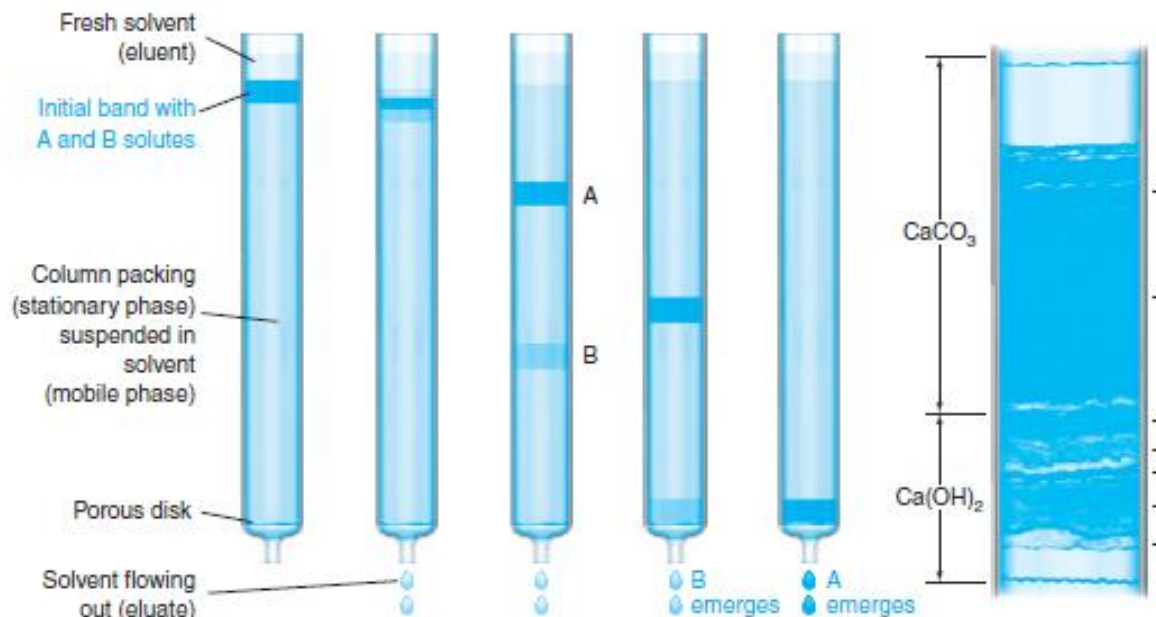


Cromatografia Líquida

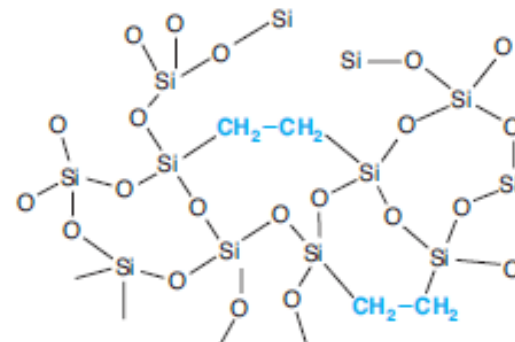
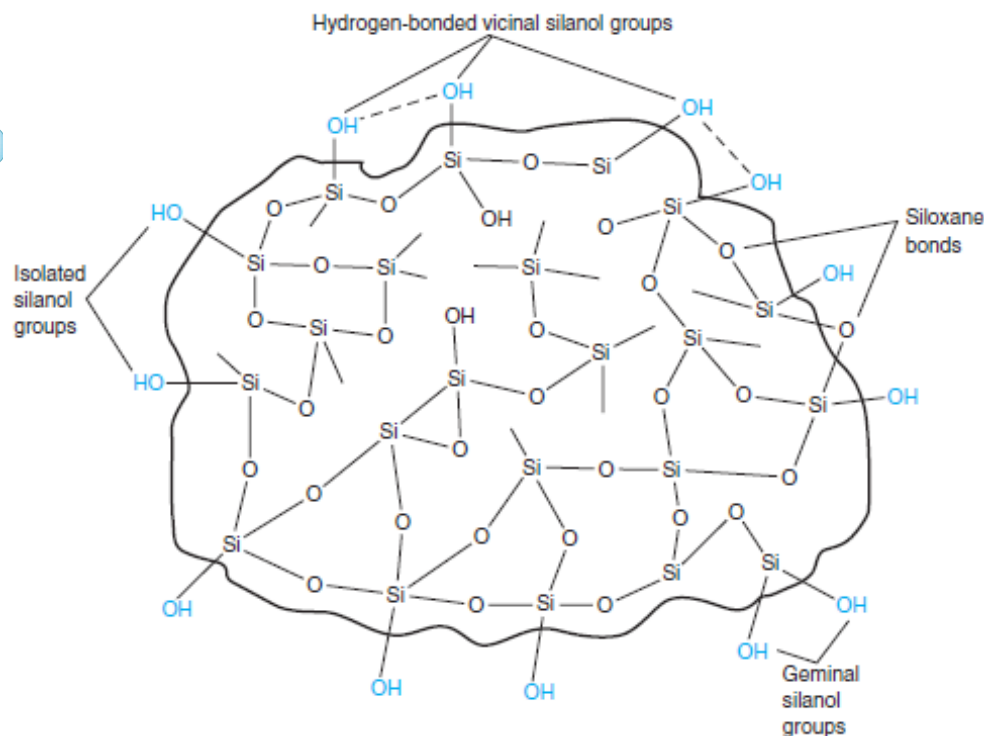


➤ Fase Estacionária

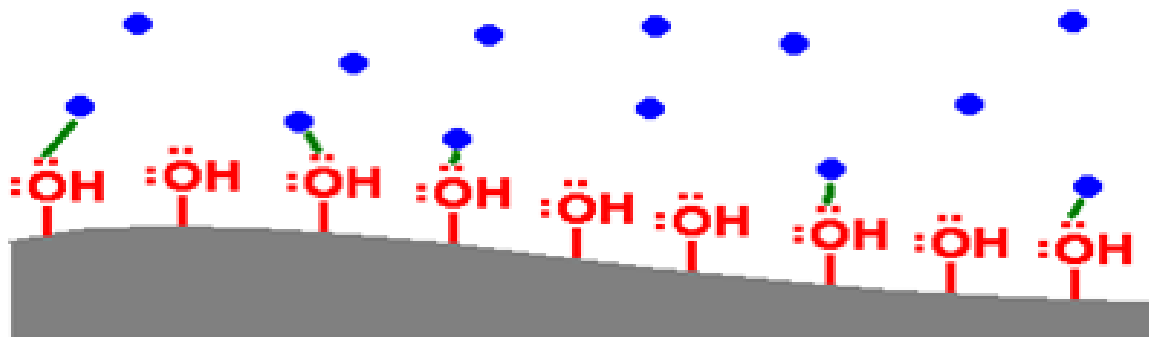
➤ Sílica: $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$, também chamado de ácido silícico é a mais empregada.

➤ Alumina: $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$, também é largamente empregado.

Cromatografia Líquida – Fase Estacionária



➤ O grupo silanol Si—O—H é o sítio ativo de adsorção.



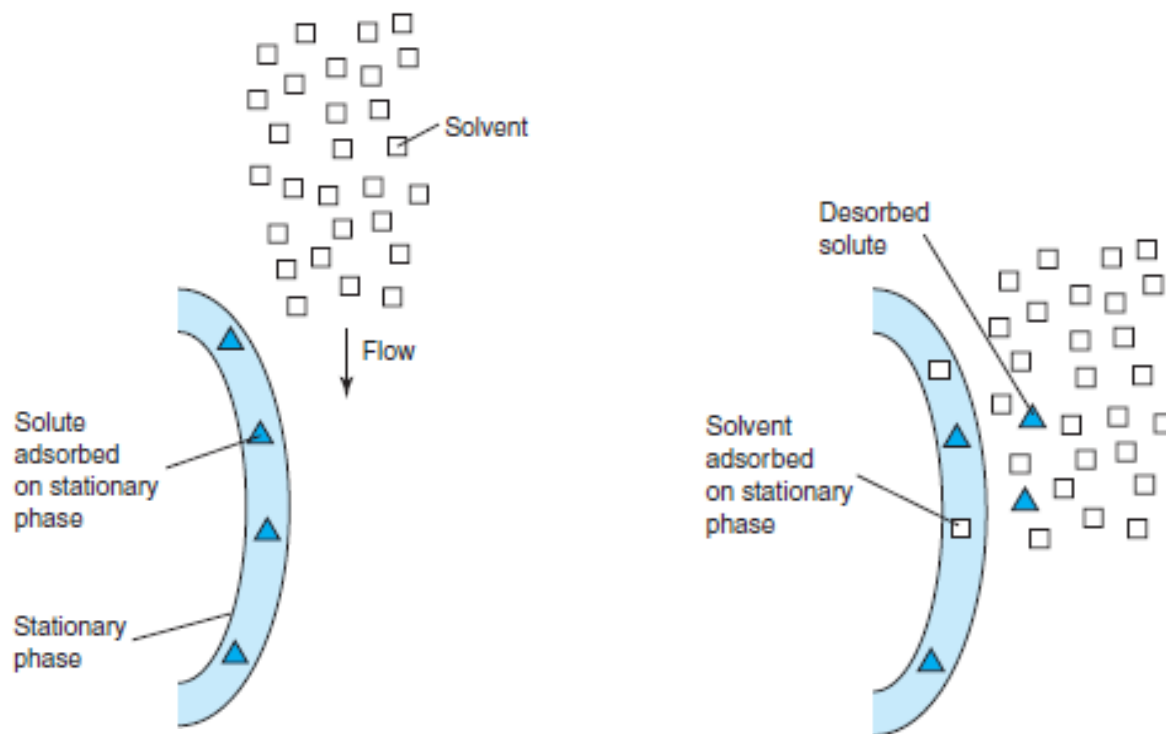
(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

Cromatografia Líquida – Solventes

- A CL é baseada na partição do soluto entre as FM e FE.
- Pode-se entender a CL como uma cromatografia de adsorção, onde o soluto fica adsorvido na FE.
- O solvente (FM), compete com os solutos pelos sítios ativos de adsorção na FE.
- A capacidade de eluição dos solventes independe da natureza do soluto.

Cromatografia Líquida – Solventes

- A eluição é o deslocamento do soluto da FE pelo solvente.



- Quanto mais o solvente se ligar na FE, maior será sua força de eluição, conseqüentemente, menor a retenção do soluto na FE.

Cromatografia Líquida – Solventes

➤ 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.

