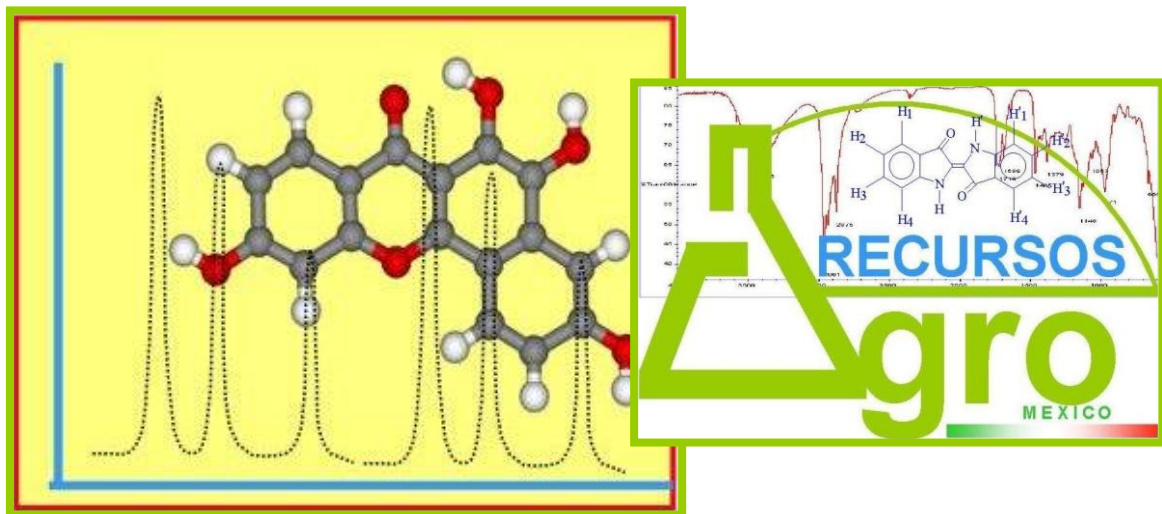


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**

# **Introducción al estudio de los AGRORECURSOS**

## **Cromatografía Líquida de Alto Desarrollo (HPLC)**



**Elías Jaime Matadamas Ortiz**

**2006**

## INTRODUCCIÓN

La Cromatografía Líquida de alto Desarrollo (**High Performance Liquid Chromatography HPLC**) es una técnica de separación muy eficiente para compuestos no volátiles que se encuentran en los **Agrorecursos** y que queremos separar de un extracto con una gran variedad de compuestos. Es una herramienta de mucho valor si se acopla el cromatógrafo a un espectrómetro de masas (EM) para separar y caracterizar al mismo tiempo. Cada vez más frecuentemente los laboratorios de investigación de los **Agrorecursos** están utilizando esta combinación de equipos para lograr de manera eficiente resultados confiables en sus estudios.

Actualmente no solo es necesario profesionalizar los métodos analíticos en los laboratorios, sino que es imperativo desarrollar experiencias particulares en los proyectos específicos en materia del manejo y caracterización de la biomasa.

Para los estudiantes de las **Ciencias de los Agrorecursos** la CLAD (HPLC) representa un elemento de trabajo indispensable. Por lo anterior, la intención de escribir estas sencillas notas, es la de dar a conocer los principios básicos de esta herramienta, para que los lectores solo tengan las nociones generales y si desean profundizar, puedan acceder a los textos altamente especializados que actualmente existen.

Elías Jaime Matadamas Ortiz

Chapingo, México, marzo de 2006

## 1. ASPECTOS GENERALES DE LA CROMATOGRAFÍA.

En los siguientes párrafos intentaremos proporcionar al lector los aspectos generales de la *cromatografía*, para que seamos capaces de comprender cada una de las técnicas en las que se ramifican el método cromatográfico.

### 1.1. DEFINICIÓN

La cromatografía es un método físico-químico de separación que está basado en las diferencias de afinidad de las sustancias que interactúan con dos fases, una *estacionaria* o fija y la otra, *móvil*. De acuerdo a la técnica cromatográfica que se trate, la separación de los compuestos contenidos en la muestra a analizar, resulta ya sea de la adsorción y de su desorción sucesivas sobre la fase estacionaria, o por su solubilidad diferente en cada una de las fases. Se considera que este método de separación nació, bajo su forma moderna, por los trabajos del botánico Tswett a quien también se le atribuye la invención de los términos de *cromatografía* y de *cromatograma*.

Aunque el término *chromos* significa *color*, las técnicas cromatográficas se extienden a sustancias en general y han devenido en un instrumento clave en la identificación y cuantificación de una gran variedad de compuestos. Tswett desarrolló las bases de la cromatografía hacia 1906 al intentar la separación de los pigmentos de la clorofila utilizando como fase estacionaria el papel y como fase móvil el metanol. Al depositar sobre el papel unas gotas de extracto foliar y al introducir el papel en un recipiente conteniendo alcohol, observó que cada uno de los depósitos migraban, al igual que la fase móvil, al margen superior del papel, resultando en una separación nítidas de los diferentes pigmentos fotosintéticos. Es así como nacieron los principios de una nueva rama de la analítica a la cual su autor bautizo como **cromatografía**. La gran diversidad de las técnicas cromatográficas y los modernos equipos que actualmente se emplean, nada tienen que ver con los experimentos sobre celulosa de Tswett. Sin embargo sus principios siguen vigentes y actualmente la **cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC)**, que cuenta con fases estacionarias revolucionadas y las fases móviles con sistemas de elusión altamente eficientes, es una herramienta muy socorrida cuando de identificación de compuestos de muestras complejas se trata.

### 1.2. NATURALEZA DE LAS FASES

Cuando en cromatografía hablamos de dos fases, nos estamos refiriendo a la interacción de dos materiales donde la fase estacionaria, como su nombre lo sugiere, generalmente está inmovilizada y la fase móvil pasa por la estacionaria.

### 1.2.1. FASE ESTACIONARIA O FIJA

La fase estacionaria o fija puede ser sólida o líquida. Los sólidos, sílice o alúmina tratados, permiten la separación de los compuestos de las mezclas gracias a sus propiedades absorbentes. Pueden ser empleados ya sea como relleno de una columna (cromatografía por gravedad o a alta presión) o ya sea sobre una placa de vidrio o de aluminio, o sobre una hoja de materia plástica (cromatografía de capa fina).

