

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS

BASIC PRINCIPLES OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION AND ANALYSIS OF MIXTURES

Daniela Suarez Ospina*
Yovanny Morales Hernández**

Recibido: 20 de abril de 2018

Aceptado: 7 de septiembre de 2018

Resumen

La cromatografía líquida de alto rendimiento es uno de métodos más usados actualmente debido a que emplea técnicas que antes no estaban disponibles, como las cromatografías de adsorción, partición, exclusión molecular y afinidad. Este artículo da a conocer los conceptos básicos del método y las formas como se puede abordar de manera satisfactoria la separación y/o análisis de una muestra.

Palabras clave: HPLC, detectores, método, muestra, separación, análisis.

Abstract

The implementation of high performance liquid chromatography is increasing because it employs chromatography techniques that were previously unavailable as adsorption chromatography, partition chromatography, molecular exclusion chromatography and affinity chromatography. This article discloses the basic concepts of HPLC and how the separation and/or analysis of a sample using high-performance liquid chromatography can be satisfactorily addressed.

Keywords: HPLC, detectors, method, sample, separation, analysis.

INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una de las técnicas de cromatografía más utilizadas debido a su capacidad de separar analitos de distinta naturaleza presentes en una mezcla. Su aplicación industrial abarca la farmacéutica, la bioquímica, los alimentos, los productos de la industria química, la medicina clínica y la química forense. No obstante, esta amplitud de aplicaciones dificulta la toma de decisiones a la hora de desarrollar un proceso de separación por esta técnica, más si es el primer acercamiento a HPLC. Este artículo expone los conceptos básicos para el desarrollo de una primera separación; igualmente, plantea los principios de la HPLC y presenta las partes más representativas del equipo con el fin de poder entender la estructura del método propuesto.

* Estudiante de Ingeniería Química. Grupo de investigación Procesos de Separación no Convencionales (GPS), línea de investigación Simulación de Procesos Químicos y Biotecnológicos, Fundación Universidad de América, Bogotá D. C., Colombia. daniela.suarez@estudiantes.uamerica.edu.co

** Ingeniero químico. Docente investigador. Grupo de investigación Procesos de Separación no Convencionales (GPS), línea de investigación Simulación de Procesos Químicos y Biotecnológicos, Fundación Universidad de América, Bogotá D. C., Colombia. yovanny.morales@profesores.uamerica.edu.co

Principios de la HPLC

La HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan las fases móvil y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Fallon, Booth y Bell, 1987). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

Cualquier variación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido (Fallon et ál., 1987).

Ventajas

A diferencia de otras técnicas, la HPLC cuenta con varias ventajas:

- Amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales, que la hacen capaz de analizar casi cualquier mezcla deseada (Snyder, Kirkland y Dolan, 2010).
- Alta precisión en sus resultados ($\pm 0.5\%$ o menor) (Snyder et ál., 2010).
- Variedad de técnicas, entre las cuales están la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular (Fallon et ál., 1987).
- Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil (Fallon et ál., 1987).
- No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras (Fallon et ál., 1987).
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada (Fallon et ál., 1987).
- Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos (Dong, 2013).
- Alto poder de separación con detección sensible (Dong, 2013).
- La operación es flexible, personalizable y automatizada (Dong, 2013).
- No está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra (Ozores, s. f.).

Equipo

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento opera generalmente con cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador (figura 1).

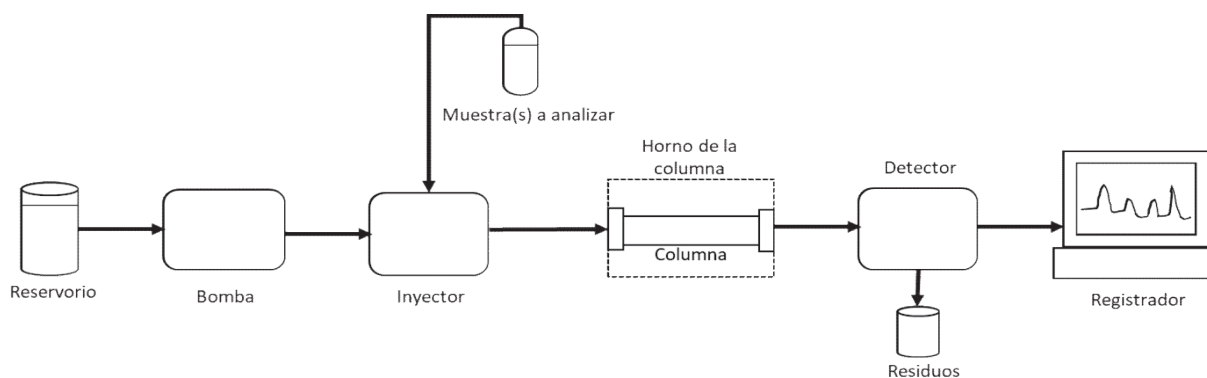


Figura 1. Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento.

