

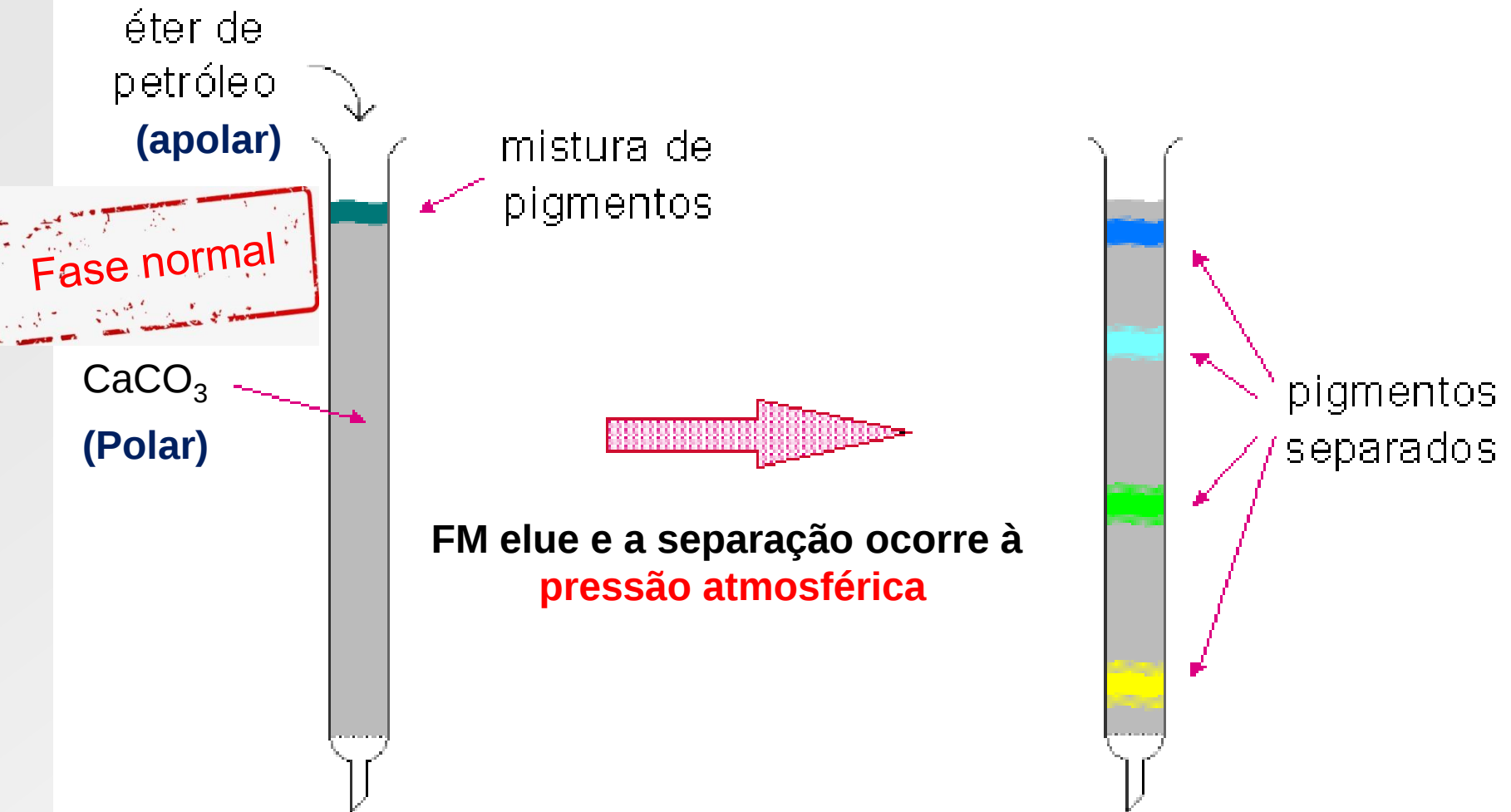
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Prof. Marcel Piovezan