La fase estacionaria puede estar también constituida por un líquido que impregna un soporte sólido o aún una cadena carbonada fijada químicamente al soporte (fase injertada). Así, en la cromatografía sobre papel, la fase estacionaria está formada por agua que las moléculas de celulosa del papel adsorben, mientras que en la cromatografía en fase gaseosa, está constituida de un líquido poco volátil y térmicamente estable que impregna gránulos porosos.

### 1.2.2. FASE MÓVIL

La fase móvil es ya sea un gas, como en la cromatografía en fase gaseosa, o un líquido, como en la cromatografía sobre papel, sobre capa fina o en columna. Cuando la fase móvil es gaseosa, es denominada *gas vector* o *gas portador*; cuando es líquida, es denominada *eluante* o, más raramente, *disolvente*.

Las diferentes técnicas cromatográficas de acuerdo a la naturaleza de la fases, estacionaria o móvil se proporciona en el siguiente cuadro.

**Cuadro 1. Técnicas cromatográficas de acuerdo a la naturaleza de las fases.**

Fase móvil	Fase estacionaria	Denominación
Líquida	Sólida	Cromatografía líquida-sólida
Gas	Sólida	Cromatografía gas-sólida
Líquida	Líquida	Cromatografía líquida-líquida
Gas	Líquida	Cromatografía gas-líquida

### 1.3. NATURALEZA DE LOS FENÓMENOS

Los fenómenos que resultan de la interacción de las fases, estacionaria y móvil con los compuestos de las muestras son varios y de acuerdo a éstos se plantea la técnica cromatográfica más adecuada sobre la base de la óptima separación de compuestos.

### **1.3.1. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN**

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación está basada sobre la adsorción selectiva de los compuestos de la mezcla en la superficie del sólido. Es la técnica cromatográfica más conocida, esencialmente por su empleo como una técnica preparativa de separación. Las fases estacionarias han progresado mucho desde la época de Tswett, que utilizaba el carbonato de calcio o el azúcar. Las separaciones de los compuestos orgánicos sobre gel de sílice o de alúmina ( o sobre capa fina), con un solvente como fase móvil, son de este tipo. Las moléculas se adhieren a la fase estacionaria por un doble efecto de fisiosorción y quimiosorción. El parámetro físico-químico involucrado es el *coeficiente de adsorción*.

### **1.3.2. CROMATOGRAFÍA IONICA**

La fase estacionaria es un sólido, ionizado o ionizable, donde los iones son intercambiables con los de la fase móvil. La separación está basada en el hecho que entre más grande es la carga ionica de los compuestos, mayor es la retención de la superficie del sólido. La fase móvil es habitualmente una solución tampón acuosa cuyo pH permite controlar la movilidad de los compuestos de la mezcla analizada. La fase estacionaria es comúnmente constituida por partículas esféricas de solo algunos micrómetros de diámetro de un polímero (poliestireno), las cuales han sido químicamente transformadas en su superficie para producir sitios ionicos. Estas fases permiten el intercambio de sus contra iones móviles con los iones, de la misma carga eléctrica, presentes en la muestra. La separación se basa en los *coeficientes de distribución ionica*.

### **1.3.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN**

También es llamada de filtración en gel o de permeación. La fase estacionaria está constituida de un sólido que presenta un sinfín de poros cuya dimensión es del orden del tamaño de las moléculas más pequeñas de la mezcla a analizar. La separación resulta del hecho que las moléculas grandes no pueden penetrar en los poros mientras que las pequeñas son retenidas más o menos tiempo. Este método se aplica a la separación de moléculas de polímeros, en función de sus masas moleculares. El coeficiente de distribución toma el nombre de *coeficiente de difusión*.

### **1.3.4. CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN**

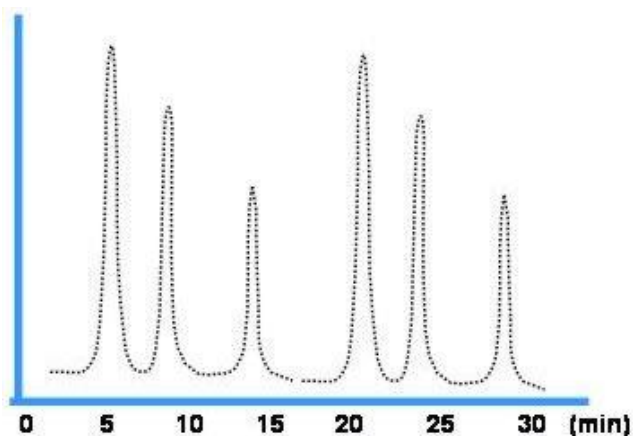
La fase estacionaria es un líquido adsorbido en la superficie de un soporte sólido inerte; la separación se basa en las diferencias de solubilidad de los compuestos en la fase móvil. La fase estacionaria puede estar inmovilizada dentro de una

columna. En este caso debemos distinguir por una parte el soporte inerte sólido que tiene solo una función mecánica, y la fase estacionaria por otra parte. La impregnación de un material poroso (el proceso más simple para inmovilizar un líquido) es una vía actualmente abandonada cuando la fase móvil es igual un líquido. Existe, en efecto, un riesgo importante de lavado de la columna, un fenómeno llamado *bleeding*. Por el contrario este método es adecuado cuando la fase móvil es un gas.

Para inmovilizar la fase estacionaria, es entonces preferible fijar de manera permanente las especies que la componen por enlaces covalentes: es la técnica del *injerto*. La fase estacionaria se comporta entonces siempre como un líquido y la separación se basa en el *coeficiente de partición* del soluto en la interfase de las dos fases. Este parámetro es comparable al que interviene en la extracción de una fase acuosa con un solvente orgánico en una ampolla de decantar.

#### 1.4. EL CROMATOGRAMA

El análisis por cromatografía se basa en el estudio del cromatograma. Este es un diagrama de dos dimensiones, que se presenta en la pantalla o dibujado en papel y muestra la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. El tiempo (o algunas veces el volumen) de elusión aparece en el eje de las abscisas y la señal del detector en el eje de las ordenadas.



