



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS– SANTA CATARINA

Fundamentos e Formalismos Teóricos da Cromatografia

Prof. Marcel Piovezan

marcel.piovezan@ifsc.edu.br

UC: Análise Instrumental II

Cromatografia em coluna com detecção por UV-Vis

Relatório da prática: Cromatograma e:

$N =$

$\mu =$

$\bar{v} =$

$H =$

k_A e $k_V =$

$R_s =$

t_{RA}' e $t_{RV}' =$

$\alpha =$

V_{RA} e $V_{RV}' =$

$V_0 =$



Cromatografia em coluna com detecção por UV-Vis

Resultado da prática:

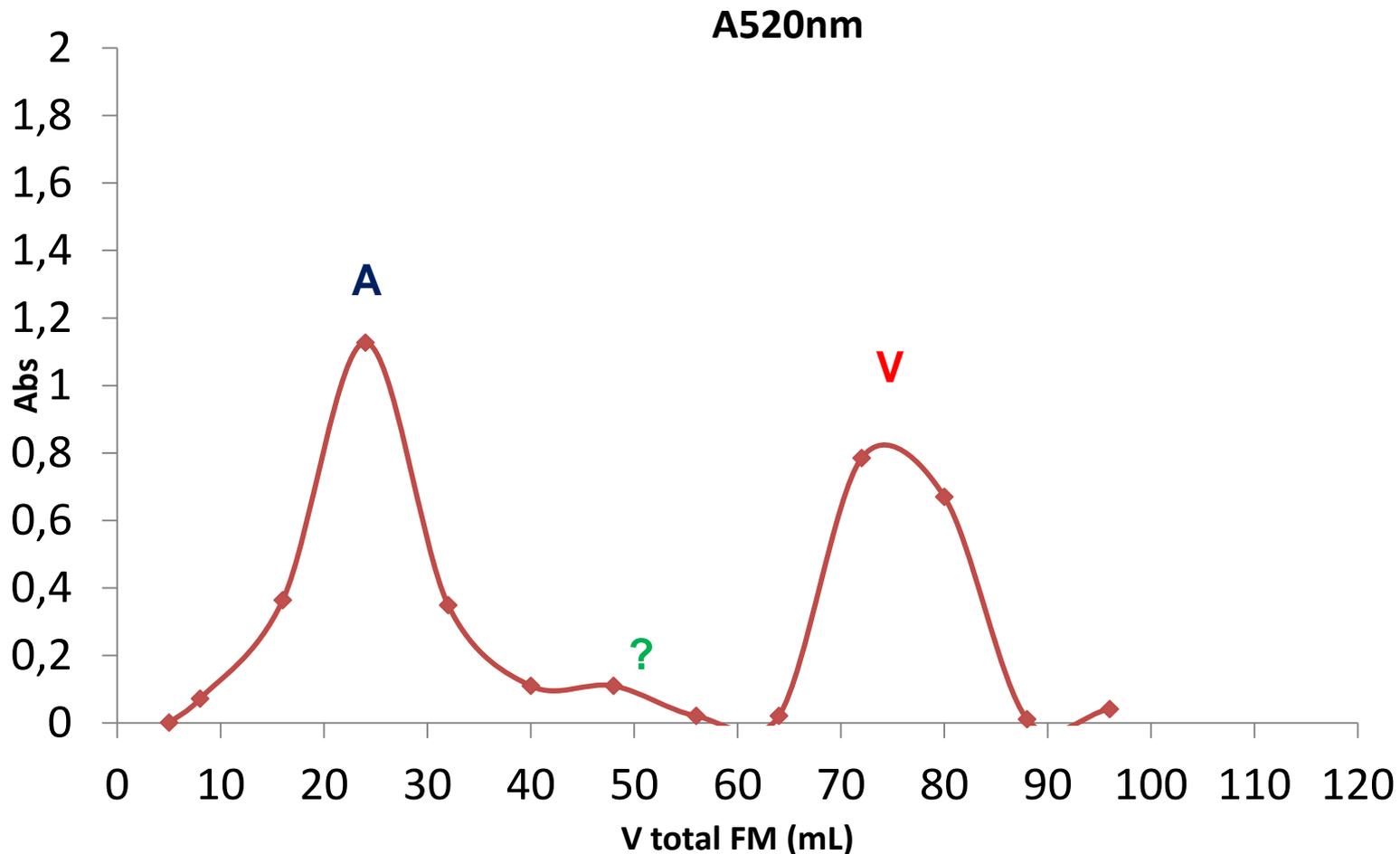
Construa dois cromatogramas, um que relacione o Volume total eluído (mL) de FM versus Abs (610 nm) e outro Abs (520 nm) no mesmo gráfico para cada uma das condições testadas.



Cromatografia em coluna com detecção por UV-Vis

Resultado da prática:

Construa dois cromatogramas, um que relacione o Volume total eluído (mL) de FM versus Abs (610 nm) e outro Abs (520 nm) no mesmo gráfico para cada uma das condições testadas.



A separação foi boa? O que significa ser boa?

EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO

Eficiência da coluna em separar dois solutos depende em parte das velocidades relativas segundo os quais são eluídos.

E a eluição depende do equilíbrio destes entre as fases móvel e estacionária

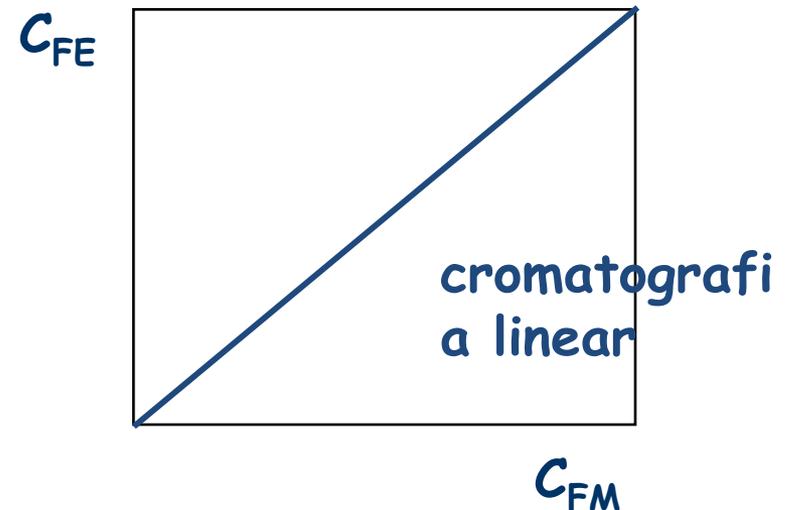


COEFICIENTE DE PARTIÇÃO, K



$$K = \frac{C_{FE}}{C_{FM}}$$

isoterma de distribuição



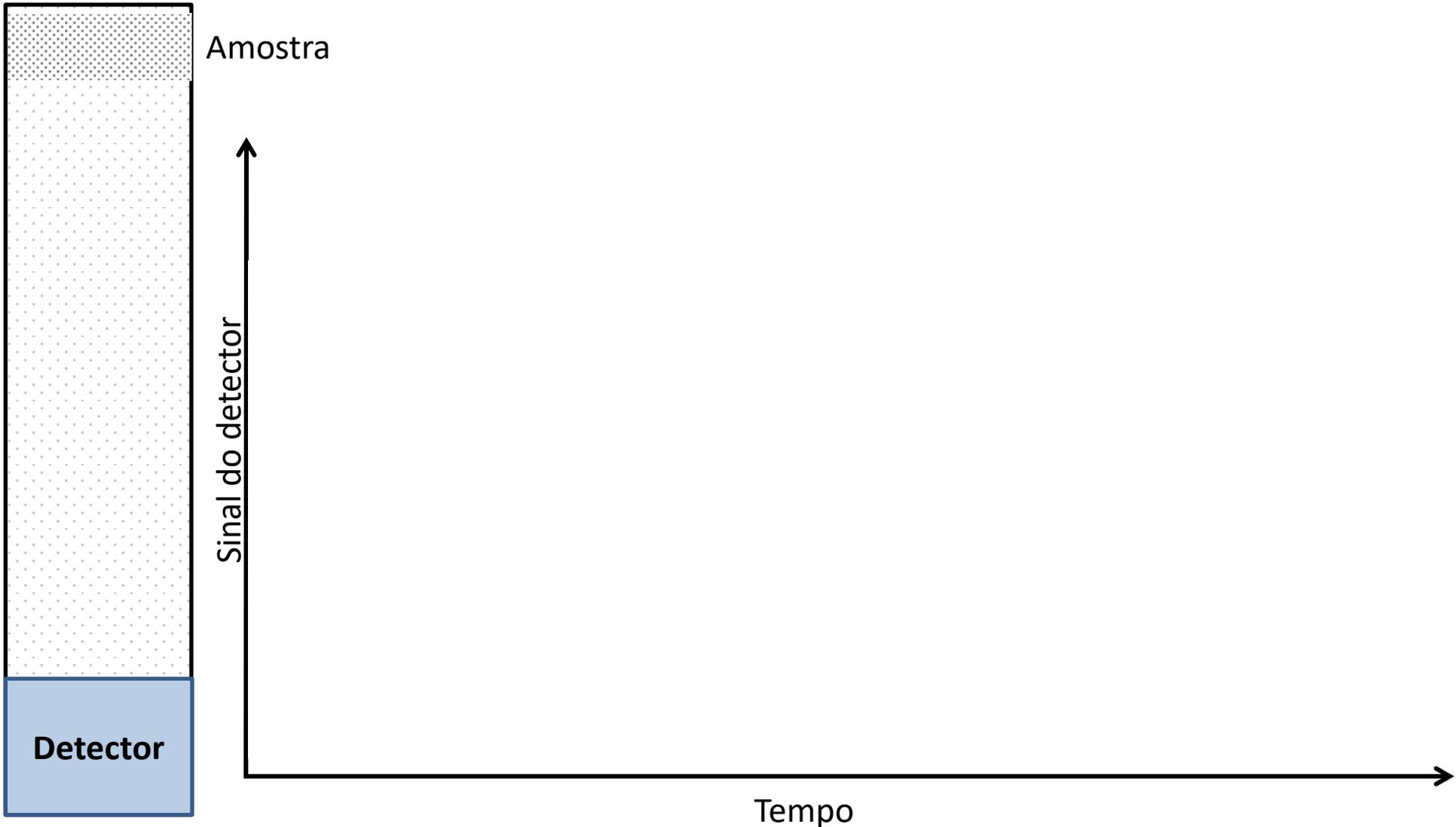
A = analito A

C_{FE} = Concentração de A na fase estacionária

C_{FM} = Concentração de A na fase móvel

→ O resultado de uma cromatografia em geral é um gráfico que correlaciona a medida de um sinal de um detector adequado com relação ao tempo decorrido ou ao volume do eluente.

