

# CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (HPLC, CLAE, CLAP O CLAR)

- Se opera en columna
- Se trabaja por elución
- Separa:
  - mezclas complejas (poder de separación)
  - solutos muy parecidos (resolución)
- Es rápida (minutos)
- Usa poca muestra ( $\mu\text{L}$ )
- Utiliza instrumentación especial
- Trabaja a altas presiones
- Proporciona información cualitativa y cuantitativa

# INTRODUCCIÓN

- UNA DE LAS FASES ES UN LECHO ESTACIONARIO DE EXTENSA SUPERFICIE QUE SE ENCUENTRA EMPACADO DENTRO DE UN TUBO, CONOCIENDO A ÉSTA COMO FASE ESTACIONARIA E INSTRUMENTALMENTE EN DONDE SE ENCUENTRA LA COLUMNA.
- LA OTRA FASE CONSISTE EN LÍQUIDO QUE PERCOLA SOBRE LA FASE ESTACIONARIA Y ALREDEDOR DE LA MISMA, ÉSTA ES LA QUE CONOCEMOS COMO FASE MÓVIL.
- EN EL CASO DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS LA FASE MÓVIL ES LA QUE LE DA SU NOMBRE Y POR LO TANTO SABEMOS QUE ES UN LÍQUIDO.

# INTRODUCCIÓN

- POR EL TIPO DE FASE ESTACIONARIA QUE SE UTILICE LA CLAE SE DIVIDE EN CLS, CLL, CFQU, CII, CPI, CE.
- EN CLAE LA FASE MÓVIL ES UN DISOLVENTE O MEZCLA DE ESTOS.
- LOS DISOLVENTES MÁS UTILIZADOS SON EL ACETONITRILO, METANOL, H<sub>2</sub>O, HEXANO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>.

# INTRODUCCIÓN

- LOS ADSORBENTES TALES COMO SÍLICA, ALUMINA SON LAS FASES ESTACIONARIAS EN CLS.
- LA BASE PARA LA SEPARACIÓN ES LA ADSORCIÓN ( $K$  DE ADSORCIÓN) DE LA MUESTRA DENTRO O FUERA DE ESTE SÓLIDO ADSORBENTE.
- SI SE PUEDE ENCONTRAR UNA FASE SÓLIDA QUE TENGA ADSORCIÓN SELECTIVA PARA DOS COMPUESTOS, ENTONCES ESTOS PUEDEN SEPARARSE MEDIANTE LA CLS.

# INTRODUCCIÓN

- LOS LÍQUIDOS ORGÁNICOS (POLÍMEROS) DE BAJA SOLUBILIDAD A LOS DISOLVENTES MENCIONADOS CONSTITUYEN LA FASE ESTACIONARIA EN LA CLL.
- LA BASE PARA LA SEPARACIÓN ES LA PARTICIÓN (K DE REPARTO O DISTRIBUCIÓN) DE LA MUESTRA DENTRO O FUERA DE ESTA PELÍCULA LÍQUIDA.
- SI SE PUEDE ENCONTRAR UNA FASE LÍQUIDA QUE TENGA SOLUBILIDAD SELECTIVA PARA DOS COMPUESTOS, ENTONCES ESTOS PUEDEN SEPARARSE MEDIANTE LA CLL.

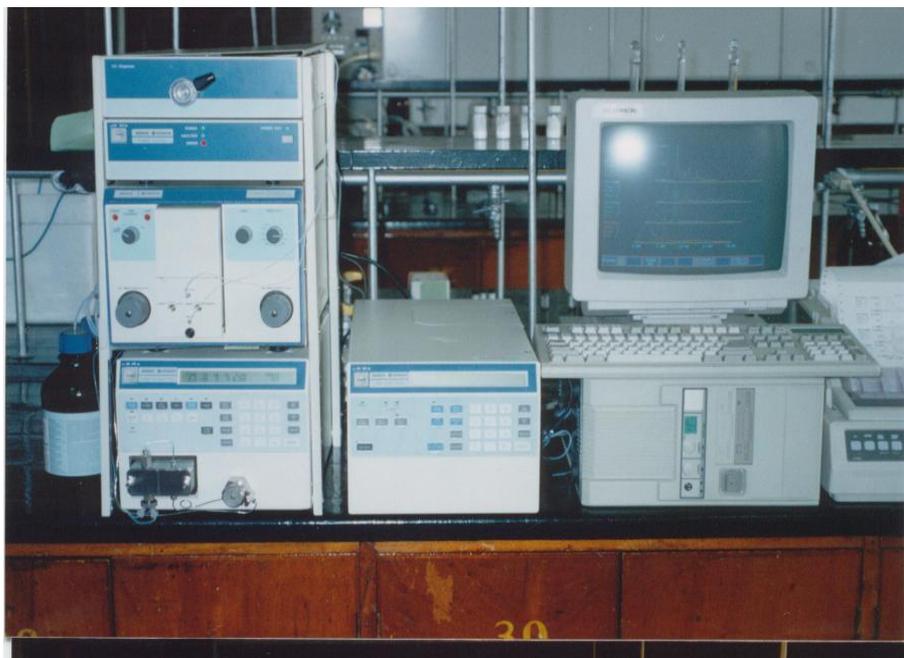
# INTRODUCCIÓN

- DEBIDO AL DESGASTE QUE ESTAS FASES TIENEN AL IR PASANDO EL DISOLVENTE SE APLICAN ACTUALMENTE MÁS LAS FASES CONOCIDAS COMO FASES QUÍMICAMENTE UNIDAS.
- SEGÚN LA TÉCNICA QUE SE VAYA A APLICAR DEPENDERÁ QUE FASE SE PEGO QUÍMICAMENTE.
- SI ES TÉCNICA DE FASE NORMAL SERÁN FASES DE TENDENCIA POLAR (NH<sub>2</sub>, OH, CN, ETC.)
- SI ES TÉCNICA DE FASE INVERSA SERÁN FASES DE TENDENCIA NO POLAR (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, DIMETIL, ETC.)

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

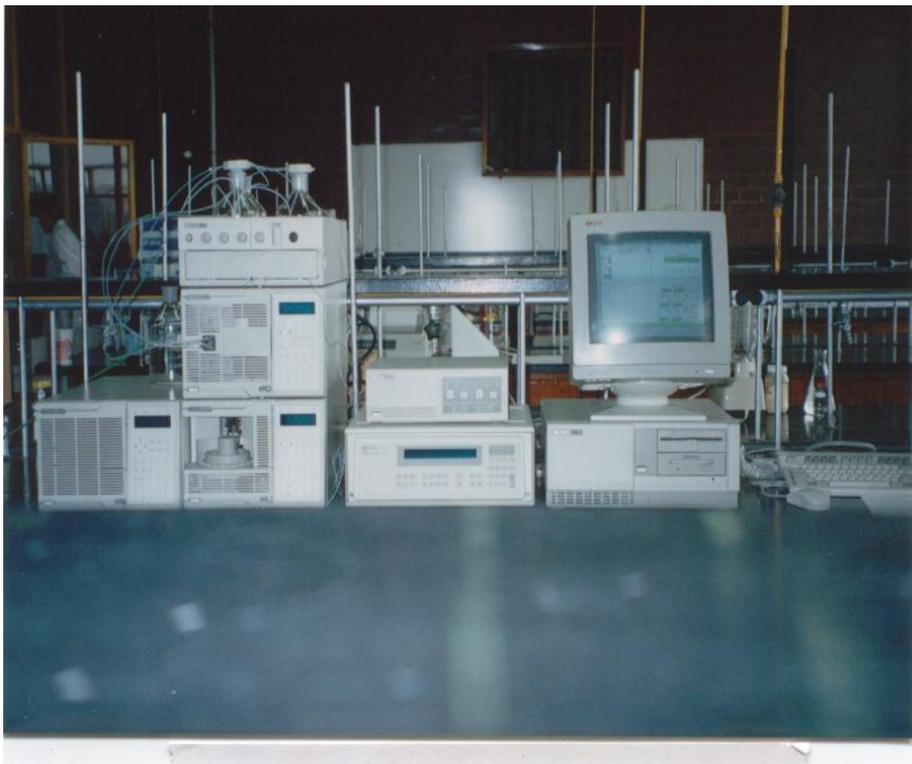
- TAWETT (RUSO) IDEO LA TÉCNICA EN 1906.
- HASTA 1930 SE MANTUVO IGNORADA HASTA LA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS DEL SUECO TISELIUS.
- MARTIN Y SYNGE EN 1941 INTRODUCEN LA TÉCNICA DE REPARTO LO QUE LES MERECIÓ EL PREMIO NOBEL EN 1952.
- PERO SU DESARROLLO Y APLICACIÓN INSTRUMENTAL APARECIÓ HASTA 1968 Y ESTO SE DEBIÓ A LA INTRODUCCIÓN DE SISTEMAS DE ALTAS PRESIONES DE OPERACIÓN Y DE SISTEMAS DE DETECCIÓN CONTINUA.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA



- CROMATÓGRAFOS DE LÍQUIDOS DE LOS AÑOS 80`s DEL SIGLO PASADO

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA



- CROMATÓGRAFOS DE LÍQUIDOS DE LOS AÑOS 90`s DEL SIGLO PASADO.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA



- CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS DEL AÑO 2002.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

- EN EL CASO DE ESTA TÉCNICA PROBABLEMENTE LOS AVANCES MÁS SIGNIFICATIVOS EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS HAN SIDO:
  - OPTIMIZACIÓN EN EL DESARROLLO DE PREPARACIÓN Y APLICACIÓN EN METODOLOGÍAS DE COLUMNAS DE DIÁMETRO MÁS PEQUEÑO QUE LAS COLUMNAS EMPACADAS, CONOCIDAS COMO MICROBORE, MICROCOLUMNAS Y TUBOS ABIERTOS PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (OPEN TUBULAR LC POR SU NOMBRE EN INGLÉS).
  - DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y APLICACIÓN EN METODOLOGÍAS DE LOS SISTEMAS ACOPLADOS CLAE/EM, CLAE/ABSORCIÓN Y EMISIÓN ATÓMICA, RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR,ETC..
  - DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y APLICACIÓN DE TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS ACOPLADAS AL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS COMO LAS TÉCNICAS ACOPLAMIENTO ENTRE COLUMNAS (COLUMN SWITCHING POR SU NOMBRE EN INGLÉS) CONOCIDAS COMO CORTE DE FRENTE, MEDIA Y FINAL (FRONT, HEART, AND END-CUT POR SU NOMBRE EN INGLÉS), LIMPIEZA O ENRIQUECIMIENTO DE TRAZAS DE MUESTRAS EN LÍNEA, ETC..

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

- **MICROBORE, MICROCOLUMNAS Y TUBOS ABIERTOS PARA CLAE:**

- A PESAR DE EMPEZAR A QUERER IMPLANTAR EL USO DE COLUMNAS CON DIÁMETROS DE TUBOS CAPILARES EN LA DÉCADA DE LOS 70'S DEL SIGLO PASADO PARA IR SUSTITUYENDO A LAS COLUMNAS EMPACADAS (QUE SIGUEN SIENDO LAS MÁS UTILIZADAS ACTUALMENTE), EN EL CASO DE LA CLAE LA TECNOLOGÍA PARA DISMINUIR EL DIÁMETRO INTERNO DE LAS COLUMNAS Y EL QUE SE PUEDAN USAR LAS FASES MÓVILES LÍQUIDAS SE HA DESARROLLADO CON MÁS LENTITUD TANTO EN EL ÁREA DE LA INVESTIGACIÓN COMO TAMBIÉN POR PARTE DE LAS COMPAÑÍAS VENDEDORAS DE EQUIPO LO QUE HACE QUE A PESAR DE HABER ALGUNA INSTRUMENTACIÓN EN EL MERCADO PARA TRABAJAR CON ESTAS COLUMNAS NO TIENEN UN COSTO QUE LOS HAGA ACCESIBLES PARA LA MAYORÍA DE LOS USUARIOS DE LA TÉCNICA, POR LO QUE ACTUALMENTE SOLO UN 10% APROXIMADAMENTE DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS UTILIZAN ÉSTAS COLUMNAS.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

- LA ADAPTACIÓN INSTRUMENTAL QUE SE TIENE QUE REALIZAR EN ESTOS CASOS POR EL DIÁMETRO INTERNO DE LAS COLUMNAS QUE SE PUEDEN UTILIZAR ASÍ DE CÓMO ESTA PRESENTE LA FASE ESTACIONARIA EN ESTAS COLUMNAS HA DEFINIDO 3 DIFERENTES TIPOS DE COLUMNAS CLASIFICADAS POR SU DIÁMETRO INTERNO EN:

MICROBORE: D.I. 0.5-2.0MM  
MICROCOLUMNAS: D.I. MENORES A 0.5MM

CLASIFICÁNDOSE ÉSTAS EN:

CAPILARES EMPACADAS	(D.I. 40-300M)
CAPILARES EMPACADAS PARCIALMENTE	(D.I. 40-80M)
CAPILARES DE TUBO ABIERTO	(D.I. 3-50M)

- ESTAS COLUMNAS PRESENTAN UNA MAYOR EFICIENCIA QUE LAS QUE PRESENTAN LAS COLUMNAS EMPACADAS CLÁSICAS DE CLAE (AUNQUE NO SON TAN LARGAS COMO EN EL CASO DE CG, APROX. 30CM), LA CAÍDA DE PRESIÓN SIGUE SIENDO ALTA PARA LAS MEGABORE Y LAS MICROCOLUMNAS EMPACADAS, AUNQUE ADEMÁS DEL AUMENTO DE LA EFICIENCIA TAMBIÉN NOS DAN UN AUMENTO EN LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA, ES MÁS SENCILLO UNIRLAS A INTERFASES Y EL QUE REDUCEN SIGNIFICATIVAMENTE EL GASTO DE DISOLVENTES.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

- **SISTEMAS ACOPLADOS:**

- EN EL CASO DE LOS SISTEMAS ACOPLADOS LA TÉCNICA QUE MÁS SE HA DESARROLLADO HA SIDO LA CLAE/EM SOBRE TODO PERMITIENDO EL ANÁLISIS DE MUESTRAS COMPLEJAS QUE NO PUEDEN SER ANALIZADAS EN LA TÉCNICA DE CG/EM, TENIENDO SU MAYOR APLICACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA EN LAS ÁREAS DE FARMACIA , BIOQUÍMICA, CLÍNICA. EL PODER QUE ESTA TÉCNICA ACOPLADA TIENE ES EL QUE PERMITE APLICAR LAS VENTAJAS QUE TIENE LA CLAE AL PODER TRABAJAR UN AMPLIO INTERVALO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS QUE PUEDEN IR DESDE PEQUEÑAS MOLÉCULAS COMO LOS METABOLITOS DE DROGAS HASTA EL ANÁLISIS DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS TENIENDO ADEMÁS LA ALTERNATIVA DE LA FUERZA CUALITATIVA DE LA EM.

