

MÓDULO CGF2036

Análise Química I:
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

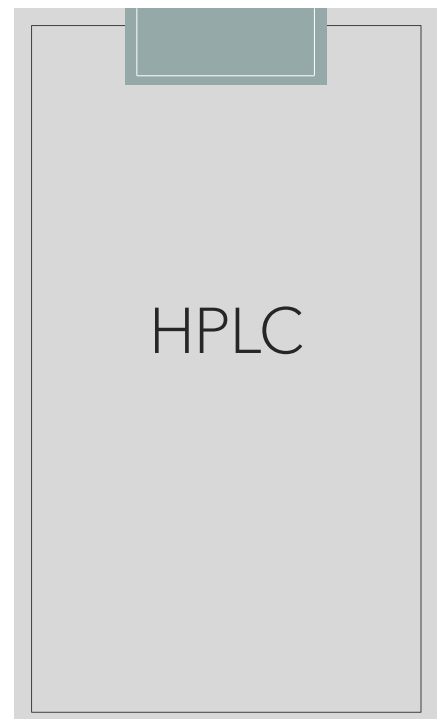
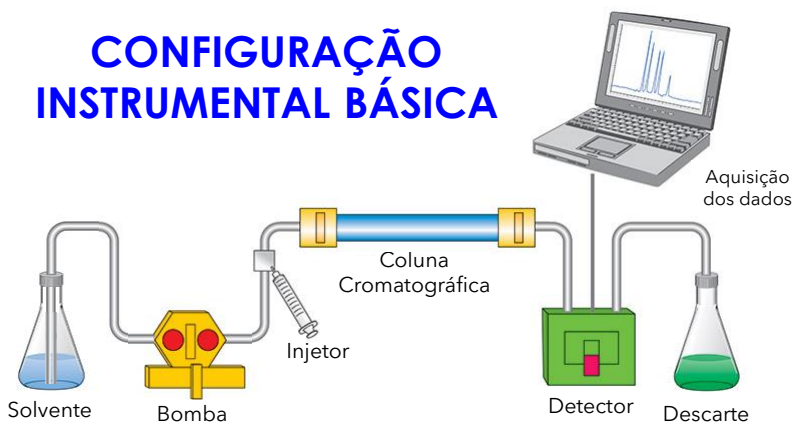
É uma técnica cromatográfica que utiliza FE acomodada sob alta pressão em colunas metálicas;

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

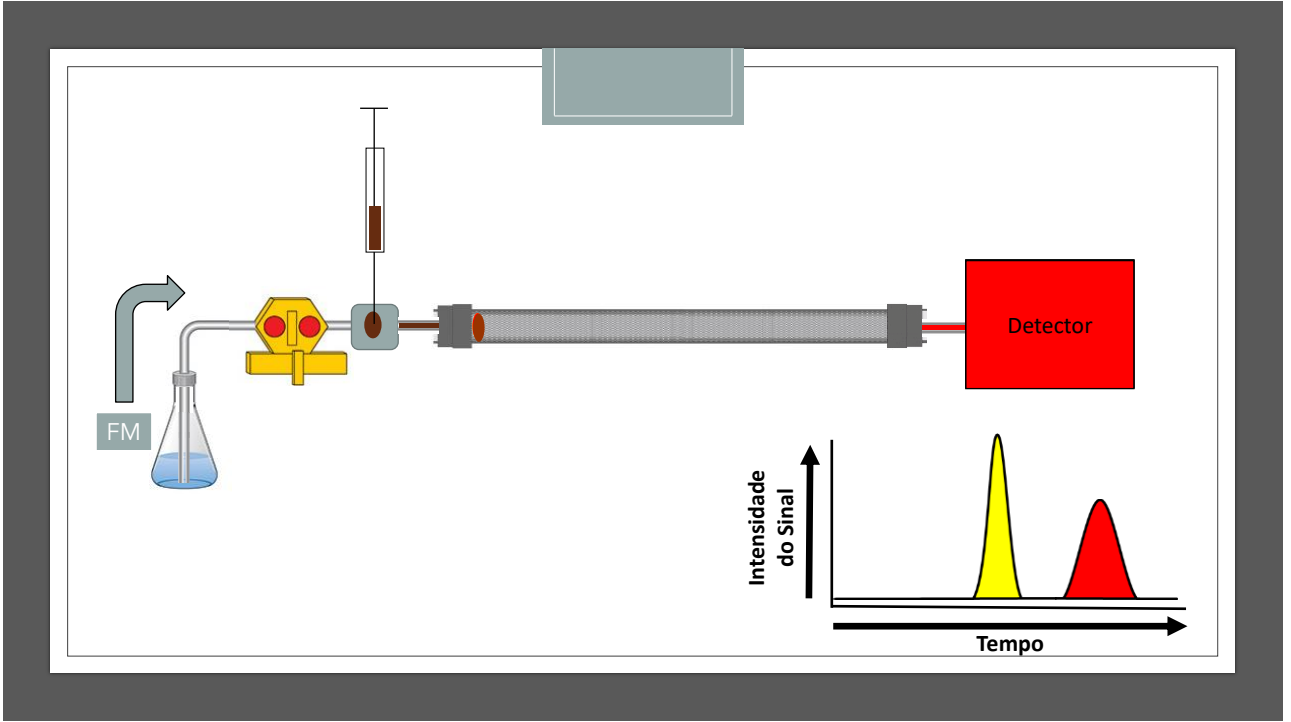
É também conhecida como HPLC, ou de Alta Velocidade, ou de Alta Pressão ou de Alto Desempenho ou, ainda, de Alta Performance.