marcel.piovezan@ifsc.edu.br

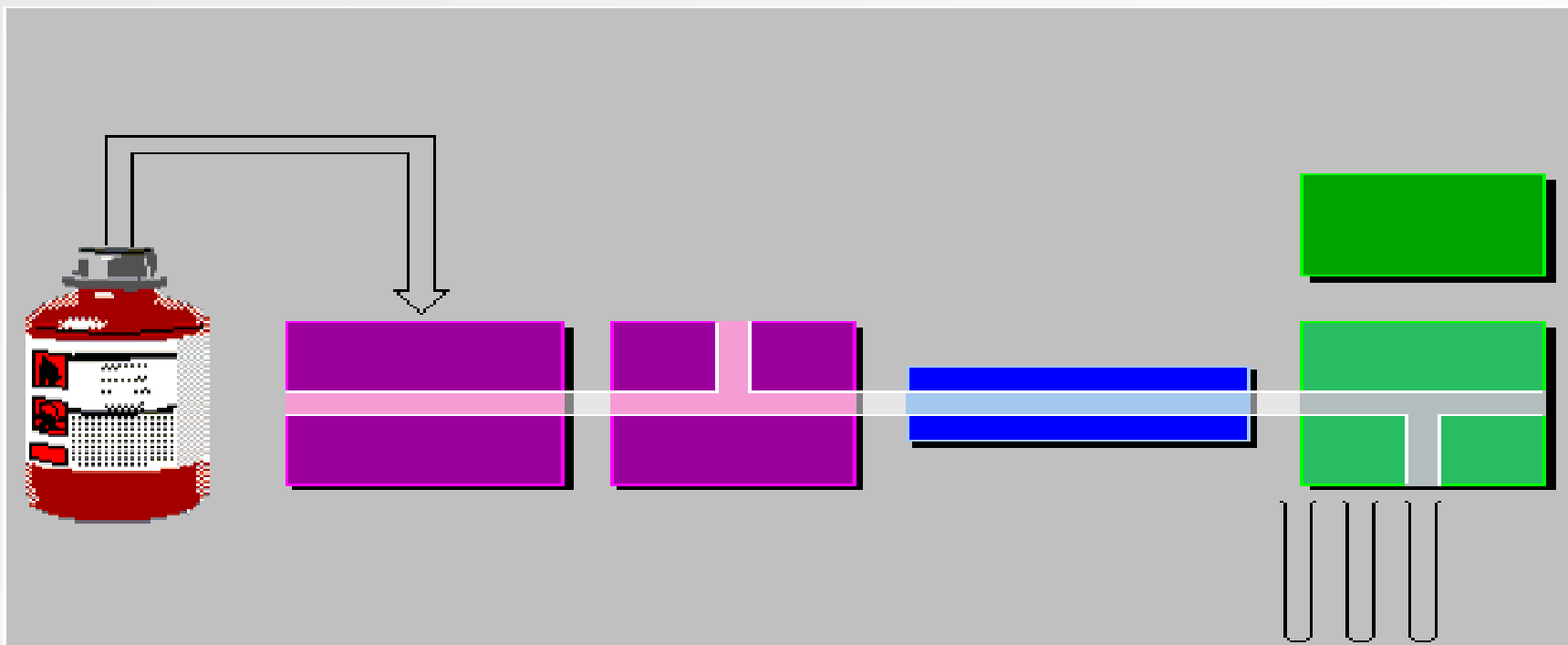
UC: Análise Instrumental II

LC x HPLC

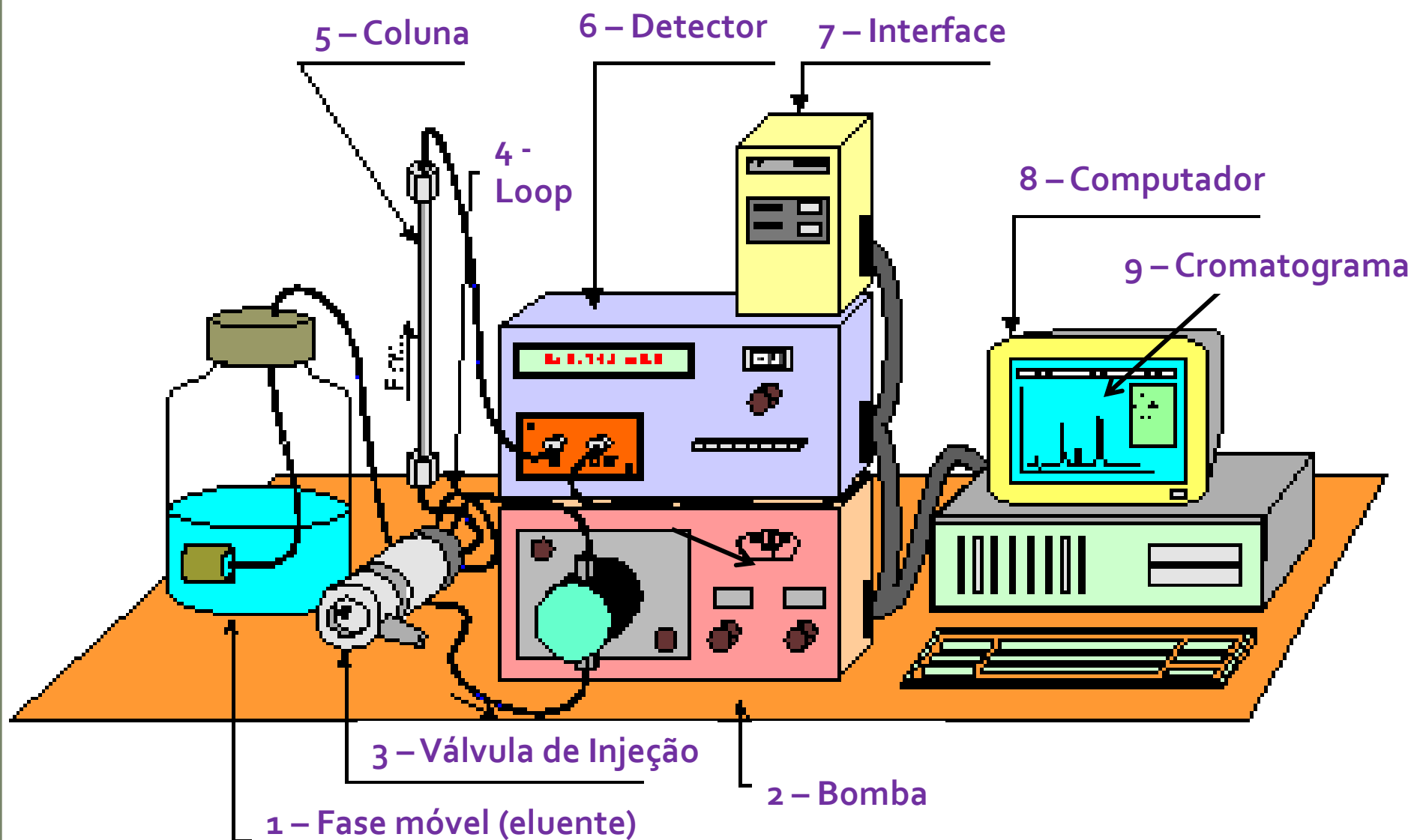


Mikhail Tsweett (1872-1919) – Botânico russo: usou uma **coluna empacotada** contendo carbonato de cálcio como fase estacionária para separar pigmentos coloridos de extratos de plantas; fase móvel utilizou éter de petróleo

“HPLC usa **pressões elevadas** para forçar a passagem do solvente através de **colunas fechadas** que contém **partículas muito finas** capazes de proporcionar **separações muito eficientes** (com alta resolução)”. Daniel C. Harris.



HPLC - Instrumentação básica



Instrumentação

1- reservatório da fase móvel e sistemas de tratamento de solvente



- Recipientes contendo fase móvel que será bombeada para dentro do sistema analítico.

Características desejadas para reservatórios de FM são:

- Reservatórios com capacidade de 1 a 2 L, vidro (**borossilicato**) ou dependendo da FM – outro **polímero conveniente ou teflon**;
- Sua **tampa deve conter furos** para a **passagem de tubulações**, as quais servirão de canal de passagem de fase móvel (linha de solvente). A superfície livre dos **furos** deve ser a menor possível a fim de **evitar a difusão de solvente para a atmosfera**;
- É imprescindível proceder-se a **degaseificação da FM**: Eliminar gases nela dissolvidos que poderão, principalmente na bomba, criar bolhas, causando aumento do ruído da linha de base;
- A linha de solvente deve possuir obrigatoriamente um filtro para reter partículas sólidas porventura existente – **vidro sinterizado**.



Instrumentação

1-reservatório da fase móvel e sistemas de tratamento de solvente



- Equipados com dispositivo para remoção de gases dissolvidos (O_2 e CO_2) a fim de evitar formação de bolhas: **causam alargamento de bandas** ou **interferem na eficiência do detector** → "*degasser*" remove o ar logo antes de entrar na bomba

- Desgaseificadores:

**IDEAL: vácuo +
ultra-som +
agitação
simultaneamente:
total de 2 a 5
minutos**

ultra-som → muito lento, pouco eficiente, requer agitação, em geral o pior método quando utilizado sozinho

bomba de vácuo → lento (mínimo 20 min, o que pode alterar a concentração da FM, requer agitação

dispositivos para aquecimento e agitação do solvente

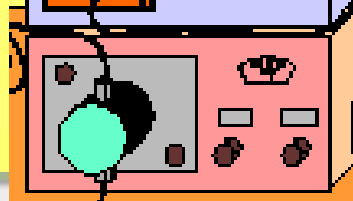
borbulhamento de gases inertes (He ou N_2) junto com agitação

**CERCA DE 50% DE TODOS OS PROBLEMAS DE ANÁLISE E COM
O EQUIPAMENTO TEM ORIGEM NA FASE MÓVEL**

(reagentes inadequados)



Instrumentação



2- Bomba

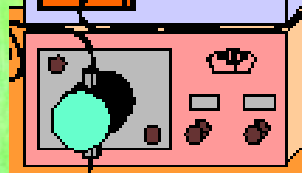
REQUISITOS:

- Pressões de até 10 000 psi ($\sim 680,4$ atm)
- a maioria das partes de uma bomba de LC que entram em contato com a FM são construídas de **aço inoxidável**
- **vazão contínua**, sem pulsos (ou, **se pulsando**, com amortecedor de pulsos)
- **vazões de 0,01 a 10 mL/min** (aplicações analíticas)
- Até **100 mL/min** (aplicações preparativas)
- Devem pressurizar os solventes com precisão e exatidão (melhor que 0,5 %)
- Devem ser compatíveis com:
 - **ampla faixa de fluxo do solvente; fáceis de trocar de solvente; e atender aos gradientes de eluição.**

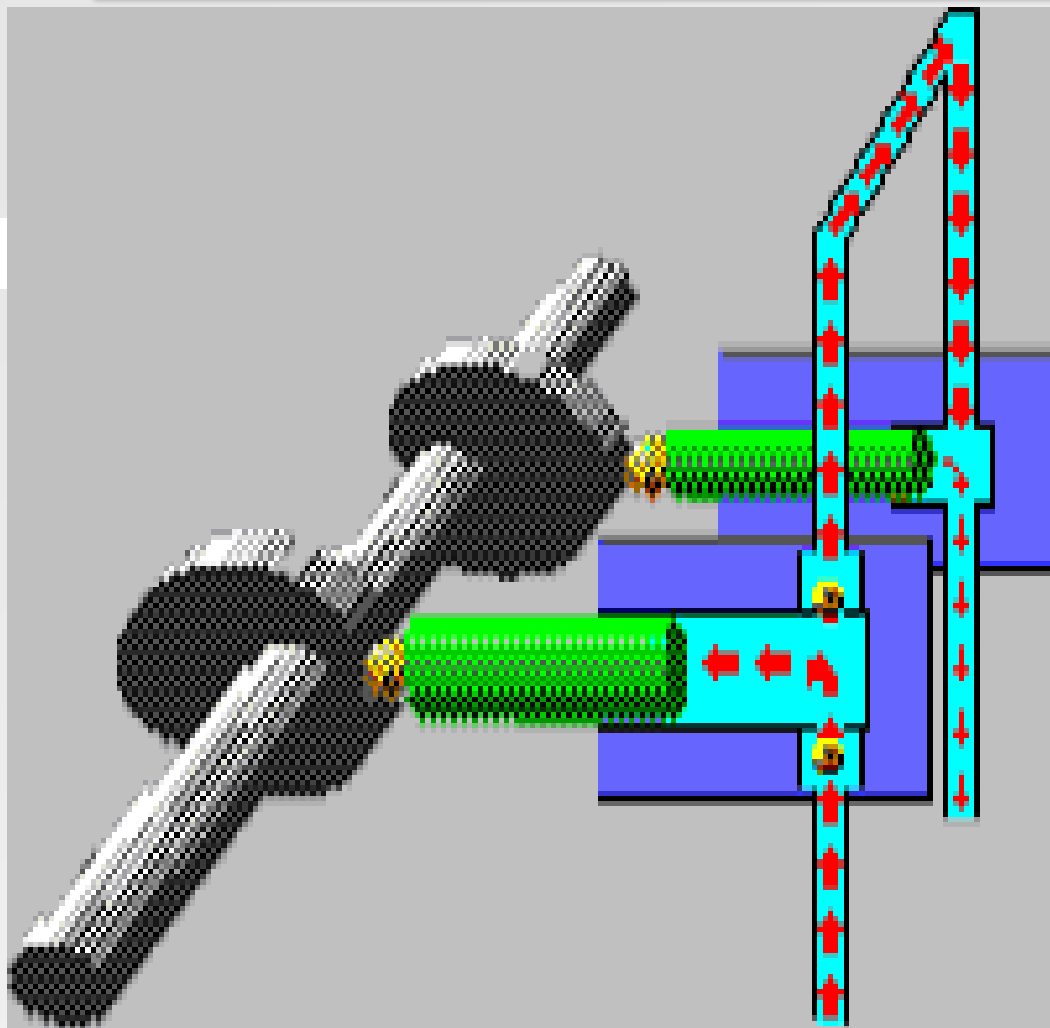
2 TIPOS:

- bombas pneumáticas → recheio de colunas (gera elevadas pressões)
- bombas mecânicas: **recíprocas** → **mais utilizadas (equipamentos comerciais)**
deslocamento (tipo seringa) → alto custo

Instrumentação



2- Bomba Recíproca



- 2 válvulas (**esferas de safira**) são abertas e fechadas alternadamente para controlar a vazão de solvente dentro e fora do cilindro; **solvente está em contato direto com o pistão**

VANTAGENS:

- ↑ **pressões** de saída (até 10.000 psi)
- ↓ **V_{interno} (35 a 400 μL)**
- fácil adaptação a eluição em gradiente
- Vazão constante
- fluxo independe da pressão de retorno da coluna e da viscosidade do solvente

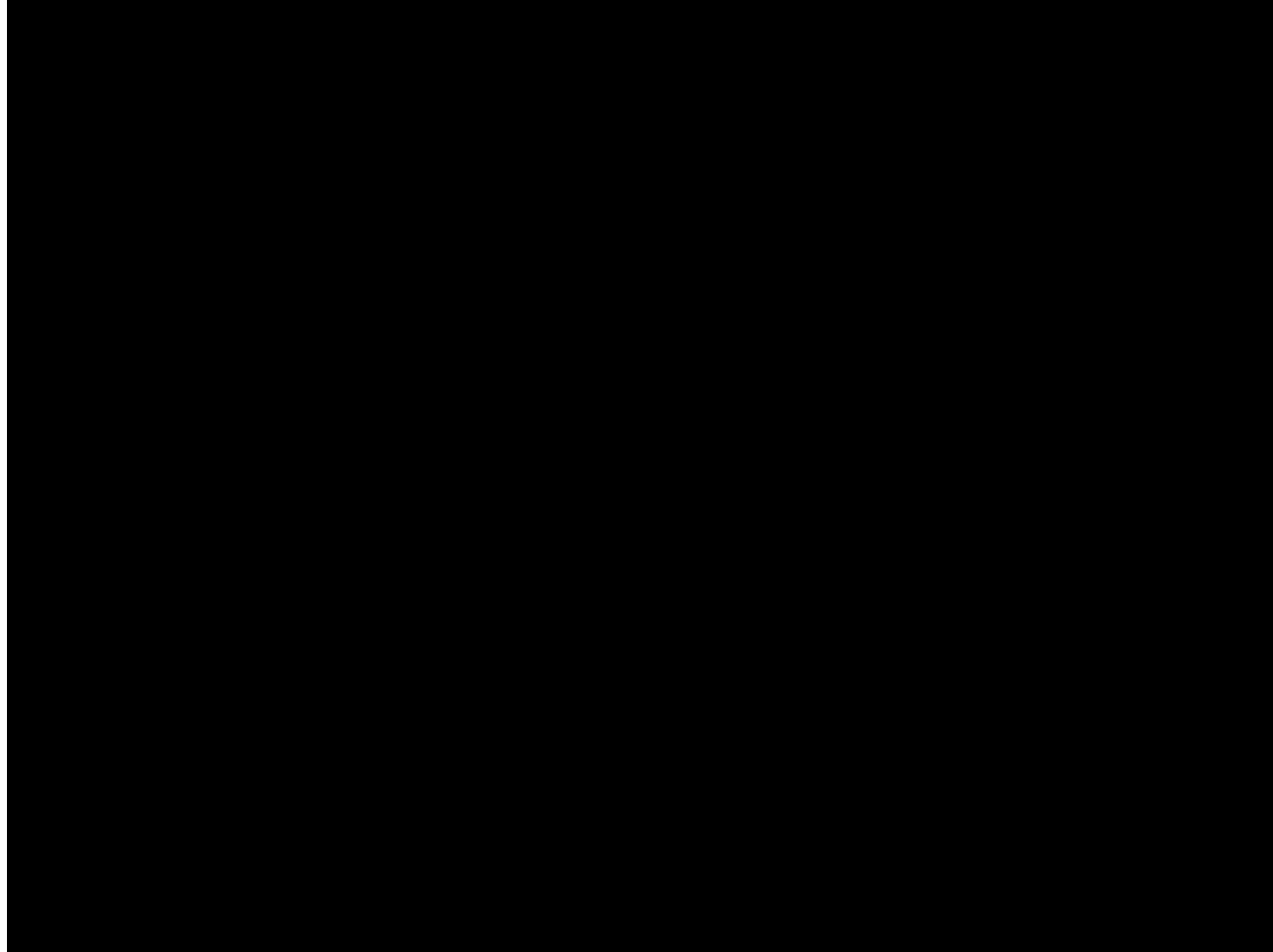
Tipos de Eluição

- **Isocrática**: A composição da fase móvel (%) **permanece constante** durante toda a análise cromatográfica. É realizada com um único solvente ou mistura constante de solventes.
- **Gradiente**: Ocorre **alterações da composição da fase móvel (%)** durante a execução da análise.

Bomba binária

Atualmente são **duas bombas de pistão** operando juntas. A taxa de fluxo relativo de cada bomba proporciona a mistura dos solventes.

As bombas operando em mesma taxa de fluxo geram uma mistura de eluição de composição 50 % do solvente A e 50 % do solvente B.
(Azul + Vermelho = Roxo)



Instrumentação

3 – Válvula de Injeção



Válvula de injeção para HPLC com alça de amostragem.

- Substituível;
- Vários tamanhos de volume fixo



<https://www.youtube.com/watch?v=8S-bgyrUfTc>

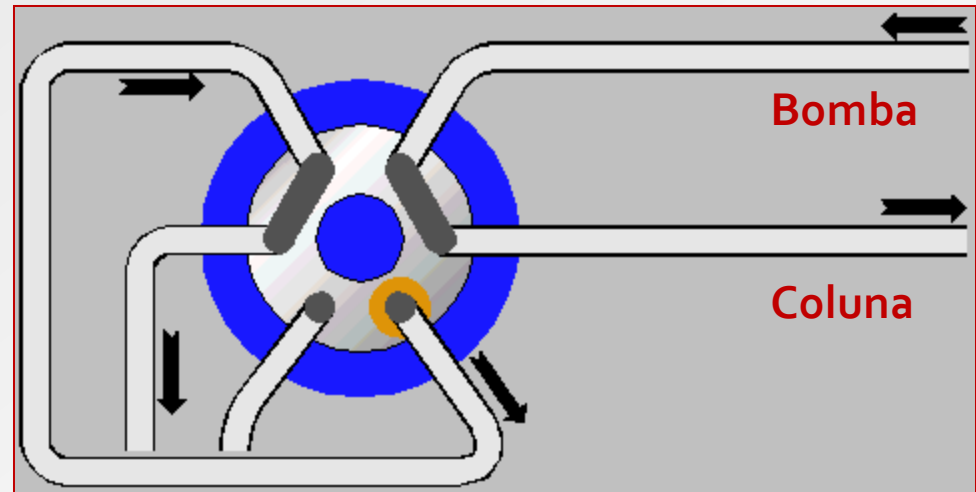
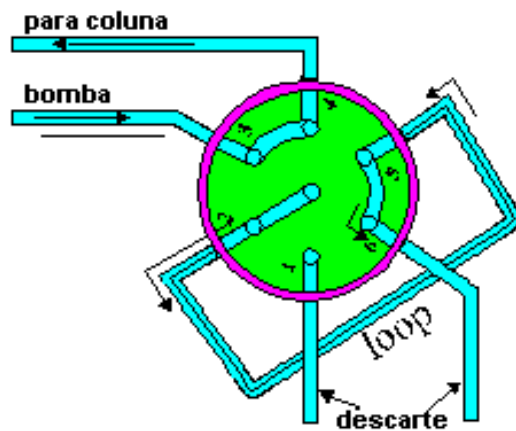
- Fator limitante da precisão: **repetibilidade da injeção**
- **Volumes** devem ser **pequenos**
(evitar alargamento de banda e sobrecarga da coluna, "overload"): < 500 µL
- Conveniente → **injetar amostra sem despressurizar o sistema**
- Sistema mais comum: **alça de injeção (loop)** mediante seringa;
 - escolha de **0,5 a 500 µL**;
 - permite injeção a pressões de até 7000 psi;
 - precisão melhor que 1%

