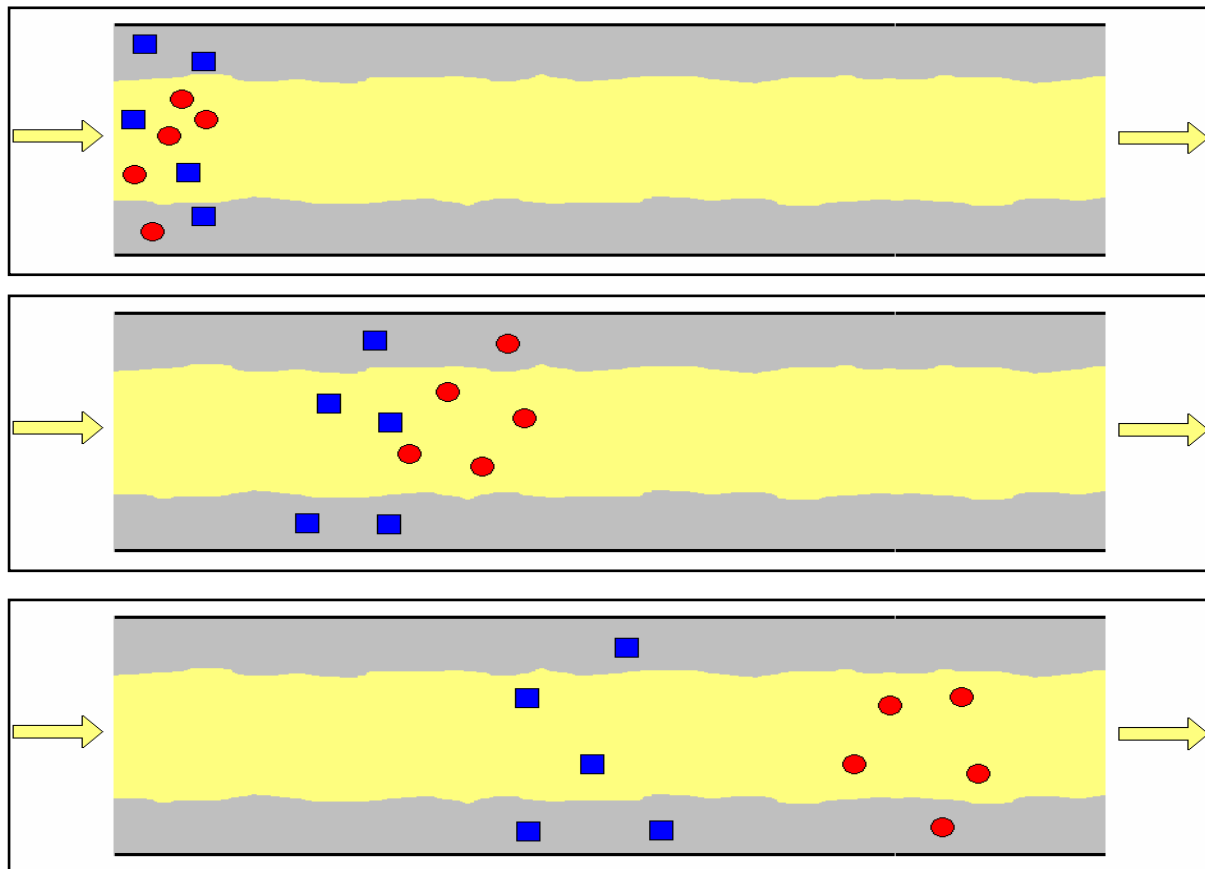
- Método físico-químico de separação de substâncias
- Presença de duas fases: Estacionária e móvel
- Separação ocorre devido a diferença de interação entre as substâncias e as fases
- Podendo ser uma análise qualitativa e/ou quantitativa



Cromatografia em papel

PRINCÍPIO BÁSICO

- Técnica de separação e análise de misturas por interação dos seus componentes entre uma Fase Estacionária e uma Fase Móvel.



Uses for Chromatography

Chromatography is used by scientists to:

- Analyze - examine a mixture, its components, and their relations to one another
- Identify - determine the identity of a mixture or components based on known components
- Purify - separate components in order to isolate one of interest for further study
- Quantify - determine the amount of the a mixture and/or the components present in the sample

Cromatografia: Classificação

1. Forma física do suporte

- *Cromatografia planar: CP e CCD*

- *Cromatografia em coluna CG e CL*

 - diâmetro interno do tubo(preparativa/ analítica)

 - estado físico da F.M.(gas/líquido/supercrítico)

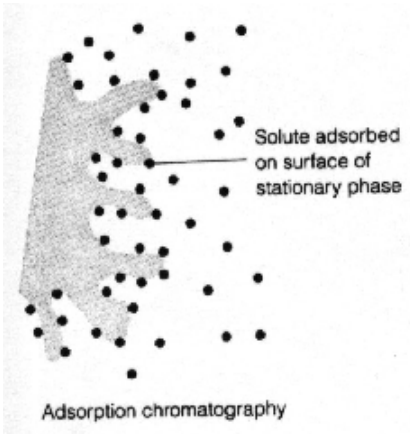
 - tipo de coluna (aberta/fechada)

 - fase estacionária (líquido/sólido)

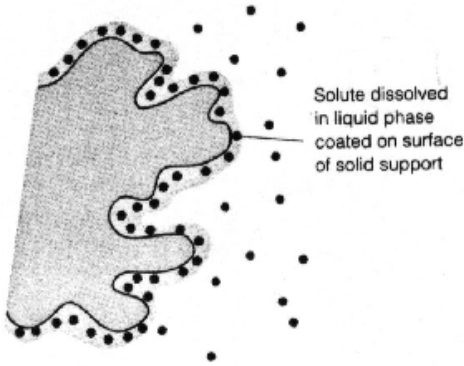
2.Mecanismo de separação (processos físico-químicos ou mecânico)

