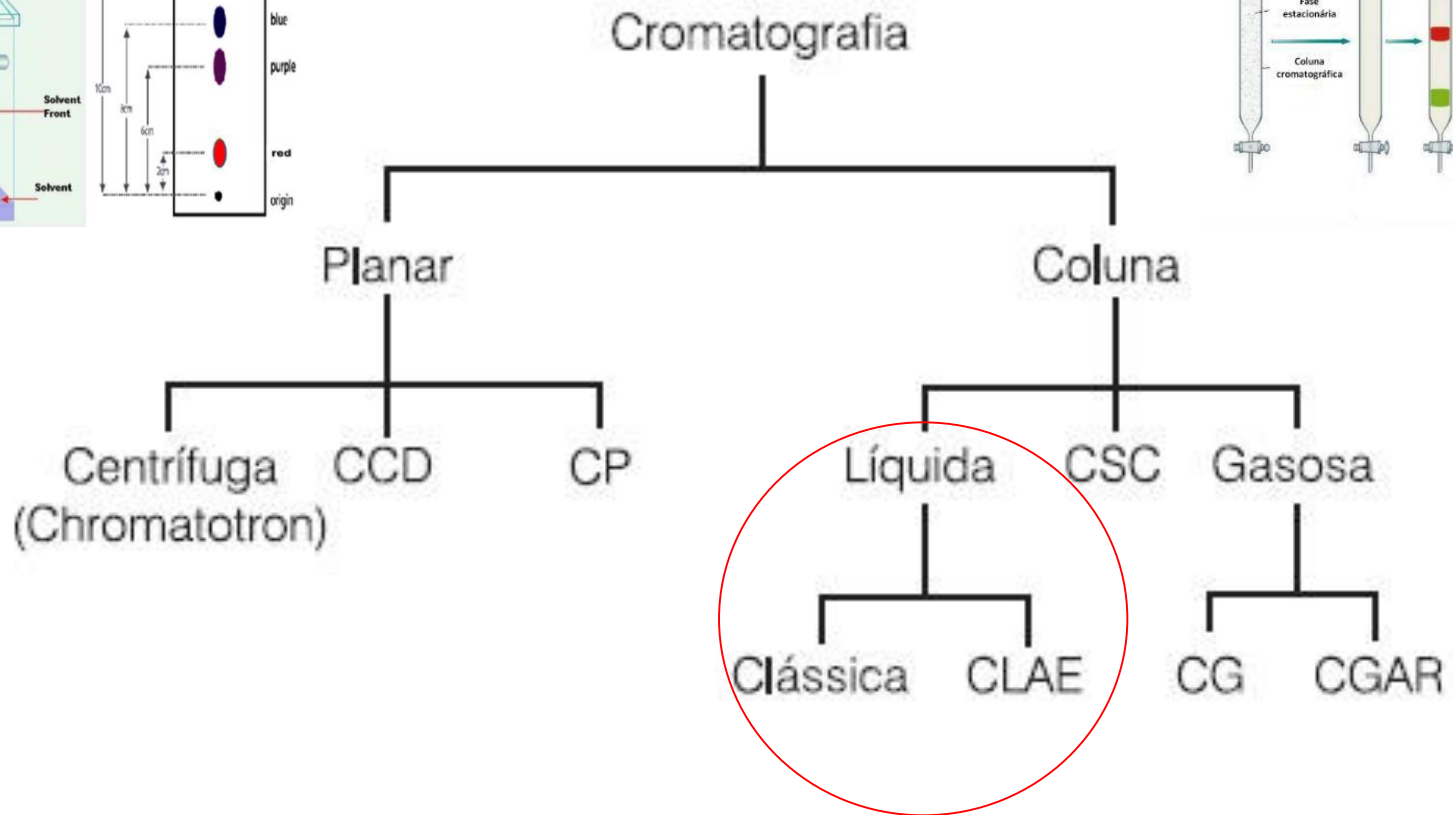
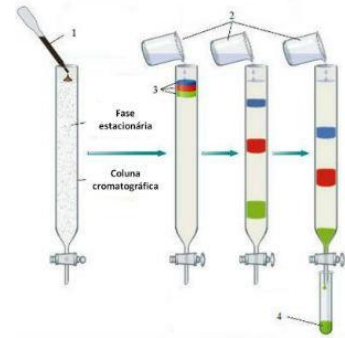
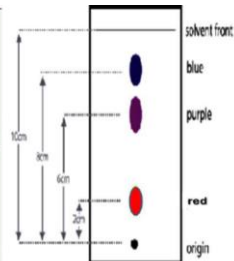
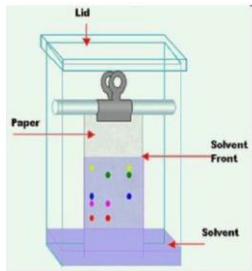


Cromatografia

Classificação pela forma física



Clássica x alta eficiência

Clássica: utiliza colunas de vidro com diâmetros internos de 10 a 50 mm e recheadas com partículas da fase estacionária (sólida ou sólido recoberto com líquido) com diâmetros de 150 a 200 μm . Normalmente a fase móvel ului por gravidade.

Alta eficiência: emprega a fase móvel líquida e uma fase estacionária muito finamente dividida 3 a 10 μm em colunas fechadas com diâmetros internos de 2 a 5 mm e 1 a 4,6 mm. Para se obter vazões satisfatórias o líquido deve ser pressurizado a altas pressões.

Cromatografia Líquida

Tipos de acordo com o mecanismo de separação

Cromatografia líquido-sólida ou de adsorção

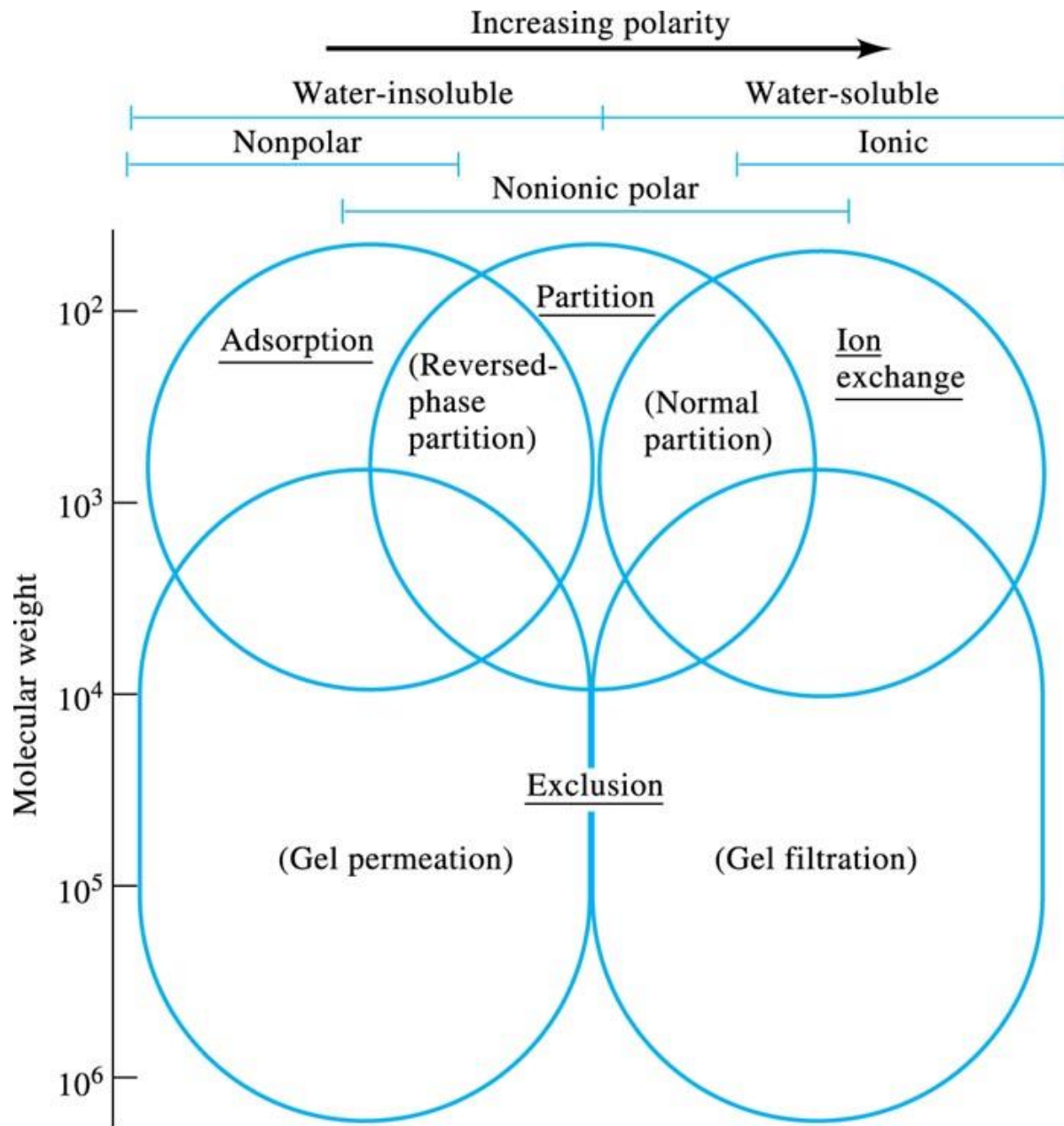
Cromatografia de partição

Cromatografia de troca iônica

Cromatografia em gel ou de exclusão por tamanho

Cromatografia por afinidade

Cromatografia quiral



Cromatografia de adsorção

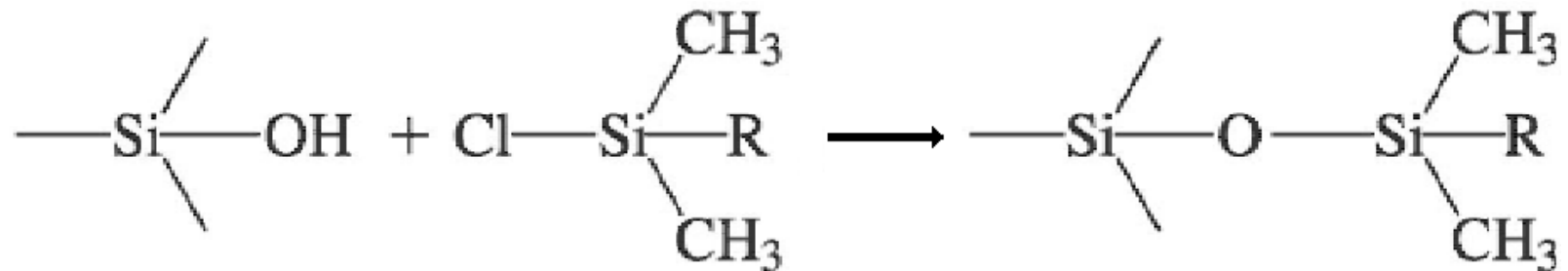
- Adsorção dos analitos em uma superfície sólida.
- A FE, nesse caso, é a superfície de um sólido polar finamente dividido.
- Nesse tipo de recheio, o analito compete com a FM pelos sítios da superfície do recheio e a retenção resulta das forças de adsorção.
- Sílica finamente dividida e a alumina são as únicas fases estacionárias empregadas.
- A única variável que afeta o coeficiente de distribuição dos analitos é a composição da FM.
- **FM** é constituída geralmente por um **solvente orgânico ou por uma mistura de solventes orgânicos**; **FE** é composta por partículas finamente **divididas de sílica ou alumina**.
- Aplicações: separação de compostos relativamente não-polares insolúveis em água e com massas molares menores que cerca de 5000.