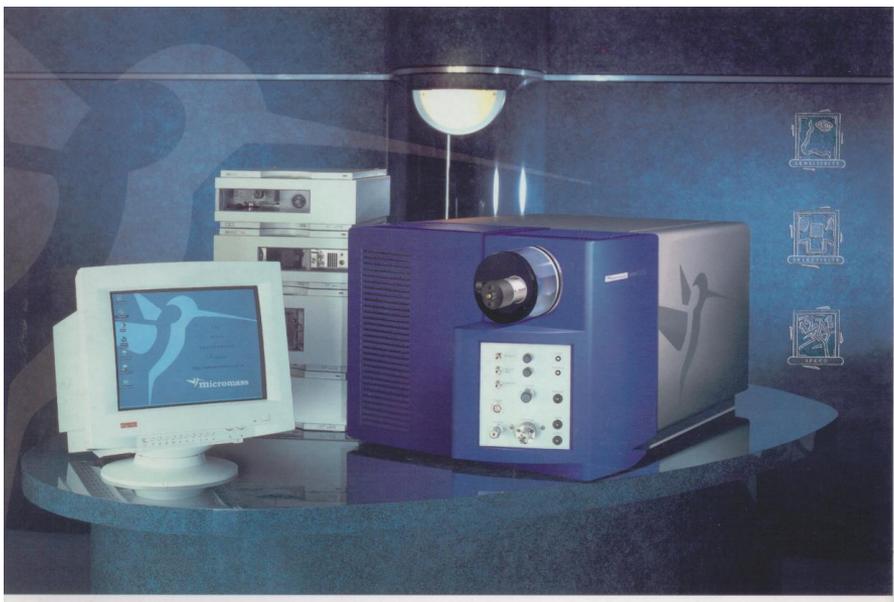
# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

- EL AVANCE DE ESTA TÉCNICA ACOPLADA EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS VA RELACIONADA AL AVANCE QUE SE TUVO EN CUANTO A LAS FUENTES DE IONIZACIÓN QUE A SU VEZ SON LA INTERFASE ENTRE LAS 2 TÉCNICAS, ESTAS SON EL “TERMOSPRAY”, HAZ DE PARTÍCULAS, LA IONIZACIÓN “ELECTROSPRAY”, FOTOIONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA, ETC..

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

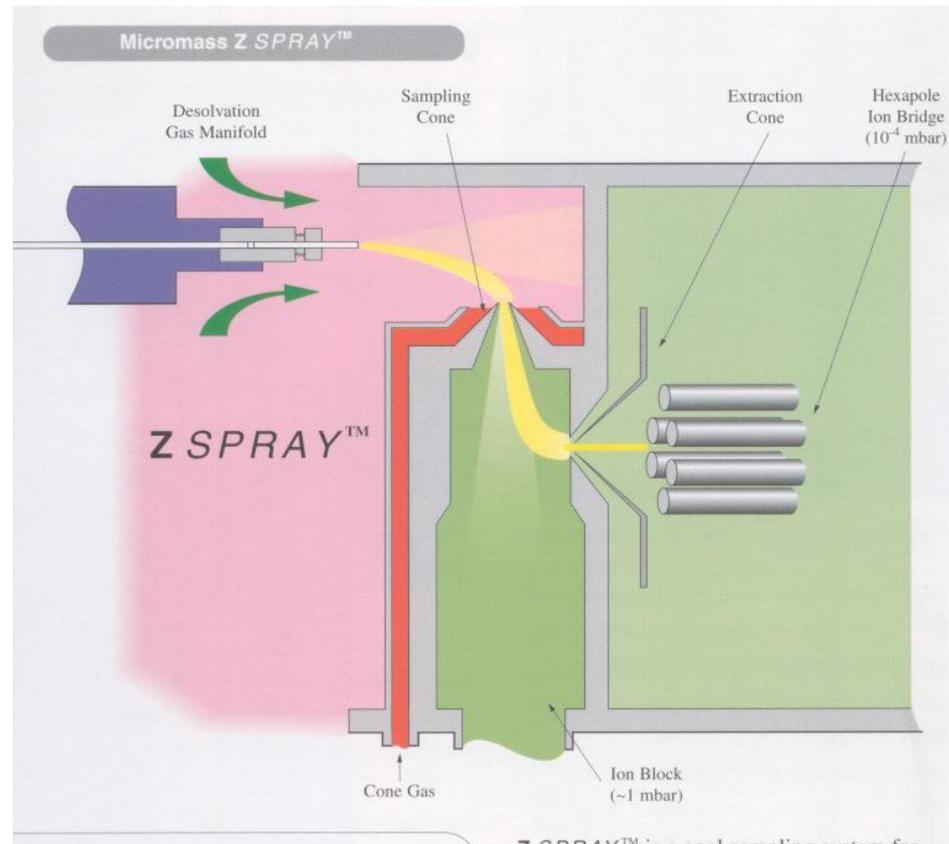
- SI HAY QUE INDICAR QUE EN ESTA TÉCNICA A COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA DE CG/EM LOS ESPECTROS DE MASAS OBTENIDOS SON DIFERENTES A LO ESTABLECIDO EN LOS PRINCIPIOS BÁSICOS CLÁSICOS, ESTO ES DEBIDO A QUE POR LAS FUENTES DE IONIZACIÓN QUE SE APLICA SE TIENE UNA IONIZACIÓN EN LA CUAL LA MATRIZ QUE FORMA CON LA MUESTRA Y LA FASE MÓVIL PROVOCA QUE HAYA VARIANTES EN LOS ESPECTROS DE MASA. LO ANTERIOR LLEVA A QUE LOS PROFESIONALES QUE TRABAJAN CON ESTA TÉCNICA ACOPLADA DEBEN BUSCAR QUE LA MUESTRA LLEGUE LO MÁS LIMPIA POSIBLE PARA QUE NO PROVOQUE PROBLEMAS EN LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE MASAS Y DE PREFERENCIA SOLO SE INTRODUZCAN AL SISTEMA LOS COMPUESTOS DE INTERÉS A SER SEPARADOS POR EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.
- TAMBIÉN SE TIENE QUE INDICAR QUE EN ESTOS ÚLTIMOS 20 AÑOS SE HA PROCEDIDO A ACOPLAR LA CLAE CON LAS TÉCNICAS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN ATÓMICA, LA ESPECTROSCOPIA FTIR (ASÍ COMO OTRAS) PERO EL AVANCE DE ESTOS ACOPLAMIENTOS TODAVÍA SIGUE A NIVEL DE INVESTIGACIÓN EN UNIVERSIDADES Y NO SE TIENE INSTRUMENTACIÓN COMERCIAL ACCESIBLE AL PROFESIONISTA QUE DESEARA TRABAJAR CON ESTAS TÉCNICAS ACOPLADAS.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA



CLAE/EM`s DE MASAS CON SEPARADOR MÁSIICO  
CUADRUPOLO DE DIFERENTES AÑOS.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA



- SISTEMA ELECTROSPAY PARA CLAE/EM`s.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