Instrumentação

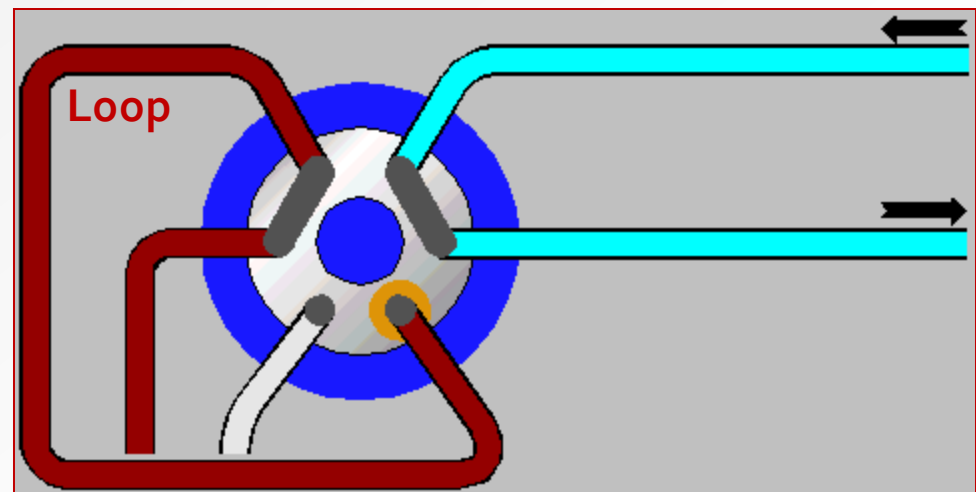
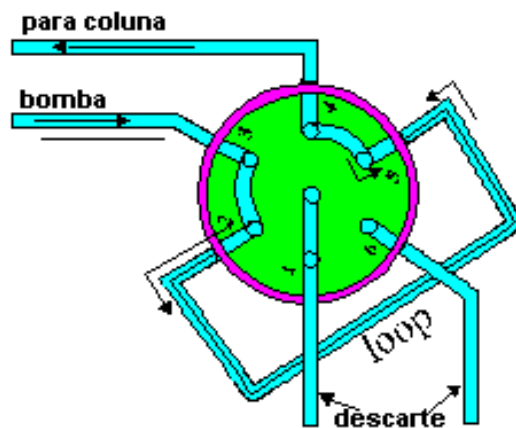


3 – Válvula de Injeção

LOAD



INJECT



➤ Força Eluente

- É uma medida da energia e adsorção do solvente (FM), considerando o valor de pentano como “zero”.
- Quanto maior a força do eluente, mais rápido é a eluição do soluto através da coluna.
- Observem que as FE mais comuns (sílica e alumina) são POLARES. Logo...
- Quanto maior a polaridade de um solvente (FM), maior é sua força eluente.

Instrumentação

Dissolução da amostra para injeção

➤ Série eluotrópica

TABLE 24-2 Eluotropic series and ultraviolet cutoff wavelengths of solvents for adsorption chromatography on silica

Polaridade

Solvent	Eluent strength (ϵ°)	Ultraviolet cutoff (nm)
Pentane	0.00	190
Hexane	0.01	195
Heptane	0.01	200
Trichlorotrifluoroethane	0.02	231
Toluene	0.22	284
Chloroform	0.26	245
Dichloromethane	0.30	233
Diethyl ether	0.43	215
Ethyl acetate	0.48	256
Methyl <i>t</i> -butyl ether	0.48	210
Dioxane	0.51	215
Acetonitrile	0.52	190
Acetone	0.53	330
Tetrahydrofuran	0.53	212
2-Propanol	0.60	205
Methanol	0.70	205

(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

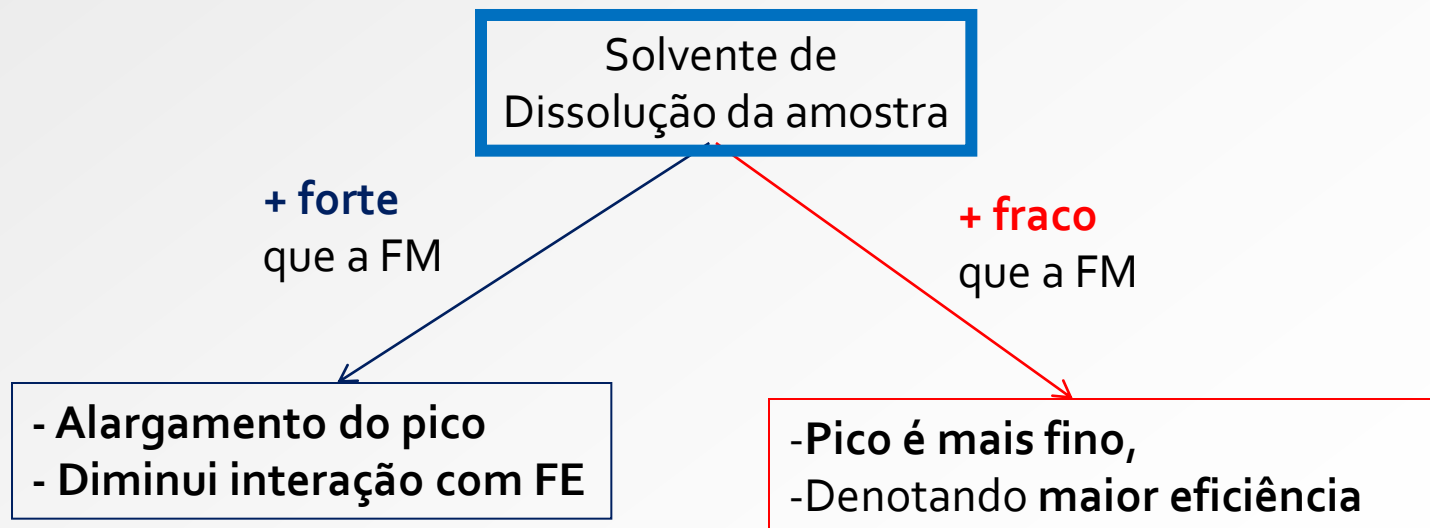
Instrumentação

Dissolução da amostra para injeção

- Sempre que possível, **dissolver a amostra na FM**.

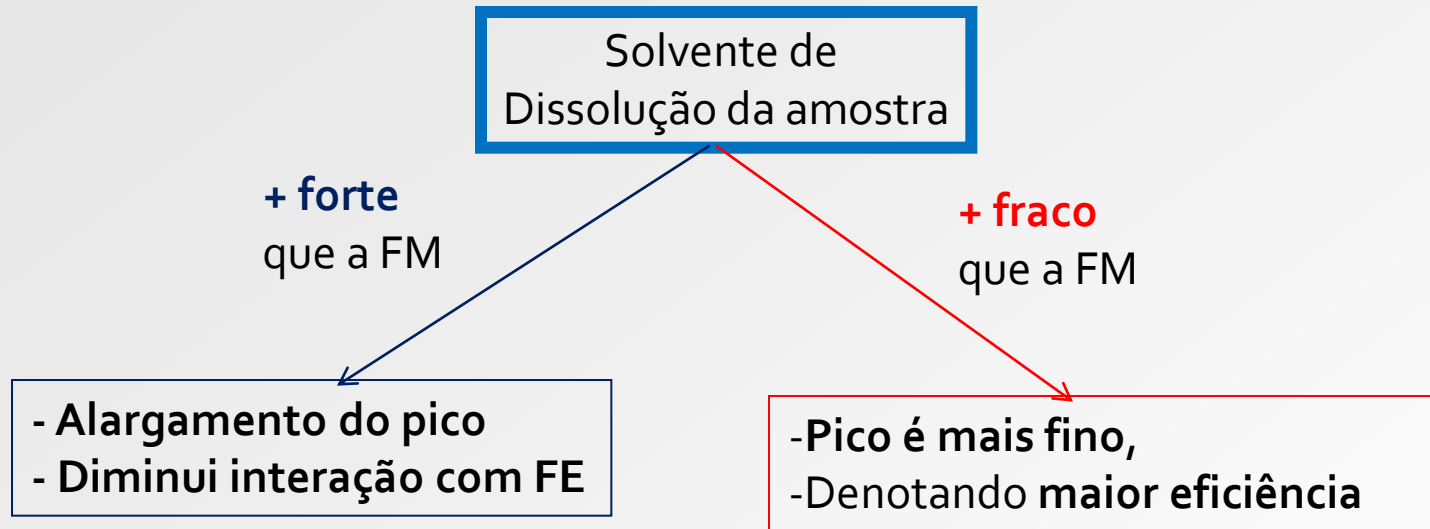
(Se o solvente da amostra é mais forte que a FM, ocorre alargamento do pico, pois o solvente arrasta uma parte da amostra mais rapidamente através da coluna).

Já se a solução da amostra foi feita em solvente mais fraco, o pico é mais fino, denotando maior eficiência.



Instrumentação

Exemplo de efeito na separação

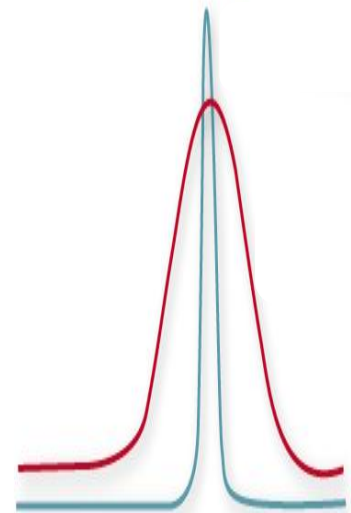


Exemplo: Uma separação foi realizada por HPLC usando sist de n-butanol, para separação de agrotóxicos de uma amostr Para tanto, a coluna utilizada foi de suporte de sílica com fa de água. Se o solvente utilizado na dissolução da amostra d Etanol os picos no cromatograma sofrerão qual efeito?

