

TEMA 4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

4.0. CARACTERÍSTICAS Y EQUIPOS DISPONIBLES

4.0.1. Características más importantes

4.0.2. Equipos disponibles en el departamento de Ingeniería Química y en los Servicios Técnicos de investigación de la Universidad de Alicante

4.1. INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

4.1.1. Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes

4.1.2. Sistemas de bombeo

4.1.2.1. Tipos de bombas

4.1.2.2. Amortiguadores de pulsos

4.1.2.3. Control del caudal y sistemas de programación

4.1.3. Sistemas de inyección de muestra

4.1.4. Columnas para cromatografía de líquidos

4.1.4.1. Columnas analíticas

4.1.4.2. Precolumnas

4.1.4.3. Termostatos

4.1.4.4. Tipos de rellenos de la columna

4.1.5. Detectores

4.1.5.1. Detectores de absorbancia

4.1.5.2. Detectores de fluorescencia

4.1.5.3. Detectores de índice de refracción

4.1.5.4. Detector de dispersión de luz

4.1.5.5. Detectores electroquímicos

4.2. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA HPLC

4.2.1. Cromatografía de reparto

4.2.1.1. Columnas para cromatografía con fases unidas químicamente

4.2.1.2. Establecimiento del método en cromatografía de reparto

4.2.1.3. Aplicaciones de la cromatografía de reparto

4.2.2. Cromatografía de adsorción

4.2.2.1. Selección del disolvente en cromatografía de adsorción

4.2.2.2. Aplicaciones de la cromatografía de adsorción

4.2.3. Cromatografía iónica

4.2.3.1. Equilibrios de intercambio iónico

4.2.3.2. Rellenos de intercambio iónico

4.2.3.3. Aplicaciones inorgánicas de la cromatografía iónica

4.2.3.4. Aplicaciones orgánicas y bioquímicas

4.2.4. Cromatografía de exclusión por tamaños

4.2.4.1. Rellenos de columna

4.2.4.2. Aplicaciones de la cromatografía de exclusión por tamaños

4.0. CARACTERÍSTICAS Y EQUIPOS DISPONIBLES

4.0.1. Características más importantes

Aplicaciones principales: Técnica de separación para los materiales menos volátiles e iónicos; análisis cuantitativo de multicomponentes.

Fenómeno molecular: Reparto entre una solución líquida y un sustrato

Ventajas en el análisis cualitativo: Separa materiales para su examen por medio de otras técnicas.

Ventajas en el análisis cuantitativo: Aplicación amplia a los materiales menos volátiles, análisis de multicomponentes.

Muestra promedio deseable: 10 mg

Limitaciones del método: Se tarda en desarrollar el método

Limitaciones para la muestra: Ninguna

4.0.2. Equipos disponibles en el departamento de Ingeniería Química y en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante

Dpto de Ingeniería Química

Tres cromatógrafos Shimadzu.

Detectores de absorbancia ultravioleta, de conductividad iónica y de índices de refracción.

Termostatos para control de la temperatura de la columna.

Servicios Técnicos de Investigación

Tres cromatógrafos (Shimadzu, Waters y Dionex) todos con posibilidades de gradientes de concentración de eluyente.

Detectores de absorción ultravioleta, índices de refracción, fluorescencia, conductividad, serie de diodos (UV) y espectrometría de masas.

Termostatos para control de la temperatura de la columna.

Un inyector automático de muestras.

Este capítulo trata de los cuatro tipos básicos de cromatografía en los que la fase móvil es un líquido: (1) *cromatografía de reparto*; (2) *cromatografía de adsorción, o líquido-sólido*; (3) *cromatografía iónica*; y (4) *cromatografía de exclusión por tamaños, o en geles*. Todo este capítulo tiene relación con las aplicaciones en columna de estos cuatro importantes tipos de cromatografía.

En una primera etapa la cromatografía de líquidos se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. En este tipo de columnas realizó Tswett sus trabajos originales. Para asegurar unos caudales razonables, el diámetro de las partículas de la fase estacionaria sólida por lo general era de 150 a 200 μm . Incluso así, los caudales eran bajos, llegando a unas pocas décimas de mililitro por minuto. En consecuencia, los tiempos de separación eran largos -a menudo de varias horas-. Los intentos para acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío, o por bombeo no resultaron efectivos, puesto que el aumento de caudal originaba un aumento de la altura de plato por encima del mínimo característico que se observa en las gráficas de la altura de plato frente al caudal y el resultado era una menor eficacia.

En las primeras etapas del desarrollo de la cromatografía de líquidos, los científicos se dieron cuenta de que se podían conseguir grandes aumentos en la eficacia de la columna disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos. Sin embargo, no fue sino hasta finales de los años sesenta cuando se desarrolló la tecnología adecuada para producir y utilizar rellenos de tamaño de partícula del orden de los 3 o 10 μm . Esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada, que contrasta con las simples columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, que todavía se utilizan con fines preparativos, se emplea la denominación de *cromatografía de líquidos de alta resolución* (HPLC).

Es incuestionable que la cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada, con unas ventas anuales de equipos de HPLC que se aproximan a la cifra de cientos de miles de millones de pesetas. 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 los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas.

La Figura 4.1 pone de manifiesto que los distintos procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos tienden a ser complementarios por lo que a sus campos de aplicación se refiere. Así, para solutos con masas moleculares superiores a 10 000, a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase inversa. Para especies iónicas de baja masa molecular, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de reparto se aplican a las especies poco polares pero no iónicas. Además, este procedimiento se utiliza muchas veces para la separación de los integrantes de una serie homóloga. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar compuestos como, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos.

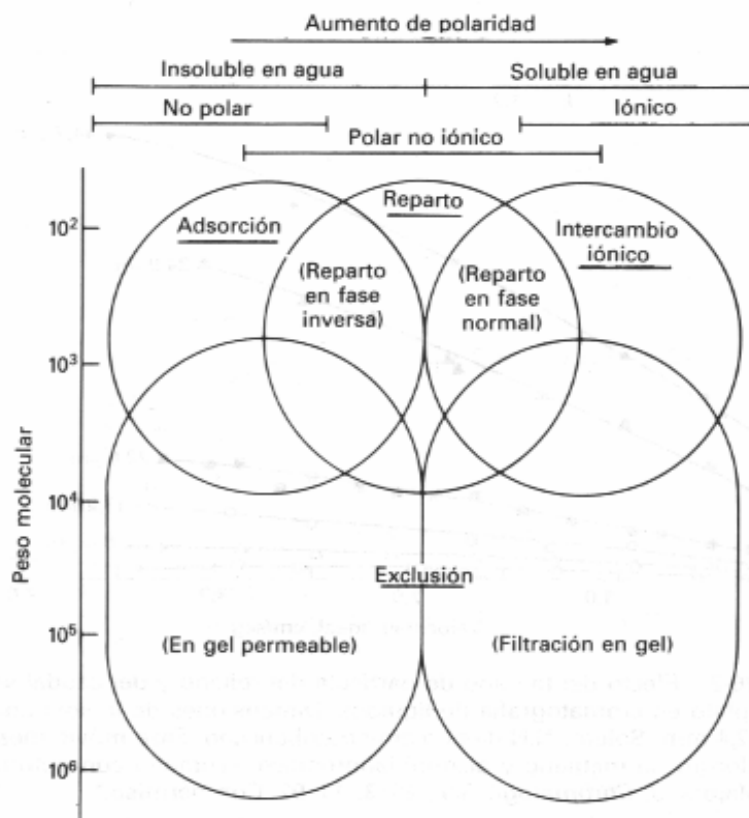


Figura 4.1. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos

Por otro lado, la discusión sobre el ensanchamiento de banda del tema 2 es aplicable a la cromatografía de líquidos. A continuación se ilustra el importante efecto del tamaño de partícula del relleno y se describen otras dos causas del ensanchamiento de zona, que a veces son de notable importancia en cromatografía de líquidos,

Efectos del tamaño de partícula del relleno. El coeficiente de transferencia de masa de la fase móvil es función inversa del cuadrado del diámetro de las partículas que constituyen el relleno. Como consecuencia de ello, la eficacia de una columna de HPLC debería mejorar espectacularmente cuando disminuye el tamaño de partícula. Por ejemplo una reducción del tamaño de partícula de 45 a 6 μm origina una disminución de diez o más veces de la altura de plato.

Ensanchamiento de banda extracolumna en cromatografía de líquidos. En cromatografía de líquidos, tiene lugar a veces un ensanchamiento de banda significativo fuera del relleno de la columna. Este ensanchamiento, denominado *ensanchamiento de banda extracolumna*, tiene lugar cuando se transporta el soluto a través de tubos como los que se utilizan en los sistemas de inyección, en los detectores y en los tubos que conectan los distintos componentes del sistema. El ensanchamiento proviene de la diferente velocidad de flujo que hay entre las capas de líquido adyacentes a las paredes del tubo y las del centro. Como consecuencia, la parte central de una banda de soluto se mueve con más rapidez que la periferia. En cromatografía de gases la difusión compensa la dispersión extracolumna. Sin embargo, la difusión en los líquidos es significativamente menor, y con frecuencia este tipo de ensanchamiento de banda se hace evidente.

Cuando se utilizan columnas de pequeño diámetro, el ensanchamiento extracolumna puede hacerse bastante importante. En este caso, todos los esfuerzos han de orientarse a la reducción del radio de los tubos del sistema externos a la columna.

Efecto del tamaño de muestra en la eficacia de la columna. La cantidad de muestra (μg de muestra/ g de relleno) también afecta a la eficacia de la columna. Para las aplicaciones con columnas de reparto y adsorción, la eficacia decrece notablemente con la cantidad de muestra. En columnas de fase inversa el decrecimiento en eficacia es mucho mas pequeño.

4.1. INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 3 y 10 μm , que, por otra parte, son comunes en la moderna cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. La Figura 4.2 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico. Cada uno de los componentes se trata en los párrafos que siguen a continuación.

