



Curso Profesional (en línea)

Cromatografía HPLC: Fundamentos

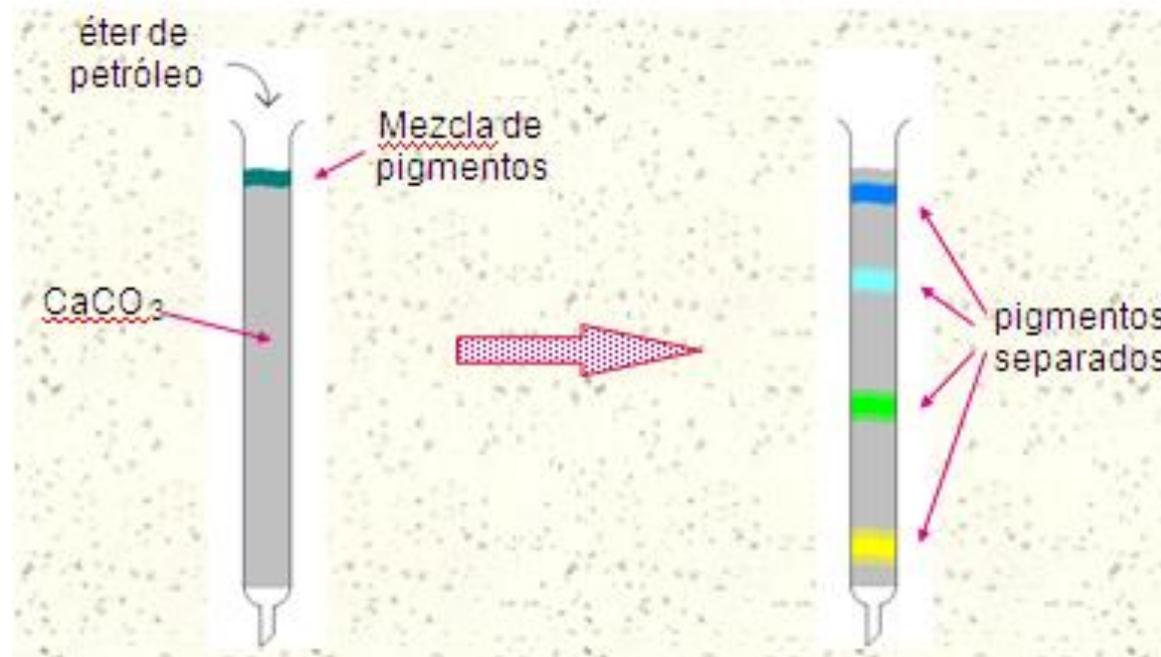
Imparte: Q Maricruz Valencia de Jesús (CATALAB)

Proyecto PAPIME UNAM 210820 (Sargazo: Contribución de la Química Analítica desde la Docencia e Investigación Formativa)

Viernes 23 de Abril del 2021, CDMX

HISTORIA

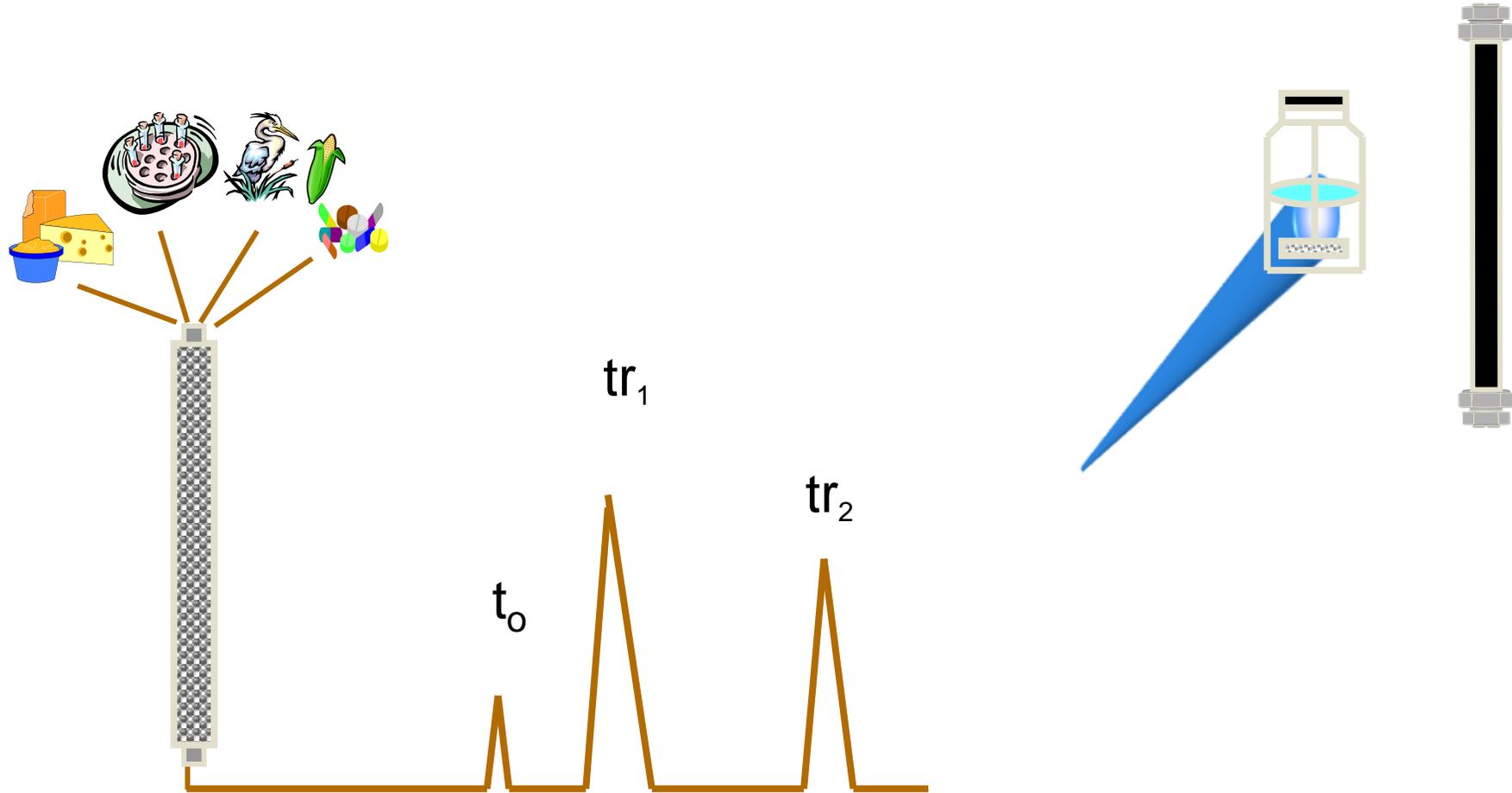
M. TSWEET (1903):