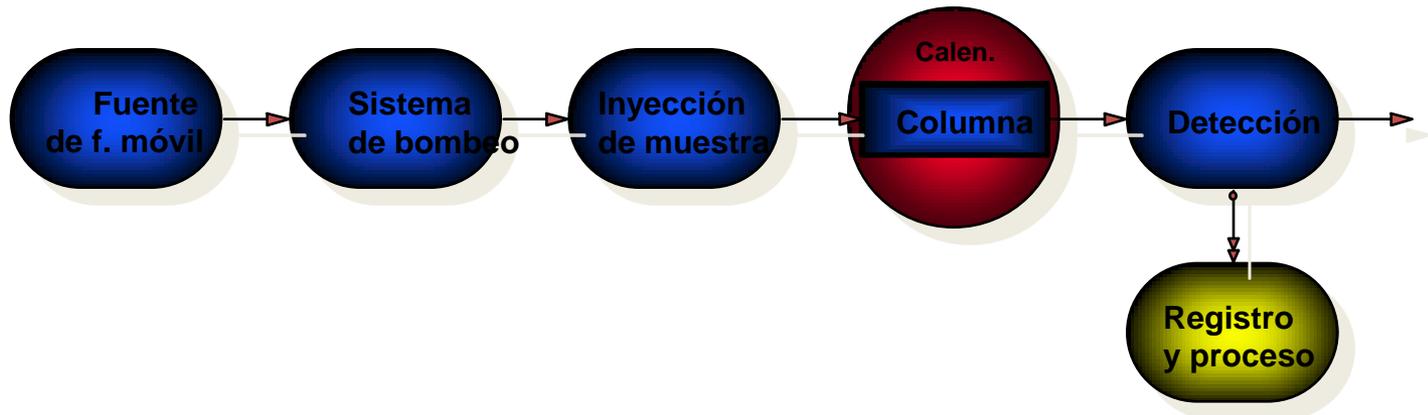
- **TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA ACOPLADAS A CLAE:**
  - ALGO QUE SE HA DESARROLLADO TAMBIÉN DE MANERA CADA VEZ MÁS CRECIENTE ES LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA POR MEDIO DE TÉCNICAS ACOPLADAS A LA CLAE Y QUE SE CONOCEN COMO ACOPLAMIENTO ENTRE COLUMNAS (COLUMN SWITCHING POR SU NOMBRE EN INGLÉS) Y QUE SON LA DE CORTE DE FRENTE, MEDIA Y FINAL (FRONT, HEART, AND END-CUT POR SU NOMBRE EN INGLÉS), LIMPIEZA O ENRIQUECIMIENTO DE TRAZAS DE MUESTRAS EN LÍNEA, ETC..
  - EN ESTAS TÉCNICAS LO QUE SE BUSCA REALIZAR (Y POR ESO RECIBEN EL NOMBRE EN INGLÉS DE “SWITCHING”), ES LA COMUNICACIÓN QUE SE HACE EN LÍNEA CON SISTEMAS DE COLUMNAS PREVIAS A LA COLUMNA DE SEPARACIÓN ANALÍTICA Y QUE PUEDEN COMUNICARSE EN ALGÚN MOMENTO DEL PROCEDIMIENTO PARA QUE LOS COMPUESTOS QUE HAYAN SIDO TRABAJADOS CON ESAS COLUMNAS DE TRATAMIENTO PREVIO SE CONECTEN CON LA COLUMNA ANALÍTICA. DEPENDIENDO DEL RELLENO O EMPAQUE QUE CONTENGAN ESTAS COLUMNAS SE LLEVARÁ AL CABO LOS FENÓMENOS ESPERADOS Y QUE LE DAN NOMBRE A LAS DIFERENTES VARIANTES MENCIONADAS ARRIBA.

# HISTORIA Y AVANCES DE LA TÉCNICA

- ESTAS TÉCNICAS ACOPLADAS CON CLAE PUEDEN PERMITIR EL TRABAJAR DE MANERA AUTOMATIZADA MUESTRAS Y YA SEA SEPARAR PREVIAMENTE PARTE DE LOS COMPUESTOS QUE LOS CONSTITUYEN, CONCENTRAR TRAZAS PRESENTES EN MUESTRAS DEL ORDEN DE PPT O PPB PARA PODER SER ANALIZADOS, LIMPIEZA DE LA MUESTRA.
- LA TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN EN LÍNEA ES LA DE MAYOR AVANCE EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS DEBIDO A QUE PERMITE HACER ESTUDIO DE TRAZAS DE CONTAMINANTES EN MUESTRAS AMBIENTALES Y EL ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE HA CRECIDO TAMBIÉN EN ESTOS AÑOS, ADEMÁS EL ENCONTRAR TÉCNICAS QUE PERMITAN CONCENTRAR A LAS MUESTRAS CON POCA MANIPULACIÓN HUMANA Y POR LO TANTO PUEDAN AUTOMATIZARSE SON DE RELEVANCIA ACTUALMENTE, Y ESTO SE PUEDE REALIZAR CON ESTOS SISTEMAS.

# INSTRUMENTACIÓN BÁSICA

## ELEMENTOS DE UN CROMATÓGRAFO



# INSTRUMENTACIÓN



- Instrumentalmente un Cromatógrafo de Líquidos esta constituido por las siguientes partes:
  1. Fuente de fase móvil y sistema de bombeo.
  2. Sistema de introducción de muestra.
  3. Sistema de separación.
  4. Sistema de detección.
  5. Sistema de registro.

# INSTRUMENTACIÓN

## FUENTE DE FASE MÓVIL



FRASCOS NORMALES DE VIDRIO CON DESGASIFICADOR DE BURBUJEO DE HELIO.

- Se utilizan disolventes de alta pureza 99.8% (conocidos como grado HPLC).
- Inertes, no tóxicos, adecuados con el detector que se utilice y de precio accesible.

# INSTRUMENTACIÓN

## FUENTE DE FASE MÓVIL

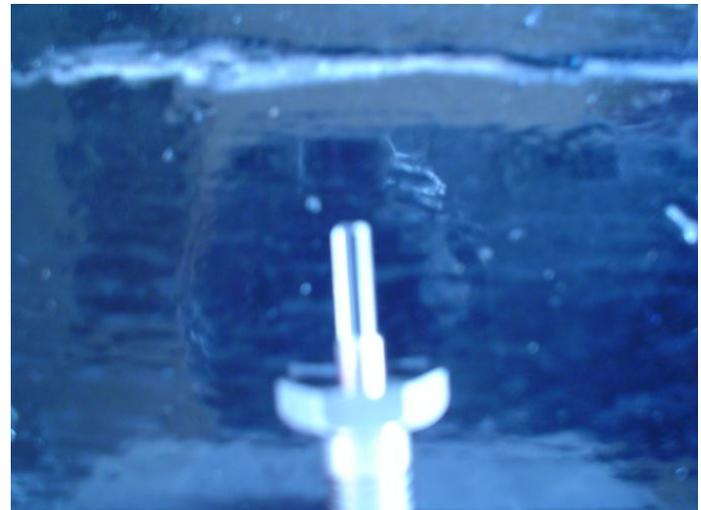


FRASCOS NORMALES DE VIDRIO CON DESGASIFICADOR DE MEMBRANA DE TEFLÓN.

- Se requiere eliminar los gases disueltos –en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección.

# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE BOMBEO



- Bombas mecánicas:  
    Recíprocas y de desplazamiento.
- Bombas neumáticas.

# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE BOMBEO

- Con el sistema de bombeo se pueden trabajar la separación de los compuestos por técnica isocrática o elución con gradiente.
- Isocrático: cuando durante la corrida de la muestra el poder de elución de la fase móvil se mantiene constante, en la práctica el disolvente o la mezcla de disolventes se mantiene igual durante toda la corrida.
- Elución con gradiente: cuando durante la corrida de la muestra se varía el poder de la elución de la fase móvil de un poder de elución baja a una alta, en la práctica el disolvente o la mezcla de disolventes varía durante la corrida.