Cromatografia por partição

- FE é um segundo líquido que é imiscível com o líquido da FM.
- Subdividida: líquido-líquido e líquida com fase ligada.
- A diferença entre as 2 está na forma com a qual a FE é imobilizada nas partículas de suporte do recheio.
- Líquido-líquido**: o líquido é imobilizado por adsorção física.
- Líquida com fase ligada**: o líquido é imobilizado por meio de ligações químicas. É o método mais utilizado, pois apresenta **maior estabilidade** da coluna.

Recheios com fases ligadas

Reação de organoclorosilano com os grupos –OH formados na superfície das partículas de sílica por hidrólise a quente em HCl diluído. O produto é um organosiloxano.



- Vantagem:** estabilidade muito maior que as fases estacionárias immobilizadas fisicamente; permite eluição por gradiente

- Desvantagem:** capacidade de amostra limitada

Recheios de fases normal e reversa

- Dois tipos de cromatografia por partição podem ser distinguidos com base nas polaridades relativas da fase estacionária e móvel.

- Fase normal:** FE polar (trielileno glicol ou água) e FM apolar (hexano)

O componente *menos* polar é eluído primeiro.

O *aumento* da polaridade da FM *diminui* o tempo de eluição.

- Fase reversa:** FE apolar (hidrocarboneto) e FM polar (água, MeOH, ACN)

O componente *mais* polar é eluído primeiro.

O *aumento* da polaridade da FM *aumento* o tempo de eluição.

Escolha da FM e FE: a separação é feita igualando-se a polaridade do analito com aquela da FE; uma FM de polaridade diferente é então empregada.

Polaridades dos grupos funcionais

Ordem crescente:

hidrocarbonetos alifáticos < olefinas < hidrocarbonetos aromáticos < haletos < sulfetos < éteres < compostos nitro < ésteres ≈ aldeídos ≈ cetonas < alcoóis ≈ aminas < sulfonas < sulfóxidos < amidas < ácidos carboxílicos < água

1- Indique a ordem de eluição pela qual os seguintes compostos deverão ser eluídos de uma coluna de CLAE contendo um recheio de fase reversa: benzeno, éter dietílico, n-hexano.

2- Indique a ordem de eluição pela qual os seguintes compostos deverão ser eluídos de uma coluna de CLAE contendo um recheio de fase normal: acetato de etila, ácido acético, dimetilamina.

Aplicações

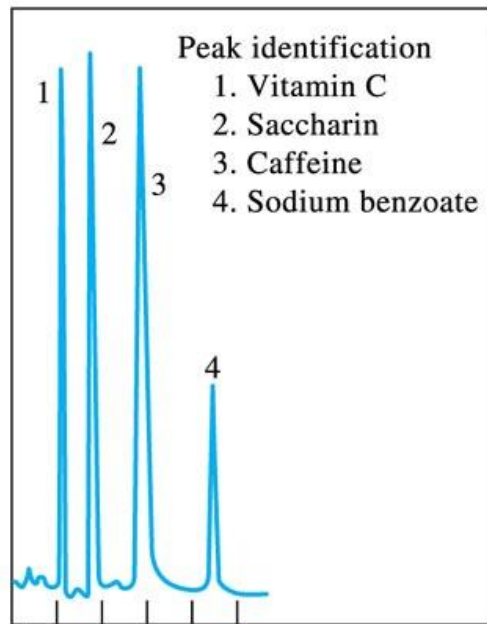
TABLE 32-2

Typical Applications of High-Performance Partition Chromatography

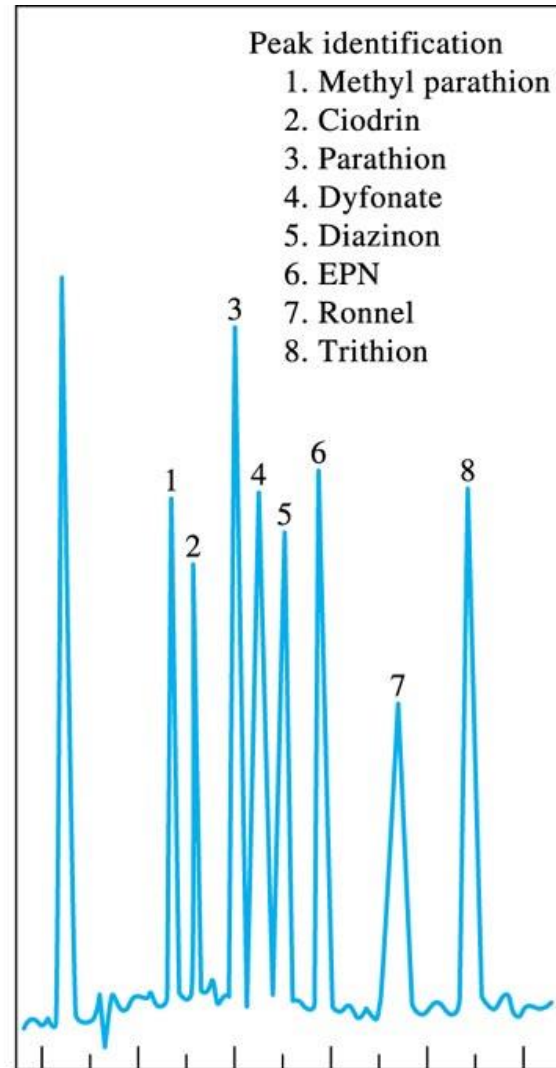
Field	Typical Mixtures Separated
Pharmaceuticals	Antibiotics, sedatives, steroids, analgesics
Biochemicals	Amino acids, proteins, carbohydrates, lipids
Food products	Artificial sweeteners, antioxidants, aflatoxins, additives
Industrial chemicals	Condensed aromatics, surfactants, propellants, dyes
Pollutants	Pesticides, herbicides, phenols, polychlorinated biphenyls (PCBs)
Forensic chemistry	Drugs, poisons, blood alcohol, narcotics
Clinical medicine	Bile acids, drug metabolites, urine extracts, estrogens

Aplicações

Aditivos de bebidas refrigerantes



(a) Time, min



(b) Time, min

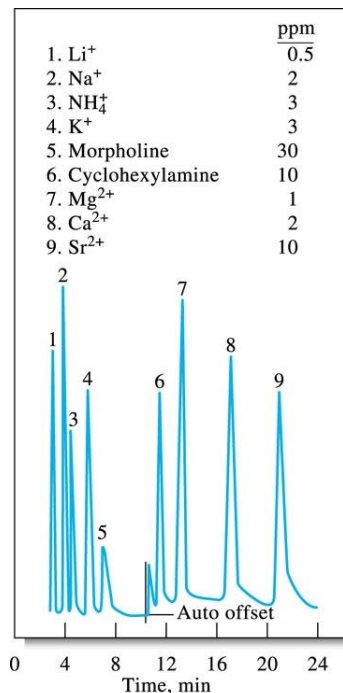
Inseticidas
organofosforados

Cromatografia por troca iônica

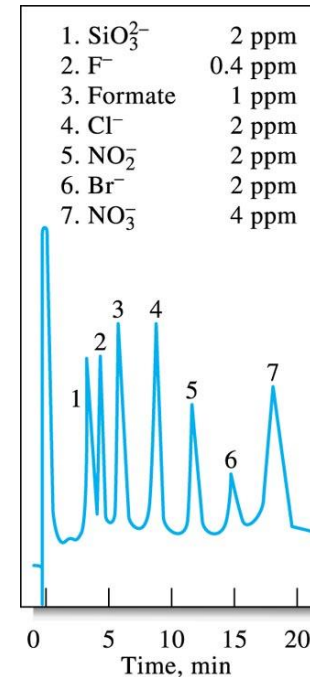
- Dois tipos de cromatografia de íons: **baseada em supressor** e de **coluna única**.
- Elas diferem no método utilizado para prevenir que a condutividade dos eletrólitos eluentes interfiram com a medida das condutividades dos analitos.
- Os detectores de condutividade apresentam muitas propriedades de um detector ideal. Eles podem ser altamente sensíveis, são universais para as espécies carregadas e, como regra, respondem de uma forma previsível às alterações de concentração.
- São de operação simples, de baixo custo de construção e de manutenção, fáceis de serem miniaturizados.
- Limitação:** alta concentração de eletrólito necessária para a eluição da maioria dos íons dos analitos em tempo razoável → sobreposição da condutividade dos componentes da FM com a dos íons analitos → redução da sensibilidade do detector.

Coluna supressora do eluente

- Introdução de uma coluna supressora do eluente logo após a coluna trocadora de íons.
- A coluna supressora é recheada com uma segunda resina de troca iônica de íons que converte efetivamente os íons do solvente de eluição para espécies moleculares de ionização limitada sem afetar a condutividade dos íons dos analitos.



Mistura de cátions



Mistura de ânions

Coluna única

- Não requer equipamentos especiais para supressão.
- Depende da pequena diferença de condutividade entre os íons da amostra e os íons prevalentes do eluente.
- Para amplificar essas diferenças, trocadores de baixa capacidade são empregados permitindo a eluição com soluções com baixas concentrações de eletrólitos.
- Pouco menos sensível para determinar os ânions que os métodos que empregam as colunas supressoras.

