

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

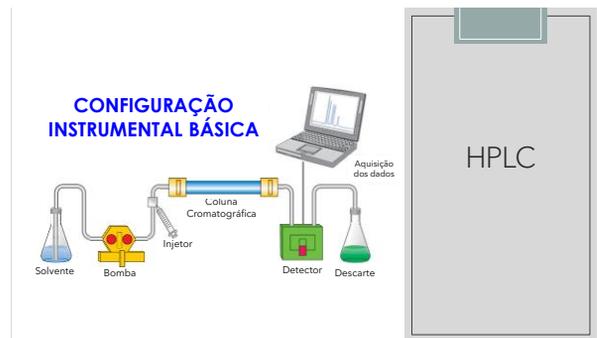
## HPLC - Definições

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

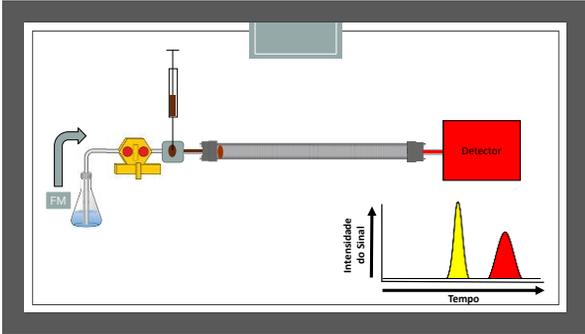
A FM líquida é pressurizada através da coluna contendo a FE, mediante auxílio de bombas de alta pressão;

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

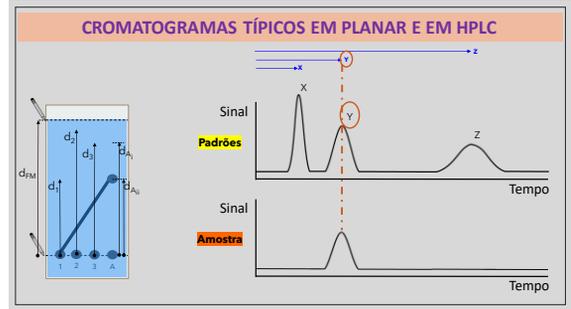
3



4



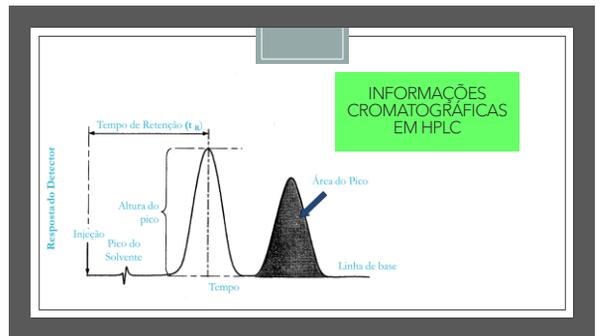
5



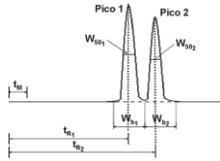
6



7



8



**Tempo de Retenção Relativo**

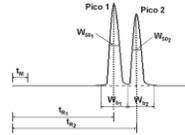
Pico 1:  $t'_{R1} = t_{R1} - t_M$

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



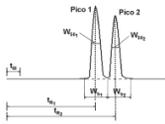
Pico 1:  $k_1 = \frac{(t_{R1} - t_M)}{t_M} = \frac{t'_{R1}}{t_M}$

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<sub>R</sub>) de uma molécula, relativo ao tempo do volume morto (t<sub>M</sub>) da coluna.

10

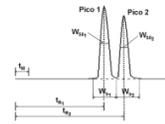


**AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRAFICA EM HPLC**

**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**

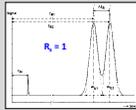
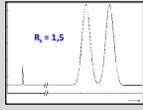
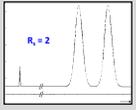
**Resolução (R<sub>s</sub>):** assim como α, R<sub>s</sub> é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases, ou das larguras na meia altura.

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

12

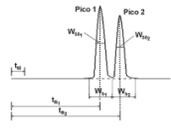
### AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

• **Resolução ( $R_s$ ):** assim como  $\alpha$ ,  $R_s$  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

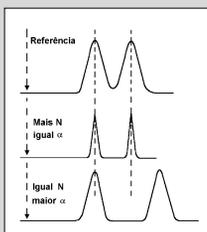
**Eficiência (N):** trata-se de uma medida de capacidade da condição cromatográfica em promover uma boa separação. É medida em termos de pratos gerados, sendo um prato equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases (FM e FE).

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

14

### AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

**Efeito de  $N$  e  $\alpha$  em  $R_s$**



15

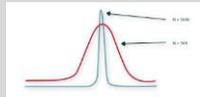
### AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

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

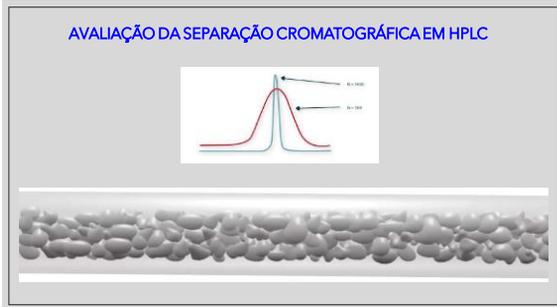
$$N = 16 \left( \frac{t'_R}{w_b} \right)^2$$

**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 C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 μm)

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 ( $\mu$ ):

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

20

**EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER**

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

Altura de Placa (H, μm)

Velocidade linear da FM (μ, mm/sm)

Optimum velocity

Minimum plate height

H

μ

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.