3

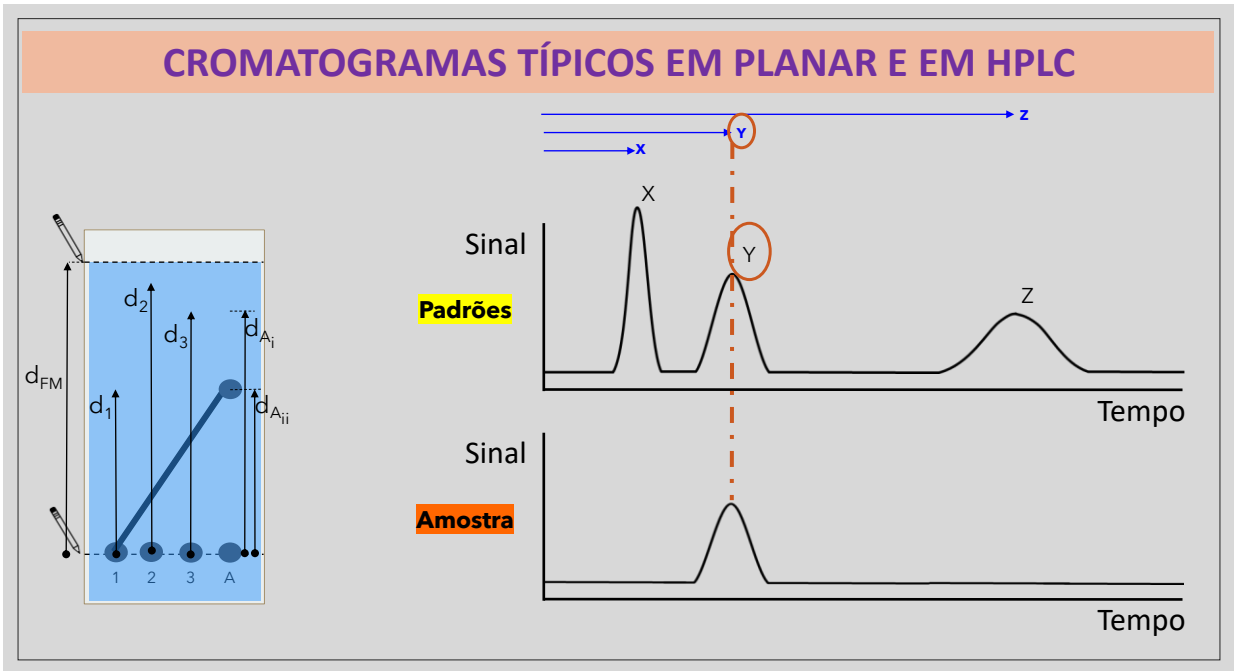
CONFIGURAÇÃO INSTRUMENTAL BÁSICA



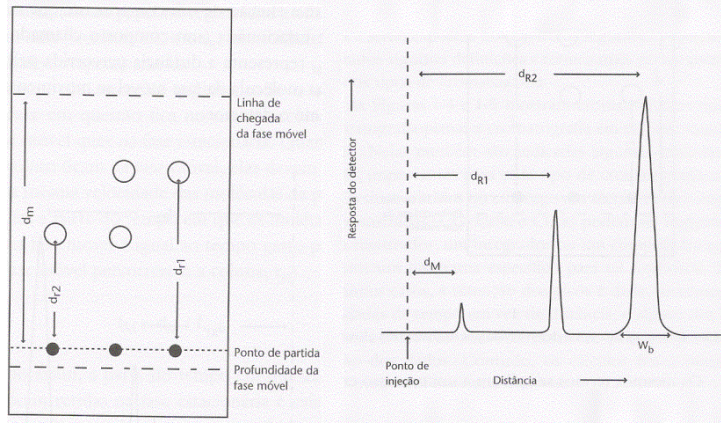
4



5

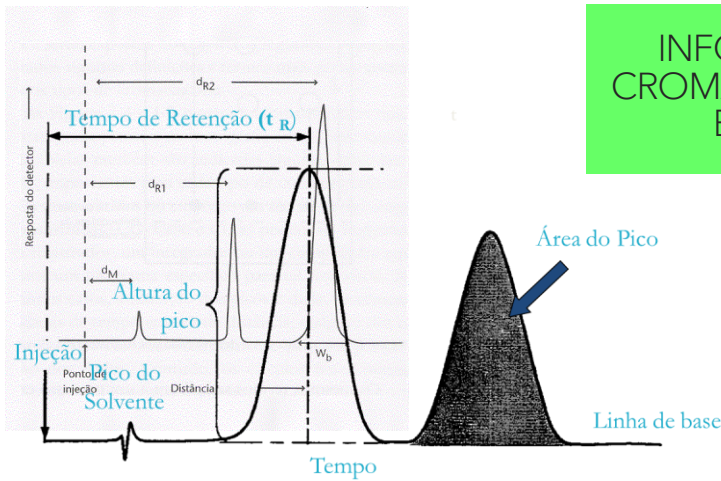


6



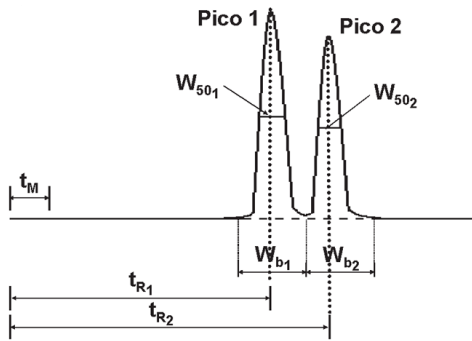
CROMATOGRAMAS TÍPICOS EM PLANAR E EM HPLC

7



INFORMAÇÕES CROMATOGRÁFICAS EM HPLC

8



Tempo de Retenção Relativo

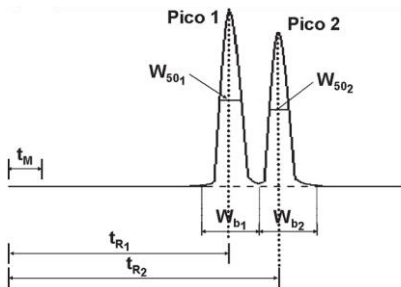
$$\text{Pico 1: } t'_{R1} = t_{R1} - t_M$$

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

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



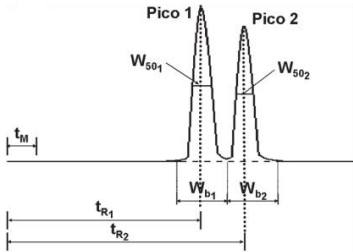
AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRAFICA EM HPLC

◦ **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.