# INSTRUMENTACIÓN

## INTRODUCCIÓN DE MUESTRA



### VÁLVULAS DE INYECCIÓN

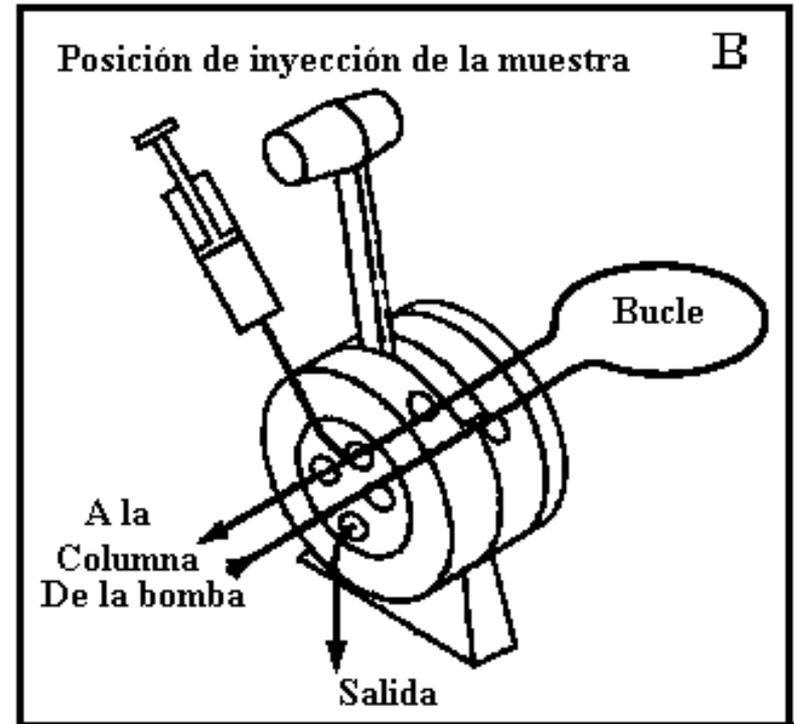
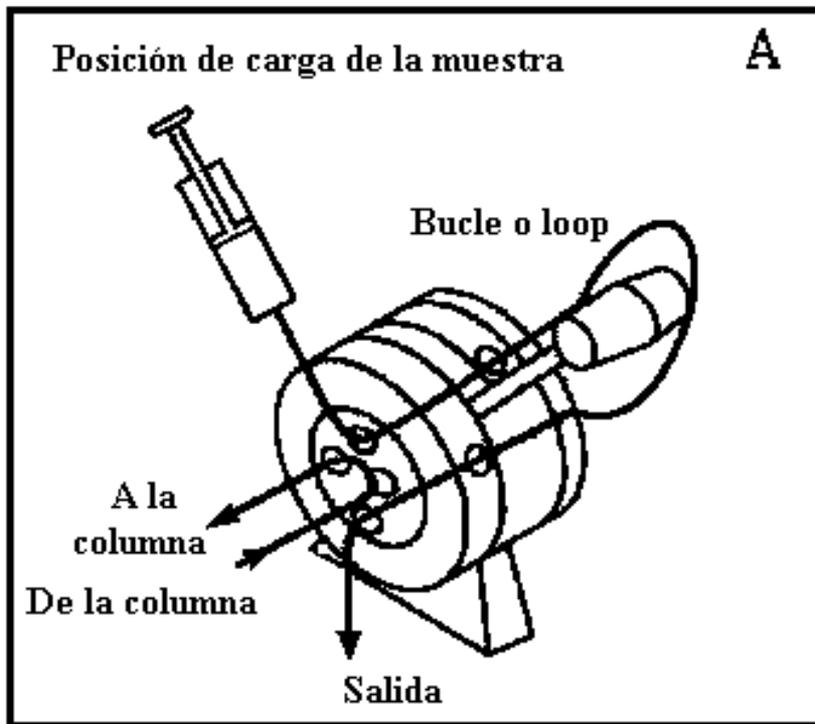
- Para introducir la muestra al inyector normalmente las muestras sólidas se introducen disueltas y por medio de jeringas se carga en la válvula de inyección.
- Se inyectan del orden de 10-250 $\mu$ L.

# INYECCIÓN DE MUESTRA

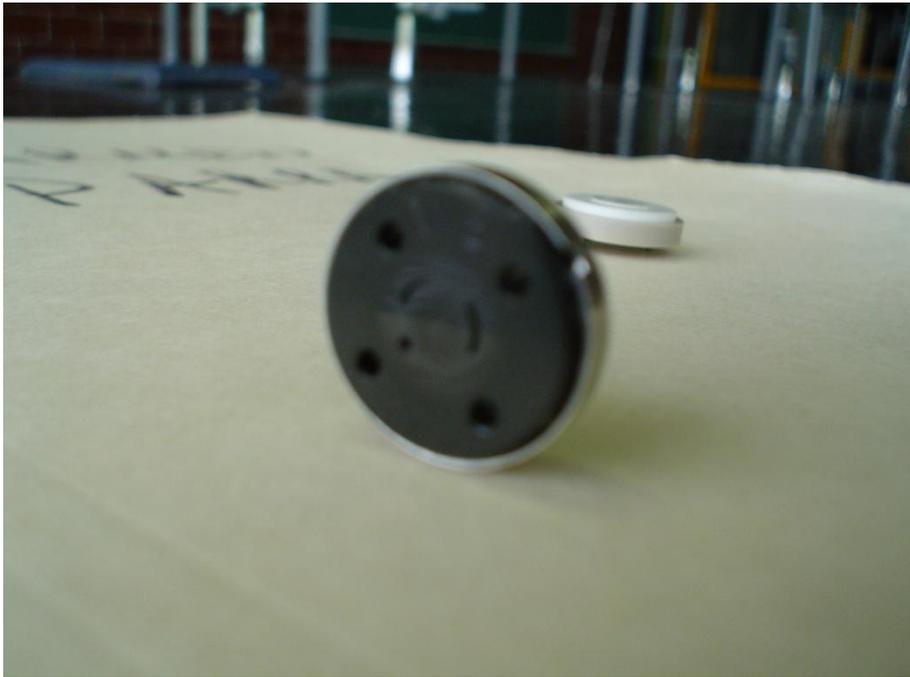


- Jeringa introduciendo muestra en la válvula de inyección.

