

# Curso de cromatografía de líquidos empleando software interactivo.

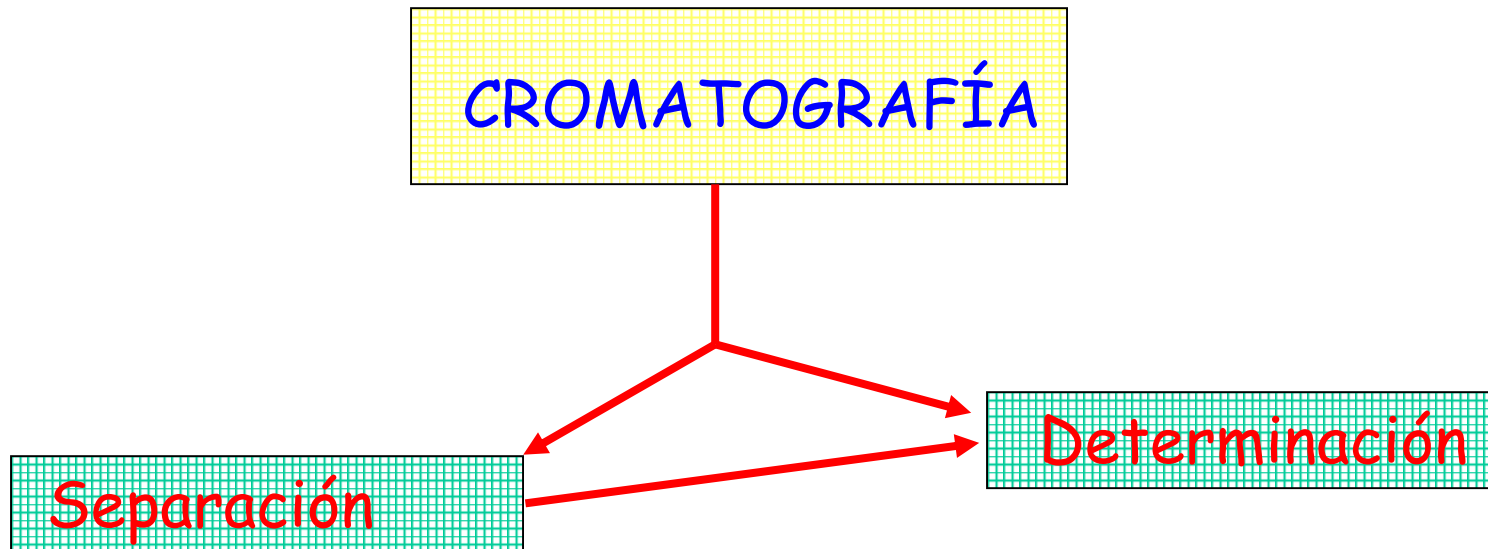
## Parte A

Dr. Juan Carlos Vázquez Lira

2023

- **Bases de la cromatografía**

# TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS



*Chroma* (color) *graphein* (escribir)

**Mikhail Tswet** (principios del siglo XX), utilizó una columna rellena de carbonato cálcico para separar varios pigmentos vegetales (Clorofilas y Xantofilas).

**A.J.P. Martyn** y **R.L.M. Singe** recibieron el Premio Nobel en 1952, por sus descubrimientos en este campo

# Definición

La cromatografía es una técnica físico-química de separación en el que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es fija o **estacionaria** y la otra **móvil**.

La velocidad de desplazamiento es función del coeficiente de distribución de cada componente entre las dos fases.

$$K_D = \frac{[A]_{FE}}{[A]_{FM}}$$

$F_E$	$F_M$
sólido	gas
líquido	líquido
gel	fluido sc

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \Delta G = -RT \ln K_D$$

# Clasificación

Fundamento del proceso  
cromatográfico

tipos de  
cromatografías

la naturaleza de las fases móvil y estacionaria y la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases, es decir, el mecanismo de interacción

Forma de realizar dicho  
proceso

técnicas  
cromatográficas

dispositivo utilizado para conseguir el contacto entre la fase móvil y la estacionaria

# Clasificación

## ❖ *La naturaleza de la fase estacionaria*

- Sólido (adsorción, reparto, intercambio iónico, afinidad, micelar, interacción hidrofóbica, partición centrifuga, quiral, pares de iones, exclusión molecular)
  - sólido-líquido (LSC)
  - sólido-gas (GSC)
  - Sólido-Fluido supercrítico (SFS)
- Líquido (reparto, intercambio iónico, afinidad, micelar, interacción hidrofóbica, partición centrifuga, quiral, pares de iones, exclusión molecular)
  - líquido-líquido (LLC)
  - líquido-gas (GLC)
  - líquido-Fluido supercrítico (LFS)

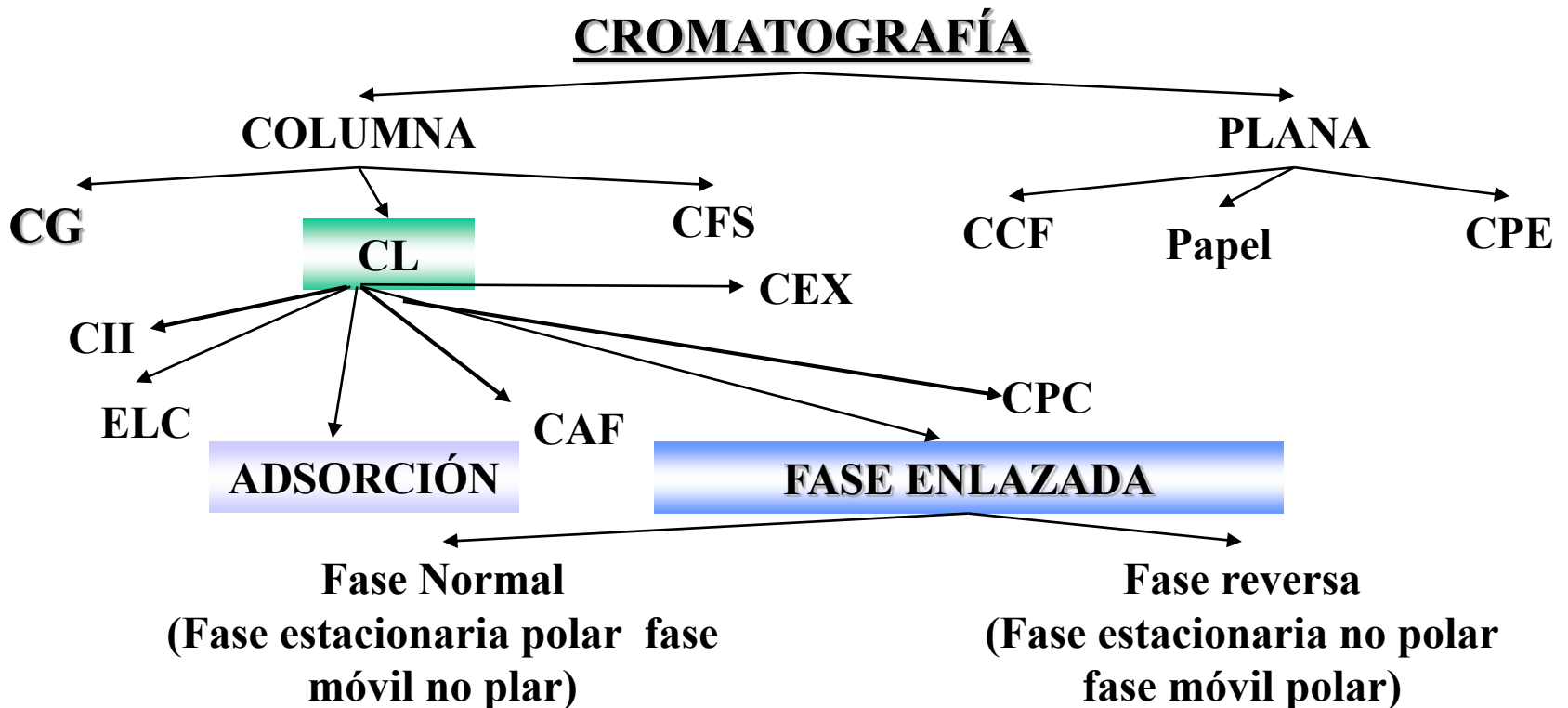
# Clasificación

- ❖ El dispositivo experimental
  - Plana
  - Columna
  
- ❖ Aplicación
  - Analítica 1 pg- 1  $\mu$ g
  - Semipreparativa 1  $\mu$ g- 1g
  - Preparativa > 1g

# Cromatografía

*Elución* de solutos:

- Gravedad
- Presión
- Fuerza centrífuga
- Potencial eléctrico

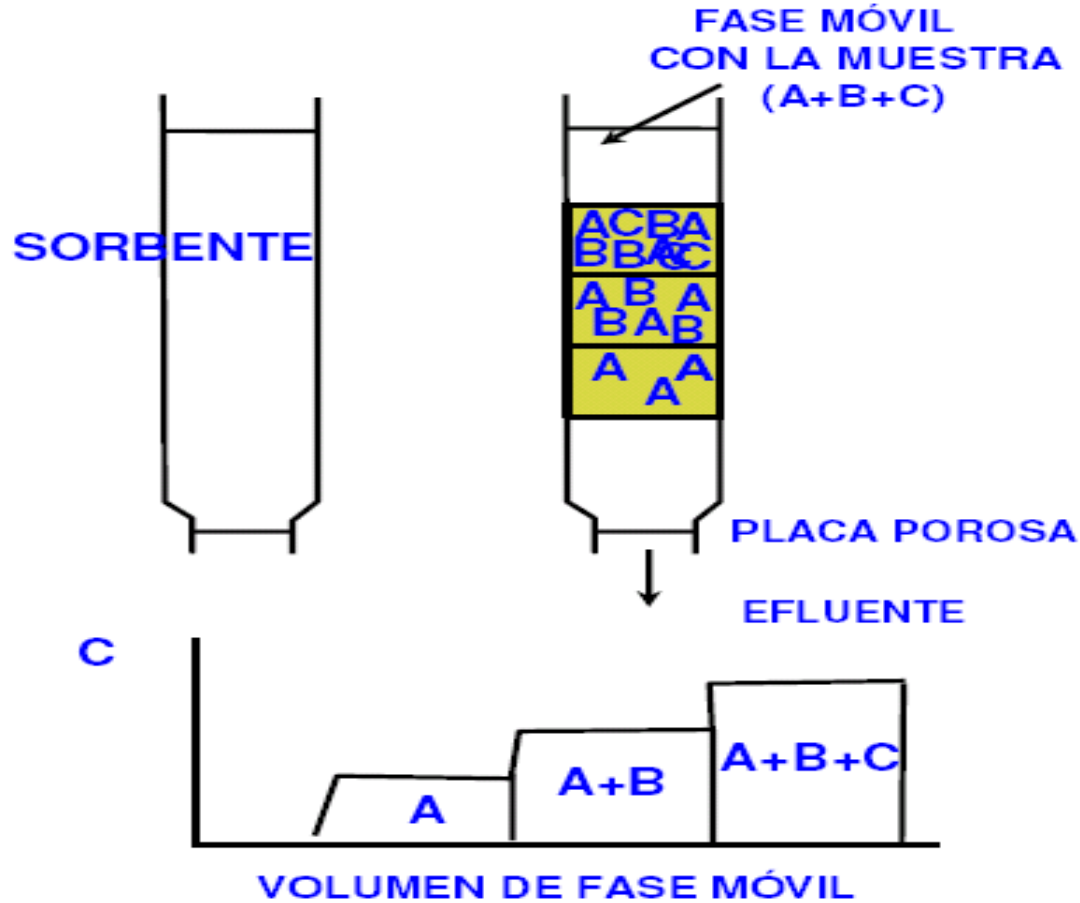




# Diferencias entre las técnicas cromatográficas

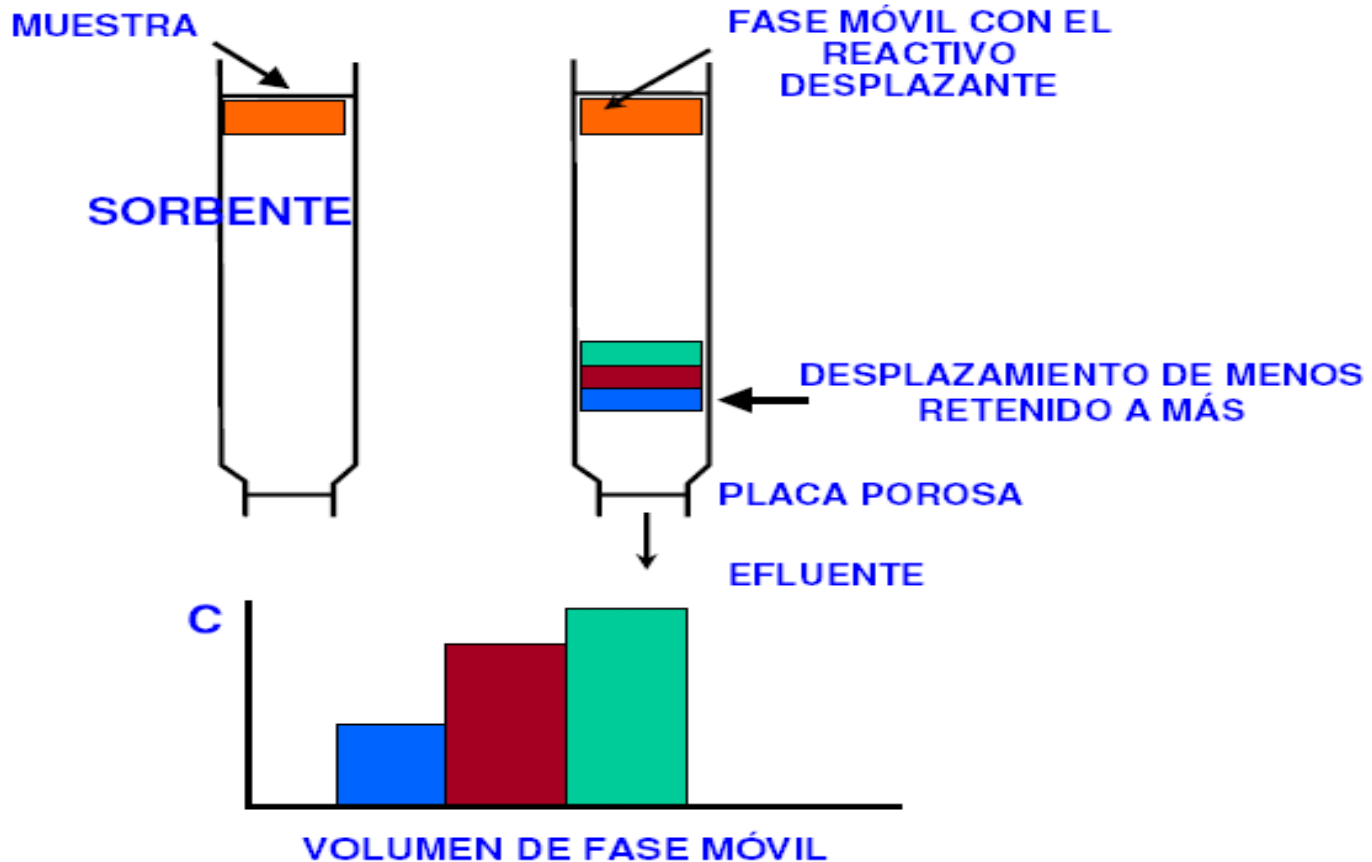
Propiedad	Gas (STP)	Fluido Supercrítico	Líquido
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	$0.6-2 \times 10^{-3}$	0.2-0.5	0.6-2
Coefficiente de difusión (cm <sup>2</sup> /s)	$1-4 \times 10^{-1}$	$10^{-3} \times 10^{-4}$	$0.2-2 \times 10^{-5}$
Viscosidad (g cm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$1-3 \times 10^{-4}$	$1-3 \times 10^{-4}$	$0.2-3 \times 10^{-2}$

# ANÁLISIS FRONTAL



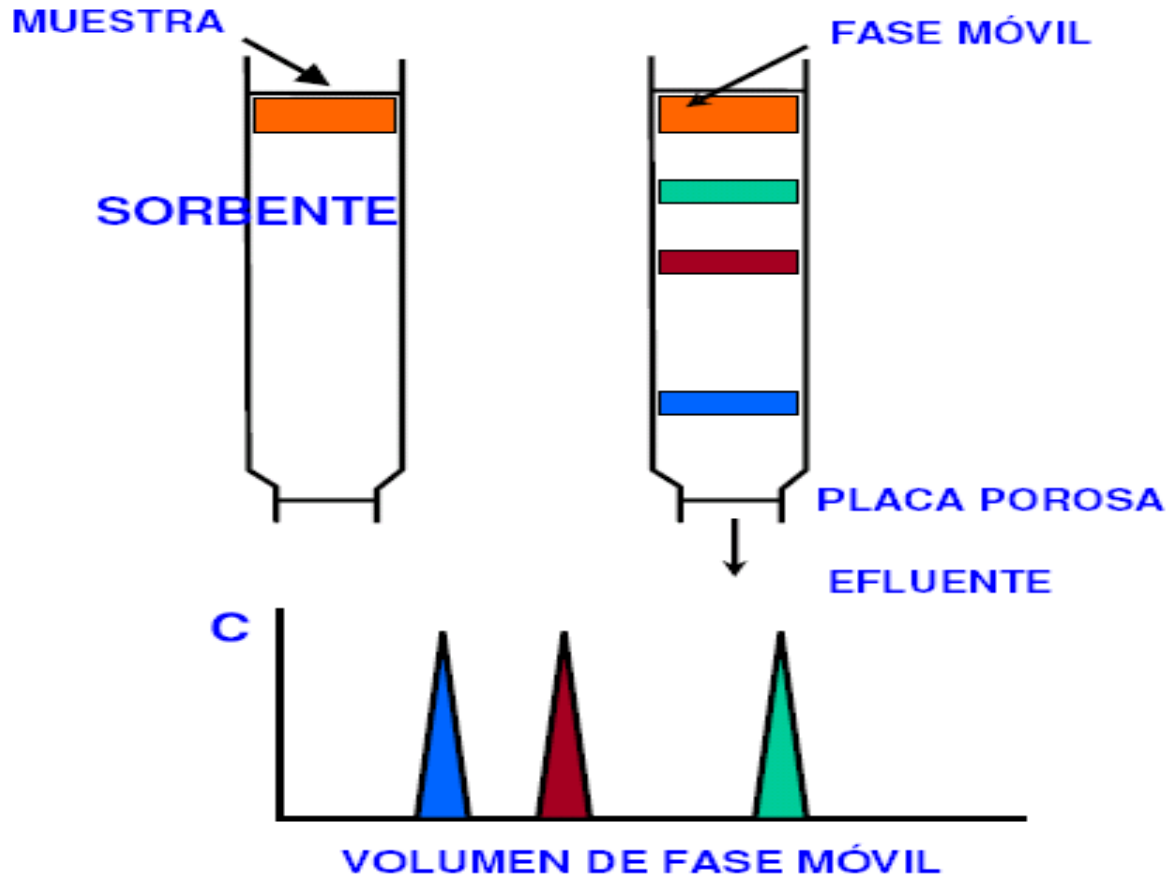
Se alimenta continuamente a la columna con una solución de la muestra, de esta forma se obtienen datos termodinámicos. Cuando la columna se satura comienzan a eluir los solutos en el efluente.

# ANÁLISIS POR DESPLAZAMIENTO



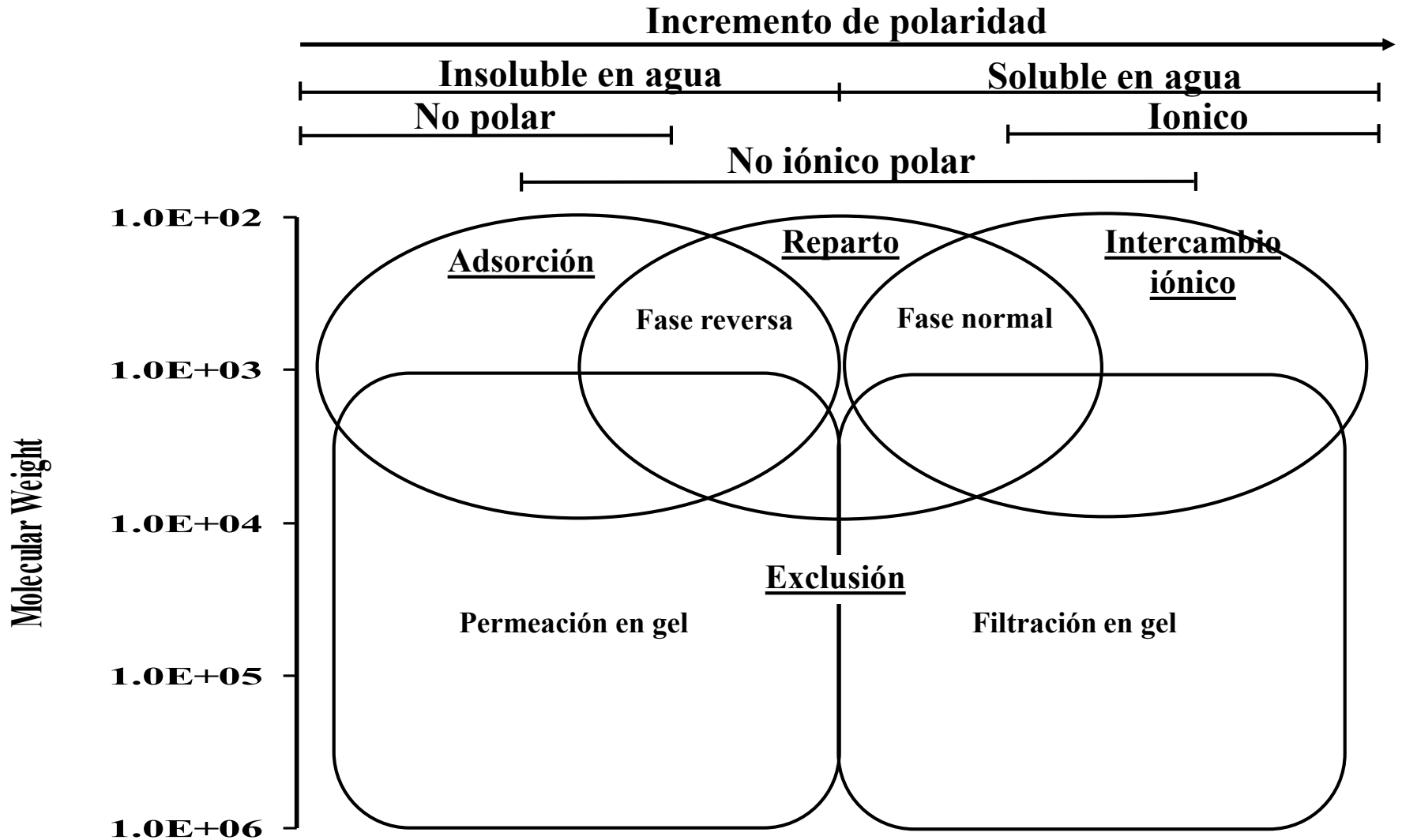
Se introduce la muestra como una solución. En una sola porción pero se hacen que los componentes eluyan por la columna por la adición continua de una solución o soluto que es más afín por la fase estacionaria que cualquier otro de los componentes de la muestra. Es utilizado más a escala preparativa.

# ANÁLISIS POR ELUCIÓN




Proceso por el cual el soluto es transportado por la columna añadiendo más disolvente (elución) y es la forma más corriente de realizar una separación.

# CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS



# Cromatografía líquida clásica

- Fase estacionaria (100 - 200  $\mu\text{m}$ )  gravedad
- Columna vidrio (1 m)
- Fuerza impulsora

## Inconvenientes

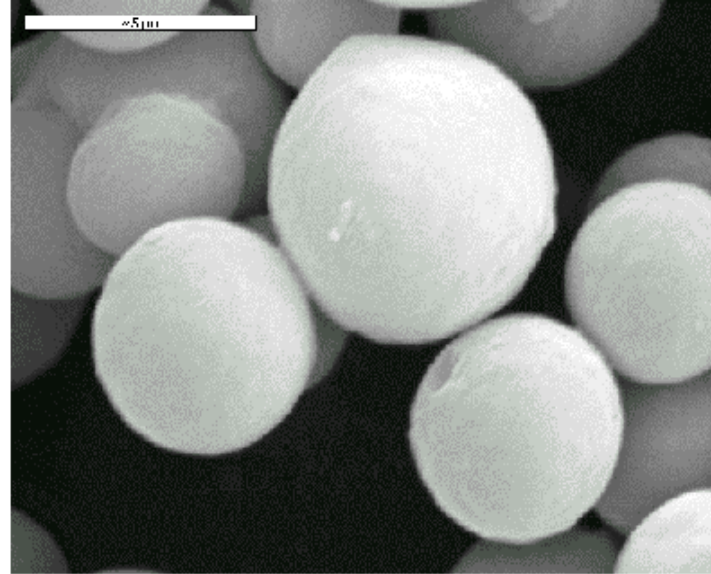
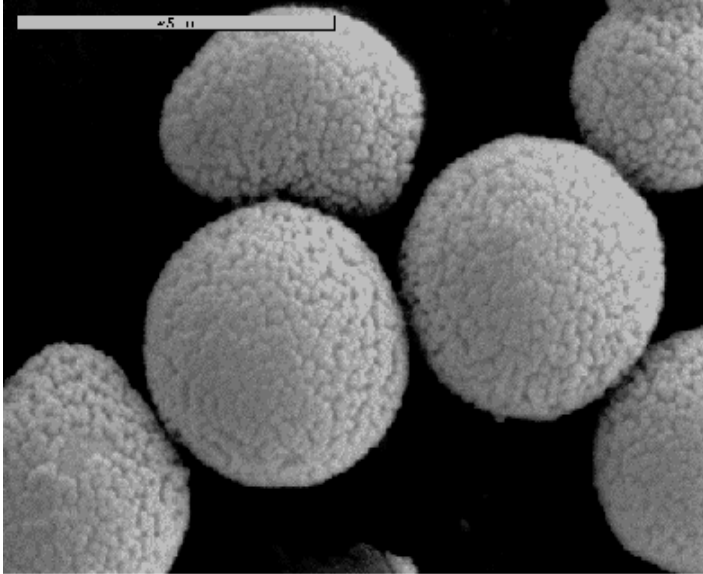
- Columnas muy largas en separaciones difíciles
- Eficiencia baja
- Poca sensibilidad
- Tiempo análisis largo
- Consumo muy alto disolventes

# Cromatografía de líquidos

- Reducción del tamaño de partícula para incrementar la eficiencia
- HPLC
- UPLC (reciente)
- CLAR
- CLAE
- CLAP
- CLUE (reciente)
- CLUR (reciente)

# Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAR, HPLC)

Fases estacionarias microparticuladas (3 - 10  $\mu\text{m}$ )



## Ventajas:

- Alta eficiencia
- Sensibilidad
- Tiempo análisis corto
- Consumo de disolventes reducido



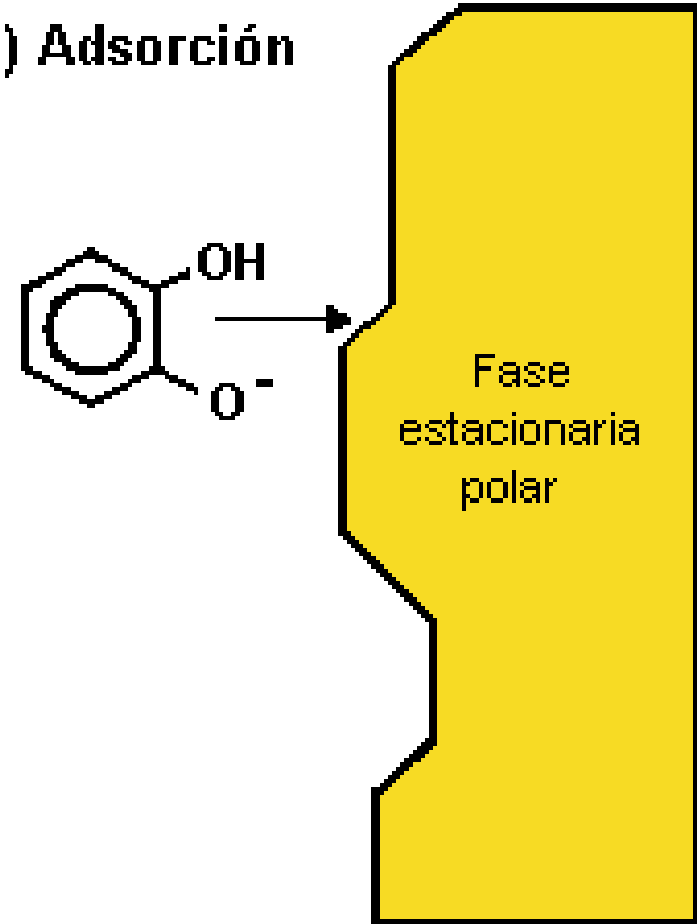
# Mecanismos de la separación (1)

Proceso físico - químico que rige la separación:

-Adsorción:

El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas de la fase estacionaria. Es un fenómeno superficial, aumentado con la formación de puentes de hidrógeno.

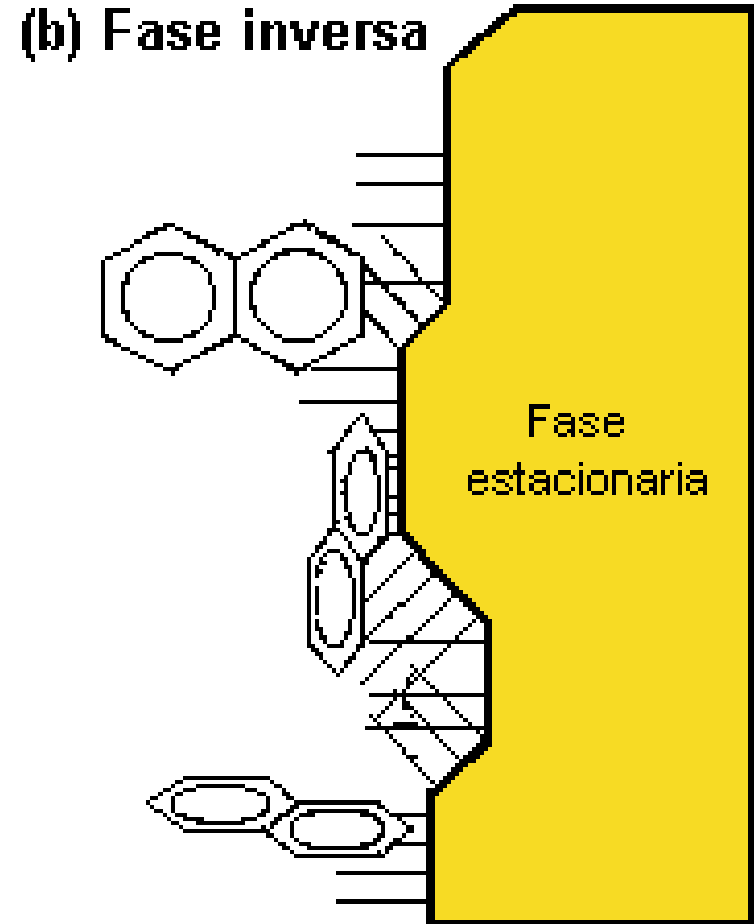
(a) Adsorción



## Mecanismos de la separación (2)

- Reparto:

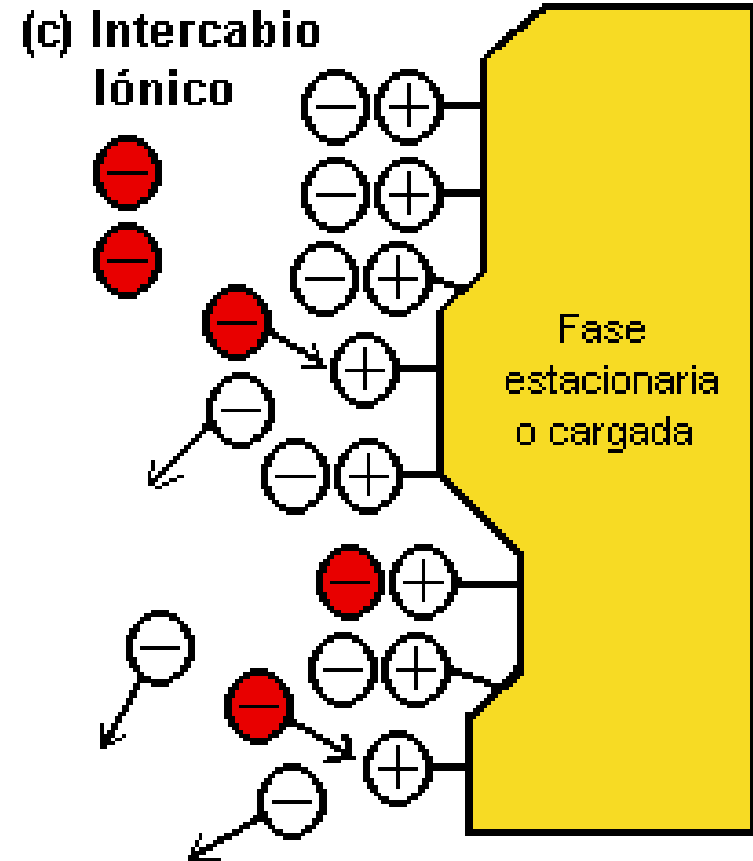
El soluto se equilibra entre el líquido de la fase estacionaria y la fase móvil, por diferencia de solubilidad. Hasta llegar a un equilibrio



## Mecanismos de la separación (3)

### - Intercambio iónico:

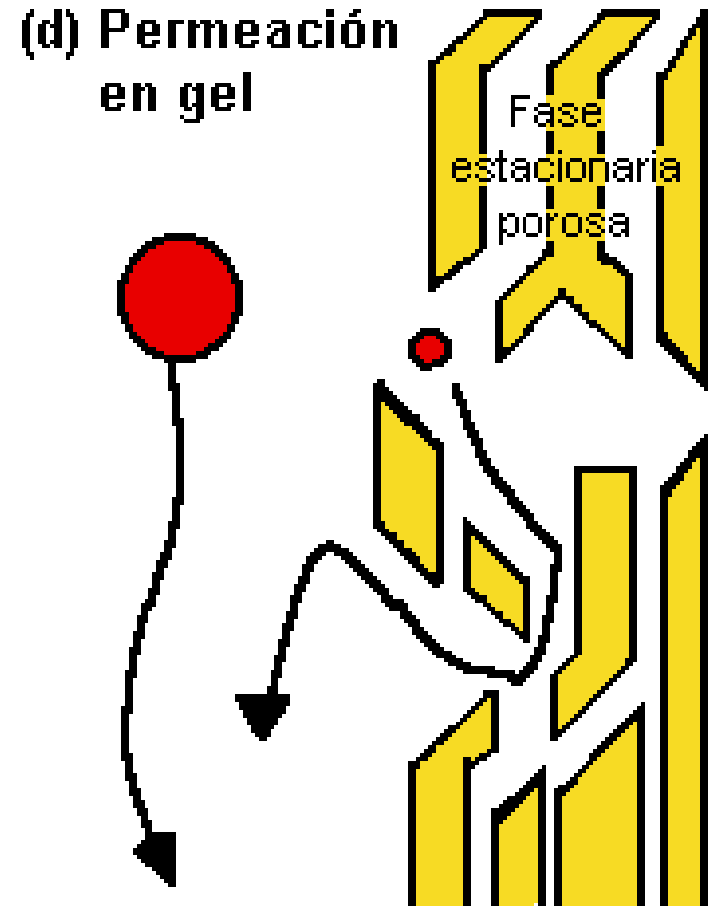
Los aniones o cationes se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida



## Mecanismos de la separación (4)

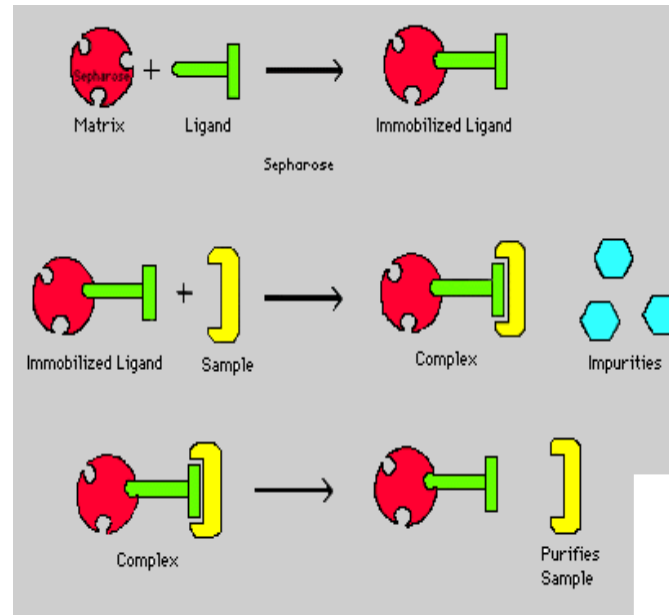
- Exclusión Molecular,  
Filtración o Permeación en  
Gel:

No existen interacciones  
entre la fase estacionaria y  
el soluto. Se separa por  
tamaño de partícula.

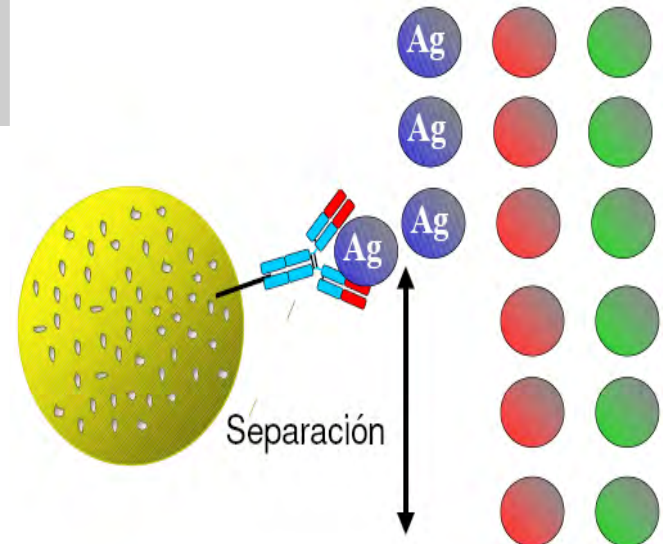


# Mecanismos de la separación (5)

## - Afinidad



La interacción de los solutos con la fase estacionaria es debida a interacciones tipo llave-cerradura muy selectivas



# Bases de la separación

- Coeficiente de reparto
- K de un analito:
- $K = C_s/C_m$ 
  - C = Concentración del analito
  - s = fase estacionaria
  - m = fase móvil
- $V_s$  = volume de fase estacionaria
- $V_m$  = volume de fase móvil

# CONCEPTOS BÁSICOS

**Elución** Proceso por el cual la FM atraviesa la columna

Eluyente → columna → eluato

**Velocidad de Fm**

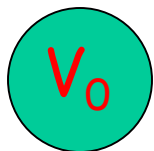
**Velocidad de flujo (mL/min) (F)**

volumen de disolvente que atraviesa la columna por minuto

**Velocidad lineal (cm/min) (u)**

longitud de columna atravesada por el disolvente en un minuto

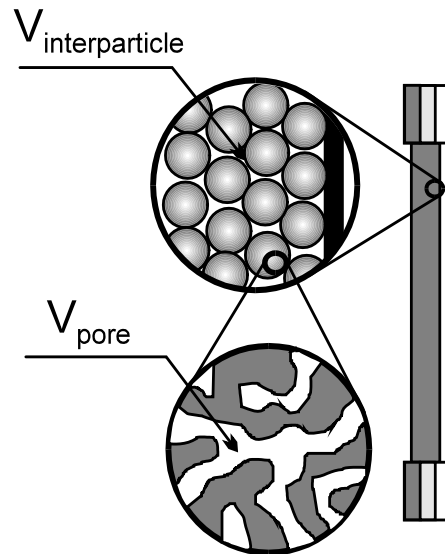
**Volumen muerto**



Representa físicamente los espacios intersticiales entre las partículas empaquetadas en la columna que son accesibles a la FM, e incluye además los volúmenes internos del sistema hasta su detección

# Volumen muerto

$V_o$ , Es el volumen de fase móvil dentro de la columna



$$V_o = V_{\text{interpart.}} + V_{\text{pores}}$$

$$V_o = V_{\text{column}} - V_{\text{particle}} + V_{\text{pores}}$$

Particles ar

$$V_o = 0.3V_{\text{column}} + V_{\text{pores}} \quad V_{\text{column}} = L\pi r^2$$

Volumen muerto = 65% del volumen de la columna vacía

$$V_o = 0.65 \frac{\pi D^2 L}{4}$$



# Determinación del volumen de fase móvil dentro de la columna $V_0$

Métodos directos

**Uso de compuestos inorgánicos y orgánicos no retenidos**

Métodos indirectos

**Marcación isotópica**

Información analítica  
relativa a la muestra

# Cromatograma

Representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo, volumen de eluyente o distancia en el lecho cromatográfico

funcionamiento del sistema  
cromatográfico

$t_0$

## Tiempo muerto

intervalo de tiempo que transcurre desde que el trazador es insertado al principio del lecho cromatográfico hasta que sale del mismo

$t_R$

## Tiempo de retención

el tiempo que tarda el máximo de un pico en ser eluido después de la inyección

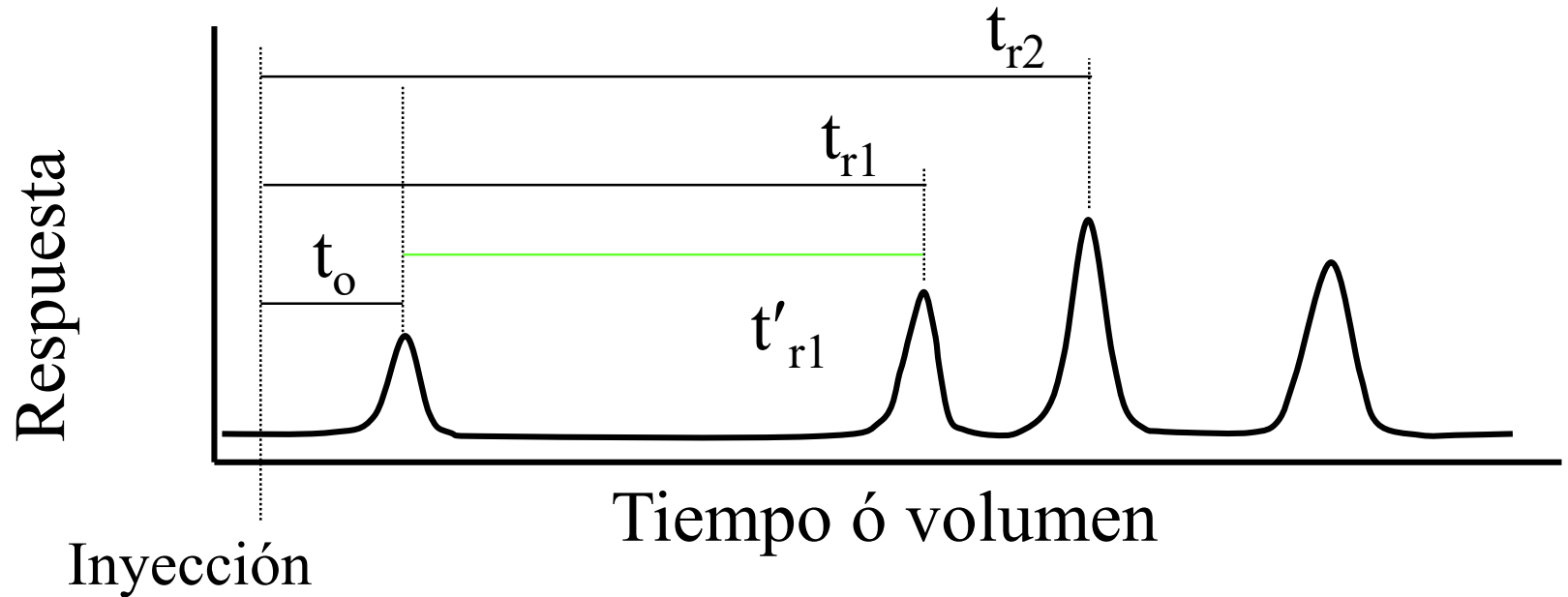
## Tiempo de retención relativo

$t'_R$

$$t'_R = t_R - t_0$$

diferencia entre el tiempo de retención del analito y el volumen muerto de la columna, es decir, el tiempo que un analito es retenido en la columna comparado con un compuesto no retenido

# CROMATOGRAMA



$t_o$  = tiempo que necesita la fase móvil para llegar al detector desde el inicio de la columna

$t_r$  = tiempo de retención

$t'_r$  = tiempo relativo =  $t_r - t_m$

# Fracción de analito en la fase móvil

---

$q$  = fracción de analito en la fase móvil

$$q = \frac{\text{moles}_m}{\text{moles}_s + \text{moles}_m} = \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s}$$

$$q = \frac{1}{1 + \frac{C_s V_s}{C_m V_m}} \longrightarrow q = \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

$$K \frac{V_s}{V_m} = \text{factor de capacidad} = k'$$

## Proceso de retención (Equilibrio)

$$V_R = V_0 + SK$$

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{S}{V_0} K$$

$$K = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) = \exp\left(\frac{\Delta G_{analito} - \Delta G_{eluyente}}{RT}\right)$$

$$\ln(k') = \frac{\Delta G_{analito} - \Delta G_{eluyente}}{RT} + \ln\left(\frac{S}{V_0}\right)$$

# Factor de capacidad o de retención

Es la relación entre el tiempo que las moléculas del analito están en la fase estacionaria y el que están en la fase móvil.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

$$k' = \beta K_D$$

$$k' = \beta D$$

$$k' = \frac{\text{tiempo que el soluto pasa en la FE}}{\text{tiempo que el soluto pasa en la FM}} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

$$t_R = t_0 (1 + K')$$

$$\beta = V_s / V_m$$

# Relaciones de volumen

Volumen muerto

volumen que ocupa en la columna la FM

$$V_0 = t_0 F$$

Volumen retención

volumen de FM necesario para que se produzca la elución de un soluto

$$V_R = t_R F$$

Volumen retención relativo

$$V'_R = t'_R F$$

Factor de capacidad

$$k' = V'_R / V'_0$$
$$V_R = V'_R + V_0$$

$$V_R = V_0 (1 + k')$$

$$V = tF$$

# ENSANCHAMIENTO DE BANDA

## Plato teórico

La longitud de una columna en la que el soluto experimenta un equilibrio completo entre las dos fases

Eficiencia de una separación cromatográfica

número de platos  
teóricos (N)

altura del plato  
teórico (H)

$$N = L/H$$

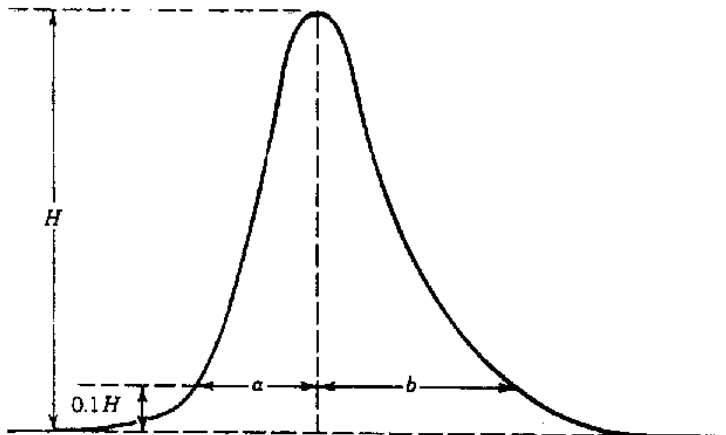
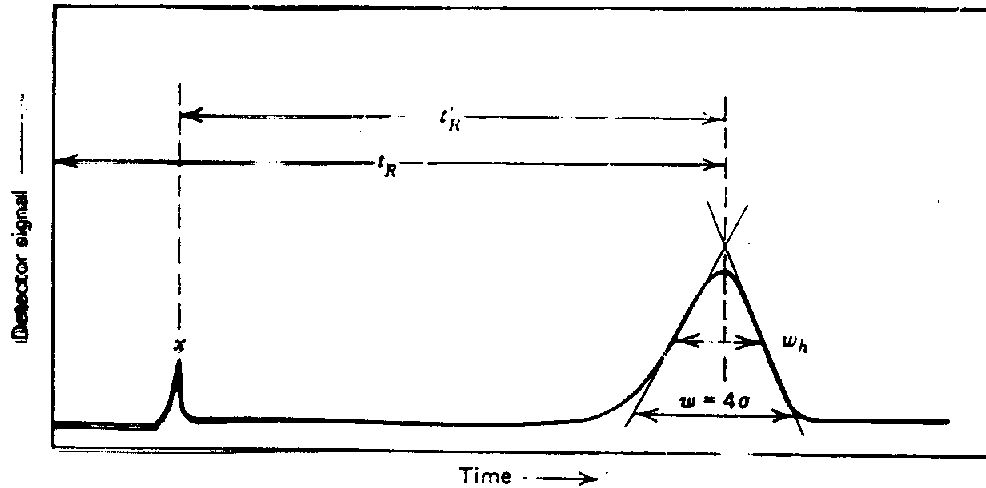
Altura del plato teórico reducida  $h = H/d_p$

4 a 10 buena columna

La eficiencia de la columna aumenta cuanto mayor es el número de platos teóricos y menor la altura del mismo.