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

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

10

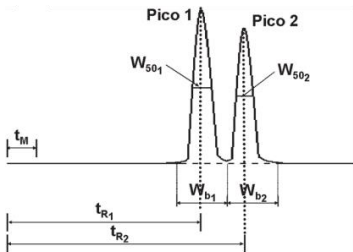


$$\alpha = \frac{(t_{R2} - t_M)}{(t_{R1} - t_M)} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA 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.

11



$$R_s = 2 \left[\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} \right] = 1,18 \left[\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{502} + w_{501})} \right]$$

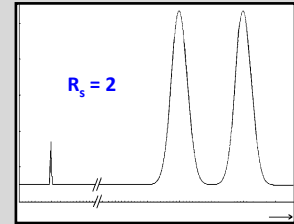
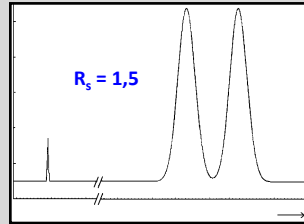
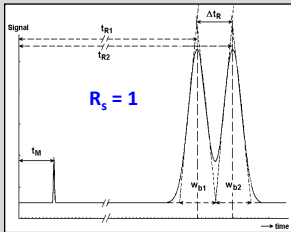
AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

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.

12

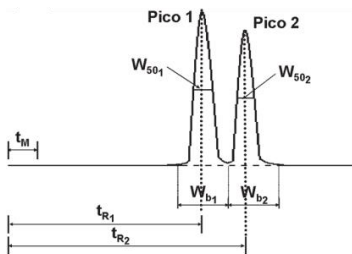
AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

- **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



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

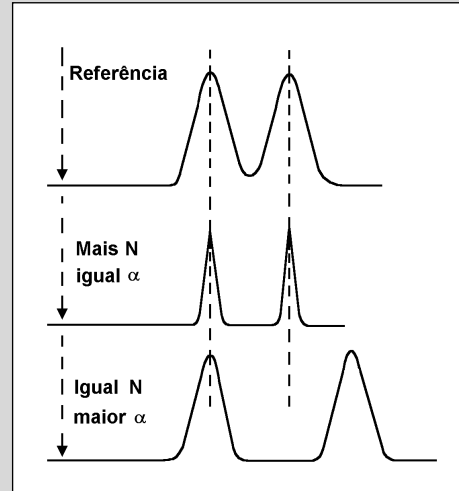
AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

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).

14

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

Efeito de N e α em R_s

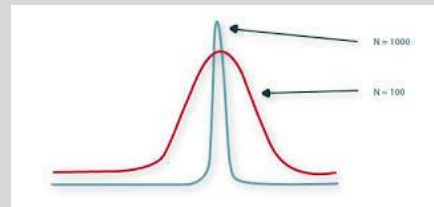


15

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC

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

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

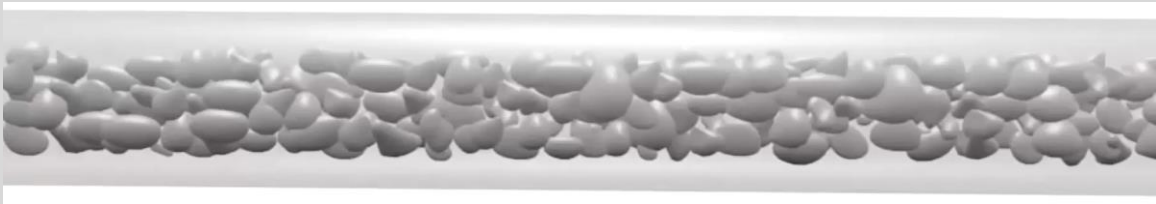
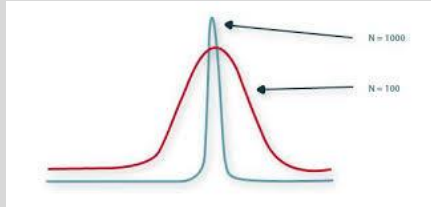


N medida em termos de número de equilíbrios que as substâncias atingem entre as duas fases (FM e FE) durante o procedimento analítico.