**Figura 1.** Cada uno de los picos en el cromatograma representa un compuesto que está separado de los demás y están caracterizados por sus tiempos de retención.

## **2. ASPECTOS BÁSICOS DE LA HPLC.**

La Cromatografía Líquida de Alto Desarrollo es una técnica donde se opera a una alta presión, de aquí que también reciba el nombre de Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP). El eficiente desarrollo de esta técnica está relacionada en parte por la utilización de alta presión que se utiliza para forzar el movimiento del solvente o una mezcla de solventes junto con la muestra a analizar en una columna muy delgada que contiene muy finas partículas, lo que arroja como resultado una alta resolución en la separación de los compuestos de la muestra.

La CLAD constituye una técnica analítica de empleo muy común. Corresponde a una evolución de la cromatografía preparativa en columna donde las ventajas (eficiencia y resolución) son en mucho mejoradas por la utilización de fases estacionarias muy evolucionadas constituidas de partículas esféricas cuyo diámetro está comprendido comúnmente entre 2 y 5 micrómetros. Sin embargo, entre más pequeñas sean las partículas, es necesaria mayor presión para empujar a la fase móvil para vencer la pérdida de carga provocada por el llenado de la columna.

El mecanismo general de la CLAD es hacer pasar una cantidad muy pequeña de la muestra diluida en un solvente que por medio de una jeringa es inyectada al cromatógrafo, a una columna recubierta en su interior con una fase estacionaria, con un cantidad de una mezcla de solventes llamado, sistema de elusión, a una gran presión.

La migración forzada de una fase líquida que contiene a la muestra al contacto de una fase estacionaria provoca la interacción de los solutos de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Intervienen mecanismos de intercambio soluto – fase móvil – fase estacionaria, basados en los coeficientes de adsorción o de partición.

### **2.1. FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.**

Los siguientes son los términos básicos que se usan comúnmente en la Cromatografía Líquida:

#### **2.1.1. Tiempo de retención ( $T_R$ ).**

Es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el máximo del pico cromatográfico.

### **2.1.2. Tiempo Muerto ( $t_M$ ).**

Es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y el máximo del pico de una sustancia no retenida.

### **2.1.3. Tiempo de Retención Corregido ( $t'_R$ ).**

Distancia entre el máximo del pico de la sustancia no retenida y el máximo del compuesto de interés.

$$t'_R = t_R - t_0$$

### **2.1.4. Factor de capacidad o relación de capacidad ( $k$ ).**

Indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente en la columna:

$$K_C = [t'_R/t_0] = t_R - t_0/t_0$$

### **2.1.5. Resolución de los picos ( $R_s$ ).**

Es la habilidad que tiene la columna para separar dos picos adyacentes. La resolución entre dos sustancias es la proporción entre la diferencia de las distancias de los máximos de los picos y el promedio de los anchos de las bandas.

## **3. EL CROMATÓGRAFO DE CLAD.**

Todo equipo de CLAD (HPLC) posee varios módulos con funciones bien definidas, que forman un sistema con elementos relacionados. Estos módulos están conectados por una serie de tuberías de pequeño diámetro interno (0.1 mm) de acero inoxidable generalmente o pueden ser también de poliéter/etercetona o PEEK<sup>®</sup> el cual es un polímero flexible, muy económico y que puede resistir los solventes usuales bajo altas presiones (350 bar).



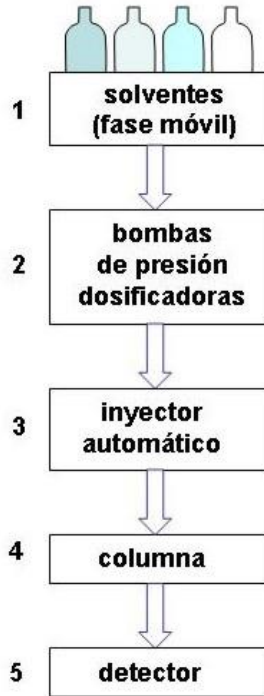


Figura 2. Esquema de un equipo HPLC con inyector automático.

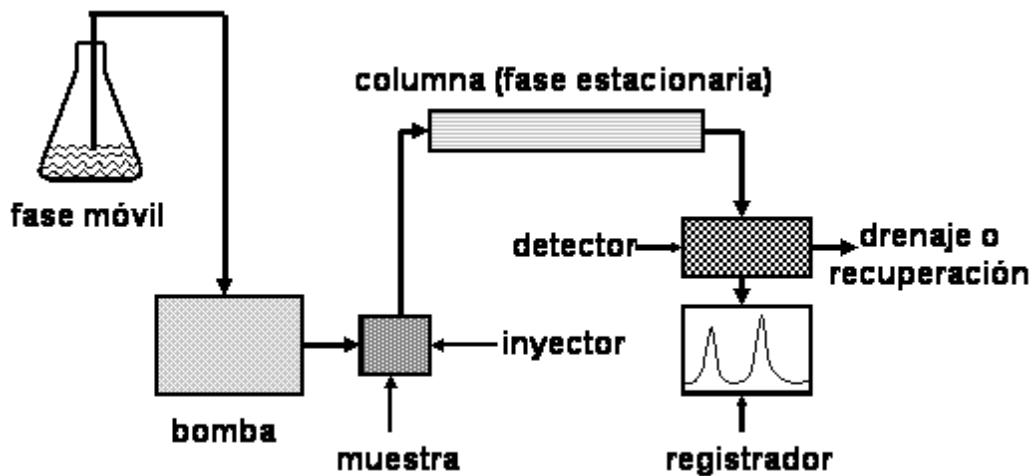
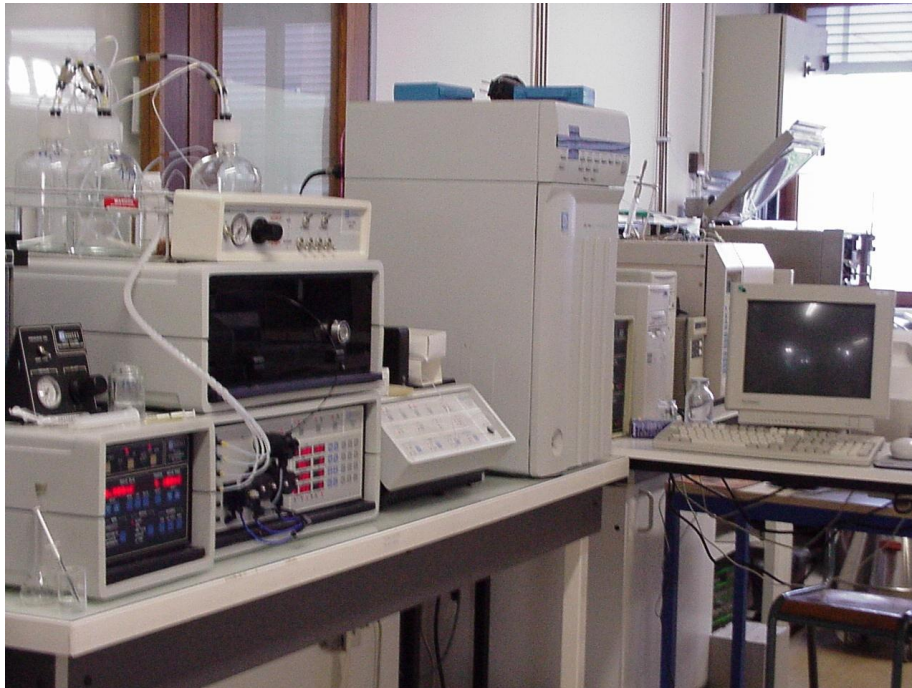