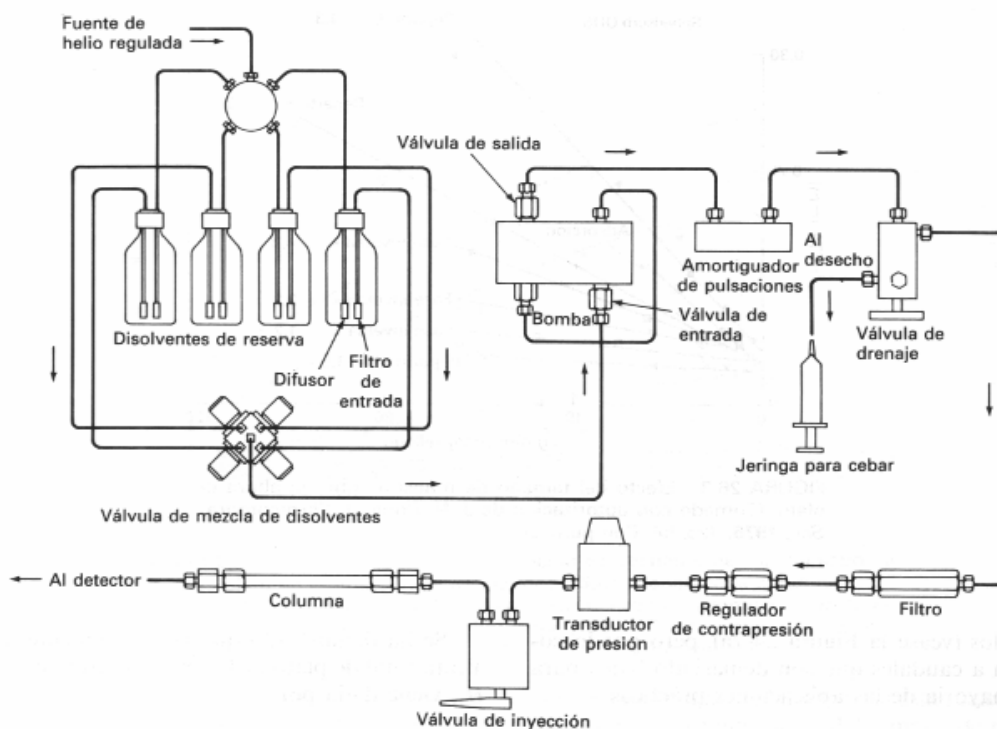


Figura 4.2. Esquema de un aparato de HPLC

4.1.1. Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes

Un aparato moderno de HPLC se equipa con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene unos 500 mL de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos -en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o, como se muestra en la Figura 4.2, sistemas de *difusión* que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes. No es necesario que los desgasificadores y los filtros sean partes integrantes de los sistemas de HPLC como se muestra en la Figura 4.2. Por ejemplo, una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en filtrarlos mediante el vacío a través de un filtro de poro muy pequeño. Este tratamiento elimina los gases además de la materia en suspensión.

Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina una *elución isocrática*. Con frecuencia, la eficiencia de la separación se aumenta notablemente por una *elución con gradiente*. En este caso se utilizan dos (y a veces más) disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez 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.

La Figura 4.3 ilustra la ventaja de una elución con gradiente en la separación de una mezcla de clorobenzenos. La curva (b) corresponde a la elución isocrática con metanol/agua 50:50 (v/v). La curva (a) muestra la elución con gradiente, que se inicia con una mezcla 40:60 de los dos disolventes y se va aumentando la concentración de metanol un 8%/min. Obsérvese que la elución con gradiente acorta notablemente el tiempo de separación sin sacrificar la resolución de los primeros picos. Nótese también que la elución con gradiente produce unos efectos similares a los producidos por la programación de temperatura en cromatografía de gases.

4.1.2. Sistemas de bombeo

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen: (1) la generación de presiones por encima de 400 kg/cm^2 , (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de caudales de 0.1 a 10 mL/min, (4) el control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo y (5) componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón). Debe subrayarse que las altas presiones que generan las bombas de HPLC no constituyen un riesgo de explosión, debido a que los líquidos no son muy compresibles. De este modo, la rotura de un componente del sistema sólo supone una pérdida de disolvente. Es evidente que esta pérdida puede suponer un riesgo de incendio.

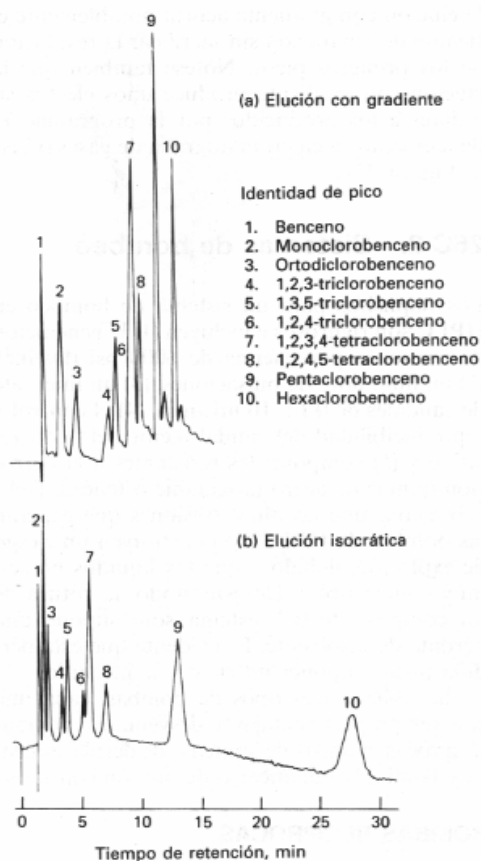


Figura 4.3. Mejora de la eficiencia de la separación mediante la elución con gradiente. Columna de 1 m x 2.1 mm d.i. de acero inoxidable, relleno 1% Permaphase ODS. Muestra: 5 μ L de bencenos clorados en isopropanol. Detector: fotómetro de UV (254 nm). Condiciones: temperatura 60°C, presión 80 kg/cm². (a) elución con gradiente: metanol 40% / agua 60% e incremento de la proporción de metanol a una velocidad de un 8% / min (b) Elución isocrática con metanol 50% / agua 50%

4.1.2.1. Tipos de bombas

Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.

Las bombas recíprocas, que se utilizan en aproximadamente el 90% de los sistemas de HPLC comercializados, consisten, por lo general, en una pequeña cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor. Dos válvulas con cierre de bola, que se abren y cierran alternativamente, controlan el flujo del disolvente hacia dentro y hacia afuera de un cilindro. Las bombas recíprocas tienen la desventaja de que producen un flujo con pulsaciones, las cuales se han de amortiguar dado que su presencia se manifiesta como ruido en la línea base en el cromatograma. Entre las ventajas de las bombas recíprocas se pueden citar su pequeño volumen interno (35 a 400 mL), sus altas presiones de salida (por encima de los 500 kg/cm²), su fácil adaptación a la elución con gradiente, y sus caudales constantes, que son prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad del disolvente.

4.1.2.2. Amortiguadores de pulsos

Muchos de los detectores utilizados en HPLC son sensibles a variaciones de flujo. Un método sencillo de amortiguación contiene un fuelle flexible o un gas compresible en la porción superior cerrada de un tubo en T para absorber parte de la energía de pulsación. Cuando la bomba se rellena esta energía se libera para ayudar a suavizar la pulsación de presión. Los amortiguadores electrónicos de pulsos proporcionan una carrera hacia delante corta y rápida del pistón, y enseguida la carrera rápida de recarga de la bomba. El pequeño impulso hacia delante amortigua el pulso de flujo llevando disolvente a la presión del sistema.

4.1.2.3. Control del caudal y sistemas de programación

Como una parte de sus sistemas de bombeo, muchos instrumentos comerciales se equipan con dispositivos controlados por ordenador que permiten medir el caudal mediante la determinación de la caída de presión a través de un restrictor colocado en la salida de la bomba. Cualquier diferencia entre la señal y un valor preestablecido se utiliza para aumentar o disminuir la velocidad del motor de la bomba.

Por otro lado, la mayor parte de los instrumentos pueden variar la composición del disolvente bien sea de una forma continua o bien de forma escalonada.

4.1.3. Sistemas de inyección de muestra

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 500 μL . Además, se ha de poder introducir la muestra sin despresurizar el sistema.

En cromatografía de líquidos el método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza bucles de muestra, como el que se muestra en la Figura 4.4. Estos dispositivos están normalmente integrados en el equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 μL . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 500 kg/cm^2 con una precisión relativa de unas décimas por ciento. También existen válvulas de inyección de micromuestras, con bucles con volúmenes de 0,5 a 5 μL .

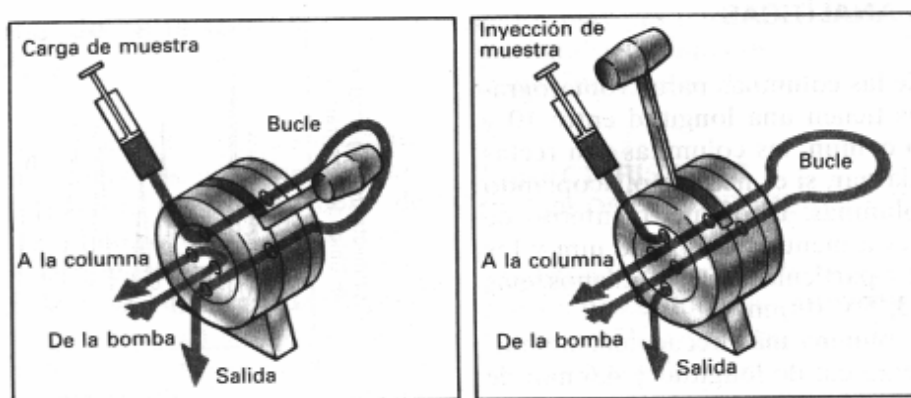


Figura 4.4. Bucle de muestra para cromatografía de líquidos.

4.1.4. Columnas para cromatografía de líquidos

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Cientos de columnas empaquetadas que difieren en tamaño y relleno se comercializan por distintos fabricantes y su coste oscila, por lo general, de 30 000 a 100 000 pesetas.

4.1.4.1. Columnas analíticas

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 5 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 μm .

Tal vez la columna más frecuentemente utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partículas de 5 μm . Estas columnas tienen de 40 000 a 60 000 platos/metro.

También, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5 μm . A menudo su longitud es de 3 a 7.5 cm. Estas columnas tienen hasta 100 000 platos/metro y presentan la ventaja de la rapidez y del mínimo consumo de disolvente. La última propiedad es de considerable importancia, puesto que los disolventes de alta pureza que se requieren en cromatografía de líquidos son muy caros.

4.1.4.2. Precolumnas

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Además, en cromatografía líquido-líquido, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión.

4.1.4.3. Termostatos

En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura, y las columnas trabajan a temperatura ambiente. Sin embargo, muchas veces si se controla la temperatura de la columna en unas pocas décimas de grado centígrado, se obtienen mejores cromatogramas. La mayoría de los instrumentos comerciales llevan actualmente hornos para las columnas que controlan la temperatura de la columna a las décimas de grado, desde la temperatura ambiente hasta 150 °C. Para poder controlar con precisión la temperatura, las columnas también se pueden colocar en camisas con agua que provenga de un baño a temperatura constante.

4.1.4.4. Tipos de rellenos de la columna

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 a 40 μm . En la superficie de estas bolas se deposita una capa delgada y porosa de sílice, alúmina 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. Por lo general, los rellenos peliculares se utilizan ampliamente en las precolumnas y no en las columnas analíticas.

Los típicos rellenos de partículas porosas de cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm y con la menor dispersión posible para un tamaño determinado. Las partículas son de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico, aunque la sílice es el material más común. Las partículas de sílice se sintetizan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores al micrón 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.