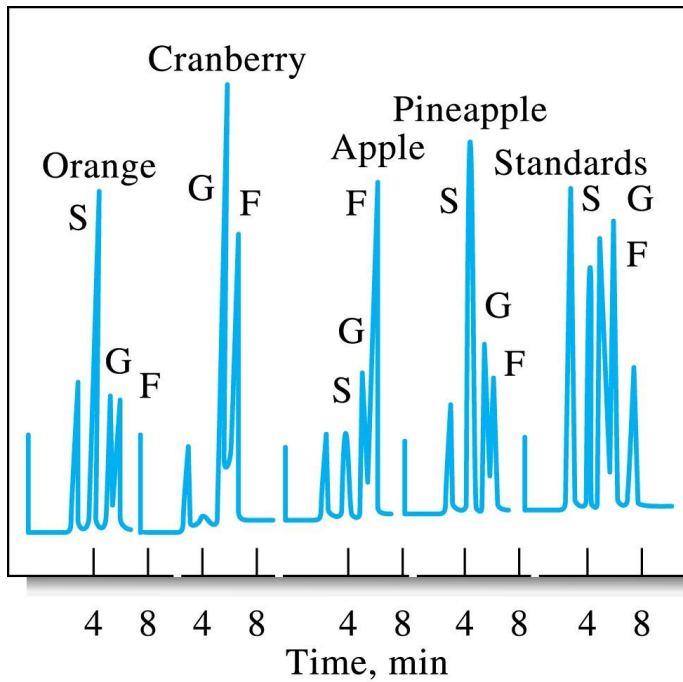
Cromatografia por exclusão por tamanho ou em gel

- Ela se constitui em uma técnica poderosa particularmente aplicada às espécies de alta massa molar.
- Os recheios consistem em partículas pequenas ($\sim 10 \mu\text{m}$) de sílica ou polímeros contendo uma rede de poros uniformes dentro dos quais as moléculas do soluto e do solvente podem difundir.
- O tempo de residência médio das moléculas do analito depende do seu tamanho efetivo.
- As moléculas que são muito maiores que o tamanho médio dos poros do recheio são excluídas e assim não sofrem nenhuma retenção; isto é, elas se deslocam através da coluna na velocidade da FM.
- **Filtração em gel:** recheios hidrofílicos; separação de espécies polares.
- **Permeação em gel:** recheios hidrofóbicos; separação de espécies não-polares

Aplicações

Recheio hidrofílico - exclusão de massas molares > 1000

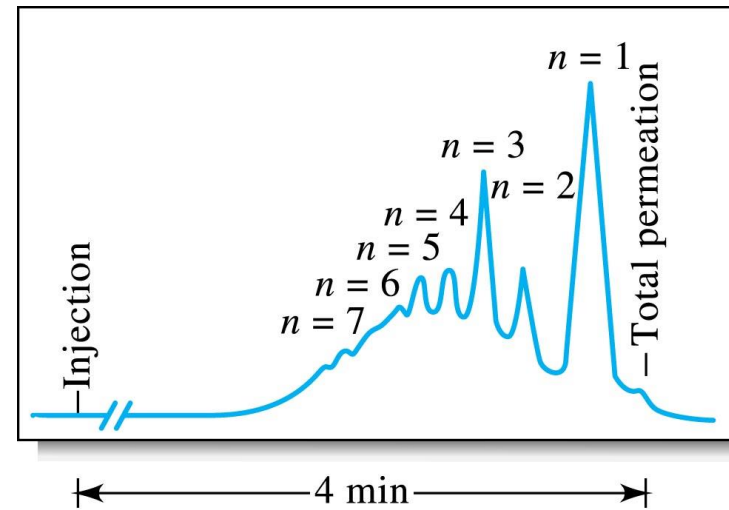
Suco enlatado



© 2004 Thomson - Brooks/Cole

Recheio hidrofóbico

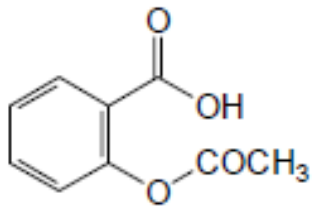
Resina epóxi comercial



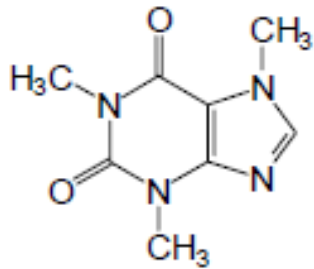
© 2004 Thomson - Brooks/Cole

Exercício

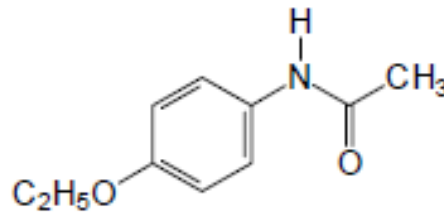
A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos cromatográficos mais modernos utilizados em análise (CLAE analítica) e separação / purificação de misturas (CLAE preparativa). Abaixo são dados os cromatogramas **X**, **Y** e **Z** de uma mistura de compostos presentes em analgésicos: aspirina (**A**), cafeína (**B**), fenacetina (**C**) e paracetamol (**D**), utilizando três fases móveis diferentes, no modo isocrático, em uma mesma coluna.



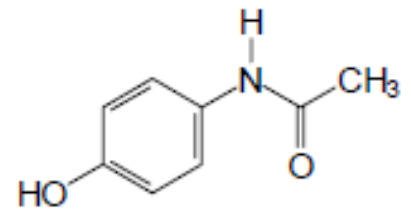
(A)



(B)



(C)

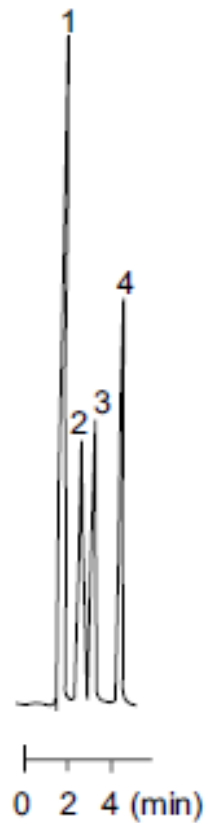


(D)



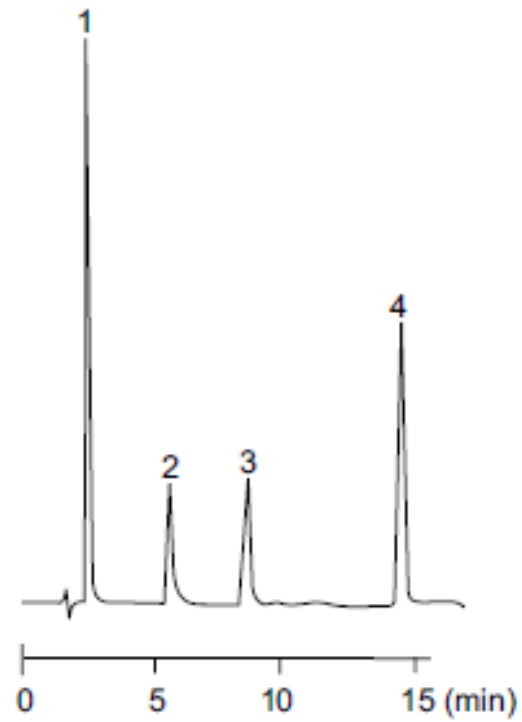
(X)

Fase móvel: 70% MeOH/
30% HOAc(1%v/v)



(Y)

Fase móvel: 60% MeOH/
40% HOAc(1%v/v)



(Z)

Fase móvel: 40% MeOH/
60% HOAc(1%v/v)

MeOH = metanol e HOAc = ácido acético

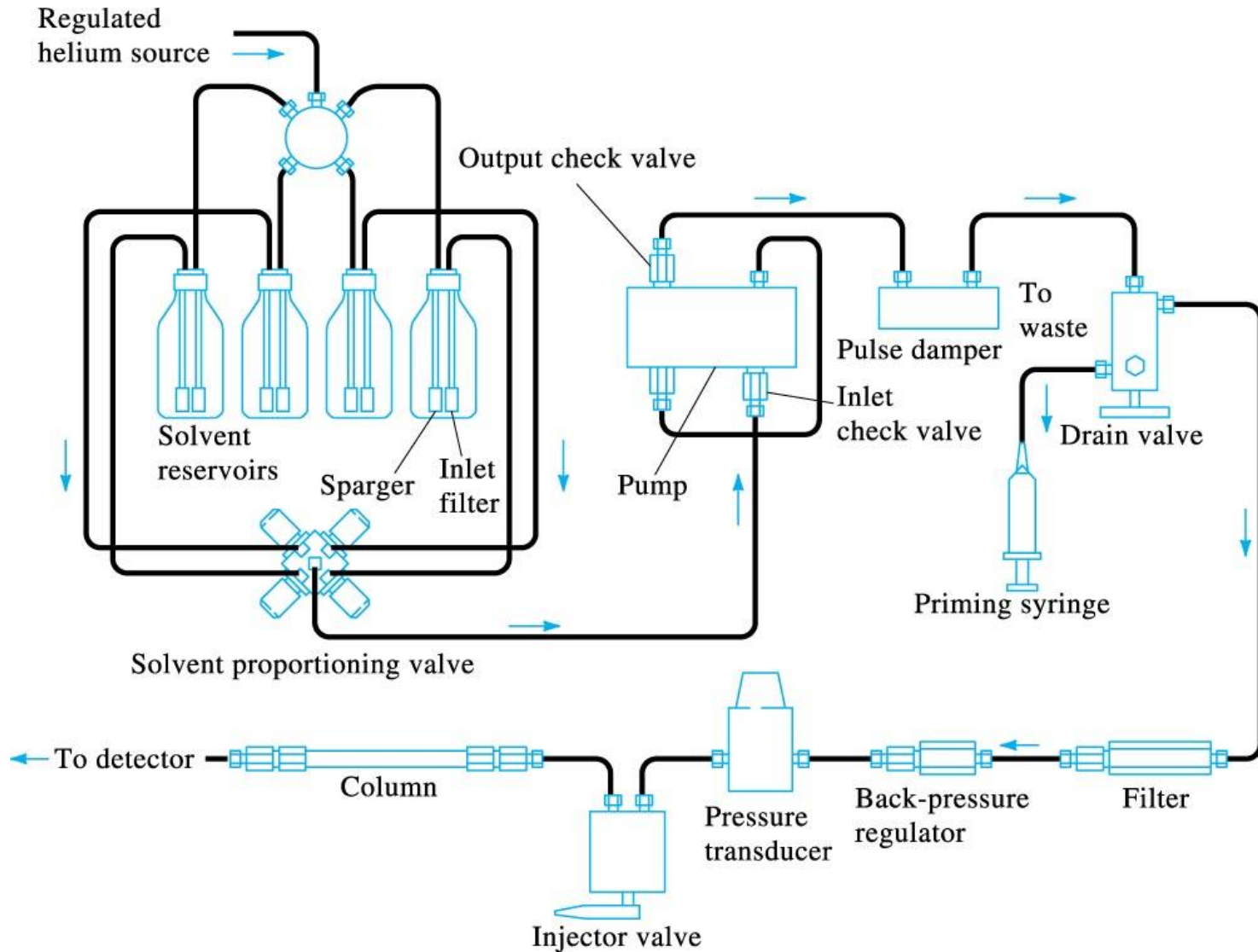
Avaliando esses cromatogramas, responda às perguntas abaixo.