FM: apolar (n-butanol)

FE: polar (água)

- Alargamento do pico
- Diminui interação com FE





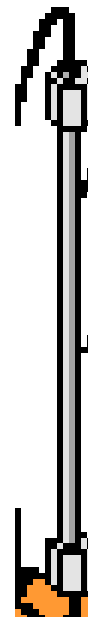
- A solução da amostra deve ser filtrada em **filtros descartáveis**, para evitar que partículas sólidas venham a entupir o **filtro da entrada da coluna** ou danificar o **rotor da válvula de injeção**.
- Para que não ocorra sobrecarga de amostra na coluna e que todos os pratos sejam aproveitados, **não se deve injetar um volume maior que 1% do volume da coluna vazia (V_c)**.

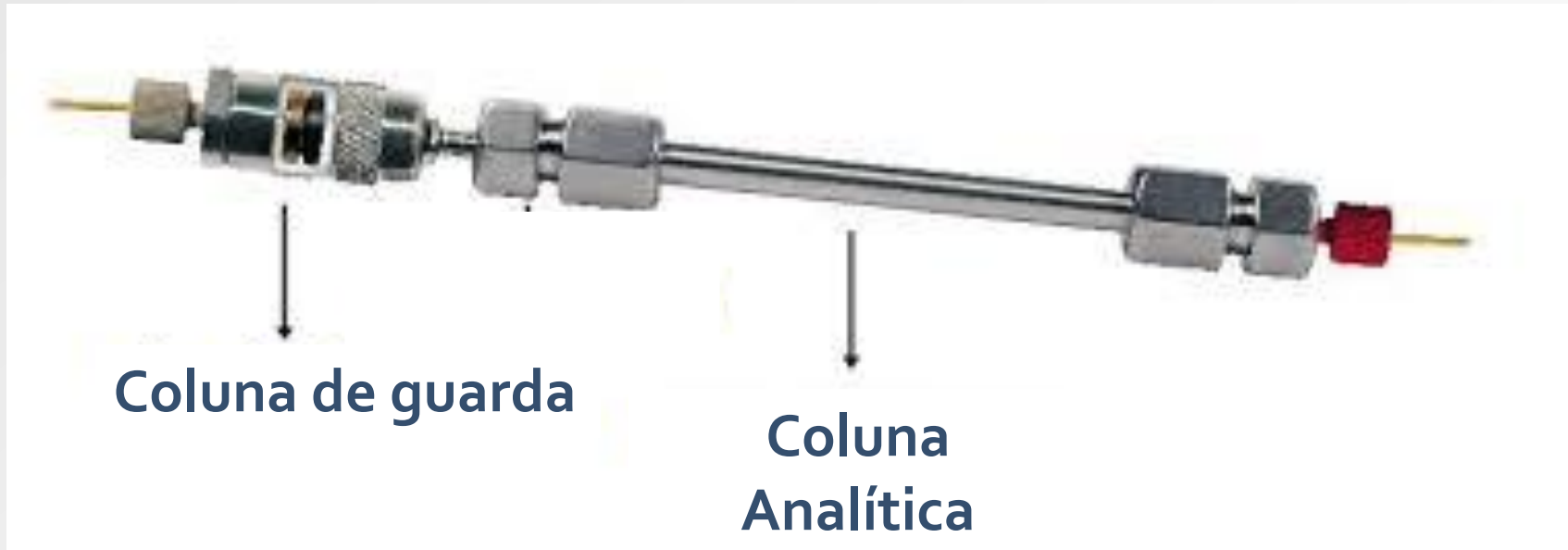
Onde

$$V_c = \pi r^2 L$$

(r , raio da coluna e
 L , o seu comprimento)

- Em geral, **tubos de aço inoxidável**, mas tubos de vidro com paredes resistentes também são encontrados (restritos a pressões mais baixas, 600 psi)
- Diversidade de colunas **recheadas são disponíveis comercialmente**, com preços a partir de **US\$ 500 (colunas quírais > US\$ 1000 ou mais)**





Instrumentação

5- Coluna
(Coluna de guarda)

- **Coluna de guarda:** colocada entre o injetor e a coluna de separação.
- Finalidade: proteger a coluna de separação, aumentando o seu tempo de uso.

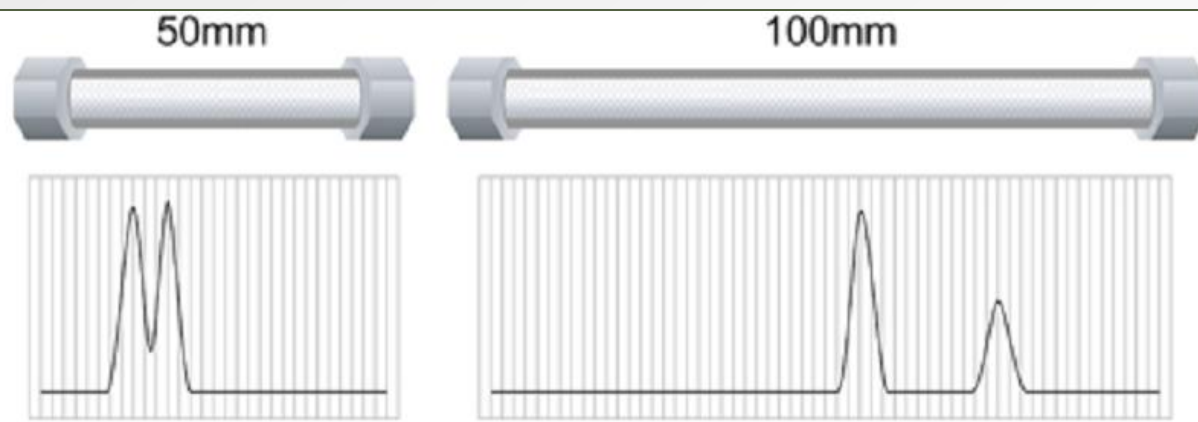
Requisitos:

→ Recheada com a **mesma FE** → previne que **impurezas** como compostos fortemente retidos, contaminem a coluna de separação (fluidos biológicos, matrizes complexas, etc).

→ Normalmente possuem **de 2 a 5 cm de comprimento**, e diâmetro interno igual ao da coluna de separação, para que apresentem as mesmas características (**sem perdas de pressão de fluxo da FM**).



- **Coluna de separação:** em geral de **10 a 30 cm**; 4 a 10 mm diâmetro com **partículas de 1,8, 3, 5 e 10 mm**
- **Eficiências de** (60 000 pratos/m).
- **Termostatização:** em geral coluna é operada a **temperatura ambiente**; no entanto, cromatogramas de melhor qualidade são obtidos quando a temperatura da coluna **é controlada**; fornos aquecidos até 150 °C estão disponíveis.



Instrumentação

5- Coluna
(Recheio/ Fase estacionária)

	Descrição	Polaridade/ interação
Fase reversa	Octadecil (C ₁₈)	Altamente apolar
	Octil (C ₈)	Moderadamente apolar
	Etil (C ₂)	Fracamente apolar
	Metil (C ₁)	Fracamente apolar
	Fenil (PH)	Moderadamente apolar
	Cicloexano (CH)	Moderadamente apolar
Fase Normal	Cianopropil (CN)	Moderadamente apolar/polar
	Diol (2 OH)	Polar
	Sílica (Si)	Polar
Troca iônica	Ácido Carboxílico (CBA)	Troca catiônica fraca
	Ácido Propilsulfônico (PRS)	Troca catiônica forte
	Ácido Benzenossulfônico (SCX)	Troca catiônica forte
	Aminopropil (NH ₂)	Troca aniônica fraca/polar
	Amina Primária/Secundária (PSA)	Troca aniônica fraca/polar
	Dietilaminopropil (DEA)	Troca aniônica fraca/polar
	Amina Quaternária (SAX)	Troca aniônica forte
	Ácido Fenilborônico (PBA)	Covalente





Quiral – (Glicopetídeos) Bioafinidade

HILIC

9 Resultado de Produtos | Critério da Combinação Nome de Produto, Propriedade

12024A ST

5 μm particle size, L $\times$ I.D. 25 cm $\times$ 4.6 mm (Supelco)

◆ SDS

SKU - Tamanho da Embalagem

Disponibilidade

Preço (BRL)	Quantida
-------------	----------

12024A ST

✓ Previsão de entrega em 26.10.18

9,579.00

000000000000000030250

Disponível para enviar no 23.03.10 - DE

4,815.00

5

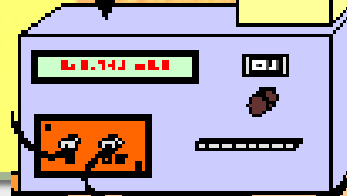
•

É o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico

→ mede de forma contínua alguma **propriedade física ou físico-química** da amostra, ou da solução que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente **proporcional à concentração** do componente da amostra.

Esse sinal é gerado assim que o **eluente sai da coluna** e chega ao detector.





✓ Principais características

- ✓ **Resposta linear para os solutos que se estenda por várias ordens de grandeza:** faixa linear é aquela região da curva de calibração que se ajusta bem a uma reta.
- ✓ **Baixo volume interno:** grande volume pode gerar **alargamento das bandas** geradas
- ✓ **Tempo de resposta curto:** detectores com respostas lentas geram **bandas deformadas (baixa e larga) e com cauda longa**.
- ✓ **Boa estabilidade e repetibilidade:** aumenta a confiabilidade nos resultados.
- ✓ **Não deve ser destrutivo:** permite coletar frações e utilizar detectores em linha.

