



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN



REVISIÓN DE LOS AVANCES EN CUANTO A EQUIPO
E INSTRUMENTACIÓN EN HPLC. RECOMEN-
DACIONES EN EL MANEJO DEL MISMO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

LEONOR ROJAS ARAGÓN

ASESOR: Q.F.B. ELIA GRANADOS ENRIQUEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Revisión de los avances en cuanto a Equipo e Instrumentación

en HPLC. Recomendaciones en el manejo del mismo.

que presenta la pasante: Leonora Rojas Araquón.

con número de cuenta: 7909330-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biológica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 14 de Diciembre de 1993

PRESIDENTE	<u>M. en C. Guadalupe Pérez Caballero.</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Delia Reyes Jaramillo.</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Elia Granados Enríquez.</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera.</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Adriana Ganem Rondero.</u>	

Gracias a la Q.F.B. Elia Granados Enríquez
por el gran apoyo prestado en la realización
de este trabajo.

AGRADEZCO

A Dios :

Por ser mi guía.

A mi Madre :

Por su gran amor y entrega hacia mí.

A Manuel :

Por ser el medio por el cual logre estudiar.

A mi Esposo Ricardo :

Por su ayuda y comprensión.

A mi hijo Ricardo Yael :

Por ser mi gran fuente de motivación.

A mi familia :

Por su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos :

Por la amistad que me ofrecieron.

INDICE

OBJETIVOS

1. INTRODUCCION.

1.1 Antecedentes Históricos	2
1.2 Concepto de Cromatografía	3
1.3 Clasificación y generalidades	4
1.4 Términos más usuales en HPLC	10

2. EQUIPO E INSTRUMENTACION.

Partes que constituyen el equipo	18
Cuidados generales	19

2.1 COLUMNAS

2.1.1 Función	20
2.1.2 Características generales y cuidados	20
2.1.3 Avances	32

2.2 FASE MOVIL

2.2.1 Función	35
2.2.2 Características generales y cuidados	35
2.2.3 Polaridad y Serie Elutrópica	39
2.2.4 Selección de solventes para los procesos de separación	41

2.3 BOMBAS

2.3.1 Función	51
2.3.2 Características generales y cuidados	51
2.3.3 Sistema Isocrático y Gradiente	57
2.3.4 Avances	58

2.4 INYECTORES

2.4.1 Función	60
2.4.2 Características generales	60
2.4.3 Avances	64

2.5	DETECTORES	
2.5.1	Función	66
2.5.2	Características generales	66
2.5.3	Clasificación	67
2.5.4	Avances	76
3.	PROBLEMAS COMUNES EN HPLC Y POSIBLE SOLUCION.	
3.1	Problema de Elución General de Snyder (PEGS)	89
3.2	Problemas comunes y posible solución	91
	Bibliografía general	104
	Bibliografía sobre avances en columnas	105
	Bibliografía sobre fase móvil	105
	Bibliografía sobre avances en bombas	106
	Bibliografía sobre avances en inyectores	106
	Bibliografía sobre avances en detectores	107

ABREVIATURAS

Min.	minuto
C.L.	Cromatografía de Líquidos
A.S.	Asimetría
e.c.	ecuación
Ej.	ejemplo
ACN	acetonitrilo
THF	tetrahidrofurano
I.R.	Índice de Refracción
Tab.	tabla
ETOH	etanol
U.V.	ultravioleta
C.C.F.	Cromatografía en Capa Fina
atm.	atmósfera
hr.	hora
d.i.	diámetro interno
ODS	octadecil silano
C ₁₈	Grupo químico Octadecil
C ₈	Grupo químico Octil
C ₄	Grupo químico Butil
HEPT.	Altura equivalente a un plato teórico
CN	Grupo Ciano
HNO ₃	Acido Nítrico

LISTA DE TABLAS

		PAG.
tabla 1.1	Fase normal vs. Fase Reversa	7
tabla 2.1	Resumen de las características de los diferentes empaques en CL.	22
tabla 2.2	Resumen de los grupos químicos que sirven como fases enlazadas	23
tabla 2.3	Tabla de miscibilidad de disolventes.....	38
tabla 2.4	Serie Eluotrópica	40
tabla 2.5	Parámetros de Polaridad de los solventes más utilizados en C.L.	42
tabla 2.6	Agrupación de los solventes de acuerdo a la selectividad de grupos de la fig. 2.4	46
tabla 2.7	Comparación de los diferentes tipos de bombas..... para la moderna C.L.	55
tabla 2.8	Inyectores: Jeringa ó Válvula.....	63
tabla 2.9	Especificaciones de los detectores más comunes en C.L.	75

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
fig. 1.1 Historia de la Cromatografía.....	3
fig. 1.2 Clasificación de la Cromatografía	5
fig. 1.3 Fase Normal	7
fig. 1.4 Fase Reversa	7
fig. 1.5 Guía para la elección del tipo de CLAR.....	8,9
fig. 1.6 Parámetros de retención.....	12
fig. 1.7 Gráfica de Van Deemter	16
fig. 1.8 Respuesta típica de un componente	17
fig. 2.1 Partes componentes de un HPLC.	18
fig. 2.2 Tipos de partículas para la moderna C.L.	21
fig. 2.3 Esquema del reservorio de la fase móvil	37
fig. 2.4 Triángulo de Selectividad para los solventes	45
de la tabla 2.5	
fig. 2.5 Esquemas de los diferentes tipos de bombas.....	52
fig. 2.6 Gráficas de composición de la fase móvil	57
en función de tiempo.	
fig. 2.7 Inyector de Septum	61
fig. 2.8 Inyector de Válvula	61
fig. 2.9 Funcionamiento del inyector automático	63
fig. 2.10 Detector de luz U.V.....	69
fig. 2.11 Detector de luz U.V. de longitud de onda variable.....	69
fig. 2.12 Detector de I.R. tipo "desviación"	70
fig. 2.13 Detector de I.R. tipo "Fresnel"	71
fig. 2.14 Fluorometro de flitro	74
fig. 3.1 PEGS.	89

OBJETIVOS

Hablar de HPIC, * High Performance Liquid Chromatography * (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) CLAR, es complicado si no ubicamos lo que se pretende con una tesis de este tipo.

El objetivo por tanto, es presentar información que apoye en la solución de los problemas de separación de las muestras trabajadas por este método.

En cuanto a los avances, el objetivo es ofrecer una revisión del desarrollo que se ha tenido en el Equipo e Instrumental a nivel mundial.

1.- INTRODUCCION

El término cromatografía define de forma acertada el conjunto de mecanismos separadores que se basan en el mismo fundamento físico y son descritos, en general por una sola teoría.

Hoy día la CLAR representa un método estandar del análisis moderno que requiere además del conocimiento de los mecanismos fundamentales y la comprensión teórica de los procesos de separación, cierta experiencia práctica por parte del Químico, para aprovechar de una manera óptima el Equipo e Instrumental.

En la primera parte de este trabajo, se mencionan fundamentos de la CLAR, para recordarlos y sirvan de soporte al resto de la tesis.

La segunda parte nos lleva directamente al Equipo e Instrumentación.

Se habla de cada parte que forma el Equipo por separado, se da una introducción y consejos para el manejo y cuidado, concluyendo con los avances que se han tenido respectivamente.

La Fase móvil no forma parte del Equipo e Instrumentación, sin embargo es básica en el proceso de separación.

La tercera parte y última, incluye problemas comunes en los análisis y resolución de los mismos.

1.1 Antecedentes Históricos.

La cromatografía como su nombre los indica, fue empleada originalmente con sustancias coloreadas. (Literalmente la palabra significa "escritura de color").

La Cromatografía de Líquidos data cerca de 75 años de desarrollo como técnica de separación, y con el advenimiento de la Instrumentación moderna la Cromatografía de Líquidos (CL) brinda cuantificación y reproducibilidad de manera rápida y simple.(2).

En 1850, Runge describió la formación de zonas coloreadas cuando se goteaban sustancias colorantes sobre papel secante, pero el desarrollo más importante - vino en 1903 con los experimentos del Ruso Botánico Michael Tswett, quién utilizó Cromatografía de Columna para separar los pigmentos de ciertas plantas como Carotina que da el color amarillo-anaranjado de la zanahoria. También la Xantofila - que da el color amarillo de ciertas células vegetales.

Estos pigmentos fueron extraídos con petróleo usando una fase estacionaria de carbonato de calcio.

No fue hasta el año de 1941 cuando Martin y Synge se encontraban experimentando con Cromatografía de Partición y descubrieron una técnica mediante la cual se pudieran separar compuestos acuosos o hidrofílicos.

Esto marcó un nuevo interés en la técnica y en 1944, Consden, Gordon y Martin lograron separar mezclas complejas de aminoácidos en papel siendo otorgado el premio Nobel por sus trabajos. Al poco tiempo en 1947, en EJA, la Comisión de Energía Atómica dió a conocer información sobre el uso de la Cromatografía de Intercambio Iónico para la separación de productos de fisión nuclear.

En el año de 1959, Porath y Flodin introdujeron una nueva técnica llamada cromatografía de filtración de gel. En 1967 el Cromatógrafo de líquidos LSC-1000 se introdujo en el mercado.

Debido a la explosión tecnológica acontecida en las últimas décadas de este siglo, el hombre ha tenido la necesidad de ir incorporando nuevos desarrollos a los sistemas que conforman la gran variedad de instrumental de análisis, que son utilizados en varios campos de aplicación. (2,7,16).

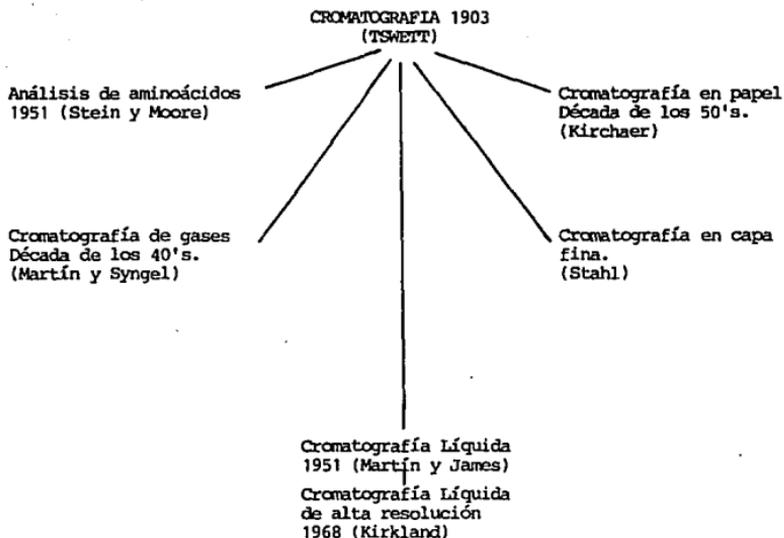


fig. 1.1. Historia de la Cromatografía.

1.2 Concepto de Cromatografía.

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en distribución de los componentes a separar entre dos fases; una de ellas es la fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra.

En otras palabras, una vez seleccionada la fase móvil y la fase estacionaria - que se va a usar, se introduce la muestra en el sistema cromatográfico. El comportamiento y características de la mezcla dictarán si se mueve o no.

Esta diferencia en movimiento que ofrece la mezcla es la migración o en realidad la base para toda separación cromatográfica. (16,17).

1.3 Clasificación y Generalidades.

La Cromatografía como técnica y ciencia se separa en tres áreas para su estudio. Gas, Líquida y Papel/Capa Fina. En realidad Papel/Capa Fina es una forma de Cromatografía de Líquidos pero nos enfocaremos a la cromatografía líquida de columna (CL). (7).

Basándonos en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en - cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, las cuales a su vez se subdividen al tomar en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria, tal y como se muestra en la fig. 1.2.

La clasificación más utilizada es considerando los procesos de separación, así se pueden enumerar cuatro tipos :

Cromatografía de adsorción.- La fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil puede ser un líquido o un gas; la separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción. El grado de separación depende por lo tanto notablemente de la superficie activa del sólido y, por lo tanto, el tamaño de partícula sólida que se emplea debe ser lo menor posible para tener una mayor superficie activa en relación al volumen del empaque.

Aplicaciones. Los compuestos que contienen ciertos grupos funcionales son retenidos más fuertemente que otros. La tendencia a ser adsorbido disminuye en el siguiente orden: ácido alcohol carbonilo éster hidrocarburo. La naturaleza del adsorbente también influye en la determinación del orden de adsorción. Gran parte de los conocimientos sobre este campo son empíricos; la elección del disolvente y el adsorbente para una separación dada debe hacerse con frecuencia en base a experiencia práctica.

Cromatografía de partición.- La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y por eso, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está saturada con la fase móvil y viceversa, de tal manera que la separación se efectúa entre dos fases debido a las diferencias de afinidad de los componentes por cada una de las dos fases, esto es, a sus diferencias en sus coeficientes de reparto.

Aplicaciones.- La cromatografía de partición ha resultado un poderoso instrumento para la separación de sustancias estrechamente relacionadas. Ejemplos típicos son la resolución de numerosos aminoácidos formados en la hidrólisis de una proteína, la separación y análisis de los alcoholes alifáticos estrechamente relacionados y la separación de derivados de azúcares.

Cromatografía de intercambio iónico.- El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluída.

La fase móvil es un tampón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

Aplicaciones. Encuentran mucho uso en el análisis de aminoácidos.

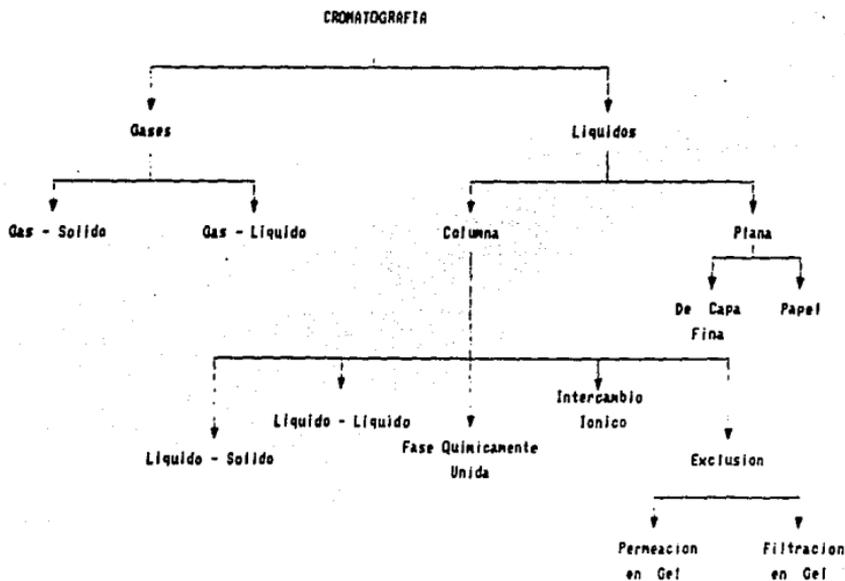


Fig. 1.2 Clasificación de la Cromatografía.

Cromatografía de par iónico.- Es una alternativa de la cromatografía de intercambio iónico. Mezclas de ácidos, bases y sustancias neutras son frecuentemente difíciles de separar por las técnicas de intercambio iónico, por lo que se utiliza par iónico. La fase estacionaria es la misma que para fase reversa*. Un compuesto orgánico iónico, el cual forma un par iónico con un compuesto de la muestra es añadido a la fase móvil. Este par iónico es una sal, que se comporta cromatográficamente de manera semejante a una molécula orgánica no iónica que puede separarse en fase reversa.

Cromatografía de Exclusión.- El relleno de la columna es un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

Si el material estacionario es un gel reticulado se le denomina filtración en gel y si es un polímero rígido se le denomina permeación en gel; en ambos casos el proceso de separación se efectúa por lo mismo, la diferencia de pesos moleculares.

Aplicaciones. Este tipo de cromatografía es usada por los químicos de polímeros y los bioquímicos para la estimación de pesos moleculares de moléculas grandes en este caso, el volumen de elución de la incógnita se compara con los volúmenes de elución de una serie de compuestos estándares que tienen las mismas características químicas. (17,18,19).

La cromatografía de líquidos también se clasifica según sea la polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto:

Cromatografía en fase normal.- En este tipo de cromatografía, necesitamos una fase estacionaria "polar" para separar compuestos polares. Así que la fase móvil o sea el solvente es apolar. Ver fig. 1.3.

Los empaques para "Fase Normal" son : Sílica (Si), Amino (NH_2), Ciano (CN), - Diol, estas tres últimas utilizadas como fases enlazadas.

*Cromatografía en fase reversa.- Tiene condiciones que requieren una fase estacionaria (empaque) no polar y una fase móvil (solvente) más polar. Ver fig. 1.4.

Los empaques para "Fase Reversa" son: ODS (C_{18}), Octyl, Etil y Dimetil.

La cromatografía en fase reversa es muy popular, le sigue la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión.

En la tabla 1.1 comparamos la cromatografía en fase normal y en fase reversa, de una manera sencilla para distinguir las diferencias entre ambas.

Y por último en la fig. 1.5 se ofrece una guía para elegir el tipo de CLAR de acuerdo al peso molecular de nuestra muestra a separar.



Fig. 1.3 Fase Normal

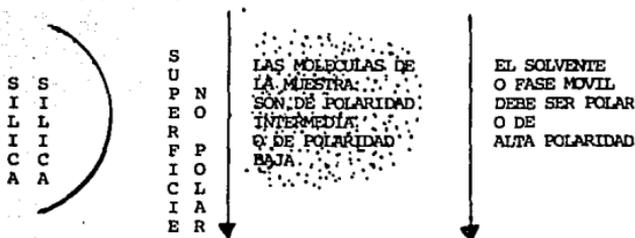


Fig. 1.4 Fase Reversa

	FASE NORMAL	FASE REVERSA
Polaridad Empaque	ALTA	BAJA
Polaridad Solvente	BAJA o MEDIANA	MEDIANA o ALTA
Orden de elución de la muestra	MENOS POLAR PRIMERO	MAS POLAR PRIMERO
Efecto de aumentar polaridad del solvente	REDUCE TIEMPO DE LA ELUCION	ALUMENTA TIEMPO DE ELUCION

Tabla 1.1. Fase Normal vs Fase Reversa

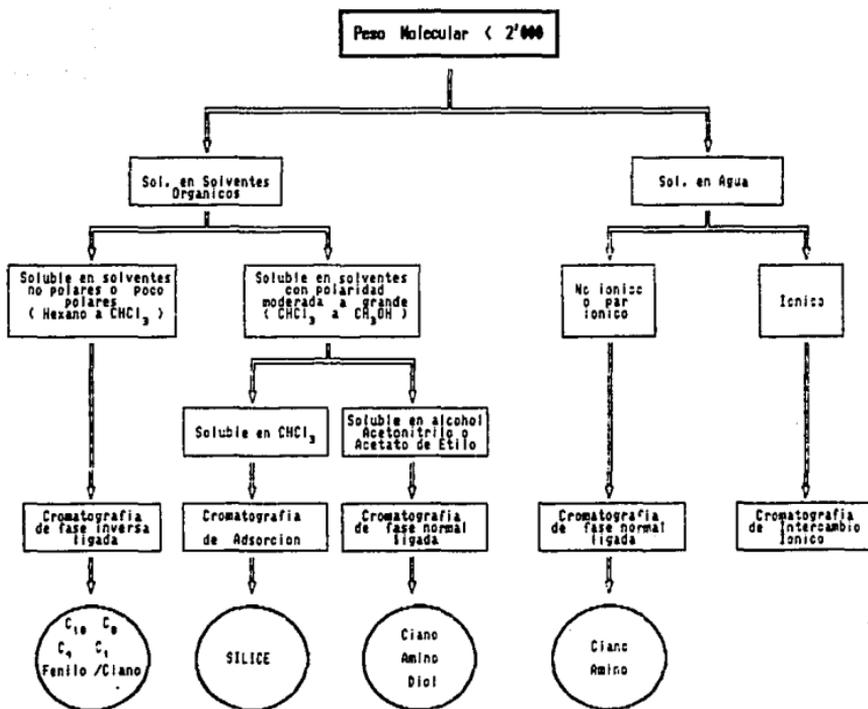


Fig. 1.5 Guía para la elección del tipo de CLAR. (8).

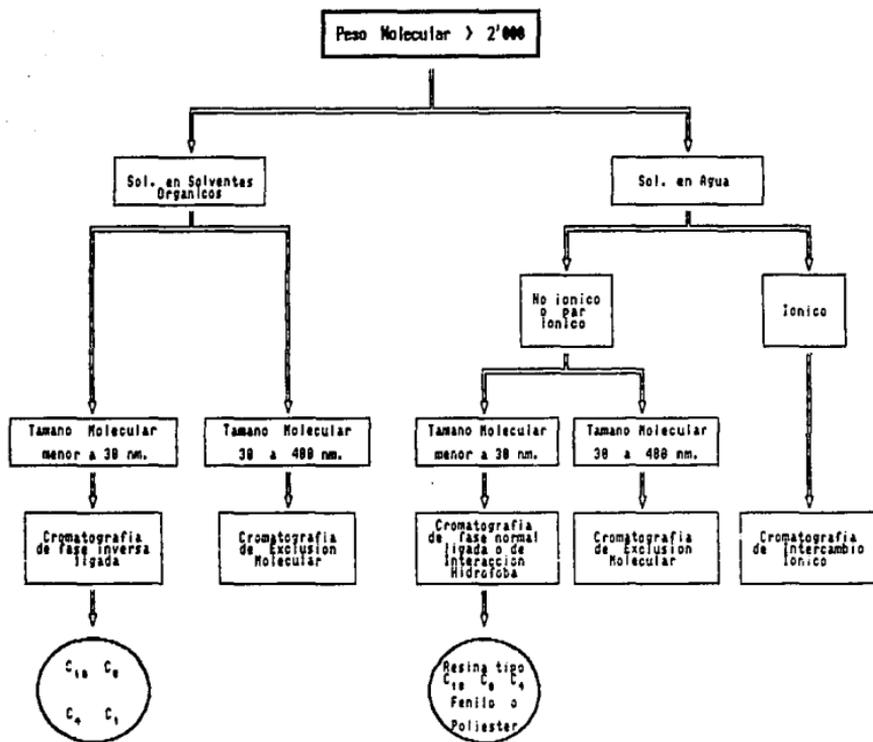


Fig. 1.5 Guía para la elección del tipo de CLAR. (8). continua

1.4 Términos más usuales en HPLC.

Para comprender el proceso cromatográfico, debemos recordar como se lleva a cabo el reparto entre dos fases no miscibles.

Al ponerse en contacto dos fases no miscibles, por ejemplo, una fase a la que denominaremos móvil (subíndice M) y la otra estacionaria (subíndice E), un soluto A que es soluble en las dos fases, se repartirá de acuerdo al equilibrio:



cuyo coeficiente de reparto K_A será:

$$K_A = \frac{C_{AE}}{C_{AM}} = \frac{n_{AE} V_M}{n_{AM} V_E} \quad (1.1)$$

en donde:

C_{AE} = concentración de la especie A en la fase estacionaria.

n_{AE} = moles de la especie A en la fase estacionaria al equilibrio.

V_E = volumen de la fase estacionaria.

C_{AM} = concentración de la especie A en la fase móvil al equilibrio.

n_{AM} = moles de la especie A en la fase móvil al equilibrio.

V_M = volumen de la fase móvil.

Este coeficiente de reparto es una medida de la afinidad del soluto por la fase estacionaria. Para un compuesto cuyo valor de coeficiente de reparto es cero se tiene una concentración nula en la fase estacionaria, por lo que se dice que no tiene afinidad o que no es retenido por la fase estacionaria. De la misma manera, si el valor del coeficiente es mayor que cero, se dice que el compuesto es retenido o tendrá más afinidad por la fase estacionaria entre mayor sea el coeficiente de reparto.

Considerando que el total de los moles de A es la suma de los moles de esta especie en cada una de las fases, la fracción molar de A en la fase móvil estará definida por p:

$$p = \frac{1}{K_A (V_E/V_M) + 1} \quad (1.2)$$

y la fracción molar de A en la fase estacionaria por q:

$$q = \frac{K_A}{K_A + (V_M/V_E)} \quad (1.3)$$

y consecuentemente :

$$p + q = 1 \quad (1.4)$$

Lo hasta aquí expuesto se refiere al reparto del soluto entre dos fases de volumen definido. En el sistema cromatográfico, se tiene un acomodo continuo de fase estacionaria y se puede considerar que se van estableciendo equilibrios sucesivos de reparto en pequeñas fracciones del sistema. A estas fracciones se les llama platos teóricos. Estos equilibrios se van estableciendo en base a lo que la fase móvil va arrastrando y poniendo en contacto con la fase estacionaria. (11).

De manera general el soluto se repartirá en las dos fases hasta alcanzar el equilibrio y tener p y q como fracciones molares de A en la fase móvil y en la estacionaria respectivamente. Si se enumera con r el número de fracción de la columna y con n el número de etapa o de transferencia se tiene una distribución binomial:

r =	0	1	2	3	4
n = 0	p q				
n = 1	pq q ²	p ² pq			
n = 2	p ² q ³	2p ² q 2pq ²	p ³ p ² q		
n = 3	p ³ q ⁴	3p ² q ² 3pq ³	3p ³ q 3p ² q ²	p ⁴ p ³ q	
n = 4	p ⁴ p ⁵	4p ² q ³ 4pq ⁴	6p ³ q ² 6p ² q ³	4p ⁴ q 4p ³ q ²	p ⁵ p ⁴ q

y así sucesivamente.

Para $n = 4$, la fracción molar total en la fase móvil es:

$$pq^4 + 4p^2q^3 + 6p^3q^2 + 4p^4q + p^5 = p (p+q)^4 \quad (1.5)$$

y la fracción molar total en la fase estacionaria es:

$$q^5 + 4pq^4 + 6p^2q^3 + 4p^3 + p^4q = q (p+q)^4 \quad (1.6)$$

Para cualquier valor de n se tendrá $p (p+q)^n$ en la fase móvil y $q (p+q)^n$ en la fase estacionaria. Esta expansión binomial se aproxima a una distribución normal o de Gauss, si n es suficientemente grande ($n > 30$), lo cual fácilmente puede cumplirse en HPLC. Se puede demostrar que la distribución de salida del compuesto A del sistema cromatográfico también sigue una distribución normal, que es lo que el detector y el graficador presentan como registro y que comúnmente se conoce como pico.

Este modelo ayuda a explicar la forma que tienen los picos, es muy simplificado y solo considera el reparto del compuesto entre dos fases y que en todos los casos se alcanza el equilibrio. (11).

Definición de los parámetros de retención.

Si se considera un cromatograma como el siguiente:

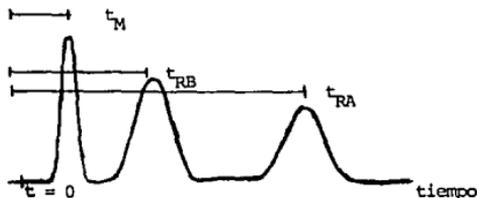


Fig. 1.6 Parámetros de retención (11).

El tiempo medido desde la introducción o inyección de la muestra al sistema hasta el máximo del pico de un compuesto no retenido (compuesto que no tiene ninguna afinidad por la fase estacionaria, esto es $K = 0$), se conoce como tiempo muerto (t_M). En ocasiones se le denomina tiempo del aire, puesto que éste generalmente no es retenido.

El tiempo que tarda en salir un compuesto A retenido, medido desde el momento

de la inyección, hasta el máximo del pico es el tiempo t_{RA} . El volumen de fase móvil necesario para que salga el máximo del pico de un compuesto no retenido es el volumen muerto V_M . El volumen necesario para que salga el compuesto A es V_{RA} .

Si F es el flujo de la fase móvil, generalmente medido en ml/min, entonces: (7,11,17).

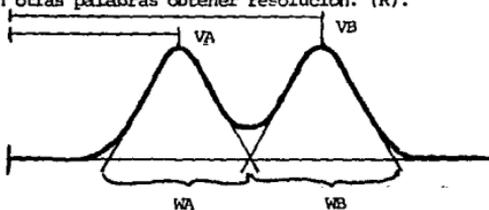
$$V_M = Ft_M \quad (1.7)$$

y

$$V_{RA} = Ft_{RA} \quad (1.8)$$

Parámetros de separación.

