

MÓDULO CGF2036

Análise Química I:  
Físico-Química

CROMATOGRAFIA

AULA 6:

HPLC

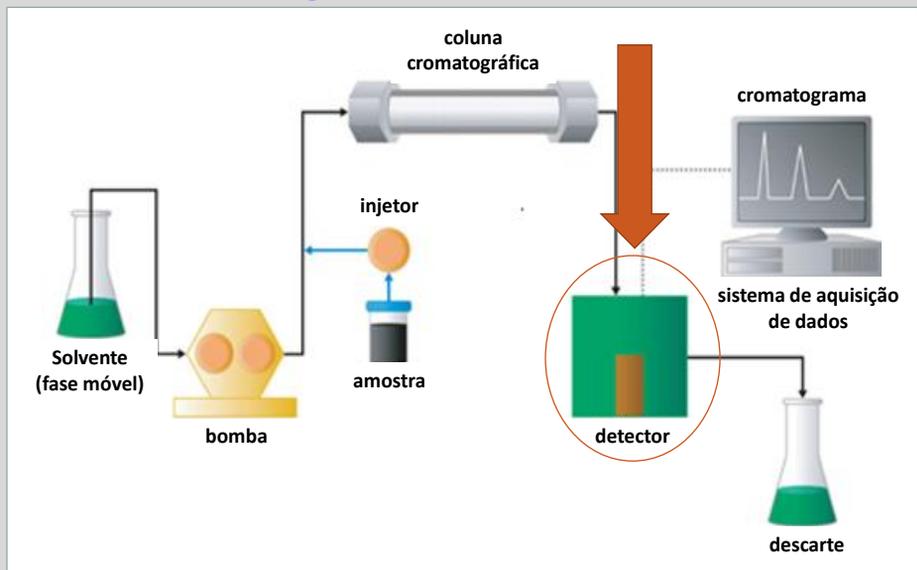
(Parte III)

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)

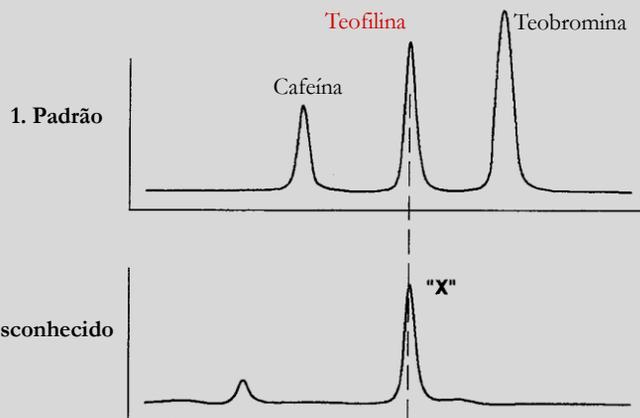
•**Seletividade** adequada: contribuir com informação qualitativa adicional ao da análise cromatográfica ( $t_R$ );

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:  $\lambda$  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

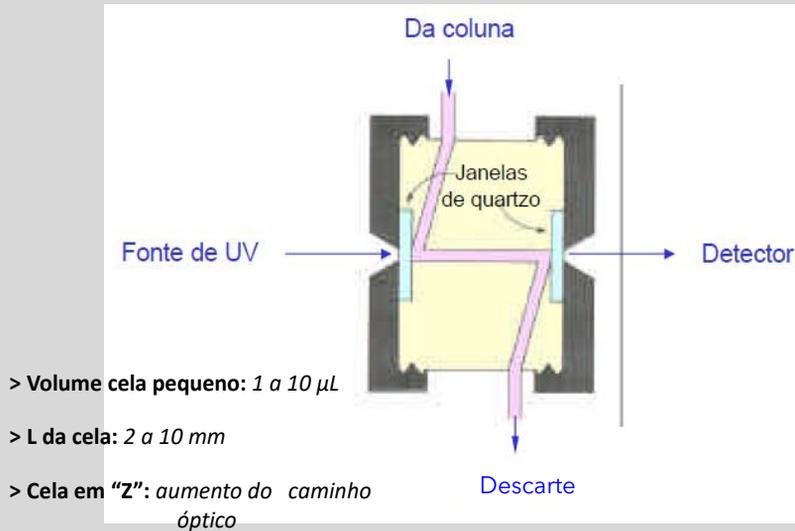
- Baseiam-se na absorvência da luz pelo analito ao passar pelo detector.
- É um detector seletivo pois só detecta os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detector for ajustado.
- É o detector mais utilizado em HPLC pois grande maioria das substâncias absorvem radiação. Exemplos de substâncias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

