

HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

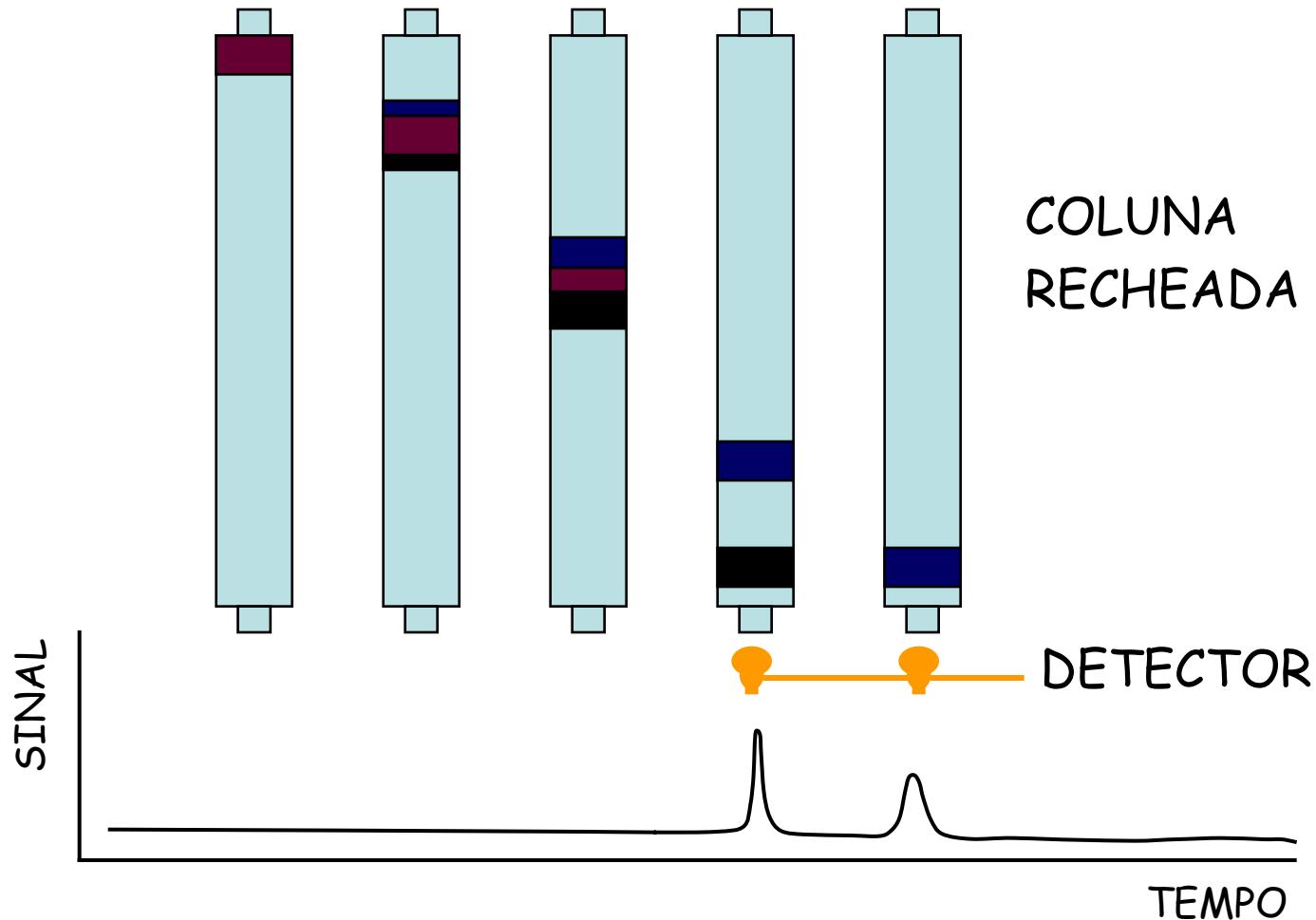
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

CONCEITOS E FUNDAMENTOS

- “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.*

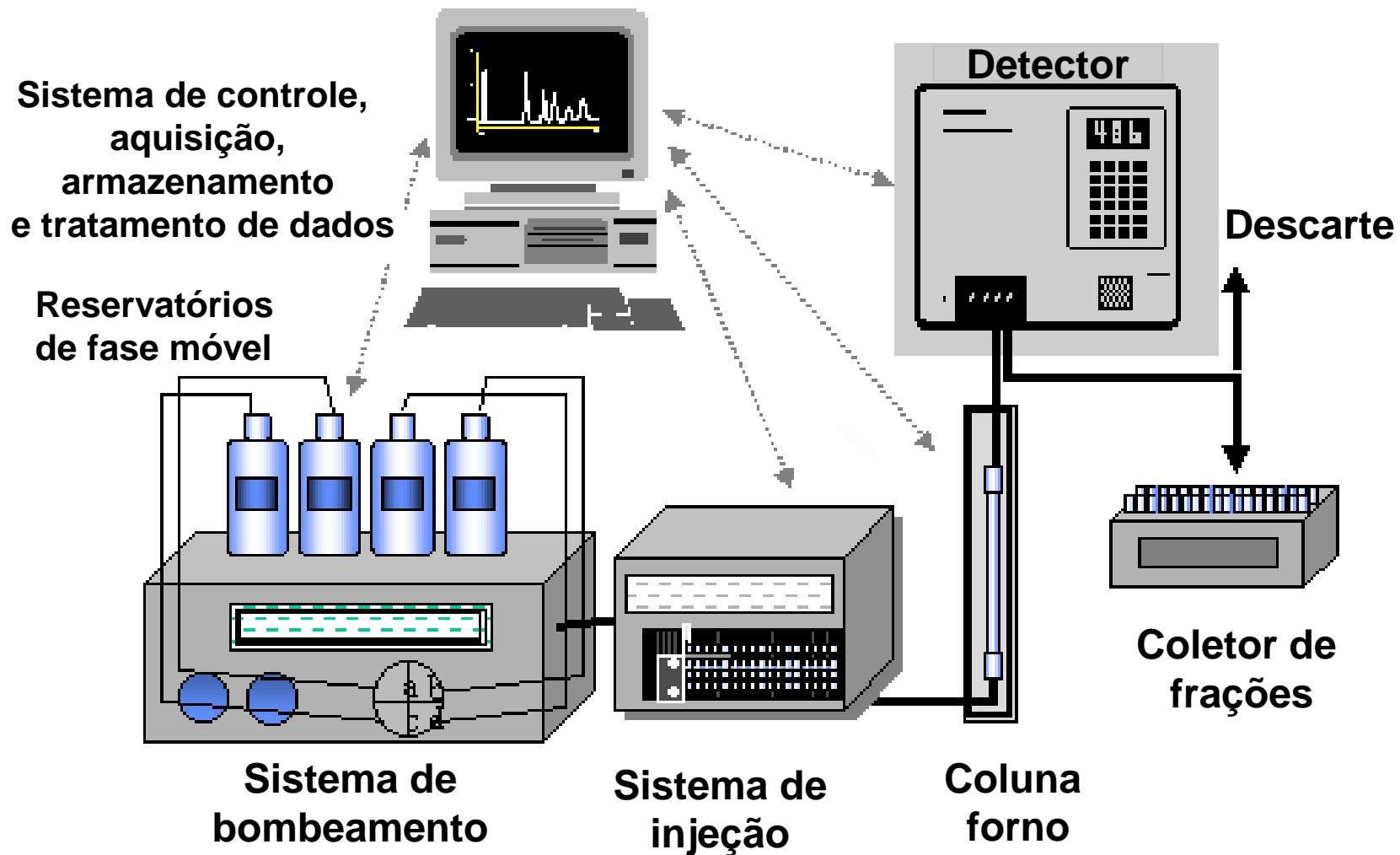
O PROCESSO CROMATOGRÁFICO



INSTRUMENTAÇÃO

- Os aparelhos empregados em HPLC são chamados de cromatógrafos líquido. Estes se caracterizam por apresentarem a seguinte configuração instrumental:
 - 1- Reservatório de fase móvel
 - 2- Sistema de bombeamento da fase móvel
 - 3- Sistema de injeção
 - 4- Sistema analítico: coluna cromatográfica
 - 5- Sistema de detecção
 - 6- Sistema de controle, aquisição e registro de dados.