Cromatografia Líquida – Solventes

➤ Série eluotrópica

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

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

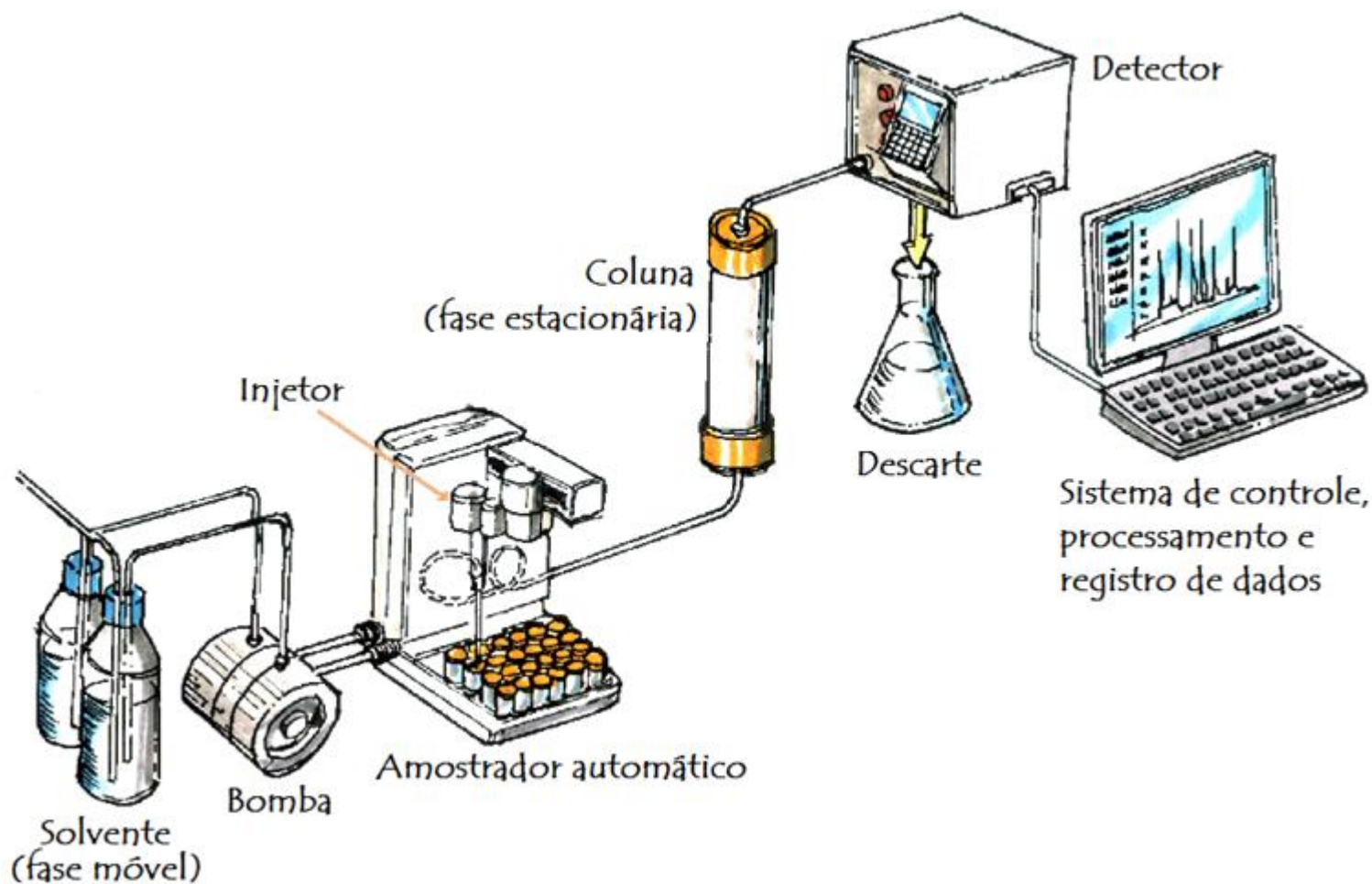
Cromatografia Líquida – Solventes

- Na CL também é comum um GRADIENTE (mudança) regular da força do eluente (análogo ao PLT do CG), em separações onde os componentes fracamente retidos são eluídos com um solvente de baixa força eluente.
- Em seguida, mistura-se um solvente ao primeiro, de modo a aumentar a força do eluente e os componentes mais fortemente adsorvidos são eluídos.
- OBS.: Uma pequena quantidade de um soluto polar já aumenta notavelmente a força eluente de um solvente apolar.

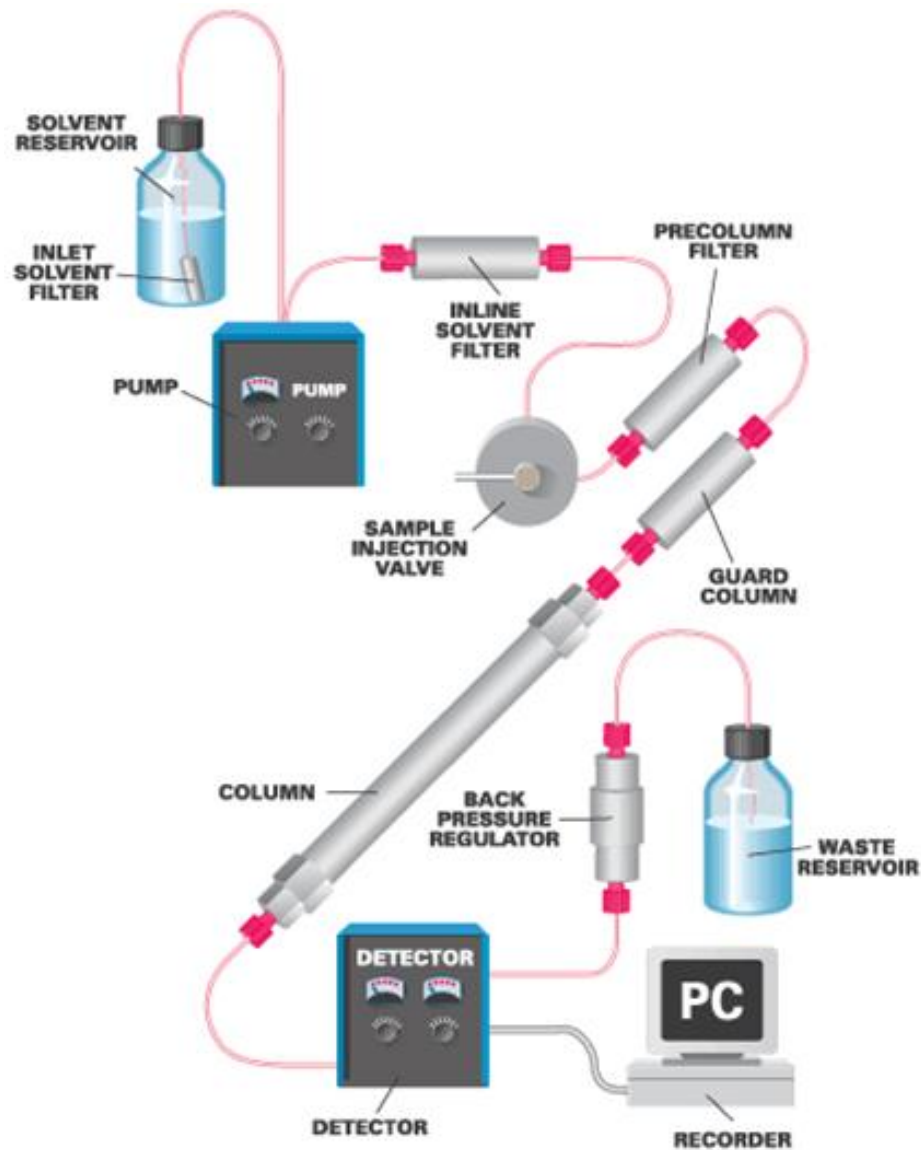
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE **High-Performance Liquid Chromatography – HPLC**

- Técnica cromatográfica emprega elevadas pressões para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contêm partículas da ordem de micrômetros.
 - Possibilita > eficiência de separação.
 - Empregada na separação de moléculas que sejam solúveis na fase móvel.
- 
- Espécies iônicas.
 - Macromoléculas (elevada massa molecular).
 - Moléculas com baixa estabilidade térmica.

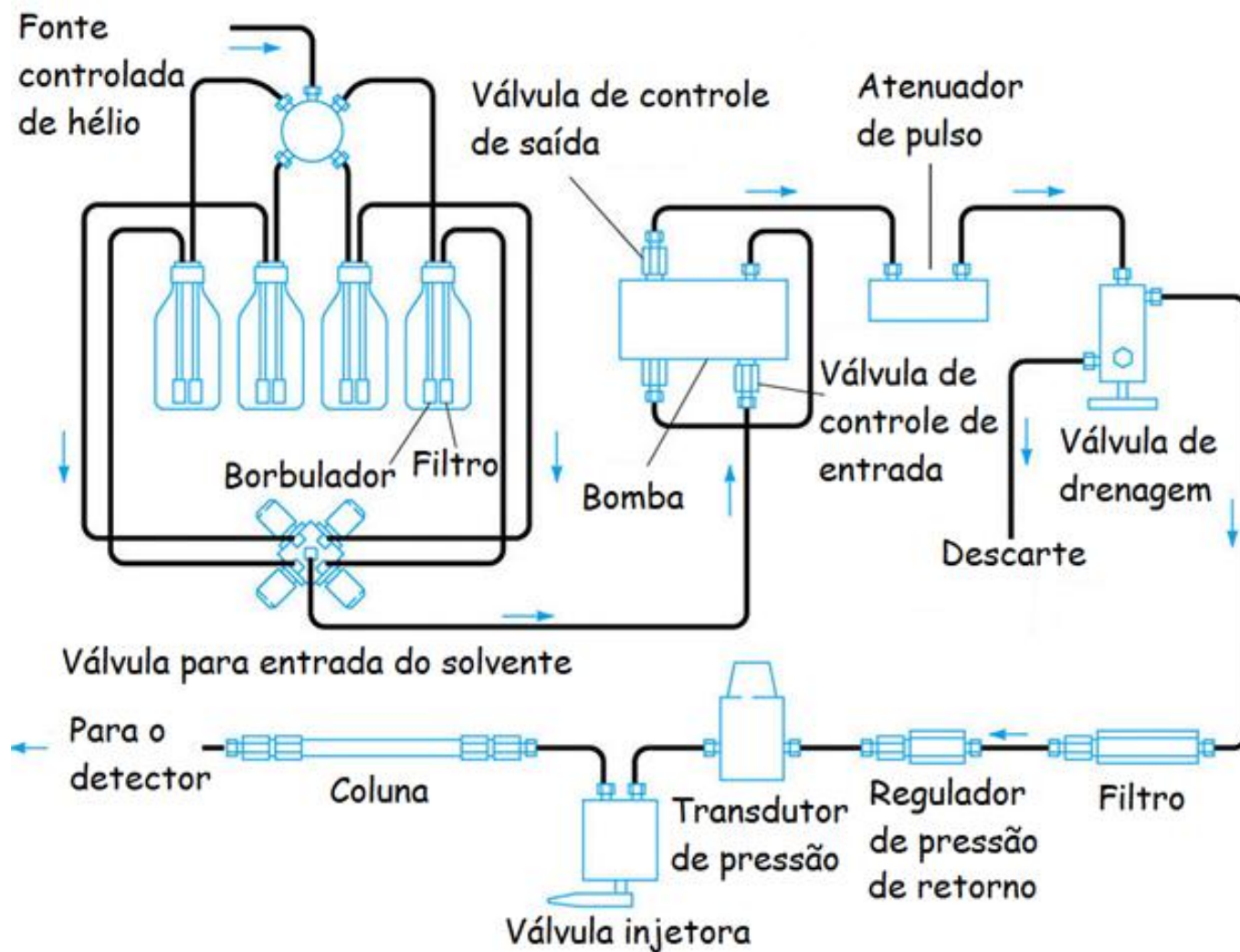
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE High-Performance Liquid Chromatography – HPLC



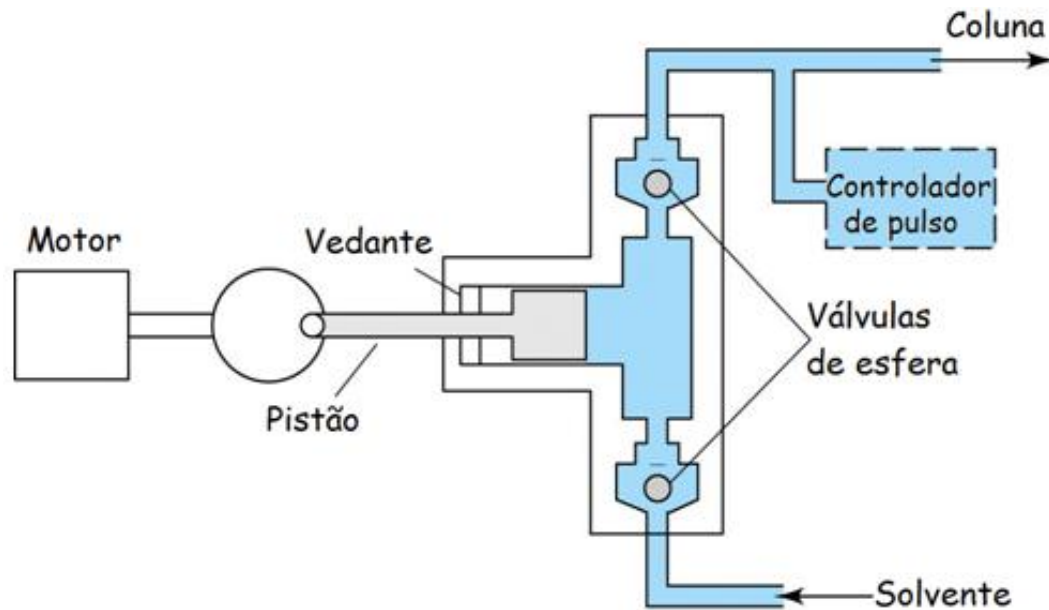
Componentes da CLAE



Esquema de um equipamento para HPLC



Sistema de Bombeamento





Colunas de HPLC



- Possui elevado custo e se degradam com facilidade devido a adsorção irreversível de impurezas provenientes da amostra e do solvente.
- Necessita-se de reagentes de grau cromatográfico, que possuem elevado custo.
- A coluna é protegida por uma pré-coluna, que possui a mesma fase estacionária.
- A pré-coluna deve ser periodicamente substituída.



