

Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC)

Fernando de J. Amézquita L.
Diana Mendoza O.

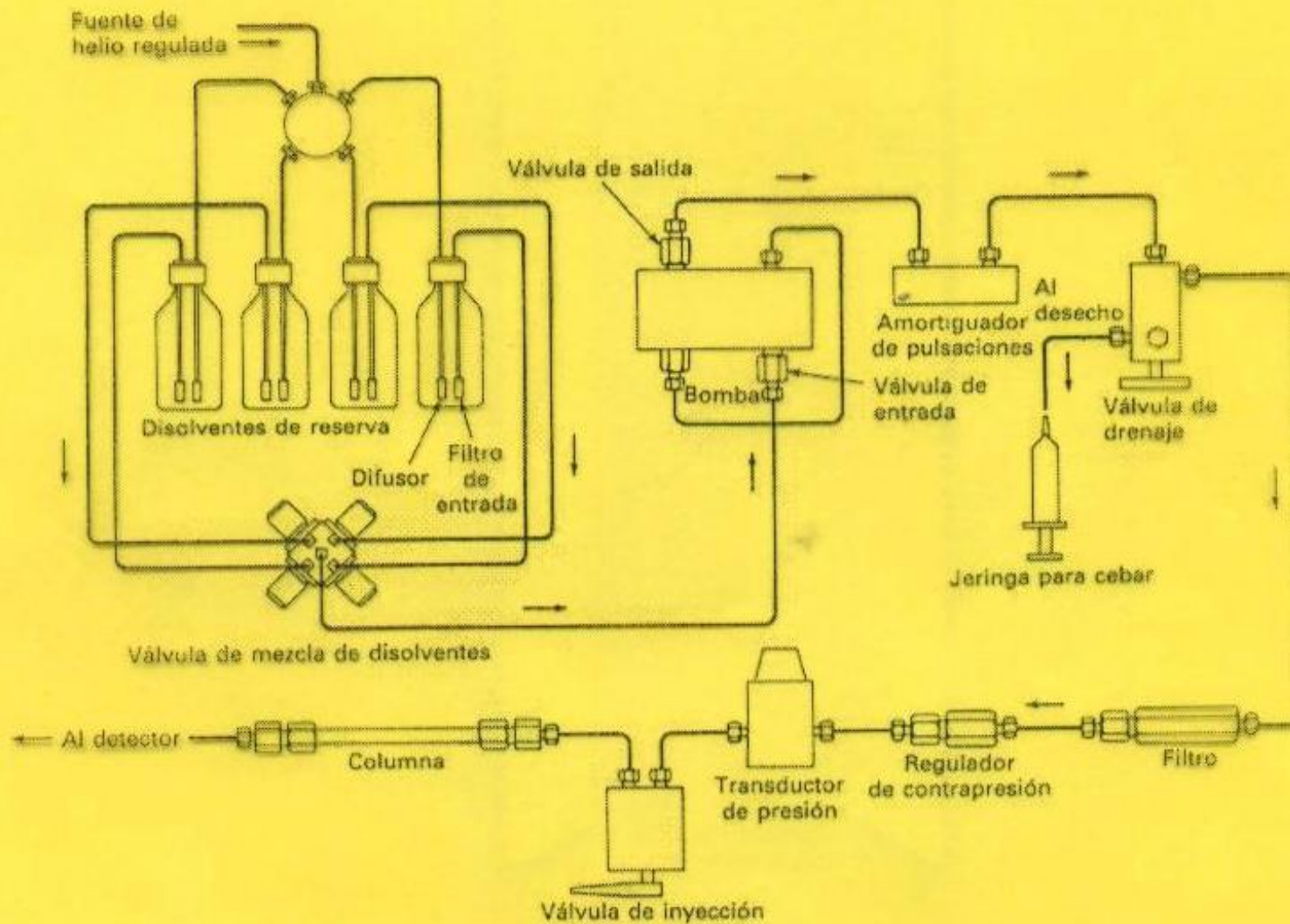


Universidad de Guanajuato

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas.

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico, está constituido básicamente por un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba, un medio de inyección, la columna de separación y el sistema de detección. Con objeto de alcanzar un flujo de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 2 μm y 10 μm , que, por otra parte, son comunes en la cromatografía moderna de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kg-fuerza por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía.

Un aparato moderno de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 mL a 1 000 mL de un disolvente. Los recipientes, a menudo se equipan con sistema para eliminar los gases disueltos –en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamientos de banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obturen la columna. Una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en filtrarlos a vacío a través de un filtro (*millipore*) de tamaño de poro muy pequeño. Este tratamiento elimina los gases, así como la materia en suspensión.





En cromatografía de líquidos el método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza *rizos* de muestra. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada del equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 μL a 500 μL . Con *rizos* de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7 000 psi con una precisión relativa de unas décimas por ciento. También existen válvulas de inyección de micromuestras, de *rizos* con volúmenes de 0,5 μL a 5 μL .

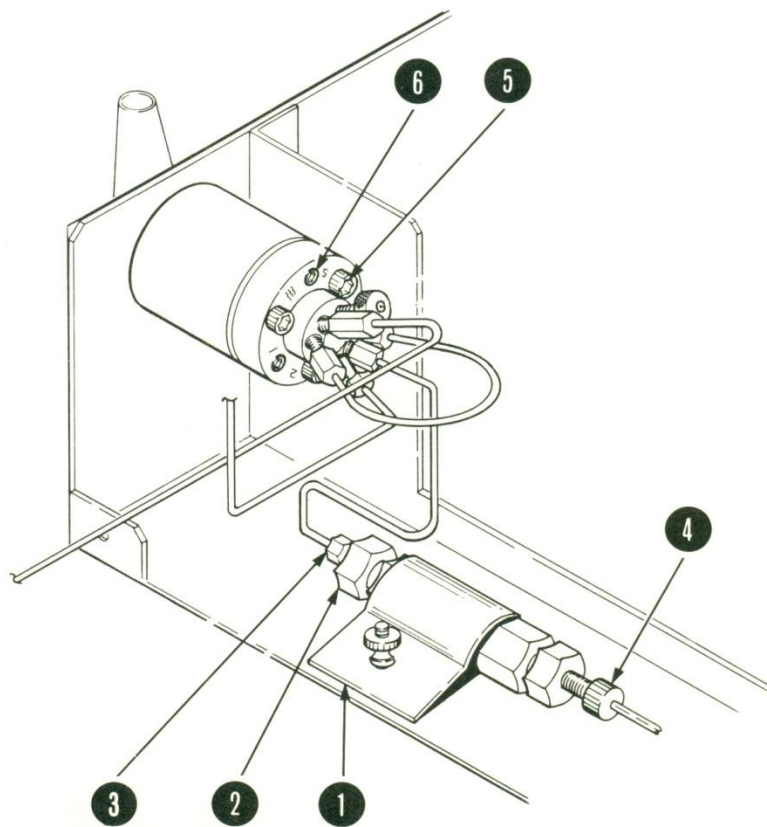
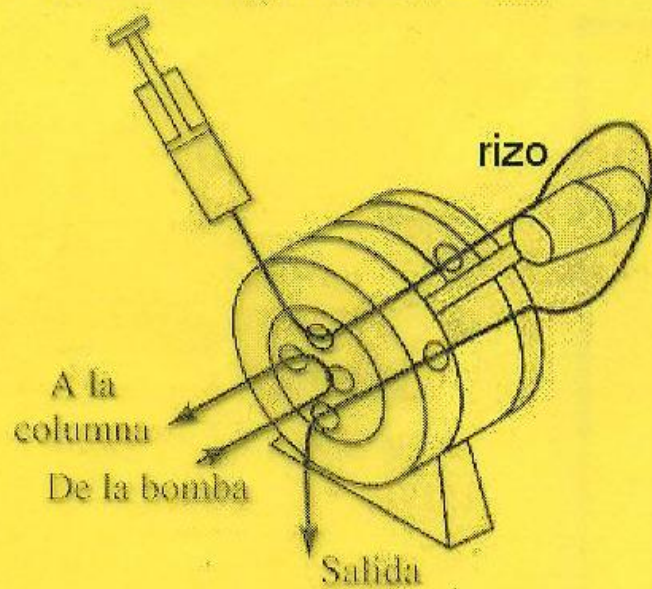
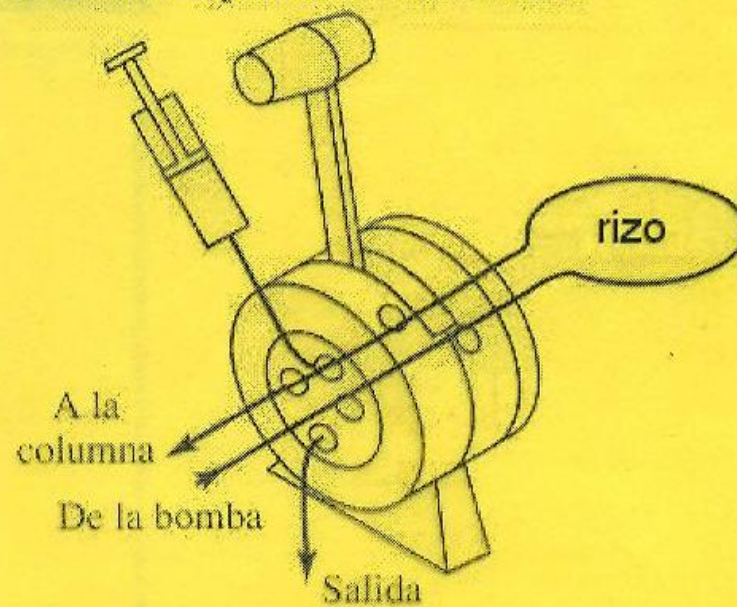


Figure 13: TriDet Detector Column

Posición de carga de la muestra



Posición de inyección de la muestra



Columnas

- Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes. Esta última sólo se utiliza a presiones menores de unos 600 psi.

