

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

PROFESOR: FEDERICO AZCÁRATE

ALGUNAS DEFINICIONES

■ Cromatografía:

Método físico en el cual los componentes de la muestras se separan entre dos fases, una de las cuales permanece inmóvil mientras que la otra se mueve en una dirección definida

■ Fase estacionaria:

Es la fase que permanece inmóvil, puede ser un solido, un gel o un liquido. En el último caso puede estar distribuida sobre un sólido

■ Fase móvil:

Es un fluido que se mueve a través de un lecho fijo en una dirección definida



ALGUNAS DEFINICIONES

■ Cromatografía de líquidos:

Es el nombre con el que se conoce a las técnicas cromatográficas en donde la fase estacionaria es un líquido; incluye la cromatografía de columna y la cromatografía plana.

■ Cromatografía de líquidos en columna:

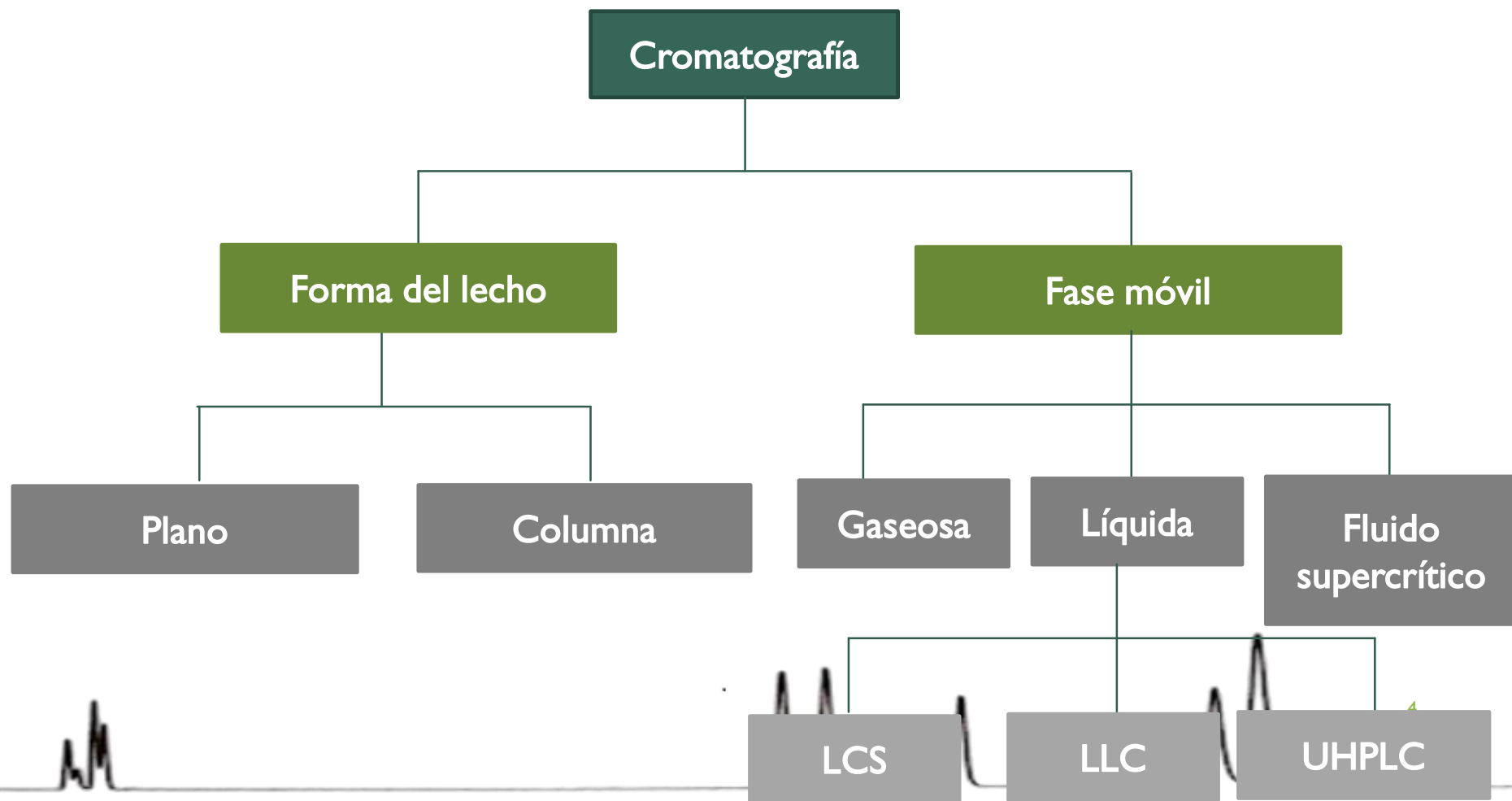
La fase estacionaria puede ser un sólido, cromatografía líquido-sólido, o un líquido retenido sobre un soporte sólido, cromatografía líquido-líquido.

■ cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

El líquido de la fase estacionaria está unido al soporte sólido mediante enlace covalente (fases ligadas químicamente)



CLASIFICACIÓN

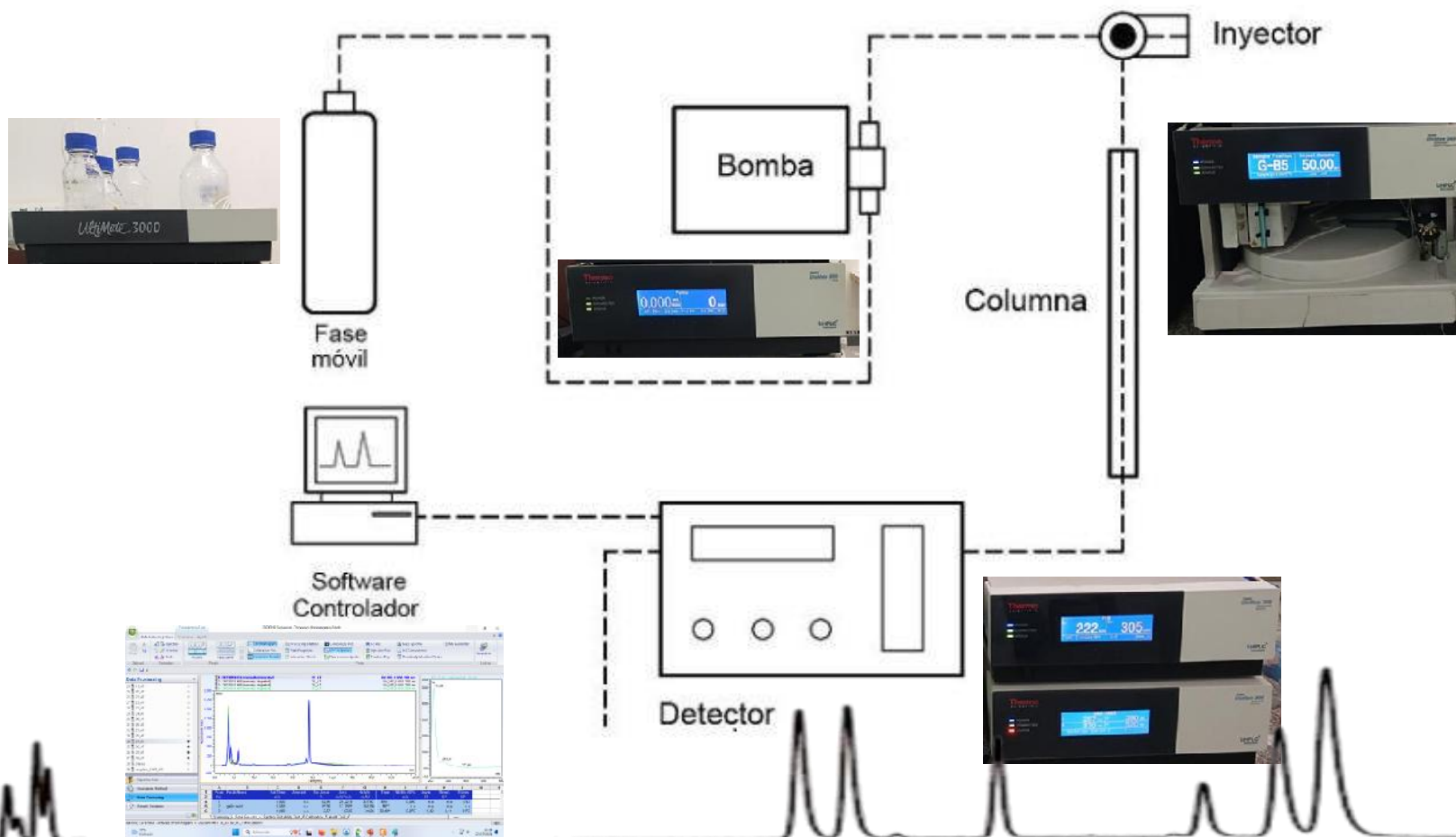


TEMARIO

- Configuración del equipo
- Requerimientos de instalación
- Calidad de los solventes
- Bombas
- Inyectores