BANDA CROMATOGRÁFICA

INÍCIO

DEPOIS

FM

Time

22

**A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)**

1 2 3

1 2 3

Time

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)

H

u

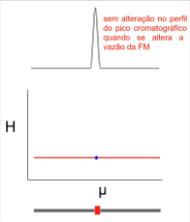
**\*O termo A é independente de  $\mu$ ; não contribui para a forma da curva H- $\mu$ .**

24

**A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)**



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

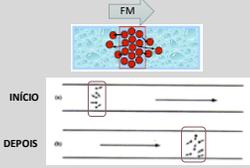


sem alteração no perfil do pico cromatográfico quando se altera a vazão da FM

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.



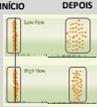
INICIO

DEPOIS

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.



INICIO

DEPOIS

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



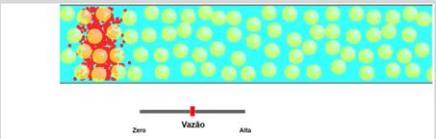
O termo B tem relação inversa com  $\mu$ .

27

**B: Difusão Logitudinal (FM)**



O termo B tem relação inversa com  $\mu$ .



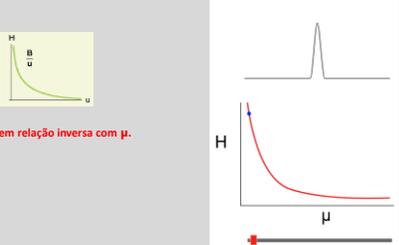
Zona

Vazão

Zona

28

**B: Difusão Logitudinal (FM)**



O termo B tem relação inversa com  $\mu$ .

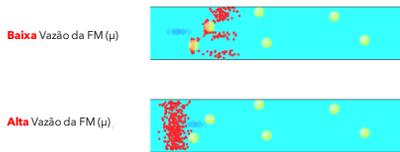
29

**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 uma **alargamento da banca (pico) cromatográfico (menor eficiência)**.



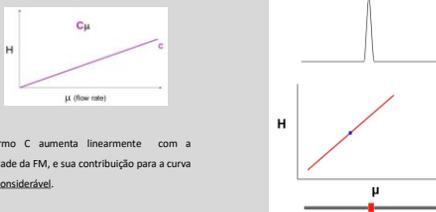
30



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

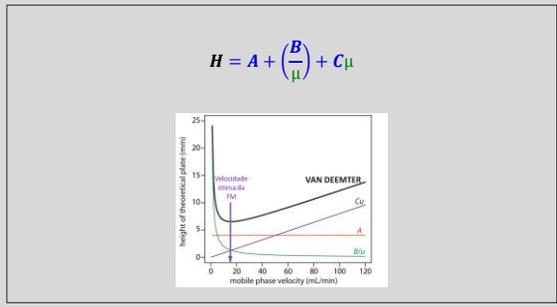
31

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

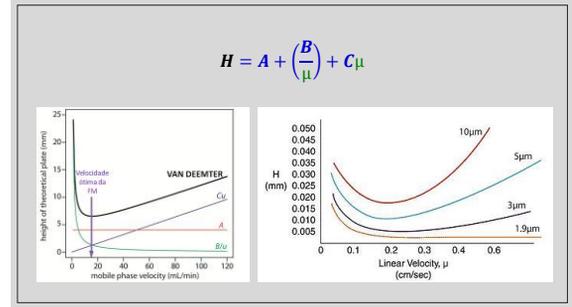


O termo C aumenta linearmente com a velocidade da FM, e sua contribuição para a curva  $H_{\mu}$  é considerável.

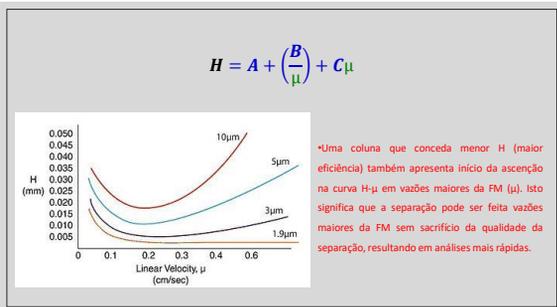
32



33



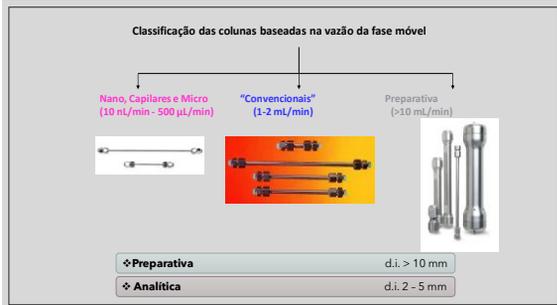
34



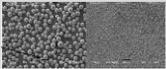
35



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 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). 
- 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