Colunas de HPLC

- Amostras devem ser filtradas antes da injeção, com o objetivo de remover as partículas, que, de outro modo, entupiriam o tubo e danificariam a bomba.



- Porosidade: 0,5 a 2 μm .



HPLC – Fase Estacionária

➤ Cromatografia de Fase Normal

- Emprega uma **FE POLAR** e um solvente (FM) **MENOS POLAR**.



- A força eluente aumenta pela adição de um solvente mais polar.

➤ Cromatografia de Fase Reversa (mais comum)

- Emprega uma **FE APOLAR** ou menos polar e um solvente (FM) **MAIS POLAR**.



- A força eluente aumenta pela adição de um solvente menos polar (ou mais apolar).

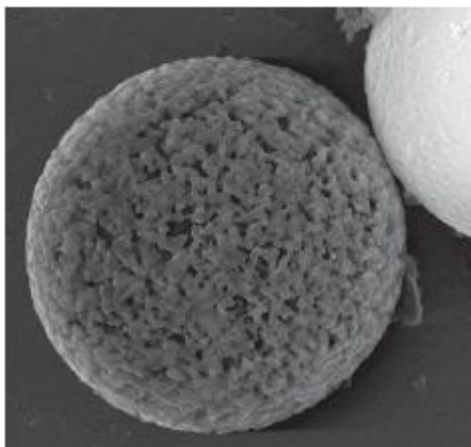
HPLC – Fase Estacionária

➤ Cromatografia de Fase Reversa

- Elimina a cauda dos picos, causada pela adsorção de compostos polares em sítios que adsorvem os solutos.
- É insensível a impurezas polares presentes no eluente, como a água.

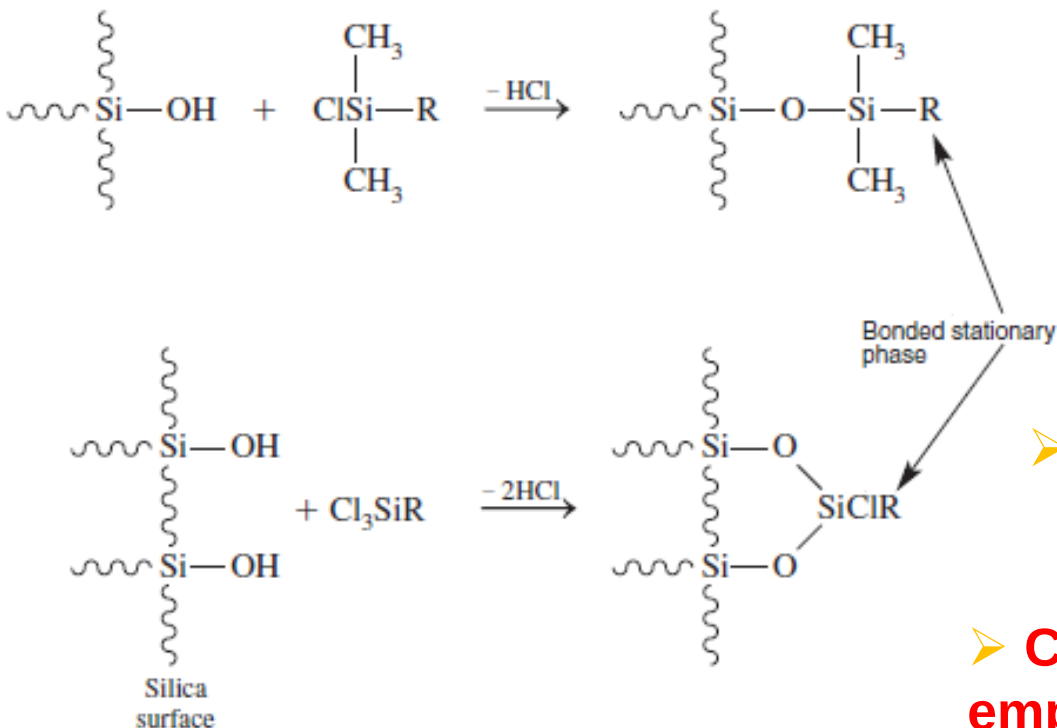
HPLC – Fase Estacionária

- As partículas microporosas de Sílica com diâmetros de 1,5 a 10 μm são o suporte sólido mais comum da FE.



- A cromatografia de partição líquido-líquido é feita com uma FE covalentemente ligada ao grupo silanol na superfície da sílica.

HPLC – Fase Estacionária



➤ Estável entre pH 2 – 8.

➤ **C₁₈** é a mais empregada em HPLC.

Common polar phases

R = (CH ₂) ₃ NH ₂	amino
R = (CH ₂) ₃ C≡N	cyano
R = (CH ₂) ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	diol

Common nonpolar phases

R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	octadecyl
R = (CH ₂) ₇ CH ₃	octyl
R = (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	phenyl
R = (CH ₂) ₃ C ₆ F ₅	F ₅ -phenyl

HPLC – Fase Estacionária

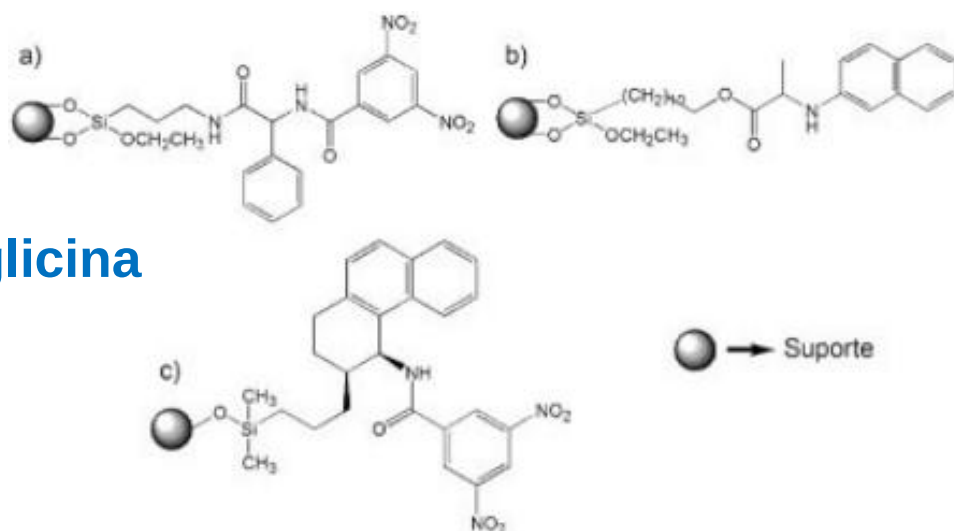
➤ Fase Estacionária Quiral

- Isômeros ópticos são compostos cuja estrutura são imagens especulares uma da outra. Sendo assim, não podem ser sobrepostas.
- Estes compostos podem ser separados por cromatografia contendo uma FE contendo apenas um isômero óptico quimicamente ligado.



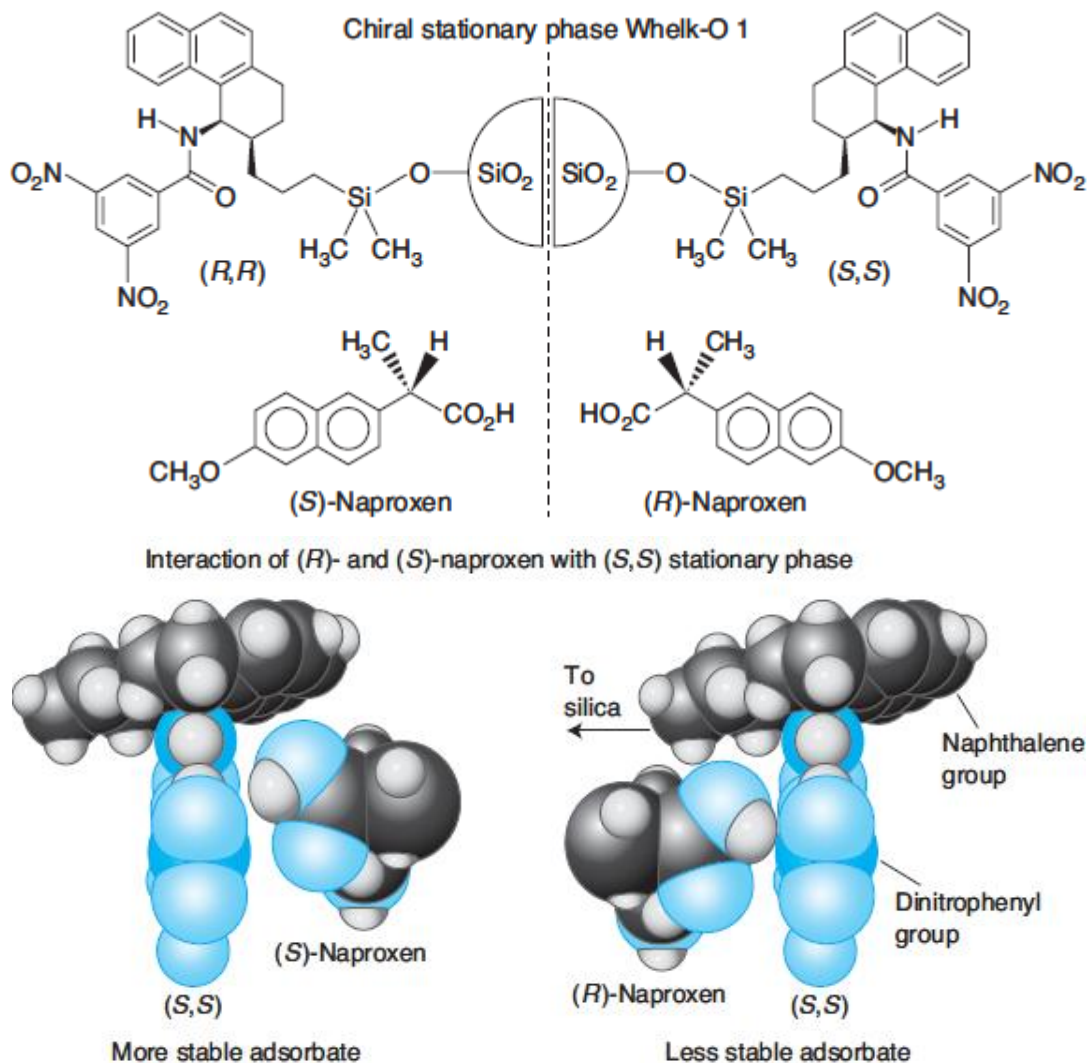
➤ Coluna Quiral.