a) Qual a fase móvel mais apropriada para ser utilizada em escala preparativa, e a fase móvel mais adequada para utilização em escala analítica, considerando um grande número de amostras a serem analisadas? Justifique sua resposta.

b) Qual o tipo de coluna (fase reversa ou fase normal) utilizada nestes três experimentos? Justifique sua resposta.

c) Sabendo-se que o composto mais polar elui primeiro, qual o composto de maior tempo de retenção? Justifique sua resposta

Instrumentação



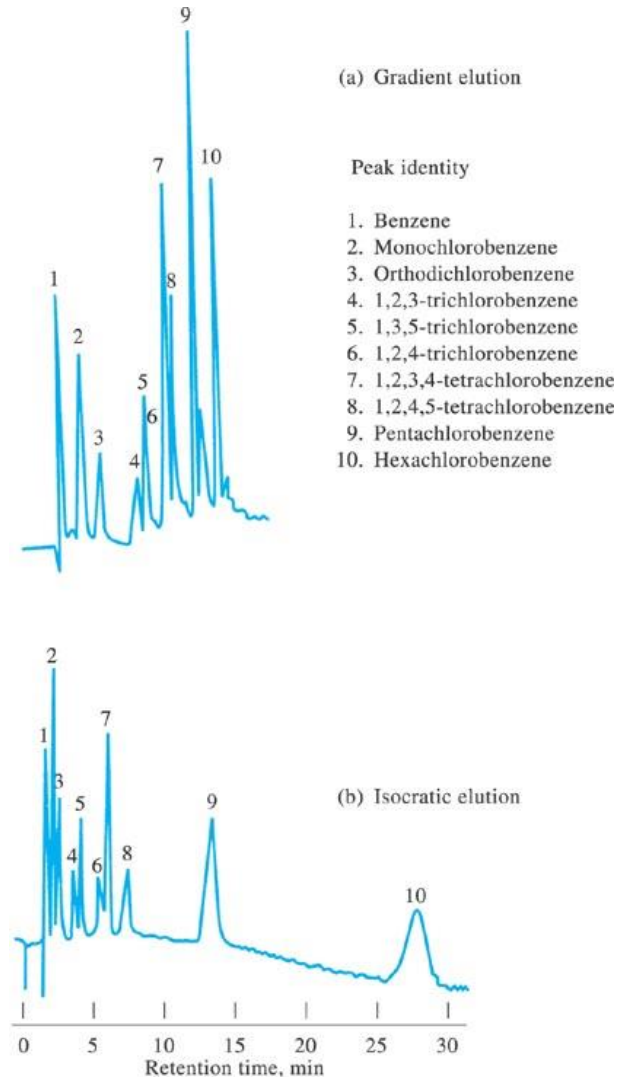
Reservatório e sistema de solventes

- Frasco de vidro com dispositivo (filtros) para remoção de partículas e gases dissolvidos presentes nos líquidos.
- As bolhas causam alargamento dos picos e interferem no desempenho da coluna e do detector.
- Partículas podem causar entupimento e afetam o desempenho da coluna e do detector.
- Os degaseificadores podem ser constituídos por sistemas de aplicação de vácuo, sistemas de destilação, um dispositivo de aquecimento e agitação ou um sistema de *sparging*, no qual os gases dissolvidos são arrastados para fora de um solvente por pequenas bolhas de um gás inerte e insolúvel.

Tipos de eluição

• **Eluição por gradiente:** sistemas de solventes que diferem significativamente em polaridade são empregados. A razão entre os dois solventes varia em uma forma pré-programada durante a separação, algumas vezes de forma contínua e por vezes em etapas. A eluição por gradiente altera o tempo de retenção, melhora a eficiência e a resolução da separação.

• **Eluição isocrática:** é feita com um único solvente ou com mistura de solvente de composição constante.



Escolha da fase móvel

–tipo de fase estacionária usada

→ determina se a fase móvel é fraca (um solvente que elui lentamente um soluto a coluna (i.e., retenção alta do soluto ou k' grande)) ou forte (um solvente que elui rapidamente solutos da coluna (i.e., baixa retenção do soluto ou k' pequeno)).

–solubilidade dos solutos

–viscosidade da fase móvel

–tipo de detector usado e o sinal de background do solvente

–pureza dos solventes

–miscibilidade dos solventes (para o gradiente de eluição)

Sistemas de bombeamento

Tem a função de enviar um fluxo constante e reprodutível da FM para a coluna.

Requisitos:

- Habilidade de gerar pressões de até 6000 psi;
- Saída livre de pulsação (vazão contínua sem pulso);
- Vazões na faixa de 0,1 a 10 mL min⁻¹ para aplicações analíticas e até 100 mL min⁻¹ para aplicações preparativas;
- Reprodutibilidade relativa da vazão de 0,5% ou melhor;
- Resistência a corrosão.

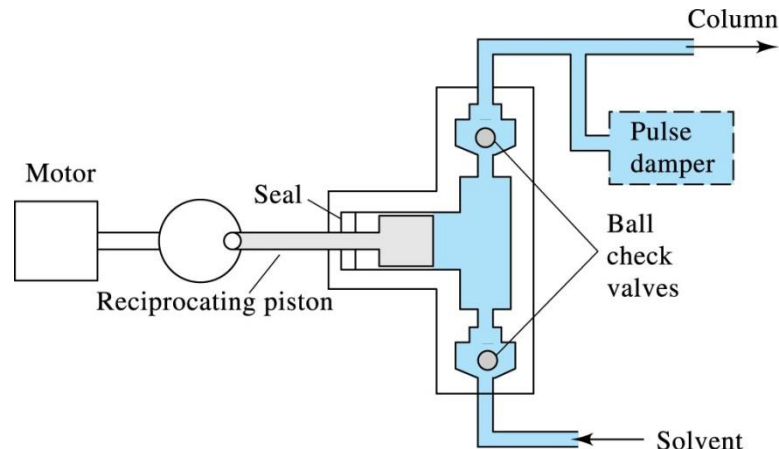
Tipos de bombas

- **Bombas de seringa:** produzem uma saída livre de pulsação cuja vazão pode ser controlada facilmente; no entanto, elas apresentam pequena capacidade (~250 mL) e se tornam inconvenientes quando é preciso trocar o solvente.

- **Bombas pneumáticas:** consistem em um reservatório maleável de solvente inserido em um vaso que pode ser pressurizado por um gás comprimido. São simples, de baixo custo e livres de pulsação; porém, elas apresentam capacidade e pressão de saída limitadas e as vazões são dependentes da viscosidade do solvente. Além disso, elas não podem ser adaptadas para eluição por gradiente.

Tipos de bombas

- **Bombas recíprocas:** consistem em uma câmara pequena cilíndrica que é preenchida e esvaziada pela movimentação de ida e vinda de um pistão. O movimento da bomba produz um fluxo pulsado que deve ser atenuado posteriormente. **Vantagens:** volume interno pequeno, alta pressão de saída, pronta adaptação à eluição por gradiente e vazões constantes, as quais são bastante independentes da queda de pressão imposta pela coluna e viscosidade do solvente.

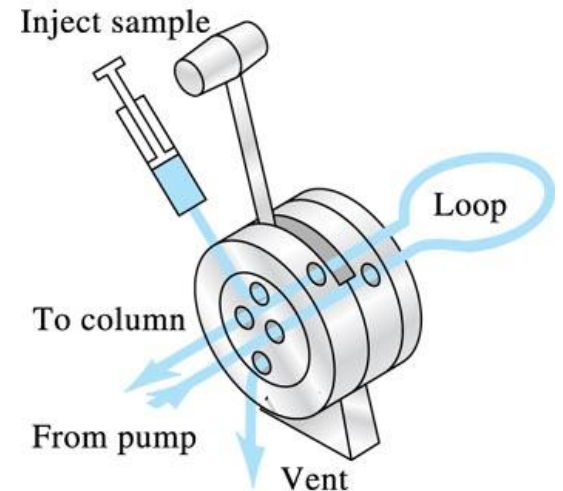
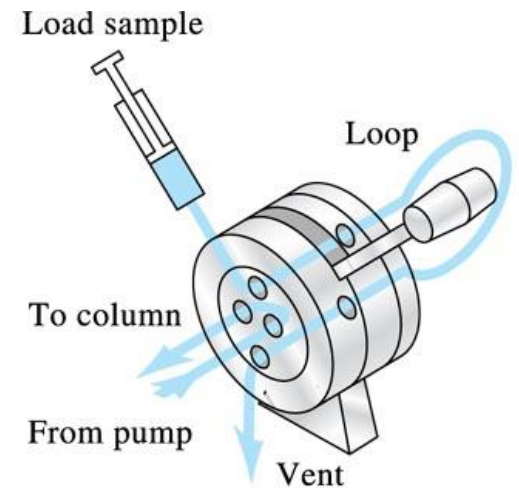


Injeção de amostras

Mais empregado: válvula com alça de amostragem.

As alças são intercambiáveis com volume que variam de 5 a 500 μL .

Há ainda injetores automáticos acoplados ao auto-amostradores (*auto-sampler*).



Coluna e Pré-coluna

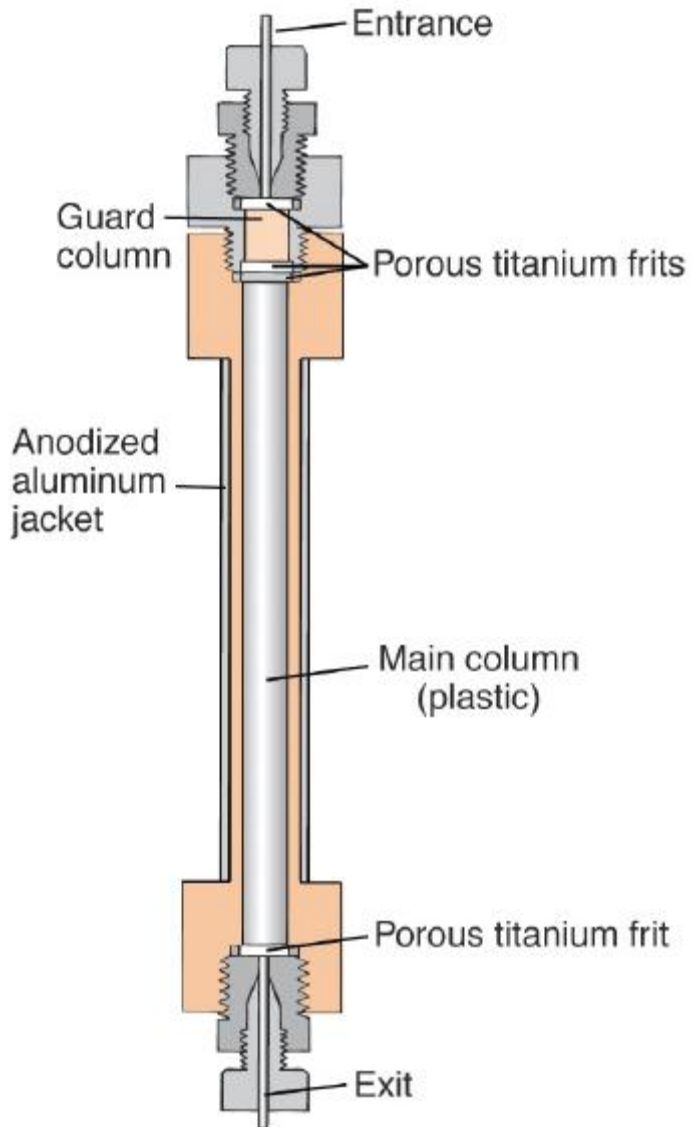
Colunas: geralmente são tubos de aço inox com 10 a 30 cm de comprimento, diâmetro interno de 2 a 5 mm e partículas de 3 a 10 μm (40.000 a 60000 pratos m^{-1}).