CONFIGURACIÓN DE UN EQUIPO

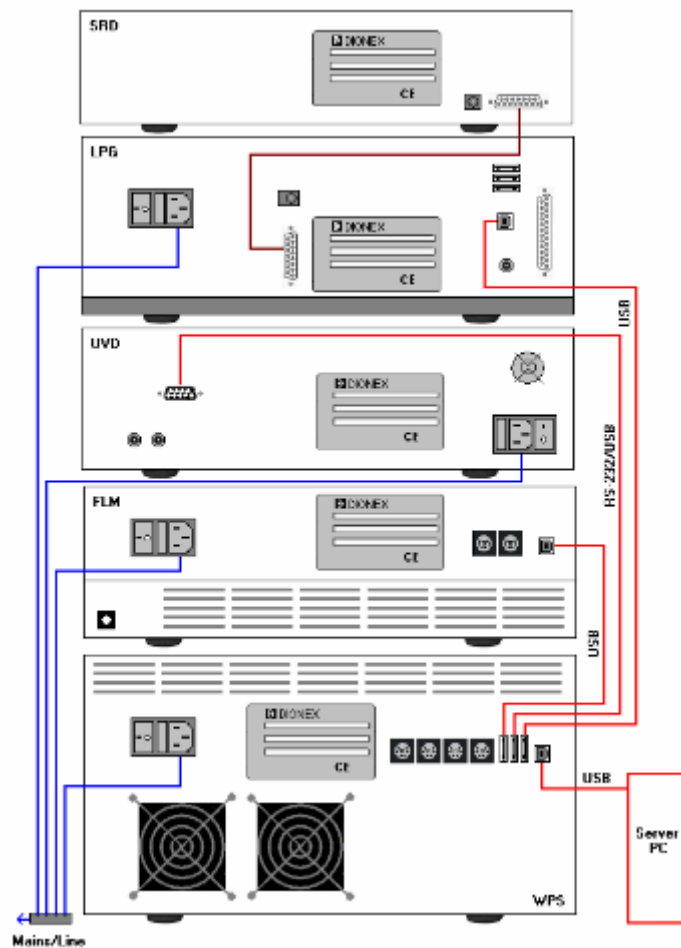


CONFIGURACIÓN DE UN EQUIPO

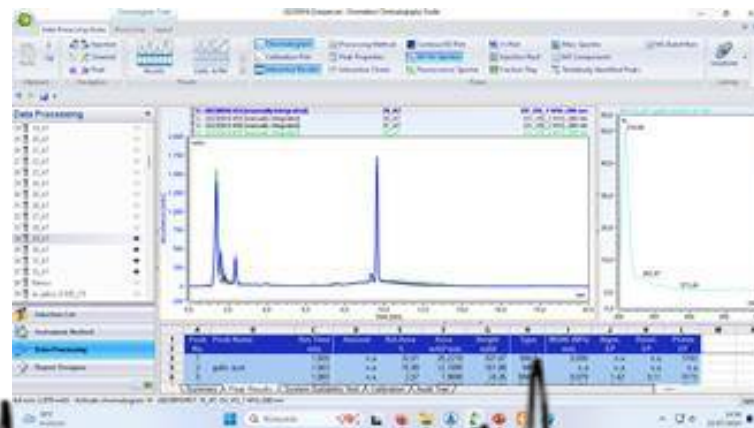
- Equipos modulares
- Equipos integrados



REQUERIMIENTOS DE INSTALACIÓN



Alimentación
Conexión
Procesador
Software



SOLVENTES/ FASE MÓVIL

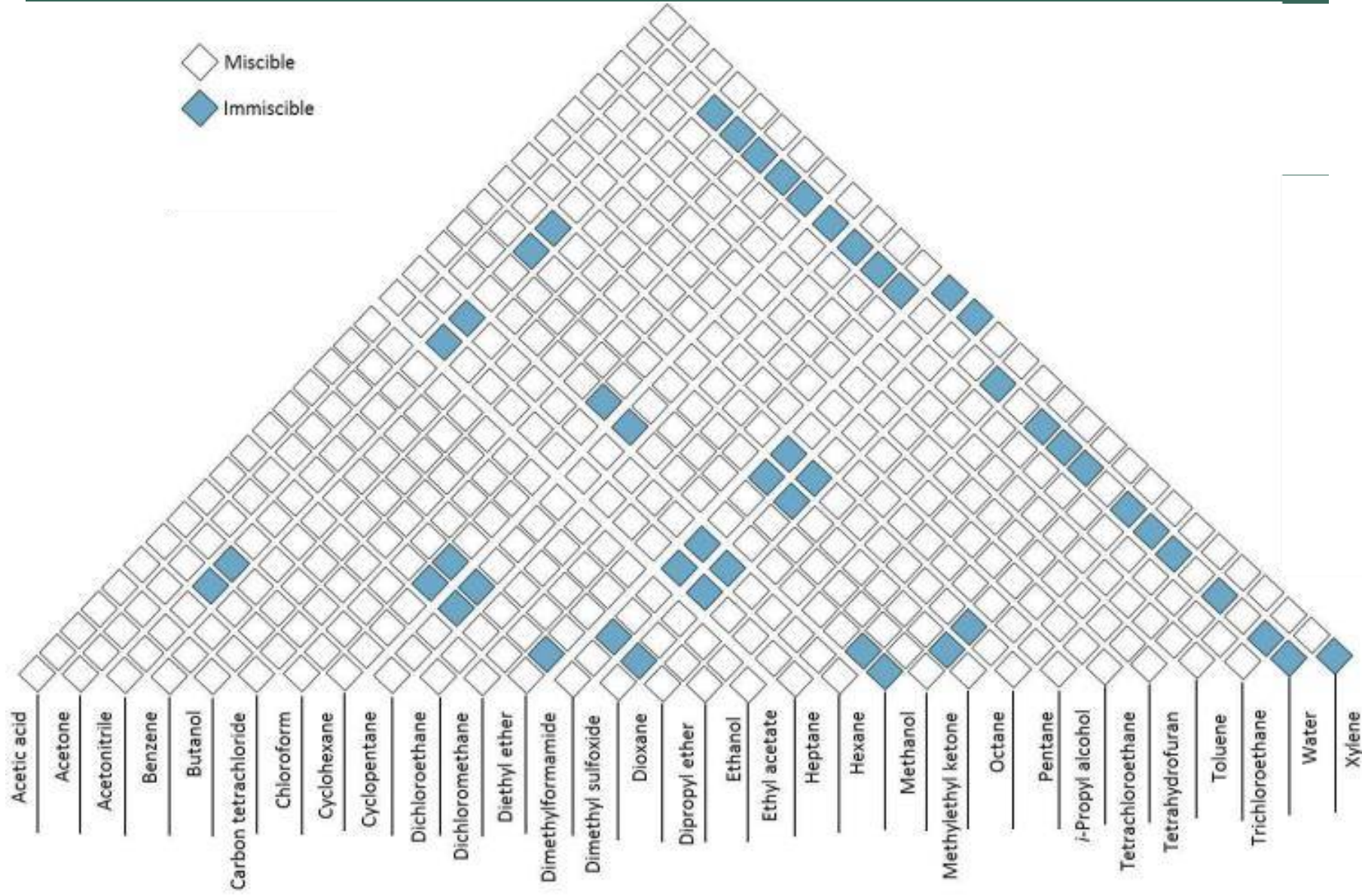
- La fase móvil es un solvente o una mezcla de solventes cuya función es mantener en solución a los analitos mientras se separan al eluir de la columna
- La separación de los analitos se fundamenta en la diferencia de selectividad de los analitos por la fase móvil y la fase estacionaria



SOLVENTES/CARACTERÍSTICAS

- Poder disolvente sobre el analito
- Poder disolvente con los otros componentes de la mezcla
- Baja reactividad
- Adecuado punto de ebullición
- Baja viscosidad
- Alto grado de pureza
- Compatibilidad con el sistema





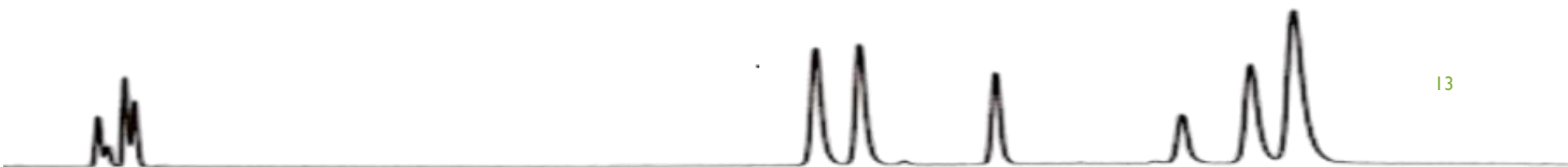
SOLVENTES/FASE REVERSA

El orden de elución de los analitos está regido por su solubilidad en agua, lo cual depende de su estructura química. Algunas generalizaciones que gobiernan el orden de elución en fase inversa

- cuanto menor es la solubilidad en agua y mayor el número de átomos de carbono, mayor es la retención
- los solutos con cadenas ramificadas se retienen menos que sus isómeros sin ramificar
- la insaturación disminuye la retención
- las moléculas polares neutras presentan menor retención que las apolares

SOLVENTES/FASE REVERSA

Solvente	Fórmula	Fuerza de elución	Observaciones
Agua	H ₂ O	Fuerza cero	
Metanol	CH ₃ OH	Fuerza de elución mas débil	Donantes de protones
Acetonitrilo	CH ₃ CN	Fuerza de elución intermedia	Dipolar
Tetrahidrofurano	C ₄ H ₈ O	Fuerza de elución mas fuerte	Aceptor de protones. Se oxida fácilmente



SOLVENTES/FASE NORMAL

La retención de los analitos se produce por adsorción mediante interacciones polares. Las moléculas más polares son más retenidas que las menos polares.

- No es adecuada para la separación individual de los miembros de una serie homóloga debido a que las fuerzas de interacción adsorbente-soluto son polares e intensas
- Resulta adecuada para separar los analitos de una muestra en grupos, cada uno de los cuales contiene un tipo de moléculas de una determinada polaridad, por ejemplo alcoholes, cetonas, esteres.
- La serie eluotrópica es una lista que refleja la capacidad de elución de los disolventes. El disolvente más fuerte en cromatografía de adsorción y, por tanto, el de mayor poder de elución, es el agua y el más débil el n-hexano.