- a) 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina
- b) naftilalanina
- c) (S,S) Whelk-O® 1



HPLC – Fase Estacionária

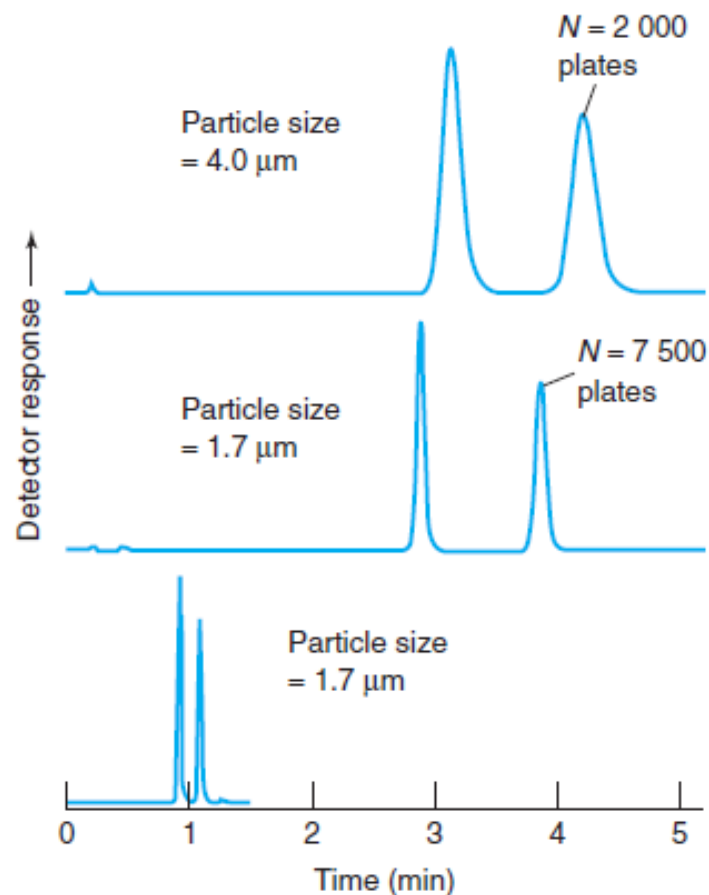
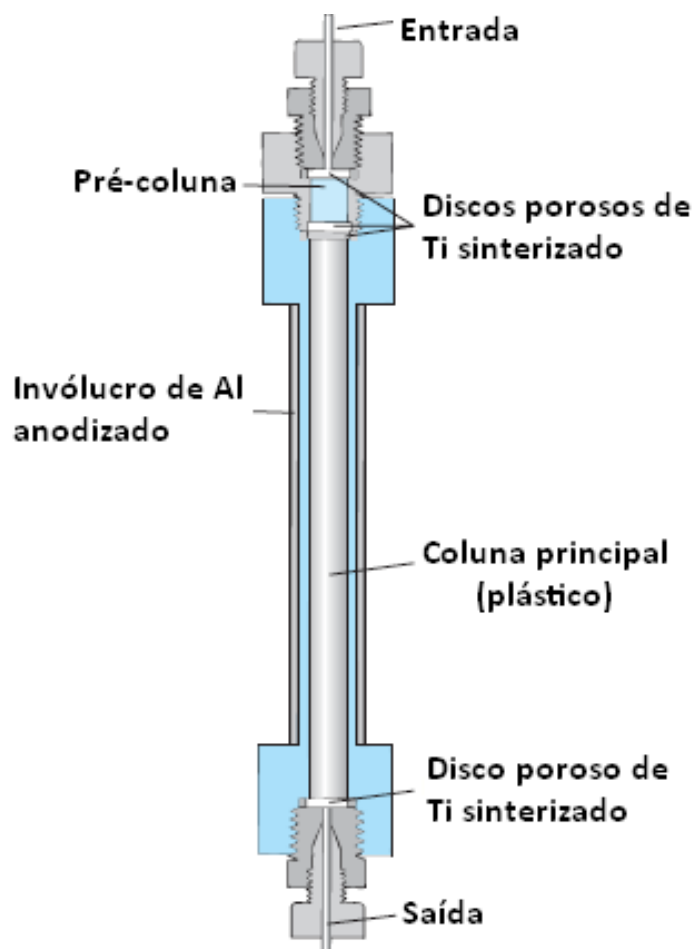
➤ Fase Estacionária Quiral



(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

- Sob condições ótimas de trabalho, a resolução aumenta com a diminuição das partículas da FE.

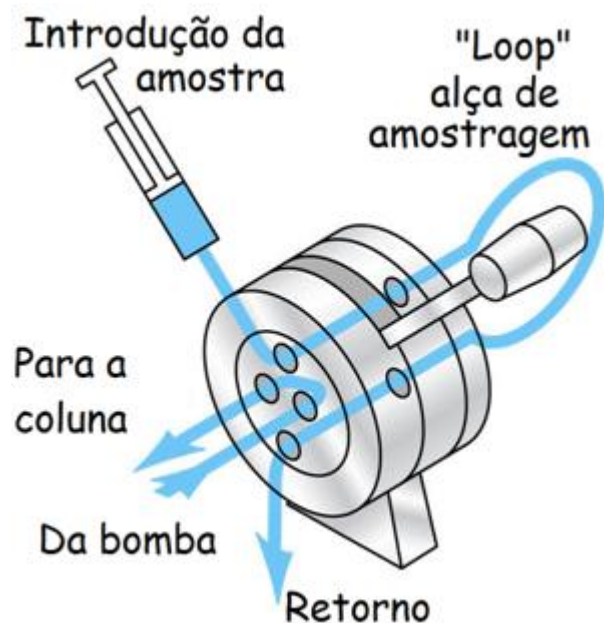


Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

- A diminuição do tamanho das partículas permite que o soluto se difunda em uma menor distância para se estabelecer o equilíbrio entre as fases (FE e FM).
- Faz-se necessário uma maior pressão devido à resistência ao fluxo do solvente.

Sistema de Injeção de Amostras

- Devido às elevadas pressões de operação na coluna, são necessários técnicas especiais de injeção de amostra.
- Comumente, emprega-se VALVULAS DE INJEÇÃO, que contém alças (LOOP) de amostragem de aço permeáveis, que mantêm os volumes fixos de 2 a 1000 μL .



Sistema de Injeção de Amostras

- Antes de serem injetadas, as amostras passam através de filtros com 0,2 a 2 μm de porosidade para remover as partículas que, de outro modo, entupiriam e danificariam a bomba.

HPLC – Solventes

➤ Características Físico-Químicas

- Elevada pureza e/ou fácil purificação.
- Dissolver a amostra sem provocar sua decomposição.
- Não danificar a FE.
- Ter baixa viscosidade e PE.
- Ser compatível com o detector.

HPLC – Solventes

➤ Força Cromatográfica da FM



➤ Mede a capacidade da FM em interagir com os componentes da amostra.

➤ Solventes fortes diminuem a retenção e solventes fracos aumentam a retenção.



➤ $1 \leq K \leq 20$ (ideal) ou $0,5 \leq K \leq 20$ (componentes múltiplos)

HPLC – Solventes

➤ NP-HPLC (CLAE-FN)

➤ A FE é mais polar que a FM.

➤ Solventes polares são fortes e apolares são fracos.

➤ RP-HPLC (CLAE-FR)

➤ A FE é mais apolar que a FM.

➤ Solventes apolares são fortes e polares são fracos.

HPLC – Solventes

➤ Eluição Isocrática

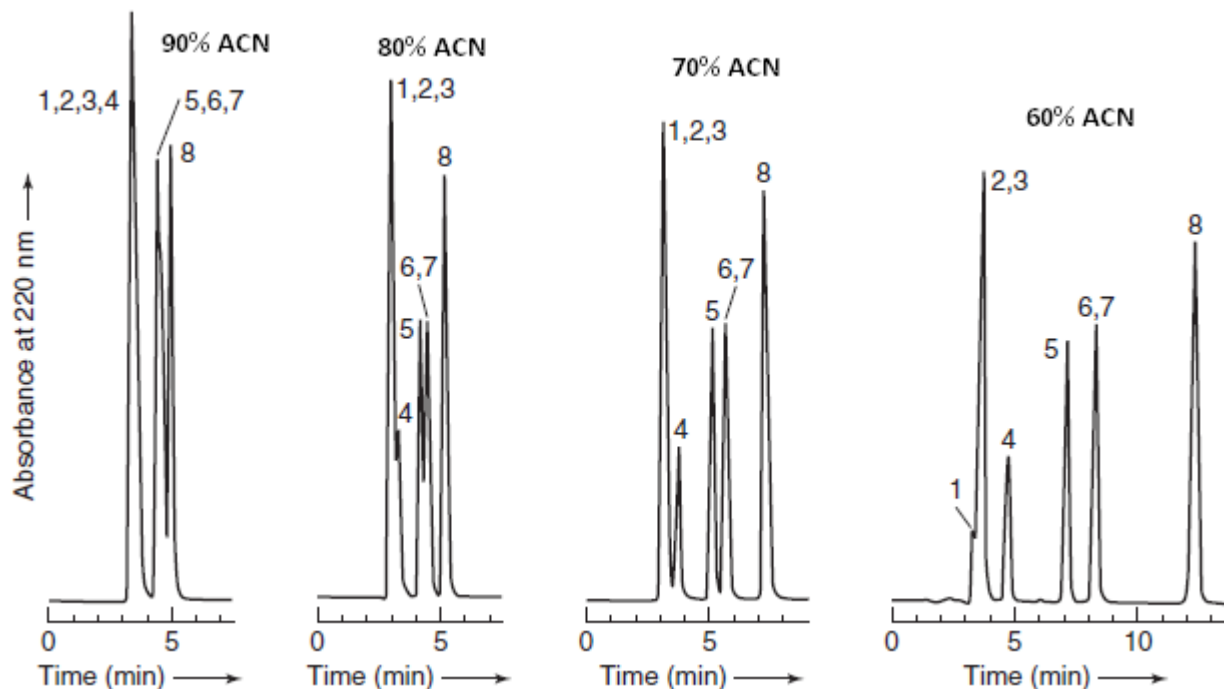
- Eluição com apenas um solvente ou uma mistura de composição constante (ex. 50% ACN e 50% CH₃OH).
- Um solvente pode ser insuficiente para promover uma separação adequada, ou ainda, pode ser insuficiente para proporcionar uma separação rápida de todos os componentes. Neste caso, emprega-se a eluição com gradiente.

➤ Eluição com Gradiente

- O solvente é continuamente alterado do mais fraco para o mais forte em termos de força eluente, através da adição de mais solvente forte ao solvente mais fraco durante a cromatografia.

HPLC – Solventes

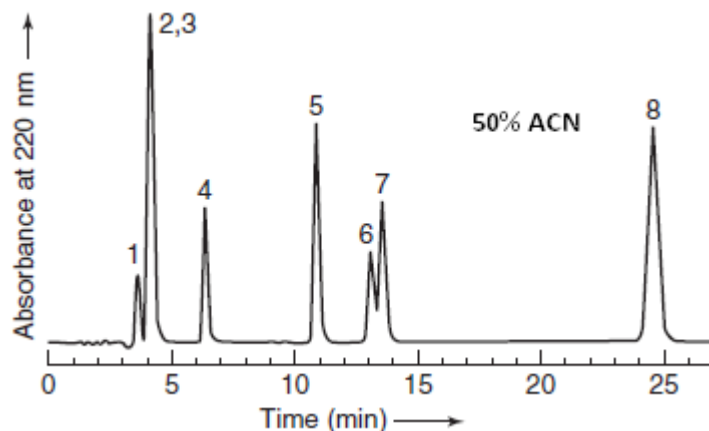
- Considere a separação em fase reversa.
- A força eluente aumenta quando a FM se torna mais polar.



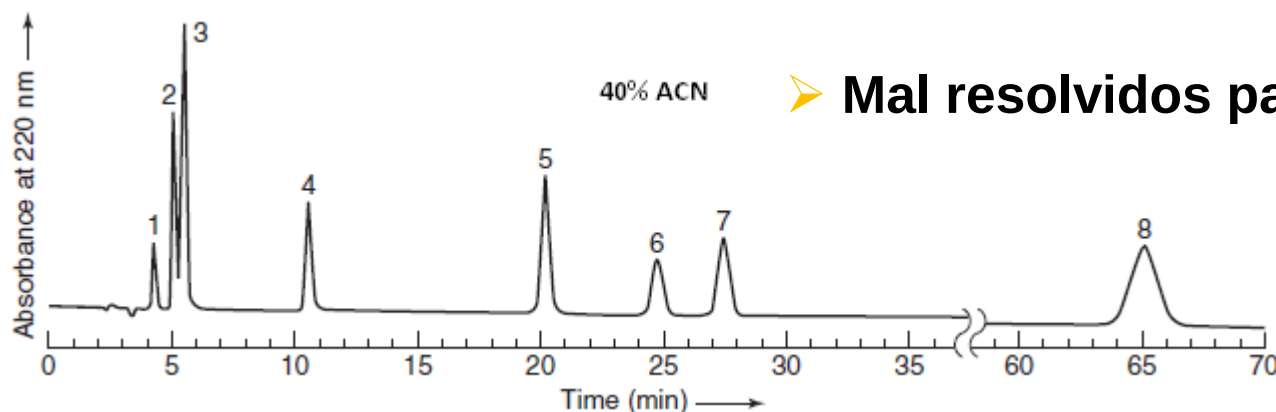
➤ ACN é menos polar que a água

- 1) Álcool benzílico
- 2) fenol
- 3) 3'-4'-dimetoxiacetofenona
- 4) Benzoína
- 5) Benzoato de etila
- 6) Tolueno
- 7) 2,6-dimetoxitolueno
- 8) metoxibifenila

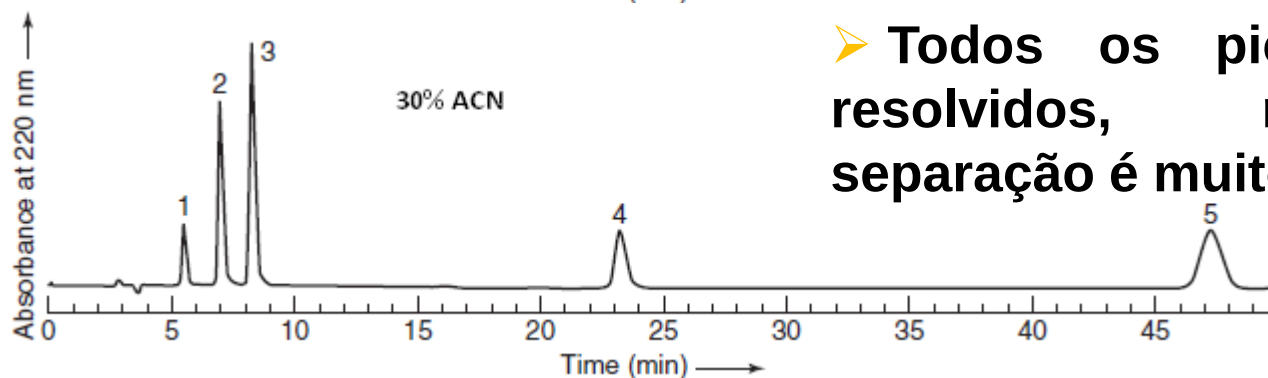
HPLC – Solventes



- Mal resolvidos para 2 e 3.
- 6 e 7 não estão bem resolvidos.