Primordialmente, lo que se desea obtener en CLAR, es la separación de dos compuestos. En otras palabras obtener resolución. (R).



$$R = \frac{V_{RB} - V_{RA}}{\frac{1}{2} (W_A + W_B)} \quad (1.9)$$

donde:

V_{RB} = Volumen necesario para que salga el máximo del compuesto B.

V_{RA} = Volumen necesario para que salga el máximo del compuesto A.

W_A = Ancho del pico A en la base.

W_B = Ancho del pico B en la base.

Esta ecuación implica la medida de separación de dos componentes. Asumiendo que existe simetría entre los dos picos podemos ampliar el concepto de resolución y encontrar tres factores fundamentales que integran la separación cromatográfica.

(5,7,11,17).

1.- Factor de Capacidad.

K' que representa la capacidad de la columna. Es decir mide la afinidad de la muestra en la fase estacionaria. K' se define como:

$$K'_A = \frac{t_{RA} - t_M}{t_M} = \frac{V_{RA} - V_M}{V_M} \quad (1.10)$$

Puede establecerse que el coeficiente de reparto, K , está en función del factor de capacidad, según: $K = K' (V_M/V_E)$ (1.11) ver ecuación 1.1.

2.- Factor de separación.

Es la proporción neta de retención para dos componentes. Se define como:

$$\alpha = \frac{V_{RB} - V_M}{V_{RA} - V_M} \quad \begin{array}{l} \alpha = 1 \text{ No separación} \\ \alpha \neq 1 \text{ Separación} \end{array} \quad (1.12)$$

3.- Número de platos teóricos.

N , se manifiesta como estaciones de separación dentro de la columna, como se vio anteriormente. Se define como: (10,11,17).

$$N = 16 \left(\frac{V_{RA}}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_{RA}}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_{RA}}{W \frac{1}{2}} \right)^2 \quad (1.13)$$

En donde:

W = Ancho del pico en la base.

$W \frac{1}{2}$ = Ancho del pico en la mitad de la altura.

t_{RA} = Tiempo de retención de A.

V_{RA} = Volumen de retención de A.

La altura equivalente de platos teóricos (HEPT), también mide la eficiencia y se define como: "la mínima distancia dentro de la columna donde se establece el equilibrio termodinámico de la concentración del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria", y se expresa mediante la ecuación:

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N} \quad \text{En donde: } L = \text{Longitud de la columna} \quad (1.14)$$

Conjuntando los tres parámetros que determinan el grado de separación de cada uno de los componentes (solutos) de una muestra, encontramos la ecuación de resolución, es ahora como sigue:

$$Rs = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) \sqrt{N} \quad (1.15)$$

Factor de separación ó de partición relativo.	Factor de capacidad ó de retención.	Factor de eficiencia de la columna.
---	-------------------------------------	-------------------------------------

Los tres factores que se muestran en la ecuación anterior, enfatizan nociones cualitativas como son:

- (a) La separación de los componentes requiere que tengan diferentes coeficientes de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria. ($\alpha \neq 1$).
- (b) La separación de los componentes requiere que sean retenidos reversiblemente por la columna ($K' \neq 0$). Un K' muy grande trae consigo un tiempo de análisis muy largo.
- (c) La separación de los componentes requiere un mínimo de eficiencia de parte de la columna en términos de platos teóricos (N).

Los primeros dos factores (a,b) son esencialmente termodinámicos en tanto que, el número de platos teóricos está asociado a parámetros cinéticos de la cromatografía.

La resolución de dos o tres componentes, hasta alcanzar un valor óptimo de la ecuación de resolución con un valor de 1.5 significando una buena separación, se logra ajustando la composición de la fase móvil y fase estacionaria (columna), esto es de los valores de K' . Para 10 o 20 componentes, la resolución es posible solo incrementando N (la eficiencia de la columna), que significa mejorar las características cinéticas de la misma, más que las termodinámicas.

Estos tres factores sugieren que una separación eficiente es aquella en que los compuestos tienen afinidad suficientemente diferente por la fase estacionaria que el sistema produce picos "angostos" y que los separa en el menor tiempo posible. (5,17).

La relación del flujo (velocidad de la fase móvil) y HEPT, también nos brinda otro concepto fundamental de separación cromatográfica, conocido como relación de Van Deemter.

Esta demuestra una ecuación de tres términos y cada uno de ellos describe un efecto físico que relaciona los parámetros operacionales de la columna con su eficiencia y que los controla el cronatografista. (11,17).

En cronatografía de gases, se utiliza la fórmula :

$$HEPT = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (1.16)$$

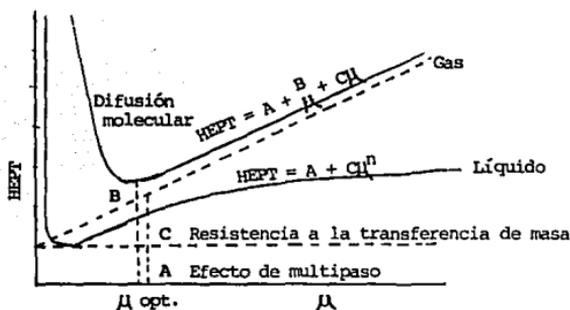


Fig. 1.7 Gráfica de Van Deemter que muestra la velocidad óptima de la fase móvil y la eficiencia de la columna en -
Cromatografía de gases y líquidos. (17).

Donde :

A = Representa el efecto de multipaso. Describe el ensanchamiento del pico debido al patrón de flujo de la fase móvil en la columna.

$\frac{B}{\mu}$ = Describe la difusión que tiene lugar en la fase móvil cuando el soluto molecular emigra desde las zonas de alta concentración hasta zonas de menor concentración.

CU = Resistencia a la transferencia de masa.

μ = Velocidad lineal promedio de la fase móvil.

μ = Longitud de la columna en cm

t_0

t_0 = Tiempo muerto.

Cuando nuevas, cada columna viene acompañada de un cromatograma que nos habla de su calidad mediante dos parámetros: N y el factor de asimetría (A_s).

$$A_s = \left(\frac{B}{A} \right)^2$$

En donde: B = Distancia después del centro del pico.

A = Distancia antes del centro del pico.

Una buena columna debe dar valores de asimetría de menos de 2.5.

A mayor número de platos teóricos (N), menor es el valor de HEPT y mayor eficiencia o poder de separación. También representa una medida de la calidad del empaque en una columna.

Como un cromatograma presenta la forma de una curva normal, esta presenta una desviación estándar σ la cual nos indica cuan agudo es un pico; debido a que este valor depende de varios parámetros, entre ellos el caudal se ha optado por utilizar un valor relativo para expresar la calidad de un pico, este valor es el cociente entre la desviación estándar y el tiempo de retención σ / T_r llamado tiempo de retención relativo.

Como el valor que se obtiene de la fórmula citada es muy pequeño se utiliza su inverso $N = \frac{T_r}{\sigma}$ y al cuadrado por ser la varianza la media básica de una distribución normal $N = \frac{T_r^2}{\sigma^2}$. Para medir la altura a la cual se toma la anchura o desviación se utiliza la siguiente figura :

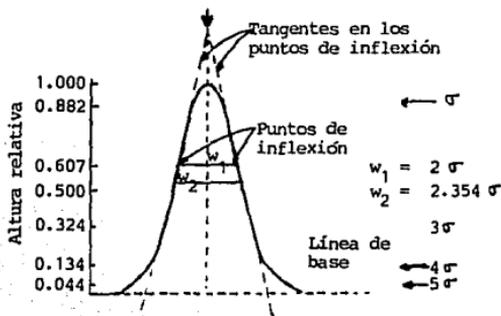


Fig. 1.8 Respuesta típica de un componente

2.- EQUIPO E INSTRUMENTACION

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las ramas más nuevas de la química analítica, cuyo crecimiento ha sido muy rápido y su potencial es enorme. Con el paso de los años se han presentado modificaciones o cambios en los componentes que integran un sistema de HPLC.

Por otro lado, el mayor potencial de la cromatografía líquida en comparación con la cromatografía de gases se debe a dos factores primordialmente.

El primero es que más moléculas pueden disolverse, a diferencia de las que pueden ser volatilizadas y aún retener su estructura molecular original.

Y segundo, la cromatografía líquida es una técnica más suave que la cromatografía de gases y menos factible de dañar las moléculas delicadas.

Los componentes físicos de un sistema de HPLC están disponibles en diferentes presentaciones y configuraciones. (17,19).

Partes que constituyen el equipo.

Los principales componentes de un sistema HPLC se ilustran en la siguiente figura, estos componentes son : la columna, el detector, el sistema de bombeo, - fase móvil, registrador, e inyector.

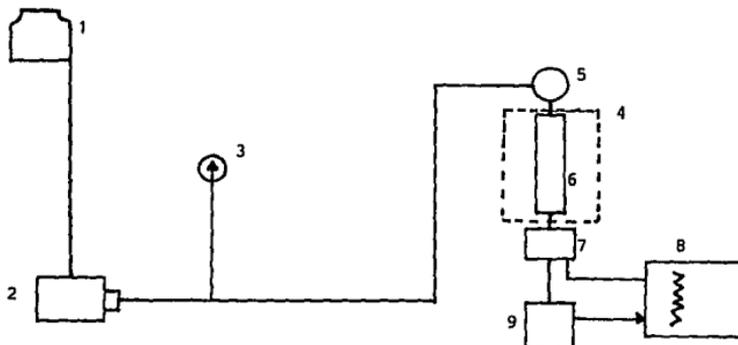


Fig. 2.1 Partes componentes de un HPLC. (1) reservorio de la fase móvil, (2) bomba, (3) medidor de presión, (4) horno de la columna, - (5) inyector, (6) columna, (7) detector, (8) registrador, (9) - equipo de manejo de datos. (19).

El sistema de HPLC, opera de la siguiente manera : la fase móvil es aspirada y entregada al sistema (a un flujo constante y libre de pulsaciones) al inyector, previamente cargado con la muestra, donde la toma y pasa a la columna.

En base a sus diferentes afinidades por la columna y la fase móvil, los principios activos de la muestra se van separando en bandas y así llegan (a diferentes tiempos) a la celda del detector. El detector genera una señal eléctrica que en el sistema de manejo de datos se transforma en una gráfica en forma de pico - gaussiano y cuya área o altura es directamente proporcional a la concentración de cada principio activo. Así también el sistema de manejo de datos realiza los cálculos y finalmente los imprime. (3,5,8,15,19).

Cuidados Generales.

La cromatografía de líquidos de alta resolución ha tomado auge en los últimos años lo que ha permitido un alto desarrollo dentro de las diferentes industrias como son : la farmacéutica, alimenticia, química, plásticos, petroquímica e investigación entre otras. A pesar de esta diversidad de campos de aplicación todas convergen en problemas comunes de manejo. De aquí nace la necesidad de sugerir algunos de los cuidados más importantes a tomar en cuenta. (14).

En primer término, siempre que se vaya a operar cualquier equipo, por buenas prácticas de laboratorio se debe leer cuidadosamente el manual de operación general un procedimiento escrito en nuestro idioma, donde se detalla minuciosamente el buen funcionamiento del equipo HPLC, depende en gran medida de los cuidados de limpieza que se tengan con el instrumento, siguiéndose para ello el siguiente procedimiento I. (5).

- 1) Retirar la columna del equipo.
- 2) Conectar la salida del inyector con la entrada del detector.
- 3) Fijar un límite de presión permisible en la bomba. NO MAYOR DE 1000 psi.
- 4) Pasarle al sistema agua grado HPLC un volumen de aproximadamente 500 ml y un flujo de 5ml/min.
- 5) Pasarle al sistema HNO_3 6N un volumen de aproximadamente 100 ml a un flujo de 5ml/min.
- 6) Pasarle nuevamente agua grado HPLC a un flujo de 5ml/min., un volumen necesario para eluir completamente el medio ácido, para ello es recomendable medir el pH de salida y que éste sea igual al de entrada.

Este procedimiento es recomendable hacerlo por lo menos una vez al mes o de--

pendiendo del uso de sales y la frecuencia, realizarlo más veces.

Procedimiento II.

- 1) Repetir los puntos 1 al 4 del procedimiento I.
- 2) Pasarle al sistema aproximadamente 100 ml de MeOH grado HPLC.
- 3) Pasarle al sistema aproximadamente 100 ml de Acetonitrilo grado HPLC.
- 4) Pasarle al sistema agua grado HPLC un volumen de aproximadamente 500 ml.

Este procedimiento es recomendable hacerlo por lo menos una vez al mes o más veces, dejándolo al criterio del analista.

Además es importante no olvidar checar los componentes del sistema por separado y de manera conjunta, para esto se recomienda ejecutar las rutinas que sugiere el fabricante, relacionados con medición de flujos, volumen de inyección y respuesta obtenida. (5).

2.1 COLUMNAS

2.1.1. Función.

La columna es el corazón de un cromatógrafo de líquidos. En ella se lleva a cabo el proceso fundamental de la cromatografía, es decir la separación de cada uno de los componentes de una muestra por la acción de la fase móvil.

La función de la columna, es contener la fase estacionaria en tanto que la fase móvil fluye a través de la columna. (5,10).

2.1.2. Características Generales y Cuidados.

Físicamente, se trata de un tubo hueco hecho de acero inoxidable o vidrio (aunque las hay de polietileno), de diferentes longitudes y diámetros internos.

Vamos hablar un poco de las características de los empaques: (14)

- a) Inerte.
- b) Gran Superficie.
- c) Resistencia mecánica.
- d) Tamaño de partícula uniforme.

En lo que respecta a (d), la resolución mejora al disminuir el tamaño de partícula (N aumenta), además la trayectoria de emigración entre partículas son más uniformes, lo cual reduce el término A en la ec. de Van Deemter. Ver ec. 1.16. El precio de utilizar partículas muy finas es la resistencia al flujo, por

lo que es necesario emplear alta presión. (8).

Generalmente los empaques son partículas de alúmina o sílica bien compactadas, estas son la base de la moderna CL. Los empaques son de tres formas, ver fig. 2.2.

- Empaques rígidos, la matriz es de sílica, pueden resistir presiones altas - (10,000 - 15,000 psi.)esto es utilizando empaque estable y con tamaño de partícula pequeño la columna será eficiente. Las partículas de sílica se pueden obtener en varios tamaños, formas y grados de porosidad. Varios grupos funcionales o capas poliméricas pueden ligarse a la superficie de la sílica. (19,20).

- Las geles duros, se utilizan para la CL de intercambio iónico y de exclusión generalmente se basan en partículas porosas de poliestireno enlazadas de manera cruzada con divinylbenceno. Dependiendo de la forma de preparación las partículas resultantes pueden ser rígidas o porosas. Estas geles alcanzan presiones arriba de 5000 psi, pero algunas se limitan a menos de 2000 psi de presión. El mayor interés en estas geles duros es en la CL de exclusión.

Las geles blandas tales como la agarosa o shephadex para la filtración por gel se utilizan para la separación de largas moléculas solubles en agua tales como - proteínas.

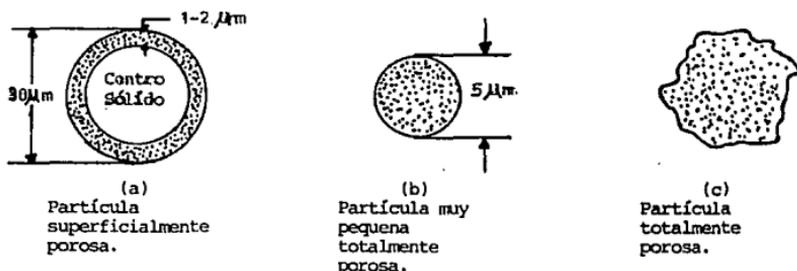
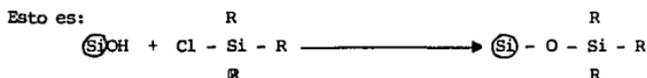


Fig. 2.2 Tipos de partículas para la moderna CL. (19).

- Las partículas peculiares, se forman a partir de cuentas esféricas de vidrio cubiertas de una película delgada de fase estacionaria. Esta capa porosa puede cubrirse con algún grupo orgánico o reactivo y formar un empaque con fase enlazada. Por ejemplo se puede formar una superficie de hidrocarburo haciendo reaccionar el clorooctadecil silano con grupos OH en la superficie de la gel de sílice. (18,19).



donde R es el grupo octadecilo y el Si en el círculo representa uno de los muchos grupos SiOH sobre la superficie de la partícula del gel. Entre los grupos que han sido unidos al gel de sílice pueden mencionarse las aminas alifáticas, los ésteres, los nitratos y los hidrocarburos aromáticos.

La columna C₁₈, que es ampliamente reconocida como la columna más versátil - utiliza este tipo de fase enlazada. Los grupos silanol (presentes en la superficie de la gel de sílice se hace reaccionar con un agente silanizante para producir la fase C₁₈ (ODS). (7).

Propiedad	Empaques totalmente porosos			Pelicular esférico (>20 μ m)
	Irregular (>20 μ m)	Esférica (>20 μ m)	Esférica o irregular (<20 μ m)	
Eficiencia	baja a moderada	baja a moderada	alta	moderada a alta
Velocidad	moderada	moderada	rápida	rápida
Características del empaque	regular	bueno	regular	excelente
Costo	bajo	moderado	alto	alto
Permeabilidad de la columna	alta	alta	baja	muy baja

Tabla 2.1 Resumen de las características de diferentes empaques para Cl. (19).

- Las partículas porosas en CL, pueden ser esféricas o irregulares, y están disponibles en varios tamaños (5 μ m y más). La sílica irregular se prepara primero por la precipitación de ácido silícico a partir de una solución acuosa, luego se cruza y se apelmaza la sílica para dar tamaños de partícula uniformes. Las partículas de sílica esféricas se sintetizan directamente usualmente por aglomeración o fusión de tamaño de partícula de A^0 o micras dentro de largas esferas. (10).

De acuerdo al tipo de cromatografía utilizada, se necesitan las siguientes fases estacionarias : (18, 20).

Cromatografía de adsorción.- El gel de sílice es sin duda el adsorbente más empleado para la cromatografía líquido-sólido, aunque también se utiliza mucho la alúmina. Se disponen de materiales de empaque de diámetro de partícula especificada que se obtienen a través de diferentes fuentes comerciales.

Cromatografía de partición.- El soporte sólido para este tipo de cromatografía es el ácido silícico o gel de sílice. Este material adsorbe agua fuertemente, la fase estacionaria es así acuosa. Para algunas separaciones la inclusión de un amortiguador o un ácido (o base) fuerte en la película acuosa ha demostrado ser útil.

El tipo de empaque para intercambio iónico y exclusión molecular se menciona antes. (18, 22).

Para ayudarnos a resolver nuestro problema de separación a continuación se -- dará una tabla con los grupos químicos que sirven como fases enlazadas .

Tabla 2.2 Resumen de los grupos químicos que sirven como fases enlazadas.(21)

Tipo de modificación	Grupo Funcional	Grupo orgánico Si-C	Aplicación
C ₄	Butil	$-(CH_2)_3-CH_3$	Se utiliza en cromatografía de fase reversa y par iónico. Para la separación de péptidos y proteínas. La fase C ₄ , muestra menor tiempo de retención que C ₈ y C ₁₈ .
C ₈	Octil	$-(CH_2)_7-CH_3$	Se utiliza en cromatografía de fase reversa y par iónico. Para compuestos de moderados a altamente polares (solubles en agua) tales como pequeños péptidos y proteínas, esteroides nucleosidos, farmacéuticos polares etc.

Continúa

Tipo de modificación	Grupo Funcional	Grupo orgánico Si-C	Aplicación
C ₁₈	Octadecil	$-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$	Se utiliza en cromatografía de fase reversa y par iónico. Para compuestos de no polares a moderadamente polares tales como ácidos grasos, glicéridos, hidrocarburos aromáticos polinucleares, ésteres (ftalatos), vitaminas solubles en grasa, esteroides, prostaglandinas, aminoácidos.
C ₆ H ₅	Fenil	$-(\text{CH}_2)_3-$	Se utiliza en cromatografía de fase reversa y par iónico. Para compuestos moderadamente solubles. Las características de retención son semejantes a los empaques C ₈ , pero con la diferencia de selectividad para hidrocarburos aromáticos policíclicos aromáticos polares y ácidos grasos.
CN	Ciano	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$	Se utiliza en cromatografía de fase normal y fase reversa. En fase normal, con solventes relativamente no polares, los empaques con grupo CN separan muestras polares sin modificar la sílica. Debido al equilibrio rápido que se obtiene, los empaques con CN son estables, inclusive en separaciones por gradiente sin modificar la sílica. En cromatografía de fase reversa, los empaques con grupo CN, ofrecen diferente selectividad que los empaques con C ₁₈ , C ₈ y Fenil.
NO ₂	Nitro	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NO}_2$	Se utiliza para la separación de compuestos con doble ligadura, ej. compuestos aromáticos en general, de preferencia hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Continúa

Tipo de modificación	Grupo Funcional	Grupo orgánico Si-C	Aplicación
NH ₂	Amino	-(CH ₂) ₃ -NH ₂	El empaque NH ₂ , se utiliza con varios tipos de cromatografía : fase normal, intercambio de aniones débiles, y fase reversa de compuestos polares tales como carbohidratos. En fase normal (usa hexano, CH ₂ Cl ₂ e isopropanol como fase móvil), el empaque NH ₂ , separa compuestos polares tales como substitutos de anilinas, esterés, pesticidas clorinados, etc. Aniones y ácidos orgánicos son analizados por intercambio iónico, usando comúnmente buffer (ej. acetatos, fosfatos) en conjunto con modificadores orgánicos (ej. acetonitrilo).
N(CH ₃) ₂	Dimetil Amino	-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	Intercambio anionico, debilmente básico. Estos empaques se pueden usar de la misma manera que los amino.
OH	Diol	-(CH ₂) ₃ -O-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ -OH	Se utiliza para cromatografía de fase normal y fase reversa. Este grupo diol es menos polar y facilmente lavable con agua. Nos ayuda en la separación de péptidos y proteínas.
SA	Acido Sulfónico	-(CH ₂) ₃ -SO ₃ Na	Se utiliza en intercambio iónico. Intercambio de cationes, fuertemente ácido. Capacidad aproximada 1mval/g.
SB	Amonio cuaternario.	-(CH ₂) ₃ -N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻	Se utiliza en intercambio iónico. Intercambio aniónico, fuertemente básico. Capacidad aproximada 1mval/g

Por otro lado, para asegurar la eficacia de la separación, es necesario que el empaquetamiento sea excelente, para esto hay que utilizar técnicas adecuadas ajustadas al tamaño de partícula.

Con materiales de empaque entre 20 y 30 micras de diámetro promedio, se usa normalmente el empaqueo en seco, que consiste en ir introduciendo el material de empaque tal cual, y con ayuda de un vibrador, asegurarse que no quedan espacios vacíos en el interior de la columna. (15,19).

El otro procedimiento para el empaque de las columnas, es el llamado "slurry" que es utilizado para materiales de empaque con un diámetro promedio menor a 20 micras, y que consiste en preparar un "lodo" con un material de empaque y solvente adecuado y posteriormente ir introduciéndolo a presión, con un aparato especial que vende cualquier distribuidor de equipos de CLAR.

Actualmente es difícil que se tenga la necesidad de preparar una columna por cuenta propia, ya que resulta más fácil, rápido y económico, adquirir las que existen en el mercado. (15).

Existen varios tipos de columnas :

- Las minicolumnas, las cuales ofrecen tiempos de análisis muy reducidos, se utilizan generalmente en análisis de trazas donde es muy improbable que ocurra una sobrecarga, son muy eficaces y el costo de éstas es muy elevado.
- Las columnas capilares, también llamadas abiertas o de Golay, y en las que la fase estacionaria se encuentra sobre las paredes, sin relleno. Utiliza empaques de diámetro interno muy pequeño, son muy costosas, por lo que no son de uso común. (23).
- Las precolumnas, en realidad son un aditamento que contiene un empaque químicamente igual al de la columna analítica. El tamaño de la partícula es sin embargo mucho mayor de modo que la caída de presión a través de la columna es despreciable con respecto al resto del sistema. La finalidad de la precolumna es retirar las impurezas del disolvente y de esta forma evitar la contaminación de la columna analítica. Además, la precolumna satura la fase móvil con el líquido que constituye la fase estacionaria; de esta forma, se evita la eliminación de la fase estacionaria del empaque de la columna analítica. (18).

Elección de los parámetros de la columna : (14).

a) Longitud de la columna

- Se empieza con columnas de unos 125 mm.
- Se prolonga en un múltiplo en caso de requerirse un número de platos más elevado para la resolución de los componentes y de no lograrse éste cambiando el sistema cromatográfico.

(Duplicación de la longitud de la columna = descenso de presión doble, tiempo de análisis doble, volumen de elución doble, permaneciendo inalterada la velocidad de flujo).

- Se prolonga en un múltiplo en caso de tratarse de cantidades de muestra mayores (aumento de la cantidad de adsorbente y la capacidad de la columna).
- Se emplearán columnas aún más cortas para problemas de separación muy rápidos pero sencillos, ya que así se reducen el tiempo de análisis, el consumo de disolvente y la dilución de la muestra ($\frac{1}{2}$ longitud de la columna = mitad del descenso de presión, mitad del tiempo de análisis, mitad del volumen de elución, manteniéndose igual la velocidad de flujo).

b) Diámetro interior

- Se empieza con un diámetro interior de unos 4mm. (Óptimo para la eficacia separadora, el límite de detección, consumo de disolvente y tiempo de análisis; descenso de la presión algo mayor en comparación con los diámetros interiores 4.6 y 5 mm).
- Aumento a 7 mm/10mm/25mm para trabajos preparativos.
- Aumento a 7 mm/10mm para la inyección de volúmenes de muestra mayores o en caso de problemas con el volumen de la célula detectora.
- Reducción a 1-2 mm si se trata de volúmenes de muestra muy pequeños, si se quiere gastar menos disolvente o si se requiere una gran sensibilidad de detección (escasa dilución) (determina también un volumen más pequeño de la célula detectora; conduce a un descenso de la presión sensiblemente mayor, siendo iguales la longitud de la columna y la velocidad de flujo).

c) Tamaño de partícula

- Se empieza con partículas de unos 7 μ m de tamaño medio. (Permeabilidad óptima; eficacia separadora extremadamente elevada).
- Se aumenta si la presión del aparato no es suficiente para columnas muy largas.
- Se aumenta para trabajos preparativos y cuando en problemas de separación sencillos sea primordial el caudal por unidad de tiempo.
- Se reduce cuando se requiera una mayor eficacia separadora por longitud de

la columna, separaciones más rápidas (columnas cortas) o volúmenes de elución pequeños (cantidad de muestra reducida).

d) Presión

- Relevante únicamente para establecer una cuota de flujo definida en el sistema cromatográfico dado.

e) Cuota de flujo

- Condiciones óptimas para columnas analíticas, generalmente alrededor de - 1 ml/min.

- Se aumentará solo en la medida que permita la pérdida de resolución (reduce el tiempo de análisis).

f) Conexión de columnas

- Interesante para la resolución de mezclas complejas con propiedades muy divergentes.

- Conduce a un ahorro significativo de tiempo (p. ej., columna corta para componentes muy retardados / columna larga para componentes no separados de - tiempo de retención corto).

- Aplicaciones nuevas y mejoradas para materiales con superficies específicas o capacidades lipófilas/hidrófilas.

Entre los cuidados que se necesitan para el buen funcionamiento de las columnas están : (5,17)

a) Cuidar el no golpearlas para evitar el fraccionamiento interno de la fase estacionaria.

b) Siempre después de un análisis, en necesario "limpiar" la columna y es aquí en donde debemos poner mayor atención.

La limpieza de las columnas de manera sistemática es un procedimiento que todo cromatografista debe practicar. Existe una falta de entendimiento para efectuar tal limpieza al igual que las razones por las cuales se tiene que hacer.

La principal razón para lavar una columna es para eliminar los solutos que - tardan mucho en eluir de la columna.

Nosotros vamos a considerar la columna C_{18} , que es la más común.

PRIMERO, HAY QUE LAVAR CON EL DISOLVENTE MAS FUERTE (POLAR). (24).

La manera más fácil de eliminar de la columna los contaminantes fuertemente - retenidos es lavar la columna con el disolvente más polar que constituye la fase móvil. Esto se hace con un procedimiento en dos etapas que se puede incorporar - en la rutina de fin de día (un programa de limpieza).

La primera etapa es eliminar el buffer del sistema, hay que hacer esto pasando de la fase móvil con el buffer, a la misma fase móvil pero sin el buffer (sin - ningun aditivo o reactivo especial y repetando la proporción de disolventes).