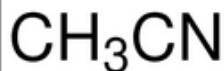
SOLVENTES/FASE NORMAL

Serie eluotrópica: permite predecir el efecto de un disolvente cuando actúa como eluyente sobre la retención y sirve de base para la selección de la fase móvil en cromatografía líquida de adsorción

$$\varepsilon^{\circ}_{mezcla} = \varepsilon^{\circ}_1 \times (\%)_1 + \varepsilon^{\circ}_2 \times (\%)_2$$

Disolvente	P'	x_e, α	x_e, β	x_e, π^*	$\ast \varepsilon^0$	Grupo
n-Hexano	0.1				0,00	
i-Octano	0.1				0.01	
Tetracloruro de carbono	1.6				0.14	
Tolueno	2.4	0.25	0.28	0.47	0.22	8
Benceno	2.7	0.23	0.32	0.45	0.25	8
Éter etílico	2.8	0.53	0.13	0.34	0.29	1
Cloruro de metileno	3.1	0.29	0.18	0.53	0.32	5
i-Propanol	3.9	0.55	0.19	0.27	0.63	2
n-Propanol	4.0	0.54	0.19	0.27	0.63	2
Tetrahidrofurano	4.0	0.38	0.20	0.42	0.35	3
Cloroformo	4.1	0.25	0.41	0.33	0.31	8
Etanol	4.3	0.52	0.19	0.29	0.68	2
Acetato de etilo	4.4	0.34	0.23	0.43	0.45	6
2-Butanona	4.7	0.35	0.22	0.43	0.39	6
Dioxano	4.8	0.36	0.26	0.40	0.43	6
Acetona	5.1	0.35	0.23	0.42	0.43	6
Metanol	5.1	0.48	0.22	0.31	0.73	2
Acetonitrilo	5.8	0.31	0.27	0.42	0.50	6
Nitrometano	6.0	0.28	0.31	0.40	0.49	7
Agua	10.2	0.37	0.37	0.25	Grande	3

SOLVENTES / CALIDAD



Acetonitrilo

Sinónimos: ACN, Cianometano

Fórmula lineal: CH₃CN

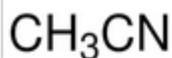
CAS No.: 75-05-8

EC No.: 200-601-2

[Todas las fotos](#) (31)

Comparar	Referencia del producto	Descripción
☐	1.37134	EMPROVE®
☐	34851	≥99.9%, grad
☐	1.00029	hypergrade f
☐	271004	99.8%, anhy
☐	1.00030	gradient gr

[Mostrar más](#) ▾

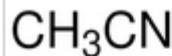


Sigma-Aldrich

34851

Acetonitrilo

suitable for HPLC, gradient grade, ≥99.9%



Supelco

1.00029

Acetonitrilo

hypergrade for LC-MS LiChrosolv®

[Incluir sesión](#)

para Ver la Fijación de precios por contrato y de la organización

Seleccione un Tamaño

1L

US\$ 251,68

2.5 L

US\$ 499,73

10L

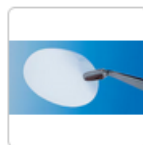
US\$ 1.851,30

SOLVENTES / FILTRADO

■ Filtrado: todas las fases móviles se deben filtrar.



Equipo de filtrado



WHA7404004

Whatman® membrane filters nylon

pore size 0.45 μm , diam. 47 mm

**Incluir
sesión**

para Ver la Fijación de precios por contrato y de la organización

Seleccione un Tamaño

100 EA

US\$ 561,44



SOLVENTE / FILTRADO

Chemical Compatibility Guide

Solvent	wwPTFE	PTFE	Glass	Versapor	Nylon	IC, Supor (PES)	PVDF
Acetone	R	R	R	NR	R	NR	NR
Acetonitrile	R	R	R	NR	R	R	R
Acetic Acid, glacial	R	R	R	NR	NR	R	R
<i>n</i> -Butanol	R	R	R	R	R	R	R
Chloroform	R	R	R	NR	R	NR	NR
Dimethyl Formamide	R	R	R	NR	R	NR	NR
Dimethyl Sulfoxide	R	R	R	NR	R	NR	R
Ethanol	R	R	R	R	R	R	R
Ethyl Acetate	R	R	R	R	R	NR	R
Ethel Ether	R	R	R	R	R	R	R
Hydrochloric Acid (1N)	R	R	R	•	NR	R	R
Hexane, dry	R	R	R	R	R	LR	R
Methanol	R	R	R	R	R	R	R
Methylene Chloride	R	R	R	NR	R	NR	R
Methyl Ethyl Ketone	R	R	R	NR	R	NR	NR
N-Methyl Pyrrolidone	R	R	R	•	NR	NR	R
Isopropanol	R	R	R	R	R	R	R
Sodium Hydroxide (3N)	R	R	R	R	R	R	NR
Tetrahydrofuran	R	R	R	NR	R	NR	NR
Tetrahydrofuran/water (50/50)	R	R	R	•	R	•	R
Toluene	R	R	R	R	R	R	R
Water	R	R	R	R	R	R	•
Ammonium Hydroxide	R	R	R	•	•	•	•

R= resistente LR= levemente resistente NR= no resistente

SOLVENTES / FILTRADO

Membrana	Tipo de solvente		
	Acuoso	Ac/Org	Orgánico
Celulosa regenerada			R
Ester de celulosa	R	NR	NR
Nitrato de celulosa	R	*	NR
Fluoruro de polivilideno	R	R	R
Nylon	R	R	R
Politetrafluor etileno (PTFE)	NR	NR	R
Teflon	NR	NR	R

R = recomendable NR = no recomendable

* = usar como máximo con 30 % de solvente orgánico

SOLVENTES / FILTRADO



Waters™



 **SHIMADZU**
Excellence in Science

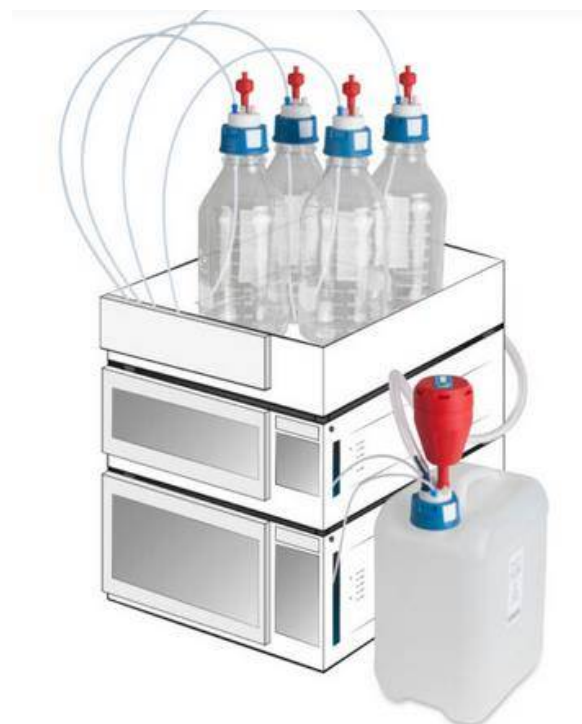
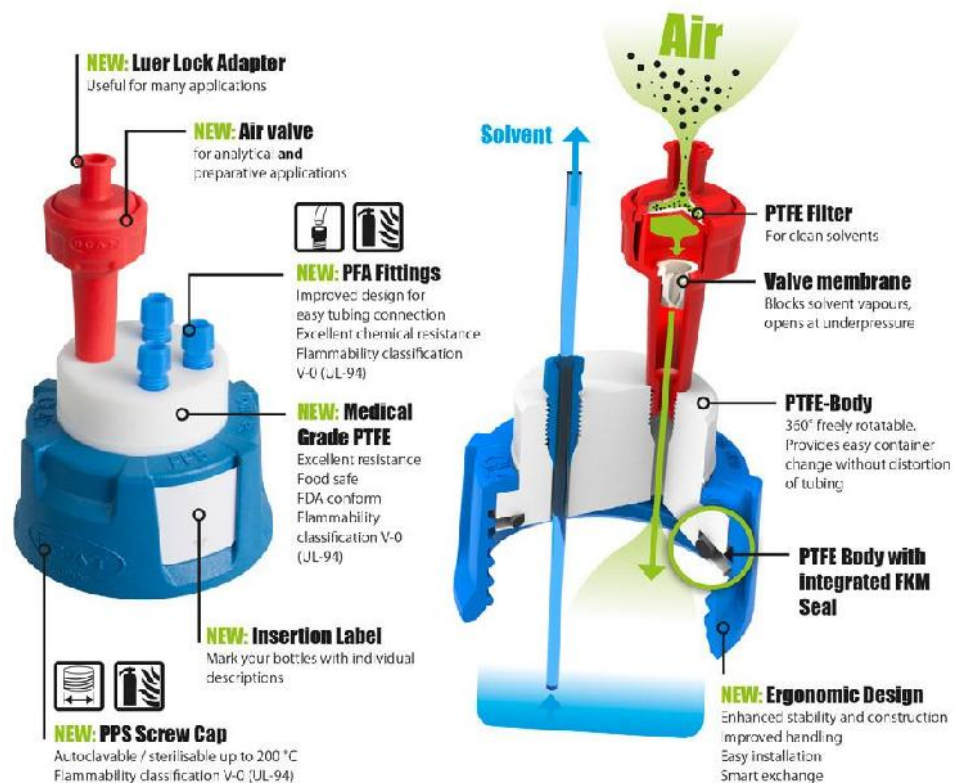


Thermo
SCIENTIFIC



Bottom-of-the-Bottle™	3/16in OD pli
Bottom-of-the-Bottle	1/8in OD tub

SOLVENTES/ FILTRADO



<https://ecientificas.com/productos/equipos-de-laboratorio/seguridad-en-cromatografia/tapas-para-botellas-de-solventes-de-hplc/>

SOLVENTES / DESGASIFICADO

Los gases disueltos pueden generar inconvenientes como

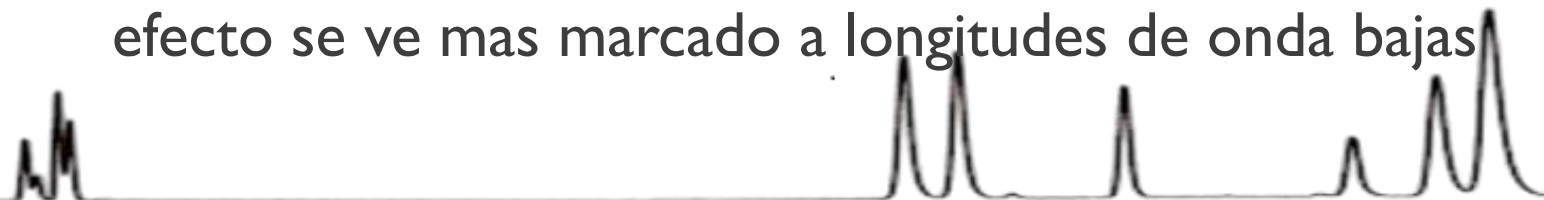
- Burbujas en el cabezal de la bomba
- Burbujas en la celda del detector
- Pérdida de sensibilidad en algunos detectores



