


MÓDULO 02/2020

Análise Química:
Físico-Química

CROMATOGRAFIA

AULA 4:
HPLC
(Parte I)

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



1

HPLC - Definições

High Performance Liquid Chromatography

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Cromatografia Líquida de Alta Performance

Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

Cromatografia Líquida de Alta Pressão

2

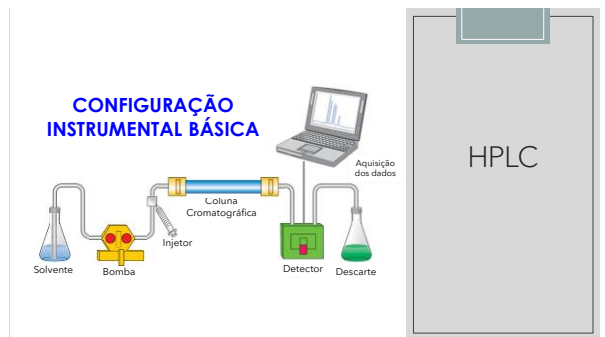
HPLC - Definições

É uma técnica cromatográfica que utiliza FE acomodada sob alta pressão em colunas metálicas;

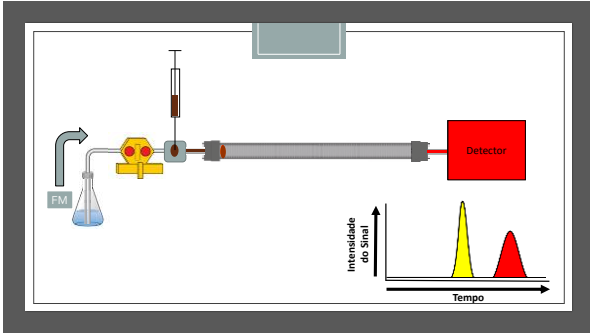
A FM líquida é pressurizada através da coluna contendo a FE, mediante auxílio de bombas de alta pressão;

É também conhecida como HPLC, ou de Alta Velocidade, ou de Alta Pressão ou de Alto Desempenho ou, ainda, de Alta Performance.

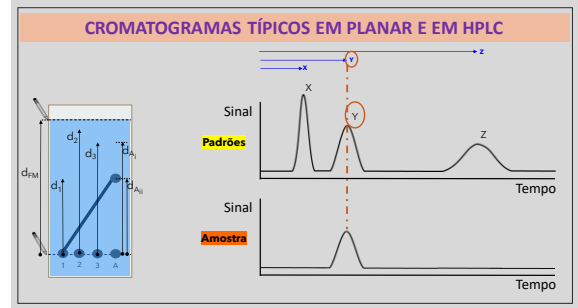
3



4



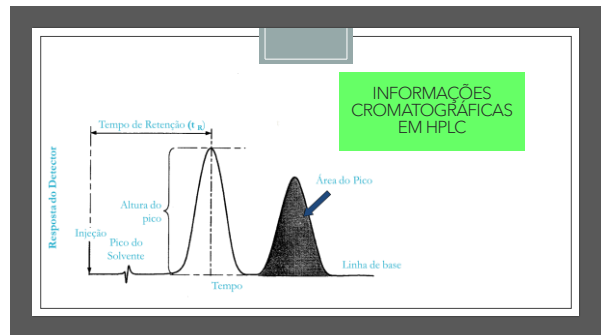
5



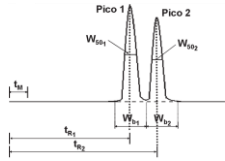
6



7



8



Tempo de Retenção Relativo

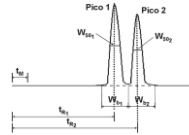
Pico 1: $t'_{R1} = t_{R1} - t_M$

Pico 2: $t'_{R2} = t_{R2} - t_M$

t_M : é o Tempo de Volume Morto, isto é, o tempo que as moléculas de uma substância leva pra sair do injetor e chegar até o detector sem ter interagido com a FE.

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRAFICA EM HPLC

9



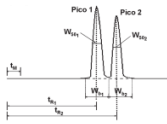
Pico 1: $k_1 = \frac{(t_{R1} - t_M)}{t_M} = \frac{t'_{R1}}{t_M}$

Pico 2: $k_2 = \frac{(t_{R2} - t_M)}{t_M} = \frac{t'_{R2}}{t_M}$

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRAFICA EM HPLC

• **Fator de retenção (k):** é a medida do tempo de retenção (t_R) de uma molécula, relativo ao tempo do volume morto (t_M) da coluna.

10

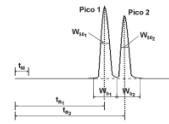


AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRAFICA EM HPLC

Seletividade (α): é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, calculada a partir da relação existente entre o tempo que os dois picos permanecem na FE.

$$\alpha = \frac{(t_{R2} - t_M)}{(t_{R1} - t_M)} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

11



AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRAFICA EM HPLC

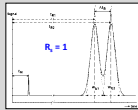
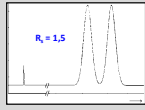
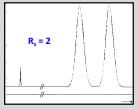
Resolução (R_s): assim como α, R_s é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases, ou das larguras na meia altura.

$$R_s = 2 \left[\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b2} + W_{b1})} \right] = 1,18 \left[\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{50,2} + W_{50,1})} \right]$$

12

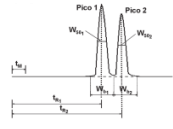
AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

• **Resolução (R_s):** assim como α , R_s é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases, ou das larguras na meia altura.