Esta es una etapa que no se debe pasar por alto ya que es posible precipitar el buffer cambiando al disolvente orgánico puro. Los problemas de precipitación son de alguna manera dependientes del sistema, aunque se ha visto precipitar -- buffer de fosfatos cuando la fase móvil se cambió directamente a 100% de acetoni trilo antes que se eliminara el buffer.

Se necesitan unos 5 volúmenes de columna de fase móvil sin buffer para eliminar precisamente el buffer presente. El volumen de una columna en ml puede estimarse para columnas estándares de 4.6 mm de diámetro interno, usando $0.1 L$, donde L es la longitud de la columna en cm. Así que una columna de 25 cm de longitud - tendrá un volumen muerto de alrededor de 2.5 ml, por lo tanto 2 ml/ mín durante 6 - 7 mint. tiene que eliminar la mayor parte del buffer.

Una vez que el buffer es eliminado, el segundo paso es lavar la columna con - el disolvente más polar. Se puede correr un gradiente desde la fase móvil no - amortiguada al disolvente orgánico puro o simplemente hacer un cambio brusco (no importa, el resultado será el mismo) hacia el disolvente orgánico puro.

QUE TANTO DISOLVENTE Y QUE TANTO TIEMPO SE DEBE LAVAR.

Si se tiene en cuenta que el material fuertemente retenido se comporta cronotograficamente de la misma manera que los compuestos de interés, la limpieza de la columna tiene que dejar de ser un misterio. Dos cosas tienen que tenerse en mente; la primera es la regla de tres y segundo es el volumen y no el tiempo lo que es más importante.

La regla del tres es una forma abreviada de recordar el efecto de la fuerza del disolvente sobre los tiempos de retención en fase reversa. La regla dice que la retención cambia por un factor de tres por cada 10% de incremento que experimenta el componente orgánico de la fase móvil. Por ejemplo, un soluto que eluye a los 15 mint. con una fase móvil 60/40 metanol:agua, es de esperarse que eluya a los 5 mint. con una fase móvil 70/30 metanol:agua. Esta regla es útil cuando se hace desarrollo de métodos , pero también nos da información acerca de que debemos - esperar bajo condiciones de lavado de columna. Consideremos un pico que eluye - tardiamente con un tiempo de retención de 100 mint. empleando 63% ACN/agua. Este pico sería muy amplio (4 mint. a nivel de la línea base para una columna de - 10000 platos teóricos) y probablemente sería visto como un pequeño levantamiento de la línea base . Veamos, usando la regla de tres, que pasa si usamos disolven-

tes más polares para lavar la columna. Pasando a un 73% de ACN, haría reducir su retención a 33 min.; 83% de ACN lo eluiría a los 11 min.; 93% de ACN lo haría a los 4 min. y 100% haría que eluyera a 2.5 min. (que equivale al volumen -- muerto de la columna). Como vemos, al cambiar a un disolvente más polar se puede eluir de la columna el material fuertemente retenido en un corto tiempo. Hasta aquí hemos hablado de retención y lavado en términos de volumen, ya que la retención cromatográfica es mejor expresada en volúmenes de columna. Podemos utilizar la relación de volumen para ayudarnos a calcular que tanto disolvente es necesario para lavar la columna. Usando la regla de tres es casi seguro que lavando -- con 10 volúmenes de columna se eluya cualquier soluto retenido. Durante la etapa de lavado se puede incrementar el flujo para apresurar esta etapa (lo cual es - perfectamente correcto ya que el volumen es más importante que el tiempo).

Al incrementar el flujo se tiene un beneficio extra, se incrementa la presión y pasa más fase móvil limpiando los sellos de la bomba., haciendo que la superficie del pistón se lave mejor.

SE NECESITA UN DISOLVENTE MAS FUERTE (24)

Lavar con el disolvente más polar de la fase móvil no siempre remueve los contaminantes más fuertemente retenidos. Este es un problema muy común cuando se - inyectan muestras sucias tales como fluidos biológicos o provenientes del medio ambiente. En estos casos se debe incrementar todavía más la fuerza del disolvente . Para separaciones en fase reversa, implica cambiar a un disolvente de fase normal, generalmente es cloruro de metileno el disolvente de elección.

Pasar directamente del disolvente más fuerte (por ejemplo metanol, ACN o tetrahidrofurano) a cloruro de metileno (y pasar 10 a 20 volúmenes de columna de este disolvente). Regresar al disolvente más fuerte (metanol, ACN o THF) y - pasar unos 10 volúmenes muertos de columna. Cada vez que se cambie de disolvente debe estarse seguro de la miscibilidad total de ambos disolventes. Por ejemplo, no se puede pasar directamente de 50% metanol/ agua a cloruro de metileno debido a que las soluciones acuosas no se mezclan con cloruro de metileno. De cometerse el error, tiene que pasarse 2-propanol que es miscible con disolventes tanto a - cuosos como con disolventes orgánicos polares.

Y SI LO ANTERIOR NO RESUELVE EL PROBLEMA DE ELUCION DE LOS CONTAMINANTES RETENIDOS

Algunas veces el lavado con disolventes no eluirá los solutos de la columna. Se puede mejorar la eficiencia del procedimiento de lavado explotando el conocimiento de la química de la muestra que se está separando.

En casos donde la contaminación con iones metálicos es el problema, el lavado

con EDTA ayudará a limpiar la columna. Cuando las proteínas enlazadas son la causa debe usarse detergentes (por ejemplo urea 8 M o guanidina) para solubilizarlas y eliminarlas. Los contaminantes fuertemente retenidos pueden removerse de la columna rápidamente si se invierte la columna y en tal posición se lava. Por ej. un soluto que ha migrado solamente 1 cm bajo condiciones normales de operación - debe lavarse durante los siguientes 24 cm antes de que abandone la columna.

Por otro lado si la columna se invierte antes de lavar, el soluto necesita migrar solamente 1 cm antes de ser eluido. Cuando la columna es invertida para lavarse, asegurarse de dejar la entrada de la columna desconectada del detector. - Lo anterior evitará que las partículas desprendidas del "frit" de entrada de la columna vayan a bloquear la celda de flujo del detector, o a ensuciarla o a actuar como centro de nucleación para otras impurezas (disminuyendo la respuesta del detector, la cual se recupera al lavar con HNO_3 diluido de acuerdo al manual de operación).

UN MÉTODO ALTERNATIVO AL LAVADO (24).

Cuando el número de muestras es pequeño o las muestras son siempre limpias -- casi no es necesario lavar la columna. Aún así, se hace necesario lavar para eliminar el buffer de la línea del cromatógrafo. Se puede dejar la misma fase móvil corriendo a un flujo muy lento como por ejemplo 0.1 ml/min. De esta manera los sellos estarán siempre húmedos y no se formará ningún depósito de sales.

Al iniciar el nuevo día de trabajo, incrementar la velocidad de flujo y proceder a inyectar. De usar este procedimiento es buena idea lavar con fase móvil libre del buffer como mínimo una vez a la semana.

DISOLVENTE PARA EL ALMACENAMIENTO DE LA COLUMNA.

Las columnas deben de almacenarse en una fase móvil libre de buffer y taparse perfectamente para evitar que se evapore el disolvente. Para columnas en fase reversa cualquier disolvente con menos del 50% de agua es adecuado para el almacenaje. Se debe consultar con el fabricante de la columna en caso de tener dudas de la compatibilidad de la columna con determinados disolventes. Una regla segura es la siguiente, dejar la columna con el mismo disolvente que tenía cuando se recibió, ya que si es bueno para el proveedor será bueno para el cromatógrafo.

RESUMIENDO LOS PASOS PARA EL LAVADO DE COLUMNAS : (24).

- 1) Cambiar a la misma fase móvil pero sin buffer (lavar con 5 volúmenes de columna).

- 2) Lavar con el solvente más fuerte de la fase móvil (10 a 20 volúmenes de columna).
- 3) Si el paso 2 no es adecuado, lavar con cloruro de metileno 10 a 20 volúmenes de columna.
- 4) Regresar al solvente más fuerte (paso 2, 10 volúmenes de columna).
- 5) Regresar a la fase móvil sin buffer (paso 1, 5 volúmenes de columna).
- 6) Regresar a la fase móvil (10 - 20 volúmenes antes de la primera inyección).

2.1.3. Avances.

Esta es una revisión de los avances enfocada en los aspectos de diseño, materiales y mantenimiento de columnas. Schmburg (1) examina una nueva tecnología e Instrumentación para cromatografía y electroforesis capilar. Tecnología para empacar columnas capilares, se reportó (2). La comparación de los finos parámetros de separación y análisis de mezclas binarias, utilizando diferentes tipos de columnas : capilares, microcolumnas, largas y cortas se reportó por (3). Las columnas capilares se encontró que proveen una significativa reducción del tiempo de análisis y una presión de entrada menor que las columnas analíticas convencionales . Un modelo matemático para cromatografía capilar dentro de las columnas -- abiertas se desarrollo (4). Ying y Darsey (5), introducen un cambio para caracterizar la retención de las columnas en fase reversa. El papel de varias columnas dentro de la HPLC preparativa bajo condiciones isocráticas, se reportó por Cox y Snyder (6).

La influencia de la estructura del poro del empaque de sílica, dentro de las características de columnas en HPLC fué reportado (7). Mallett y Law (8) demostraron la compatibilidad entre el empaque, y los sistemas de detección convencionales. Una discusión teórica sobre el volumen muerto (9) en CL y la dispersión en el espacio intersticial del empaque de la columna (10) se reportó.

Técnicas de empaque.

Una nueva técnica para empacar columnas preparativas para HPLC por sedimentación de partículas se reportó por Wang y colaboradores (11). Una consistencia lechosa del empaque, y un solvente adecuado, se vacía dentro de la columna; la cama se forma por la sedimentación y entonces solidifica, por una floculación del solvente. Shalon (12) desarrollo un compresor para obtener una cama lechosa homogénea, con una presión controlada, en una columna cromatográfica.

La influencia de la fabricación de la columna, y el tamaño de partícula de la

silica dentro de las condiciones de operación se reportó por (13), esto en HPLC preparativa a media presión. Cinco nuevos procedimientos se probaron. Dos nuevos procedimientos por empaque seco usando vacío y nitrógeno a una presión alta resultaron en un buen empaque. Como una alternativa, para la preparación de columnas convencionales las cuales usan camas, se desarrolló una técnica la cual consiste de una compresión del gel conectado a unos canales (14). La cama se formó por la polimerización de una solución monomérica dentro del tubo cromatográfico. Varias técnicas para recubrir la pared interior de columnas tubulares abiertas (15-17), son reportadas.

Desarrollo y materiales de las columnas.

Ito y colaboradores (18-19) desarrollaron una columna cromatográfica, la cual contiene una dispersión de platos en un principio antes del filtro, lo cual resulta un incremento de la resolución de la columna. Una columna de alta presión para CL se reportó por Cox (20). Una nueva columna para HPLC se reportó por Ge y Wallace (21), el sistema consiste de una columna de pared flexible hecha de tubo de teflón y un trabajo de compresión a través del cual el eluyente se bombea. El sistema puede ser utilizado para la caracterización o aplicación de nuevas fases estacionarias las cuales no son comercialmente disponibles.

Mantenimiento y Problemas.

Una revisión (22), examina la heterogenicidad de la superficie de la silica y la existencia de una baja población de los sitios de adsorción. Métodos para la detección y determinación de estos sitios, se discutieron como buenas técnicas, para la supresión de la actividad no deseada de adsorción. Tanaka y colaboradores (23) reportan trabajos para caracterizar materiales de empaque para HPLC. La evaluación de la estabilidad de recubrimientos de polímeros y materiales de empaque basados en la silica, para HPLC se examinó por Takeuchi y colaboradores (24).

Jinno (25) identificó la funcionabilidad del C_{18} en las fases estacionarias, por medio de polarización cruzada y ángulo de rotación carbono 13 en estado sólido por espectrometría de absorción atómica NMR. Jeng y Langer (26) describen el uso de la oxidación de hidroquinona a benzoquinona como una reacción de diagnóstico para la detección de zonas reactivas en la silica para columnas de HPLC. Law y colaboradores (27) estudian la estabilidad de los materiales de empaque de silica, con una mezcla de eluyente acuoso-orgánico, a un pH alcalino. Pfannkoch y colaboradores (28), encontraron en el ión aluminio un mediador de la estabilidad de los empaques de silica para intercambio anionico por regeneración cáustica.

La presencia de iones aluminio en el lavado cáustico reduce significativamente y en algunos casos elimina virtualmente la disolución de la sílica. El cambio físico y químico en los empaques, resultado del lavado cáustico se estudió por NMR y otras técnicas fisicoquímicas. Verzele y colaboradores (29) reportaron una cubierta elástica, en la pared interior usando columnas capilares, de esta manera estabilizaron la cama del empaque, incrementando la eficiencia y vida de la columna. Dolan discute factores con respecto al lavado (30) y tapado de columnas (31).

2.2 FASE MÓVIL

2.2.1 Función

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes; de ahí que en este capítulo se traten los aspectos generales y las características de la fase móvil.

La función de la fase móvil, es la de fluir por el sistema permitiendo la elución de la muestra. La constituyen los solventes que ayudan a la separación en base a la afinidad que presente nuestra muestra por la fase móvil o por la fase estacionaria.

La fase móvil, presenta uno de los mayores puntos de interés en el análisis cromatográfico. Para cada tipo de problema y para cada tipo de cromatografía, es necesario seleccionar cuidadosamente el solvente que ha de usarse entre una amplia gama de solventes. (7).

2.2.2 Características Generales y Cuidados.

En lo que respecta a las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida, están: (14)

- Elevada pureza y estabilidad.
- Serie de polaridad completa y buena miscibilidad.
- Baja toxicidad.
- Transmisión de UV elevada.
- Baja viscosidad.
- Poder de elución elevado para el respectivo problema de separación.
- No reaccionar con el empaque.
- Compatible con el detector.
- Disolver la muestra.
- Fácil recuperación de la muestra.
- Estar comercialmente disponible a bajo precio.
- Valores de K' entre 2 y 10.

El solvente debe ser seleccionado y preparado cuidadosamente. En seguida se dan algunas recomendaciones al respecto :

- a) Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil, caso contrario causarían la precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna, debido a la diferencia de polaridad entre la muestra y fase móvil, afectándose la resolución en la separación.
- b) Para la adecuada preparación de la fase móvil, se deben seguir estos pasos:

DESGASIFICAR
con helio o
nitrógeno

Para evitar la disolución de otros gases atmosféricos (O_2 , CO_2), que pudieran interferir con la detección o reaccionar con la muestra.

FILTRAR
con membranas
de 0.2 a 0.45
micras

Mediante vacío para eliminar el gas y posibles partículas suspendidas.

ULTRASONIDO

Tratamiento ultrasónico para la eliminación de microburbujas.

- c) Cada vez que se cambie por fase móvil diferente. Para asegurar el lavado completo, es conveniente utilizar disolventes de polaridad intermedia. (1).

Debido a que muchas soluciones reguladoras (buffers) son buen sustrato para el desarrollo de algas o bacterias, deberán descartarse aquellos que se encuentren turbios y preparar frescos. Se puede prevenir el crecimiento en soluciones reguladoras acuosas agregando 100 ppm de azida sódica o mezclando el "buffer" con acetonitrilo. También se puede filtrar con membrana esterilizante. Recordar que altas concentraciones de acetonitrilo (más de 50%) y otros disolventes orgánicos pueden precipitar el par iónico.

Los solventes deben ser libres de impurezas que absorban en el UV., ya que estas impurezas pueden producir, líneas bases muy inestables, un alto grado de absorbancia y lo que es todavía peor, pueden producir picos falsos en el cromatograma. Por esta razón, es importante correr un blanco, para asegurarnos que los picos en el cromatograma no son debido a los solventes.

El uso de solventes de alta calidad y en vidrio, ayudará en mucho a resolver problemas de impurezas.

Al usar agua como solvente debe limpiarse de compuestos orgánicos, mediante el uso de adsorbentes adecuados. El agua debe redestilarse ocasionalmente para evitar el crecimiento de bacterias. El agua también absorbe dióxido de carbono del aire y esto altera el pH. Asegurarse que el agua que se emplee, sea de cali-

dad antes de usarla.

Los solventes utilizados deben ser libres de preservativos, ya que estos pueden alterar las características de los solventes, además de provocar incrementos en la absorbancia.

Actualmente se encuentran en el mercado, una gran variedad de solventes "grado HPLC" que son adecuados para usarse en el análisis cromatográfico, sin embargo - cabe señalar en base a la experiencia que deben ser filtrados éstos, ya que de esta manera ayudaremos a prolongar la vida útil de nuestras columnas. (1,7,8,9, 14).

Reservorio para la fase móvil.

El reservorio para fase móvil, presenta una capacidad de 500 ml máximo para - cromatografía analítica, para aplicaciones preparativas se requiere de mayor volumen. Un aparato moderno de CLAR, está equipado con uno o más reservorios de - vidrio o acero inoxidable. Ver siguiente figura:

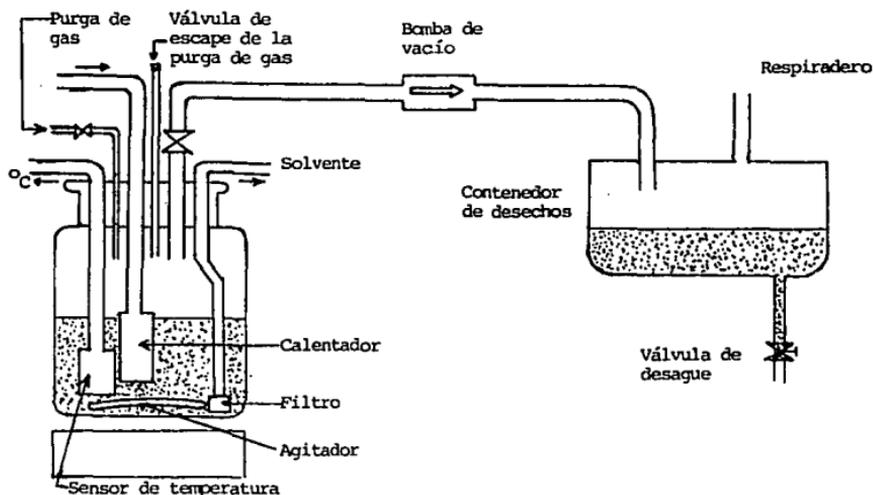


Fig. 2.3 Esquema del reservorio de la fase móvil (Hewlett-Packard). (19).

2.2.3 Polaridad y Serie elutrópica.

Las características cromatográficas de los solventes, dependen de los tipos - de interacciones moleculares que afectan la solvencia y la separación. Estan representadas por cuatro tipos : (7, 8, 10, 19).

Tipos de interacciones moleculares

- a) Fuerzas de dispersión
- b) Interacción dipolo
- c) Enlace de hidrógeno
- d) Enlace covalente

a) Fuerzas de dispersión.- Se refiere a la interacción entre dipolares. Tienen - que ver con la energía de interacción que mantienen todas las moléculas en la fase líquida.

Estas interacciones son independientes de la interacción de dipolos moleculares permanentes. Se forman por que un dipolo instantáneo, en la molécula X induce un dipolo interactivo en la molécula Y.

Este tipo de interacción se relaciona de una manera directa con los valores de I.R. de los compuestos. En general el I.R. es mayor, para compuestos con - enlaces saturados y compuestos con elementos de la 2a. y 3a. fila de la tabla periódica.

b) Interacción dipolo.- Inducción y orientación.

Cuando una molécula posee un momento dipolar permanente (opuesto al dipolo - transitorio) dos interacciones adicionales con moléculas cercanas son posibles :

Dipolo inducido. En este caso el dipolo transitorio de la molécula X es reemplazado por un dipolo molecular permanente. Es decir este dipolo permanente en X induce un dipolo en Y, pero en este caso la interacción es más fuerte.

Dipolo orientado. Involucra el alineamiento de dos moléculas cercanas cada una poseyendo un momento dipolar permanente.

c) Enlace de hidrógeno.- Este tipo de enlace interactua entre una molécula donadora de un protón (ácido) y una molécula receptora de protón (base).

d) Enlace covalente.- Esta interacción esta formada por moléculas individuales -

con pequeñas fuerzas que las mantienen unidas entre sí. Incluidas en este tipo se encuentran, las reacciones ácido-base y varias reacciones de complejación.

La polaridad, será la habilidad que tengan las moléculas del solvente o del soluto para interactuar en alguno o todos los tipos de interacciones.

Es decir, polaridad será la habilidad relativa de una molécula, para acoplarse en interacciones fuertes con otras moléculas polares.

Los solventes polares disuelven solutos polares, y la fuerza de estos se relaciona directamente a esta polaridad.

La fuerza de un solvente es mayor cuando éste es polar, esto en CL en fase normal, partición y adsorción, mientras que en CL fase reversa, la fuerza del solvente es menor con el incremento de la polaridad. (10).

Una Serie eluotrópica, es una lista de solventes ordenados conforme a su capacidad relativa de desplazar solutos de un adsorbente dado. Ver tab. 2.4.

La fuerza eluotrópica (ϵ°) es una medida de la energía de adsorción del solvente; el valor definido para el pentano es de cero. Las fuerzas eluotrópicas de la tab. 2.4 son para la alúmina, pero se observa un orden relativo similar en el caso del gel de sílice. En general, a mayor fuerza eluotrópica del solvente, mayor velocidad de elución de los solutos de la columna. (8).

Tab. 2.4 Serie eluotrópica. (8).

Solvente	ϵ° (para la alúmina)	Solvente	ϵ° (para la alúmina)
Fluoroalcanos	-0.25	Diclorometano	0.42
n-Pentano	0.00	Tetrahidrofurano	0.45
i-Octano	0.01	1,2 Dicloroetano	0.49
n-Heptano	0.01	2-Butanona	0.51
n-Decano	0.04	Acetona	0.56
Ciclohexano	0.04	Dioxano	0.56
Ciclopentano	0.05	Acetato de etilo	0.58
Disulfuro de carbono	0.15	Acetato de metilo	0.60
Tetracloruro de Carbono	0.18	1-Pentanol	0.61
1-Cloropentano	0.26	Dimetilsulfóxido	0.62
Eter isopropílico	0.28	Anilina	0.62
Cloruro de isopropilo	0.29	Nitrometano	0.64
Tolueno	0.29	Acetonitrilo	0.65
1-Cloropropano	0.30	Piridina	0.71
Clorobenceno	0.30	2-Propanol	0.82
Benceno	0.32	Etanol	0.88
Brometano	0.37	Metanol	0.95
Eter dietílico	0.38	1,2-Etanodiol	1.11
Cloroformo	0.40	Acido acético	Largo

2.2.4. Selección de los solventes para los procesos de separación.

Una de las mejores guías para la selección de los solventes es precisamente - el parámetro P' , basados en los datos experimentales de solubilidad reportados - por Rohrschneider¹. P' es una medida del grado de polaridad de los solventes.

El considerar este parámetro es un mejor índice sobre otras propiedades estudiadas. Se dan los valores para P' en la tabla 2.5, para los solventes más utilizados. (19).

Mezclas de solventes (25)

Ya sea en CL de partición o adsorción, la fuerza del solvente se ajusta por - medio de mezclas.

Si tenemos un solvente A débil y se mezcla con un solvente más fuerte, puede resultar una mezcla intermedia con la fuerza necesaria correcta.

Para una mezcla de solventes binaria compuesta de los solventes A y B, P' - para la mezcla esta dada por :

$$P'_{\text{mezcla}} = \phi_a P'_a + \phi_b P'_b \quad (2.1)$$

Donde ϕ_a y ϕ_b son las fracciones de volumen de los solventes A y B en la - mezcla, P'_a y P'_b , se refiere a los valores de P' de los solventes puros.

Un cambio de 10% en la composición del solvente (Ej. de 30%v a 40%v metanol/ agua) cambiará el valor de la mezcla P' por 0.1 ($P'_b - P'_a$).

Para fase reversa con MeOH/agua como fase móvil, P' para MeOH y agua es igual a 5.1 y 10.2 respectivamente, así que un cambio de 10%v en la composición del - solvente representa 0.5 cambios en unidad de P' .

En CL de adsorción, la fuerza del solvente ϵ^o no varía de manera lineal con la composición del solvente.

En este caso se incrementa ϵ^o por pequeñas adiciones de un solvente B más fuerte a un solvente A más débil, y el resultado es en forma asintótica para el solvente B puro.

1. Rohrschneider, introduce este término P' , como una medida de las propiedades de los solventes. Esto es, utiliza modelos de soluto (Ej. etanol, nitrometano dioxano) C/u de los cuales ejemplifican un tipo de interacción. Dipolo-nitrometano, aceptor-dioxano y donador-ETOH. Se determina la solubilidad de manera indirecta por la presión de vapor.

Tab. 2.5 Parámetros de Polaridad de los solventes más utilizados en CL. (2)

Solvente (1)	UV (2)	ρ' (3)	ρ (4)	Selectividad de grupo (5)	$\rho'+$ 0.25 (6)
1. Isooctano (*) (2,2,4-tri metilpentano)	197 ^b	0.1	0.01	-	0.1
2. n-Heptano (*)	195	0.2	0.01	-	0.5
3. n-Hexano (*)	190	0.1	0.01	-	0.5
4. n-Pentano (**)	195	0.0	0.00	-	0.5
5. Ciclohexano	200	-0.2	0.04	-	0.5
6. Ciclopentano (*)	200	-0.2	0.05	-	0.6
7. 1-Clorobutano (*)	220	1.0	0.26	VIa	2.8
8. Disulfito de carbono	380	0.3	0.15	-	1.7
9. 2-Cloropropano (**)	230	1.2	0.29	VIa	3.7
10. Tetracloruro de carbono	265	1.6	0.18	-	2.3
11. n-Eter butílico	220	2.1	0.25	I	2.4
12. Trietilamina		1.9	0.54	I	2.4
13. Brometano (*)		2.0	0.35	VIa	4.3
14. i-Propil éter (*)	220	2.4	0.28	I	3.2
15. Tolueno	285	2.4	0.29	VII	2.9
16. p-Xileno	290	2.5	0.26	VII	3.0
17. Clorobenceno		2.7	0.30	VII	4.1
18. Bromobenceno		2.7	0.32	VII	4.1
19. Iodobenceno		2.8	0.35	VII	
20. Fenil éter		3.4		VII	3.7
21. Eter etílico (**)	218	2.8	0.38	I	4.0
22. Benceno	280	2.7	0.32	VII	3.6
23. n-Octanol	205	3.4	0.50	II	5.8
24. Fluorobenceno		3.1		VII	4.6
25. Eter Bencilico		4.1		VII	
26. Cloruro de Metileno (**)	233	3.1	0.42	V	5.6
27. i-Pentanol		3.7	0.61	II	7.3
28. 1,2-Dicloroetano	228	3.5	0.44	V	6.3
29. t-Butanol		4.1	0.70	II	
30. n-Butanol	210	3.9	0.70	II	8.3
31. n-Propanol	240	4.0	0.82	III	
32. Tetrahidrofurano (*)	212	4.0	0.57	III	
33. Propilamina (*)		4.2		I	
34. Acetato de Etilo (*)	256	4.4	0.58	VIa	5.8
35. Isopropanol	205	3.9	0.82	II	
36. Cloroformo (*)	245	4.1	0.40	VIII	5.6
37. Acetofenona		4.8		VIa	8.7
38. Metilacetona (*)	329	4.7	0.51	VIa	9.1
39. Ciclohexanona		4.7		VIa	9.1
40. Nitrobenzono		4.4		VII	13.2

Tab. 2.5 (Continuación)

Solvente (1)	UV (2)	P' ¹ (3)	' (4)	Selectividad de grupo (5)	P' + 0.25 (6)
41. Benzonitrilo		4.8		Vib	10.9
42. Dioxano	215	4.8	0.56		
43. Tetrametil urea	265	6.0		III	10.7
44. Quinolina		5.0		III	7.4
45. Piridina		5.3	0.71	III	
46. Nitroetano	380	5.2	0.60	VII	
47. Acetona (*)	330	5.1	0.56	VIa	
48. Alcohol bencílico		5.7		IV	8.8
49. Tetrametilguanidina		6.1		I	
50. Metoxietanol	210	5.5		III	
51. Etanol	210	4.3	0.88	II	
52. Anilina		6.3	0.62	Vib	8.1
53. Ac. Acético		6.0		IV	
54. Acetonitrilo (*)	190	5.8	0.65	Vib	
55. N,N-dimeti acetamida	268	6.5		III	
56. Dimetilformamida	268	6.4		III	
57. Dimetilsulfóxido	268	7.2	0.75	III	
58. N-metil-2- pirrolidona	285	6.7		III	
59. Metanol (*)	205	5.1	0.95	II	
60. Nitrometano	380	6.0	0.64	VII	
61. m-Cresol		7.4		VIII	10.0
62. N-metilformamida		6.0		III	
63. Etilenglicol		6.9	1.11	IV	
64. Formamida		9.6		IV	
65. Agua		10.2		VIII	

1. (*) Indica que es un solvente para CL de baja viscosidad (0.5 cP), y de con-
veniente punto de ebullición (45); (**) indica solvente de muy baja vis-
cosidad y bajo punto de ebullición.
2. Longitud de onda a la cual absorbe el solvente.
3. Parámetro de polaridad del solvente.
4. Parámetro de la fuerza del solvente para Cromatografía Líquido-Sólido en -
alúmina.
5. Ver figura 2.4
6. Función de P' y constante dieléctrica que es proporcional a la fuerza del -
solvente en cromatografía de par iónico.