3.Polaridade das fases utilizadas

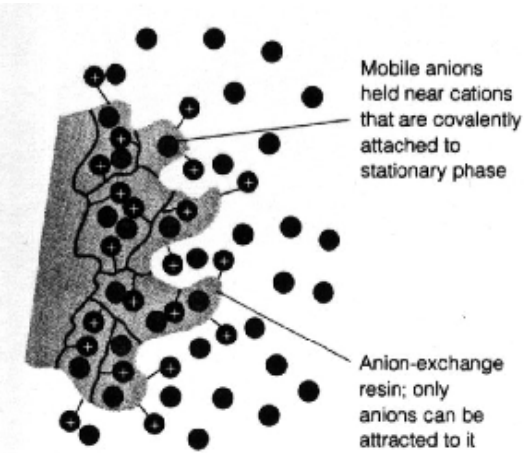
Mecanismos de separação



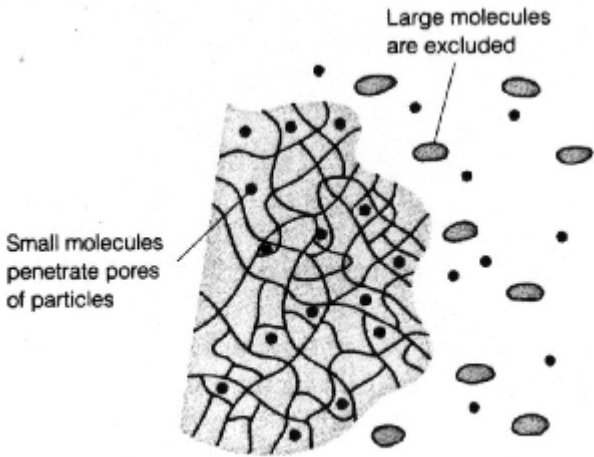
Adsorption chromatography



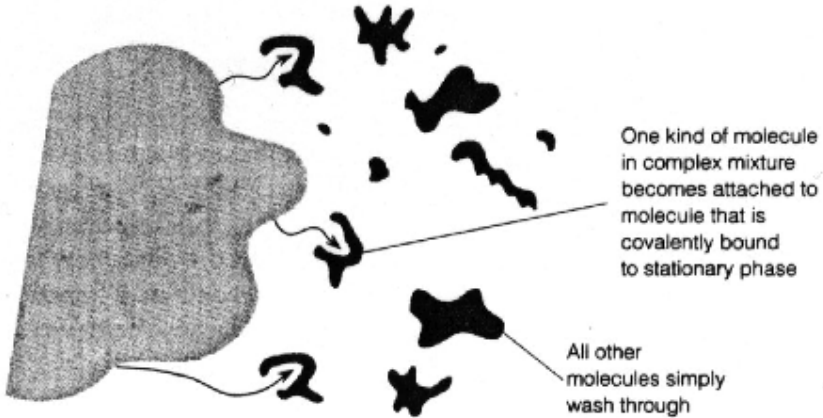
Partition chromatography



Ion-exchange chromatography



Molecular exclusion chromatography

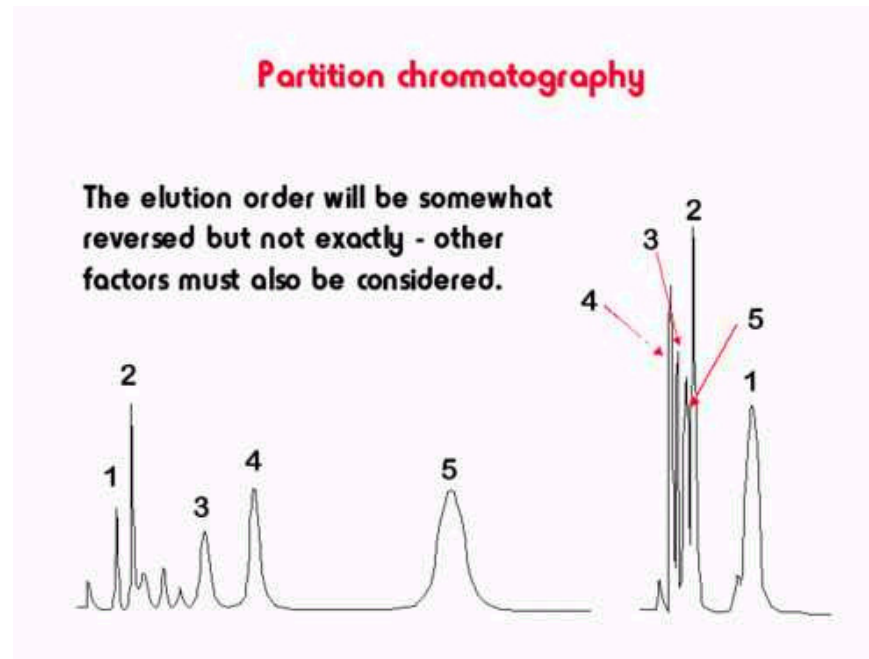


Affinity chromatography

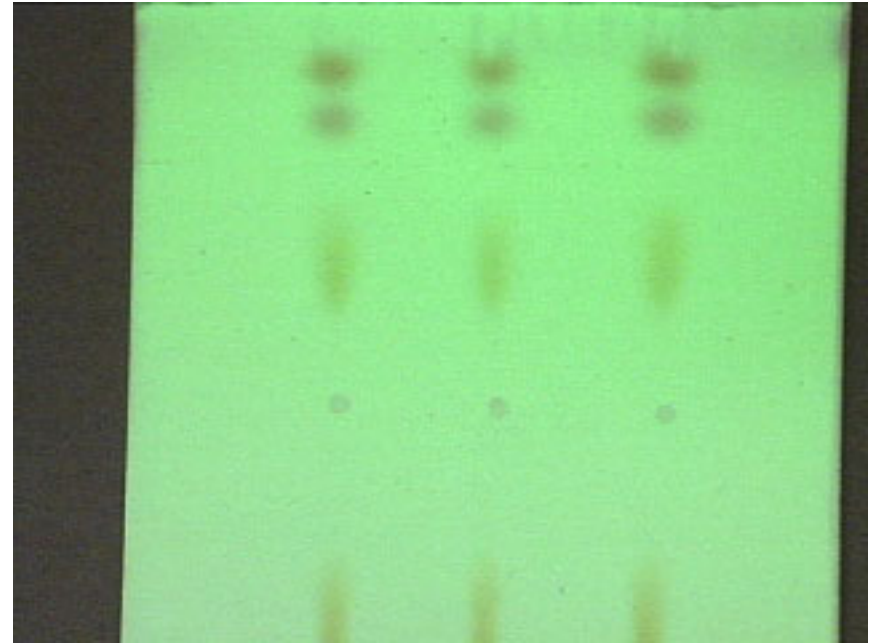
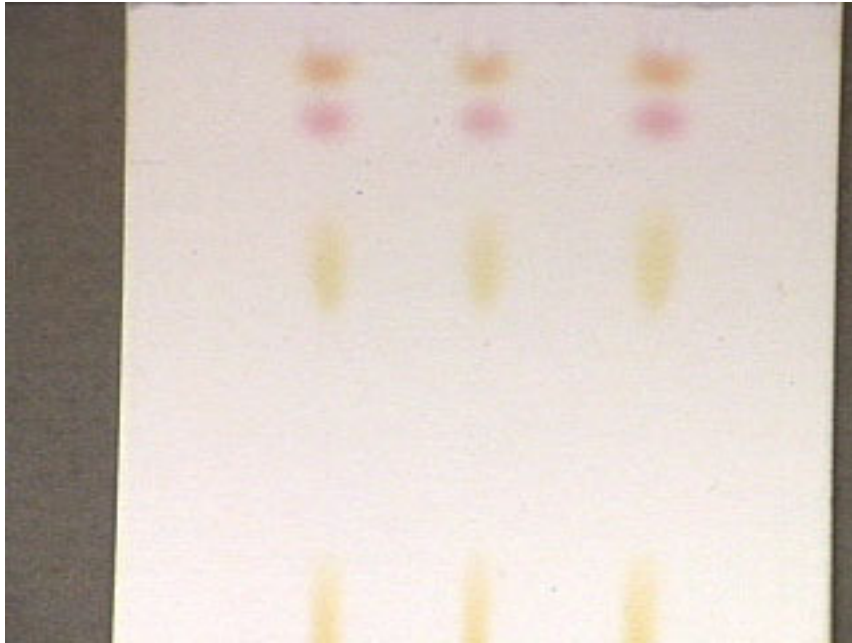
Polaridade da fase estacionária:

Fase normal - Fase estacionária polar

Fase reversa - Fase estacionária apolar



CCD - exemplos



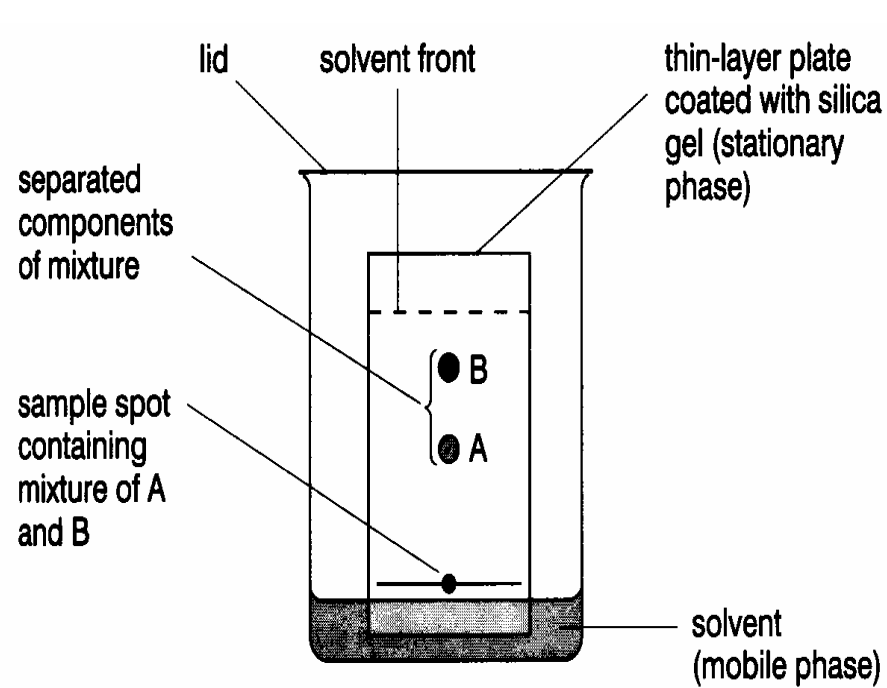
Requerimento da amostra::

detectável no cromatograma

solúvel na FM

estável à luz, oxigênio, solvente, não ser volátil

Thin Layer Chromatography - t.l.c.