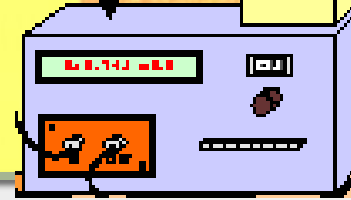
Hifenização

HPLC - MS

LC-ESI-MS/MS



Sorbato
(MAPA)

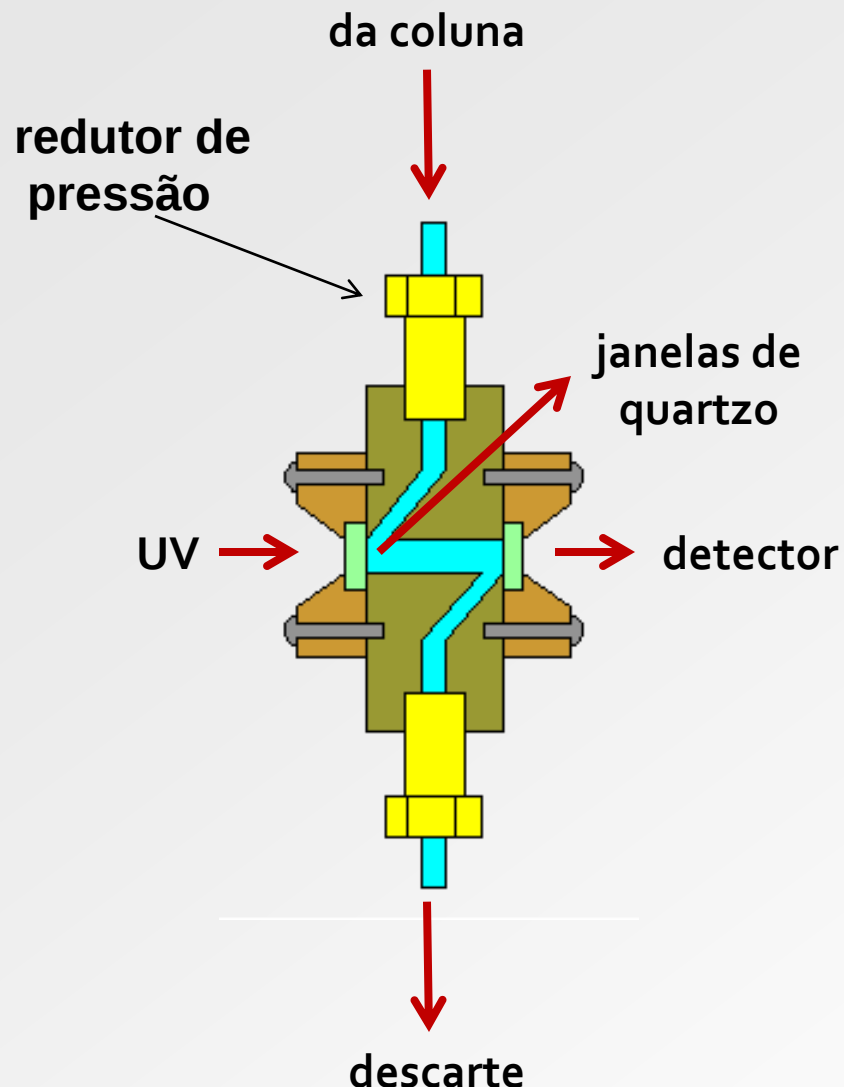
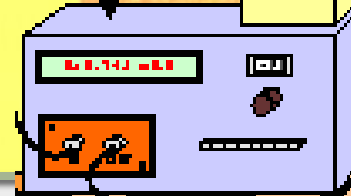


2 TIPOS BASICAMENTE: UNIVERSAL *versus* SELETIVO

Os detectores em cromatografia líquida são de 2 tipos:

DETECTORES DE PROPRIEDADES UNIVERSAIS: respondem às propriedades da fase móvel como um todo, como **índice de refração, constante dielétrica ou densidade**, a qual é modulada pela presença do soluto.

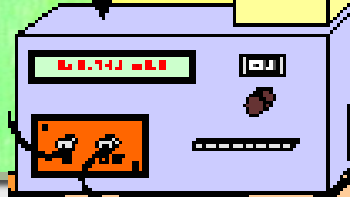
DETECTORES DE PROPRIEDADE DO SOLUTO ou SELETIVOS: respondem a algumas propriedades do soluto (absorvância no **UV-vis, fluorescência**, que não incluem a fase móvel).



- **cubeta de fluxo contínuo** de microdimensões
- diâmetro de **1 mm** e caminho óptico de **10 mm** (volume na ordem de **8 μ L**)
- **volume** é mantido **pequeno** para **minimizar alargamento de banda**: **1-10 mL**
- comprimento: **2-10 mm**
- $P < 600$ psi (**redutor de pressão** é requerido)

Célula



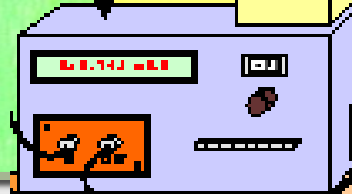


PRINCÍPIO: absorvância da luz por parte da amostra ao passar através desta qualquer radiação eletromagnética (**UV, Vis, IV**)

- **resposta seletiva:** só detecta os **componentes da amostra que absorvem a radiação no comprimento de onda selecionado**; grande maioria das substâncias absorvem radiação **UV**

- Ex.: **olefinas** (hidrocarboneto alifático, ou seja, de cadeia aberta, apresentando pelo menos uma ligação dupla entre os carbonos – **alcenos**), **compostos aromáticos** e compostos contendo **$>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{O}$ e $-\text{N}=\text{N}-$** , dentre tantos outros.

Instrumentação

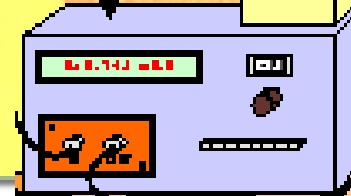


6- Detector
(absorvância)

Table. Molar Absorptivity (ϵ) Values of Various Compound Types at Specified Wavelengths.

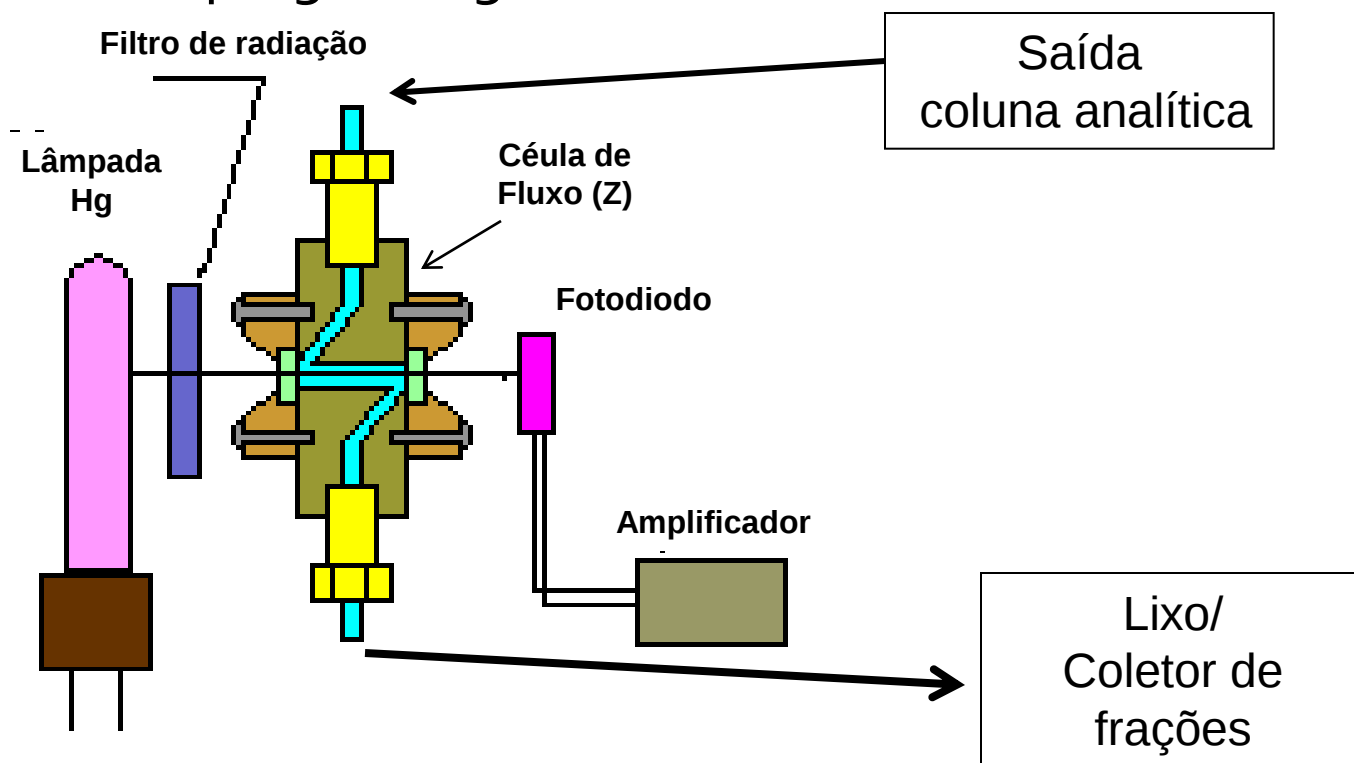
Name	Chromophore	Wavelength [nm]	Molar extinction, ϵ
acetylide	-C≡C	175-180	6,000
Aldehyde	-CHO	210	1,500
amine	-NH ₂	195	2,800
azo	-N=N-	285-400	3-25
bromide	-Br	208	300
carboxyl	-COOH	200-210	50 - 70
disulphide	-S-S-	194	5,500
ester	-COOR	205	50
ether	-O-	185	1,000
ketone	>C=O	195	1,000
nitrate	-ONO ₂	270	12
nitrile	-C≡N	160	-
nitrite	-ONO	220 - 230	1000-2000
nitro	-NO ₂	210	strong

