

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta

llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido.²¹

Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.²¹

Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo del compuesto, sus partes lo describe la figura 3.²¹

El papel esencial de las bombas es impulsar a la fase móvil con presión y flujo constante, el proceso de inyección de la muestra en la actualidad es automática, las columnas que se utilizan normalmente son de acero inoxidable y los detectores su papel fundamentalmente es de indicar el momento de aparición de los diferentes componentes que constituyen la muestra, calificarlo cuantitativamente como cualitativamente.²¹



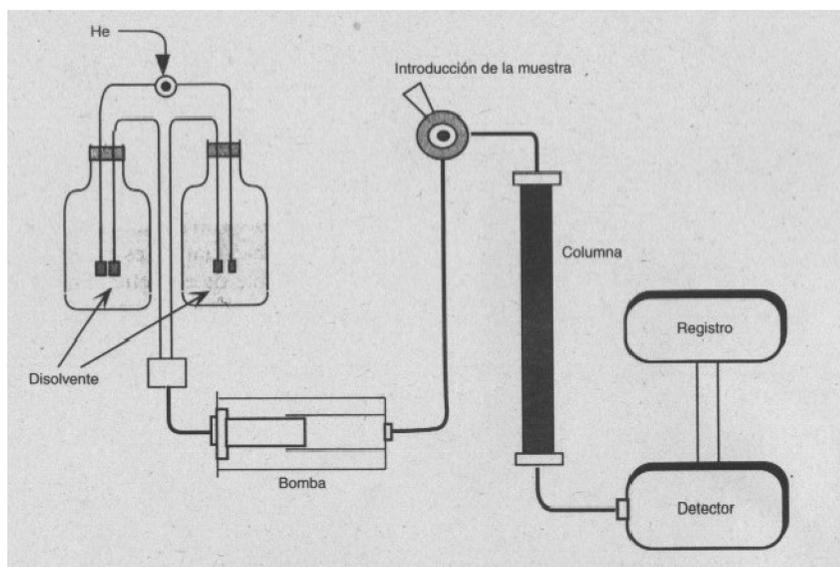


Figura 3. Partes fundamentales en las que se compone un HPLC.
Tomado de: Skoog, Leary. 2000.

El uso de la cromatografía ha demostrado ser muy significativo para el estudio del ácido lipóico, un tipo de cromatografía utilizado fue el HPLC-fase inversa (figura 4), porque trabaja con las polaridades de los compuestos que se van analizar en el futuro, ya que la fase móvil es mas polar que la fase estacionaria. La fase móvil es agua con un componente menos polar como puede ser: agua/metanol, agua/ACN.²¹

El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, tal es el caso del ácido lipóico que es un compuesto apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.²¹

En este tipo de estudios, los proveedores recomiendan que se filtre y se desgasifique todo componente antes de ser introducido a un sistema de HPLC, esto con el propósito de evitar daños futuros.²¹

En el análisis de ácido lipóico todos los solventes, el agua de HPLC, junto con la fase móvil deben ser pasados a través de un filtro de 4 μ y desgasificados al bajo vacío, antes de su uso.²¹

Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. El efecto hidrofobico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil.²¹

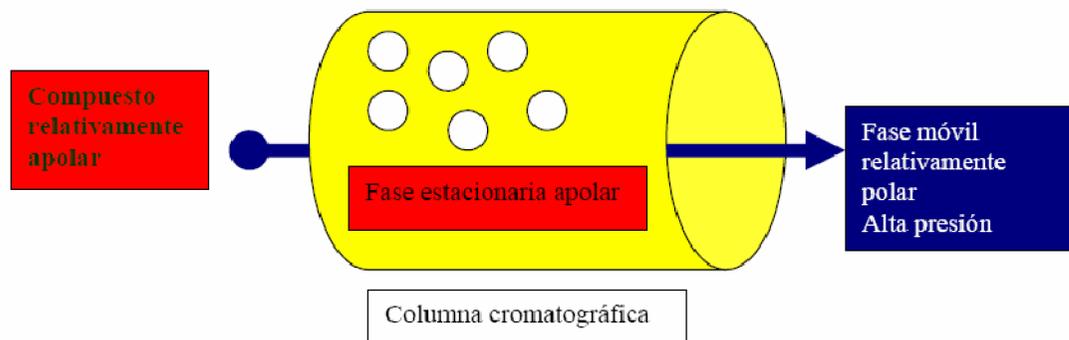


Fig. 4 Representación de cromatografía de fase inversa.

Tomado de: Skoog, Leary. 2000.

Proceso de derivatización

Derivatización pre-columna. Esta acoplada con cromatografía de fase reversa en lugar de cromatografía de intercambio catiónico, fue originalmente introducida como respuesta al incremento en la demanda de mayor sensibilidad y mayor velocidad de análisis, las ventajas de la metodología de la derivatización pre-columna incluyen simplicidad, velocidad y alta sensibilidad.²²

Por ello, si se requiere máxima sensibilidad de detección, un reactivo fluorescente combinado con la derivatización pre-columna es el método más indicado.²²

Como desventaja está la necesidad de garantizarse la completa reacción del reactivo derivatizante y la posibilidad de interferencia con la separación por exceso del reactivo, el medio de reacción o la producción de diferentes derivados de un componente.²²

Además la estabilidad del derivado puede ser un importante factor durante la derivatización pre-columna, la demora entre la derivatización y la inyección llega a ser fundamental para los resultados obtenidos.²²

La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.²²

Solvente utilizado para el análisis de ácido lipóico

El uso de agentes acarreadores es de suma importancia ya que es quien transporta la muestra por todo el sistema de HPLC, en el análisis de ácido lipóico el solvente mas efectivo para su elusión es una mezcla de agua/ACN en concentraciones de (80:20), por ser bajo en contenido de impurezas, disolviéndose junto con la muestra, sin degradar la fase estacionaria y es de baja viscosidad lo que le permite reducir caídas de presión.²²