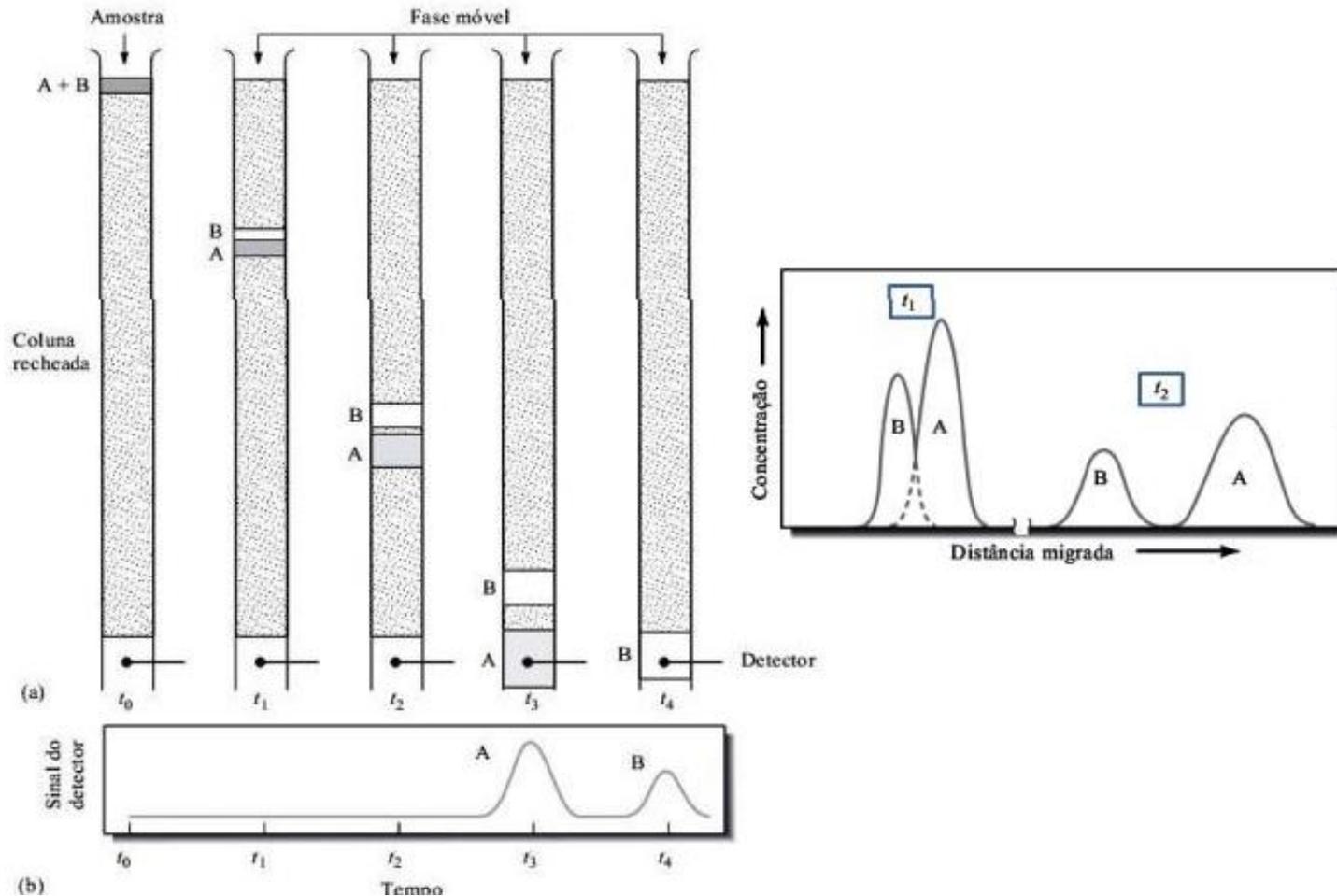
→ O formato é de pico gaussiana. → O tempo ou volume pode ser usado para identificá-lo, a área sob o pico pode ser utilizada para medida quantitativa.



CROMATOGRAFIA: Teoria Básica

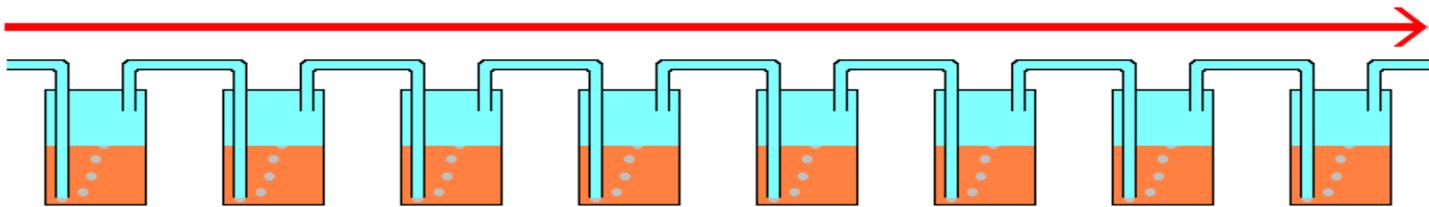
Diluição do analito

- ✓ Consiste no alargamento da zona original (banda de aplicação da amostra) à medida que os componentes da mistura são separados;
- ✓ Implica no uso de detectores mais sensíveis.

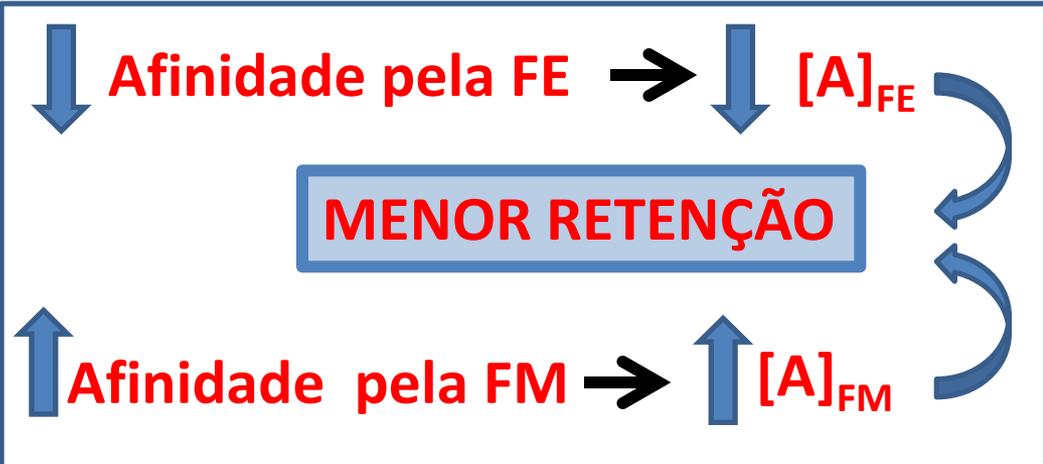
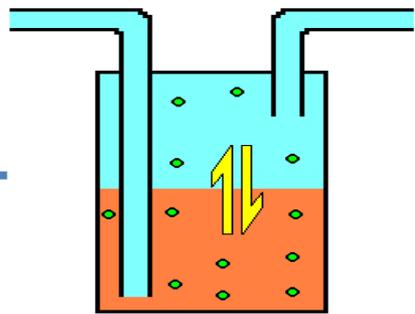


CROMATOGRAFIA: Teoria Básica

Coluna cromatográfica: série de estágios independentes onde acontece o equilíbrio entre o analito dissolvido (sorvido) na fase estacionária e na fase móvel.



$$K_A = \frac{[A]_{FE}}{[A]_{FM}}$$

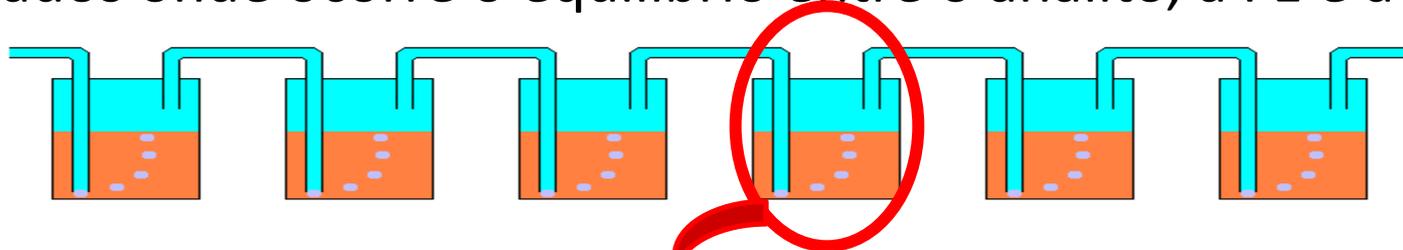


K = constante de distribuição do analito
 $[A]_{FE}$ = concentração do analito na FE
 $[A]_{FM}$ = concentração do analito na FM

- Sendo $K_A > K_B$ qual substância ficará mais tempo retida?

Quantificação da eficiência: Número de Pratos (N)

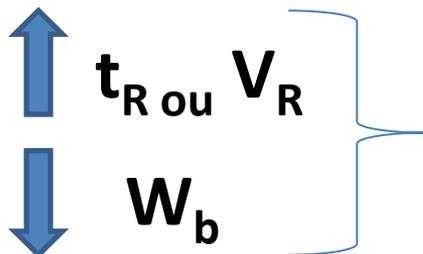
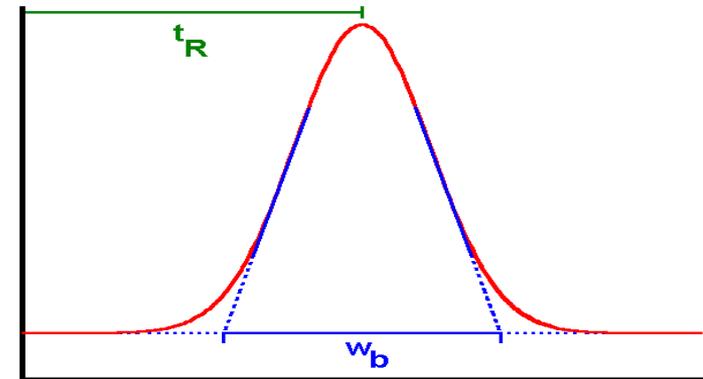
Supondo a coluna cromatográfica como uma série de estágios separados onde ocorre o equilíbrio entre o analito, a FE e a FM:



Cada "estágio" de equilíbrio é chamado de PRATO TEÓRICO

O número de pratos teóricos de uma coluna (N) pode ser calculado por:

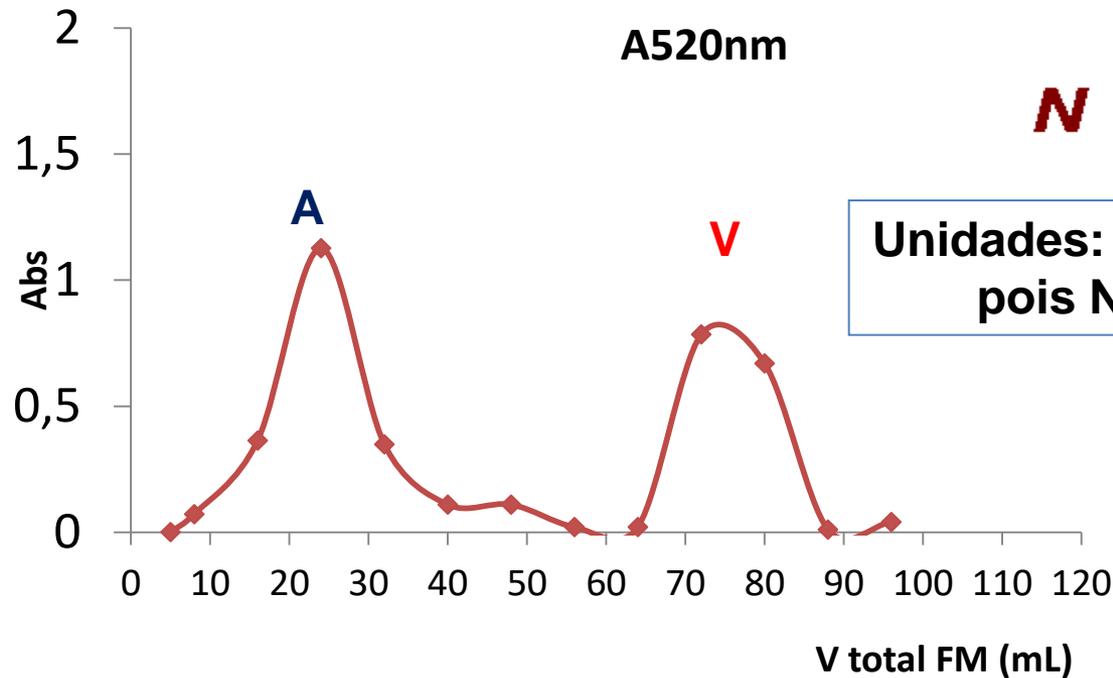
$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$