**Cromatografía = *kroma* [color] + *graph* [escribir]
(griego)**

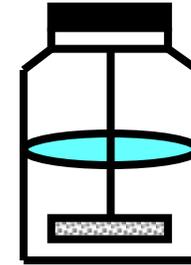
Definición

- **Técnica de Separación, Identificación y Cuantificación**



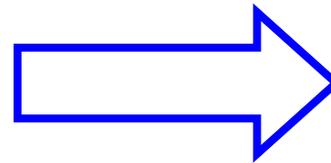
Separación de los Compuestos

- Fase móvil



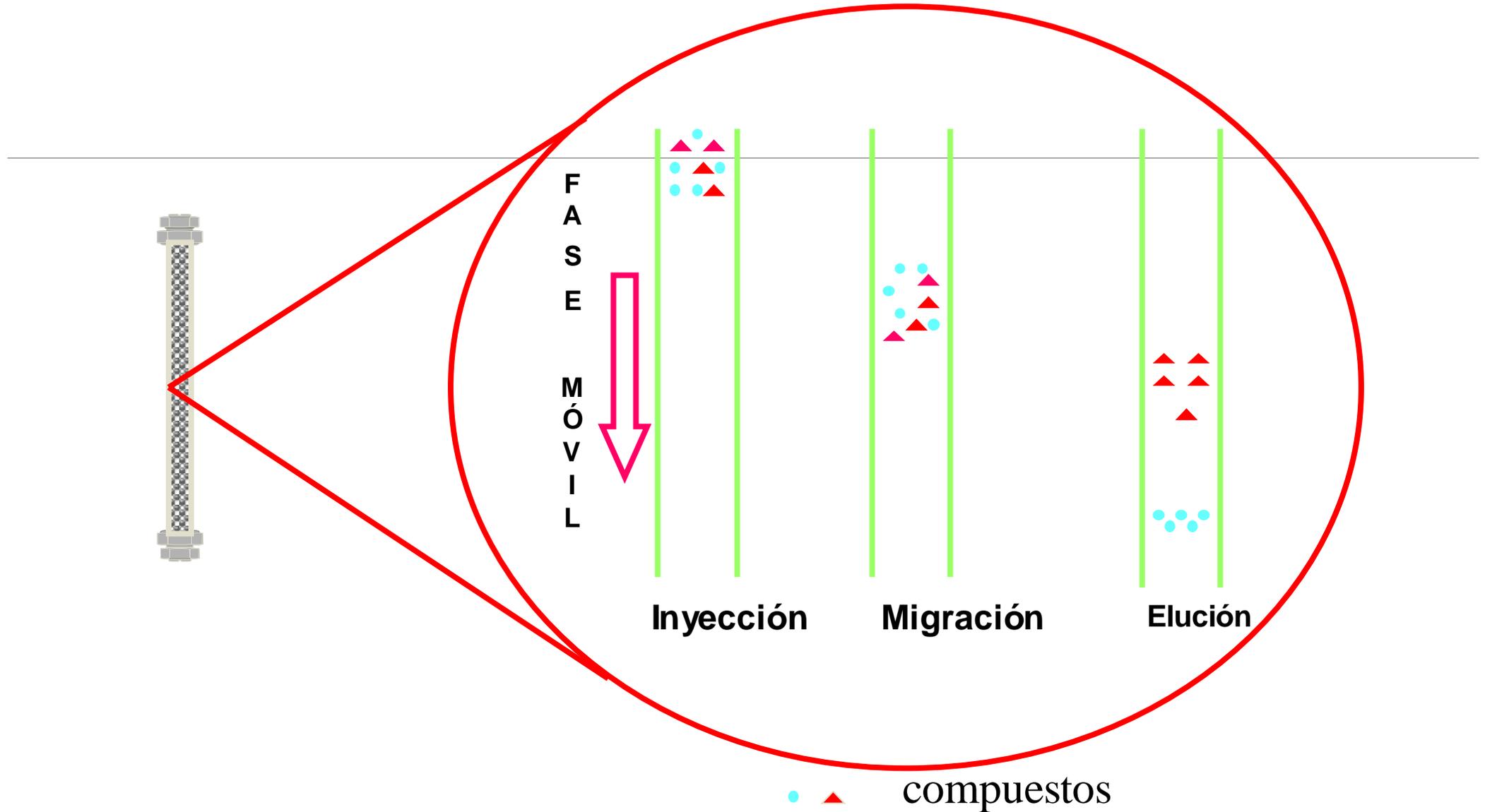
Disolventes

- Fase estacionaria



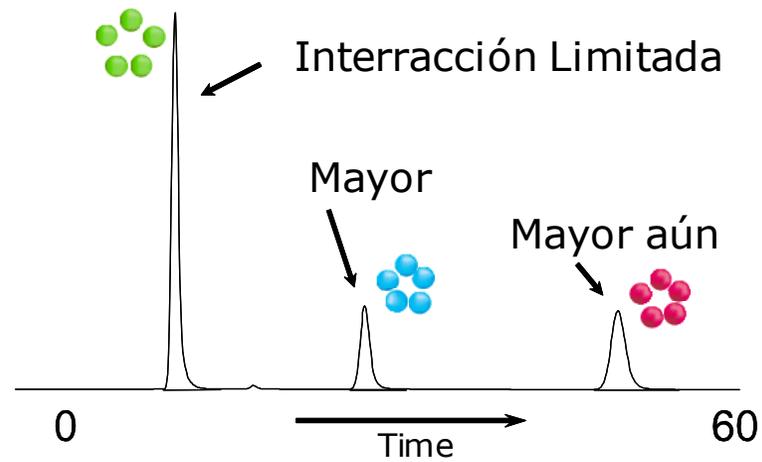
Columna

Separación de los Compuestos

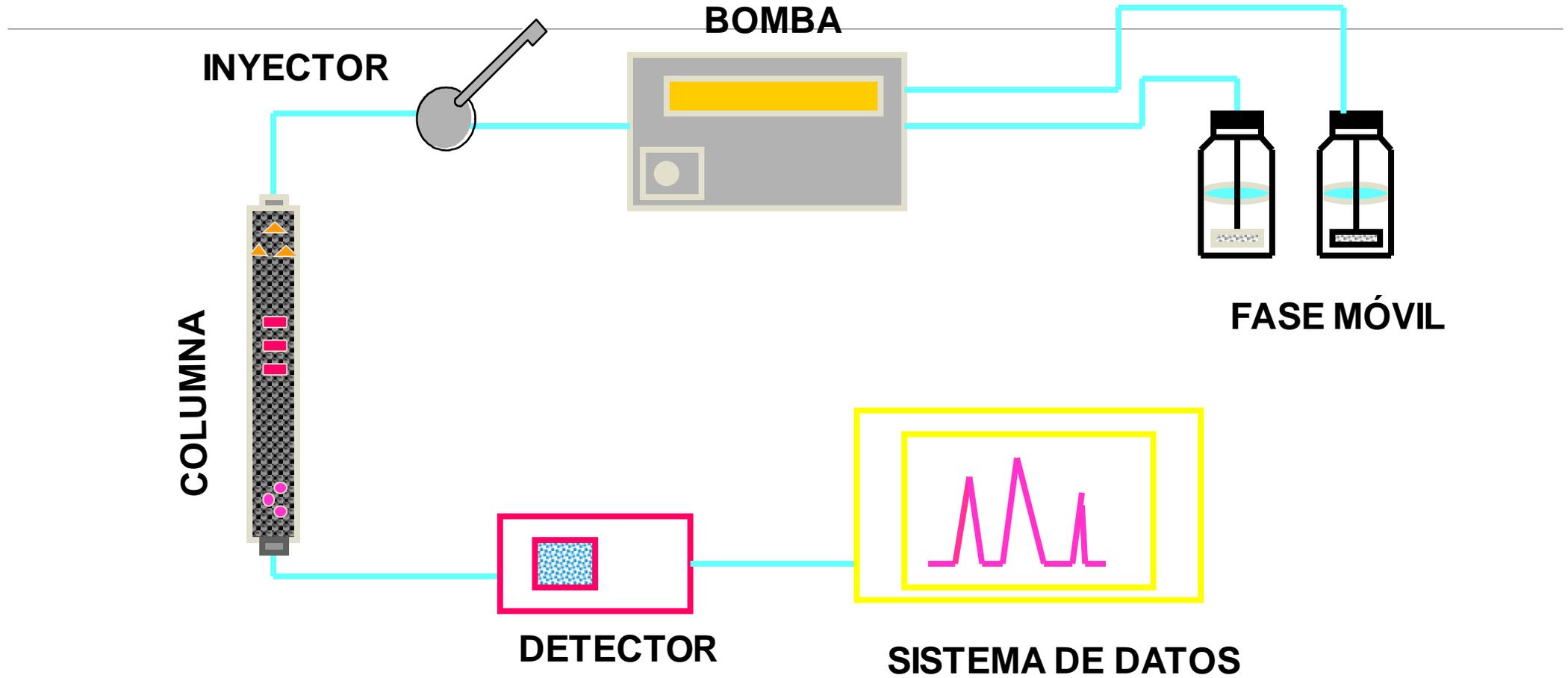


Teoría de HPLC :

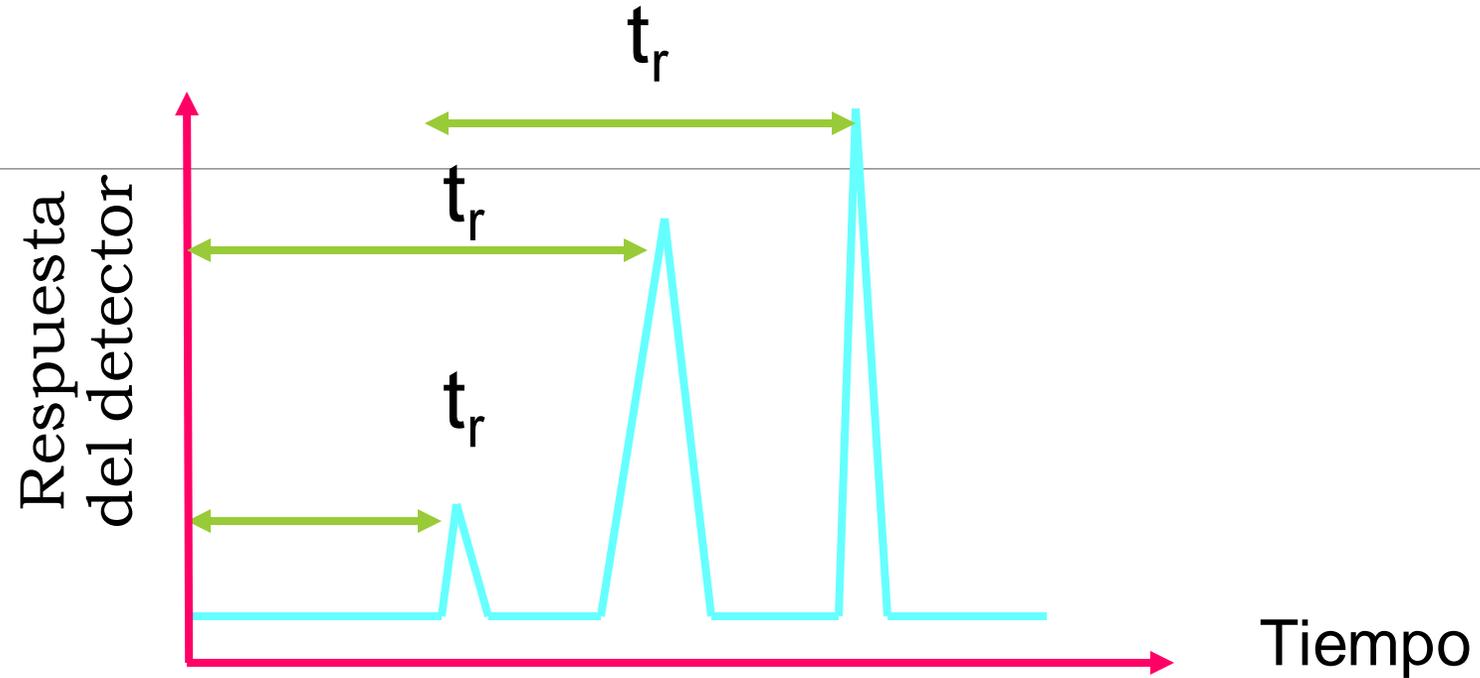
Separación de mezclas de compuestos



Sistema Cromatográfico

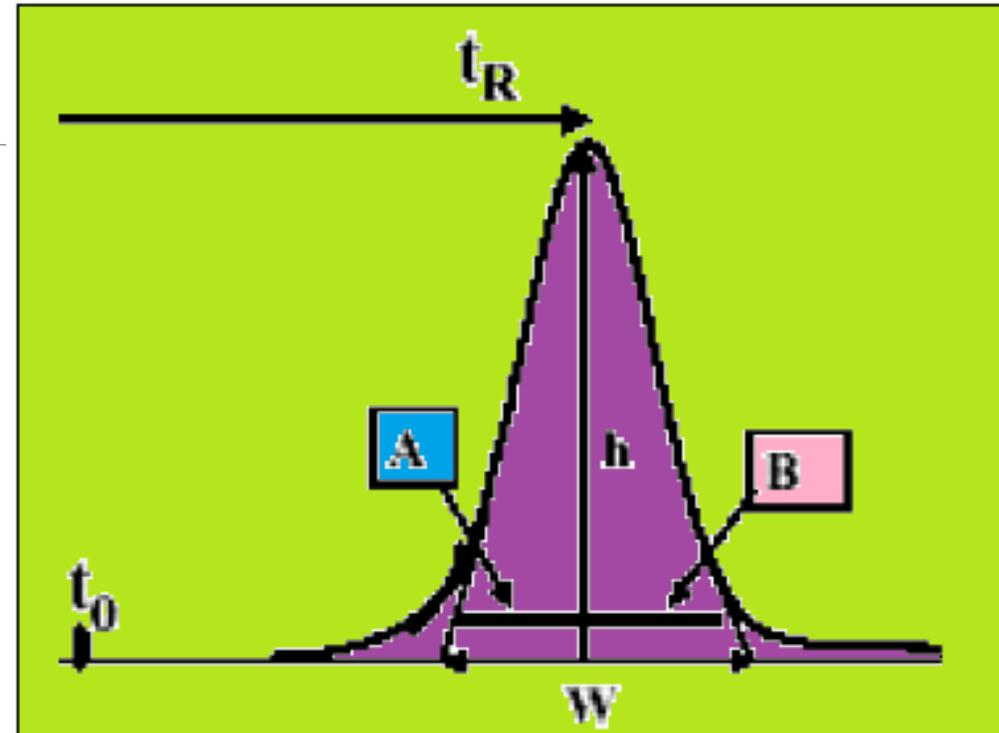


Cromatograma



t_r = tiempo de retención absoluto

TIEMPOS DE RETENCIÓN



Elementos de un pico cromatográfico (t_R : tiempo de retención, h : altura del pico, w : anchura del pico, t_0 : tiempo de un compuesto no retenido)

Coeficiente de retención o de reparto

Es cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. El soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases.

La concentración en fase está dada por el coeficiente termodinámico de reparto:

$$K = C_s/C_M$$

donde C_s , y C_M son las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente.

Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases.

El coeficiente de reparto determina la velocidad promedio de cada zona de soluto conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna.