Una columna cromatográfica es más eficaz cuando menor sea el ensanchamientos de banda que genera.



$$N = t_R^2 / \sigma_t^2$$

$$N = 16 t_R^2 / W_b^2$$

$$N = 4 t_R^2 / W_i^2$$

$$= 5,54 t_R^2 / W_h^2$$

$$N = \frac{41,7 (t_R / W_{0,1})^2}{\left( \frac{A}{B} + 1,25 \right)}$$

# Teoría cinética

- velocidad finita a la cual el soluto alcanza el equilibrio entre ambas fases
- la forma resultante de la banda depende
  - velocidad de elución
  - difusión del soluto a lo largo de la columna
  - existencia de diferentes caminos que las diversas moléculas de soluto pueden seguir cuando se mueven entre partículas de la fase estacionaria.



estos efectos dependen de la velocidad con que la fase móvil atraviesa la columna, y constituyen un mecanismo diferente de ensanchamiento de banda cromatográfica.

Ecuación de van Deemter para la AEPT(CG)

Ecuación de Knox (CL)

$$H = A + B/u + Cu$$

Existe una velocidad óptima para operar con cualquier columna, a la cual la AEPT alcanza un valor mínimo

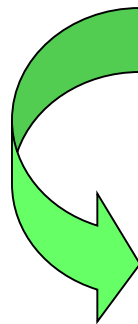
A, B y C son ctes características de un sistema dado:

- coeficiente de difusión axial
- coeficiente de difusión longitudinal
- coeficiente de transferencia de masa

H : cm

u: velocidad lineal de Fm (cm/s)

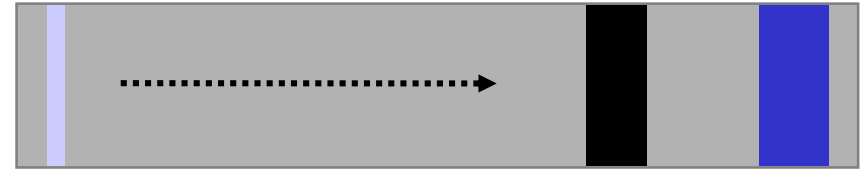
B, C<sub>S</sub>, C<sub>M</sub>: ctes relacionadas con las propiedades de la columna y del analito



Mecanismo diferente de ensanchamiento de la banda

$$H = A + B/u + C_S u + C_M u + C_{Mi} u$$

# Por que se ensanchan los picos

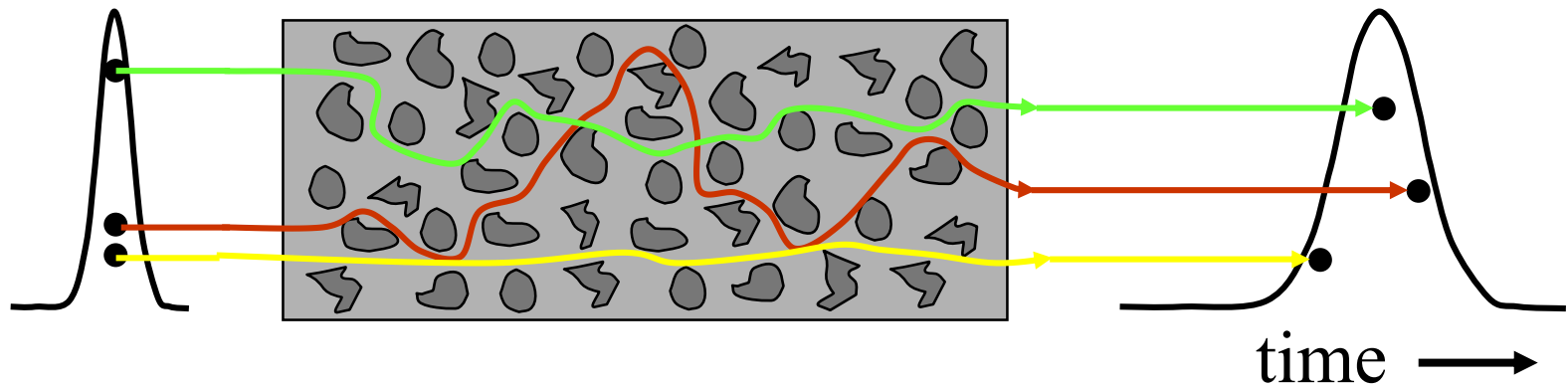


- Ensanchamiento de banda

- Causas:

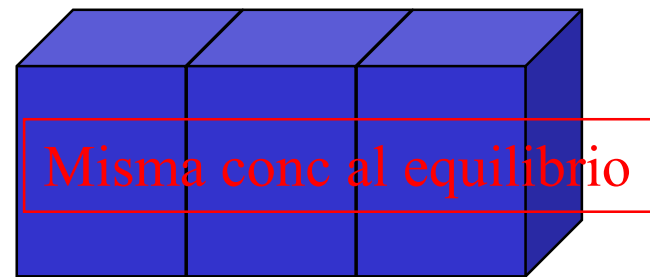
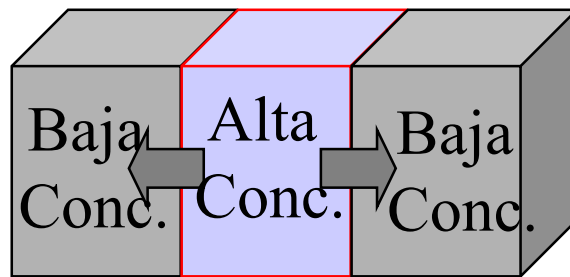
- Difusión longitudinal
- Resistencia a la transferencia de masa
- Difusión axial o tipo Eddy

# Difusión Eddy o axial



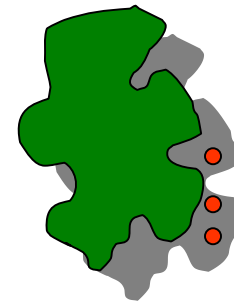
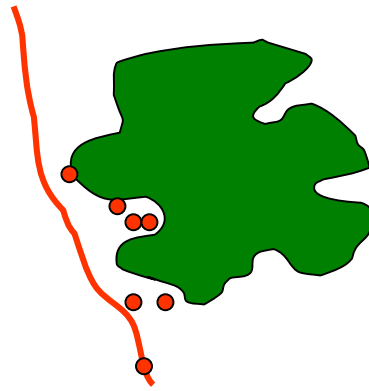
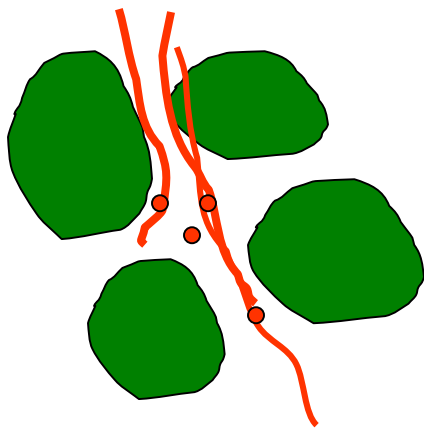
# Difusión longitudinal

La concentración del soluto es distinta conforme avanza en la columna.



$$B = 2 \gamma D \quad (\gamma \text{ Factor de obstrucción})$$

# Resistencia a la transferencia de masa



# Ecuación de Knox

$$H = v^{0.33} + 2/v + 0.05v$$

$$H = A + B/u + Cu$$

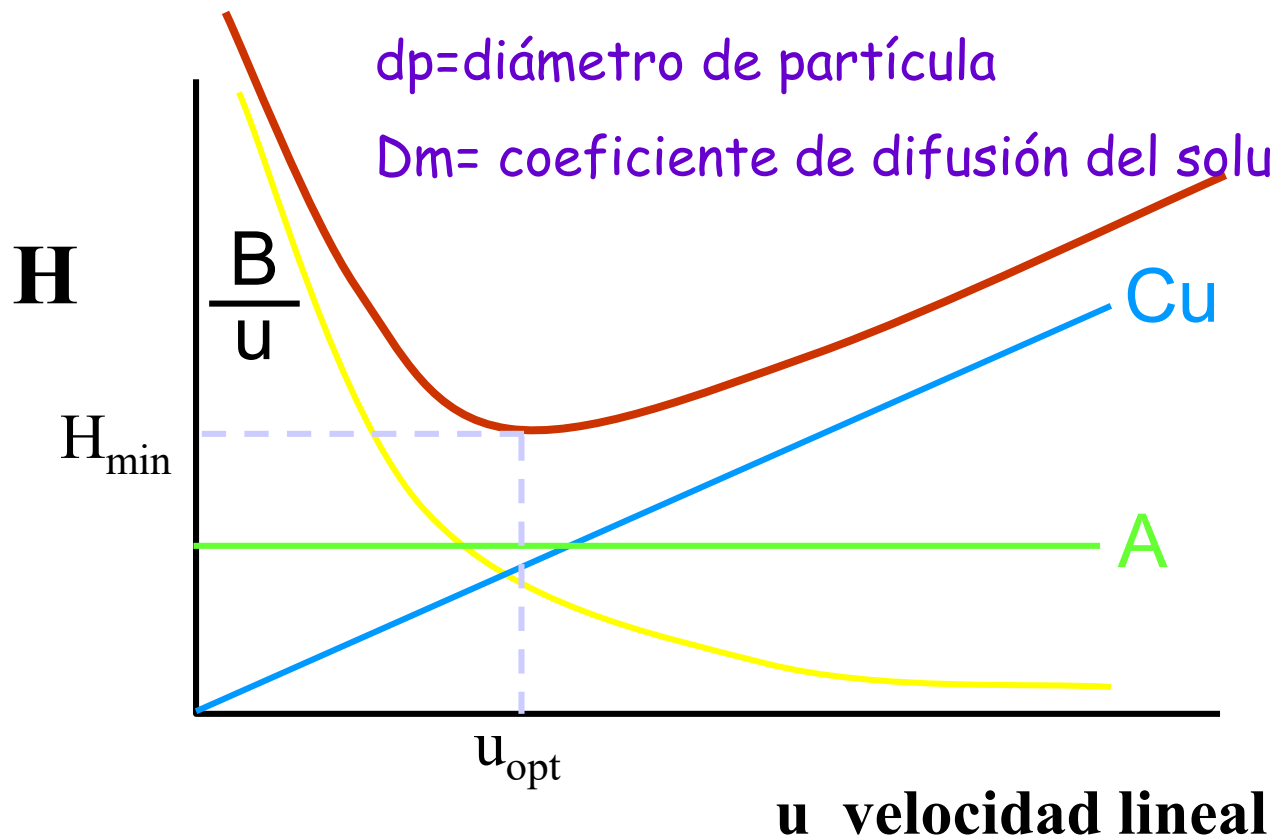
$$H = A + B/u + (C_S + C_M + C_{Mi})u$$

$v$  = velocidad lineal reducida

$$v = u_{dp}/D_m$$

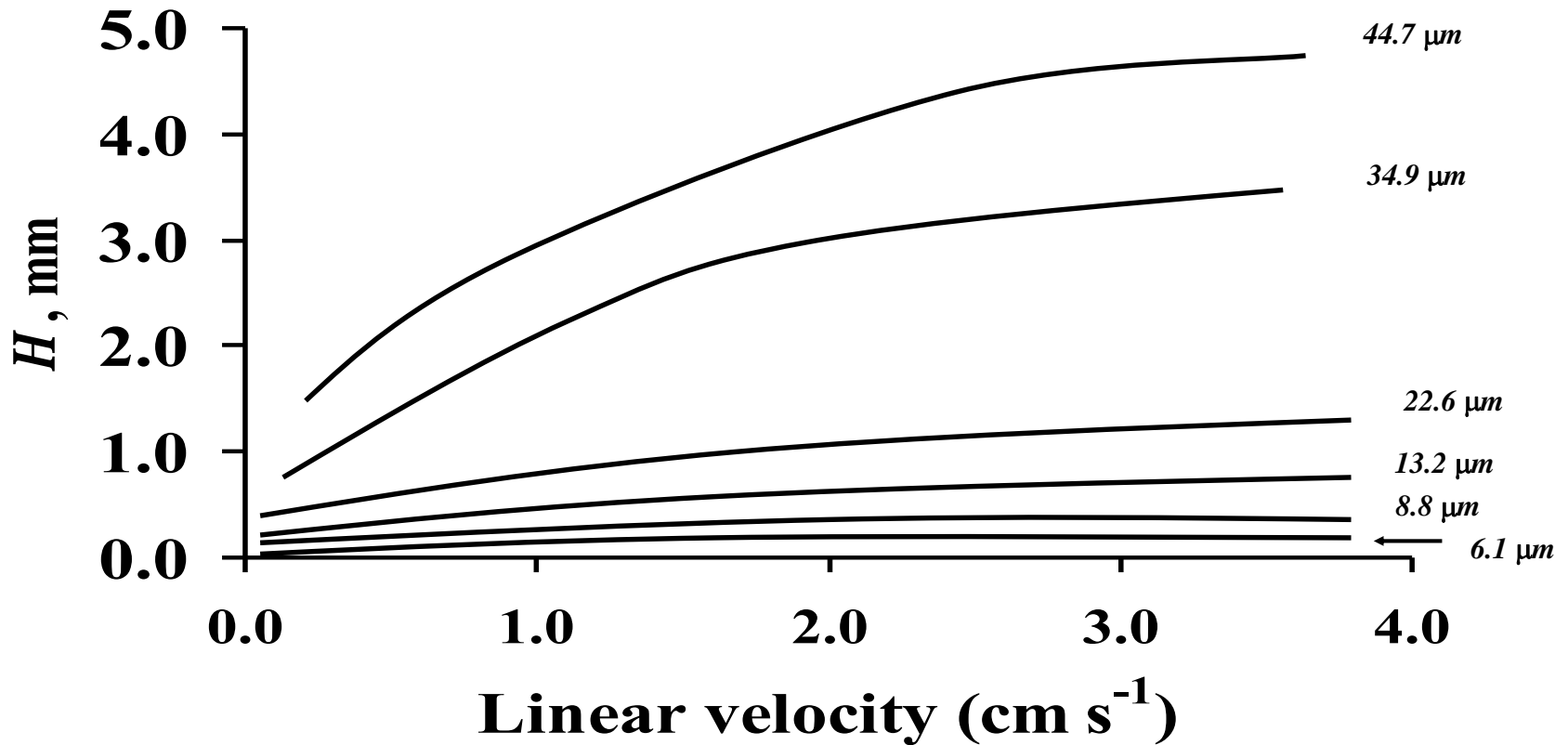
$d_p$  = diámetro de partícula

$D_m$  = coeficiente de difusión del soluto en fase móvil.





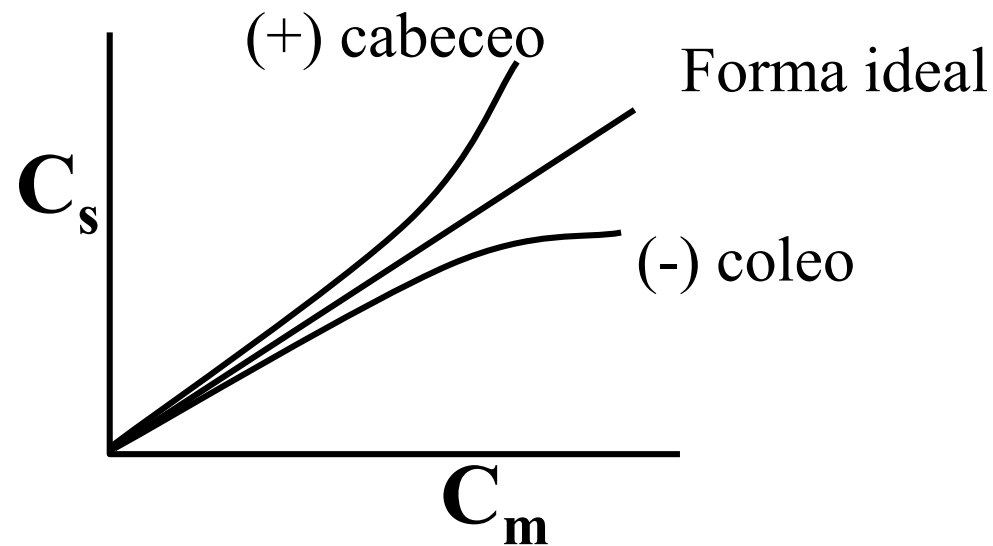
## Efecto del tamaño de partícula en la eficiencia



Cromatografía de fase enlazada: 3 - 10  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula

# Picos asimétricos

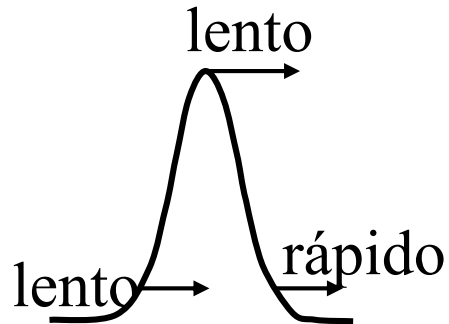
- K depende de la concentración



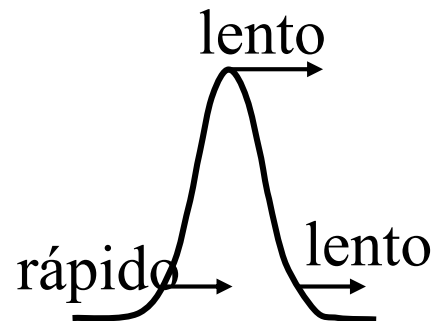
# Asimetría del pico

Factor de asimetría  $T = b/a$  tomado al 10 % de la altura del pico

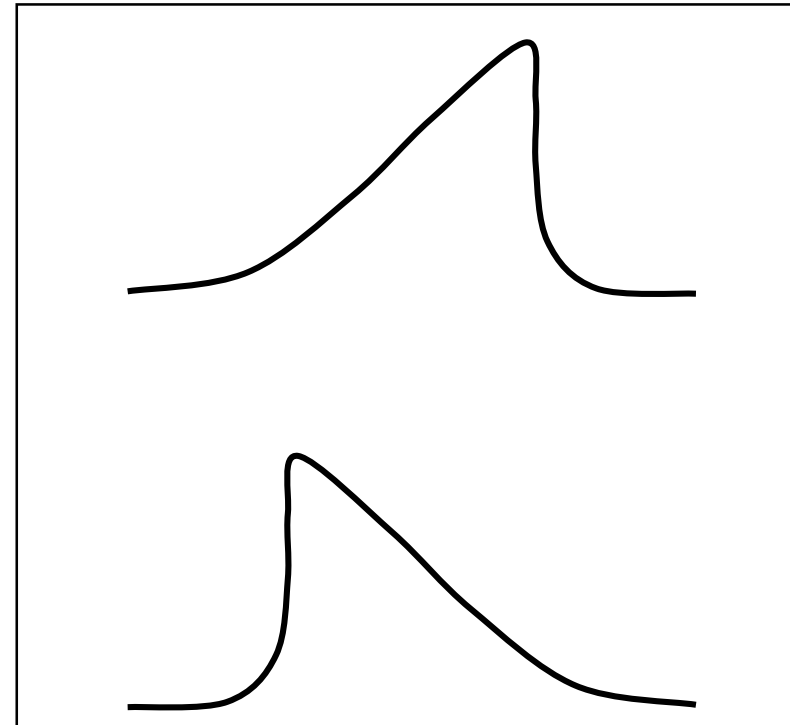
(+) cabeceo:



(-) coleo:



Cromatograma



time

# Resolución

Es un factor que se refiere a la capacidad de un sistema cromatográfico para separar dos sustancias, teniendo en cuenta no sólo la separación entre picos, sino también los anchos de la banda

$$R = 2(t_{R,2} - t_{R,1}) / (W_{b,1} + W_{b,2})$$

$$R = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2}{1 + k_2} \frac{\sqrt{N}}{4}$$

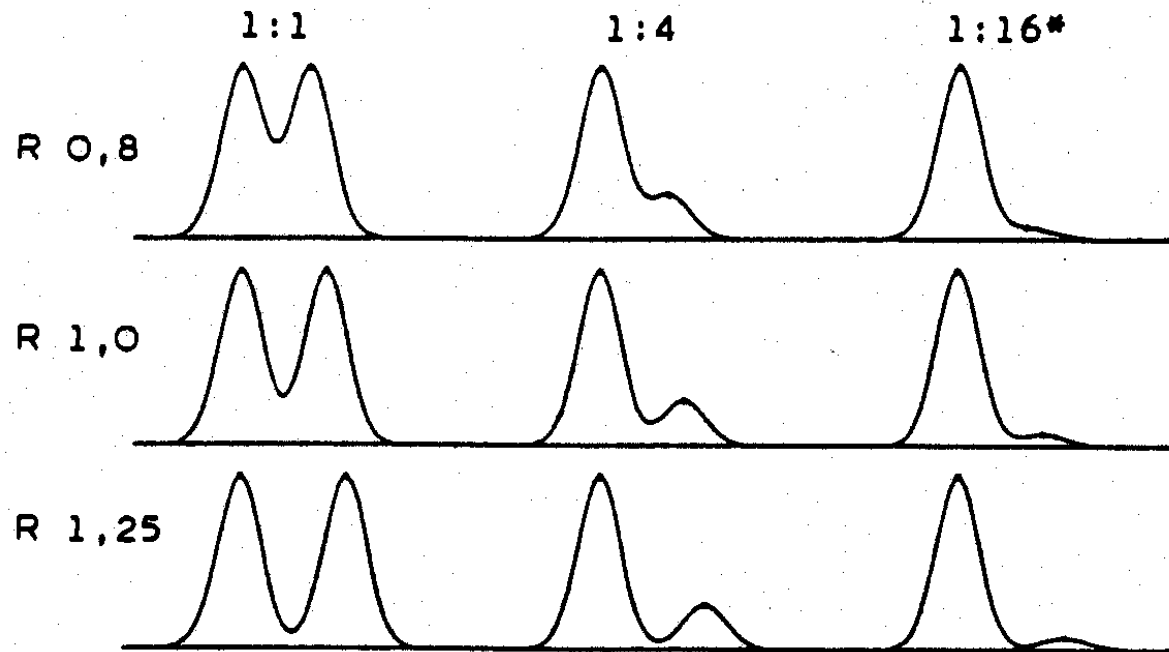
Selectividad ( $\alpha$ ), se relaciona con los valores de retención relativa y mide el poder discriminatorio del sistema cromatográfico.

Retención ( $k'$ ), mide la fracción de eluito presente en la FE y expresa el poder de retención del sistema cromatográfico.

Eficiencia ( $N$ ), mide la estrechez relativa de los picos mediante el número de platos teóricos con que funciona la columna

# Resolución

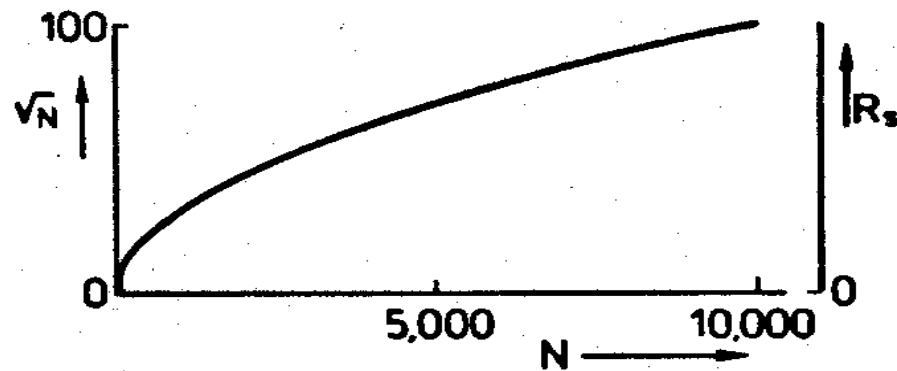
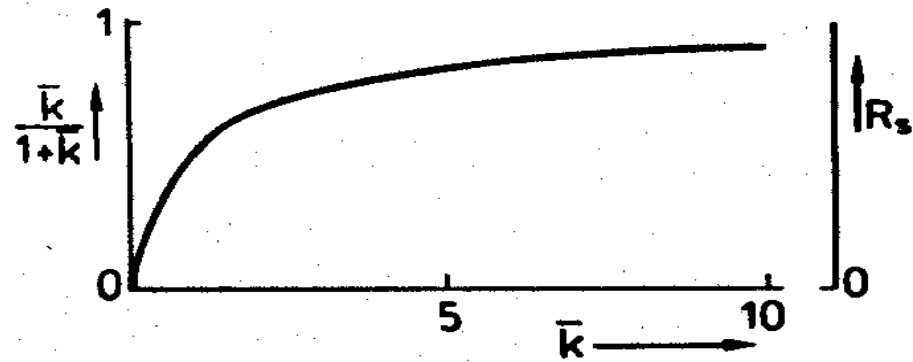
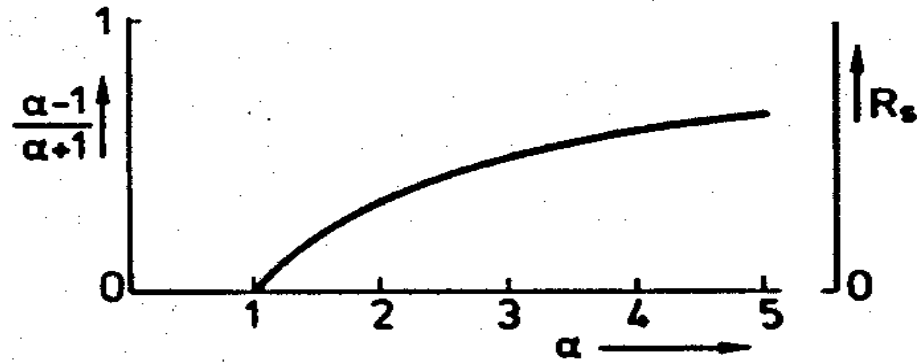
- Resolución: Valor alto de R, mejor separación



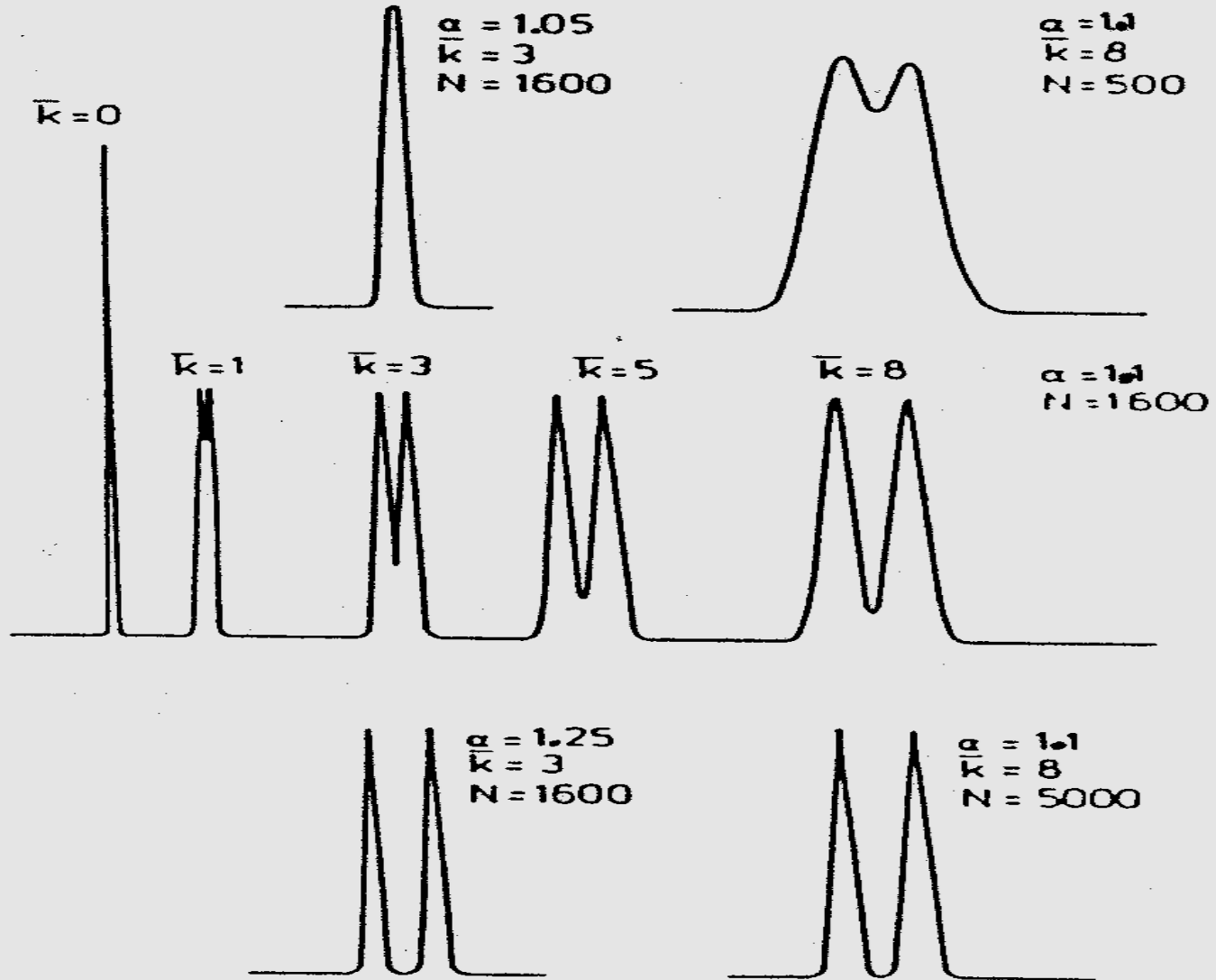
$R \geq 1.5$

Es adecuada

# Resolución



# Resolución



# Flujo dentro de la columna y caída de presión

$$Rn = \frac{\rho u d}{\eta}$$

$Rn > 2100$  flujo turbulento  
 $Rn < 2100$  flujo laminar

$$\Delta P = \frac{u l \eta \Phi}{d p^2}$$

Caída de presión

$\Phi = 1000$  Empaque irregular

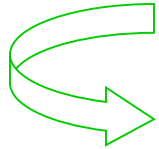
$\Phi = 500$  Empaque esférico



# Optimización del proceso cromatográfico

## Objetivo

conseguir picos bien definidos y separados en el menor tiempo posible de análisis



variando las condiciones experimentales:

- velocidad de flujo,
- tamaño de partículas de soporte,
- temperatura de la columna,
- selección de fase móvil y estacionaria más adecuada,
- aumentando la longitud de la columna, etc

La ecuación de la resolución sirve de guía para elegir las condiciones que permitan una buena separación:  $\alpha$ ,  $K'$  y  $N$  pueden ajustarse más o menos independientemente.

- modificar  $\alpha$  y  $K'$ : la composición de las fases
- cambiar  $N$  modificando la longitud de la columna, y  $H$  variando el caudal de fase móvil, el tamaño de partícula del relleno, la viscosidad de la fase móvil y el grosor de la película de líquido adsorbido que constituye la fase estacionaria.

# Variación de N

Aumento del número de platos de la columna mejora la resolución:

longitud de la columna, temperatura, tipo de analito, caudal, tamaño de la muestra, técnica de inyección, etc.

El resultado es un estrechamiento de las bandas con el consiguiente aumento de la altura de las mismas; el tiempo de retención prácticamente no se modifica.

# Variación de H

- disminuir el tamaño de partícula del relleno
- reducir la viscosidad de la fase móvil líquida

# Variación de $k'$

Un aumento de  $k'$  generalmente aumenta la resolución pero también el tiempo de elución. Intervalo óptimo de valores de  $k'$ : 1 a 5 y de 2 a 10 con más de 5 picos

- Con fases móviles líquidas, cambiando la composición del disolvente.

# Variación de $\alpha$

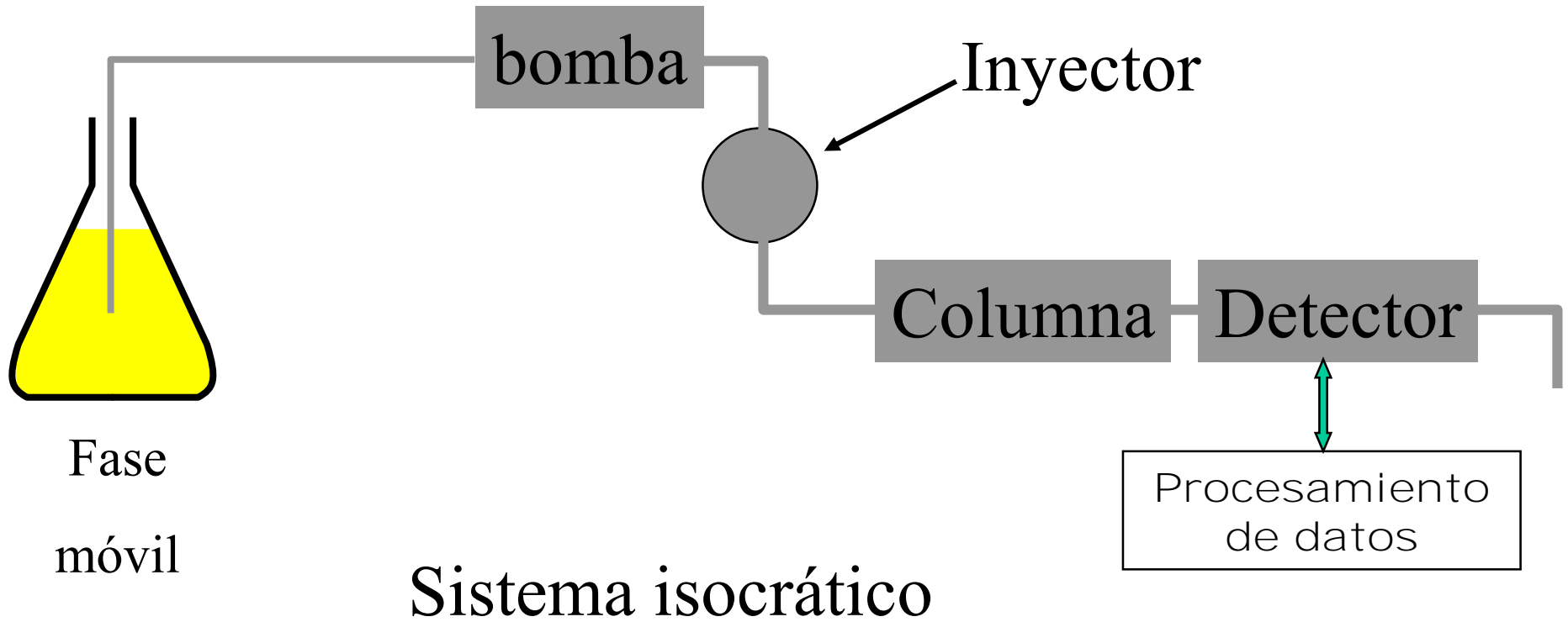
Un aumento en el factor de selectividad produce un desplazamiento relativo de los máximos de las bandas, con un rápido aumento de la resolución.

Los procedimientos para aumentar  $\alpha$  sin modificar significativamente  $K'$  son, por orden decreciente de conveniencia:

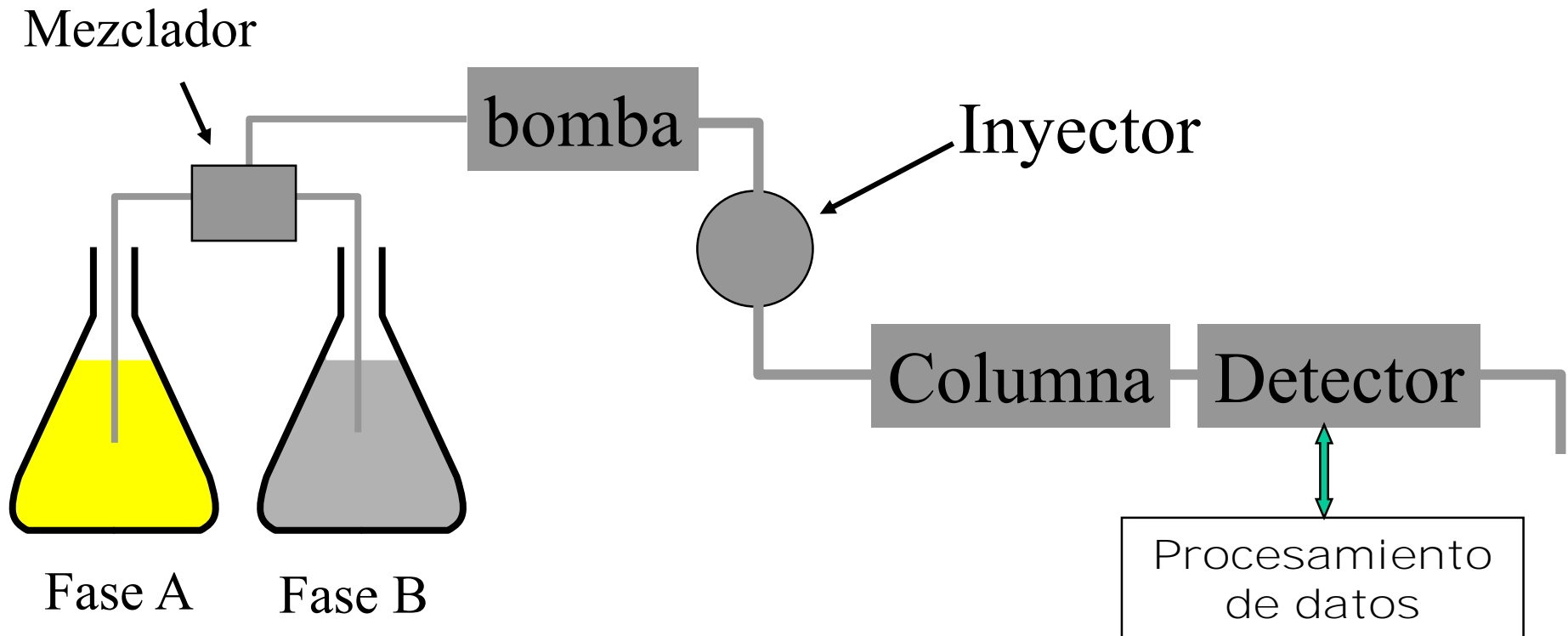
# Variación de $\alpha$

1. cambiar la composición de la fase móvil incluyendo cambios en el pH (en separaciones de ácidos o bases ionizables)
2. cambiar la temperatura de la columna, muy útil sobre todo en cromatografía de cambio iónico
3. cambiar la naturaleza de la fase estacionaria: disponer de varias columnas fácilmente intercambiables
4. utilizar efectos químicos especiales; incorporar a la fase estacionaria una especie que forme complejos o interacciones de otra forma con uno o más componentes de la muestra.

# CLAR Equipo



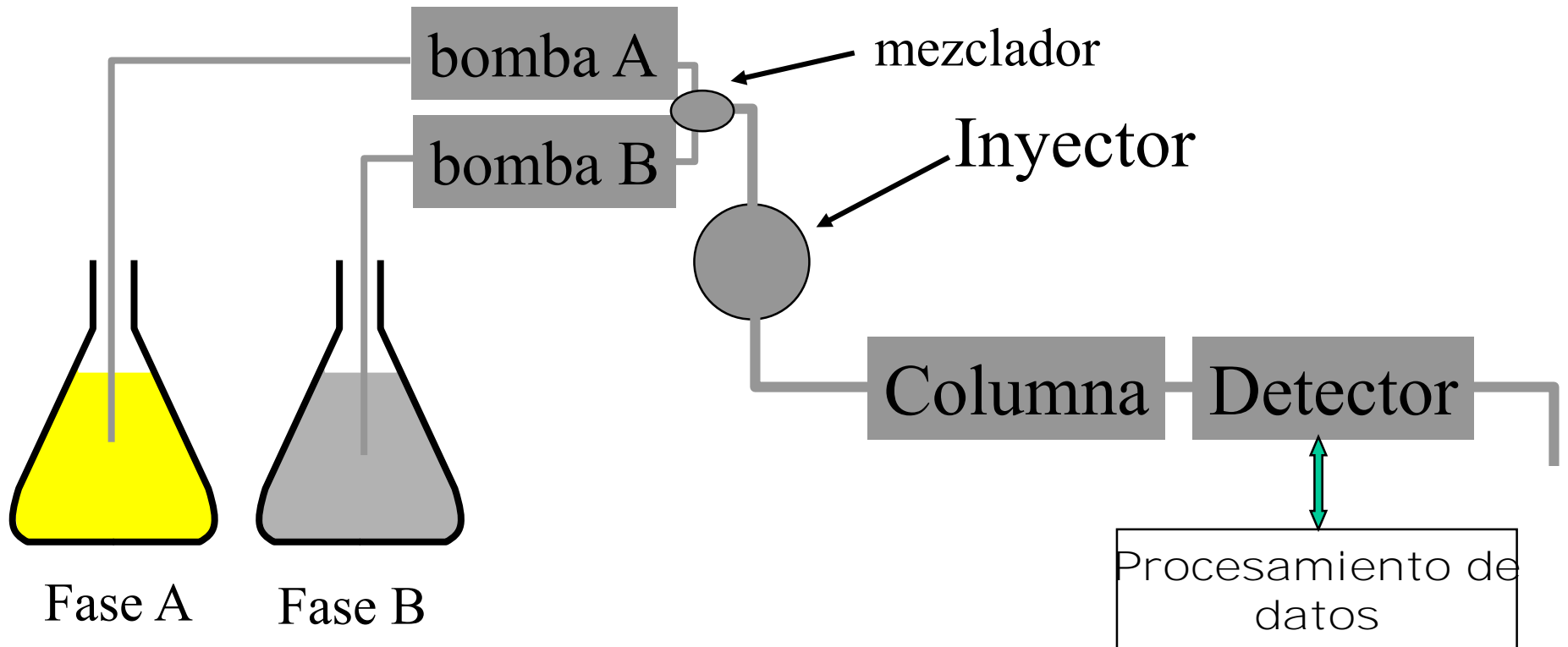
# CLAR Equipo



Sistema para gradiente: 2 o más  
disolventes (mezclado en baja presión)



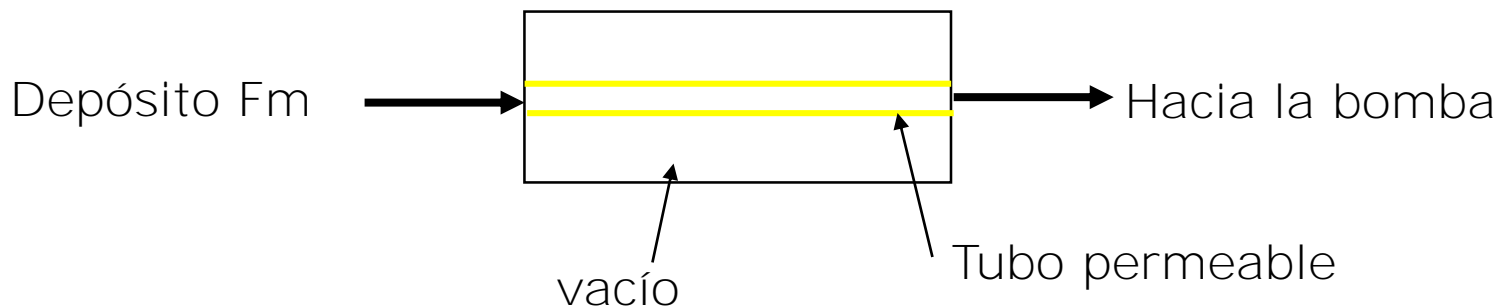
# CLAR Equipo



Sistema para gradiente: 2 o más disolventes o fases (Mezclado a alta presión)

# CLAR Equipo

- Desgasificar fases móviles
- Ultrasonido
- Gases inertes
- Calentamiento
- Filtración al vacío



# CLAR Equipo Bombas

- Flujo constante
- Material inerte
- Rango adecuado flujos
- Facilidad de cambio
- Flujo sin pulsos
- Cambio fácil de disolvente
- Fácil de desmontar y reparar

## CLAR Equipo Bomba recíproca

El pistón avanza y retrocede llenando la cámara de disolvente (10 – 100  $\mu\text{L}$ ) e impulsando la fase móvil hacia la columna. Suelen tener dos pistones.