Instrumentação

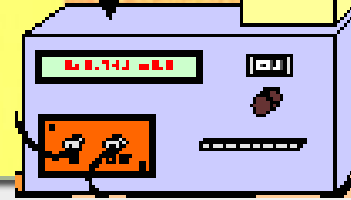


6- Detector
(absorvância)

- **FOTOMÉTRICO:** comprimento de onda fixo (**normalmente 254 e 280 nm**) → **sensível, econômico**. Quando os componentes da FM não absorvem em um grau significativo no comprimento de onda no qual opera o detector, é muito fácil realizar análises empregando gradiente.

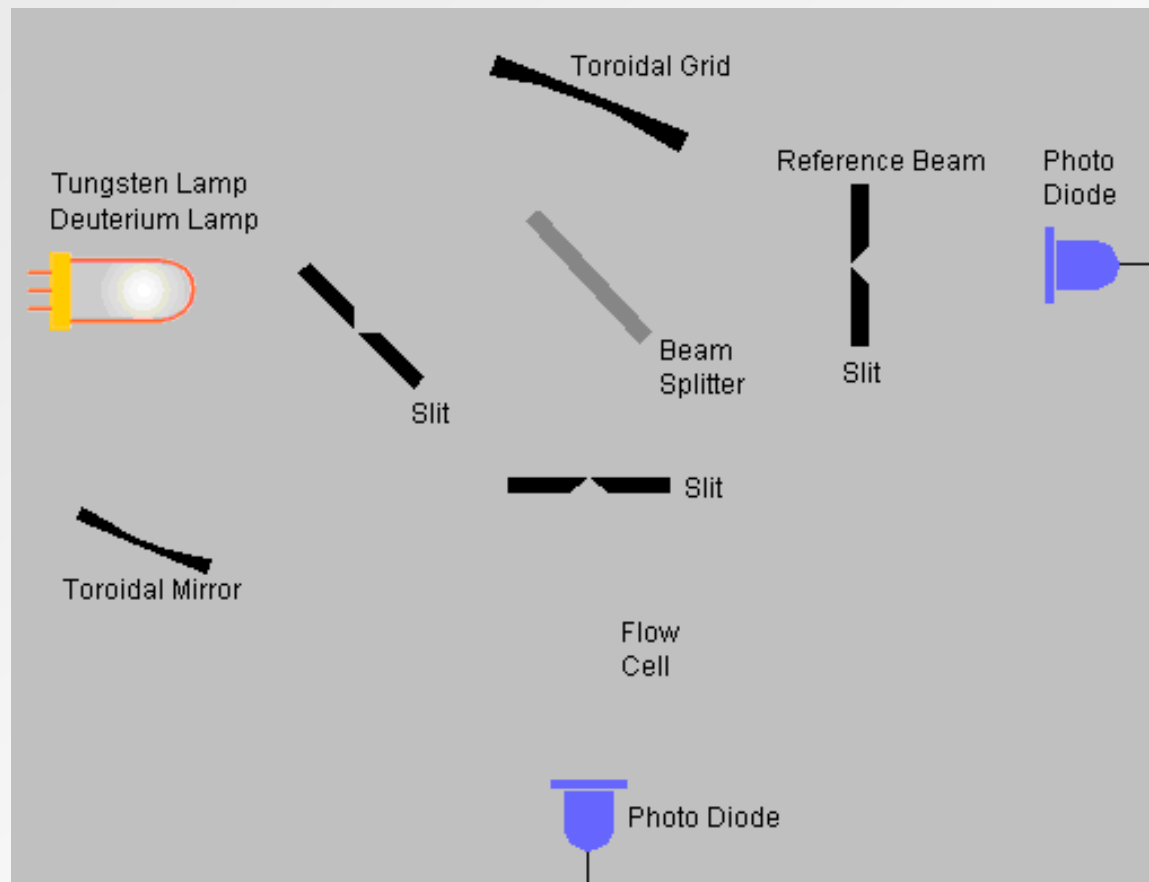


Instrumentação

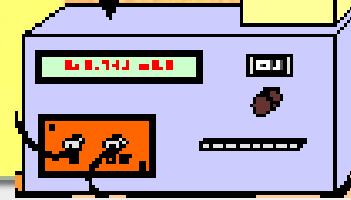


6- Detector
(absorvância)

- **UV-Vis:** cobrindo faixas de **190-800 nm**, através de monocromador, que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (Vis).



Instrumentação

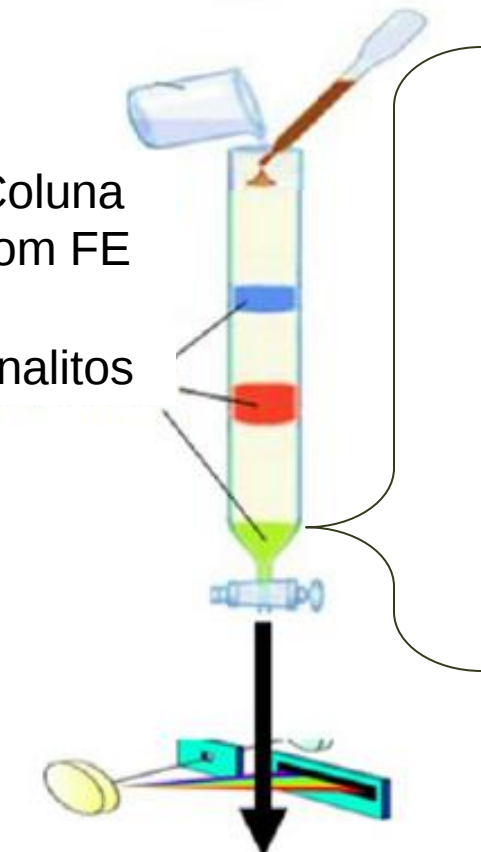


6- Detector
(absorvância)

- **arranjo de diodos (DAD):** todo o espectro pode ser armazenado, apresentando diversas vantagens:
 - Espectros tridimensionais (**absorvância x comprimento de onda x tempo de retenção**)
 - **Conhecimento do espectro** de absorvância de **cada composto** presente na amostra.
 - Obtenção e armazenamento do espectro de absorvância de cada pico durante a corrida – mesmo para picos próximos.
 - **Comparação com biblioteca, determinação de pureza do pico cromatográfico**, detecção simultânea em mais de um comprimento de onda, etc...

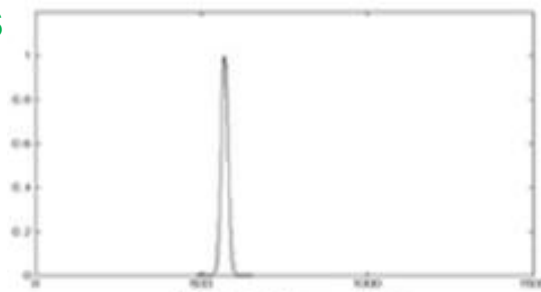
Coluna
com FE

Analitos



Detector Arranjo de
diodos (DAD)