FACTOR DE RETENCIÓN

$$k = (t - t_0) / t_0$$

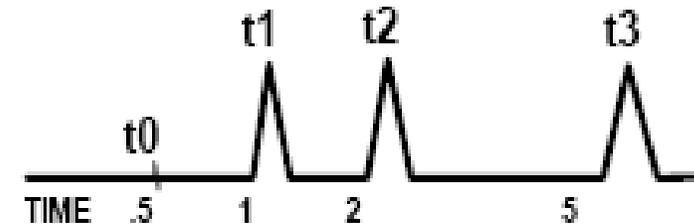
Donde:

k = constante de retención de una partícula del soluto y la fase del sistema, depende solo de k_c (coeficiente de distribución).

t = tiempo de retención.

t₀ = tiempo muerto.

EJEMPLO



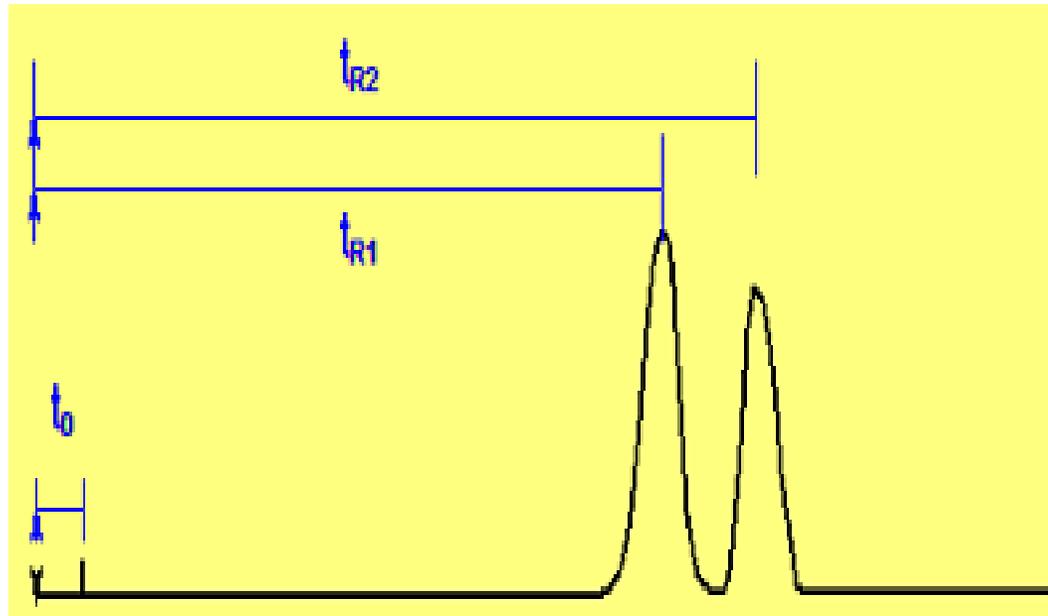
$$k'_{t1} = \frac{1 - 0.5}{0.5} = 1$$

$$k'_{t1} = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

$$k'_{t2} = \frac{2 - 0.5}{0.5} = 3$$

$$k'_{t3} = \frac{5 - 0.5}{0.5} = 9$$

SELECTIVIDAD



$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1}$$

Donde:

α = selectividad

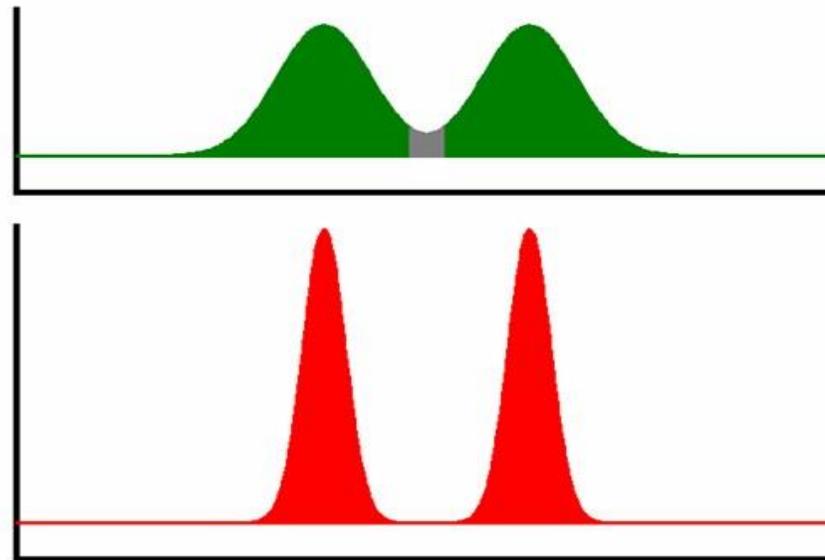
t_r = tiempo de retención

t_0 = tiempo muerto

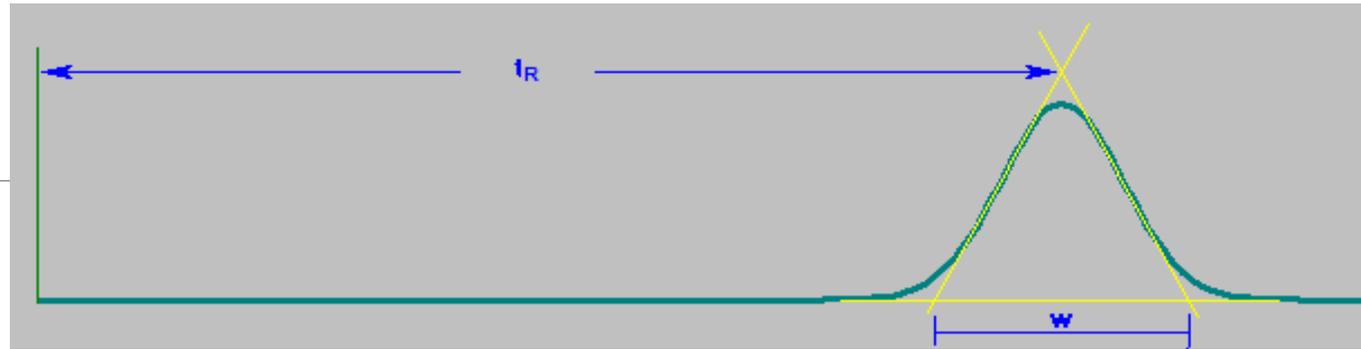
k = factor de retención

EFICIENCIA

Se refiere al ancho del pico. Una columna eficiente, da picos estrechos, haciendo que los componentes de la muestra sean fácilmente separados.



EFICIENCIA



Haciendo una analogía con la destilación, la eficiencia esta medida en términos de **N**, número de platos teóricos. **N** esta dado por:

$$N = 16 [t / W]^2$$

Donde:

t = tiempo de retención.

W = ancho del pico medido en la base.

La altura equivalente a un plato teórico, **H**, esta dada por:

$$H = L / N$$

Donde:

L = longitud de la columna.

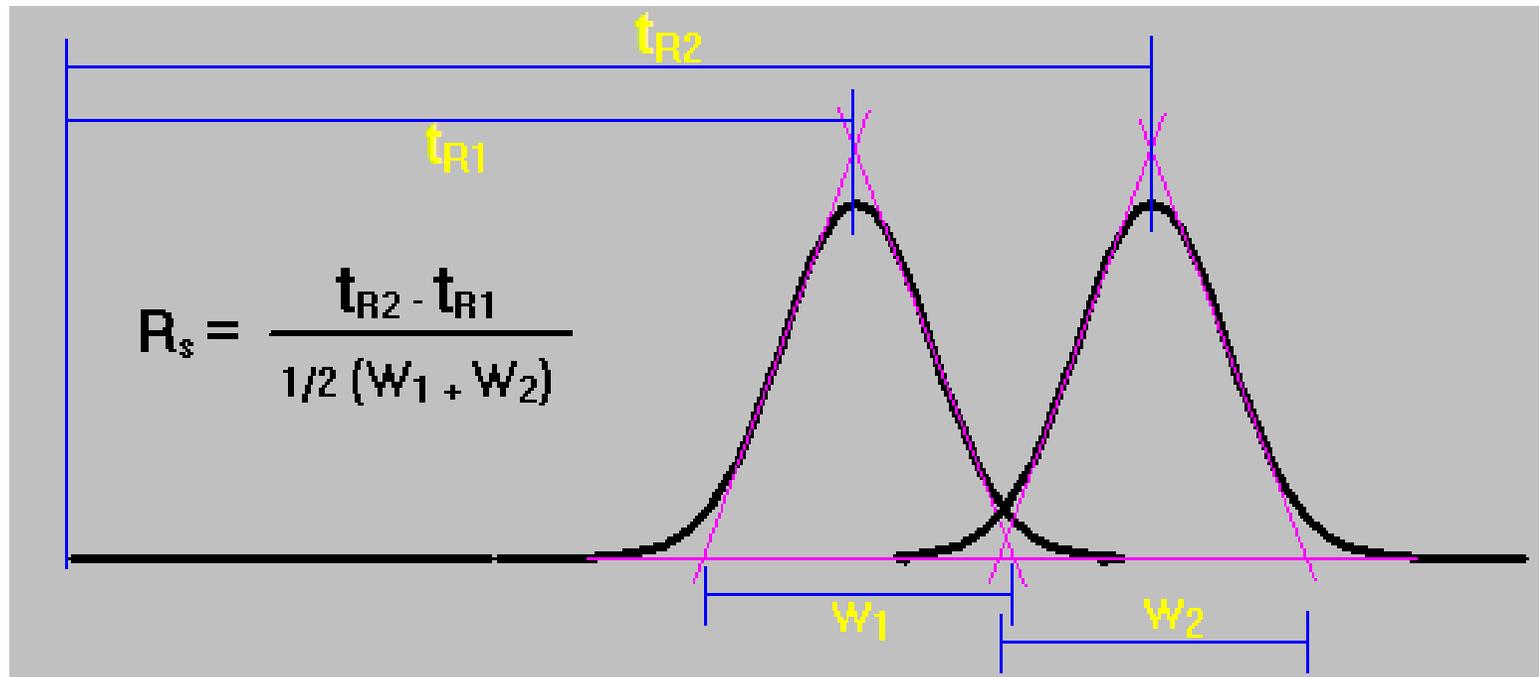


PLATOS TEÓRICOS (N) EFICIENCIA

Se calcula con los siguientes propósitos:

- Comparar materiales y métodos bajo las mismas condiciones experimentales
- Optimizar un método analítico
- Controlar que un método continúe siendo idóneo
- Controlar el estado de la columna durante su vida útil