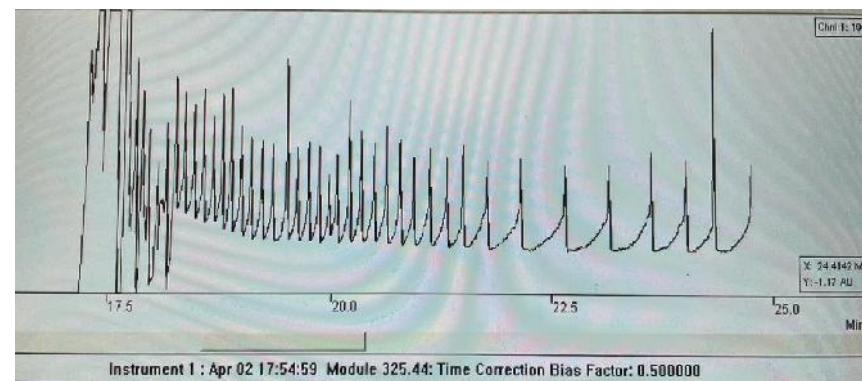
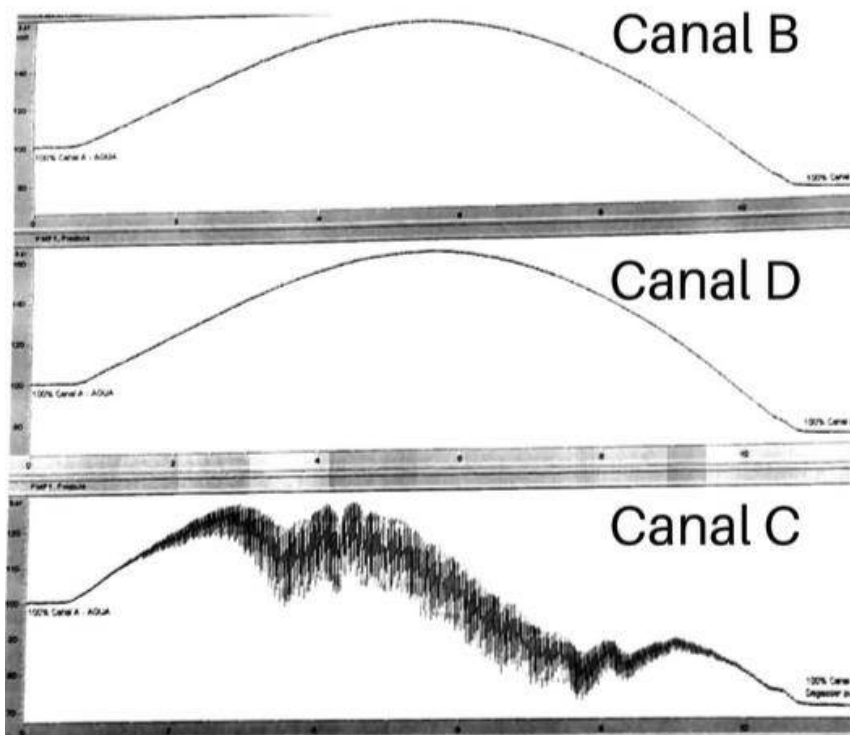
CALIDAD DE SOLVENTES / DESGASIFICADO

La presencia de oxígeno disuelto puede dar lugar a

- Oxidación de analitos, por ejemplo ascorbato
- Pérdida de sensibilidad en el detector de Fluorescencia, puede causar extinción (quenching) de ciertos analitos
- Incremento del ruido en detector electroquímico, trabajando en forma reductiva el oxígeno puede consumir parte del potencial aplicado incrementando el ruido
- Aumento en la línea de base de detectores UV-VIS, este efecto se ve más marcado a longitudes de onda bajas



CALIDAD DE SOLVENTES / DESGASIFICADO



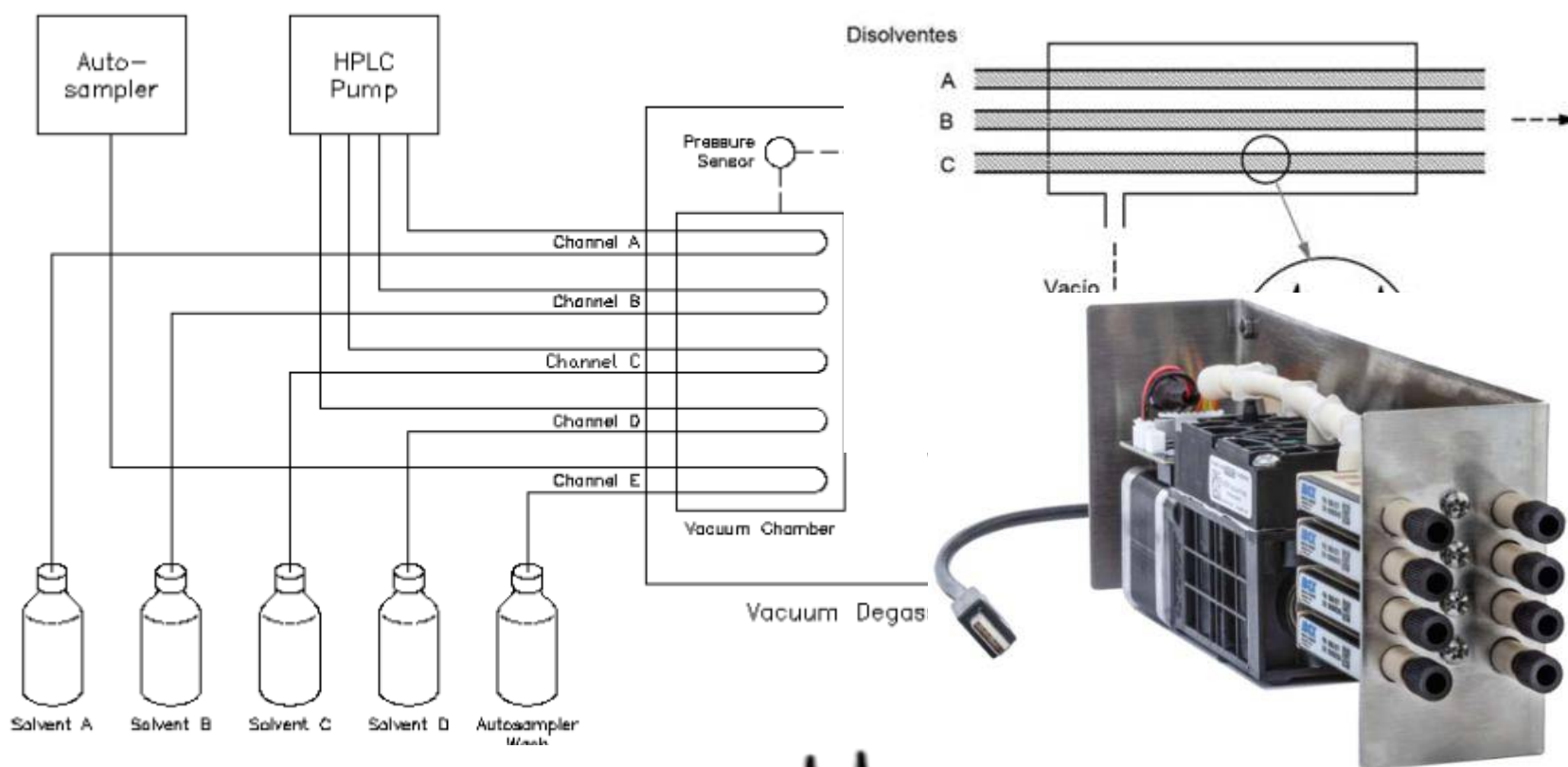
CALIDAD DE SOLVENTES / DESGASIFICADO

Métodos de desgasificado

- Reflujo (calentamiento)
- Burbujeo de gas inerte (helio)
- Sonicado (en desuso)
- Vacío (desgasificado en línea)