Selectividad de los solventes. (25)

Los valores de K' para una buena separación de la muestra, son de 1-5. No debemos olvidar que también contribuye la eficiencia de la columna. En algunos casos sin embargo, 2 ó más bandas de muestra se pueden sobreponer lo que requiere de un cambio en la selectividad de la fase móvil. Se va a ilustrar un ejemplo para la fase normal de partición.

Asumimos que tenemos una mezcla de solventes uno no polar A ($P_a \leq 1$) con un solvente polar B que da una mezcla A/B, de quien el valor de P' para la fuerza del solvente es la adecuada, así como su valor de K' para una separación particular.

Si queremos ahora cambiar la selectividad del solvente, lo podemos hacer, cambiando a otro solvente polar C en lugar de B. Otra vez la composición de la mezcla A/C se puede ajustar para dar una fuerza correcta del solvente (igual al valor de P' de la primera fase móvil A/B. Entonces P_a es aprox. 0, de la ecuación 2.1, se observa que la composición de la primera A/B y la segunda A/C se relacionan como :

$$\phi_c = \phi_b \frac{P_b}{P_c} \quad (2.2)$$

Por ejemplo: Si asumimos que A/B es 25%v CHCl_3 /Hexano y A/C está constituida de una mezcla de etil éter/Hexano. Los valores de $P_b = 4.4$ (CHCl_3) y $P_c = 2.9$ (etil éter), entonces ϕ_c es $0.25 (4.4/2.9) = 38\%$ éter/hexano.

La ec. 2.2 nos muestra la forma rápida para substituir la fase móvil de diferente composición pero de similar fuerza para el solvente inicial A/B.

Es una aproximación buena para el ajuste de la concentración en el óptimo rango de $1 \leq K' \leq 5$.

Clasificación de la Selectividad de los Solventes. (19, 25).

Cuando se cambian las interacciones moleculares existentes entre solvente y muestra de una forma brusca, entonces la selectividad de la fase móvil se modifica notablemente.

La substitución de un solvente polar B (Ej. MeOH) por otro similar (Ej. Propanol), hace que el cambio en la selectividad o en la interacciones sea mínima, ya que estos solventes tienen la misma propiedad de donar protón.

Si el cambio se hiciera por un solvente C que fuera aceptor como dietil éter ó que tuviera largo momento dipolar (Ej. Cloruro de Metileno).

Con un solvente C, aceptor como el dietil éter, las moléculas de la muestra -

que son donadoras serán retenidas en la fase móvil.

En el caso del solvente C con largo momento dipolar, las moléculas de la muestra con fuertes grupos dipolos se retendrán en la fase móvil también. En cada caso para controlar el parámetro de retención de un tipo de muestra en particular en la fase móvil, se logrará siempre y cuando los valores de K' no varíen. Esto sobre todo cuando se desea cambiar la posición de un pico ya dentro del cromatograma final.

El conocer los tipos de interacción moleculares, nos dará una guía para la selección de un solvente C que produzca cambios en la selectividad del solvente. Esto inclusive si lo hicieramos al azar.

Los datos de Rohrschneider, usados para definir los valores de polaridad P' también permiten una clasificación para la selección del solvente de acuerdo a x_d , x_e y x_n , respectivamente². Cuando estos valores se grafican para cada solvente en un diagrama triangular Fig. 2.4, encontraremos que varios solventes se agrupan dentro de las mismas características de selectividad.

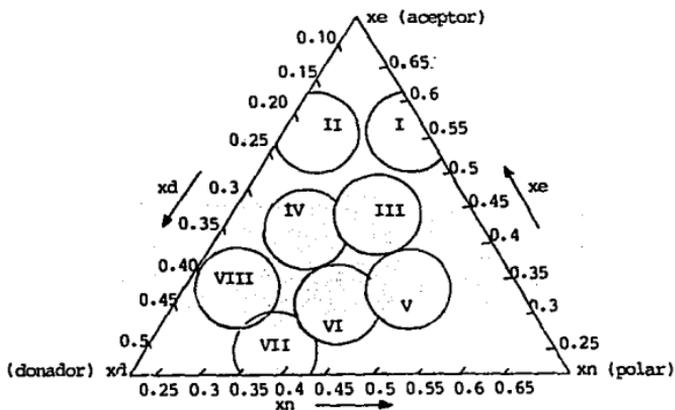


Fig. 2.4 Triángulo de Selectividad para los solventes de la tabla 2.5 (ver columna 5 de datos) (25)

2. x_d (aceptor), x_e (donador) y x_n (interacción dipolar), son los parámetros de selectividad de Rohrschneider, y significan la relativa solubilidad de estos solutos en determinados solventes. De tal forma que se suman los tres términos para cada uno de los solventes y así se da un valor P' global.

Tab. 2.6 Agrupación de los solventes de acuerdo a la selectividad de grupos - de la Fig. 2.4

Grupo	Solventes
I	Eteres alifáticos, trietilaminas, tetrametilguanidina
II	Alcoholes alifáticos
III	Piridina, Tetrahidrofurano, aminas (excepto ácido formamídico)
IV	Glicoles, éter glicólico, alcohol bencílico, formamida, ác. acético.
V	Cloruro de metileno, cloruro de etileno, tricresil fosfato.
VIa	Cetonas, ésteres, nitrilos, sulfoxidos, sulfonas, anilina y dioxano.
VIb	Compuestos nitro, hidrocarburos aromáticos.
VII	Halobencenos, difenil éter.
VIII	Fluoroalcanos, m-cresol, cloroformo, agua.

Propuesta sistemática para la selección de solventes. (14,25,19)

Para entender esta selectividad, vamos a estudiar un ejemplo de separación por CL en fase normal, usaremos una mezcla de solventes (A) Hexano y (B) Cloroformo como fase móvil. Posteriormente asumimos que la fuerza del solvente correcta es de 20% Cloroformo/Hexano como fase móvil. De la tabla 2.5 y ecuación 2.1, calculamos P' . $P' = (0.8 \times 0.1) + (0.2 \times 4.1) = 0.9$.

Pero observamos, que la separación no es suficiente por lo que debemos cambiar la selección del solvente B polar.

De la tabla 2.6 observamos que el cloroformo pertenece al grupo VIII, si nosotros queremos un gran cambio en la selectividad, de la fig. 2.4 que los grupos - I y V son los más alejados del grupo VIII. Si tomamos del grupo V Cloruro de metileno por ser el menos volátil y disponible, entonces de la ecuación 2.2 la concentración del solvente en la fase móvil final será : $0.2 (4.4/3.1) = 28\%$ Cloruro de metileno/Hexano para el cual el valor de P' sigue siendo igual a 0.9.

Si este cambio no sigue funcionando entonces podemos seguir el mismo procedimiento solo que ahora trabajaremos con I (Ej. Trietilamina, dietil éter) o algún otro solvente. Sin embargo si un solvente polar no dio una buena selectividad, es probable que otro solvente del mismo grupo no sea mejor.

A cerca del solvente A que no es polar , porque no cambiar a este ?. Normalmente las interacciones entre los solventes polares vencen a las de los solventes no polares, por lo que si se cambiará por alguno de estos sería de ~~propor~~ propor provecho para la separación.

Algunas excepciones a esto, es con muestras no polares de diferente Índice de Refracción (en donde las fuerzas de dispersión son diferentes). En estos casos la sustitución de un solvente polar de diferente I.R. por el solvente original A - puede ser útil en la separación. Por ejemplo Ciclopentano (I.R. = 1.404) o Disulfuro de carbono (I.R = 1.624) se puede substituir por n-Hexano (I.R = 1.372).

Selección de solventes para CL en Fase Reversa y Adsorción. (19, 25).

En CL de Fase Reversa, el agua es el solvente polar B y algún otro solvente - miscible en agua con menor polaridad será usado como el solvente A. Comúnmente - ejemplos de los solventes A incluyen : metanol, ACN y THF.

Se ha observado que cambios en el solvente menos polar (Ej. MeOH ó ACN) son menos efectivos para la selectividad del solvente, así que para Fase Reversa - existe menos oportunidad de cambiar la selectividad en la separación. El cambio será entonces con respecto al segundo solvente, es decir de MeOH a Propanol a - ACN. En CL de Fase Reversa, un cambio en la Ec. 2.2 se puede usar para esto :

$$\phi_c = \phi_b \frac{(P_w - P_b)}{(P_w - P_c)} \quad (2.2 a)$$

Donde: $P_w = P'$ del agua (solvente A) = 10.2

También se pueden utilizar los valores de fuerza del solvente para sistemas de Fase Reversa tal como :

$$\phi_c = \phi_b \frac{S_b}{S_c} \quad (2.2 b)$$

Donde:

S_b = Fuerza del solvente b

S_c = Fuerza del solvente c

Valores experimentales de S son :

Agua (0.0)	Dioxano (3.5)
MeOH (3.0)	Etanol (3.6)
ACN (3.1)	i-Propanol (4.2)
Acetona (3.4)	THF (4.4)

Así que si al inicio la fase móvil es 50%v MeOH/H₂O y si se desea cambiar a - THF/H₂O para la selectividad, la fracción de volumen de THF se puede obtener de 2.2 b como :

$$\phi_c = \frac{0.5 (3.0)}{4.4} = 0.34$$

Entonces 34%v THF/H₂O, se pueden utilizar siempre y cuando los valores de K' para 50%v MeOH/H₂O se mantengan.

La selección de solvente para la CL de adsorción, también varía de la misma - manera que en el Ej. de CL de partición.

Mezclas ternarias de dos solventes fuertes B y C con un solvente A débil son algunas veces útiles dentro de la afinación de la selección de solventes para -- separaciones intermedias entre estos por los sistemas A/B y A/C.

Así que la selección está controlada por la relación de concentración de B a C, mientras que la fuerza del solvente podrá ser controlada por el cambio de - concentración de A.

Fases móviles para la Cromatografía de Adsorción.

Como eluyentes para la cromatografía de adsorción se emplean de preferencia - disolventes de la mitad no polar de la serie eluotópica.

Su poder de elución sobre óxido de aluminio como fase estacionaria se sitúa - aproximadamente en el intervalo de $E^0 = 0$ (pentano) a $E^0 = 0.49$ (1,2 diclorometano). Según Snyder, incluso son suficientes seis eluyentes para cubrir todo el - intervalo del poder de elución desde los alcanos al agua pura: pentano (hexano), 2-cloropropano (éter diisopropílico), éter etílico (Tetrahidrofurano), acetoni - trilo, etanol (metanol) y agua. En caso de emplear eluyentes más polares en la - cromatografía de adsorción (p. ej. dioxano con $E^0 = 0.56$, acetonitrilo con $E^0 = 0.65$ ó Isopropanol con $E^0 = 0.82$), ha de tenerse en cuenta que ha medida que au - menta el poder de elución, los mecanismos de separación de pura cromatografía de adsorción son reemplazados cada vez más por equilibrios de reparto liq-liq.

Si para un problema de separación en la cromatografía de adsorción existen ya resultados de análisis en capa fina, las mezclas de eluyentes allí encontradas pueden a menudo adoptarse directamente para la HPLC. Si los resultados de la CCF se hallan más bien en el ámbito de la cromatografía de reparto, se puede seguir la pauta siguiente: Empezar con aproximadamente la mitad de la proporción de por - centaje en volumen del componente más polar de la mezcla de eluyentes empleada - en la CCF, como fase móvil en la HPLC. (14,16,20).

Comportamiento al cambiar de fase móvil.

- El equilibrio de silicagel y óxido de aluminio con la fase móvil se establece lentamente; por lo consiguiente, hay que dejar un período de equilibrio lo suficientemente largo (control con una mezcla patrón de ensayo hasta lograr tiempos de retención constantes).
- Todos los eluyentes no polares empleados principalmente en la cromatografía de adsorción deben estar saturados con agua al 50% o bien se añade una proporción del 1-2% en volumen de un componente más polar.
- No deben hacerse saltos grandes dentro de la serie eluotrópica, a fin de garantizar un equilibrio más rápido (intercalar lavados intermedios). (14).

Fases móviles para la cromatografía de Fase Reversa.

Con las fases estacionarias hidrófobas se superficie modificada (p.ej. C_2 , C_8 , C_{18}) se suelen emplear como eluyentes mezclas de agua con diferentes solventes orgánicos miscibles con agua (p.ej. la siguiente serie de polaridad decreciente y poder de elución creciente : metanol, acetonitrilo, etanol, isopropanol, dimetilformamida, n-propanol, dioxano).

Posibilidades de variación adicionales : valor de pH, concentración salina, - adición de reactivos de par iónicos para sustancias problema iónicas; empleo de un tercer componente solvente (p.ej. THF) para regular la selectividad en forma específica con mezclas eluyentes ternarias. (10,12,14).

En general, la selección de solventes usados como fase móvil depende de varios parámetros.

En la cromatografía de adsorción y partición, el papel más importante lo desempeña la polaridad pero también lo son la viscosidad y otras características.

En la cromatografía de Intercambio Iónico, son importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en la cromatografía de exclusión la característica primordial es la solubilidad de la muestra en la fase móvil. (17).

Avances

Dentro de los avances sobre este terreno, en lo que se refiere a la desgasificación de la fase móvil, Shirato y colaboradores (1), diseñaron un módulo especial y Stubba (2), Elerhard y colaboradores diseñaron un sistema esparsor de --

helio a bajo costo así como un sistema de entrega de solvente para Cl_2 (3). Un -
solvente de alta pureza se desarrollo por Dasgupta (4) usando una membrana permea-
ble selectiva de intercambio iónico.

2.3 BOMBAS

2.3.1 Función.

Los sistemas de bombeo, pueden ser muy variados, pero cualquiera que sea su tipo, todos tienen por función, tomar la fase móvil de los reservorios por medio de unas conexiones que en el extremo llevan unos filtros, para evitar que pasen partículas de tamaños mayores, que pueden obstruir alguna parte del sistema, y transportarla al inyector donde se encontrará con la muestra y serán transportadas a la columna, al detector y finalmente al colector de desechos.

El objetivo principal de cualquier bomba destinada a usarse en HPLC consiste en entregar a la columna un flujo de fase móvil constante, confiable y precisa a varias presiones. (7,12,13).

2.3.2 Características generales y cuidados.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son :

- a) Ser resistente químicamente, a todo tipo de fase móvil.
- b) Proporcionar presiones hasta de 7500 psi.
- c) No presentar pulsaciones en el flujo que produce.
- d) Proporcionar flujos hasta de 3ml/min.
- e) Que la variación de flujo no sea mayor de 1%.
- f) Facilidad para efectuar el cambio de fases móviles. (5,7,8).

En general los materiales de construcción de las bombas, deben resistir ataque químico, por ejemplo acero inoxidable y teflón.

- Los sellos, son fabricados usualmente de teflón (grafito-teflón).
- Pistones. En ciertas bombas reciprocantes, los pistones y las válvulas check son fabricadas de safiro.

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas :

- Bombas mecánicas, y
- Bombas neumáticas.

En lo que se refiere a las primeras, las hay de dos tipos distintos :

- 1.- Bombas reciprocantes (pistón o diafragma)
- 2.- Bombas de desplazamiento continuo.

La fig. 2.5 muestra en forma esquemática cada uno de estos tipos de bombas.

Bombas recíprocantes.— Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, sino más bien punsante. La presión máxima que se puede obtener varía según el diseño, pero en general es de aproximadamente 600 atm.

La forma como operan estas bombas es la siguiente : Mediante el movimiento de un pistón o diafragma, y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, se llena y se vacía de modo alternativo, una pequeña cámara.

El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta variando la distancia a que se desplaza el pistón o diafragma; el flujo total se ajusta variando el número de desplazamientos por unidad de tiempo.

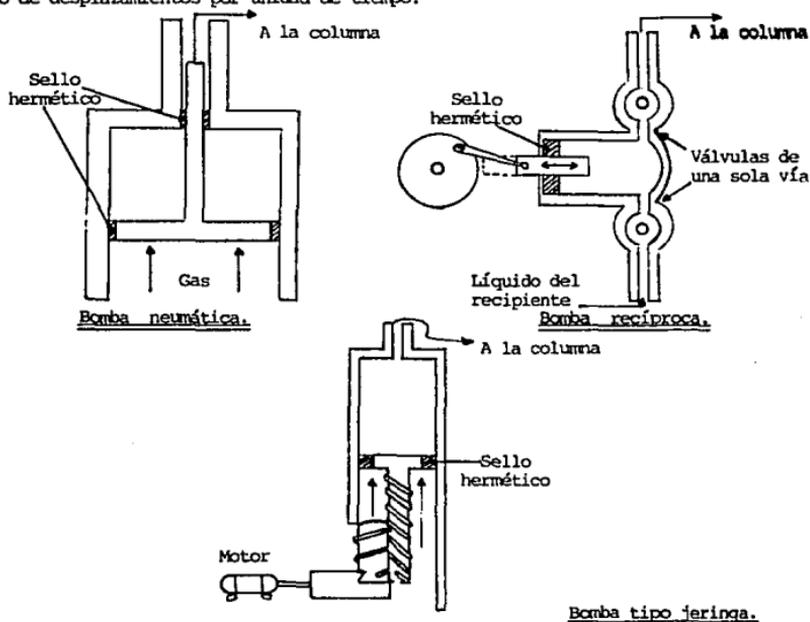


Fig. 2.5

Esquemas de los diferentes tipos de bombas (7).

Una de las desventajas de la bomba recíproca, es que el flujo se obtiene en forma de pulsos y no en forma continua y uniforme. Lo anterior puede causar pérdida en la eficacia de la columna e inestabilidad del detector y por lo tanto es necesario eliminar dichas pulsaciones mediante algún sistema amortiguador. Una forma sencilla y conveniente de lograrlo es colocando una sección larga de tubo capilar (6 mts. de largo x 1 mm de diámetro) entre la bomba y la cámara de inyección; este tubo se deja flotar libremente y así absorbe las pulsaciones producidas por la bomba.

El flujo de volumen constante, a pesar de las variaciones en la caída de presión a través de la columna, constituye la ventaja principal de estas bombas. Por lo general se utilizan manómetros del tipo Bourdon para medir la presión a la cual está trabajando la bomba; estos manómetros también ayudan a amortiguar, en parte, las pulsaciones. Una ventaja más de estas bombas es la capacidad de aumentar de modo continuo el sistema. (7,10).

Bombas de desplazamiento continuo.- Llamadas también bombas de émbolo o bombas de tipo jeringa, son aquellas en que el émbolo ó pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen; el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo o sea libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada y para rellenar la cámara es necesario suspender momentáneamente su operación.

Por último, cabe mencionar que los flujos desplazados por estas bombas varían entre 0.5 y 200 ml/hr, a presiones de hasta 340 atm. Su costo relativo es elevado.

Bombas neumáticas.- En este sistema de bombeo vease fig. 2.5, el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.

La presión máxima obtenible está limitada por la presión del gas mismo y por el material de fabricación del sistema.

Los flujos obtenidos están libres de pulsaciones y son de presión constante, lo cual significa que si la caída de presión de la columna cambia, el flujo también cambiará.

Las desventajas de estas bombas son la capacidad limitada en el volumen total

que pueden bombear (al igual que las bombas de desplazamiento continuo) y la difusión que presenta el gas en el líquido. Este último problema se puede resolver utilizando algún interfase entre el líquido y el gas, evitando el contacto directo entre ellos, o bien, más fácil aún, desechando las últimas porciones de líquido que han sido saturadas por el gas.

En este tipo de bombas existen algunas de diseño especial que emplean sistemas amplificadores de presión, lo que permite obtener presiones de hasta 400 atm utilizando bajas presiones de gas.

Sea cual sea el tipo de bomba empleado, conviene colocar un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que las partículas extrañas bloqueen el sistema; este filtro debe tener la capacidad de retener partículas extrañas sin producir caída de presión excesiva.

Cuando se utilizan bombas que desplazan flujos de volumen constante, es recomendable emplear una válvula o sello de seguridad que libere la presión del sistema cuando ha alcanzado un límite superior al normal. Esto podría suceder si por alguna razón el sistema se bloquea y la bomba continua desplazando el mismo volumen e incrementando continuamente la presión. (7, 10, 15).

En la tabla 2.7, comparamos diferentes tipos de bombas para la moderna CL.

Todos los sistemas son satisfactorios para algunas aplicaciones, pero algunas tienen limitaciones en ciertas áreas. El mayor desarrollo se obtiene con las bombas reciprocantes más sofisticadas, las que son también más caras. En suma el usuario obtiene mejor desarrollo únicamente con equipo más costoso.

En la tabla 2.7, observamos dos propuestas dentro de los sistemas de bombeo que producen alta precisión en la velocidad de flujo, así como un mínimo de pulsación. Estos dos sistemas involucran sistemas sofisticados de hardware.

La primera opción utiliza bajo costo, menos precisión y bombas ruidosas con corrección para el flujo, esto con el objetivo de producir un flujo final preciso y con baja pulsación.

La segunda opción, tiene por objetivo el diseño de una bomba que provee de precisión, exactitud y baja pulsación de flujo sin la necesidad de corrección.

Cada bomba tiene inherentes ventajas y desventajas que pueden evaluarse para aplicaciones individuales. (19).

Tab. 2.7 Comparación de los diferentes tipos de bombas para la moderna CL. (19)

Características de la bomba	Bombas Recíprocas						Desplazamiento continuo			Neumáticas	
	Simple de una cabeza	Una cabeza, buena pulsación.	Simple de dos cabezas	Dos cabezas buena pulsación.	Dos cabezas loop-co	Tres cabezas	Tipo jerin-ga.	Ampli- ficador hidráulico	Simple	Ampli- ficador	Ampli- ficador con control de flujo
Arrastre	+	+	+	++	++	++	++	+	-	+	+
Precisión a corto plazo	-	+	+	++	++	++	++	++	+	+	++
Exactitud	+	+	+	+	++	++	+	+	-	-	+
Versati - lión y convenien- cia	-	+	++	++	++	++	-	+	-	++	+
Servicia- lidad.	+	+	+	+	+	+	-	+	++	+	-
Durabili- dad.	+	+	+	+	+	+	+	-	++	++	++
Costo	Bajo	Mod.	Mod.	Alto	Muy Alto	Muy Alto	Mod. a Muy Alto	Mod.	Bajo	Mod	Alto
Flujo constante	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí
Presión constante	No	No	No	Sí	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí

Nota : ++ = óptimo, + = satisfactoria, - = algunas deficiencias

Mantenimiento y Cuidados.

Las modernas bombas para CL, ofrecen alta precisión, una desviación de 0.07% en el volumen de retención, se observan después de períodos de 12 hrs. de trabajo, para obtener esta precisión es necesario tener cuidado y mantenimiento del sistema de bombeo.

Para ello debemos seguir procedimientos sencillos:

- 1) La fase móvil debe prepararse como se mencionó anteriormente, particularmente si el solvente tiene que ser pasado por sílica gel o alúmina.
- 2) El filtro dentro de la bomba, debe lavarse regularmente o cambiarse por otro para asegurar que las partículas no entren dentro de la cámara de la bomba.
- 3) La bomba no debe permitirse que se seque de corrida a corrida, la abrasión entre el sello y el pistón eventualmente produce fugas.
- 4) No debe trabajarse con materiales que conozcamos sean corrosivos.
- 5) Las fases móviles con sales disueltas, no deben trabajarse por la bomba por largos períodos. Si esto es permitido puede ocurrir que una pequeña cantidad de fase móvil gotee a través de los sellos de alta presión, el líquido evaporado produce restos de pequeños cristales de sal que pueden rasgar los sellos de alta presión y el émbolo de la bomba.
- 6) Cuando usemos soluciones de sal, es mejor lavar la bomba directamente con agua por una noche.
- 7) La disminución de la presión debe hacerse lentamente para evitar la deformación de los sellos de alta presión y así evitar fugas.
- 8) Las válvulas deben ser lavadas con (Ej. 20% HNO_3), cuando existen flujos erráticos estas válvulas deben cambiarse.
- 9) Para operaciones óptimas, algunas bombas requieren que el calibre del tubo del solvente sea relativamente ancho (Ej. > 2 mm d.i.), para prevenir la falta de solvente hacia la bomba.
- 10) Se requiere que el reservorio de la fase móvil, sea colocado justo arriba de la bomba para crear un cabezal de la misma.
- 11) Finalmente los solventes deben desgasificarse, - como se mencionó en la sección de la fase móvil -, para la óptima precisión de la bomba. (9, 14, 17).

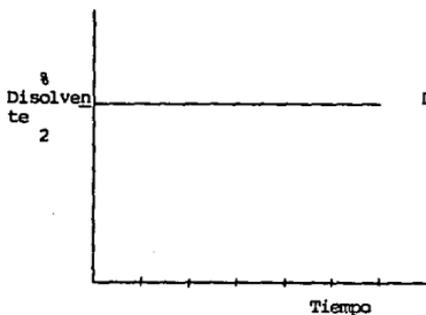
2.3.3 Sistema Isocrático y Gradiente.

Sistema isocrático, se refiere al manejo de un solo disolvente cuando trabajamos en CL, es decir una sola polaridad, en donde se mantiene constante la composición de la fase móvil. La elución isocrática, toma mucho tiempo y la forma de las señales no es muy buena.

Sistema por gradiente, se refiere a la programación de solventes, es decir - consiste en cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Por lo general, se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varía el porcentaje del disolvente más polar en la mezcla binaria.

Algunas de las ventajas de la elución con gradiente son los tiempos menores - en el análisis, mejor formación del pico (en especial en picos tardíos), mejor - limpieza de la columna y mejor reconocimiento de las condiciones isocráticas. Ver siguiente figura.

A. ELUCION ISOCRATICA



B. ELUCION POR GRADIENTE

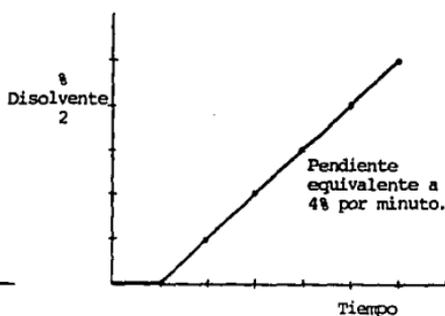


Fig. 2.6 Gráficas de composición de la fase móvil en función del tiempo. (7).

Desde el punto de vista del instrumental, el programador de fase móvil es un dispositivo muy complejo que puede resultar tan costoso como el instrumento mismo. Básicamente hay programadores de dos clases :

- 1) Sistemas de gradiente de baja presión.- Se forman normalmente por una sola bomba y el mezclado se realiza en la entrada de la misma. En general válvulas de intercambio se usan para medir los diferentes porcentajes de las fases móviles que entran a la bomba con cada golpe.
- 2) Sistemas de gradiente de alta presión.- Son sistemas de bombas binarias o ternarias, donde cada bomba impulsa una fase móvil diferente. A su vez cada bomba aporta una fracción de la velocidad final del flujo, dependiendo de la velocidad deseada.

Mientras los sistemas de gradiente de baja presión son normalmente más baratos que los de alta presión, en general los sistemas de alta presión son más flexibles, más reproducibles y permiten un mayor rango en la composición y selección de la forma gradiente. Con cualquier tipo de formador de gradiente que se use es necesario siempre asegurar una mezcla adecuada de los solventes. Esto lleva a utilizar algún tipo de cámara de mezclado y la experiencia indica que en la mayoría de los casos un mezclador dinámico es necesario para la cromatografía de alta resolución.