RESOLUCIÓN



RESOLUCIÓN ADECUADA

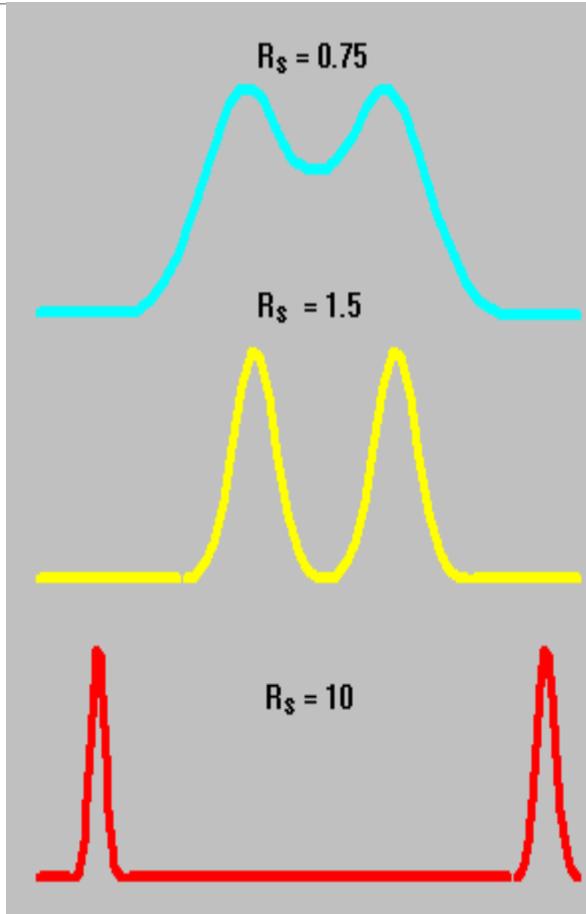
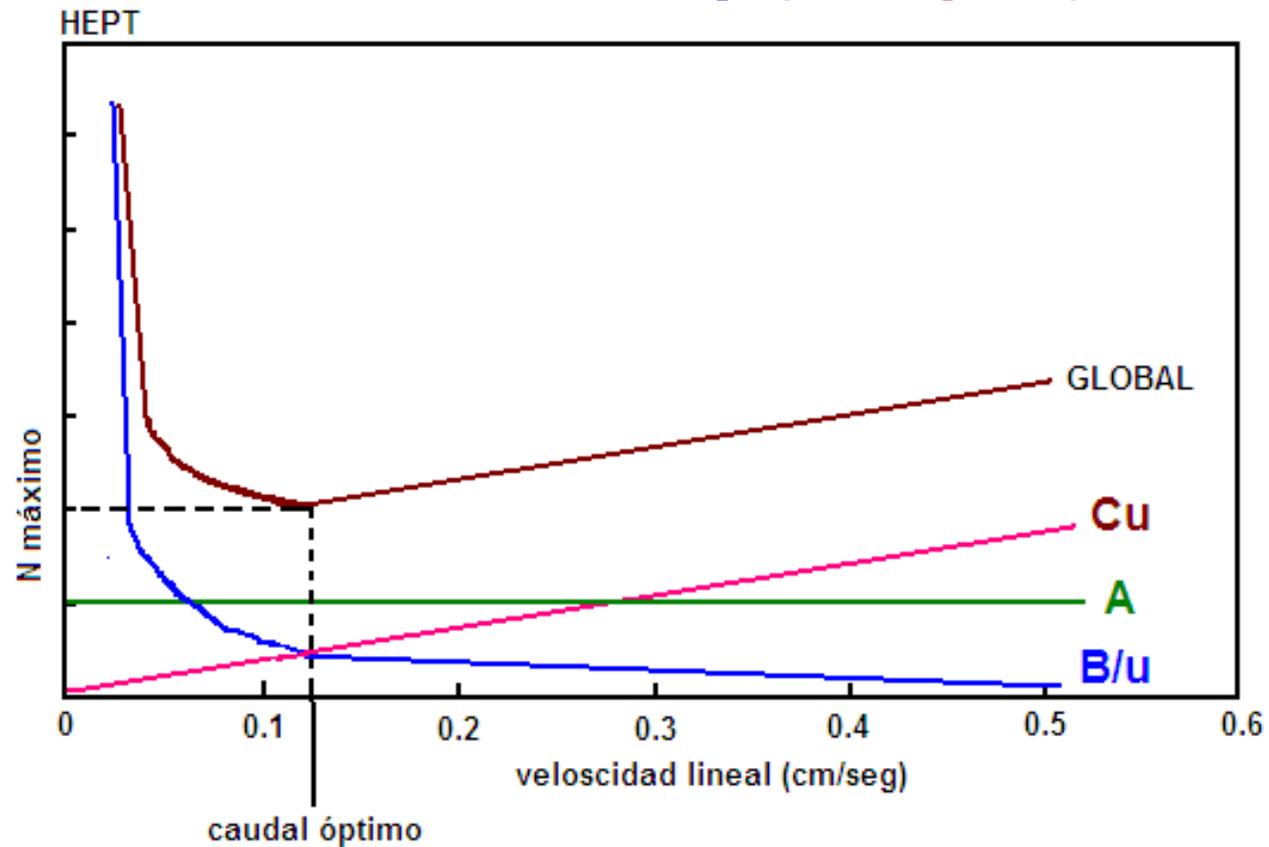
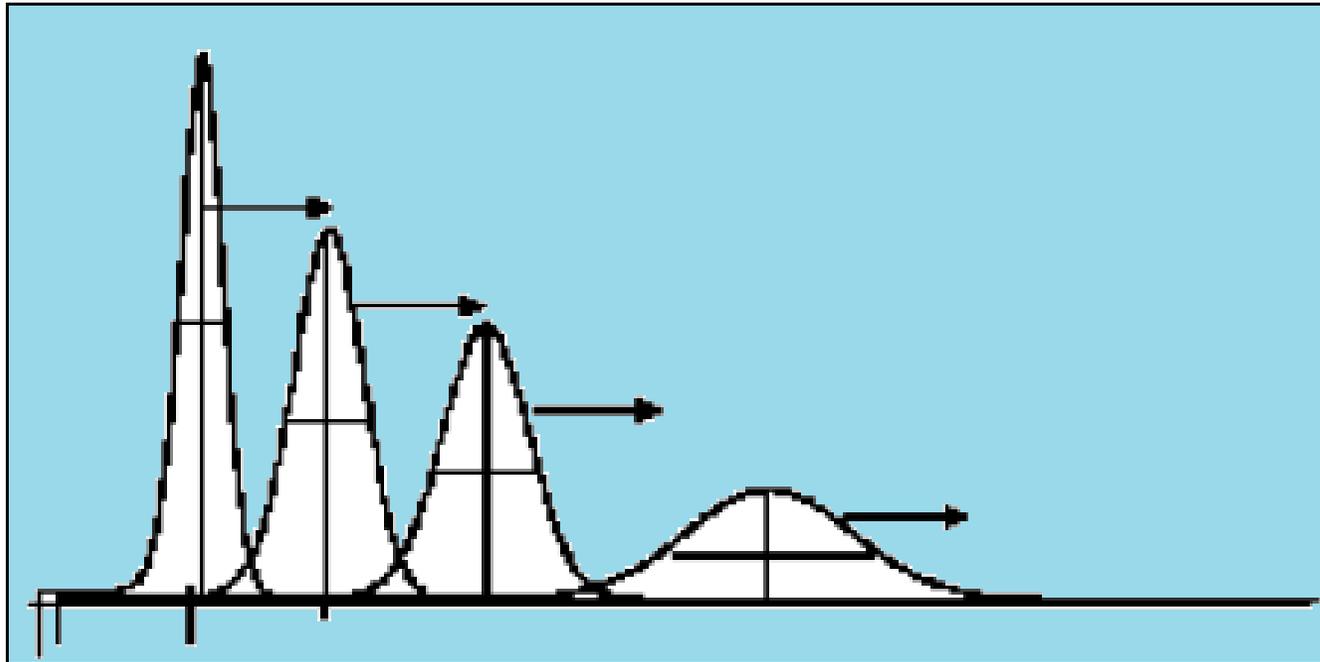