Microcolunas: com diâmetros internos de 1 a 4,6 mm e comprimentos de 3 a 5 μm , contêm cerca de 100.000 pratos m^{-1} e apresentam vantagens como à velocidade e consumo mínimo de solventes.

Coluna de guarda: é colocada entre o injetor e a coluna analítica, possui a finalidade de proteger a coluna de separação. É utilizada para prevenir que impurezas e compostos fortemente retidos contaminem a coluna de separação. Sua composição deve ser similar àquela da coluna analítica.

Pré-coluna: é utilizada para condicionar a FM com a FE. Deve conter a mesma FE da coluna analítica (pode mudar o perfil da separação).

Coluna



A difusão é muito mais lenta em um líquido que em um gás.

Temperatura \uparrow \rightarrow Tempo de retenção \downarrow \rightarrow

Resolução \uparrow \rightarrow Difusão \uparrow

Detectores

2 tipos



Detectores de propriedades universais ou globais

Detectores de propriedades do soluto



Respondem a propriedades das fase móvel

Respondem a algumas propriedades do soluto



Índice de refração
Constante dielétrica
Densidade

Absorbância no UV
Fluorescência
Corrente de difusão

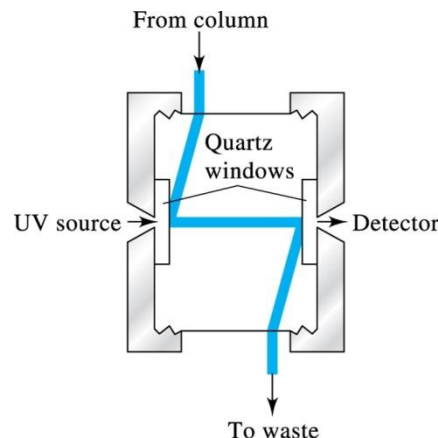
CARACTERÍSTICAS:

- Apresentar volume morto pequeno (minimizar o alargamento dos picos)
- Deve ser pequeno e compatível com a vazão de trabalho.

O detector a ser empregado vai depender da natureza da amostra.

Detectores de absorbância

- Baseia-se no princípio da absorbância da radiação eletromagnética que passa continuamente através de uma célula, pelos compostos presentes na amostra.
- Detecta compostos que absorvem no λ de operação do detector.
- Grande parte dos compostos absorve no UV.
- Ex: compostos contendo bromo, iodo ou enxofre, grupos carbonilas, grupos nitro, etc.



Tipos

Detectores a um λ fixo: a absorbância de um único λ é monitorada pelo sistema
(ex: 254 nm)

- detectores de UV/Vis mais simples e mais baratos
- limitado em flexibilidade
- limitado em tipos de compostos que podem ser monitorados

Detectores de λ variável: um único λ é monitorado em uma dada experiência, mas qualquer λ em certa faixa do espectro pode ser selecionado

- os λ s variam de 190-900 nm.
- mais caro e requer um tipo de óptica mais avançada
- mais versátil, usada para uma faixa maior de compostos

Tipos

Detectores de fotodiodo: opera monitorando *simultaneamente* a absorbância dos solutos a vários e diferentes λ s

- usa uma série ou um conjunto de várias células de detecção dentro do instrumento, em que cada um responde à variação de absorbância a diferentes λ s
- o espectro inteiro de um composto pode ser lido em um tempo mínimo
- útil para detectar a presença de picos mal resolvidos ou picos de contaminantes

Exemplo

Quim. Nova, Vol. 29, No. 6, 1164-1168, 2006

METODOLOGIA PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ÁCIDO NICOTÍNICO, TRIGONELINA, ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA EM CAFÉ TORRADO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Sandriel Trindade Alves, Rafael Carlos Eloy Dias e Marta de Toledo Benassi*

Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-970 Londrina - PR, Brasil

Maria Brígida dos Santos Scholz

Instituto Agronômico do Paraná, CP 481, 86001-970 Londrina - PR, Brasil

Recebido em 21/3/05; aceito em 17/2/06; publicado na web em 14/6/06

HPLC ANALYSIS OF NICOTINIC ACID, TRIGONELLINE, CHLOROGENIC ACID AND CAFFEINE IN ROASTED COFFEE. A reverse phase liquid chromatography method was developed for simultaneous determination of trigonelline, caffeine, nicotinic and chlorogenic (5-CQA) acids in roasted coffee. A gradient of acetic acid/acetonitrile was used as mobile phase and detection was carried out in the UV. The samples were extracted with acetonitrile/water (5:95 v/v) at 80 °C/10 min. Good recovery (89 to 104%), repeatability and linearity were obtained. Detection limits of 0.01, 0.15, 0.04 and 0.04 mg mL⁻¹ were observed for nicotinic acid, trigonelline, 5-CQA and caffeine. The method, applied to arabica and robusta coffees with different degrees of roasting, was efficient and fast (~35 min) and also allowed identification of cinnamic acids.

Exemplo

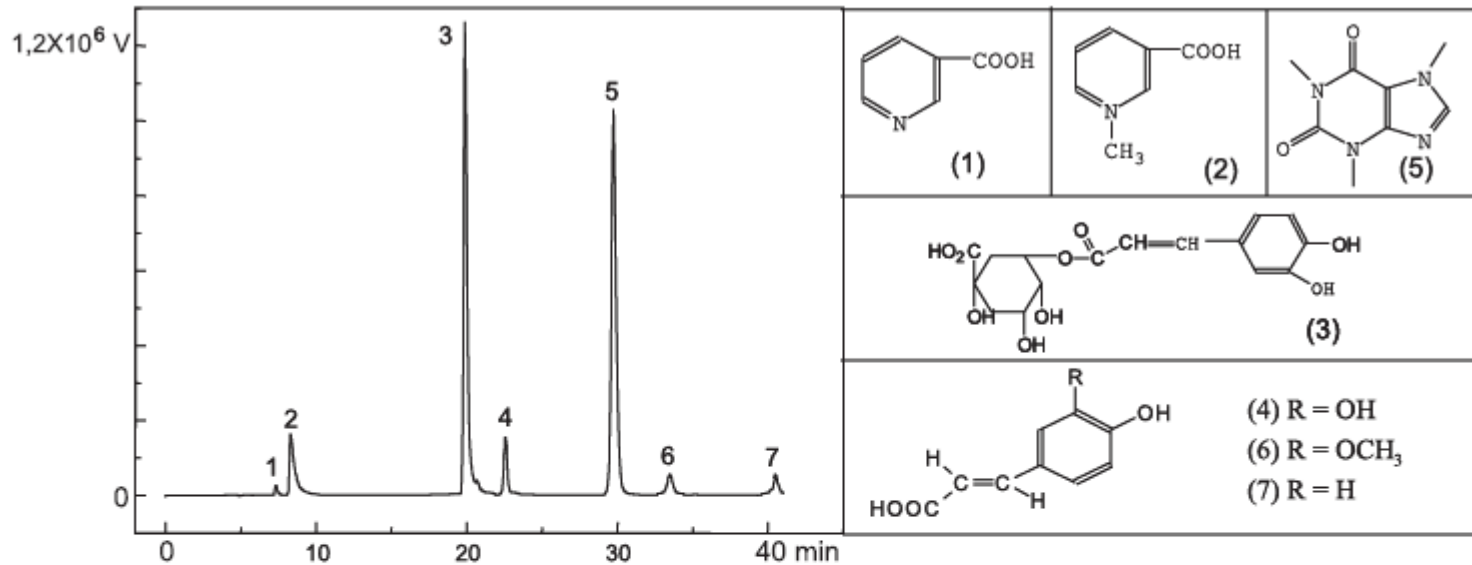


Figura 1. Cromatograma de mistura padrão de ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3), ácido caféico (4), cafeína (5), ácido ferúlico (6) e ácido cumárico (7). Condições: Coluna Spherisorb ODS-1, 4,6 x 250 mm, 5 μ m. Fase móvel: gradiente de ácido acético/H₂O (5:95 v/v) (A) e MeCN (B), 0 a 5' – 5% B; 10' – 13% B, vazão: 0,7 mL/min. Detecção: 0 a 15' – 272 nm, 15' a 23' – 320 nm e, de 23' até o final, 272 nm