4.1.5. Detectores

A diferencia de la cromatografía de gases, en la cromatografía de líquidos no hay detectores tan aplicables universalmente ni tan fiables como los detectores de ionización de llama y de conductividad térmica. Uno de los mayores retos en el desarrollo de la cromatografía de líquidos ha sido el perfeccionamiento de los detectores.

Un detector ideal para cromatografía de líquidos debería poseer todas las propiedades listadas en relación con la cromatografía de gases, con la excepción de que un detector para cromatografía de líquidos no es necesario que sea sensible en un intervalo tan grande de temperaturas. Además, un detector de HPLC debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda.

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los *detectores basados en una propiedad de la disolución* responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los *detectores basados en una propiedad del soluto* responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil. En la Tabla 4.1 se indican los detectores más comunes empleados en HPLC y algunas de sus propiedades más importantes. Un informe de 1982 sobre 365 trabajos publicados en los que tenía un papel importante la cromatografía de líquidos, reveló que el 71 % se utilizaban en la detección de la absorción UV, el 15% la fluorescencia, el 5,4% el índice de refracción, el 4,3% empleaba medidas electroquímicas y el 4,3% restante otras medidas.

4.1.5.1. Detectores de absorbancia

La Figura 4.5 muestra el esquema de una cubeta de flujo en forma de Z para la medida de la absorbancia de los efluentes de una columna cromatográfica. A fin de minimizar el ensanchamiento de banda extracolumna, el volumen de estas cubetas ha de ser lo menor posible, de modo que los volúmenes se limitan por lo común de 1 a 10 μL y las longitudes de la cubeta de 2 a 10 mm. La utilización de cubetas de este tipo está restringida a presiones no mayores de unos 50 kg/cm^2 .

Tabla 4.1. Características de los detectores de HPLC

Detector LC	Disponible comercialmente	LOD de masa (detectores comerciales) ^a	LOD de masa (situación actual) ^b
Absorbancia	Si ^c	100 pg-1 ng	1 pg
Fluorescencia	Si ^c	1-10 pg	10 fg
Electroquímico	Si ^c	10 pg-1 ng	100 fg
Índice de refracción	Si	100 ng-1 μ g	10 ng
Conductividad	Si	500 pg-1 ng	500 pg
Espectrometría de masas	Si ^d	100 pg-1 ng	1 pg
FT-IR	Si ^d	1 μ g	100 ng
Dispersión de luz ^e	Si	10 μ g	500 ng
Actividad óptica	No	—	1 ng
Selectivo de elemento	No	—	10 ng
Fotoionización	No	—	1 pg-1 ng

^a El LOD de masa se calcula para una masa inyectada que proporciona una señal igual a cinco veces el ruido σ , empleando un compuesto de masa molecular 200 g/mol e inyectando 10 μ L en LC convencional o 1 μ L en LC con columnas microcapilares.

^b La misma definición que en *a*, pero el volumen inyectado por lo general es menor.

^c Disponible comercialmente sólo para LC con columnas microcapilares.

^d Disponible comercialmente, todavía muy caro.

^e Incluyendo la dispersión de luz de bajo ángulo y la nefelometría.

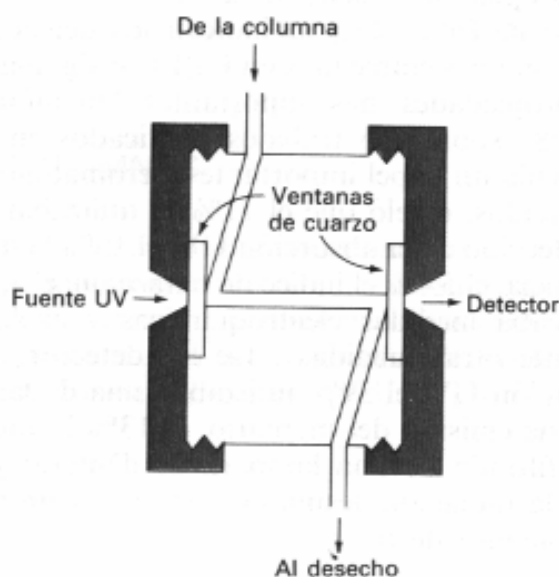


Figura 4.5. Celda de detector ultravioleta en HPLC

Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados. También se utilizan instrumentos de un solo haz. En este caso, las medidas de intensidad del disolvente se almacenan en la memoria de un ordenador y al final se recuperan para el cálculo de la absorbancia.

Detectores de absorción ultravioleta con filtros. Los detectores de absorción UV más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Lo más común en estos casos es aislar la línea intensa a 254 nm por medio de filtros; en algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a 250, 313, 334 y 365 nm empleando otros filtros. Resulta obvio que este tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda. Algunos grupos funcionales orgánicos y diversas especies inorgánicas exhiben una banda ancha de absorción a una o más de esas longitudes de onda.

Detectores de absorción ultravioleta con monocromadores. La mayoría de los fabricantes de instrumentos de HPLC ofrecen detectores que consisten en un espectrofotómetro de barrido con óptica de red. Algunos se limitan a la radiación ultravioleta; mientras que otros abarcan la radiación ultravioleta y la visible. Se pueden elegir varios modos operacionales. Por ejemplo, se puede obtener el cromatograma completo a una sola longitud de onda o alternativamente, cuando los picos que eluyen están suficientemente separados, se puede elegir distinta longitud de onda para cada pico. En este caso, debe emplearse el control por ordenador para elegir la mejor longitud de onda en cada caso. Cuando se desean los espectros completos con fines de identificación, se puede parar el flujo del eluyente durante un tiempo suficiente que permita el barrido de la región de longitud de onda que interesa.

Los detectores espectrofotométricos de ultravioleta más potentes son los instrumentos de series de diodos. Algunos fabricantes ofrecen este tipo de instrumentos, que permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo. De esta forma, los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger y almacenar a medida que van saliendo de la columna. Una de las formas de presentación de los datos espectrales, que resulta útil para la identificación de las especies y para elegir las condiciones de la determinación cuantitativa, consiste en un gráfico tridimensional tal como el que se muestra en la Figura 4.6. En este caso, los espectros se obtuvieron a intervalos de cinco segundos. La aparición y desaparición de cada uno de los esteroides en el efluente de la columna resulta evidente.

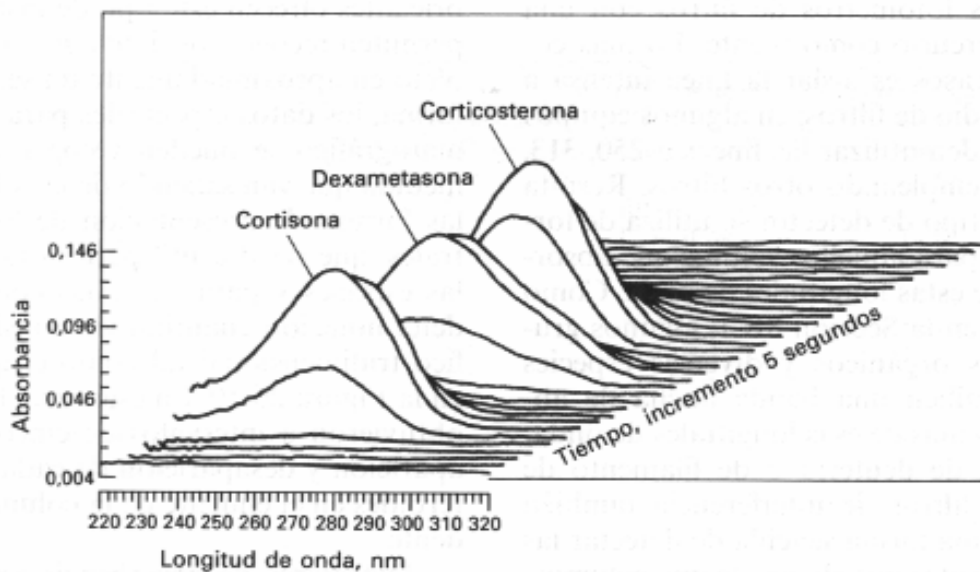


Figura 4.6. Espectros de absorción del efluente de una columna de HPLC tomados a intervalos de 5 s para una mezcla de tres esteroides.

Detectores de absorbanza en el infrarrojo. Comercialmente se ofrecen dos tipos de detectores de infrarrojo. El primero con barrido de longitud de onda que proporcionan tres segmentos de filtro semicirculares. El segundo, mucho más sofisticado, es un tipo de detector infrarrojo que se basa en los instrumentos de transformada de Fourier.

Las cubetas de los detectores de infrarrojo son semejantes a las de radiación ultravioleta excepto en que las ventanas se construyen de cloruro de sodio o de fluoruro de calcio. Las longitudes de la cubeta oscilan de 0.2 a 1.0 mm, y los volúmenes de 1.5 a 10 μL . Los instrumentos de infrarrojo más sencillos pueden trabajar a una o más longitudes de onda; alternativamente, se pueden obtener los espectros de los picos parando el flujo en su tiempo de elución. Los instrumentos con transformada de Fourier se utilizan de manera análoga a los instrumentos de series de diodos para las medidas de absorbanza ultravioleta que se han descrito en la sección anterior.

Una de las mayores limitaciones al uso de los detectores de infrarrojo se debe a la baja transparencia de muchos de los disolventes que se utilizan. Por ejemplo, las bandas anchas de absorción infrarroja del agua y de los alcoholes impiden prácticamente el uso de este detector para muchas aplicaciones.

4.1.5.2. Detectores de fluorescencia

Los detectores de fluorescencia para HPLC son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros. En la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente. Los futuros desarrollos en los detectores de fluorescencia probablemente se basarán en el uso de fuentes de láser sintonizables, las cuales permiten una mayor sensibilidad y selectividad.

Una ventaja inherente a los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbanza. En cromatografía de líquidos se ha aprovechado esta ventaja para la separación y determinación de los componentes fluorescentes de las muestras.

4.1.5.3. Detectores de índice de refracción

Estos detectores miden la diferencia de índice de refracción, entre el disolvente que en su camino hacia la columna pasa a través de una mitad de la cubeta y el efluente de la columna que pasa por la otra mitad. Los dos compartimentos están separados por una placa de vidrio montada a un ángulo de modo que si las dos disoluciones difieren en el índice de refracción se produce una desviación de un haz de luz incidente. El desplazamiento del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma.

Los detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Es decir, son detectores universales análogos a los detectores de llama en cromatografía de gases. Además, son fiables y no dependen del caudal. Sin embargo, son muy sensibles a los cambios de temperatura, y se han de mantener a una temperatura constante en unas pocas milésimas de grado centígrado. Por otra parte, no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores, y por lo general no se pueden utilizar en la elución con gradiente.

4.1.5.4. *Detector de dispersión de luz*

Recientemente, se ha comercializado un nuevo tipo de detector general para la HPLC, el *detector de dispersión de luz* (ELSD). En este detector, el efluente de la columna se pasa a un nebulizador donde se convierte en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno o aire. Las finas gotitas se llevan a través de un tubo de conducción a temperatura controlada donde tiene lugar la evaporación de la fase móvil, lo que origina unas finas partículas de analito. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz láser. Mediante un fotodiodo de silicio se detecta la radiación dispersada perpendicularmente al flujo.