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

AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM HPLC



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)**.

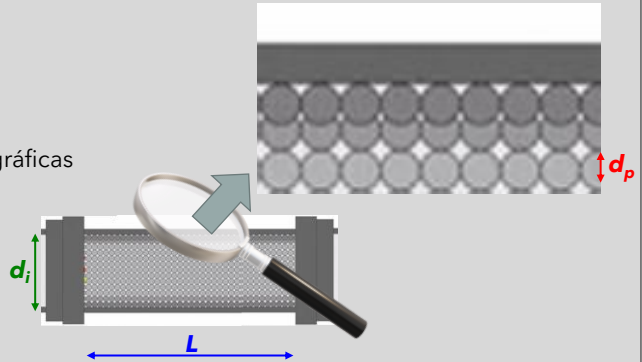
Logo, colunas diferentes podem proporcionar N diferentes a depender do seu L e do seu H .

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

As dimensões importantes das colunas cromatográficas são:

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

Ex.: Coluna C_{18} (**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 (μ):

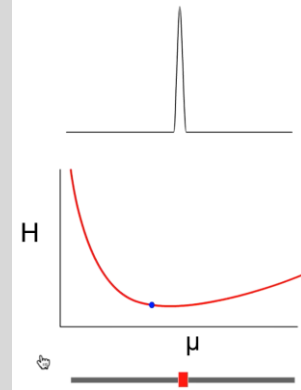
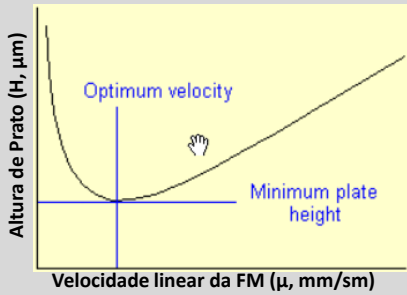
EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER

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

20

EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER

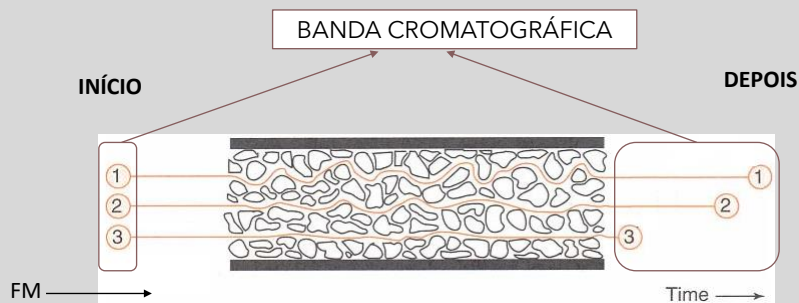
$$H = A + \left(\frac{B}{\mu}\right) + C\mu$$



21

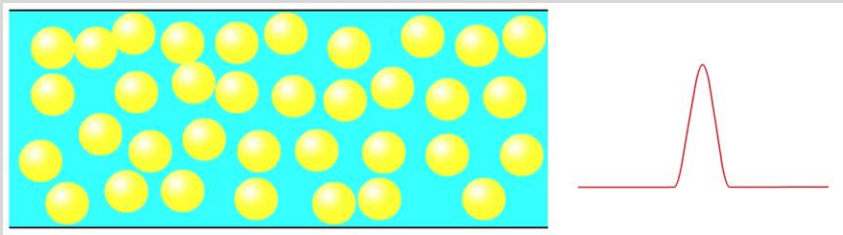
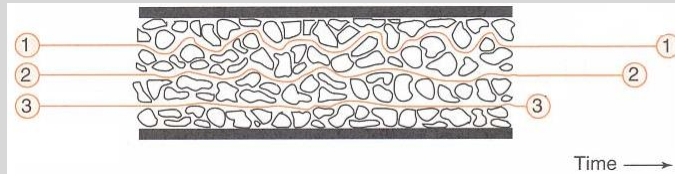
A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)

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.



