


MÓDULO 02/2021

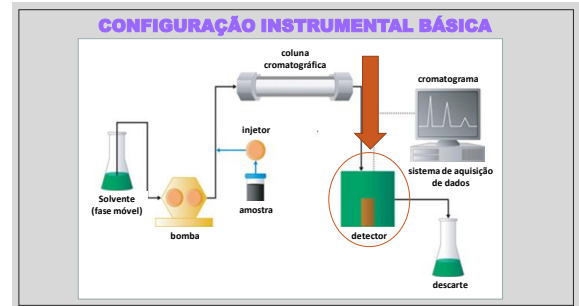
Análise Química I:  
Físico-Química

CROMATOGRAFIA  
AULA 6:  
HPLC  
(Parte II)

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



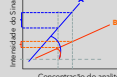
1



2

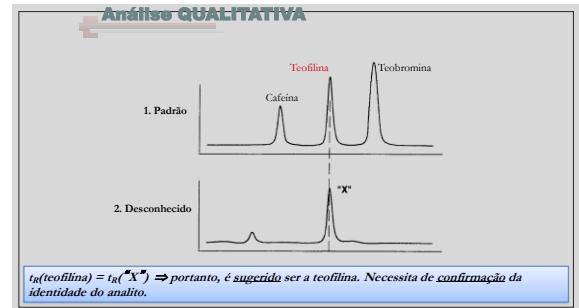
**Características desejáveis para o detector**

- Alta **Detectabilidade** (baixo Limite de Detecção) e alta **Sensibilidade** (alta capacidade de distinguir concentrações diferentes = coeficiente angular da curva analítica).



- Alta **Estabilidade** do Sinal: resistente à mudanças de temperatura e na FE (eluição por gradiente)
- Resposta **Linear**: sinal variando linearmente com a alteração na concentração do analito
- Não contribuir para o alargamento do pico (volume da cela do detector)
- Seletividade** adequada: contribuir com informação qualitativa adicional ao da análise cromatográfica ( $t_R$ ); habilidade de distinguir analitos que eventualmente venham a ter o mesmo  $t_R$  (coeluição de analitos).
- Alta **Reprodutibilidade** (Precisão; Confiabilidade).

3



4

## CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS DETECTORES

- ❖ **UNIVERSAIS:** geral sinal para qualquer substância eluída
- ❖ **SELETIVOS:** detectam apenas substâncias com determinada propriedade físico-química
- ❖ **ESPECÍFICOS:** detectam substâncias que possuam determinado elemento ou grupo funcional em suas estruturas químicas

5

## ALGUNS DOS DETECTORES MAIS EMPREGADOS EM ASSOCIAÇÃO AO HPLC

- Absorção UV-Vis:
  - ✓ Fotométrico:  $\lambda$  fixo
  - ✓ Espectrofotômetro:  $\lambda$  variável
  - ✓ Espectrofotômetro por arranjo de diodos: espectro instantâneo
- Índice de Refração
- Fluorescência
- Espalhamento de luz
- Eletroquímico
- Dicroísmo Circular
- Espectrometria de Massas

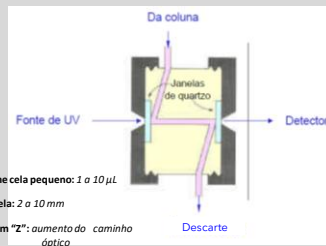
6

## ABSORBÂNCIA UV-VIS

- Baseiam-se na absorbância da luz pelo analito ao passar pelo detector.
- É um detector seletivo pois só detecta os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detector for ajustado.
- É o detector mais utilizado em HPLC pois grande maioria das substâncias absorvem radiação. Exemplos de substâncias são: olefinas, aromáticos, compostos contendo ligações C=O, C=S, N=O.
- **CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES:**
  - ✓ A FM utilizada não pode absorver no comprimento de onda selecionado
  - ✓ A pureza da FM é extremamente importante

7

## ABSORBÂNCIA UV-VIS

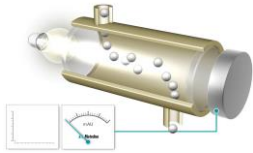


> Volume cela pequeno: 1 a 10  $\mu$ L

> L da cela: 2 a 10 mm

> Cela em "Z": aumento do caminho óptico

8



ABSORBÂNCIA UV-VIS

9

**ABSORBÂNCIA UV-VIS**

**TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:**

- ✓ Espectrofotométricos – monocromadores
  - ☐ Comprimento de onda é variável entre 190nm e 800nm selecionado através do monocromador (UV = lâmpada de deutério e VIS = lâmpada de tungstênio).

10



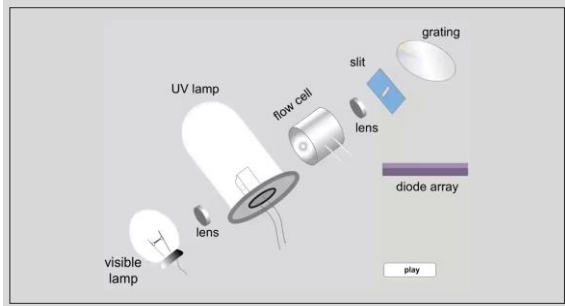
11

**ABSORBÂNCIA UV-VIS**

**TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:**

- ✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos
  - ☐ Detector UV mais útil para HPLC: pode-se varrer o espectro inteiro e escolher o melhor valor de  $\lambda$  para um analito em questão.