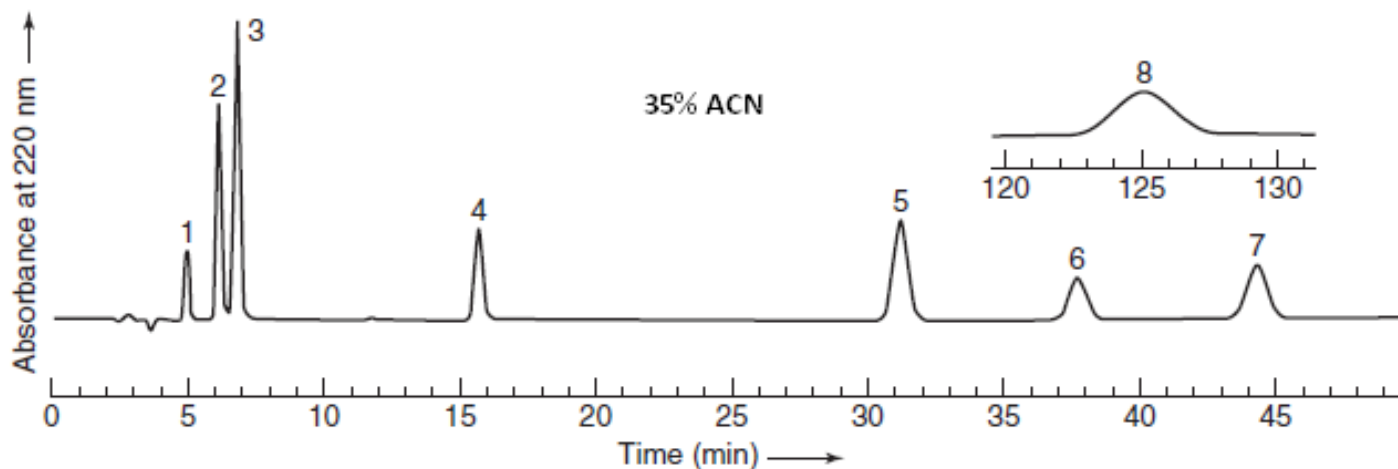
- Mal resolvidos para 2 e 3.



- Todos os picos estão resolvidos, mas a separação é muito lenta.

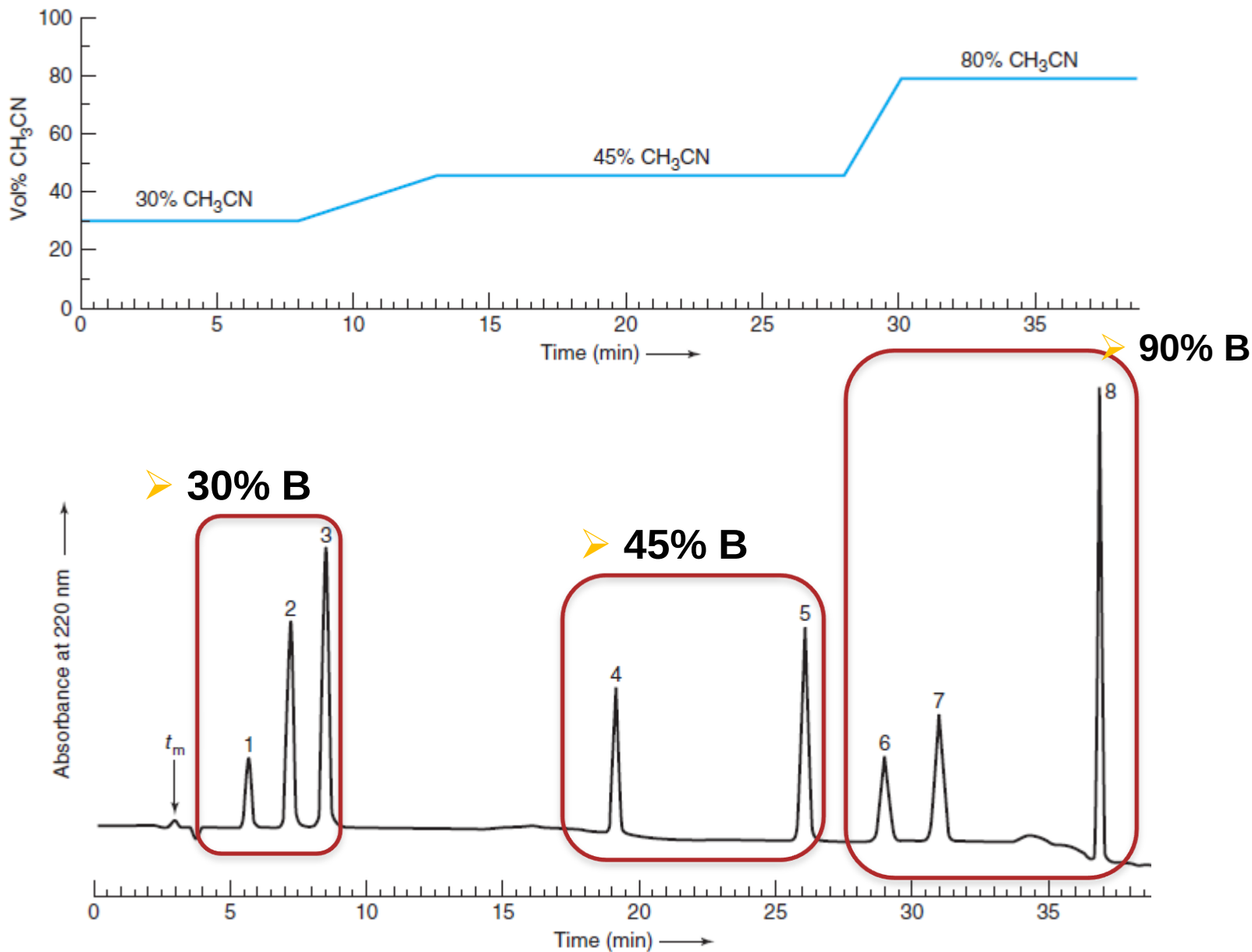
(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

HPLC – Solventes



- Todos os picos estão bem resolvidos, mas a separação é muito lenta.
- Uma maneira de aumentar a velocidade da separação e aumentar, gradativamente a força eluente.

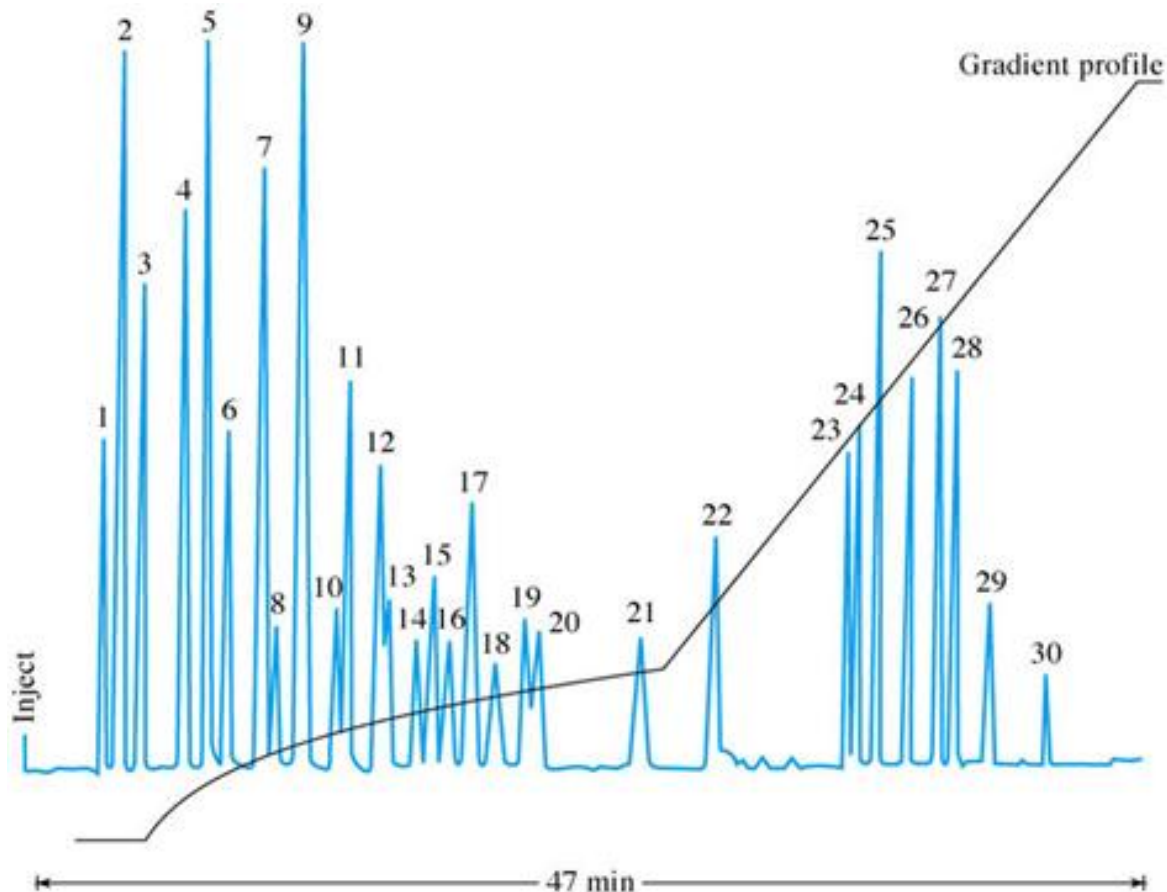
HPLC – Solventes



(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

Solventes

1. Phosphoserine
2. Aspartic acid
3. Glutamic acid
4. α -Amino adipic acid
5. Asparagine
6. Serine
7. Glutamine
8. Histidine
9. Glycine
10. Threonine
11. Citrulline
12. 1-Methylhistidine
13. 3-Methylhistidine
14. Arginine
15. β -Alanine
16. Alanine
17. Taurine
18. Anserine
19. β -Aminobutyric acid
20. β -Aminoisobutyric acid
21. Tyrosine
22. α -Aminobutyric acid
23. Methionine
24. Valine
25. Tryptophan
26. Phenylalanine
27. Isoleucine
28. Leucine
29. δ -Hydroxylysine
30. Lysine