EQUIPAMENTO PARA HPLC



Adaptado de: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/system.gif>

RESERVATÓRIO DE FASE MÓVEL (RFM)

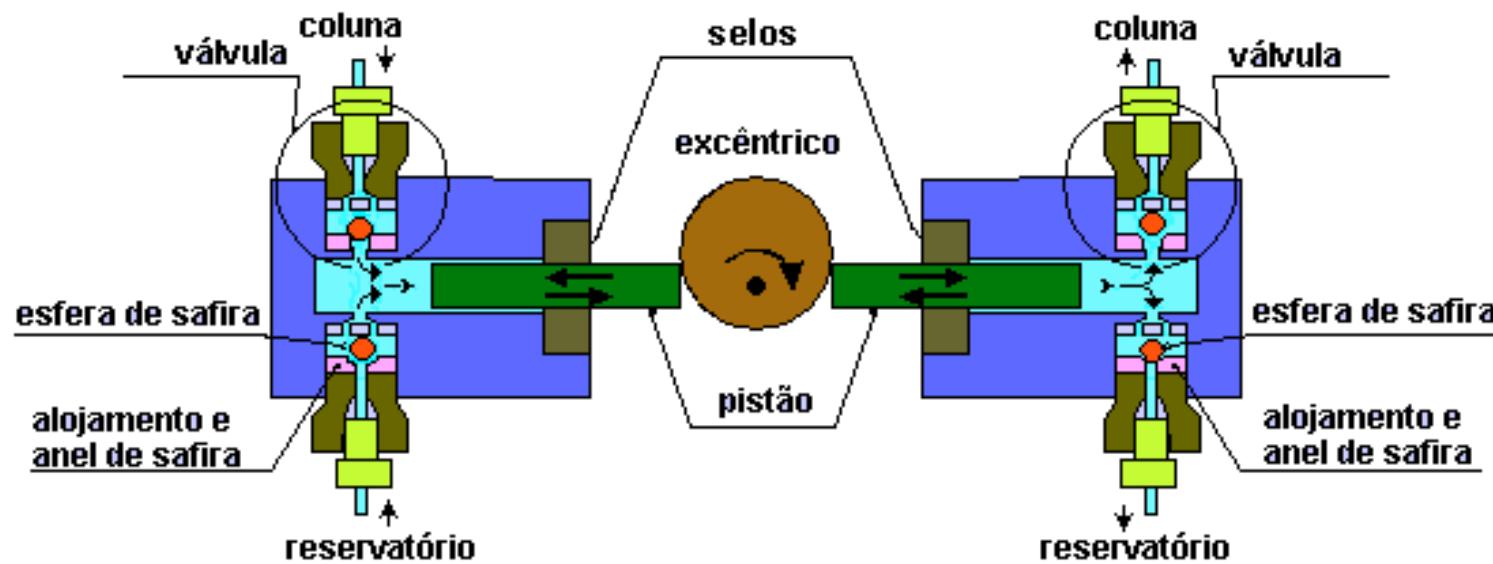
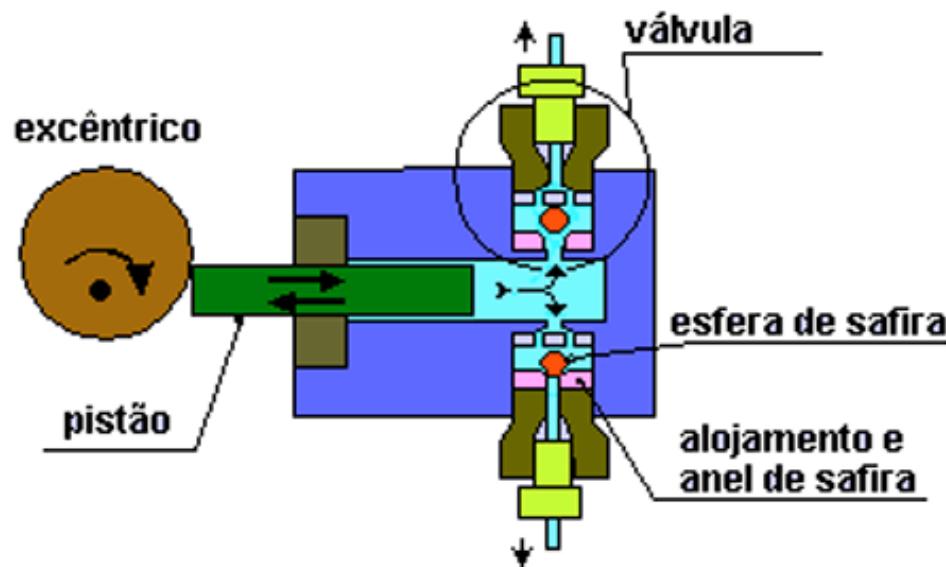
- Recipiente contendo fase móvel que será bombeada dentro do sistema analítico.
- **As características desejadas em um RFM são:**
- O frasco deve ser de vidro (borossilicato) e, às vezes, dependendo da fase móvel empregada, poderá ser de teflon ou outro polímero conveniente.
- Sua tampa deve conter furos 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.
- Dependendo da técnica de degaseificação empregada o frasco poderá estar acoplado a aquecimento agitação ou sistema de vácuo.
- A linha de solvente possui obrigatoriamente um filtro para reter partículas sólidas porventura existente.

CARACTERÍSTICAS IDEAIS PARA A FASE MÓVEL

- Ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação
- Dissolver a amostra sem decompor os seus componentes
- Não decompor ou dissolver a fase estacionária
- Ter baixa viscosidade
- Ser compatível com o detector utilizado
- Ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra

SISTEMA DE BOMBEAMENTO

- **Os aspectos mais importantes para o sistema de bombeamento são:**
 - pressão máxima de operação na faixa de 600 bar;
 - vazão contínua sem pulsos ou se pulsando, com amortecedor de pulsos;
 - intervalo de vazões entre 0,01 e 10 mL/min para aplicações;
 - analíticas e até 100 mL/min para aplicações preparativas;
 - reproduzibilidade e constância na vazão de 1%;
 - Não deve ser corroído pelas fases móveis empregadas. Logo, são construídas com material nobre: sede de safira, esfera de rubi.



Adaptado de: CEFET-QUÍMICA, Unidade Rio de Janeiro, ANÁLISE INSTRUMENTAL, CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO

TIPOS DE ELUIÇÃO

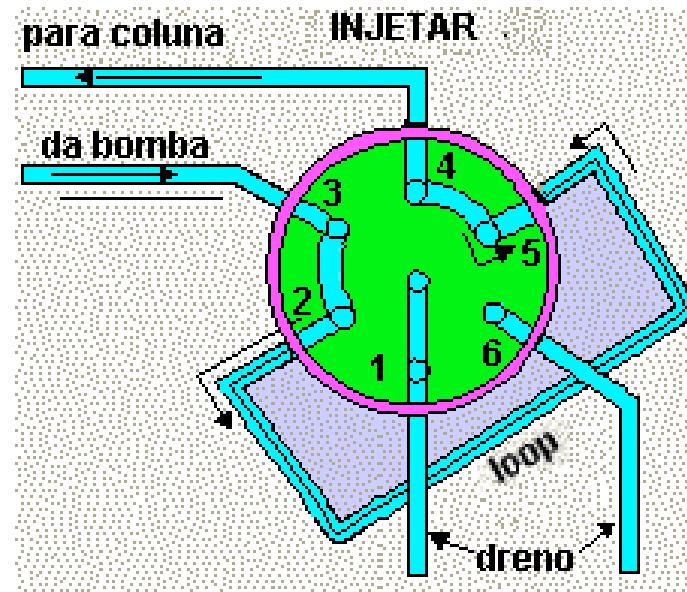
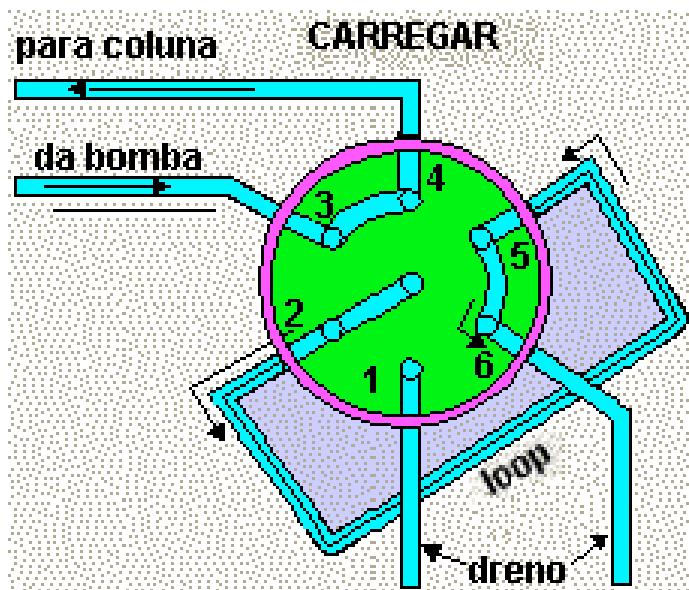
- **Isocrática**: A composição da fase móvel (% B) permanece constante durante toda a análise cromatográfica. É realizada com um único solvente ou mistura constante de solventes.
- **Gradiente**: Ocorre alterações da composição da fase móvel (% B) durante a execução da análise.

EM RELAÇÃO A ELUIÇÃO POR GRADIENTE

- Gradiente linear
- Gradiente segmentado
- Gradiente formado a baixas pressões
 - Demanda uma única bomba e uma válvula de diversas vias controlada por um microcomputador
- Gradiente formado a altas pressões
 - Cada solvente é bombeado por uma bomba específica

SISTEMA DE INJEÇÃO

- Válvula de injeção para HPLC com alça de amostragem substituível em vários tamanhos de volume fixo



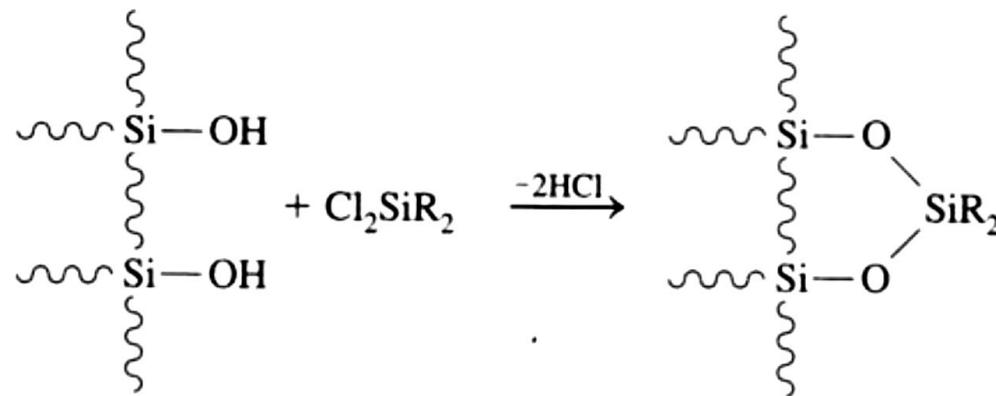
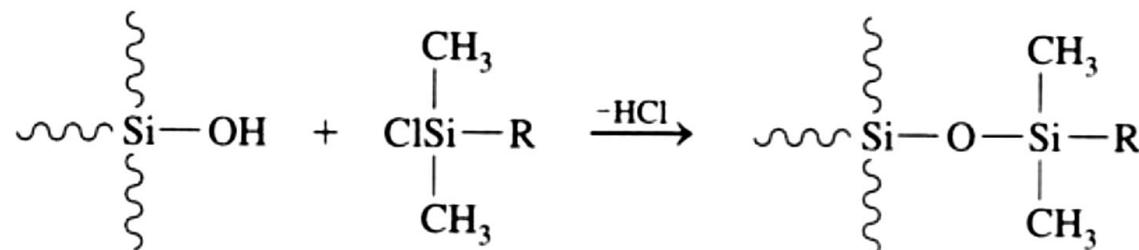
COLUNA CROMATOGRÁFICA

- O equipamento usa colunas de aço de material polimérico, com um comprimento de 5 a 30 cm e um diâmetro interno de 1 a 5 mm.
- Essas colunas têm custo elevado e se degradam com facilidade pela ação de poeira ou de partículas sólidas presentes na amostra e no solvente e pela adsorção irreversível de impurezas, também provenientes da amostra ou do solvente.
- A entrada da coluna principal é protegida por uma pequena ***pré-coluna*** contendo a mesma fase estacionária presente na coluna principal.
- Dispositivo de alocação da coluna termostatisado.

FASE ESTACIONÁRIA (FE)

- Os suportes mais comuns são as partículas porosas, microporosas de sílica ou peliculares, altamente puras e esféricas, que são permeáveis ao solvente e possuem uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama.
- Pode ser usada a sílica descoberta como fase estacionária para a cromatografia por adsorção.
- Normalmente a cromatografia líquida por partição é realizada com uma fase estacionária quimicamente ligada, unida covalentemente a superfície da sílica mediante reações específicas.

ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA FE



Superfície
da sílica

Fases polares comuns

$\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
 $\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$
 $\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$

Fases apolares comuns

amino $\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ octadecil
 ciano $\text{R} = (\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ octil
 diol $\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$ fenil

TIPOS DE PARTÍCULAS PARA F

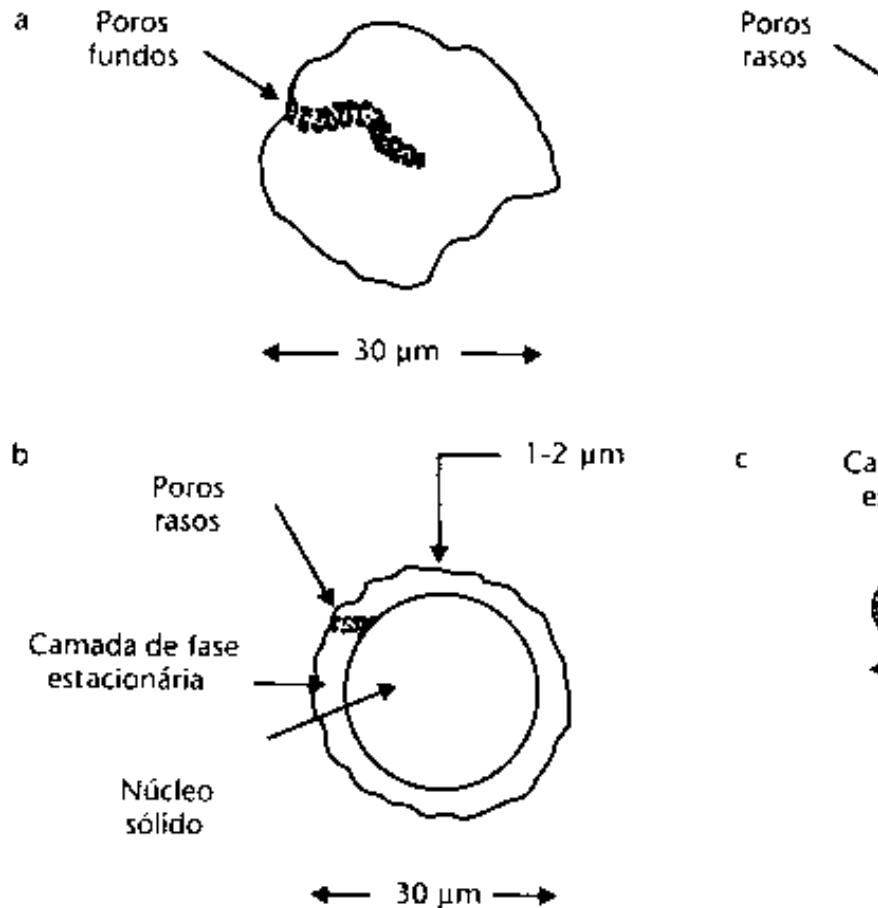
- ***Porosas ou microporosas:***

Consiste de micro partículas porosas com diâmetro variando de 3 a 10 μm . As partículas podem ser compostas de sílica, alumina, resina sintética de poliestireno-divinil-benzeno ou resina de troca iônica

