

CAPITULO 4

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

María Guillermina Volonté

Su aplicación al Análisis Farmacéutico

Introducción

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación muy utilizada debido a su gran versatilidad, ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones, con rapidez y con excelentes resultados, siendo además un muy buen método analítico cuantitativo. Se aplica en casi todos los laboratorios donde se realizan análisis químicos, bioquímicos y farmacéuticos, tanto de rutina como de investigación.

Mediante HPLC se separan los componentes de una mezcla, en base a la migración diferencial de los mismos, en un sistema que consta de dos fases, una móvil, que fluye continuamente en una determinada dirección, y otra estacionaria, que permanece fija. Se realiza en columna y por sus características particulares se ha convertido en una de las de mayor rendimiento y eficacia

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma que llamaremos “clásica” y que consistió básicamente en lo siguiente: una columna de vidrio, cuyo diámetro variaba entre 2-10 cm, una longitud de 50-500 cm, rellena de algún material, como silicagel, alúmina, etc., cuyas partículas poseían un tamaño entre 150-200 μm , en la que la muestra se introducía disuelta en la fase móvil u otro disolvente y luego se agregaba el mismo, con el cual eluía a través de la columna. Los tamaños de la muestra variaban entre 0,1-1,0 g o más. El disolvente o fase móvil fluía a través de la columna por efecto de la gravedad y se recolectaba en la base de la misma en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica era el largo tiempo de análisis requerido, horas o días, otra desventaja era que el material

de relleno se utilizaba por lo general una sola vez debido a que parte de la muestra se adsorbía en forma irreversible en él.

Otro problema consistía en la identificación y cuantificación de los componentes separados, en general mediante técnicas auxiliares, como ser la espectrofotometría, gravimetría, etc.

En HPLC en cambio, se usan columnas de acero inoxidable, de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm, rellenas de materiales cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30–40 μm , usualmente entre 3-10 μm . Este tipo de columna ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 6000 psi) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, en el rango de μg a pocos mg.

La muestra se introduce en el sistema mediante válvulas de inyección.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, por lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

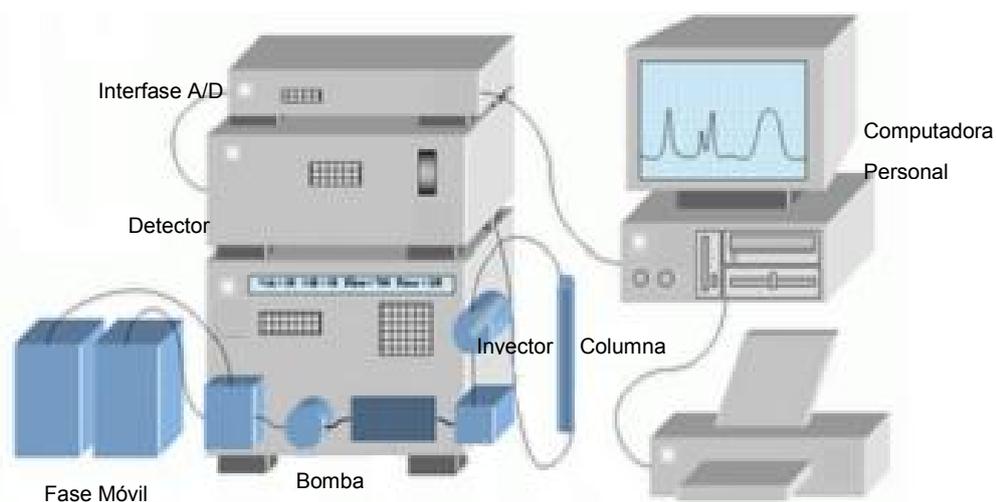


Figura 1. Esquema de un HPLC tipo

Ventajas y limitaciones de la HPLC

Ventajas:

- Con esta técnica es usual obtener separaciones en el término de minutos y hasta segundos.
- Otra ventaja es la alta resolución que permite separar mezclas muy complejas, por ejemplo muestras de fluidos biológicos, como la orina, plasma, etc.
- También proporciona muy buena información de tipo cuantitativo.
- Presenta un escaso deterioro de la columna a pesar de su repetido uso.
- Quizás la ventaja más importante sea la diversidad de sus aplicaciones, tanto a compuestos orgánicos como inorgánicos, a muestras de alto y bajo PM, a sustancias sólidas y líquidas, iónicas o covalentes. Desde el punto de vista práctico las únicas muestras que no son susceptibles de ser analizadas por HPLC son las gaseosas.
- Por último presenta la gran ventaja de automatizar los instrumentos de forma tal que realicen el análisis completo de la muestra, desde su introducción en el cromatógrafo hasta el cálculo e impresión de los resultados, en forma automática.

Limitaciones:

- Instrumental costoso.
- El personal que utilice esta técnica tendrá que tener experiencia como para poder obtener el mayor provecho de la técnica instrumental.
- La comparación de los tiempos de retención, como método de identificación, no es confiable, por lo que será necesario emplear otras técnicas, tales como Espectroscopia de Masa, IR, o Resonancia Magnética Nuclear para obtener identificaciones más precisas.
- No existe aún un detector universal y sensible para HPLC, el detector de índice de refracción es de respuesta universal pero de limitada

sensibilidad y el detector de luz UV es sensible, pero su respuesta es selectiva y responde solo a compuestos que absorben radiación UV.

Tipos de mecanismos de separación

Hay cinco métodos de realizar la HPLC, cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra:

1. *Cromatografía líquido-líquido*: El mecanismo de separación se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria, ambas líquidas. Se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo PM sea inferior a 1500. El mayor inconveniente de esta técnica es la solubilidad de la fase estacionaria en la fase móvil y el deterioro de la columna. Una forma de resolverlo es saturando la fase móvil con la fase estacionaria por medio de una precolumna que contenga un alto porcentaje de fase estacionaria.

2. *Cromatografía de fase químicamente unida o fase ligada*: Surgió como otra forma de evitar la solubilización de la fase estacionaria en la fase móvil, ya que utiliza materiales que contienen la fase estacionaria químicamente unida a la superficie de un soporte (generalmente partículas de sílice), a través de sus grupos funcionales. Estos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino (-NH₂) y el nitrilo (-CN) en el caso de la cromatografía de fase normal, o bien no polar como el grupo octilo (-C₈H₁₇), octadecilo (-C₁₈H₃₇), fenilo (-C₆H₅), en el caso de la cromatografía de fase reversa.

El mecanismo de separación de esta técnica es complejo, con características similares a las de la cromatografía líquido-sólido.

3. *Cromatografía líquido-sólido*: Llamada también de Adsorción, cuyo mecanismo se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido polar, como es la silicagel o la alúmina. Se aplica a moléculas de baja o media polaridad, de PM no mayor a 1000.

4. *Cromatografía de exclusión molecular*: Este tipo de cromatografía conocida también como cromatografía de Permeación o de Filtración, efectúa la separación de acuerdo con el tamaño de las moléculas. Las columnas se rellenan de un gel, cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las

moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedan retenidas, en tanto que las grandes no lo hacen. El intervalo de PM de las muestras está entre 500 hasta varios millones.

Las dos variantes que existen en cromatografía de exclusión son: la Cromatografía de Permeación en gel y la Cromatografía de Filtración en gel, ésta última emplea materiales blandos (dextranos) incapaces de resistir presiones mayores de 60 psi y es muy aplicada en el estudio de biopolímeros. En cambio la cromatografía de Permeación emplea materiales de relleno semirígidos (poliestirenos) o rígidos (silica porosa, vidrio poroso) que pueden resistir presiones muy elevadas y es aplicada en estudios de polímeros sintéticos (poliolefinas, poliamidas). Aunque existen excepciones, la eficiencia de las columnas de cromatografía de exclusión es relativamente baja, por lo cual no es corriente en esta técnica obtener la separación de compuestos individuales, sino más bien fracciones de un cierto intervalo de PM.

5. *Cromatografía de intercambio iónico*: Se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios ó grupos activos de una resina intercambiadora. Se aplica a compuestos de un intervalo de PM muy amplio, por ejemplo péptidos y aminoácidos.

Términos y símbolos característicos

- **Cromatograma**: Gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del eluente u otra cantidad usada como una medida de concentración del eluente, versus el volumen de eluente o tiempo (IUPAC).

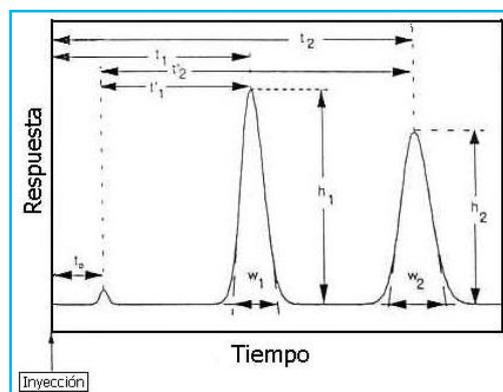


Figura 2. *Cromatograma tipo*

El cromatograma se inicia en el momento en que la solución muestra es inyectada. Las señales encontradas en el cromatograma pueden ser:

- Volumen de elución (V_e): es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la detección de la concentración máxima de cada componente de la muestra.