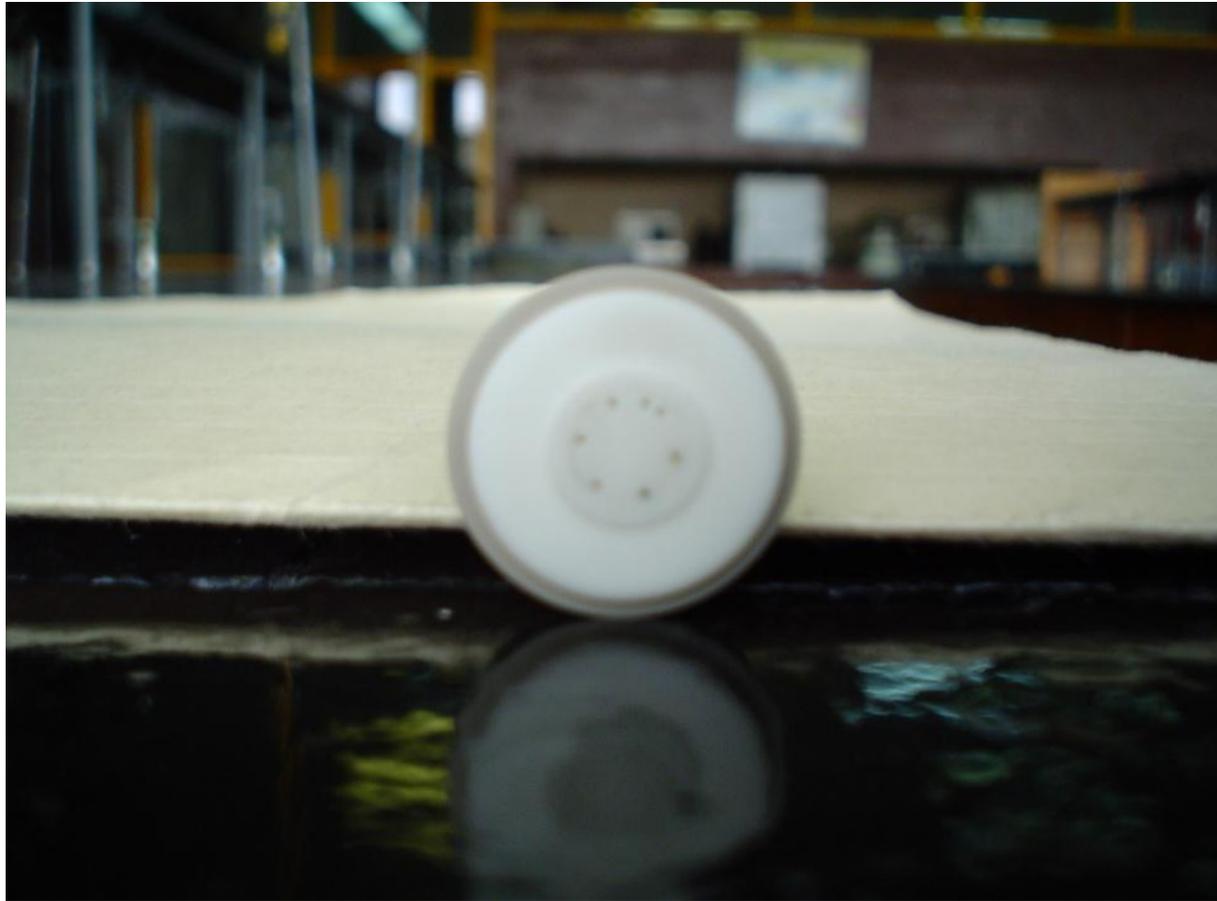
# INYECCIÓN DE MUESTRA



# INYECCIÓN DE MUESTRA



# INYECCIÓN DE MUESTRA

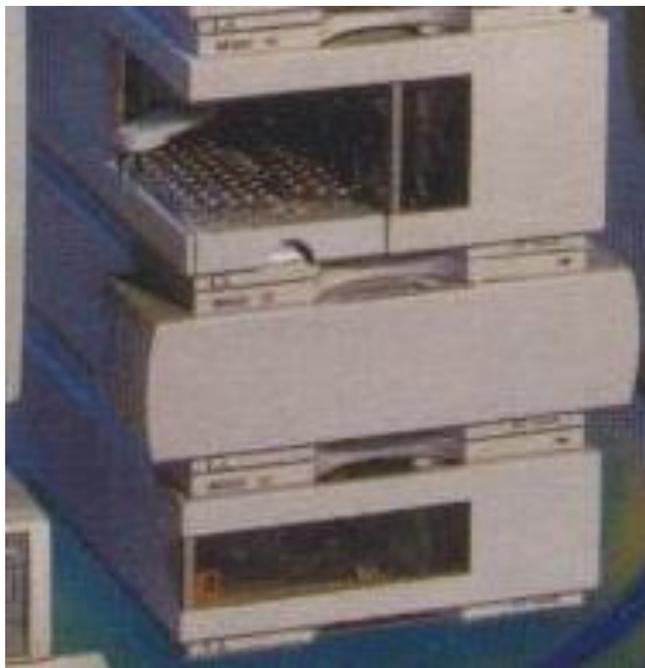


# REQUISITOS DE LA MUESTRA.

- Debe ser soluble en alguno de los disolventes que formen la fase móvil.
- No debe reaccionar con ningún componente del sistema (instrumentación con superficies internas inertes).

# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE SEPARACIÓN



### HORNO O CHAQUETA DE CALENTAMIENTO

- La variación de la temperatura para buscar la separación de los compuestos que forman la muestra no es común pero se llega a calentar la columna para bajar la viscosidad de la fase móvil y/o para mantener una temperatura constante y mejorar la reproducibilidad de los tiempos de retención.

# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE SEPARACIÓN

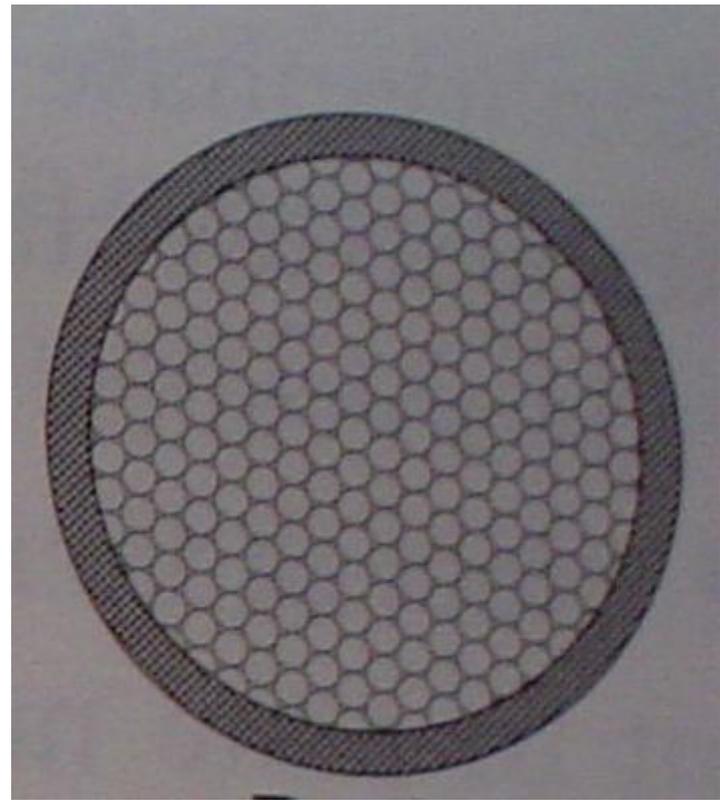
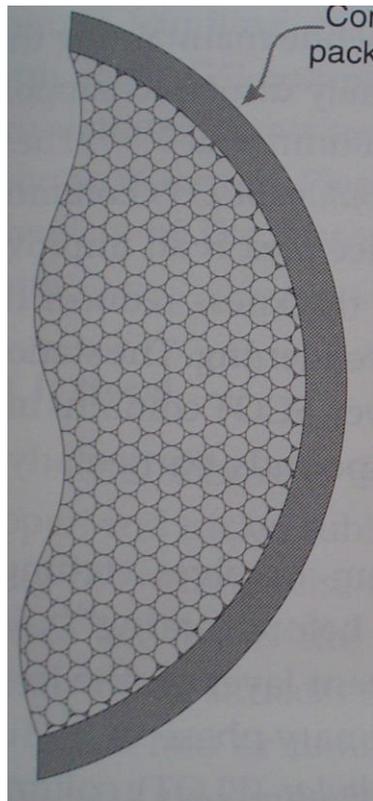