Rellenos de Columnas

En cromatografía de líquidos se han utilizado dos tipos básicos de rellenos, *pelicular* y de *partícula porosa*.

El primero consiste en bolas de vidrio o de polímero, no porosas y esféricas con unos diámetros característicos de 30 μm a 40 μm . En la superficie de estas bolas se depositan una capa delgada y porosa de sílice, alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o de una resina de intercambio iónico. Para algunas aplicaciones se aplica un recubrimiento adicional, constituido por una fase estacionaria líquida que se mantiene fija por adsorción. Las bolas también se pueden tratar químicamente para obtener una capa superficial orgánica.

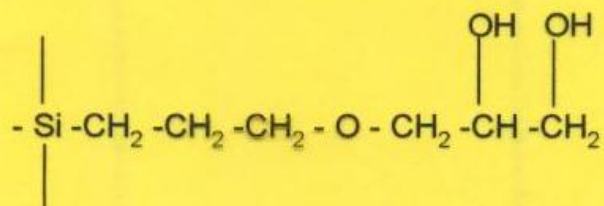
De partículas

Las partículas son de sílice, alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico, aunque la sílice es el material de relleno más común en cromatografía de líquidos. Las partículas de sílice se preparan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores a un micrómetro en unas condiciones tales que se forman partículas mayores con diámetros muy uniformes. Las partículas que resultan se recubren muchas veces con películas orgánicas, que se unen química o físicamente a la superficie.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Rellenos de columna

Las partículas de vidrio y de sílice porosas, que se comercializan actualmente, tienen tamaños promedio de poro que oscilan entre 4 nm y 250 nm. A fin de reducir la adsorción, las superficies de estas partículas se modifican por reacción con sustituyentes orgánicos. Por ejemplo, la superficie de un relleno hidrofílico tiene la estructura

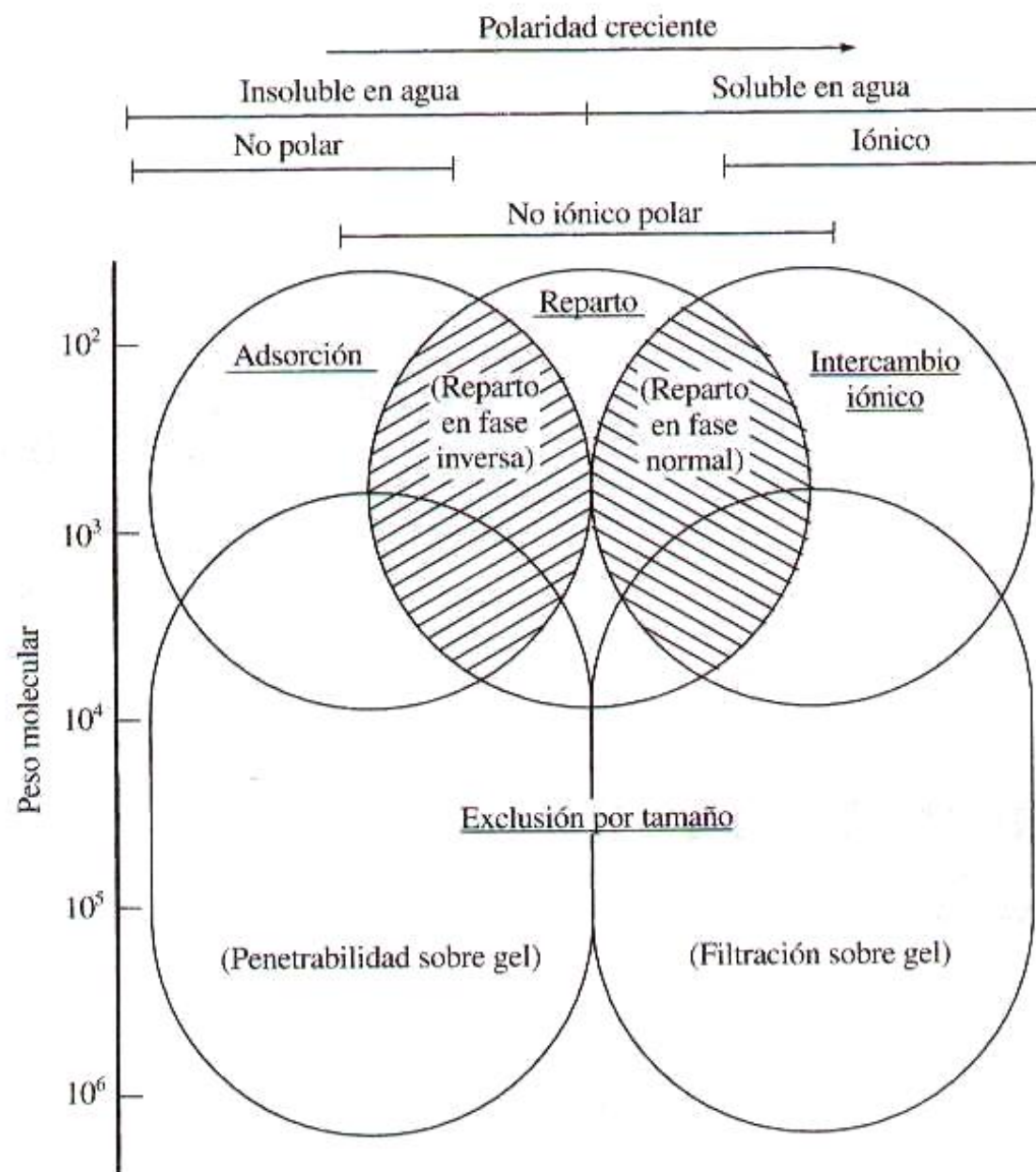


La Tabla 3.15 indica las propiedades de algunos rellenos comerciales típicos de la exclusión por tamaño.

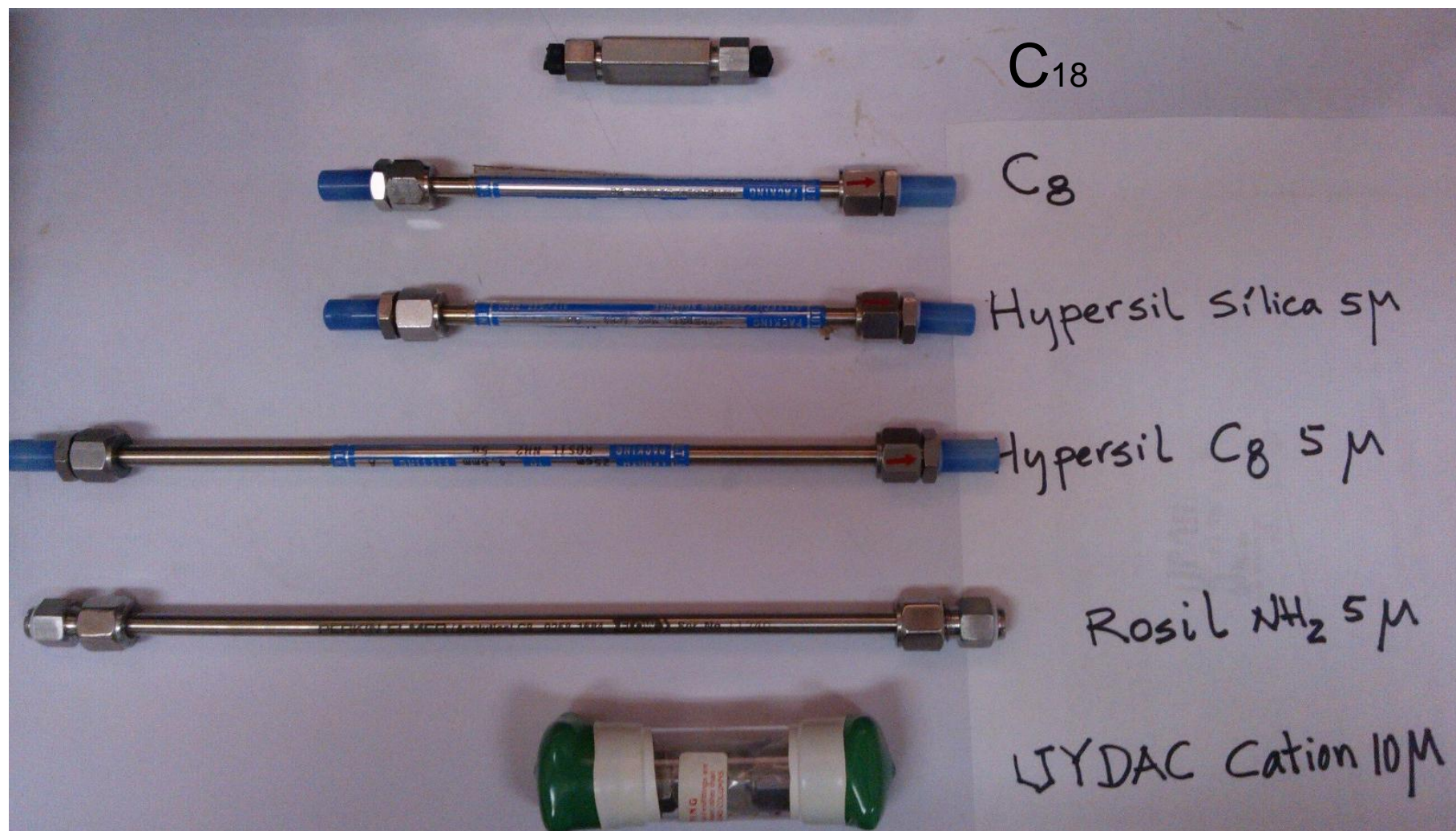
Tabla 3.15. Propiedades de los rellenos comerciales típicos para la cromatografía de exclusión por tamaño