Figura 3. Los componentes de un cromatógrafo líquido de alto desarrollo.



**Figura 4. Cromatógrafos de HPLC en el Laboratorio de Química Agroindustrial de la Escuela Nacional Superior de Ingenieros en Artes Químicas y Tecnológicas (ENSIACET) de Toulouse, Francia.**

### **3.1. Las bombas y los gradientes de elusión.**

Todo aparato de HPCL posee una varias bombas para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna en la que el relleno, muy compacto, es el responsable de una pérdida de carga que puede alcanzar 20 000 kPa en utilización corriente. Esta se traduce, en cantidad del inyector, por una presión elevada que depende del gasto, de la viscosidad de la fase móvil y del tamaño de los gránulos de la fase estacionaria. Se utilizan bombas *debimétricas* concebidas para mantener un gasto estable y no pulsada, aunque la composición de la fase móvil varíe.

En los solventes encontramos la presencia, en cantidad no despreciable, de gases ambientales ( $N_2$ ,  $O_2$ ...). Las separaciones pueden ser perturbadas a causa de una modificación de la compresibilidad de la fase móvil y de la formación de eventuales burbujas. En particular, el oxígeno molecular puede acortar la vida de las columnas y dañado en el caso de detección electroquímica. Por lo anterior, es preferible de

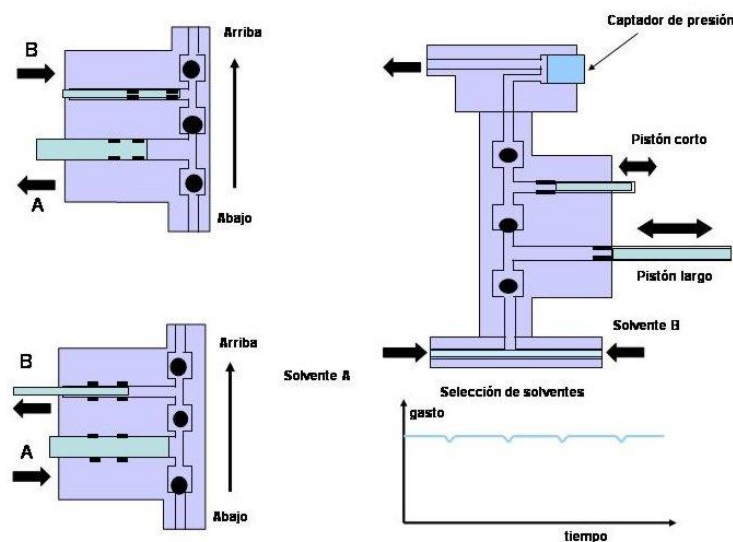
desgasificar los solventes, ya sea por ultrasonido, por una inyección de gas helio o por la difusión a través de una membrana.

Por otro lado, los efectos de la corrosión aumentan con la presión, las partes y revestimientos en contacto de la fase móvil deben ser inertes. Así, los pistones de las bombas son de zafiro, ágata, teflón o aleaciones especiales.

La gran mayoría de los aparatos poseen bombas de pistón alternativo. A fin de evitar las variaciones de gasto, propias del modo de funcionamiento de las bombas de pistón simple (llenado/expulsión), los constructores a fabricado bombas de dos pistones que se clasifican en dos categorías, llamadas *en serie* o *en paralelo*.

En los montajes en serie, el pistón empuja una cantidad de solvente dos veces más grande que el pistón aval, ya sea porque su diámetro es más grande, o porque su carrera es más grande. El volumen de eluante almacenado en el cilindro correspondiente al pistón **B** es restituído en la columna mientras que el pistón **A** aspira una nueva cantidad de eluante, En seguida, cuando el pistón **B**, que regula así el gasto nominal. Estos montajes necesitan de válvulas en amont y en aval.

Para regularizar el gasto, los pistones se desplazan a velocidad controlada por un motor y de cammes de forma particular.



**Figura 5. Esquema de un cuerpo de bomba de dos cabezas en serie. a) aspiración por el pistón grande y empuje por el pequeño; b) situación inversa, para regularizar el gasto; c) montaje de dos pistones de mismo diámetro donde uno de ellos dobla la carrera y velocidad del otro; d) gráfica mostrando las variaciones de gasto en función del movimiento de los pistones en el curso del tiempo.**

### 3.1.1. Gradientes de alta o baja presión.

Actualmente la solución generalmente aceptada consiste en un sistema de electroválvulas para hacer pasar en la única bomba, vía una cámara de mezcla de *baja presión* situada abajo, los diferentes solventes cuya composición está programada.

En los montajes de alta presión, es necesario tantas bombas como de solventes se utilicen. La mezcla final es realizada en una cámara de mezcla después de la bomba y antes de entrar a la columna.