12



13

### ABSORBÂNCIA UV-VIS

**TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:**  
 ✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos  
 Informações obtidas com um detector com arranjo de diodos

14

### ABSORBÂNCIA UV-VIS

**TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:**  
 ✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos  
 Determinação da pureza de pico utilizando detector com arranjo de diodos

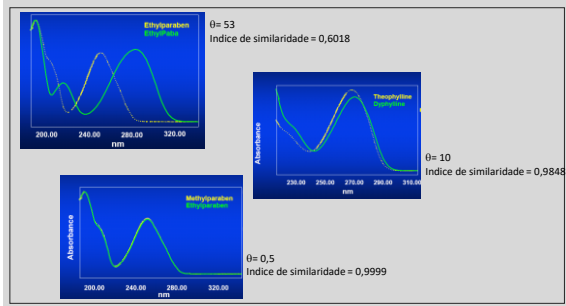
nm	Abs	nm	Abs	nm	Abs	nm	Abs
208	0.98	209	0.93	210	0.91	211	0.89
211	0.81	211	0.91	211	0.81	211	0.81
212	0.80	212	0.80	212	0.80	212	0.80
213	0.80	213	0.80	213	0.80	213	0.80

15

### Detector por arranjo de diodos

$A \text{ diferente de } B \rightarrow \theta = 90$   
 $A \text{ igual a } B \rightarrow \theta = 0$

16



17

### ABSORBÂNCIA UV-Vis

**•VANTAGENS:**

- ✓ Fácil de operar, baixo custo, grande faixa linear.
- ✓ Determinação da pureza do pico (somente com DAD).

**•LIMITAÇÕES:**

- ✓ Sensibilidade média a baixa (dependente da estrutura do analito).
- ✓ Seletividade moderada (interferências de compostos presentes na matriz é frequente).

18

### FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

- **Princípio:** Excitação com radiação eletromagnética (luz) produz emissão fluorescente (absorve luz em  $\lambda$  menores e reemite em  $\lambda$  maiores)
- **Seletividade:** Seletivo para moléculas que fluorescem, ou seja, sistemas aromáticos policíclicos ou que contenham duplas ligações conjugadas múltiplas
- **Sensibilidade:** cerca de 10 a 1000 vezes maior que detector UV para compostos que absorvam fortemente no UV

19

### FLUORESCÊNCIA

**• PRINCÍPIO:** luz de comprimento de onda adequado passa através da cela de amostra, que é excitada por ela. No retorno ao estado fundamental, a molécula excitada emite luz de comprimento de onda maior, a qual é detectado a um ângulo reto da radiação incidente.

20

## FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

### VANTAGENS:

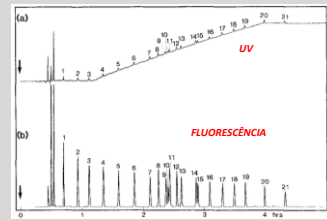
- ✓ Fácil de operar, médio custo e grande faixa linear.
- ✓ Maior sensibilidade e seletividade comparado ao UV-Vis. Para compostos altamente fluorescentes, sensibilidade superior a qualquer outra técnica.

### LIMITAÇÕES:

- ✓ Aplicável apenas a compostos que fluorescem: restrito a compostos farmacêuticos, petróleo, etc.
- ✓ Seletividade regular.
- ✓ Não fornece informações a respeito da identidade do analito (apenas  $t_R$  é obtido).

21

Detector de fluorescência: alta sensibilidade, menor razão S/N



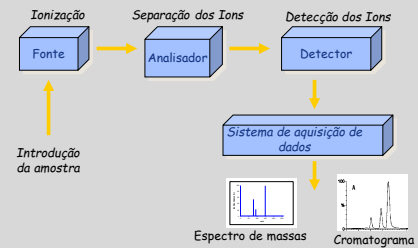
22

## ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

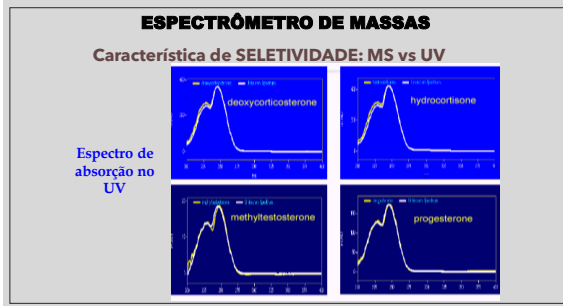
- MS é um detector universal para HPLC
- Alta sensibilidade
  - ✓ baixos limites de detecção
- Confirmação da presença do analito
  - ✓ massa molar e informação estrutural
- Alta seletividade
  - ✓ possibilidade de análise de compostos com picos sobrepostos (SIM)
- Pureza dos picos
- Potencial para análise de compostos não voláteis e termolábeis

23

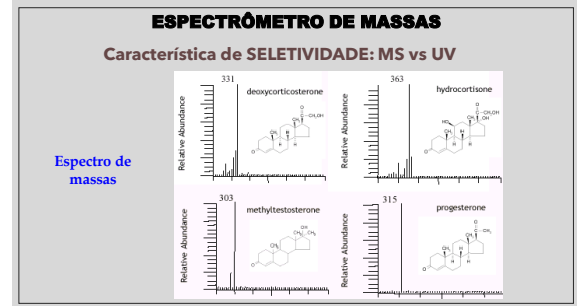
## ESPECTRÔMETRO DE MASSAS



24



25



26