- Volumen muerto (V_0): es el volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas de la fase estacionaria y todos los espacios libres existentes en la columna, en las tuberías, uniones, etc. La solución atraviesa estos espacios, sin participar en ningún proceso separativo.

- Línea de Base: es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida a los componentes de la muestra.

- Tiempo de Retención (t_n): es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima de cada componente de la muestra (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea de base es la altura del pico (h_n).

- Tiempo muerto (t_0): es el tiempo del primer pico que aparece, no perteneciente a ningún componente de la muestra. Como su valor se utiliza en algunos cálculos cromatográficos hay que determinarlo con exactitud, no se tiene la completa seguridad de que el primer pico, generalmente debido al solvente de disolución de la muestra o a alguna impureza desconocida, sea el correcto. Para su estimación pueden utilizarse, en Fase Reversa, soluciones diluidas de nitrato de sodio o de dicromato de potasio.

- Tiempo de Retención neto o relativo (t'_n): también llamado tiempo de retención ajustado o corregido, es la diferencia entre el tiempo de retención de un pico y el tiempo muerto.

- Anchura de la base de la señal o Ancho de Pico (w): es la porción de la línea de base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución (R) y eficiencia de los sistemas cromatográficos (N). Se puede calcular tomando el ancho en distintas posiciones, por ejemplo al 50 % de la altura de pico, al 60.7 %, etc.

- Número de platos teóricos (N): un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. El número de platos teóricos se calcula como: $N = a (t_r/w)^2$

El valor de (a) puede variar de acuerdo a cómo se determine el ancho de pico (w), ver la siguiente tabla:

w	a	Altura de pico (%)
w _i	4	60,7% (inflexión)
w _h	5,54	50% (media onda)
w ₃	9	32,4% (3σ)
w ₄	16	13,4% (4σ)
w ₅	25	4,4% (5σ)
w _{tan}	16	tangente

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados y por lo tanto de su poder separativo, es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna, nos dará picos más estrechos y mejor separados.

- Altura equivalente del plato teórico (H): se calcula como:

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

donde L es la longitud de la columna expresada en mm. Si el valor de H es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud y por lo tanto la columna será más eficiente. Sirve para comparar columnas de distinta longitud.

- Velocidad lineal (μ): para la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno es preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Se expresa en cm/seg y se calcula:

$$\mu = \frac{L}{t_0}$$

- Factor de Capacidad (k'): Conceptualmente es la relación entre el número de moles de cada componente de una muestra en la fase estacionaria

y el número de moles del mismo en la fase móvil. Como k' es proporcional al tiempo de retención del soluto se calcula para el pico n ésimo como:

$$k'_n = \frac{(t_n - t_0)}{t_0} = \frac{(V_n - V_0)}{V_0}$$

k' puede variar entre cero (si no es retenido en la fase estacionaria) e infinito (si se retiene en forma irreversible). Se ajusta modificando la fuerza de elución de la fase móvil, por ejemplo:

- * En fase reversa k' disminuye al aumentar la proporción del compuesto orgánico (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano) y aumenta al aumentar la proporción de fase acuosa.

- * En fase normal k' disminuye al aumentar la proporción de solvente polar y aumenta al aumentar la proporción del no polar.

- * En cromatografía de intercambio iónico la variación del pH de la fase móvil puede aumentar o disminuir k' de acuerdo a las características ácido-base del analito.

- Factor de Separación (α): es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos. Si no existe separación entre dos picos, por ejemplo pico 1 y 2, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. Se calcula como:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

No depende de la fuerza de elución, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna.

La variación de α puede lograrse:

- * modificando el componente activo de la fase móvil (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, en fase reversa o Cloroformo en fase normal)
 - * modificando el pH de la fase móvil
 - * empleando aditivos (reactivos de apareamiento, complejantes, etc.)
 - * cambiando la fase estacionaria
- Resolución (R): es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2 \cdot (w_2 + w_1)}$$

Un valor de $R \geq 1,5$ significa separación completa.

▪ Asimetría (As): la asimetría (tailing) es una medida de la simetría del pico, tiene el valor 1 para un pico perfectamente simétrico y su medición es importante puesto que puede llevar a errores considerables de cuantificación, e incluso a solapar picos adyacentes de tal manera que la integración y la precisión se tornan menos confiables. Se calcula:

$$As = a+b/2a$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anterior (simétrico) y posterior del pico (con tailing) respectivamente, medidos al 5 o al 10 % de su altura.

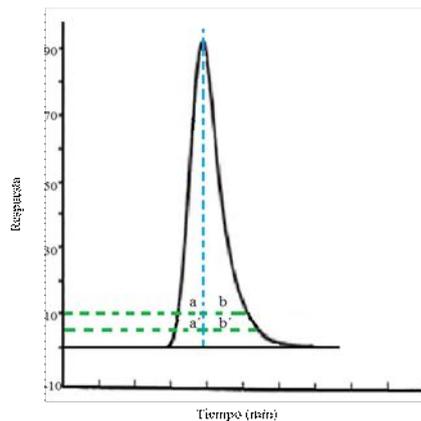


Figura 3. Esquema de un pico asimétrico

Ensanchamiento de la Banda Cromatográfica

Al cromatografiar una mezcla de solutos en un volumen determinado de solución, por ejemplo 20 μl , cuando la mezcla se separa y eluye de la columna, cada componente estará disuelto, no en los 20 μl originales de solvente sino en un volumen mayor, debido a que sufre diluciones a medida que avanza a través del sistema. Este fenómeno puede verse en los cromatogramas, donde

se observa claramente que los picos o bandas menos retenidos tienen mayor ancho que los más retenidos.

Este ensanchamiento de banda es normal y se conocen como ensanchamiento de banda intracolumnar. Existen sin embargo otros procesos, extracolumnares, que provocan el ensanchamiento de los picos y son producidos por factores instrumentales y experimentales.

- **Ensamchamiento de banda intracolumnar**

Según Van Deemter, las contribuciones al ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica son cuatro:

- Proceso multipaso
 - Difusión longitudinal
 - Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil
 - Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria
- **Proceso multipaso:** Cuando el soluto atraviesa la fase estacionaria encontrará diversos caminos por los cuales será impulsado por la fase móvil a recorrerlos. Algunas moléculas seguirán caminos directos y otras, encontrando partículas en su paso, caminos más complejos, retrasándose respecto de las primeras. Este fenómeno se conoce también como Difusión de Eddy y su contribución al ensanchamiento de banda está dado por el diámetro de la partícula de la fase estacionaria y por una constante que depende del relleno y de la calidad de su empaquetamiento en la columna. Una reducción del tamaño de partícula de 45 a 6 μm origina una disminución de diez veces de la altura del plato teórico (H).
- **Difusión longitudinal:** Las moléculas de un soluto en un líquido, en este caso la fase móvil, no permanecerán inmóviles sino que difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno de líquido. Este efecto ocurre en forma evidente o imperceptible y será más notorio cuanto menor sea el caudal empleado.
- La contribución de este efecto al ensanchamiento está en función inversa con la velocidad lineal de la fase móvil (μ) y en forma directa respecto del

coeficiente de difusión del soluto en el solvente y de una constante que evalúa el espacio ocupado por la fase móvil y su geometría.

□ **Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil:** El soluto se desplaza a través de la columna y sus moléculas se transferirán, por un proceso reversible, desde la fase móvil hacia la fase estacionaria y desde ésta nuevamente hacia la fase móvil.

Las moléculas de soluto más cercanas a la fase estacionaria interaccionarán mejor con ésta y las más alejadas a la inversa. Como la fase móvil está en movimiento, las moléculas más alejadas de la partícula habrán recorrido un determinado trayecto antes de que sean retenidas por la fase estacionaria, lo que resultará en una dispersión de la banda inicial.

La contribución de este efecto al ensanchamiento de banda es directamente proporcional a un factor dependiente de k' , a la velocidad lineal de la fase móvil (μ) y al diámetro de la partícula, e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil.

□ **Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria:** Este efecto es semejante al anterior. Las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en un tiempo finito. Las moléculas de soluto próximas a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que dará lugar a un ensanchamiento de la banda original. El ensanchamiento será proporcional al espesor de la fase estacionaria, a la profundidad del poro e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.

La combinación de los cuatro efectos descritos da lugar a la expresión final de la ecuación de Van Deemter:

$$H = A + B/\mu + C\mu$$

Donde A, B y C son los coeficientes de difusión aparente, provocada por el proceso multipaso, difusión longitudinal y de transferencia de masa, respectivamente, y μ es la velocidad lineal de la fase móvil.

De la ecuación de Van Deemter pueden extraerse valiosas conclusiones. Se deduce una mayor eficiencia de la columna en las siguientes condiciones:

- Cuanto menor sea el diámetro de la partícula.
- Cuanto menor sea la viscosidad de la fase móvil (menor coeficiente de difusión)
- A mayor temperatura, (disminución de la viscosidad de la fase móvil)
- Cuanto mejor sea el empaquetamiento del relleno.
- Cuanto menor sea el espesor de la capa de fase estacionaria fijada al soporte de relleno.