Exemplo

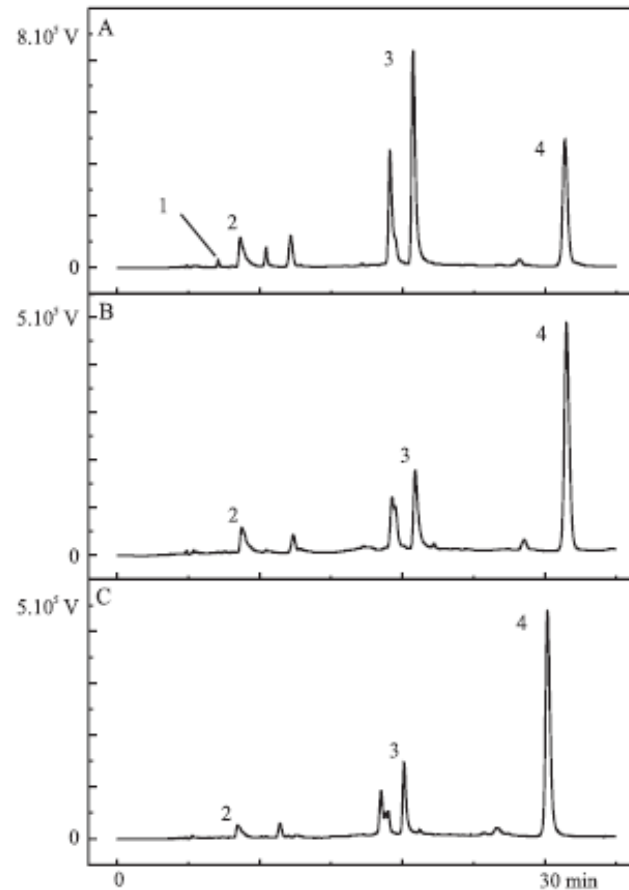
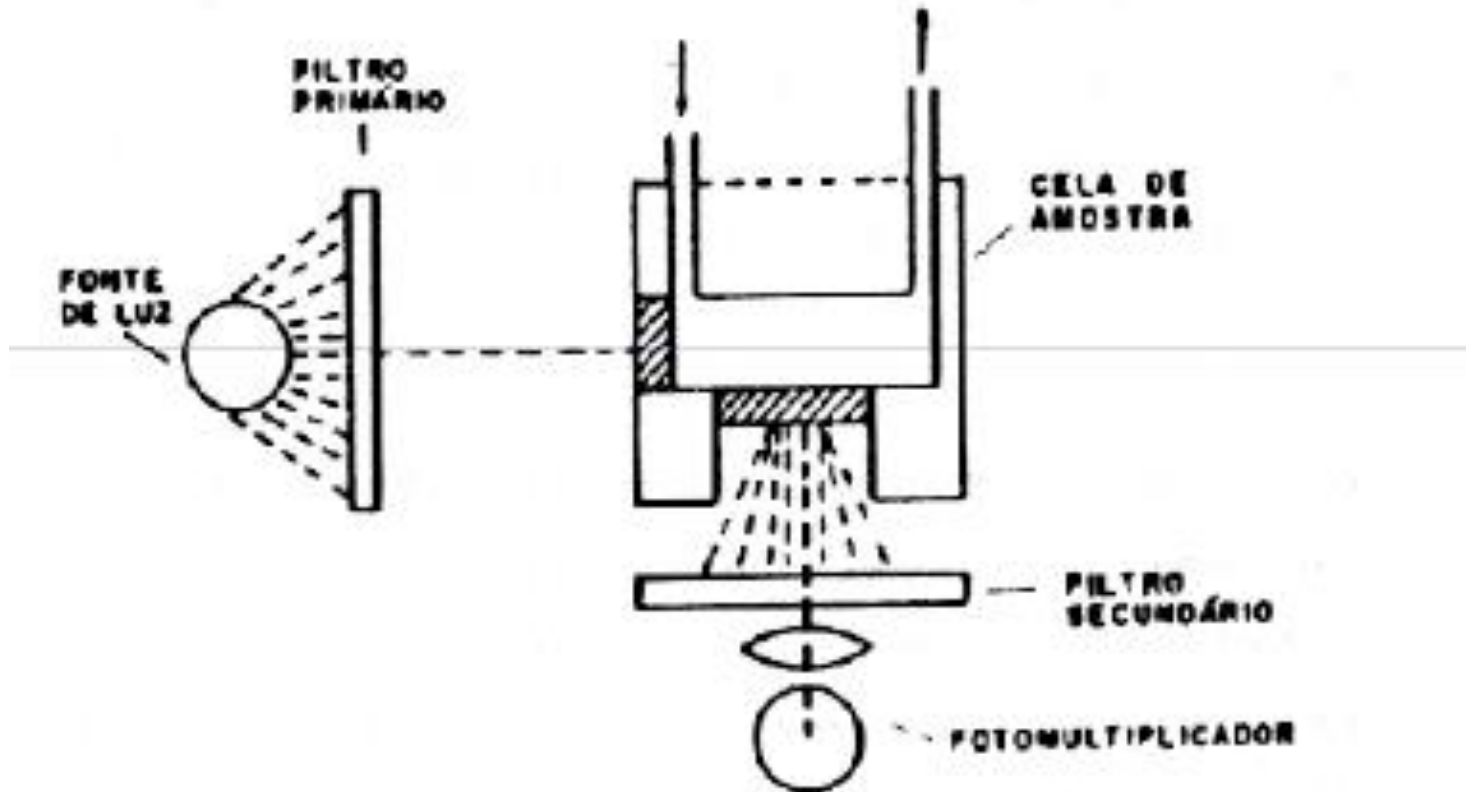


Figura 2. Cromatogramas dos extratos de amostra de café arábica com torra clara (A) e escura (B) e conilon com torra escura (C). Picos: ácido nicotínico (1), trigonelina (2), 5-ACQ (3) e cafeína (4). Condições: Coluna Spherisorb ODS-1, 4,6 x 250 mm, 5 μ m. Fase móvel: gradiente de ácido acético/H₂O (5:95 v/v) (A) e MeCN (B), 0 a 5' – 5% B; 10' – 13% B, vazão: 0,7 mL/min. Detecção: 0 a 15' – 272 nm, 15' a 23' – 320 nm e, de 23' até o final, 272 nm

Detector de fluorescência

A luz de comprimento de onda adequado passa através da cela da amostra, que é excitada por ele. No retorno ao estado fundamental, a molécula excitada emite luz de comprimento de onda maior que a detectada a um ângulo reto da radiação incidente.



Aplicações

➤ Fluorescência pode ser utilizada para detectar seletivamente qualquer composto que absorve e emite luz a um dado conjunto de λ de excitação e emissão.

-relativamente poucos compostos são fluorescentes

-alta seletividade, baixo sinal de background

➤ Limites de detecção para um detector de fluorescência são $\sim 10^{-10}$ mol L⁻¹.

➤ Aplicações comuns:

-compostos farmacêuticos

-aditivos para alimentação

-poluentes ambientais

-qualquer composto que possa ser convertido em um derivado fluorescente:

álcoois, aminas, aminoácidos e proteínas

➤ Pode ser usado com gradiente de eluição.

-requer fase móveis extremamente puras

-impurezas podem afetar o sinal de background

Exemplo

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48 (2008) 456–461



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Short communication

Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection

Laura Mercolini^a, Roberto Mandrioli^a, Bruno Saladini^a, Matteo Conti^b, Cesare Baccini^b, Maria Augusta Raggi^{a,*}

^a *Laboratory of Pharmaco-Toxicological Analysts, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Via Belmeloro 6, I-40126 Bologna, Italy*

^b *Laboratory of Clinical Pharmacology and Toxicology, "S. Maria delle Croci" Hospital, Viale Randi 5, I-48100 Ravenna, Italy*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2007

Received in revised form 5 February 2008

Accepted 8 February 2008

Available online 15 February 2008

Keywords:

Cocaine

Hair

High-performance liquid chromatography

Fluorescence detection

Solid-phase extraction

ABSTRACT

Cocaine is currently one of the most widespread abuse drugs in the world. Since hair cocaine concentrations are a reliable marker of exposition to the drug, an original liquid chromatographic method has been developed for the determination of cocaine in human hair. The chromatographic analysis was carried out on a Hydro-RP C18 column, using a mobile phase containing a phosphate buffer (pH 3.0)–acetonitrile–methanol (75:15:10, v/v/v). Native cocaine fluorescence was monitored at 315 nm while exciting at 230 nm. Mirtazapine was used as the internal standard. Sample pre-treatment was carried out by incubative extraction with 0.1 M HCl followed by solid-phase extraction with C2 cartridges. Good linearity was obtained over a working range of 0.3–100.0 ng/mg. Both extraction yield (>89%) and precision values (R.S.D. < 6.2%) were highly satisfactory. The method was successfully applied to hair samples collected from cocaine users.

Thus, the method is suitable for the long-term monitoring of cocaine use by means of hair testing.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Exemplo

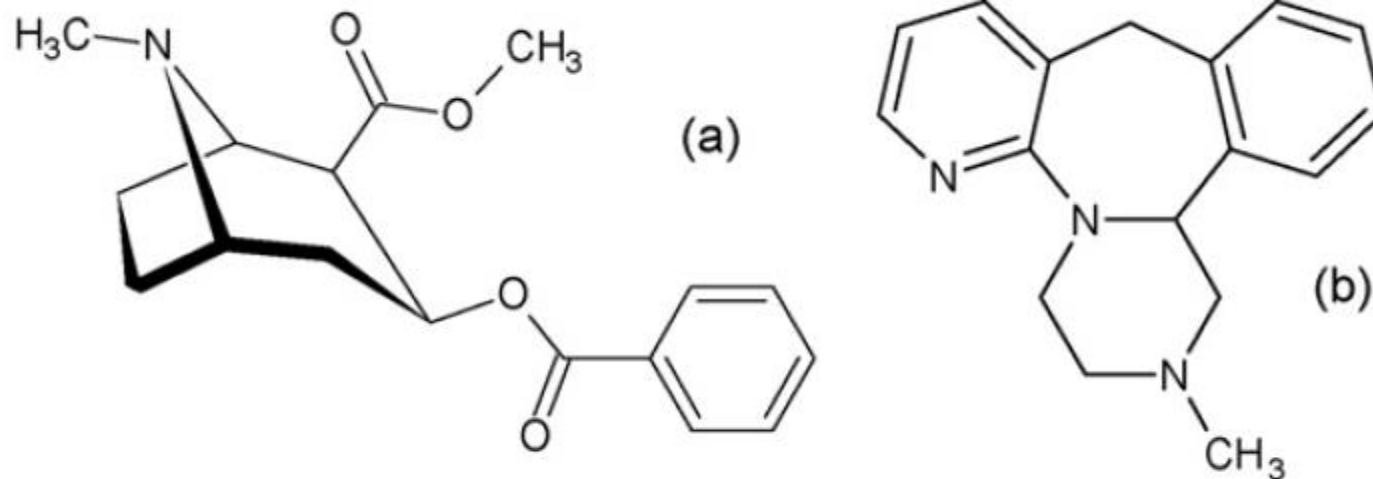


Fig. 1. Chemical structures of COC (a) and the IS, mirtazapine (b).