Fuente: adaptado de Giri (2015).

En el reservorio se encuentra la fase móvil. Esta fase consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración (Snyder et ál., 2010).

La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5 μ L y 5 mL (Snyder et ál., 2010).

El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados (Snyder et ál., 2010).

El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma (Snyder et ál., 2010). Por otro lado, la columna está fabricada generalmente en acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria; además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10 μ m (Giri, 2015). Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna.

El detector, ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla (solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados), y universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil) (Weston y Brown, 1997).

Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación (Giri, 2015).

MÉTODO

Teniendo claras las nociones básicas del funcionamiento y principios de la cromatografía líquida de alto rendimiento se pueden revisar aquellos criterios indispensables para realizar la separación de una mezcla de analitos. En *Introduction to modern liquid chromatography* (Snyder et ál., 2010) y

Practical HPLC development (Snyder, Kirkland y Glajch, 1997), los autores proponen un método para seleccionar las condiciones de separación que provea el mejor resultado en el análisis de las muestras. Este método tiene cinco pasos:

- Evaluar la composición de la muestra y determinar las metas de separación.
- Pretratamiento de la muestra.
- Selección del modo de operación y el tipo de HPLC.
- Selección del detector.
- Selección de las condiciones de separación.

Evaluar la composición de la muestra y determinar las metas de separación

Antes de tomar cualquier decisión, es necesario evaluar la composición de la mezcla y establecer las metas de separación. Según Snyder et ál. (2010), se deben conocer tres factores de la muestra a separar:

- El número de compuestos presentes, estructura química, funcionalidad, peso molecular, valor de pKa, espectro UV y el rango aproximado de las concentraciones de cada molécula presente en la muestra.
- La solubilidad de la muestra.
- La posible existencia de enantiómeros en la muestra.

El objetivo de la separación no se debe limitar a la obtención de buena resolución y tiempo mínimo de análisis (Snyder et ál., 2010). Al respecto, Snyder et ál. (1997) sugieren dar respuesta a las siguientes preguntas con el fin de definir las metas que se quieren alcanzar, las cuales dependen de las necesidades del investigador y la naturaleza de la muestra a analizar:

- ¿Cuál es el fin principal: el análisis cuantitativo, la detección de alguna sustancia, la caracterización de los compuestos de la muestra o el aislamiento/purificación del material?
- ¿Es necesario la detección de todos los componentes presentes en la muestra?
- Si es necesario un análisis cuantitativo, ¿qué niveles de precisión y exactitud son necesarios?
- ¿Será necesario diseñar más de un procedimiento para cada tipo de muestra?
- ¿Cuántas muestras serán analizadas a la vez?
- ¿Qué equipo HPLC y qué habilidades debe tener el operador encargado de emplear el método a diseñar?

Pretratamiento de la muestra

Teniendo claras las respuestas anteriores, se valora la posibilidad de que la muestra a analizar necesite un pretratamiento. Según Snyder et ál. (1997), las razones más usuales por las que la muestra requiere el pretratamiento son:

- Necesita dilución, neutralización o cualquier otro tipo de manipulación volumétrica.
- Es sólida y necesita ser disuelta o extraída.
- Contiene sólidos suspendidos o cualquier otra interferencia o sustancia tóxica que pueda dañar el equipo, por lo que necesitan ser removidos.
- Requiere una separación parcial, ya sea para concentrar los analitos en la muestra o eliminar contaminantes.

Para la medición de distintos azúcares en residuos forestales por la técnica de HPLC, por ejemplo, es necesario emplear varios de los pretratamientos anteriormente nombrados, así: 1) reducción

volumétrica de los residuos por medio de una explosión a vapor, seguido del secado del material en un horno; 2) tratamiento del material con líquidos iónicos, con el fin de romper la pared de lignina y permitir que la hidrólisis enzimática se lleve a cabo en menor tiempo, y 3) regeneración del material lignocelulósico y separación mecánica del líquido de los sólidos, para su análisis en el cromatógrafo (Cortines, 2010).