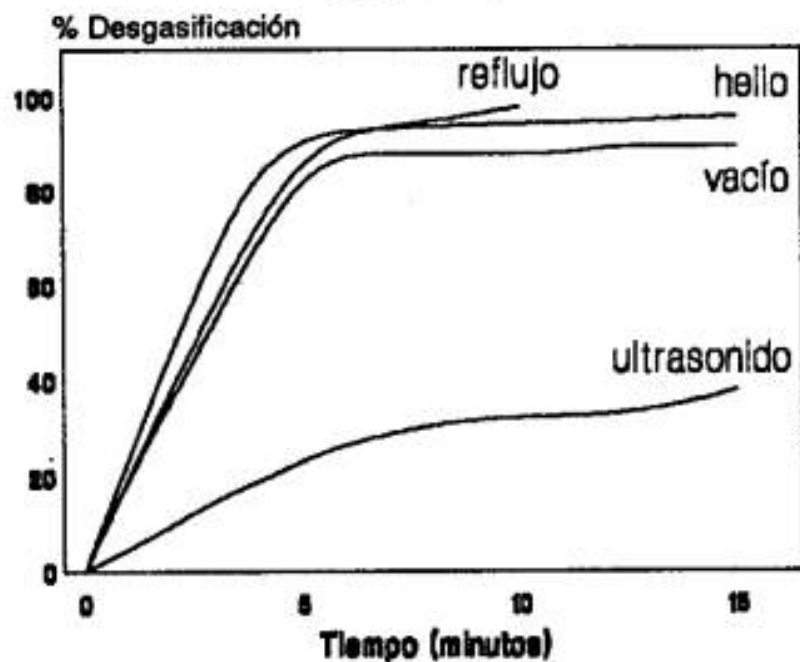


CALIDAD DE SOLVENTES/DESGASIFICADO

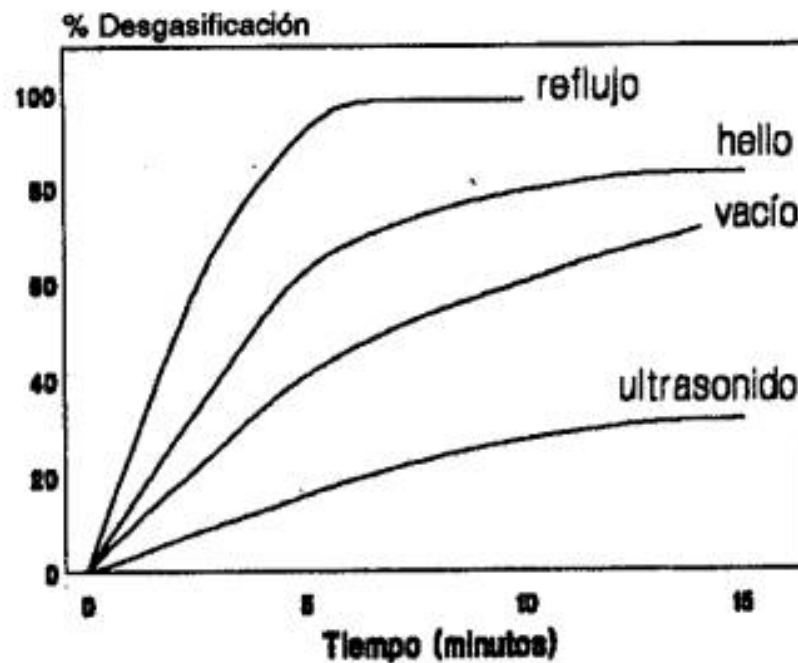


CALIDAD DE SOLVENTES/DESGASIFICADO

Hexano



Metanol



BOMBAS

Bomba

Es el dispositivo que posibilita el movimiento de las fases móviles a través de la columna. Debe proporcionar un flujo constante y estable, libre de pulsaciones, y tiene que ser capaz de mezclar dinámicamente los componentes del eluyente para formar gradientes.

Las bombas actuales proporcionan una presión de hasta 1500 bares, además de una precisión y exactitud de flujo excelentes.



BOMBA/REQUERIMIENTOS

- Proveer un flujo constante y libre de fluctuaciones
 - HPLC (0,1 a 10 mL/min) Pmax 400 bar
 - UHPLC (0,01 a 2-5 mL/min) Pmax 1500 bar
 - Micro LC (0.001 to 0.1 mL/min)
- Ser inerte a los solventes. Están compuesta por metales y otros materiales poliméricos compatibles con la mayoría de los solventes de HPLC
- Permitir el mezclado de dos o mas solventes con exactitud. La mezcla se puede realizar de forma isocrática o gradiente
- Brindar repetibilidad a lo largo del tiempo

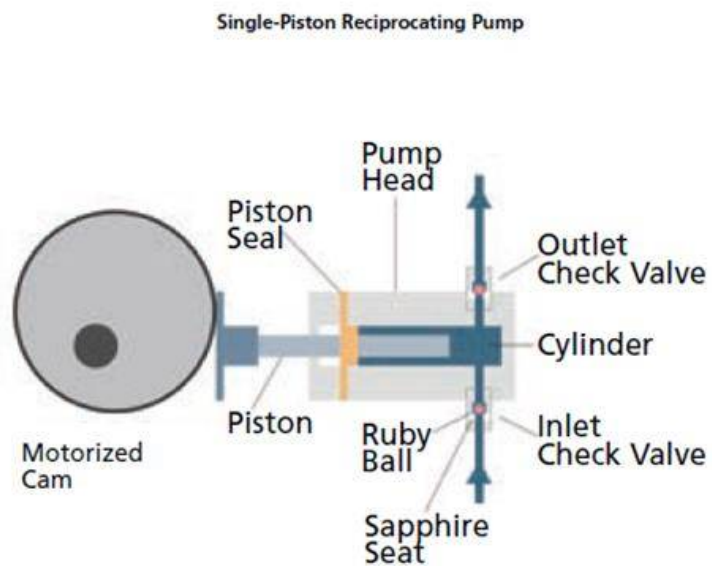
BOMBAS/CLASIFICACIÓN

Existen dos tipos de bombas:

- Bombas de desplazamiento continuo (de jeringa)
- Bombas reciprocantes (de pistón)



BOMBAS/CLASIFICACIÓN

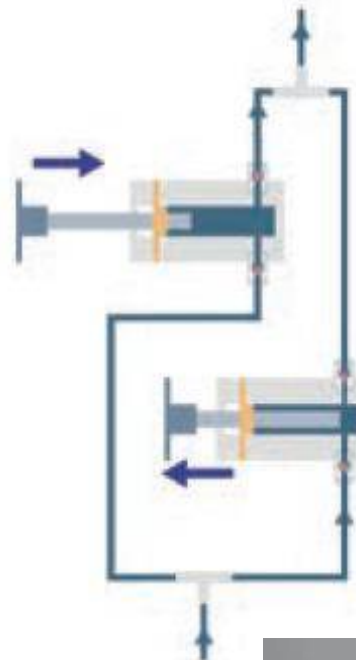


Ruido sinusoidal de la bomba de un pistón

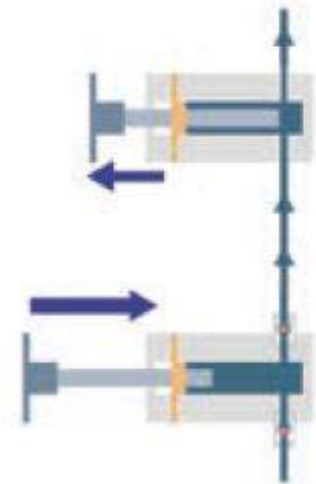
Fase de descarga

Fase de carga

Dual-Piston In-Parallel



Dual-Piston In-Series



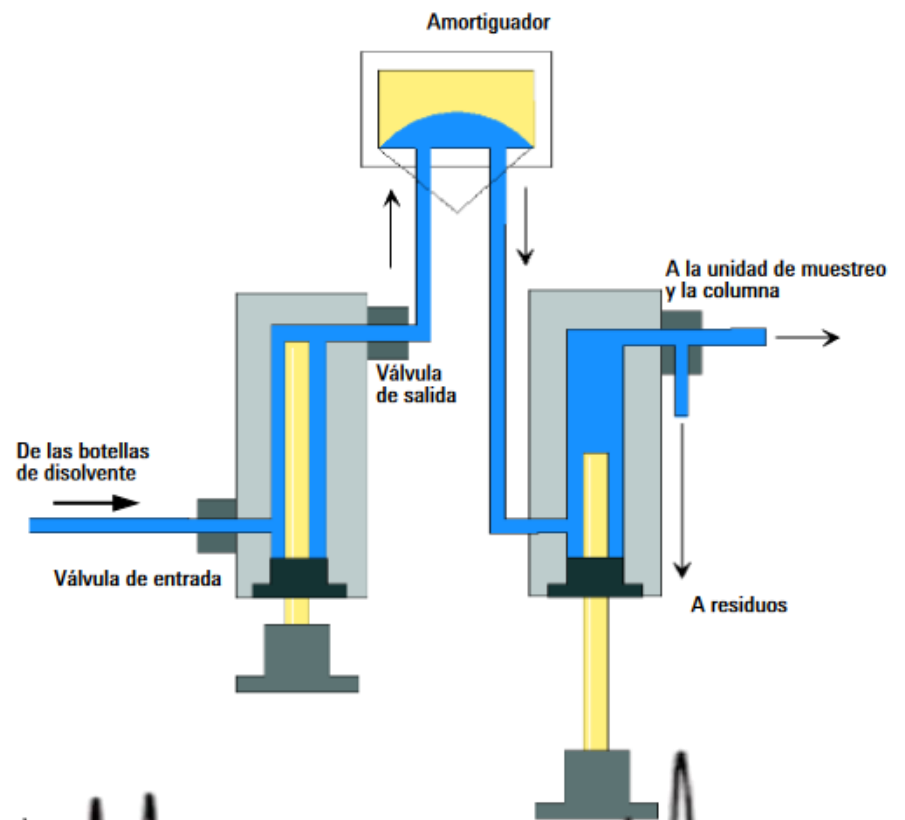
Ruido sinusoidal de la bomba de dos pistones