(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

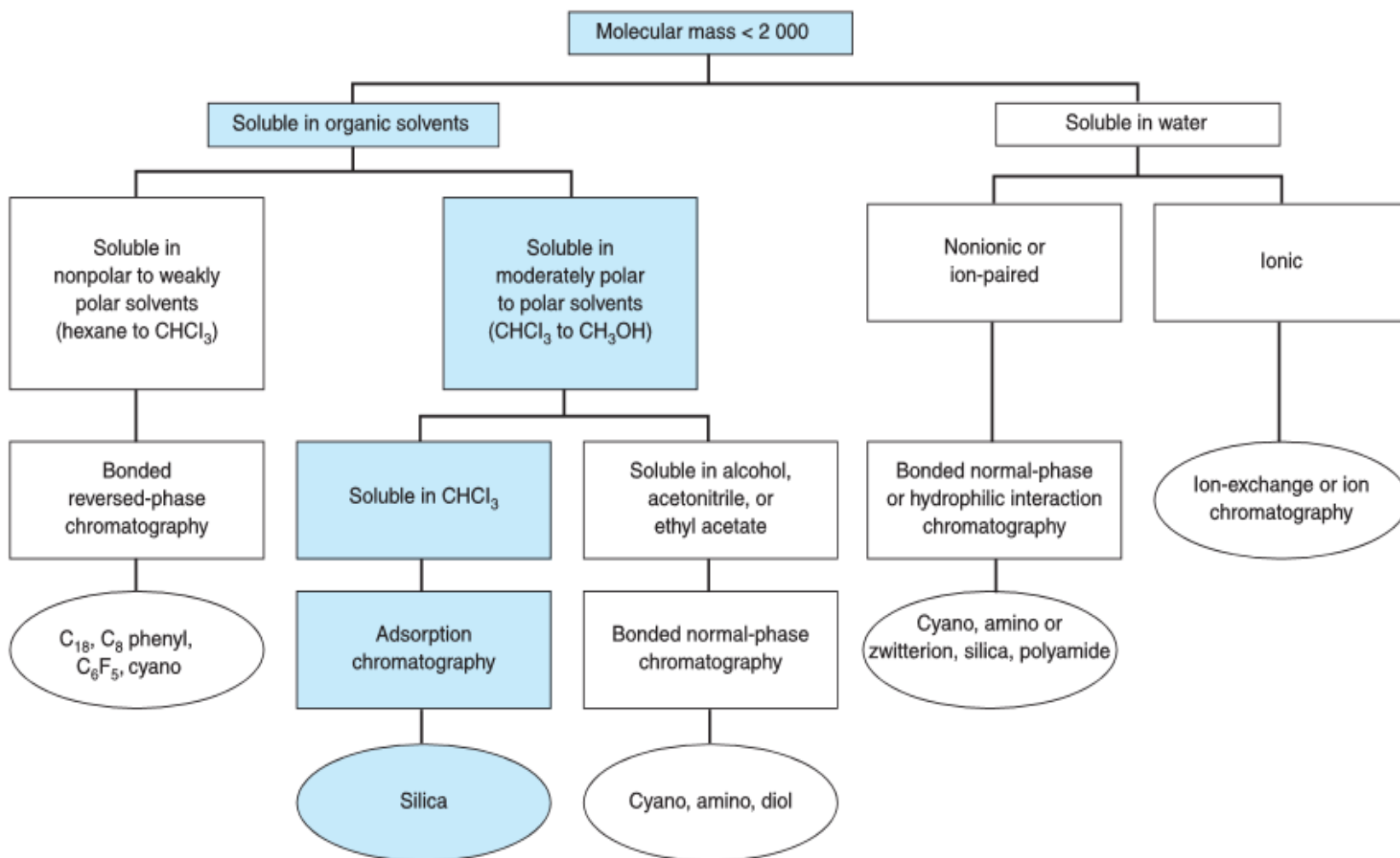
Exercícios

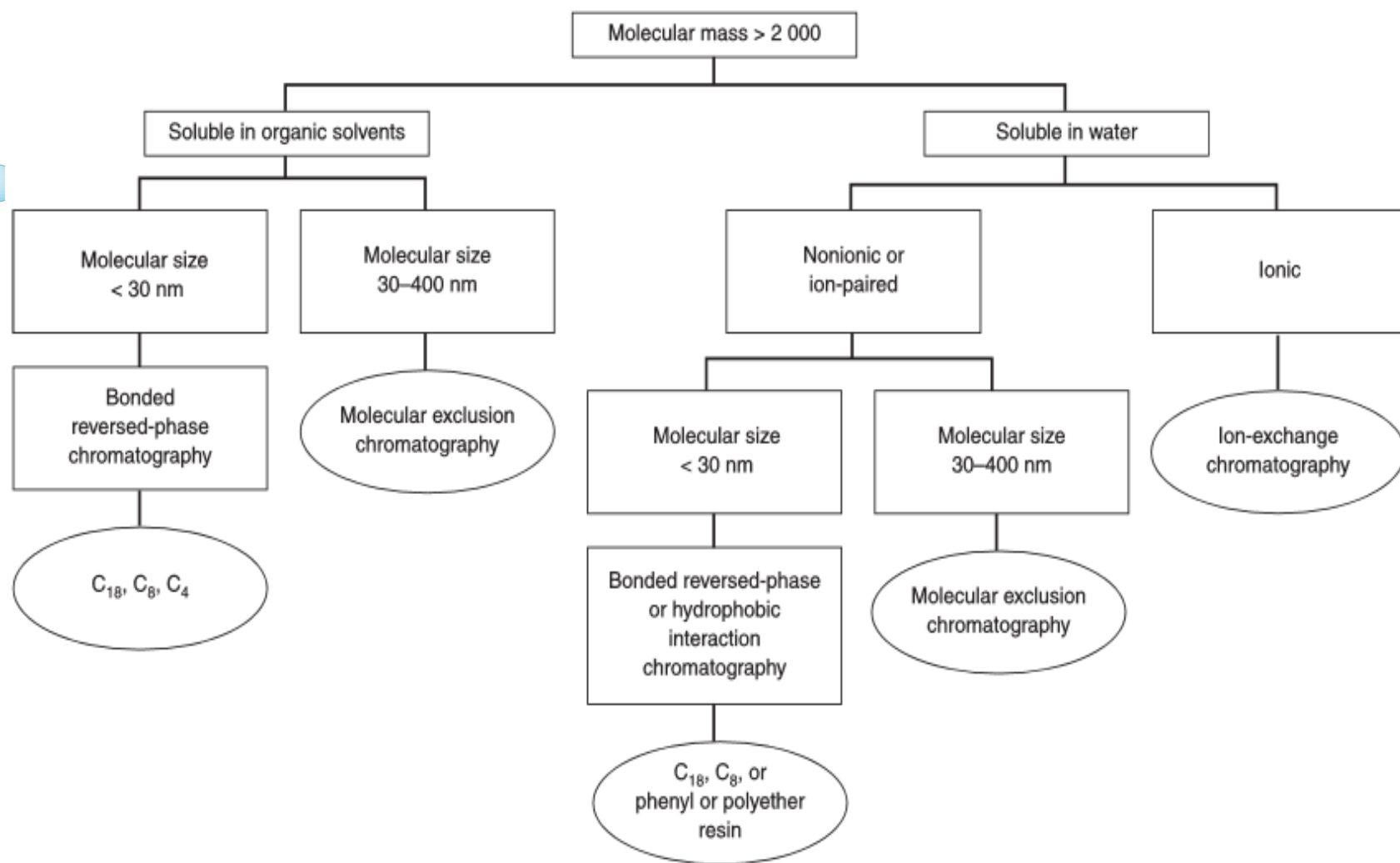
- Qual cromatografia seria a mais adequada para separar os compostos abaixo?
- a) MF < 2000, solúvel em diclorometano.
- b) MF < 2000, solúvel em octano.
- c) MF > 2000, solúvel em água, não-iônico, tamanho de 50 μm .
- d) MF > 2000, solúvel em água, iônico.

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

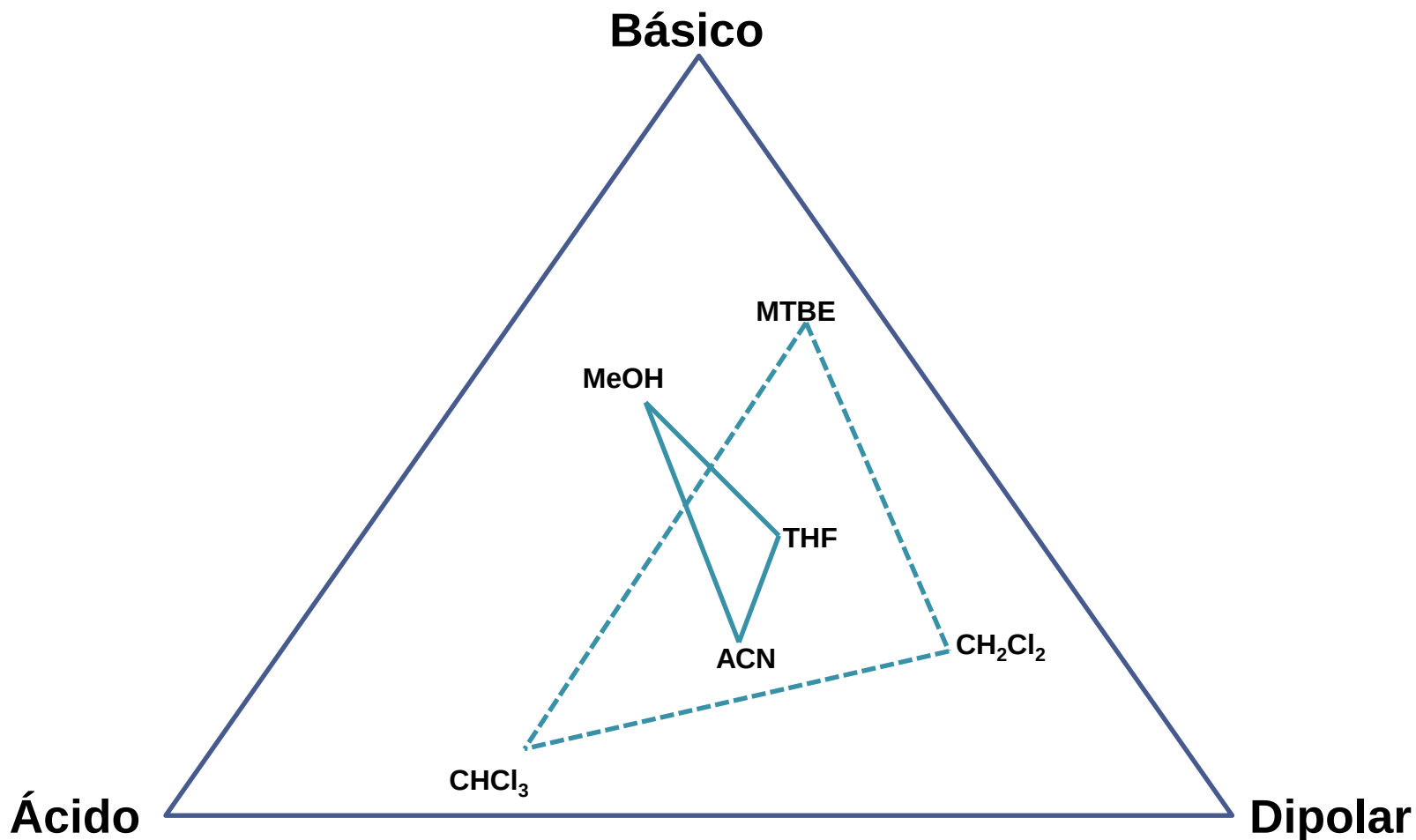
Solvent	Eluent strength (ϵ°)	Ultraviolet cutoff (nm)
Pentane	0.00	190
Hexane	0.01	195
Heptane	0.01	200
Trichlorotrifluoroethane	0.02	231
Toluene	0.22	284
Chloroform	0.26	245
Dichloromethane	0.30	233
Diethyl ether	0.43	215
Ethyl acetate	0.48	256
Methyl <i>t</i> -butyl ether	0.48	210
Dioxane	0.51	215
Acetonitrile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

NOTE: The ultraviolet cutoff for water is 190 nm.





HPLC – Solventes



➤ Triângulo de seletividade para os solventes em (—) Fase Reversa e (-----) Fase Normal.

HPLC – Solventes

➤ Exemplo:

➤ Ao realizar a separação de uma amostra empregando a FE no modo reverso e a FM MeOH:H₂O :: 70:30 (v/v), obteve-se sobreposição de picos. Para que a sobreposição dos picos não aconteça, qual é a FM adequada e sua composição?

