

MÓDULO CGF2036

Análise Química I:
Físico-Química

CROMATOGRAFIA

AULA 6:

HPLC

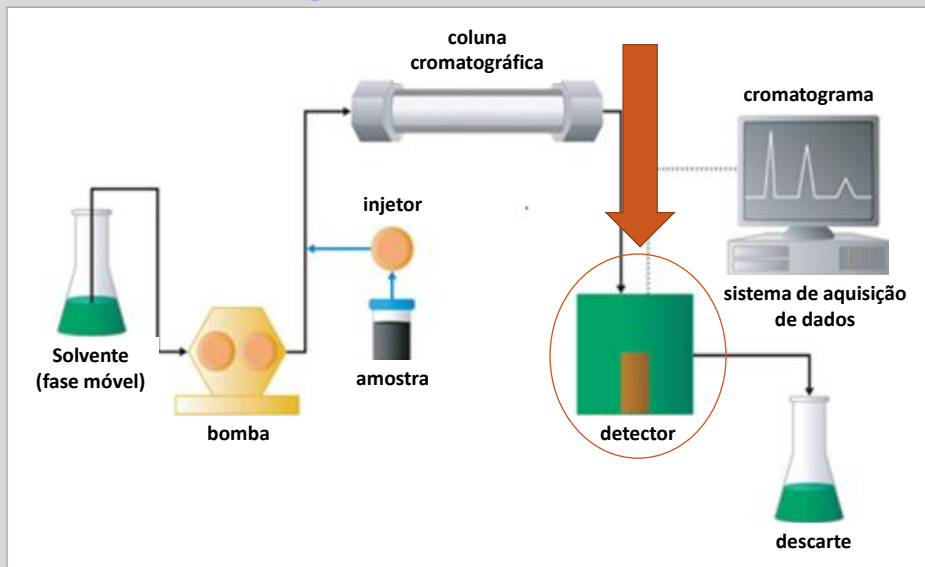
(Parte III)

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



1

CONFIGURAÇÃO INSTRUMENTAL BÁSICA



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)

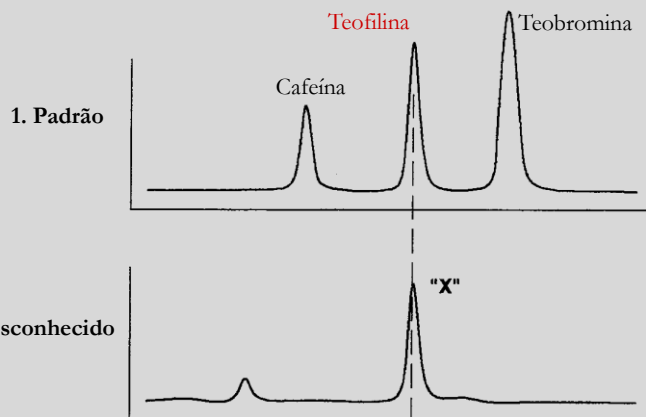
•**Seletividade** adequada: contribuir com informação qualitativa adicional ao da análise cromatográfica (t_R);

habilidade de distinguir analitos que eventualmente venham a ter o mesmo t_R (coeluição de analitos).

•Alta **Reprodutibilidade** (**Precisão**; Confiabilidade).

3

Análise QUALITATIVA



$t_R(\text{teofilina}) = t_R(\text{"X"}) \Rightarrow$ portanto, é sugerido ser a teofilina. Necessita de confirmação da identidade do analito.

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: λ fixo
 - ✓ Espectrofotômetro: λ 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

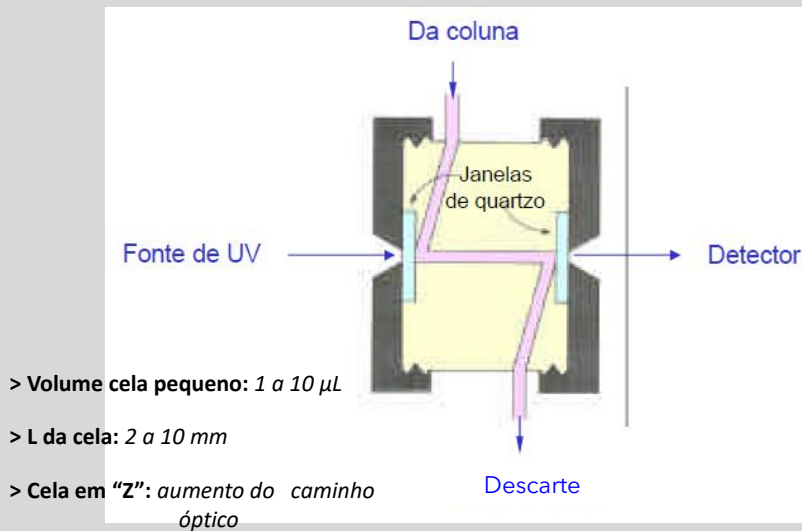
- Baseiam-se na absorvência da luz pelo analito ao passar pelo detector.
- É um detector seletivo pois só detecta os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detector for ajustado.
- É o detector mais utilizado em HPLC pois grande maioria das substâncias absorvem radiação. Exemplos de substâncias são: olefinas, aromáticos, compostos contendo ligações C=O, C=S, N=O.

•CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES:

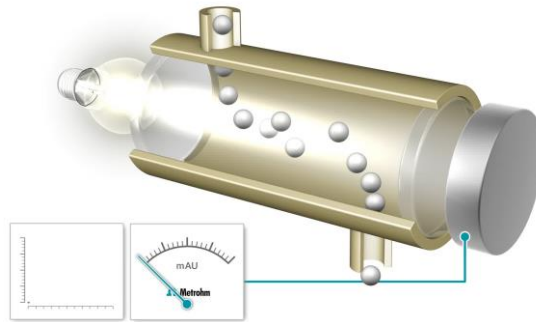
- ✓A FM utilizada não pode absorver no comprimento de onda selecionado
- ✓A pureza da FM é extremamente importante

7

ABSORBÂNCIA UV-Vis



8



ABSORBÂNCIA UV-VIS

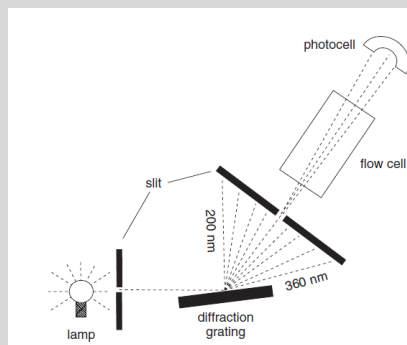
9

ABSORBÂNCIA UV-Vis

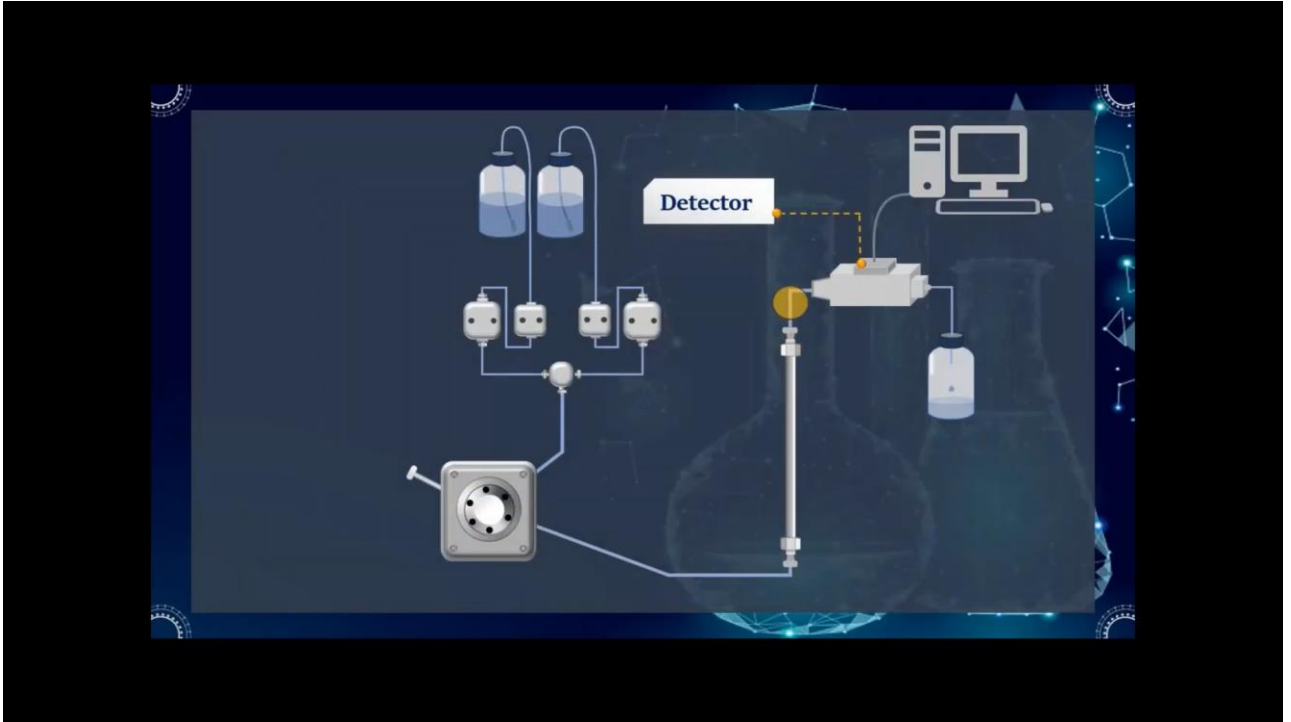
•TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