# CLAR EQUIPO

Presión de trabajo habitual: 25 – 250 atm

Presión máxima: 350 atm

## Flujo de fase móvil

En cromatografía analítica: 0,5 – 2,5 mL/min

La bomba ajusta la presión necesaria para conseguir el flujo requerido.

La presión depende de: longitud columna, tamaño de partícula, viscosidad y flujo fase móvil, temperatura

Unidades de presión (SI)

Pascal (Pa) = Newton m<sup>-2</sup>

1 atm = 10<sup>5</sup> Pa = 1 bar

psi (pound square inch, libra por pulgada cuadrada)

Kg cm<sup>-2</sup>

1 psi = 6897 Pa

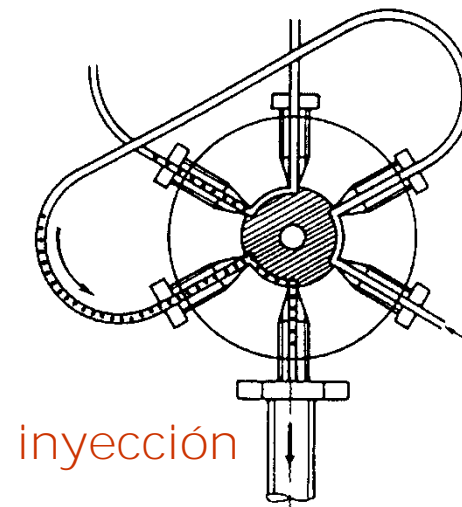
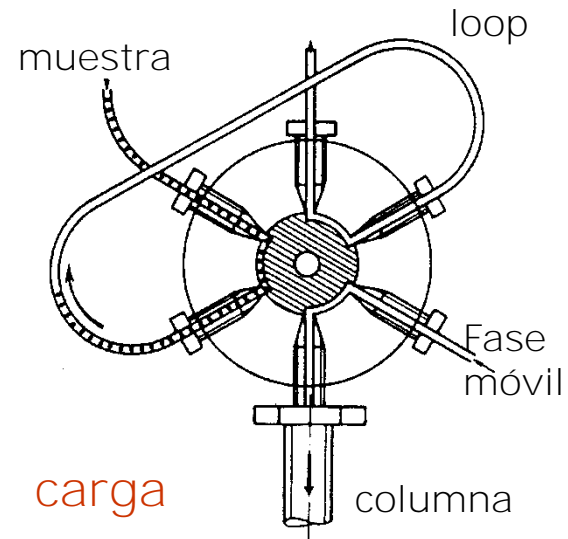
1 atm = 10<sup>5</sup>/6897 = 14,5 psi

# CLAR Equipo

- Válvula de inyección

Volúmen de loop:

1 to 100  $\mu\text{L}$



# CLAR Equipo

- Las columnas son empacadas con partículas irregulares o esféricas –porosas y no porosas (Diámetro de partícula entre 3 a 10  $\mu\text{m}$ )



- 3-30 cm longitud  
(acero)

- 0.5-5 mm diámetro interno

(velocidades de flujo: 1 mm d.i. : 100  $\mu\text{L}/\text{min}$

4 mm d.i. : 1  $\text{mL}/\text{min}$ )

- Pueden utilizarse precolumnas

## CLAR Equipo Pre-Columna

Columna de dimensiones reducidas, situada antes de la columna analítica

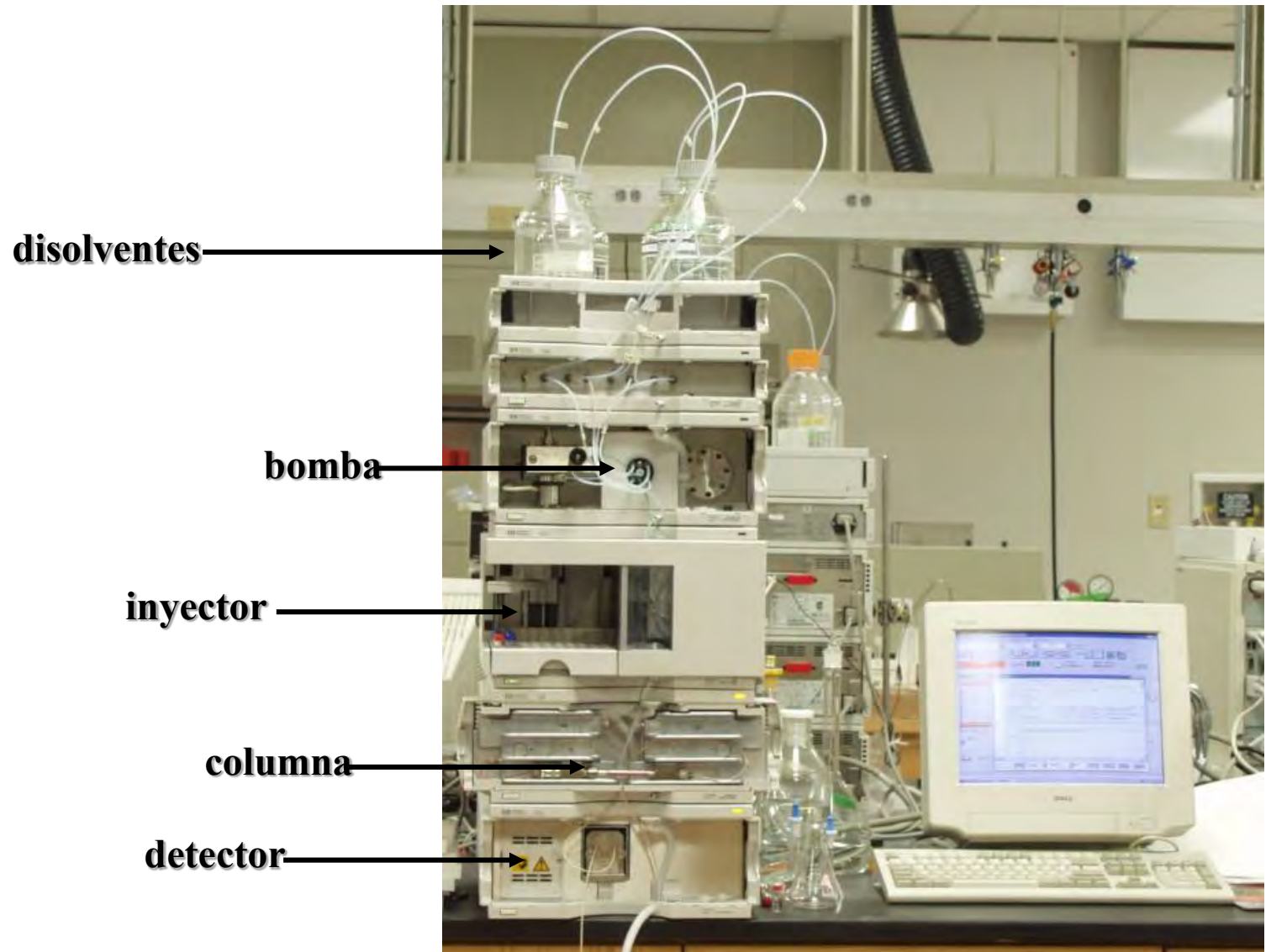
Mismo tipo de fase estacionaria, partículas de mayor diámetro, menor empaquetamiento

Protección de la columna analítica



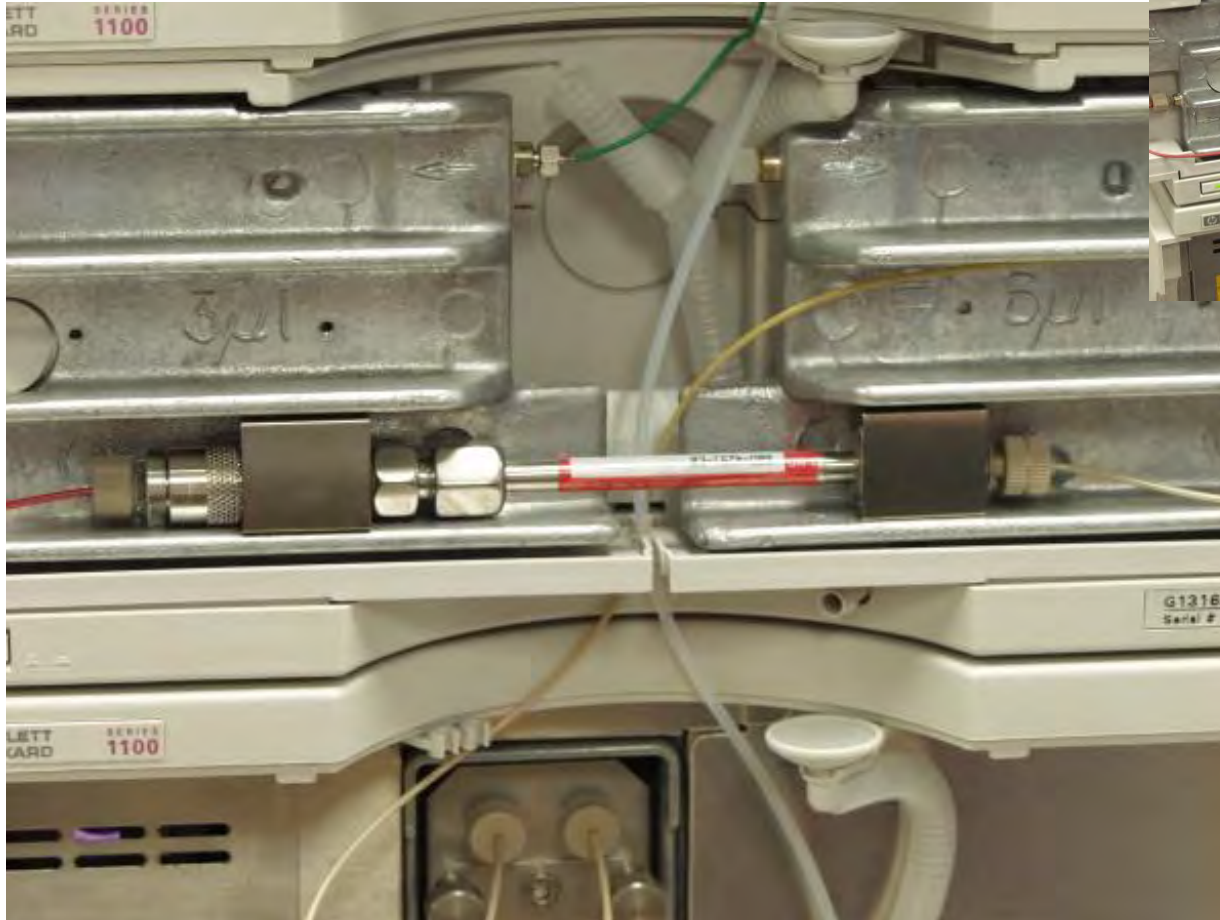


# CLAR Equipo



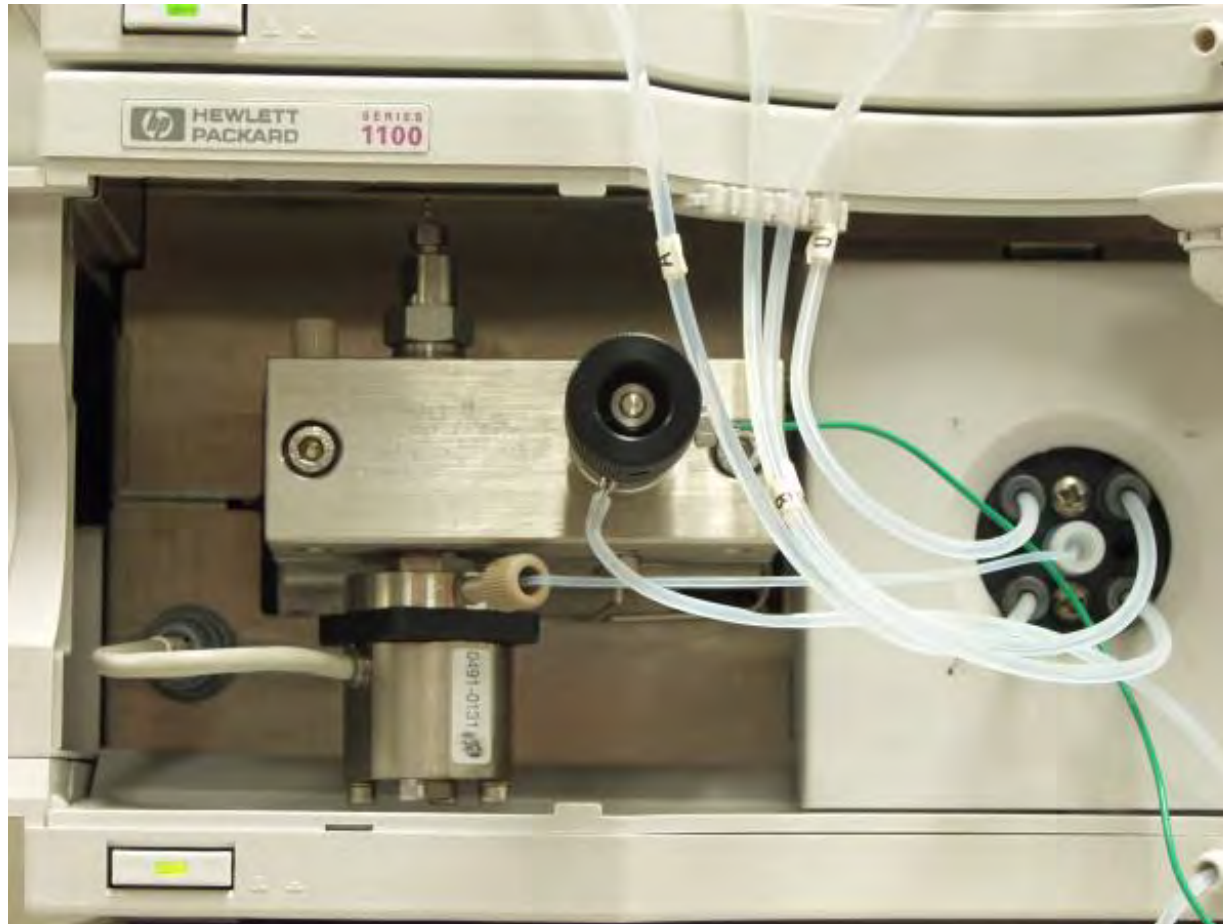
# CLAR Equipo

## Columna



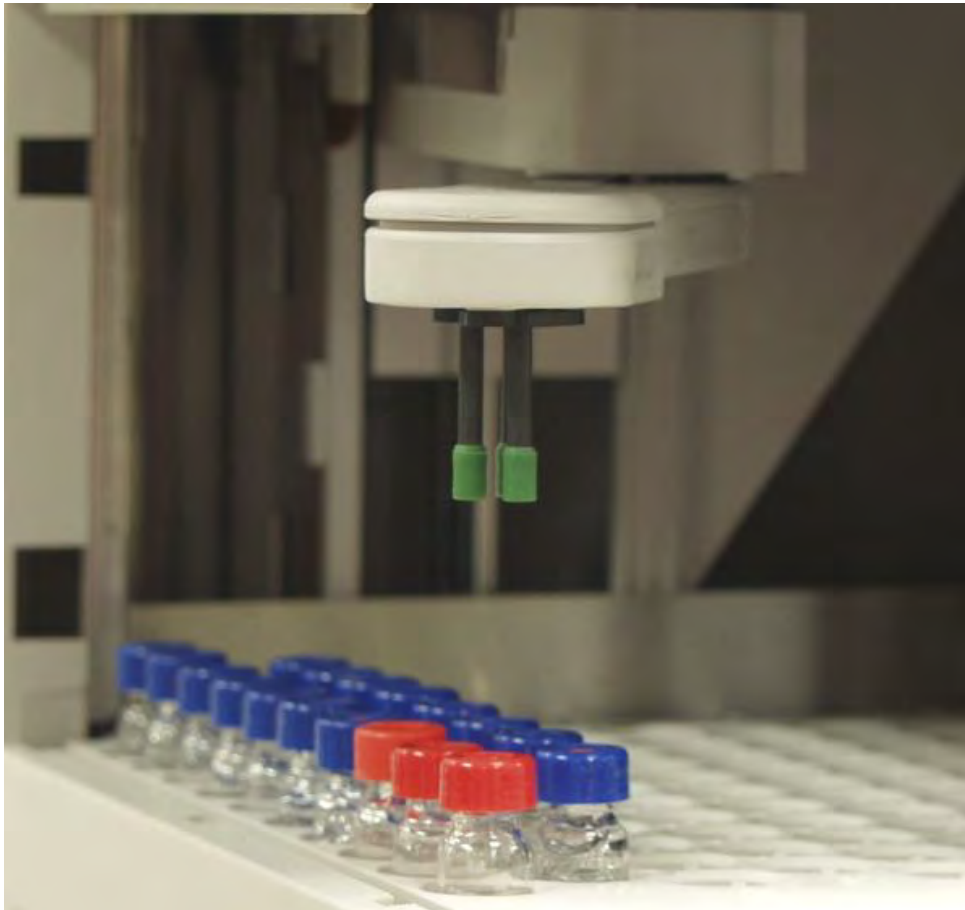
# CLAR Equipo

**bomba**



# CLAR EQUIPO

**Automuestreador e inyector**



# CLAR EQUIPO Loop de muestra

Mide el volumen de muestra inyectado



10 - 250  $\mu$ L



# CLAR EQUIPO

**Detector**

**espectrofotómetro UV/Visible**



# Detectores

Dispositivo que monitoriza el eluato de la columna. Genera una señal eléctrica, que es proporcional a alguna propiedad de los analitos y/o de la fase móvil.

## **Características.**

Sensible

Lineal

Universal

Selectivo

Volumen muerto reducido

No destructivo

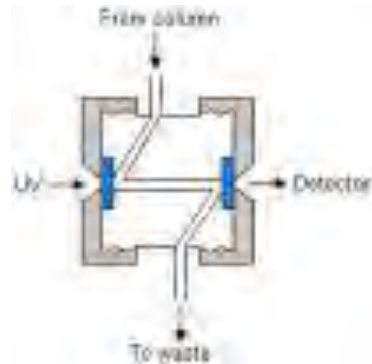
Barato

Fácil de manejar

# Detector de absorción UV

**Fundamento:** absorción de radiación UV por parte de los compuestos eluidos de la columna.

El eluato de la columna pasa por una célula de flujo, que es atravesada por el haz de radiación procedente de la lámpara.



Camino óptico 0,5 cm  
Volumen 8  $\mu\text{L}$

La mayoría de los compuestos orgánicos absorben en la zona UV del espectro. Ej. hidrocarburos aromáticos y sus derivados, compuestos con enlaces múltiples entre carbono y oxígeno, nitrógeno y azufre.



# Detector de absorción UV

Las absorciones más intensas son en el intervalo 180 - 210 nm. También para los disolventes. Por ello la zona útil de medida  $\lambda > 210$  nm.

$\lambda$  de medida no tiene por qué situarse en el máximo del espectro de absorción.

## Componentes básicos:

**Fuente de radiación:** lámpara de deuterio (wolframio + deuterio)

**Monocromador,** selecciona  $\lambda$ .

**Tubo fotomultiplicador.**

## Ventajas

Buena sensibilidad

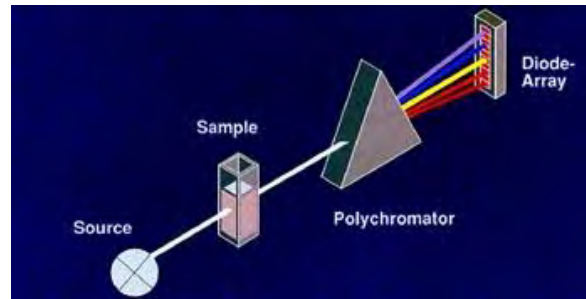
Rango lineal muy amplio

Sirve para muchos compuestos

# Detector de absorción de dispositivo de diodos

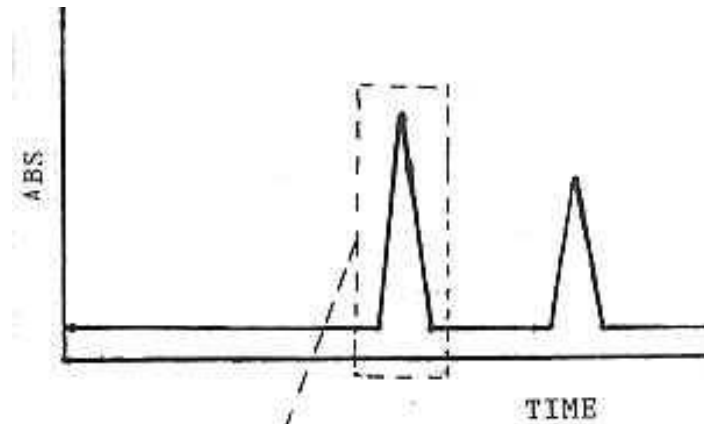
## (Diode Array Detector, DAD)

La radiación policromática, después de atravesar la muestra, llega a un elemento dispersor, fijo, que descompone la radiación y la hace llegar hasta una fila de fotodiodos.

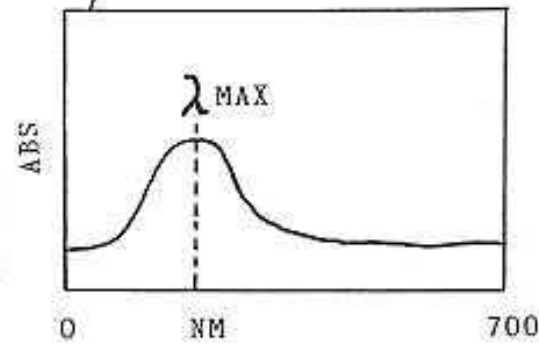


Cada fotodiodo mide, simultáneamente, la radiación que le llega, y, por lo tanto, todas las absorbancias a las distintas longitudes de onda se miden simultáneamente. → Espectro completo

# Detector de absorción de dispositivo de diodos



cromatograma

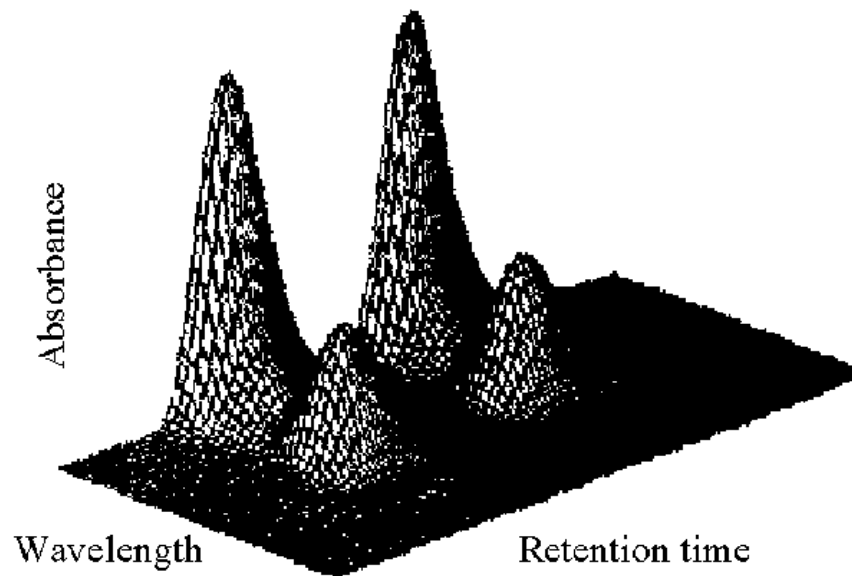


espectro

# Detector de absorción de dispositivo de diodos

Genera una enorme cantidad de datos. Registra todos los valores de absorbancia, en el intervalo de  $\lambda$  de trabajo, cada microsegundo.

Matriz de datos que puede ser consultada en tiempo real y después del registro del cromatograma (uso de ordenador)



Gráficos tridimensionales (diagramas de contorno)

# Detector de absorción de dispositivo de diodos

## Ventajas

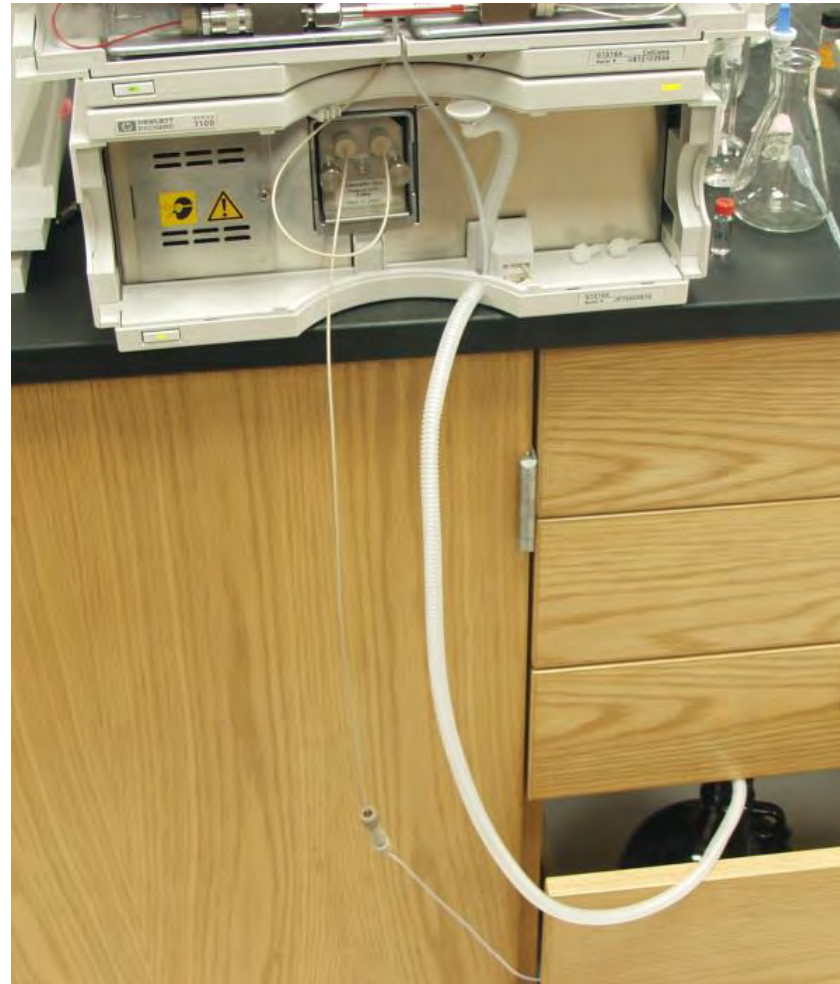
- Identificación fácil de  $\lambda$  óptima para cada pico, y programar los cambios de  $\lambda$  a lo largo del cromatograma.
- Identificación de coelutos.
- Determinación de la pureza de pico (superponiendo espectros, relación de absorbancias a dos  $\lambda$ ).
- Confirmación de picos.
- El cromatograma puede reintegrarse (generar un nuevo cromatograma) sin tener que repetir la experiencia

# Detectores CLAR

Detector	Límite de detección	¿Util con gradiente?
Ultravioleta-visible	100 pg – 1 ng	si
índice de refracción	100ng -1 µg	no
electroquímico	10 pg -1 ng	no
fluorescencia	1pg – 10 pg	si
conductividad	500 pg – 1ng	no
espectrofotometría de masas	1 pg - 10 pg	si
infrarrojo de transformada de Fourier	1 µg	si
dispersión de la luz	500 ng	sí

# CLAR Equipo

## Desechos



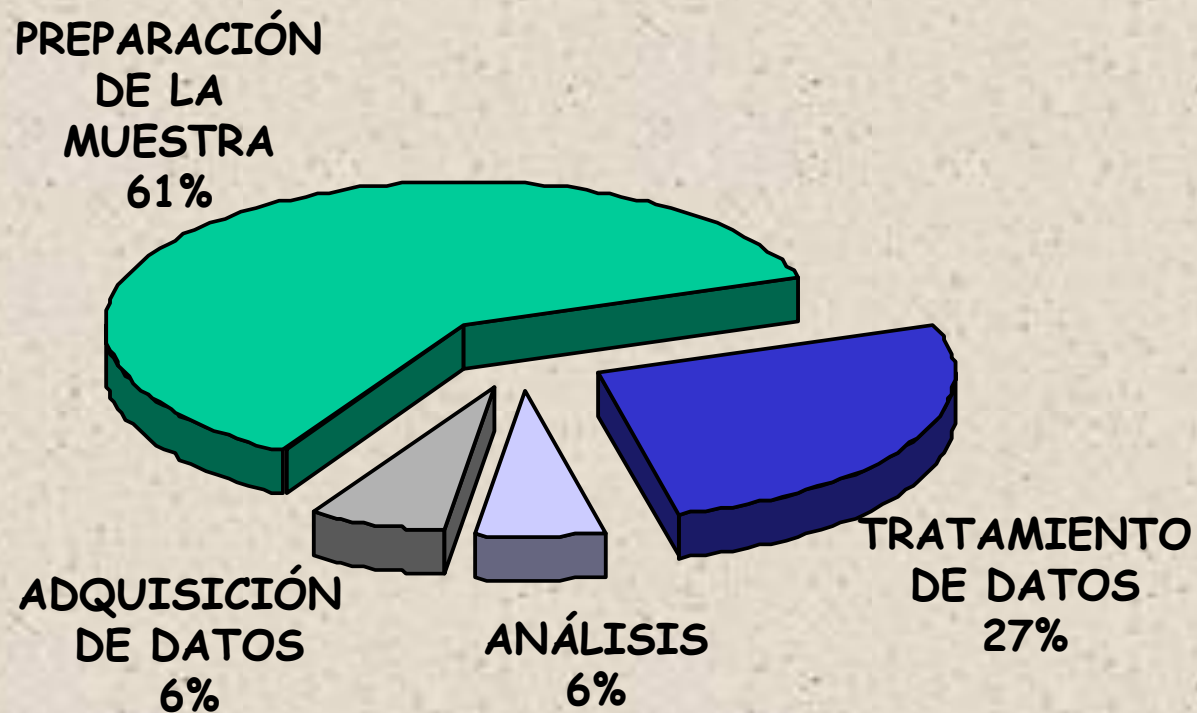
- **Preparación de muestra**



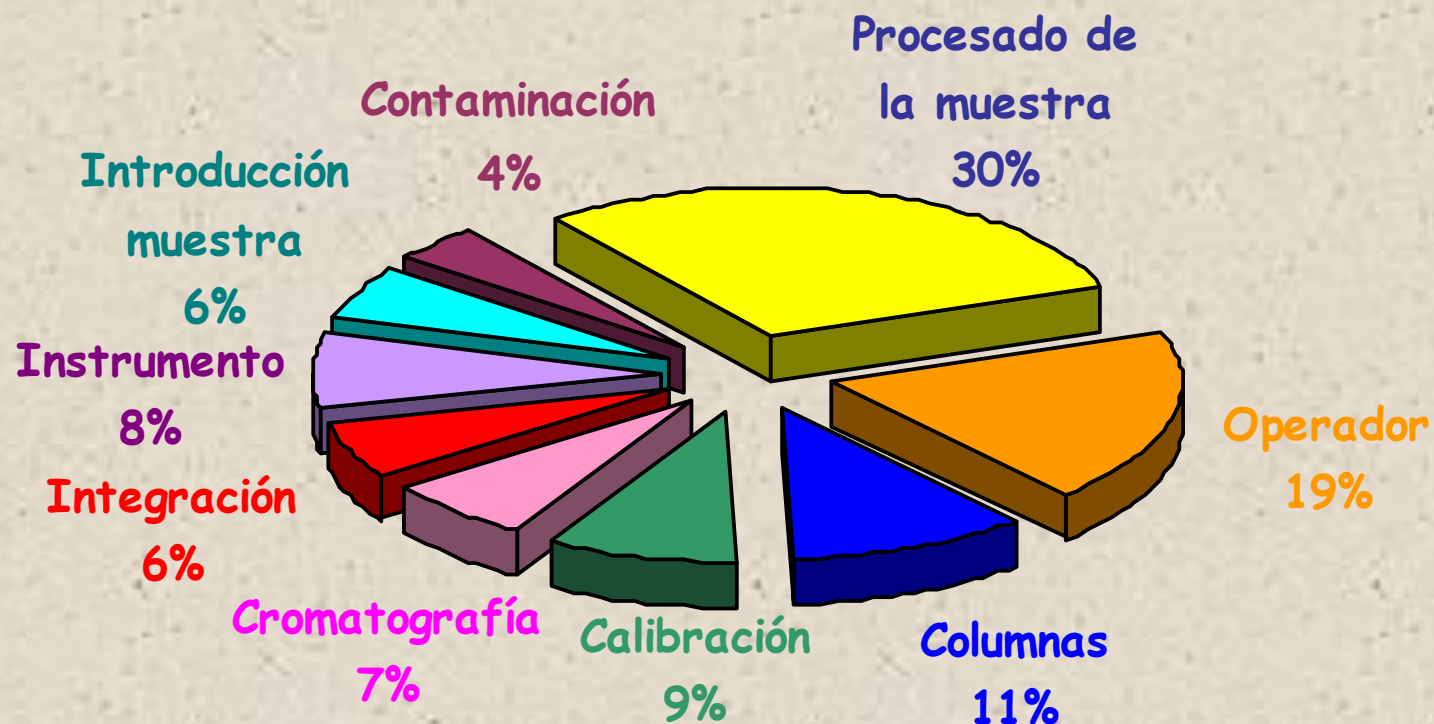
# ETAPAS BÁSICAS DEL PROCESO ANALÍTICO



# DISTRIBUCIÓN DE TIEMPO EN EL PROCESO ANALITICO



# DISTRIBUCIÓN DE ERRORES GENERADOS DURANTE EL ANÁLISIS DE LA MUESTRA



# PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- *Objetivos generales:*
  - Hacer el analito accesible al análisis
  - Obtener el analito a una concentración adecuada
  - Eliminar interferencias
  - Proteger el instrumento final de medida

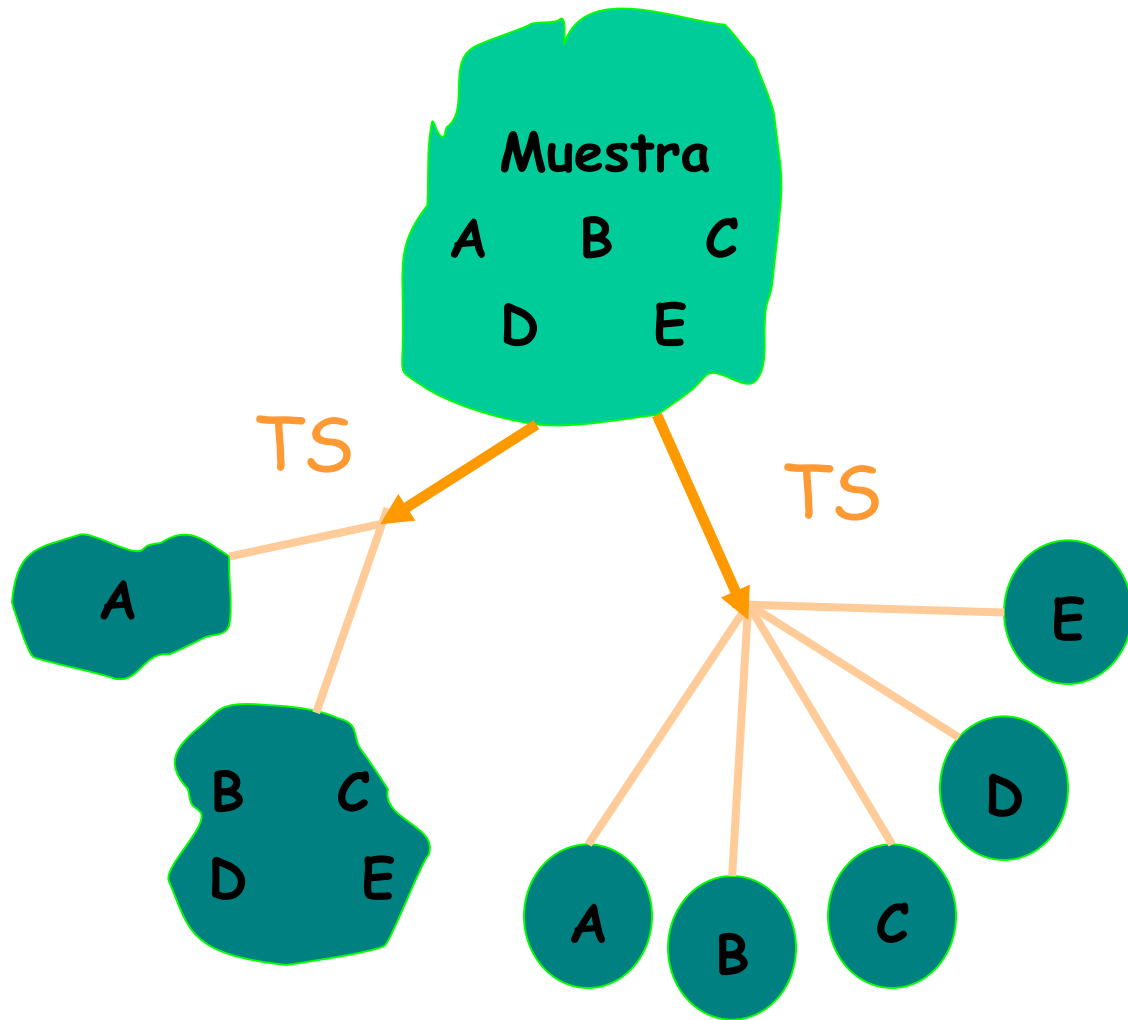
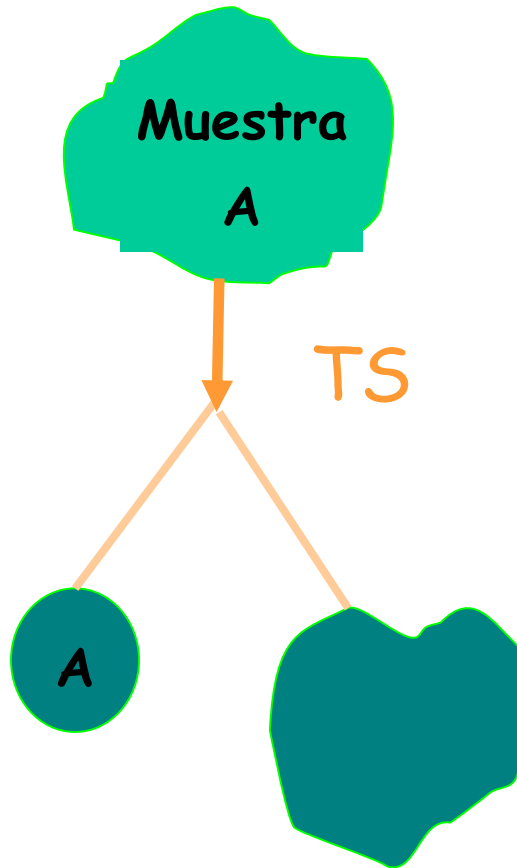
# PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Llevar un porcentaje de analitos tan alto como sea posible desde la muestra original al paso de determinación
2. Obtener los analitos en el estado de agregación más adecuado para el procedimiento instrumental a utilizar, asegurando que los analitos permanecen en su estado original ó están totalmente convertidos en una especie estable.
3. Llevar sólo algunos de los componentes de la matriz de la muestra original al paso de determinación.
4. Obtener el analito a una concentración apropiada para la detección y medida.
5. No añadir ninguna nueva interferencia.

## ¿Por qué se produce pérdida de analitos?

- absorción, adsorción o penetración en la superficie del recipiente
- pérdidas por el cierre del envase
- reacciones de descomposición
- crecimiento de microorganismos
- presencia de enzimas que degraden los analitos
- fugas en los sistemas de transferencia
- accidentes o forma de trabajo descuidada

# TÉCNICAS SEPARATIVAS



# **Pasos para la selección de un método apropiado de preparación de muestra.**

- Propiedades el analito.
- Concentración en la muestra.
- Naturaleza de la matriz.
- Forma en la que se presenta el analito en la muestra.
- Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico.
- Tipo de detector.
- Compatibilidad con el detector



# Preparación de muestra

**-Filtración**

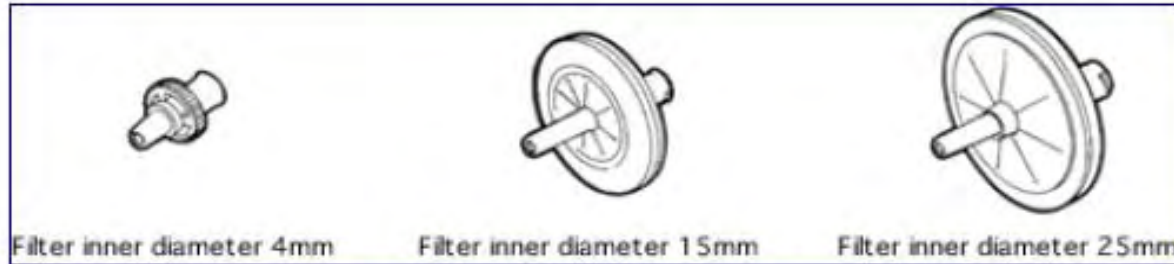
**-Extracción**

**-Limpieza (Clean-up)**

**-Concentración**

**-Derivatización**

# Filtros para jeringa



# Filtros para jeringa



# Desproteínización

## (separación por precipitación)

Efecto salting in y salting out. ( $\text{Hg}^{+2}$   $\text{Cd}^{+2}$   $\text{Fe}^{+3}$ ,  
 $\text{Cu}^{+2}$   $\text{Zn}^{+2}$ )

AGENTE	PROPORCION
Acetonitrilo	1.5 vol
Metanol	2.0 vol
Acetona	1.5 vol
TCA al 10 % P/V	0.2 vol
$\text{HClO}_4$ al 6 % P/V	0.8 vol
Soluc $\text{ZnSO}_4/\text{NaOH}$	2.0 vol

Agentes precipitantes utilizados en muestras con contenido proteínico de 89 g/100 mL.

# Disminución de solubilidad

- El efecto de las sales en la solubilidad de no electrolitos a partir de soluciones acuosas esta gobernado por:

$$\log \frac{S_0}{S_s} = K_s M$$

- Esta ecuación es válida para concentraciones 0-3 M donde  $K_s$  es positiva

# Disminución de solubilidad

Cationes:



Aniones:

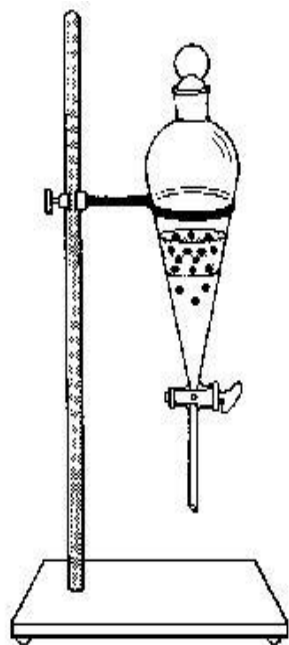


Formación de pares iónicos:

Sulfonatos y Cloruros para aminas

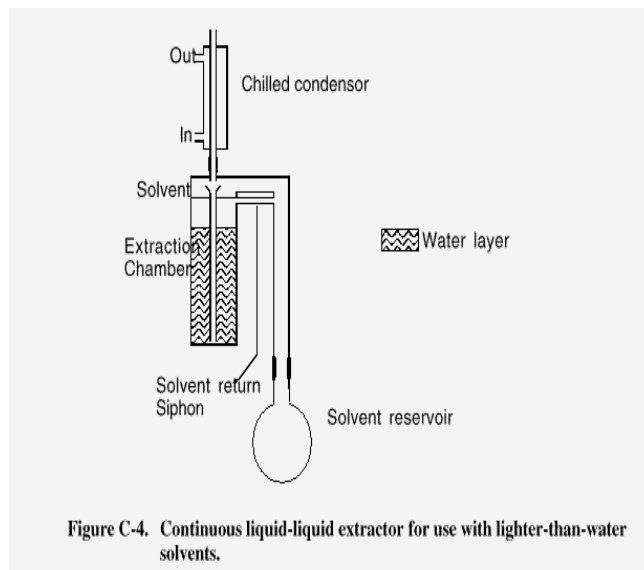
Sales de amonio cuaternario para ácidos.