➤ DADOS:

➤ $S_{\text{MeOH}} = 2,6$

➤ $S_{\text{THF}} = 4,5$

➤ $S_{\text{ACN}} = 3,2$

HPLC – Solventes

- A força relativa de uma fase móvel pode ser descrita pelo ÍNDICE DE POLARIDADE DO SOLVENTE (“P”).

$$P_{total} = \varphi_A P_A + \varphi_B P_B$$

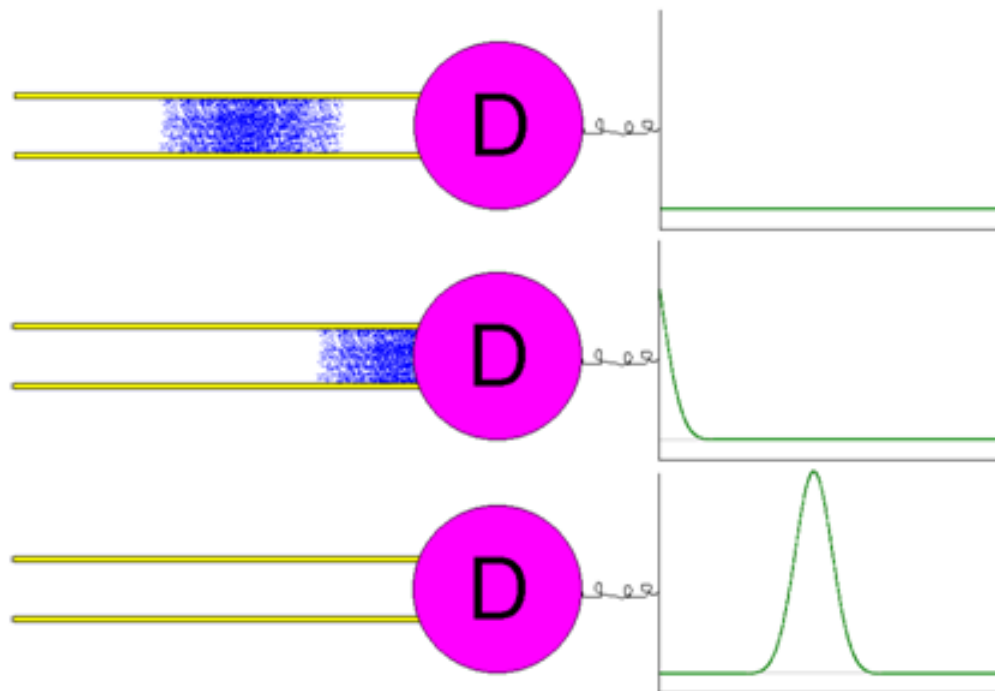
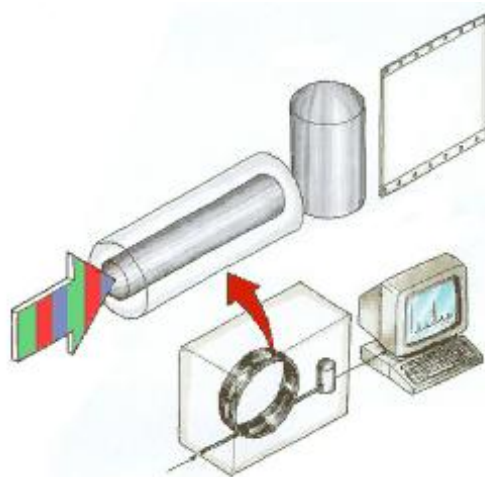
- P_{Total} = Índices de polaridade do solvente.
- P_A e P_B = Índices de polaridade dos constituintes A e B, respectivamente.
- φ_A e φ_B = Fração de volume dos constituintes A e B, respectivamente.

HPLC – Solventes

➤ Exemplo:

- Considerando uma mistura de 10 : 50 % (v/v) de ACN e H₂O e outra de 25 : 75 % (v/v) de ACN e H₂O, qual apresenta maior polaridade? Ou ...
- Qual solvente possui maior poder de eluição em uma coluna de fase normal? E se fosse em uma comuna de fase reversa?
- DADOS: ➤ $P_{\text{água}} = 10,2$ ➤ $P_{\text{ACN}} = 5,64$
- $P_{\text{total}} = (0,10 \times 5,64) + (0,9 \times 10,2) = 9,74$
- $P_{\text{total}} = (0,25 \times 5,64) + (0,75 \times 10,2) = 9,06$

Detectores



Detectores

➤ Ultravioleta

➤ É o mais comum.

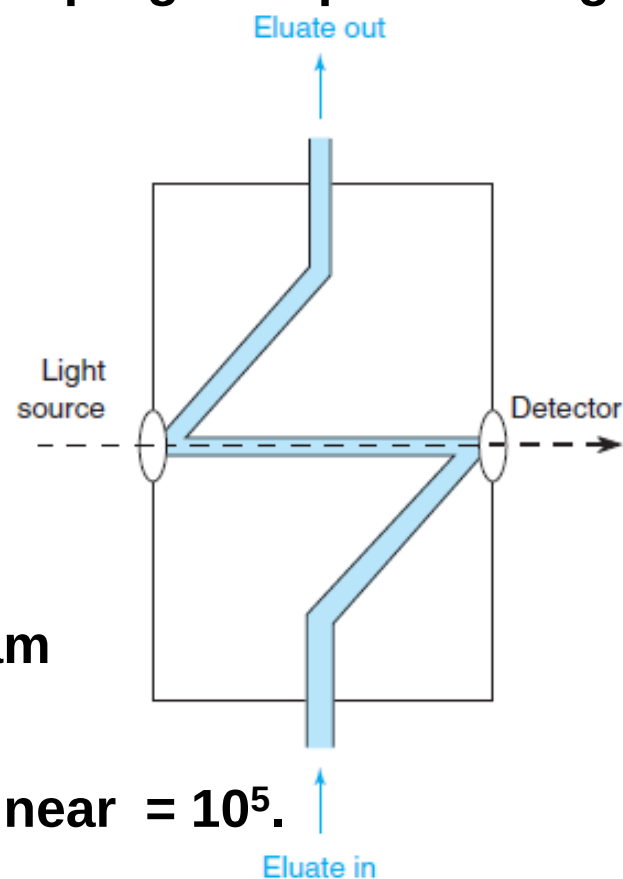
➤ Pode ser um sistema simples, que emprega lâmpada de Hg em 254 nm.

➤ Pode ser um sistema versátil, que emprega fontes de D₂ ou Xe e um monocromador.

➤ Proporciona maior seletividade.

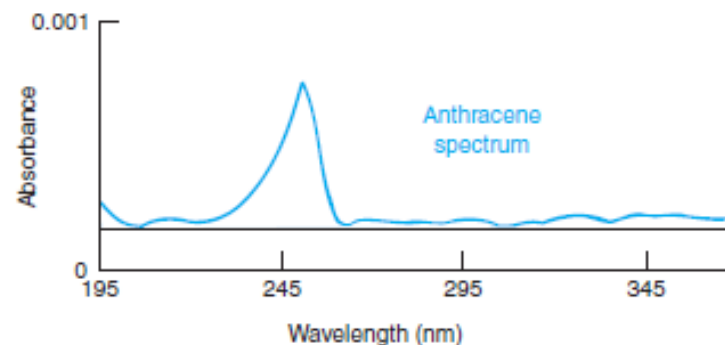
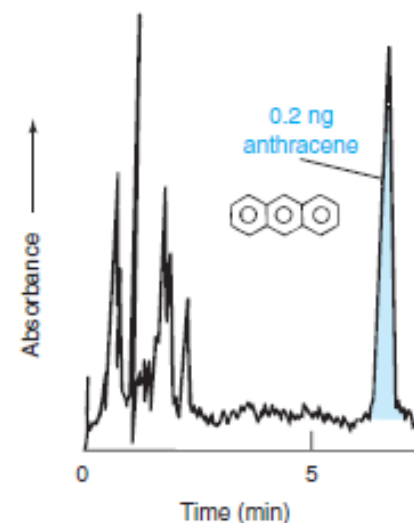
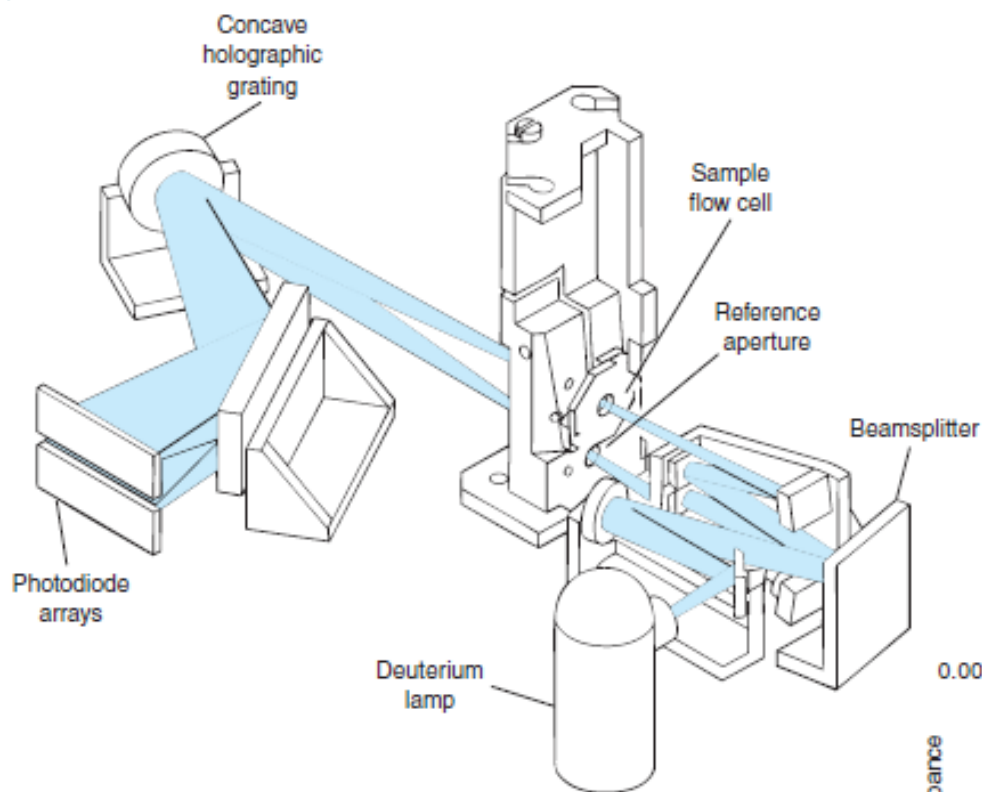
➤ Sensível a espécies que apresentam elevada absorvidade (ϵ ou a).

➤ Sensibilidade = 10^{-9} g/mL e Faixa Linear = 10^5 .



Detectores

➤ Ultravioleta



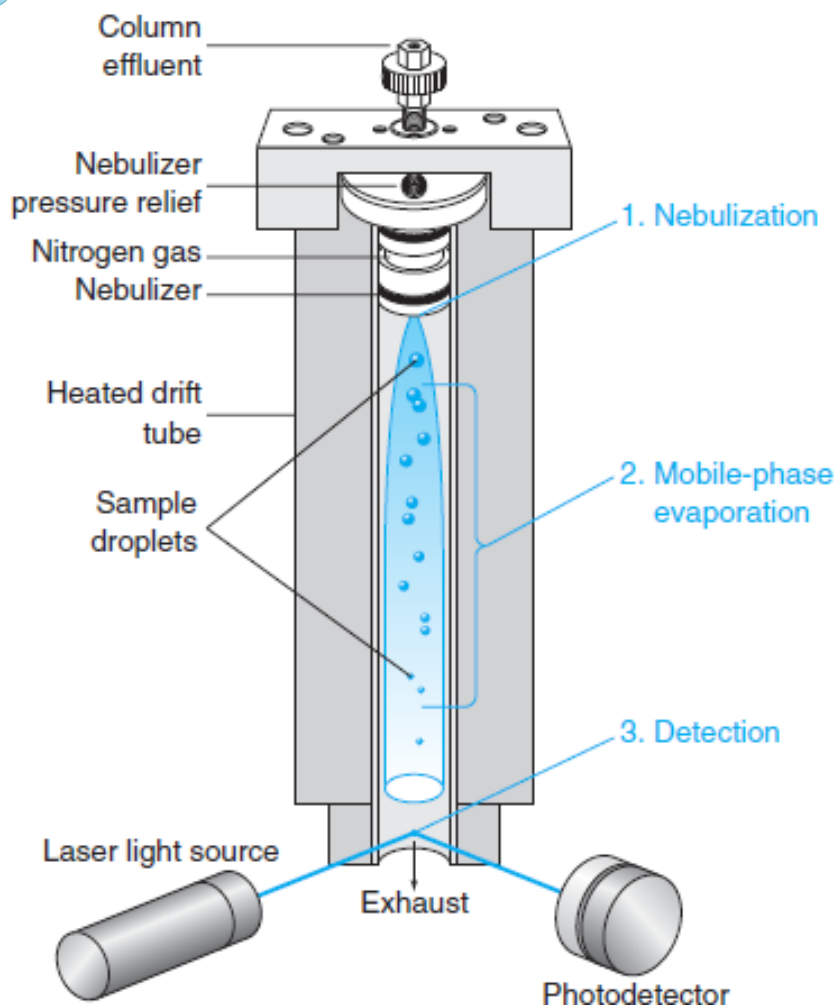
Detectores

➤ Índice de Refração

- Detector mais universal.
- Sensibilidade = 10^{-7} g/mL e Faixa Linear = 10^5 .
- O analito apresenta uma capacidade de refletir a luz diferente do solvente (FM). Assim, o detector mede a capacidade de um eluato em refletir a luz.
- Uma vez que a capacidade de refletir a luz é afetada pela composição do meio (neste caso, do solvente), não se aplica a eluição com gradiente, pois a linha de base sofrerá modificação após cada alteração.