N

Coluna mais eficiente

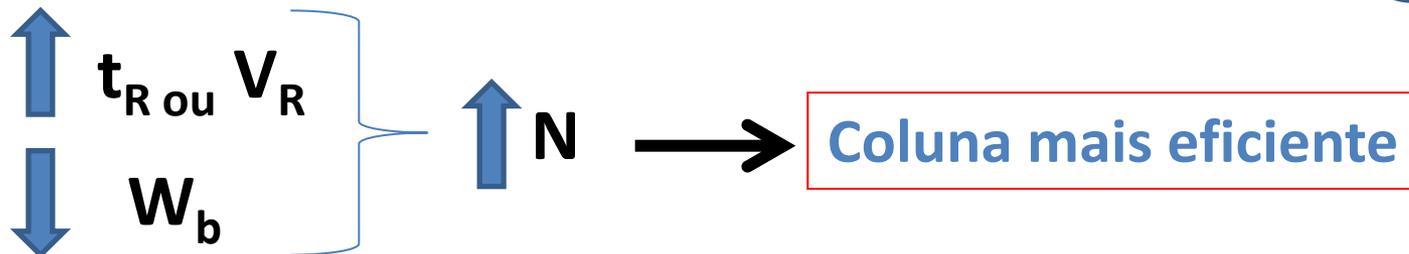
Quantificação da eficiência: Número de Pratos (N)



$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Unidades: sempre as mesmas ,
pois N é adimensional

O número de pratos teóricos de uma
coluna (N) pode ser calculado por:



Faça o
seu!!!

CROMATOGRAFIA:

Quantificação da eficiência

ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO TEÓRICO (H)

“Tamanho” de cada estágio de equilíbrio

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

(L = comprimento da coluna)

Valores típicos de H e N:

d_c	d_f	H	N
0,10	0,25	0,081	370370
0,25	0,25	0,156	192308
0,32	0,32	0,200	150000
0,32	0,50	0,228	131579
0,32	1,00	0,294	102041
0,32	5,00	0,435	68966
0,53	1,00	0,426	70423
0,53	5,00	0,683	43924
2,16	10%	0,549	3643
2,16	5%	0,500	4000

Capilares, L = 30 m

Empacotadas, L = 2 m

d_c = diâmetro da coluna em mm

d_f = espessura da fase estacionária em μm

Valores de H para colunas capilares e empacotadas são próximos, mas como L para capilares é MUITO maior tipicamente elas são mais eficientes.

CROMATOGRAFIA:

Quantificação da eficiência

ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO TEÓRICO (H)

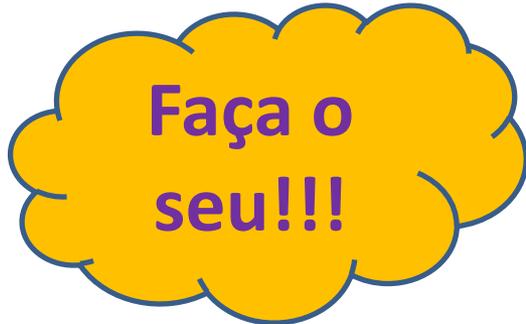
“Tamanho” de cada estágio de equilíbrio

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

(L = comprimento da coluna)

Valores típicos de H e N:

Unidades: Tipicamente L e H
São expressos em mm



Faça o
seu!!!

CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

Tempo de retenção (t_R)

- é tempo decorrido entre a injeção da amostra e o ápice do pico cromatográfico do analito

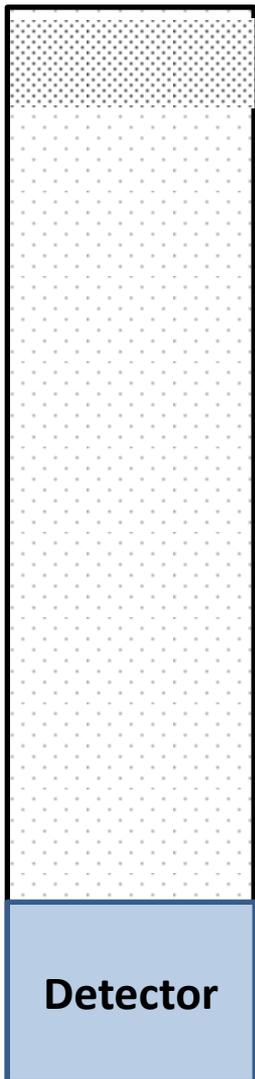
Tempo de retenção de composto não-retido (t_M , tempo morto):

- tempo para eluição de um composto que não interage com a fase estacionária;
- fornece a velocidade média de migração da fase móvel

Tempo de retenção ajustado (t_R' ou t_E):

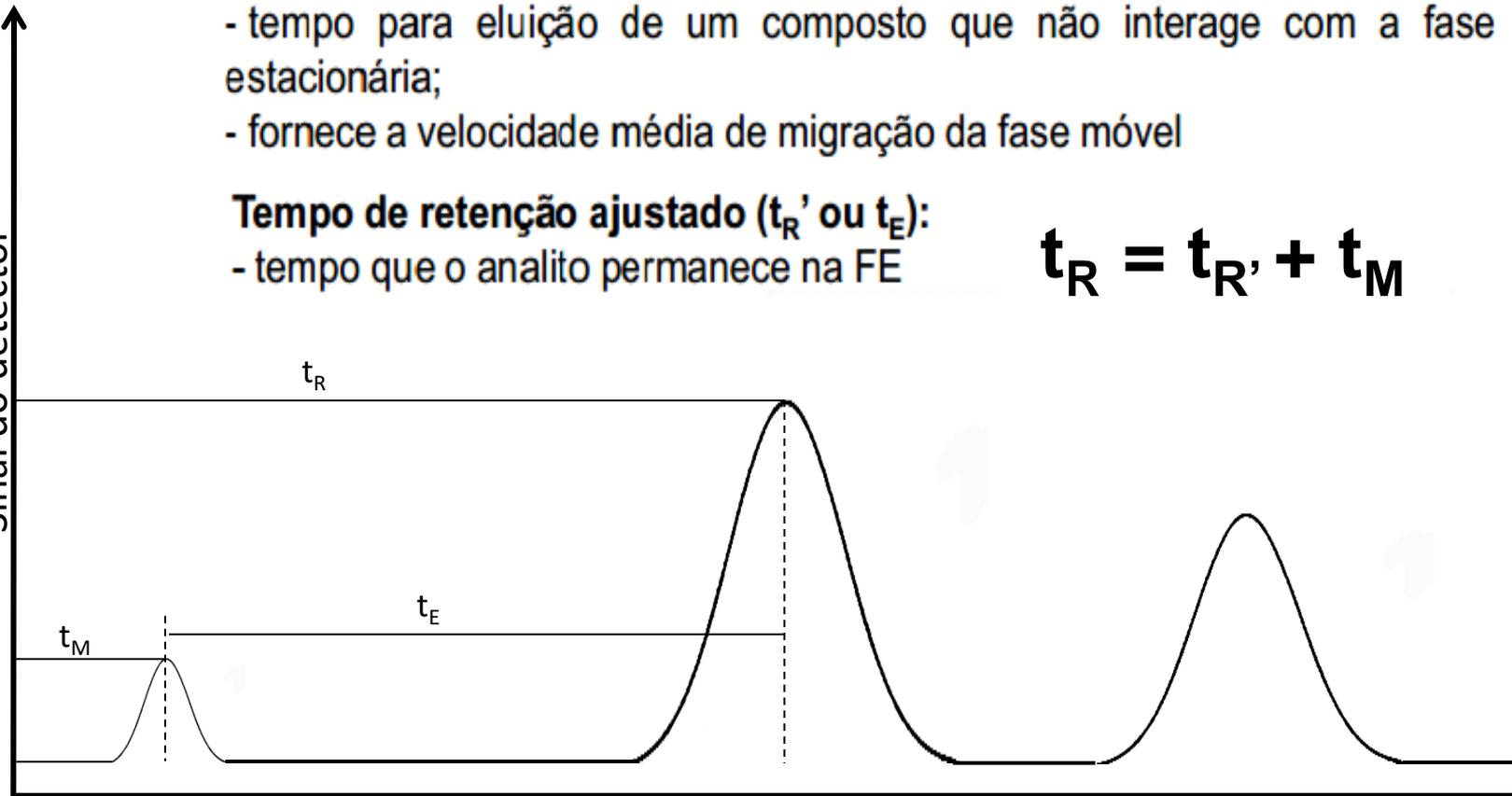
- tempo que o analito permanece na FE

$$t_R = t_R' + t_M$$



Amostra

Sinal do detector



t_M

t_R

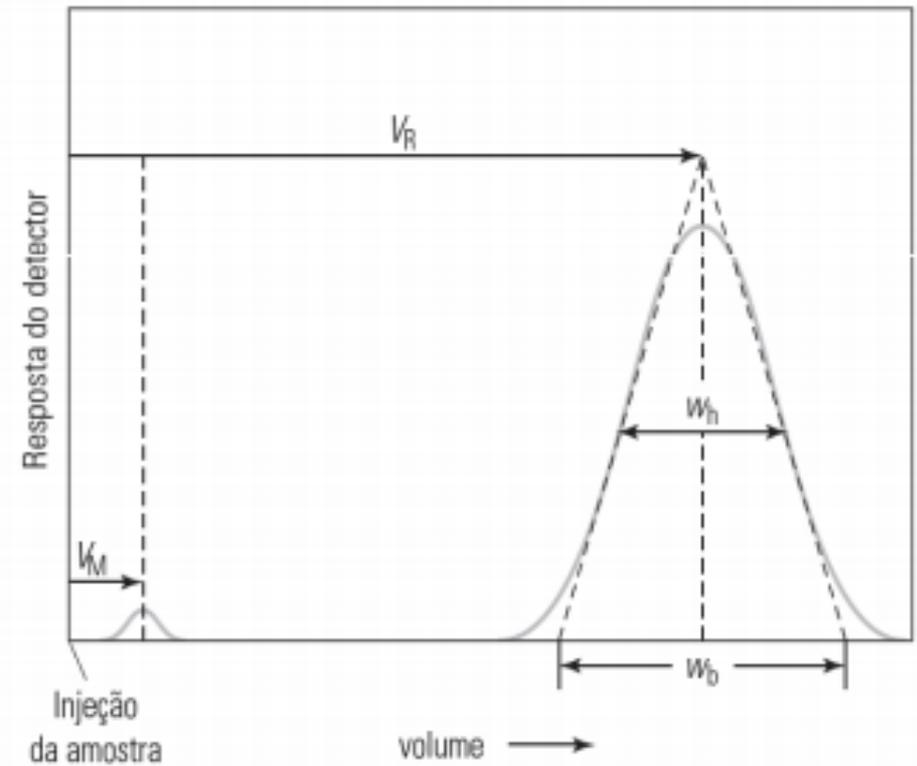
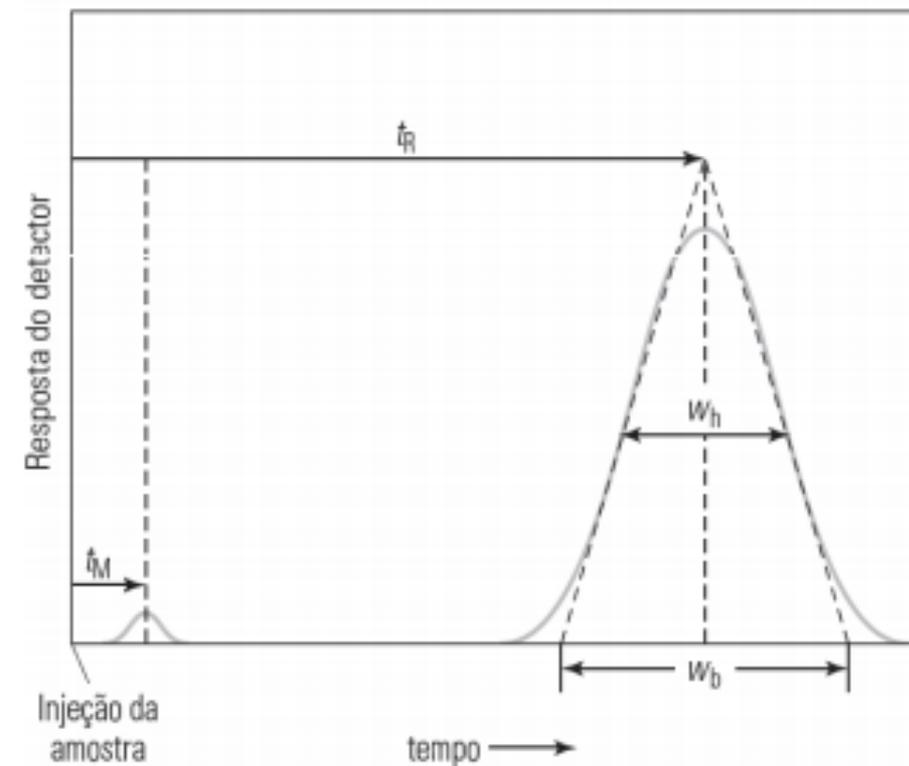
t_E