✓ Espectrofotométricos – monocromadores

☐ O comprimento de onda é variável entre 190nm e 800nm selecionado através do monocromador (UV = lâmpada de deutério e VIS = lâmpada de tungstênio).



10



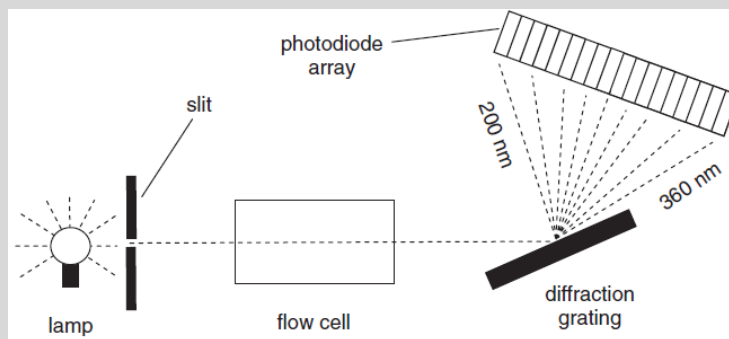
11

ABSORBÂNCIA UV-Vis

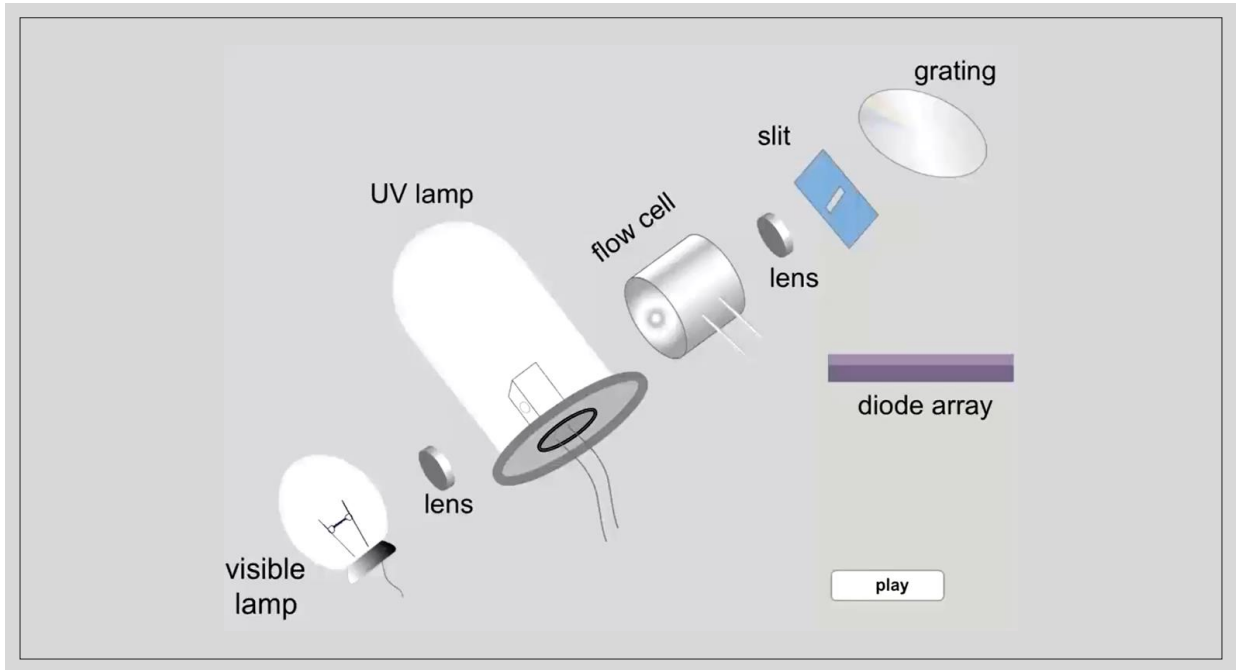
•TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos

☐ Detector UV mais útil para HPLC: pode-se varrer o espectro inteiro e escolher o melhor valor de λ para um analito em questão.