Quando $R_s = 1$, os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Maiores valores de R_s indicam melhor separação: $R_s = 1,25$ é suficiente para fins quantitativos, e $R_s > 1,5$ indica separação completa.

13



AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

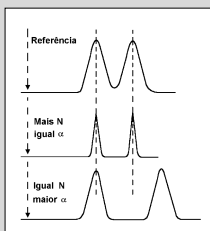
Eficiência (N): trata-se de uma medida de capacidade da condição cromatográfica em promover uma boa separação. É medida em termos de pratos gerados, sendo um prato equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases (FM e FE).

$$N = 16 \left(\frac{t'_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t'_R}{w_{50}} \right)^2$$

14

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

Efeito de N e α em R_s



15

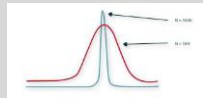
AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

A **eficiência (N)** é uma medida de capacidade da condição cromatográfica em promover uma boa separação.

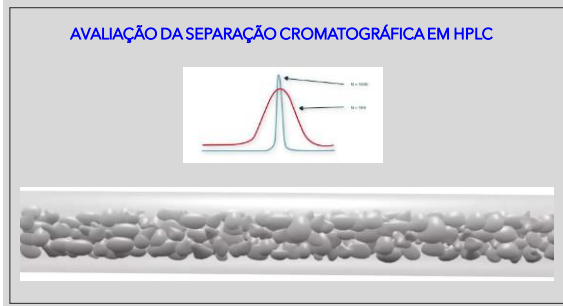
$$N = 16 \left(\frac{t'_R}{w_b} \right)^2$$

N medida em termos de número de equilíbrios que as substâncias atingem entre as duas fases (FM e FE) durante o procedimento analítico.

Logo, quanto maior o número de equilíbrios a partir de uma condição cromatográfica estabelecida, maior será **N** (picos com maiores tempos de retenção e mais estreitos).



16



17

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

Em cromatografia, Eficiência também é conhecida como Pratos Teóricos (número de equilíbrios). Portanto:

$$N = \text{Eficiência} = \text{Número de Pratos} = \text{Número de Equilíbrios}$$

O comprimento da coluna (L) necessário para a obtenção de um Prato Teórico é conhecido como **Altura Equivalente a um Prato Teórico (H)**. Portanto, quanto **menor** for essa grandeza, **mais eficiente** é a coluna.

Logo, colunas diferentes podem proporcionar **N** diferentes a depender do seu **L** e do seu **H** .

relação entre **N** , **H** e **L** pode ser dada pela equação: $H = \frac{L}{N}$ Quanto **maior N** , **menor** será **H** e **mais eficiente** será a **coluna**.

18

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

O comprimento da coluna (L) necessário para a obtenção de um Prato Teórico é conhecido como **Altura Equivalente a um Prato Teórico (H)**.

Logo, colunas diferentes podem proporcionar **N** diferentes a depender do seu **L** e do seu **H** .

$$H = \frac{L}{N}$$

As dimensões importantes das colunas cromatográficas são:

- Comprimento (L)
- Diâmetro interno (d_i)
- Diâmetro de partículas da FE (d_p)

Ex.: Coluna C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 μ m)

19

$$H = \frac{L}{N}$$

* Três fatores (**A**, **B** e **C**) determinam **H** em uma coluna cromatográfica, dentre os quais, dois (**B** e **C**) são influenciados pela vazão da FM (μ):

EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER $H = A + \left(\frac{B}{\mu}\right) + C\mu$

20

EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER

$$H = A + \left(\frac{B}{\mu}\right) + C\mu$$

21

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)

Refere-se aos diferentes caminhos percorridos pelo soluto dentro da coluna em função de irregularidades no empacotamento e na forma das partículas da FE, de modo que a velocidade da FM nos vários canais do fluxo diferem.

22

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)

23

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)

INÍCIO

DEPOIS

Fatores que influenciam no termo A:

- ✓ Tamanho das partículas, d_p
- ✓ Forma das partículas (regular ou irregular?)
- ✓ Qualidade do empacotamento
- ✓ Efeitos das paredes (material, rugosidade, diâmetro do tubo)

*O termo A é independente de μ ; não contribui para a forma da curva H- μ .

24

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)

*O termo A é independente de μ ; não contribui para a forma da curva $H-\mu$.

25

B: Difusão Logitudinal (FM)

Refere-se à difusão molecular do soluto na FM. Quanto maior a difusão maior o alargamento da banda do pico, logo, menos eficiente a coluna.

26

B: Difusão Logitudinal (FM)

Algumas moléculas se movimentam mais rapidamente que outras em relação a sua velocidade média, ocasionando alargamento do pico. Este efeito é mais pronunciado em fluxos (vazões) mais lentos.