Tempo

Detector

CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

✓ A eluição dos componentes de uma mistura em um sistema cromatográfico pode ser acompanhada em função do tempo ou do volume de fase móvel.



CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

Faça o seu!!!

Tempo de retenção (t_R)

- é tempo decorrido entre a injeção da amostra e o ápice do pico cromatográfico do analito

Tempo de retenção de composto não-retido (t_M , tempo morto):

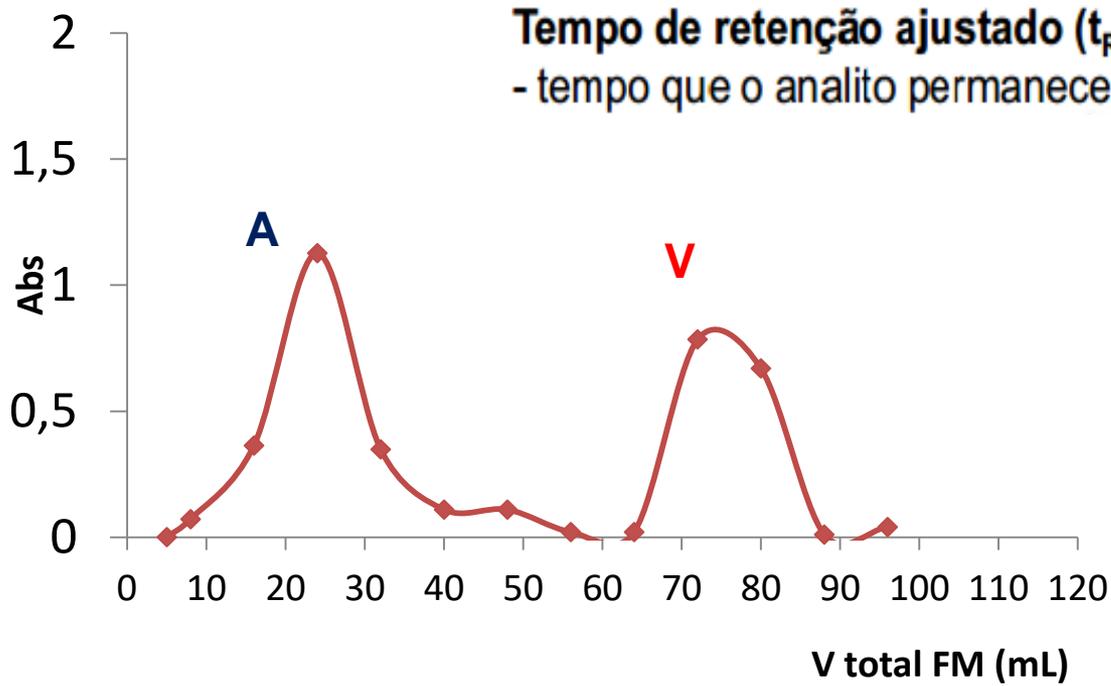
- tempo para eluição de um composto que não interage com a fase estacionária;
- fornece a velocidade média de migração da fase móvel

Tempo de retenção ajustado (t_R' ou t_E):

- tempo que o analito permanece na FE

$$t_R = t_R' + t_M$$

$$V_R = t_R \cdot F$$

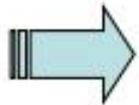


$t_M = 5 \text{ mL}$
 $t_{RV} = 25 \text{ mL}$
 $t_{RV}' = ?$

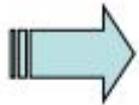
$t_M = 5 \text{ mL}$
 $t_{RA} = 75 \text{ mL}$
 $t_{RA}' = ?$

Volume da coluna

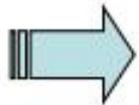
V_0 = Volume (tempo) de eluição de um pico não retido pela coluna.



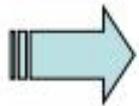
Normalmente é a 1ª perturbação da linha de base.



Volume mínimo que a bomba precisa bombear para qualquer amostra chegar até o detector.



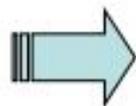
Volume de fase móvel contido no sistema entre o injetor e o detector, inclusive dentro dos poros.



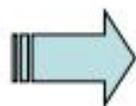
A coluna é responsável por 90-95% deste volume.

V_0 = significado

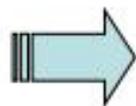
- Quaisquer picos ou grupo de picos que eluem junto ao V_0 :



Não interagiram com a coluna e, contém prováveis impurezas (picos escondidos)



Não podem ser reconhecidos pelo tempo de retenção: afinal não houve retenção!



Não podem ser quantificados. Não haverá exatidão nem precisão na integração.

Volume da coluna

- Determinar V_0 por:
 - Fase reversa: injeção de hidrocarboneto saturado ou aromático (tolueno).
 - Fase normal: Injeção de água ou acetona.

- Cálculo aproximado:

Erro de 10-20% (3-10 μ m)

$$V_0 = (\pi \times r^2 \times C) (0,5)$$



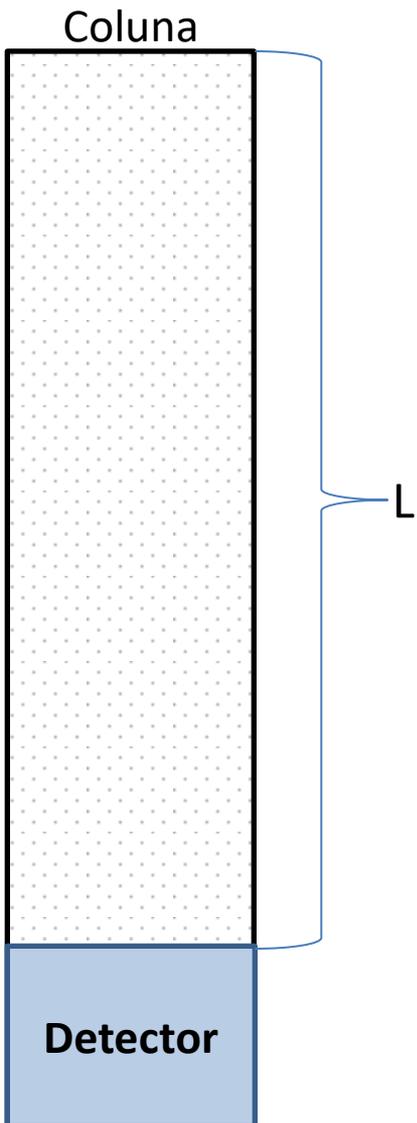
r = raio interno em 'mm', C = comprimento em 'mm'

diâmetro = 22 mm

C = mm

V_0 = ?

CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

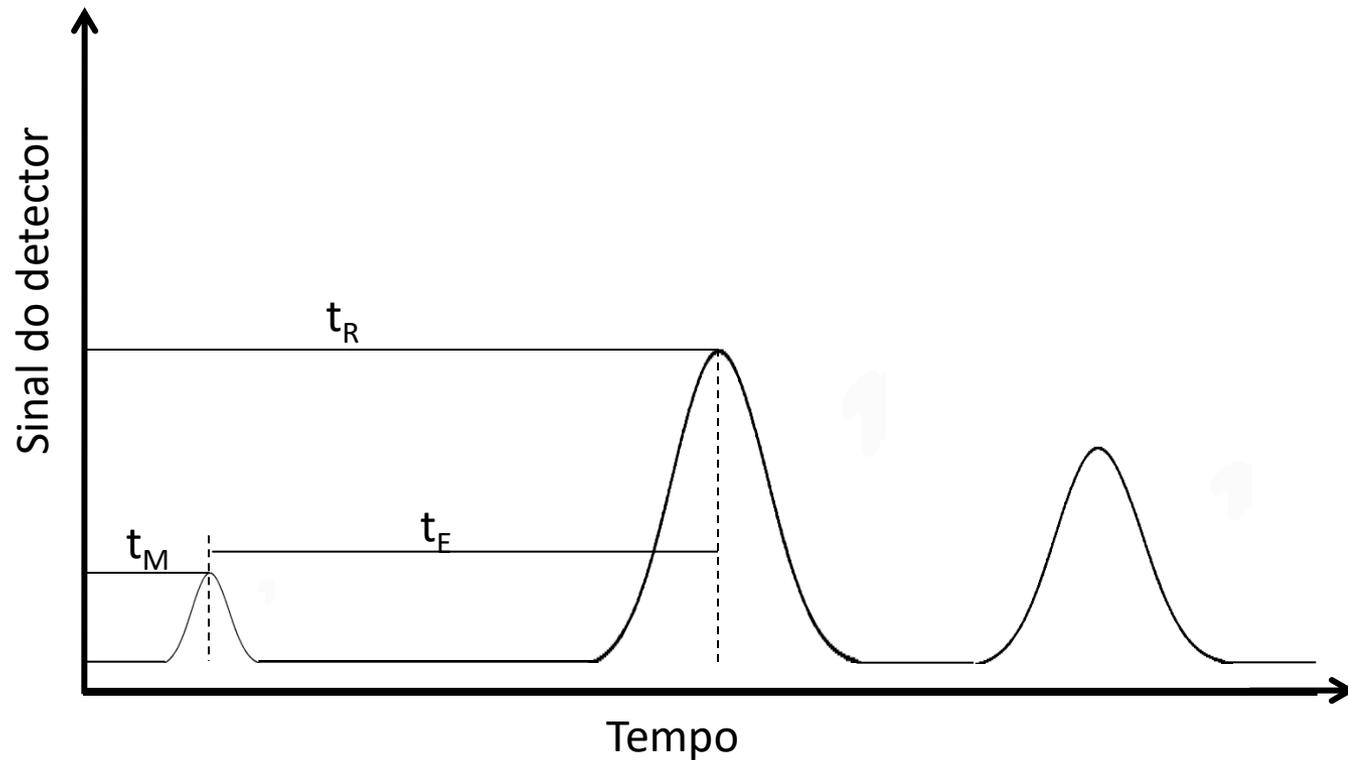


Velocidade linear média de migração do soluto pela coluna ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$):

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad L = \text{comprimento da coluna}$$

Velocidade linear da fase móvel ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$):

$$u = \frac{L}{t_M} \quad \text{ou} \quad u = \frac{(F L)}{V_M} \quad F = \text{vazão da FM} (\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1})$$



CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

Faça o seu!!!