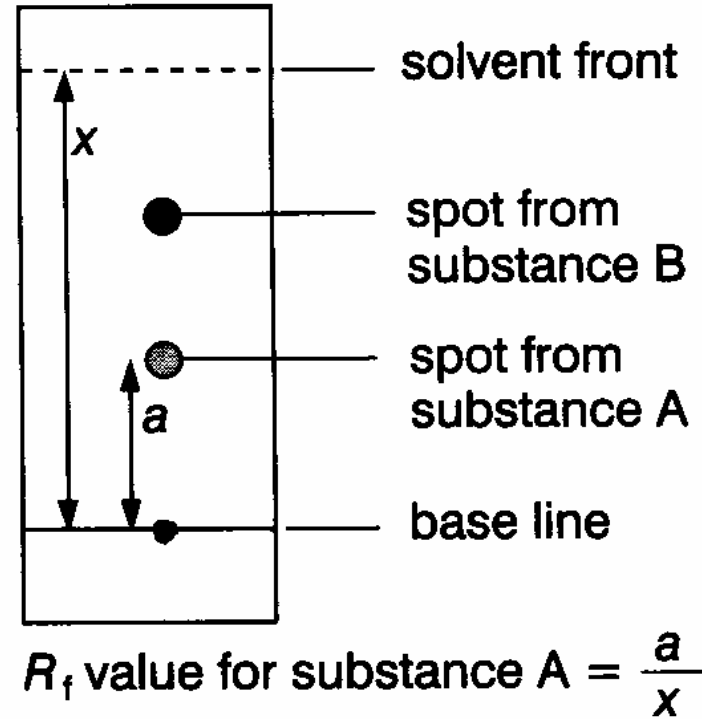
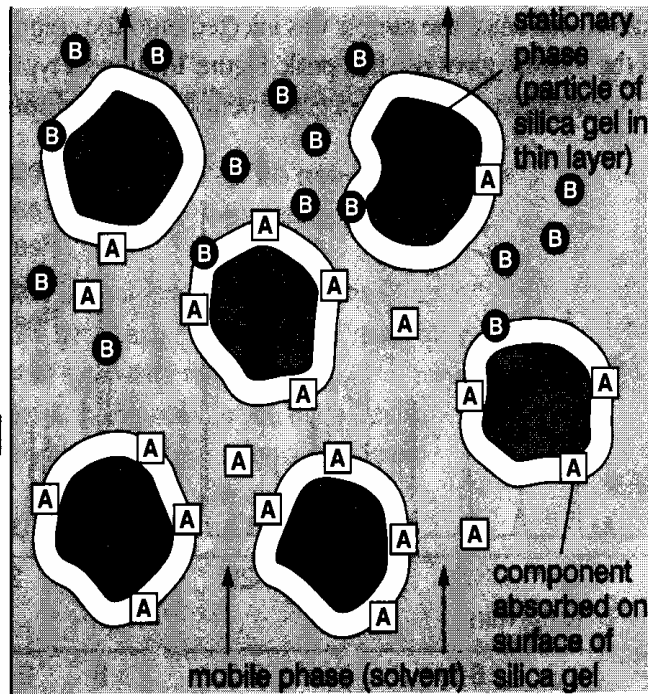


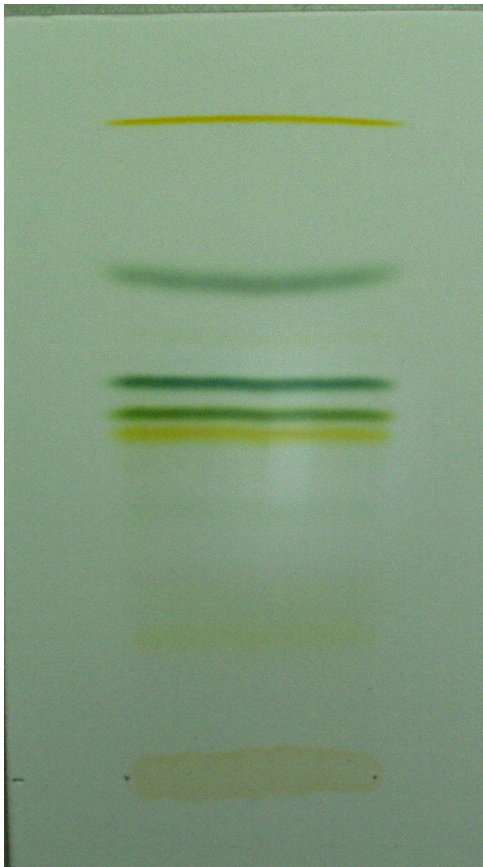
- Series of spots forms
- Compare samples in mixture with known substances.
- Measure R_f values.
- Coloured compounds & colourless compounds.

Separation and identification.

Component **B**
has greater
affinity for
mobile phase.
Gets carried
further.

Component **A**
has greater
affinity for
stationary phase.
Does not get
carried so far
by mobile phase.





<i>Pigment</i>	<i>Colour</i>	<i>R_F value</i>
<i>carotene</i>	<i>yellow-orange</i>	<i>0.91</i>
<i>pheophytin a</i>	<i>grey</i>	<i>0.75</i>
<i>pheophytin b</i>	<i>light grey</i>	<i>0.63-0.75</i>
<i>chlorophyll a</i>	<i>blue green</i>	<i>0.63</i>
<i>chlorophyll b</i>	<i>green</i>	<i>0.58</i>
<i>xanthophylls</i>	<i>yellow</i>	<i>0.53</i>
<i>xanthophylls</i>	<i>yellow</i>	<i>0.47</i>
<i>xanthophylls</i>	<i>yellow</i>	<i>0.32</i>

Eluent: Cyclohexane : propanone : petroleum ether (low boiling point) 5 : 3 : 2

Cromatografia em Camada Delgada

- Método rápido (20-40 min.)
- Uso de diversos agentes cromogênicos
- Maior sensibilidade que C.P. (10^{-9} g)
- Grande gama de compostos pode ser analisada
- Método simples e barato
- F.M. - sistema de solventes
- F.E - Adsorventes (sílica, alumina, celite, amido)
- Métodos de detecção: físico-químicos
- Princípio: Adsorção (polaridade)

Adsorção:

Alumina, **Silica**, magnésio, carbonato de cálcio, amido

Natureza da amostra x Comportamento cromatográfico

1. saturados x insaturados > retenção insaturados

2. grupos funcionais

COOH > -OH > -NH₃ > -SH > -CHO > C=O > CO₂R > OCH₃ > CH=CH

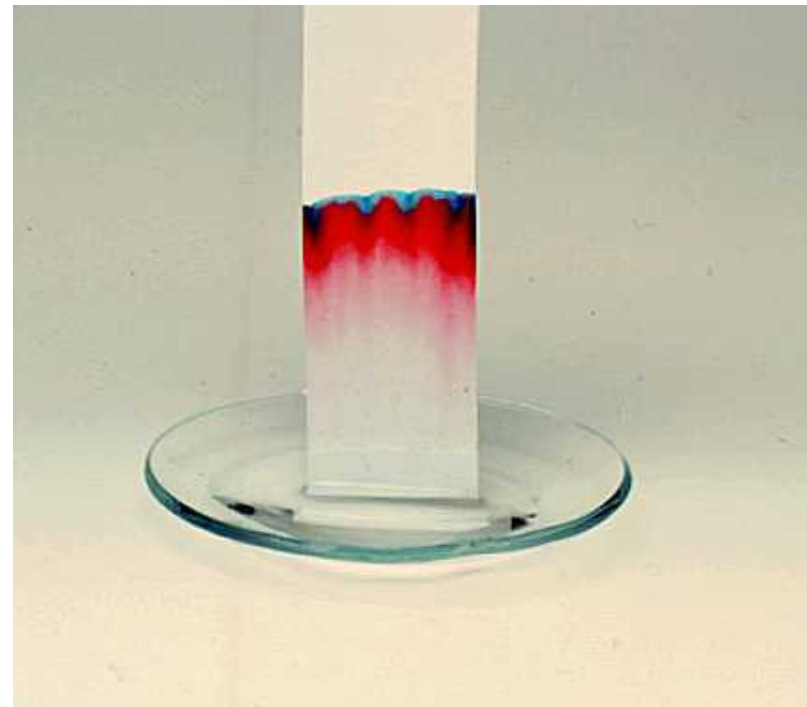
e

3. Impedimento estérico

Atividade: I, II ... V (% de água adicionada 0----15%)

Cromatografia em papel

- Compostos hidrossolúveis, ácidos orgânicos e ions metálicos
- Princípio: partição (solubilidade)
- Quantidade de amostra necessária 10^{-3} a 10^{-6} g
- Tipos: ascendente, descendente, bidimensional, circular
- F.M. - Sistema de solventes
- F.E. - Água retida na celulose (papel Whatman)
- Métodos de detecção: físico-químicos
- Análise qualitativa: R_f (fator de retenção) - problema : reprodutibilidade
- Análise quantitativa: densitômetro, extração dos solutos



Adsorção depende:

natureza química do adsorvente

área de superfície/
tamanho da partícula

porosidade da partícula

- atividade - - > sítios ativos

Tipos de adsorventes:

G- aglutinantes (gesso amido ou talco)

H- sem aglutinante (p/ CL)

P-camada preparativa

F- contém fluorescência

R- adsorvente sem aditivo

Critérios para escolha da fase móvel:

analitos devem ser solúveis diferentemente

não deve haver reação entre analitos/FM e FM/FE

Comparação

CP

Vantagens:

- técnica simples
- não requer instrumentação sofisticada
- baixo custo

Desvantagens:

- uso limitado
- alargamento de banda-difusão-
- pouca alternativa de reveladores

CCD

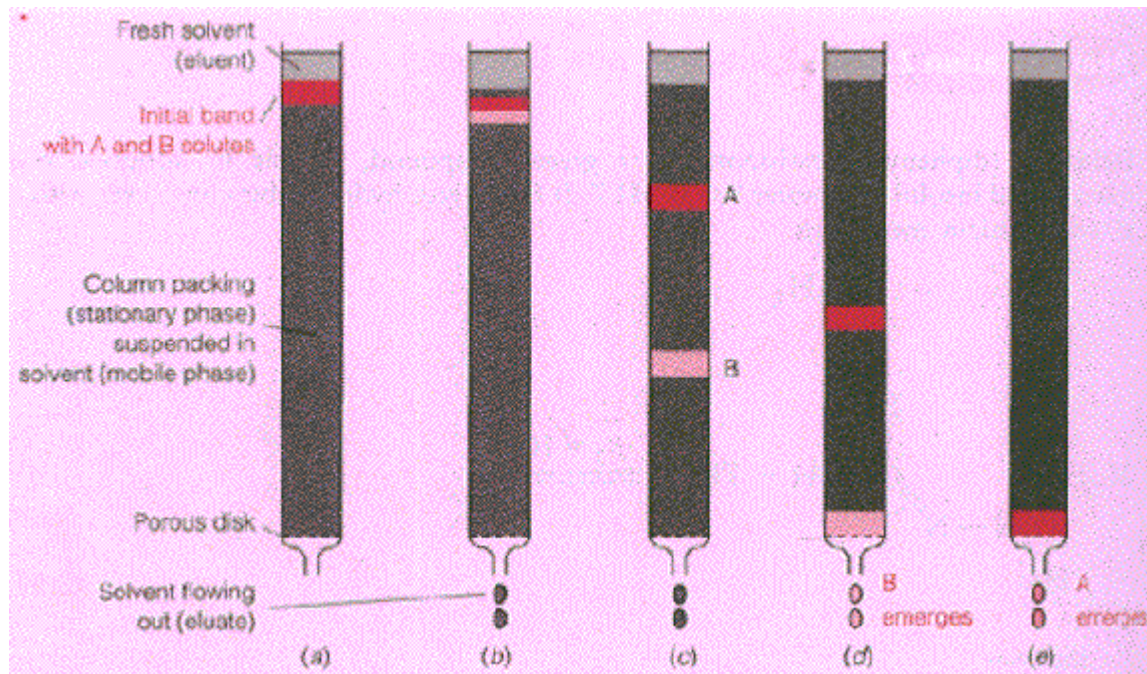
Vantagens:

- maior sensibilidade
- mais rápido
- > repetibilidade
- < difusão
- > faixa de aplicação
- reveladores reativos
- permite aquecimento

Desvantagens

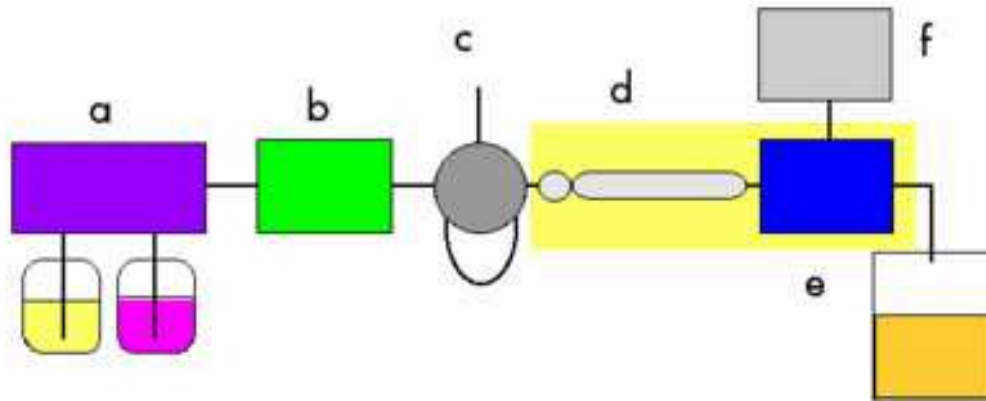
- degradação de compostos lábeis devido á grande superfície de exposição
- dificuldades na quantificação

Cromatografia Líquida em coluna aberta



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Basic HPLC equipment



a - gradient controller
b - pump/dampning system
c - sample introduction

d - column/precolumn
e - detector
f - data output

- Solvente: Alto grau de pureza, filtrado e degaseificado, caros

Sistemas de injeção: válvulas de volumes definidos

- Colunas de guarda
- Colunas: recheios → materiais porosos com partículas de diâmetros o mais homogêneo possível e de diâmetro igual ou menor a 10 um (em geral) → Silica e Alumina.
- Colunas com fase ligada → silica como suporte
- A) formação do éster silicato ($\text{Si}-\text{O}-\text{R}$)
- B) formação da ligação siloxano ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$)
- C) Ligação $\text{Si}-\text{C}$

Até 60.000 pratos teóricos

Partition phases

Normal

Amino	(-NH ₂)
Cyano	(-CN)
Diol	(glycidoxy-ethylmethoxysilane)

Reverse

C-2 or RP-2	(-Si-CH ₂ CH ₃)
C-8 or RP-8	(-Si-(CH ₂) ₇ CH ₃)
C-18 or RP-18	(-Si-(CH ₂) ₁₇ CH ₃)

Increasing the C number results in a thicker, more retentive phase

Absorption phases

alumina

common mobile phases

hexane, chloroform, 2-propanol.

example application - amines.

silica

common mobile phases

hexane, chloroform, 2-propanol.

example applications - ethers, esters,
porphyrins, fat-soluble vitamins.