Los programadores pueden también emplearse, inclusive para regenerar columnas cuando esto es necesario. El uso de microprocesadores permite hoy día emplear los generadores de gradientes en forma automática. (3,7,8,9,19).

2.3.4 Avances

Miller y Shafer (1), desarrollaron un sistema para probar la estabilidad del hardware en las bombas para CL, reportando además, la mínima y máxima velocidad de flujo, tiempo después Sheenan y Schachterle (2) describen pruebas fáciles para evaluar el funcionamiento de los sistemas de bombeo en algunos laboratorios.

Una válvula check utilizando material de cerámica se reportó por Ledtje y Long (3), esto con el objeto de evitar el "engarrotamiento" de los pistones, utilizando mezclas de ACN/H₂O.

Risler y Nagel (4) reportaron un trabajo en donde desarrollaron un original piston para líquidos, empleando dos pistones a 180° fuera de la fase repartien-

do de esta forma una capacidad constante. Bruin y colaboradores (5), reportaron un conductor eléctrico para CL tubular abierta, con una mejor eficiencia de la separación, que con las separaciones a presión. Pfeiffer y Yeung (6) demuestran el uso del flujo electroosmótico para la CL tubular abierta para la separación de isómeros neutros geométricos, y su posición con una eficiencia de 230,000 platos teóricos dentro de una columna de 54 cm en menos de 4 min.

Una membrana para bomba, con suficiente flujo y especificaciones de presión para HPLC se reportó por Obst (7). James (8) describe un pistón para bomba recíproca con una nueva configuración de dos sellos para incrementar la vida útil de los mismos.

Una nueva bomba para HPLC que muestra una alta estabilidad de flujo fue descrita por Le Blanc (9).

Un microsistema de gradiente para HPLC se estudió por Trisciani y Andreolini (10, 11). Hue y Sioffi (12) presentan una revisión de asistencia computacional para la optimización del gradiente de elución en HPLC.

Un nuevo sistema de gradiente de elución para microcolumnas en CL utilizando gradiente de paso con una válvula múltiple loop se demostró por Banks y Novotny (13).

Un regenerador de columnas usando programador de gradiente se desarrolló por Munk (14) para operar a baja o alta presión en una bomba HPLC. Berry y colaboradores (15) usando tubo capilar abierto con fusión de sílica, generan microgradientes en forma de S.

Un sistema de gradiente para microsoporte y CL tubular abierta se reportó por Bauer (16).

2.4 INYECTORES

2.4.1. Función.

Toda separación depende en que la muestra llegue a la columna. Esto requiere un inyector que es colocado entre la bomba de alta presión y la columna.

El inyector rápidamente introduce la muestra al sistema sin afectar el flujo de fase móvil. Los inyectores CLAR utilizan "loop" variable, "loop" fijo e inyectores tipo jeringa, activados todos ellos en forma manual, neumática o eléctrica. (6).

2.4.2. Características Generales

Las características principales de los inyectores son: (7)

- Introducir la muestra dentro de la columna rápidamente.
- Resistir altas presiones.
- Ser reproducible.
- Tener un volumen pequeño.
- Sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.

Existen varios tipos de inyectores :

Inyector de Septum.- Esta inyección se realiza sin parar el flujo y sin desarmar ninguna parte del sistema. Los únicos problemas son que usando un inyector de septum la membrana se rompe, es atacada por solventes, no sostiene buena presión, y en fin no dura mucho. Ver fig. 2.7. (3).

Inyector de válvula.- La válvula es uno de los más populares. La espira de muestra, intercambiable, es un tubo de acero con diámetro interno estrecho y volumen fijo entre 2 y 1000 μ l llamado comúnmente "loop". En la posición de carga se utiliza una jeringa para lavar y cargar la espira con muestra nueva a la presión atmosférica. Ocurre un flujo de alta presión desde la bomba hacia la columna por el segmento de válvula abajo a la izquierda. Cuando la válvula se hace girar 60° en sentido antihorario, el contenido de la espira de muestra se inyecta en la columna de alta presión. (8).

Ver fig. 2.8.

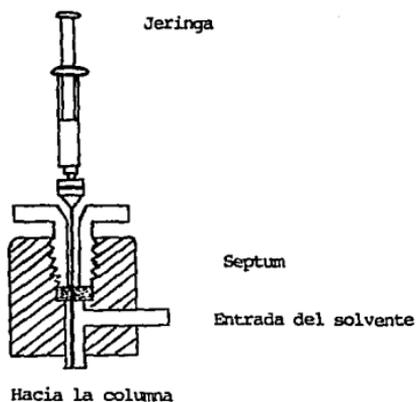


Fig. 2.7 Inyector de Septum

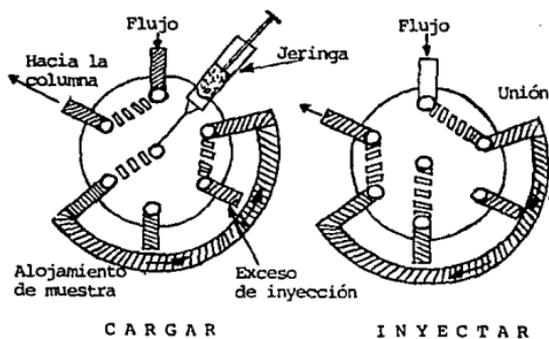


Fig. 2.8 Inyector de Válvula

Inyectores automáticos.- Con los dispositivos automáticos de muestreo comercialmente disponibles, muchas muestras de rutina se pueden analizar aún sin el operador. Tal equipo es popular para el análisis de rutina (Ej. control de calidad de medicamentos, particularmente cuando se está unido a un sistema de manejo de datos.

Los inyectores automáticos son indispensables sobre todo cuando se trabaja de noche. El inyector automático Micrometrics mostrado en la Fig. 2,9, permite la inyección de aprox. 64 muestras, las que son presionadas en forma continua por medio de una válvula muestreadora para su inyección.

En este orden [1], un vial que contiene la muestra se coloca debajo de una aguja ensamblada al inyector, [2] una válvula de inyección motorizada rota a la posición de "carga" simultáneamente, permitiendo el flujo continuo de fase móvil. [3] Con la válvula de inyección motorizada en la posición de carga, la aguja penetra el sello de polietileno del vial. [4] La aguja entonces mueve la capucha del sello para desplazar totalmente la muestra dentro del loop del inyector. Para inyectar la muestra, la válvula motorizada rota [5] permitiendo el desplazamiento de la muestra desde el loop hacia la columna. La acción de la válvula [2] a [5] se puede repetir para duplicar la inyección. [6] Después de terminar una inyección se coloca una nueva muestra, para la próxima inyección.

El loop se lava automáticamente para eliminar residuos de la muestra anterior esto como parte del ciclo de lavado. (19).

Por último se compara en la tabla 2.8, los inyectores tipo jeringa con respecto a los que utilizan válvulas, siendo los segundos de mayor aplicación.

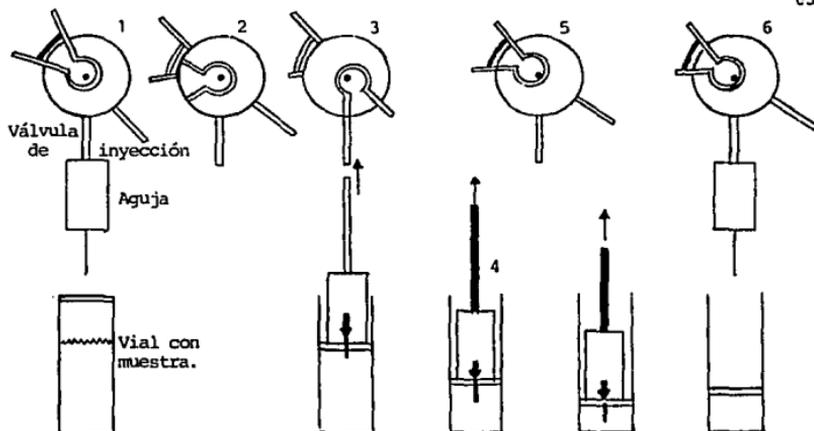


Fig. 2.9 Funcionamiento del inyector automático. (19).

Tab. 2.8 Inyectores: Jeringa ó Válvula ?.

Parámetro	Jeringa (con septum)	Válvula
Reproducibilidad	0	++
Resistencia alta presión	0	++
Cambio del volumen de mta.	++	+
Costo	++	+
Sistema optimizado	++	++
Operación de rutina, autonmatización	0	++
Entrega de grandes volumenes (> 10 ml.)	++	0 ^a
Uso con muy pequeños volumenes de muestra	+	0 ^b
Utilidad a alta temperatura	0	+

Nota: 0 = deficiente, o utilizable bajo ciertas condiciones, + = satisfactoria
++ = óptimo o claramente ventajoso.

^a Para grandes volúmenes de muestra, se utiliza una válvula con una bomba por separado para medir la muestra e introducirla en la columna.

^b Se emplea para pequeños volúmenes siempre y cuando existan loop de muestra de esos tamaños disponibles.

2.4.3. Avances

Una evaluación de dos sistemas de inyección para CL se presentó por Claensens y colaboradores. (1). Un nuevo sistema de inyección para la correlación cromatográfica, se reportó por Mars y Smith (2), quienes tiempo después reportan el desarrollo de un modulador de concentración electromecánico, como un dispositivo de la inyección (3). Evans y Mc. Giffin (4) examinan directamente el efecto de la inyección de solvente en el perfil de zona por la colocación de un detector - antes del empaque de la columna y en cinco posiciones en la misma. Un sistema - para la transmisión de fluidos de alta a baja presión en un ambiente apropiado - para CL se describió por Nickerson y colaboradores (5). Debets y colaboradores - (6) describen una zona electroforética de una muestra pretratada acoplada a una línea para CL, con límite de detección similar a la inyección directa. En cromatografía preparativa se utilizó la inyección sólida, para muestras insolubles por Miller y colaboradores (7). Pavlik y colaboradores describen el uso de un sensor óptico para detectar la completa carga de una válvula de inyección con el control de la posterior inyección, controlada por el sensor óptico.

Un nuevo sello para el fluido, se reportó por Sgourakes y Koziol (8), para ser utilizado por las válvulas de inyección en aplicaciones para HPLC.

Automatización/ preparación de la muestra.

Una línea de extracción de flujo, preconcentración y separación en CL, se reportó por Halvax y colaboradores (9). Del Mar y Hemberger (10) reportan el uso de tubos de polietileno y polipropileno para la preconcentración de compuestos orgánicos del agua subterránea utilizando un solvente apropiado para liberar estos - compuestos e inyectarlos en un sistema de CL.

Haginaka y Wakai (11) usan un reactor de membrana y cambio de columnas para la derivatización automatizada de aminoácidos. Varias diluciones automatizadas se reportaron (12-14). La tecnología de membrana fue empleada en la industria de - alimentos (15,16), industria clínica (17) y análisis ambiental (18), para la limpieza automática de muestras.

Similarmente, la extracción automática en fase sólida se uso para la preparación de la muestra (19-21). Simon y colaboradores (22) usaron una línea acoplada a un sistema de CL para análisis de trazas de la atmosfera SO_2 .

Robots

Una revisión con 42 referencias de robots de laboratorio fue presentada por Felder (23). Un sistema robotizado se modificó por Russell y Boyd (24) para una inyección doble de muestras de disolución.

Lloyd y Lang (25), compararon la exactitud y precisión de los robots contra la preparación manual en CL. El análisis de crema de cacahuate por medio de la preparación de la muestra por un robot se presentó por Pieta (26). La preparación de la muestra por medio de un robot empleando un sistema de control experto se reportó por Kingston y colaboradores. (27). La preparación de la muestra por un robot y el análisis de muestras clínicas por CL para nefazodone (28), diclofenac (29), SC-4711 (un nuevo antibacterial) (30) y la extracción automática de bis(2-etilhexil)-ftalato (31) se reportó. La preparación robotizada y el análisis de productos farmacéuticos por CL lo trabajo Kanczewski y colaboradores (32). Un análisis completamente automático de péptidos y secuencia de proteínas se reportó por Thoma y Crimmins (33).

2.5 DETECTORES

2.5.1. Función.

La función de un detector HPLC es el de monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía y por lo tanto hacer posible un registro de como la composición varía con el tiempo.

Antes de discutir la operación de los detectores será de ayuda explicar algunos términos que se usan para describir y comparar los mismos. Estos términos incluyen el ruido, la deriva y la linealidad. El ruido se refiere a la inestabilidad de la línea basal y normalmente se mide en desviaciones porcentuales de una escala establecida. El ruido también se puede medir en unidades absolutas considerando las oscilaciones del registro de un pico a otro. Causas múltiples como impurezas en la fase móvil, tierras mal establecidas, solventes inmiscibles o fallas electrónicas entre otras pueden ocasionar el ruido.

Por otro lado, la deriva se puede describir como el movimiento lento hacia arriba o hacia abajo de la línea basal en un período de tiempo considerable. Estos cambios de la línea basal normalmente se miden en unidades de cambio por hora y generalmente se asocian con cambios de temperatura o de la fase móvil. Finalmente se dice que un detector es lineal, si la respuesta eléctrica producida por el mismo es directamente proporcional a la masa o concentración de los componentes que pasan por el detector.

La linealidad se expresa como una desviación porcentual y se define para un rango establecido de detección. El rango dinámico de linealidad es otro número sin unidades que proporciona información acerca del rango de masa en el cual el detector es lineal. (24).

2.5.2. Características Generales

Tal vez una de las dificultades de la CLAR, que más tardará en resolverse, sea la carencia de un detector universal e ideal. Desafortunadamente no hay todavía un detector de esa naturaleza, es decir, no hay un detector que posea las siguientes características : (7,8,9,24).

- 1.- Tener un diseño tal, que los componentes de la muestra, no se mezclen al pasar por el detector.

- 2.- Tener una señal de ruido y de deriva baja de tal manera que los componentes que eluyen en pequeña cantidad, puedan ser distinguidos.
- 3.- Tenga un tiempo de respuesta rápido para no distorsionar los picos que eluyen rápido.
- 4.- Tenga un rango dinámico lineal amplio para que el análisis cuantitativo se pueda llevar a cabo.
- 5.- Sea relativamente insensible a cambios en la velocidad de la fase móvil, temperatura o composición.
- 6.- Responda de la misma manera a todas las sustancias, o bien si es selectivo, se pueda ajustar fácilmente para que la respuesta a cada sustancia sea óptima.
- 7.- Que responda independiente de la fase móvil.
- 8.- Debe ser fácil de manejar y confiable.

2.5.3 Clasificación

Existen varios tipos de detectores, los cuales tienen aplicaciones diferentes según el tipo de moléculas que se separen. Conociendo como trabaja un detector en términos generales, es posible determinar qué detector cubre mejor necesidades - particulares. (7,8,9,24).

Los detectores pueden ser clasificados en forma gruesa en 2 tipos: los detectores de propiedades generales, los cuales funcionan midiendo alguna propiedad - física general del eluyente de la columna, por ejemplo la constante dieléctrica o el índice de refracción. Estos detectores responden a una amplia gama de sustancias casi con la misma sensibilidad, por lo que son conocidos como detectores universales o no específicos.

El segundo tipo de detectores son aquellos que son selectivos en su respuesta. Estos son detectores de propiedades del soluto y funcionan midiendo una propiedad física o química del mismo soluto, como la absorción ultravioleta.

La siguiente es una lista de algunos de los detectores más utilizados en cromatografía líquida :

- 1.- Detector Espectrofotométrico (uv/vis).
- 2.- Detector de Índice de Refracción
- 3.- Detector de Fluorescencia
- 4.- Detector Electroquímico

- 5.- Detector Infrarrojo
- 6.- Detector de Conductividad
- 7.- Detector de Radioactividad
- 8.- Detector por Espectrometría de Masas.

A continuación se mencionarán solo aquellos que son más usados. (7,8,9,24)

Detector de absorción (uv/vis): Estos detectores son los de más uso en HPLC y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. Una gran cantidad de compuestos caen en esta categoría, incluyendo sustancias que tienen electrones sin compartir como olefinas, así como todos los aromáticos y compuestos que tienen enlaces del tipo $>C=O$, $>C=S$, $-M=O$, $-N=N-$.

A la salida de la columna el haz de luz es enfocado a través de la celda de flujo hacia el sistema de foto-detección. Cuando los solutos que absorben luz se encuentran en la fase móvil, la intensidad de la luz que llega a la fotocelda se reduce produciendo un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser amplificada e introducida a un registro o sistema de datos. La relación entre la absorción de luz en la celda de flujo y la concentración del soluto está dada por la ley de Beer:

$$A = E l C$$

donde :

A = Absorbancia

E = Coeficiente de extinción del soluto a una longitud de onda.

l = Paso de luz de la celda de flujo.

C = Concentración del soluto en la celda.

La sensibilidad del detector será directamente proporcional al valor del coeficiente de extinción y al paso de luz de la celda. La mayoría de las celdas tienen un paso de luz entre 1 y 10 mm y varían en volumen de 0.5 a 20 μ l.

Existen diferentes categorías de detectores espectrofotométricos :

- a) Detectores de longitud de onda fija. Utilizan filtros para fijar la longitud a 254 nm. Ver Fig. 2.10.
- b) Detectores con longitud de onda seleccionable. En estos se intercambian filtros, lo cual permite seleccionar diferentes longitudes de onda directamente de una lámpara de mercurio.
- c) Detectores con selección dual. Similares a los anteriores pero tienen un sistema doble de detección que permite monitorear la celda de flujo a dos

longitudes de onda, con lo cual se puede conocer la relación entre ambas longitudes. Esta relación es útil para identificar picos y confirmar su pureza.

- d) Detectores de longitud de onda variable. Permiten una gran flexibilidad para optimizar las longitudes de onda. Utilizan un monocromador para seleccionar la longitud de onda, como en un espectrofotómetro. Ver Fig. 2.11.

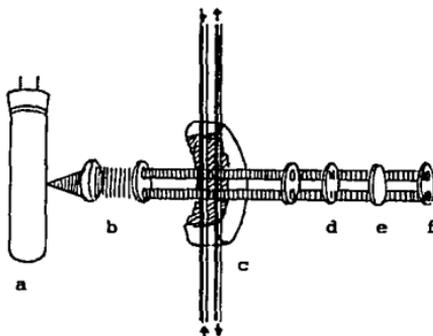


Fig. 2.10 Detector de luz ultravioleta. a) Fuente luminosa; b) Lente colimadora; c) Celdas analítica y de referencia; d) Ventana de cuarzo; e) Filtro; f) Fotocelda (7).

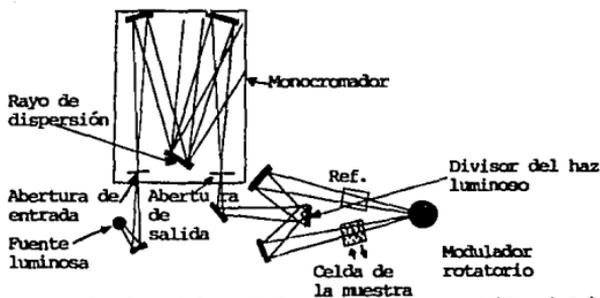


Fig. 2.11 Detector de ultravioleta de longitud de onda variable (7).

- e) Detectores de barrido (uv/vis). La característica principal de este detector es que puede barrer rápidamente por varias longitudes de onda durante la elución de un pico de cromatografía. Esto permite tener un espectro de absorción para identificar la longitud de onda óptima. Con los detectores de barrido se pueden realizar varias funciones en forma simultánea tales - como cromatogramas a dos ó más longitudes de onda, gráficas de relación y barridos rápidos. También es posible programar cambios en la longitud de onda mientras se realiza una corrida, lo cual permite optimizar aún más la longitud de onda. (7,8,9,24).

Detector de Índice de Refracción: Estos detectores miden la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad - es moderada, por lo general del orden de microgramos ó partes por millón.

Hay dos modelos distintos de este tipo de detector, que se ilustran en la Fig. 2.12 y 2.13.

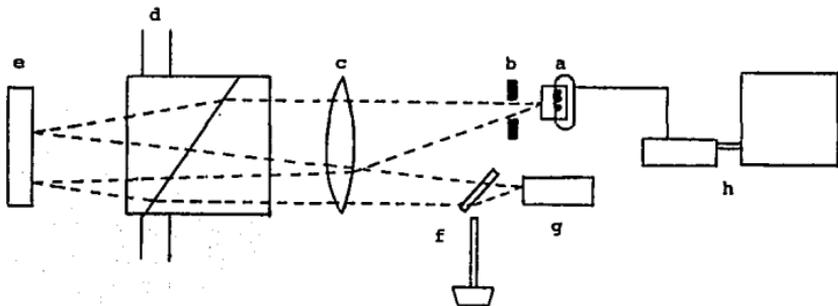


Fig. 2.12. Detector de Índice de Refracción, tipo "desviación". a) Fuente luminosa; b) abertura; c) lente colimadora; d) celdas analíticas y de referencia; e) espejo; f) ajuste óptico de cero; g) fotocelda; y h) amplificador. (7).

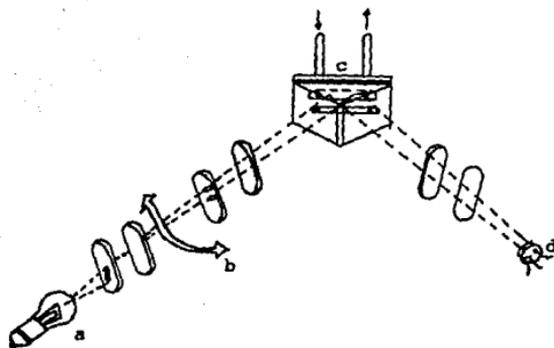


Fig. 2.13 Detector de Índice de Refracción, tipo "Fresnel".

a) Fuente luminosa; b) proyector; c) prisma y celdas; d) fotocelda.

Uno de ellos, llamado refractómetro de desviación, se basa en el desplazamiento óptico de un rayo de luz, que es proporcional a la diferencia del índice de refracción entre dos líquidos. El otro se funda en el principio de Fresnel, según el cual en la interfase entre el prisma de vidrio y algún líquido, la cantidad de luz transmitida y reflejada es proporcional al ángulo de incidencia de la luz y al índice de refracción del líquido.

En el refractómetro de desviación (Fig. 2.12), un rayo de luz pasa a través de una abertura (a) y es colimado en el lente (b), atraviesa luego las celdas (c), que contienen respectivamente, el disolvente puro y la solución que sale de la columna, es reflejado por un espejo (d) y enfocado a través de un mecanismo de ajuste óptico (e); incidiendo más sobre la superficie de una fotocelda (f).

El ángulo de incidencia del rayo de luz sobre la fotocelda está determinado por el ángulo de desviación que resulta de la diferencia entre los índices de refracción de los líquidos en ambas celdas. Conforme el rayo cambia su ángulo de incidencia sobre la fotocelda, se genera una señal que es amplificada y representada gráficamente por el registrador.

El esquema óptico de un refractómetro de tipo Fresnel (Fig. 2.13), consta de dos rayos de luz colimados y de igual intensidad, que pasan a través de un prisma

e inciden sobre la interfase vidrio-líquido de las celdas de referencia y muestra respectivamente. Dichas celdas de aproximadamente 3 microlitros cada una, consisten en cavidades ovaladas en una pequeña pieza de teflón, ubicada entre el prisma y una placa de sostén. La diferencia de intensidad de la luz transmitida a través de las celdas está en función de los índices de refracción de ambos líquidos y se mide por medio de una fotocelda doble la cual genera una señal que es registrada gráficamente.

Concluyendo el detector de índice de refracción es casi un detector universal, pero es poco popular en cromatografía líquida por las siguientes razones:

- a) Tiene menos sensibilidad que los detectores por fluorescencia o uv.
- b) Es sensible a variaciones de temperatura. Esto se debe a que el índice de refracción cambia con la temperatura. Por otro lado los elementos ópticos del sistema están diseñados para detectar cambios pequeños en el ángulo de la luz y por lo tanto cambios pequeños en la temperatura ocasionan variaciones ópticas.
- c) Tendencia a romperse y sensible a la presión. También la celda de flujo del detector es muy frágil.
- d) No puede usarse normalmente para gradientes. Si la composición de la fase móvil cambia, el índice también cambia. La elución con gradiente sólo se puede hacer dividiendo el flujo de la fase móvil usando dos columnas, una para la muestra y otra de referencia.(7,24)

Detector de Fluorescencia: Las ventajas más grandes de la fluorescencia son la selectividad y la sensibilidad. Se trata de una técnica muy poderosa cuando se realizan análisis sustancias que existen en muy pequeña cantidad (trazas).

Pero, como se puede definir la fluorescencia?

Cuando una molécula absorbe energía ocupa un estado de energía excitado. Esta energía debe disiparse antes de que la molécula regrese a su estado normal o nivel de energía basal. Si la molécula cae instantáneamente a su nivel basal con la emisión de energía en forma de luz se dice que fluoresce. La luz emitida es generalmente de baja energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación. Es importante hacer notar que la fluorescencia no se presenta a menos de que haya primero absorción de energía.

La cantidad de fluorescencia o eficiencia (F) se puede definir sencillamente como la relación entre el número de fotones emitidos con el número de fotones -

absorbidos. De tal manera que la eficiencia F tiene un valor máximo de 1. las moléculas con un valor F mayor a 0.5 son altamente fluorescentes, mientras que los compuestos que tienen un valor de F menor a 0.1 tienen muy poca fluorescencia.

Ahora bien, qué tipo de compuestos tienen fluorescencia. Estos compuestos se pueden dividir en dos grandes grupos: nativos y derivados.

1) Fluorescencia nativa.

Son compuestos con estructura clínica, tales como el anillo benzénico. Es difícil predecir la fluorescencia ya que ésta depende del pH, solvente y el tipo de sustitución.

2) Derivados fluorescentes.

Para aquellos compuestos que no poseen fluorescencia nativa se pueden emplear técnicas de derivación.

a) Cloruro de Dansilo: Este compuesto reacciona con aminas primarias secundarias así como fenoles. Se utiliza como una derivación precolumna.

b) Fluorescamina: Reacciona con aminas primarias y se emplea para una derivación post columna.

c) Opa (O-ftaldehído): Este compuesto también reacciona con las aminas primarias y lo hace en el rango de picomoles. Se usa para derivaciones pre y post columna.

Hay dos tipos básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados - fluorímetros de filtros que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, (ver Fig. 2.14) y los espectrofluorímetros que emplean - monocromadores. Ambos diseños rinden muy buenos resultados y no parece haber muchas más ventajas en los espectrofluorímetros que compensan su alto costo.

Las fases móviles empleadas en los detectores de fluorescencia deben ser cuidadosamente seleccionadas debido a que la intensidad de sus emisiones dependen notablemente del medio en que se efectúan; esto dificulta en diverso grado algunas de sus aplicaciones, como son la programación de la fase móvil y en análisis cuantitativo. (7,24).

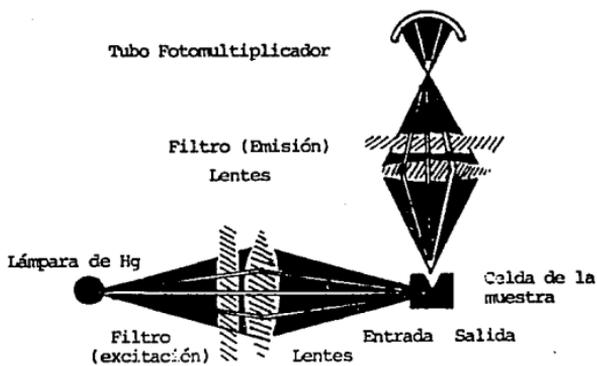


Fig. 2.14 Fluorómetro de filtro. (7).

Tabla 2.9 Especificaciones para los detectores más comunes en CL. (19).

Parámetro	UV (abs)	Índice de Refra.	Radioactividad	Electromecánico	IR (abs)	Fluorómetro
Tipo	Selectivo	General	Selectivo	Selectivo	Selectivo	Selectivo
Uso con gradiente	Si	No	Si	No	Si	Si
Límite superior del rango dinámico lineal	2-3	10^{-3}	No disp.	2×10^{-5}	1	No disp.
Rango Lineal	10^5	10^4	Largo	10^6	10^4	10^3
Sensiti- vidad en 1% de la escala total ruido	0.002	2×10^{-6}	No disp.	2×10^{-9}	0.01	0.005
Sensiti- vidad fa- vorable a la mta.	2×10^{-10} g/ml	1×10^{-7} g/ml	50 cpm ^{14}C /ml	10^{-12} g/ml	10^{-6} g/ml	10^{-11} g/ml
Sensiti- vidad res- pecto a la Temp.	Bajo	10^{-4}°C	Despreciable	$1.5 \text{ }^\circ\text{C}$	Bajo	Bajo

2.5.4 Avances

Los avances en cuanto a detectores en los últimos años ha sido enorme, es por ello que se va a mencionar más ampliamente este tema.