| Tipo | Tamaño de Partícula, μm | Tamaño promedio de poro, Å | Límite de exclusión, en peso molecular* |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------|---|
| Poliestireno-divinilbenceno | 10 | 10^2 | 700 |
| | | 10^3 | $(0,1 \text{ a } 20) \times 10^4$ |
| | | 10^4 | $(1 \text{ a } 20) \times 10^4$ |
| | | 10^5 | $(1 \text{ a } 20) \times 10^5$ |
| | | 10^6 | $(5 \text{ a } > 10) \times 10^6$ |
| Sílice | 10 | 125 | $(0,2 \text{ a } 5) \times 10^4$ |
| | | 300 | $(0,03 \text{ a } 1) \times 10^5$ |
| | | 500 | $(0,05 \text{ a } 5) \times 10^5$ |
| | | 1 000 | $(5 \text{ a } 20) \times 10^5$ |

* Peso molecular por encima del cual no se produce la retención.



Tipos de columna



Detectores

Un detector de HPLC debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda. *Y en HPLC existe una gran versatilidad en el empleo de detectores; los hay de índice de refracción, ultravioleta de onda fija y variable, de fluorescencia, acoplados a espectrometría de masas, conductividad eléctrica, por mencionar algunos.*

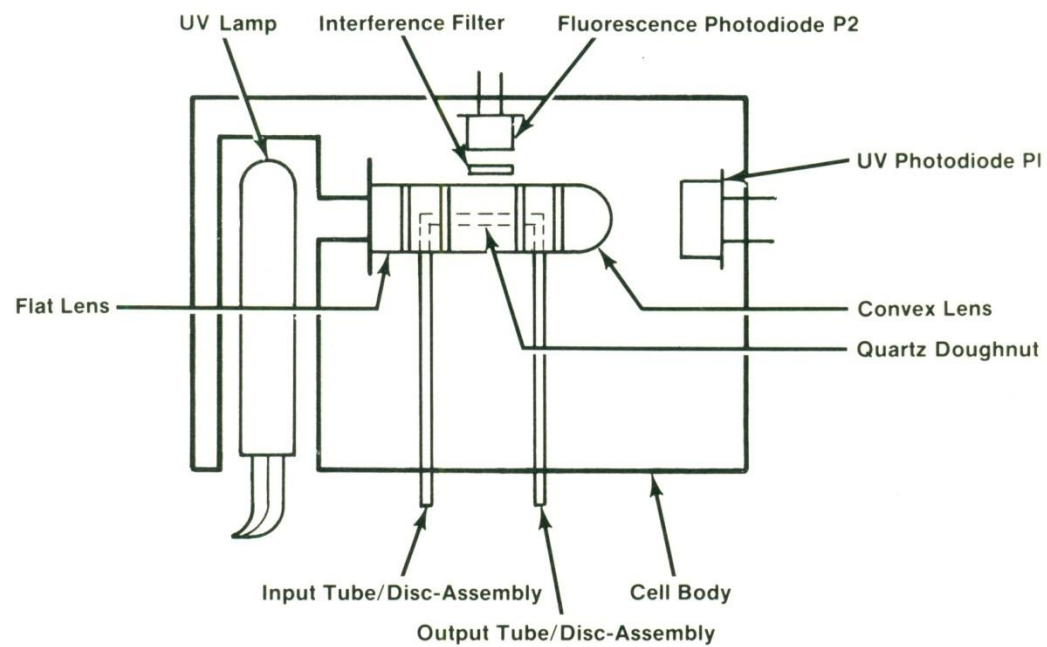
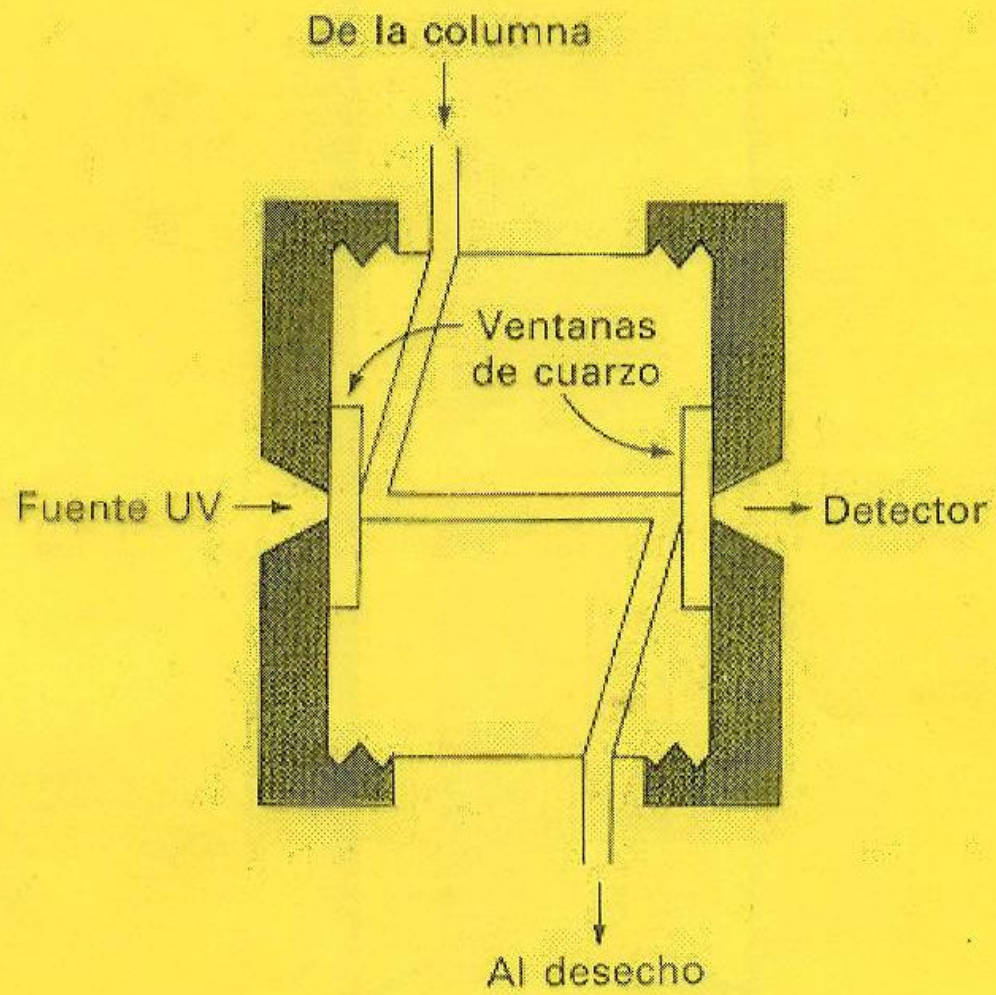
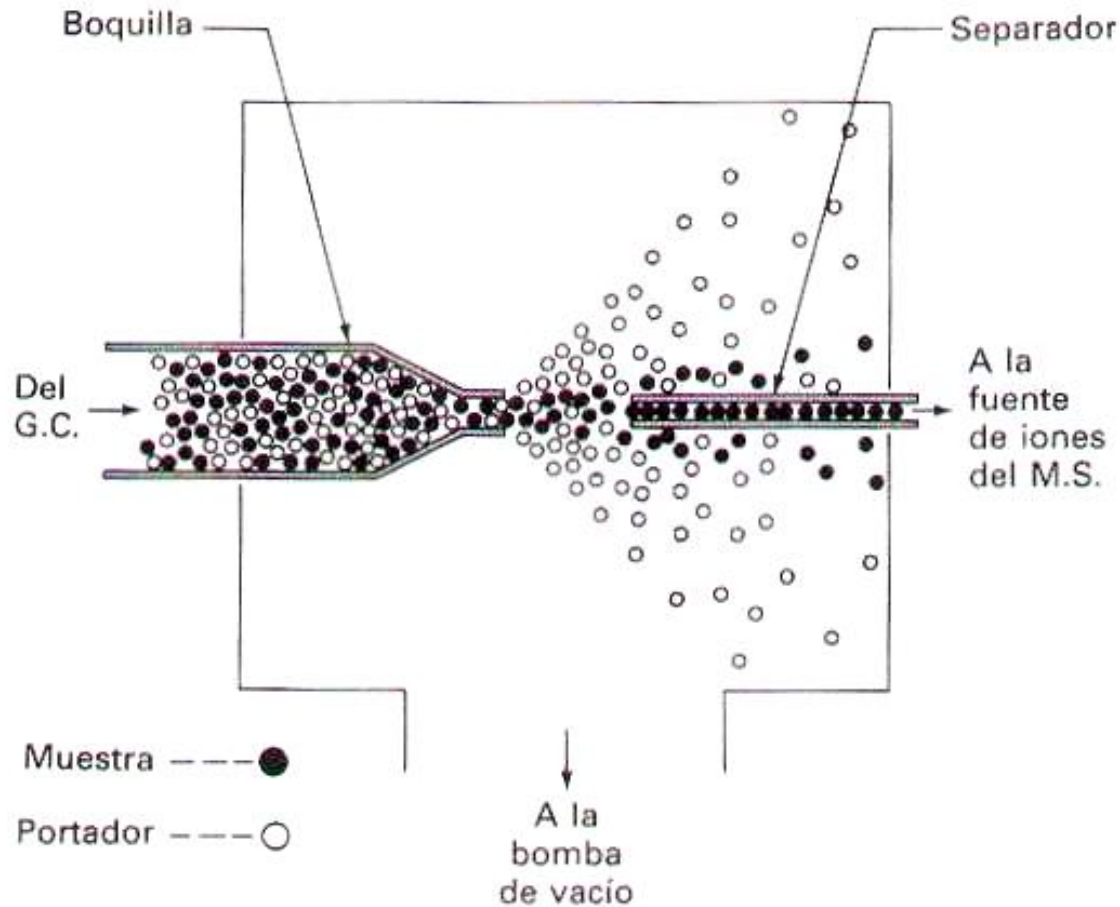