Ion exchange phases

Strong cation - sulfonic acid group

Strong anionic - quaternary amine

Weak anion - primary amine

Weak cation - COOH

Detector:

- Alta sensibilidade
- Resposta rápida para todos os compostos da amostra
- Insensível à mudanças na Fase móvel
- Insensível à mudanças de temperatura
- Resposta independente para a fase móvel
- Resposta linear
- Não deve destruir a amostra
- Fácil operação
- Fornecer informações qualitativas

Detector Uv Vis

Detector de Fluorescência

Detector de arranjo de diodos

Detector de Índice de Refração

Detectores eletroquímicos

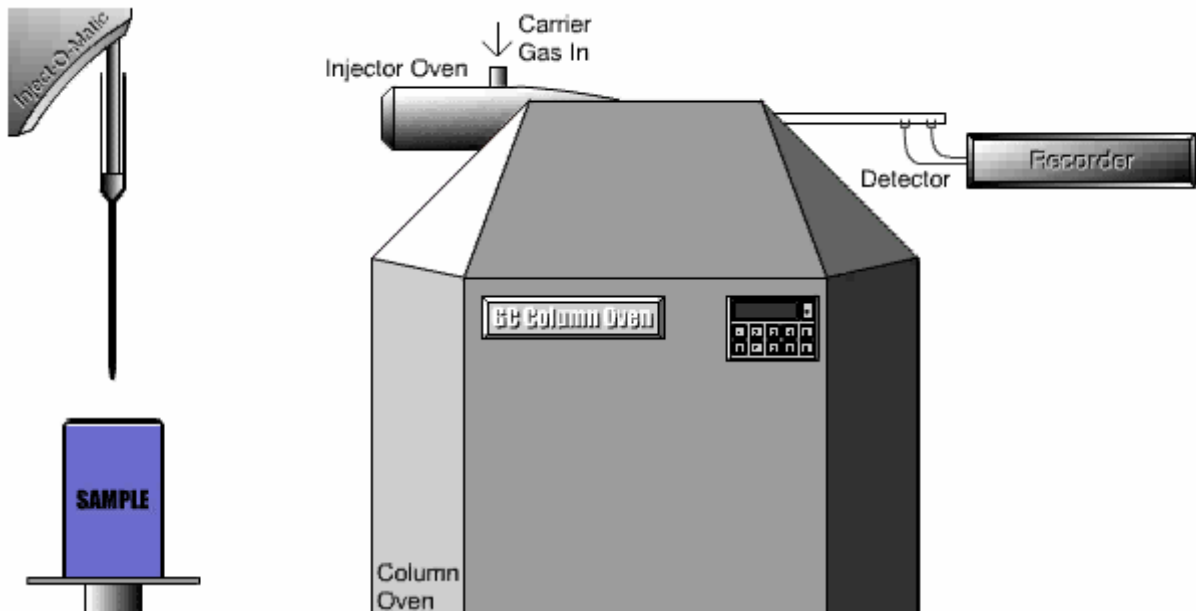
Quantificação:

Calibração Externa

Calibração Interna

Cromatografia a Gás

- Rapidez
- Alto poder de separação
- Separação de várias classes de compostos em uma análise
- Sensibilidade (ppm - ppb)
- Facilidade de registrar dados
- Variedade de detetor (especificidade)
- Amostras voláteis
- Compostos termicamente estáveis
- Técnicas auxiliares p/ identificação



Cromatografia a Gás: aplicações

- Análise de ácidos graxos e triglicerídeos
- Análise de micotoxinas
- Análise de compostos voláteis responsáveis pelo aroma característico de alimentos
- Análise de açúcares
- Análise de amino ácidos
- Análise de pesticidas
- Análise de fármacos
- etc
- etc

Cromatografia a Gás: tipos

- Cromatografia Gás-Sólido

FE: sólidos (sílica, carvão grafitizado, polímeros porosos)

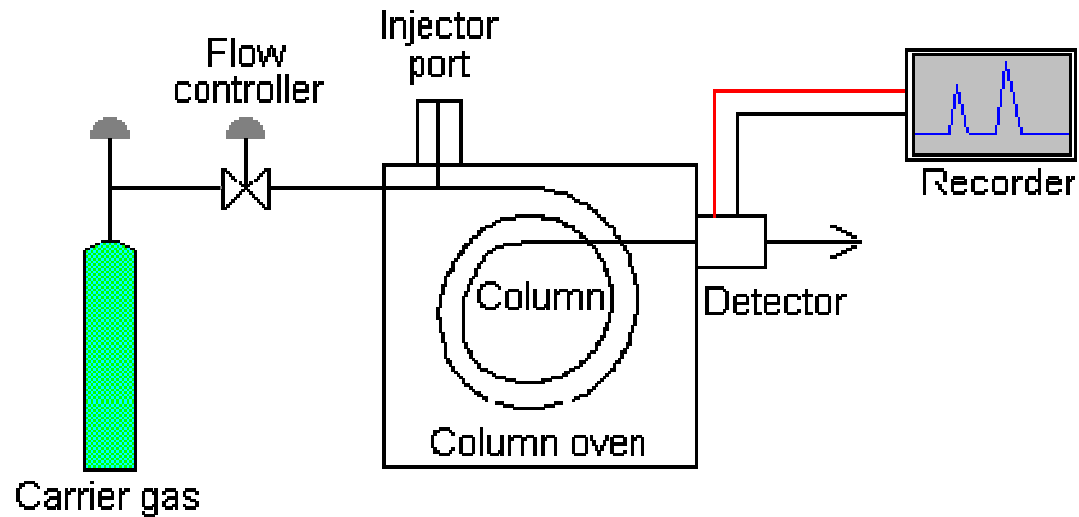
Princípio de retenção:(adsorção, volatilidade)

- Cromatografia Gás-Líquido ***

Líquido mantido estacionário em suporte inerte

Princípio de retenção: solubilidade, volatilidade

Cromatografia a Gás: Instrumentação



- **Gás de arraste (FM)**
- H₂, N₂, He, Ar
- Função: transporte da amostra
- Propriedades: inerte, compatível com o detetor, puro