### 3.2. Inyectores.

La inyección se debe hacer en un tiempo muy breve a fin de perturbar el menos tiempo posible el régimen dinámico establecido dentro de la columna y el detector. La dificultad consiste a introducir en la cabeza de la columna, sin parar la circulación de la fase móvil, un volumen de la muestra, donde la presión supera frecuentemente los 10 000 kPa. Para esto utilizamos una válvula de alta presión de varias vías, que es una pieza mecánica de precisión, manual o con motor, montada sobre el curso de la fase móvil, justo antes de la columna. En la posición **carga**, la válvula hace la comunicación la bomba y la columna. La muestra, en solución, es introducida con una jeringa en pequeño tubo llamado *hebilla*. Esta existe para toda cantidad de volúmenes, es ya sea exterior, o puede estar integrada en el cuerpo de la válvula. En la posición **inyección**, la muestra, guardada en la hebilla a presión atmosférica, es insertada en el flujo de la fase móvil. Para este fin accionamos **una palanca** que permite, por una rotación de 60°, invertir el sentido de la circulación en la hebilla. Condiciones de buena reproducibilidad se pueden alcanzar si la hebilla ha estado totalmente llena de muestra.

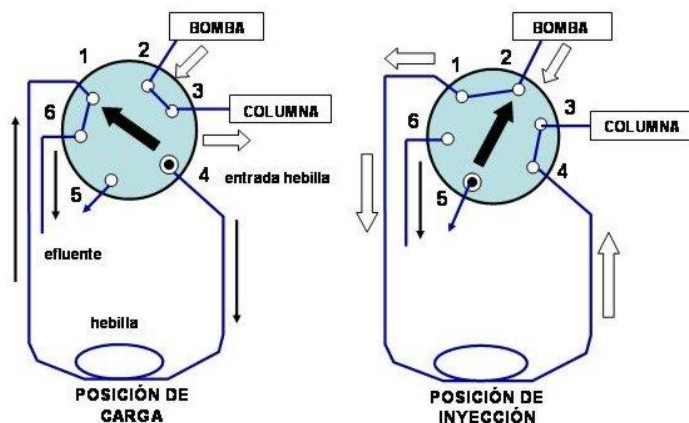


Figura 6. Las dos etapas de la inyección en una válvula. a) carga, b) inyección.

### 3.3. Columnas.

La columna es un tubo recto, calibrado, de acero (eventualmente reforzado de un material inerte de vidrio, o de PEEK<sup>®</sup> que mide entre 3 y 25 cm de longitud. El diámetro interno varía de 0.5 a 5 mm. La fase estacionaria es mantenida entre dos discos porosos situados en las extremidades cuyos volúmenes muertos son lo más pequeños posibles. El gasto de la fase móvil no puede sobrepasar algunos ml/min. Ciertos constructores proponen microcolumnas de un diámetro de aproximadamente 0.3 mm y de 5 cm de longitud por las que el gasto admisible baja a solo algunos  $\mu\text{l}/\text{min}$ . La fase estacionaria y la bomba deben estar adaptadas a fin de que basten solo algunas gotas del solvente para mojar todos los compuestos de la columna. Estas columnas estrechas tienen la ventaja, además de un consumo muy reducido de eluantes, de conducir a una mejor resolución y por consiguiente una menor difusión. Estas columnas facilitan el éxito de acoplamiento de la HPLC con la MS.

A continuación daremos una serie de recomendaciones para mantener una columna en buen estado y alargar su vida útil.

- Seguir al pie de la letra las indicaciones del fabricante relativa a su uso (naturaleza de la sustancias a analizar, especificaciones de presión y de temperatura).
- Selección adecuada del o los solventes de la fase móvil.
- Utilización de una pre- columna. Esta es una micro columna que protege la columna de una eventual adsorción irreversible, tiene la forma de un cartucho intercambiable.
- No dejar nunca las columnas secarse completamente, para este efecto es necesario conservar la columna en el solvente que estamos utilizando en los ensayos, tapando la extremidades.
- Evitar sobrecargar la columna al inyectar muestras muy concentradas ya que esto provoca la saturación de los sitios de adsorción. La concentración recomendada es de  $\approx 0.01\%$ .
- Limpiar regularmente la columna con solventes. Para las fases de polaridad inversa (RP) con metanol, y para las fases normales de sílice con acetato de etilo.
- Utilización de una solución tampón implica dejar un escurrimiento constante a fin de evitar la formación de precipitado que dañaría la columna. Lavado obligatorio después de su utilización.

- Respetar los límites de temperatura de utilización. Poner atención con el punto de ebullición del solvente. Es importante regular la temperatura cuando se utiliza un detector refractómetro.

El control de la temperatura en la columna es esencial para la estabilidad de la línea de base del detector y reproducibilidad de los tiempos de retención en cromatografía líquida de intercambio de iones, partición, partición en gel y adsorción, Aún en laboratorios con aire acondicionado es común experimentar una variación de la temperatura de 3-4°C. Esta variación es suficiente para causar errores en la cuantificación o identificación de los picos, especialmente en sistemas automatizados o al usar detectores sensibles a la temperatura. Para lograr una temperatura estable durante la corrida cromatográfica es recordable la instalación de *un controlador de temperatura*.

### **3.4. FASES ESTACIONARIAS**

El éxito de una separación reposa esencialmente de una buena elección de la fase estacionaria caracterizada por diferentes parámetros de superficie.

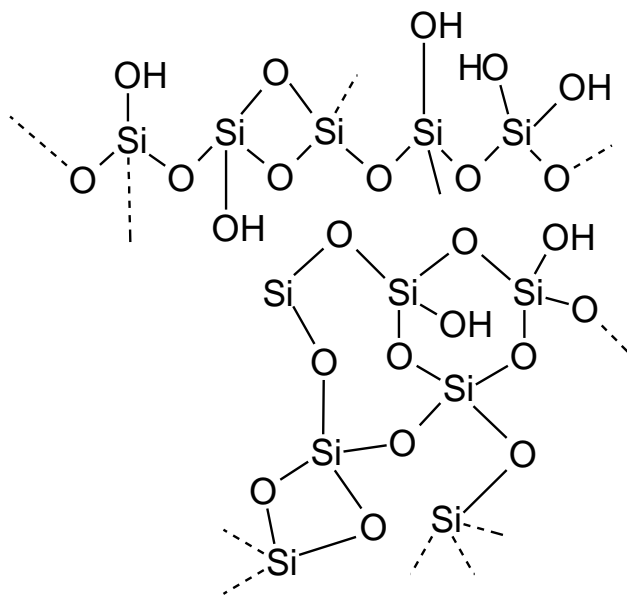
#### **3.4.1. EL gel de sílice, materia prima de las fases actuales.**

Excepto por algunas nuevas fases constituidas por polímeros orgánicos, el gel de sílice es el material básico para el relleno de las columnas de HPLC. Este gel de sílice para la cromatografía no tiene nada que ver con el sílice natural cristalino ( $\text{SiO}_2$ ) que sirve de materia prima para su elaboración.