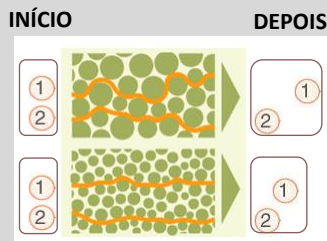
22

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)



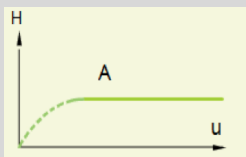
23

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)



Fatores que influenciam no termo A:

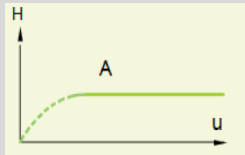
- ✓ Tamanho das partículas, d_p
- ✓ Forma das partículas (regular ou irregular?)
- ✓ Qualidade do empacotamento
- ✓ Efeitos das paredes (material, rugosidade, diâmetro do tubo)



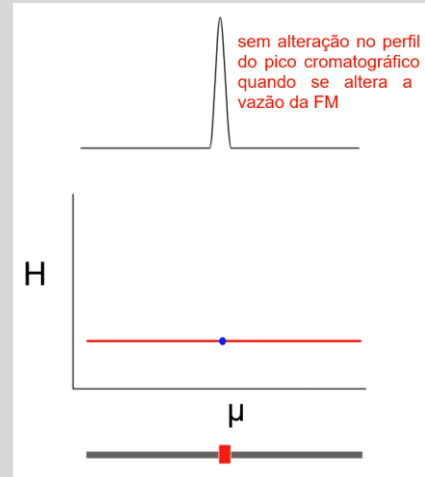
*O termo A é independente de μ ; não contribui para a forma da curva H- μ

24

A: Caminhos Preferenciais (Difusão de Eddy)



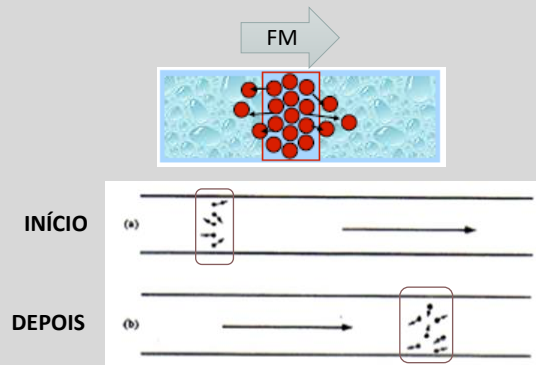
*O termo A é independente de μ ; não contribui para a forma da curva H - μ .



25

B: Difusão Logitudinal (FM)

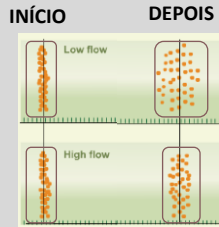
Refere-se à difusão molecular do soluto na FM. Quanto maior a difusão maior o alargamento da banda do pico, logo, menos eficiente a coluna.



26

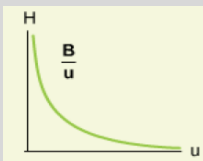
B: Difusão Logitudinal (FM)

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:

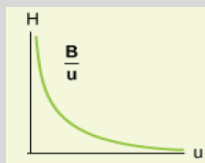
- ✓ Velocidade linear da fase móvel (VAZÃO)
- ✓ Coeficiente de difusão do analito na fase móvel
- ✓ Viscosidade da fase móvel
- ✓ Temperatura



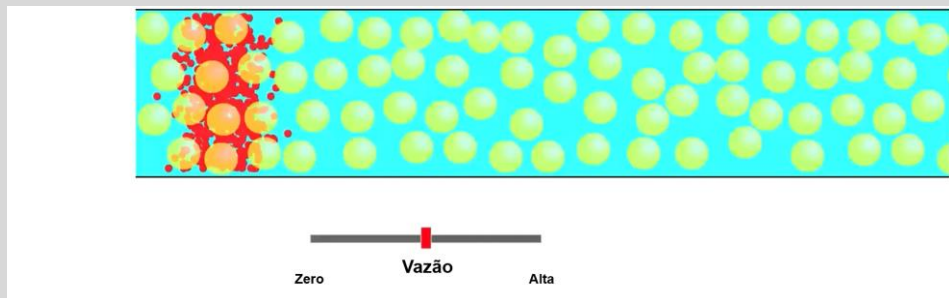
O termo B tem relação inversa com μ .