Fatores que influenciam no termo B:

- ✓ Velocidade linear da fase móvel (VAZÃO)
- ✓ Coeficiente de difusão do analito na fase móvel
- ✓ Viscosidade da fase móvel
- ✓ Temperatura

O termo B tem relação inversa com μ .

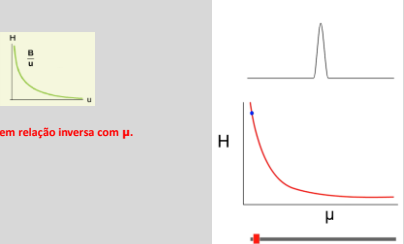
27

B: Difusão Logitudinal (FM)

O termo B tem relação inversa com μ .

28

B: Difusão Logitudinal (FM)




O termo B tem relação inversa com μ .

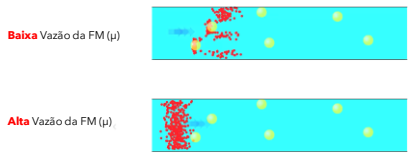
29

C: Resistência à Transferência de Massa (FM-FE)

O equilíbrio de transferência do soluto entre a FM e a FE não ocorre de forma **simultânea** (ao mesmo tempo) para **todas** as moléculas do soluto, de modo que enquanto há moléculas interagindo com a FE também haverá moléculas migrando com a FM, resultando numa diferença de velocidade de eluição entre as moléculas de uma mesma substância, o que, por sua vez, promoverá um alargamento da banca (pico) cromatográfico (menor eficiência).



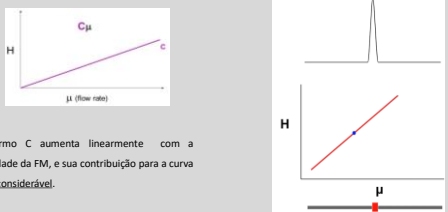
30



C: RESISTÊNCIA À TRANSFERÊNCIA DE MASSA (FM-FE)

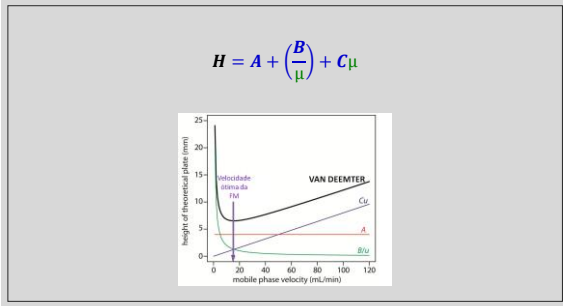
31

C: Resistência à Transferência de Massa (FM-FE)

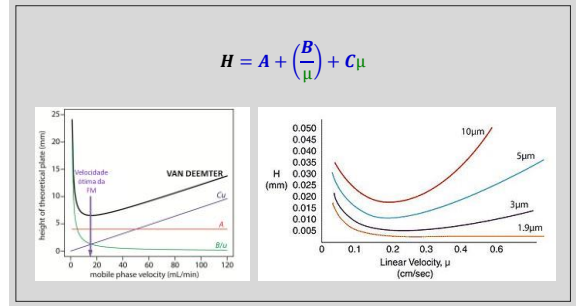


O termo C aumenta linearmente com a velocidade da FM, e sua contribuição para a curva H_{μ} é considerável.

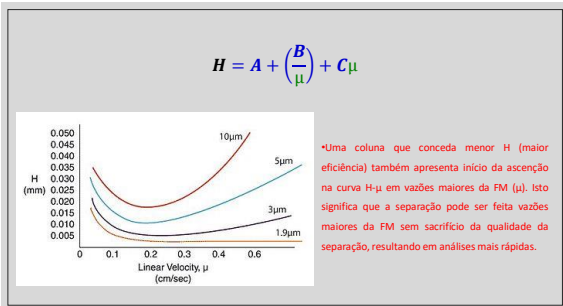
32



33



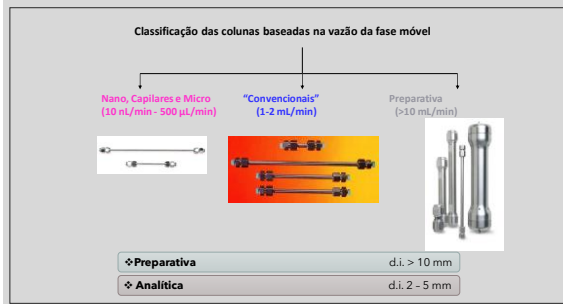
34





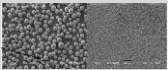
35



36



37

- Frequentemente emprega **materiais particulados**. 
- Partículas **esféricas** e de tamanho próximos (**regulares**).
- Frequentemente partículas **porosas** ou altamente porosas (área superficial próxima ou superior a 500 m² g⁻¹). 
- Partículas **pequenas** (CLAE → 3 a 10 µm) (CLUE → < 2 µm, não porosas).
- Partículas **fortemente compactadas** ("empacotadas") e de forma bastante **regular**, dentro das colunas. 

38