GRÁFICO DE VAN DEEMTER

$$H = A + B/u + C \cdot u$$



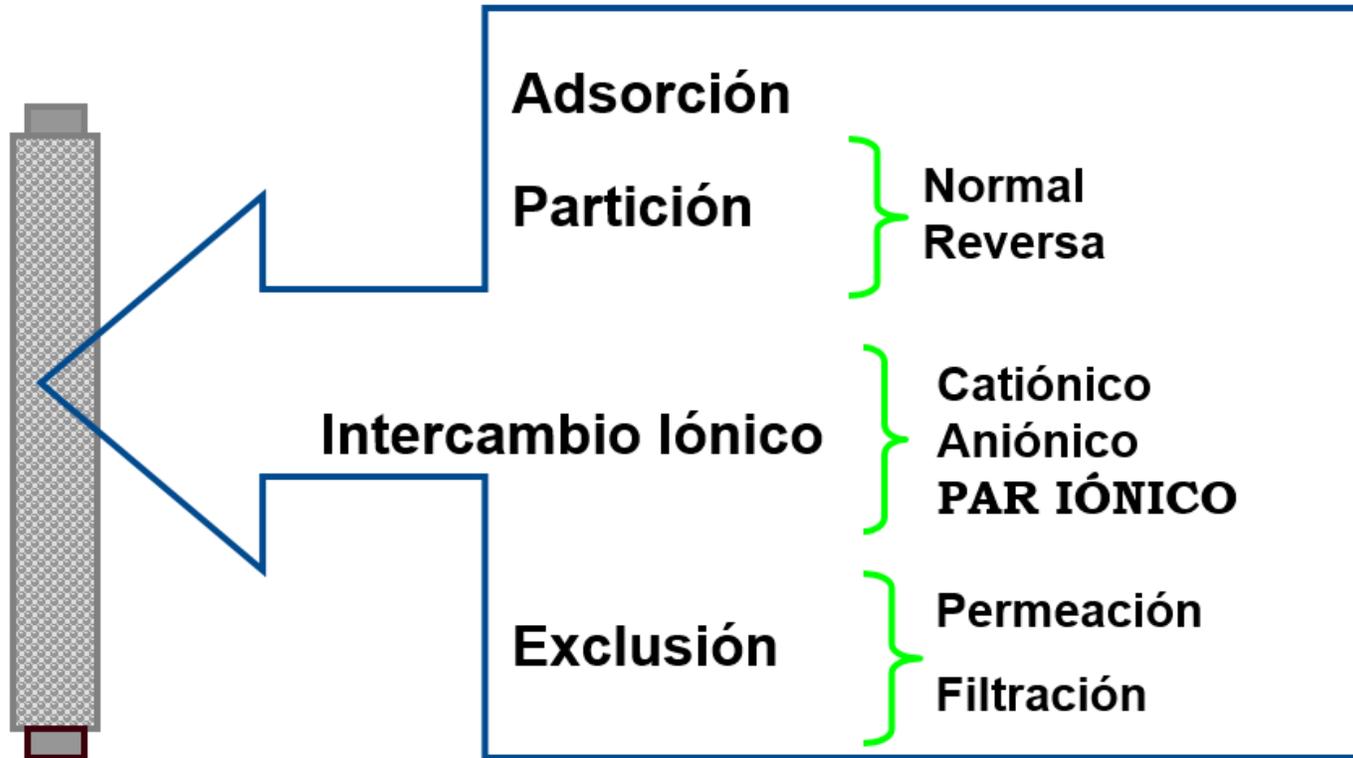
Ensanchamiento de picos



En función del Factor de capacidad, también llamado factor de retención

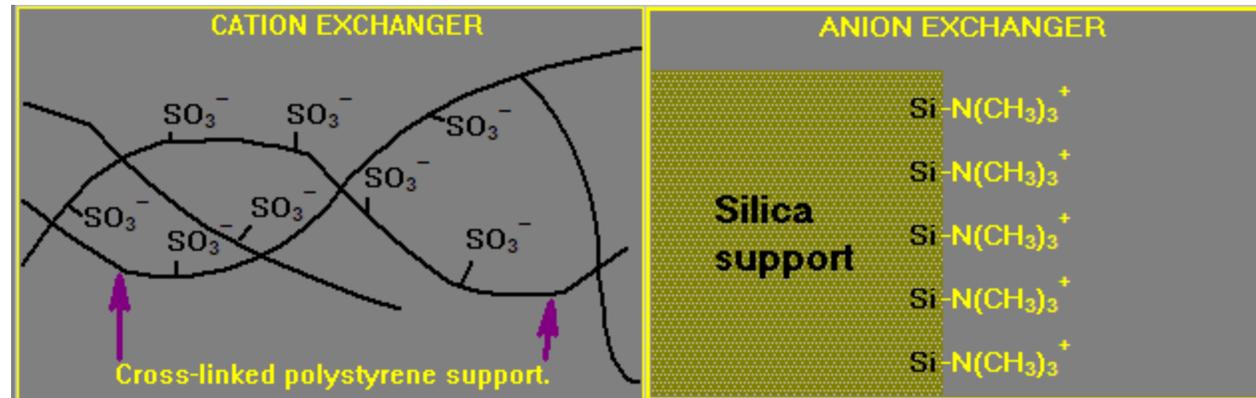
MÉTODOS DE SEPARACIÓN

Mecanismos de Separación



Cromatografía de Intercambio Iónico

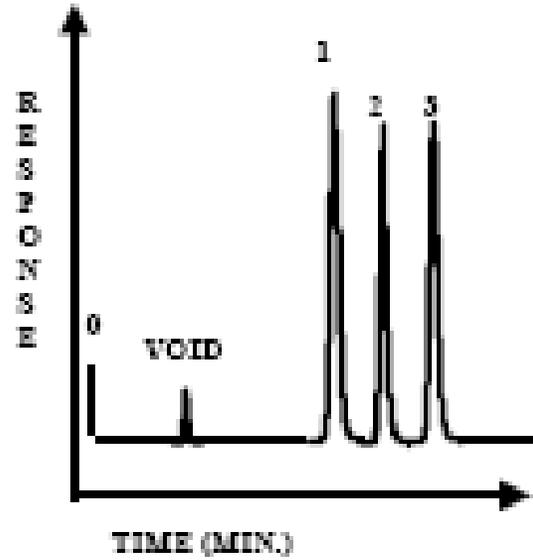
El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Las partículas de relleno están constituidas por un polímero o por sílica gel, en cada caso unida a un grupo funcional aniónico o catiónico.



ORDEN DE ELUSION DE INTECAMBIO IONICO

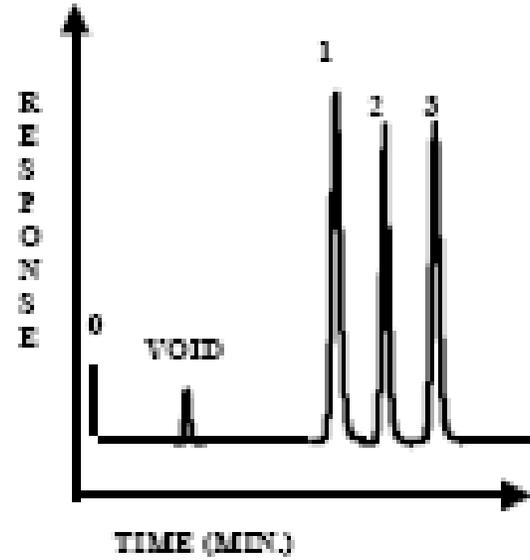
ANION EXCHANGE

ACIDO FUERTE



CATION EXCHANGE

BASE FUERTE



Instrumentación



Fase Móvil

CARACTERÍSTICAS

Grado HPLC

Polaridad

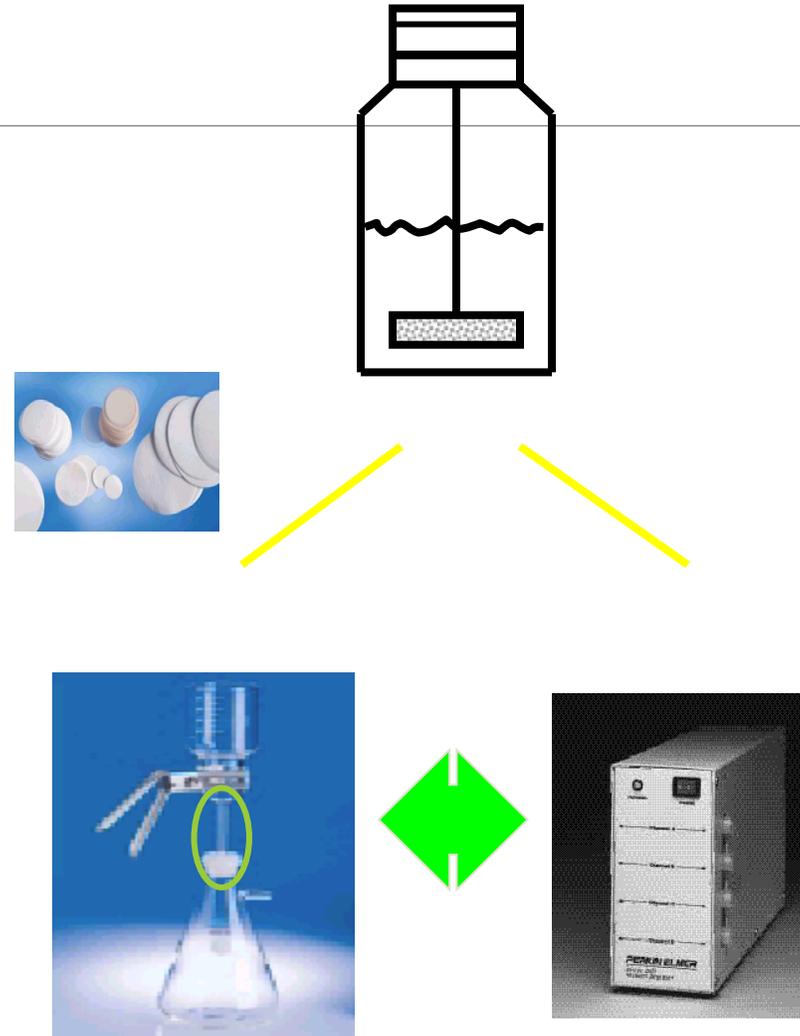
Viscosidad

Fuerzas Iónicas y pH

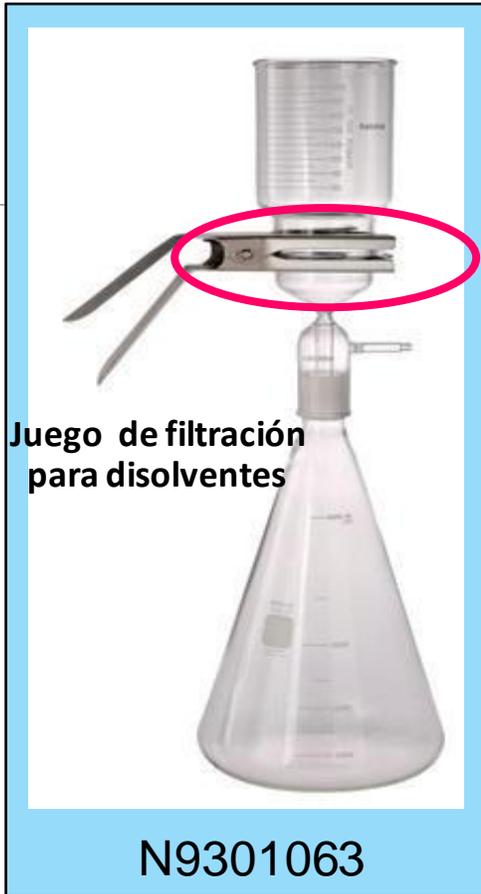
Solubilidad con la muestra

Compatibilidad con la columna

Ejem: Metanol, Agua, ACN,
Hexano, etc



Fase Móvil – Filtración

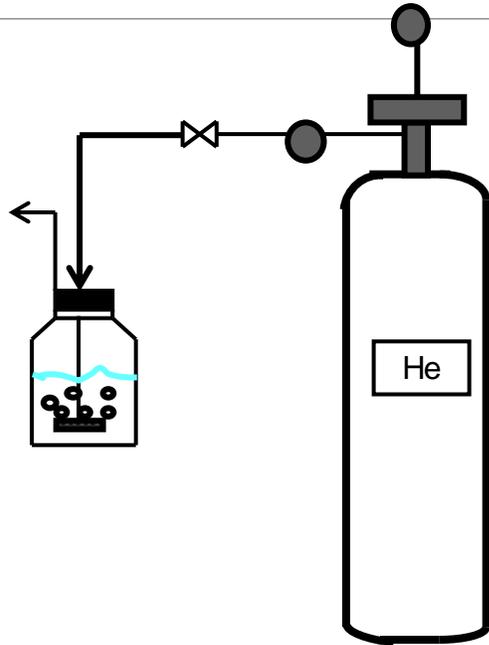


Membranas

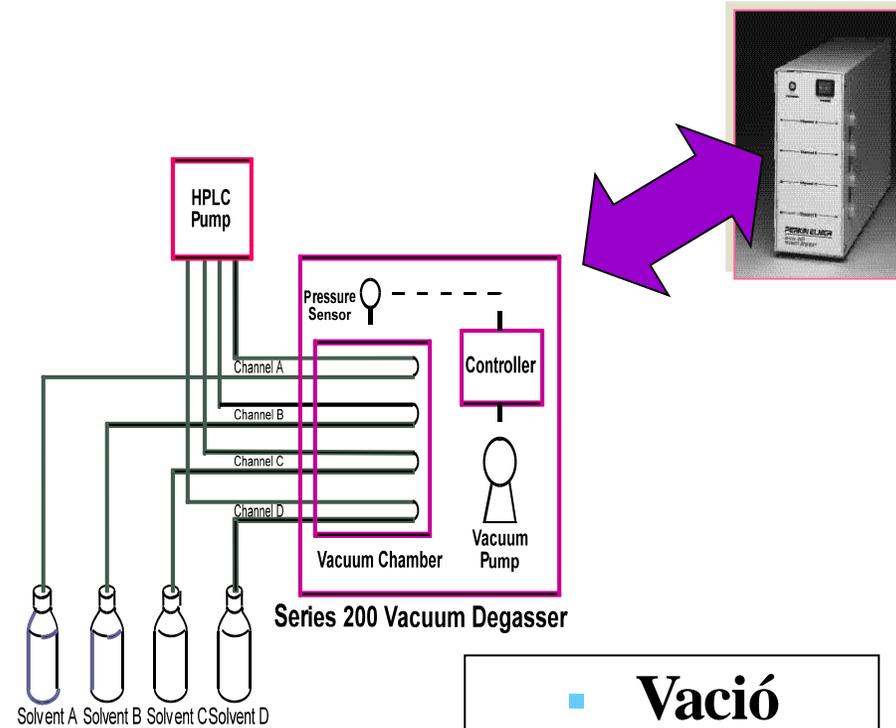
- Material
- Tamaño de Poro ($0.45\ \mu\text{m}$)



Desgasificación



■ **Gas Inerte**

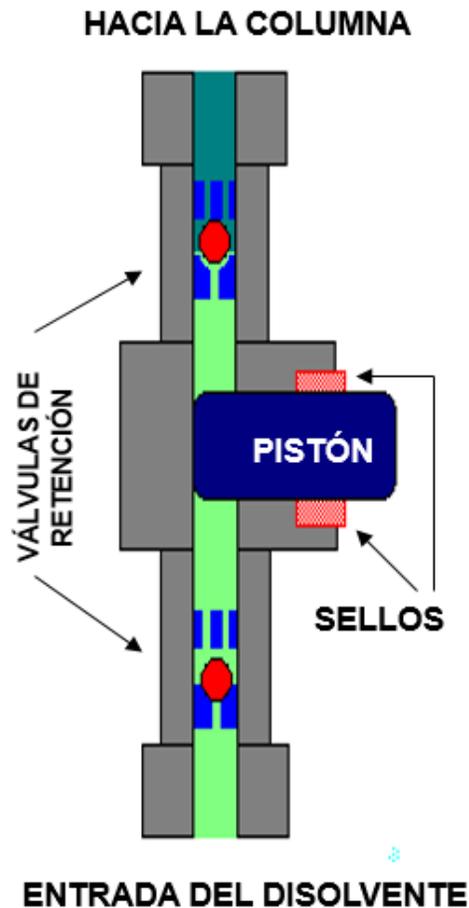


■ **Vació**

Sistema de Bombeo



Bomba reciproca de pistón



Las más utilizadas.