- ***Pelicular:***

Consiste de leitos de polímeros ou vidro não poroso. Um camada fina e porosa de sílica, alumina resina sintética de poliestireno-divinil-benzeno ou resina de troca iônica é depositado sobre a superfície desses leitos.

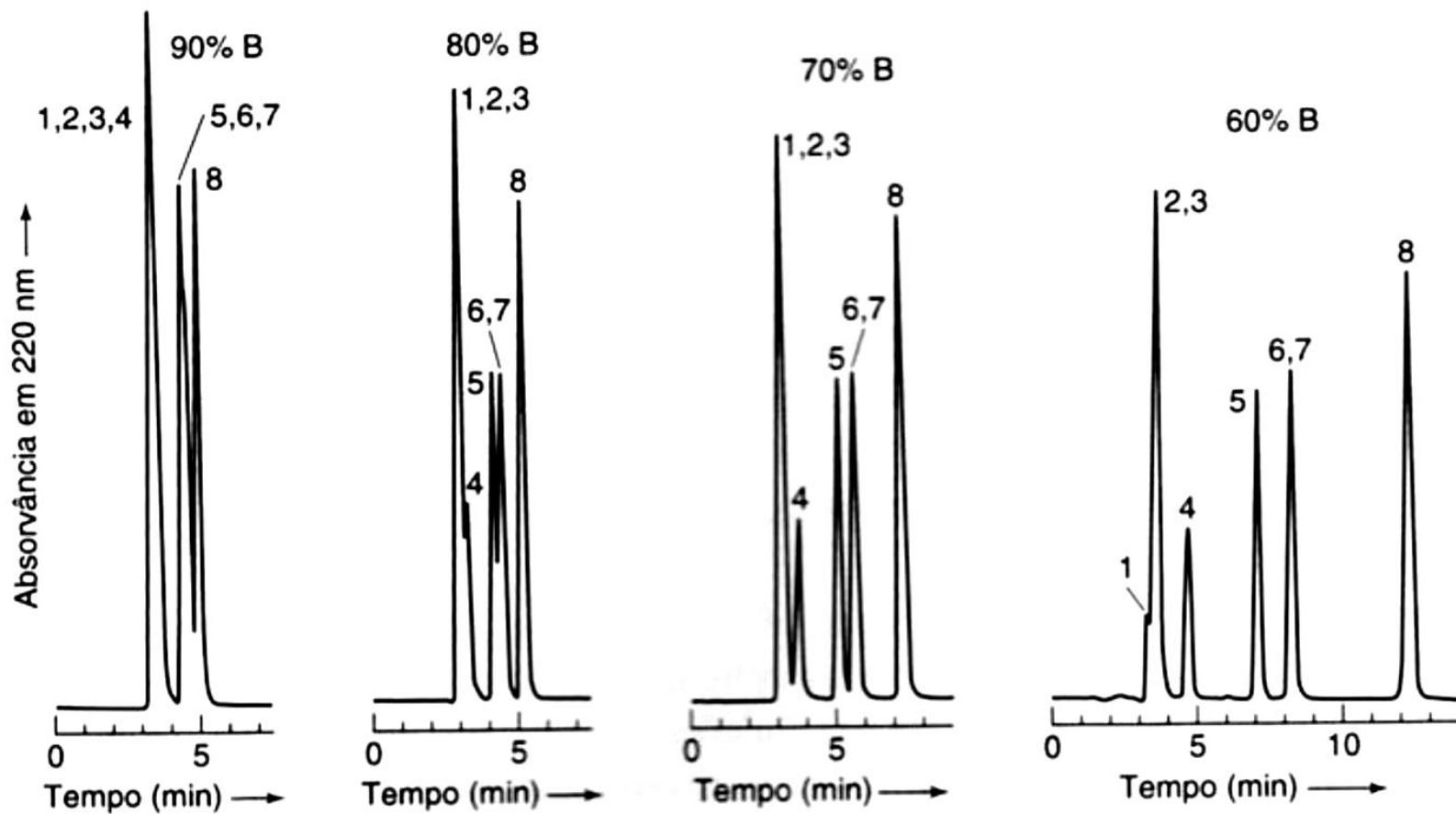
ESQUEMA DAS PARTÍCULAS DE FE

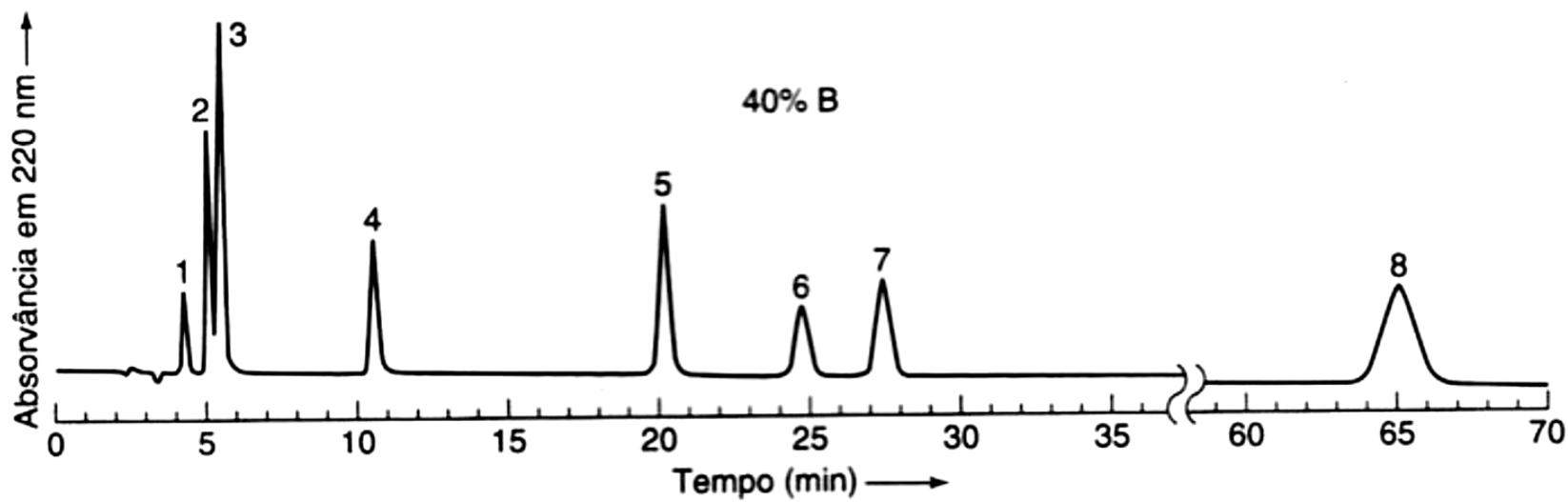
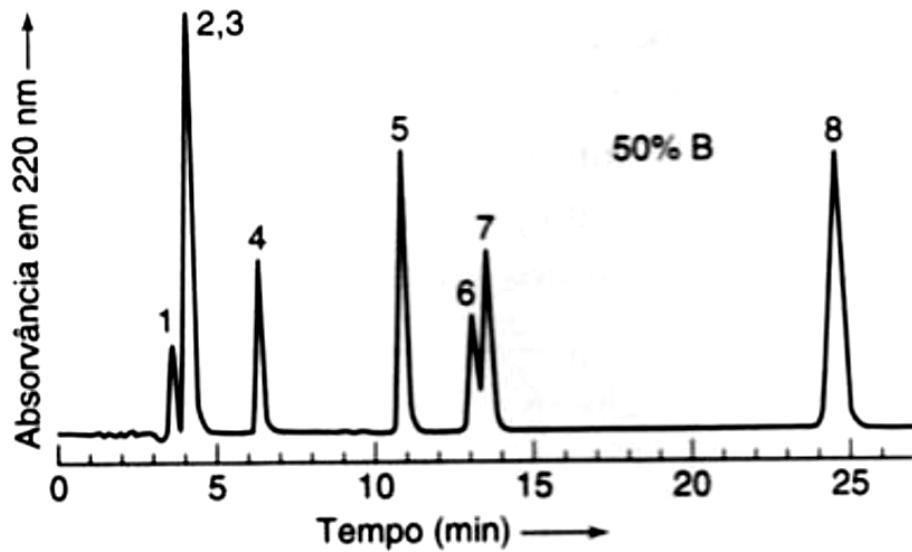