### •CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES:

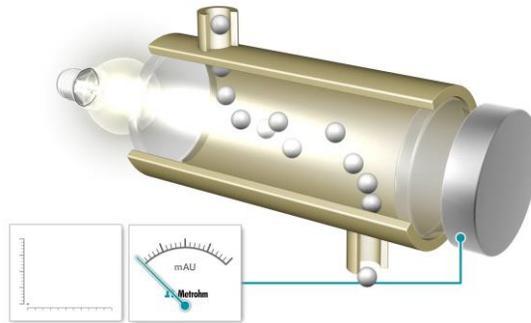
- ✓ A FM utilizada não pode absorver no comprimento de onda selecionado
- ✓ A pureza da FM é extremamente importante

7

## ABSORBÂNCIA UV-Vis



8



# ABSORBÂNCIA UV-VIS

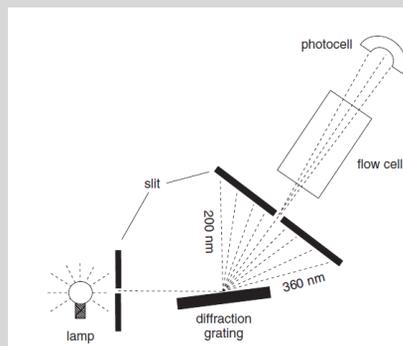
9

## ABSORBÂNCIA UV-Vis

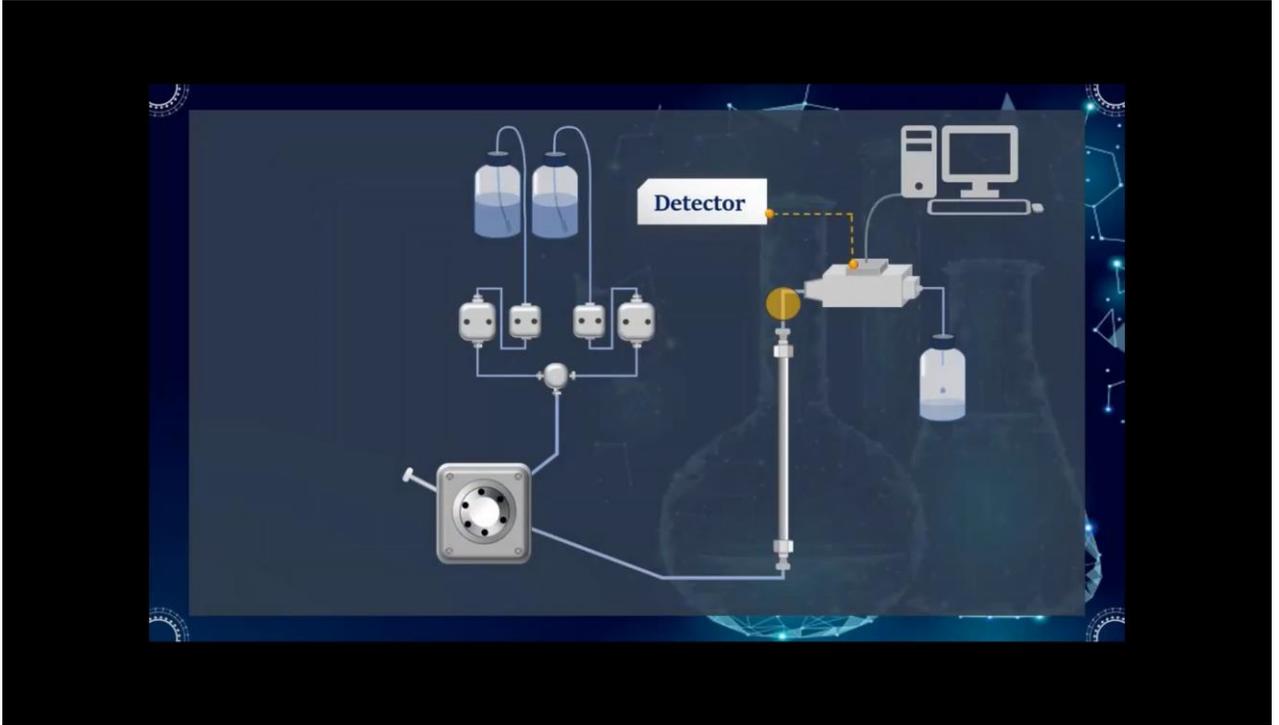
### •TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