- **Ensanchamiento de banda extracolumnar**

Hay componentes del equipo cromatográfico que pueden ser responsables de un ensanchamiento de los picos, lo que lleva a la pérdida de eficiencia. Por esta razón es importante verificar el diseño instrumental, por ejemplo controlar el armado de longitud y tipo de tuberías, uniones, etc. Este ensanchamiento dependerá de:

- Volumen de tuberías inyector-columna y columna-celda del detector
- Volumen de inyección
- Detector: volumen y velocidad de respuesta

Ensanchamiento de banda producido por tuberías: el ensanchamiento es mayor a mayor longitud y diámetro interno de las tuberías.

Ensanchamiento de banda producido por el volumen de inyección: Se recomienda que el volumen de inyección sea pequeño, que no supere 1/6 del volumen del primer pico de interés, otros criterios son más estrictos y recomiendan un volumen no mayor de 17 µl para columnas convencionales.

De todos modos, es interesante destacar que es posible inyectar volúmenes mayores si la muestra se disuelve en un solvente más débil que la fase móvil.

Ensanchamiento de banda producido por el detector: El detector puede contribuir de dos formas al ensanchamiento de banda, en función del tubo de ingreso a la celda, volumen y geometría de la misma y en función de su componente electrónico (velocidad de respuesta).

Evidentemente el volumen de esta celda debe ser pequeño, para que no vuelva a mezclar los componentes que fueron separados en la columna.

Además del volumen de la celda debe considerarse su diseño, ya que las celdas que induzcan flujos turbulentos son capaces de producir dispersión.

La constante de tiempo (T) de un detector indica, por su parte, la velocidad a la cual éste responde a un cambio instantáneo de la concentración de analito. Si la constante de tiempo es muy alta (respuesta lenta), un pico angosto podría achatarse tanto que no se detecte ó mezclarse con otro pico adyacente. Este problema no ocurre si la constante de tiempo es muy baja (respuesta rápida).

Descripción y tipo de instrumental

Existen dos tipos de equipos de HPLC, los integrados y los modulares. En los primeros cada una de sus partes está reunida en un gabinete, lo cual proporciona un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas. En los segundos, cada parte es un módulo distinto, como si fueran instrumentos individuales.

En cualquier tipo de instrumental, ya sea integrado o modular, hay ciertas características de orden general que deben ser reunidas, como ser:

- ❑ Versatilidad: el instrumental debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo, debe prestarse a las distintas técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones, tales como, programación de la fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc.
- ❑ Rapidez: para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea adecuados sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.
- ❑ Reproducibilidad y estabilidad: el instrumento debe poseer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión, composición de la fase móvil, etc. y para ello debe estar provisto de controles de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil, detectores, etc.

- ❑ Sensibilidad: un buen instrumental además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciable. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.

Componentes básicos de un equipo de HPLC

▪ Recipiente para la Fase Móvil:

Es conveniente ubicarlo algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones. Puede utilizarse un frasco de laboratorio de buena calidad, con una tapa adecuada. En el extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

▪ Tuberías:

Las tuberías que se utilizan para conectar los componentes sometidos a alta presión son de acero inoxidable (entre bomba e inyector, inyector y columna, columna y detector y entre detectores conectados en serie) y son de materiales poliméricos las que conectan componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (entre el reservorio de solvente-bomba, último detector-frasco de desperdicios).

Las tuberías de acero tienen un diámetro externo estandarizado: 1/16 pulgadas. Sin embargo su diámetro interno es variable, por lo cual se selecciona la de sección más fina para conectar los instrumentos por donde circula la muestra (entre el inyector y detector, de modo de no provocar dilución de la muestra) y la de sección más gruesa para conectar aquellos componentes del sistema por los que no circula la muestra, y en los cuales un diámetro interno delgado sólo aumentaría la presión del sistema.

Se debe considerar la longitud de las tuberías ya que tuberías demasiado largas conducen a ensanchamientos extracolumnares importantes, como ya

hemos visto. Las conexiones entre bomba e inyector y posteriores al detector no contribuyen al ensanchamiento de banda extracolumnar y su efecto es menos importante.

▪ **Uniones:**

Las uniones permiten conectar las tuberías con los distintos componentes del sistema cromatográfico. Las uniones deben reunir determinadas características, entre ellas:

- ❑ Deben ser inertes a fases móviles y muestras.
- ❑ Deben cerrar herméticamente.
- ❑ No deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos.

▪ **Sistemas de Bombeo:**

La bomba de un HPLC impulsa la fase móvil desde el recipiente que la contiene hacia el inyector y desde allí hacia la columna. El flujo de dicha fase móvil puede ser muy variable, desde $\mu\text{l}/\text{min}$ hasta ml/min .

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- ✓ Presión máxima de operación, usualmente hasta 6000 psi con un sistema de corte al excederlo.
- ✓ Intervalo de volúmenes obtenibles, entre 0.1-10 ml/min (flujo).
- ✓ Características del flujo, que debe ser libre de pulsaciones, ya que generarían “ruido” y provocarían variaciones en el flujo del solvente, lo que es muy importante en el análisis cuantitativo ya que las áreas de los picos de HPLC cambian cuando varía el flujo.
- ✓ Control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo.
- ✓ Componentes resistentes a la corrosión.
- ✓ Facilidad para efectuar el cambio de fases móviles.
- ✓ Limpieza del sistema.

Según las características de funcionamiento y de diseño hay tres tipos de bombas mecánicas:

- A) Bombas recíprocas o reciprocantes, con pistón o diafragma.
- B) Bombas de desplazamiento continuo o bombas jeringas.
- C) Bombas neumáticas o de presión constante

A) *Bombas Recíprocas*: En la actualidad aproximadamente el 90% de los equipos cromatográficos utilizan bombas con pistones de tipo recíprocante. Pueden ser de un solo pistón, de dos pistones, de tres pistones, bomba tándem, y bomba a pistón y diafragma flexible, de bombeo hidráulico.

Estas bombas permiten modificar el caudal entregado variando el recorrido del pistón o variando la velocidad de movimiento del pistón.

El volumen de la cámara del pistón es pequeño, normalmente entre 35-400 μl . Las fases móviles constituidas por solventes puros no causan problemas, pero las soluciones salinas (buffer fosfatos, por ejemplo) pueden producir depósitos por evaporación. Estos depósitos pueden rayar los sellos o los mismos pistones, por lo cual es recomendable lavar el sistema con un solvente apropiado luego de usarlas.

La bomba de un solo pistón es el modelo más sencillo de las bombas reciprocantes. Esta bomba impulsa a la fase móvil, por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor, en ciclos alternados de llenado y vaciado de la cámara de bombeo. En uno de los ciclos el pistón entrega el solvente contenido en la cámara y en el ciclo complementario cierra su comunicación con la columna y toma solvente del reservorio. Es evidente que cuando la bomba llena la cámara del pistón, el caudal se discontinúa. Este proceso se visualiza como un pulso originando ruido en la línea de base del cromatograma, este inconveniente puede reducirse empleando amortiguadores de pulso, engranajes excéntricos o utilizando dos o más pistones de funcionamiento sincrónico.

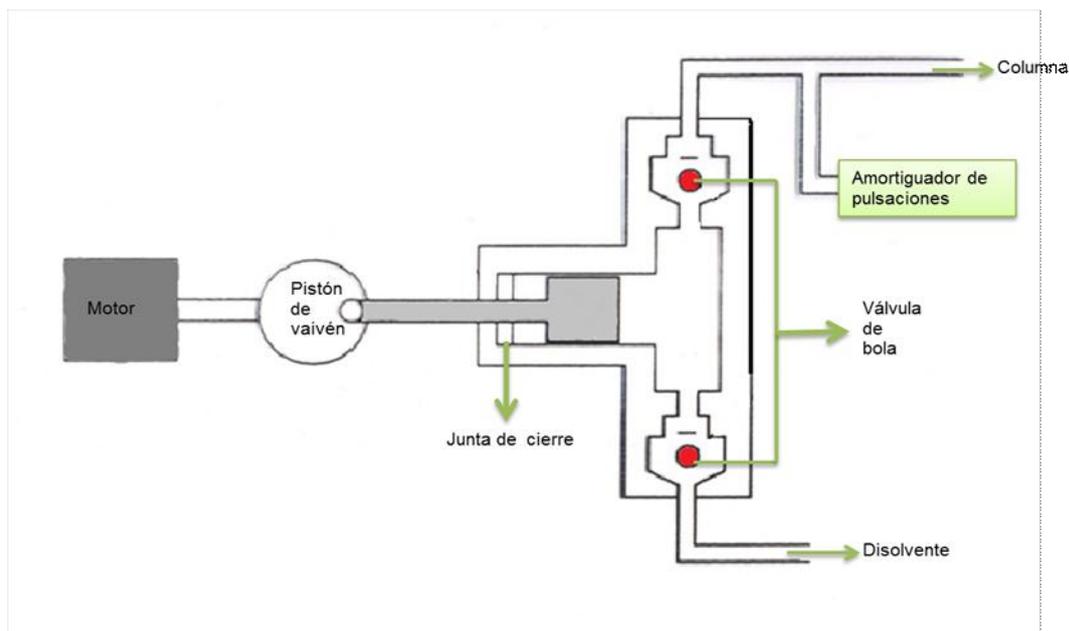


Figura 4. Esquema de una bomba recíproca

B) *Bombas de Desplazamiento Continuo*: Llamadas también bombas de émbolo o de tipo jeringa porque un émbolo desplazado en forma continua, por un mecanismo de tornillo accionado mediante un motor de pasos, comprime un líquido en una cámara obteniéndose un flujo de volumen constante, uniforme y continuo, es decir, libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada, aproximadamente 250 ml, y para rellenar la cámara es necesario suspender momentáneamente la operación.