Exemplo

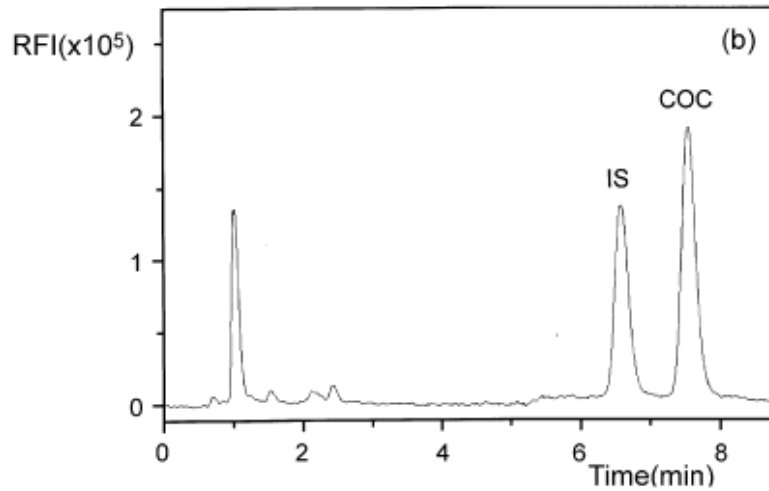
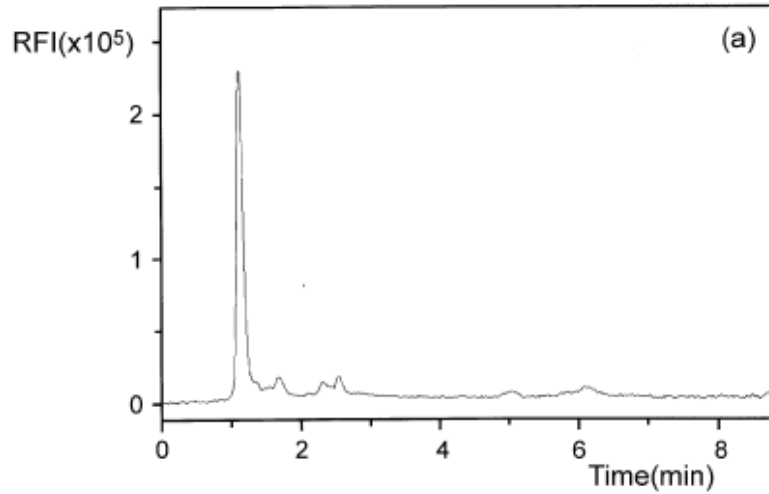


Fig. 2. Chromatogram of a blank hair sample (a) and the same sample spiked with 5 ng/mg of COC (hair concentration) and 2 μ g/mL of the injected solution).

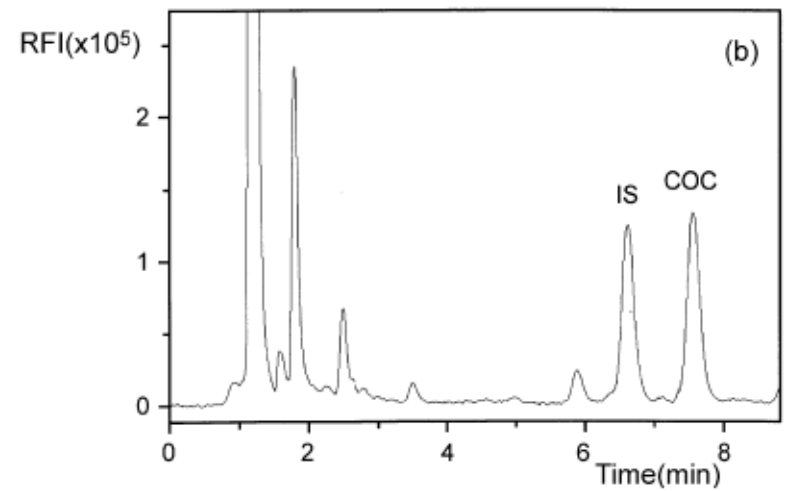
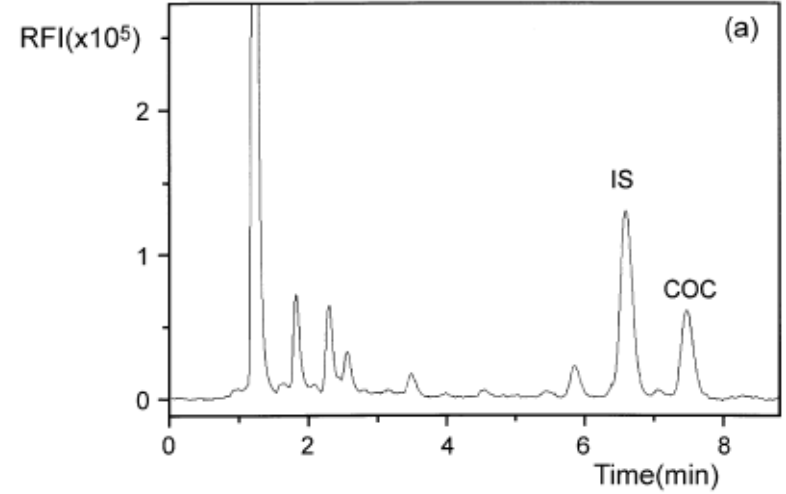


Fig. 3. Chromatogram of a hair sample from a COC user (a) and the same sample after spiking with 2 ng/mg of COC (hair concentration) (b).

Detector de índice de refração

- Acompanha continuamente a diferença do índice de refração entre o eluente da coluna e uma cela de referência contendo a FM pura.

Vantagens:

- detector universal e não-destrutivo
- aplicável à detecção de qualquer soluto
- aplicável a trabalho preliminar de LC onde a natureza e as propriedades do soluto são desconhecidas-a concentração fornecida é suficientemente alta para ser detectada

Desvantagens:

- altos limites de detecção (10^{-6} a 10^{-5} mol L⁻¹)
- este detector não permite o uso de gradiente devido a sensibilidade às variações de vazão e mudanças na composição da FM.

Processo

- luz da fonte passa através das células contendo tanto a amostra como a referência
- quando o índice de refração é o mesmo entre as duas células não ocorre refração da luz na interface entre as células
 - quantidade de luz máxima que chega ao detector
- à medida que o soluto elui, o índice de refração muda entre a célula da referência e a célula da amostra
 - luz refrata à medida que passa através da interface das células
 - a quantidade de luz que chega ao detector diminui

Exemplo

ARTIGO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

Análise de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência em refrigerante dietético e adoçante de mesa

Analysis of sucralose by high performance liquid chromatography in diet soft drink and table top sweetener

RIALA6/1040

Iracema de Albuquerque KIMURA^{1*}; Cristiane Bonaldi CANO²; Leticia Araújo Farah NAGATO²; Maristela Satou MARTINS¹

* Endereço para correspondência: Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, S. Paulo / SP, telefone (11) 3068-2944.

¹ Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz.

² Seção de Bebidas, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz.

Recebido: 04/04/2005 – Aceito para publicação: 30/09/2005

RESUMO

A sucralose é obtida a partir da sacarose em um processo que substitui 3 grupos hidroxilas por 3 átomos de cloro, aumentando assim o poder adoçante em até 600 vezes, quando comparado ao açúcar. Nos produtos “light” e “diet” o edulcorante sucralose pode ser utilizado isoladamente ou associado a outros edulcorantes. A técnica comumente empregada para a determinação de sucralose é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração. O objetivo deste trabalho foi aplicar o método recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e pelo JECFA (FAO/OMS) para o edulcorante sucralose puro, em amostras de refrigerante dietético e adoçante de mesa. A técnica utilizada foi a CLAE com coluna C18, fase móvel água/acetoneitrila (85:15 v/v) e detector de índice de refração. Para a quantificação foi adotado o método de padronização externa. A curva de calibração obtida foi linear a 95 % de confiança com $R^2_{\text{ajust}} = 1,00$. A recuperação variou de 96 a 101 %. Os resultados de sucralose encontrados variaram de 0,1 a 7 g. 100g⁻¹ para os adoçantes e de 6,1 e 16,2 mg. 100mL⁻¹ para os refrigerantes. A aplicação desta metodologia mostrou ser eficiente na separação e quantificação desse composto, nas amostras testadas. **Palavras-Chave.** sucralose, edulcorantes, adoçante de mesa, refrigerante dietético, CLAE

Exemplo

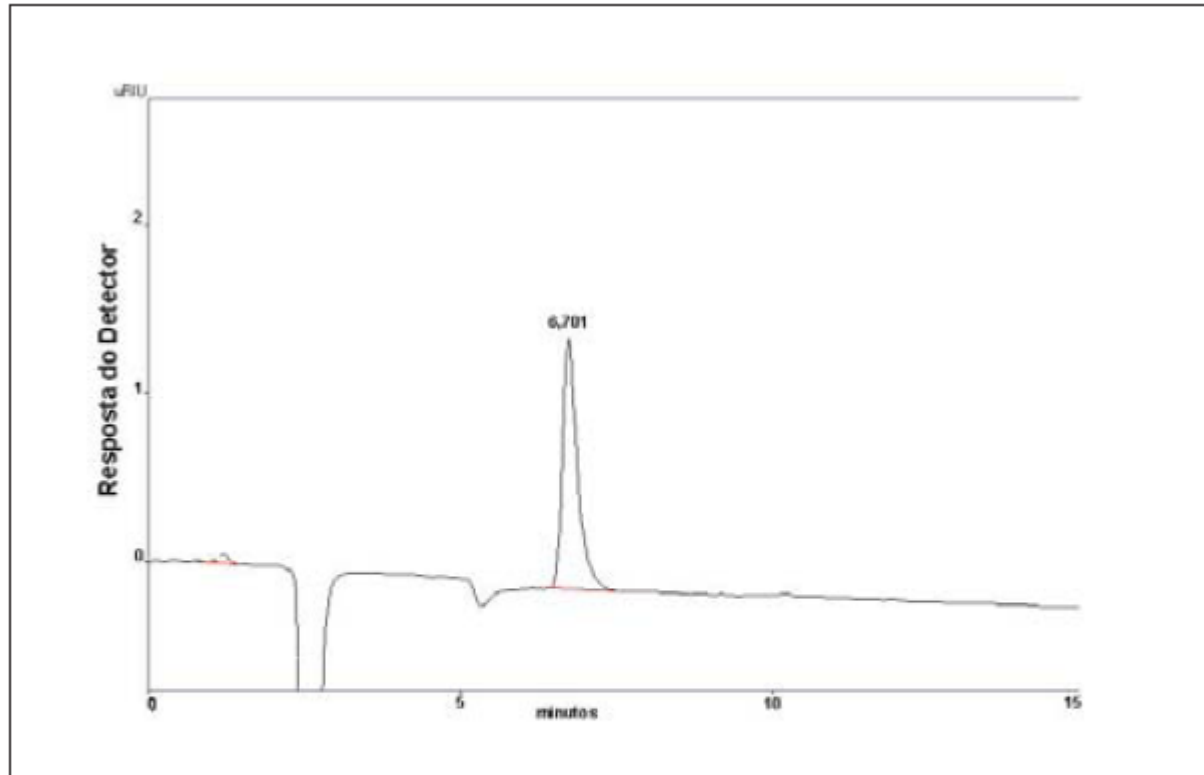


Figura 2. Cromatograma por CLAE-IR de uma solução padrão de sucralose (10 mg.100 mL). Coluna C18 (Lichrospher 100), 5 μm , 125x4 mm, temperatura do forno: 30 $^{\circ}\text{C}$; fase móvel: água/ acetonitrila (85:15 v/v), vazão de fluxo: 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detector de índice de refração, temperatura de 35,5 $^{\circ}\text{C}$.