✓ 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



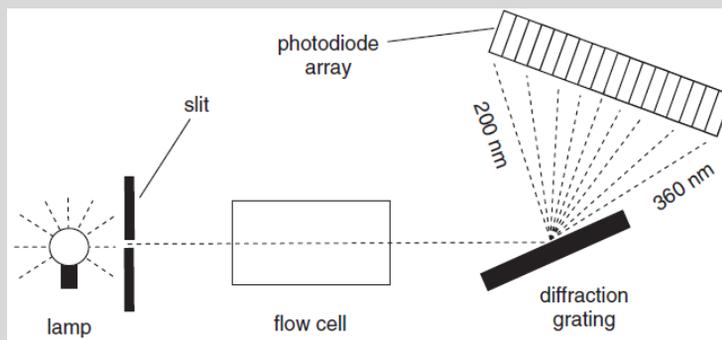
11

## ABSORBÂNCIA UV-Vis

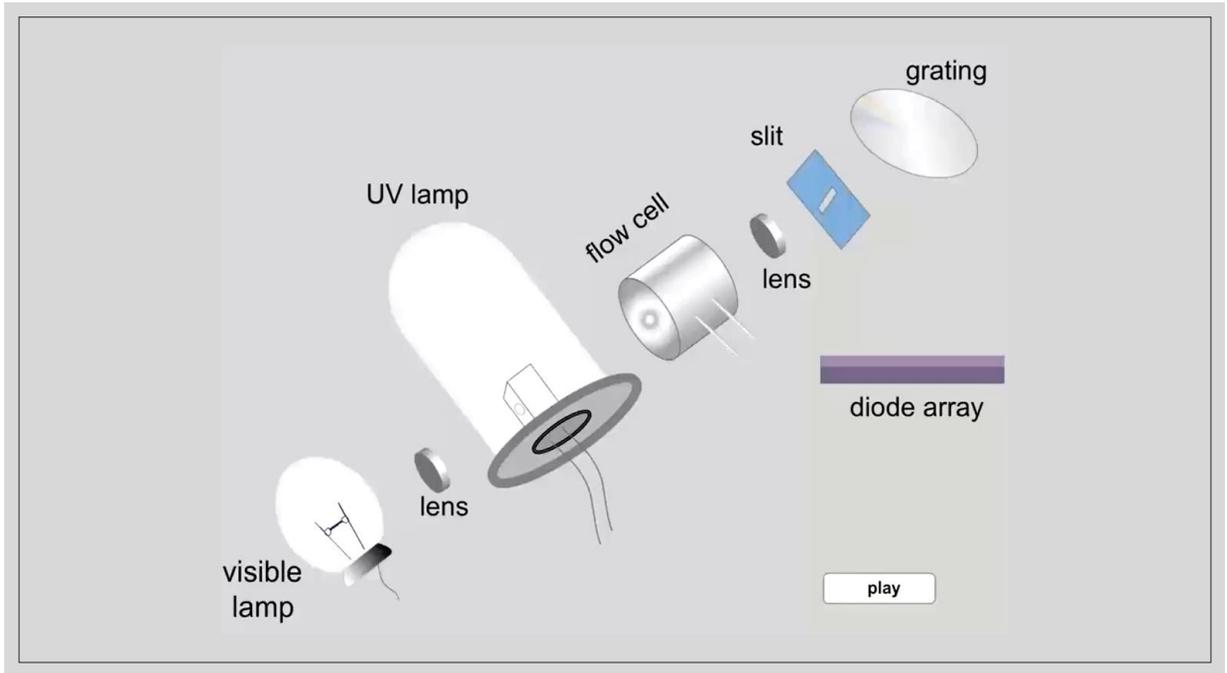
### •TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos

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



12



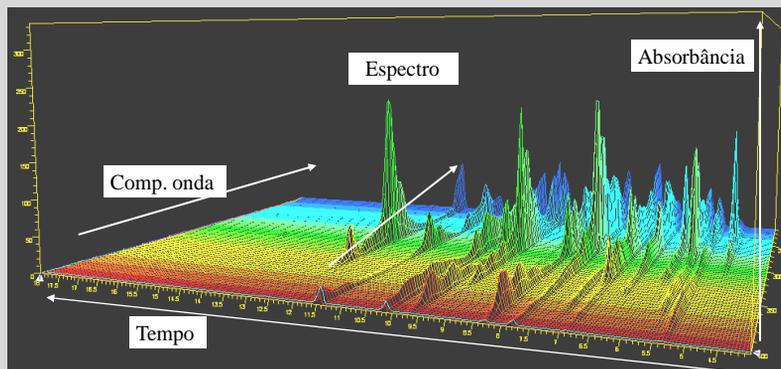
13

## ABSORBÂNCIA UV-Vis

### •TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

- ✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos

Informações obtidas com um detector com arranjo de diodos



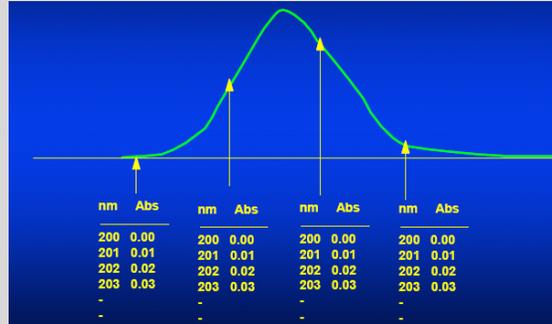
14

## ABSORBÂNCIA UV-Vis

### •TIPOS DE DETECTORES UV-VIS:

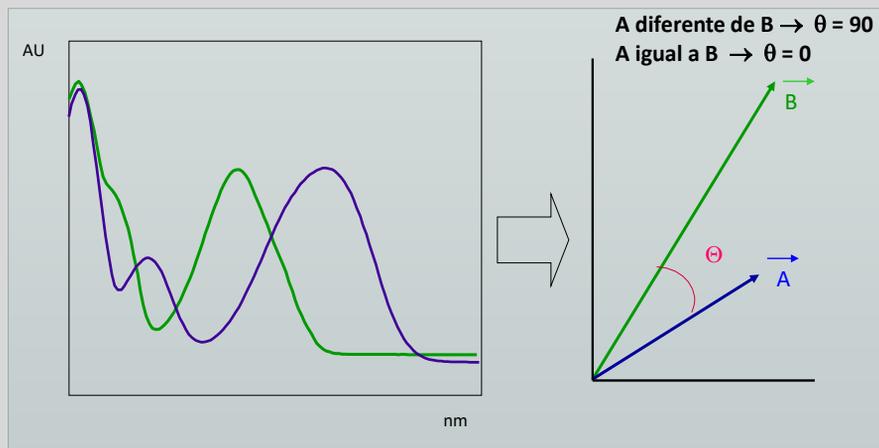
✓ Espectrofotométricos – Arranjo de Diodos