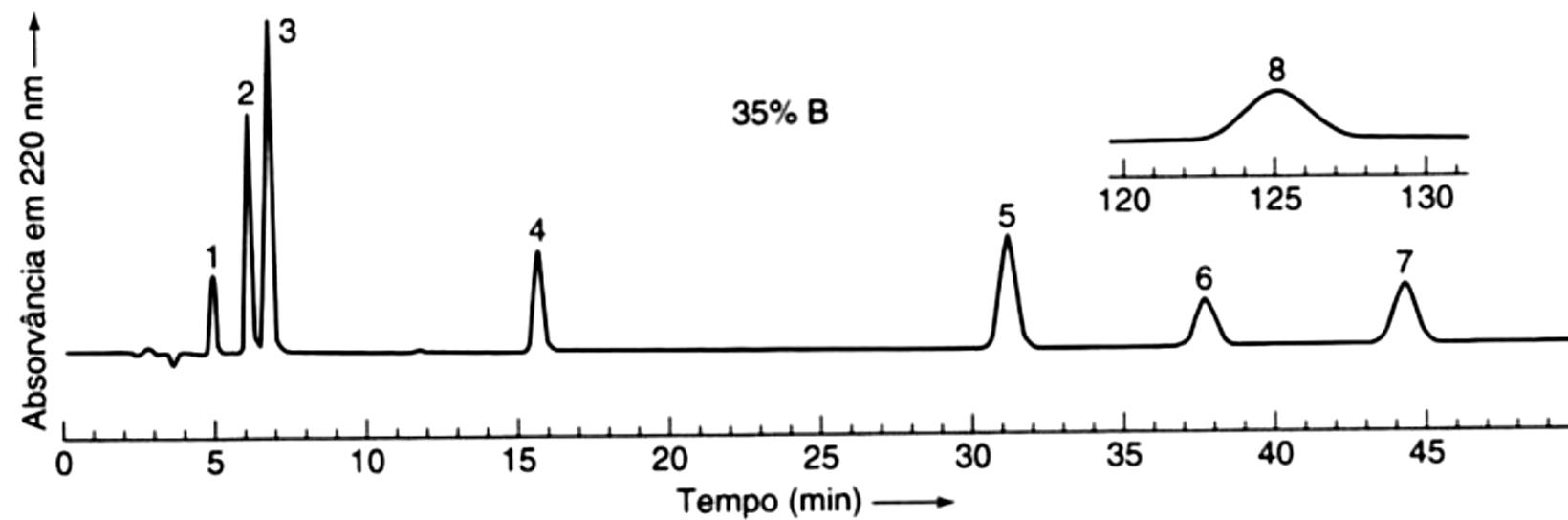
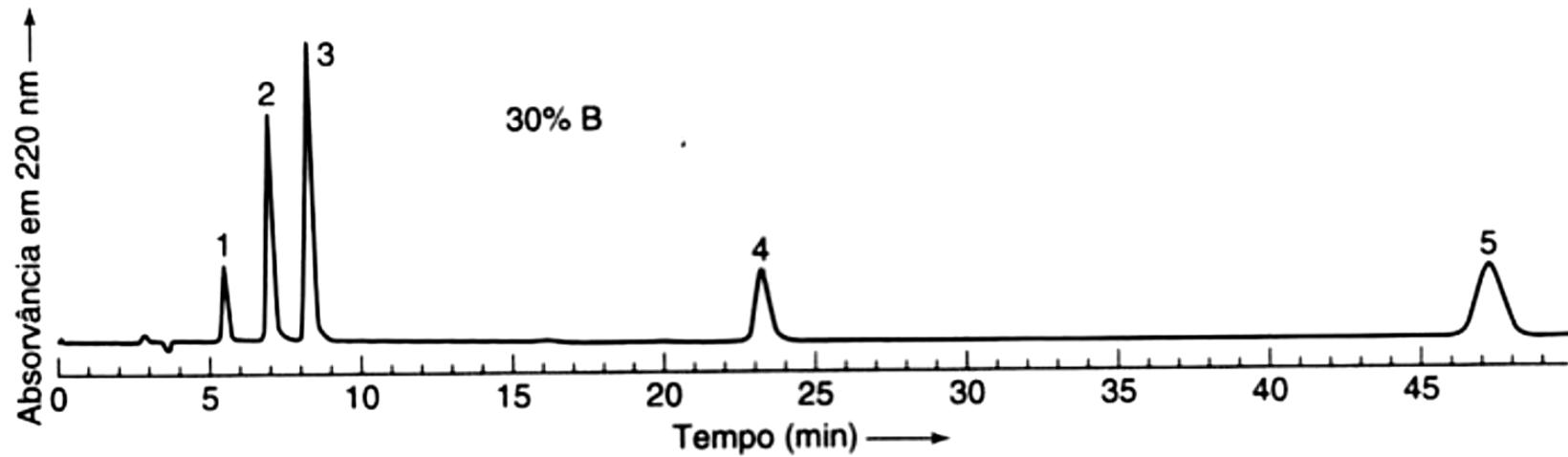
a) partículas porosas; b) partículas peliculares; c) micropartículas peliculares¹⁷