Una de las mayores ventajas de este tipo de detector es que su respuesta resulta ser aproximadamente la misma para todos los solutos no volátiles. Además es notablemente más sensible que el detector de índice de refracción.

4.1.5.5. *Detectores electroquímicos*

Los fabricantes de instrumentos proporcionan en la actualidad varios tipos de detectores electroquímicos. Estos dispositivos se basan en cuatro métodos electroanalíticos que incluyen la amperometría, la voltamperometría, la coulombimetría y la conductimetría.

4.2. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA HPLC

4.2.1. Cromatografía de reparto

La cromatografía de reparto ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado. En el pasado, la mayoría de las aplicaciones se han referido a compuestos polares no iónicos de baja a moderada masa molecular (< 3000). Sin embargo, recientemente se han desarrollado algunos métodos que han extendido las separaciones de reparto a los compuestos iónicos.

La cromatografía de reparto se puede subdividir en cromatografía *líquido-líquido* y *cromatografía con fases unidas químicamente (enlazadas)*. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma como se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno. En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física. En fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. La cromatografía de reparto, al principio era del tipo líquido-líquido; sin embargo, en la actualidad los métodos de fase enlazada son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquido. Una de esas desventajas es la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que hace necesario un periódico recubrimiento de las partículas del soporte. Por otra parte, el problema de la solubilidad de la fase estacionaria impide el uso de los rellenos de fase líquida en la elución con gradiente. La discusión se centrará exclusivamente en la cromatografía de reparto con fases unidas químicamente.

4.2.1.1. *Columnas para cromatografía con fases unidas químicamente*

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos con fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm . La superficie de la

sílice totalmente hidrolizada está constituida por grupos SiOH químicamente reactivos. Las superficies de sílice características contienen cerca de $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ de grupos SiOH.

Los recubrimientos de fase enlazada más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano.

Rellenos de fase inversa y de fase normal. 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 colocadas sobre partículas de sílice o alúmina. Por razones históricas, a este tipo de cromatografía se le conoce ahora como *cromatografía en fase normal*. En la *cromatografía en fase inversa (o reversa)*, 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). En cromatografía en fase normal, el componente *menos polar* se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un *aumento* de la polaridad de la fase móvil provoca una *disminución* del tiempo de elución. Por contraste, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero, y un *aumento* de la polaridad de la fase móvil *aumenta* el tiempo de elución.

Los rellenos de fase enlazada se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido químicamente tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares. Tal vez las tres cuartas partes de toda la cromatografía de líquidos de alta resolución se llevan a cabo normalmente con rellenos de fase inversa. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C_8 (n-octilo) o una cadena C_{18} (n-octadecilo). En estas preparaciones, los grupos de hidrocarburo de cadena larga se alinean el uno junto al otro y en perpendicular a la superficie de la partícula, dando una estructura semejante a una brocha o a un cepillo.

La Figura 4.7 ilustra el efecto de la longitud de la cadena del grupo alquilo sobre la eficiencia. Como se esperaba, las cadenas más largas originan rellenos que muestran una mayor retención. Además, una mayor longitud de la cadena permite una mayor cantidad de muestra.

En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía en fase inversa, la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad como es el caso de una solución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Se ha de procurar que el pH sea menor de, aproximadamente, 7,5 porque si no puede tener lugar la hidrólisis del siloxano, lo que originaría la degradación o destrucción del relleno.

Con rellenos de fase enlazada en fase normal, R en la estructura del siloxano es un grupo funcional polar como es el caso de los grupos ciano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), diol ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) y los dimetilamino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$). Las polaridades de estos materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el tipo amino el más polar. Los rellenos de diol son de una polaridad intermedia. Con los rellenos de fase normal, la elución se realiza con disolventes relativamente no polares, tales como el etiléter, el cloroformo y el n-hexano.

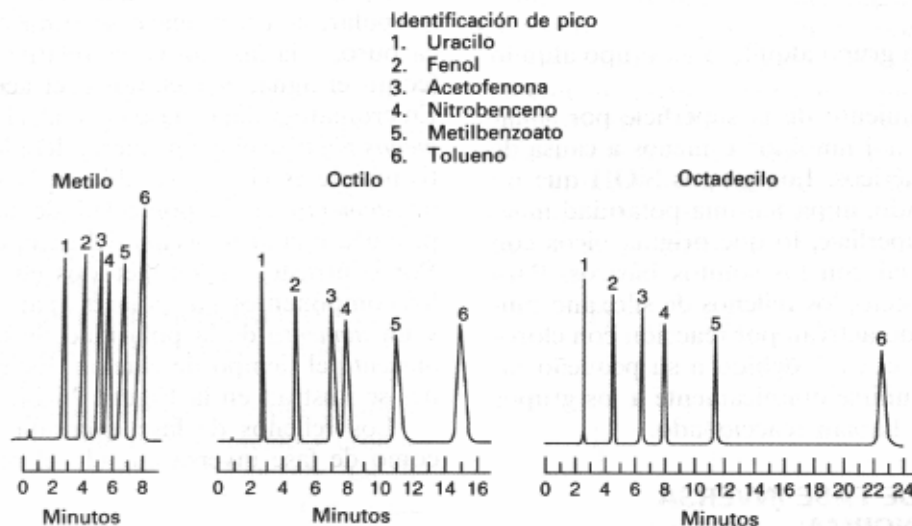


Figura 4.7. Efecto de la longitud de la cadena en la eficiencia de las columnas de siloxano en fase inversa empaquetadas con partículas de 5 μm . Fase móvil: 50/50 metanol/agua. Caudal 1 mL/min

4.2.1.2. Establecimiento del método en cromatografía de reparto

En cromatografía de líquidos, el establecimiento del método tiende a ser más complejo que en cromatografía de gases, debido a que cuando la fase móvil es líquida, los componentes de la muestra interactúan con ambas fases, la estacionaria y la móvil. Por el contrario, en la cromatografía de gases, la fase móvil se comporta como un gas ideal y no contribuye al proceso de separación; sólo sirve como portador de los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria. Es decir, en cromatografía de gases, el que la fase móvil sea helio, nitrógeno o hidrógeno no afecta significativamente a la separación. Muy al contrario, el éxito de una separación cromatográfica de reparto depende de que la fase móvil sea acetonitrilo, hexano o bien dioxano.

Selección de la columna en las separaciones cromatográficas de reparto. Una buena cromatografía con fases móviles interactivas, requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los tres participantes activos en el proceso de la separación -el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos. Las polaridades en orden creciente para varios grupos funcionales del analito son: hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes. El agua es más polar que cualquier compuesto que contenga alguno de los anteriores grupos funcionales.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica de reparto, la polaridad de la fase estacionaria ha de ser bastante similar a la de los analitos, y para la elución se utiliza entonces una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta. Este procedimiento por lo general resulta más adecuado que si las polaridades del soluto y de la fase móvil son parecidas pero difieren mucho con respecto a la fase estacionaria. En este caso, la fase estacionaria a menudo no puede competir efectivamente por los componentes de la muestra, y los tiempos de retención se hacen demasiado cortos para las aplicaciones prácticas. En el otro extremo, por supuesto, se encuentra el caso de que

las polaridades del soluto y de la fase estacionaria sean demasiado parecidas y totalmente distintas de la fase móvil; en estas circunstancias, los tiempos de retención se hacen excesivamente largos.

En resumen pues, si se quieren obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Por desgracia, las teorías que relacionan las interacciones de la fase móvil y la fase estacionaria con una serie determinada de componentes de una muestra son imperfectas, y en el mejor de los casos, un científico sólo puede elegir la fase estacionaria de una manera general. Una vez hecha la elección, el científico ha de realizar una serie de ensayos tentativos obteniendo los cromatogramas con varias fases móviles hasta que se llega a una separación satisfactoria. Si la resolución de todos los componentes de la mezcla resulta imposible, se ha de elegir otro tipo de columna.

Selección de la fase móvil en la cromatografía de reparto

De los tres métodos para mejorar la resolución de una columna cromatográfica basados en la variación del número de platos, factor de capacidad k' y factor de selectividad α , en cromatografía de líquidos, el factor de capacidad k' es el que más fácilmente se puede manipular de los tres, debido a que este parámetro depende considerablemente de la composición de la fase móvil. Tal como se ha subrayado anteriormente, para una eficiencia óptima, k' debería estar en el intervalo comprendido entre 2 y 5; sin embargo, para mezclas complejas, este intervalo se ha de extender tal vez de 0.5 a 20 para que todos los picos de los componentes tengan tiempo de aparecer.

En algunas ocasiones, el ajuste de k' no es suficiente para obtener picos individuales sin superposición y entonces se ha de recurrir a la variación de los factores de selectividad. De nuevo en este caso, la forma más simple de producir variaciones en α es modificando la composición de la fase móvil, procurando sin embargo, mantener k' dentro de un intervalo razonable. Alternativamente, se puede cambiar α eligiendo un relleno de columna distinto.

Efecto de la fuerza del disolvente sobre los factores de capacidad. Los disolventes que interactúan fuertemente con los solutos a menudo se les denomina disolventes «fuertes» o disolventes polares. Para describir cuantitativamente la polaridad de los disolventes, se han desarrollado varios índices. El más útil para la cromatografía de reparto parece ser el *índice de polaridad P'* desarrollado por Synder. Este parámetro se basa en las medidas de la solubilidad para la sustancia en cuestión en tres disolventes: dioxano (un aceptor de protones de dipolo débil), nitrometano (un aceptor de protones de dipolo intenso) y el etanol (un donador de protones de dipolo intenso). El índice de polaridad es una medida numérica de la polaridad relativa de varios disolventes. La Tabla 4.2 lista los índices de polaridad (y otras propiedades) para varios disolventes que se utilizan en cromatografía de reparto. Obsérvese que el índice de polaridad varía de 10.2 para un compuesto muy polar como el agua hasta 2 para los fluoroalcanos muy poco polares. Cualquier índice de polaridad que se desee entre esos límites se puede conseguir por mezcla de dos disolventes adecuados.