# Extracción líquido-líquido (ELL)

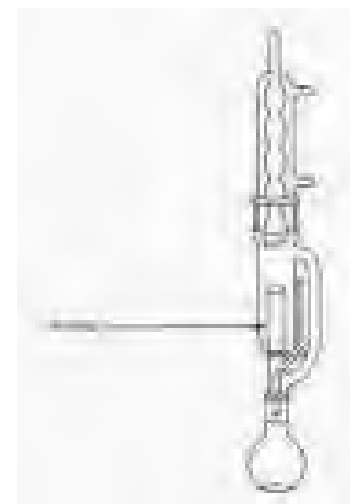


Extracción  
simple

Muestras líquidas



Extracción  
continua

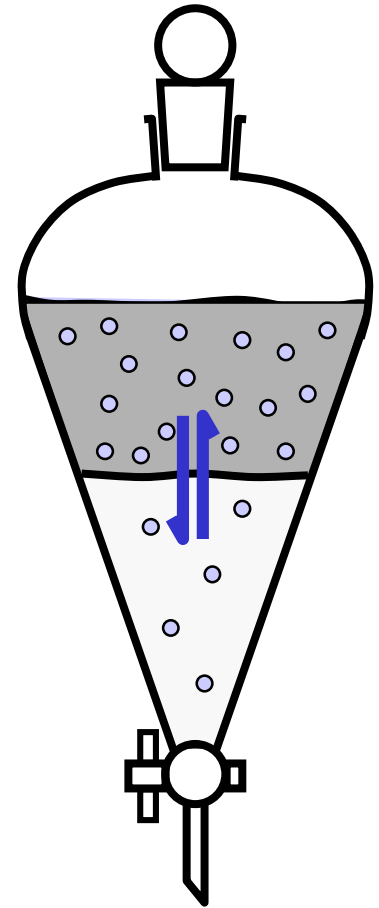
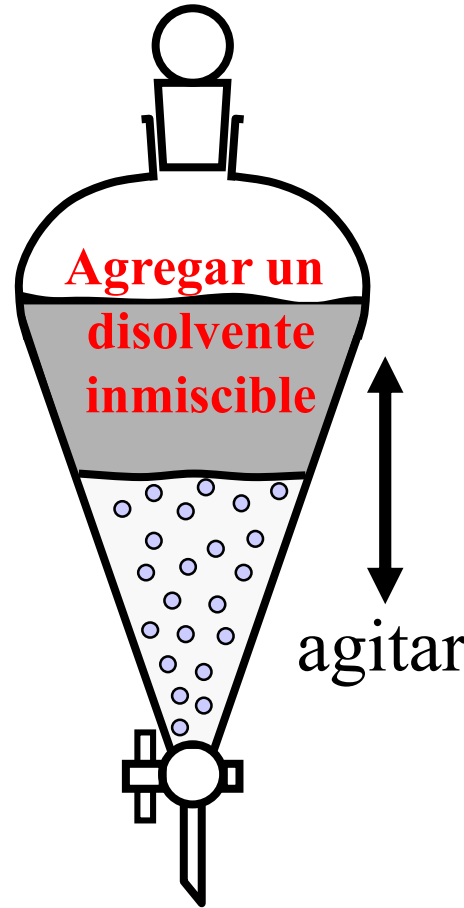
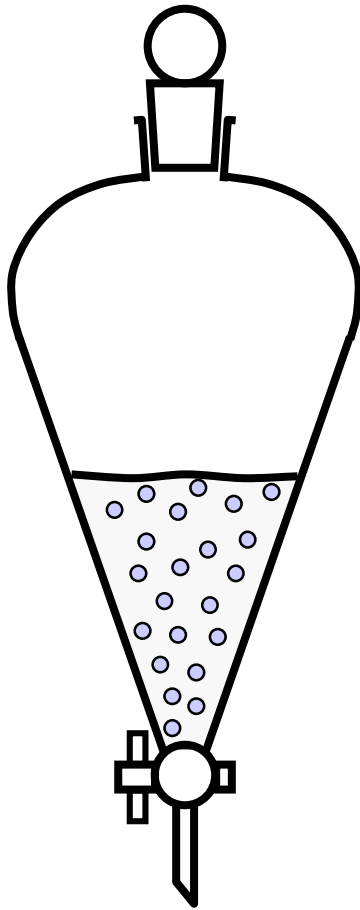


Soxhlet

Muestras  
sólidas

# ELL

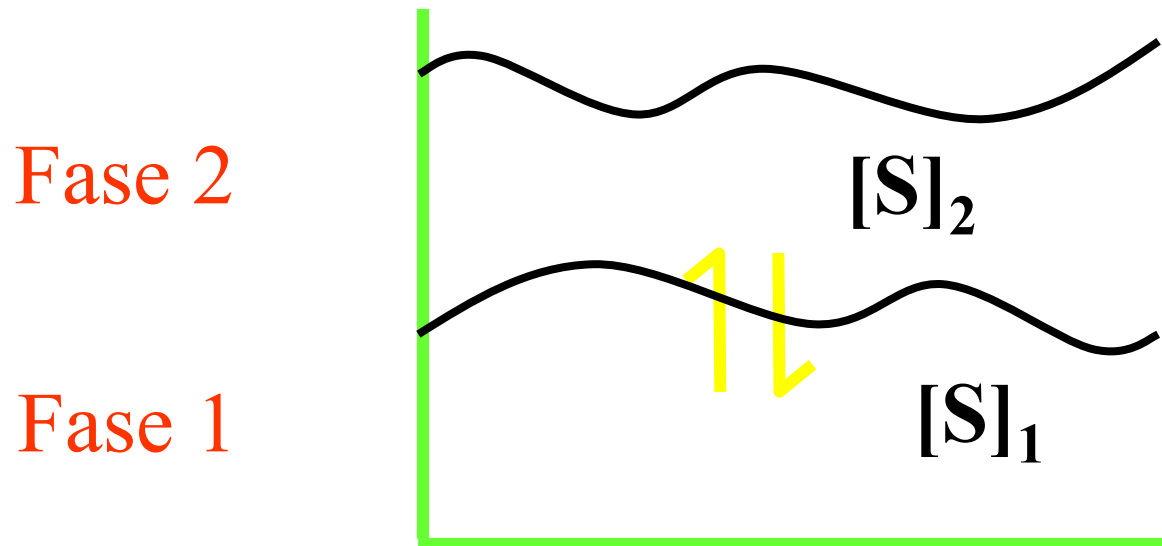
Embudo de  
separación





# ELL

- El soluto se reparte entre 2 fases inmiscibles



# ELL

- La constante de equilibrio  $K_d$

$$K_d = \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

## ELL

- Determinación de la concentración del soluto en cada fase.
- Definir algunas variables:
  - $V_1$  &  $V_2$  son los volúmenes de los disolventes 1&2
  - $m$  = total # de moles del soluto (S) presente
  - $q$  = fracción del soluto remante en la fase 1 en estado de equilibrio
  - $[S]_1 = qm/V_1$
  - $[S]_2 = (1-q)m/V_2$

## ELL

$$K = \frac{[S]_2}{[S]_1} = \frac{(1-q)m/V_2}{qm/V_1} = \frac{(1-q)/V_2}{q/V_1}$$

sustituyendo:

$$q = \frac{V_1}{KV_2 + V_1}$$

$$(1-q) = \frac{KV_2}{KV_2 + V_1}$$

fracción of S en: Fase 1

Fase 2

## ELL

- Sí se remueve  $V_2$  de  $V_1$  con más disolvente  $V_2$ , que fracción permanece en  $V_1$ ?
  - Moles iniciales =  $m$
  - Después de la primera extracción -  $qm$
  - Después de la segunda extracción -  $q(qm)=q^2m$

$$q(2) = \left[ \frac{V_1}{KV_2 + V_1} \right]^2 \quad q(\mathbf{n}) = \left[ \frac{V_1}{KV_2 + V_1} \right]^{\mathbf{n}}$$

# ELL

- Ejemplo: Un Solute A tiene un coeficiente de reparto de 4. entre hexano y agua. ( $K = [S]_{\text{hexano}}/[S]_{\text{agua}} = 4$ ) Sí 150.0 mL de una solución acuosa 0.03000 M A es extraída con hexano, que fracción de A permanece en la fase acuosa realizando una extracción con 600 mL de hexano y realizando 6 extracciones con 100 mL de hexano.

## ELL

- a) Una alícuota de 600.0 ml de hexano

$$q = \left[ \frac{150\text{ml}}{4(600\text{ml}) + 150\text{ml}} \right] = 0.05882 = 5.882\%$$

# moles remanentes

$$0.05882 (0.03\text{M} \cdot 0.150\text{L}) = 2.647 \times 10^{-4} \text{ moles}$$

## ELL

- b) 6 extracciones con 100 mL.

$$q = \left[ \frac{150\text{ml}}{4(100\text{ml}) + 150\text{ml}} \right]^6 = 0.0004115$$

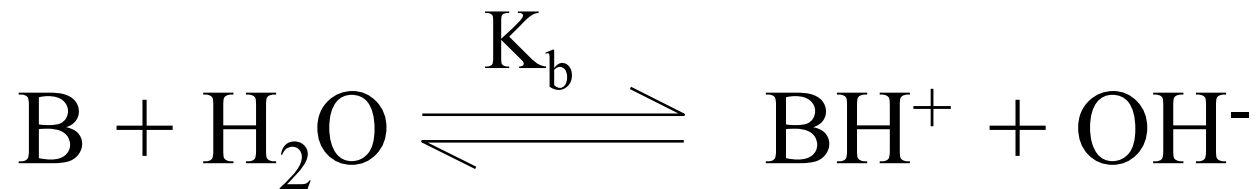
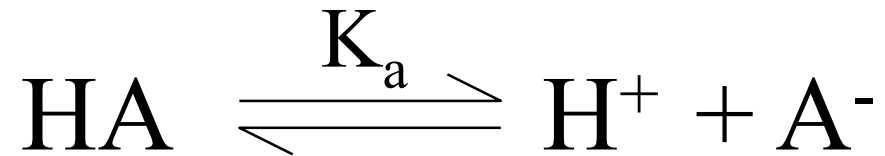
# moles remanentes

$$4.115 \times 10^{-4} (0.03\text{M} \cdot 0.150\text{L}) = 1.852 \times 10^{-6} \text{moles}$$



## ELL (efecto del pH)

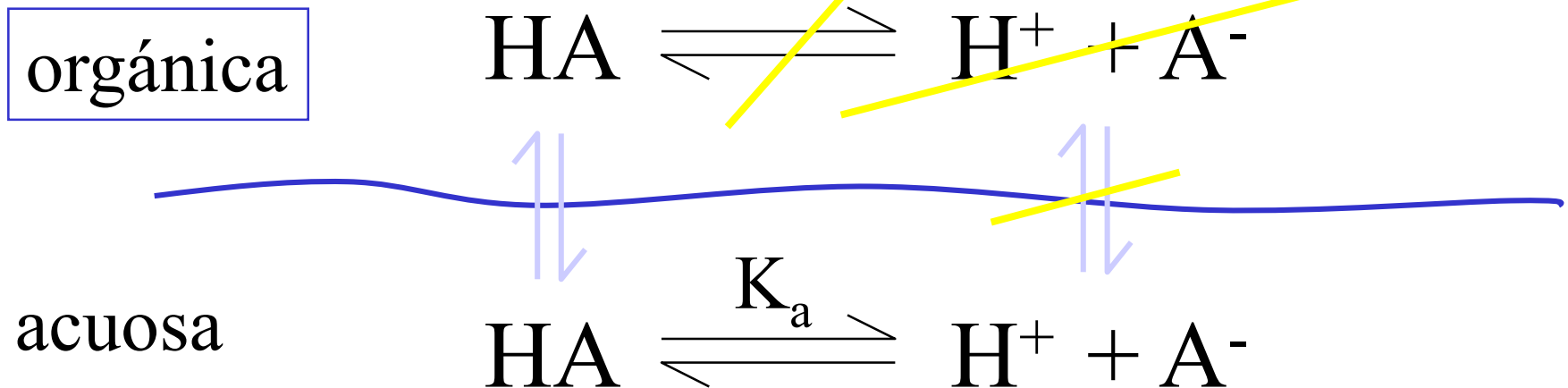
- Con ácidos/bases orgánicos:



Las especies moleculares son más solubles en disolventes orgánicos

# ELL (efecto del pH)

- Reparto de un ácido orgánico

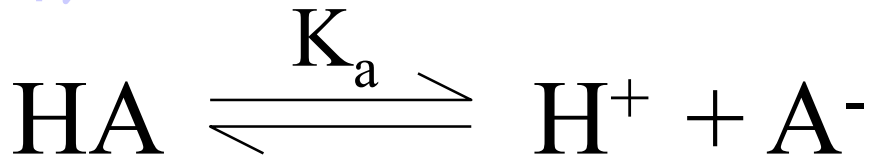
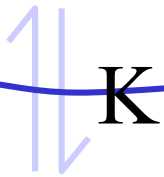


## ELL (efecto del pH)

D= coeficiente de  
distribución

$$D = \frac{\text{conc total. in fase 2}}{\text{conc total. in fase 1}}$$

HA



$$D = \frac{[\text{HA}]_{\text{org}}}{[\text{HA}]_{\text{ac}} + [\text{A}^-]_{\text{ac}}}$$

## ELL (efecto del pH)

- Sustituyendo  $[A^-]$  en D

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \qquad [A^-] = \frac{K_a [HA]}{[H^+]}$$

$$D = \frac{[HA]_2}{[HA]_1 + \frac{K_a [HA]_1}{[H^+]}}$$

## ELL (efecto del pH)

$$D = \frac{[\text{HA}]_2}{[\text{HA}]_1 + \frac{K_a [\text{HA}]_1}{[\text{H}^+]}} = \frac{[\text{HA}]_2}{[\text{HA}]_1 \left( 1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)}$$

$$D \left( 1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right) = \frac{[\text{HA}]_2}{[\text{HA}]_1} = K$$

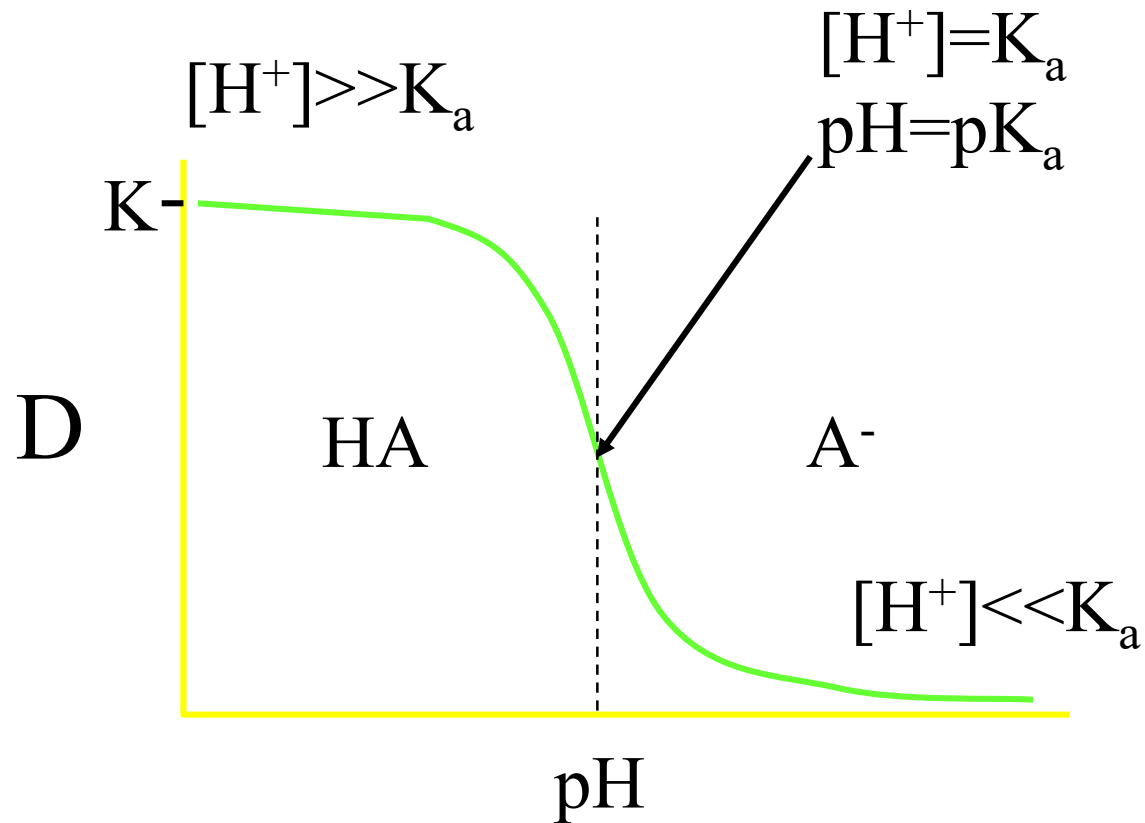
## ELL (efecto del pH)

$$D \left( 1 + \frac{K_a}{[H^+]} \right) = K$$

$$D = \frac{K}{\left( 1 + \frac{K_a}{[H^+]} \right)} = \frac{K[H^+]}{[H^+] + K_a}$$

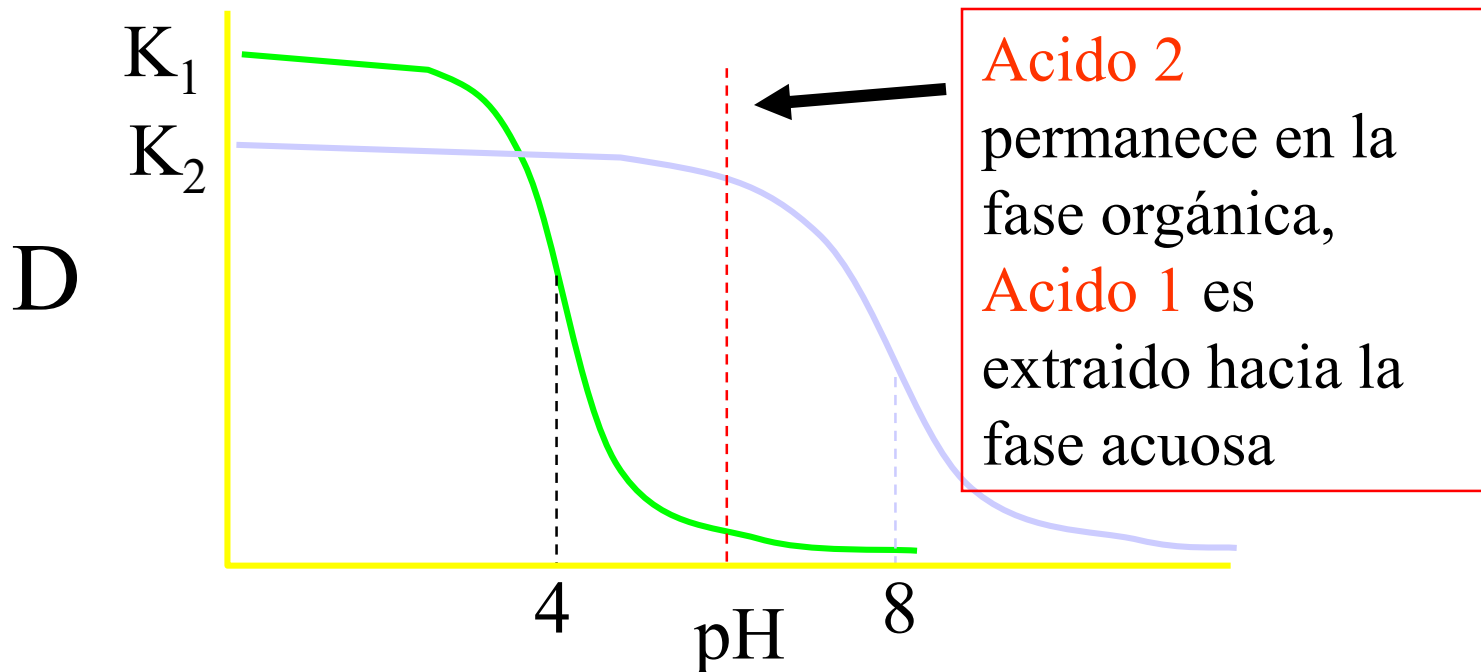
# ELL (efecto del pH)

- Efecto de pH en D



## ELL (efecto del pH)

- Ejemplo: ¿Como se podrían separar 2 ácidos empleando un esquema de pH?. Ácido 1 ( $pK_a = 4$ ), Ácido 2 ( $pK_a = 8$ )

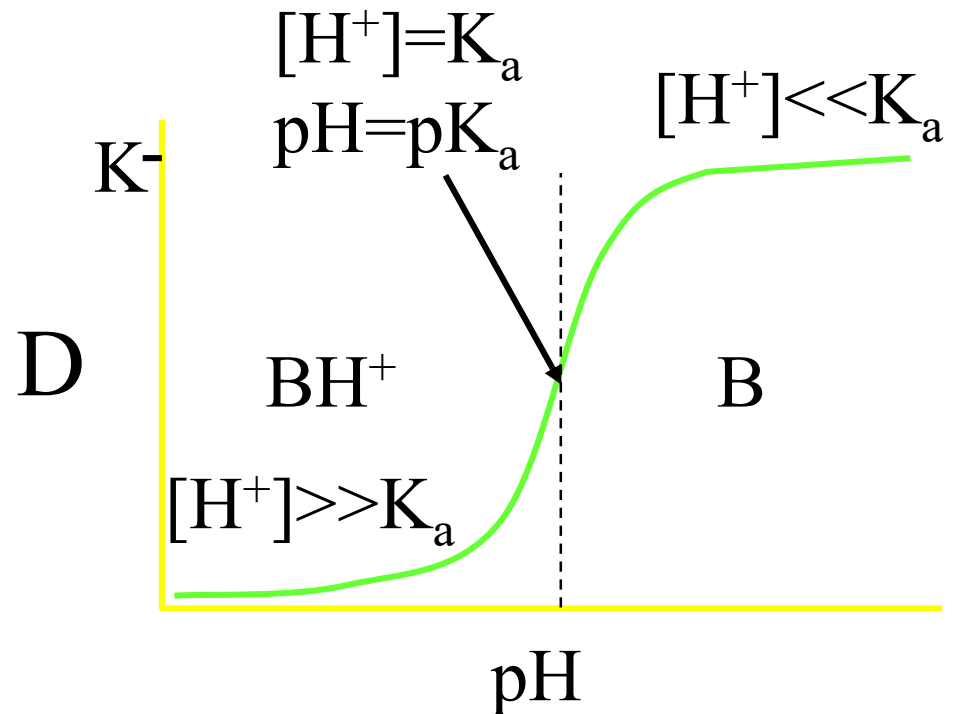




## ELL (efecto del pH)

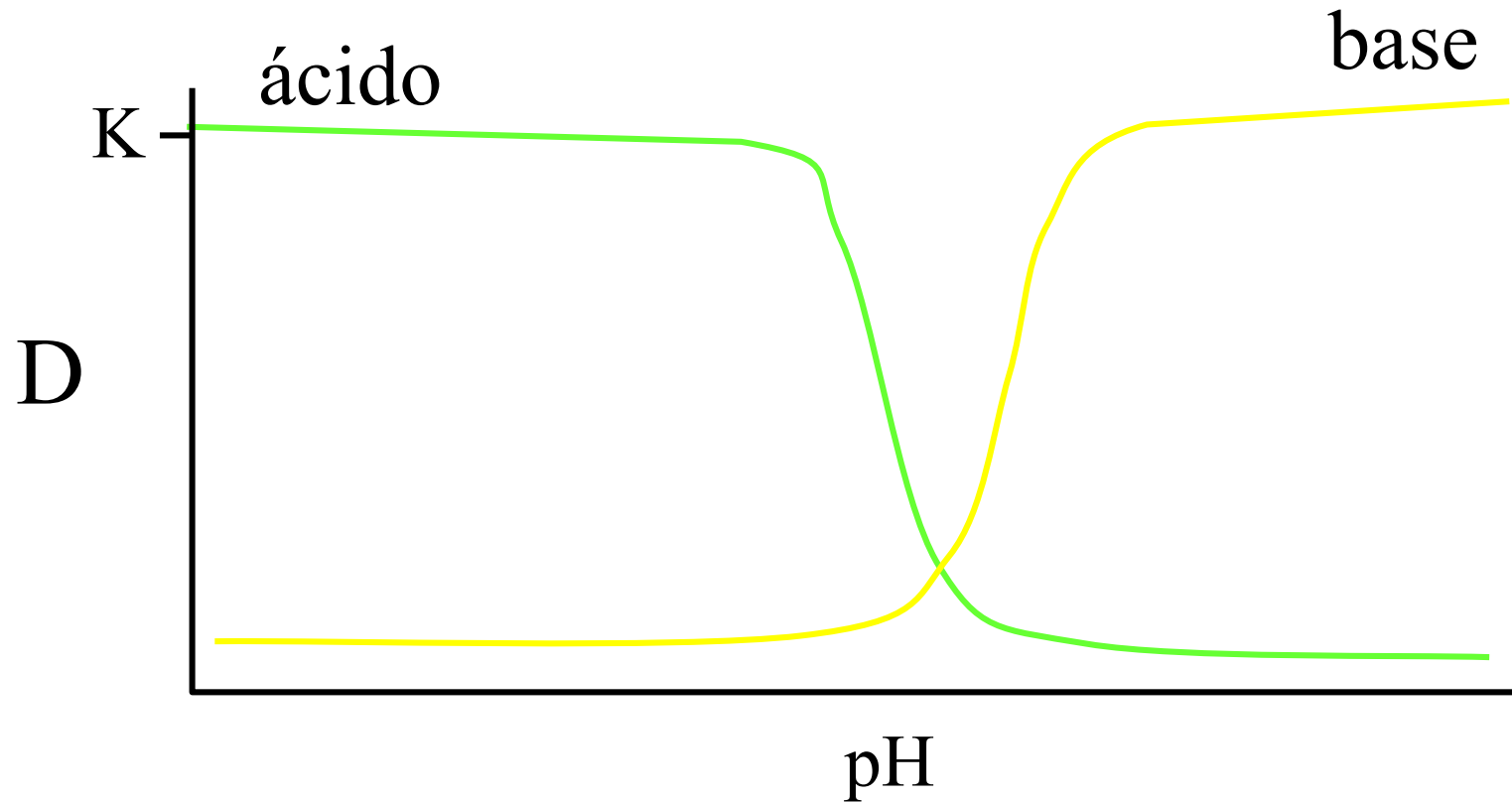
- Tratamiento análogo para bases.

$$D = \frac{K K_a}{[H^+] + K_a}$$

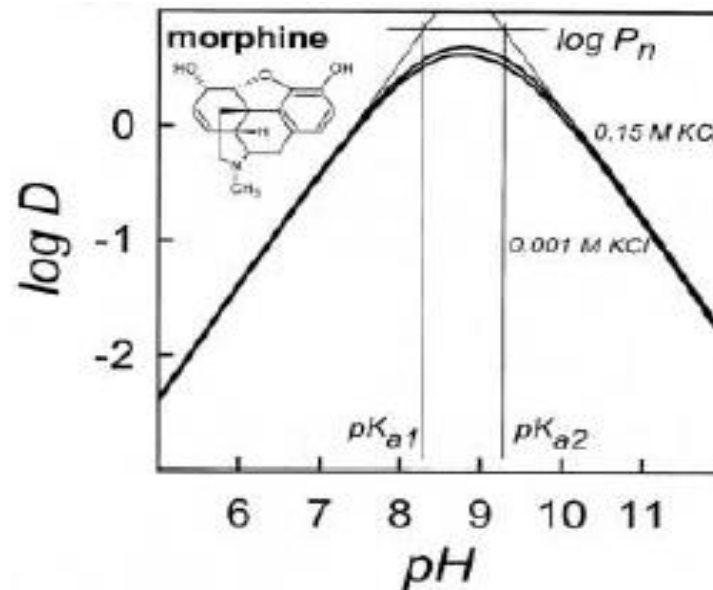
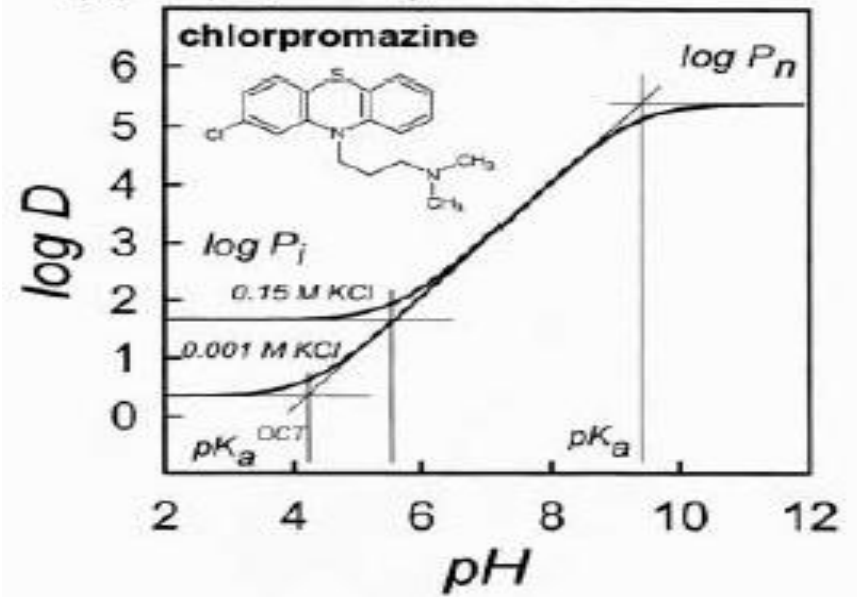
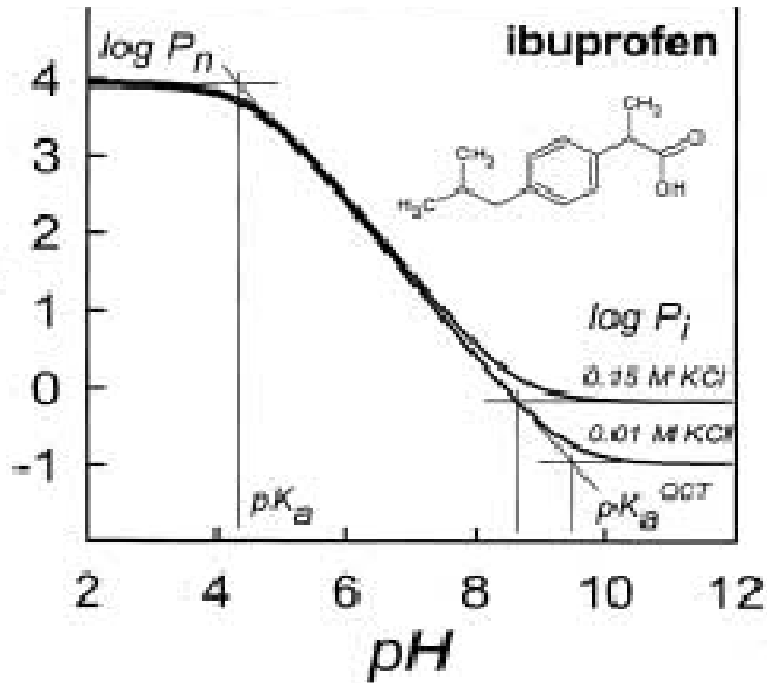


# ELL (efecto del pH)

En general:

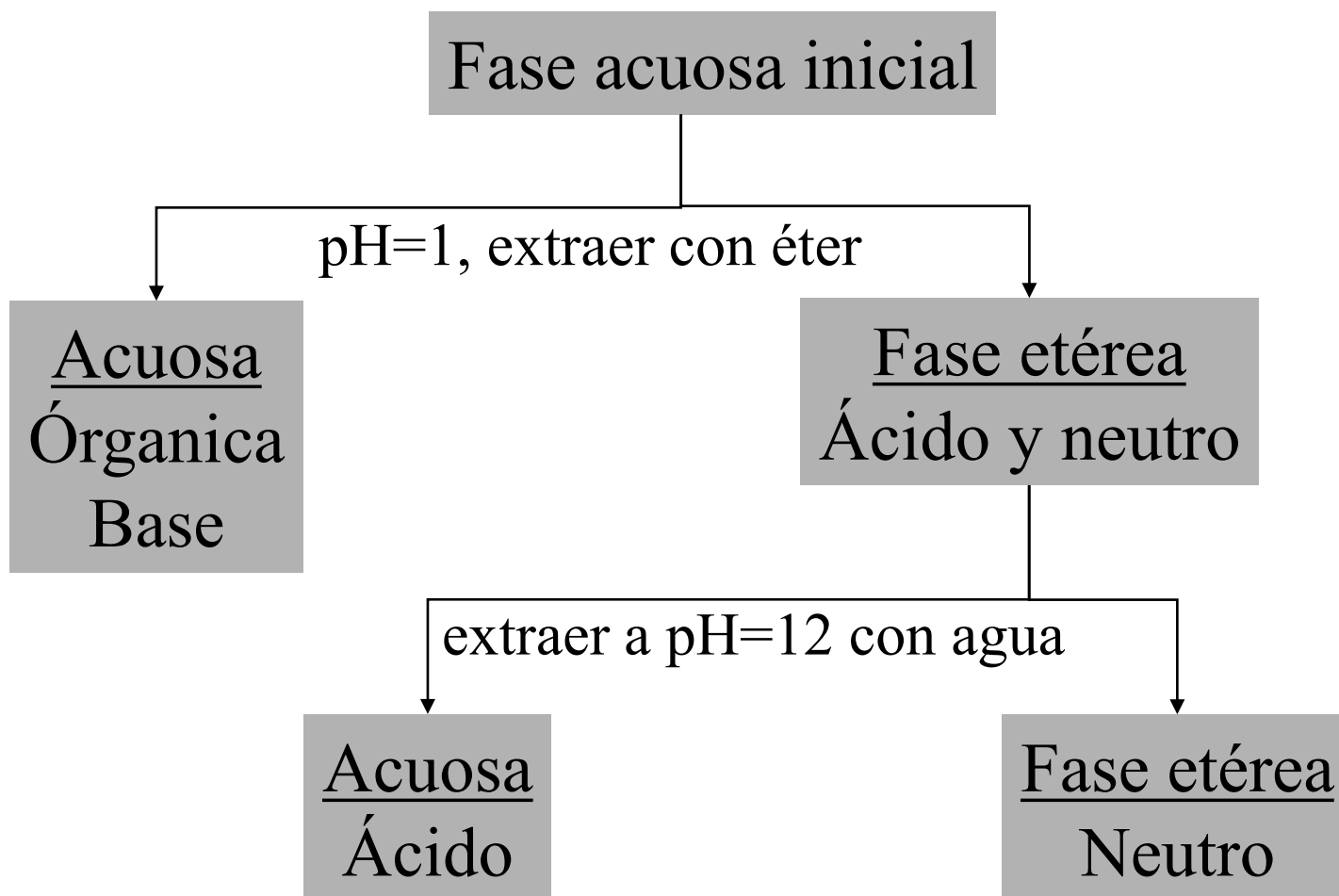


# Efectos del pH en Kd

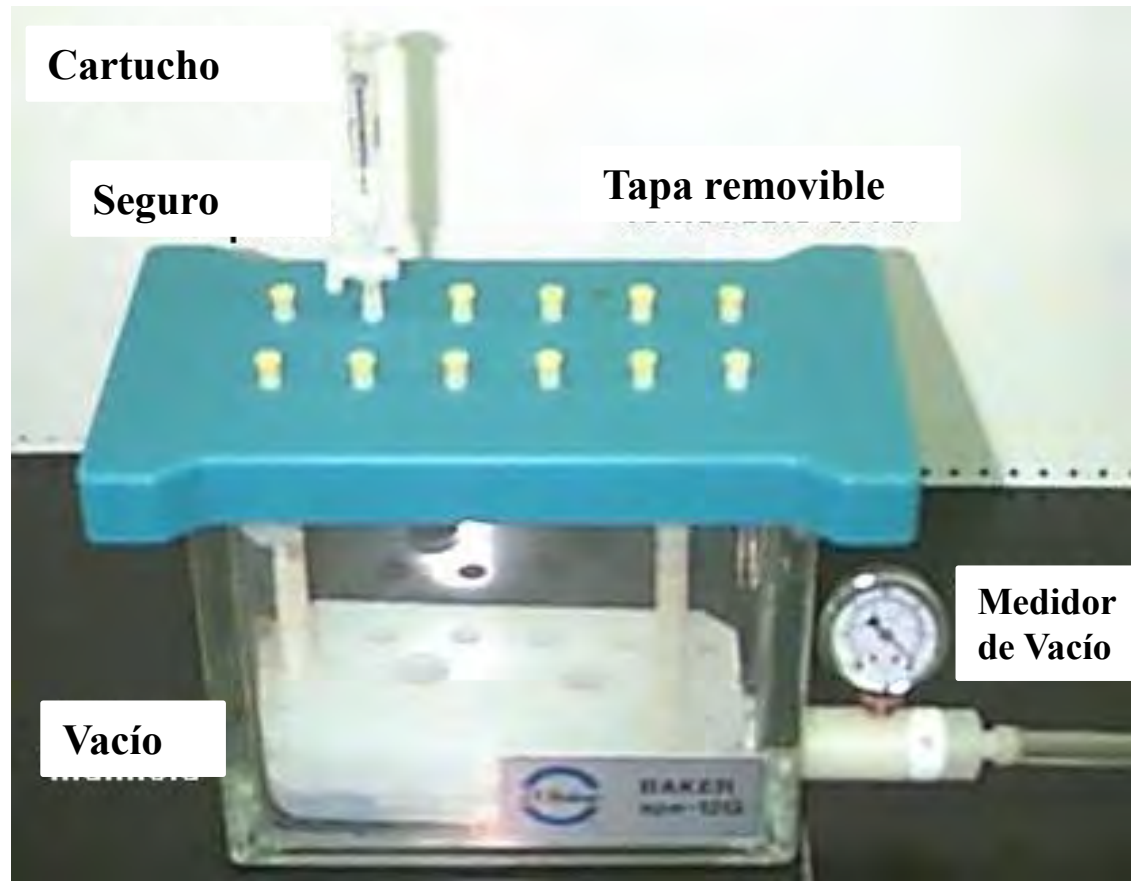
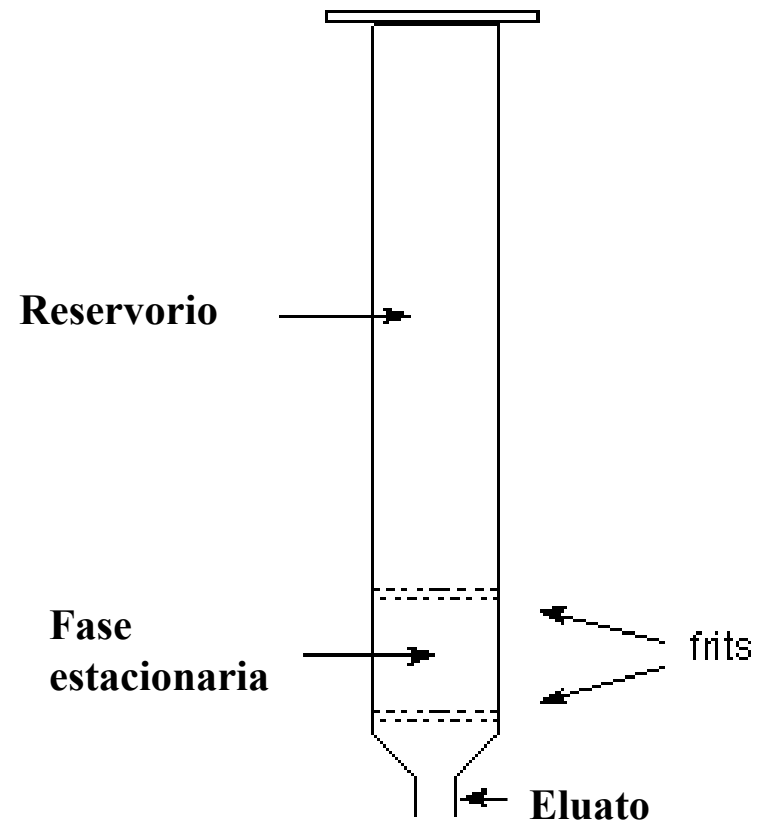


Perfiles de lipofilicidad

# Separación de ácidos, bases y analitos neutros.



# Extracción en fase sólida (EFS) (SPE)



# EFS

## **Extracción en fase sólida.**

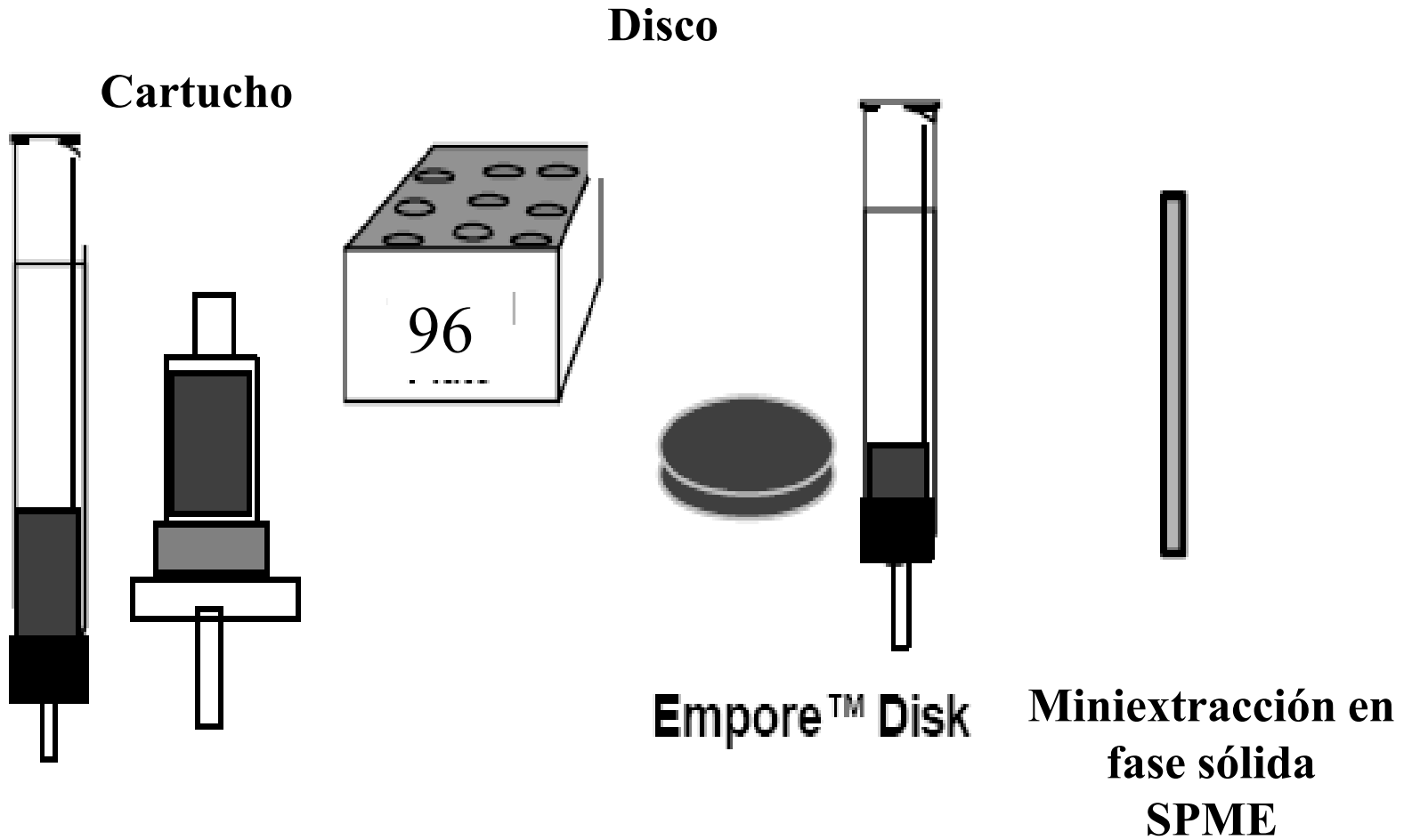
Se trata de un procedimiento de aislamiento, purificación, concentración y filtrado en una sola operación de preparación de muestra previa a la realización del análisis cromatográfico.

Está basado en el uso de **minicolumnas cromatográficas** desechables conteniendo un relleno de adsorbente o absorbente variable (SDVB, C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>, fenilo, ciano, intercambio iónico, sílice) de igual naturaleza que el de la columna de separación y retenido entre dos filtros y una carcasa exterior polimérica.