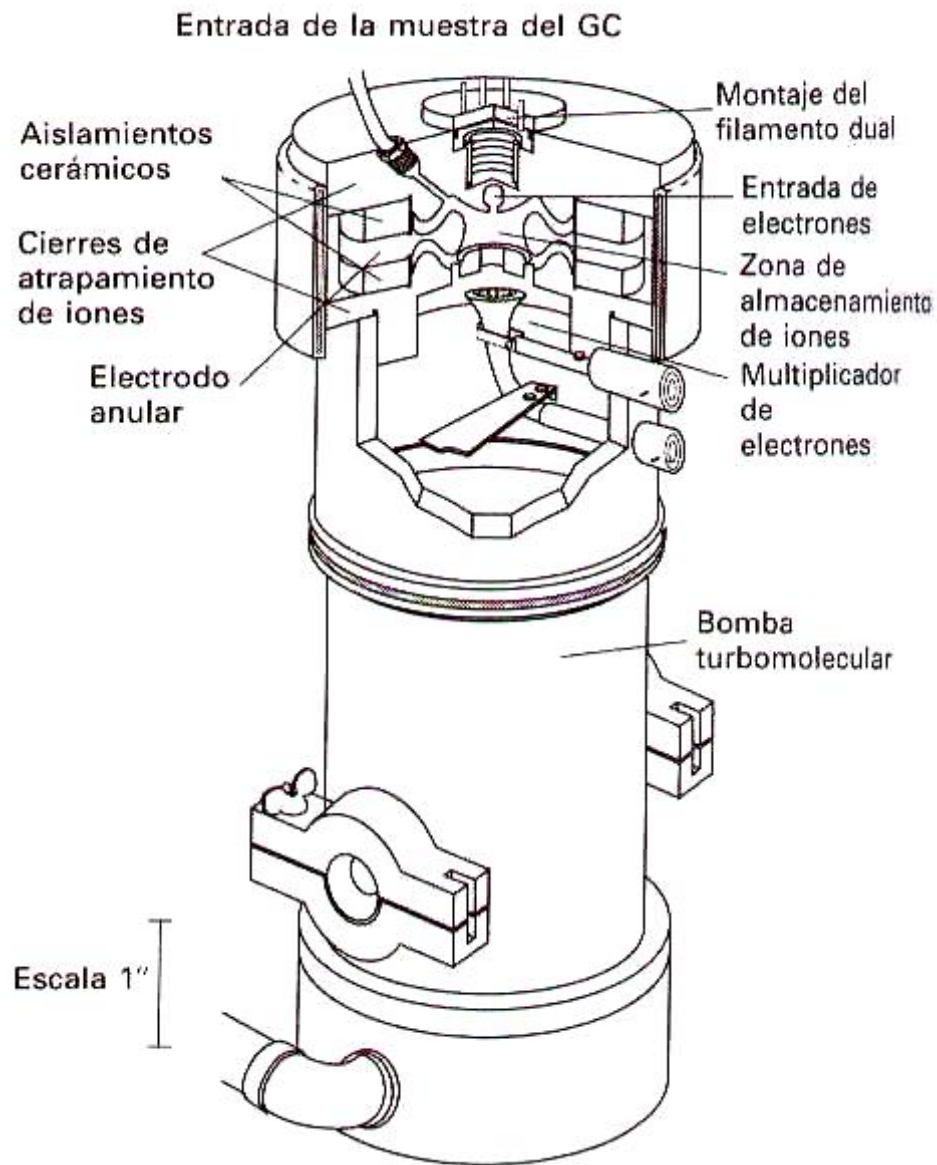
Figure 19: TriDet Detector Flowcell



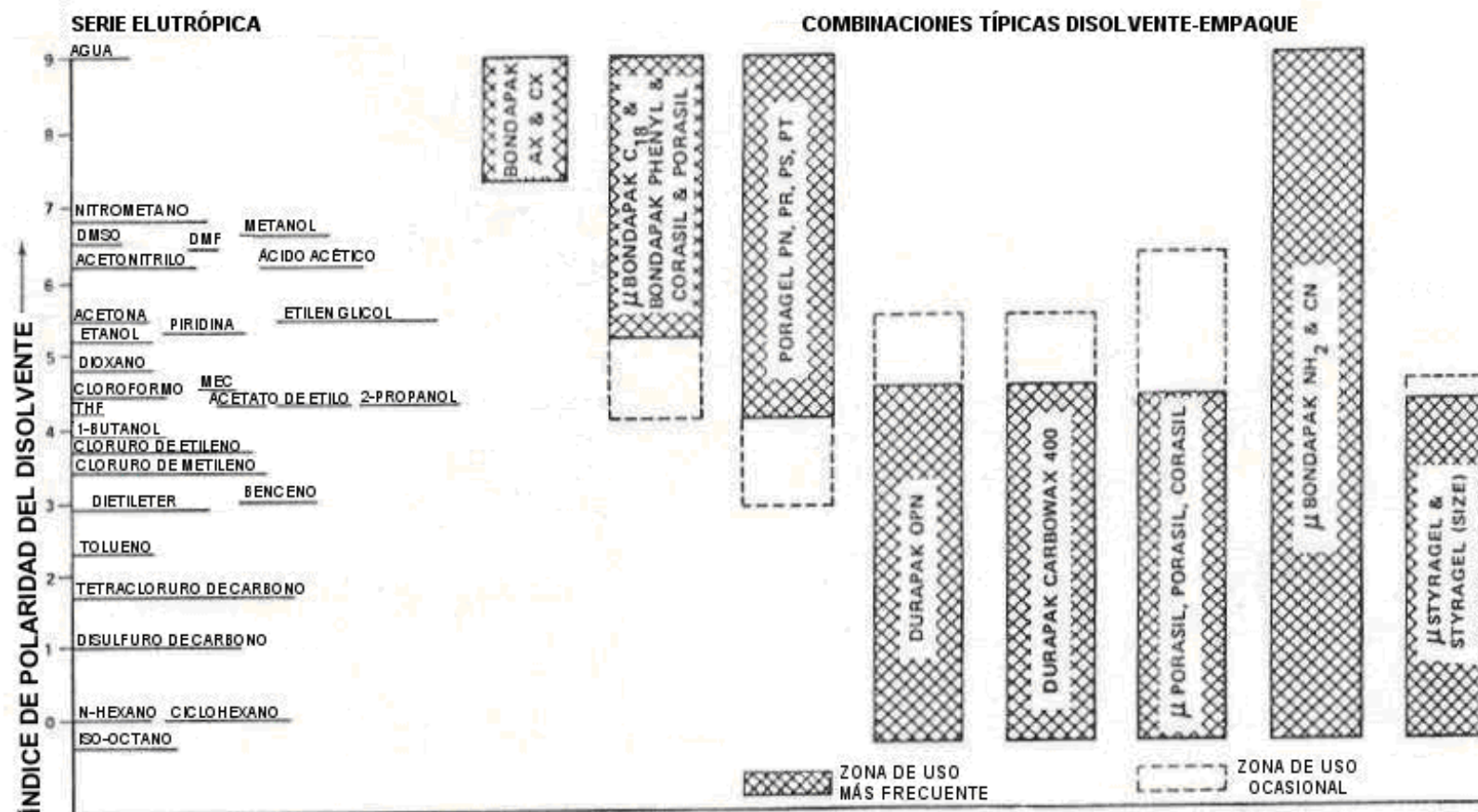
Esquema de un separador de chorro.