Detectores

➤ Espalhamento de Luz por Evaporação



➤ O solvente é evaporado e o aerossol formado a partir de solutos não voláteis é detectado por espalhamento.

➤ Praticamente universal.

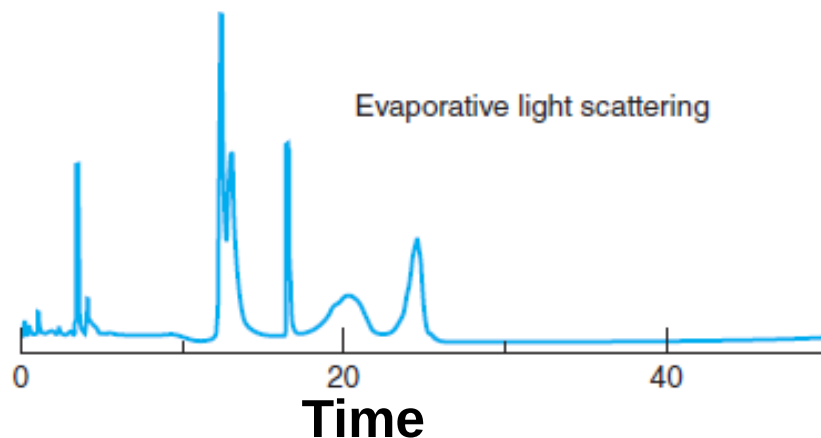
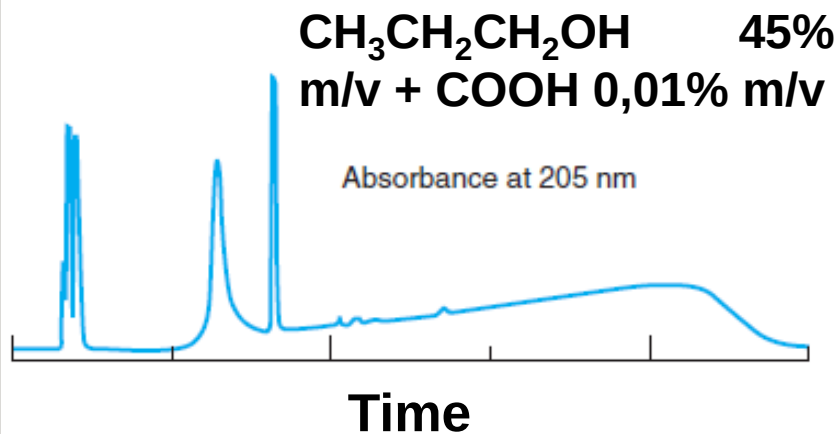
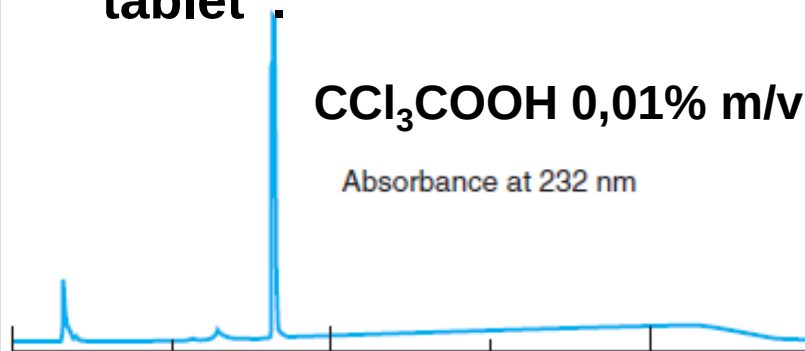
➤ A resposta do detector independe da estrutura do analito, mas de sua massa.

➤ O analito deve ser menor volátil que o soluto.

Detectores

➤ Espalhamento de Luz por Evaporação

➤ Considere a separação por HPLC em fase reversa de alguns componentes não voláteis extraídos de um 'drug tablet'.



(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

Detectores

➤ Aerossol Carregado

- Detector universal mais novo e sensível.
- É compatível com a eluição com gradiente.
- Após evaporação do solvente, o aerossol gerado a partir dos solutos não voláteis são misturados a uma corrente de N_2^+ , formando uma descarga de alta voltagem.
- As partículas adquirem cargas positivas e o N_2^+ não adsorvido é separado por um campo elétrico, enquanto o aerossol é carregado para um coletor.
- O cromatograma descreve a carga que chega no coletor em função do tempo.
- Faixa Dinâmica ~ 5 ng a 10^5 .

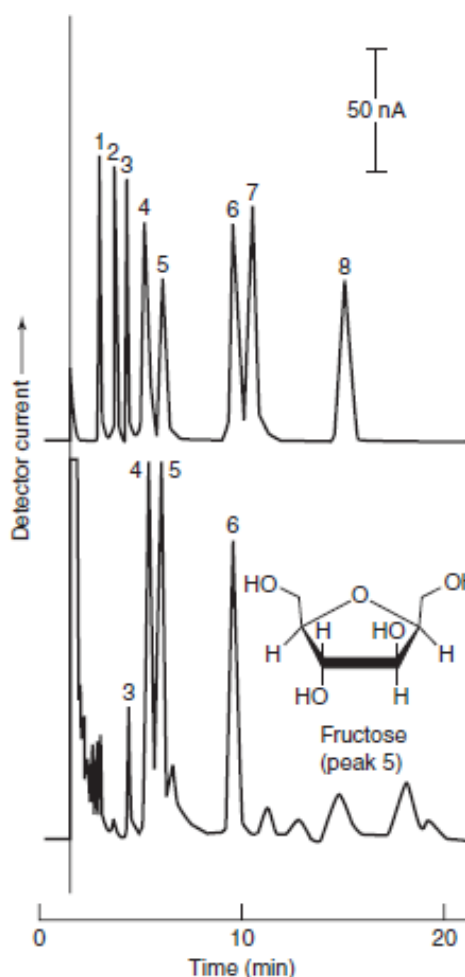
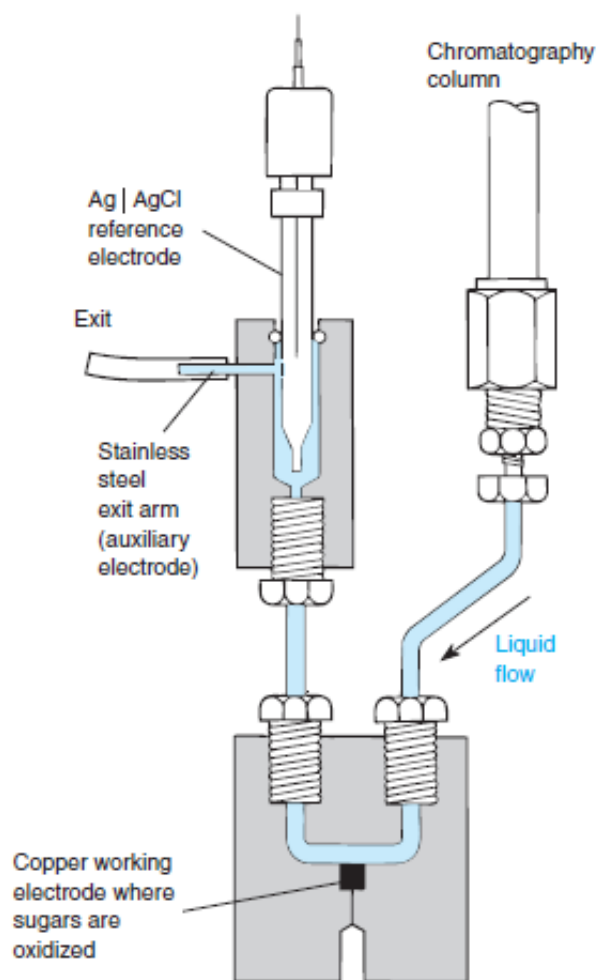
Detectores

➤ Eletroquímico (Detector Amperométrico)

- Responde aos analitos que podem ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo no qual um eluato passa.
- A corrente elétrica é proporcional à concentração do soluto.
- Na figura a seguir, a medida que os analitos (neste caso, os açúcares) são eluidos, eles são oxidados sobre a superfície de cobre.
- A redução da água ($\text{H}_2\text{O} + \text{e}^- \rightarrow \frac{1}{2} \text{H}_2 + \text{OH}^-$) ocorre no eletrodo de trabalho.
- Assim, a corrente elétrica que flui entre os eletrodos é proporcional a cada açúcar (analito) que sai da coluna.

Detectores

➤ Eletroquímico (Detector Amperométrico)



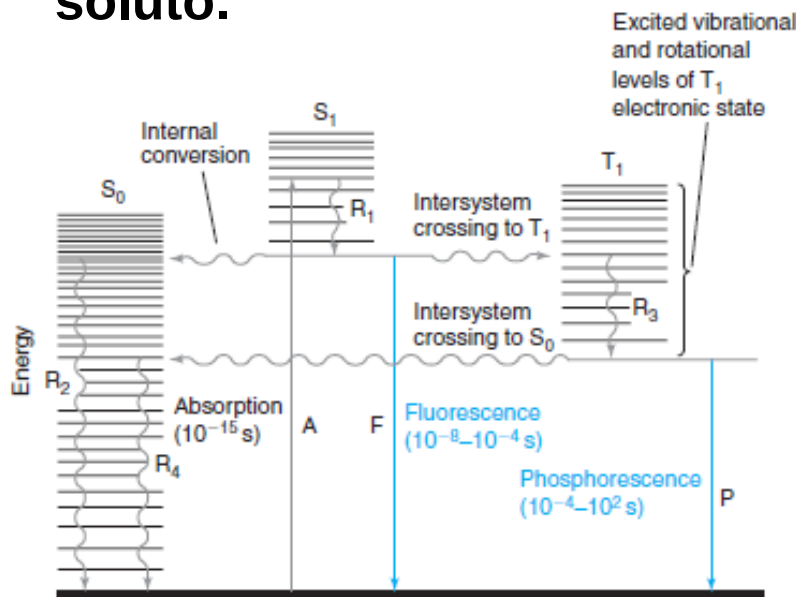
Brand	Sugar concentration (g/L)			
	Glucose	Fructose	Lactose	Maltose
Budweiser	0.54	0.26	0.84	2.05
Bud Dry	0.14	0.29	0.46	—
Coca-Cola	45.1	68.4	—	1.04
Pepsi	44.0	42.9	—	1.06
Diet Pepsi	0.03	0.01	—	—

(Adaptado de Harris – Quantitative Chemical Analysis)

Detectores

➤ Fluorescência

- Responde aos analitos que fluorescem ou que podem se tornar fluorescentes por derivatização.
- O eluato é irradiado pelo detector em um comprimento de onda e mede a emissão em um comprimento de onda maior.
- A intensidade de emissão é proporcional à concentração do soluto.



- Na fluorescência ocorre a emissão de um fóton durante a transição entre estados de mesmo spin.
- Na fosforescência ocorre a emissão de um fóton durante a transição entre estados de spin diferentes.

Detectores

➤ Comparação

Comparison of commercial HPLC detectors

Detector	Approximate limit of detection ^a (ng)	Useful with gradient?
Ultraviolet	0.1–1	Yes
Refractive index	100–1 000	No
Evaporative light-scattering	0.1–1	Yes
Charged aerosol	1	Yes
Electrochemical	0.01–1	No
Fluorescence	0.001–0.01	Yes
Nitrogen ($\text{N} \xrightarrow{\text{combustion}} \text{NO} \xrightarrow{\text{O}_3} \text{NO}_2^* \rightarrow h\nu$)	0.3	Yes
Conductivity	0.5–1	No
Mass spectrometry	0.1–1	Yes
Fourier transform infrared	1 000	Yes

Detectores – Espectrometria de Massas