## Materiales utilizados en EFS para preparación de muestra en análisis farmacéutico

- ✓ Sílicas modificadas  $C_8$   $C_{18}$  CN.
- ✓ Carbón grafitizado.
- ✓ Copolímeros (PS-DV).
- ✓ Resinas intercambiadoras.
- ✓ Inmunoadsorbentes.
- ✓ Polímeros molecularmente impresos

# TIPOS DE EFS





MATERIAL DE RELLENO	TIPOS DE ANALITOS	NATURALEZA DE LA MATRIZ	ACTIVACION DE LA COLUMNA	SOLVENTE DE ELUCION
C18/C8	Sustancias no polares  Sustancias ionizables, en su forma no ionizada	Acuosa	Metanol  Agua	MeOH/AcN o mezclas de éstos con agua o buffers de pH adecuado
Sílice Diol CN	Sustancias polares	Solución en solventes no polares Aceites	Cloroformo Hexano	Solventes polares IPA, MeOH
Aniónico	Aniones Carboxilatos/Sulfonatos	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffers de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con MeOH o AcN
Catiónico	Cationes Aminas	Soluciones acuosas de baja I	Metanol Buffer	Buffers de alta de pH adecuado sólo o en mezclas con MeOH o AcN

# EFS

## FASES DE LA OPERACIÓN

**Preacondicionamiento:** equilibrado de la minicolumna con un disolvente adecuado para compatibilizar ambas fases, relleno y matriz de la muestra. Por ejemplo, solutos apolares en agua como matriz a extraer con  $C_{18}$  que repele al agua : compatibilizar con metanol o acetonitrilo.

**Carga de la muestra:** paso de toda la matriz por la minicolumna siendo deseable la retención de el o los analitos a medir solos o con pocas impurezas.

**Lavado:** elución de contaminantes e impurezas indeseables que hayan podido quedar retenidos con la muestra y que deben eliminarse por paso del disolvente adecuado.

**Elución:** con fase móvil para HPLC en la que la muestra sea soluble. Los retenidos irreversiblemente quedan en el relleno y las impurezas no eliminadas antes y solubles en este medio acompañarán a la muestra.

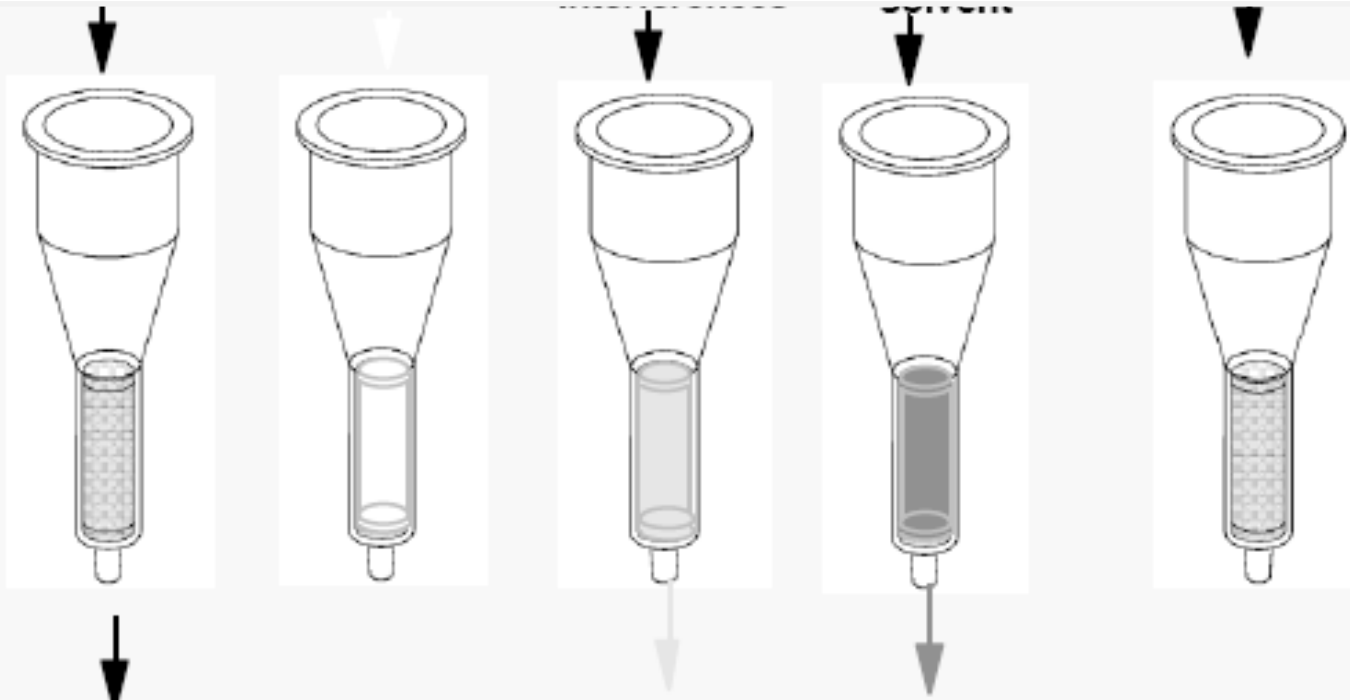
# EFS Operación

**Activación**

**Carga de la muestra**

**Elución de interferencias**

**Elución con disolvente fuerte**



**Elución de interferentes poco retenidos**

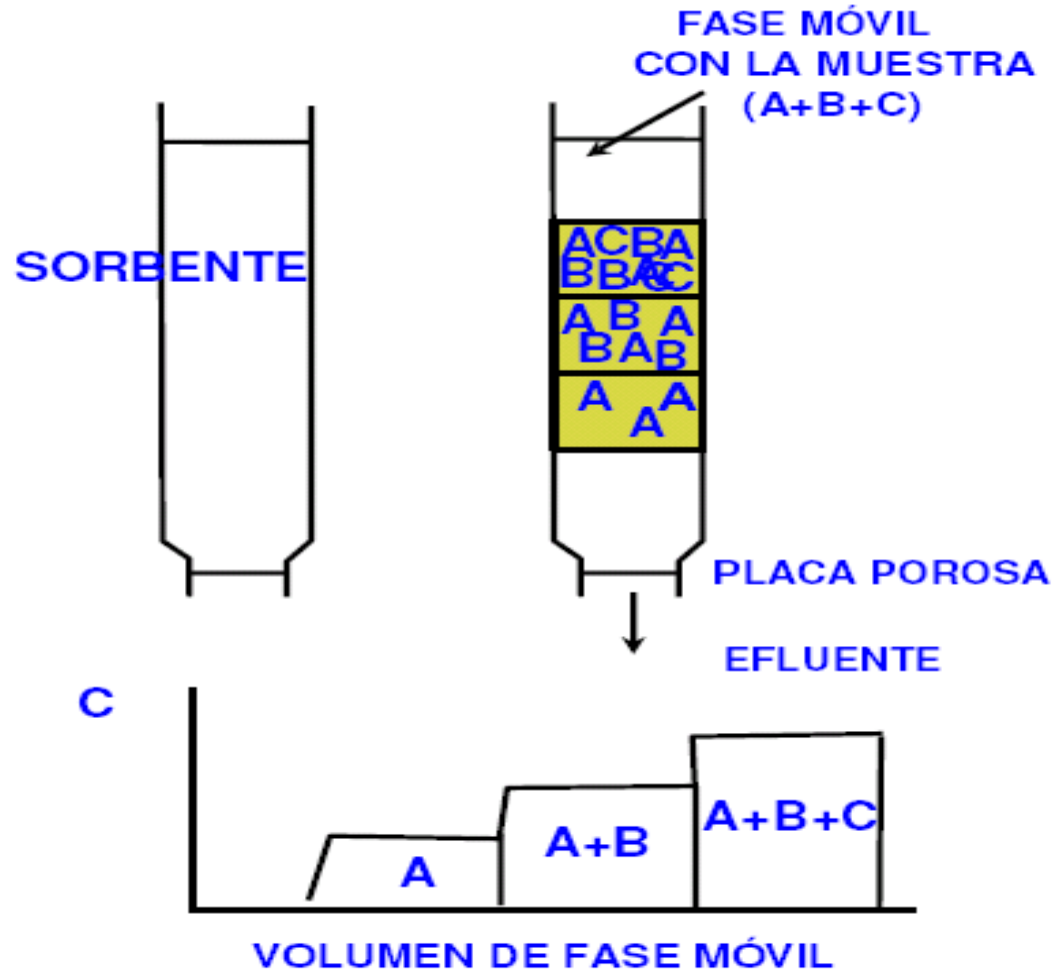
**Elución de analito muy retenido**

# EFS

- Elución de los analitos de interés y retención de impurezas.  $K_d$  grande para las impurezas y  $K_d$  pequeño para analitos.
- Elución de las impurezas y retención de los analitos de interés.  $K_d$  grande para los analitos y  $K_d$  pequeño para las impurezas
- En línea (on line)
- Fuera de línea (off line)

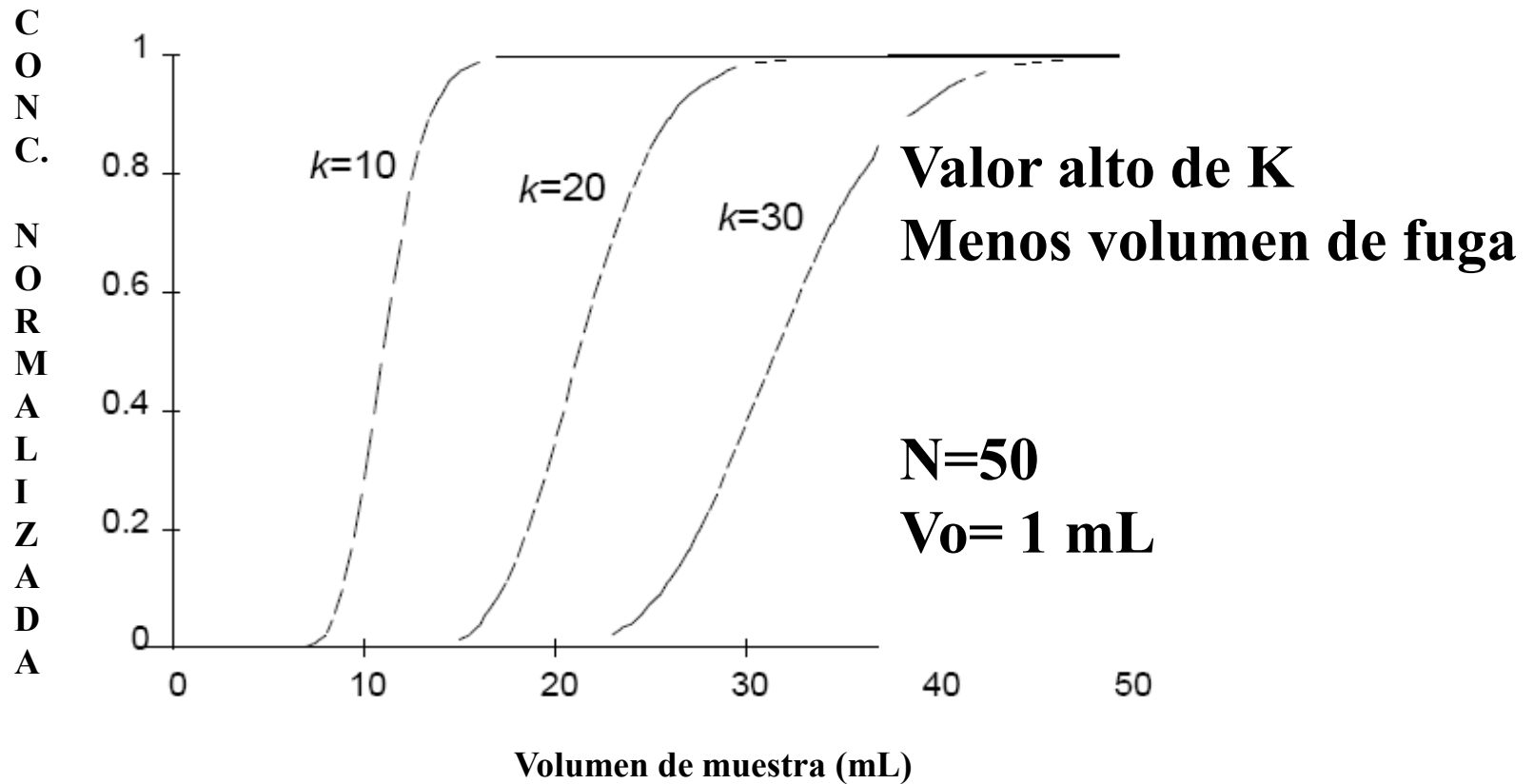
# EFS

## ANÁLISIS FRONTAL



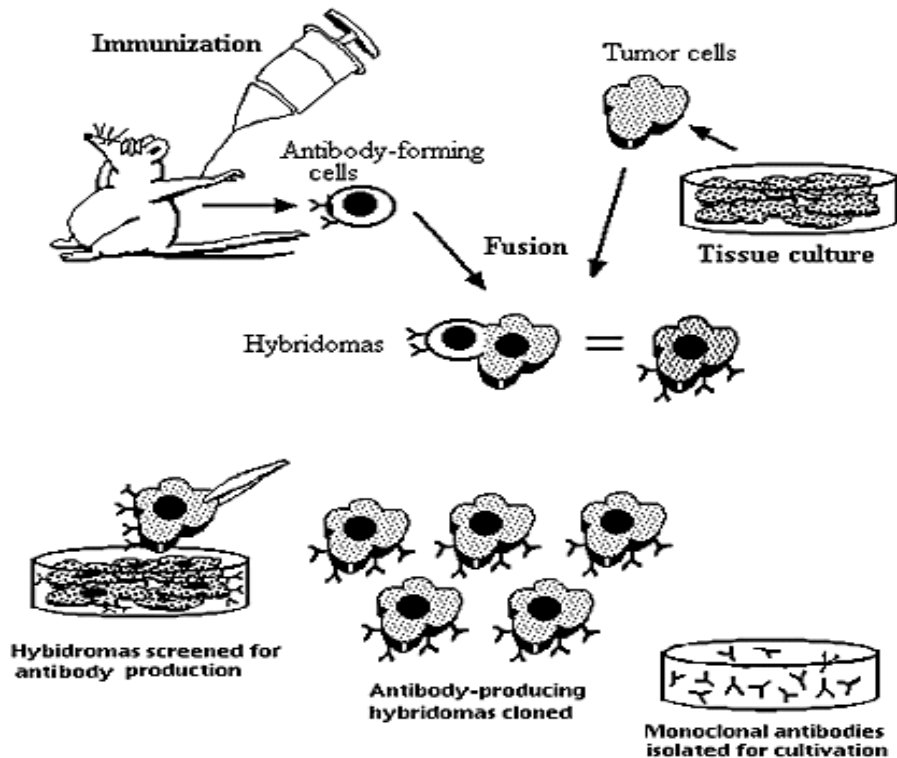
# EFS

## Carga de la muestra



# Inmunoadsorbentes (IA)

- Es la preparación de un antígeno o un anticuerpo enlazado covalentemente sobre un soporte macroporoso o encapsulado en una matriz de gel, el cual tiene como finalidad separar selectivamente anticuerpos o antígenos en una mezcla de sustancias.



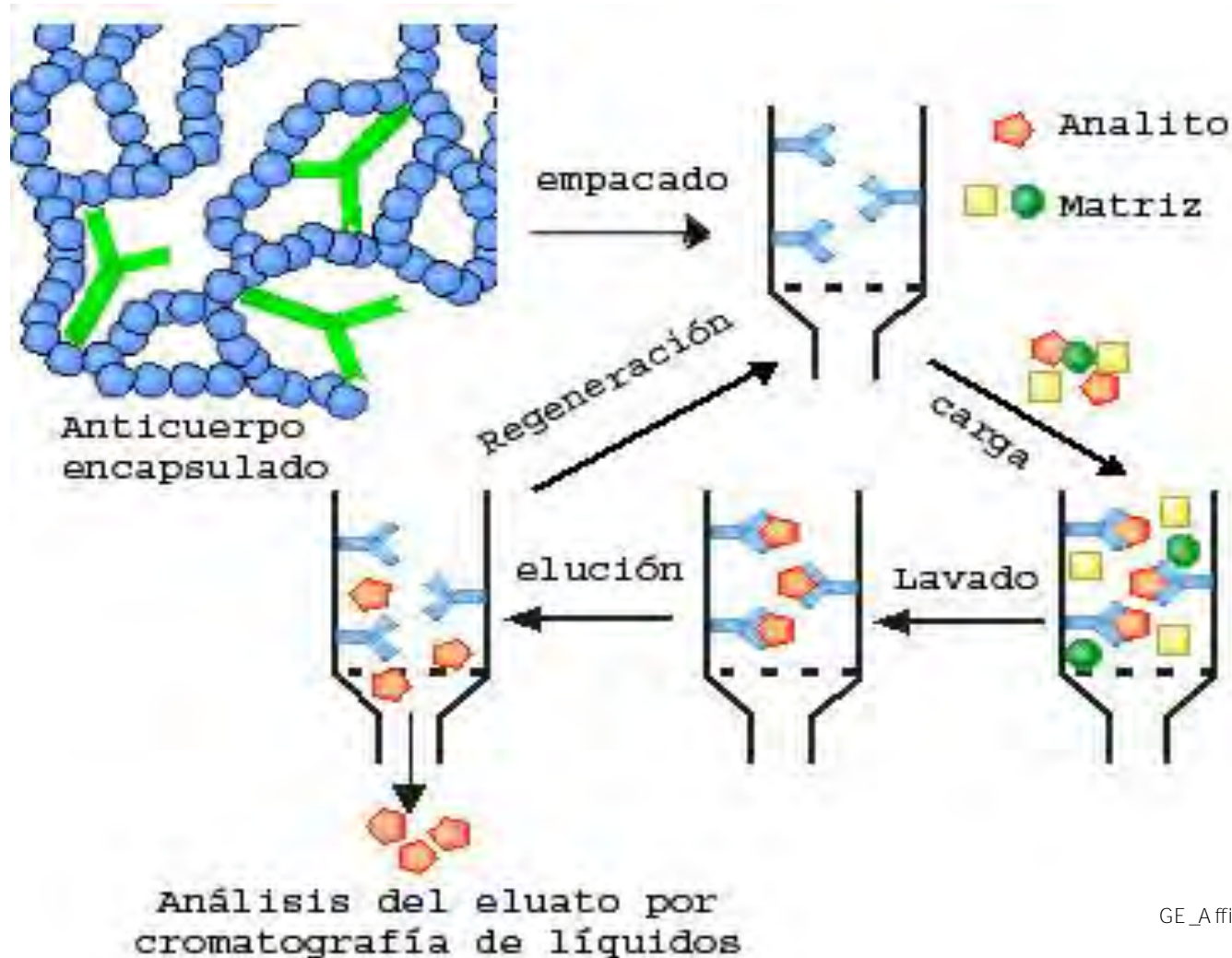
## **Biomoléculas: anticuerpos**

- monoclonales.
- policlonales.
- recombinantes

## **Soporte o matriz**

- Rígido y macroporoso.
- Químicamente estable.
- Poseer grupos funcionales adecuados para un acoplamiento covalente.
- Ser hidrofílico evitando adsorción no específica.
- Físicamente estable.

# Evaluación del inmunoadsorbente obtenido. Proceso de inmunoextracción



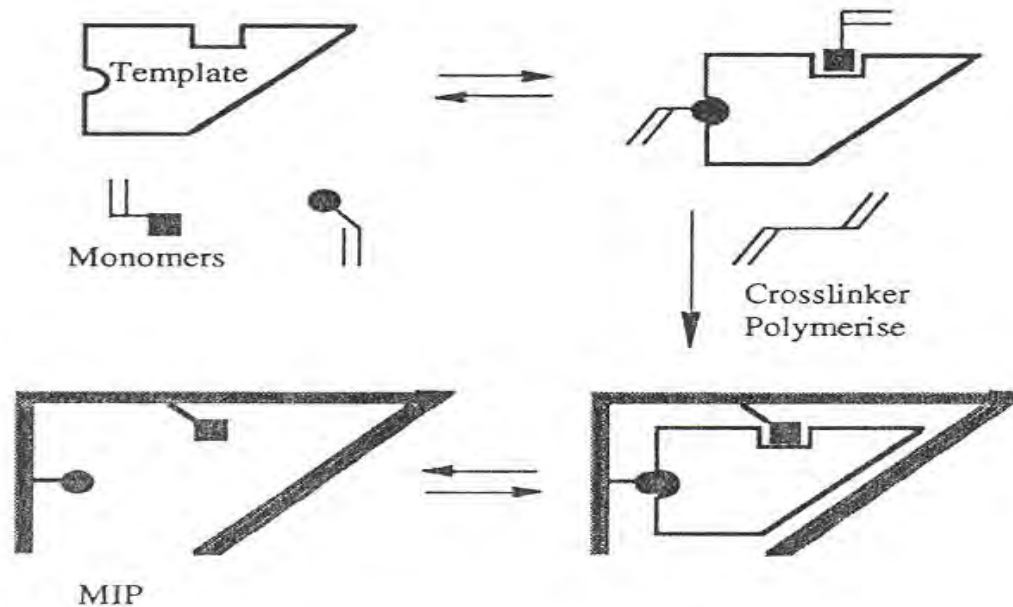


# Polímeros impresos molecularmente.

Son materiales en los que existen sitios de unión altamente específicos para una molécula deseada, esto se logra cuando monómeros funcionales se ordenan alrededor de la molécula de interés (plantilla o molécula de impresión) y se copolimerizan formando un polímero altamente entrecruzado, después de remover la plantilla se obtienen cavidades complementarias en forma y tamaño a la molécula de impresión.

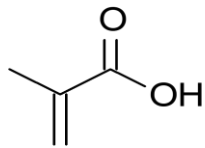
# Polímeros Impresos Molecularmente (PIM).

- Adsorbentes altamente selectivos.

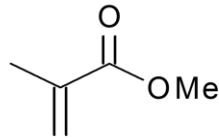


# Materiales de impresión molecular.

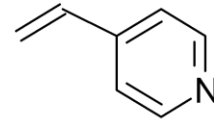
- Plantilla.
- Monómeros funcionales.



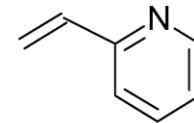
MAA



MMA

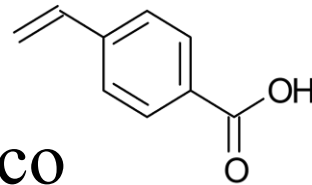


4-VP



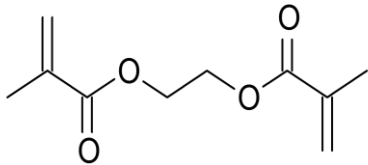
2-VP

Ácido p-vinilbenzónico

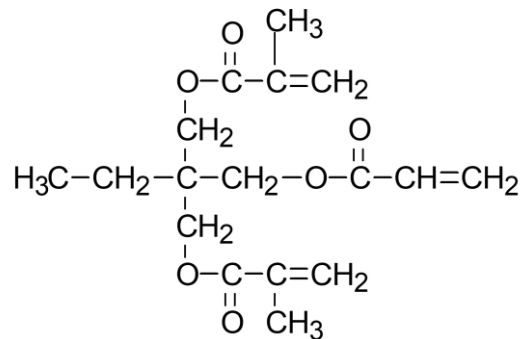


# Materiales de impresión molecular.

- Entrecruzador.

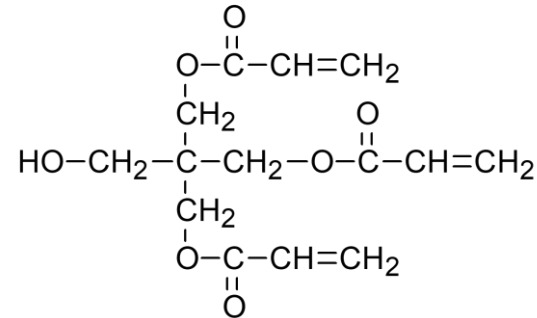


EDMA

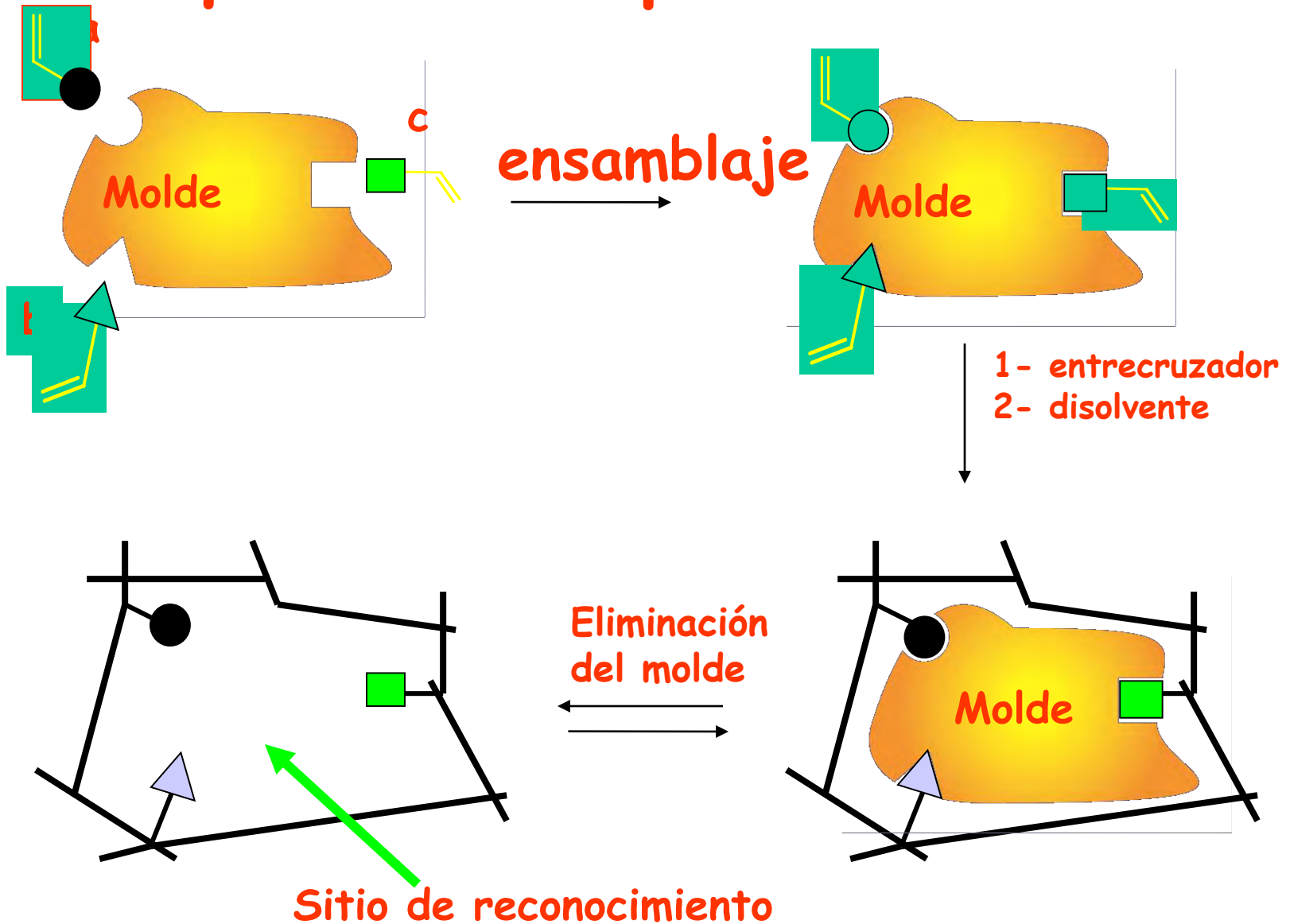


Triacrilato de pentaeritritol

Trimetacrilato de trimetilolpropano

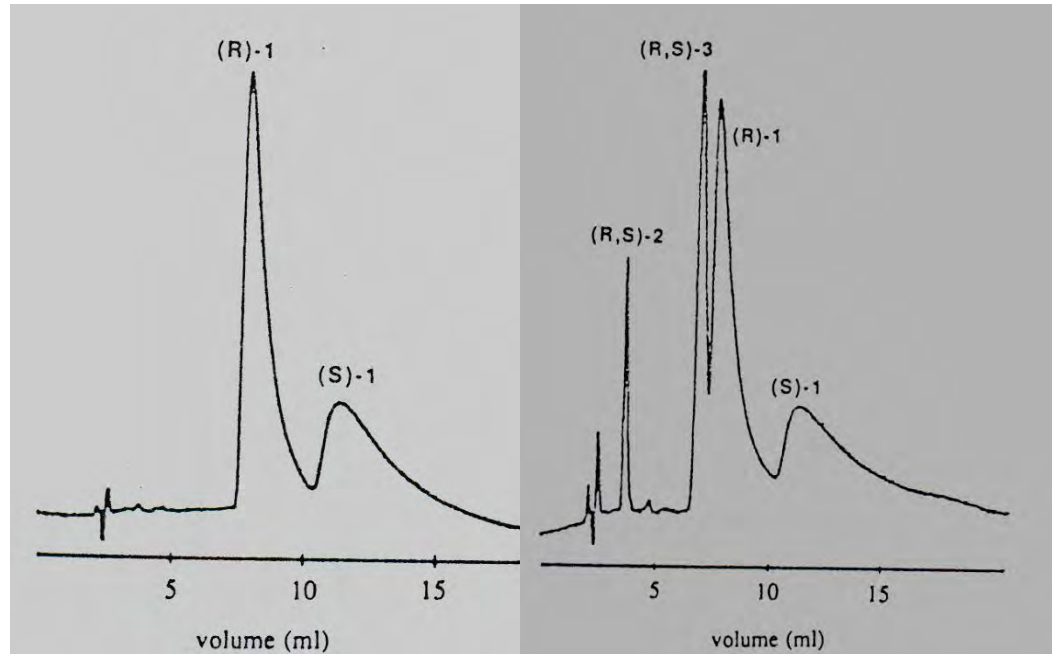
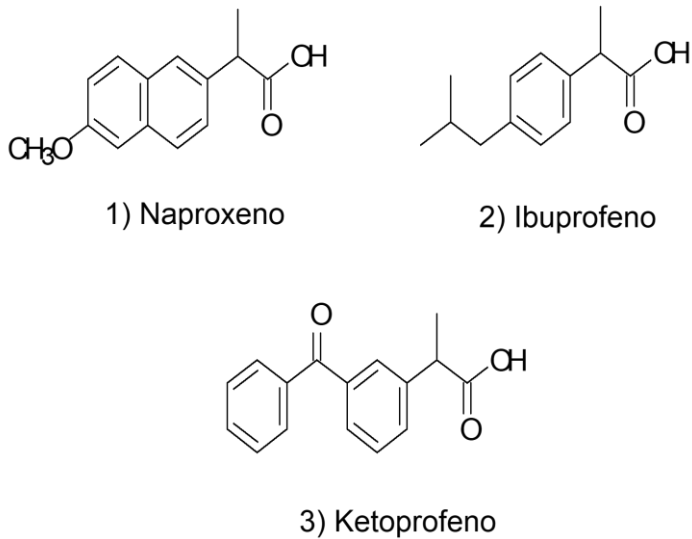


# Esquema de impresión molecular



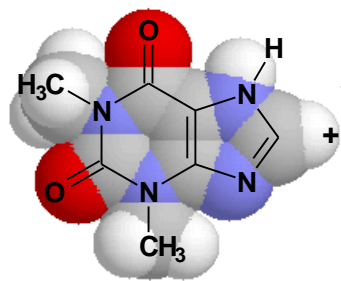
# EFS PI

- Materiales de separación hechos a la medida.

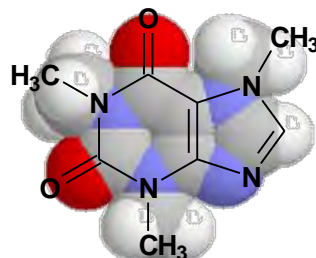
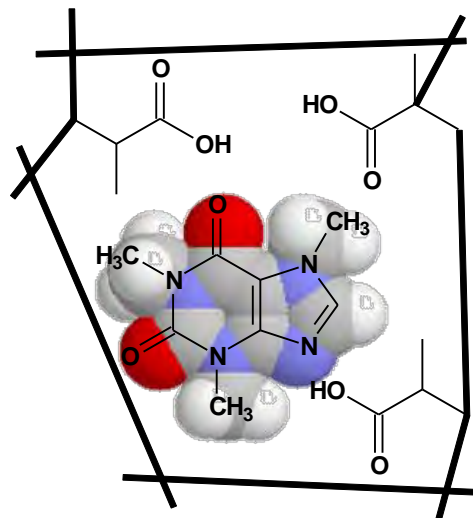
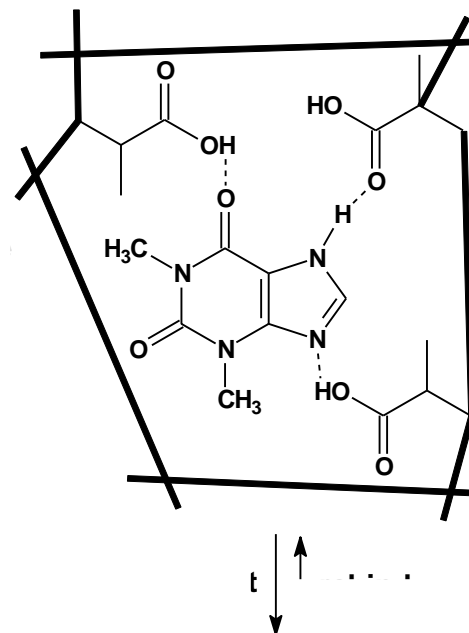
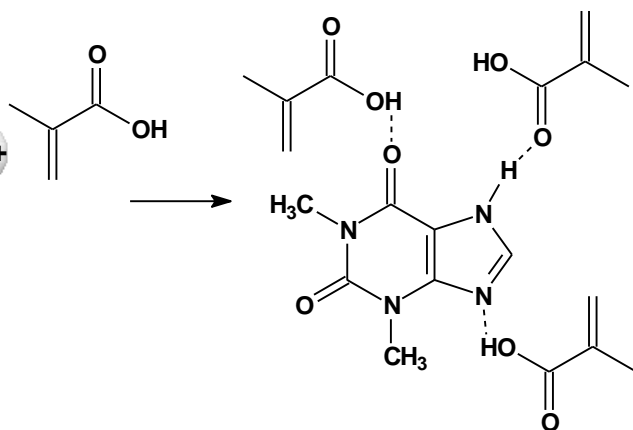


Separación de una mezcla racémica de R y S-naproxeno, -ibuprofeno y -ketoprofeno.

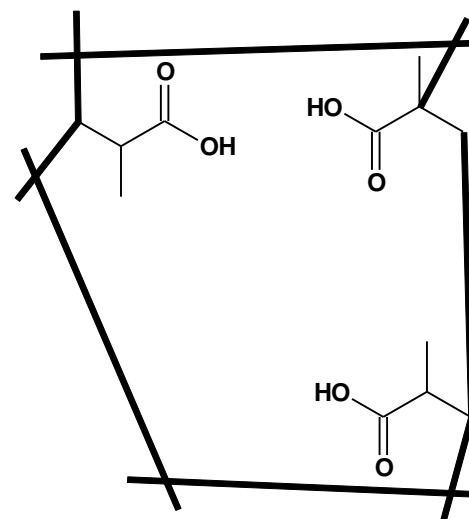
# Especificidad de polímeros impresos



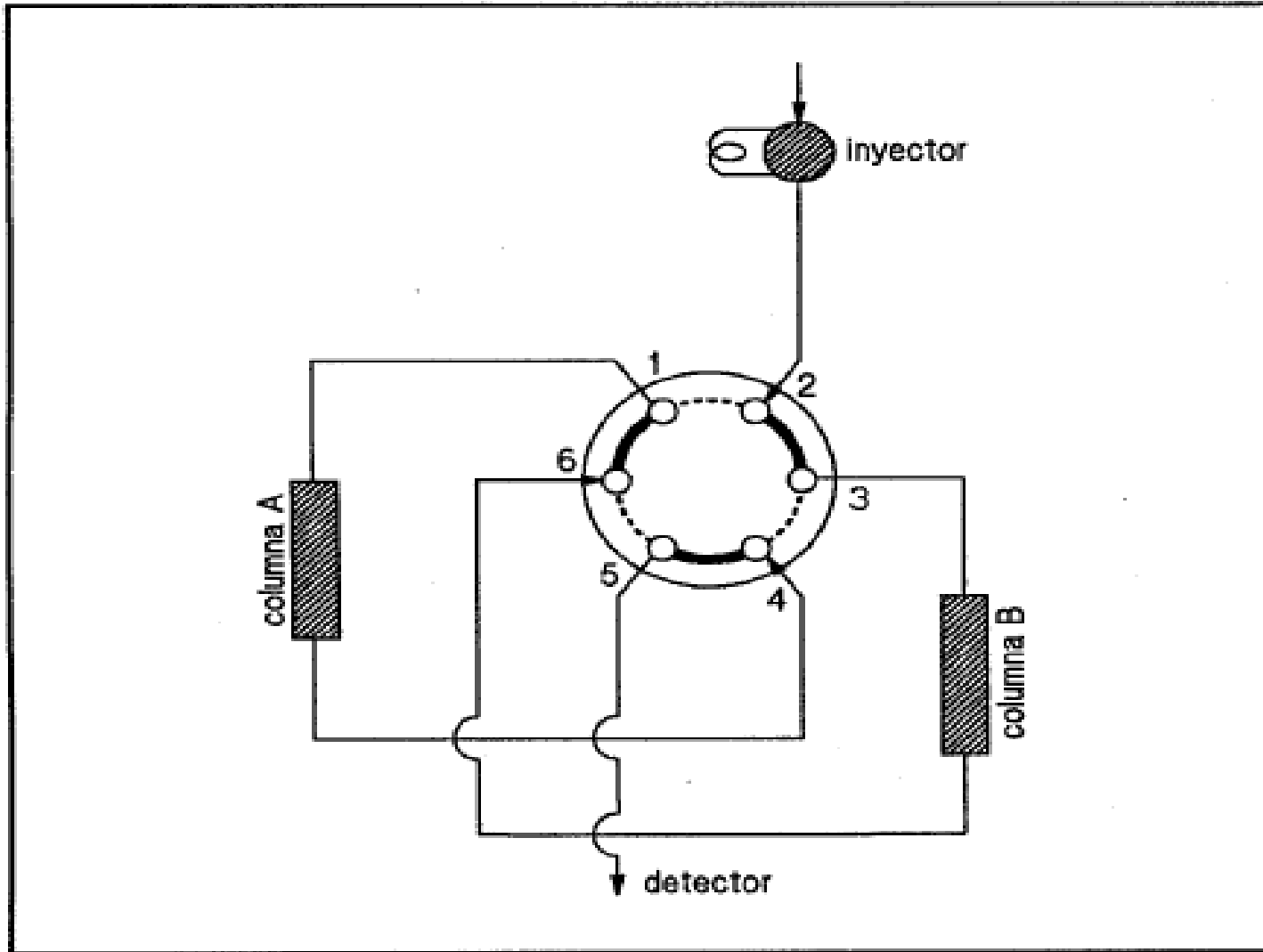
Theophylline



Caffeine

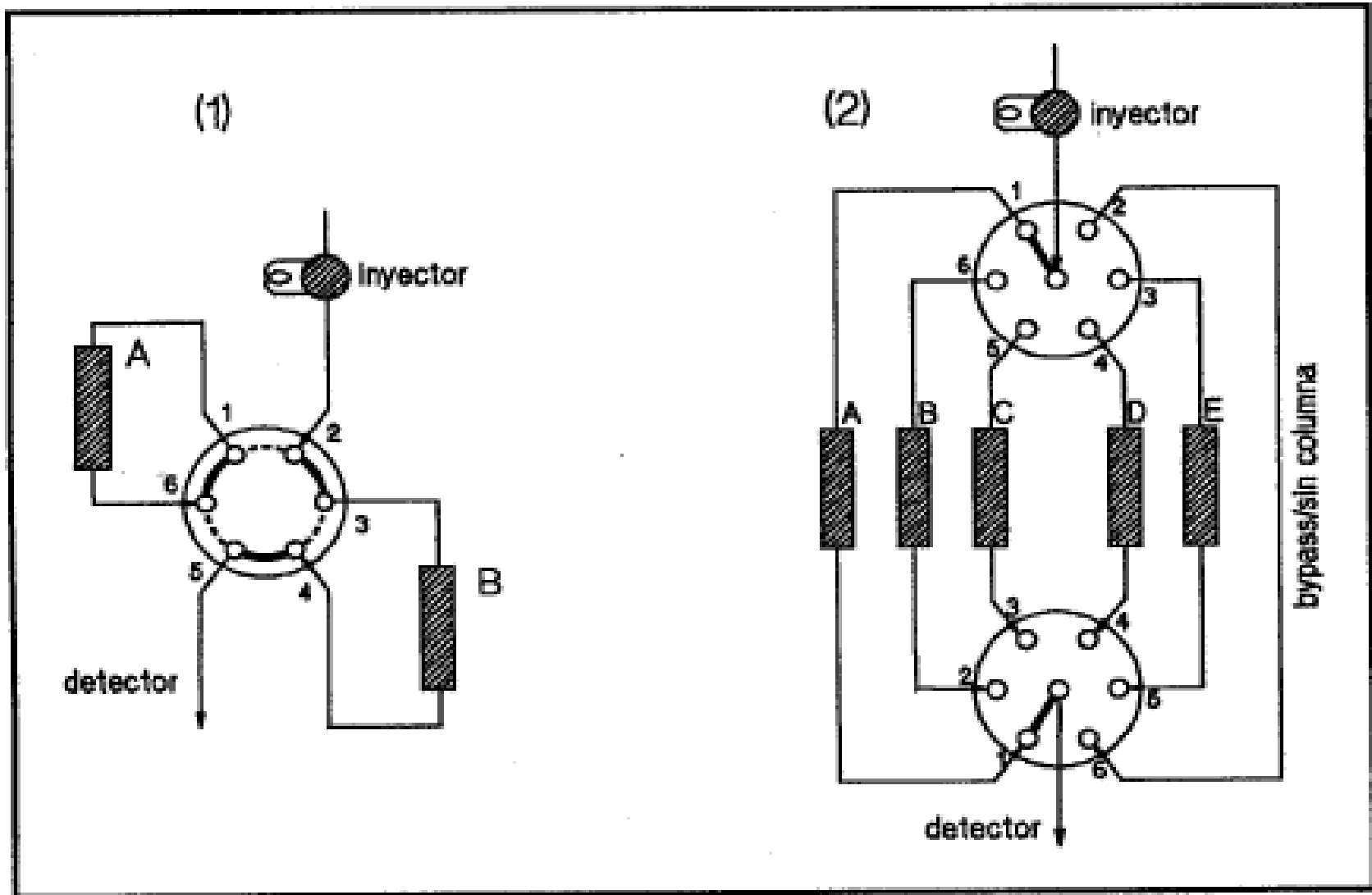


# Cromatografía de reciclaje

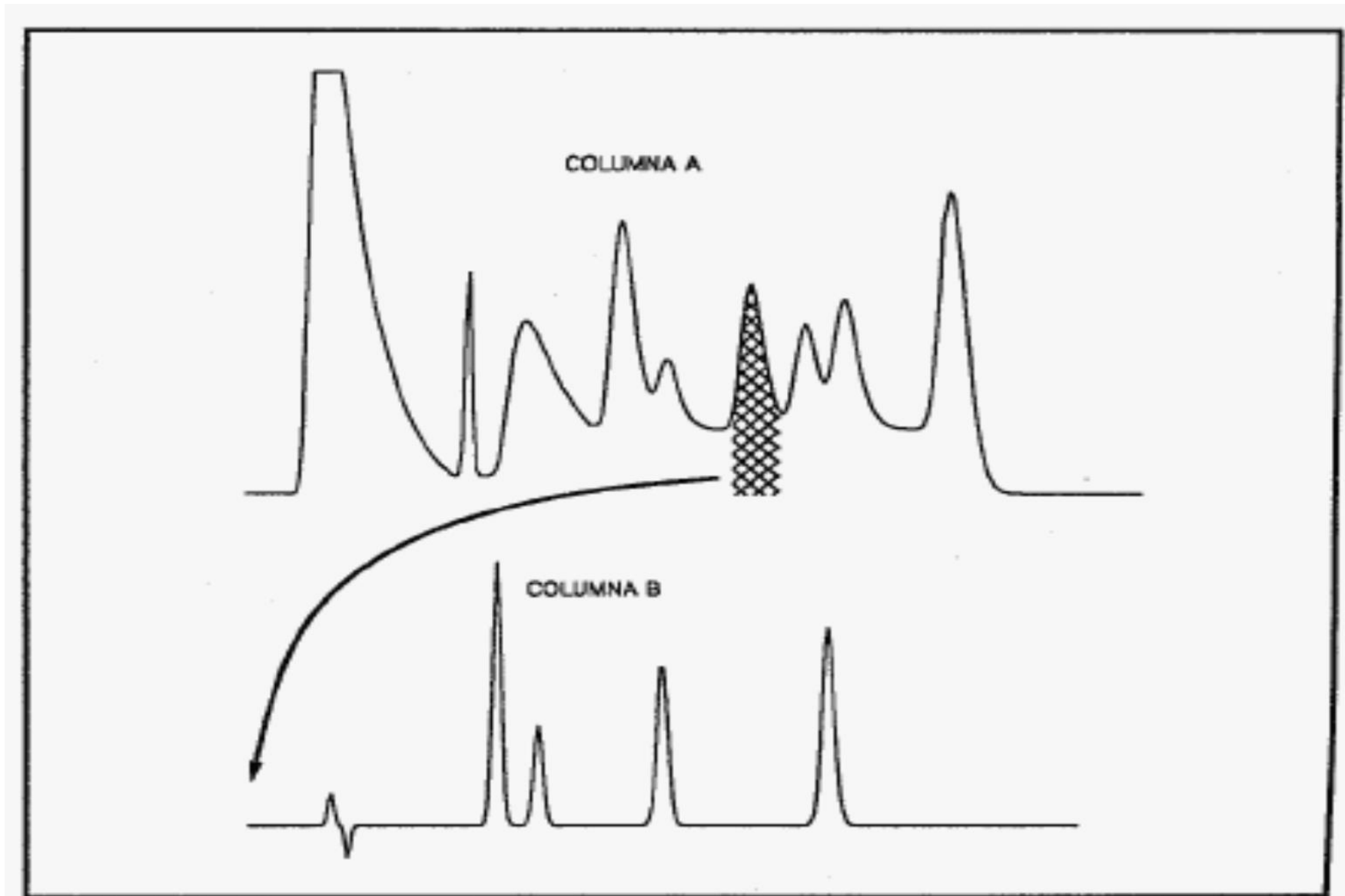




# Cromatografía multidimensional (enriquecimiento y/o limpieza)



# Cromatografía multidimensional (enriquecimiento y/o limpieza)



# Derivatización

Modificación de la molécula del analito para facilitar su análisis por cromatografía