Anteriormente se ha subrayado que la forma más fácil de mejorar la resolución cromatográfica de dos especies es manipulando el factor de capacidad k' , el cual puede a su vez modificarse cambiando el índice de polaridad del disolvente. En este caso, el control de P' se consigue con facilidad utilizando fases móviles consistentes en mezclas

de dos disolventes. Por lo común, un cambio de 2 unidades en P' origina (muy aproximadamente) una variación de diez veces en k'

Tabla 4.2. Propiedades de las fases móviles cromatográficas mas comunes

Disolvente	Índice de refracción ^a	Viscosidad, cP ^b	Punto de ebullición, °C	Índice de polaridad, P'	Fuerza eluyente ^c , ε ^o
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
n-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-Propiléter	1,365	0,38	68	2,4	0,28
Tolueno	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Diéter	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	1,359	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

Muchas veces, en las separaciones en fase inversa, se emplea una mezcla de disolventes formada por agua y un disolvente orgánico polar. El factor de capacidad se manipula entonces fácilmente variando la concentración de agua. El efecto de estas manipulaciones se puede observar en los cromatogramas de las Figuras 4.8 a y b, donde la muestra es una mezcla de seis esteroides. Con una mezcla del 41 % de acetonitrilo y 59% de agua, k' tiene un valor de 5, y los demás analitos se eluyen en un tiempo tan corto (aproximadamente 2 min) que la separación resulta bastante incompleta. Al aumentar el porcentaje de agua a 70, la elución tiene lugar en 7 min, lo que dobla el valor de k' . En estas circunstancias el tiempo total de elución es suficiente para permitir la separación, aunque el valor de alfa para los compuestos 1 y 3 no sea lo suficientemente grande para una buena resolución.

Influencia de la fase móvil en las selectividades. En muchos casos, ajustar k' a un nivel adecuado es todo lo que se necesita para una separación satisfactoria. Sin embargo, cuando todavía se superponen dos bandas, como en la Figura 4.8b, se ha de procurar aumentar el factor de selectividad α para las dos especies. Esta variación se puede llevar a cabo convenientemente cambiando la naturaleza química de la fase móvil mientras se mantiene más o menos el mismo valor de k' .

Para la cromatografía en fase inversa se ha desarrollado un procedimiento de optimización de cuatro disolventes que permite establecer el sistema que, en teoría, resolverá una mezcla dada en el mínimo tiempo. En este caso, se han utilizado tres disolventes compatibles para ajustar los valores de α . Se incluyen metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. El agua se emplea para ajustar la fuerza de la mezcla y de este modo conseguir un valor adecuado de k' .

La Figura 4.8 ilustra la sistemática empleada para el desarrollo de la separación de seis esteroides por cromatografía en fase inversa basada en cuatro disolventes. Los dos primeros cromatogramas muestran los resultados iniciales para determinar el valor mínimo de k' que se requería. Con un k' de 10 existe espacio suficiente en la escala de tiempos para la separación de picos; sin embargo, en estas condiciones los valores de α para los componentes 1 y 3 (y en menos extensión para 5 y 6) no son suficientemente grandes como para obtener una separación satisfactoria. Con el objetivo de encontrar

unos mejores valores de α se realizaron ensayos adicionales; en todos los casos la proporción de agua se ajustaba para obtener una k' de 10. En las Figuras 4.8 c y d se muestran los resultados obtenidos en los ensayos con las mezclas metanol/agua y tetrahidrofurano/agua. Se realizaron experimentos adicionales variando sistemáticamente los pares de disolventes orgánicos (en cada caso k' se ajustaba a 10 mediante el agua). Finalmente, la mezcla mostrada en la Figura 4.8e se eligió como la mejor fase móvil para la separación del grupo particular de compuestos ensayado.

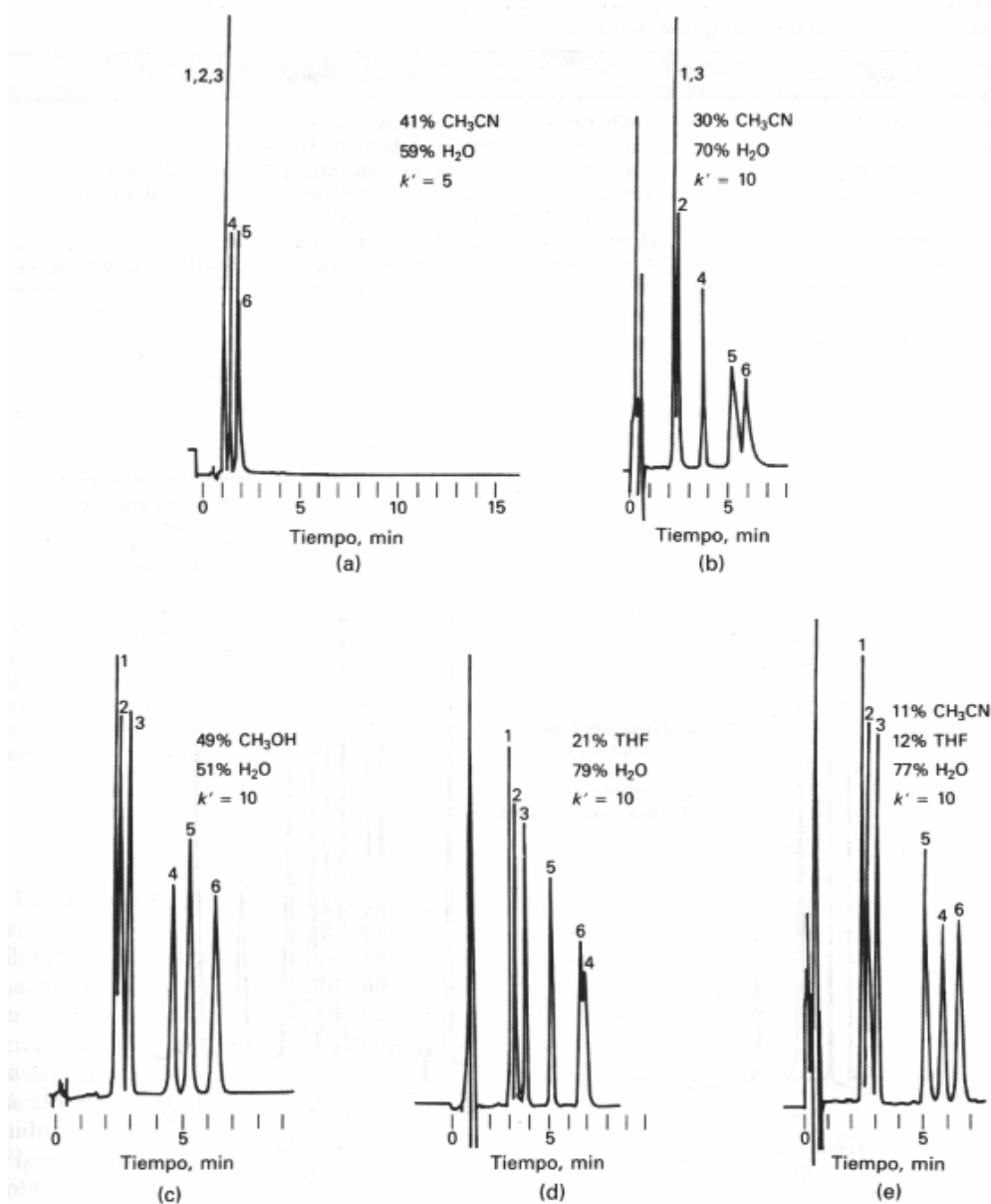


Figura 4.8. Sistemática experimental para la separación de los seis esteroides. En (a) y (b) se muestra el uso del agua para el ajuste de k' . Los efectos de la variación de α a k' constante se muestran en (b), (c), (d) y (e). Columna: 0.4 x 150 mm empaquetada con partículas de 5 μ m con fase inversa enlazada C₈. Temperatura: 50°C. Caudal: 3 cm³/min. Detector: UV-254 nm. Compuestos: (1) prednisona; (2) cortisona; (3) hidrocortisona; (4) dexametasona; (5) corticosterona; (6) corticoexolona.

En fase normal se ha utilizado un sistema de cuatro disolventes similar, en el cual los disolventes para el control de la selectividad son etileter, cloruro de metileno y cloroformo; para el ajuste de la fuerza del disolvente se utiliza n-hexano. Con este sistema de cuatro disolventes, se dice que es posible la optimización con un número mínimo de ensayos.

4.2.1.3. Aplicaciones de la cromatografía de reparto

Los rellenos con fases unidas químicamente, cuando se utilizan en fase inversa en combinación con disolventes muy polares (a menudo acuosos) se aproximan al sistema ideal y universal para la cromatografía de líquidos. Para investigar la separación de nuevos tipos de muestras, estos son los rellenos que se utilizan en primer lugar debido a su amplio intervalo de aplicabilidad, su adecuación, y a la facilidad con que pueden modificarse k' y α variando las fases móviles acuosas.

La Tabla 4.3 enumera unos cuantos ejemplos característicos entre la gran variedad de aplicaciones de la cromatografía de reparto en diversos campos. La Figura 4.9 ilustra dos de los muchos miles de aplicaciones de la cromatografía de reparto con fases unidas químicamente para el análisis de materiales de consumo e industriales.

Tabla 4.3.

Aplicaciones típicas de la cromatografía de reparto

Campo	Mezclas típicas
Productos farmacéuticos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensoactivos, propulsores, colorantes
Contaminantes	Plaguicidas, herbicidas, fenoles, PCBs
Química forense	Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos

4.2.2. Cromatografía de adsorción

La cromatografía de adsorción, o líquido-sólido, es la forma clásica de cromatografía de líquidos que introdujo Tswett por vez primera a principios de este siglo. Más recientemente, se ha convertido en un método importante de HPLC.

Las únicas fases que se utilizan en HPLC líquido-sólido son la sílice y la alúmina, siendo la primera la que se prefiere para casi todas las aplicaciones debido a su mayor capacidad de carga y a su mayor diversidad de presentaciones. Con pocas excepciones, las características de adsorción de los dos adsorbentes son similares. Con ambos, el orden de tiempos de retención es: olefinas < hidrocarburos aromáticos < haluros = sulfuros < éteres < nitrocompuestos < esterres = aldehídos = cetonas < alcoholes = aminas < sulfonas < sulfóxidos < amidas < ácidos carboxílicos.