COLUMNAS  
ANALÍTICAS



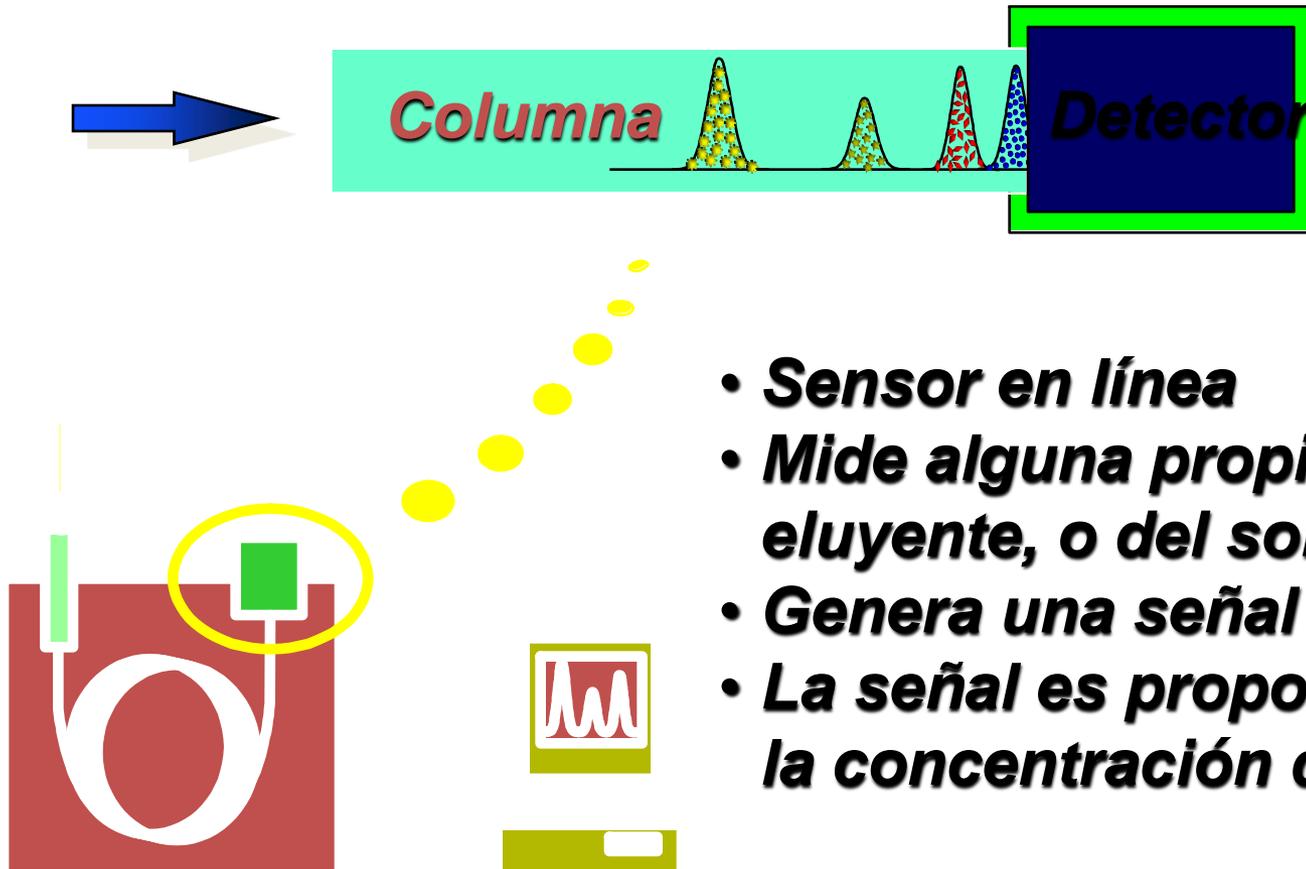
# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE SEPARACIÓN



COLUMNAS EMPACADAS

# DETECTORES



# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE DETECCIÓN

### ➤ Espectroscópicos:

Detector UV-Vis de  $\lambda$  fija o variable.

Detector de Fluorescencia.

Detector de Refractometría.

### ➤ Electroquímicos:

Conductímetro.

Amperímetro.

Voltamperímetro.

Coulombímetro.

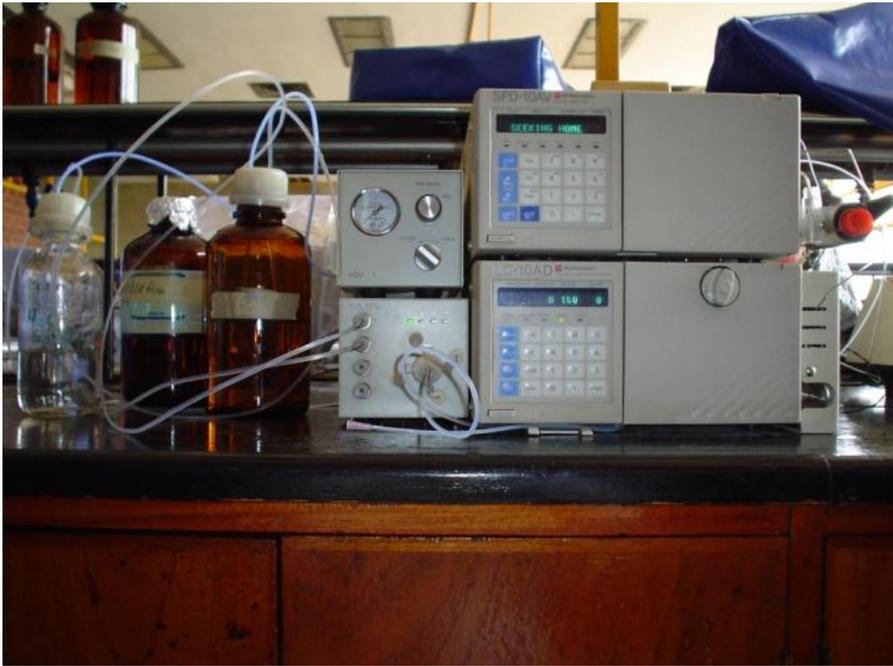
### ➤ Acoplados:

Espectrómetro de Masas.

FTIR.

# INSTRUMENTACIÓN

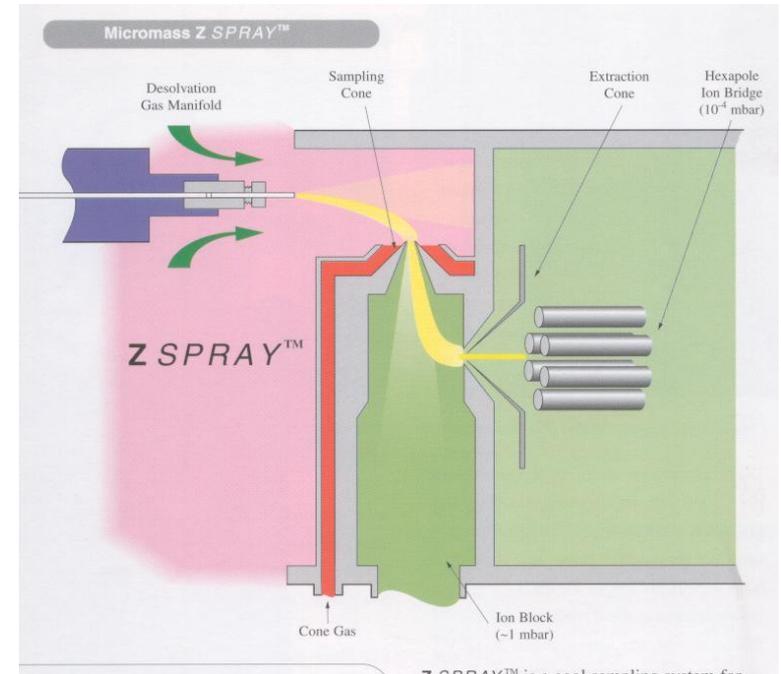
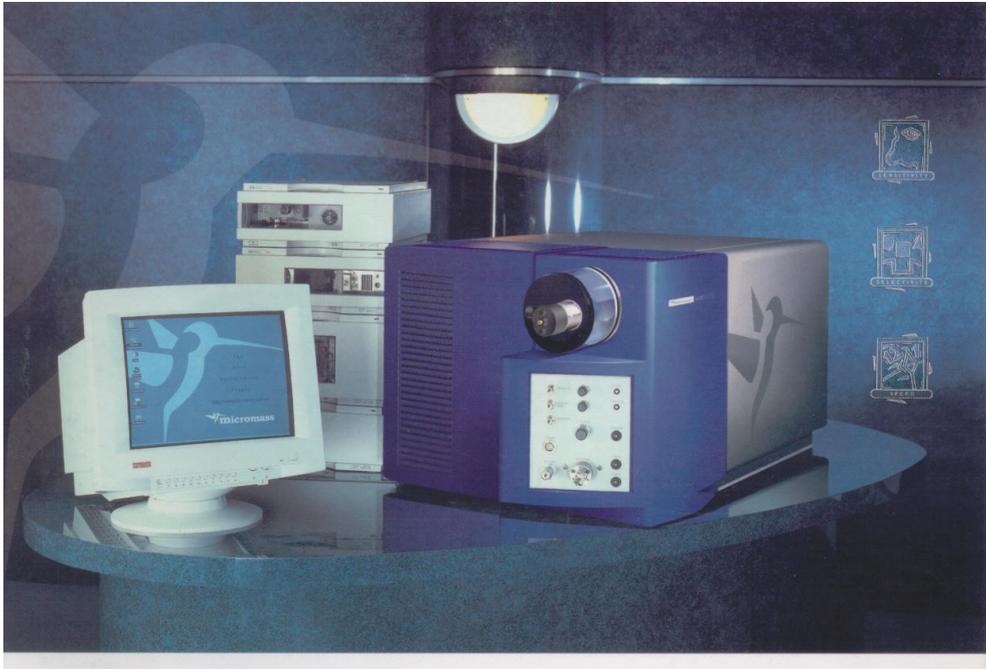
## SISTEMA DE DETECCIÓN



Detector UV-Vis.