BOMBAS/CLASIFICACIÓN

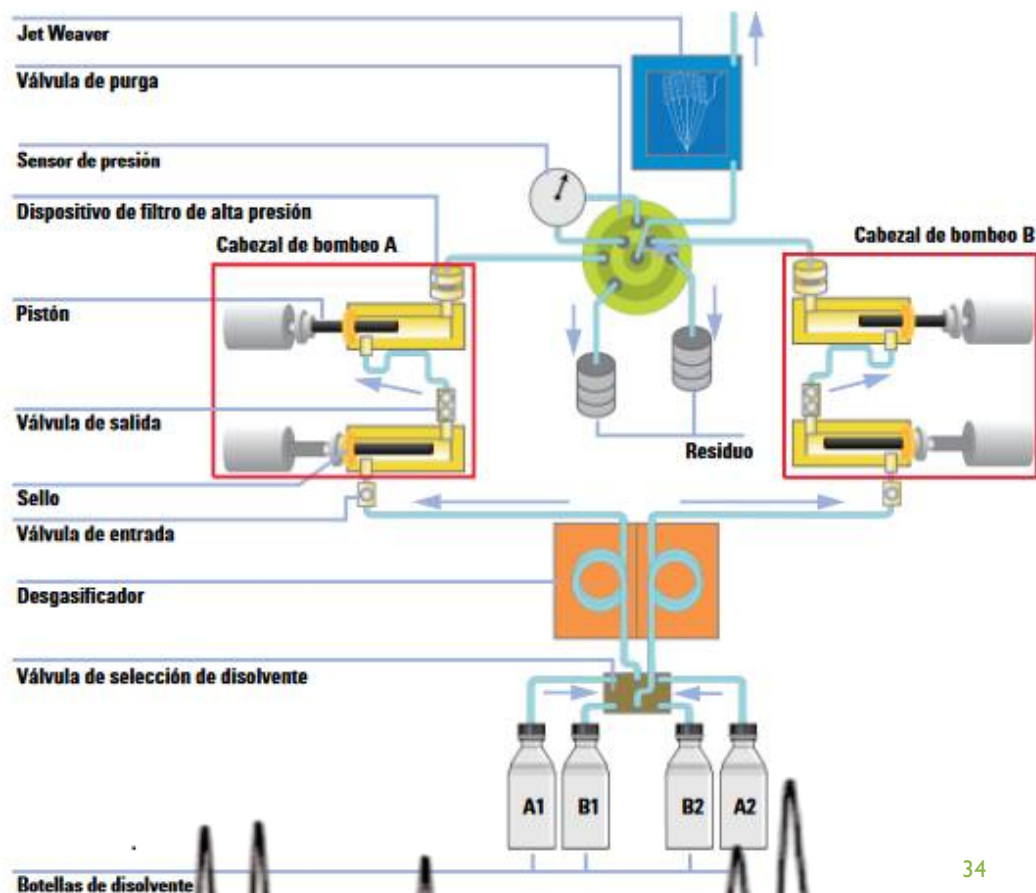
- **Bombas isocráticas:** Utilizan solo una unidad de bomba y un solo conducto de entrada de disolvente. Son ideales con la detección de índice de refracción para el análisis de garantía y control de la calidad.
- **Bombas binarias:** Utilizan dos unidades de bomba y dos conductos de entrada de disolvente, lo que permite la mezcla a alta presión de dos disolventes distintos. Se utilizan para aplicaciones de LC-MS, UHPLC o HPLC de alto rendimiento y resolución.



BOMBAS/ISOCRÁTICAS



BOMBAS/BINARIAS

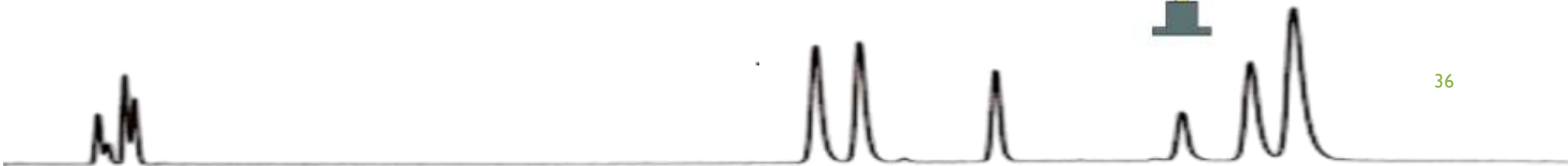
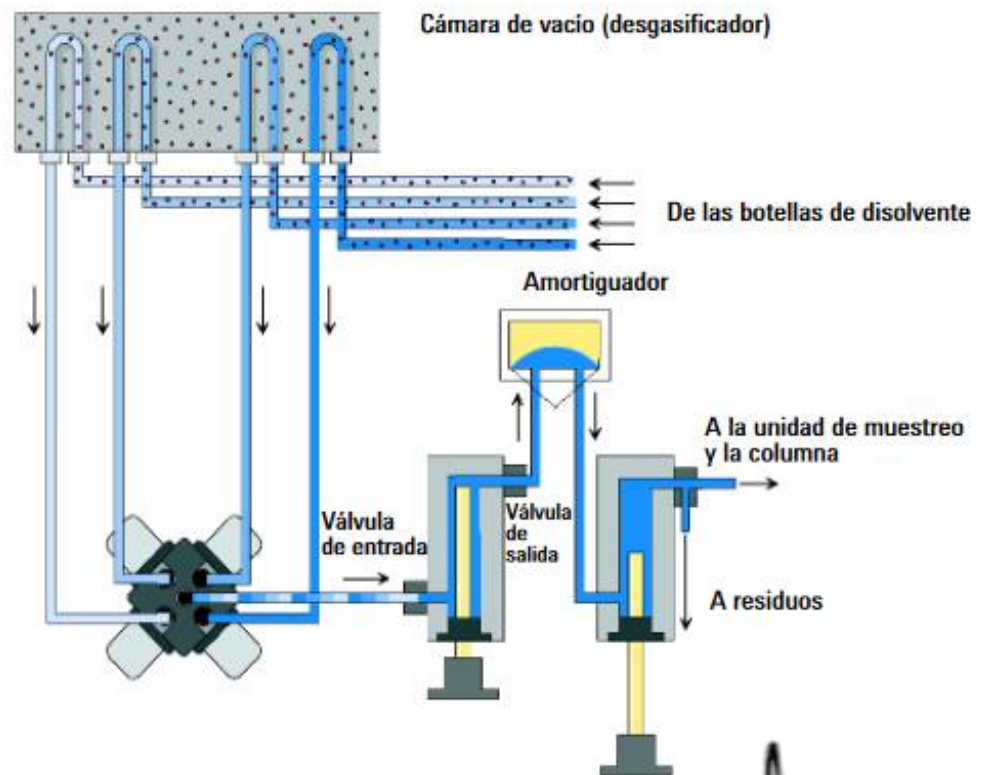


BOMBAS/CLASIFICACIÓN

- **Bombas cuaternarias** Utilizan solo una unidad de bomba y cuatro conductos de entrada de disolvente para mezclar hasta cuatro disolventes diferentes. Estas bombas ofrecen la gama de aplicaciones más amplia con una flexibilidad máxima en la composición de la fase móvil.



BOMBAS/CUATERNARIAS

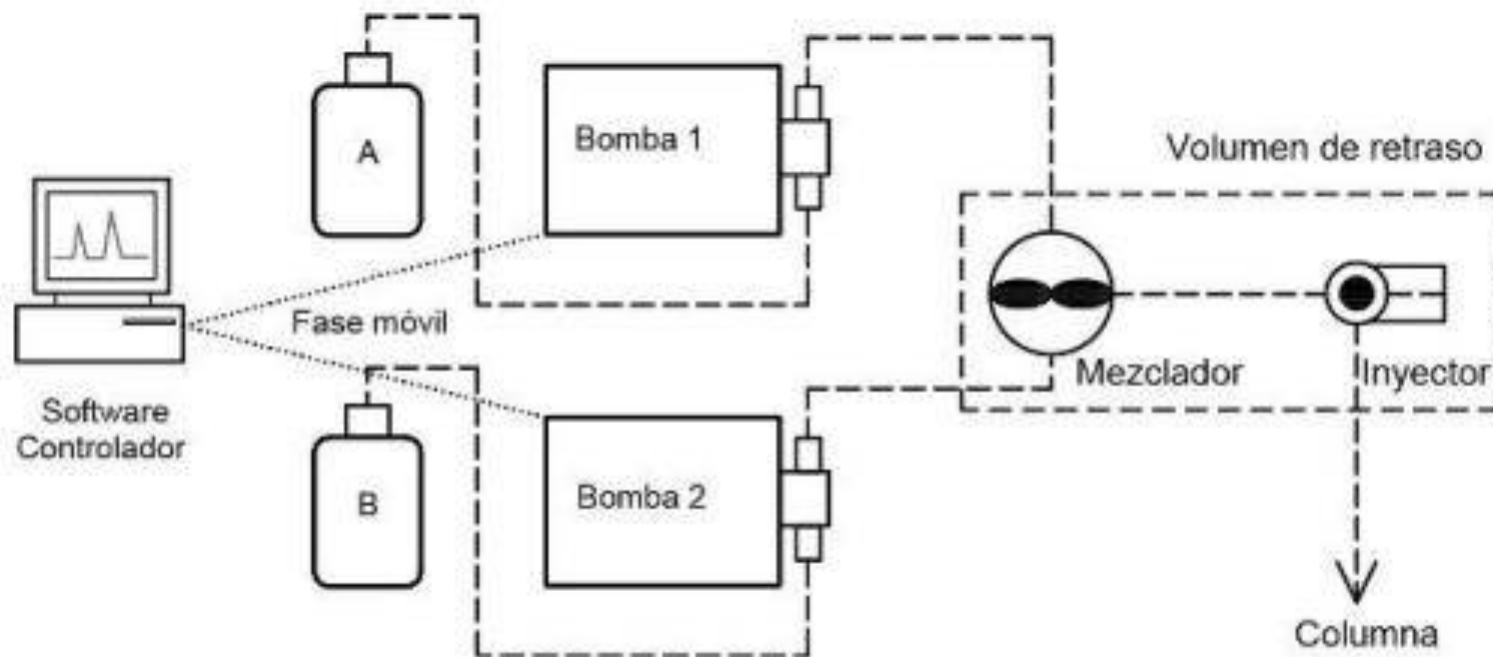


BOMBAS/GRADIENTES

Sistema de mezcla en alta presión

- La composición de la mezcla está determinada por un controlador que modifica la relación de caudales aportados por cada una de las bombas.
- Se necesita una bomba para cada disolvente.
- Puede tener limitada exactitud cuando la proporciones de los solventes es muy pequeñas
- El sistema es menos sensible a la presencia de gases en la fase móvil
- No permite realizar mezclas de tres solvente