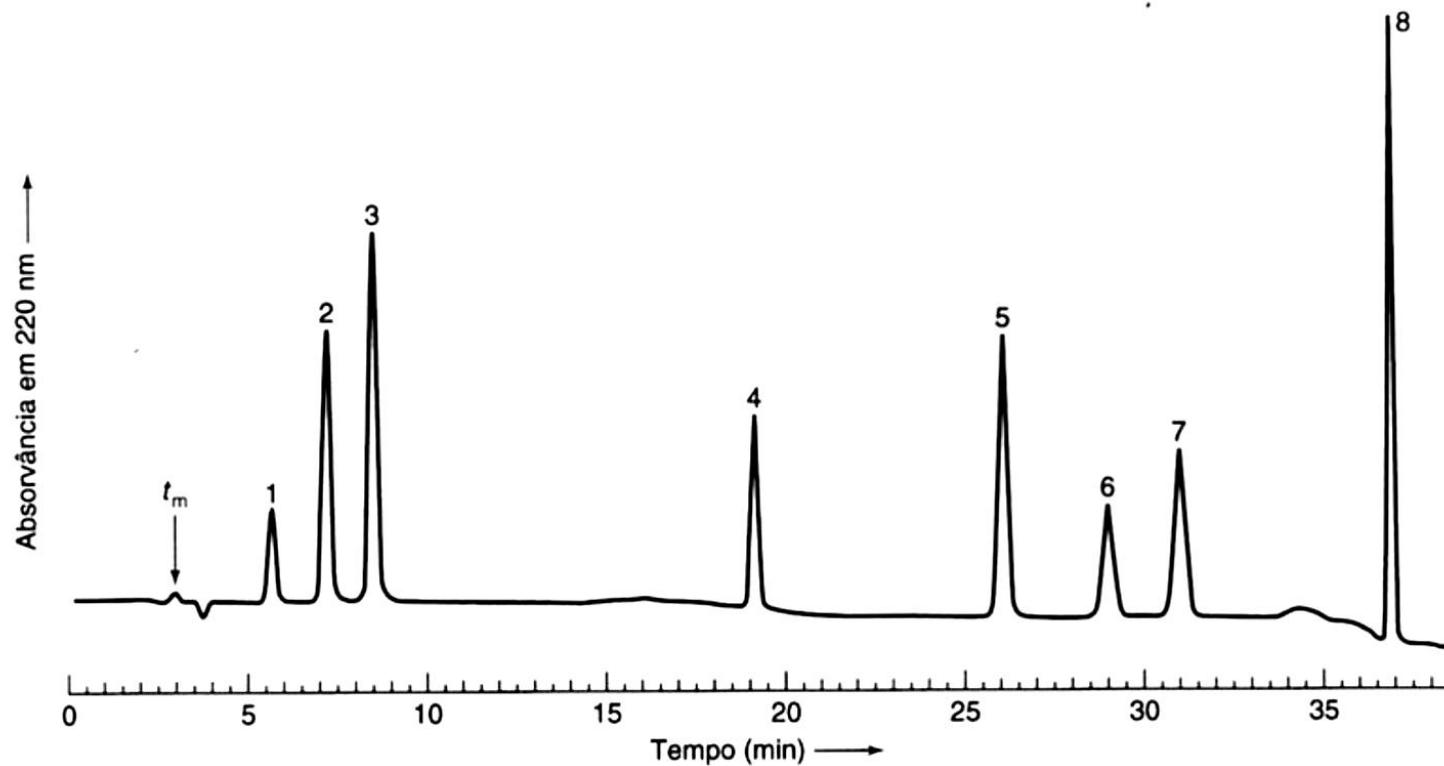
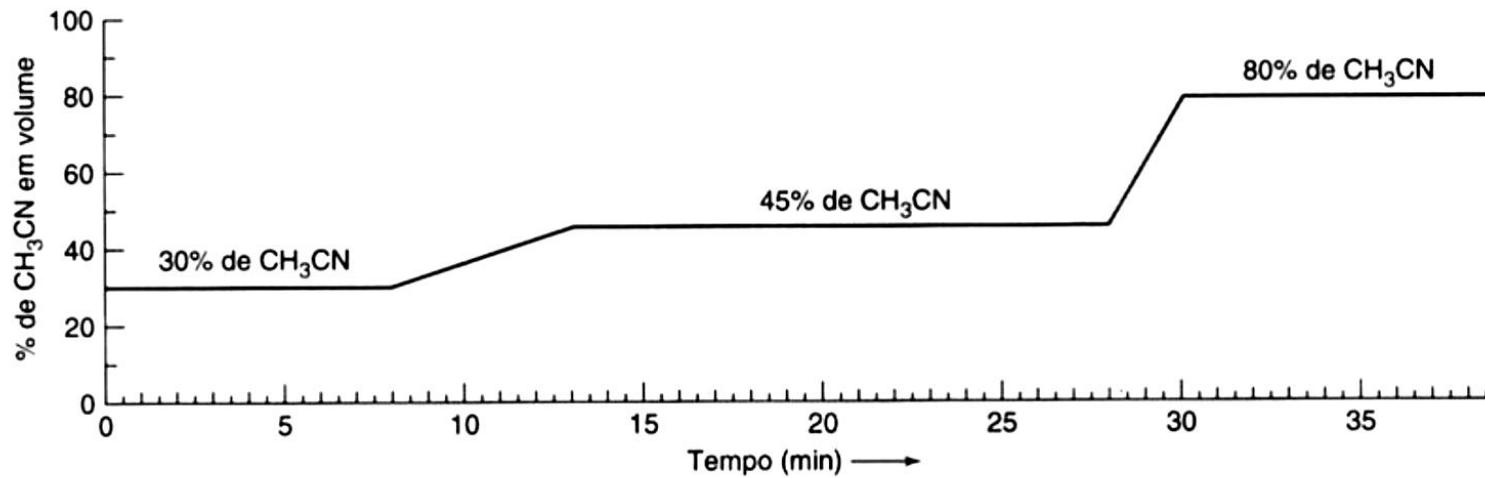
CLASSIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO A FASE ESTACIONÁRIA

- ***Cromatografia em fase normal:***
 - Fase estacionária polar, solvente menos polar;
 - O solvente mais polar tem força eluente maior
- ***Cromatografia em fase reversa:***
 - Fase estacionária apolar ou fracamente polar, solvente é mais polar.
 - O solvente menos polar tem força eluente menor.