# INSTRUMENTACIÓN

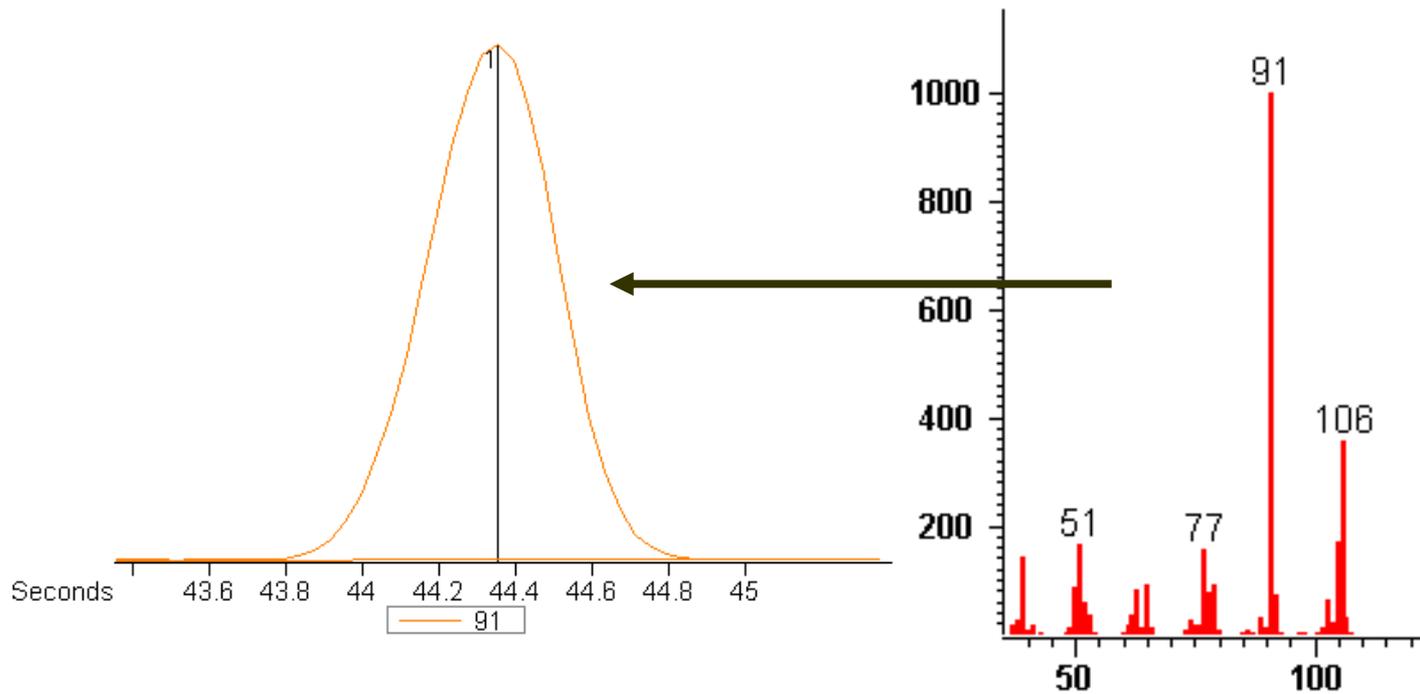
## SISTEMA DE DETECCIÓN



- Detector de Espectrometría de masas con interfase electrospray y separador másico de tipo sextupolo para CLAE.

# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE DETECCIÓN



# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE REGISTRO

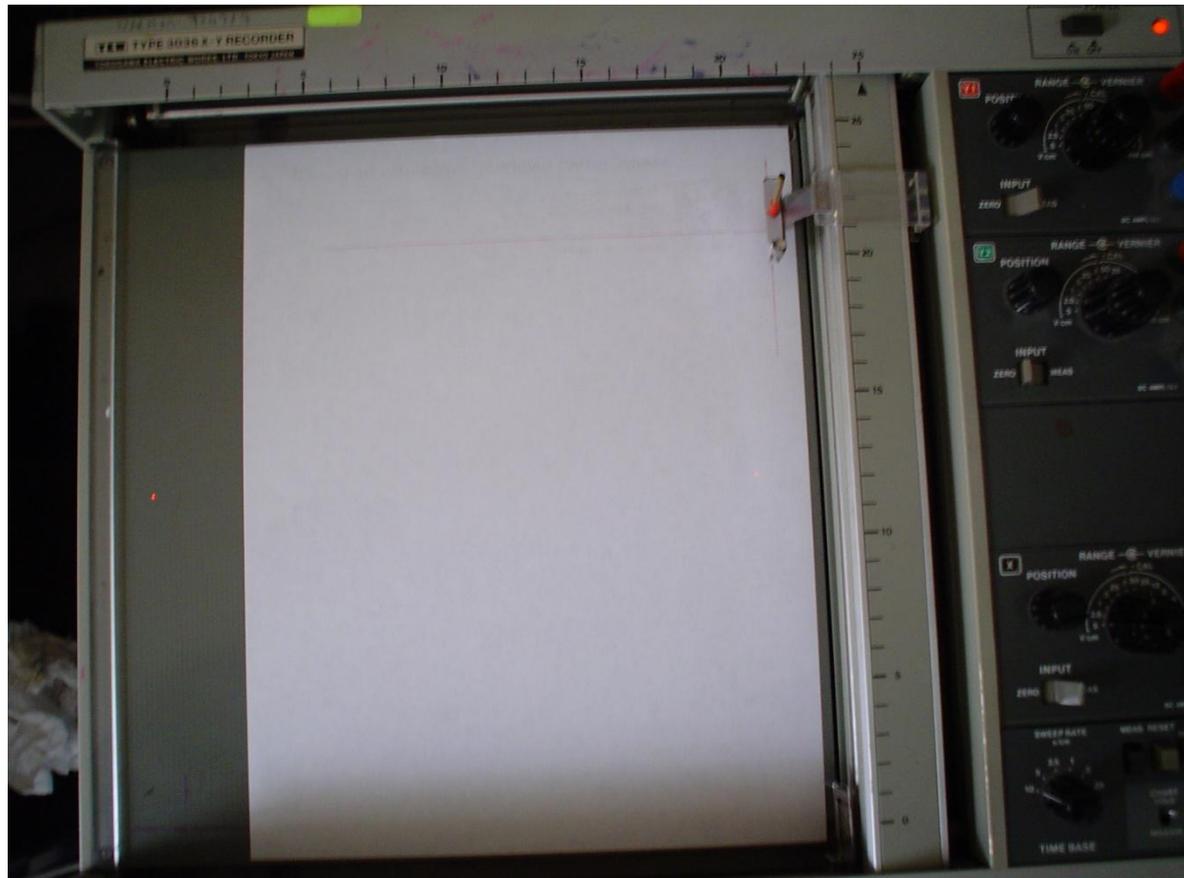
Diferentes alternativas:

- Registrador
  - costoso
  - lento y con pobre calidad de resultados.
- Integrador
  - Basado en los 1°s microprocesadores.
- Computadora con Tarjetas A/D
  - Permite optimizar la calidad de los resultados, y reprocesarlos cuanto se necesite.

# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE REGISTRO

- Registradores (historia)



# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE REGISTRO

- Integradores



# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE REGISTRO

- Computadoras



# INSTRUMENTACIÓN

## SISTEMA DE REGISTRO

- Cromatograma