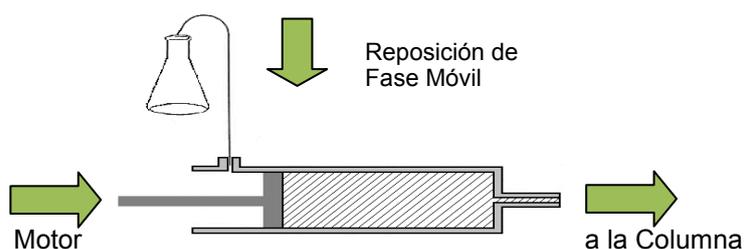


Figura 5. Bomba Jeringa

C) *Bombas Neumáticas*: En estas bombas la fase móvil se encuentra en un contenedor plegable colocado en un recipiente que puede presurizarse

mediante gas comprimido. No provocan pulsaciones aunque tienen una limitada capacidad y presión de salida, menores a 2000 psi, además el caudal depende de la viscosidad del solvente y no pueden utilizarse en la elución con gradiente.

- **Sistemas de Inyección:**

Son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no, según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar (figura 6). Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.

Poseen un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop externo, intercambiable, con volúmenes entre 5-500 μl , que contiene la muestra. También existen válvulas de inyección de micromuestras, con loops de volúmenes entre 0,5-5 μl . Los inyectores automáticos deben poseer además un carrusel que aloja viales donde se coloca las muestras a inyectar.

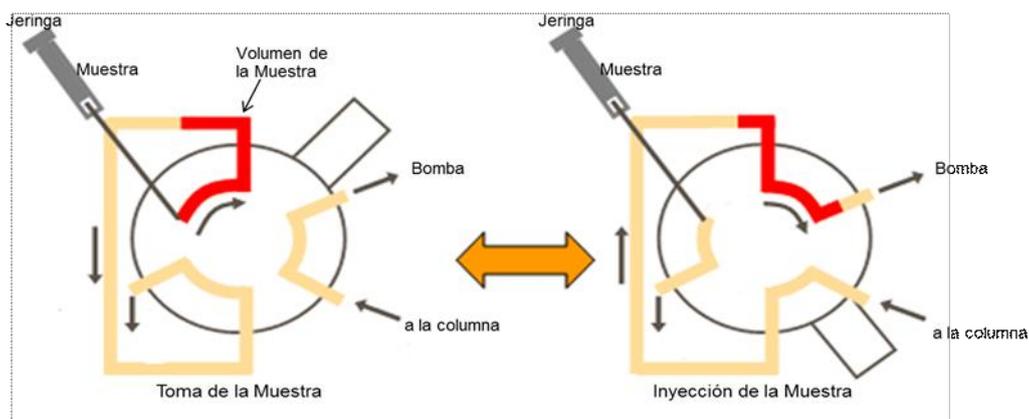


Figura 6. *Válvula de inyección*

- **Programadores de Fase Móvil:**

Se utilizan para cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Por lo general se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varía el porcentaje del disolvente más polar en la mezcla binaria. Las ventajas que ofrece esta técnica son: análisis más rápidos, mejores separaciones, mayor simetría en los picos y mejor detectabilidad.

La elución isocrática (composición constante de la fase móvil) en algunos casos insume mucho tiempo y la forma de las señales no es muy buena, en cambio la separación por gradiente es rápida y las señales son simétricas.

Hay programadores de dos clases:

1. **Gradientes de baja presión** o programadores que efectúan el mezclado en una cámara, después de lo cual el líquido pasa a la bomba, la que envía la mezcla a la columna.

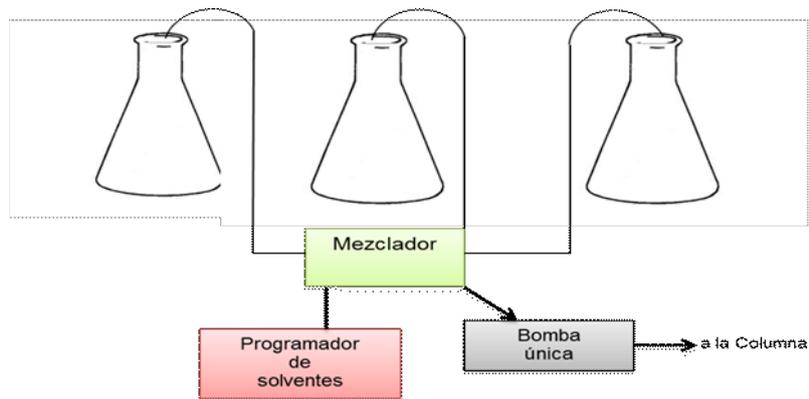


Figura 7. Sistema de formación de gradiente de baja presión

2. **Gradientes de alta presión** ó programadores de mezclado en corriente. Requieren dos bombas, que por lo común son del tipo de desplazamiento continuo y desplazan cantidades determinadas de cada líquido, lo que permite generar cualquier forma de gradiente. El uso de microprocesadores permite hoy día emplear los generadores de gradientes en forma automática.

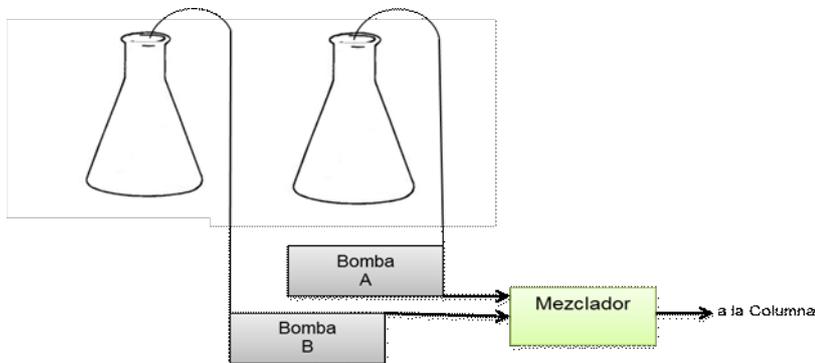


Figura 8. Sistema de formación de gradiente de alta presión

▪ **Detectores:**

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

El detector ideal será aquel que satisfaga los siguientes requisitos: alta sensibilidad, estabilidad, lectura continua y respuesta universal. El detector debe poseer un dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra, a medida que esta sale de la columna.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, deben tenerse en cuenta algunas propiedades generales tales como:

- ❑ **Respuesta:** Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o solo con una específica. En general, los detectores universales son más deseables, si bien los selectivos, que suelen ser más sensibles, efectúan mejor el análisis de muestras complejas porque detectan ciertos componentes a muy bajas concentraciones.
- ❑ **Sensibilidad:** Se define la sensibilidad de un detector como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Este es un término relativo puesto que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras.
- ❑ **Ruido:** Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo ó temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.
- ❑ **Linealidad:** Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad se conoce como linealidad. El intervalo lineal de un detector se puede definir como la diferencia entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

- ❑ Estabilidad: Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo y ser compatible con programaciones de fase móvil.

Tipos de detectores

▪ **Detector de Índice de Refracción:**

Mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es decir, es un detector basado en una propiedad de la disolución, pues responde a una propiedad de la fase móvil que se modifica por la presencia de un analito. Es un detector universal, ya que es imposible que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente y además no es destructivo. Sin embargo es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por los cambios de temperatura. No puede utilizarse con gradiente de fase móvil porque el cambio de composición de la misma se acompaña con un cambio de su índice de refracción y entonces no puede estabilizarse la línea base.

▪ **Detector UV:**

Es el detector más utilizado en HPLC. En este caso, es un detector basado en una propiedad del soluto, como es la de absorber al UV, que no es propia de la fase móvil. Es muy sensible y posee un rango lineal, permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de fase móvil. Es un detector muy poco sensible a los cambios de flujo y de temperatura.

Existen tres tipos de detectores UV: de longitud de onda fija y de longitud de onda variable y de ordenamiento de fotodiodos.

El primero de ellos es el más simple, trabaja a longitudes de onda fijas, especialmente a 254 nm, aunque pueden encontrarse detectores que lo hagan a otras longitudes de onda. El detector de onda variable o espectrofotométrico, es simplemente un espectrofotómetro en el cual se reemplaza al compartimiento de cubetas por una celda de flujo. Permite seleccionar

libremente la longitud de onda de trabajo y en los equipos más modernos pueden elegirse 1,2 ó más longitudes de onda, obteniéndose cromatogramas superpuestos a cada una de ellas.