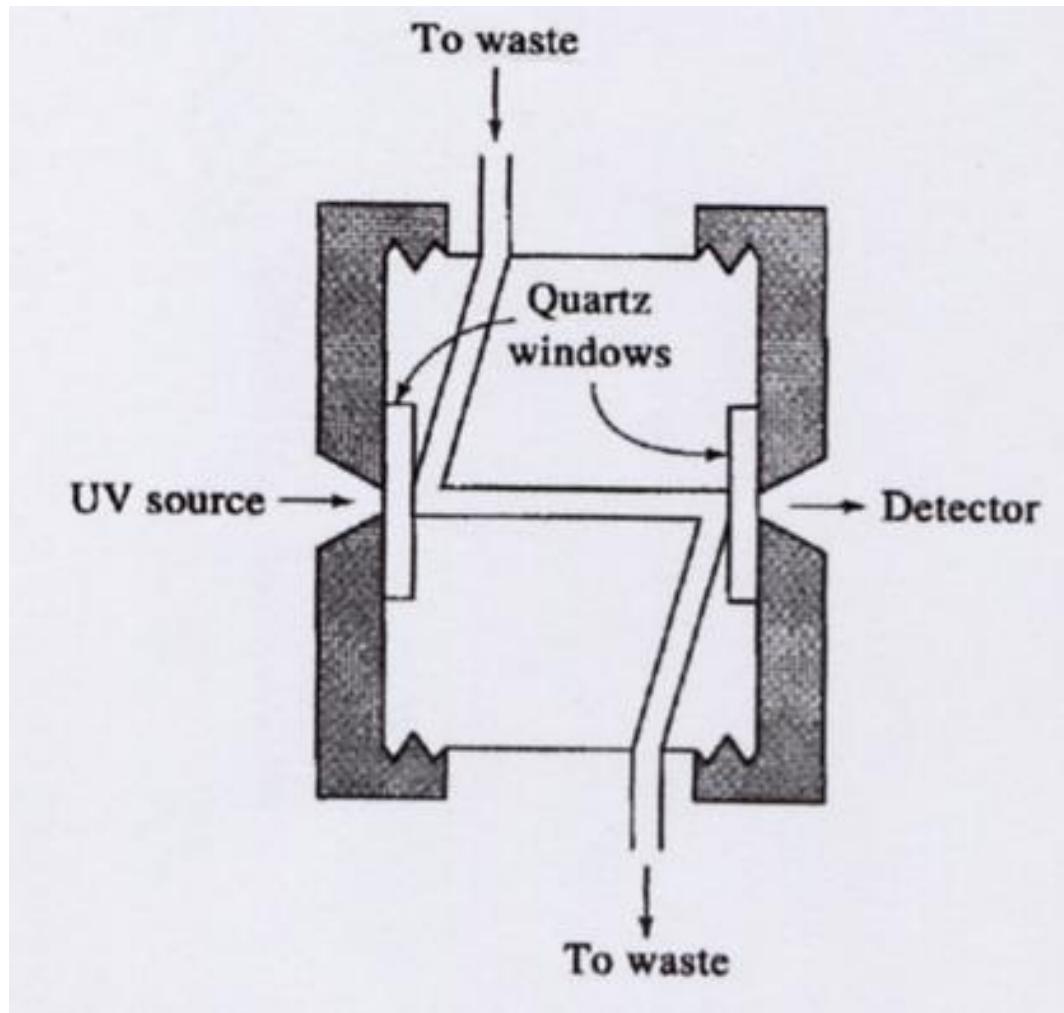




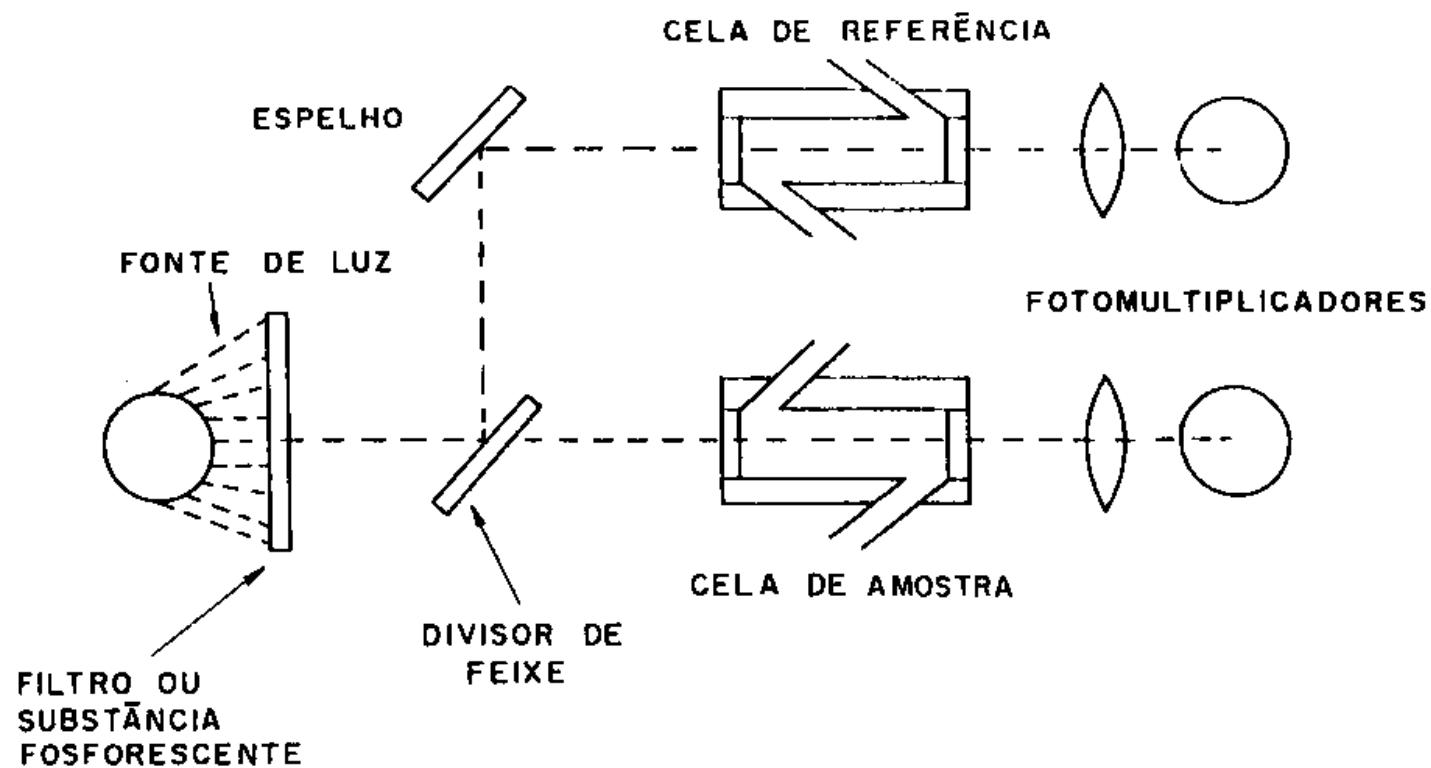
SISTEMAS DE DETECÇÃO

- ULTRAVILOETA
- ÍNDICE DE REFRAÇÃO
- EVAPORATIVO COM ESPALHAMENTO DE LUZ
- ELETROQUÍMICO
- FLUORESCÊNCIA
- NITROGÊNIO
- CONDUTIVIDADE
- ESPECTROMETRIA DE MASSA
- INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