Movimientos cíclicos de uno o más pistones

Ventajas:

- pequeños volúmenes internos (35-400 uL)
- altas presiones (6000 psi)
- fácil adaptación a sistemas por gradientes y caudales constantes

Usan amortiguamiento de pulsos.

Alimenta de forma continua al sistema.

USO FRECUENTE EN SISTEMAS HPLC



Bombas



■ Isocrática

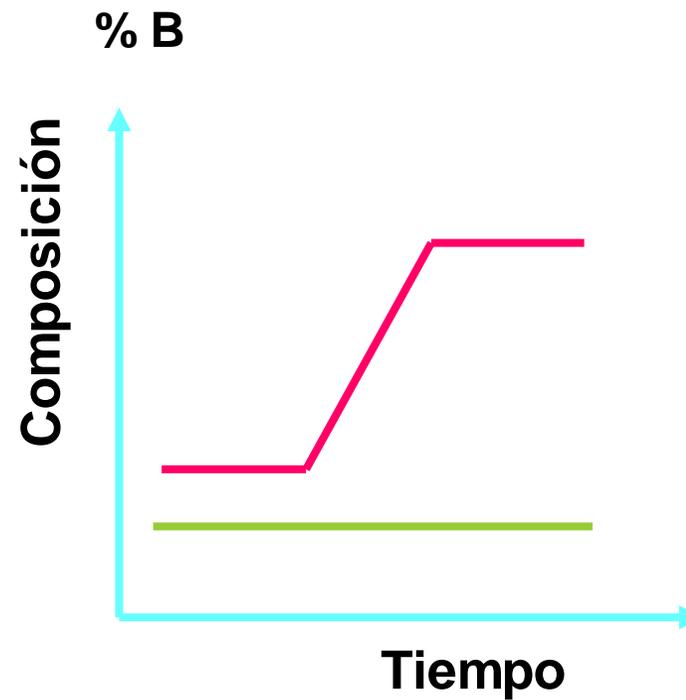
■ Gradiente



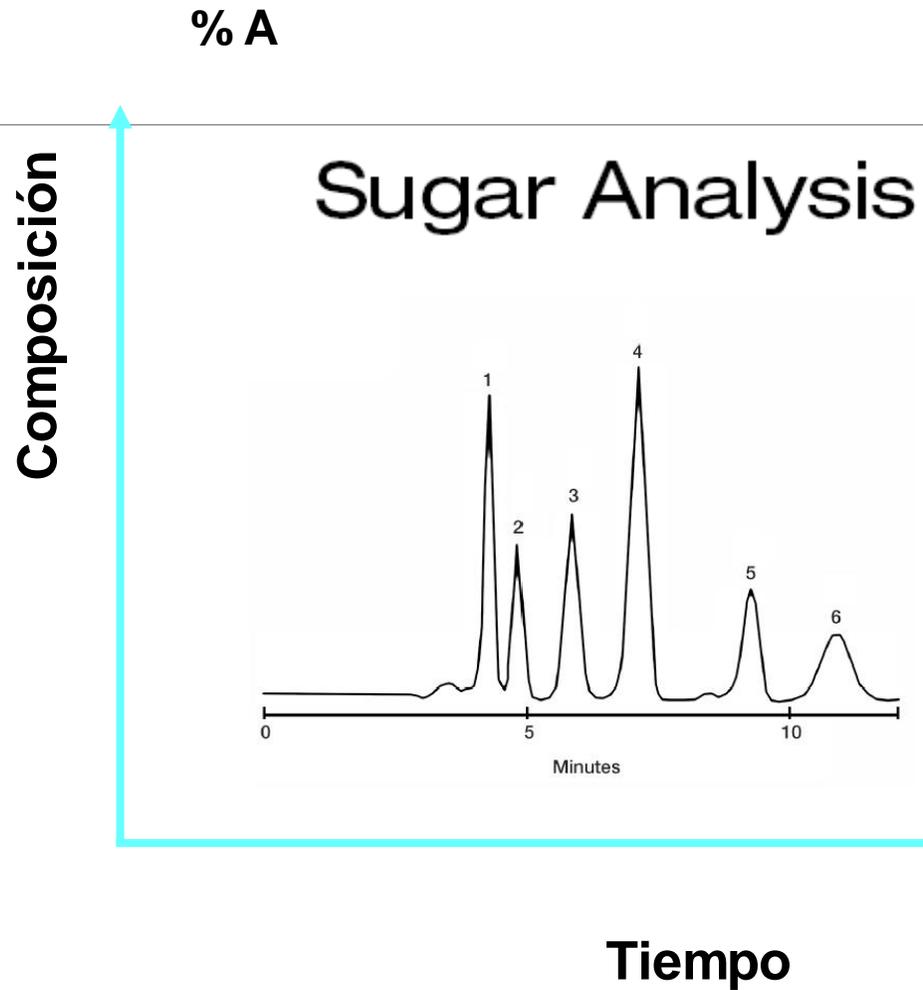
Binaria

Ternaria

Cuaternaria



Análisis Isocrático



Peak List

1. maltotriose
2. maltose
3. glucose
4. fructose
5. mannitol
6. ribose

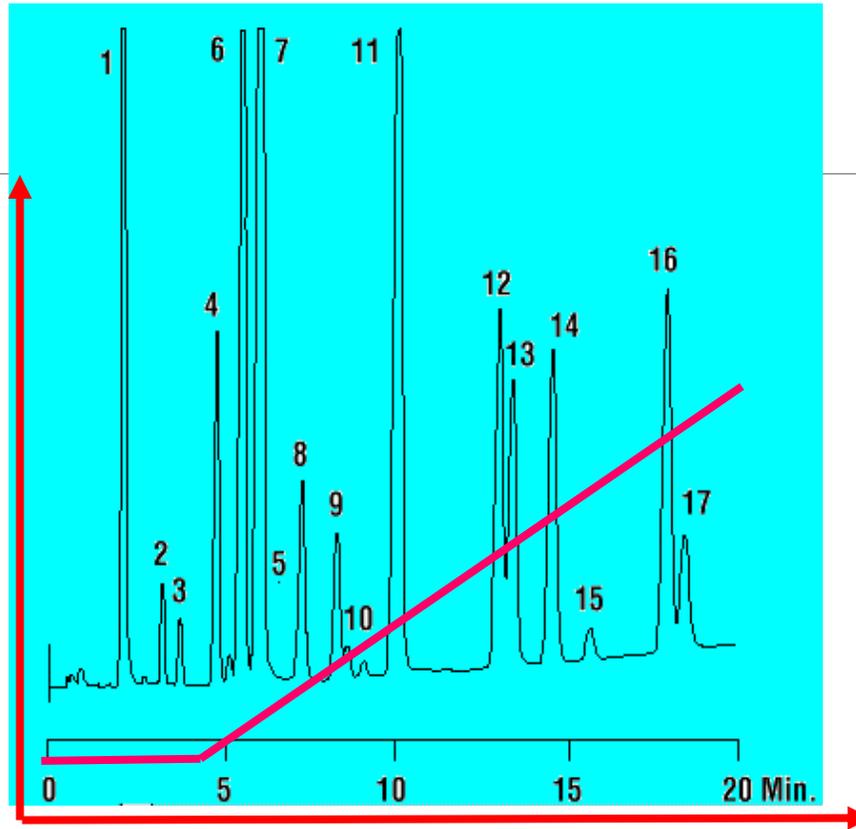
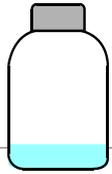
Column

Column name: Brownlee Polypore CA
Part number: 07110095
Dimensions: 220 x 4.6 mm i.d.

Conditions

Mobile phase: water
Flow: 0.3 mL/min
Temperature: 85 °C
Detector: RI

Bomba - Análisis de Gradiente



Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (EPA 610)

- | | |
|-------------------|------------------------------|
| 1. Benzene | 7. Anthracene |
| 2. Naphthalene | 8. Fluoranthene |
| 3. Acenaphthylene | 9. Pyrene |
| 4. Fluorene | 10. 1,2-Dibenzanthracene |
| 5. Acenaphthene | 11. Chrysene |
| 6. Phenanthrene | 12. Benzo[b]fluoranthene |
| | 13. Benzo[k]fluoranthene |
| | 14. Benzo[a]perylene |
| | 15. 1,2,5,6-Dibenzanthracene |
| | 16. 1,12-Dibenzoperylene |
| | 17. Indeno[1,2,3,c,d]pyrene |

Column: Adsorbosphere[®] UHS C18, 5 μ m, 150 x 4.6mm
Mobile Phase: A: Acetonitrile:Water (80:20)
B: Acetonitrile
Gradient:

Time:	0	4	20
%B:	0	0	100

Flowrate: 1.5mL/min
Detector: UV at 254nm

% B

Gradiente

Tiempo

Inyector



**Inyector
Manual**

**Inyector
Automático**



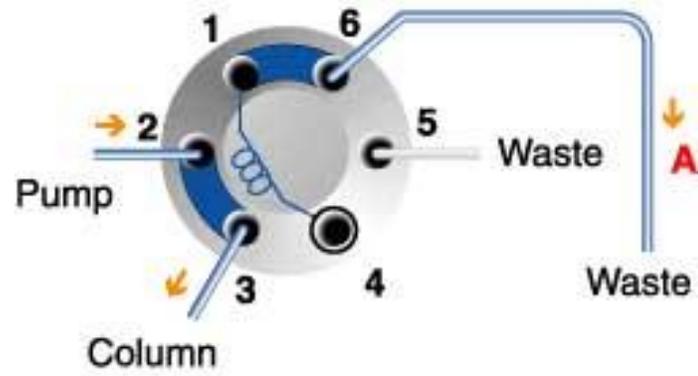
Inyector Manual

Características

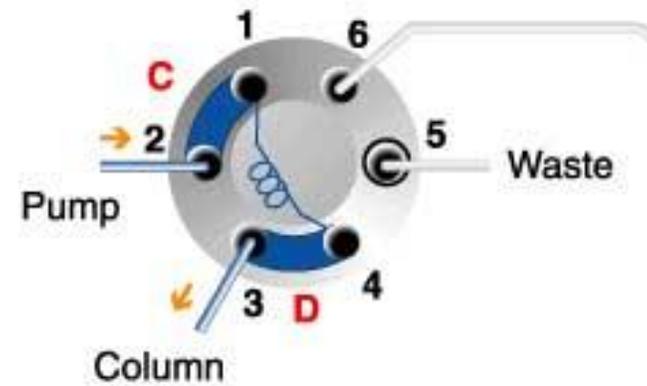
- Válvula de 6 puertos
- Utiliza un loop
- 2 posiciones: carga e inyección
- Jeringa para introducir la muestra
- Limpieza manual del loop