Determinação da pureza de pico utilizando detector com arranjo de diodos

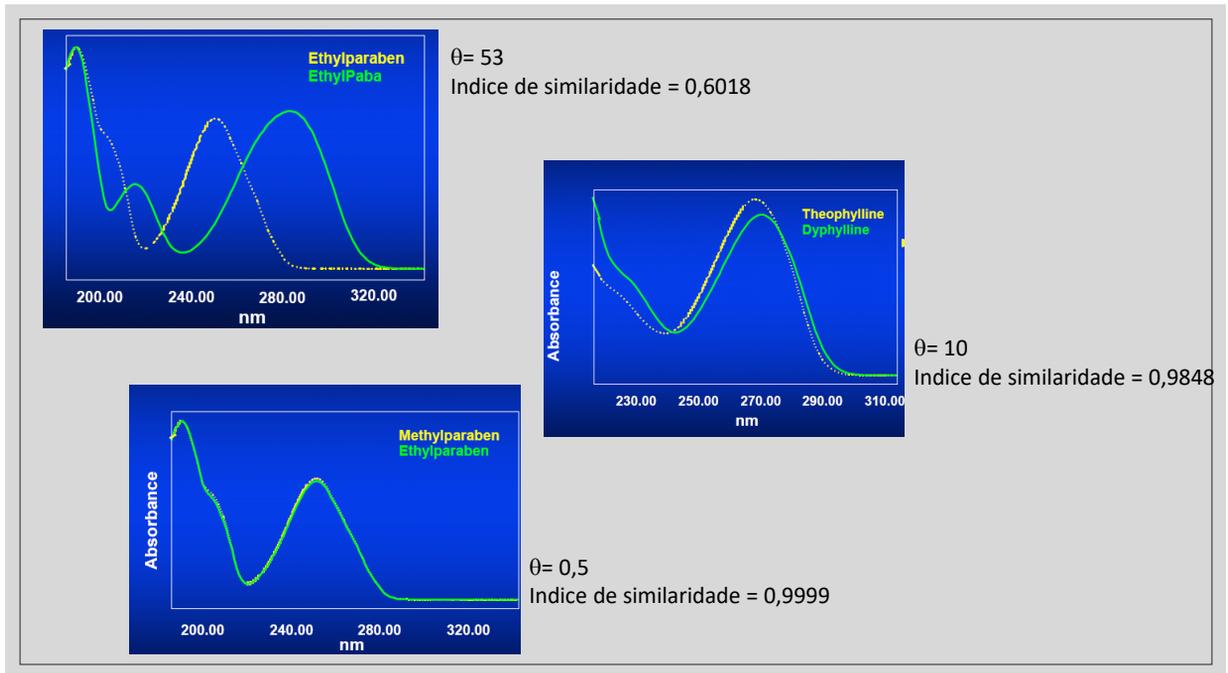


15

## 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

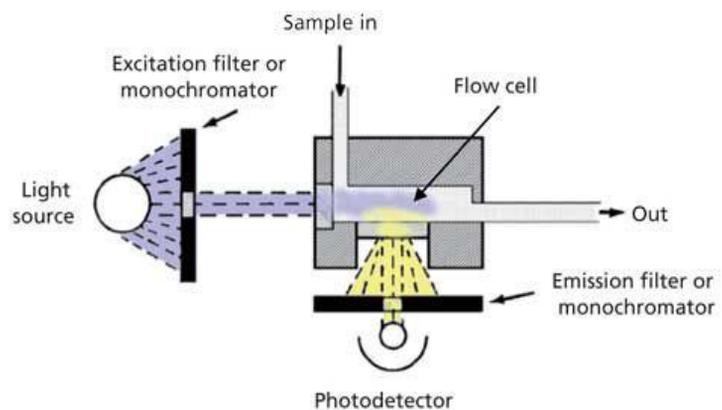
## FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

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



20

## FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

### •VANTAGENS:

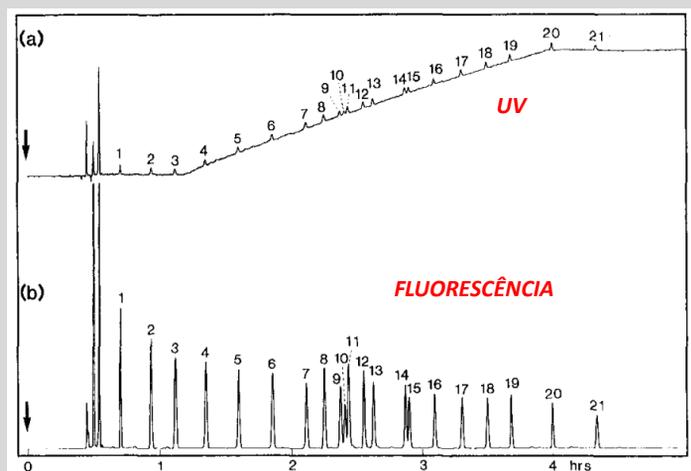
- ✓ Fácil de operar , médio custo e grande faixa linear.
- ✓ Maior sensibilidade e seletividade comparado ao UV-Vis. Para compostos altamente fluorescentes, sensibilidade superior a qualquer outra técnica.