Esquema del detector de trampa de iones.



SERIE ELUTRÓPICA Y POLARIDADES DE LOS EMPAQUES DE COLUMNAS



Cromatografía de fase normal e inversa

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto.

Inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina; y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente apolar como el hexano o el *iso*-propiléter. Por razones históricas, a este tipo de cromatografía se le conoce ahora como *cromatografía en fase normal*. En la *cromatografía en fase inversa*, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol o el acetonitrilo).

Fase normal vs Fase inversa

| | FASE NORMAL | FASE REVERSA |
|---|-----------------------------|------------------------------|
| POLARIDAD DEL EMPAQUE | ALTA | BAJA |
| POLARIDAD DEL DISOLVENTE | BAJA A MEDIA | MEDIA A ALTA |
| ORDEN DE ELUCIÓN DE LA MUESTRA | MENOS POLAR PRIMERO | MÁS POLAR PRIMERO |
| EFFECTO DE INCREMENTO DE LA POLARIDAD DE L DISOLVENTE | REDUCE EL TIEMPO DE ELUCIÓN | AUMENTA EL TIEMPO DE ELUCIÓN |

Tabla 3.13. Propiedades de las fases móviles cromatográficas más comunes

| Disolvente | Índice de Refracción ^a | Viscosidad, cP ^b | Punto de Ebullición °C | Índice de Polaridad, P' | Fuerza Eluyente ^c , ϵ |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|---|
| Fluoroalcanos ^d | 1,27-1,29 | 0,4-2,6 | 50-174 | <-2 | -0,25 |
| Ciclohexano | 1,423 | 0,90 | 81 | 0,04 | -0,2 |
| <i>n</i> -Hexano | 1,372 | 0,30 | 69 | 0,1 | 0,01 |
| 1-Clorobutano | 1,400 | 0,42 | 78 | 1,0 | 0,26 |
| Tetracloruro de carbono | 1,457 | 0,90 | 77 | 1,6 | 0,18 |
| <i>iso</i> -Propileter | 1,365 | 0,38 | 68 | 2,4 | 0,28 |
| Tolueno | 1,494 | 0,55 | 110 | 2,4 | 0,29 |
| Dietileter | 1,350 | 0,24 | 35 | 2,8 | 0,38 |
| Tetrahidrofurano | 1,405 | 0,46 | 66 | 4,0 | 0,57 |
| Cloroformo | 1,443 | 0,53 | 61 | 4,1 | 0,40 |
| Etanol | 1,357 | 1,08 | 78 | 4,3 | 0,88 |
| Acetato de etilo | 1,370 | 0,43 | 77 | 4,4 | 0,58 |
| Dioxano | 1,420 | 1,2 | 101 | 4,8 | 0,56 |
| Metanol | 1,326 | 0,54 | 65 | 5,1 | 0,95 |
| Acetonitrilo | 1,341 | 0,34 | 82 | 5,8 | 0,65 |
| Nitrometano | 1,380 | 0,61 | 101 | 6,0 | 0,64 |
| Etilenglicol | 1,431 | 16,5 | 182 | 6,9 | 1,11 |
| Agua | 1,333 | 0,89 | 100 | 10,2 | Grande |

^a A 25 °C

^b El centipoise es una unidad típica de viscosidad; en unidades del SI, 1 cP = 1 mN . s . m⁻²

^c En Al₂O₃. Multiplicando por 0,8 se obtiene el ϵ^0 para la SiO₂.

^d Las propiedades dependen de la masa molecular. Se da un intervalo de datos.

Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina una *elución isocrática*. Con frecuencia, la resolución de la separación se aumenta notablemente por una *elución con gradiente*. En este caso se utilizan dos o tres sistemas disolventes con una polaridad significativamente distinta. Toda vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. Los instrumentos en la moderna HPLC a menudo están equipados con unos dispositivos que permiten introducir los disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo.

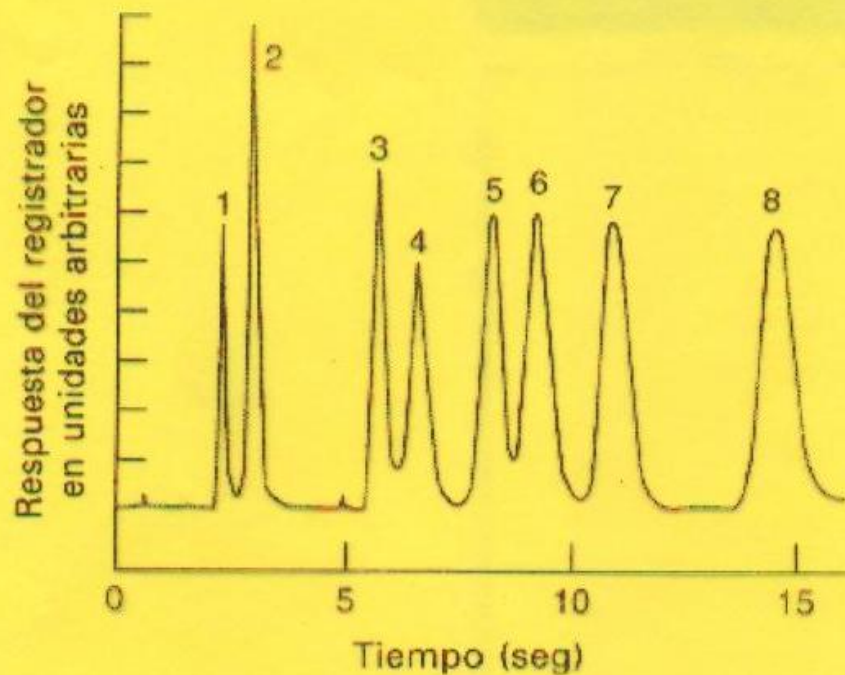


Figura 3.46. Separación isocrática de alta velocidad. Dimensiones de la columna: 4cm de longitud; 0,4 cm de d.i.; relleno: sperisorb de 3 μ m; fase movi: 4,1 por ciento de acetato de etilo en n-hexano. Compuestos: (1) p-xileno, (2) anisol, (3) acetato de bencilo, (4) ftalato de dioctilo, (5) ftalato de dipentilo, (6) ftalato de dibutilo, (7) ftalato de dipropilo, (8) ftalato de dietilo

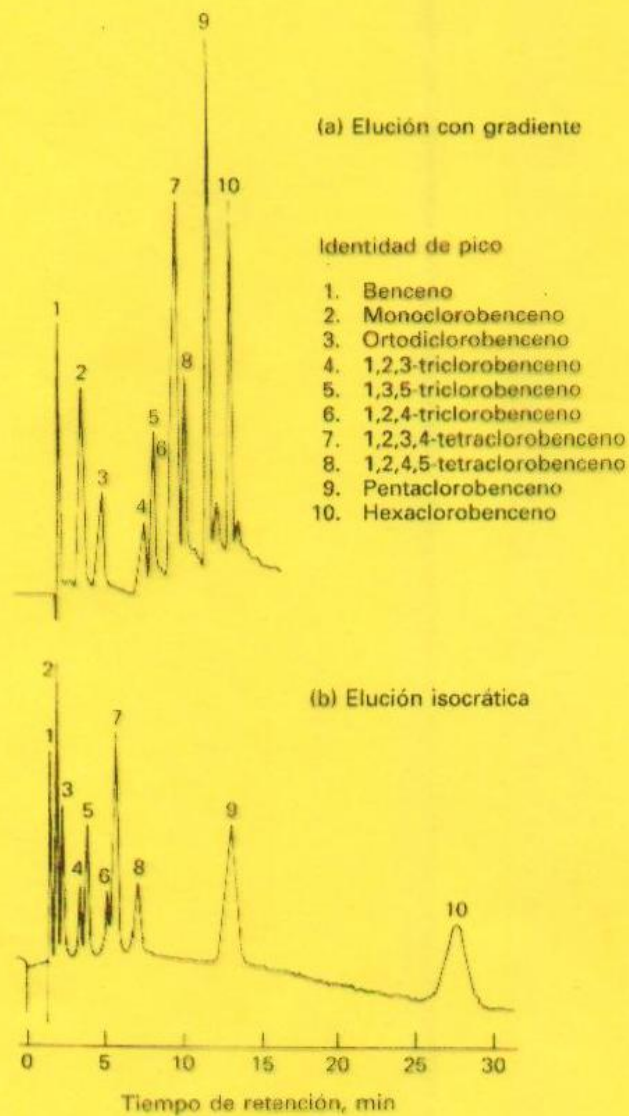


Figura 3.43. Mejora de la separación mediante la elución con gradiente. Columna: 1 m x 2,1 mm d.i. , de acero inoxidable con calibre de precisión; relleno: 1 por ciento de Permaphase[®] ODS. Muestra: 5 μ L de bencenos clorados en isopropanol. Detector: fotómetro de UV (254 nm). Condiciones: temperatura, 60 °C, presión 1 200 psi.