Posiciones de la Válvula



Position A (LOAD)



Position B (INJECT)

Automuestreador

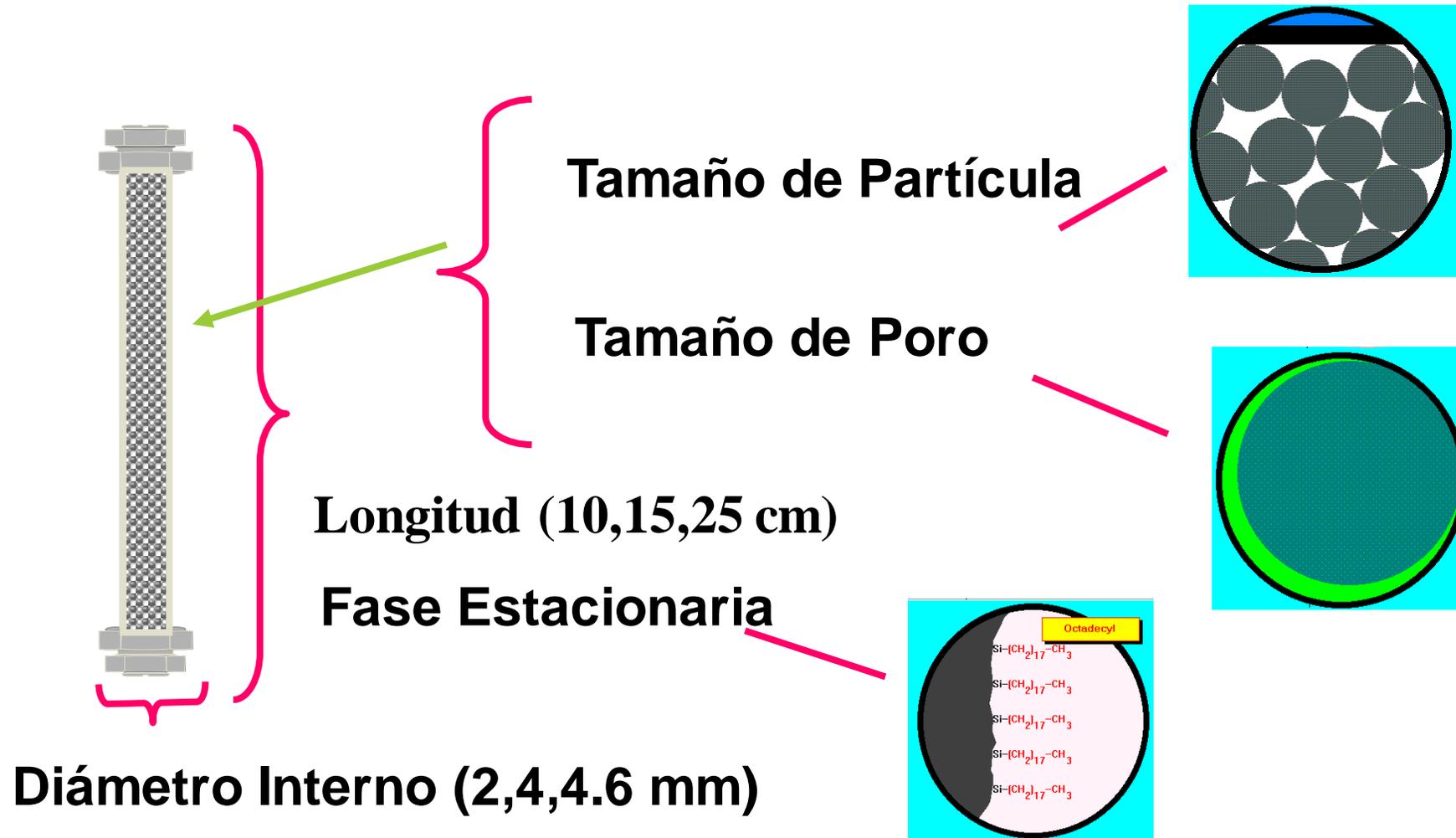
Características

- Automatización
- Productividad
- Lavado automático del loop
- Mayor repetibilidad y precisión

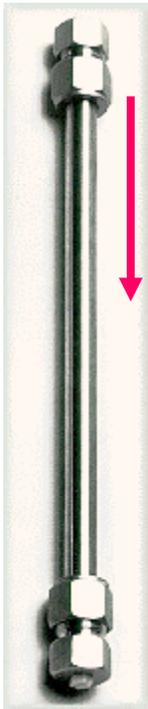


Columnas

Características Generales



Cuidados de la columna



- Respetar Sentido del Flujo
- Respetar Presión Máxima
- Compatibilidad de disolventes
- Limpieza de la Columna
- Filtrar la muestra
- Utilizar Precolumna



NewGuard cartridges directly coupled to a 220 mm MPLC cartridge and connected externally to a 250 mm conventional column.

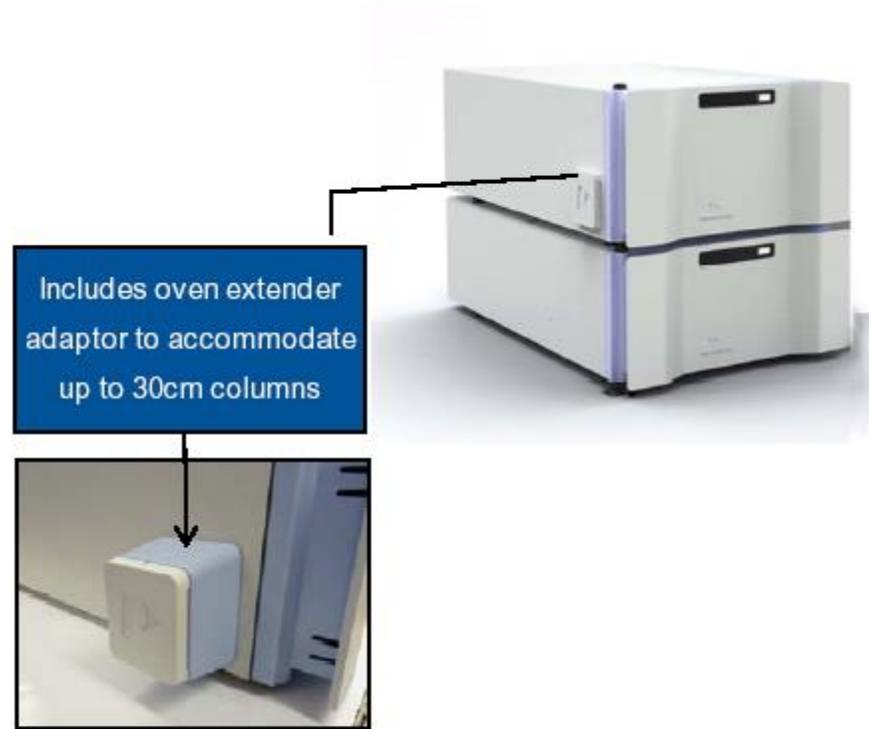


View of the NewGuard holder and a NewGuard 3/pack.

PRECOLUMNS



Horno de Columnas

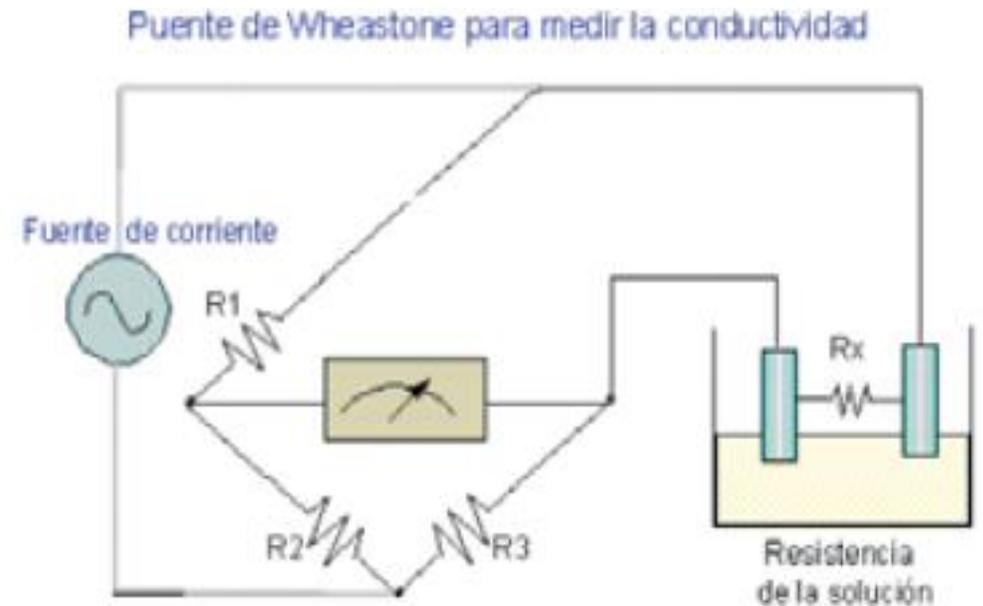


- Aumentar la solubilidad de la muestra
 - Disminuir la selectividad
 - Disminuir el tiempo de análisis

Detector de conductividad

La detección de conductividad de aniones en la cromatografía iónica requiere la reducción de la conductividad de fondo para aumentar la sensibilidad de detección.