El detector de ordenamiento de fotodiodos, posee una distribución distinta de la red de difracción, se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz "blanca", es decir, no monocromática y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. Una de las formas de presentación de los datos espectrales que resulta útil para la identificación de las especies y para elegir las condiciones de la determinación cuantitativa, consiste en un gráfico tridimensional. Para poder controlar y procesar toda la información es necesario la presencia de una computadora con el software adecuado.

Es el detector ideal para realizar el desarrollo de métodos analíticos por HPLC, ya que permite asegurar, dentro de ciertos límites, la integridad y pureza de un pico cromatográfico.

▪ **Detector de Fluorescencia:**

Utilizado en el análisis de sustancias que presentan fluorescencia natural u obtenida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Es de muy alta sensibilidad y selectividad por lo cual es muy adecuado para el análisis de trazas. La selectividad se debe a que existen pocas sustancias fluorescentes y además las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en la molécula del analito, lo cual no es siempre posible. La fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación.

▪ **Detector Electroquímico:**

Es mucho más sensible que el detector UV además de ser altamente selectivo, ya que no sólo detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que puede seleccionarse el potencial aplicado, con lo cual se reducen los compuestos detectables. Se basan en cuatro métodos electroanalíticos que

incluyen la amperometría, la voltamperometría, la coulombimetría y la conductimetría.

Otros detectores:

- De absorbancia en el Infrarrojo
- De Dispersión de luz
- Detectores de espectrometría de masas

Fase Móvil

No todos los solventes son adecuados para trabajar en HPLC. Un solvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos, por ejemplo:

- Solubilizar bien las muestras
- No degradar o disolver la Fase Estacionaria
- Poseer baja reactividad
- Ser compatible con el detector utilizado
- Poseer baja viscosidad
- Ser seguro
- Tener alto grado de pureza

La muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible, debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil.

Los solventes muy reactivos no se utilizan en HPLC, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico.

Si se tiene en cuenta que el detector más usado es el espectrofotométrico, debe usarse un solvente transparente a la longitud de onda de trabajo. Para ello es muy útil conocer la *longitud de onda de corte* (λ_c) o sea la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10 mm de paso

óptico, es igual a 1 unidad de absorbancia usando aire como referencia. Es decir, si un solvente tiene una longitud de corte de 254 nm no se puede usar a λ menores, pero sí a mayores λ . Solventes como el tolueno (λ_c : 285 nm) y acetona (λ_c : 330 nm) prácticamente no se emplean, ya que la señal de fondo que producen en un detector convencional es muy alta y por lo tanto impide la medición de los compuestos eluidos. En cambio el metanol (λ_c : 205 nm) y el acetonitrilo (λ_c : 190 nm) son los solventes más empleados en HPLC.

La viscosidad de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con los solventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. A mayor viscosidad mayor presión en el sistema, por eso se prefiere evitar el uso de solventes de alta viscosidad como dimetilsulfóxido o isopropanol.

Como en cualquier método analítico, en HPLC debe evitarse el empleo de solventes que por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representan un serio riesgo para el operador.

La presencia de impurezas puede producir una señal de base importante en el detector. A veces no es posible obtener comercialmente un solvente de buena pureza. En estos casos pueden emplearse solventes de menor calidad, pero se recomienda una purificación previa.

Preparación de la fase móvil:

Hay que tener en cuenta la posible contracción de volumen, que se produce al mezclar solventes muy polares. Esta alteración en la composición de la fase móvil puede modificar los tiempos de retención de los analitos provocando la superposición de picos que en condiciones apropiadas serían separados.

La fase móvil luego de preparada, debe ser filtrada y desgasificada. La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45 μm de porosidad, en equipos de filtración adecuados. Las soluciones a inyectar también deben filtrarse a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Si la cantidad

de muestra es muy pequeña, se puede reemplazar la filtración por la centrifugación.

Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre ellos: liberación de burbujas en el cabezal de la bomba, liberación o formación de burbujas en la celda del detector, que se verán como señales en el cromatograma y afectarán la estabilidad de la línea de base. Los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de la fase móvil son: calentamiento, ebullición a reflujo, burbujeo de un gas inerte, vacío y ultrasonido.

El valor del pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente. A valores de pH mayores a 7,5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pH menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada.

Columnas

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida ó gaseosa, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado. Las paredes internas deben tener una superficie finamente pulida pues se ha observado que posee una cierta influencia sobre la eficacia de la columna.

La longitud de la columna se encuentra entre 10 y 50 cm, aunque puede ser bastante más larga, en especial en cromatografía de permeación donde se suele usar varias columnas conectadas una detrás de otra. El diámetro en la mayoría de los casos es de alrededor de 3-4 mm.

Tal vez la columna más frecuentemente utilizada con fines analíticos sea la de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de 5 μm , que pueden tener de 40000 a 60000 platos/metro. Recientemente han

aparecido columnas con 1-4,6 mm de diámetro interno, rellenas con partículas de 3-5 μm y longitud entre 3-7,5 cm, con 100000 platos/metro, presentando la ventaja de la rapidez y el mínimo consumo de solventes.

Si se desea realizar trabajos de tipo preparativos, o sea separar y recuperar los componentes de una muestra en cantidad suficiente para poder utilizarlos posteriormente, se debe recurrir a columnas con dimensiones mayores. Dichas columnas efectuarán la separación en forma más lenta y con una eficiencia menor que una columna de diámetro pequeño.

Respecto a la forma o geometría de la columna, por regla general, se prefieren las rectas a las de cualquier otra forma, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas.

Las conexiones entre columnas, así como entre la columna y el detector o el inyector deben ser herméticas. En los extremos de la columna se coloca un disco de teflón o metal poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o pierda, es necesario que este disco o tapón retenga las partículas del relleno sin producir una caída de presión muy grande.

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna, se coloca delante una pre-columna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los solventes. Su relleno debe ser semejante al de la columna analítica con tamaños de partículas mayores para minimizar la caída de presión.

La mayoría de los equipos llevan hornos para las columnas que controlan la temperatura de las mismas, cuando es necesario trabajar a una temperatura estricta.

El material de relleno de las columnas se denomina Fase Estacionaria y se detalla a continuación.

▪ **Fase Estacionaria:**

El material ideal será aquel que en el menor tiempo posible dé la mejor resolución para la separación de la mezcla, tenga la máxima capacidad de muestra, produzca caídas de presión pequeñas y que además sea de costo reducido, por supuesto que no existe un material con todas estas propiedades y a veces se justifica sacrificar algunas ventajas para obtener otras.

Los materiales que se utilizan son:

Materiales porosos, cuyas partículas sean de tamaño menor a 40 μm (silicagel y alúmina)

Adsorbentes peliculares, también conocidos con el nombre de adsorbentes de capa porosa, de porosidad superficial o de centro sólido. Consisten en partículas esféricas, generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de un adsorbente, como silicagel o alúmina. El espesor de esta capa es de alrededor de 1 μm .

Estos dos tipos de materiales tienen cosas en común pues ambos pueden utilizarse en cromatografía líquido-sólido, o bien pueden recubrirse de alguna fase líquida y utilizarse en cromatografía líquido-líquido. Asimismo se pueden unir químicamente en su superficie a compuestos polares o no y transformarse en una fase químicamente unida o ligada. De los materiales de fase químicamente unida los de más uso son los que contienen el grupo octadecilo, no polar, RP-18 o C₁₈, lo cual equivale a decir que la cromatografía de fase inversa ó reversa es quizás la más popular.

Materiales para cromatografía de intercambio iónico, son resinas porosas que consisten en partículas rígidas del copolímero estireno-divilbenceno en cuya superficie y poros se encuentran los grupos intercambiadores de iones.

Intercambiador de iones peliculares o resina pelicular, consisten en partículas vítreas de forma esférica recubiertas de una capa muy fina del copolímero estireno-divinilbenceno, las cual contiene los grupos activos.

Materiales porosos de silicagel con grupos intercambiadores químicamente unidos, tienen la ventaja de resistir presiones elevadas y poseer una capacidad de intercambio superior a la de los materiales peliculares.

Los grupos presentes en todo tipo de resinas de intercambio iónico suelen ser $-\text{NR}_4^+$ y $-\text{NH}_2$, en el caso de resinas de intercambio aniónico, que se obtienen comercialmente en forma de cloruros y $-\text{HSO}_3$ en el caso de resinas de intercambio catiónico, que se adquieren en forma de sales de sodio.

Materiales para cromatografía de exclusión molecular, varían de acuerdo con su rigidez y con el intervalo de pesos moleculares dentro del cual son

útiles, es decir, el material a utilizar en la columna dependerá del tamaño de las moléculas que se deban analizar. El intervalo de pesos moleculares dentro del cual es útil un material está determinado por dos límites, uno inferior, llamado *límite de permeación*, por debajo del cual todas las moléculas de menor tamaño son igualmente difundidas dentro de los poros del material y otro límite superior, *límite de exclusión*, por encima del cual todas las moléculas de mayor tamaño son demasiado grandes para penetrar los poros. Moléculas de tamaño intermedio entre ambos límites serán total o parcialmente separadas de acuerdo con la selectividad característica de cada material. Es obvio que moléculas más pequeñas que el límite de permeación ó más grandes que el límite de exclusión serán eluidas de la columna sin resolución.