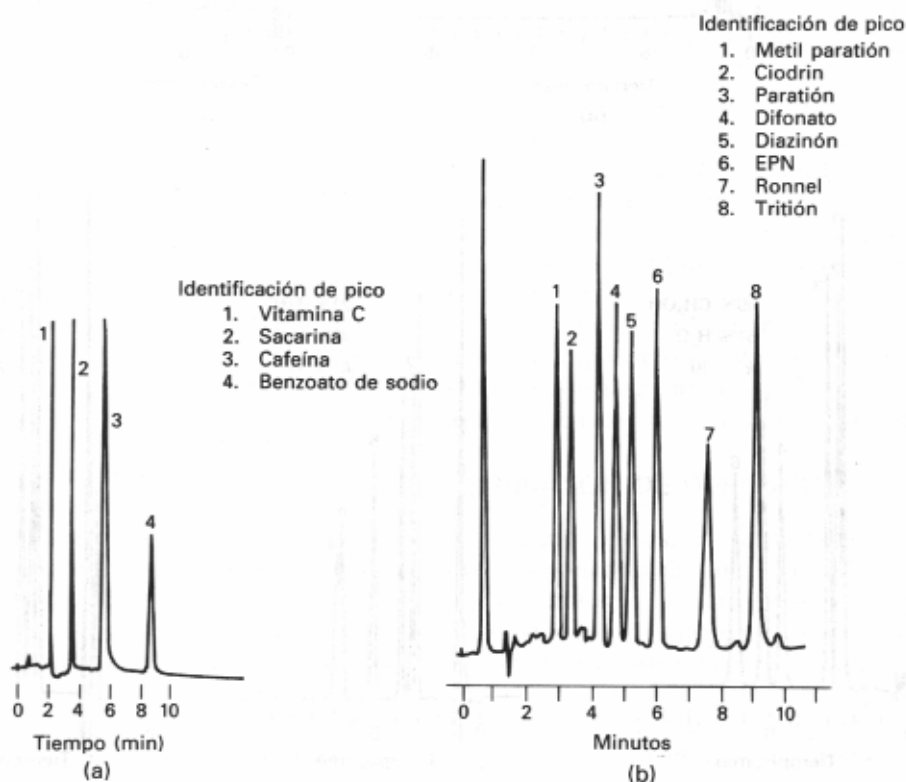


Figura 4.9. Aplicaciones de la cromatografía de fase enlazada. (a) Aditivos en bebidas refrescantes. Columna 4.6 x 250 mm empaquetada con rellenos de fase enlazada polares (nitrilo). Disolvente en modo isocrático: CH₃OH 6% / H₂O 94%. Caudal 1 mL/min. (b) Insecticidas organofosforados. Columna 4.5 x 250 mm empaquetada con partículas de 5 μm con fase enlazada C₈. Gradiente de CH₃OH 67% / H₂O 33% a CH₃OH 80% / H₂O 20%. Caudal 2 mL/min. En ambos casos la detección UV es a 254 nm.

4.2.2.1. Selección del disolvente en cromatografía de adsorción

En cromatografía líquido-sólido, la única variable que se puede utilizar para optimizar k' y α es la composición de la fase móvil (por contraste con la cromatografía de reparto, donde el relleno de la columna tiene un efecto acusado sobre α). Afortunadamente, en la cromatografía de adsorción, las modificaciones del disolvente provocan una gran variación en la resolución y en el tiempo de retención, y casi siempre se suele encontrar la fase móvil adecuada.

Fuerza del disolvente. En cromatografía de adsorción se ha comprobado que el índice de polaridad P' , que se ha descrito anteriormente, puede servir como una guía de la fuerza de los disolventes. Sin embargo, un índice mucho mejor es la *fuerza eluyente* ϵ^0 que es la energía de adsorción del disolvente por unidad de superficie. Este parámetro depende del adsorbente, siendo los valores de ϵ^0 para la sílice 0.8 veces los de la alúmina. En la Tabla 4.2, los valores de ϵ^0 de la última columna corresponden a la alúmina. Obsérvese que las diferencias entre disolventes con respecto a ϵ^0 se corresponden bastante bien con las que se dan entre los valores de P' .

Elección de los disolventes. El procedimiento para la elección del disolvente en cromatografía de adsorción es semejante al descrito para las separaciones de reparto. Es decir, se eligen dos disolventes compatibles, uno de los cuales es demasiado fuerte (ϵ^0 demasiado grande) y el otro resulta ser demasiado débil. Variando la relación entre los dos disolventes se puede obtener el valor adecuado para k' . Se ha encontrado que un aumento de 0.05 unidades en el valor de ϵ^0 por lo general disminuye 3 o 4 veces los valores de k' . De este modo, se pueden conseguir grandes variaciones de k' , y casi siempre se puede encontrar un sistema binario entre los disolventes de la Tabla 4.2 que proporcione unos tiempos de retención adecuados para cualquier tipo de muestra. Por desgracia, ϵ^0 no varía linealmente con la relación de volúmenes, como era el caso de P' en la cromatografía de reparto; por ello es más difícil calcular la mezcla óptima para la separación.

Cuando se presenta una superposición de picos, el cambio de un disolvente fuerte por otro, manteniendo k' más o menos constante, permite cambiar los valores de α y a menudo obtener la resolución que se desea. Estas pruebas de tanteo son tediosas y a veces resultan inútiles.

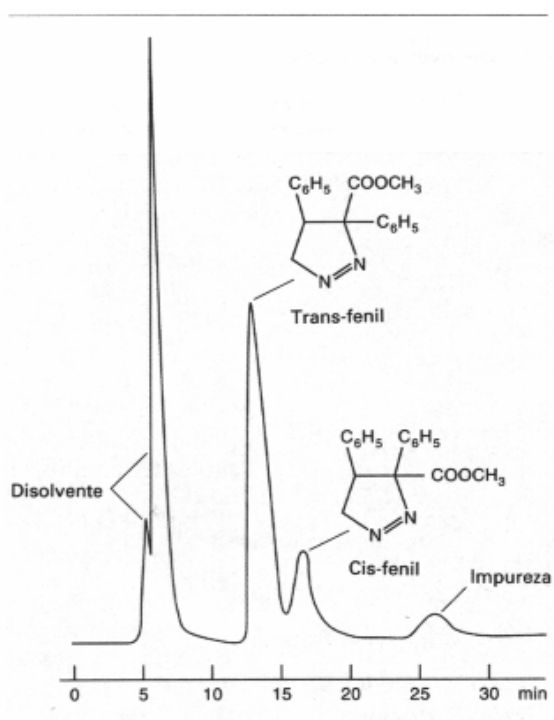


Figura 4.10. Aplicación típica de cromatografía de adsorción: separación de cis y trans pirazolina. Columna 100 x 0.3 cm, sílice pelicular. Fase móvil: 50% cloruro de metileno / isooctano. Caudal 0.25 mL/min. Detector UV 254 nm.

4.2.2.2. Aplicaciones de la cromatografía de adsorción

La Figura 4.1 indica que la cromatografía de adsorción es más adecuada para compuestos no polares probablemente con masas moleculares inferiores a 5000. Los métodos de cromatografía de adsorción y los de reparto, aunque en algún caso se superponen, tienden a ser complementarios.

En general, la cromatografía líquido-sólido es más adecuada para muestras que son solubles en disolventes no polares, y que por tanto tienen una solubilidad limitada en los disolventes acuosos que son los que se utilizan en los procedimientos de reparto en fase inversa. Como en cromatografía de reparto, los compuestos que tienen distintos grupos funcionales por lo general se pueden separar. Una característica particular de la cromatografía de adsorción, que no es compartida por otros métodos, es su capacidad para diferenciar compuestos isómeros. La Figura 4.10 ilustra una aplicación característica de la cromatografía de adsorción.

4.2.3. Cromatografía iónica

La cromatografía iónica está relacionada con los métodos modernos y eficaces para la separación y determinación de iones que se basan en el uso de las resinas de intercambio iónico. La cromatografía iónica empezó a desarrollarse a mediados de los años setenta, cuando se demostró que mediante las columnas de HPLC rellenas con resinas de intercambio catiónico o aniónico, se podían resolver fácilmente mezclas de cationes o aniones. Por entonces, la detección se realizaba por lo general con medidas de conductividad.

La cromatografía iónica se desarrolló durante el proyecto Manhattan que optimizaba la separación con resinas de intercambio catiónico de los cationes de las tierras raras estrechamente relacionados. Este espectacular trabajo, en el cual se basa la teoría de las separaciones por intercambio iónico, se extendió tras la 2ª Guerra Mundial a muchos otros tipos de materiales y al final condujo a los métodos automatizados para la separación y detección de aminoácidos y otras especies iónicas en mezclas complejas. El desarrollo de la HPLC moderna empezó a finales de los años sesenta, pero su aplicación a la separación por intercambio iónico se retrasó debido a la inexistencia de un método general y sensible para la detección de especies como los cationes alcalinos y alcalinotérreos, y aniones como los haluros, acetato y nitrato. Esta situación se remedió en 1975 al desarrollarse por técnicos de Dow Chemical Company la técnica de supresión del efluente, la cual hace posible la detección conductimétrica de los iones eluidos. Esta técnica se describe posteriormente.

4.2.3.1. Equilibrios de intercambio iónico

Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble. Durante varias décadas se han utilizado intercambiadores iónicos naturales como las arcillas y las zeolitas. A mediados de los años treinta se fabricaron por primera vez resinas de intercambio iónico sintéticas para eliminar la dureza del agua, la desionización del agua y la purificación de las disoluciones. Los puntos activos más comunes en las resinas de intercambio catiónico son los grupos de ácido sulfónico $-SO_3^- H^+$, un ácido fuerte, y los grupos de ácido carboxílico $-COO^- H^+$, un ácido débil. Los intercambiadores aniónicos contienen grupos de amina cuaternaria $-N(CH_3)_3^+ OH^-$ o grupos de amina ternaria primaria $-NH_3^+ OH^-$ los primeros son de base fuerte y los últimos de base débil.

Cuando un intercambiador iónico de ácido sulfónico se pone en contacto con un disolvente acuoso que contiene cationes M^+ , se establece un equilibrio de intercambio entre este catión y el H^+ de los grupos sulfónicos de la resina. De forma semejante, se

comporta un intercambiador de ácido débil. En el caso de los intercambiadores aniónicos el equilibrio se establece entre el anión del disolvente acuoso y los OH⁻ de los grupos amina de la resina polimérica.

Estos equilibrios pueden ser modelizados usando la constante de equilibrio K_{ex} definida por la ley de acción de masas aplicada a cada uno de los equilibrios de intercambio. Esta K_{ex} representa la afinidad de la resina por los iones en disolución M^+ relativa a otro ion (en este caso, H⁺). Cuando K_{ex} es un valor alto, la fase sólida tiene una gran tendencia a retener los iones M^+ y cuando K_{ex} es pequeña sucede lo contrario. Seleccionando un ion de referencia común como el H⁺, se pueden comparar experimentalmente las constantes de distribución de distintos iones para una resina dada. Estos experimentos demuestran que los iones polivalentes se retienen mucho más fuertemente que las especies con una sola carga. Sin embargo, dentro de un grupo con la misma carga, se dan diferencias relacionadas con el tamaño del ion hidratado y con otras propiedades. De este modo, para una resina típica de intercambio catiónico con grupos sulfónicos, los valores de K_{ex} , disminuyen según el orden $Tl^+ > Ag^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$. Para los cationes divalentes, el orden es $Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > UO_2^{2+}$.

Para los aniones, K_{ex} , en las resinas de base fuerte disminuye en el orden $SO_4^{2-} > C_2O_4^{2-} > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > HCO_2^- > CH_3CO_2^- > OH^- > F^-$. Esta secuencia debería considerarse sólo como una aproximación, pues depende en parte de la resina y de las condiciones experimentales.

4.2.3.2. Rellenos de intercambio iónico

Históricamente, en cromatografía de intercambio iónico se han empleado pequeñas partículas esféricas porosas que se forman en la copolimerización del estireno y del divinilbenceno emulsionados. La presencia de divinilbenceno (normalmente en un 8%) origina una polimerización entrecruzada que imparte estabilidad mecánica a las bolitas. Con objeto de activar el polímero frente a los iones, a la estructura se le unen químicamente grupos funcionales ácidos o básicos. Los grupos más comunes son el ácido sulfónico y las aminas cuaternarias.