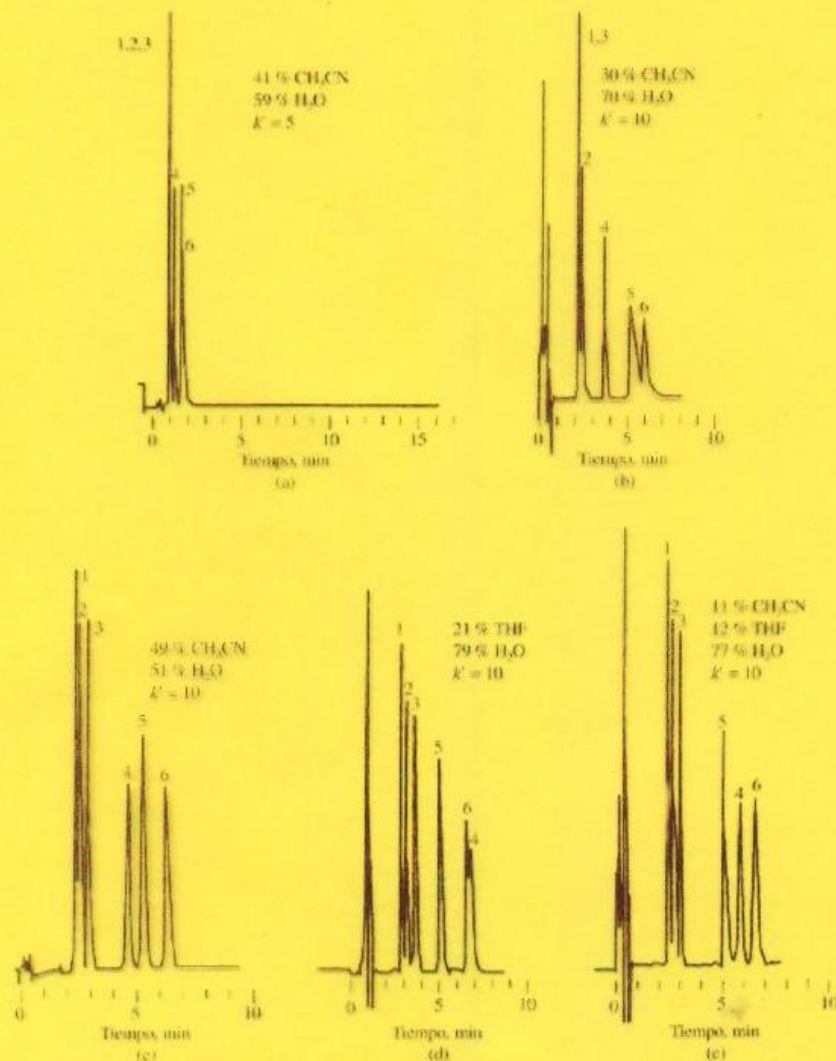


Figura 3.55. Metodología sistemática para la separación de seis esteroides. En (a) y en (b) se muestra el uso del agua para ajustar k' . Los efectos de la variación de α a k' constante se muestra en (b), (c) (d) y (e). Columna: 0,4 mm x 150 mm rellena con una fase inversa unida químicamente C₈ con partículas de 5 μ m. Temperatura: 50 °C. Flujo: 3,0 cm³/min. Detector: UV 254 nm. THF= tetrahidrofurano. CH₃CN= acetonitrilo. Compuestos: (1) prednisona; (2) cortisona; (3) hidrocortisona; (4) dexametasona; (5) corticosterona; (6) corticoexosolona.

Tabla 3.12. Sistemas para cromatografía de pares iónicos en fase inversa

| Muestra | Fase móvil | Contraion | Tipo de fase estacionaria |
|---------------------|--|--|---------------------------|
| Aminas | 0,1 M HClO ₄ /H ₂ O/acetonitrilo | ClO ₄ ⁻ | FUQ ^a |
| | H ₂ O/CH ₃ OH/H ₂ SO ₄ | C ₁₂ H ₂₅ SO ₃ ⁻ | FUQ |
| Ácidos carboxílicos | pH 7,4 | (C ₄ H ₉) ₄ N ⁺ | FUQ |
| | pH 7,4 | (C ₄ H ₉) ₄ N ⁺ | L ^b |
| Ácidos sulfónicos | H ₂ O/C ₃ H ₇ OH | (C ₁₆ H ₃₃)(CH ₃)N ⁺ | FUQ |
| | pH 7,4 | (C ₄ H ₉) ₄ N ⁺ | L ^b |
| | pH 3,8 | Bis-(2-etilhexil)fosfato | L ^c |
| Colorantes | pH 2-4; H ₂ O/CH ₃ OH | (C ₄ H ₉) ₄ N ⁺ | FUQ |

^a Fase unida químicamente (FUQ)^b 1-pentanol adsorbido (L)^c ácido bis-(2-etilhexil)fosfórico/CHCl₃ adsorbido (L)

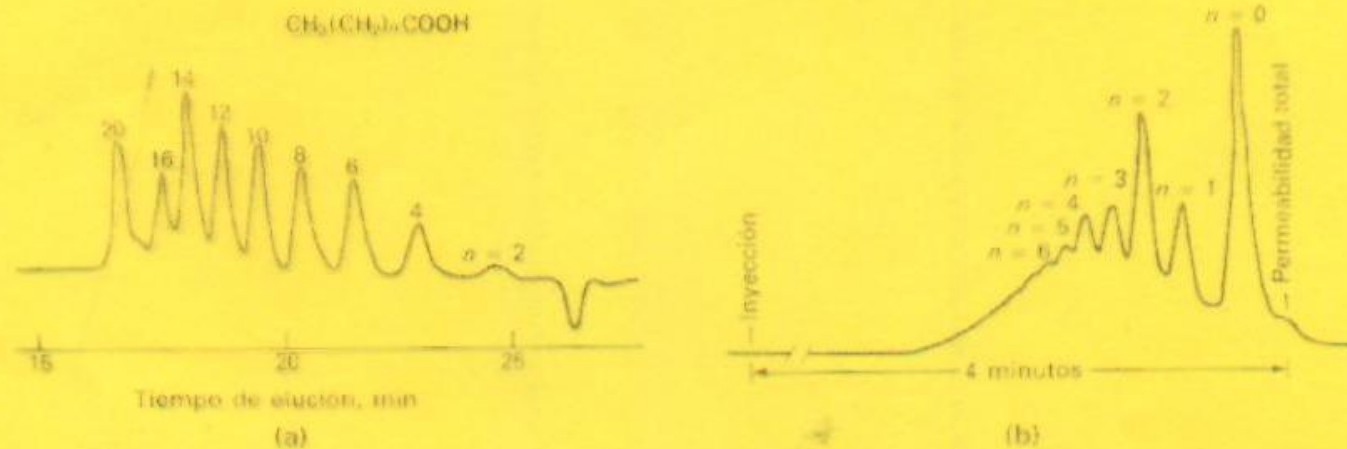


Figura 3.67. Aplicaciones de la cromatografía de exclusión por tamaño. (a) Separación de ácidos grasos. Columna: de poliestireno, de 7,5 x 600 mm, con un límite de exclusión por tamaño de 1×10^3 . Fase móvil: tetrahidrofurano. Flujo: 1,2 mL/min. Detector: índice de refracción. (b) Análisis de una resina epoxi comercial (n = número de unidades monoméricas en el polímero). Columna: de sílice porosa, 6,2 x 250 mm. Fase móvil: tetrahidrofurano. Caudal: 1,3 mL/min. Detector: absorción UV.