Entre este tipo de materiales encontramos a los *materiales blandos*, que son geles de povidonas y poliácridamidas, utilizados casi siempre con disolventes acuosos, su capacidad es elevada y no resisten presiones superiores a 60 psi. Los límites de pesos moleculares en los cuales se pueden utilizar varían desde 100 hasta 200.000. Como ya se ha mencionado la técnica que utiliza este tipo de materiales se denomina Cromatografía de filtración y se aplica a biopolímeros.

Los *materiales semirígidos ó geles macroporosos*, usados en análisis de olefinas, resisten presiones del orden de 900 psi, son por lo general microesferas de algún copolímero, como el poliestireno-divinilbenceno. Se emplean sólo con disolventes acuosos. Los límites de pesos moleculares en los cuales se pueden utilizar varían desde 100 hasta 1.000.000.

Los *materiales rígidos*, se utilizan a cualquier presión y son generalmente partículas de sílice porosa o vidrio poroso. A causa de su rigidez se pueden obtener separaciones muy rápidas a flujos de fase móvil acuosa, o no acuosa, sumamente altos, lo cual requiere presiones elevadas. Los límites de pesos moleculares en los cuales se pueden utilizar varían desde 100 hasta 1.000.000; se aplica a muestras de proteínas y polisacáridos.

Preparación de la muestra

Esta etapa es sumamente importante sobre todo cuando la matriz que rodea al analito es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores, como ser:

- *Propiedades físicoquímicas del analito.* Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido-base (pKa) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado.
- *Concentración del analito en la muestra.* Para analitos en altas concentraciones, en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, pueden requerir metodologías más complejas.
- *Naturaleza de la matriz de la muestra.* Los componentes de la matriz pueden interferir en la detección del analito. Hay que conocerlos para saber cómo preparar la muestra.
- *Forma en la que se presenta el analito en la muestra.* Es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal, sino unido a proteínas transportadoras, como metabolito, etc.
- *Compatibilidad de los medios de solubilización con el sistema cromatográfico.* La solución a inyectar debe ser compatible y miscible con la fase móvil.
- *Tipo de detector.* Los detectores poco selectivos como el de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más limpias que los detectores más selectivos como el de fluorescencia.
- *Compatibilidad con el detector.* No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes poseen una elevada absorción de base y pueden producir picos espúreos o señales importantes en el frente del solvente.

Es decir que cada muestra deberá ser preparada en forma apropiada para reducir interferencias y aumentar la vida de la columna.

En los casos más simples, por ejemplo si la muestra es líquida, quizás solamente se necesite inyectarla directamente, previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario pulverizarlo y homogeneizarlo apropiadamente y luego solubilizarlo en un solvente adecuado.

En cambio, hay muestras que necesitan pasar por un proceso de *desproteización* previo a la inyección en el cromatógrafo, por ejemplo las muestras biológicas. Este proceso se puede realizar agregando alguno de estos agentes: solventes orgánicos, como el metanol, acetonitrilo o etanol, sales neutras, ácidos, como el tungstico, tricloroacético, perclórico, metafosfórico, cationes del tipo Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} o bien por ultrafiltración. En muchos casos durante la desproteización se produce una pérdida de analito por adsorción al precipitado lo que acarrea bajas recuperaciones, es decir baja exactitud analítica. Este efecto puede minimizarse controlando apropiadamente las condiciones en las que se realiza la desproteización y agregando la solución muestra al agente desproteizante y no el agente desproteizante a la solución muestra.

Puede ser necesario una *extracción líquido-sólido*, también llamada lixiviación, que consiste en la solubilización del analito, presente en una muestra sólida previamente molida, con un solvente adecuado, con la ayuda de agitación, manual, mecánica o ultrasónica. Un tipo especial de extracción líquido-sólido emplea sistemas continuos con solventes calientes (Soxhlet) y se aplican a analitos poco solubles o a matrices muy complejas.

La *extracción líquido-líquido* también puede ser utilizada en algunas ocasiones, para preparar una muestra antes de cromatografiarla, si bien la extracción convencional es una operación lenta, tediosa y está expuesta a numerosos problemas: formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables, peligro en evaporaciones finales, etc.

En todos los casos la muestra deberá filtrarse antes de inyectarse al equipo, ya que tanto las muestras como los estándares deben estar totalmente libres de partículas en suspensión. La filtración de las muestras se realiza con dispositivos desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 ó 0.22 μm

de un material apropiado, seleccionado de acuerdo a su resistencia frente al solvente de disolución de las muestras.

Existe un proceso de *extracción denominado en Fase Sólida*, que utiliza columnas o cartuchos de extracción, de suma utilidad cuando las muestras son muy complejas y cuando la concentración del analito es muy baja, ya que permiten aumentar su concentración. Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una pequeña columna ó cartucho de plástico (usualmente polipropileno), relleno con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de HPLC, pero de mayor granulometría.

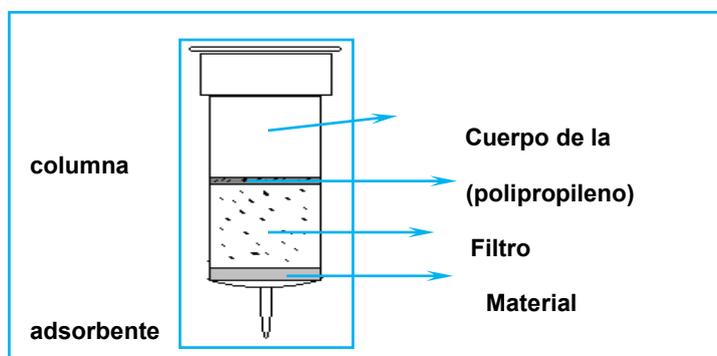


Figura 9. Esquema de un cartucho de extracción en fase sólida

Los materiales que se emplean para el relleno comprenden desde adsorbentes muy polares como la silica, hasta muy poco polares como una fase ligada de RP-18, incluso también materiales de intercambio iónico.

La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas.

La selección de las condiciones óptimas para la extracción depende de la naturaleza del analito y de la matriz que lo rodea.

En primer lugar se debe lavar el cartucho para eliminar las sustancias provenientes de muestras anteriores que pudieran quedar retenidas en la columna, esto se realiza fluyendo metanol u otros solventes menos polares como acetonitrilo o tetrahidrofurano. Luego debemos activar la columna, para solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna, en fase reversa la activación se suele realizar percolando aproximadamente dos

volúmenes de columna de agua o buffers acuosos. A continuación se agrega lentamente la muestra en la columna, utilizando un caudal determinado (1 a 10 ml/min). Esta operación puede efectuarse aplicando directamente la solución a inyectar de manera tal de lograr la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna. Otra forma es mediante la retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, en general seguido de un lavado con un solvente con el cual no eluya el analito y posteriormente eluirlo con un solvente fuerte. Este método es el más habitual y puede utilizarse para la preconcentración de muestras, pasando a través de la columna un volumen mayor de muestra y luego eluyendo con poco volumen de solvente.

Una vez aplicada la muestra deben eliminarse las impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no eluye. Finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 volúmenes de columna. Esta etapa puede realizarse impulsando el solvente con la ayuda de una jeringa o aspirarlo con vacío. En todo momento las columnas deben mantenerse húmedas y no dejar que se sequen para obtener una buena recuperación del analito. Existen cámaras especialmente diseñadas para efectuar todas las operaciones citadas, para ello se colocan varias columnas juntas de manera tal que es posible procesar varias muestras en forma simultánea. En muchos casos las columnas pueden reutilizarse dependiendo de la naturaleza de los componentes de la matriz y de las condiciones de lavado.

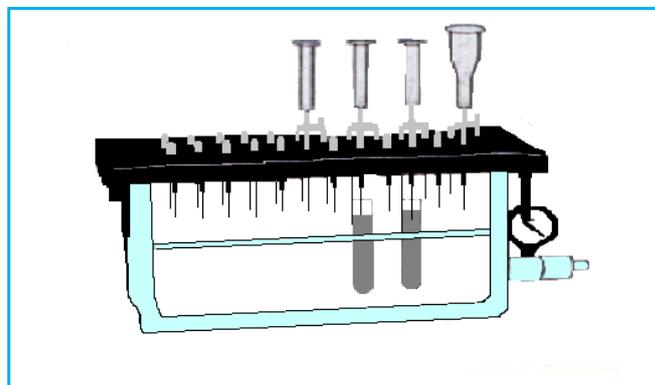


Figura 10. Esquema de una cámara para extracción en fase sólida

Dentro de las metodologías no convencionales de preparación de muestras podemos citar a la denominada cromatografía de *intercambio de columnas* (column-switching). Esta técnica se pudo aplicar gracias a la aparición de válvulas apropiadas, con bajos volúmenes muertos y capacidad para operar a altas presiones. Estas válvulas están construidas de acero inoxidable, soportan presiones de hasta 6000 psi y se accionan electrónicamente, automatizando el proceso de intercambio de columnas. Además existen válvulas de intercambio de solventes que operan a bajas presiones, construidas de teflón y que se usan en combinación con las de alta presión para las metodologías de intercambio de columnas donde se seleccionan distintos solventes, y también se utilizan solas para lavar las columnas, recolectar fracciones o purgar las celdas de referencia de los detectores.