Velocidade linear média de migração do soluto pela coluna (cm.s^{-1}):

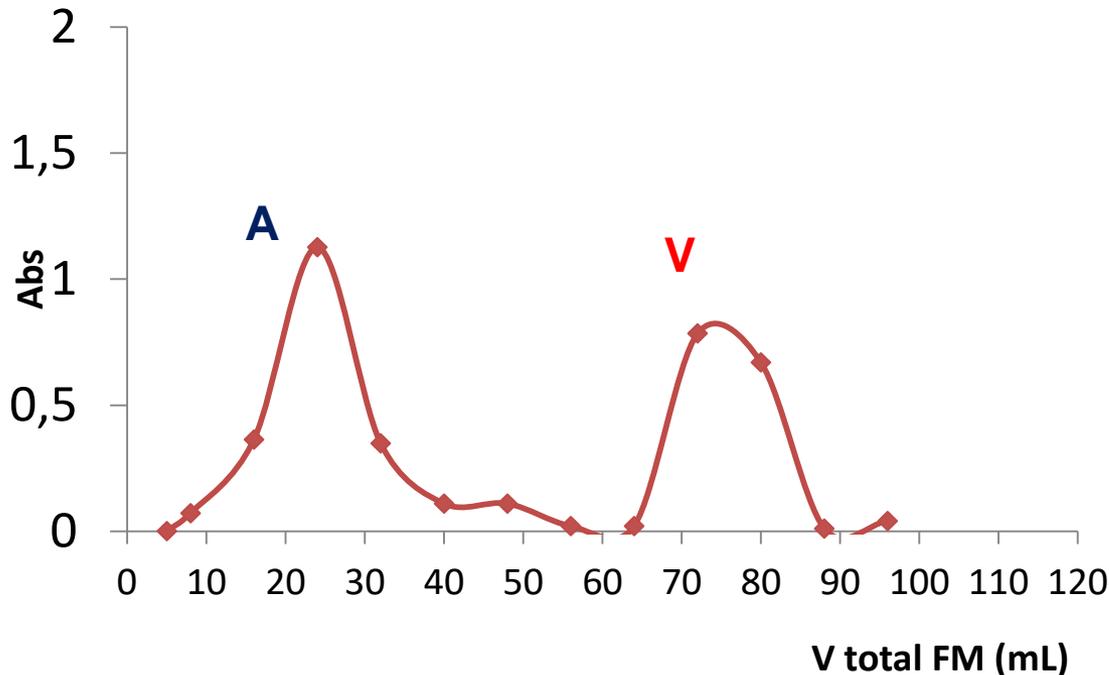
$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

L = comprimento da coluna

Velocidade linear da fase móvel (cm.s^{-1}):

$$u = \frac{L}{t_M} \quad \text{ou} \quad u = \frac{(F L)}{V_M}$$

F = vazão da FM ($\text{cm}^3.\text{min}^{-1}$)



$u = ?$
 $L = \text{cm}$
 $V_M = 5 \text{ mL}$
 $F = 1 \text{ cm}^3/\text{min}$

Podemos agora?

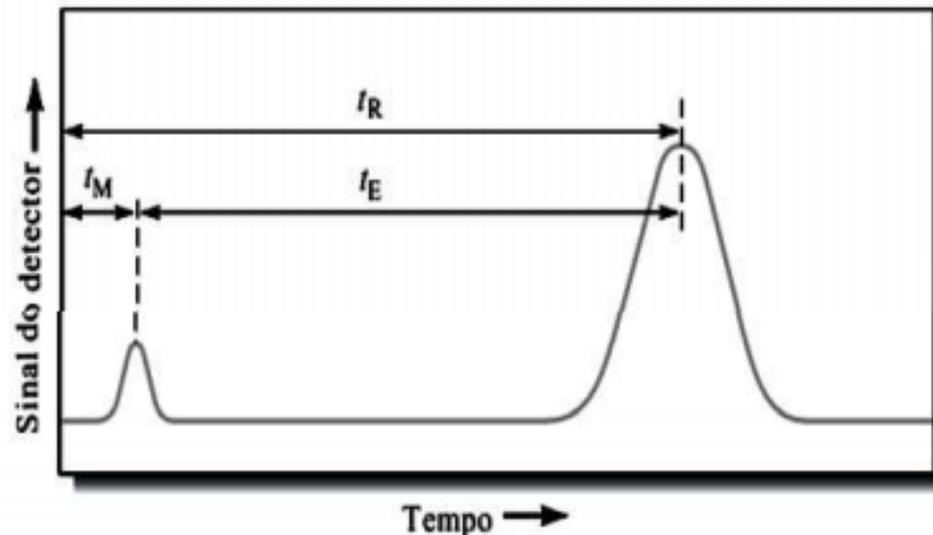
$$V_R = t_R \cdot F$$

CROMATOGRAFIA: Comparar velocidades de migração

Fator de retenção (k)

- parâmetro utilizado para comparar as velocidades de migração de solutos em uma determinada coluna e fase móvel.
- corresponde ao intervalo de tempo que um soluto permanece na fase estacionária em relação à fase móvel
- quando $k \ll 1$: pequena retenção (eluição próxima a t_M)
- quando $k \gg 1$: tempos de retenção muito longos
- o ideal é $1 < k < 10$ para os analitos em uma mistura

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_E}{t_M}$$



CROMATOGRAFIA: Comparar velocidades de migração

Faça o seu!!!

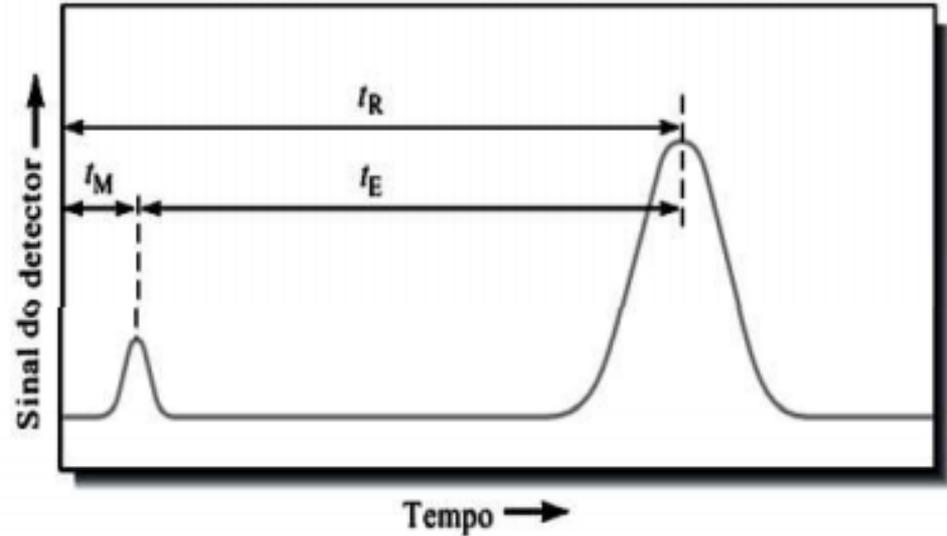
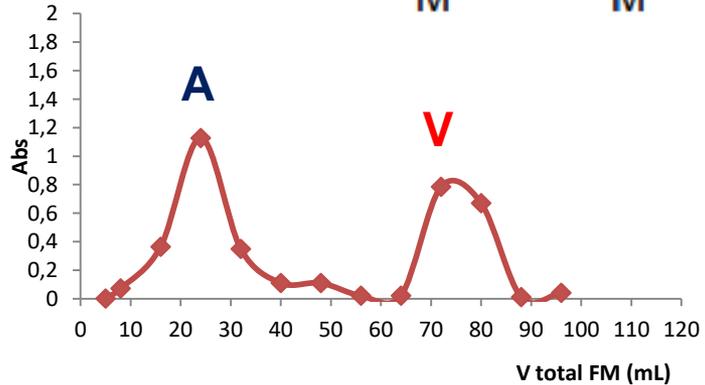
Fator de retenção (k)

- parâmetro utilizado para comparar as velocidades de migração de solutos em uma determinada coluna e fase móvel.
- corresponde ao intervalo de tempo que um soluto permanece na fase estacionária em relação à fase móvel
- quando $k \ll 1$: pequena retenção (eluição próxima a t_M)
- quando $k \gg 1$: tempos de retenção muito longos
- o ideal é $1 < k < 10$ para os analitos em uma mistura

$k_A = ?$

$k_V = ?$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_E}{t_M}$$

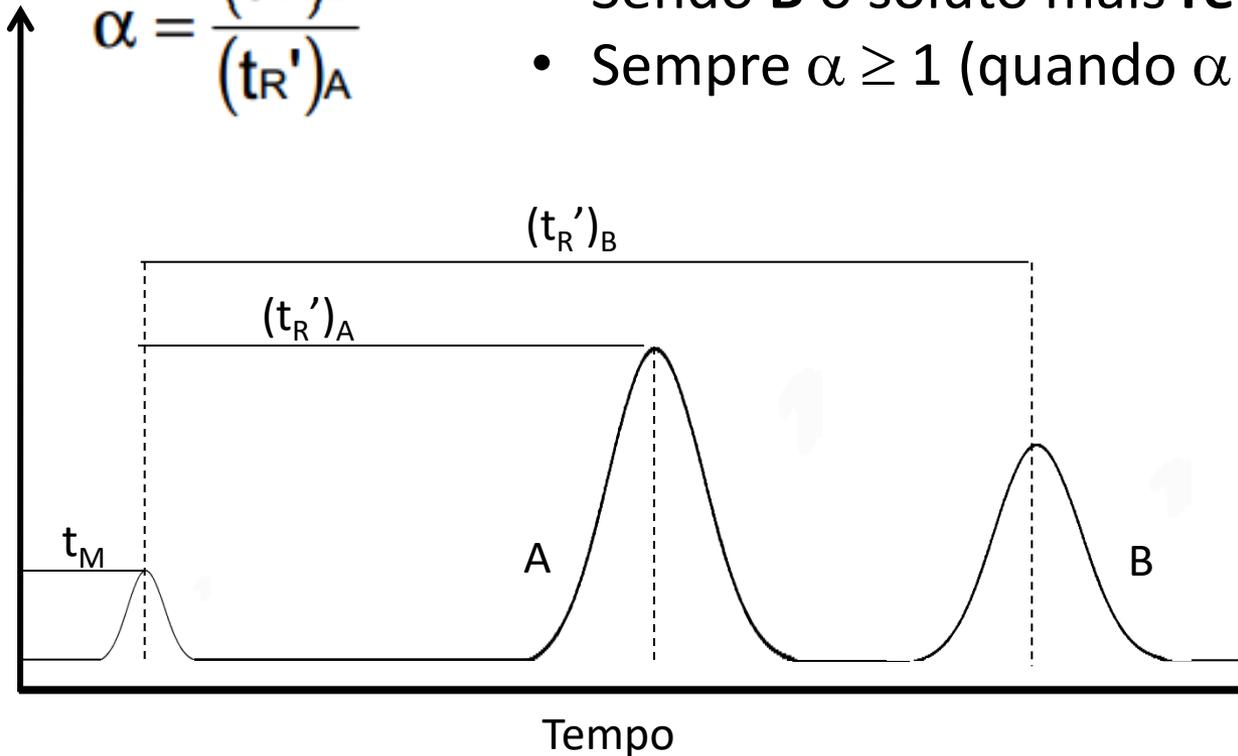


CROMATOGRAFIA: Compara a capacidade de separação entre 2 analitos

Fator de separação ou seletividade (α)

$$\alpha = \frac{(t_{R'})_B}{(t_{R'})_A}$$

- Sendo **B** o soluto mais **retido** que **A**
- Sempre $\alpha \geq 1$ (quando $\alpha = 1$, A e B co-eluem)