Su preparación bajo forma de microesferas de un diámetro tan constante como posible, del orden de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , se derivan de procesos delicados de polimerización en emulsión de tetraetoxilano bajo el efecto de una hidrólisis controlada. Se forma un *sol-gel* cuyas más pequeñas partículas deben crecer regularmente para alcanzar un diámetro de algunos micrómetros. Este material debe estar exento de todo ión metálico. Los granos deben ser de dimensión regular a fin de evitar la existencia de caminos o vías preferenciales en la columna.

El gel de sílice amorfo corresponde a una red tridimensional, del cual emergen a la superficie del material, *grupos silanoles* en número variable, formados en el curso de la fase final de preparación. Este gel no tiene más la estructura ordenada del sílice cristalino que sirvió para su elaboración, pero permanece sin embargo construido alrededor de una base tetraédrica del átomo del silicio. Una parte de los átomos de oxígeno forma puentes entre las cadenas de ácido polisilícico. Este es un polímero inorgánico, a la imagen de un polímero orgánico reticulado. Su

estructura es difícil a representar. La concentración de las funciones Sinaloa puede ser establecida por RMN en estado sólido del  $^{29}\text{Si}$ .



**Figura 7. El gel de sílice para cromatografía. Representación de la superficie del gel.**

La calidad del gel de sílice depende de varios parámetros entre los cuales se encuentra, ***estructura externa, el tamaño de los gránulos, la resistencia al quebrado y la polaridad.***

Los geles de sílice comunes en HPLC están constituidos de granos esféricos (diámetro de 2 a 5  $\mu\text{m}$ ), resistentes a un quebrado bajo una presión de 1 000 bars y poseyendo aproximadamente 5 grupos silanoles por  $\mu\text{m}^2$ . La superficie específica es de aproximadamente 350  $\text{m}^2/\text{g}$ , con poros de 10 nm (volumen total de poros 0.7 ml/g).

El gel de sílice es un material muy polar. Los grupos silanoles son responsables de las propiedades catalíticas ácidas de este material (el pKa de Si – OH es comparable al del fenol). Su mecanismo de acción se basa sobre la adsorción, fenómeno que consiste en la acumulación de un compuesto en la interfase entre dos fases. En los casos más simples, hay la formación de una monocapa (isoterma de Langmuir), aunque frecuentemente se crea también una atracción entre las moléculas ya adsorbidas y las que están en solución. Es la razón principal de la asimetría de los picos de elusión. Aunque teniendo una capacidad de adsorción elevada, y que permite de tener buenas resoluciones, es poco utilizado más que el

análisis. Para muchas aplicaciones debe ser parcialmente hidratado (3-8% de agua) para desactivarlo.

### **3.4.2. Los sílices injertados.**

El gel de sílice evoluciona en el curso del tiempo, lo que conlleva a una falta de reproducibilidad de las separaciones. Para remediar este problema y disminuir su polaridad frecuentemente excesiva, aprovechamos la reactividad de las funciones silanoles presentes para fijar moléculas orgánicas por enlaces covalentes. La fase estacionaria injertada se comporta como un líquido, la separación pone en juego los *coeficientes de partición* y no los *coeficientes de adsorción*. Estas fases injertadas, cuya polaridad puede ser ajustada con una gran flexibilidad, son el origen de la *Cromatografía de partición a polaridad inversa*, utilizada en casi todos los análisis por HPLC.

Entre las transformaciones más clásicas del gel de sílice, encontramos la reacción de los alquilclorosilanos, en presencia de un agente básico. Es así que podemos obtener las fases **RP-8** (grupos dimetiloctisilano), **RP-18** o ODS (grupos dimetiloctadecilano). Aproximadamente la mitad de los grupos silanoles presentes están injertados. Con el clorotrimetilsilano ( $\text{ClSiMe}_3$ ) o el hexametildisilano ( $\text{Me}_3\text{SiNHSiMe}_3$ ), la reacción es más completa. Los sitios no transformados no tienen consecuencias dañinas, siendo que son inaccesibles al reactivo, y ellos también lo serán para los analitos. El empleo de di- o triclorosilanos, en presencia de vapor de agua, conduce a una capa polimérica reticulada, hidrofoba.

Al lado de las fases injertadas que llevan cadenas lineares de 8 o 18 átomos de carbono del tipo alquil, utilizables de pH 2 a pH 13, existe otras cuyas cadenas son portadoras de funciones (grupos aminopropilo, cianopropilo, bencilo o fases mixtas) que confieren una cierta polaridad al conjunto. Las separaciones de azúcares por ejemplo se vuelven posibles con cadenas aminoalquilas.

Existe aún más otras fases a base de gráfita o de polímeros estireno/divinilbenceno o hidroximetilestireno no injertadas. Toda una ciencia química de estas interfases se ha desarrollado para llevar a las fases híbridas entre las fases actuales de la HPLC y de la Cromatografía Iónica.