Selección del modo de operación y el tipo de HPLC

Existen tres modos en los que se puede operar la cromatografía líquida de alto rendimiento:

- *Fase reversa.* Es la primera opción para analizar la mayoría de muestras, especialmente, aquellas que contienen sustancias neutras o no ionizadas, solubles, en mezclas de compuestos orgánicos y agua (Snyder et ál., 1997). La fase estacionaria es hidrofóbica mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente una mezcla de agua-metanol o agua-acetonitrilo (Giri, 2015).
- *Par ion.* Este modo es empleado cuando se tienen compuestos iónicos o ionizables, especialmente bases y cationes (Snyder et ál., 1997). Los iones en solución pueden ser neutralizados y separados como un par de iones en una columna de fase reversa o normal con la adición de contraiones lipofílicos (Kazakevich y McNair, 2007).
- *Fase normal.* Este método separa los analitos con base en su polaridad. La fase estacionaria (usualmente sílice) es polar, mientras la móvil es no polar. Se emplea como segunda opción cuando ninguna de las anteriores funciona; aunque es la primera opción para muestras lipofílicas que no se disuelven bien en mezclas de agua y compuestos orgánicos o mezclas de isómeros (Snyder et ál., 1997). Las sustancias comúnmente usadas como fase móvil para este método son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, éter dietílico y mezclas de estos (Giri, 2015).

Por otro lado, están los tipos de HPLC, que se clasifican según el mecanismo de retención, el cual se escoge dependiendo de la naturaleza de los compuestos presentes en la muestra. Los tipos existentes son:

- *Adsorción.* Se basa en la competencia por los analitos neutros entre la fase móvil (líquida) y la fase estacionaria (sólida) (Weston y Brown, 1997). Los compuestos de la muestra interactúan con la fase móvil a través de enlaces dipolo-dipolo reversible (AlphaCrom, s. f.). Los tiempos de retención de las moléculas dependerán de la fase estacionaria; por ejemplo, si se desea retener compuestos polares se debe utilizar una fase estacionaria igualmente polar; en el caso contrario se emplearía una fase estacionaria apolar (AlphaCrom, s. f.).
- *Partición.* En este HPLC también se da la competencia por los analitos; pero, a diferencia del método de adsorción, la fase estacionaria es un líquido. Debido a la inestabilidad de las fases líquidas estacionarias, este método no es muy empleado en la actualidad (Weston y Brown, 1997).
- *Exclusión molecular.* Es conveniente para la separación de analitos con una diferencia en su tamaño molecular mayor al 10 % para moléculas pequeñas y al 20 % para macromoléculas. Es empleado también para calcular los pesos de los compuestos de una muestra. En este tipo de HPLC, la columna funciona como un tamiz molecular con una fase estacionaria sólida porosa, en la que las moléculas más grandes son las primeras en salir (Weston y Brown, 1997).
- *Afinidad.* Este método aprovecha la tendencia de algunas sustancias a reaccionar a otras como un método cromatográfico (AlphaCrom, s. f.). Se aplica usualmente para la separación de moléculas biológicas capaces de formar complejos disociables con otras especies como las proteínas y los ácidos nucleicos. Se basa en el mecanismo de llave-herradura, característico de los sistemas biológicos, en los que el ligando (ente biológico) se une a la molécula biológica específica de este

mediante un enlace covalente a un soporte inerte. Solamente las especies que son complementarias al ligando son adsorbidas, mientras que el resto de los componentes son eluidos de la columna sin ser retenidos (Weston y Brown, 1997).

- *Intercambio iónico.* En este HPLC, la superficie de la fase estacionaria tiene una carga opuesta a la de los iones presentes en la muestra. Esta técnica es utilizada exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. El tiempo de retención de las moléculas está directamente relacionado con la carga de la muestra: entre más fuerte es la carga, la molécula tardará mayor tiempo en eluir. El método utiliza soluciones acuosas *buffer* como fase móvil, donde el pH y la fuerza iónica controlan el tiempo de elución (LaboratoryInfo, 2015).

Selección del detector

El detector usado por defecto es el de UV, ya que normalmente el rango UV de cada uno de los componentes de la muestra es fácil de encontrar en la literatura, aunque no siempre es el detector adecuado. Para tener una idea más clara de cuál detector es el más apropiado, se deben tener en cuenta las metas planteadas para la separación, los tipos de detectores y la naturaleza de la muestra. Según su mecanismo, los detectores se clasifican en:

- *Detectores de propiedades intensivas.* Miden el cambio en la propiedad intensiva (que es común para todos los compuestos), como la diferencia de las medidas entre la fase móvil con y sin la muestra. Detectan todos los compuestos. Dentro de este mecanismo se encuentran los detectores de índice de refracción, electroquímicos y de dispersión de luz (Snyder et ál., 2010).
- *Detectores específicos.* Responden a una característica única de la muestra o de algunos analitos de la muestra. En este grupo se encuentran los detectores UV-VIS de matrices de fotodiodos, de fluorescencia, de espectroscopia de masas y de conductividad eléctrica (Snyder et ál., 2010).
- *Detectores de modificación de la fase móvil.* Modifican la fase móvil después de que atraviesa la columna para producir un cambio en las propiedades del analito. Los detectores de reacción, de espectrometría de masas y de dispersión de luz por evaporación pertenecen a esta clasificación (Snyder et ál., 2010).
- *Técnicas hífenizadas.* Hacen referencia al acoplamiento de un instrumento analítico independiente al sistema de HPLC, como el LC-MS, que es un espectrofotómetro de masa acoplado al HPLC o el LC-IR (unión de un espectroscopio infrarrojo al HPLC) (Snyder et ál., 2010).