La cromatografía de intercambio de columnas comprende varios modos diferentes de operación, entre ellos la selección de columnas, que combinada con algún dispositivo que permita el cambio automático de solventes como las válvulas de intercambio de baja presión, permite cambiar automáticamente las columnas y los solventes. Otra aplicación es en la operación en contracorriente, utilizada para solucionar los problemas que producen algunos compuestos muy afines al material de relleno de las columnas que se retienen fuertemente y no eluyen en las condiciones de operación habituales y deben removerse diariamente con el lavado. Quizás la aplicación más frecuente de estos métodos sea la preparación de la muestra en la misma línea del cromatógrafo en forma automática (clean-up online) que puede efectuarse con la combinación apropiada de una válvula, un guardacolumna y una columna analítica. Fundamentalmente estas preparaciones comprenden la retención del analito utilizando una fase móvil débil en un guardacolumna o columna secundaria, el lavado de la misma, y la elución posterior utilizando un solvente más fuerte.

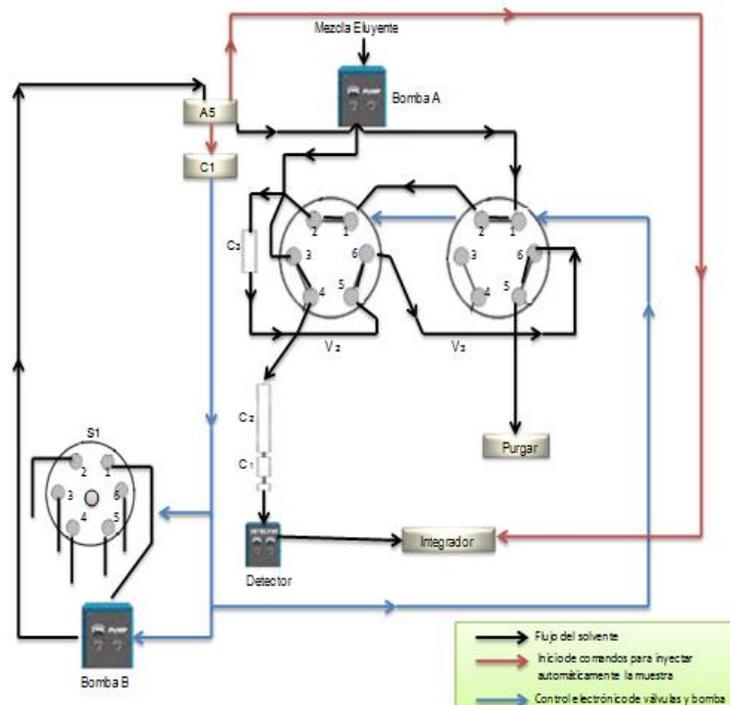


Figura 11. Esquema de un intercambio de columna para *clean-up* de muestras

Son también sumamente aplicados los métodos de enriquecimiento que comprenden un proceso de concentración del analito en el mismo equipo cromatográfico seguido de alguna modalidad de preparación de las muestras. Pueden utilizarse sistemas similares a los indicados para la preparación de las muestras en la figura 11 con la diferencia que el volumen de muestra introducido es mucho mayor.

Otro procedimiento que se suele aplicar antes de cromatografiar una muestra es la *derivatización* que se refiere a la reacción química que se produce entre el analito y un reactivo determinado, ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico. Si se efectúa antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo, la derivatización se denomina *precolumna* y los derivados ya formados se separan en la columna cromatográfica.

Una de las mayores ventajas de la *derivatización pre-columna* reside en el hecho que no existen limitaciones en cuanto a la cinética de la reacción, es decir, que puede esperarse todo el tiempo que sea necesario como para

completar la reacción sin ningún perjuicio en el resultado cromatográfico. Además, puede utilizarse un gran exceso de reactivo que puede eliminarse en un paso previo o separarse en la misma corrida cromatográfica. La mayor desventaja de los sistemas pre-columna reside en la posible aparición de picos espúreos provenientes de derivados no deseados.

También puede realizarse la derivatización después de inyectar la muestra, en cuyo caso se denomina post-columna. La *derivatización post-columna* comprende la reacción química del analito en el mismo equipo de HPLC. Esta reacción se realiza después de la separación cromatográfica en dispositivos denominados reactores. En la figura 12 se esquematiza un equipo de HPLC para operar con derivatización post-columna. Este instrumento consta de los módulos habituales de un cromatógrafo convencional, conjuntamente con los módulos necesarios para realizar la reacción de derivatización en la línea del instrumento. En primer lugar se necesita una bomba para bombear el reactivo hacia el eluyente de la columna. Esta bomba opera en la zona de baja presión del instrumento por lo cual no necesita ser de alta presión. En segundo lugar se necesita un dispositivo en el cual pueda mezclarse íntima y rápidamente el líquido eluyente de la columna, este dispositivo se denomina mezclador y un reactor donde los analitos puedan reaccionar a temperatura controlada con el reactivo derivatizante.

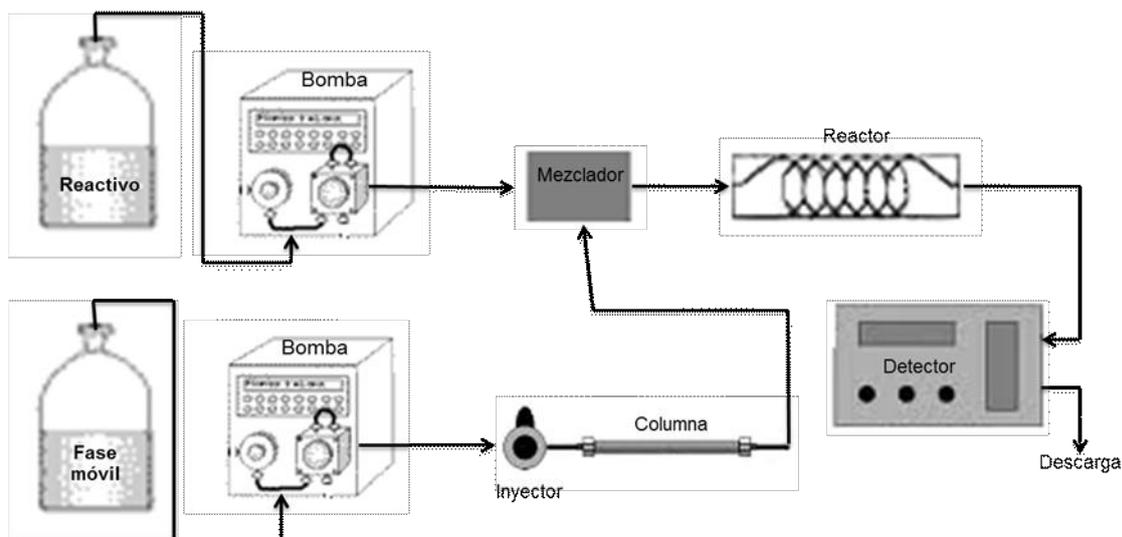


Figura 12. Esquema de un equipo de HPLC para operar con derivatización post columna

Para aplicar un método de análisis por derivatización post-columna de las muestras se debe conocer el tiempo necesario para completar la reacción. Las reacciones rápidas pueden realizarse con reactores que permitan tiempos de estadía cortos, mientras que las lentas requieren la utilización de reactores que permitan mayores tiempos de estadía. En general no es necesario que la reacción alcance su punto máximo, y puede operarse sin dificultad con reacciones incompletas. Esto se debe a que la detección se realiza siempre al mismo tiempo, aunque no se complete en su totalidad.

La elección de un método de derivatización pre o post-columna depende principalmente de la velocidad de la reacción y de la compatibilidad de la reacción (y los reactivos) con la fase móvil empleada.

Los motivos por los que se recurre a la derivatización pueden ser, en primer lugar para *mejorar la detección*, debido a la falta de detectores universales que posean la sensibilidad adecuada. Muchos compuestos que no poseen grupos cromóforos o fluoróforos no pueden ser detectados mediante un detector de UV o de fluorescencia, como por ejemplo los ácidos grasos y los aminoácidos. Estas sustancias deben derivatizarse para poder detectarse por HPLC. Existen diversos reactivos de derivatización dirigidos al grupo amino o al carboxilo. Habitualmente se derivatiza el grupo amino para producir derivados fluorescentes. Otro motivo por el cual se recurre a la derivatización es para *mejorar la selectividad*, en este caso se utiliza para separar compuestos, que de otra manera, o bien no se pueden separar o bien la separación resulta muy compleja. Si bien la derivatización para mejorar la selectividad no es frecuente en HPLC, dado que una adecuada combinación de fases estacionaria y móvil puede resolver sin dificultades la mayoría de las preparaciones, existe un caso especial que se refiere a la separación de isómeros ópticos. Como los enantiómeros no poseen propiedades diferentes entre sí, salvo las que se refieren a su comportamiento frente a la luz polarizada, difícilmente puedan separarse por algún sistema cromatográfico. En este caso, y para lograr la separación, los enantiómeros se derivatizan con reactivos estereoespecíficos para formar los correspondientes diastereoisómeros, siendo estos últimos,

sustancias más simples de ser separadas. Se puede usar Fase Estacionaria ó Fase móvil quiral, o combinar ambas.

Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo por medio de HPLC es tan confiable como el realizado por cromatografía de gases. Etapas del análisis cuantitativo:

1. Muestreo.
2. Preparación de la muestra
3. Inyección de la muestra
4. Separación cromatográfica
5. Detección
6. Integración de la señal
7. Cálculo de la concentración del analito

Los puntos 1, 2, y 3 ya fueron oportunamente tratados.

4. *Separación cromatográfica*: Puede ser la fuente de muchos errores debido a múltiples factores. Por ejemplo puede haber descomposición del analito o interacción del analito con el instrumento, por ejemplo adsorción irreversible de los componentes de la muestra en la columna, ya sea por efecto de la fase móvil o del material de relleno de la columna, o también pueden ser errores asociados a la separación en sí misma. Para minimizar estos últimos errores se deben controlar los parámetros cromatográficos descritos con anterioridad: factor de capacidad (k'), tailing y resolución (R).

5. *Detección*: La sensibilidad, estabilidad, linealidad y especificidad del detector son muy importantes. El tamaño de la muestra debe estar dentro del intervalo lineal del detector, los cambios de flujo, de temperatura y las fallas electrónicas pueden afectar las características de la respuesta del detector, por otra parte el detector puede ser completamente ciego a un determinado tipo de muestra o

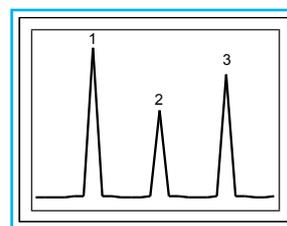
bien su sensibilidad variar para compuestos de diferente estructura. Por estas razones se recomienda tener cuidado al interpretar los resultados.

6. *Integración de señales*: Se lleva a cabo por diversas técnicas que varían en cuanto a complejidad y exactitud. El propósito de esta etapa es transformar de alguna forma la intensidad de las señales emitidas por el detector en medidas que puedan relacionarse con la cantidad de muestra. La señal generada por el detector se transmite a integradores que transforman la señal analógica en digital, calculan el área o altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente un reporte analítico.

7. *Cálculo de la concentración de analito*: Se lleva a cabo por alguno de los siguientes métodos:

a) *Normalización Interna ó Estandarización Interna*. Relaciona las áreas obtenidas con el % de composición de la mezcla.

$$\%A_1 = \frac{A_1}{AreaTotal} \times 100$$



Esta técnica requiere que todos los componentes de la mezcla sean separados y que la respuesta del detector sea igual para todos ellos, condición ésta que por lo común no se cumple y que da lugar a que la normalización de áreas lleve implícito el uso de factores de corrección ó de respuesta.

b) *Calibración Externa ó Estándar Externo*. Es el método de cuantificación más utilizado en HPLC. Consiste en la preparación de estándares de concentración aproximadamente igual al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia, es decir:

$$P = \frac{A_m \cdot C_s}{A_s} \times D \times 100$$

Donde P = % analito en la muestra

A_m y A_s = áreas de la muestra y de estándar

C_s = concentración del estándar

D = factor de dilución

- c) *Estándar Interno*. Consiste en agregar cantidades iguales y exactamente medidas de la solución de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar de referencia del analito. Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas, es decir:

$$P = \frac{R_m \cdot C_s}{R_s} \times D \times 100$$

Donde R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente.

Este método no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas.

La sustancia utilizada como patrón interno debe ser similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema, pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra.

- d) *Estándar Agregado*. Consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

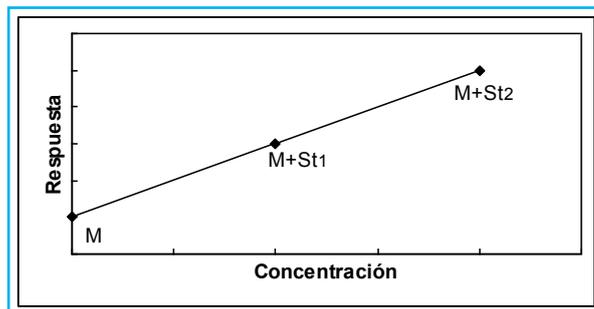
$$P = \frac{A_m \cdot C_s}{A_{ms} - A_m} \times D \times 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_{ms} son las áreas del analito en la muestra tal cual y la muestra a la que se le ha

agregado el estándar respectivamente, C_s es la concentración de estándar y D es un factor de dilución.

Este método, como el del Estándar Externo, tiene principalmente dos desventajas: requiere el uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios o deformaciones en los picos. En estos casos suele también agregarse la matriz de la muestra al estándar como alternativa al método del Estándar Agregado.

Con este método se puede, al igual que con los anteriores, efectuar directamente los cálculos o trabajar con una curva de calibración. La diferencia respecto de los otros métodos es que en este caso la curva de calibración no es proporcional, es decir no pasa por el origen, y la ordenada al origen corresponde a la concentración de analito en la muestra, como se puede ver en la siguiente figura:



Agradecimiento: A la Lic. Analía Nolasco por el diseño de las figuras y gráficos incluidos en el presente capítulo.

Preguntas Orientadoras

1. Defina los siguientes parámetros y explique conceptualmente qué interpretan cada uno de ellos y para qué se utilizan:
 - * Tiempo de retención

- * Número de platos teóricos
- * Factor de capacidad
- * Factor de separación
- * Resolución
- * Tailing

2. Con qué varía el Tiempo de Retención?
3. En un sistema cromatográfico en fase reversa cómo puede modificar el factor de capacidad y el factor de separación?
4. Cuáles son las causas de la aparición del tailing? Cómo puede disminuirlo?

Test de Autoevaluación

1. En la cuantificación de un principio activo por HPLC, con cuál de estos métodos se independiza de los errores originados por variaciones en el volumen de inyección de la muestra?
 - (a) Método del Estándar Interno
 - (b) Método del Estándar Externo
 - (c) Método del Estándar Agregado
2. La derivatización de un principio activo previo a la inyección en el cromatógrafo puede realizarse cuando:
 - (a) El principio activo es polar
 - (b) El principio activo está en gran cantidad
 - (c) El principio activo no absorbe al UV
3. La velocidad lineal (μ) no depende de:
 - (a) El tamaño de partícula de la Fase estacionaria

- (b) La sección interna de la columna
 - (c) La porosidad del relleno de la columna
4. En Cromatografía en Fase Reversa, con cuál de estas Fases Móviles tendrá un mayor valor de k' (Factor de Capacidad), para un determinado principio activo:
- (a) Metanol: Agua (60:40)
 - (b) Metanol: Buffer Fosfato (70:30)
 - (c) Acetonitrilo: Buffer Acetato (40:60)
5. Cuál de estos factores es importante para un buen rendimiento del sistema de bombeo en HPLC?
- (a) Fase móvil correctamente desgasificada
 - (b) Temperatura de trabajo
 - (c) Sistema de inyección automático
6. Cuál detector de los siguientes es más sensible?
- (a) Detector de Índice de Refracción
 - (b) Detector UV
 - (c) Detector Electroquímico
7. Cuál de estas Fases Estacionarias se usan en Cromatografía de Adsorción:
- (a) Copolímero de estireno-divinilbenceno
 - (b) Dextrano
 - (c) Alúmina
8. Cuál de estos factores extra-columnares influye en el ensanchamiento de los picos:
- (a) Volumen de inyección
 - (b) Material de las tuberías
 - (c) Longitud de onda de detección

9. En HPLC, cuál de los siguientes parámetros interpreta la Eficiencia de la columna cromatográfica:

- (a) Tiempo de retención
- (b) Número de platos teóricos
- (c) Factor de capacidad

Bibliografía

1. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. (1979) *Introduction to modern liquid chromatography*. Wiley Int. Publication
2. Asshauer J.; Ullner H. (1986) *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. Springer-Verlag
3. Quattrocchi, O.; Abelaira de Andrizzi, S. I.; Laba, R.F. (1992) *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro
4. Novotny, M.; Wainer, I. (1985) *Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development: An Introduction*. Aster Pub.Co. Springfield
5. Engelhardt, H. (1986) *Practice of HPLC, Applications, Equipment and Quantitative Analysis*. Springer-Verlag, Heidelberg
6. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
7. Skoog, D. A.; Leary, J.J. (1996) *Analisis instrumental*. Mc Graw-Hill, 4ª. Ed.
8. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.