Cromatografia a Gás: Instrumentação

Injetor

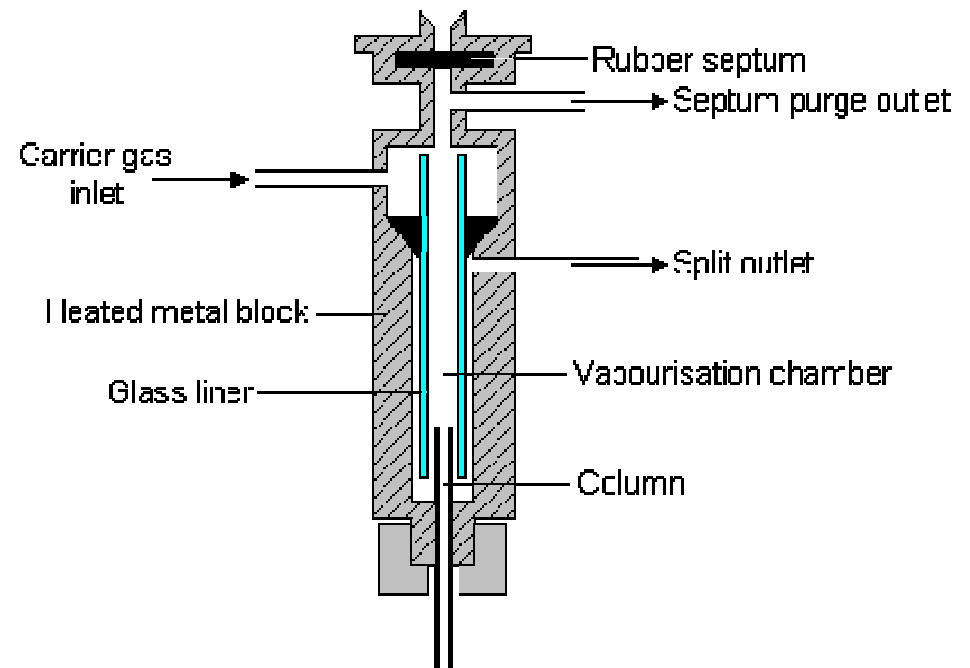
- Colunas empacotadas - câmara de aquecimento
- Colunas capilares:

split
splitless
on- column

Cuidados:

- Introduzir qtddes reprodutíveis de amostra
- Vaporizar totalmente a amostra sem decompô-la
- Não discriminar compostos

The split / splitless injector



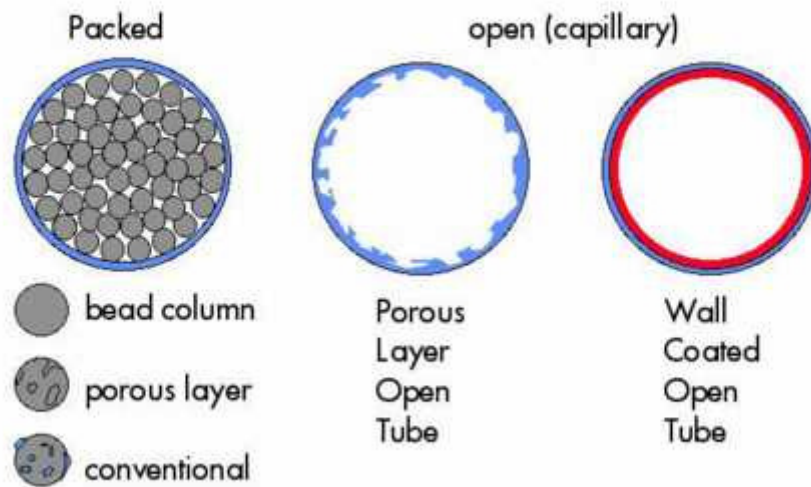
Cromatografia a Gás: Instrumentação

Colunas - tipos

Parâmetro	Coluna empacotada	Coluna capilar
Diam. Int. (mm)	1 - 4	0,15 - 0,75
Compr/o (m)	1 - 3	10 -100
Pratos teóricos	2400	3000
Espessura F.E.(μm)	5	0,5 - 2
Vazão gás (ml/min)	20 - 60	1- 5
Vol. amostra (μl)	02 - 20	0,001- 0,5

<http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/gc/>

Types of columns



1/4" packed column



Fused silica capillary column



Cromatografia a Gás: Instrumentação

Colunas - fase estacionária (FE)

- **Apolar:** hidrocarbonetos não aromáticos, silicones (ex.: SE-30) - P.E.
- **Polar:** contém grande quantidade de grupos polares (Ex.: Carbowax)- interações tipo pontes de hidrogênio
- **Intermediária:** grupos polares ou potencialmente polares em esqueleto apolar (Ex. SE-52)

Escolha da coluna:

- Polaridade da fase estacionária,
- diâmetro e espessura do filme → quantidade de amostras, tempo de análise, pressão (velocidade da FM), temperatura do forno
- Comprimento → pratos teóricos

Cromatografia gasosa: Instrumentação

Colunas - fase estacionária (FE)

- Abreviação de algumas fases estacionárias

DEGA- adipato de dietileno glicol

DEGS- succinato de dietileno glicol

SE 30- metil silicone

OV- 11- 35% fenil metilsilicone

Carbowax 20 M- polietilnoglicol

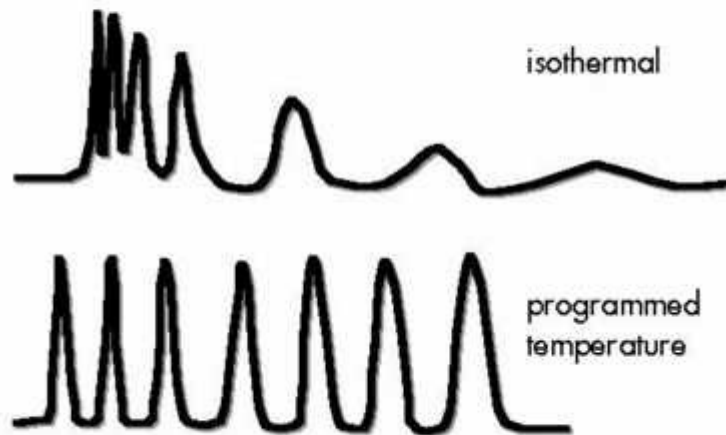
Examples of stationary phases

Phase [USP Code] (Solvent)	Temp. (°C) Min/Max
OV-351, 10g (C) (suggested substitute: SP-1000)	50/270
OV-1701, vinyl, 3g	0/250
β,β -Oxydipropionitrile, 50g (M)	0/75
Phenyldiethanolamine succinate [G12], 25g (C)	0/230
Polyethylene glycol adipate (EGA) [G23], 25g (A)	
Polyethyleneimine, 50g (A)	0/175
Polyphenyl ether (5 rings) OS-124, 25g (A)	0/200
Polyphenyl ether (6 rings) OS-138, 25g (A)	0/225
Polypropylene glycol, 50g (M)	0/150
Polypropyleneimine, 10g (C)	0/200
PPE-20 (poly-M-phenoxy) (C)	125/375

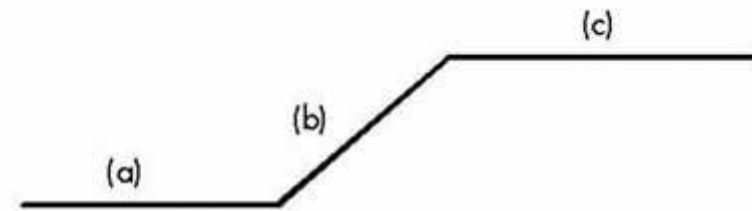
Copyright, 1997, Supelco Inc.
Bellefonte, PA. Used with permission.

Programação de temperatura

Example



A temperature program



a - initial temperature and time

b - ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

c - final hold time and temperature

Some GCs will allow for a more complex program.