Selección de las condiciones de separación

Snyder et ál. (1997) plantean las siguientes condiciones iniciales para la separación:

- Columna de 15 x 0.46 cm con un tamaño de partícula de 5 μm .
- Fase estacionaria C_8 o C_{18} .
- Fase móvil compuesta por dos solventes: acetonitrilo y una solución *buffer* 25 mM de fosfato de potasio de pH entre 2 y 3, con una fuerza de la fase móvil (%B) entre 80 y 100 %.
- Flujo de 1.5 a 2 mL/min para la fase móvil.
- Temperatura del horno entre 35 y 45 °C.
- Inyección de menos de 25 μL de muestra.

Estas condiciones pueden ser mejoradas para una muestra en particular mediante un sistema de ensayo y error, el cual consta de tres pasos: 1) variar la fuerza de la fase móvil (%B) hasta alcanzar el rango de detección correcto; 2) modificar los valores de %B y la temperatura de separación hasta obtener valores aceptables de resolución y selectividad, y 3) cambiar de las condiciones de la columna,

como largo, tamaño de partícula y/o velocidad de flujo, hasta obtener una buena resolución y un tiempo de análisis adecuado a las necesidades de quien realiza la técnica (Snyder et ál., 2010).

Otra manera de abordar el problema de establecer las condiciones iniciales de separación es la búsqueda en la literatura de métodos de separación por HPLC de muestras similares a la(s) que se desea(n) separar. Una vez establecidas estas condiciones, se puede emplear el método de ensayo-error para adaptar mejor las condiciones y obtener buenos resultados (Snyder et ál., 2010).

En este punto del desarrollo del método, se debe verificar que este cumpla efectivamente con las metas planteadas, minimice el tiempo de análisis y sea reproducible y robusto (Agilent Technologies, s. f.).

Por último, es importante mencionar que no todos los pasos descritos deben ser llevados a cabo, esto depende de la complejidad de la muestra y las metas propuestas para la separación (Snyder et ál., 1997).

CONCLUSIONES

La HPLC es una técnica rápida para el análisis y separación de mezclas. Los avances tecnológicos relacionados con esta técnica permiten analizar una amplia gama de analitos de manera eficiente y precisa. Es por esto que se han propuesto varios métodos para poder establecer las mejores condiciones y se han desarrollado equipos para la separación de muestras de diferentes naturalezas.

Después de la búsqueda bibliográfica, se puede concluir que la base para desarrollar un buen método de separación de una o varias muestras por HPLC radica en el conocimiento de los principios de la técnica y las propiedades de los analitos. Igualmente, es de suma importancia tener claras las metas o el fin último de la separación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud al grupo de investigación en Procesos Separaciones no Convencionales (GPS), por el apoyo a la investigación.

REFERENCIAS

- Fallon, A., Booth, R., y Bell, L. (1987). *Applications of HPLC in biochemistry* (1.ª ed.). EE. UU.: Elsevier Science Ltd.
- Agilent Technologies. (s. f.). *The secrets of rapid HPLC method development. Choosing columns for rapid method development and short analysis times*. Recuperado de <https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/Microsoft%20PowerPoint%20-%20Rapid%20HPLC%20Method%20Development.pdf>
- Alphacrom. (s. f.). *Chromatography Basics*. Recuperado de <http://www.alphacrom.com/en/hplc-basics>
- Cortines, V. (2010). *Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos* (tesis de maestría). Maestría en Ciencias de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Dong, M. (2013). The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. *LCGC North America*, 31(6), 472-479.
- Giri, D. (2015). High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications. *LaboratoryInfo*. Recuperado de <https://laboratoryinfo.com/hplc/>

- Kazakevich, Y., y McNair, H. (Eds.). (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. Recuperado de http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/glossary/df_ionex.html
- Ozores, M. (s. f.). Cromatografía de líquidos HPLC. *Laboratorios de técnicas instrumentales UVA*. Recuperado de <http://laboratorioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografia-de-liquidos-hplc>
- Snyder, L., Kirkland, J., y Dolan, J. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3.^a ed.). Hoboken, EE. UU.: John Wiley & Sons Inc.
- Snyder, L., Kirkland, J., y Glajch, J. (1997). *Practical HPLC method development* (2.^a ed.). Hoboken, EE. UU.: John Wiley & Sons Inc.
- Weston, A., y Brown, P. (1997). *HPLC and CE: principles and practice*. San Diego, EE. UU.: W.B. Saunders Company.