12



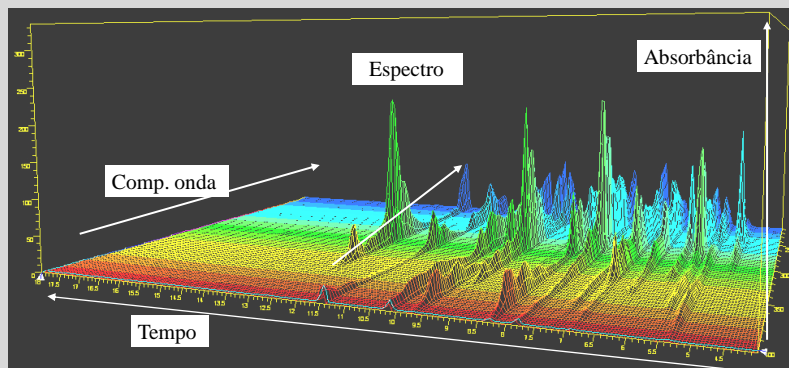
13

ABSORBÂNCIA UV-Vis

•TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

- ✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos

Informações obtidas com um detector com arranjo de diodos



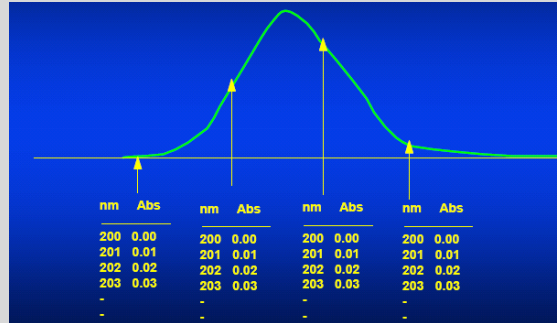
14

ABSORBÂNCIA UV-Vis

•TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

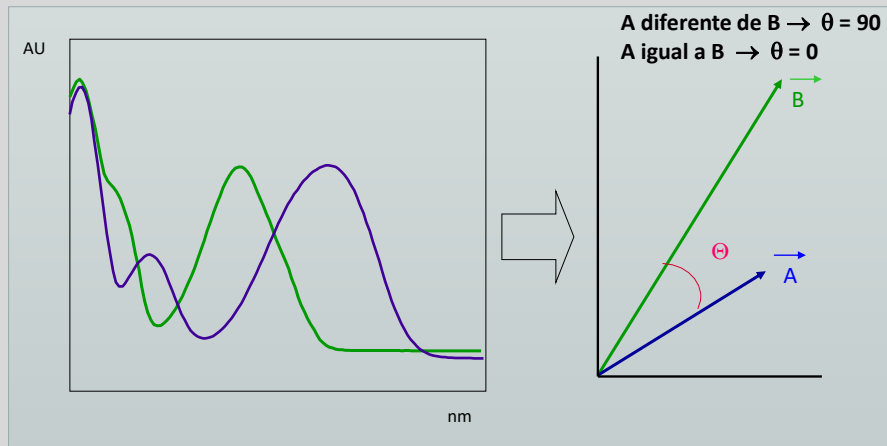
✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos

Determinação da pureza de pico utilizando detector com arranjo de diodos

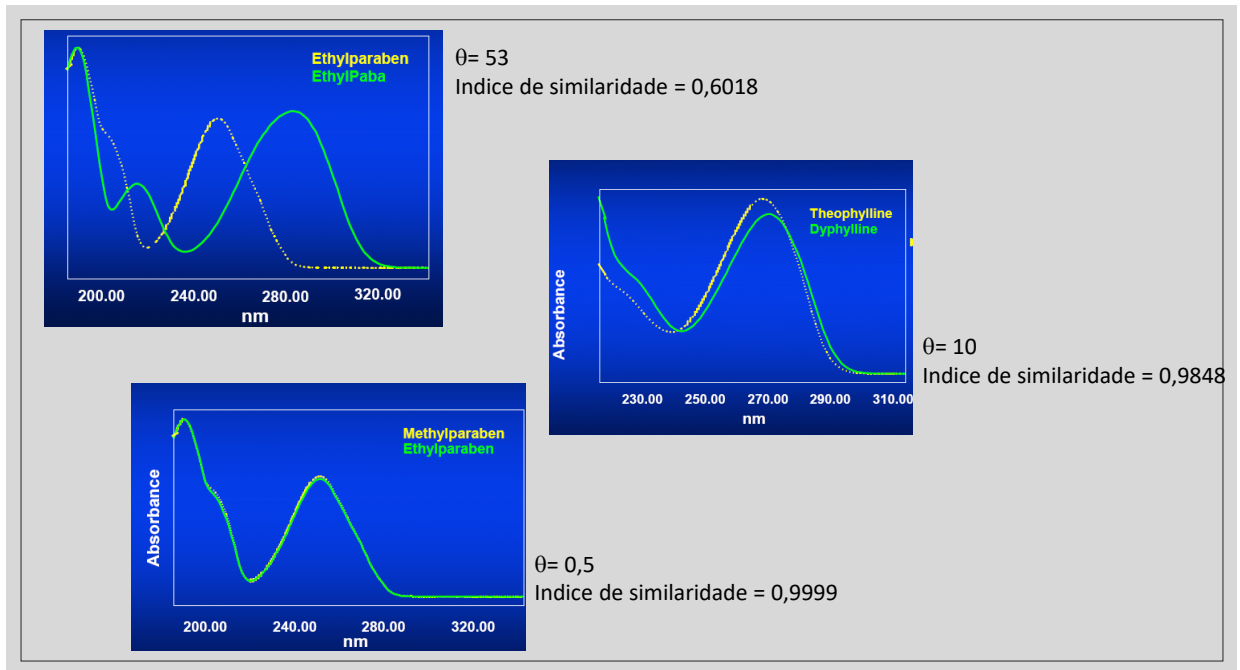


15

Detector por arranjo de diodos



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

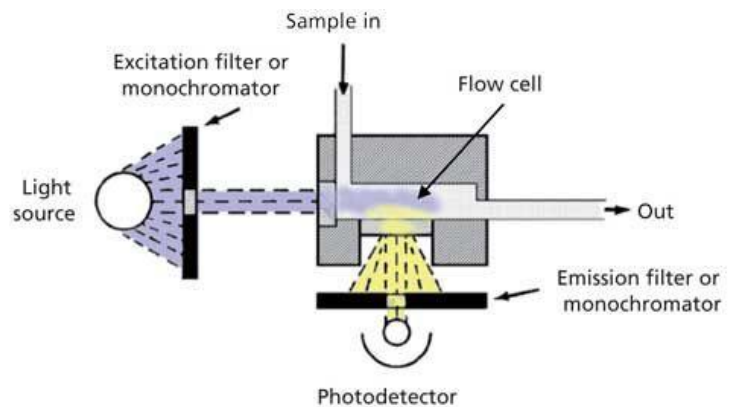
FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

- Princípio:** Excitação com radiação eletromagnética (luz) produz emissão fluorescente (absorve luz em λ menores e reemite em λ 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, o qual é detectado a um ângulo reto da radiação incidente.



20

FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

•VANTAGENS:

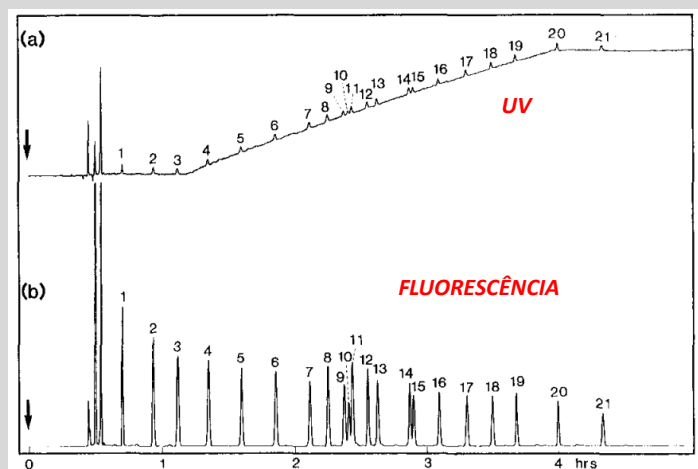
- ✓ Fácil de operar , médio custo e grande faixa linear.
- ✓ Maior sensibilidade e seletividade comparado ao UV-Vis. Para compostos altamente fluorescentes, sensibilidade superior a qualquer outra técnica.