En cromatografía líquida la derivatización se utiliza para mejorar la detección

**Pre-columna.** Antes de la separación cromatográfica

**Post-columna.** Después de la separación cromatográfica

## **Pre-columna:**

-Off-line

-No se modifica el sistema cromatográfico

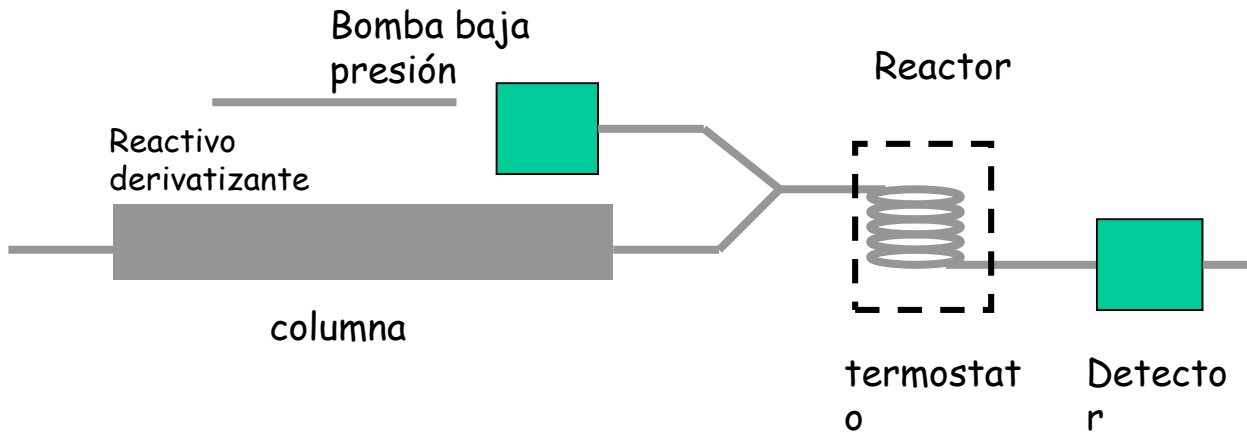
-Cambia el modo de separación

## **Post-columna:**

-On-line

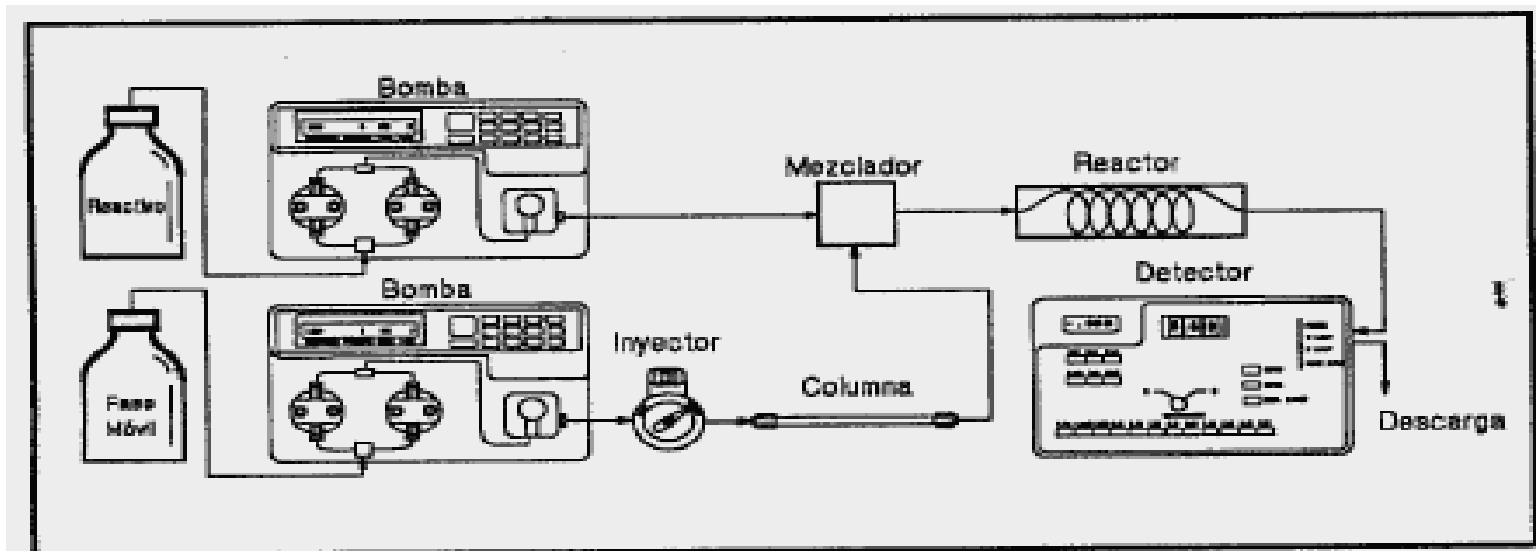
-Dispositivo situado entre columna y detector

# Derivatización



Post-column on-line

- Formación derivados coloreados
- Formación derivados fluorescentes

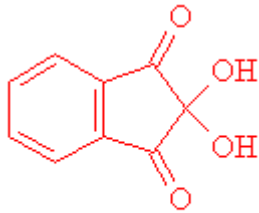


# Derivatización

## Formación derivados coloridos

Compuesto

Aplicación



NINHIDRINA

Aminoácidos      color  
azul ( $\lambda$ , 570 nm)

Ejemplo: Determinación de aminoácidos.  
Separación por cromatografía iónica y  
derivatización post-columna con  
ninhidrina

# Reactivos comunes de derivatización

Grupo Funcional	Derivatización		Detección
	Reactivo	Tipo	
Ac Carboxílicos	Haluro de Fenacilo	pre	UV 260 nm
	Bromometilmetoxicumarina	pre	Fluorescencia
Alcoholes Fenoles/tioles	Haluro de Benzoilo	pre	UV 260 nm
	Fenilisotiocianato	pre	UV 240 nm
Aldehídos y Cetonas	Dinitrofenilhidrazina	pre	UV 430 nm
	Dansilhidrazina	pre	Fluorescencia
Aminas	Fenilisotiocianato	pre	UV 254 nm
	Cloruro de Dansilo	pre	Fluorescencia
	o-ftalaldehído	pre post	Fluorescencia
	Fluorescamina	pre post	Fluorescencia
Aminas Terciarias	Naftil cloroformiato	pre	Fluorescencia

# Preparación de la muestra

## Concentradores

Después de la extracción y limpieza la muestra suele quedar diluida

El disolvente se elimina por evaporación en vacío o mediante el paso de una corriente de nitrógeno



# Preparación de la muestra

## Concentrador es



Concentrador aplicando fuerza centrífuga calentamiento y vacío.



# Derivatización

Modificación de la molécula del analito para facilitar su análisis por cromatografía

En cromatografía líquida la derivatización se utiliza para mejorar la detección

**Pre-columna.** Antes de la separación cromatográfica

**Post-columna.** Después de la separación cromatográfica

## **Pre-columna:**

- Off-line
- No se modifica el sistema cromatográfico
- Cambia el modo de separación

## **Post-columna:**

- On-line
- Dispositivo situado entre columna y detector

- **Fase estacionaria, fase móvil y análisis cuantitativo**

# CLAR COLUMNA

## COLUMNA

CONTENEDOR

MATERIAL

DIÁMETRO

LONGITUD

GEOMETRÍA

TIEMPO DE ANÁLISIS  
LÍMITE DE DETECCIÓN  
CONSUMO DISOLVENTE

RELLENO

TAMAÑO

FORMA

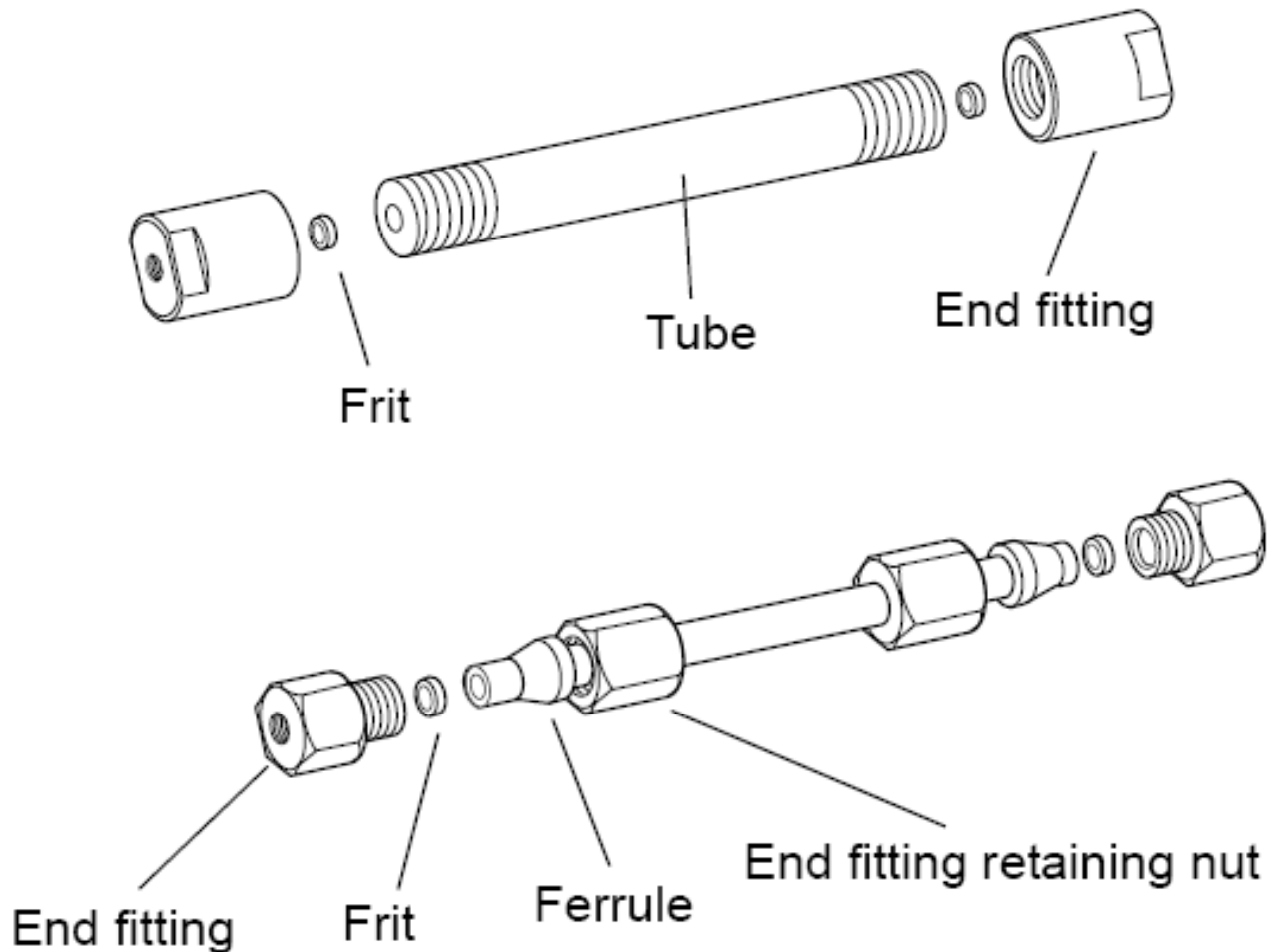
NATURALEZA  
QUÍMICA

CINÉTICA

TERMODINÁMICA

RETENCIÓN  
SELECTIVIDAD  
RESOLUCIÓN<sub>6</sub>

# CLAR Column



Diferencias entre una columna PEEK™ y una de acero

# CLAR SOPORTES

## (1). Óxidos inorgánicos mesoporosos

### Métodos sol-gel

(a) **silica,**  
**SiO<sub>2</sub>**

Sol: silicato de sodio o solución ácida de tetralcoxisilano.

↓  
Hidrolisis  
↓ crecimiento  
gel

(b) **Alumina, titania and zirconia** (Estable en todo el rango de pH)

(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>)  
↓                  ↘          ↙  
pH: 2-14      1-14

c. **Óxidos derivatizados**

d. **Polímeros porosos**

e. **Carbón grafitizado**

f. **Partículas no porosas**

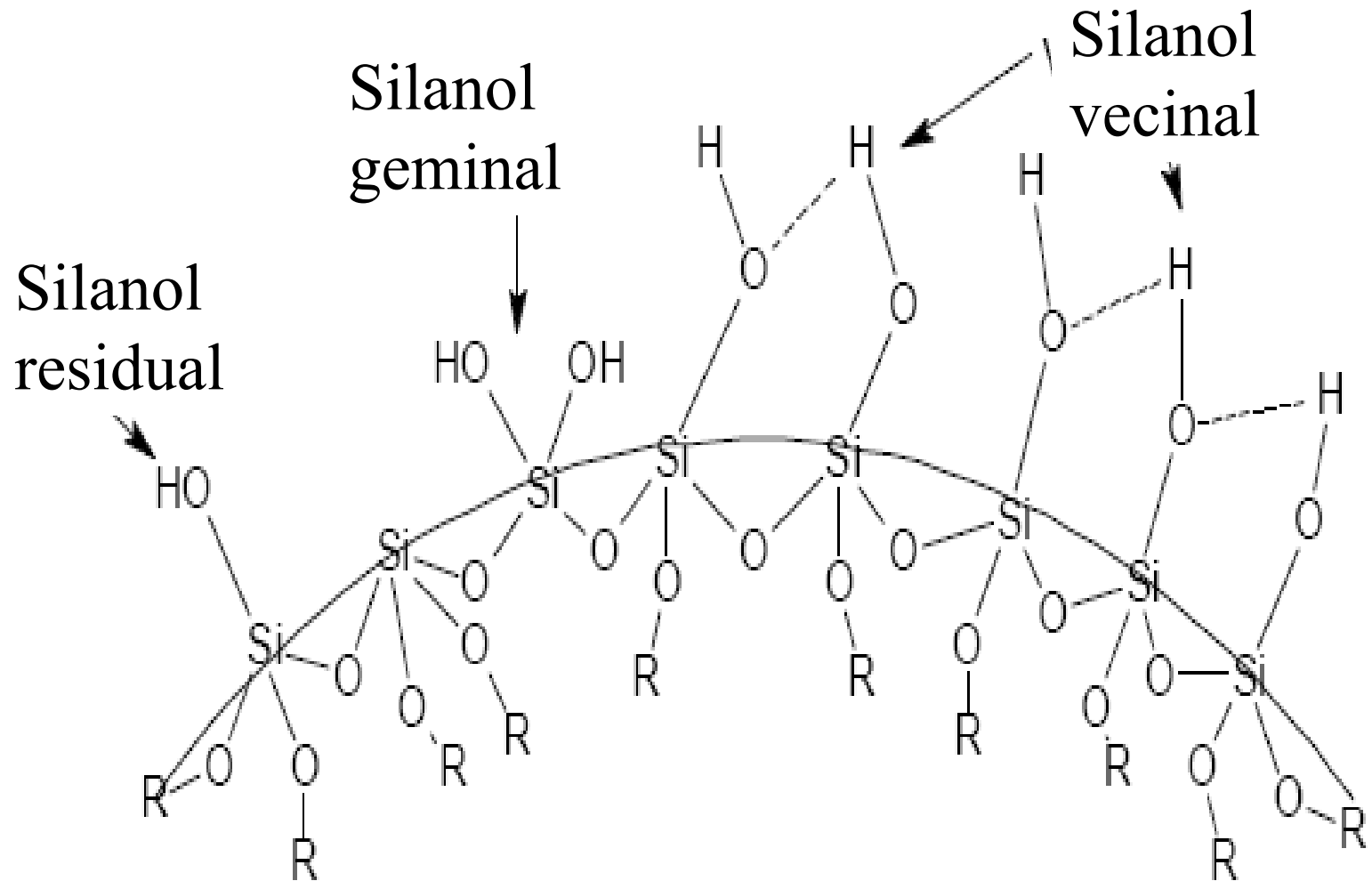
g. **Monolitos**

# CLAR Fases estacionarias

- Diámetro de partícula (3 to 10 micras).
- Distribución de tamaño de partícula (muy estrecho el intervalo).
- Forma (Esféricas o irregulares).
- Porosidad (no porosa , totalmente porosa, mediamente porosa – monolíticas-  $\epsilon = 0.9$ )
- Tamaño de poro (5 to 30 nm )
- Distribución de tamaño de poro (estrecho)
- Área superficial ( 100- 250 m<sup>2</sup>/g)
- Estabilidad química (pH, fases móviles)

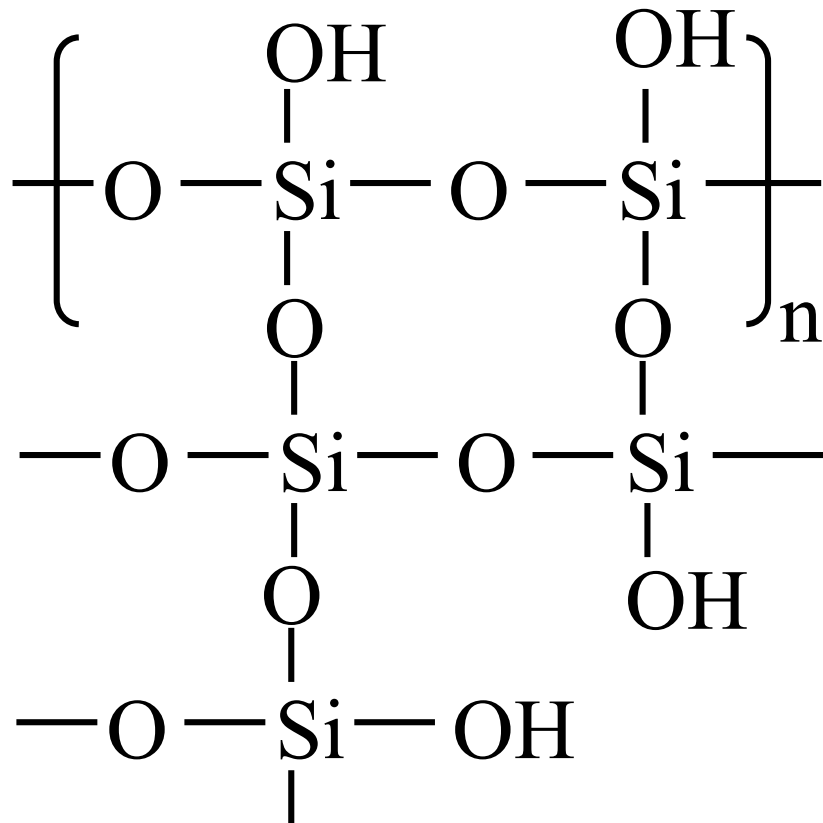
# CLAR

## SOPORTE DE SÍLICE



# Fase Normal

- Grupos silanol o superficie modificada polar (amino, diol, nitro, ciano)





# Fase reversa

Fase estacionaria: no polar

Fase móvil: polar

La Retención disminuye con el incremento de polaridad de los analitos

La Retención se incrementa con el aumento de polaridad de la fase móvil

- Sílices modificadas (C8, C18, fenilo,...),  
estabilidad  $2 < \text{pH} > 8$
- poli(estireno/divinilbenceno)
- Carbon grafitizado

# Fase reversa

Fase móvil orgánica

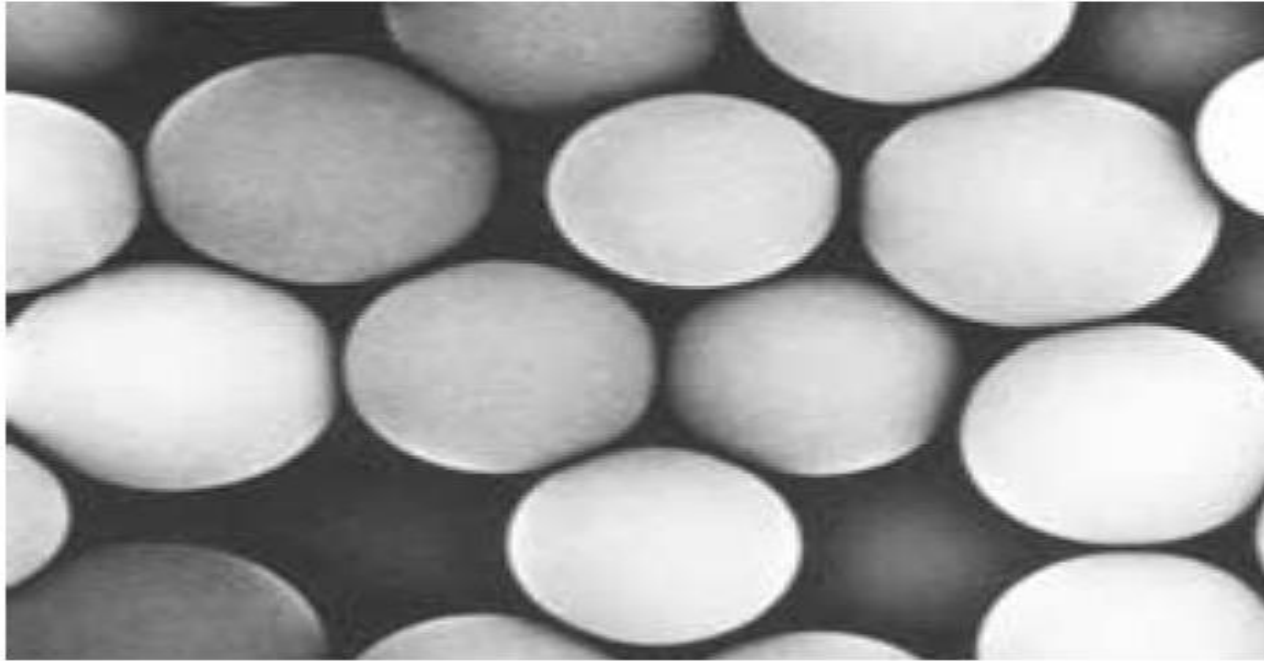


Fase móvil acuosa

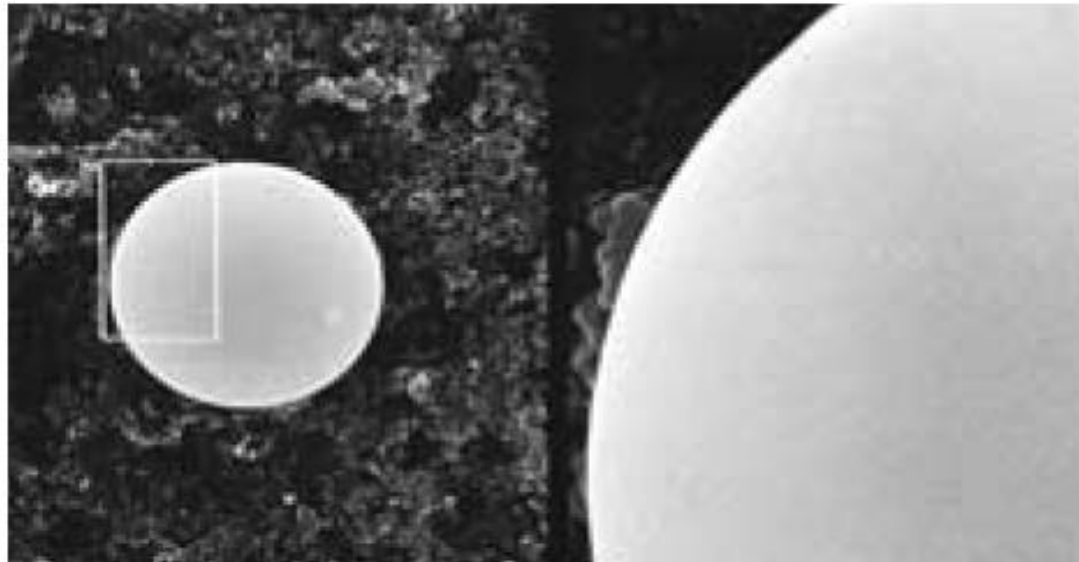


# CLAR

## Cationes adsorbidos.



Los cationes metálicos en la superficie de la sílice incrementan la acidez del soporte



# CLAR

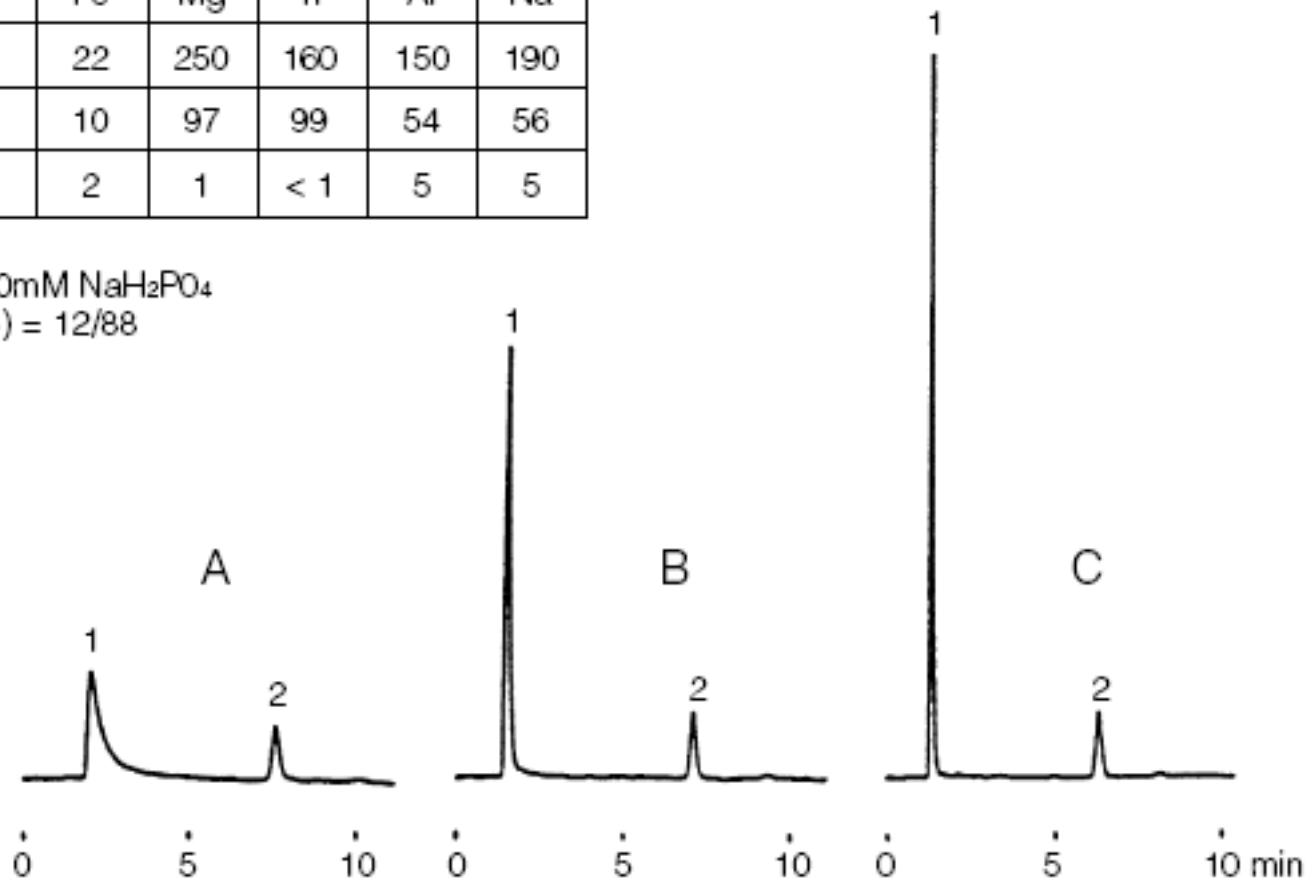
## Columna. Fases. Impurezas de cationes metálicos

Impurezas de metales (ppm)

	Zn	Fe	Mg	Ti	Al	Na
A	19	22	250	160	150	190
B	4	10	97	99	54	56
C	1	2	1	< 1	5	5

CH<sub>3</sub>CN/10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
(PH = 2.5) = 12/88

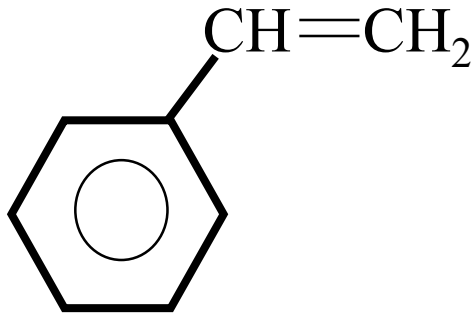
1 Riboflavina 2 Tiamina



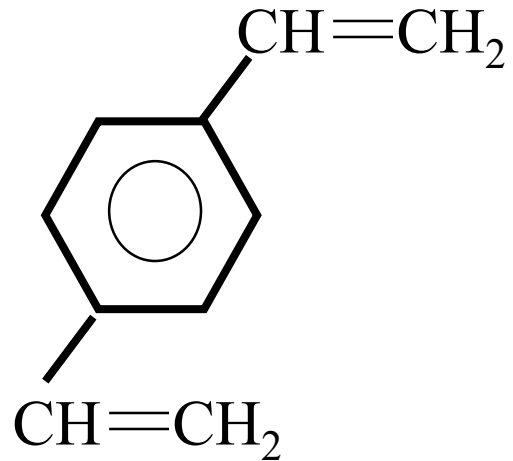
# Fase reversa

Fases poliméricas

PS/DVB poliestireno-divinil benceno



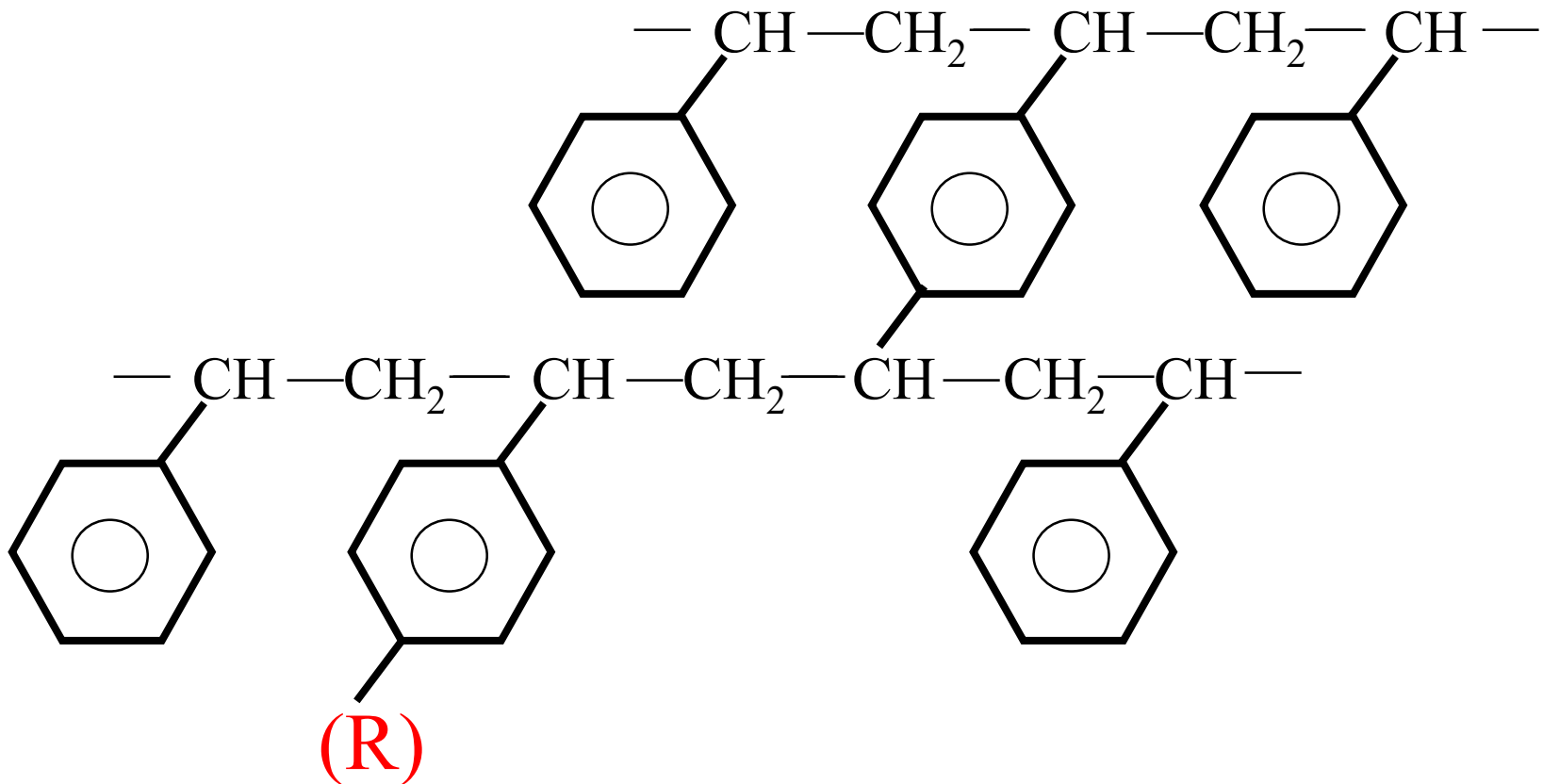
estireno



divinil benceno

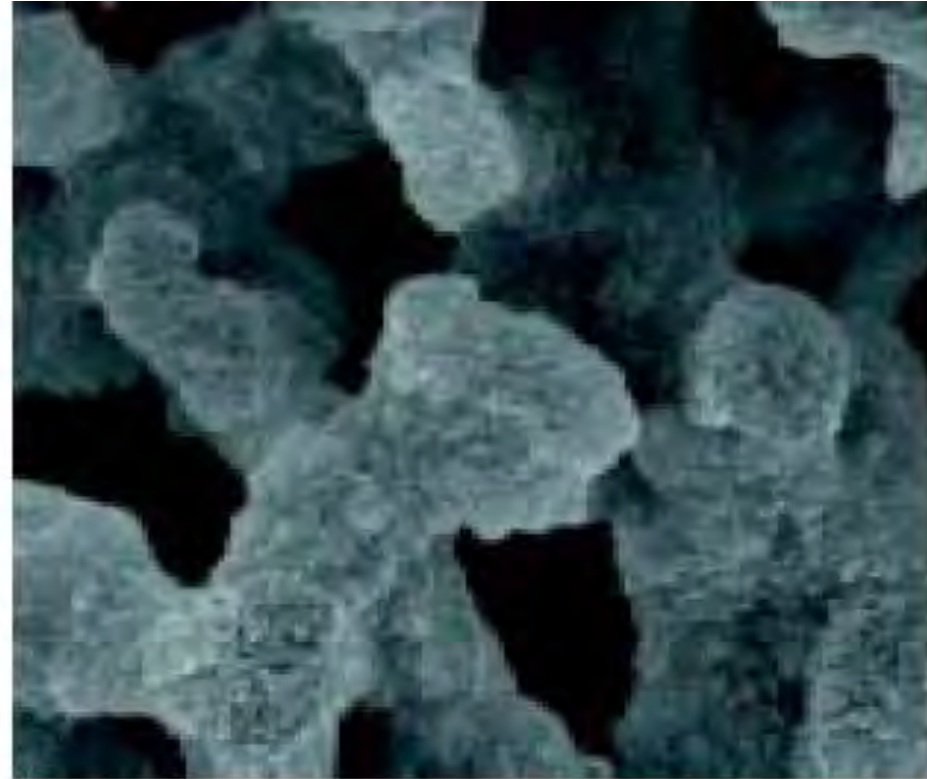
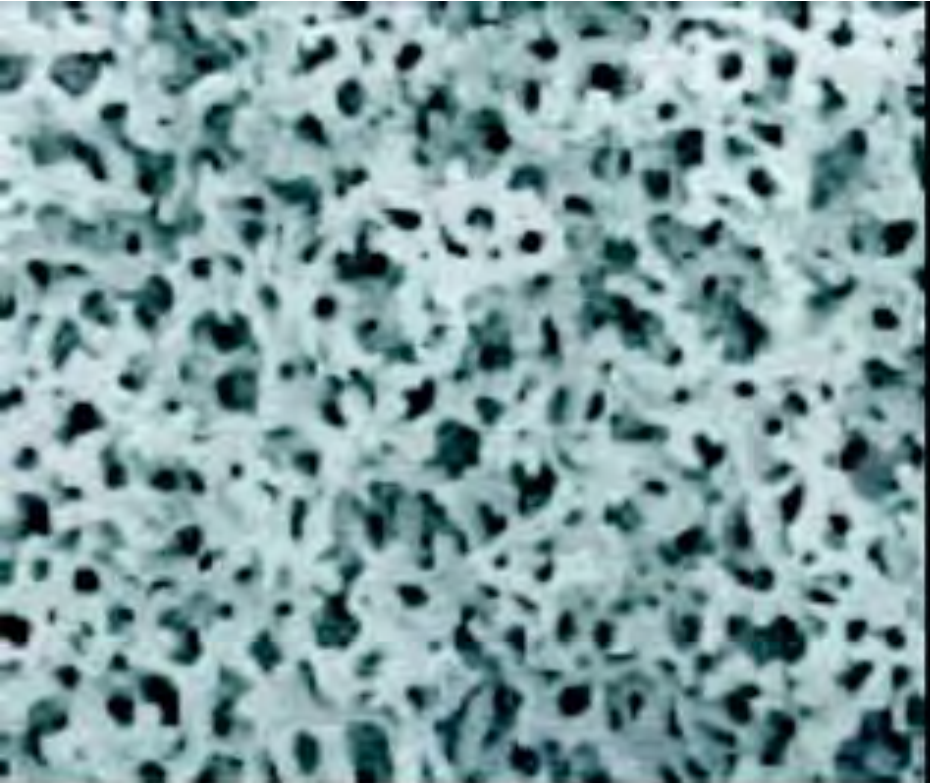
# Fase reversa

PS/DVB



# CLAR

## Columna. Fases monolíticas



ESTRUCTURA  
MICROSCÓPICA Y  
MACROSCÓPICA DE LA  
SÍLICE **MONOLÍTICA**

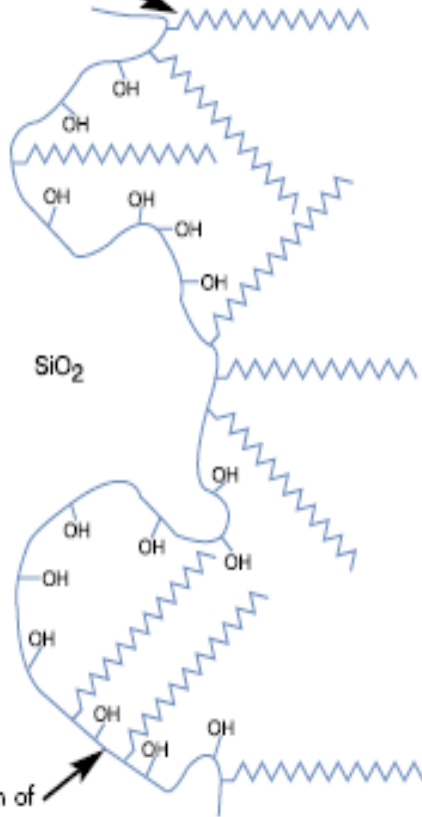


# CLAR

## Column. Fases a base de carbón

C 18

Cleavage of organosilane at low pH

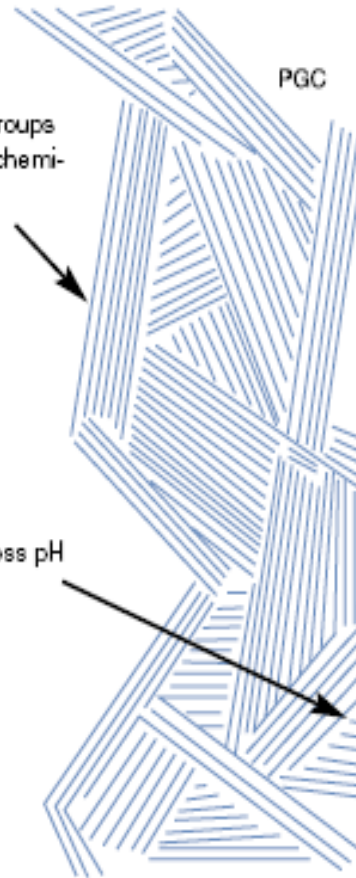


Dissolution of Silica at >pH9

Hypercarb

No surface groups available for chemical attack

Stable across pH range 0-14



- Estabilidad pH 1-14
- Compuestos polares, isómeros geométricos y diastereoisómeros.
- Diferente selectividad a fases C-18 y poliméricas PS-DV.