27

B: Difusão Logitudinal (FM)

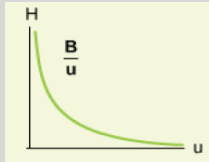


O termo B tem relação inversa com μ .

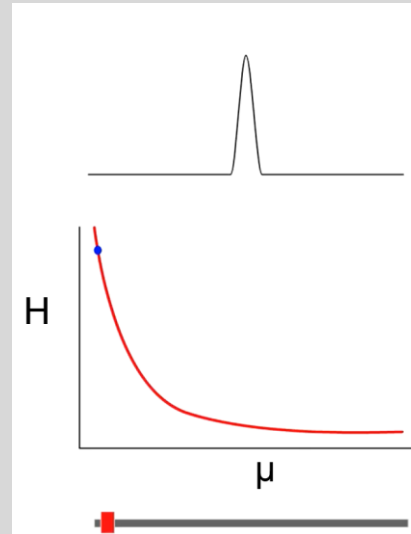


28

B: Difusão Logitudinal (FM)



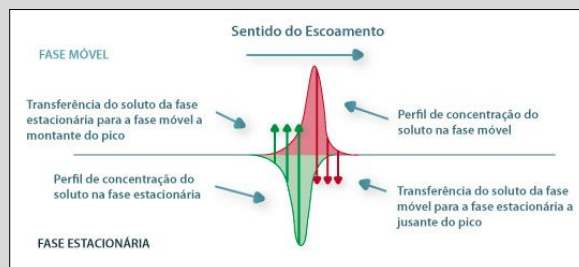
O termo B tem relação inversa com μ .



29

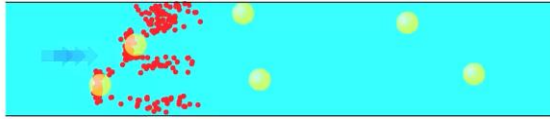
C: Resistência à Transferência de Massa (FM-FE)

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

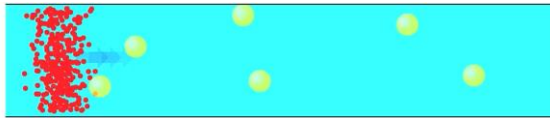


30

Baixa Vazão da FM (μ)



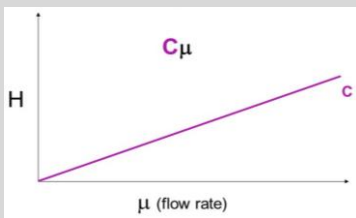
Alta Vazão da FM (μ)



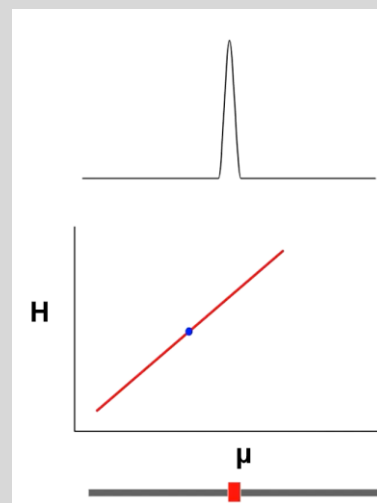
C: RESISTÊNCIA À TRANSFERÊNCIA DE MASSA (FM-FE)

31

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

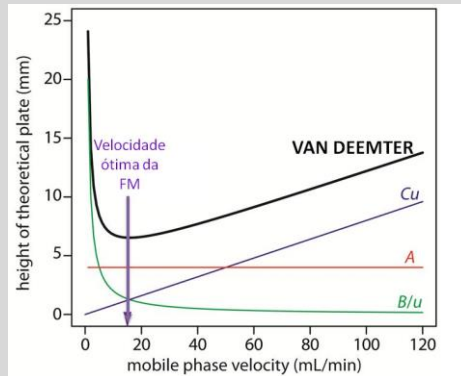


- O termo C aumenta linearmente com a velocidade da FM, e sua contribuição para a curva H- μ é considerável.