Cromatografia a Gás: Instrumentação

Detetor - requisitos

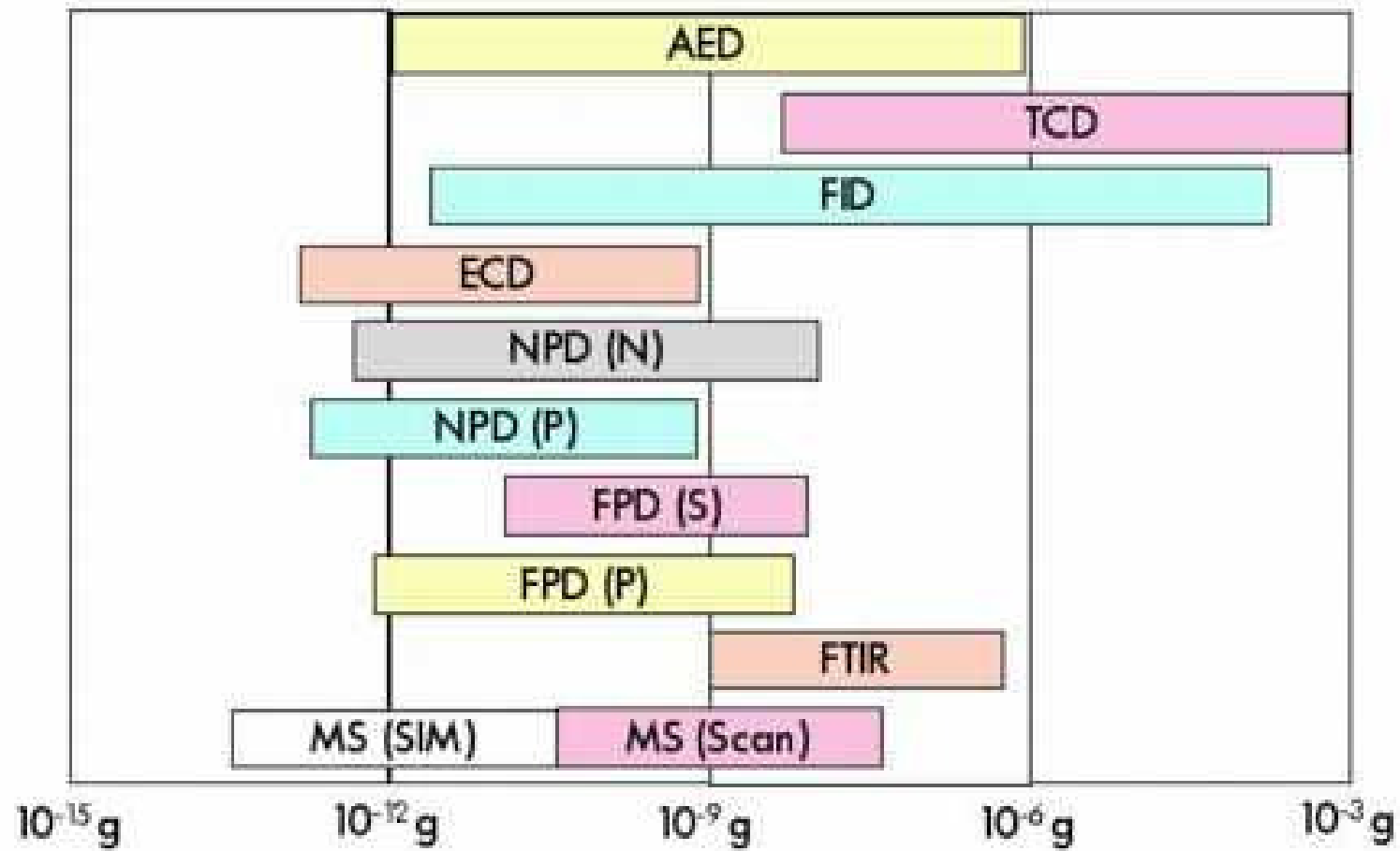
- Alta sensibilidade
- Baixo nível de ruído
- Faixa linear ampla p/ a resposta
- Resposta p/ os compostos de interesse (universais, seletivos, específicos)
- Insensível a pequenas mudanças de fluxo e temperatura
- Destrutivos/ não destrutivos

Cromatografia gasosa: Instrumentação

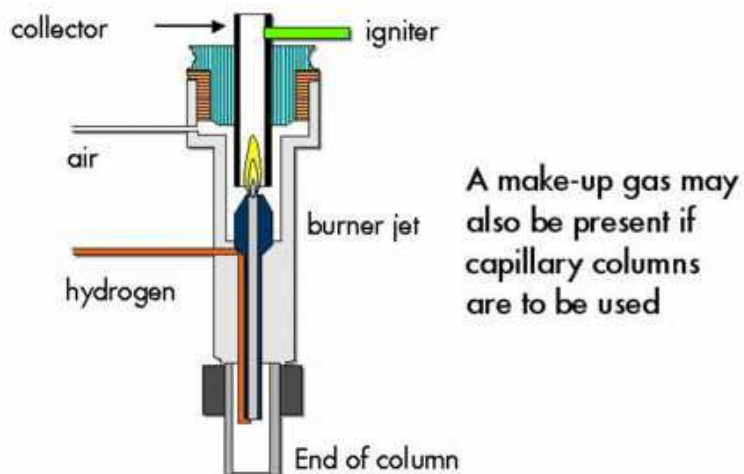
Detetor -Tipos

- **Ionização de chamas FID** (alta sensibilidade, resposta quase universal)
FM = hidrogênio ou nitrogênio, destrutivo
- **Condutividade térmica** (resposta universal, não destrói a amostra) - FM
= helio ou hidrogênio, não destrutivo
- **Captura de elétrons** (seletivo p/ halogênios orgânicos, nitrilas, nitratos e organometálicos) FM = nitrogênio, não destrutivo
- **Termiônico** (seletivo p/ compostos contendo N e P)

GC detectors sensitivities and ranges



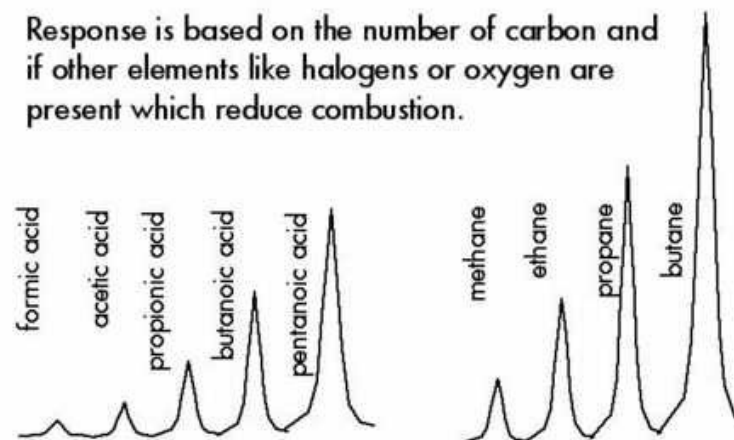
Flame ionization detector



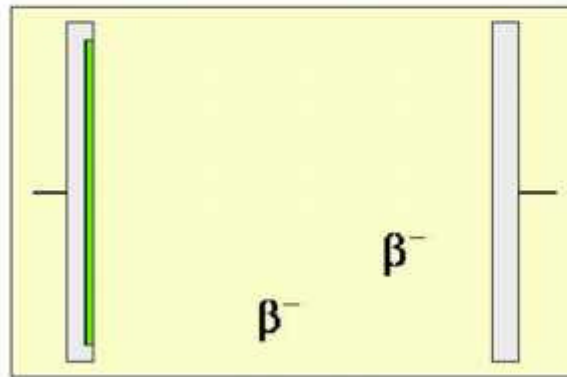
Formação de íons pela combustão da amostra na presença de H_2 e O_2 . Origina corrente elétrica no coletor gerando um sinal do qual a combustão do gás de arraste é descontada

FID response

Response is based on the number of carbon and if other elements like halogens or oxygen are present which reduce combustion.



Electron capture

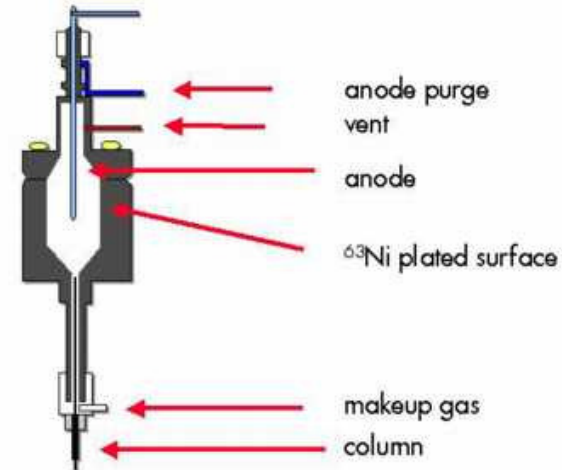


β^- are emitted by an ^{63}Ni source.