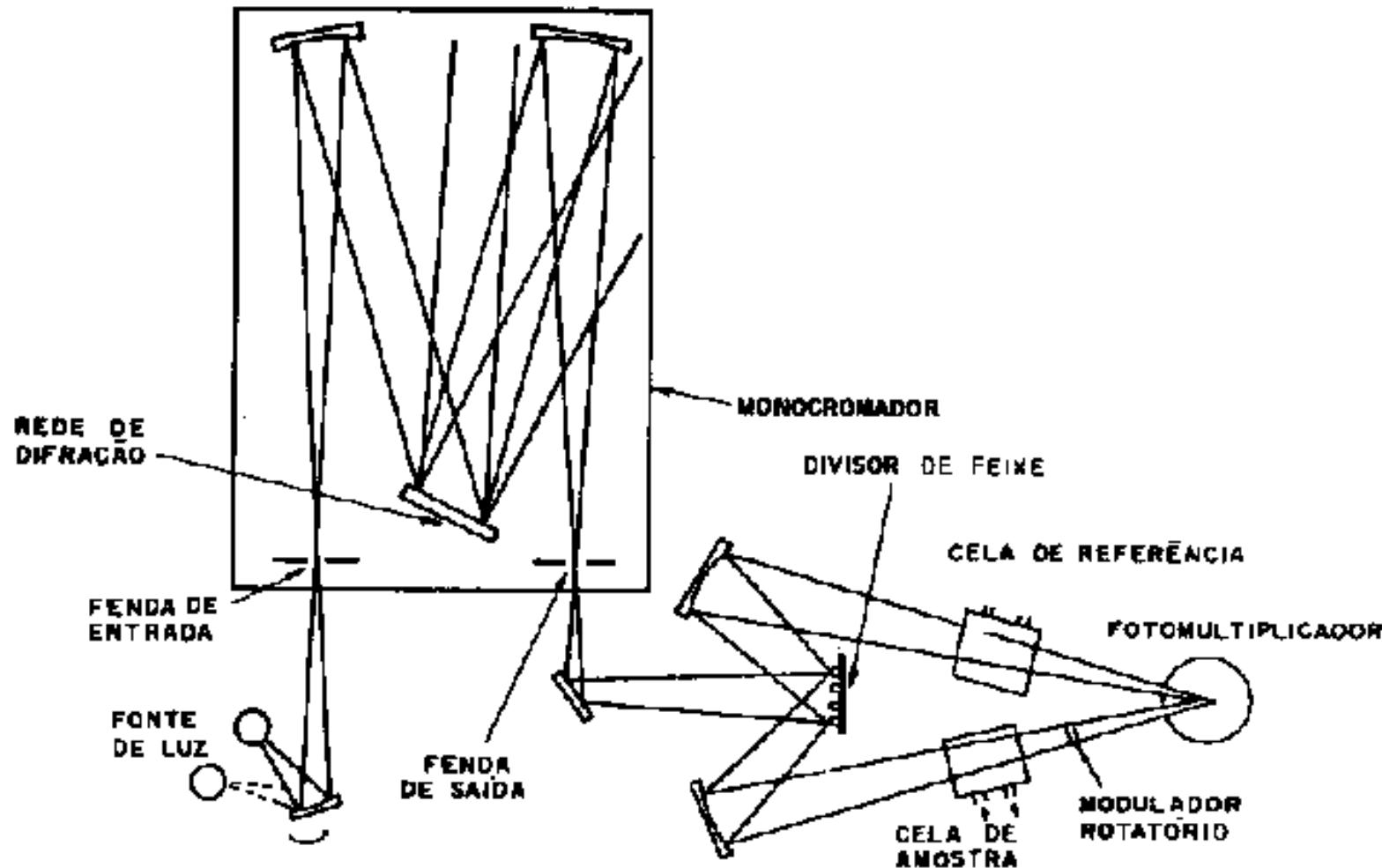
ABSORVÂNCIA UV COM CÉLULA EM Z

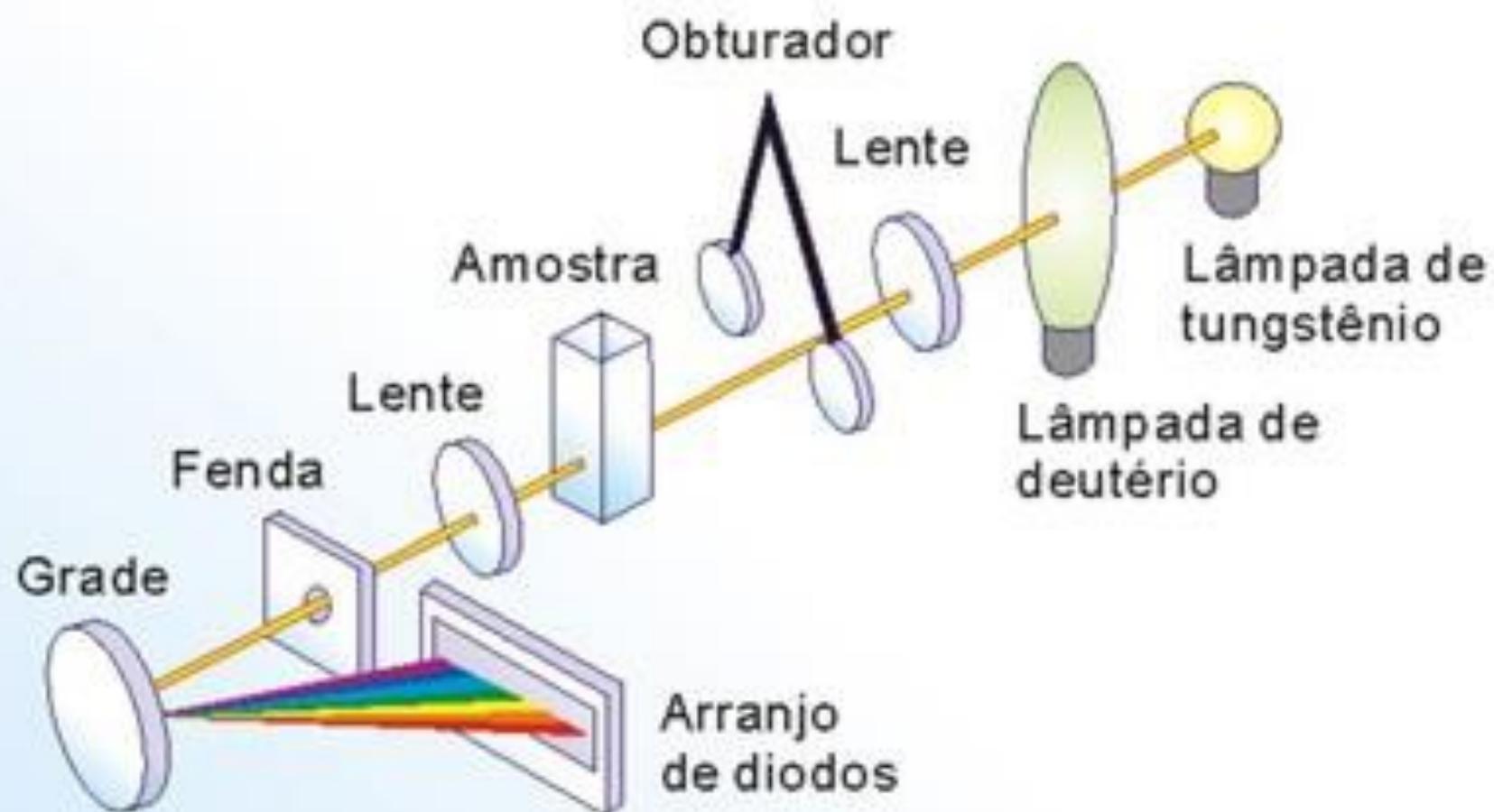


COMPRIMENTO DE ONDA FIXO



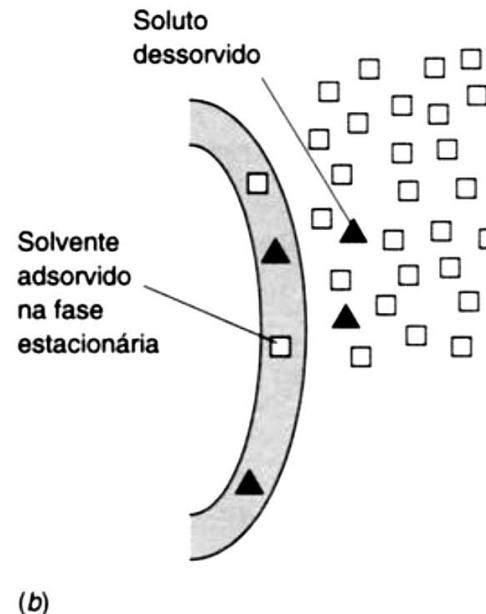
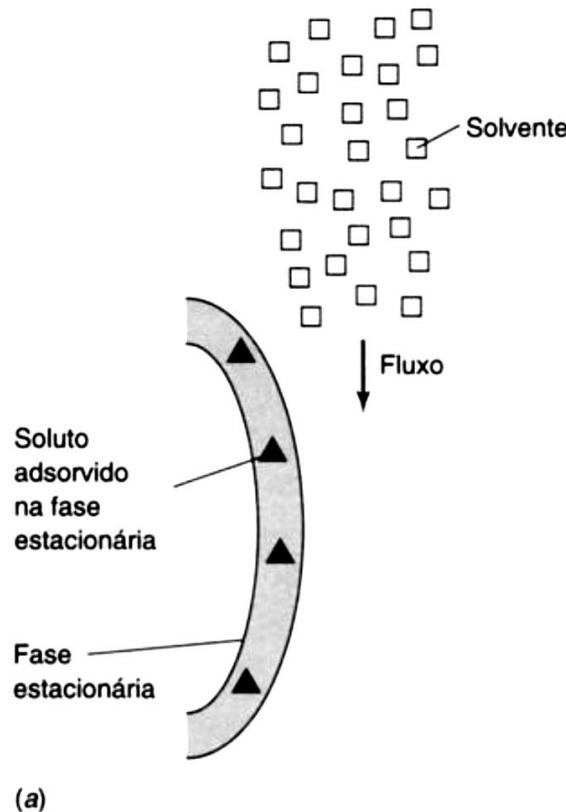
UV – VIS COM COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL





PROCESSO DE ELUIÇÃO

- As moléculas do solvente competem com as moléculas do soluto para se ligarem aos sítios ativos presentes na fase estacionária. Quanto maior a força eluente do solvente, mais facilmente ele deslocará o soluto.



APLICAÇÕES

- **Análises qualitativas**

- Espectrometria de massa, RMN, infravermelho.

- **Análises quantitativas**

- Curva de calibração externa
 - Curva por adição de padrão
 - Curva por padrão interno
 - Curva de calibração externa por interpolação dematriz