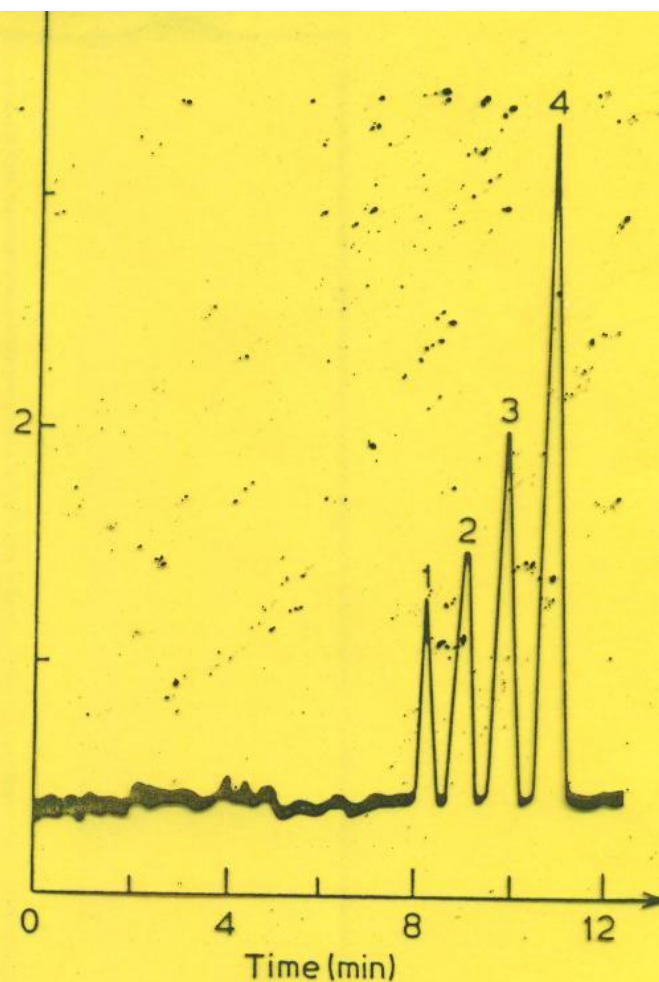


Fig. 16.4 Separation of aflatoxin standards. Column packing, μ Porasil ($10\ \mu\text{m}$); column dimensions, $300 \times 4\ \text{mm i.d.}$; eluent, water-saturated dichloromethane/methanol (99.4:0.6); flow rate, $1.05\ \text{ml min}^{-1}$; column temperature, $20^\circ\ \text{C}$; detection system, fluorimeter with cell filled with purified silica ($100\text{--}200\ \mu\text{m}$). Solutes: 1, aflatoxin B_1 ; 2, aflatoxin G_1 ; 3, aflatoxin B_2 ; 4, aflatoxin G_2 ($2.4\ \text{ng}$ of each). Reproduced with permission from reference 679.

High performance liquid chromatography

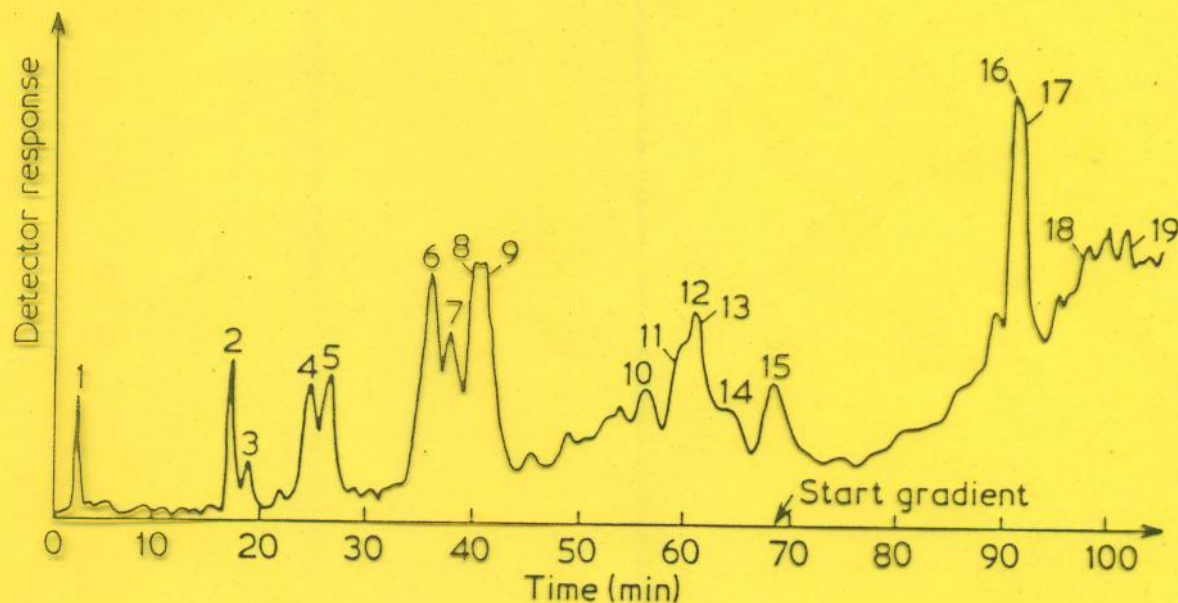


Fig. 16.5 Separation of polynuclear aromatic hydrocarbons in an air sample. Column packing, Zorbax ODS; column dimensions, 250 × 2.1 mm i.d.; eluent, methanol/water (65:35), gradient of 1 per cent methanol min⁻¹ initiated after 70 min; pressure, 1200 psi; flow rate, 0.21 ml min⁻¹; column temperature, 60° C; detection, UV at 254 nm. Solutes: 1, solvent; 2, phenanthrene; 3, anthracene; 4, fluoranthene; 5, pyrene; 6, triphenylene; 7, benzo[ghi]-fluoranthene; 8, chrysene; 9, benzo[a]anthracene; 10, benzo[j]fluoranthene; 11, benzo[b]fluoranthene; 12, benzo[e]pyrene; 13, perylene; 14, benzo[k]-fluoranthene; 15, benzo[a]pyrene; 16, benzo[ghi]perylene; 17, indeno[123-cd]pyrene; 18, anthanthrene; 19, coronene. Reproduced with permission from reference 760.

High performance liquid chromatography

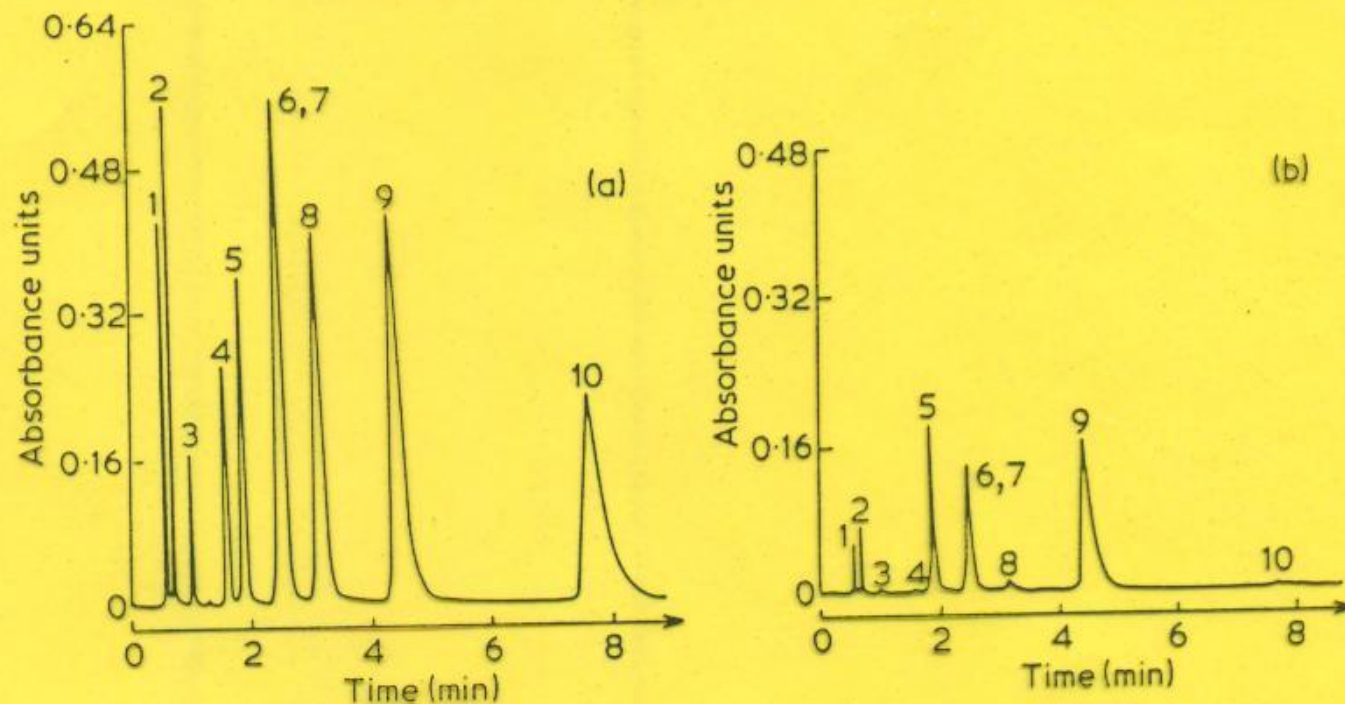
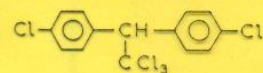


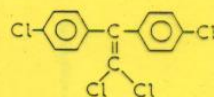
Fig. 16.2 Separation of chlorinated insecticides and related compounds. Column packing, LiChrosorb SI 60 (5 μm); column dimensions, 250 x 3 mm i.d.; eluent, dry hexane; flow rate, 4 ml min⁻¹; column temperature, 27° C; detection, UV at (a) 205 nm and (b) 254 nm. Solutes: 1, hexachlorobenzene; 2, decachlorobiphenyl; 3, aldrin; 4, heptachlor; 5, *p,p'*-DDE; 6, *o,p'*-DDE; 7, *o,p'*-DDT; 8, *p,p'*-DDT; 9, biphenyl; 10, *p,p'*-DDD. Reproduced with permission from reference 44.