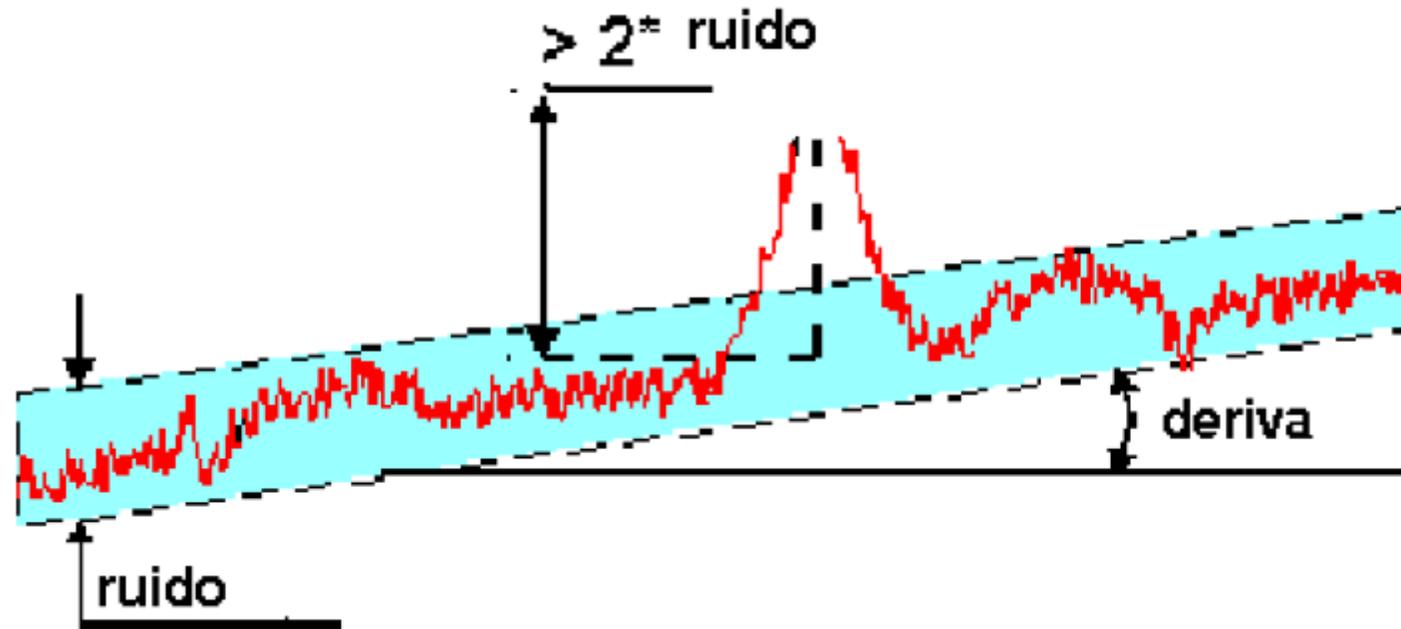
El tampón eluyente (por ejemplo, $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$) utilizado para realizar la cromatografía de aniones perturba la medición del analito (por ejemplo, cloruro, nitrato, sulfato).



ANÁLISIS CUALITATIVO

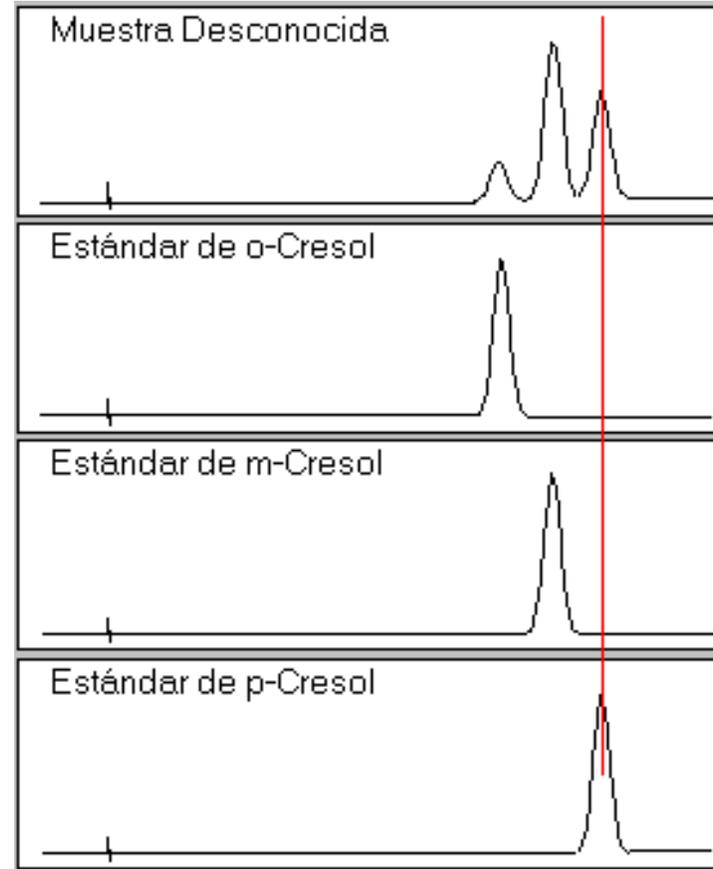


Esquemmatización de los fenómenos de ruido y deriva



ANÁLISIS CUALITATIVO

Comparación de los tiempos de retención
El tiempo de retención absoluto o relativo debe estar entre ± 0.3 min con relación al del estándar.

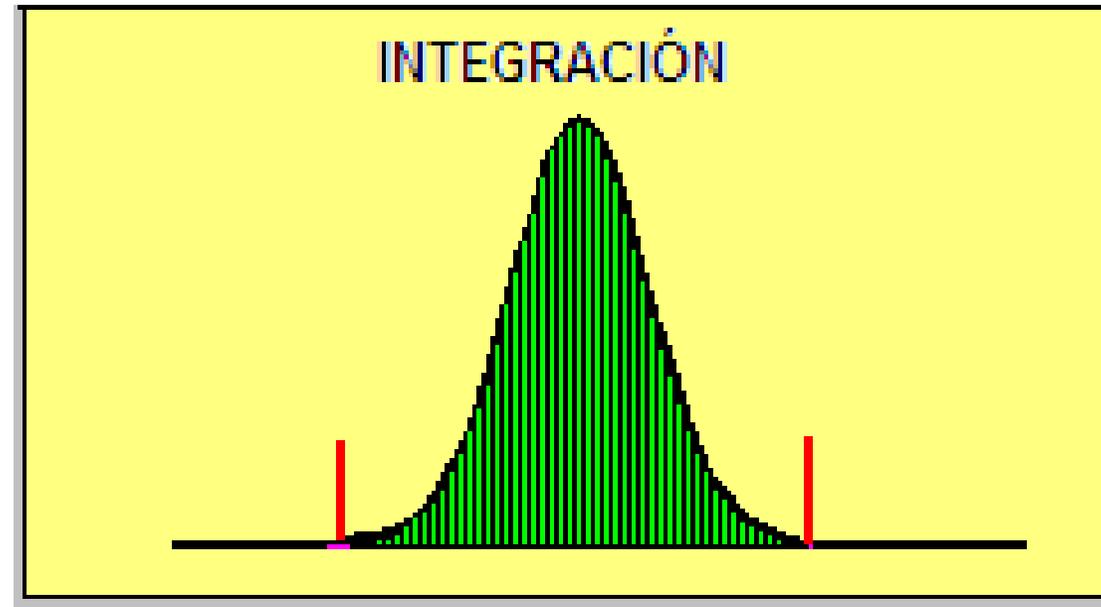


ANÁLISIS CUANTITATIVO

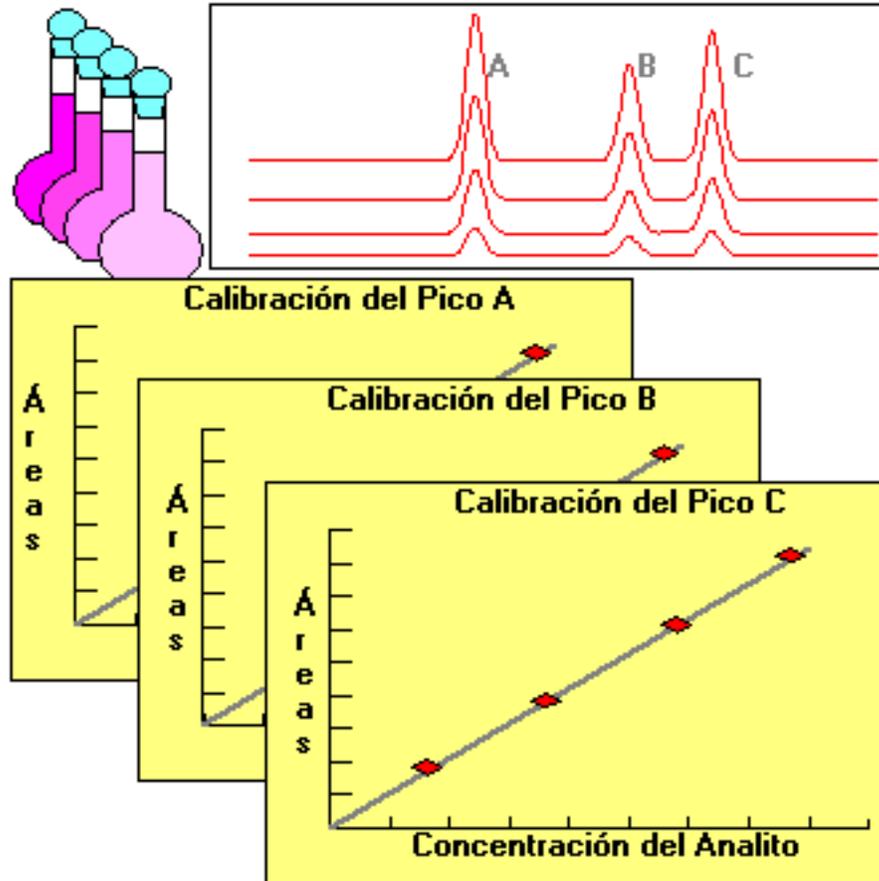


Midiendo los picos

**El pico detectado puede ser medido por: altura o por área.
La medición normalmente se realiza utilizando el área,
debido a que presenta mayor uniformidad.**



Estándar Externo:



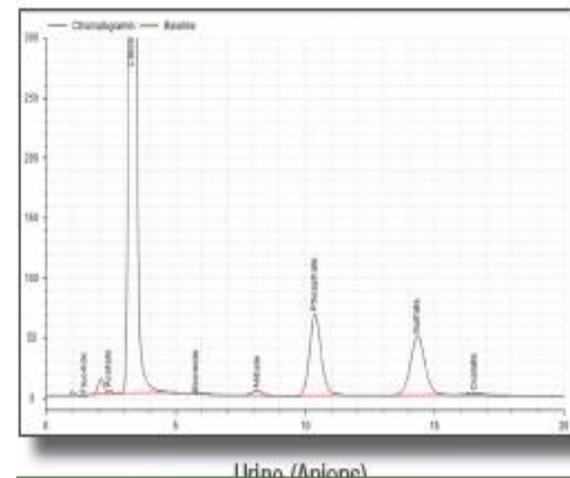
La concentración del analito es directamente proporcional a la respuesta.

La concentración se obtiene directamente por interpolación de la curva de calibración.

APLICACIONES DE INTERCAMBIO IONICO

El campo de aplicación de la cromatografía iónica es versátil. Esta técnica se abrió camino en aplicaciones rutinarias y de investigación:

- Parámetros
 - Aniones
 - Cationes
 - Ácidos orgánicos
 - Metales de transición
 - Aminas



APLICACIONES DE INTERCAMBIO IONICO

- **Aplicaciones Típicas**

- Agua potable
- Agua del grifo
- Agua de mar
- Aguas residuales
- Agua de lluvia
- Determinación de ultratrazas en plantas electrónicas y eléctricas.
- Control de calidad y análisis de impurezas.
- Análisis elemental
- Productos farmacéuticos
- Análisis de orina



Water analysis for water treatment plants



Cooling water control for power plants



Ground water analysis for quality control

GRACIAS



Q. MARICRUZ VALENCIA DE JESÚS

email: mvalenciaj@yahoo.com.mx