• pode ser determinado através dos fatores de retenção (k):

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

• pode ser determinado através das constantes de distribuição (K):

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

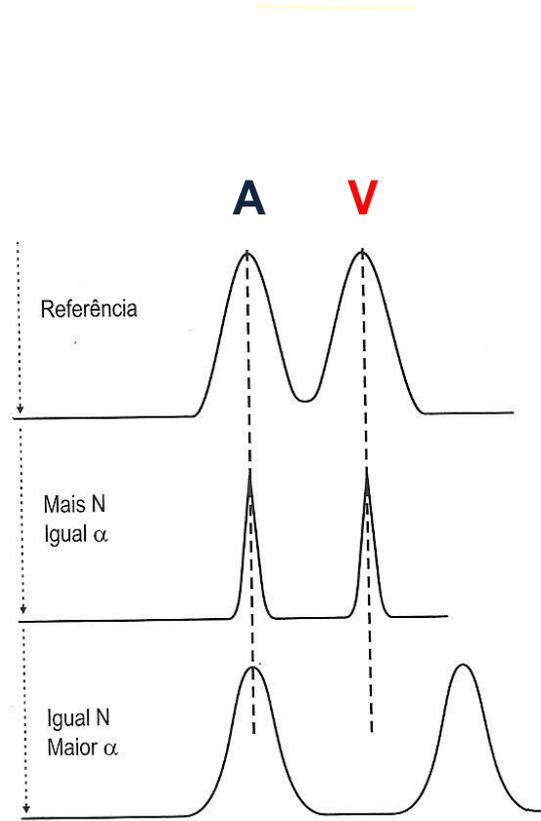
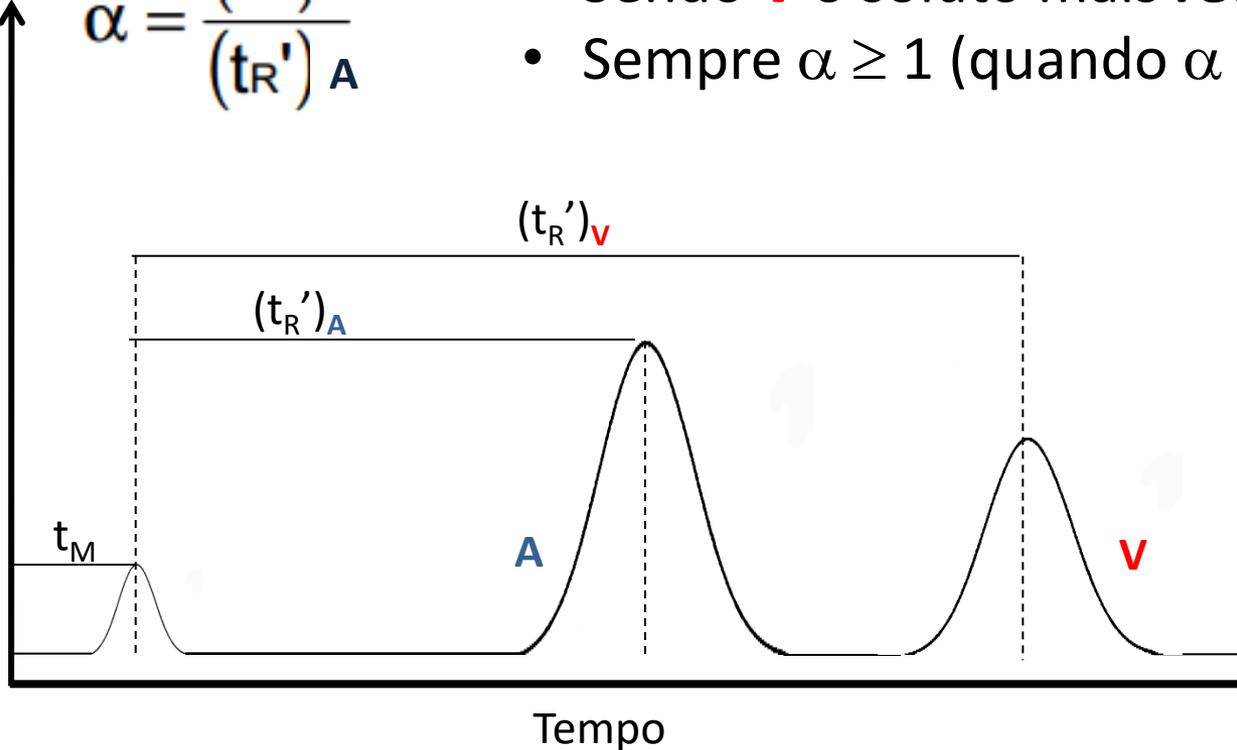
CROMATOGRAFIA: Compara a capacidade de separação entre 2 analitos

Faça o seu!!!

Fator de separação ou seletividade (α)

$$\alpha = \frac{(t_R')_V}{(t_R')_A}$$

- Sendo **V** o soluto mais **retido** que **A**
- Sempre $\alpha \geq 1$ (quando $\alpha = 1$, **A** e **V** co-eluem)

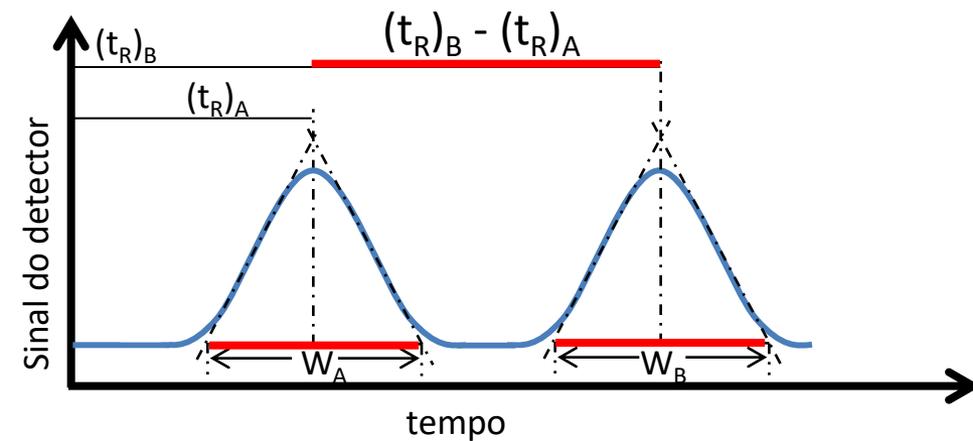
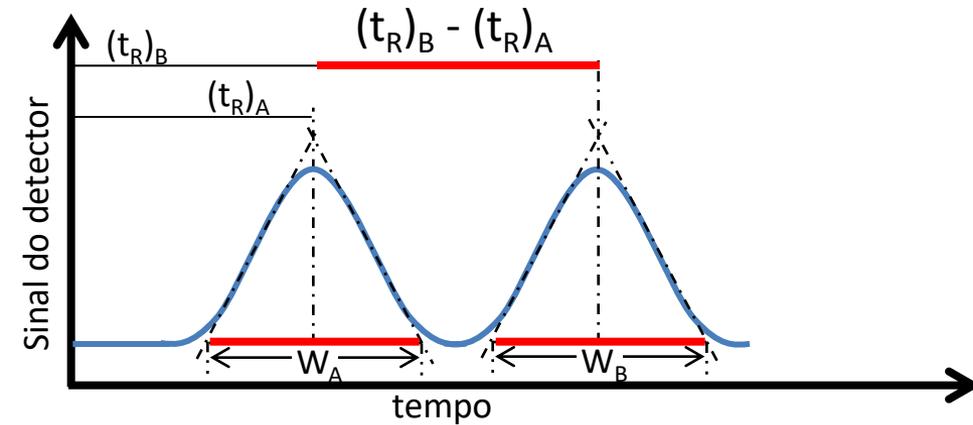


CROMATOGRAFIA: Medida quantitativa da separação de 2 picos consecutivos

Resolução (R_S)

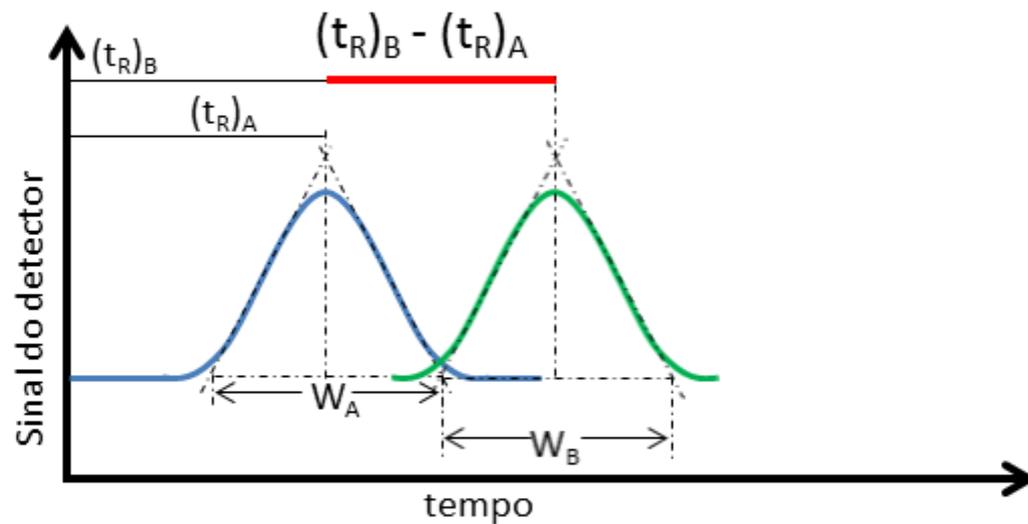
$$R_S = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)}$$