High performance liquid chromatography

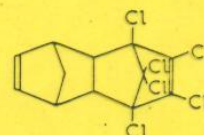
Chlorinated insecticides



p,p'-DDT

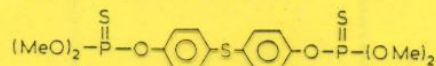


p,p'-DDE
(metabolite of DDT)

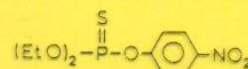


Aldrin

Organophosphorus insecticides

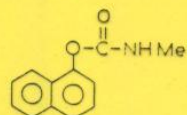


Abate

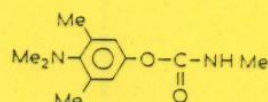


Parathion

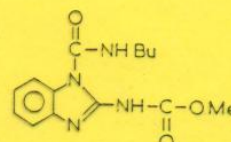
Carbamates



Carbaryl

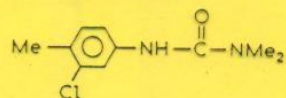


Zectran



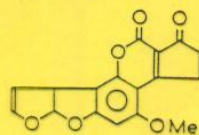
Benomyl

Substituted urea herbicide

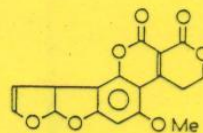


Chlortoluron

Carcinogens



Aflatoxin B₁



Aflatoxin G₁

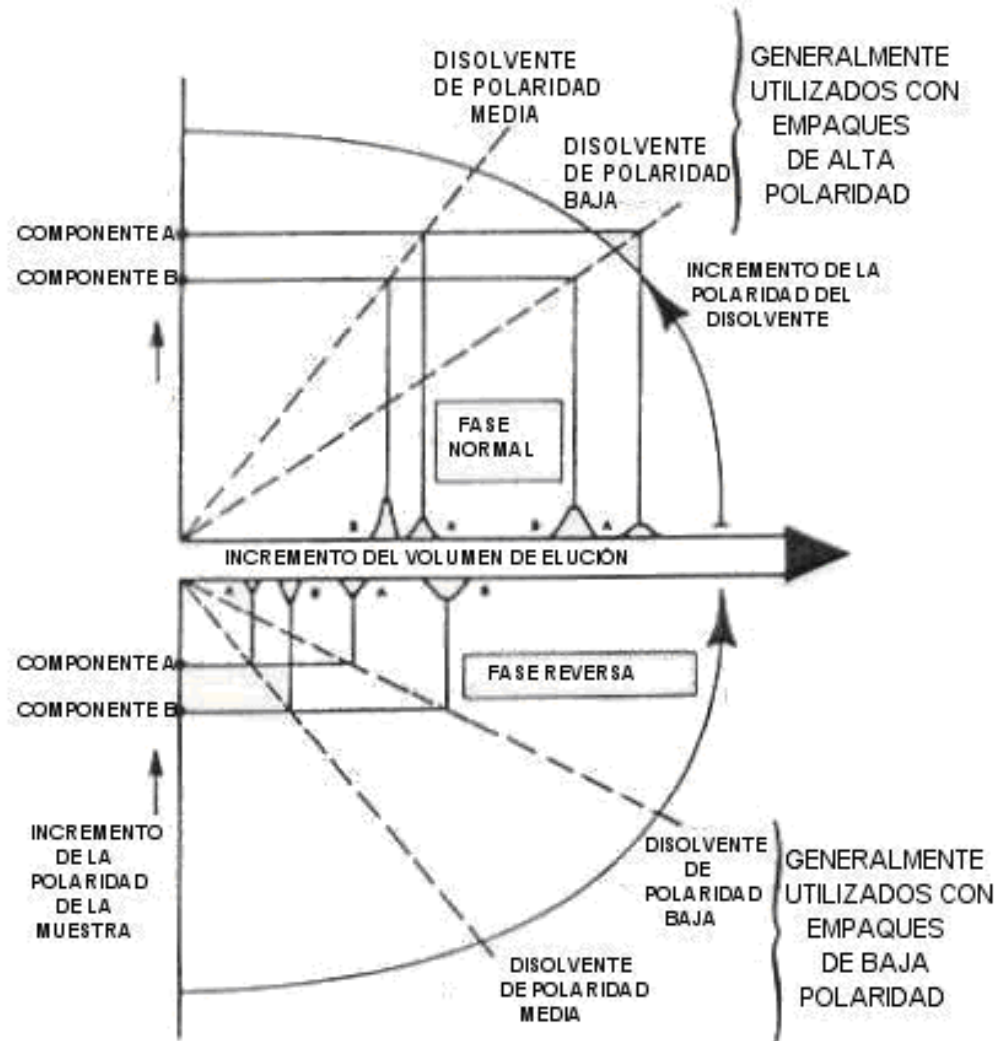


Benzo[a]pyrene

Fig. 16.1 Representative pesticides and carcinogens.

INTERACCIONES GENERALES ENTRE LA MUESTRA Y EL DISOLVENTE COMO UNA FUNCIÓN DE LA POLARIDAD

INTERACCIONES MUESTRA DISOLVENTE EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA VELOCIDAD



PROPIEDADES DE LOS DISOLVENTES CROMATOGRÁFICOS ^a

| Disolvente | $\epsilon^* b (Al_2O_3)$ | Viscosidad (cP, 20°C) | Índice de Refracción | Línea de corte nm |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Fluoroalcanos | -0.25 | | 1.25 | |
| <i>n</i> -Pentano | 0.00 | 0.23 | 1.358 | 210 |
| <i>iso</i> -octano | 0.01 | 0.54 | 1.404 | 210 |
| Éter de Petróleo | 0.01 | 0.3 | | 210 |
| <i>n</i> -Decano | 0.04 | 0.92 | 1.412 | 210 |
| Ciclohexano | 0.04 | 1.00 | 1.427 | 210 |
| Ciclopentano | 0.05 | 0.47 | 1.406 | 210 |
| Diiso-butileno | 0.06 | | 1.411 | |
| 1-Penteno | 0.08 | | 1.371 | |
| Disulfuro de carbono | 0.15 | 0.37 | 1.626 | 380 |
| Tetracloruro de carbono | 0.18 | 0.97 | 1.466 | 265 |
| Cloruro de amilo | 0.26 | 0.43 | 1.413 | 225 |
| Xileno | 0.26 | 0.62 - 0.81 | 1.50 | 290 |
| <i>iso</i> -Propil éter | 0.28 | 0.37 | 1.368 | 220 |
| Cloruro de <i>iso</i> -propilo | 0.29 | 0.33 | 1.378 | 225 |
| Tolueno | 0.29 | 0.59 | 1.496 | 285 |
| Cloruro de <i>n</i> -propilo | 0.30 | 0.35 | 1.389 | 225 |
| Clorobenceno | 0.30 | 0.80 | 1.525 | |
| Benceno | 0.32 | 0.65 | 1.501 | 280 |
| Bromuro de etilo | 0.37 | 0.41 | 1.424 | |
| Éter etílico | 0.38 | 0.23 | 1.353 | 220 |
| Sulfuro de etilo | 0.38 | 0.45 | 1.442 | 290 |
| Cloroformo | 0.40 | 0.57 | 1.443 | 245 |
| Cloruro de metileno | 0.42 | 0.44 | 1.424 | 245 |
| Metil- <i>iso</i> -butilcetona | 0.43 | | 1.394 | 330 |
| Tetrahidrofurano | 0.45 | | 1.408 | 220 |
| Dicloruro de etileno | 0.49 | 0.79 | 1.445 | 230 |
| Metil etil cetona | 0.51 | 0.43 | 1.381 | 330 |
| 1-Nitropropano | 0.53 | | 1.400 | 380 |
| Acetona | 0.56 | 0.32 | 1.359 | 330 |
| Dioxano | 0.56 | 1.54 | 1.422 | 220 |
| Acetato de etilo | 0.58 | 0.45 | 1.370 | 260 |
| Acetato de metilo | 0.60 | 0.37 | 1.362 | 260 |
| Alcohol amílico | 0.61 | 4.1 | 1.410 | 210 |
| Dimetil sulfóxido | 0.62 | 2.24 | 1.477 | |
| Anilina | 0.62 | 4.4 | 1.586 | |
| Diethyl amina | 0.63 | 0.38 | 1.387 | 275 |
| Nitropropano | 0.64 | 0.67 | 1.394 | 380 |
| Acetonitrilo | 0.65 | 0.37 | 1.344 | 210 |
| Piridina | 0.71 | 0.94 | 1.510 | 305 |
| Butil celosolve | 0.74 | | | 220 |
| 2-Propanol, 1-Propanol | 0.82 | 2.3 | 1.38 | 210 |
| Etanol | 0.88 | 1.20 | 1.361 | 210 |
| Metanol | 0.95 | 0.60 | 1.329 | 210 |
| Etilén glicol | 1.11 | 19.9 | 1.427 | 210 |
| Ácido acético | Grande | 1.26 | 1.372 | |
| Agua | Muy grande | 1.00 | 1.333 | |

^a Adaptado de "Principles of Adsorption Chromatography"
by Lloyd Snyder, by Courtesy of Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

^b ϵ^* es definido por Snyder como "la energía de adsorción por unidad de área de la superficie activa de referencia."