Introducción General.

El trabajo fundamental de la detección en CL está condicionada por las imposiciones físicas que presentan los métodos de separación capilar y microbore. Para los detectores ópticos tales como los detectores de absorbancia, esto implica nuevas ideas en la detección que maximizen la sensibilidad mientras se minimice el ensanchamiento de las bandas. Varía información trata trabajos para la reducción de artefactos ópticos debido al cambio de I.R que ocurre durante el gradiente de elución en ambos microbore y CL capilar.

Un significativo incremento en CL/MS para CL capilar también se observa. Otro punto fundamental en el trabajo de detección en CL es el desarrollo de detectores y métodos de detección que proveen y añaden selectividad.

De acuerdo a varia información en el área de la quimioluminiscencia, actividad óptica y detección en IR se garantiza la separación por c/u de estos detectores, al final en la sección de Miscelanea de Detectores se discutirá estos puntos.

Así esta revisión tiene 2 grupos, divididos de una manera burda: 1) Detectores con un desarrollo básicos y 2) Detectores con un desarrollo más sustancial, estos se discutirán en orden alfabético : Absorbancia, Actividad Óptica, Detección Indirecta, Electroquímicos, Fluorescencia, Índice de Refracción, Infrarrojo, Quimioluminiscencia.

Dentro del grupo 1, en una revisión por Yeung (1), dos desarrollos recientes en la sensibilidad de la detección por absorbancia para CL capilar y electroforesis capilar fue descrita. La primera propuesta involucra irradiación debajo del eje para ganar un significativo aumento en la sensibilidad. La segunda propuesta involucra una transferencia de energía de analito absorbiendo una fluorofora añadida a la fase móvil, con una segunda mejor emisión mejorando los límites de detección para el analito. El uso de detectores basados en laser se revisó por -- Berthod (2). Una revisión con 29 referencias, presenta la discusión de los requisitos mínimos para los detectores en CL, menciona relevantes propiedades del laser y varios ejemplos de combinaciones entre laser-dispersión de luz, fluorescencia

fotoionización, Infrarrojo, actividad óptica y detectores fotoacústicos. En una revisión relacionada por Belen'kii (3), el detector basado en laser para CL -- capilar se caracterizó en términos de sensibilidad de la concentración y una muy baja capacidad del volumen de detección.

La popularidad de la cromatografía iónica CI tiene consigo una notable revisión por Dasgupta (4) y Rocklin (5). El primero es una revisión de 170 referencias dentro de la manipulación post-columna en CI para mejorar la selectividad y sensibilidad para la detección de un analito o clases de analitos. El segundo es una revisión de 36 referencias comparando diferentes tipos de detectores para CI (5).

Una revisión por Synovec (6) describe nuevos detectores de absorbancia e Índice de refracción diseñados para CL. Estos fueron diseñados para funcionar dentro de las más difíciles condiciones de Laboratorio y aún suministrar un buen funcionamiento.

A. DETECTORES DE ABSORBANCIA.

En general, la detección por absorbancia está siguiendo las más recientes tendencias de instrumentación por CL; por ejemplo, el desarrollo de microboro, los capilares empacados y el tubular abierto en HPLC son una tendencia hacia la miniaturización de las celdas de flujo del detector de absorbancia para reducir la -- amplitud de banda del detector.

Esta sección incluye documentos de revistas sobre detectores de absorbancia, detectores para nuevas técnicas de separación, investigaciones teóricas y experimentales sobre celdas de flujo de absorbancia, técnicas de calibración instrumental y finalmente el Hardware nuevo para la reacción post-columna.

Las revistas sobre instrumentación en absorbancia se limitarán a dos. Una revista de principios e instrumentación de la detección por arreglo de diodos se escribió por Huber y Fiedler (1). Jones (2), trabajo sobre dos nuevas fuentes de luz UV encabezadas por el ⁹⁰Sr y la radioluminiscencia de acuerdo al fenómeno de radiación de Cerenkov.

Los nuevos problemas de separación, han sido la fuerza motriz para los nuevos esquemas de detección por absorbancia. Connord y Siouffi (3), han estudiado la cromatografía en columna en dos dimensiones, en la cual una mezcla es eluida por dos diferentes solventes en direcciones ortogonales a lo largo de un cuadrado, columna fina y eluida a través de una abertura (slit) que actúa como celda de detec

tora. Un arreglo de fotodiodo es localizado paralelamente al slit para monitorear continuamente la absorción UV de las bandas del analito difundidas a lo largo de la amplitud de la columna para la cromatografía de líquidos capilar tubular abierto. Synovec y Renn (4) han desarrollado un espectrofotómetro especial de absorban-cia de longitud de onda múltiple de fibra óptica que incorpora un detector de posición sensible para corregir fluctuaciones en la fuente de luz y aberraciones en el límite de detección de 1×10^{-4} au con este espectrofotómetro, cuando lo apli-carán a una temperatura alta (150°). La solarización de la fibra óptica en el rango UV fue evaluado, enfatizando en las precauciones necesarias. Las re-laciones teóricas se derivaron por Renn y Synovec (5), para relacionar cambios - en el IR de la fase móvil para las medidas de absorbancia como las aplicadas a la fibra óptica simple del detector de doble longitud de onda. El método eliminó - virtualmente la dirección de la línea base asociada con las aberraciones del IR inducidas térmicamente durante el gradiente térmico (de la ambiente hasta 150°) en la cromatografía de líquidos de microboro también como durante el gradiente de la fase móvil y otros métodos de flujo como en los análisis por inyección de flu-jo. Sulya, Moore y Synovec (6) detectaron que el éxito del detector en la corre-cción del IR en tiempo real es una mejoría en el método de detección por la rea-lización en columna de la preconcentración de muestras bajo condiciones de no-elu-ción seguidas ya sea por un gradiente térmico de elución.

Algunas otras investigaciones teóricas y experimentales de las celdas de flujo fuerón realizadas con énfasis en la miniaturización y sensibilidad. Las normas - sugeridas para las medidas de absorbancia en capilares de silica difusa fuerón - sugeridas por Bruin et al. (7) después de los estudios teóricos y experimentales del diseño de la celda de flujo y la sensibilidad resultante, ruido, linealidad, amplitud de la banda y los efectos del índice de refracción. Ellos reportarán que un lente enfocado al frente de la capilaridad resultó en una mayor sensibilidad y rango lineal que una celda con una amplitud de la apertura ajustable. Un diseño de celda-U produjo una trayectoria de luz longitudinal más larga y una razón se-ñal-ruido incrementada. Chervet et al. (8) construyeron una celda de flujo para CL capilar con una longitud de paso cerca de 2 cm y un volumen menor de 90 n L. Este modelo mostró progresos en la sensibilidad de 100 a 500 veces que la com-para-da a la detección en-columna.

Algunos métodos para la optimización de la longitud de onda y la calibración de los detectores de absorbancia de longitud de onda múltiple se investigarán. Un

procedimiento para determinar la longitud exacta de los detectores de longitud de onda variable se patentó por Esquivel (9). Después de que una celda de flujo se llena con una solución de calibración de iones Tb (III) en propanol, se encuentra la longitud de onda de máxima absorbancia y comparada a la longitud de onda de máxima absorbancia real como la obtenida de un espectro de referencia. La diferencia es, entonces calculada. Binder et al. (10) usó razones de longitud de onda durante la detección de una droga para calibrar un detector de longitud de onda múltiple y evaluar la variación del instrumento a instrumento en una serie de detectores. Esta información, así como también la segunda derivada y el intercepto cero para el espectro de la droga se usó para aplicar exitosamente a la biblioteca espectral UV de diferentes instrumentos. Bogusz y Wu (11) también reportaron un procedimiento de corrección para el uso interlah de bibliotecas espectrales. Usando un tipo de información teórica llamada función de información mutua (FUMI).

Carr y Chan (12) establecieron que la mayoría de los detectores de arreglo de diodos disponibles comercialmente no efectúan homogeneidades de pico a bajo nivel. Ellos realizaron la estadística de pruebas F y pruebas t para detectar las homogeneidades de pico con un alto nivel de confianza. Blaffert (13) patentó un servicio de análisis espectroquímico para separaciones por HPLC el cual utiliza un mecanismo de evaluación en circuito que colecta una matriz de valores espectrales para una sustancia eluida y determina la concentración de la sustancia por un análisis simple de la matriz de 4 datos a través de una evaluación. El mecanismo también calcula la concentración de la sustancia acarreadora.

La instrumentación de postcolumna mejorada por la derivación y otros esquemas de detección se han reportado. Wolf y Schmid (14) adicionaron un fotoreactor en línea para la irradiación de barbituratos con luz UV para producir una reacción fotoquímica que crea una desviación batocrónica en los analitos y una banda espectral fuerte a 270 nm. León González y Townshend (15) reportaron la determinación de carbamato y pesticidas organofosforados por monitoreo espectrofotométrico de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa que se inmovilizó en una minicolumna de vidrio de poro controlado. El sistema incorpora un montaje del análisis de inyección de flujo (FIA) convencional. El FIA también fue acoplado a la HPLC por Baba et. al. (16), para la detección espectrofotométrica de H-fosfonatos. De acuerdo con la cromatografía cuantitativa actual y la detección de arreglo de fotodiodos, Schaufelberger (17) usó un reactor postcolumna para adicionar un solvente auxiliar que reduce el ruido en el detector causado por la fase estaciona-

ria no retenida. La turbidez de las fases móviles termolábiles en la cromatografía cuantitativa reciente hace difícil el monitoreo UV. Este problema fue resuelto por Oka e Ito (18) quienes colocaron un tubo de teflón de 3 m de longitud con un diámetro interno de 0.46 mm entre la columna y el detector y termoregularon el tubo en un baño a 30°C. Un tubo similar se aplicó al detector, en la salida, para suprimir la formación de burbujas de gas.

B. ACTIVIDAD OPTICA

La detección por Actividad Óptica (OA) ha crecido en popularidad como lo demuestran el gran número de documentos por los últimos dos años. La detección óptica comprende 3 variaciones: Polarimetría, Dicroísmo Circular (CD) y Rotación Magnética Óptica (MOR). Un Polarímetro para HPLC está comercialmente disponible (1), lo cual indica la necesidad que existe por este detector en muchos laboratorios.

Lloyd y Goudall (2) revisaron la detección polarimétrica con énfasis en la determinación de la pureza enantiométrica y el estudio sobre reacciones enantioselectivas. Kawasaki y Col (3) así como Xi y Yeung (4) desarrollaron un detector universal para HPLC basado en MOR, es decir el efecto Faraday y se han reportado resultados lineales así como límites de detección. En un trabajo posterior Kawazumi y Col. (5) examinaron dos modos de modulación adecuados para el detector MOR. Xu y Tran (6) desarrollaron un detector ultrasensible, basado en la medida de una señal en lentes térmicas CL, la cual corresponde a la diferencia en la señal producida por la excitación secuencial del efluente por la luz láser polarizada circulante a derecha e izquierda. Bertucci y col. (7) encontraron que la medida simultáneamente de la absorbancia y señales CD. disimulan la determinación del factor anisotrópico y por lo tanto la pureza óptica de los eluatos. Kuroso y col. (8) aplicaron un gradiente de elución en HPLC con la detección CD para la separación y conformidad en el análisis de proteínas. Bobbit y col. (9, 10) encontraron que la combinación del HPLC con la detección polarimétrica basada en el láser proporcionaba ventajas únicas para el análisis de los análogos de penicilina (9) y gentamicina en leche (10). Heyraud y Rinaudo (11) usaron la detección polarimétrica de Índice de Refracción y de dispersión de luz para la caracterización de dextrinas y almidones usando la permeación en gel y fase reversa en CL.

C. DETECCION INDIRECTA.

Cuando los analitos deseados poseen baja sensibilidad al modo de detección - disponible (absorbancia, fluorescencia, conductividad, etc), el uso de una fase móvil o fase móvil adicionada conteniendo una respuesta al detector, a menudo - denominado agente visualizante, proporciona casi siempre resultados satisfacto - rios. Los analitos son indirectamente detectados por el cambio en la señal de - fondo del agente visualizante desde la fase móvil de acuerdo a mecanismos defini - dos tales como conservación de la carga, apareamiento del ión o desplazamiento - de volumen o cuando los analitos inyectados compiten con el agente visualizante o perturban el equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Yeung y Kuhr (1) revisaron la detección indirecta fluorométrica y electroquí - mica en CL capilar, electroforesis de zona capilar. Morris (2) revisó técnicas - fototérmicas CL y TLC, en la cual el índice de refracción cambia por causa de la absorción de luz y en consecuencia la evolución de calor es medida.

Algunos desarrollos en instrumentación para la detección indirecta fueron re - portados. Rice, Thorne y Bobbit (3) demostraron la detección fototérmica indirec - ta para microcolumna HPLC usando un espectrómetro con lente de diferencial térm - co por una bomba a prueba que minimizó la influencia de la señal de fondo. Pfe - ffer y Yeung (4) prepararon columnas capilares de tubular abierto cruzando y - uniendo gomas de silicono vinílico dentro de los capilares de sílica fundida. Si - guiendo por la cromatografía en fase reversa o de intercambio anionico, la -- detección fluorométrica indirecta basada en el laser proporcionó concentraciones detectables en el rango de 30 nM para alcoholes y aniones comunes, respectivamen - te. Winefordner y col (5) construyeron un detector fotométrico indirecto de bajo ruido, empleando un diodo de emisión de luz altamente estable como fuente de luz y el azul de metileno como agente visualizante. Obrezkov y col (6) reportaron un nuevo detector "cinético" para cromatografía iónica, el cual cuando es acoplado con un conductor conductométrico convencional, permite la determinación simultá - nea de aniones de ácidos orgánicos débiles y fuertes. El detector cinético usa la degradación de KBrO_3 en HCL, catalizada por aniones reductores (especialmente - aniones conteniendo azufre), como la reacción indicadora cinética. Esta reacción disminuye la absorbancia de fondo del reactivo a anaranjado de metilo.

Dorland y col. (7) describieron un método de detección UV indirecta para anio - nes inorgánicos usando hidroxido de tetrabutilamonio perclorato de papaverina co - mo contraíón y reactivo de interacción respectivamente. Un efecto de sobrecarga

causando áreas de pico reducidas y razones de desplazamiento calculadas, se observó y un mecanismo teórico se propuso.

D. ELECTROQUÍMICOS.

Esta sección esta compuesta de la siguiente manera: Nuevos detectores, Nuevos electrodos, Nuevas aplicaciones electroquímicas y Detección por conductividad.

Nuevos detectores.

Un detector a través de flujo con un alambre amperométrico de carbón de bajo costo se describió por Yang (1). Una nueva celda de flujo de microbanda de capa fina con un volumen de 5 μ l y una respuesta independiente de la velocidad de flujo ha sido reportado por Kuwana y col. (2). Otros diseños de celdas empleando ya sea fibras de carbón o de oro han sido también reportados (3). En ensayos para obtener mayor selectividad, Connor y col. han descrito detectores utilizando tejidos y microbios (4). Nagels y col. describieron un detector con surtidor de pared que puede ser fácilmente operado ya sea por convección/difusión o por difusión controlada (5). Un nuevo detector de cristal de cuarzo ha sido descrito (6). Un detector capaz de una detección simultánea UV/VIS y amperométrica ha sido descrita por Nagy y Anderson (7). Dos documentos discutieron el potencial de detección electrocinética en cromatografía de líquidos (8 y 9).

Nuevos electrodos.

Johnson y LaCourse revisaron el uso de técnicas conducidas por electrodos de platino y oro (10). Stoianovic y col. han mostrado que los microelectrodos carecen de la sensibilidad para detectar arsénico en agua embotellada cuando son comparados con electrodos de tamaño convencional (11). Se ha reportado que un electrodo de Ag/AgBr exhibe una sensibilidad excelente para un amplio rango de aniones separados por cromatografía de iones. Dos documentos reportaron el uso de electrodos de mercurio en cromatografía de líquidos (12,13). Un estudio comparativo de electrodos de Pt, Au, Cu, Ni, Ag y Co para la detección de carbohidratos y aminoácidos se ha reportado (14). Algunos documentos reportaron varios aspectos de los electrodos de fibra de carbón (15-18).

Gunasingham et al. (19) reportaron sobre ensayos para ganar selectividad usando electrocompuestos hechos por dispersión de partículas de platino en una chaqueta de polímeros intercambiadora de cationes en un carbón vidrioso.

El carbón vidrioso era un sustrato popular para muchos electrodos químicamente modificados. El carbono modificado en Nickel (20), base-activado (21), alumina (22) y ftalocianina de cobalto polimérica (23) así como electrodos de vidrio-carbono fueron reportados.

Nuevas aplicaciones electroquímicas.

LaCourse y Johnson (24) describieron los mecanismos de detección amperométrica para carbohidratos. Barisci y Wallace (25) evaluaron reactores fotoquímicos a través de flujo combinados con la detección electroquímica. La derivación para permitir la detección electroquímica fue revisada por Lisman y col. (26). Una revista discute el uso de enzimas inactivadas y detección amperométrica con énfasis en sus ventajas (27). La detección de aminoácidos como sus derivados usando la detección electroquímica se discutió. Clos y Dorsey reportaron sobre el uso de surfactantes para reducir o prevenir la suciedad adsorptiva de los electrodos de vidrio-carbono (28).

Detección por conductividad

Berglund y Dasgupta (29) reportaron sobre una nueva técnica de conductividad bidimensional que permite realzar la sensibilidad para los ácidos débiles. El uso de membranas y técnicas electroquímicas para generar el eluyente para la cromatografía por iones se reportaron por Dasgupta y col. (30). Una celda de flujo de tres electrodos miniaturizada única fue designada para proporcionar medidas simultáneas de potenciometría y conductividad. Un documento similar describió simultáneamente la conductividad y la detección UV (31). Dos documentos discutieron los aspectos teóricos de la detección por conductividad suprimida (32,33).

E. DETECTORES DE FLUORESCENCIA

En CL, los detectores de fluorescencia son a menudo preferidos para estudios analíticos de trazas por su buena selectividad y excelente sensibilidad.

El alto flujo de fotones y la excelente resolución espacial proporcionada por los laser realzan la sensibilidad y selectividad de la detección por fluorescencia sobre las obtenidas con fuentes de luz de amplias bandas convencionales. Van de Nesse y col. (1) emplearon un laser de ion Argón de doble frecuencia para la detección por LIF en una columna de CL de tamaño convencional.

Van de Nesse y col. (2) combinaron el laser de ión Argón de doble frecuencia

con un detector de arreglo de diodos lineal para facilitar la identificación al vuelo por LIF. La técnica se adaptó para el análisis a nivel de trazas de mezclas complejas.

Nuevos métodos de separación y detección para microcolumnas CL, usando un detector de fluorescencia de doble fotón excitado de cobre-vapor se describió por Pfeffer (3).

La detección en columna con la capacidad de ejecutar programas de longitud de onda múltiple se usaron por Ong y col. (4) para la separación de dansil-aminocidos por MEKC.

El primer uso de un espectrofluorometro de modulación de fase con multifrecuencia para las determinaciones de tiempo de vida de la fluorescencia al vuelo en CL se describió por Cobb y Mc.Gown (5,6).

Mastenbroek y col. (7) utilizaron la fluorometría como un método independiente de identificación para mejorar la rutina de análisis HPLC de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en muestras de sedimento marino. Las bajas temperaturas de la técnica proporcionan un espectro de fluorescencia de alta resolución de PAH's que pueden servir como huellas digitales. Zhao y Quan (8) combinaron una técnica de fluorescencia sincronizada con HPLC para la identificación de PAH's en muestras de orina de fumadores.

Un acceso al enlace competitivo en el desarrollo de reacciones postcolumna en CL se reportó por Przyjazny y Bachas (9). La biotina, en tabletas de vitamina se determinó por el decremento en la fluorescencia cuando el efluente de la columna en CL encuentra una corriente del reactivo que contiene el enlazante adivina cual estaba acomplejada con el fluorescente de prueba ácido 2-amino-naftalen-6-sulfónico.

Wegrzyn y col. (10) desarrollaron un detector de fluorescencia con multicanales para el arreglo de fotodiodos desintensificado y se usó como un detector HPLC.

Una singular característica de este detector es el uso de una lámpara-flash capilar de Xenón como una fuente de excitación la cual proporciona bajo calor de radiación, mientras sigue proporcionando un espectro continuo de alta intensidad.

Jalkian y Denton (11) usaron un mecanismo bidimensional de estado sólido acoplado para integrar la emisión natural de fluorescencia natural de compuestos policíclicos aromáticos. Esta nueva técnica, cuando es aplicada a la espectros copia unidimensional conduce al incremento del rango dinámico. Los autores obtuvieron excelente linealidad y límites de detección en algunos contaminantes im-

portantes. Además los autores, aplicaron técnicas sincronizadas y derivadas a los datos de fluorescencia bidimensional para resolver picos superpuestos.

Patel y col. (12) construyeron y optimizaron un detector de fotólisis post-columna y extensivamente examinaron algunas clases de fármacos nitrogenados usando dos aproximaciones para la generación de fluorescencia: a) UV-fotólisis, seguida por la reacción con o-ftaldehído-2-mercaptoetanol, b) UV- fotólisis simple. Los autores encontraron que con el uso de sistemas de solventes adecuados y un fotosensibilizador y optimización de todas las condiciones experimentales, muchos - compuestos pueden ser transformados en productos fluorescentes y alcanzar niveles de límites de detección de nanogramos. Mawatari y col. (13) también irradiaron el efluente de la columna con luz UV para dar fluorescencia y detectar isoniazida y sus derivados acetilados al nivel de nanogramos.

Los reactores empacados con enzimas inmovilizadas ofrecen la selectividad de reacciones enzimáticas y la economía ganada por inmovilización la frecuente costosa catalisis. Kiba y col. (14) inmovilizaron sorbitol deshidrogenasa químicamente sobre cuentas de alcohol polivinílico y la usaron en un reactor de columna en un sistema de CL para la detección específica de azúcares selectos. El NADH producido de la reacción enzimática fue monitoreado espectrofluorométricamente. La enzima inmovilizada del reactor de columna puede también simplificar el sistema CL.

F. DETECTORES DE INDICE DE REFRACCION

El detector IR es el detector popular más "universal" para CL, pero esta limitado por fluctuaciones en el eluente debido a cambios en temperatura, presión, composición y gases disueltos. Muchos de los trabajos recientes han sido dirigidos hacia la minimización de estas limitaciones en la resolución del detector IR.

Bruno y Col. (1) reportaron un detector en columna IR basado en laser para la electroforesis capilar que explotaba el patrón de interferencia de tubos capilares iluminados lateralmente. El nivel de ruido reportado RMS de 3×10^{-8} - unidades fue solamente de orden de 1 de magnitud más grande que la calculada para el límite de ruido de inyección.

Tres reportes (2-4) fueron reportados en los cuales la identidad del pico y la homogeneidad fueron investigados por racionalización de los factores de respuesta de la detección simultanea UV e IR. Weigang y col. (2) desarrollaron un método de intercambio cationico para la determinación de substratos de carbohidratos y metabolitos en cultivos de células mamarias. Masson y col. (3) desarro

llaron un método de intercambio catiónico para analizar los metabolitos en los efluentes de hígado de rata. Vaccher y col. (4) desarrollaron un método HPLC para los azúcares relacionados (lactosa, fructuosa, galactosa, epilactosa) usando una fase estacionaria de sílice (aminopropil).

El detector de gradiente de Índice de Refracción (GIR) tiene la ventaja de que la dirección y las fluctuaciones de baja frecuencia en el eluyente IR son removidas, mientras se mantiene la buena sensibilidad para los analitos. En este detector, un rayo láser pasa axialmente a través de la celda de flujo y es deflectado en proporción al gradiente radial de IR que es causado por el perfil de la concentración del analito dispersado y esta deflexión es cuantitativamente registrada.

Synovec, Renn y Hancock (5-7) continuaron el desarrollo del detector por gradiente del Índice de Refracción (GIR) para microcolumnas HPLC.

G. DETECTORES INFRARROJOS.

La CL de unión de interface y la espectroscopía infrarroja de la transformada de Fourier (FTIR) generalmente cae dentro de una de dos categorías. Las interfaces en las cuales el efluente es medido en una celda de flujo son comercialmente disponibles, pero la absorbancia del solvente limita la sensibilidad. El otro acceso es para vaporizar el solvente, depositando así los analitos disueltos en algún medio móvil, idealmente como manchas pequeñas las cuales son después medidas. La mayor parte del trabajo se enfocó sobre la manera de remover el solvente, particularmente en CL de microbore, donde la cantidad del solvente es altamente reducida.

Un número de revisiones aparecieron en este período Griffith y col. (1,2) describieron una manera unificada para acoplar la cromatografía de gases (CG), la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), y la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) a la FTIR con cambios mínimos en el hardware. De Haseth y Robertson (3) revisaron la generación de aerosol monodisperso (MAGIC) en interface para HPLC-FTIR. Los mismos colaboradores también proporcionaron la primera demostración del espectro IR identificable obtenido de fases móviles amortiguadoras (buffers volátiles y no volátiles) usando la interfase MAGIC (4).

Jinno y Fujimoto (5,6) revisaron la microcolumna HPLC acoplada con la detección FTIR. dos estudios generales de HPLC-FTIR fueron también publicados (7,8).

Busch y col. (9) patentaron un detector de emisión infrarroja que era adecuada para aplicaciones cromatográficas y para la determinación de C , Cl^- y Cl_2 dispo-

nibles en muestras acuosas. El CO_2 en su banda de emisión (estrecha y asimétrica) a 4.3 nm, proveniente de la introducción de la muestra dentro de una flama de H_2 en aire, se usó con un sistema birradial para la substracción del fondo. Lange, Griffiths y Frase (10) introdujeron una interfase nueva para la CL de microboro en fase reversa-FTIR consistente de tubos concéntricos de sílica fundida por nebulización del flujo con gas He rodeando el tubo interior conteniendo el efluente y un estado rotatorio para depositar el soluto. La completa remoción de la fase móvil acuosa se logró por una velocidad de flujo de 50 L/min. En una comparación de la reflectancia difusa (RD) y transmitancia difusa (TD) en la espectroscopía infrarroja de HPLC-FTIR, Fraser, Norton y Griffiths (11) encontraron que TD-FTIR era útil siguiendo la CL de microboro, ya que los analitos penetraban bien bajo la superficie del substrato pulverizado usado para la remoción del solvente. Mientras la RD-FTIR era superior cuando los analitos eran depositados en la punta de la capa del substrato, por ejemplo siguiendo CFS. La técnica de almacén de memoria, en la cual el total del efluente de la columna es depositado en una placa de cristal de KBr, se describió por Jinno y Fujimoto (12) para combinar la microcolumna HPLC con FTIR y la espectroscopía de laser Raman.

H. DETECTORES DE QUIMIOLUMINISCENCIA

La detección de quimioluminiscencia en cromatografía de líquidos ha recibido esfuerzos de investigación crecientes como resultado de la excelente sensibilidad y selectividad de ésta técnica.

El interés en la detección por quimioluminiscencia es ejemplificado por las tantas revistas dedicadas a tal objetivo.

Nieman (1,2) escribió dos revistas, una con 90 referencias, la otra con 156, describiendo algunos esquemas de detección de fases -solución en línea- para HPLC y análisis de inyección de flujo (AIF). Fujiwara y Kumamaru (3) reportaron 65 referencias relacionadas con la detección en CL de algunas técnicas de separación por membrana y FIA para nombrar unas cuantas. Una revista con 99 referencias fue descrita por Townshend (4) respecto a los alcances recientes para el monitoreo por CL en FIA y HPLC, incluyendo aplicaciones del luminol y peroxioxalato así como aplicaciones donde la luminiscencia resulta directamente del analito. Imai (5) ha resumido los tipos de reactivos, analitos y los límites de detección para CL en HPLC en una revista que contiene 133 referencias.

Algunos desarrollos en la instrumentación por CL fueron reportados.