Electrodes will absorb β^- , reducing the current.

This is the basis for the response

Electron capture



O bombardeamento do gás de arraste com as partículas β^- geram elétrons lentos que migram para o ânodo gerando corrente constante que será registrada como linha de base.

Qdo a substância que entra no detector é capaz de capturar elétrons, há diminuição da corrente gerando um sinal negativo proporcional à concentração do composto.

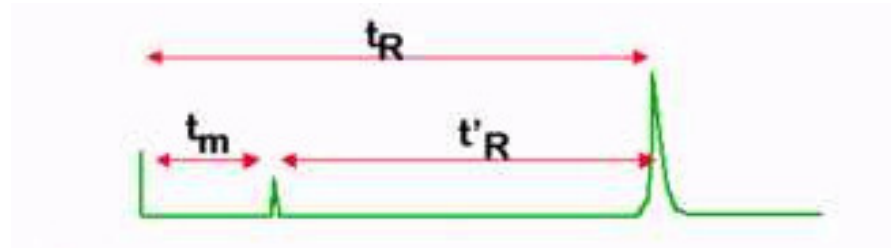
Cromatografia a Gás: Análise qualitativa

- Tempo de retenção
- Tempo de retenção relativo
- Co-cromatografia com padrões (spiking)
- Gráficos p/ séries homólogas
- Índices de retenção (Kovats, ECL)
- Técnicas auxiliares (EM, IR, RMN)

T_r = tempo de retenção

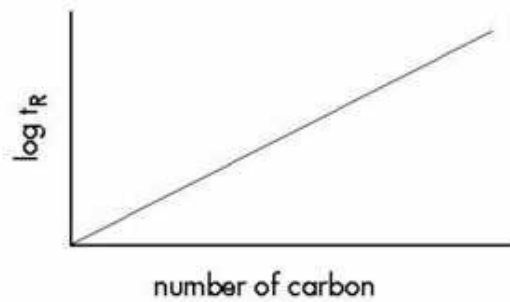
T_m = tempo morto- tempo que a FM leva para percorrer a coluna

T'_r = tempo de retenção corrigido = $T_r - T_m$

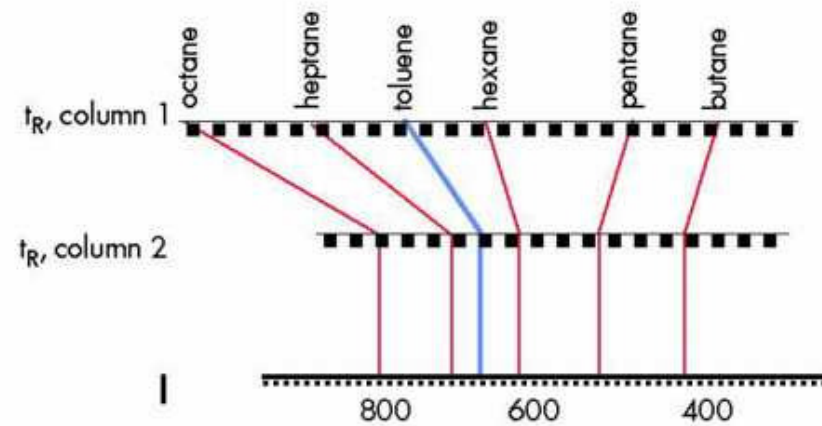


Kovats retention index

Method is based on results of homologous series
where $\log t_R \propto n$.

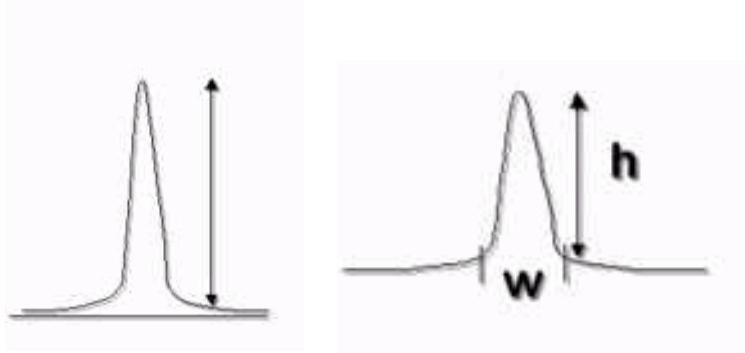


Kovats retention index



$$I_K = 100 I_p$$
$$= 100n_1 + 100(n_2 - n_1) \frac{\ln V_x - \ln V_{n_1}}{\ln V_{n_2} - \ln V_{n_1}}$$

Cromatografia a Gás: Análise quantitativa

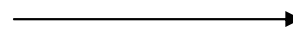


Method	Time, min	Precision, %
Planimeter	15	4.1
Triangulation	10	2.5 - 4
Cut & weigh	20	1.7
Int. Recorder	5	1.3
Integrator	N/A	0.44
Computer	N/A	0.44

Relação concentração

x

Área do pico



- Normalização
- Padrão interno
- Padrão externo
- Fator de resposta

Normalização:

- Todo componente produz um pico (f)
- A resposta do detector é dependente apenas da concentração (f)

$$\%C_i = \%Area_i = 100 \frac{Area_i}{Area_{total}}$$

Calibração externa

Solução contendo padrões de todas as substâncias a serem analisadas

Padrões em concentrações próximas à amostra

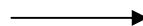
Condições analíticas devem ser as mesmas, inclusive o volume de injeção

$$conc_{unknown} = \frac{Area_{unknown}}{Area_{known}} \cdot conc_{known}$$

Fator de resposta do detector: determina a real resposta para uma determinada classe de substâncias

Fator de resposta= concentração/área

Para um padrão contendo a mesma concentração de três substâncias diferentes com áreas A1, A2 e A3



$$C_1 = f_1 A_1$$

$$C_2 = f_2 A_2$$

$$C_3 = f_3 A_3$$

$$C_1 = C_2 = C_3$$

$$f_1 A_1 = f_2 A_2 = f_3 A_3$$

$$\frac{f_1}{f_3} = \frac{A_3}{A_1} \quad \& \quad \frac{f_2}{f_3} = \frac{A_3}{A_2}$$

Se assumirmos um fator como 1,00 por ex. **f3 = 1,00**



$$f_1 = \frac{A_3}{A_1}$$

$$f_2 = \frac{A_3}{A_2}$$

Então, para uma amostra com estas três substâncias, a concentração de cada uma é calculada utilizando estes fatores:

$$A'_1 f_1 + A'_2 f_2 + A'_3 f_3 = \sum_{i=1}^n A'_i f_i$$

$$\%C_x = 100 \frac{A'_x f_x}{\sum A'_i f_i}$$

Exemplo .Uma amostra contém X, Y e Z.

O padrão contém 200 mg de cada em 100mL de solvente.

A injeção de 5uL resulta em:

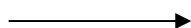
Component	Area
X	238
Y	660
Z	1190

Z é a referência

$$F_x = 1190/238 = 5,8$$

$$F_y = 1190/660 = 1,8$$

II. A análise da mostra-problema resulta em:



Component	Area
X	90
Y	265
Z	460

Multiplica-se cada pico por seu fator:

$$X = 90 \times 5,8 \quad Y = 265 \times 1,8 \quad e \quad Z = 460 \times 1 \rightarrow$$

$$\text{Área total} = 450 + 477 + 460 = 1387$$

Depois calcula-se a % de área

Z deve estar presente em todas as amostras

Esse método corrige a diferença de volume a cada injeção

Padronização interna

- Uma **substância conhecida** é adicionada em concentração definida em todos os padrões e nas amostras;
- Não co-elui com a amostra
- É estável e detectado na concentração em que se encontra

Etapas:

Faz-se uma curva de calibração baseada na relação entre as áreas e concentrações do PI e da substância de interesse

Contamina-se a amostra com um volume conhecido da solução estoque do padrão interno (PI)