Las partículas poliméricas porosas no resultan del todo adecuadas como rellenos cromatográficos debido a la baja velocidad de difusión de las moléculas de los analitos a través de los microporos de la matriz polimérica, y también debido a la compresibilidad de la matriz. Para solventar este problema, se han desarrollado dos nuevos tipos de rellenos que se utilizan más que el tipo de polímero poroso. Uno es el relleno de partícula pelicular en el que la superficie relativamente grande (de 30 a 40 μm) de una partícula, esférica y no porosa, de vidrio o polimérica se recubre con una resina sintética de intercambio iónico. Un segundo tipo de relleno se prepara recubriendo micropartículas porosas de sílice, tal como las que se utilizan en la cromatografía de adsorción, con una delgada película del intercambiador. Con cualquiera de ellas, se obtiene un aumento de la eficacia debido a que la difusión en el polímero es más rápida. Por otra parte, la capacidad de carga de estos rellenos es menor, especialmente los de tipo pelicular.

4.2.3.3. Aplicaciones inorgánicas de la cromatografía iónica

La fase móvil en cromatografía de intercambio iónico ha de tener las mismas propiedades generales que se requieren para los otros tipos de cromatografía. Es decir, ha de solubilizar la muestra, tener una fuerza de disolvente que conduzca a tiempos de retención razonables (valores de k' adecuados), y debe interaccionar con los solutos de tal forma que favorezca la selectividad (valores de α adecuados). En cromatografía iónica las fases móviles suelen ser disoluciones acuosas que pueden contener cantidades moderadas de metanol u otros disolventes orgánicos miscibles con el agua; estas fases móviles, a menudo contienen especies iónicas en forma de disolución reguladora. La fuerza eluyente y la selectividad se determinan por el tipo y concentración de esos ingredientes añadidos. En general, los iones de la fase móvil compiten con los iones del analito por los puntos activos del relleno del intercambiador iónico.

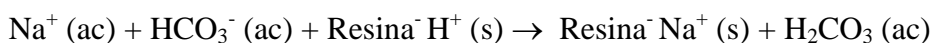
Cromatografía iónica con columnas supresoras. Como se ha señalado anteriormente, la aplicación de la cromatografía iónica para la determinación de especies inorgánicas no se desarrolló debido a la falta de un buen sistema de detección universal, que permitiera la determinación cuantitativa basada en las áreas de los picos cromatográficos. Los detectores de conductividad eran la elección obvia para este objetivo. Estos detectores pueden tener una elevada sensibilidad, son universales para las especies cargadas y, como norma general, responden de una forma predecible a los cambios de concentración. Por otra parte, dichos detectores son simples, baratos de fabricar y mantener, fáciles de miniaturizar, y por lo común son robustos y de prolongada duración. La única limitación de los detectores de conductividad resultó ser un serio problema que impidió su uso generalizado. Esta limitación proviene de la elevada concentración de electrólito que se requiere para eluir la mayoría de los iones analito en un tiempo razonable. En consecuencia, la conductividad de los componentes de la fase móvil tiende a enmascarar la de los analitos, y por ello se reduce considerablemente la sensibilidad del detector.

En 1975, el problema de la elevada conductividad del eluyente se resolvió mediante la introducción de la denominada columna supresora que se utiliza inmediatamente a continuación de la columna de intercambio iónico. La columna supresora está rellena con una segunda resina de intercambio iónico, que convierte eficazmente los iones del disolvente en especies moleculares poco ionizadas, sin alterar los iones del analito. Por ejemplo, cuando se separan y determinan cationes, se elige en muchas ocasiones el ácido clorhídrico como reactivo eluyente, y la columna supresora es una resina de intercambio aniónico en la forma hidróxido. El producto de la reacción en la columna supresora es agua. Esto es,



Es evidente que los cationes analito no se retienen en esta segunda columna.

Para la separación de aniones, el relleno supresor es la forma ácida de una resina de intercambio catiónico. En este caso, el bicarbonato o carbonato de sodio puede utilizarse como agente eluyente. La reacción en la columna supresora es entonces



En este caso, el ácido carbónico muy poco disociado que se forma no contribuye de manera significativa a la conductividad.

Un inconveniente de las columnas supresoras es la necesidad de regenerarlas periódicamente (de ordinario, cada 8 o 10 h) a fin de convertir sus rellenos otra vez a la forma ácida o básica original. Sin embargo, recientemente se dispone de supresores de membrana que operan continuamente. En este caso, el eluyente y la disolución supresora fluyen en direcciones opuestas en ambos lados de unas membranas permeables de intercambio iónico. Para el análisis de aniones, las membranas son resinas intercambiadoras de cationes y para cationes, son intercambiadoras de aniones. Cuando, por ejemplo, se trata de eliminar los iones sodio del efluente de la columna analítica, en la corriente supresora fluye continuamente ácido para la regeneración. Los iones sodio del efluente se intercambian con los iones hidrógeno de la membrana y entonces migran a través de la membrana hasta intercambiarse con los iones hidrógeno del reactivo regenerador. El dispositivo tiene una velocidad de intercambio notablemente alta; por ejemplo, es capaz de eliminar completamente los iones sodio de una disolución 0.1 M de hidróxido de sodio cuando el caudal del eluyente es de 2 mL/min.

La Figura 4.11 muestra dos aplicaciones de la cromatografía iónica que utilizan una columna supresora y detección conductimétrica. En cada caso, los iones están presentes al nivel de partes por millón, y el tamaño de las muestras es de 50 μL en un caso y de 100 μL en el otro. El método es de gran importancia para el análisis de aniones debido a que actualmente no existe un método tan rápido y adecuado para muestras de este tipo.

Cromatografía iónica con una sola columna. También se dispone de equipos comerciales para cromatografía iónica en los que no se utiliza una columna supresora. Estos sistemas se basan en las pequeñas diferencias de conductividad que existe entre los iones de la muestra eluidos y los del eluyente que prevalecen. Para amplificar esas diferencias, se utilizan intercambiadores de baja capacidad, con los que es posible la elución utilizando especies de baja conductividad equivalente. La cromatografía con una sola columna tiende a ser algo menos sensible que la cromatografía iónica con columna supresora.

4.2.3.4. Aplicaciones orgánicas y bioquímicas de la cromatografía iónica

La cromatografía de intercambio iónico se ha aplicado a una variedad de sistemas orgánicos y bioquímicos incluyendo drogas y sus metabolitos, sueros, conservantes de alimentos, mezclas de vitaminas, azúcares y preparaciones farmacéuticas. El ejemplo de una de estas aplicaciones se muestra en la Figura 4.12, donde se separan con una columna de intercambio catiónico 1×10^{-8} moles de cada uno de los 17 aminoácidos de una muestra.

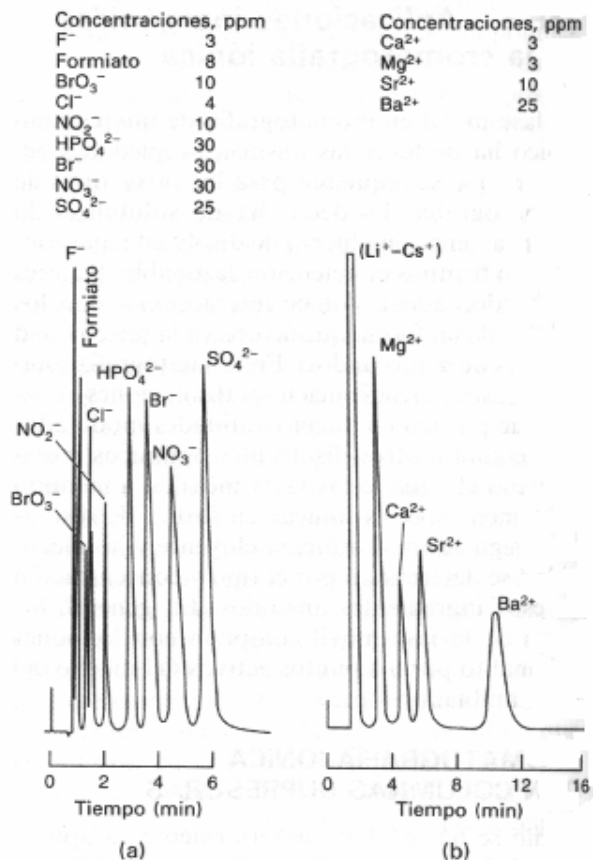


Figura 4.11. Aplicaciones típicas de la cromatografía iónica. (a) Separación de aniones en una columna de intercambio aniónico. Eluyente NaHCO₃ 0.0028M / Na₂CO₃ 0.0023M. Tamaño de muestra 50 µL. (b) Separación de iones alcalinos en una columna de intercambio catiónico. Eluyente: Diclorhidrato de fenilendiamina 0.025 M / HCl 0.0025 M. Tamaño de muestra 100 µL

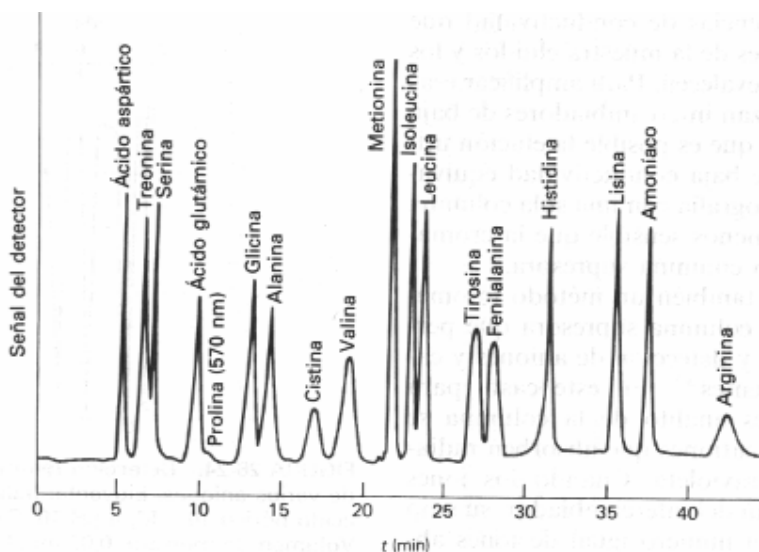


Figura 4.12. Separación de aminoácidos con una columna de intercambio iónico. Relleno: intercambiador catiónico con un tamaño de partícula de 8µm.

4.2.4. Cromatografía de exclusión por tamaños

La cromatografía de exclusión por tamaños, que también se ha denominado cromatografía en geles permeables o de filtración en geles, es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas (de unas 10 μm) poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. En los poros, las moléculas son atrapadas efectivamente y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de poros del relleno son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen y, por tanto, son las primeras que eluyen. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo; éstas son las últimas en eluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo, tiene lugar el fraccionamiento, que está directamente relacionado con el tamaño molecular y en cierto modo con la forma molecular. Obsérvese que las separaciones por exclusión por tamaños difieren de los otros procedimientos que se han considerado, en que no implican una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones dado que originan una mala eficacia de la columna.