### •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*

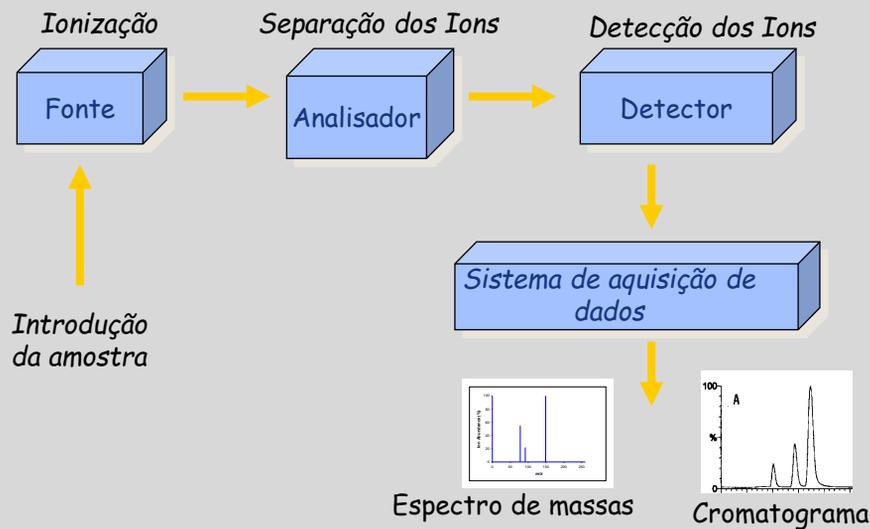
22

## 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

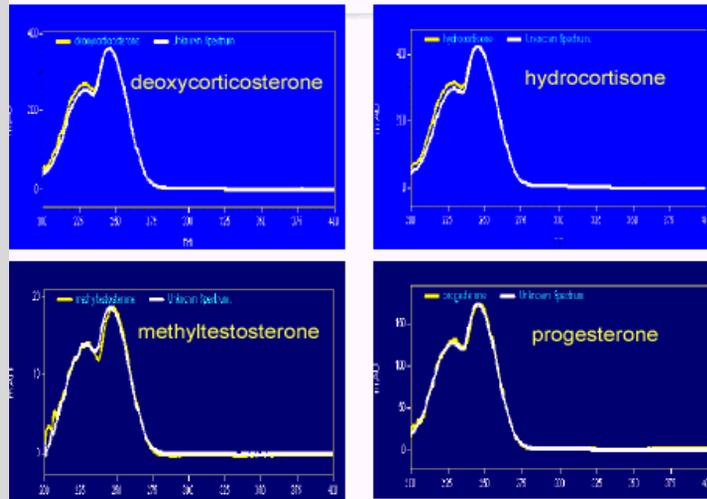


24

## ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

### Característica de SELETIVIDADE: MS vs UV

Espectro de absorção no UV

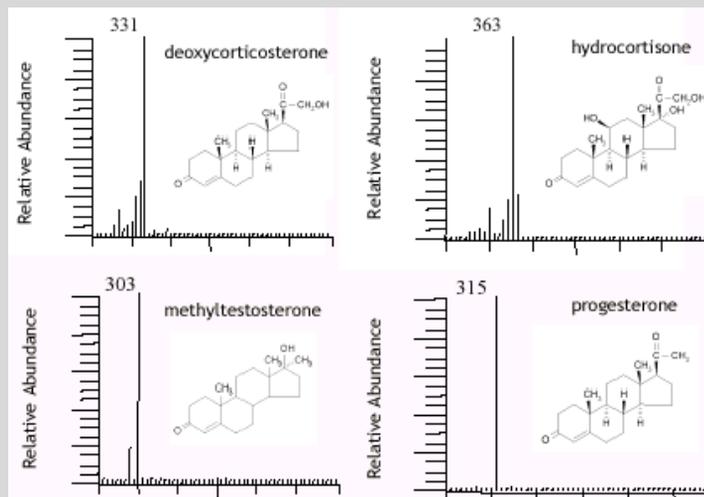


25

## ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

### Característica de SELETIVIDADE: MS vs UV

Espectro de massas



26