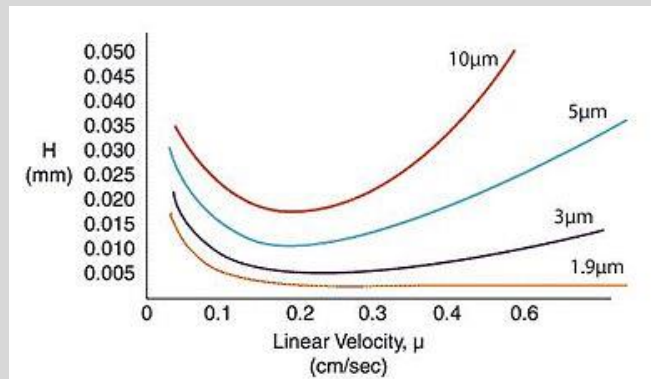
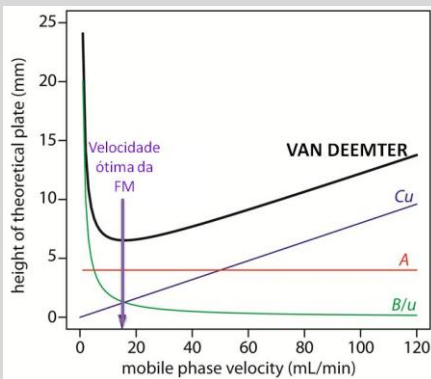
32

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



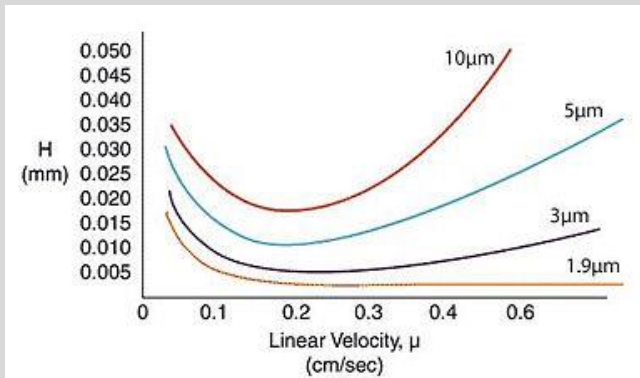
33

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



34

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



•Uma coluna que conceda menor H (maior eficiência) também apresenta início da ascensão na curva H-μ em vazões maiores da FM (μ). Isto significa que a separação pode ser feita vazões maiores da FM sem sacrifício da qualidade da separação, resultando em análises mais rápidas.

35

HPLC

COLUNAS
CROMATOGRÁFICAS

36

Classificação das colunas baseadas na vazão da fase móvel

Nano, Capilares e Micro
(10 nL/min - 500 μ L/min)



“Convencionais”
(1-2 mL/min)



Preparativa
(>10 mL/min)



❖ Preparativa

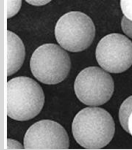
d.i. > 10 mm

❖ Analítica

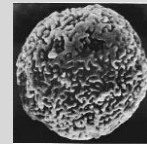
d.i. 2 - 5 mm

37

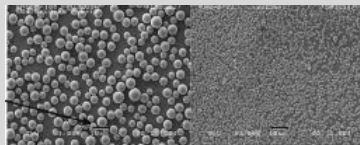
- Frequentemente emprega **materiais particulados**.



- 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 μ m) (CLUE → < 2 μ m, não porosas).
- Partículas **fortemente compactadas** (“empacotadas”) e **de forma bastante regular**, dentro das colunas.



38