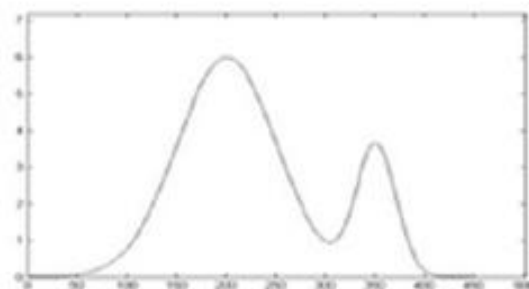
Abs



2D

Tempo de retenção, min

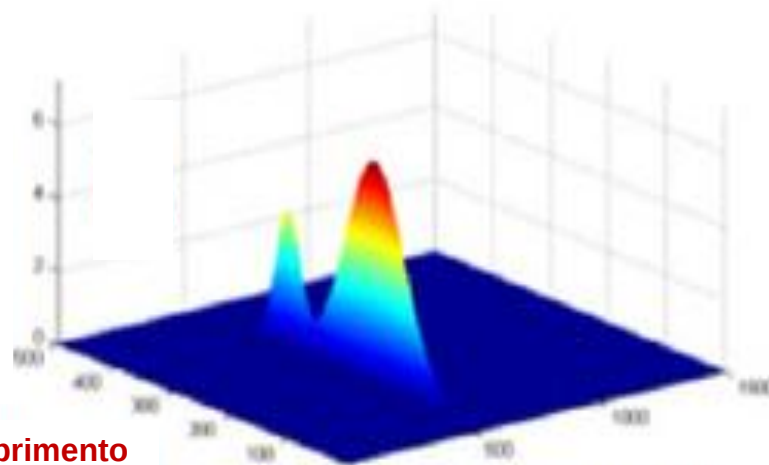
Abs



Comprimento de onda, nm

Abs

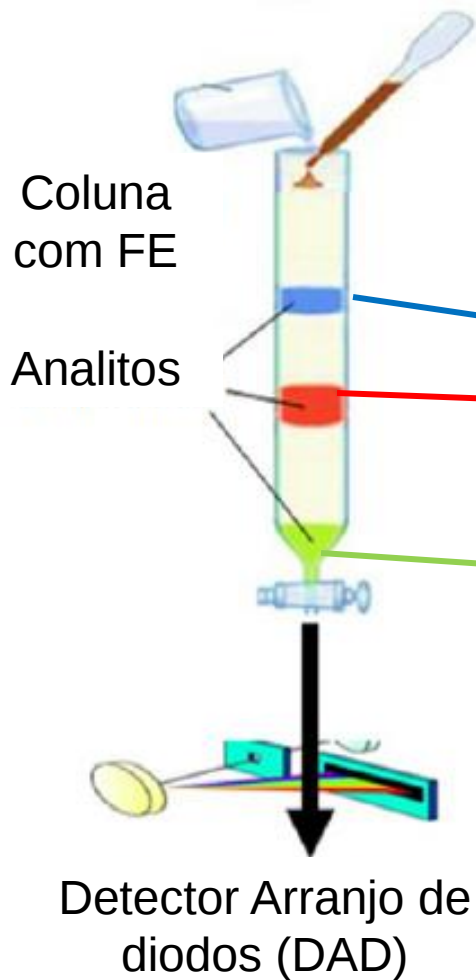
3D



Comprimento
de onda, nm

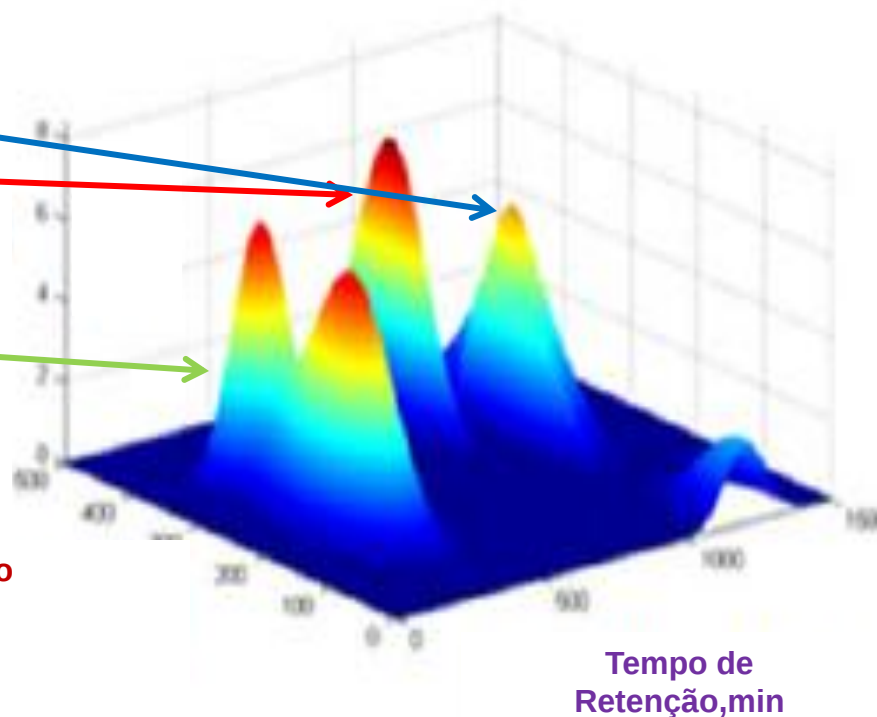
Tempo de
Retenção,min

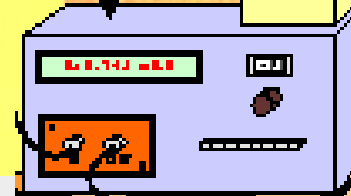
Separação e identificação de 3 analitos: com t_R , espectro UV-vis



Abs

Comprimento
de onda, nm

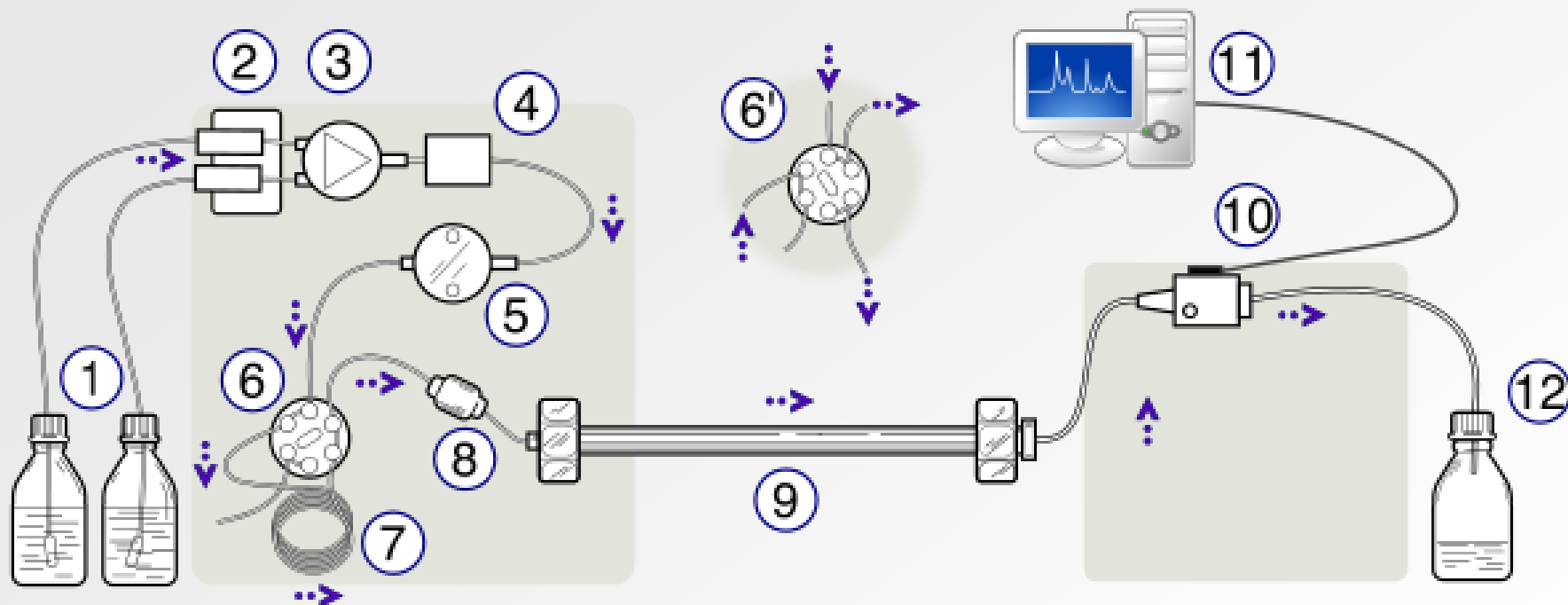




Detetores mais utilizados em HPLC

Detector	Limite de detecção (ng)	Gradiente	Aplicação
Ultravioleta/Visível – UV-Vis	0,1-1	Sim	Seletivo
Índice de refração (IR)	100-1000	Não	Universal
Espalhamento de luz	0,1-1	Sim	Alta massa molar
Eletroquímico – (EC)	0,01-1	Não	Seletivo
Fluorescência – (LIF)	0,0001-0,01	Sim	Seletivo
Espectrometria de massas - MS	0,1-1	Sim	Universal
Infravermelho transformada de Fourier - (FTIR)	1000	Sim	Seletivo

Instrumentação + Real



1 – Reservatório de Solvente
2- Degasser
3- Válvula de gradiente
4- misturador de fase móvel
5 – Boba de alta pressão
6 – Válvula de Injeção

7 – Loop para injeção da amostra
8- Pré-coluna
9- Coluna Analítica
10- Detector (UV-Vis, DAD, IR, LIF)
11 – Aquisição de dados
12 – Lixo ou Coletor de Frações

Cronograma das próximas aulas

- Aula prática 2– Separação de corantes alimentícios por Cromatografia Líquida com detecção por UV-Vis

ROSA, Elisa A. da; SCHELEDER, Michelle Z.. Pinhão, Quirera e Tapioca: das prateleiras para as bancadas dos laboratórios de Química. **Química Nova na Escola**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.383-386, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160051>

- Teoria da separação, Qualidade das separações cromatográficas (Eficiência, Resolução, Teoria dos pratos, fator de retenção)
- Tratamento dos dados experimentais Prática 2 (Avaliação da Qualidade da separação)