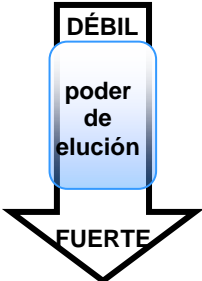
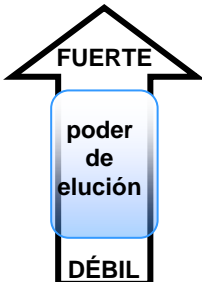
### **3.5. FASES MÓVILES.**

La interacción más o menos fuerte entre la fase móvil y la fase estacionaria *normal* o a *polaridad inversa* repercute sobre los tiempos de retención de los solutos. La polaridad de la fase estacionaria permite distinguir dos situaciones de principio:



- Si la fase estacionaria es *polar*, utilizaremos una fase móvil *poco polar*. La cromatografía es denominada EN FASE NORMAL.
- Si la fase estacionaria es *muy poco polar*, seleccionaremos una fase móvil *polar* (lo más frecuente son las mezclas de metano o de acetonitrilo con el agua). A esta cromatografía se le denomina CROMATOGRAFÍA DE FASE INVERSA (RP) o CROMATOGRAFÍA HIDROFOBA.

Modificando la polaridad de la fase móvil, actuamos sobre los factores de retención  $k$  de los compuestos.

fase de polaridad normal	solventes clasificados por polaridad creciente	Fase a polaridad inversa
 <p>DÉBIL poder de elución FUERTE</p>	<p>hexano tolueno triclorometano diclorometano éter acetato de etilo acetonitrilo metanol agua</p>	 <p>FUERTE poder de elución DÉBIL</p>

**Figura 8. Fuerza de los solventes utilizados como fases móviles. Podemos, al mezclar diferentes solventes, ajustar el poder de elución de la fase móvil.**

Del anterior cuadro podemos sacar las siguientes conclusiones:

Para las fases normales de sílice o con injerto polar:

- Utilizaremos eluantes poco polares como, hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, etc.). **i No utilizar agua !**
- Entre más polar es un solvente, mayor es su fuerza de elución.
- No es aconsejable para moléculas muy polares.
- Es recomendable la utilización de un gradiente con una polaridad creciente.

Con fases de sílice injertadas con polaridad inversa:

- a) Utilizaremos eluantes polares como por ejemplo, acetonitrilo, agua, metanol, etc.
- b) Los compuestos polares son eluidos antes que los compuestos apolares.
- c) Un aumento de la polaridad de la fase móvil (por ejemplo el aumento del contenido de agua) aumenta la retención.
- d) Entre más polar es el solvente, menor es fuerza eluante.
- e) Se recomienda un gradiente de polaridad decreciente.

En la selección de la mejor fase móvil es necesario tener en cuenta que ***los solventes polares disuelven preferentemente los solutos polares***. De tal manera que debemos estar seguros de solubilizar todas las sustancias que contiene la muestra. Para esto es necesario hacer pruebas de solubilidad para estar seguros que la muestra se diluye satisfactoriamente en la fase móvil.

Las características de la fase móvil deben por regla general ser las siguientes:

- Grado HPLC
- Solubilidad con la muestra
- Compatibilidad con la columna
- Compatibilidad con el detector
- Polaridad
- Miscibilidad
- pH
- Viscosidad

El poder eluante de un líquido, es decir, su capacidad de *arrastrar* compuestos polares en un sistema cromatográfico, depende de su propia polaridad (existencia de dipolos en una estructura molecular). Por esta razón, los líquidos se clasifican en orden creciente de su polaridad. Esta clasificación se denomina *serie elutrópica*. En la serie elutrópica que se presenta en el siguiente cuadro, los hidrocarburos alifáticos son los compuestos menos polares y el ácido etanoico es el más polar. Podemos ampliar indefinidamente el número de compuestos de una serie haciendo mezclas de disolventes en proporciones variadas, lo que permite obtener una polaridad del eluante bien definida.

## Cuadro 2. Serie elutrópica de disolventes.

Éter de petróleo	<b>Poder eluante creciente</b>  ↓
Ciclohexano	
Tetraclorometano	
Tricloroetano	
Tolueno	
Benceno	
Diclorometano	
Éter dietílico	
Triclorometano	
Etanoato de etilo	
Piridina	
Propanona	
Propanol - 1	
Etanol	
Metanol	
Agua	
Ácido metanoico	

## 4. CROMATOGRAFÍA QUIRAL.

Si se cromatografía sobre una fase estacionaria quiral un compuesto puro que posee un cuerpo asimétrico y en cual los dos enantiomeros R y S están presentes, observamos dos picos cuyas áreas son proporcionales a la abundancia de cada una de las dos formas. La pureza óptica representa el exceso enantiomérico (e.e.), calculado a partir de la siguiente relación donde  $S_R$  y  $S_S$  designan las áreas de los picos de los enantiomeros:

$$\text{PUREZA OPTICA (e.e.\%)} = 100 [S_R - S_S / S_R + S_S]$$

Diferentes tipos de columnas quirales existen. Las columnas de Pirkle contienen un soporte de sílice recubierto de un injerto aminopropilo que sirve el mismo a fijar un derivado de la D-fenilglicina. Estas fases son poco estables y el factor de selectividad se encuentra muy próximo a 1. Se utiliza ahora de resinas ópticamente activas o de geles de sílice sobre las cuales han sido injertadas generalmente ciclodextrinas (oligosacaridos) por la intermediación de un "brazo" de algunos átomos de carbono. Estas moléculas de forma cilíndrica presentan una cavidad

hidrófoba mientras que la pared externa es hidrófila. Tienen la particularidad de permitir la inclusión selectiva de una gran variedad de compuestos que forman diastereoisómeros en la superficie de la fase quiral, bajo la forma de complejos reversibles.

## **5. PRINCIPALES DETECTORES.**

El análisis por cromatografía líquida tiene raramente por objetivo determinar la composición total de la muestra, sino más bien de conocer con precisión la concentración de una especie presente, por la que seleccionamos un detector bien adaptado. El detector universal no es entonces indispensable en el análisis cuantitativo. Incluso puede ser una desventaja para la legibilidad del cromatograma. Es por lo anterior, frecuentemente las áreas relativas de los picos de un cromatograma no tienen ninguna relación con la composición molar o másica de la mezcla analizada.

De cualquier modo, el detector debe reunir un cierto número de cualidades: dar una respuesta proporcional a la concentración instantánea másica, ser sensible, tener una débil inercia, ser estable en el tiempo y tener poco ruido de fondo.

Los modos de detección más explotados en vistas a obtener el cromatograma, se basan en las propiedades ópticas de los compuestos: absorción, fluorescencia y el índice de refracción.