4.2.4.1. Rellenos de columna

En cromatografía de exclusión por tamaños se encuentran dos tipos de rellenos, partículas poliméricas y partículas de sílice, con diámetros de partícula que oscilan de 5 a 10 μm . Los últimos tienen la ventaja de una gran rigidez, lo que facilita el empaquetamiento; una mayor estabilidad, lo que permite el uso de una gran variedad de disolventes incluyendo el agua; una equilibración más rápida al cambiar el disolvente; y una buena estabilidad a elevadas temperaturas. Los inconvenientes de las partículas de sílice son su tendencia a retener solutos por adsorción, y su capacidad para catalizar la degradación de las moléculas del soluto.

En un principio, la cromatografía de exclusión por tamaños se llevó a cabo fundamentalmente utilizando copolímeros de estireno-divinilbenceno entrecruzados de estructura semejante (excepto en que los grupos sulfónicos están ausentes) a los utilizados en cromatografía iónica. El tamaño de poro en estos polímeros se controla por el grado de entrelazamiento entre las cadenas poliméricas y por tanto con la cantidad relativa de divinilbenceno presente en la fabricación. Como consecuencia, los rellenos poliméricos se han comercializado con distintos tamaños promedio de poro. Los geles de estirenodivinilbenceno son hidrofóbicos y de este modo sólo pueden utilizarse con fases móviles no acuosas. Sin embargo, en la actualidad se dispone de geles hidrofílicos, que hacen posible el uso de disolventes acuosos para la separación de moléculas grandes solubles en agua como los azúcares. Estos geles hidrofílicos son por lo general polímeros de estireno-divinilbenceno con grupos sulfónicos, o poliacrilamidas.

Las partículas de vidrio y de sílice porosas, que se comercializan actualmente, tienen tamaños promedio de poro que oscilan entre 40 y 2500 Angstroms. A fin de reducir la adsorción, las superficies de estas partículas se modifican por reacción con

sustituyentes orgánicos. En la Tabla 4.4 se indican las propiedades de algunos rellenos comerciales y típicos de la exclusión por tamaños.

El intervalo útil de pesos moleculares para un determinado relleno de exclusión por tamaños, se obtiene convenientemente a partir de una curva de calibración. En ella, se representa el peso molecular, que está directamente relacionado con el tamaño de las moléculas de soluto, frente al volumen de retención.

El *límite de exclusión* determina el peso molecular de una especie por encima del cual no existe retención. Todas las especies que tengan pesos moleculares mayores que el límite de exclusión, son tan grandes que no se retienen, y eluyen conjuntamente para dar un mismo pico. El *límite de permeabilidad* es el peso molecular por debajo del cual las moléculas del soluto pueden penetrar completamente en los poros. Por debajo de este peso molecular, todas las moléculas del soluto son tan pequeñas que eluyen en una sola banda. A medida que los pesos moleculares disminuyen con respecto al límite de exclusión, las moléculas del soluto pasan cada vez más tiempo, de promedio, en los poros de las partículas y de este modo se mueven cada vez con mayor lentitud. Es en la región de permeabilidad selectiva en la que tiene lugar el fraccionamiento, dando lugar a picos de soluto individuales.

Las curvas de calibración experimentales se obtienen fácilmente a partir de productos estándar. En muchas ocasiones, estas curvas las suministran los propios fabricantes de los materiales de relleno.

Tabla 4.4.

Propiedades de los rellenos comerciales típicos para la cromatografía de exclusión por tamaños

Tipo	Tamaño de partícula, μm	Tamaño medio de poro, Å	Límite de exclusión en peso molecular*
Poliestirenodivinilbenceno	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	$(5 \text{ a } > 10) \times 10^6$
Silice	10	125	$(0,2 \text{ a } 5) \times 10^4$
		300	$(0,03 \text{ a } 1) \times 10^5$
		500	$(0,05 \text{ a } 5) \times 10^5$
		1000	$(5 \text{ a } 20) \times 10^5$

* Peso molecular por encima del cual no existe retención.

4.2.4.2. Aplicaciones de la cromatografía de exclusión por tamaños

Los métodos de exclusión por tamaños se subdividen en la cromatografía de filtración en gel y la de gel permeable. En el primer tipo se utilizan disolventes acuosos y rellenos hidrofílicos. En el último, los métodos se basan en disolventes no polares y en rellenos hidrofóbicos. Los métodos son complementarios en el sentido que en un caso se aplican a muestras solubles en agua, y en el otro a sustancias solubles en disolventes orgánicos poco polares.

Una de las aplicaciones más útiles del procedimiento de filtración en gel consiste en separar las moléculas de alto peso molecular de productos naturales de las especies de bajo peso molecular y de las sales. Por ejemplo, un gel con un límite de exclusión de varios miles, puede separar bien las proteínas de los aminoácidos y de los péptidos de bajo peso molecular.

Una aplicación útil de la cromatografía de gel permeable es la separación de homólogos y oligómeros. Estas aplicaciones se ilustran con los ejemplos que se muestran en la Figura 4.13.

El primero muestra la separación de una serie de ácidos grasos con pesos moleculares entre 116 y 344 mediante un relleno de poliestireno con un límite de exclusión de 1000. El segundo es el cromatograma de una resina epoxi comercial; en este caso, n se refiere al número de unidades monoméricas en las moléculas de resina.

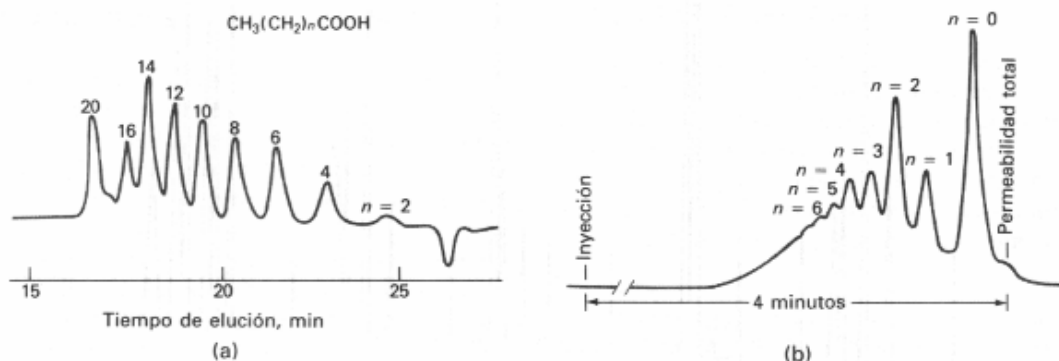


Figura 4.13. Aplicaciones de la cromatografía de exclusión por tamaños. (a) Separación de ácidos grasos. Columna de poliestireno 7.5 x 600 mm con un límite de exclusión de 1000. Fase móvil tetrahidrofurano. Caudal 1.2 mL/min. Detector: índice de refracción. (b) Análisis de una resina epoxi comercial (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

La Figura 4.14 ilustra una aplicación de la cromatografía de exclusión por tamaños a la determinación de glucosa, sacarosa y fructosa en cuatro tipos de zumos de fruta. El relleno, con un límite de exclusión de 1000, era un polímero de poliestireno entrelazado de características hidrofílicas por la incorporación de grupos sulfónicos. Una columna de 25 cm con este relleno tenía 7600 platos a una temperatura de trabajo de 80°C.

Otra gran aplicación de la cromatografía de exclusión por tamaños es a la determinación rápida de los pesos moleculares, o de la distribución de pesos moleculares en los grandes polímeros o en los productos naturales. En este caso, se comparan los volúmenes de elución de la muestra con los volúmenes de elución de compuestos estándar que tengan las mismas características químicas.

Las ventajas más importantes de los procedimientos de exclusión por tamaños son: (1) tiempos de separación cortos y bien definidos [todos los solutos salen de la columna entre dos límites]; (2) bandas estrechas, que conducen a una buena sensibilidad; (3) no hay pérdida de muestra, porque los solutos no interactúan con la fase estacionaria; y (4) no se desactiva la columna por interacción del soluto con el relleno.

Las desventajas son: (1) debido a que la escala de tiempos en el cromatograma es corta, sólo se pueden acomodar un número limitado de bandas y (2) no es aplicable a muestras de componentes semejantes, como las mezclas de isómeros. Para una resolución aceptable se necesita que la diferencia de pesos moleculares sea la menos de un 10%.

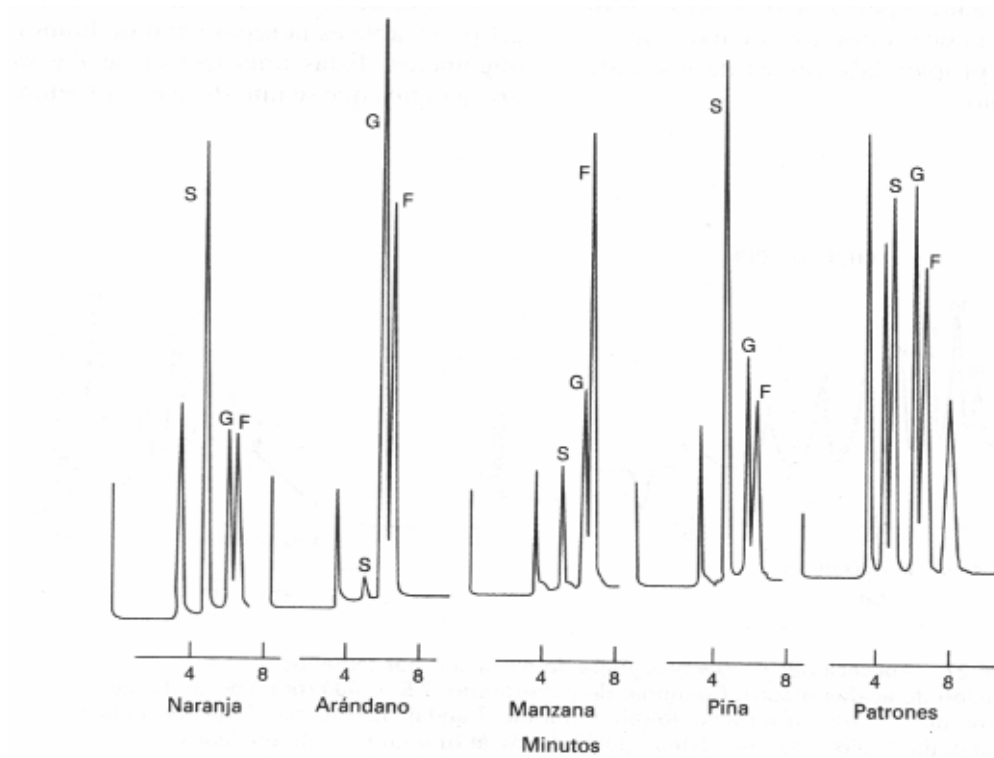


Figura 4.14. Determinación de glucosa (G), fructosa (F) y sacarosa (S) en zumos enlatados