# CLAR

## Columna. Fases a base de carbón

### Isómeros del ácido benzoico

Hypercarb, 7 $\mu$ m, 100x4.6mm

Eluent: phosphate buffer / ACN 65:35

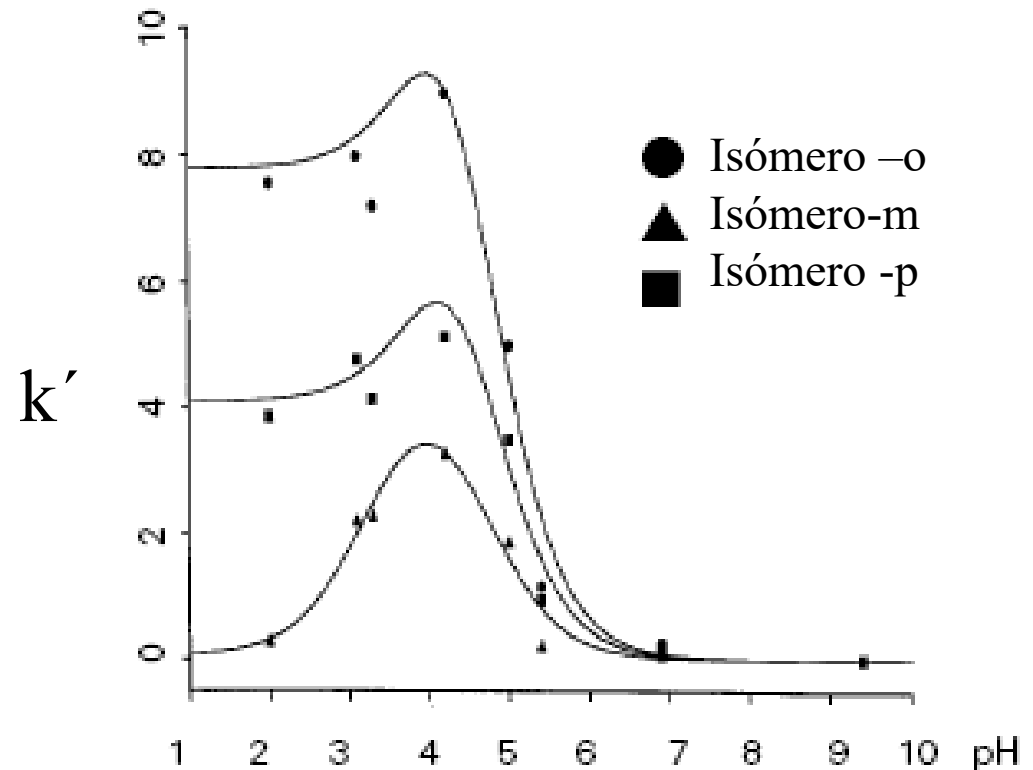
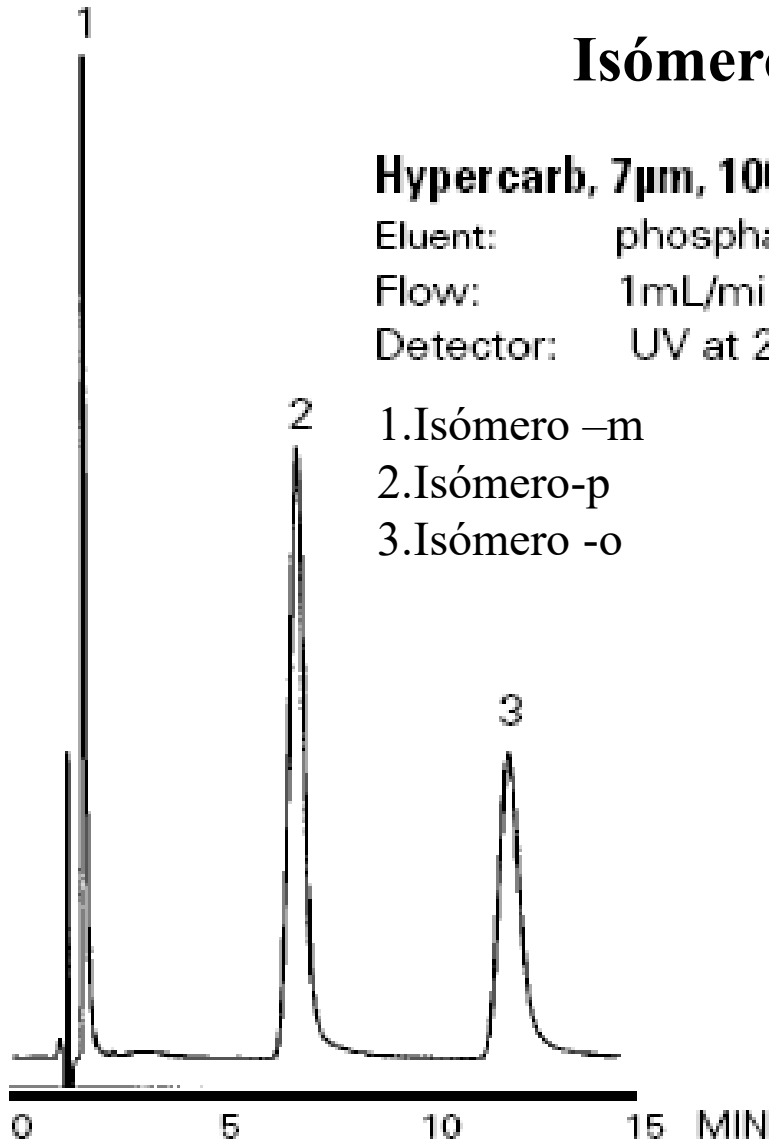
Flow: 1mL/min

Detector: UV at 254nm

1. Isómero -m

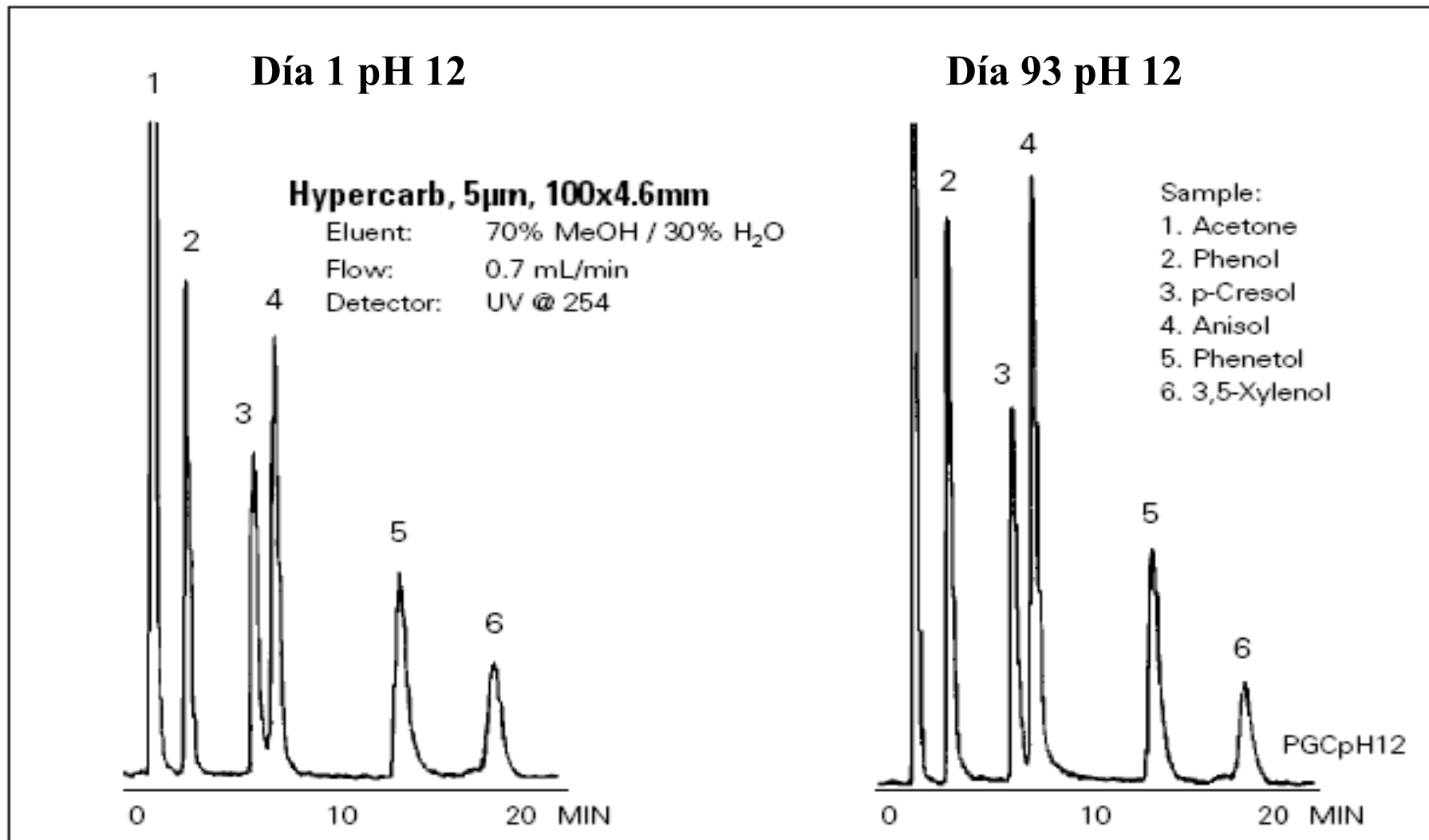
2. Isómero -p

3. Isómero -o



# CLAR

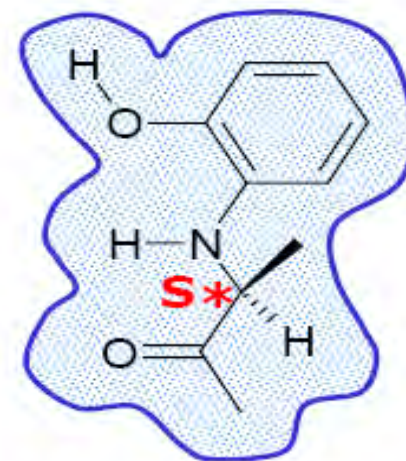
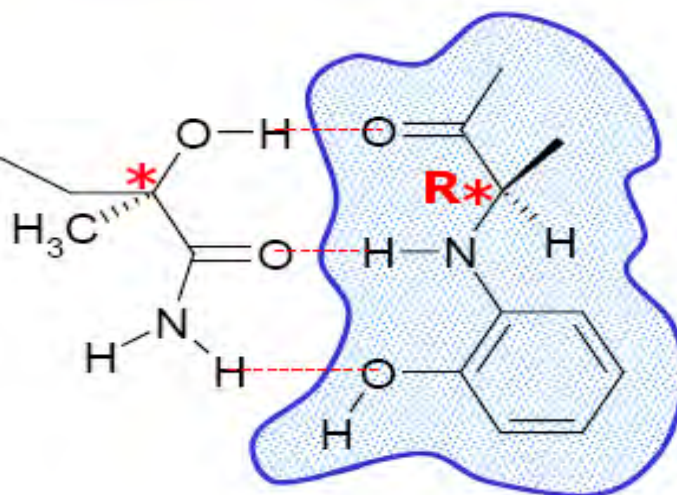
## Columna. Fases a base de carbón



# CLAR

## Columnas quirales

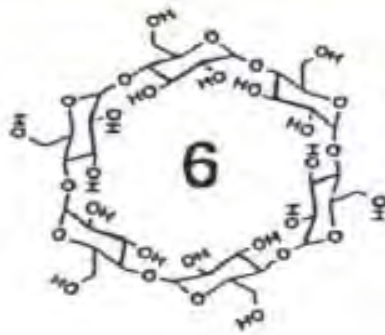
COMPLEJO DE AFINIDAD DE  
UNA FASE ESTACIONARIA  
QUIRAL CON UNO DE LOS  
ENANTIÓMEROS ANALITO



# CLAR

## Columnas quirales

COMPLEJOS DE INCLUSIÓN EN UNA CAVIDAD (CICLODEXTRINAS)



$\alpha$ -Cyclodextrin



$\alpha$



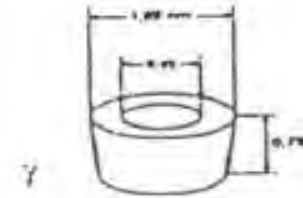
$\beta$ -Cyclodextrin



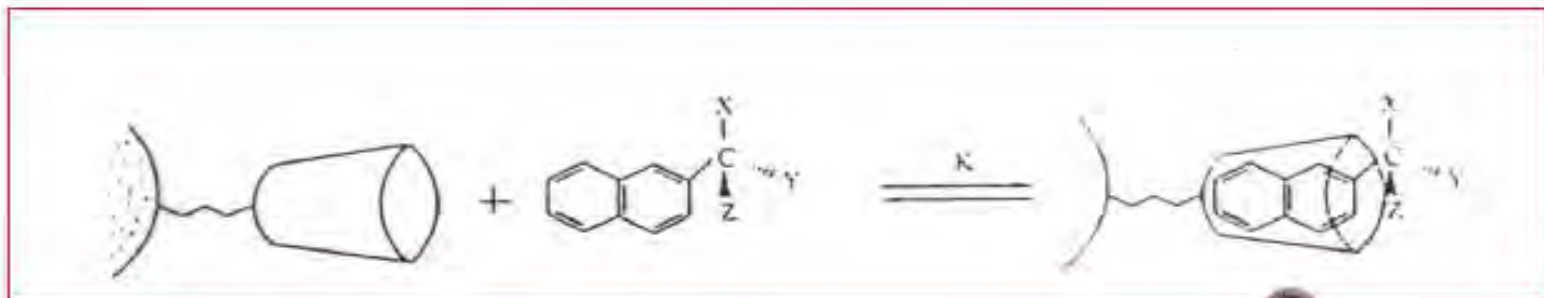
$\beta$



$\gamma$ -Cyclodextrin



$\gamma$



**CLAR**  
**Caída de presión**

$$\Delta p = 1000 \frac{F \eta L}{\pi r^2 dp^2}$$

$$\Delta p = \frac{u \eta L \Theta}{dp^2}$$

$\Delta P$  es importante cuando oscila entre  
150 a 200 bar.

# CLAR Columna

$$h = \frac{H}{dp}$$

Altura del plato teórico reducida

4-10 buena columna

Número de capas de partículas equivalentes a un plato teórico.

$$v = \frac{udp}{D_M}$$

El plato teórico no debe tener un espesor menor a una partícula.

Velocidad lineal reducida

# CLAR

## valores de operación

Tipo de columna	D.I. (mm)	Longitud (cm)	F (mL/min)	Capacidad
Convencional	4.6	10-25	1	10-100 $\mu\text{g}$
Semianalítica	0.2-1	1-10	0.001-0.020	1-10 $\mu\text{g}$
Capilar	0.04-0.08	1-100	0.0005-0.002	100 ng -1 $\mu\text{g}$
Capilar abierta	0.015-0.040	1-100	< 0.001	< 100 ng

Sí la columna se usa al día siguiente puede guardarse con la fase móvil de trabajo, excepto sí está un pH menor de 4 o cercano a 8

Sí la columna se guarda más de 2 días lavar con agua pura

Sí la columna se guarda por más tiempo la fase será 80:20 ACN:Agua o ACN puro

# **CLAR Prueba de calidad**

## **FASE REVERSA**

**Solutos: tolueno, xileno, cumeno naftaleno, acenafteno, antraceno, ftalatos de cadena larga (hexil ftalato o dioctil ftalato) (mezclas de parabenos).**

**Fase móvil ACN: Agua 50-70 % C8-C18 y 30-50 C1-C8 v:v o ajustar para un adecuado factor de capacidad mayor de 2.**

## **FASE NORMAL (sílice pura)**

**Solutos: acetanilida, ftalatos de cadena corta, anisaldehído.**

**Fase móvil: Hexano, cloruro de metileno con pequeñas cantidades (0.1-0.5%) de ACN, MeOH o Is-PropOH.**

**Sí se usan detectores de absorbancia una concentración máxima de 100 mg/mL y una altura del pico que no exceda 0.1 AUFS**



# CLAR Prueba de calidad

## FASE NORMAL (fase enlazada)

Solutos: acetanilida, ftalatos de cadena corta, anisaldehido.

Fase móvil: Hexano, cloruro de metileno con pequeñas cantidades (0.1-0.5%) de ACN, MeOH o Is-ProOH

Para fase enlazada amino, los solutos son una muestra de carbohidratos y fase móvil 70:30 ACN:agua

## FASE DE INTERCAMBIO IÓNICO

Solutos: ácido benzoico, feniletilamina, sulfatos o nitratos

Elución con soluciones amortiguadoras 0.01M o con soluciones salinas 0.01M

**Sí se usan detectores de absorbancia una concentración máxima de 100 mg/mL y una altura del pico que no exceda 0.1 AUFS**

# CLAR Regeneración de columnas

## Fase reversa

Lavado con agua (20 volúmenes de columna)

Lavado con acetonitrilo (20 volúmenes de columna)

Lavado con isopropanol (5 volúmenes de columna)

Lavado con acetonitrilo (20 volúmenes de columna)

Lavado con heptano (20 volúmenes de columna)

Lavado con isopropanol (5 volúmenes de columna)

Lavado con acetonitrilo (20 volúmenes de columna)

# CLAR Regeneración de columnas

## Fase normal

Lavado con heptano (20 volúmenes de columna)

Lavado con isopropanol (5 volúmenes de columna)

Lavado con acetonitrilo (20 volúmenes de columna)

Lavado con agua (20 volúmenes de columna)

Lavado con acetonitrilo (20 volúmenes de columna)

Lavado con isopropanol (5 volúmenes de columna)

Lavado con heptano (20 volúmenes de columna)

# CLAR Regeneración de columnas

## Intercambio iónico

Lavado con buffer 0.01M (20 volúmenes de columna)

Lavado con isopropanol (5 volúmenes de columna)

Lavado semejante a los de fase reversa

Lavado con agua (20 volúmenes de columna)

Lavado de la columna a las condiciones originales

# Fases móviles

Disolventes, puros o mezclas, que deben ser reactivos de alta pureza y microfiltrados

Disolvente	$\delta$ , polaridad	Viscosidad, (cp)	$\lambda$ , cut-off (nm)
Hexano	14,9	0,31	190
Tolueno	18,1	0,58	285
Tetrahidrofurano	18,6	0,47	220
Cloroformo	19,0	0,57	245
Acetato etilo	19,6	0,44	260
Dioxano	20,4	1,54	220
Acetonitrilo	23,9	0,37	190
Etanol	25,9	1,20	210
Metanol	29,4	0,60	205
Agua	47,8	1.0	190

# Fases móviles

La **viscosidad** debe ser baja para que la presión de trabajo no sea demasiado elevada

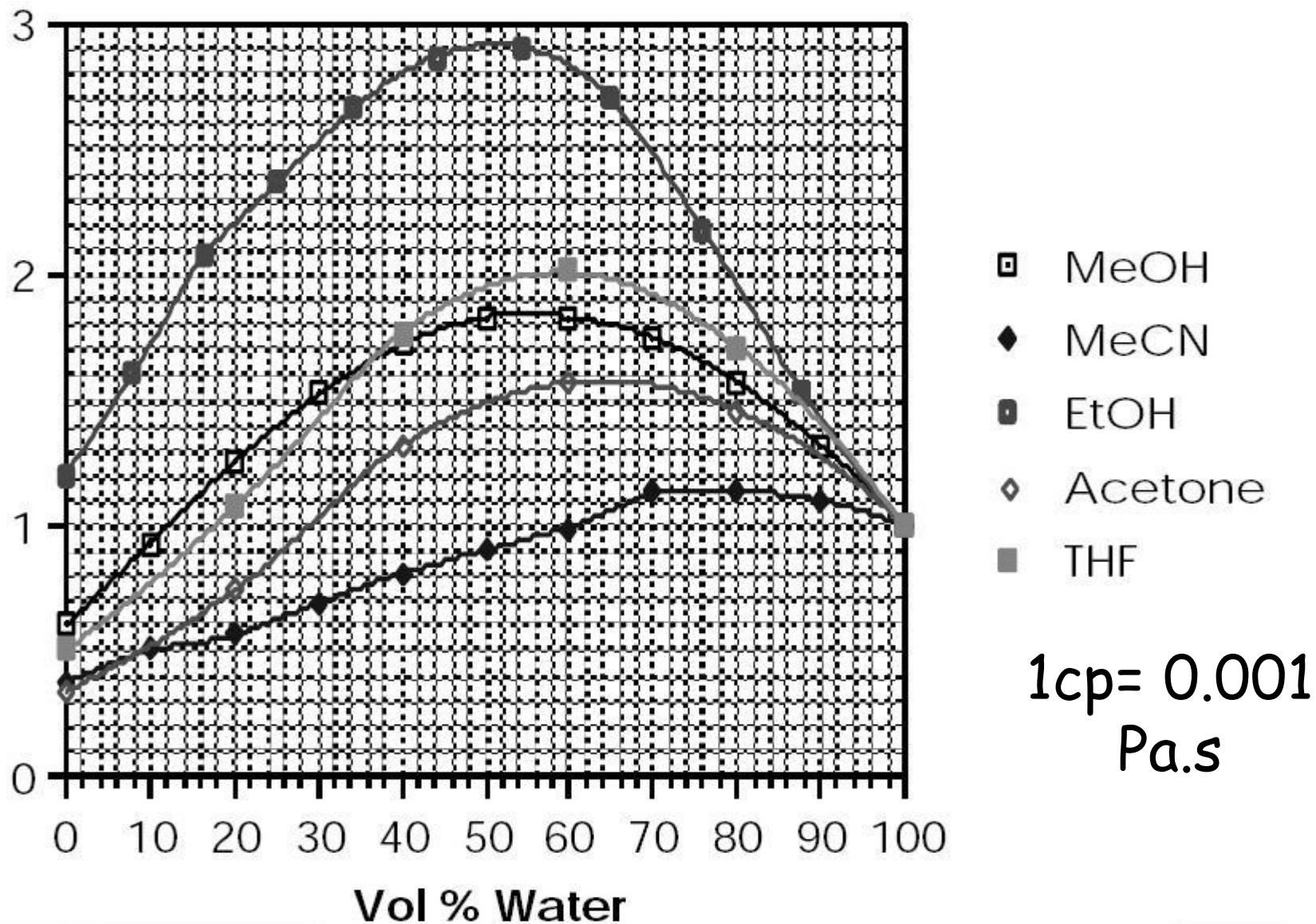
Cuando dos disolventes tienen polaridades similares se elige el menos viscoso.

Por ejemplo, metanol se utiliza en lugar del etanol

**Longitud de onda de corte** ( $\lambda$  cut-off). Longitud de onda a la que el disolvente presenta una absorbancia = 1,000, medida en una célula de 1 cm de paso de luz.

Parámetro importante cuando se utiliza el detector de absorbancia UV. Indica el rango útil de longitudes de onda del disolvente. Debe ser lo más bajo posible.

# Viscosidad de la fase móvil



# Fases móviles

**Polaridad.** En cromatografía de reparto la distribución de un soluto entre las dos fases depende de las interacciones del soluto con cada fase.

Las fuerzas relativas de estas interacciones dependen de la variedad y la intensidad de las fuerzas moleculares,

- momento dipolar
- carácter dador o aceptor de protones
- formación enlaces hidrógeno
- fuerzas tipo dispersivo

El concepto de **polaridad** se usa en cromatografía como un índice de la capacidad de los compuestos de interactuar con otros en las formas citadas.

Se aplica a solutos y a las fases móviles y estacionarias.

Cuanto más polar es una molécula mayor es su interacción con otras moléculas mediante los mecanismos citados



Fases móviles  
Medida de la polaridad

Disolvente	$\delta$	P'
Hexano	14,9	0,1
Tolueno	18,1	2,4
Tetrahidrofurano	18,6	4,0
Cloroformo	19,0	4,1
Acetato etilo	19,6	4,4
Dioxano	20,4	4,8
Acetonitrilo	23,9	5,8
Etanol	25,9	4,3
Metanol	29,4	5,1
Agua	47,8	10,2

# Disolventes. Clasificación de Snyder

Clasifica los disolventes según sus valores de  $P'$  y, además, tiene en cuenta los efectos específicos ( $X$ )

- carácter aceptor de protones ( $X_e$ )
- carácter dador de protones ( $X_d$ )
- carácter dipolar ( $X_n$ )

Separa los disolventes en ocho grupos, según la similitud de sus valores de  $X$ .

De los disolventes con valores similares de  $P'$  sólo tendrán comportamientos similares aquellos que estén en el mismo grupo de selectividad.

# Disolventes. Clasificación de Snyder

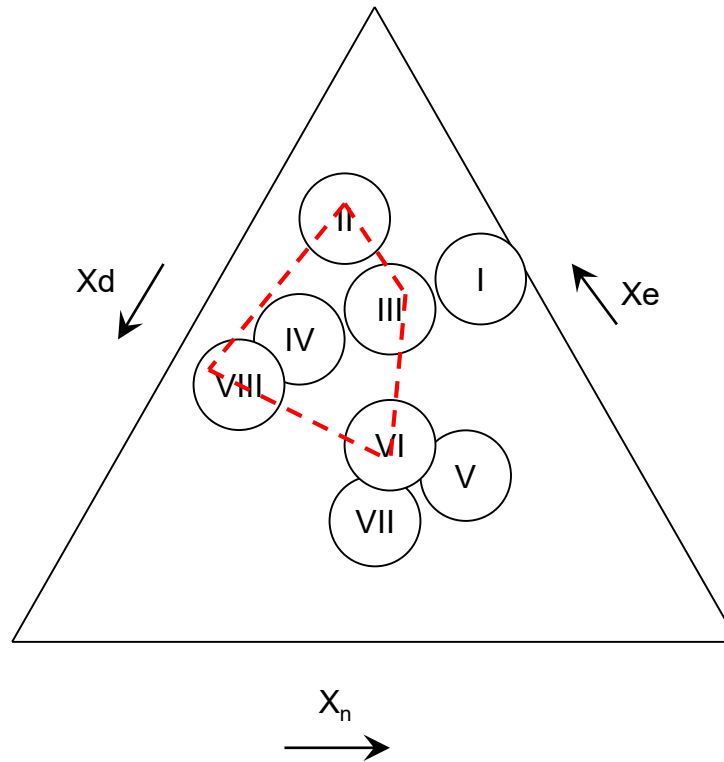
Grupo	Tipo de compuesto	Ejemplo
I	Hidrocarburos alifáticos, éteres	Hexano Éter etílico
II	Alcoholes alifáticos	Metanol, etanol
III	Sulfóxidos, furanos, piridinas	Tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido
IV	Ácidos, alcoholes aromáticos	Ácido acético, alcohol bencílico
V	Hidrocarburos alifáticos halogenados	Cloroformo, diclorometano
VI	Cetonas, ésteres, nitrilos	Propanona, acetonitrilo
VII	H. aromáticos, H. aromáticos halogenados	Tolueno, clorobenceno
VIII	Agua,	agua

# Disolventes

## Triángulo de selectividad (Snyder)

Cromatografía en fase reversa:

- agua
- metanol
- acetonitrilo
- tetrahidrofurano



# Fase móvil CLAR

**Fuerza (Polaridad).** Capacidad de un disolvente para disolver preferencialmente compuestos polares.

- P' Snyder:

$$P' = \log K_g''e + \log K_g''d + \log K_g''n$$

- Fase normal

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{\frac{(P'_1 - P'_2)}{2}}$$

- Fase reversa

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{\frac{(P'_2 - P'_1)}{2}}$$

- Mezclas de disolventes

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

# Fase móvil CLAR

En una columna en fase reversa, un soluto tenía un tiempo de retención de 31.3 min mientras que el de una especie no retenida era de 0.48 min, cuando la fase móvil contenía un 30% (en volumen) de metanol y un 70% de agua. Calcular:

- $k'$
- una composición de agua/metanol que produjera un  $k'$  de aproximadamente 5.

## Resolución

a)  $k' = (31.3 \text{ min} - 0.48 \text{ min}) / 0.48 \text{ min} = 64$

b) Para obtener  $P'$  de la fase móvil se sustituyen los índices de polaridad del metanol y del agua en la ecuación:

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

De modo que se obtiene:

$$P'_{H_2O/MeOH} = (0.30 * 5.1) + (0.7 * 10.2)$$

$$P'_{H_2O/MeOH} = 8.7$$

# Fase móvil CLAR

Este resultado, además de los valores de  $k'$  se sustituyen en la ecuación:

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{\frac{(P'_2 - P'_1)}{2}}$$

Tomando logaritmos se llega a

$$-1.11 = (P'_2 - 8.7) / 2$$

$$P'_2 = 6.48$$

Siendo  $X$  la fracción de volumen de metanol en la nueva mezcla de disolventes, y sustituyendo de nuevo en la ecuación  $P'_AB = \phi AP'_A + \phi BP'_B$ , se tiene:

$$6.48 = X * 5.1 + (1 - X) * 10.2$$

$$x = 0.729 \text{ o } 73\%$$

De esta forma, el valor que se desea para  $k'$  lo debería proporcionar la mezcla de un 73% de metanol y 27% de agua.

# Fase móvil CLAR

## Ajuste de $P'$ cuando se cambia la selectividad

Suponer una mezcla de disolventes 25%  $\text{CHCl}_3$ /Hexano (A/B) cuyo valor de  $P'$  da la fuerza correcta y el valor correcto de  $k'$  para una separación particular. Ahora se desea cambiar la selectividad del disolvente, y cambiamos  $\text{CHCl}_3$  por éter etílico. Para seguir conservando la polaridad  $P'$ , la relación  $\text{CHCl}_3$ /éter etílico (A/C) debe ajustarse, para obtener la fuerza correcta.

La composición de las fases A/B y A/C están relacionadas:  $\phi_C = \phi_B (P'_B/P'_C)$

En este caso,  $\phi_B = 0.25$   $P'_B = 4.1$   $P'_C = 2.8$ , de manera que  $\phi_C = 0.25 (4.1/2.8) = 0.37$

De esta manera, la nueva proporción de disolventes será 37%v de éter/Hexano



# Fase móvil CLAR

## Fuerza (S) disolventes en fase reversa

$$\Theta_c = \Theta_b \left( \frac{S_b}{S_c} \right)$$

Agua	0
Metanol	3
Acetonitrilo	3.1
Acetona	3.4
Dioxano	3.5
etanol	3.6
isopropanol	4.2
THF	4.4

# Fase móvil CLAR

## Tipo de elución

% COMPONENTE MAYOR FUERZA DE ELUCIÓN



PODER DE ELUCIÓN **LINEAL**



PODER DE ELUCIÓN **CONVEXO**

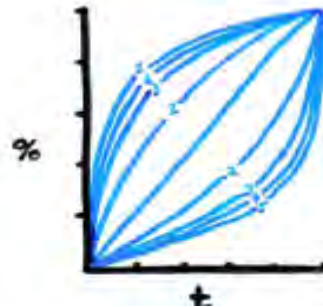
(mayor poder de elución al principio)



PODER DE ELUCIÓN **CÓNCAVO**

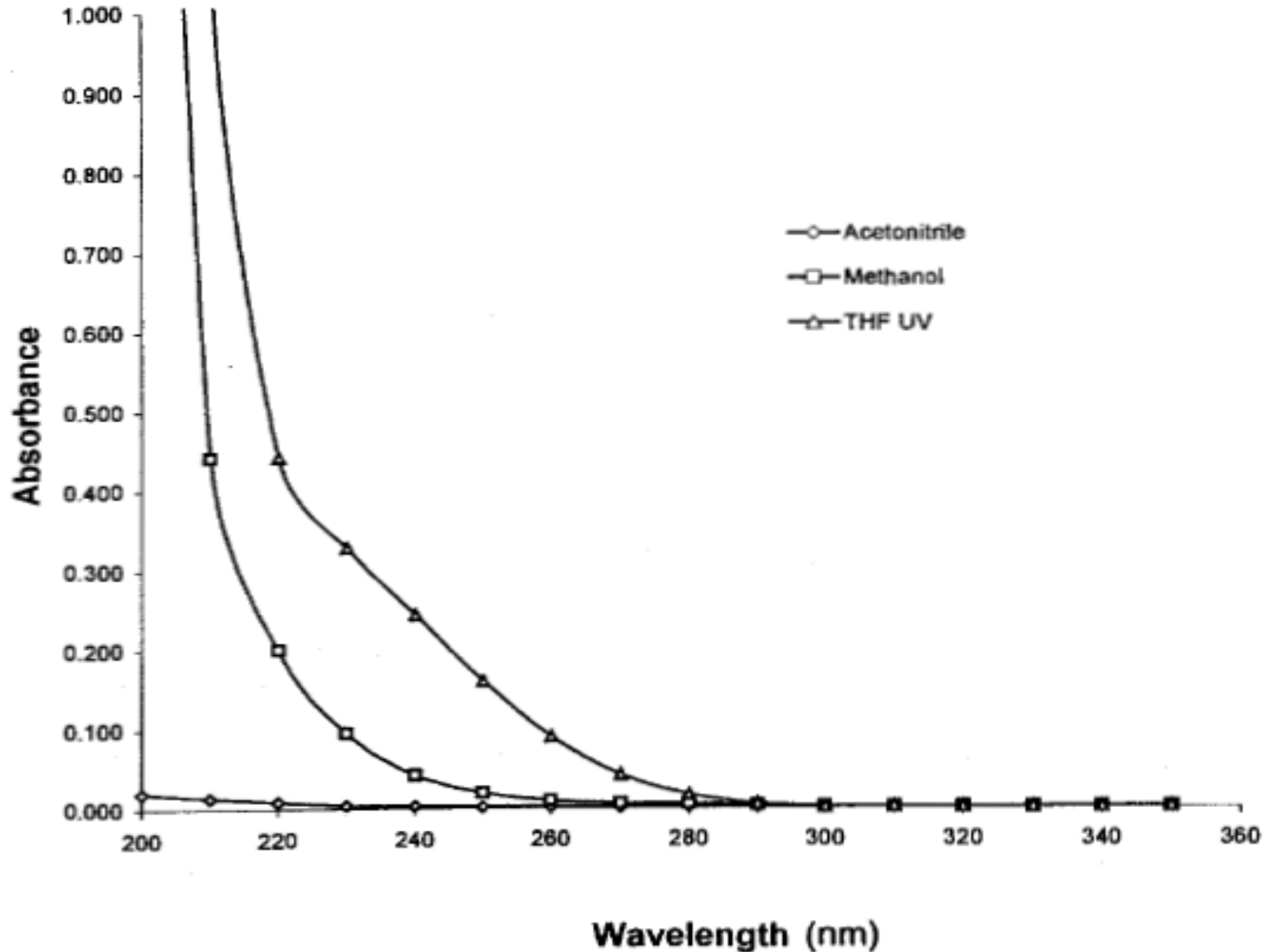
(mayor poder de elución al final)

TIEMPO

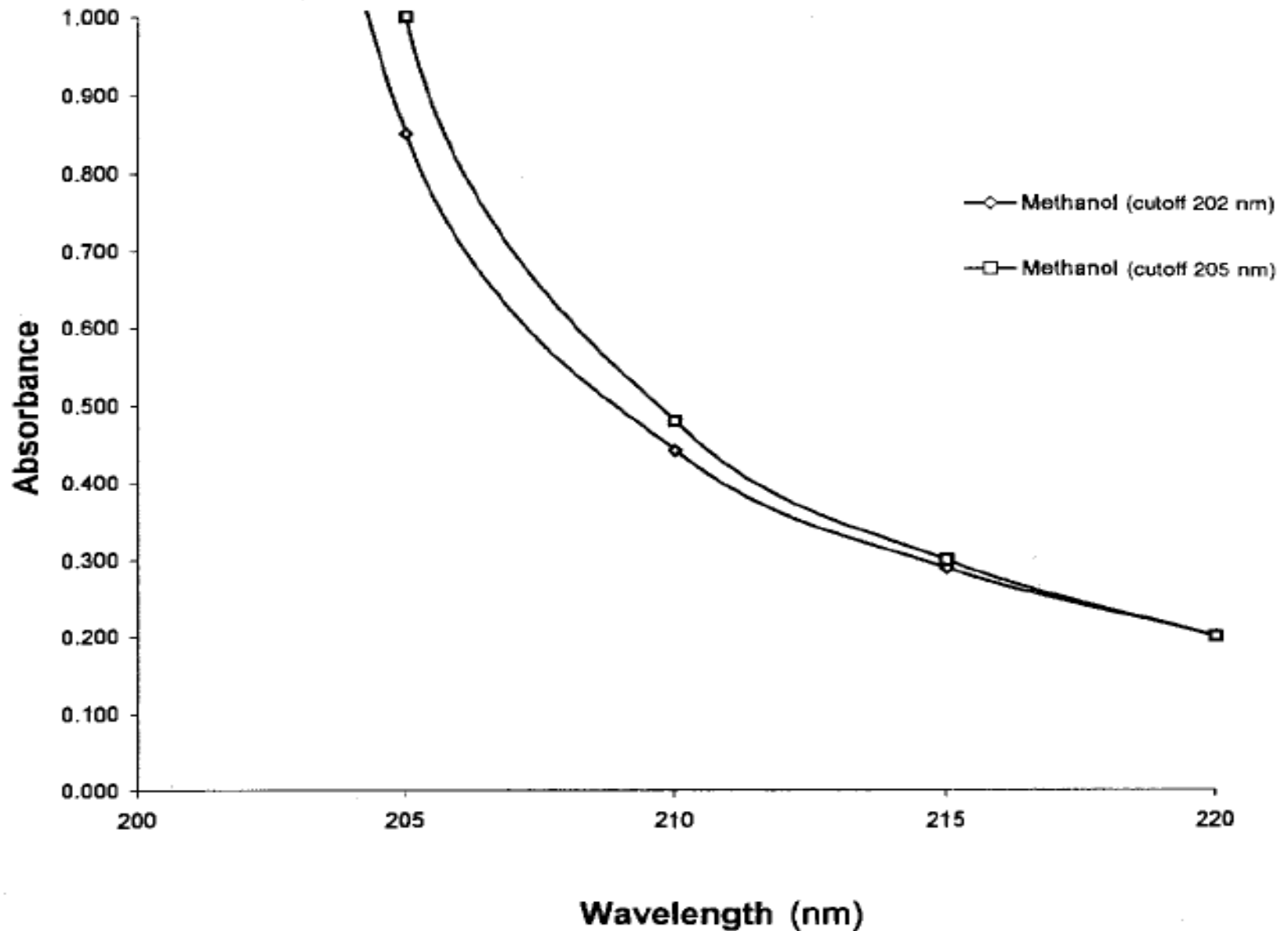


Selección rápida de un perfil de elución

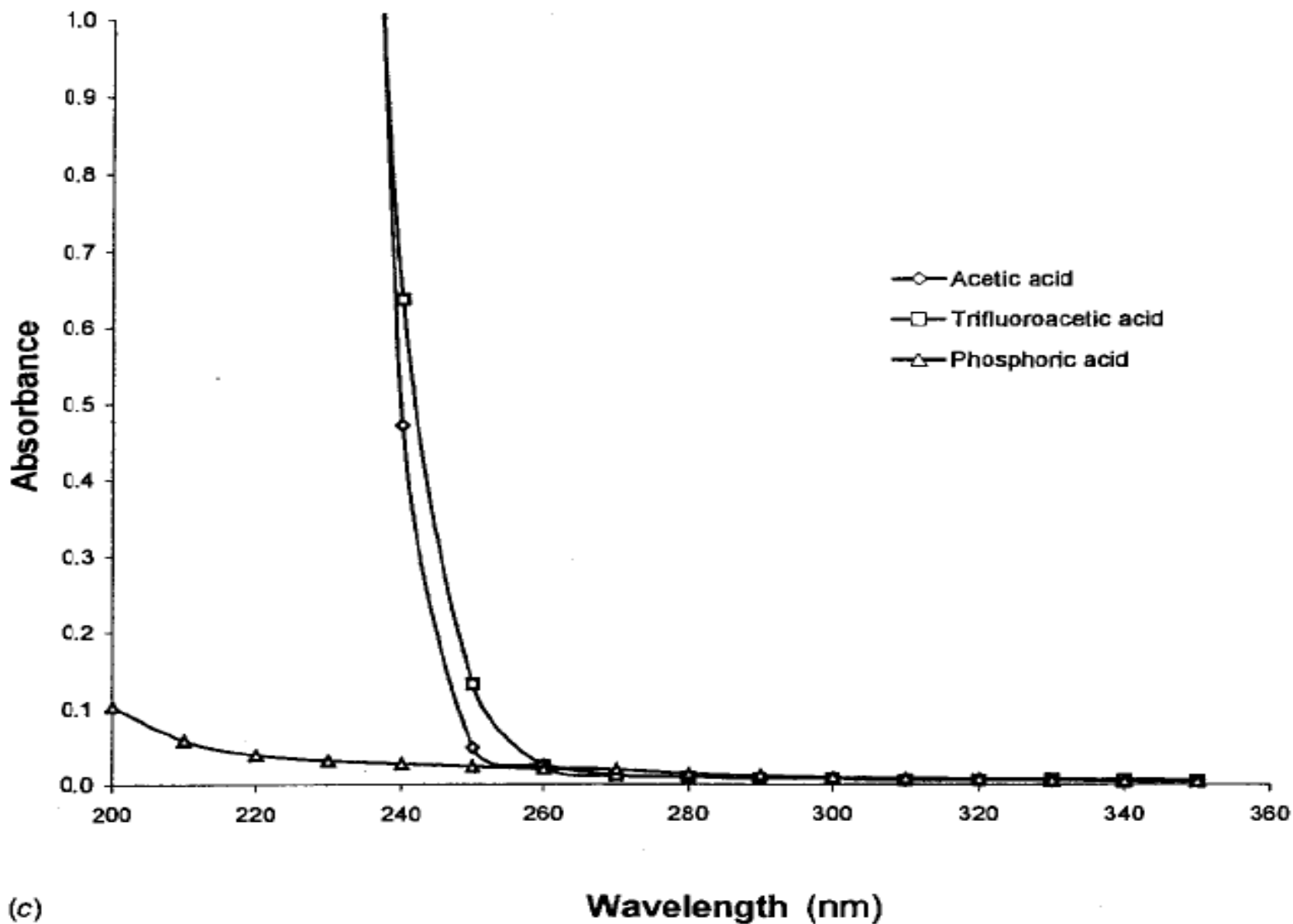
# CLAR EFECTO DE LA ABSORBANCIA DE FONDO DE DISOLVENTES



# CLAR EFECTO DE LA ABSORBANCIA DE FONDO DE DISOLVENTES

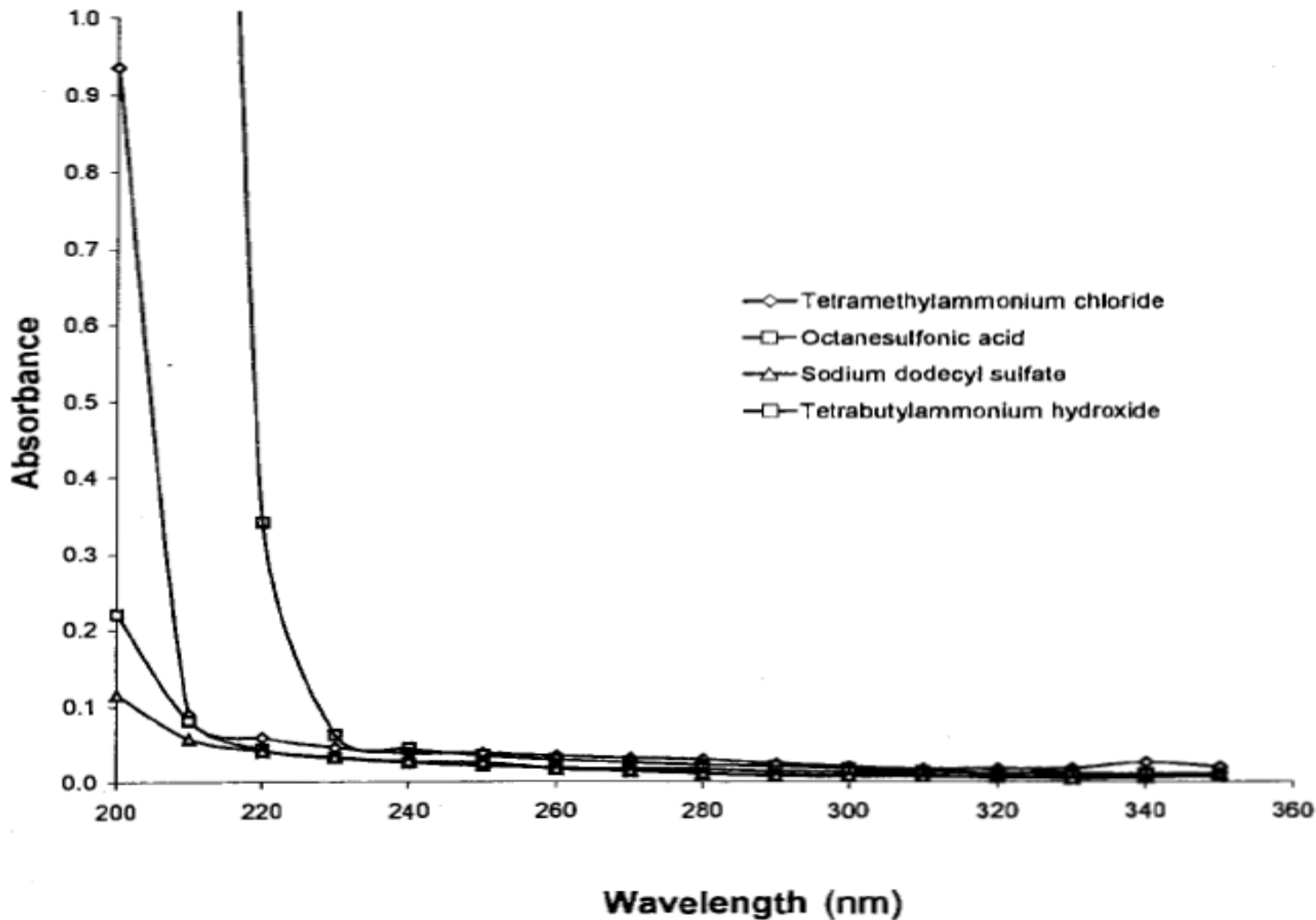


# CLAR EFECTO DE LA ABSORBANCIA DE FONDO DE LA FASE MÓVIL



(c)

# CLAR EFECTO DE LA ABSORBANCIA DE FONDO DE LA FASE MÓVIL



# CLAR

## pH aparente en Metanol y Acetonitrilo

pH en agua	pH 50:50 MeOH/Buffer	pH 50:50 ACN/Buffer
1.70	2.32	2.02
2.21	2.66	2.72
2.90	3.91	3.71
3.46	4.10	4.43
4.38	5.02	5.51
5.34	6.18	6.42
5.62	6.45	6.04
6.91	7.85 <sup>b</sup>	7.33 <sup>c</sup>





**PROPIEDAD ANALÍTICA**: *Propiedad de la materia que se utiliza para obtener información química*

**“La propiedad condiciona la técnica”**



**Otros condicionantes:**

- Concentración relativa del analito
- Interferencias
- Tipo de análisis (Cuali, cuanti o estructural)
- Exactitud
- Número de muestras

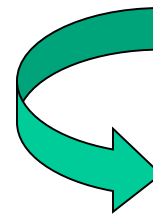
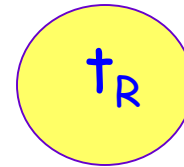
# ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

Cromatograma



Dato de información cualitativa

Sustancia desconocida podemos identificarla comparando su  $t_R$  con el de un patrón



dividir la muestra en dos alícuotas: una de ellas de cromatografía directamente, mientras que a la otra se le adiciona una cantidad dada de una sustancia patrón que se sospecha existe en la muestra, y también se cromatografía.

dependen de una variedad de condiciones experimentales

# Introducción análisis cualitativo y cuantitativo

## ***Instrumento***

- ***Definición:*** Sistema que proporciona una señal relacionable con una propiedad física ( $P_{eb}$ ) o química (concen.) de una especie. Ejemplos:
  - 1) Instrumentos ópticos → Señal luminosa
  - 2) Instrumentos electroanalíticos → Señal eléctrica
- Proporciona información cualitativa, cuantitativa y/o estructural

## ***Técnicas analíticas***

### 1) ***Clásicas***

- Gravimetría: Se mide el peso de una especie
- Volumetría: Se mide el volumen gastado de reactivo patrón

### 2) ***Instrumentales***

- Fotometría (Espectroscopía UV-Visible): Se mide la luz (UV o Visible) que absorbe una especie. (Fluorescencia).
- Potenciometría: Se mide la  $\Delta E$  que se establece entre dos electrodos

# Señal y ruido instrumental

## Señal

- **Definición:** Salida de un transductor que está respondiendo al sistema químico de interés

- **Componentes:**

1) *Componente 1:* Lleva la información sobre el analito

2) *Componente 2 (ruido):* Lleva información ajena al analito y por tanto no deseada

- **Consideraciones sobre el ruido:**

1) Degrada la exactitud y precisión del método

2) Empeora el límite de detección

- **Algunas fuentes** de ruido:

(a) *Variación de  $T^a$  o  $P$*

(b) *Fluctuación de la humedad relativa*

(c) *Cambios de la intensidad de la luz*

(d) *Vibraciones*

# CLASIFICACIÓN METROLÓGICA : CUANTIFICACIÓN

- **MÉTODOS ABSOLUTOS**: Se relacionan con patrones básicos, Kg. patrón, Amperio y segundo (Gravimetría y Culombimetría). Se calibra la balanza.
- **MÉTODOS ESTEQUIMÉTRICOS**: Se relacionan con patrones químico analíticos que no contienen al analito como las volumetrías. La determinación analítica se basa en la relación estequiométrica de la reacción entre el valorante y el analito de la muestra. Se calibra la bureta y la balanza en su caso.
- **MÉTODOS RELATIVOS**: Se relacionan con patrones químico analíticos que si contienen al analito y precisan de **calibración metodológica**. (cromatografía)

## **CALIBRACIÓN METODOLÓGICA:**

**Operación que permite relacionar la señal analítica con la concentración/composición de la sustancia/s que se está analizando.**

### **MÉTODOS DE CALIBRADO:**

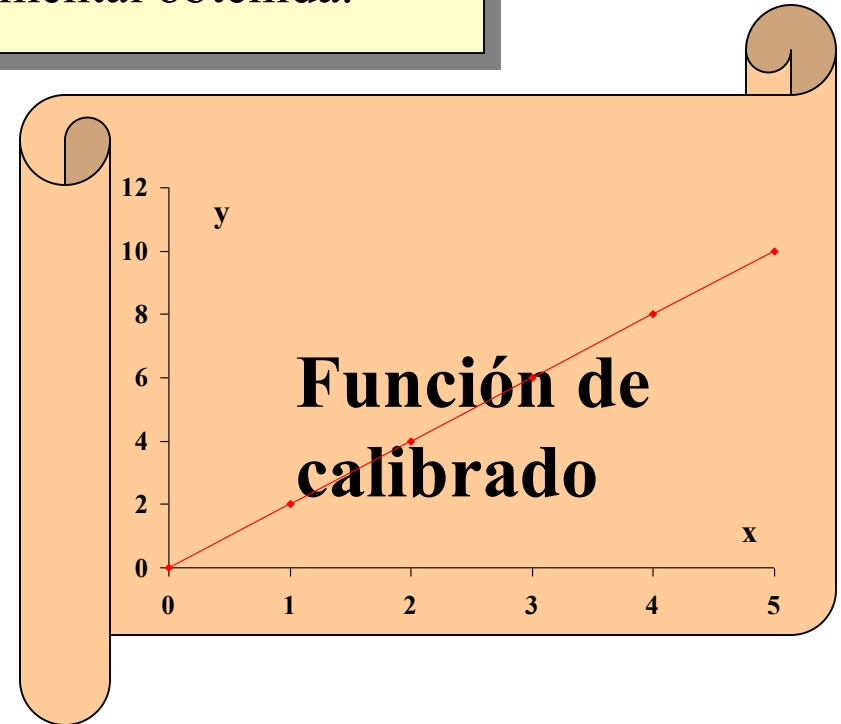
- **Calibrado completo**
- **Calibrado simplificado**

## Métodos de calibrado completo:

Implican la obtención de una “**función de calibrado**” que define la respuesta equivalente a concentraciones conocidas del componente analizado. Una vez conocida esta función, se utiliza su inversa (**Función analítica**) para determinar la concentración a partir de la señal instrumental obtenida.