Unidades: t_R e W
São expressos na mesma unidade



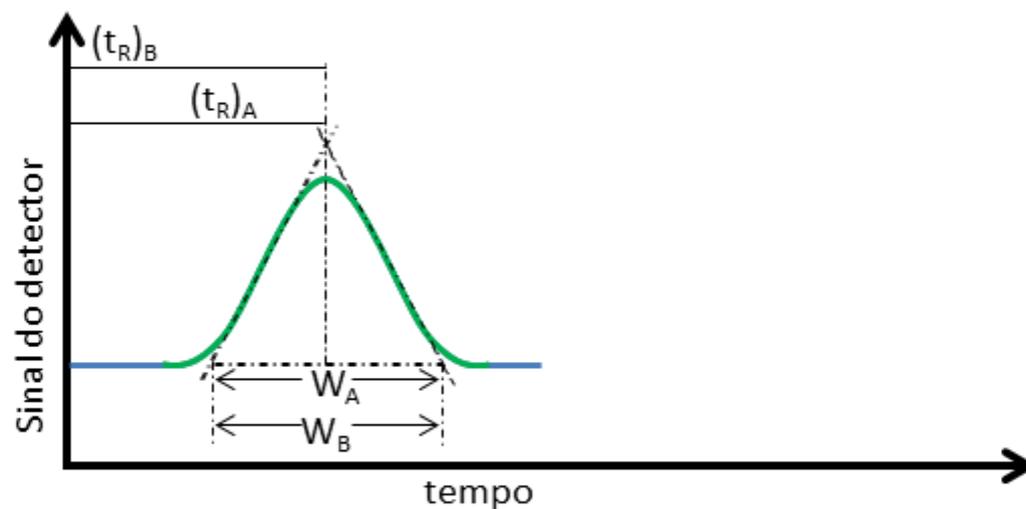
CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

$$R_E = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} = 1$$



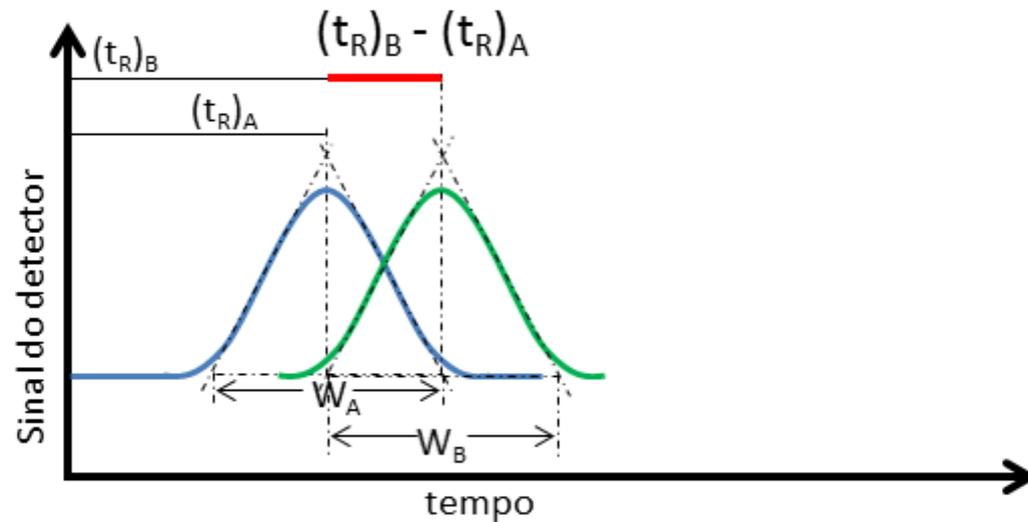
CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

$$R_E = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} = 0$$



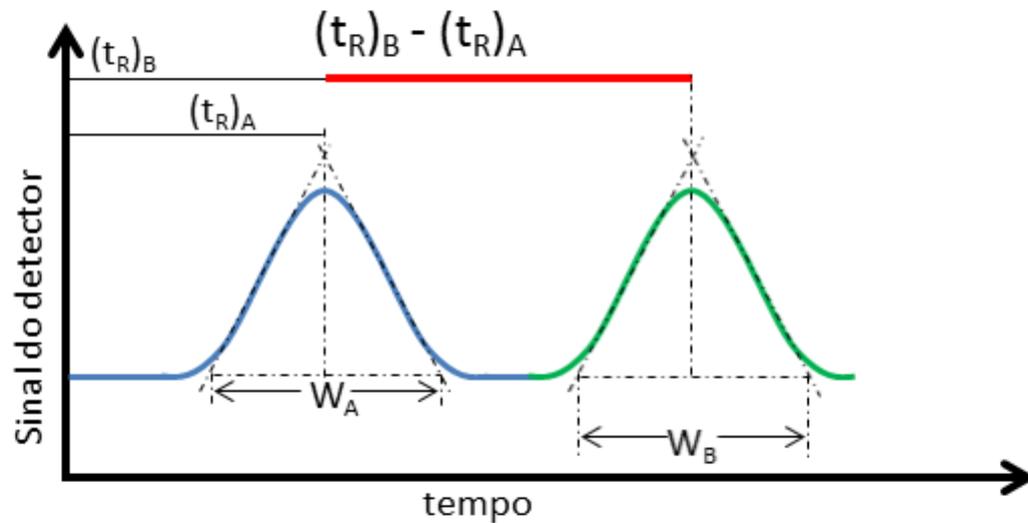
CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

$$R_E = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} \quad 0 < R_E < 1$$



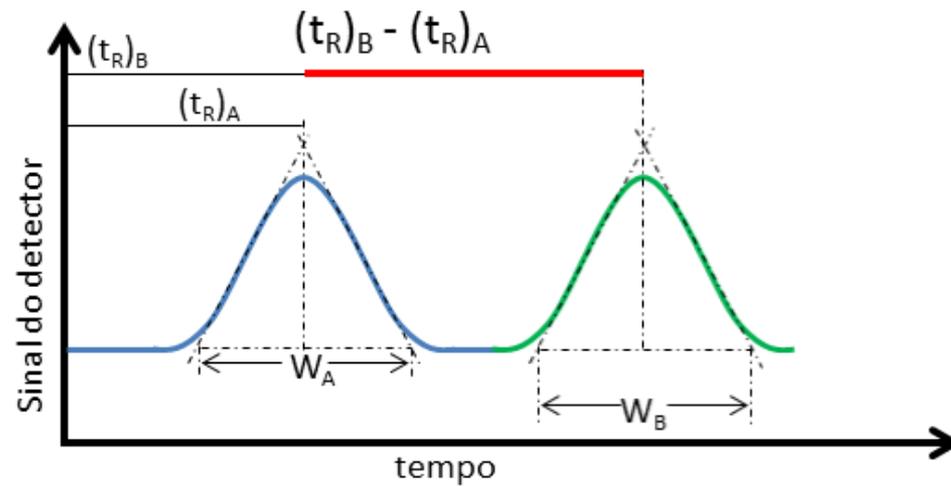
CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

$$R_E = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} > 1$$



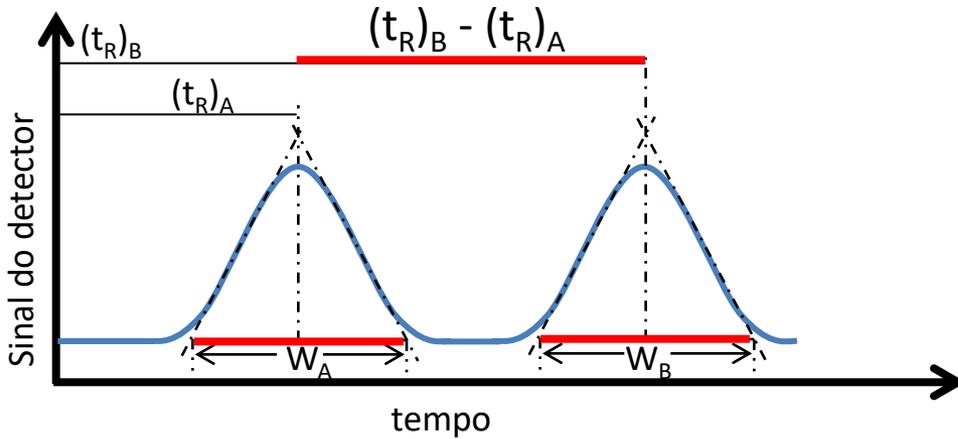
CROMATOGRAFIA: CÁLCULOS

$$R_E = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)} > 1$$



CROMATOGRAFIA: Medida quantitativa da separação de 2 picos consecutivos

Resolução (R_S)

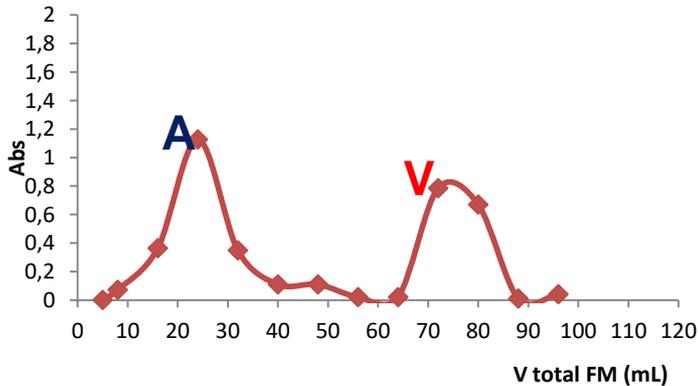


$$R_S = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)}$$

Unidades: t_R e W
São expressos na mesma unidade

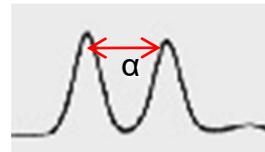
Faça o seu!!!

$R_S = ?$



Resumão:

- FATOR DE RETENÇÃO (k): razão entre a massa do soluto presente na FM e na FE.
 - ◆ Quanto maior o k , maior o tempo de retenção na coluna.
 - ◆ Juntamente com o fluxo, determina o TR do pico.
- SELETIVIDADE (α): relação entre o tempo que 2 solutos passam na fase líquida.
 - ◆ Mede a capacidade de separação entre 2 picos e é alterada com a troca do solvente da FM, pH, FE e temperatura.



Resumão:

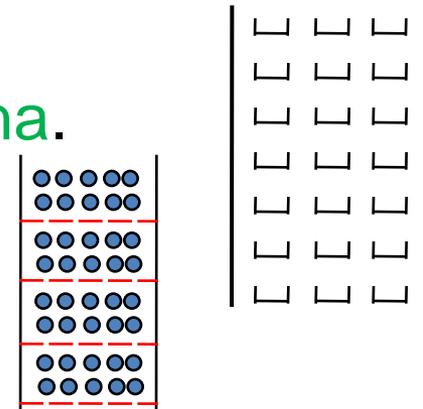
- EFICIÊNCIA DA COLUNA:

Número de pratos teóricos (**N**): número de distribuição de equilíbrio entre a fase móvel e a estacionária.

◆ Quanto maior o n° de **N**, mais eficiente a coluna.

- RESOLUÇÃO:

Medida quantitativa da **separação de 2 picos consecutivos**, determinada pela distância entre os t_R s e a largura da base dos picos.