BOMBAS/GRADIENTES



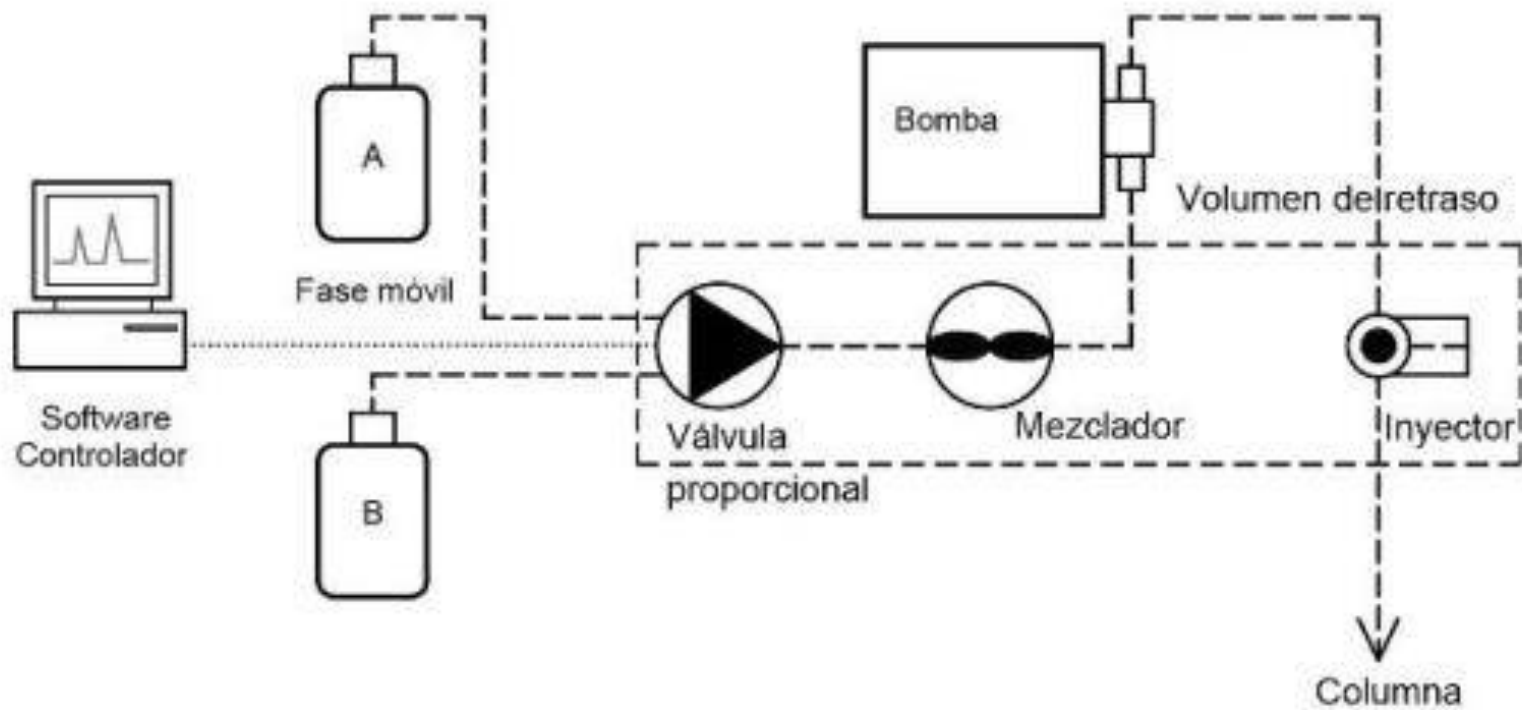
BOMBAS/GRADIENTES

Sistema de mezcla en baja presión

- Una única bomba suministra el gradiente de elución para varios disolventes, típicamente hasta cuatro en las bombas cuaternarias. El paso de cada disolvente a la bomba está controlado por una electroválvula.
- Se pueden generar gradientes muy precisos con proporciones muy bajas de alguno de los disolventes.
- El sistema requiere una exhaustiva degasificación



BOMBAS/GRADIENTES



CONEXIONES/CAÑERÍAS

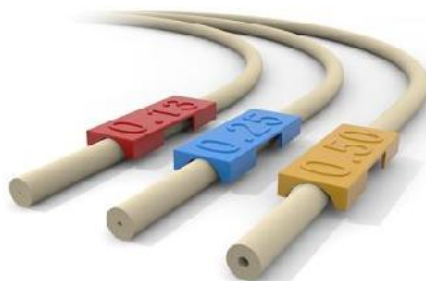
Cañerías

Los módulos de los equipos se unen por cañerías que difieren en su naturaleza y dimensiones según su función.

- Se comercializan en rollos que típicamente tiene igual diámetro externo pero difieren en el interno
- El diámetro interno impacta sobre la presión del sistema y el ancho de los picos
- La longitud repercute el volumen muerto



CONEXIONES/CAÑERÍAS



316L OD: 1/16" ID: 0.13mm (0.005")
 0.18mm (0.007")
 0.25mm (0.01")
 0.50mm (0.02")
 0.75mm (0.03")
 1.0mm (0.04")



色谱仪器耗材店
 18827621189

Stainless steel tubing



PEEK tubing OD: 1/16" ID: 0.13mm (0.005")
 0.18mm (0.007")
 0.25mm (0.01")
 0.50mm (0.02")
 0.75mm (0.03")
 1.0mm (0.04")



色谱仪器耗材店
 18827621189



CONEXIONES/CAÑERÍAS

Material	Presión Máxima	Temperatura Máxima	Observaciones
Acero Inoxidable	Muy alta	Muy alta	Atacado por halógenos
PEEK (poliéter-eter-cetona)	480 bar	100 °C	Se solubiliza en THF Biocompatible, flexible, fácil de cortar
Teflón	Muy baja	80 °C	Inerte, flexible

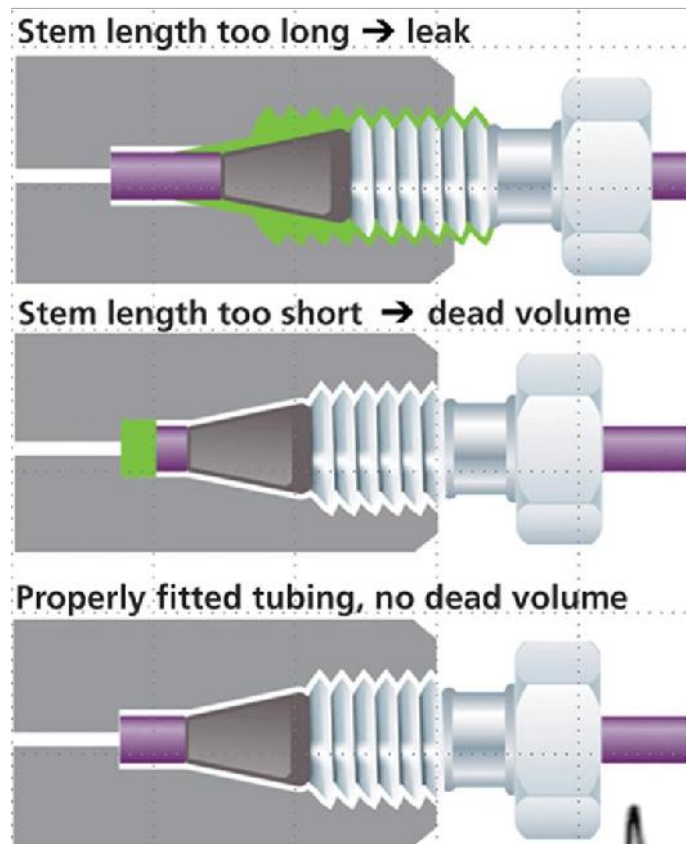
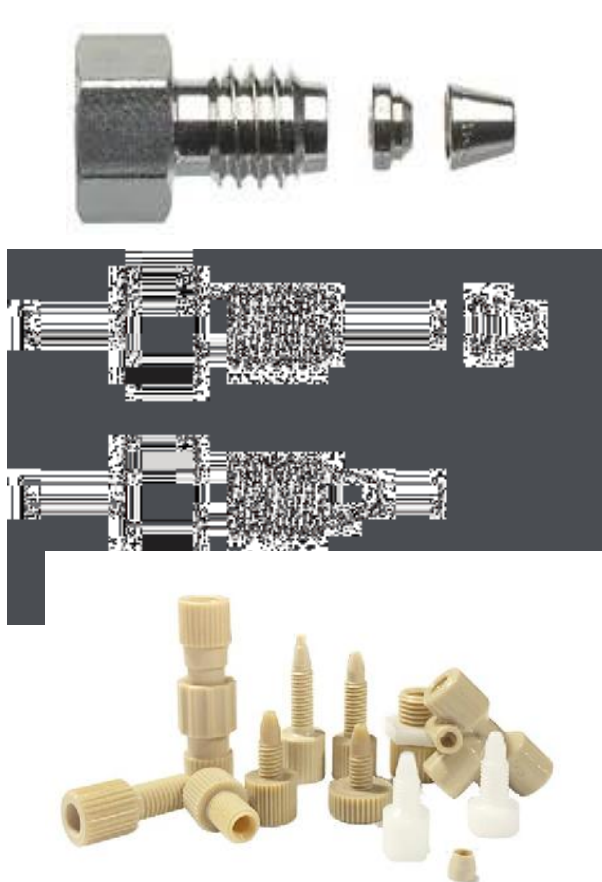
CONEXIONES/CONECTORES

Conectores

Los conectores son los dispositivos que unen las cañerías a los módulos del equipo