### **5.1. DETECTORES ESPECTROFOTOMETRICOS.**

Se mide permanentemente la absorbancia de la fase móvil a la salida de la columna, a una o varias longitudes de onda dentro del espectro UV/visible. Para poder detectar los compuestos presentes, la fase móvil no debe, o muy poco, absorber ella misma.

#### **5.1.1. DETECCIÓN MONOCROMÁTICA.**

El modelo básico se compone de una fuente de deuterio o de vapor de mercurio, de un monocromador para aislar una banda estrecha (10 nm) o una raya (ejem., la raya 254 nm del Hg), de una célula de circulación de un volumen de algunos  $\mu\text{l}$  (trayecto óptico de 0.1 a 1 cm) y de un medio de detección óptico. Este es un ejemplo de detector selectivo: la intensidad de la absorción depende del coeficiente de absorción molar, lo que hace imposible el cálculo de las concentraciones de las especies detectadas por una medida directa de las áreas de los picos que no tomarían en cuenta de estos coeficientes de absorción específicos.

Para los compuestos que no poseen espectro de absorción explotable, se hace uso de la "derivación" de los analitos.

### **5.1.2. DETECCIÓN POLICROMÁTICA.**

Los detectores más perfeccionados permiten, ya sea de cargar de longitud de onda en curso del análisis, o de registrar la absorbancia a diferentes longitudes de onda simultáneamente. Estos detectores permiten no solamente obtener un cromatograma, sino proporcionan informaciones espectrales que pueden servir a la identificación de los compuestos. Lo que se denomina el *análisis de certitud*.

Es también posible captar todo un dominio de longitudes de onda sin interrumpir la circulación de la columna. Para esto, se dispone en todo momento del espectro UV de la fase móvil en curso, un medio útil para asegurarse de la identidad de los compuestos separados. Estos detectores son utilizables en modo de gradiente de elusión.

### **5.2. DETECTOR ESPECTROFLUOROMETRICO.**

Ciertos compuestos son fluorescentes, es decir que remiten, bajo forma de luz toda o una parte de la radiación de la fuente de excitación, de la cual son sometidos. En la práctica, la fluorescencia es observada en una dirección perpendicular a la dirección de la excitación. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de la sustancia a condición sea baja. Es un detector muy sensible y selectivo, su dominio de aplicación puede ser ampliado por el proceso de derivación antes o después de inyección (a la salida de la columna).

### **5.3. DETECTOR REFRACTOMÉTRICO.**

El principio se basa en las leyes de Fresnel de transmisión de la luz en los medios transparentes cuyo índice de refracción es  $n$ . Esquemáticamente, un rayo luminoso (mono- o policromático) pasa a través de una célula que se compone de dos compartimientos donde uno de ellos está lleno solo de eluante y el otro con la fase móvil a la salida de la columna. La diferencia del índice entre los dos líquidos, que aparece cuando un compuesto es mezclado al eluante, se traduce por un desplazamiento angular del rayo refractado. En la práctica, la señal corresponde a la medida en continuo de la retroacción que es necesario proporcionar a un elemento óptico para compensar el desplazamiento del rayo reflejado.

Este detector considerado como casi universal es frecuentemente utilizado, en modo isocrático, de manera conjunta al detector UV al lado al cuales instalado para proporcionar un cromatograma complementario. Es muy poco sensible y debe

estar regulado en su temperatura (0.1°C) así como la columna. Conduce a picos negativos o positivos, lo que impone una regla de línea de base a la mitad de la altura de la gráfica. Puede ser utilizado solo en modo isocrático. En efecto, en gradiente de elusión, la composición de la fase móvil evoluciona en el curso del tiempo así como su índice, donde una derivada de la línea de base. La compensación, fácilmente obtenida en el caso de un eluante en cabeza de la columna difiere de la que sale.

#### **5.4. OTROS DETECTORES.**

La identificación de un compuesto de acuerdo a su solo tiempo de retención es algunas veces aleatoria. Esta exige que dispongamos para poder hacer una inyección testigo.

Como ya ha sido señalado para la CFG, los detectores más perfeccionados, que dan informaciones complementarias sobre los productos eluidos de la columna, pueden estar igualmente instalados a la salida de la columna. Entre ellos figuran los detectores de masas, o diversos tipos de espectrofotómetros que pueden jugar el rol de detectores clásicos (obtención del cromatograma) y de herramientas de identificación de las especies separadas. En este ámbito, el acoplamiento HPLC /RMN  $^1\text{H}$ , por mucho tiempo considerado como utópico, se ha vuelto una realidad por consecuencia del progreso en la miniaturización de las sondas y del acrecentamiento de la sensibilidad de los aparatos.

Las ventajas actuales de los aparatos de altos campos permiten obtener espectros sobre cantidades del orden de  $\mu\text{g}$ . En estas condiciones, la instalación en el seno del aparato de una célula de circulación de algunos decenas de  $\mu\text{l}$  en la que pasa la fase móvil a la salida de la columna permite obtener los espectros de los compuestos eluidos. Se opera con un pequeño gasto de fase móvil ( $\text{D}_2\text{O}$  y  $\text{CD}_3\text{CN}$ ), o si es posible en modo *stop-flow*, es decir que paramos momentáneamente el gasto de la columna, para dejar al aparato el tiempo de adquirir un buen espectro. Este método que exige una material muy costoso está aún reservado al estudio de compuestos muy inestables para ser aislados por las vías clásicas.

#### **6. ALGUNAS APLICACIONES.**

Siendo como es el campo inmenso de aplicación de esta técnica, se utiliza en todos los sectores: industrias químicas y paraquímicas, agro-alimentaria, ambiente, farmacia, bioquímica. Para mostrar a guisa de conclusión que el campo de aplicación de una técnica no está jamás cerrado, citaremos tres campos actuales:

- Control de la pureza óptica de las moléculas terapéuticas,
- Análisis de residuos y trazas en el campo ambiental,

- Seguimiento de las concentraciones de los compuestos citotóxicos (quimioterapia anticancerosa).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Chavanne, M., Jullien, A., Beaudoin, G.J. y Flamand, E. 1991. **Chimie organique expérimentale**. Ed. Belin. Canada.
2. Rouessac, F., y Rouessac, A. 1995. **Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes**. 3<sup>e</sup>. Edición. Ed. MASSON. Paris, Francia.