Schereus et al (6) aplicaron la detección resuelta sobre tiempo con una lámpara de Xe y un fotomultiplicador en la entrada para detectar analitos del nivel del ácido 4-maleimidil salicílico que en reacción con TB (III) produce una gran luminiscencia con un tiempo de decadencia 0.1 ms. Chang y Taylor (7) desarrollaron un detector selectivo para azufre en HPLC utilizando columna capilar empacada que se basa sobre la descomposición de analitos que contienen azufre en una flama de hidrógeno/aire. Los analitos se descomponen en monóxido de azufre y reaccionan con el ozono. La optimización de la flama, la cual era dependiente de la fase móvil usada, proporciona un límite de detección de 4 pg de azufre usando agua/metanol 50/50 como fase móvil. Jalkian, Ratzlaff y Denton (8) demostraron la utilidad del mecanismo de acoplamiento-carga (CCD) para la detección por CL de Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} y H_2O_2 , en estado sólido bidimensional. El rango dinámico notable fue establecido por la aplicación simultánea de variables para medir la emisión transitoria de luz.

La optimización de 14 parámetros para la detección por peroxioxalato en CL de derivados de ácidos grasos se completó por Hanaoka (9) por la incorporación de resultados de otro trabajo publicado. La ejecución de un espectrofluorómetro modificado para la detección fue evaluada por Jones et al. (10) para desarrollar un método nuevo para las trazas de metales. Los metales separados por cromatografía de iones desplazan el cobalto de un reactivo postcolumna de Co-EDTA. El cobalto liberado se detecta por CL de luminol-peróxido. Los límites de detección se encuentran entre 2 y 100 g/L.

Se han reportado nuevos sistemas de reactivos para la detección por CL, así como nuevas fases sólidas. Aichinger et al. (11) usaron una columna de reacción corta empacada con bis 9,2,4,6-triclorofenil oxalato y una celda de flujo de cuarzo, conteniendo aminofluoranteno inactivado sobre perlas de vidrio. Tal sistema es aplicable para la detección de una variedad de compuestos de interés farmacéutico que exhiben absorbancia UV baja.

3.- PROBLEMAS COMUNES EN HPLC Y POSIBLE SOLUCION.

3.1 "Problema de Elución General de Snyder" (PEGS). (24)

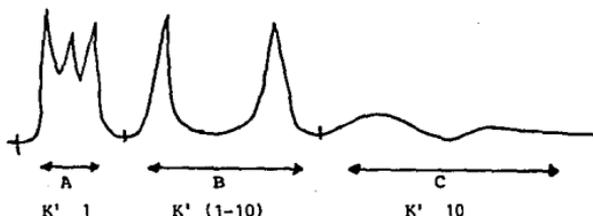


Fig. 3.1 PEGS (24)

No hace falta tener muchos componentes para que se presente un problema, 2 solutos lo pueden ocasionar; por ejemplo si el primero eluye rápido y K' tiene valores cercanos a la unidad y el segundo es fuertemente retenido y por lo tanto K' es mayor que 10.

En el PEGS se pueden identificar 3 regiones bien definidas de un cromatograma (A, B y C).

La región A tiene un valor de resolución (R_S) menor que el óptimo (1.5), y por lo tanto la identificación cualitativa como el análisis cuantitativo de un compuesto no se pueden hacer. La región B tiene un valor ideal de R_S (igual a 1.5 ó mayor), por lo que el análisis cualitativo como cuantitativo se pueden hacer.

La región C presenta valores de K' mayores de 10, por lo que el consumo de fase móvil y tiempo de análisis son considerables, incrementándose así el costo por análisis y disminuyendo la productividad.

De acuerdo a Snyder, bajo condiciones de elución con una sola polaridad, (elución isocrática), K' (el factor de capacidad o poder de retención de una columna) es óptimo si tiene valores en un rango de 1-10.

Para solucionar este problema con una sola bomba, habría que inyectar la misma muestra, 3 veces, bajo 3 diferentes condiciones de polaridad y tres diferentes

flujos; sin embargo, tal solución es más académica que práctica ya que la productividad -número de análisis por unidad de tiempo- es muy baja.

Una bomba con 4 disolventes, programables en tiempo como en orden de entrada a la columna -léase polaridad- como en velocidad de flujo, resuelve con alta productividad PEGS, de acuerdo con la siguiente filosofía : una inyección, 3 diferentes polaridades y 3 diferentes flujos. Al tiempo inicial, la región A es separable con una polaridad mínima (menor que para las dos siguientes regiones) y un flujo también bajo (en comparación con las regiones B y C) y que corresponde a la máxima eficiencia de operación de la columna.

Una vez separado A, se programa la entrada de una polaridad y flujo mayor que la usada en la región A, para poder separar a la región B. Como la polaridad es mayor ahora, habrá un cambio en el índice de refracción y la línea base se desplazará, por lo tanto hay que programar un autocero en el detector.

Una vez separado B, entra a la columna una polaridad y un flujo mayor que en los dos casos anteriores para separar la región C. Se debe programar también el auto cero sobre el detector para estabilizar la línea base a su posición original por razones ya mencionadas anteriormente.

Como la columna queda bajo condiciones de alta polaridad hay que regresar a la polaridad y velocidad de flujo iniciales, (también aquí el auto cero sobre el - detector tiene que programarse). Pasado algún tiempo la columna se estabiliza, lo cual garantiza que entre corrida y corrida los tiempos de retención y áreas de - pico, al igual que los tiempos de retención relativos sean constantes. Esta condición debe cumplirse para lograr un análisis cualitativo y cuantitativo adecuado.

La programación de un gradiente de polaridad en tiempo real partiendo de una mínima polaridad y llegando a una máxima, permite la elución de cada uno de los solutos de una muestra dada. Son tres los gradientes que proporcionan las bombas, a saber; linear cóncavo y convexo.

Es recomendable correr primero el linear para observar donde hace falta resolución; si R_g es < 1.5 al principio, es preciso correr un gradiente cóncavo -la polaridad se mantiene a un mínimo acoplada a un flujo que también sea bajo- y so lo en la última porción del gradiente este se acelera al igual que el flujo.

Si $R_g < 1.5$ al final del cromatograma, tiene que programarse un gradiente convexo, donde al principio se incrementa la polaridad y al final del gradiente se mantiene alta. (24).

3.2 Entre los problemas más comunes en HPLC y su posible solución se encuentran: (1)

Problema No. 1

No se registran picos o son muy pequeños.

Causa probable

1. Lámpara del detector apagada
2. El alambre de conexión entre el detector y el registrador/integrador está roto o flojo.
3. No hay flujo de la fase móvil.
4. No hay muestra o la muestra está degradada.

Corrección/comentarios

1. Conectar lámpara.
2. Verificar conexiones y cables.
3. Ver problema 2
4. Si usa automuestreador asegúrese que los viales tienen suficiente líquido.

Problema No. 2

No hay flujo.

Causa probable

1. Bomba desconectada
2. Flujo interrumpido/obstruido.
3. Fuga
4. Aire atrapado en la cabeza de la bomba.

Corrección /comentarios

1. Arranque la bomba
2. Verifique nivel de la fase móvil. Verifique flujo en cada componente del sistema. Examine el loop para determinar si está libre de obstrucción o tapón de aire. Verifique que el filtro de fase móvil este limpio. Asegurese que los componentes de la fase móvil sean miscibles y que esté desgasificada.
3. Verifique que no hay conexiones flojas en el sistema. Verifique que no haya fugas, incrustaciones o ruidos en la bomba. Si es necesario cambie sellos.
4. Desconecte tubo a la entrada de pre-columna o columna analítica. Verifique el flujo. Purgue la bomba a flujo grande (10ml/mint) y cebo el sistema si es necesario. Si el sistema tiene válvula "check", aflójela para permitir salida del aire. Si el problema persiste, lave el sistema con metanol 100%.

Problema No.3

No hay presión o es menor a la usual .

Causa probable

1. Fuga
2. Interrupción/obstrucción en el flujo de fase móvil.
3. Aire atrapado en cabeza de la bomba (revelado por fluctuaciones en presión).
4. Fuga a la entrada de la columna y sus conexiones.
5. Aire atrapado en otra parte del sistema.
6. Sello de la bomba gastado causa fugas en cabeza de la bomba.

Conexión/comentarios

1. Verifique que el sistema no tiene fugas. Verifique que la bomba no tiene fugas, incrustaciones o ruidos. Cambie los sellos si es necesario.
2. Verificar nivel de fase móvil. Verificar flujo en componentes del sistema. Examinar "loop" para obstrucciones o sello de aire. Limpiar filtro de fase móvil. Asegurar que componentes de fase móvil son miscibles y que está perfectamente desgasificada.
3. Desconecte tubo a la entrada de la precolumna o a la columna analítica. Verifique flujo. Purgar con flujo grande (10ml/mint) y cebar sistema si es necesario. Si existe válvula "check", aflojar para dejar salir el aire.
4. Reconectar columna y bombear solvente a 1-2 ml/mint si la presión es aún -baja, verifique si hay fuga en la conexión de entrada o salida de columna.
5. Deconectar columna analítica y pre-columna. Reconectar. Si el problema persiste, pasar metanol 100%.
6. Reemplazar sello.

Problema No. 4

Presión mayor que lo usual.

Causa probable

1. Problema en la bomba, inyector o tubería.
2. Pre-columna o columna analítica obstruida.

Conexión/comentarios

1. Desconectar pre-columna y columna analítica y bombear a 2-5 ml/mint. Si la presión es mínima ver causa 2. Si no, aislar el problema sistemáticamente eliminando componentes del sistema, empezando con el detector y acabando con la bomba.

2. Quitar pre-columna y verificar presión. Reemplazar por nueva si es necesario. Si la columna analítica está obstruida, lavar en reversa. Si el problema persiste, la columna puede estar tapada con contaminantes fuertemente retenidos. Utilizar procedimiento de restauración adecuado (ver tabla al final de este trabajo). Si todavía hay problema, cambiar frit de entrada o reemplazar columna.

Problema No. 5

Tiempos de retención variables.

Causa probable

1. Fugas.
2. Cambios en la composición de la fase móvil (cambios pequeños pueden producir cambios grandes en el tiempo de retención).
3. Aire atrapado en bomba (los tiempos de retención aumentan y disminuyen al azar).
4. Variación en la temperatura de la columna (especialmente evidente en sistemas de intercambio iónico).
5. Sobrecarga de la columna (los tiempos de retención disminuyen en la medida que la masa de soluto inyectado excede la capacidad de la columna).
6. Disolvente de la muestra es incompatible con la fase móvil.
7. Problema de la columna. (No es causa común de retención errática. A medida que la columna envejece, el tiempo de retención gradualmente decrece).

Correcciones/comentarios

1. Verifique sistema para determinar si existen conexiones flojas. Verificar si existen fugas, incrustaciones o ruidos en la bomba. Cambiar sellos si es necesario.
2. Verifique el sistema de nivel constante de fase móvil. Si la fase móvil es mezclada mecánicamente, mezcle manualmente y abastezca de una sola botella.
3. Purgar el aire de la cabeza de la bomba y de las válvulas check. Cambiar sellos de las bombas si es necesario. asegurar que la fase móvil está desgasificada.
4. Utilizar horno adecuado o aislar la columna (más altas temperaturas aumentan la eficiencia de la columna. Es conveniente calentar el eluyente antes de introducir en la columna).
5. Inyecte menor volumen (10 microlitros vs 100 microlitros o disoluciones de

1:10 y 1:100 de la muestra).

- Ajuste su solvente. Tratar de inyectar muestra disuelta en fase móvil.
- Sustituir por una columna nueva idéntica para confirmar si la columna es la causa del problema. Descartar la columna vieja si el procedimiento de restauración falla.

Problema No. 6

Pérdida de resolución.

Causa probable

- Fase móvil contaminada o deteriorada (Esto causa cambios en los tiempos de retención).
- Pre-columna o columna analítica tapada.

Corrección/comentarios

- Verifique el sistema de mantenimiento de nivel de la fase móvil o cambiéla.
- Quite la pre-columna y repita el análisis. Cambie pre-columna si es necesario. Si la columna analítica está obstruida, lávela en reversa. Si el problema persiste, la columna puede estar tapada con contaminantes fuertemente adsorbidos.

Use el procedimiento de restauración adecuado (ver tabla al final de este trabajo). Si el problema persiste, cambie el "frit" de entrada o reemplace la columna.

Problema No. 7

Picos partidos (en el ápice del pico hay sub-picos).

Causa probable

- Contaminación a la entrada de la precolumna o la columna analítica.
- El disolvente de la muestra es incompatible con la fase móvil.

Corrección/comentarios

- Quite la pre-columna y repita el análisis. Reemplázela si es necesario. Si la columna analítica esta obstruida, lávela en reversa. Si el problema persiste utilice el procedimiento de restauración adecuado, cambie "frit" o columna.
- Ajuste el solvente. Siempre que sea posible, inyectar la muestra en la fase móvil.

Problema No. 8

Los picos de las inyecciones iniciales y finales se colean.

Causa probable

1. Interferencia en la muestra.
2. Columna incorrecta.
3. pH de la fase móvil equivocado.

Corrección/comentarios

1. Verificar el desempeño de la columna con estándares.
2. Tratar con otro tipo de columna (P. ej., desactivada para compuestos básicos).
3. Ajuste el pH. Para compuestos básicos un pH menor usualmente dá picos más simétricos.
4. Agregar reactivo de par-iónico o un modificador básico volátil.

Problema No. 9

Los picos eran simétricos ahora colean.

Causa probable

1. Interferencia en la muestra.
2. Fase móvil contaminada o deteriorada.
3. Precolumna o columna analítica contaminada o gastadas.

Corrección/comentarios

1. Verificar desempeño de la columna con estándares.
2. Verifique la formulación de su fase móvil; prepare nueva. Si su equipo tiene sistema de nivel automático, verifíquelo.
3. Quite pre-columna, repita análisis. Cambiela si es necesario. Si la analítica es el problema proceda a restaurar. Cambie por columna nueva.

Problema No. 10

Picos cabecean (contrario a colean) (la línea base crece antes del pico).

Causa probable

1. Interferencia en la muestra.
2. Otro componente puede ser tapado por el hombro o gradual crecimiento de la línea base.
3. Columna sobrecargada.
4. El solvente de la muestra es incompatible con la fase móvil.

Remedios/comentarios

1. Verifique columna con estándares.
2. Aumente eficiencia o cambie la selectividad del mismo para mejorar la resolución. Pruebe otro tipo de columna (P. ej. cambie de una C-18 no polar a una -CN polar).
3. Inyecte menor volumen (10 μ l vs. 100 μ l) o diluya la muestra (1:10-1:100).
4. Ajuste solvente. Cuando sea posible inyecte muestra en fase móvil. Lave - columna polar químicamente unida, con Acetato de etilo HPLC (2.5ml/min) y luego con solvente de polaridad intermedia antes de análisis.

Problema No. 11

Picos redondeados.

Causa probable

1. Detector operando fuera de su rango lineal.
2. La ganancia del detector está muy baja.
3. Columna sobrecargada.
4. Interacción entre la muestra y la columna.
5. Las constantes de tiempos de detector y/o registrador están demasiado altas.

Remedios/comentarios

1. Reducir volumen o concentración de la muestra.
2. Ajuste ganancia.
3. Inyectar menor volumen (10 μ l vs 100 μ l) diluir muestra (1:10-1:100).
4. Cambie fuerza del "buffer", pH o composición de la fase móvil. Si es necesario aumente la temperatura o cambie la columna por otro tipo. El análisis de la estructura del soluto permite predecir la interacción.
5. Reduzca los ajustes a los menores valores en donde no se observa mejoría.

Problema No. 12

Línea base empieza a subir lentamente.

Causa probable

1. Fluctuación de temperatura de la columna. (Aún cambios pequeños causan caídas y subidas cíclicas de la línea base).
2. Fase móvil no homogénea (El ascenso de la línea base es debido a mayor absorbanza más que a cambio cíclicos de temperatura).
3. Contaminante o burbuja de aire en la celda del detector.

4. La tubería de salida del detector está tapada. (La alta presión agrieta la celda y da ruido en la línea base).
5. Problema de mezclado de la fase móvil o cambio en el flujo.
6. El tiempo para equilibrar es largo; especialmente cuando se cambia fase móvil.
7. Fase móvil contaminada o preparada de materiales de baja calidad.
8. Materiales de fuerte adsorción de la muestra, eluyen como picos muy anchos y a veces parecen como línea base creciente. (K' grande).
9. Fase móvil reciclada pero no se ajusto el detector.
10. El detector (uv) no está en el máximo de absorbancia, sino en la pendiente de la curva.

Remedios/comentarios

1. Controle la temperatura de la columna y de la fase móvil; utilice intercambiador de calor antes del detector.
2. Utilizar solventes HPLC, sales de alta pureza y aditivos puros. Desgasificar fase móvil antes de usar.
3. Lave celda con metanol u otro solvente polar. Si es necesario lave la celda con Ac. Nítrico 1N. (Nunca con HCL).
4. Desconectar o reemplazar la línea. Refiérase al manual del detector para reemplazar la ventana de la celda.
5. Corrija la composición/flujo. Para evitar problemas, rutinariamente verifique composición y flujo.
6. Lave la columna con solvente de polaridad intermedia; pase 10-20 volúmenes de la columna con fase móvil nueva antes del análisis.
7. Verifique la composición aspecto y edad de la fase móvil.
8. Use pre-columna o lave su columna analítica con solvente polar entre inyecciones o periódicamente durante el análisis.
9. Reajuste línea base. Utilice nueva fase móvil cuando el rango dinámico del detector se excede.
10. Cambie la longitud de onda al máximo de absorbancia.

Problema No. 13

Ruido de frecuencia regular en línea base.

Causa probable

1. Aire en la fase móvil, celda o bomba.
2. Fuga.
3. Mezclado incompleto de la fase móvil.

4. Efecto de temperatura (columna caliente detector sin calor).
5. Otro equipo electrónico en la misma línea.
6. Pulsaciones de la bomba.

Remedio/comentarios

1. Desgasificar fase móvil. Purgue el sistema y pase fase móvil.
2. Asegúrese que no haya conexiones flojas. Verifique fugas en bomba, cristalización o ruidos. Cambie sellos si es necesario.
3. Mezcle la fase móvil a mano o utilice solventes de menor viscosidad.
4. Reduzca la diferencial de temperatura o coloque intercambiador.
5. Aisle cromatógrafo, detector o registrador.
6. Incorpore un absorbedor de pulsos a su equipo.

Problema No. 14

Ruido de frecuencia irregular en línea base.

Causa probable

1. Fuga.
2. Fase móvil contaminada o deteriorada.
3. Electrónica del detector o registrador.
4. Aire atrapado en el sistema.
5. Burbujas en detector.
6. Celda contaminada.
7. Lámpara del detector débil.
8. Fuga de material de empaque de la columna.

Remedio/comentarios

1. Apriete conexiones. Verifique fugas en bomba, cristalización o ruidos. Cambie sellos si es necesario.
2. Verifique la composición, aspecto y edad de la fase móvil.
3. Referirse al manual de instrucciones para corregir el problema electrónico.
4. Purgue el detector e instale control de retropresión después del detector.
5. Lave celda.
6. Cambie lámpara.
7. Purgue y lave el sistema con solvente polar.
8. Cambie columna.

Problema No. 15

Picos anchos.

Causa probable

1. Cambios de la composición de la fase móvil.
2. Flujo muy bajo.
3. Fuga (especialmente entre columna y detector).
4. Ajustes en el detector incorrectos.
5. Efectos extracolumna:
 - * Columna sobrecargada.
 - * Tiempo de respuesta del detector o volumen de celda muy grandes.
 - * El tubo entre columna y detector es muy largo o su diámetro muy grande.
 El tiempo de respuesta del registrador es muy grande.
6. Concentración de buffer muy baja.
7. Pre-columna contaminada o gastada.
8. Columna analítica contaminada o gastada.
9. Hueco a la entrada de la columna.
10. El pico puede representar dos o más compuestos pobremente resueltos.
11. Temperatura de la columna muy baja.

Remedio/comentarios

1. Prepare fase móvil nueva.
2. Ajuste flujo.
3. Apriete conexiones. Verifique fugas en la bomba, cristalización o ruidos. cambie sellos si es necesario.
4. Corregir ajustes.
5. Inyecte menor volumen o diluya. Reduzca tiempo de respuesta o use celda - más chica.
Use la menor longitud posible de tubo, de 0.007 a 0.010" de diámetro interior. Reduzca el tiempo.
6. Aumente concentración.
7. Cambiar precolumna.
8. Reemplace por una columna nueva. Si la nueva da picos simétricos, restaure la nueva y vuelva a analizar.
9. Desarme con cuidado la entrada de la columna, llene el hueco con el material.
10. Cambie tipo de columna para mejorar separación.
11. Aumenta la temperatura sin exceder 75°.

Problema No. 16

Cambio en la altura de los picos. (Uno ó más).

Causa probable

1. Uno ó más componentes de la muestra se han deteriorado o la actividad de la columna ha cambiado.
2. Fuga, especialmente entre inyector y entrada de la columna (esto también - cambia los tiempos de retención).
3. Volumen de muestra inconsistente.
4. Los ajustes del detector o registrador están cambiados.
5. Lámpara del detector débil.
6. Contaminación en celda.

Remedios/comentarios

1. Utilice muestra fresca o estándares para confirmar que la muestra es la - causa.
Si alguno o todos los picos todavía son más pequeños de lo esperado, reemplace la columna. Aún así, trate de restaurar la columna vieja y si esto no funciona, desechar.
2. Verifique el sistema por fugas, conexiones flojas, cristalización en cabeza de la bomba, ruidos. Cambie sellos si es necesario.
3. Asegúrese que el volumen inyectado es consistente, para "loops" de volumen fijo, use 2 a 3 inyecciones del volumen del "loop" para asegurar que se ha llenado. Asegúrese que los viales del muestreador automático contienen suficiente muestra.
4. Verifique ajustes.
5. Cambie lámpara.
6. Lave celda.

Problema No. 17

Cambio en selectividad.

Causa probable

1. Aumente o disminuya la fuerza iónica del solvente, su pH o concentración de aditivos.
2. Se ha cambiado la columna. La nueva tiene diferente selectividad.
3. La muestra fue inyectada en el solvente incorrecto o con mucho solvente po lar. (100-200 microlitros).

4. Cambio de temperatura de la columna.
5. Columna gastada.

Remedio/comentarios

1. Verifique composición de la fase móvil, aspecto y edad.
2. Confirmar la identidad del empaque de la columna. Para análisis reproducibles use el mismo tipo de columna.
Columnas del mismo tipo, de proveedores diferentes, deberían tener la misma selectividad, pero algunas tienen propiedades únicas.
3. Ajuste solvente, trates de inyectar muestra en fase móvil.
4. Ajuste temperatura.
5. Cámbiela.

Problema No. 18

Pico negativo.

Causa probable

1. terminales del registro invertidas.
2. Índice de refracción del soluto menor que el de la fase móvil.
3. El solvente de la muestra y de la fase móvil difieren mucho en composición.
4. La fase móvil absorbe más que los componentes de la muestra (uv).

Remedio/comentarios

1. Verifique polaridad.
2. Use fase móvil con índice de refracción menor o cambie polaridad del registrador.
3. Ajuste ó cambie el solvente de la muestra. Disuelva su muestra cuando sea posible en fase móvil.
4. Cambiar la longitud de onda o usar fase móvil que no absorba en la región de prueba.

Problema No. 19

Pico fantasma.

Causa probable

1. Contaminación en el inyector o columna.

Remedio/comentarios

1. Lave su inyector entre cada análisis (excelente práctica). Si es necesario pase por la columna solvente muy polar para eluir sustancias fuertemente retenidas.

Procedimientos de restauración de columnas HPLC. (1).

Estos procedimientos sirven para rejuvenecer una columna HPLC cuya efectividad y desempeño se ha deteriorado a través del tiempo ó por mala operación.

Desconecte e invierta la columna. Conéctela a la bomba. No la conecte al detector. Siga el procedimiento adecuado indicado en esta tabla, utilizando un flujo - que produzca una contrapresión de 1500 a 4000 Lb/in². La mayoría de las columnas contienen un cromatograma de prueba que se acompaña en el estuche de la misma.

La eficiencia, simetría y capacidad deberán estar dentro del 10-15% de los - valores de la hoja de control. Si no es así, reempacar la entrada de la columna cambiar frit o reemplazar la columna.

1. Columna de sílica sin modificar

- * lave con 50 ml hexano.
- * Lave con 50 ml de cloruro de metileno.
- * Lave con 50 ml de isopropanol.
- * Lave con 50ml de metanol.
- * Lave con 25 ml de cloruro de metileno.
- * Lave con 25 ml de fase móvil.
- * Evalúe su columna.

2. Columna no polar (C₄, C₈, C₁₈, Fenil).**a) Muestras solubles en agua**

- * Lave con 50 ml de agua a 40-50°C.
- * Lave con 50 ml metanol .
- * Lave con 50 ml de acetonitrilo.
- * Lave con 50 ml de tetrahidrofurano.
- * Lave con 25 ml de metanol.
- * Lave con 25 ml de fase móvil.
- * Evalúe su columna.

b) Muestras insolubles en agua

- * Lave con 50 ml de isopropanol.
- * Lave con 50 ml tetrahidrofurano.
- * Lave con 50 ml de cloruro de metileno
- * Lave con 50 ml de hexano.

- * Lave con 25 ml de isopropanol.
- * Lave con 25 ml de fase móvil.
- * Evalúe su columna.

3. Columna Polar (Amino, Ciano, Diol)

Para columnas usadas en fase reversa con solvente orgánico + buffer acuoso, - utilizar método 1.

Para columnas con fase móvil no acuosa, usar el procedimiento siguiente:

- * Lave con 50 ml de cloroformo.
- * Lave con 50 ml de cloruro de metileno.
- * Lave con 50 ml de isopropanol.
- * Lave con 50 ml de cloruro de metileno.
- * Lave con 25 ml de fase móvil.
- * Evalúe su columna.

4. Columnas para Proteínas/Biopolímeros

(C₄, C₈, C₁₈, Difenil)

- * Lave con 100 ml de agua.
- * Lave con 50 ml de Ac. Trifluoro acético 0.1%.
- * Lave con 50 ml de isopropanol.
- * Lave con 50 ml de acetonitrilo.
- * Lave con 50 ml de agua.
- * Lave con 50 ml de fase móvil.
- * Evalúe su columna.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- 1.- Cattori, Conzelman Pedro; "Problemas, causas y remedios en HPLC" Pharma News vol. 2 N° 1 pp. 22-24 y N° 2 pp. 22-29, (1991).
- 2.- Edward, I; "Cromatografía, principios y técnicas", El Manual Moderno, Cap.1 México, (1975).
- 3.- Engelhardt, H; "High Performance Liquid Chromatography", Scinger Verlag; - Cap. 3 y 5, Bérlin (1979).
- 4.- Freeman, Bauman; "Basic Liquid Chromatography", Varian Aerograph; Walnut - Creek, California, (1978).
- 5.- Gerónimo, Bello; "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Pharma News Vol. 3 N°1, pp. 19-21, (1991).
- 6.- Garrido, Fernin; "Sugerencias en CLAR", Pharma News, Vol. 3 N°2, pp. 18 (1991).
- 7.- Harold, Mc. Nair y Benjamin Esquivel H; "Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Edit. Eva V. Chesneau, Cap. 1 y 2, Chile (1980).
- 8.- Harris, C Daniel; "Análisis Químico Cuantitativo", Iberoamericana, Cap. 23, México (1992).
- 9.- J.J, Kirkland; "Modern Practices in Liquid Chromatography", Whiley Interscience Pub, New York (1970).
- 10.- Johnson, E.L and R, Stevenson; "Basic Liquid Chromatography", Varian Aero - graph, Walnut Greek, California (1978).
- 11.- Jurado Baizaval, Jose Luis; "Colección de Química Analítica", UNAM, Cap. 1 México, (1991).
- 12.- Knox, H. L., et. al; "High Performance Liquid Chromatography", University - Press; pp. 130-35, London, (1979).
- 13.- Loheac, J, J. N. Done; "Applications of High Speed Liquid Chromatography", John Wiley and sons; Cap. 5, London (1974).
- 14.- Merck; "Cromatografía en la Química Farmacéutica", Merck; pp. 9-13, R. F Alemania (1986).
- 15.- Parris, N.A; "Instrumental Liquid Chromatography", Elsevier Scientific; - pp. 32-34, Amsterdan (1975).
- 16.- Peckson, L.R y Shields, L.L; "Métodos modernos de análisis químicos", 1a. ed. Limusa, pp. 61 y 62, México (1983).
- 17.- Perkin Elmer; Manual "Introducción a la CLAR", UNAM, México, (1989).
- 18.- Pietrzyk, J.D y Frank, W.C.; "Química Analítica", 2a. ed, Interamericana, Cap. 22 y 23; México (1983).
- 19.- Snyder, L.R y Kirkland, J.J; "Introduction to Modern Liquid Chromatography" 2a. ed, Wiley, Cap. 3,4,5 y 6; Nueva York (1979).
- 20.- Snyder, L.R.; "Principles of adsorption Chromatography", Marcel Dekker Inc Cap. 1 y 3; Nueva York (1968).
- 21.- Watters, Curso.; "Introducción a la CLAR", México (1991).
- 22.- William S. Hancock; "HPLC. Analysis of Biological Compounds. A. Laboratory Guide", Marcel Dekker Inc, pp. 22-33; New York (1987).
- 23.- Analítica Chemical, N° 61, pp. 1128 (1989).
- 24.- Gerónimo, Bello; Curso "Curso Basico sobre HPLC" del 9 al 13 de Marzo de 1992.
- 25.- Snyder, L. R; "Solvent selection for separation processes", memorias del - curso anterior, Cap. 3,4 y 5 (1992).