Exemplo

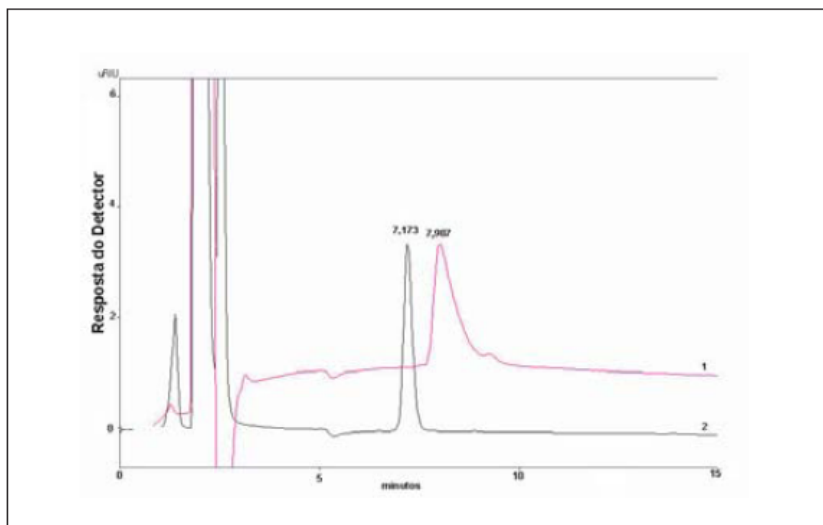


Figura 4. Cromatogramas de adoçantes obtidos por CLAE-IR: (1) adoçante de mesa sem sucralose; (2) adoçante de mesa contendo sucralose. Mesmas condições cromatográficas da solução padrão de sucralose.

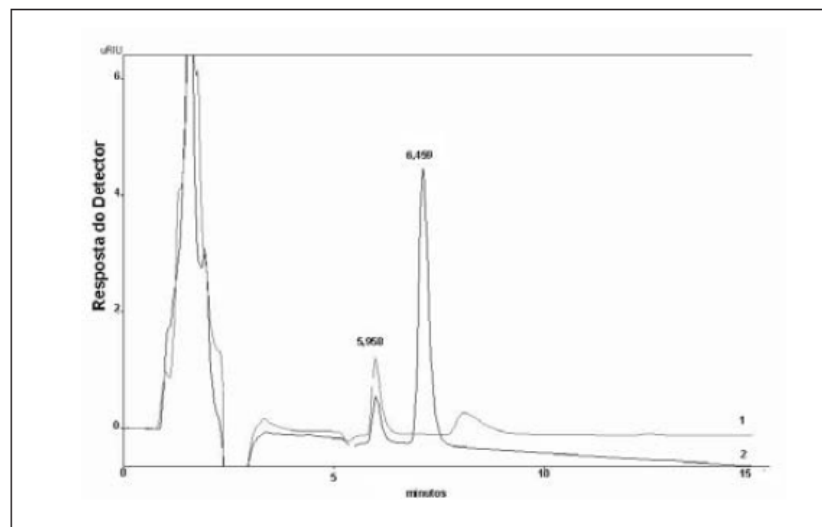


Figura 5. Cromatogramas de refrigerantes obtidos por CLAE-IR: (1) refrigerante “light” sem sucralose; (2) refrigerante “light” contendo sucralose. Mesmas condições cromatográficas da solução padrão de sucralose.

Detector de condutividade

Usado em aplicações analíticas de cromatografia de troca iônica para a detecção de compostos iônicos

-detector mede a capacidade da fase móvel conduzir corrente quando posto em uma célula de fluxo entre dois eletrodos

-corrente dentro da célula depende do número e do tipo de íons presentes na fase móvel

Aplicações:

-pode ser usado para detectar qualquer composto que é iônico ou fracamente iônico

-alta seletividade, sinal de background baixo, limites de detecção são $\sim 10^{-6}$ mol L⁻¹

-mais utilizadas: componentes alimentares, amostras industriais e ambientais

-pode ser usado com gradiente de eluição (força iônica e pH da fase móvel constantes, background da condutância da fase móvel é suficientemente baixa)

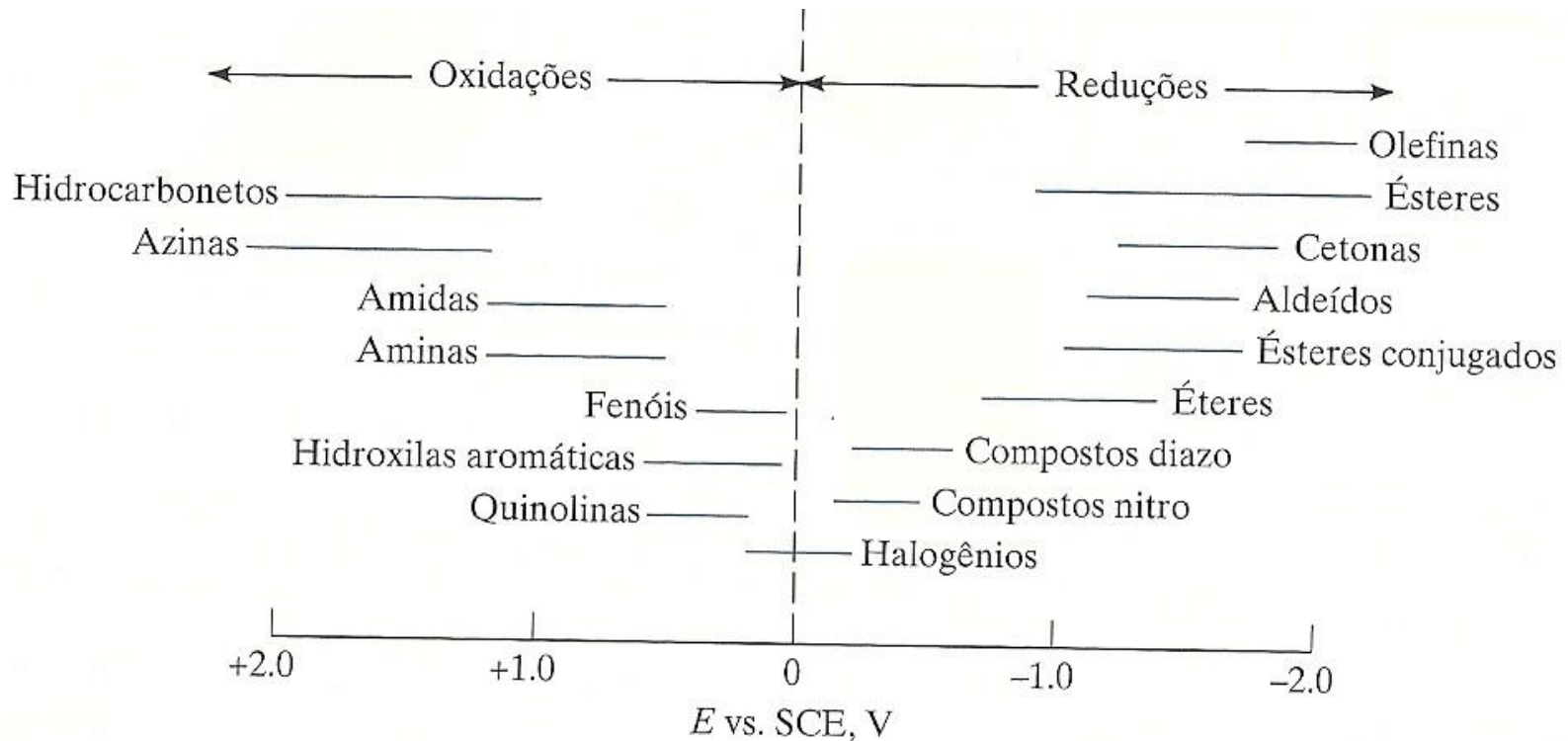
Detectores eletroquímicos

- Detectam compostos orgânicos que podem ser oxidados ou reduzidos.
- Apresentam alta seletividade e alta sensibilidade.

Análise de traços (limite de detecção para é $\sim 10^{-11}$ mol L⁻¹)

- É seletivo porque detecta somente as espécies que se oxidam (ou reduzem) em um potencial inferior ou igual ao fixado.
- Compostos que podem ser detectados por redução: aldeídos, cetonas, ésteres, compostos insaturados, etc.
- Compostos que podem ser detectados por oxidação: fenóis, mercaptanas, etc.

Medidas amperométricas – grupos funcionais



LC-MS

- Universal e seletivo (monitoramento de íons selecionados)
- Boa sensibilidade
- Avaliar pureza
- Confirmar presença do analito

Vantagens e limitações

Vantagens

- alta resolução
- boa sensibilidade
- versatilidade
- automatização

-Limitações

- alto custo de instrumentação
- alto custo de operação
- análise qualitativa difícil
- falta de detector universal sensível (adquirir vários detectores)
- necessidade de experiência no seu manuseio

CG x CLAE

Fator	CG	CLAE
Requisito para amostra	Amostra ou derivado volátil	Amostra solúvel na fase móvel
Tipo de amostra	Gases, líquidos e sólidos. PM: 2 a 600	Líquidos e sólidos, iônicos ou covalentes. PM: 32 a 4.000.000
Tempo de análise	Minutos à poucas horas	Minutos até muitas horas
Capacidade preparativa	Pobre até razoável, usando múltiplas injeções	Boa, com facilidade de coleta e capacidade de automatização
Capacidade analítica	Excelente. Separação de amostras com até 200 compostos	Excelente. Separação de até 50 compostos numa amostra
Tempos de treinamento	Cerca de 3 meses	Pelo menos 6 meses

Exercício

Um método de CLAE foi desenvolvido para separação e determinação de ibuprofeno em amostras de plasma de rato como parte de um estudo do tempo de permanência da droga em animais de laboratório. Vários padrões foram cromatografados, e os seguintes resultados foram obtidos:

Concentração de ibuprofeno, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área relativa do pico
0,5	5,0
1,0	10,1
2,0	17,2
6,0	41,0
8,0	54,0
10,0	66,9
15,0	97,0

Depois, uma amostra de 10 mg kg^{-1} de ibuprofeno foi administrada por via oral a um rato de laboratório. As amostras de sangue foram coletadas a vários intervalos de tempo após a administração da droga e submetidas à análise por CLAE. Os seguintes resultados foram obtidos:

Tempo, h	Área do pico
0	0
0,5	91,3
1,0	80,2
1,5	52,1
2,0	38,5
3,0	24,2
4,0	21,2
6,0	18,5
8,0	15,2

Encontre a concentração de ibuprofeno no plasma sanguíneo para cada um dos tempos acima e faça um gráfico da concentração versus tempo. Em bases percentuais, durante qual período de meia hora (primeiro, segundo, terceiro, etc.) a maior parte do ibuprofeno é perdida?