•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



Separação e identificação de ácidos graxos

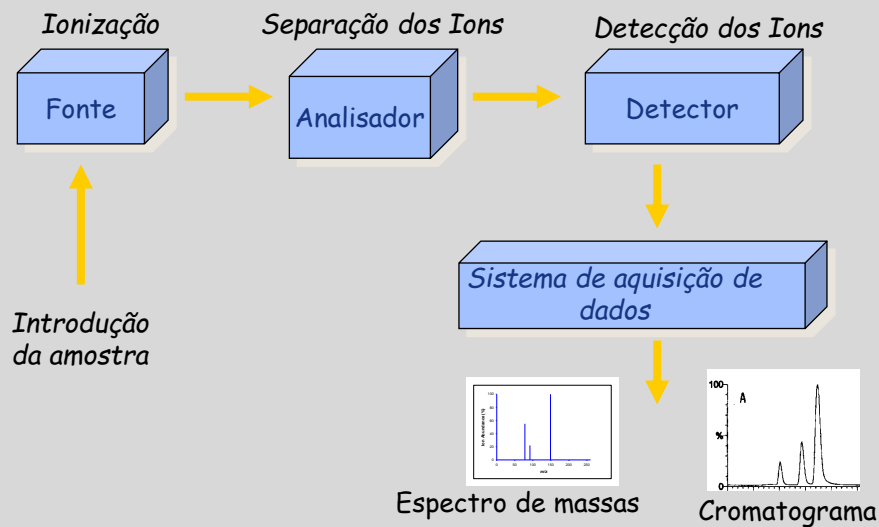
22

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

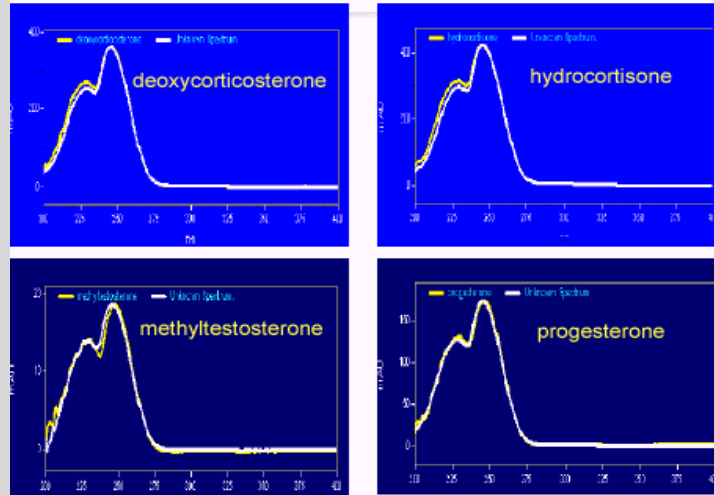


24

ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Característica de SELETIVIDADE: MS vs UV

Espectro de absorção no UV

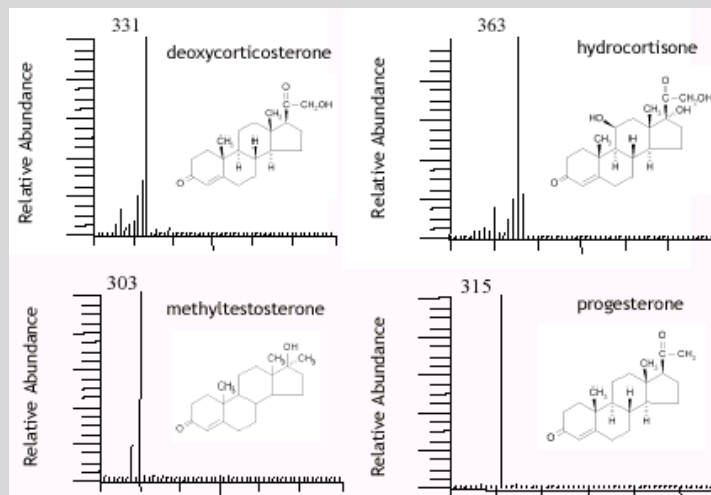


25

ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Característica de SELETIVIDADE: MS vs UV

Espectro de massas



26