BIBLIOGRAFIA SOBRE COLUMNAS

- 1.- Schomburg, G. *Chromatographia* 1990, 30, 500-8.
- 2.- Hirata, Y. J. *Microcolumn Sep.* 1990, 2, 214-21.
- 3.- Chizhkov, V. P.; Varivonchik, E. A.; Goryachko, Y. V.; Zabokritskii, M. P.; Landau, V. V. *Zh. Anal. Khim.* 1990, 45, 1798-806.
- 4.- Andreev, V. P.; Khidekel, M. I. *Zh. Fiz. Khim.* 1991, 65, 2614-19.
- 5.- Ying, P. T.; Dorsey, J. G. *Talanta* 1991, 38, 237-43.
- 6.- Snyder, L. R.; Cox, G. B. *J. Chromatogr.* 1989, 483, 85-94.
- 7.- Novak, I.; Buszewski, B.; Garal, J.; Berek, D. *Chem Pap.* 1990, 44, 31-43.
- 8.- Mallett, D. N.; Law, B. J. *Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 9, 53-57.
- 9.- Alhedal, A.; Martire, D. E.; Scott, R. P. W. *Analyst* 1989, 114, 869-75.
- 10.- Magnico, P.; Martin, M. J. *Chromatogr.* 1990, 517, 31-49.
- 11.- Wang, T.; Hartwick, R. A.; Miller, N. T.; Shelly, D. C. *J. Chromatogr.* - 1990, 523, 22-34.
- 12.- Shalon, Y. *PCT Int. Appl. WO 9114490 A1*, 3 Oct 1991, 38 pp.
- 13.- Zogg, G. C.; Nyiredy, S.; Sticher, O. *J. Liq. Chromatogr.* 1989, 12, - 2031-48.
- 14.- Liao, J. L.; Zhang, R.; Hjerten, S. *J. Chromatogr.* 1991, 586, 21-6.
- 15.- Van Berkel-Geldof, O.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr.* 1990, 499, 345-59.
- 16.- Eguchi, S.; Kloosterboer, J. G.; Zegers, C. P. G.; Schoenmakers, P. J.; - Tock, P. P. H.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr.* 1990, 516, 301-12.
- 17.- Eguchi, S.; Kloosterboer, J. G.; Dirk, J. *Eur. Pat. Appl. EP 414324 A1*, 27 Feb. 1991, 10 pp.
- 18.- Ito, M.; Satake, H.; Takata, Y. *Ger. Offen. DE 3939854 A1*, 13 Jun 1990, 8 pp.
- 19.- America, W. G. *Eur. Pat. Appl. EP 328146 A2*, 16 Aug 1989, 7 pp.
- 20.- Cox, G. B. *LC-GC* 1990, 8, 690, 692-4.
- 21.- Ge, H.; Wallace, G. G. *J. Liq. Chromatogr.* 1991, 14, 1615-29.
- 22.- Nawrocki, J. *Chromatographia* 1991, 31, 193-205.
- 23.- Tanaka, N.; Kimata, K.; Araki, T.; Tsuchiya, H.; Hashizume, K. *J. Chromatogr.* 1991, 544, 317-44.
- 24.- Takeuchi, T.; Hu, W.; Haraguchi, H.; Ishil, D. *J. Chromatogr.* 1990, 517 257-62.
- 25.- Jinno, K. *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 27, 729-34.
- 26.- Jeng, C. Y.; Langer, S. H. *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 27, 549-52.
- 27.- Law, B.; Chan, P. F. *J. Chromatogr.* 1989, 467, 267-71.
- 28.- Pfannkoch, E. A.; Switzer, B. S.; Kopaciewicz, W. *J. Chromatogr.* 1990, - 503, 385-401.
- 29.- Verzele, M.; Dewaele, C.; De Weerd, M.; Abbott, S. *J. High Resolut. - Chromatogr.* 1989, 12 164-8.
- 30.- Dolan, J. W. *LC-GC* 1989, 7, 556, 558, 560.
- 31.- Dolan, J. W. *LC-GC* 1990, 8, 358, 360.

BIBLIOGRAFIA SOBRE FASE MOVIL

- 1.- Shirato, K.; Chatfield, C. G.; Nevius, T. A. *Am. Lab.* 1991, 23, 36N-36T.
- 2.- Stubba, W. *Labor Praxis* 1989, 13, 758-60, 762.
- 3.- Eberthard, A.; Stranick, S. J.; McNeil, J. *LC-GC* 1991, 9, 132-134.
- 4.- Dasgupta, P. K.; Strong, D. L.; Stillan, J. R.; Friedman, K. A. *Eur. Pat. Appl. EP 442224 A2*, 21 Aug 1991, 20 pp.

BIBLIOGRAFIA SOBRE BOMBAS

- 1.- Miller, L. A.; Shafer, R. U.S. 4905161 A, 27 Feb 1990, 9 pp.
- 2.- Sheehan, T.; Schachterle, S. LC-GC, 1990, 8, 726, 728-31.
- 3.- Ledtje, M.; Long, D. Jr. U.S. 4862907 A, 5 Sep 1989, 7 pp.
- 4.- Risler, W.; Naqel, U. Ger. Offen. DE 3837325 A1, 10 May 1990, 8 pp.
- 5.- Bruin, G. J. M.; Tock, P. P. H.; Kraak, J. C.; Poppe, H. J. Chromatogr 1990, 517, 557-72.
- 6.- Pfeiffer, W. D.; Yeung, E. S. Anal. Chem. 1990, 62, 2178-82.
- 7.- Obst, D. Ger. (East) DD 278838 A1, 16 May 1990, 4pp.
- 8.- James, P. A. Eur. Pat. Appl. EP 341784 A2, 15 Nov 1989, 10 pp.
- 9.- Le Blanc, J. C. Rev. Sci. Instrum. 1991, 62, 1642-6.
- 10.- Trisciani, A.; Andreolini, F. J. High Resolut. Chromatogr. 1990, 13, - 270-4.
- 11.- Trisciani, A.; Andreolini, F. Eur. Pat. Appl. EP 377202 A2, 11 Jul 1990, 7 pp.
- 12.- Hue, X.; Siouffi, A. M. Spectra 2000 1990, Suppl. 15, 21-3.
- 13.- Banks, J. F., Jr.; Novotny, M. V. J. Microcolumn Sep. 1990, 2, 84-87.
- 14.- Munk, M. N. U.S. 4942018 A, 17 Jul 1990, 24 pp.
- 15.- Berry, V.; Van Rossum, P.; Pretorius, V. J. Liq. Chromatogr. 1990, 13, 391-407.
- 16.- Bauer, H. Chromatographia 1989, 28, 289-92.

BIBLIOGRAFIA SOBRE INYECTORES

- 1.- Clamsens, H. A.; Murcinova, A.; Cramers, C. A.; Mussche, P.; Van Tiburg, C. C. E. J. Microcolumn Sep 1990, 2, 132-7.
- 2.- Mars, C.; Smit, H. C. Anal. Chim. Acta. 1990, 228, 193-208.
- 3.- Engelsma, M.; Louwerse, D. J.; Boelens, H. F. M.; Kok, W. T.; Smit, H. C. Anal. Chim. Acta. 1990, 228, 209-27.
- 4.- Evans, C. E.; McGuffin, V. L. Anal. Chem. 1991, 63, 1393-402.
- 5.- Nickerson, M. A.; Poole, J. S.; Frank, L. G. R. Eur. Pat. Appl. EP 384969 A2, 5 Sep 1990, 8 pp.
- 6.- Debets, A. J. J.; Hupe, K. P.; Brinkman, U. A. T.; Kok, W. T. Chromatographia 1990, 29, 217-22.
- 7.- Miller, L.; Bush, H.; Derrico, E. M. J. Chromatogr. 1989, 484, 259-65.
- 8.- Spourakes, G. E.; Koziol, S. Eur. Pat. Appl EP 421463 A2, 10 April 1991, 9 pp.
- 9.- Halvax, J. J.; Whese, G.; Van Bennekom, W. P.; Bult, A. Anal. Chim. Acta. 1990, 239, 171-9.
- 10.- Del Mar, P.; Hemberger, B. J. U.S. 5037553 A, 6 Aug 1991, 7 pp.
- 11.- Haqinaka, J.; Wakal, J. J. Chromatogr. 1990, 502, 317-24.
- 12.- Nohl, A. Eur. Pat. Appl. EP 385026 A2, 5 Sep 1990, 7 pp.
- 13.- Perkins, R.; Nohl, A.; Pohlt, A. LC-GC 1990, 8, 238, 240-1.
- 14.- Vogel, W. Labor Praxis 1990, 14, 936, 938, 940, 942-4.
- 15.- Tuinstra, L. G. M. T.; Klenhuis, P. G. M.; Traaq, W. A.; Aerts, M. M. L.; Beek, W. M. L. J. J. High Resolut. Chromatogr. 1989, 12, 709-13.
- 16.- Aerst, M. M. L.; Beek, W. M. J.; Brinkman, U. A. T. J. Chromatogr. 1990, 500, 453-68.
- 17.- Aqasoester, T.; Rasmussen, K. E. J. Chromatogr. 1991, 570, 99-107.
- 18.- Nilve, G.; Audunsson, G.; Joensson, J. A. J. Chromatogr. 1989, 471, - 151-60.

- 19.- Timoney, P.; Newton, S.; Beals, P. *Adv. Lab. Autom. Rob.* 1989, 5, - 249-65.
- 20.- Simonson, L. A.; Lightbody, B. *Lab. Rob. Autom.* 1990, 2, 221-8.
- 21.- Picot, V. S.; Doyle, E.; Pearce, J. C. *J. Chromatoqr.* 1990, 527, - 454-60.
- 22.- Simon, P. K.; Vecera, Z. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1237-42.
- 23.- Felder, R. A. *Drugs. Pharm. Sci.* 1991, 47, 185-210.
- 24.- Russell, J.; Boyd, T. *Adv. Lab. Autom. Rob.* 1991, 7, 451-64.
- 25.- Lloyd, T. L.; Lang, J. R. *Adv. Lab. Autom. Rob.* 1990, 7, 73-87.
- 26.- Pieta, L. *Adv. Lab. Autom. Rob.* 1991, 7, 303-13.
- 27.- Kingston, H.; Ruegg, F.; DeVoe, J.; Clements, C. *Adv. Lab. Autom. Rob.* 1989, 5, 27-35.
- 28.- Franc, J. E.; Duncan, G. F.; Farmer, R. H.; Pittman, K. A. *J. Chromatogr.* 1991, 570, 129-38.
- 29.- Brunner, L. A.; Juders, R. C. *J. Chromatoqr. Sci.* 1991, 29, 287-91.
- 30.- Chang, M.; Kosobud, L.; Schoenhard, G. *Adv. Lab. Autom. Rob.* 1989, 5, 433-40.
- 31.- Hartshorn, L. A.; Zepchi, M. T.; Bueno, C. S. *Adv. Lab. Autom. Rob.* - 1989, 5, 235-47.
- 32.- Kanczewski, E. G.; Doering, R.; Skrilec, M.; Daly, R. E. *Lab. Rob. - Autom.* 1990, 2, 229-33.
- 33.- Thoma, R. S.; Crimmins, D.L. *J. Chromatoqr.* 1991, 537, 153-65.

BIBLIOGRAFIA SOBRE DETECTORES

Detectores con desarrollo básico.

- 1.- Yeung, E. S. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)* 1991, 38, 307-12.
- 2.- Berthod, A. *Spectrochim. Acta. Rev.* 1990, 13, 11-25.
- 3.- Belen'kii, B. G. *Zh. Anal. Khim.* 1990, 45, 643-64; *Chem. Abstr.* 1990, 113, 34157y.
- 4.- Dasgupta, P. K. *J. Chromatoqr. Sci.* 1989, 27, 422-48.
- 5.- Rocklin, P. K. *J. Chromatoqr. Sci.* 1989, 27, 422-48.
- 6.- Synovec, R. E. *AIP Conf. Proc.* 1989, 191, 716-21.

A. Detectores de Absorbancia.

- 1.- Huber, L.; Fiedler, H. P. *Drugs. Pharm. Sci.* 1991, 47, 123-46.
- 2.- Jones, K. P. *Trends Anal. Chem.* 1990, 9, 195-9.
- 3.- Gonnard, M. F.; Sioffi, A. M. *J. Planar Chromatoqr. Mod. TLC* 1990, - 3, 206-9.
- 4.- Sinovec, R. E.; Renn, C. N.; Moore, L. K. *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* 1990, 1172, 49-59.
- 5.- Renn, C. N.; Synovec, R. E. *Anal. Chem.* 1991, 63, 568-74.
- 6.- Sulya, A. W.; Moore, L. K.; Synovec, R. E. *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* 1991, 1434, 147-58.
- 7.- Bruin, G. J. M.; Stegeman, G.; Van Asten, A. C.; Xu, X.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatoqr.* 1991, 559, 163-81.
- 8.- Chervet, J. P.; Ursem, M.; Salzmann, J. P.; Vanncoort, R. W. *J. High. - Resolut. Chromatoqr.* 1989, 12, 278-81.
- 9.- Esquivel, H.; Benjamin, J. *U.S. 4886965 A*, 12 Dec 1989, 4 pp.

- 10.- Binder, S. R.; Adams, A. K.; Reqalla, M.; Essien, H.; Rosenblum, R. *J. Chromatogr.* 1991, 550, 449-59.
- 11.- Bogusz, M.; Wu, M. *J. Anal. Toxicol.* 1991, 15, 188-97.
- 12.- Chan, H. K.; Carr, G. P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990, 8, 271-7.
- 13.- Blaffert, T. *ger. Offen. DE 3827066 A1*, 15 Feb 1990, 7 pp.
- 14.- Wolf, C.; Schmid, R. W. *J. Liq. Chromatogr.* 1990, 13, 2207-16.
- 15.- Leon-Gonzalez, M. E.; Townshend, A. *J. Chromatogr.* 1991, 539, 47-54.
- 16.- Baba, Y.; Tshako, M.; Yoza, N. *J. Chromatogr.* 1990, 507, 103-11.
- 17.- Schaufelberger, D. E. *J. Chromatogr.* 1989, 12, 2263-80.
- 18.- Oka, H.; Ito, Y. *J. Chromatogr.* 1989, 475, 229-35.

B. Detectores de Actividad Optica.

- 1.- Vos, J. N.; Kat-Van den Nieuwenhof, M. W. P.; Basten, J. E. M.; Van - Boeckel, C. A. A. *J. Carbohydr. Chem.* 1990, 9, 501-5.
- 2.- Lloyd, D. K.; Goodall, D. M. *Chirality* 1989, 1, 251-64.
- 3.- Kawazumi, H.; Nishimura, H.; Ogawa, T. *Anal. Sci.* 1990, 6, 135-6.
- 4.- Xi, X.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* 1991, 63, 490-6.
- 5.- Kawazumi, H.; Nishimura, H.; Otsubo, Y.; Ogawa, T. *Talanta* 1991, 38, 965-9.
- 6.- Xu, M.; Tran, C. D. *Anal. Chem.* 1990, 62, 2467-71.
- 7.- Bertucci, C.; Domenici, E.; Salvador, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990, 8, 843-6.
- 8.- Kurosu, Y.; Sasaki, T.; Tasakuwa, T.; Sakayanaqi, N.; Hibi, K.; Senda, M. *J. Chromatogr.* 1990, 515, 407-14.
- 9.- Rice, P. D.; Shao, Y. Y.; Bobbitt, D. R. *Talanta*, 1989, 28, 263-6.
- 10.- Ng, K.; Rice, P. D.; Bobbitt, D. R. *Microchem. J.* 1991, 44, 25-33.
- 11.- Heyraud, A.; Rinaudo, M. *ACS Symp. Ser.* 1991, 458, 171-88.

C. Detección Indirecta.

- 1.- Yeung, E. S.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* 1991, 63, 275A-276A, 278A, 280A-282A.
- 2.- Morris, M. D. *Chem. Anal. (N.Y.)* 1989, 101, 361-90.
- 3.- Rice, P. D.; Thorne, J. B.; Bobbitt, D. R. *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* 1991, 1435, 104-13.
- 4.- Pfeffer, W. D.; Yeung, E. S. *J. Chromatogr.* 1990, 506, 401-8.
- 5.- Berthod, A.; Glick, M.; Winefordner, J. D. *J. Chromatogr.* 1990, 502, 305-15.
- 6.- Obrezkov, O. N.; Shpigun, O. A.; Zoitov, Y. A.; Shlyamin, V. I. *J. Chromatogr.* 1991, 558, 209-13.
- 7.- Dorland, P.; Tod, M.; Postaire, E.; Pradeau, D. *J. Chromatogr.* 1989, 478, 131-40.

D. Detectores Electroquímicos.

- 1.- Yang, J.; Fanq, Q.; Zhang, S. *Chim. Chem. Lett.* 1990, 1, 113-6.
- 2.- Zadei, J. M.; Mitchell, R.; Kuwana, T. *Electroanalysis* 1990, 2, 209-15.
- 3.- Hua, C.; Saqar, K. A.; McLaughlin, K.; Jorqe, M.; Meaney, M. P.; Smyth, M. R. *Analyst* 1991, 116, 1117-20.
- 4.- Connor, M. P.; Wang, J.; Kubiak, W.; Smyth, M. R. *Anal. Chim. Acta.* 1990, 229, 139-43.

- 5.- Nagels, L. J.; Kauffmann, J. M.; Dewaele, C.; Parmentier, F. *Anal. Chim. Acta.* 1990, 234, 75-81.
- 6.- Nomura, T.; Yanagihara, T.; Mitsui, T. *Anal. Chim. Acta* 1991, 248, - 329-35.
- 7.- Naqy, T. R.; Anderson, J. L. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2668-72.
- 8.- Neca, J.; Vespalec, R. J. *Chromatoqr.* 1990, 514, 161-70.
- 9.- Vespalec, R.; Neca, J. *Chromatoqr.* 1991, 541, 257-64.
- 10.- Johnson, D. C.; La Course, W. R. *Anal. Chem.* 1990, 62, 589A-597A.
- 11.- Stojanovic, R. S.; Bond, A. M.; Butler, E. C. V. *Anal. Chem.* 1990, 62 2692-7.
- 12.- Kublak, W. W. *Electroanalysis* 1989, 1, 379-88.
- 13.- Ramstad, T. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 1989, 335, 493-4.
- 14.- Luo, P.; Zhang, F.; Baldwin, R. P. *Anal. Chim. Acta.* 1991, 244, 169-78.
- 15.- Ji, H.; Wang, E. *Talanta*, 38, 73-80.
- 16.- Baur, J. E.; Wightman, R. M. *J. Chromatoqr.* 1989, 482, 65-73.
- 17.- Ji, H.; He, J.; Dong, S.; Wang, E. *J. Electroanal. Chem. Interfacial - Electrochem.* 1990, 290, 93-103.
- 18.- Chi, H.; Wang, Y.; Zhou, T.; Jin, C. *Anal. Chim. Acta* 1990, 235, 273-7.
- 19.- Gunasingham, H.; Tan, C. B.; Tan, C. H.; Aw, T. C. *J. Chromatoqr. Sci.* 1989, 27, 672-5.
- 20.- Casella, I. G.; Desimoni, E.; Cataldi, T. R. I. *Anal. Chim. Acta* 1991, 248, 117-25.
- 21.- Elsenberg, E. J.; Cundy, K. C. *Anal. Chem.* 1991, 63, 845-7.
- 22.- Hou, W.; Wang, E. *Talanta* 1991, 38, 557-60.
- 23.- Qi, X.; Baldwin, R. P.; Li, H.; Guarx, T. F. *electroanalysis* 1991, 3 119-24.
- 24.- LaCourse, W. R.; Johnson, D. C. *Carbohydr. Res.* 1991, 215, 159-78.
- 25.- Barisci, J. N.; Wallace, G. G. *Electroanalysis* 1989, 1, 347-51.
- 26.- Lisman, J. A.; Underberg, W. J. M.; Lingeman, H. *Chromatoqr. Sci.* 1990 48, 283-322.
- 27.- Marko-Varga, G.; Gorton, L. *Anal. Chim. Acta* 1990, 234, 13-29.
- 28.- Clos, J. F.; Dorsey, J. G. *Anal. Lett.* 1990, 23, 2327-37.
- 29.- Berglund, I.; Dasgupta, P. K. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2175-83.
- 30.- Stronq, D. L.; Dasgupta, P. K.; Friedman, K.; Stillian, J. R. *Anal Chem* 1991, 63, 480-6.
- 31.- Janecek, M.; Slais, K. *J. Chromatoqr.* 1989, 471, 303-9.
- 32.- Iwachido, T.; Hayama, N. *Anal. Sci.* 1990, 6, 307-8.
- 33.- Midgley, D.; Parker, R. L. *Talanta* 1989, 36, 1277-83.

E. Detectores de Fluorescencia.

- 1.- Van de Nesse, R. J.; Hoornweg, G. P.; Goojier, C.; Brinkman, U. A. T.; Velthorst, N. H.; *Anal. Chim. Acta* 1989, 227, 173-9.
- 2.- Van de Nesse, R. J.; Goojier, C.; Hoornweg, G. P.; Brinkman, U. A. T.; Velthorst, N. H.; Van der Bent, S. J. *Anal. Lett.* 1990, 23, 1235-44.
- 3.- Pfeffer, W. D. Report IS-T-1501; Order No. DE91007666, 1991; 160 pp.
- 4.- Ong, C. P.; Ng, C. L.; Lee, H. K.; Li, S. F. Y. *J. Chromatoqr.* 1991, 559, 537-45.
- 5.- Cobb, W. T.; McGown, L. B. *Appl. Spectrosc.* 1989, 43, 1363-7.
- 6.- Cobb, W. T.; McGown, L. B. *Anal. Chem.* 1990, 62, 186-9.

- 7.- Mastenbroek, J. W. G.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Velthorst, H. H.; Hofstraat, J. W.; Van Zeijl, W. J. M. *Chemosphere* 1990, 21, 377-86.
- 8.- Zhao, Z.; Qian, W. *J. Environ. Sci. (China)* 1989, 1, 109-15.
- 9.- Przyjazny, A.; Bachas, L. G. *Anal. Chim. Acta* 1991, 246, 103-12.
- 10.- Wegrzyn, J.; Patonay, G.; Ford, M.; Warner, I. *Anal. Chem.* 1990, 62, 1754-8.
- 11.- Jalkian, R. D.; Denton, M. B. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* 1989, - 1054, 91-102.
- 12.- Patel, B. M.; Moye, H. A.; Weinberger, R. *Anal. Lett.* 1989, 22, 3057-79.
- 13.- Mawatari, K.; Iinuma, F.; Watanabe, M. *Anal. Sci.* 1990, 6, 515-8.
- 14.- Kiba, N.; Matsushita, R.; Oyama, Y.; Furusawa, M. *Anal. Chim. Acta* - 1991, 248, 367-70.

F. DETECTORES DE INDICE DE REFRACCION.

- 1.- Burd, A. E.; Krattiger, B.; Maystre, F.; Widmer, H. M. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2689-97.
- 2.- Weigand, F.; Relter, M.; Jungbauer, A.; Katinger, H. *J. Chromatogr.* 1989, 497, 59-68.
- 3.- Masson, S.; Sciaky, M.; Desmoulin, F.; Fontanarava, E.; Cozzone, P. J. *J. Chromatogr.* 1991, 563, 231-242.
- 4.- Vaccher, C.; Berthelot, P.; Flouquet, N.; Debaert, M. *Ann. Pharm. Fr.* 1990, 48, 264-272; *Chem. Abstr.* 1991, 114, 129232d.
- 5.- Hancock, D. O.; Renn, C. N.; Synovec, R. E. *Anal. Chem.* 1990, 62, - 2441-7.
- 6.- Renn, C. N.; Synovec, R. E. *J. Chromatogr.* 1991, 536, 289-301.
- 7.- Synovec, R. E.; Renn, C. N. *Proc. SPIE- Int. Soc. Opt. Eng.* 1991, 1435, 128-39.

G. DETECTORES INFRARROJOS.

- 1.- Griffiths, P. R.; Haefner, A. M.; Norton, K. L.; Fraser, D. J. J.; Pyo, D.; Makishima, H. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1989, 12, 119-22.
- 2.- Norton, K. L.; Lange, A. J.; Griffiths, P. R. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1991, 14, 225-9.
- 3.- De Haseth, J. A.; Robertson, R. M. *microchem. J.* 1989, 40, 77-93.
- 4.- Robertson, R. M.; De Haseth, J. A.; Browner, R. F. *Appl. Spectrosc.* 1990, 44, 8-13.
- 5.- Jinno, K.; Fujimoto, C. *J. Chromatogr.* 1990, 506, 443-60.
- 6.- Fujimoto, C.; Jinno, K. *TRAC, Trends Anal. Chem.* 1989, 8, 90-6.
- 7.- *Pract. Spectrosc.* 1990, 10, 95-136.
- 8.- Salzer, R.; Meyer, U. *teubner-Texte Phys.* 1989, 20, 39-53; *Chem. Abstr.* 1990, 112, 47983u.
- 9.- Busch, K. W.; Hudson, K. M.; Busch, M. A.; Kubala, S. W., Jr.; Tilotta D. C.; Lam, C. K. Y.; Srinivasan, R. *PCT Int. Appl. WO 9105241 A1*, 18 April 1991, 166 pp.
- 10.- Lange, A. J.; Griffiths, P. R.; Fraser, D. J. J. *Anal. Chem.* 1991, 63, 782-7.
- 11.- Fraser, D. J. J.; Norton, K. L.; Griffiths, P. R. *Anal. Chem.* 1990, 62, 308-10.
- 12.- Jinno, K.; Fujimoto, C. *Prog. HPLC* 1989, 4, 273-96.

H. DETECTORES DE QUIMIOLUMINISCENCIA.

- 1.- Nieman, T. A. In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*; Birks, J. W., Ed.; VCH: New York, 1989; pp. 99-123.
- 2.- Nieman, T. A. *Pract. Spectrosc.* 1991, 12, 523-65.
- 3.- Fujjiwara, T.; Jumamaru, T. *Spectrochim. Acta. Rev.* 1990, 13, 399-406.
- 4.- Townshend, A. *Analyst* 1990, 115, 495-500.
- 5.- Inal, K. *Chromatoqr. Sci.* 1990, 48, 359-79.
- 6.- Schreurs, M.; Coojier, C.; Velthorst, N. H. *Anal. Chem.* 1990, 62, - 2051-3.
- 7.- Chang, H. C. K.; Taylor, L. T. *Anal. Chem.* 1991, 63, 486-90.
- 8.- Jalkian, R. D.; Ratziaff, K. L.; Denton, M. B. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* 1989, 1055, 123-34.
- 9.- Hanaoka, N. *J. Chromatoqr.* 1990, 503, 155-65.
- 10.- Jones, P.; Williams, T.; Ebdon, L. *Anal. Chim. Acta* 1990, 237, 291-8.
- 11.- Aichinger, I.; Guebtz, G.; Birks, J. W. *J. Chromatoqr.* 1990, 523, - 163-72.