FÓRMULAS

$$K_A = \frac{[A]_{FE}}{[A]_{FM}}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

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

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

$$u = \frac{L}{t_M}$$

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_C V_E / V_M}$$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_E}{t_M}$$

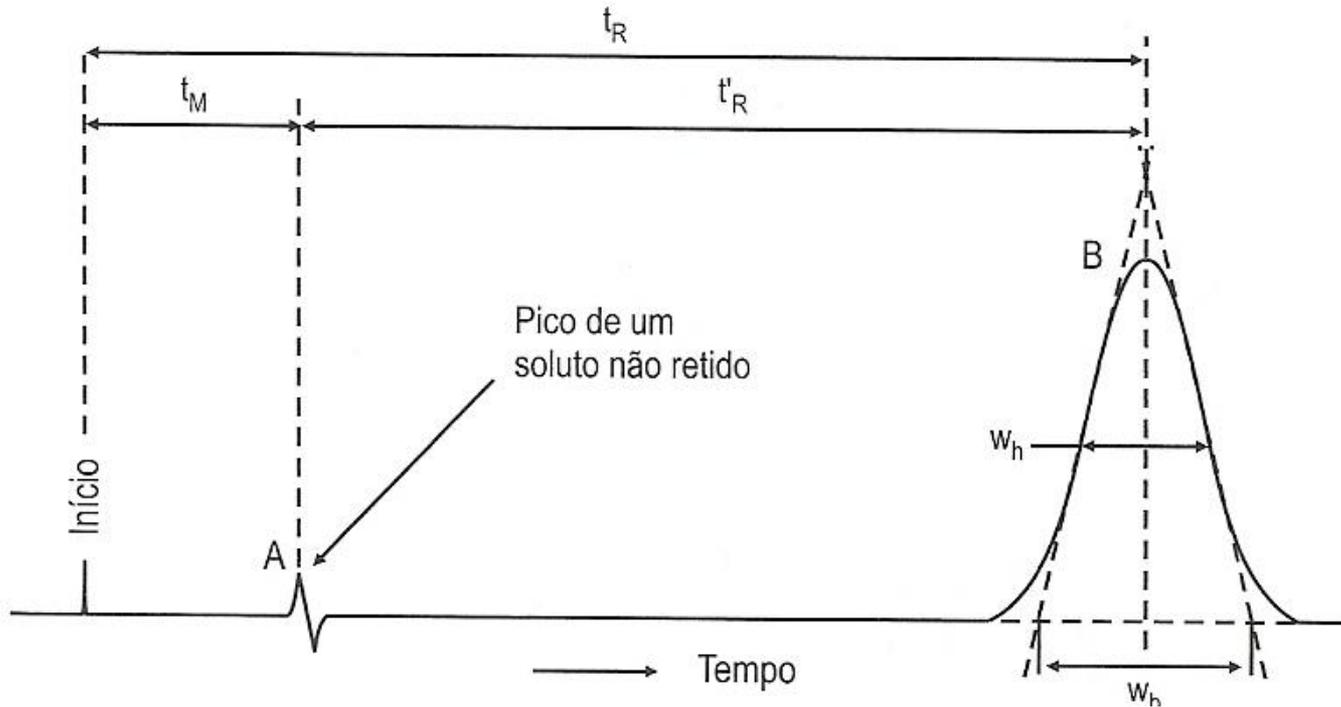
$$\alpha = \frac{(t_E)_B}{(t_E)_A}$$

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$$R_E = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A + W_B)}$$

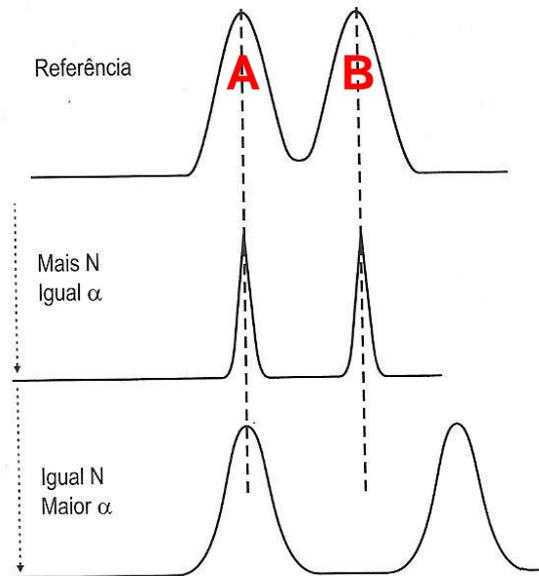
DEFINIÇÕES GERAIS:



$$\alpha = \frac{T_R (B)}{T_R (A)}$$

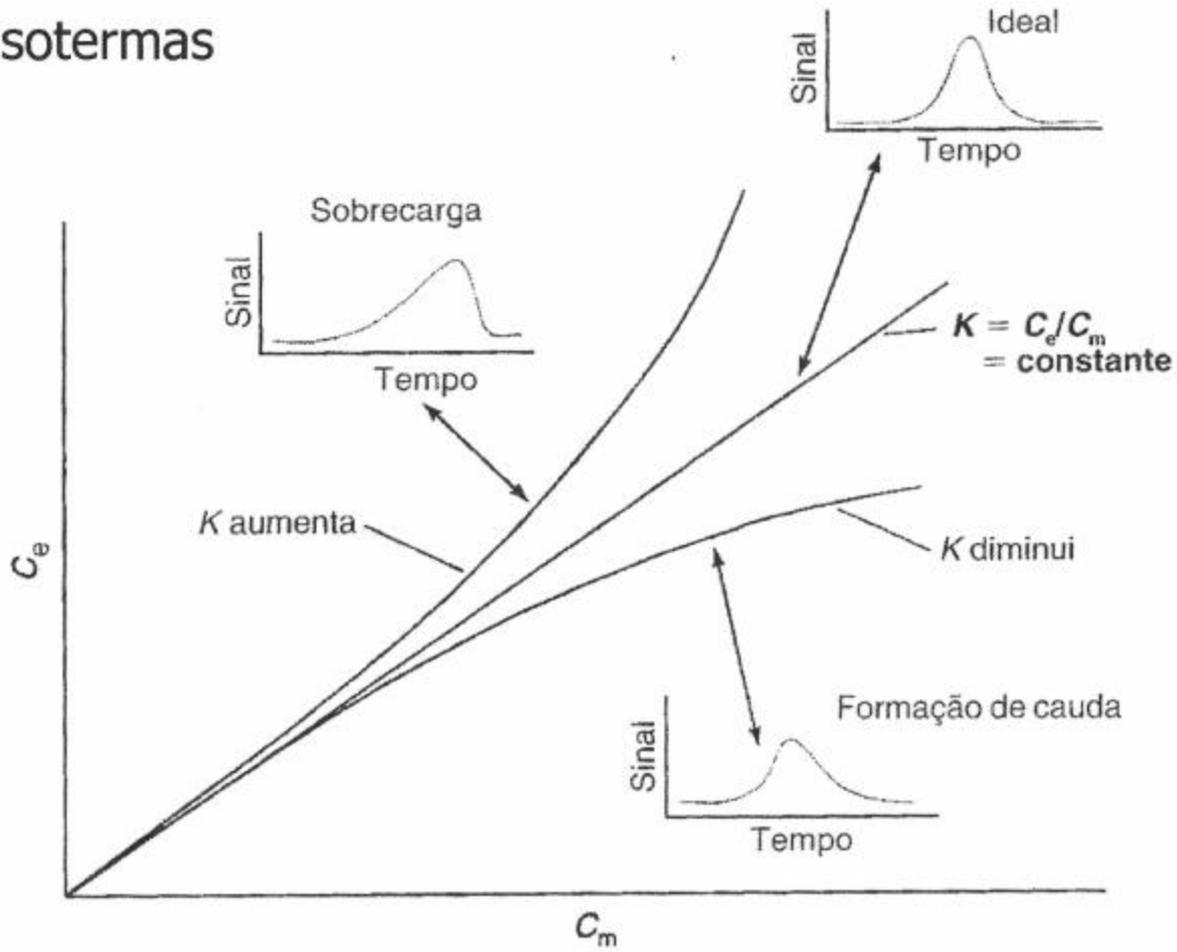
$$R_s = \frac{\Delta t}{W_b^2}$$

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{W_b} \right]^2$$

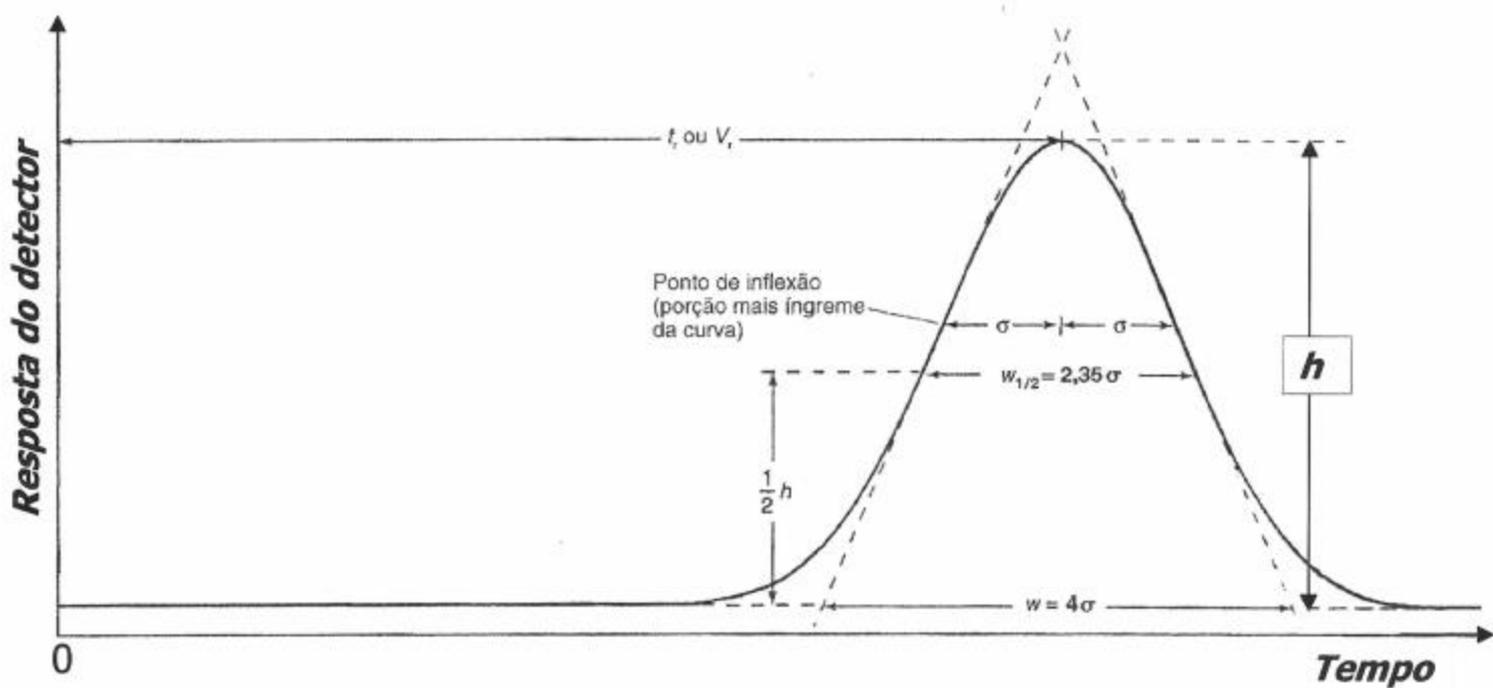


Assimetria dos Picos (A_s)

Isotermas



Dispersão



w : largura medida na base do pico

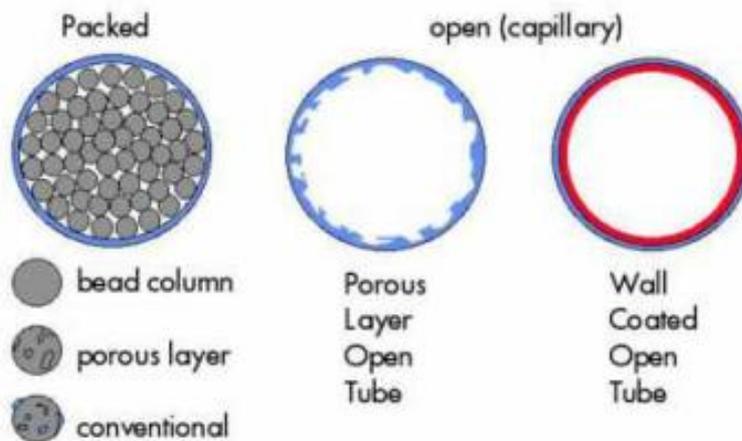
$w_{1/2}$: Largura medida à meia altura

σ : Desvio padrão

h : Altura do pico

<http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/gc/>

Types of columns



1/4" packed column



Fused silica capillary column