- Deben ser inertes
- Cerrar herméticamente
- No deben aportar volumen muerto

CONEXIONES/ CONECTORES



INYECTORES

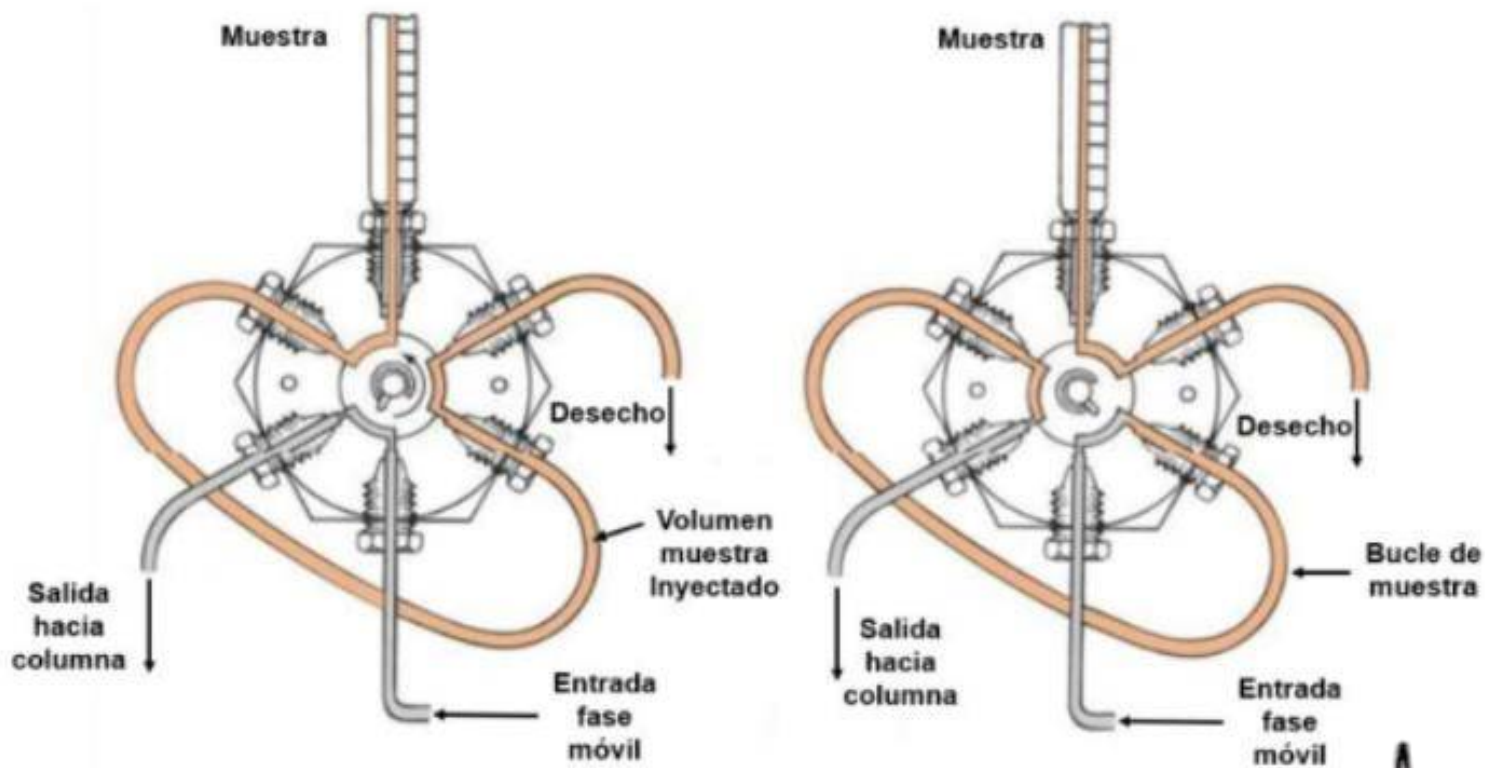
Inyector

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en el equipo sin interrumpir el caudal y manteniendo la presión del sistema.

Existen dos tipos de inyectores: manuales y automáticos



INYECTORES / INYECTOR MANUAL



INYECTORES / INYECTOR MANUAL

- El volumen del *loop* se selecciona en función del tamaño de columna
- Existen dos formas de llenado: completo (*full loop*) o parcial (*partial loop*)
- Volumen de inyección: llenado completo se debe cargar con al menos 3 a 5 veces el volumen del *loop* (RSD = 0,05 %). Llenado parcial debe emplearse un volumen no mayor al 50 % de su volumen nominal (0,5 %)



INYECTORES / INYECTOR MANUAL



INYECTORES / INYECTOR AUTOMÁTICO

- Utilizan una válvula de seis vías al igual que los inyectores manuales. Pueden accionarse de forma neumática o eléctrica.
- Permiten las dos formas de llenado del *loop* (*partial* o *full*)
- Poseen mayor precisión y productividad que los inyectores manuales.
- Se pueden hacer programas de inyección que incluyen, entre otras cosas, el control de temperatura, el lavado de jeringa y aguja, una preparación de la muestra en el vial (derivatización)

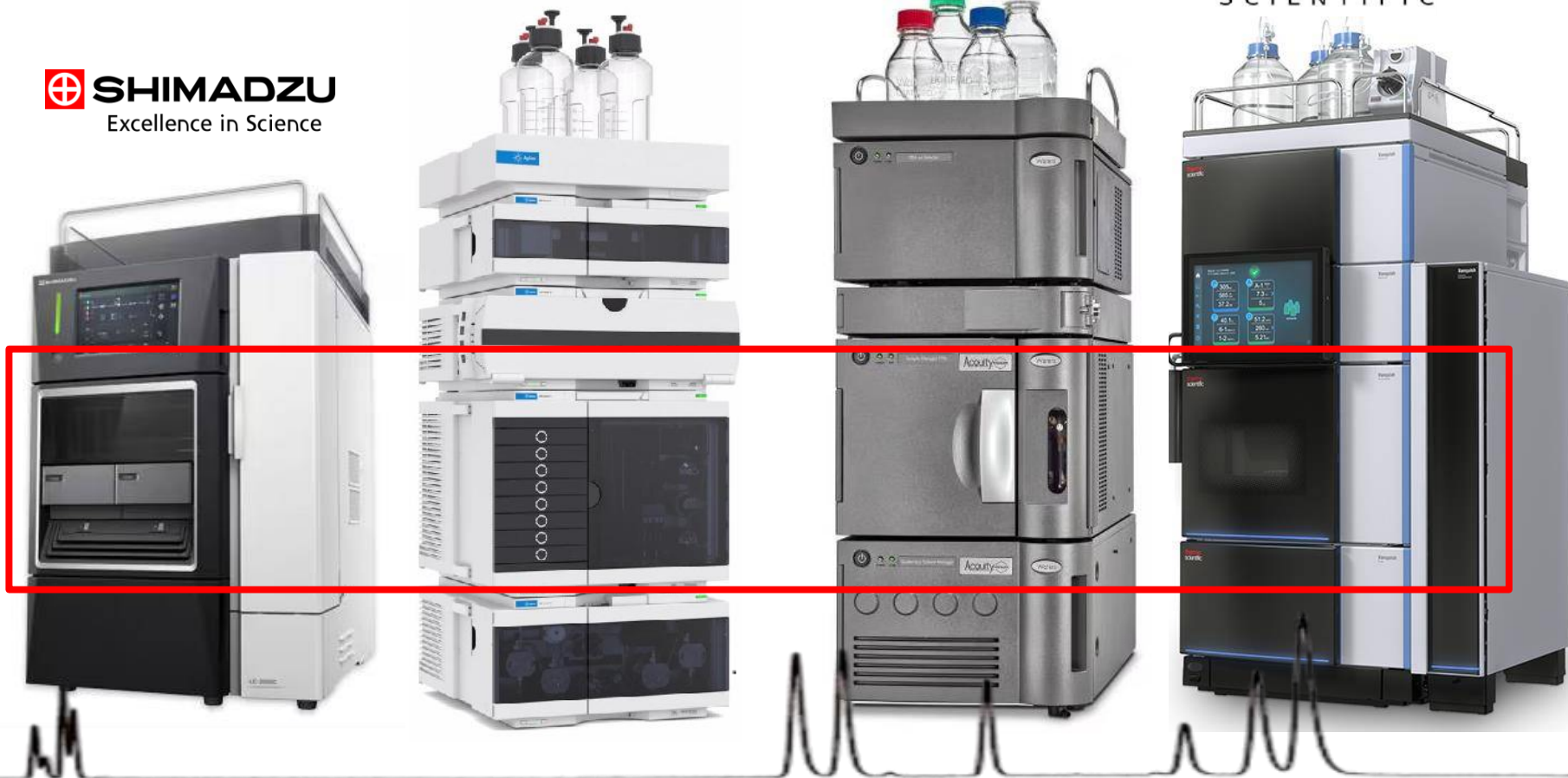
INYECTORES / INYECTOR AUTOMÁTICO

 **SHIMADZU**
Excellence in Science

 **Agilent**

Waters™

Thermo
SCIENTIFIC



INYECTORES / INYECTOR AUTOMÁTICO

Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids

- **Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC**

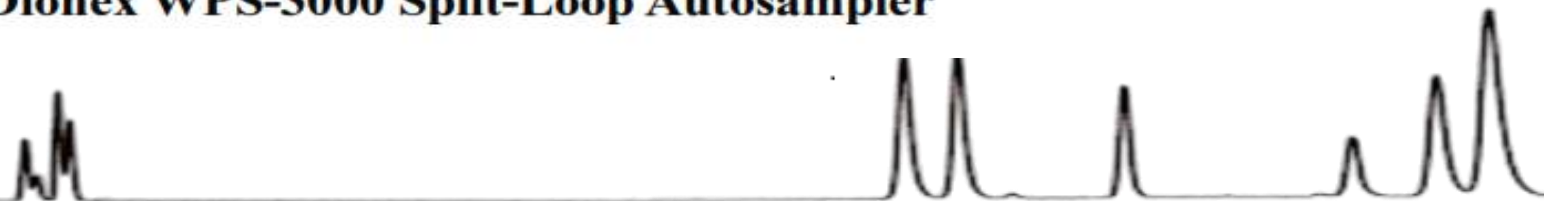
John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer,
and Cliff Woodward



Technical Note 107



Automated In-Needle Derivatization Applying a User-Defined Program for the Thermo Scientific Dionex WPS-3000 Split-Loop Autosampler



INYECTORES / INYECTOR AUTOMÁTICO

Existen dos diseños

- La aguja se deposita sobre el puerto de inyección durante toda la corrida. En este un solvente lava la aguja por fuera mientras que la fase móvil hace lo suyo por dentro
- La aguja toma la muestra del vial, la deposita del puerto de inyección, se retira para descansar en un puerto de lavado hasta la próxima inyección



INYECTORES / INYECTOR AUTOMÁTICO