Pueden ser:

- DIRECTO o INTERPOLACIÓN
- ADICIÓN DE PATRÓN
- PATRÓN INTERNO



## Métodos de calibración simplificada:

Se utilizan cuando no es necesario conocer los contenidos verdaderos, sino simplemente establecer si están incluidos dentro de unos márgenes predeterminados

**Calibrado de “banda ancha”.** Con este tipo de calibrado, en vez de obtener una función de calibración, se obtiene un margen o banda dentro de la cual puede estar o no incluido el analito; es muy útil y característico del análisis clínico.



# Propiedades analíticas de las técnicas instrumentales

## ***Sensibilidad***

- *Definición teórica*: Grado del cambio de respuesta instrumental debido a una variación de la concentración de analito

- *Definición práctica*: Pendiente de la recta de calibrado ( $m = \Delta s / \Delta c$ ) →

Dos técnicas sólo son comparables cuando las unidades de señal son las mismas

## ***Límite de detección***

- *Definición teórica*: Mínima cantidad de analito que se puede detectar con una técnica determinada

- *Definición práctica*: La concentración de analito que corresponde a una señal que es 3 veces la desviación estándar del blanco ( $LD = 3\sigma_b / m$ ) →

Dos técnicas siempre son comparables

***Límite de cuantificación***: Mínima cantidad de analito que se puede determinar con una técnica determinada ( $LQ = 10\sigma_b / m$ )

# Formas de aumentar la sensibilidad

## 1) *Mediante reacciones químicas*

(a) Transformando el analito en otra especie más sensible

Ej.: *Derivatizar a una especie más absorbente*

(b) Evaporar disolvente → Preconcentración

Ej.: *Método fotométrico ( $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ ):  $\uparrow C \rightarrow \uparrow A$*

## 2) *Aumento de la señal analítica*

(a) Utilizando instrumentos más sensibles

Ej.: *Pasar de gravimetría a una técnica instrumental*

(b) Minimizando el ruido de fondo →  $\downarrow S/R \rightarrow \uparrow S/R$

(c) Trabajando en las condiciones óptimas

Ej.: *Trabajando con la  $\lambda_{\text{máx}}$*

## 3) *Separación de materiales*

(a) Extracción líq-líq, sól-líq, etc. del analito en un volumen menor  
→ Preconcentración

(b) Precipitación del analito y posterior redisolución en un volumen menor → Preconcentración

# Propiedades analíticas de las técnicas instrumentales

## Selectividad

- **Definición:** Término que expresa la perturbación a la cual está sujeta la determinación de un analito, en un método dado, debido a la presencia de interferencias

- **Especificidad:** Grado máximo de selectividad

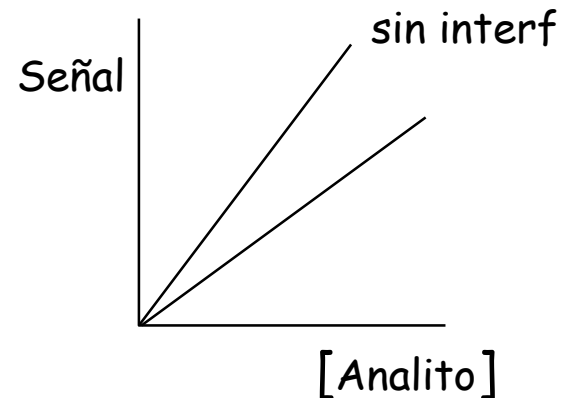
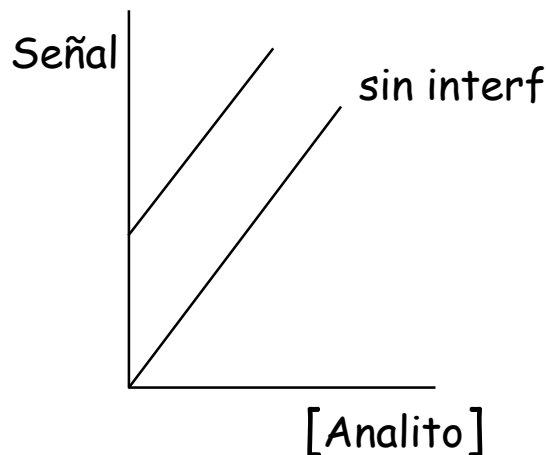
- *¿Cómo afectan las interferencias a la recta de calibrado?*

1) *Interferencias aditivas* (No dependen de la concentración de analito)

- Ej.:  $M, M' + L \rightarrow ML, M'L$  (ambos absorben a la misma  $\lambda$ )

2) *Interferencias multiplicativas* (Dependen de la concentración de analito)

-Ej.:  $M + L \rightarrow ML$  (80%),  $ML_2$  (20%, no absorbe)



# Formas de aumentar la selectividad

## 1) *Mediante reacciones químicas*

(a) Transformando el analito en otra especie más selectiva

*Ej.: Derivatizar a una especie que absorba a otra  $\lambda$  donde no absorba la interferencia*

(b) Utilizando especies que eliminen el efecto de las interferencias:

- Retirando físicamente la interferencia. *Ej.: Precipitándola*

- “Inactivando” la interferencia (Enmascaramiento)

*Ej.: Transformar la interferencia en otra especie que no absorba a la misma  $\lambda$  que el analito*

## 2) *Separación de materiales*

(a) Extracción líq-líq, sól-líq, etc. del analito sin que se extraiga la interferencia

(b) Precipitación del analito y posterior redisolución en un disolvente libre de interferencia

## 3) *Discriminación de señales*

(a) Aplicando procesos matemáticos. *Ej.: Restando a la señal total la parte debida a la interferencia (si lo sabemos)*

## PARÁMETROS A CONSIDERAR:

**Exactitud:** Grado de concordancia entre el valor experimental y el real

**Precisión:** Grado de dispersión de los valores experimentales

**Tiempo de operación:** Tiempo que se tarda en analizar una muestra

**Costo:** Dos tipos

1) Costo inicial del equipo

2) Costo de mantenimiento

# CURVAS DE CALIBRACIÓN

## DEFINICIÓN:

*Son las relaciones funcionales existentes entre la propiedad medida por el método de análisis y la "concentración" de analito en estudio.*

# ANÁLISIS DE REGRESIÓN

## DEFINICIÓN:

El análisis de regresión es una **HERRAMIENTA ESTADÍSTICA** que se usa para establecer la relación funcional entre dos variables.

## SUPONIENDO MODELO LINEAL PARA EL EJEMPLO

Expresión de la recta

$$y = a + bx$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

# COMPROBACIÓN DE AJUSTE DE MODELO

## 1- COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(\bar{y}_i - \bar{y})]}{\left\{ \left[ \sum (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$x_i$  Valor de concentración de los distintos patrones

$\bar{y}_i$  Valor experimental promedio para cada valor de concentración

$\bar{x}, \bar{y}$  Valores promedio de los  $x_i$  y de los  $y_i$  promedios respectivamente



# INCERTIDUMBRE EN LA PENDIENTE Y EN LA ORDENADA

$$b \pm t_{1-\alpha/2} (n-2) \frac{s_{y/x}}{\left[ \sum (x_i - \bar{x})^2 \right]^{1/2}}$$

$$a \pm t_{1-\alpha/2} (n-2) s_{y/x} \left[ \frac{\sum x_i^2}{n * \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

$$s_{y/x} = \left[ \frac{\sum (y_{i,R} - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

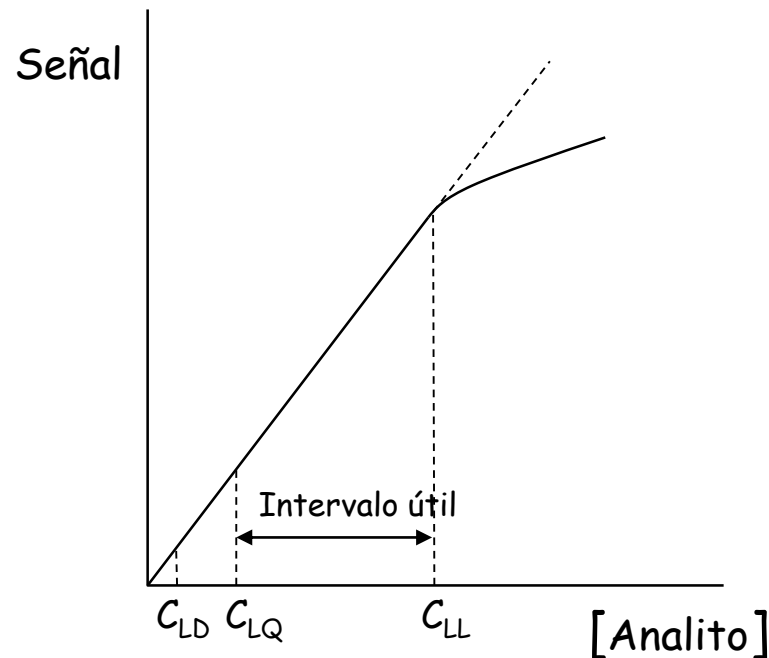
## INCERTIDUMBRE EN LA DETERMINACIÓN DE UN PUNTO

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

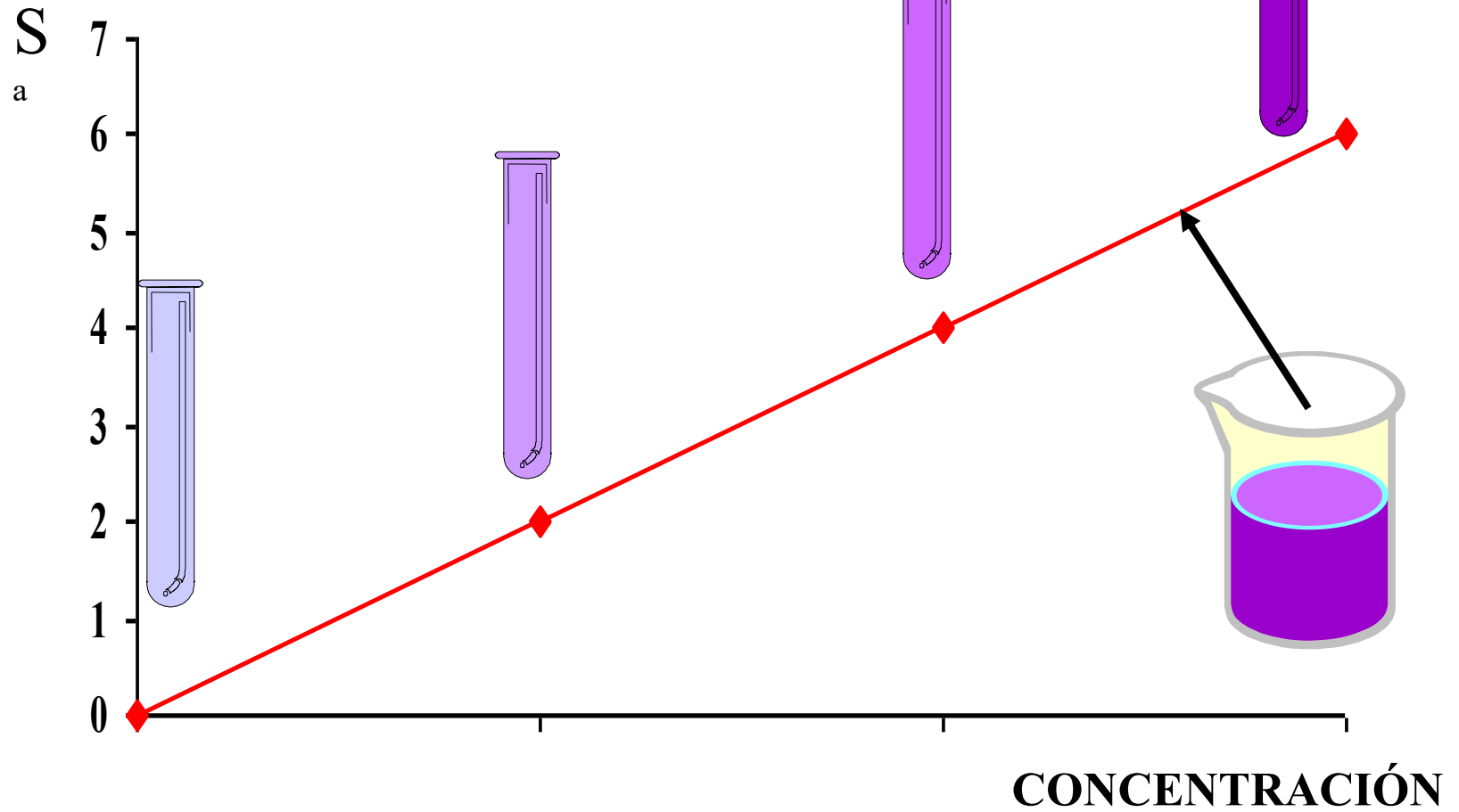
$$x_0 \pm t_{(n-2)} s_{x_0}$$

# Intervalo útil de un método analítico

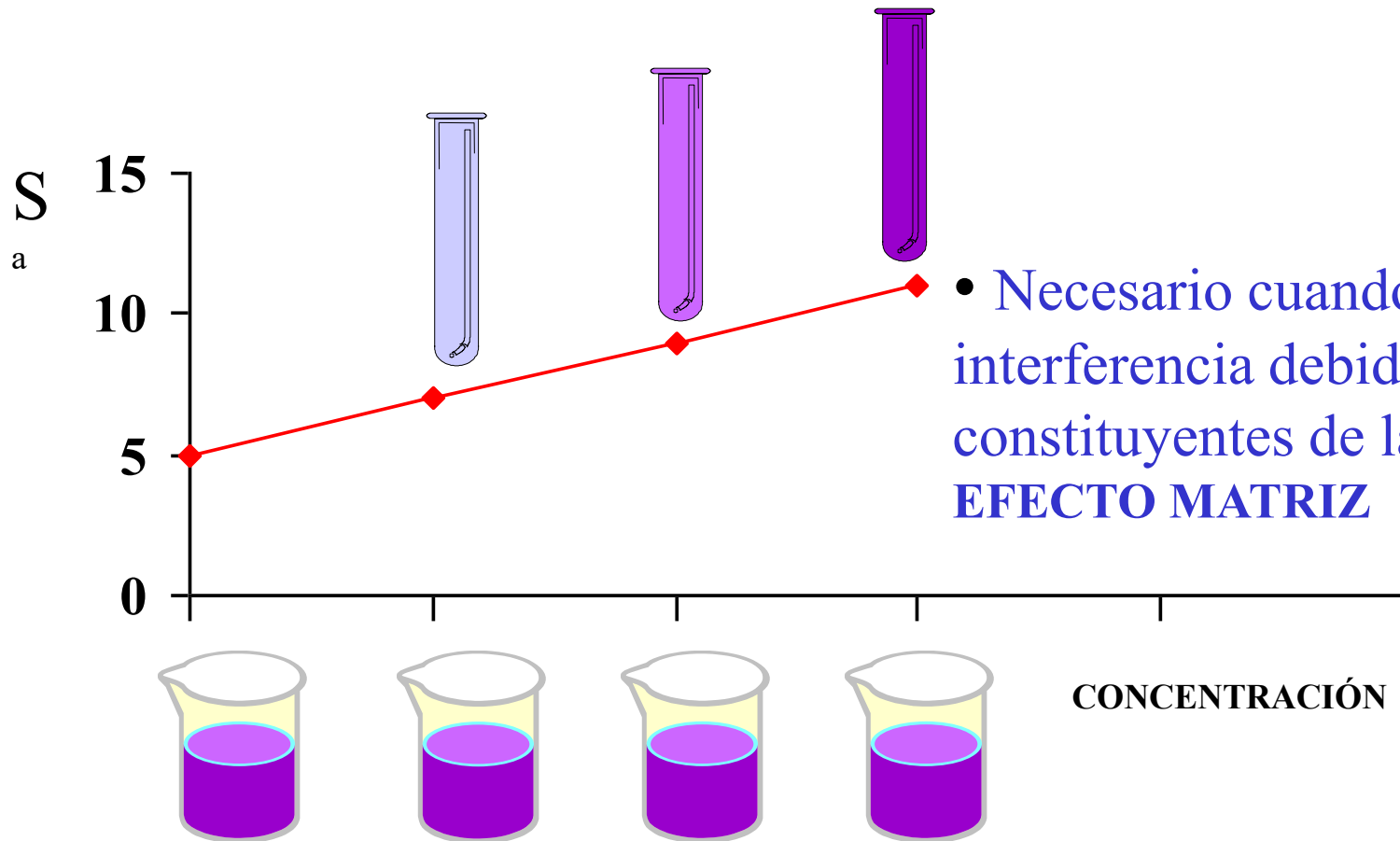
**Definición:** Intervalo de concentraciones que va desde la concentración más pequeña que se puede determinar ( $C_{LQ}$ ) hasta la concentración a la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad ( $C_{LL}$ )



# CALIBRADO DIRECTO

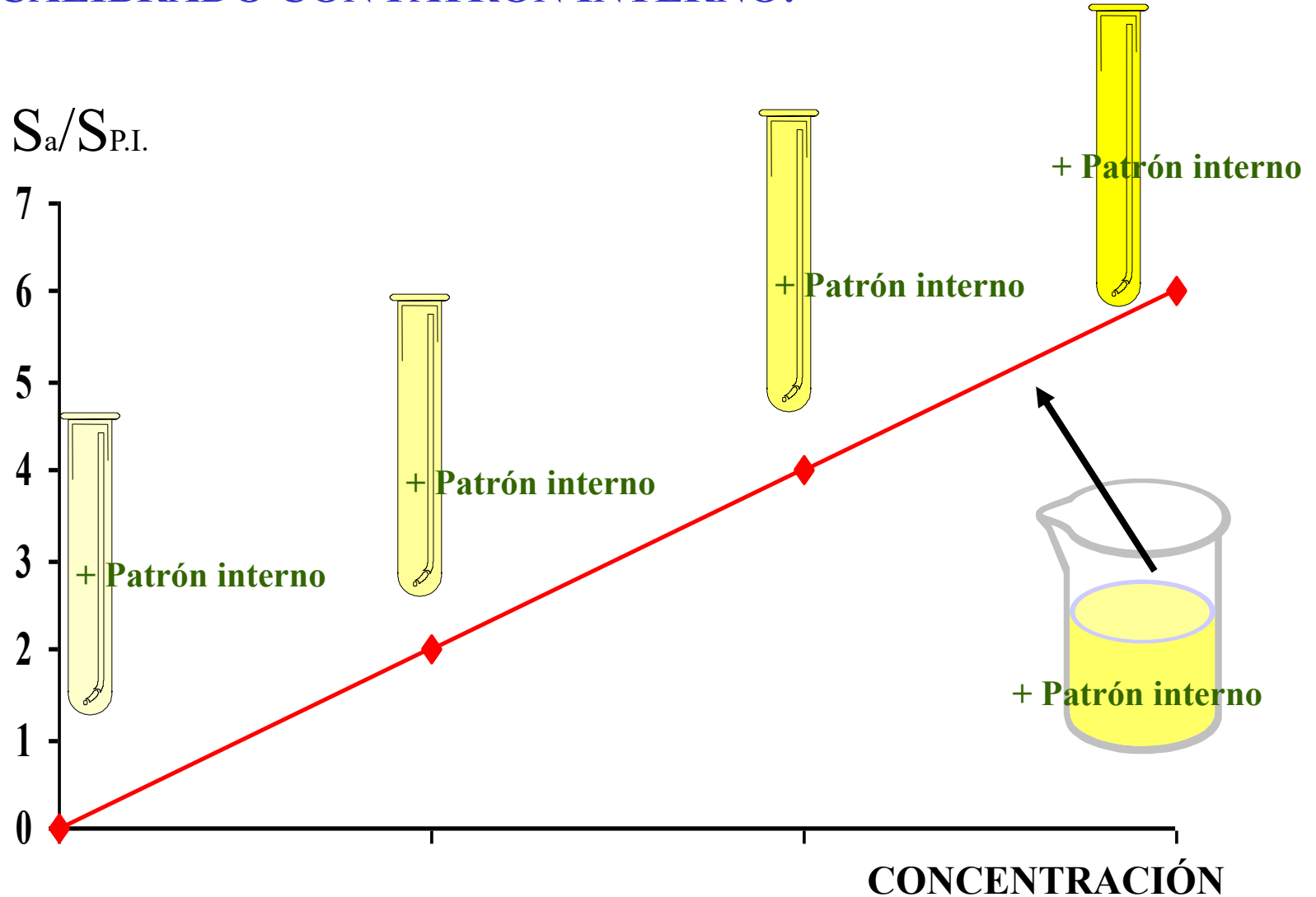


# CALIBRADO POR ADICIÓN DE PATRÓN



• Necesario cuando hay interferencia debida a los constituyentes de la matriz:  
**EFFECTO MATRIZ**

## CALIBRADO CON PATRÓN INTERNO:

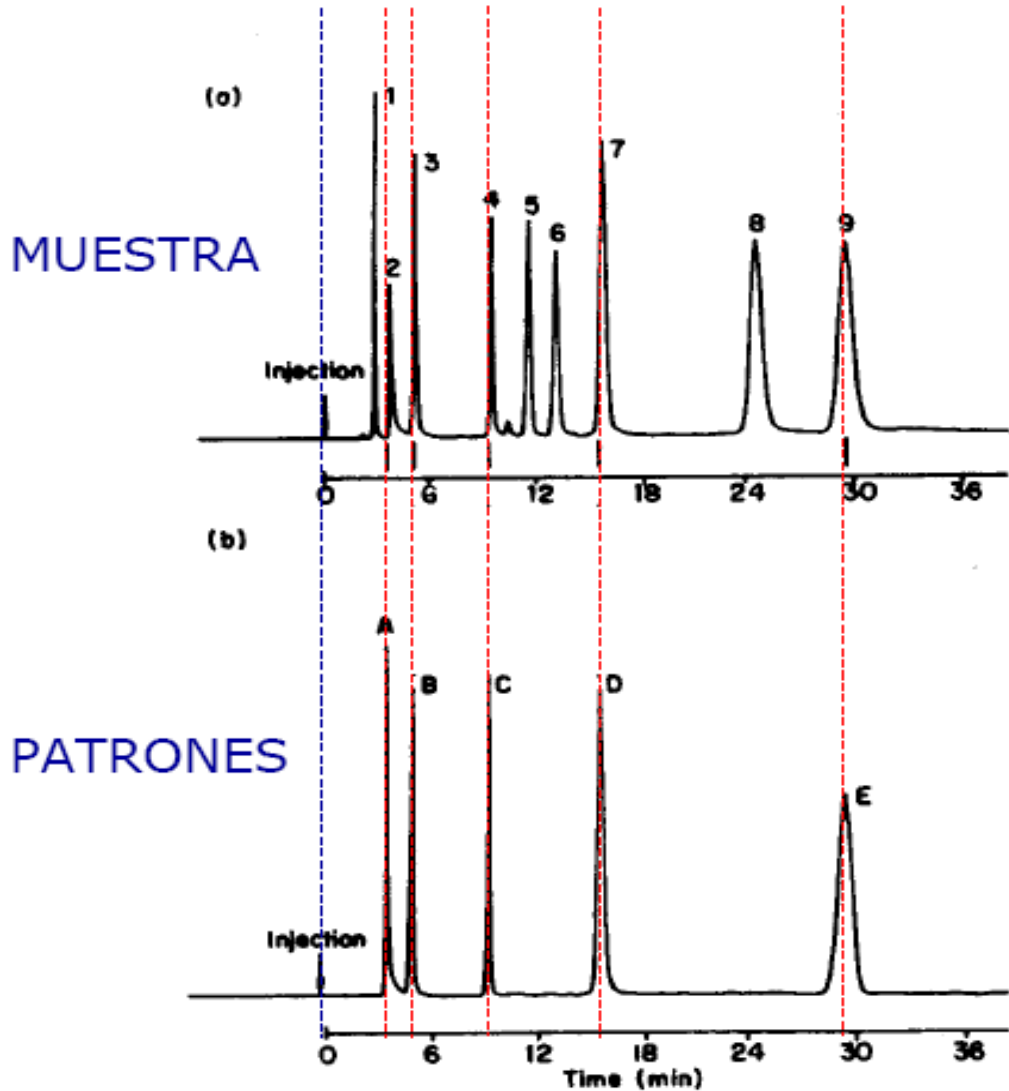


- Útil cuando la señal analítica fluctúa debido a las características de la técnica de medida
- El “PATRÓN INTERNO” debe tener un comportamiento y una estructura similares a la del analito

# TRAZABILIDAD

Aquella característica de un resultado analítico que implica su relación inequívoca con estándares o materiales de referencia apropiados a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones en las que la calibración juega un papel preponderante

# Análisis cualitativo



UTILIDAD ANALÍTICA  
CUALITATIVA DE LA  
COMATOGRFÍA POR  
COMPARACIÓN DE  
CROMATOGRAMAS

- Iguales condiciones
- No inequívoco



## Análisis cuantitativo

$$A_i = k S_i m_i$$

$A_i$  = área de pico

$k$  = constante

$S_i$  = sensibilidad detector

$m_i$  = masa componente

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{S_1}{S_2} \frac{m_1}{m_2}$$

# Método por normalización interna



## Estándar

Picos	Concentración	Area 1	Area 2	Area 3	Promed.	RSD
1	20.5 g/100ml	10556	10608	10577	10580	0.2 %
2	11.0 g/100ml	5357	5384	5368	5370	0.3 %
3	40.5 g/100ml	21801	21910	21844	21852	0.3 %

## Muestra

Picos	Area 1	Area 2	Area 3	Promedio	RSD
1	10446	10509	10477	10477	0.3 %
2	5277	5309	5293	5293	0.3 %
3	23961	24105	24032	24033	0.3 %
ΣA	39684	39923	39802	39803	0.3 %

## Normalización interna

$$\% 1 = \frac{10477 \times 100}{39803} = 26.3 \%$$

$$\% 2 = \frac{5293 \times 100}{39803} = 13.3 \%$$

$$\% 3 = \frac{24033 \times 100}{39803} = 60.4 \%$$

# Método por normalización interna

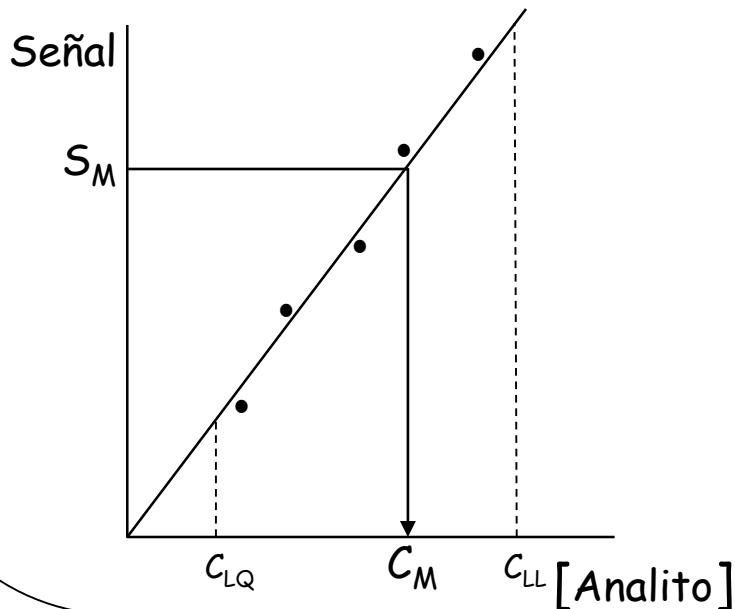
## CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- simple y rápido.
- deben eluirse todos los componentes.
- poca precisión y exactitud.
- exclusivamente utilizable cuando la respuesta del detector sea similar para todos los componentes.

# Método de calibración externa

## Procedimiento

- 1) Se preparan  $n$  disoluciones  $E$  de analito de concentraciones crecientes y que estén dentro de la zona útil de medida
- 2) Se les mide la señal instrumental
- 3) Se representan los datos señal/concentración
- 4) Se ajustan los datos a una recta (recta de calibrado)  $\rightarrow$
- 5) Se le mide la señal instrumental a la muestra ( $S_M$ )
- 6) Se determina la concentración de analito ( $C_M$ ) en la muestra por interpolación en la recta de calibrado



$$y = mx + b$$

( $m$  y  $b$  por mínimos cuadrados)

$$S_M = m \cdot C_M + b \Rightarrow C_M = \frac{S_M - b}{m}$$

# Método de calibración externa

## CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Mantener las condiciones cromatográficas constantes.
- Disponer de patrón puro de todos los analitos.
- No es necesario eluir todos los componentes.
- Varias repeticiones para valor estadístico.
- Precisión y exactitud media-alta.
- Requiere inyecciones de volúmenes muy exactas (inyector automático recomendado).

## Método de calibración externa

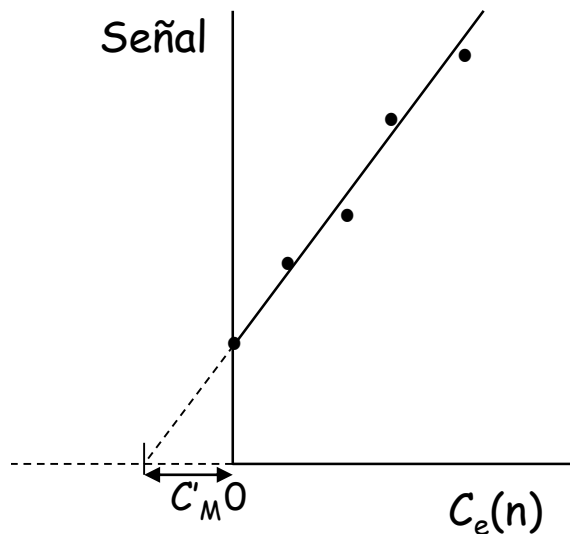
El análisis cuantitativo por calibración externa proporciona resultados precisos y exactos cuando se tienen muestras simples pues los estándares serán muy parecidos a a muestra, lo cual permite una comparación directa del área o altura del pico con la concentración.

# Método de adiciones estándar

## Procedimiento

- 1) Se toman  $n$  alícuotas de la muestra ( $V_M, C_M$ )
- 2) Se añaden a las alícuotas volúmenes variables de una disolución patrón ( $V_E(n)$ ) y se enrasa a un mismo volumen ( $V_F$ ) → tiene que estar dentro de la zona útil
- 3) Se les mide la señal instrumental a las  $n$  disoluciones preparadas
- 4) Se representan los datos señal/concentración de patrón ( $C_e(n)$ )
- 5) Se ajustan los datos a una recta (*p.e. por mínimos cuadrados*) →
- 6) El punto de corte con el eje x da la concentración de la muestra diluida ( $C'_M$ )
- 7) Se determina la concentración de la muestra original ( $C_M$ )

$$y = mx + b$$



$$y = mx + b$$

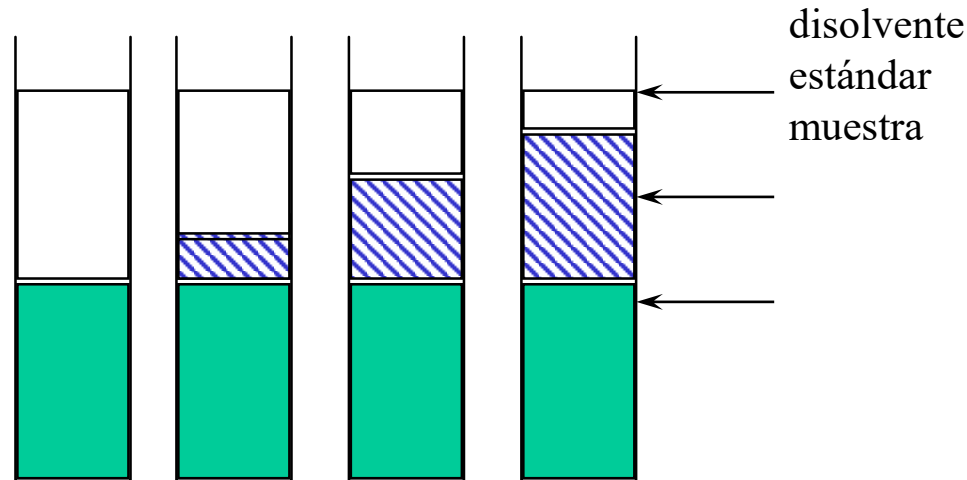
$$0 = m \cdot x + b \Rightarrow x = C'_M = \frac{-b}{m}$$

$$C_M = C'_M \cdot \frac{V_F}{V_M}$$

# Método de adiciones estándar

## Preparación de soluciones

- Mismo volumen de muestra.
- Variar el volumen de estandar agregado.
- Se puede diluir al final.



Solución no.	1	2	3	4	<i>Conc E=10 mg/ml</i>
muestra ml.	5	5	5	5	
E vol.	0	1	3	4	
Total vol.	10	10	10	10	



# Método de adiciones estándar

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\frac{[X]_i}{[S]_f + [X]_f} = \frac{I_X}{I_{S+X}}$$

$$[X]_f = [X]_i \left( \frac{V_o}{V} \right) \quad [S]_f = [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right)$$

**Determinación  
a un punto**

**Efecto de dilución.**

## Método de adiciones estándar

Una muestra de suero oral que contiene  $\text{Na}^+$  proporciona una señal de 4.27 mV en un sistema cromatográfico con detector de conductividad y columna de intercambio catiónico. 5.00 mL de una solución 2.08 M de NaCl son agregados a 95.0 mL de la muestra de suero oral la cual proporciona un pico cromatográfico con una señal de 7.98 mV. Determinar la concentración of  $\text{Na}^+$  en el suero.

$$[S]_f = [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right) = (2.08M) \left( \frac{5.00\text{mL}}{100.0\text{mL}} \right) = 0.104M$$

$$[X]_f = [X]_i \left( \frac{V_o}{V} \right) = [\text{Na}^+]_i \left( \frac{95.0 \text{ mL}}{100.0 \text{ mL}} \right) = 0.950 [\text{Na}^+]_i$$

$$\frac{[X]_i}{[S]_f + [X]_f} = \frac{I_X}{I_{S+X}} = \frac{[\text{Na}^+]_i}{[0.104M] + 0.950 [\text{Na}^+]_i} = \frac{4.27\text{mV}}{7.98\text{mV}}$$

$$[\text{Na}^+]_i = 0.113M$$

## Método de estándar interno

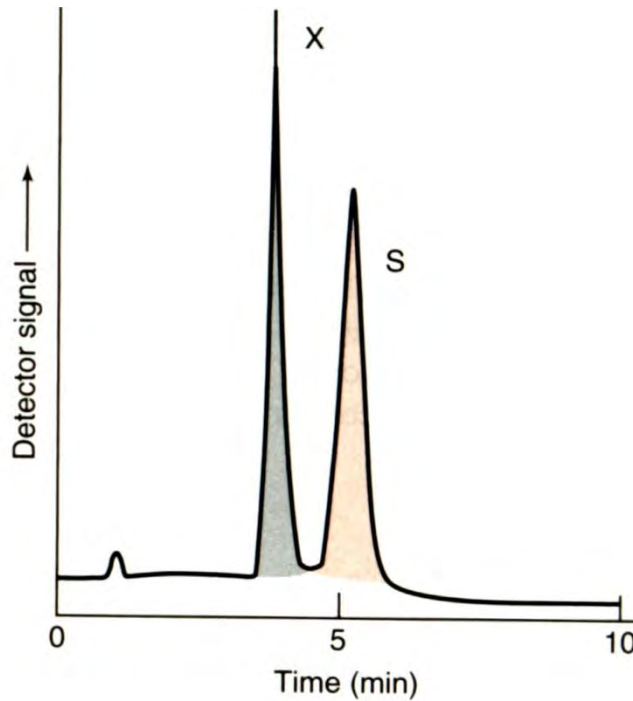
Selección de un **patrón**, características adecuadas:

- alta pureza.
- naturaleza similar a la muestra en conjunto.
- no estar presente en el problema.
- dar pico resuelto y simétrico.
- factor de capacidad ( $k'$ ) intermedio en el problema.
- similar concentración, tiempo de retención y respuesta del detector que el analito.

# Método de estándar interno

## Procedimiento

- 1) Se toman volúmenes distintos de EI
- 2) Se añaden volúmenes iguales de una disolución patrón ( $V_{EI}(n)$ ) y se enrasa a un mismo volumen ( $V_F$ ) → tiene que estar dentro de la zona útil
- 3) Se les mide la señal instrumental a las n disoluciones preparadas
- 4) Se representan los datos cociente de señal de E/EI vs concentración de E /EI ( $C_e(n)$ )
- 5) Se ajustan los datos a una recta (p.e. por mínimos cuadrados) →
- 6) Se determina la concentración de la muestra original ( $C_M$ )



$$\frac{I_X}{I_S} = F \frac{[X]}{[S]}$$

# Método de estándar interno

## Ejemplo

Una solución que contiene 0.0837 M del fármaco X y 0.0666 M de EI S, al realizar un análisis cromatográfico proporciona las áreas  $A_x = 423$  and  $A_s = 347$ . Una muestra desconocida de X (10.0 mL) se le agregan 10.0 mL 0.146 M de EI S y la mezcla se diluye a 25.0 ml en un matraz volumétrico. La mezcla proporciona las áreas de  $A_x = 553$  y  $A_s = 582$ . Encontrar la concentración del fármaco

**Mezcla**

$$\frac{A_x}{[X]} = F \left( \frac{A_s}{[S]} \right) = \frac{423}{0.0837} = F \left( \frac{347}{0.0666} \right) \Rightarrow F = 0.970$$

*Determinar la concentración de EI (S) en la mezcla:*

$$[S] = (0.146M) \times \left( \frac{10.0}{25.0} \right) = 0.0584M$$

**muestra**

$$\frac{A_x}{[X]} = F \left( \frac{A_s}{[S]} \right) = \frac{553}{[X]} = 0.970 \left( \frac{582}{0.0584} \right) \Rightarrow [X] = 0.0572M$$

**Concentración original**

$$0.0572M \times \left( \frac{25.0mL}{10.0mL} \right) = 0.143M$$

# Método de estándar interno

## CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Tediosa preparación de estándares y patrón.
- Un factor de respuesta para cada analito.
- Laboriosa elección del patrón interno.
- Requiere alta pureza del patrón y los componentes a determinar para los estándares.
- No se afecta por pequeños cambios en las condiciones.
- No requiere medidas exactas de volúmenes.
- Máxima precisión y exactitud.

**Para inyección manual, el método de estándar interno mejora la precisión, lo cual no sucede en inyección automática. Útil en muestras biológicas. El pico de estándar interno debe ser muy parecido en área al pico de interés**

# Análisis cualitativo y cuantitativo

## Inyección de la muestra CLAR

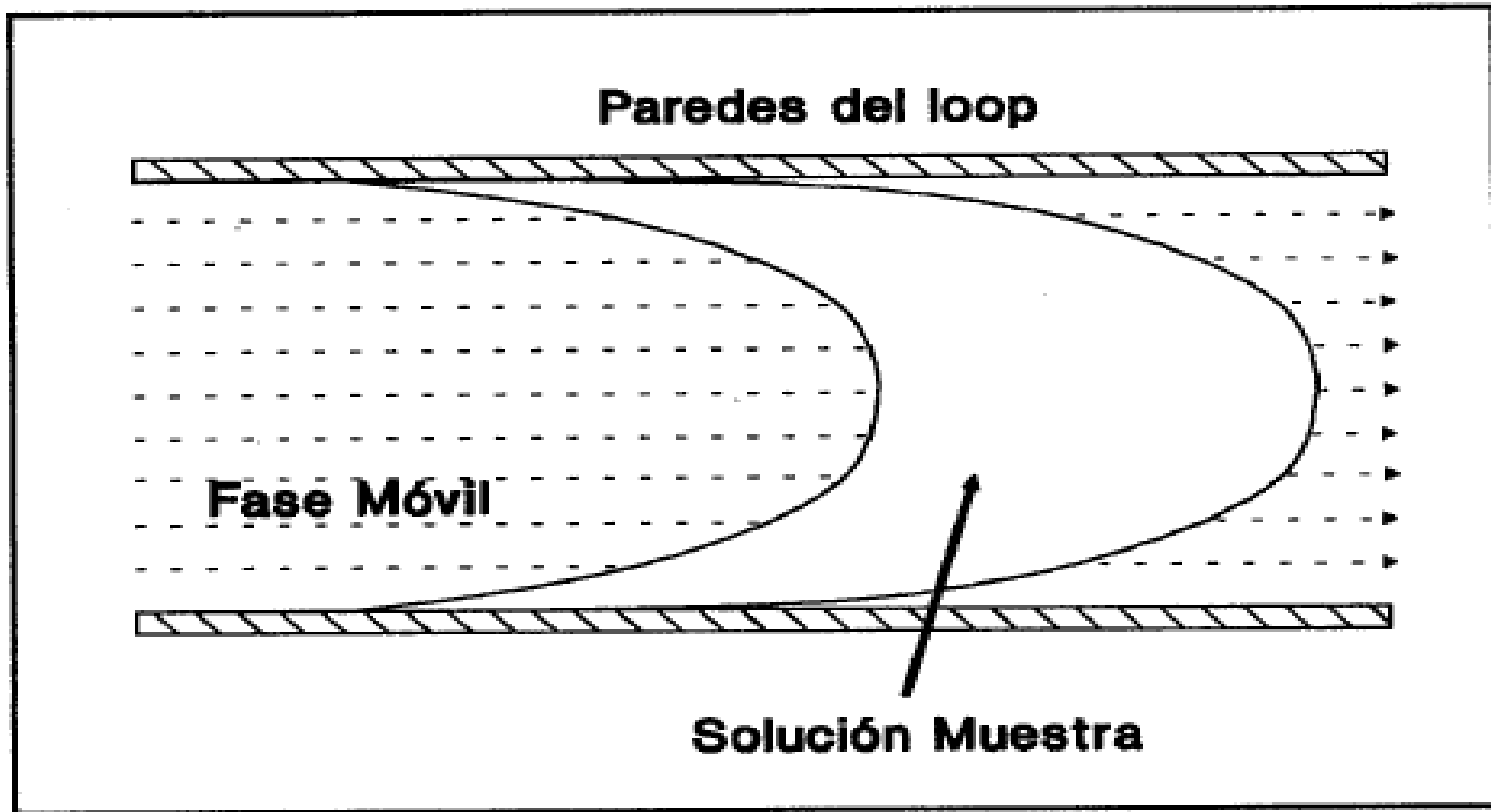
- Muestra líquida y homogénea
- A mayor volumen de inyección mayor precisión (también se ensancha el pico y se pierde eficiencia).
- Volumen de inyección:
- No más del 2% del volumen de retención del primer pico de interés



Longitud Columna cm	Volumen $\mu\text{L}$
25	100
10-15	50
Menor de 10	20

# Análisis cualitativo y cuantitativo

Inyección de la muestra CLAR

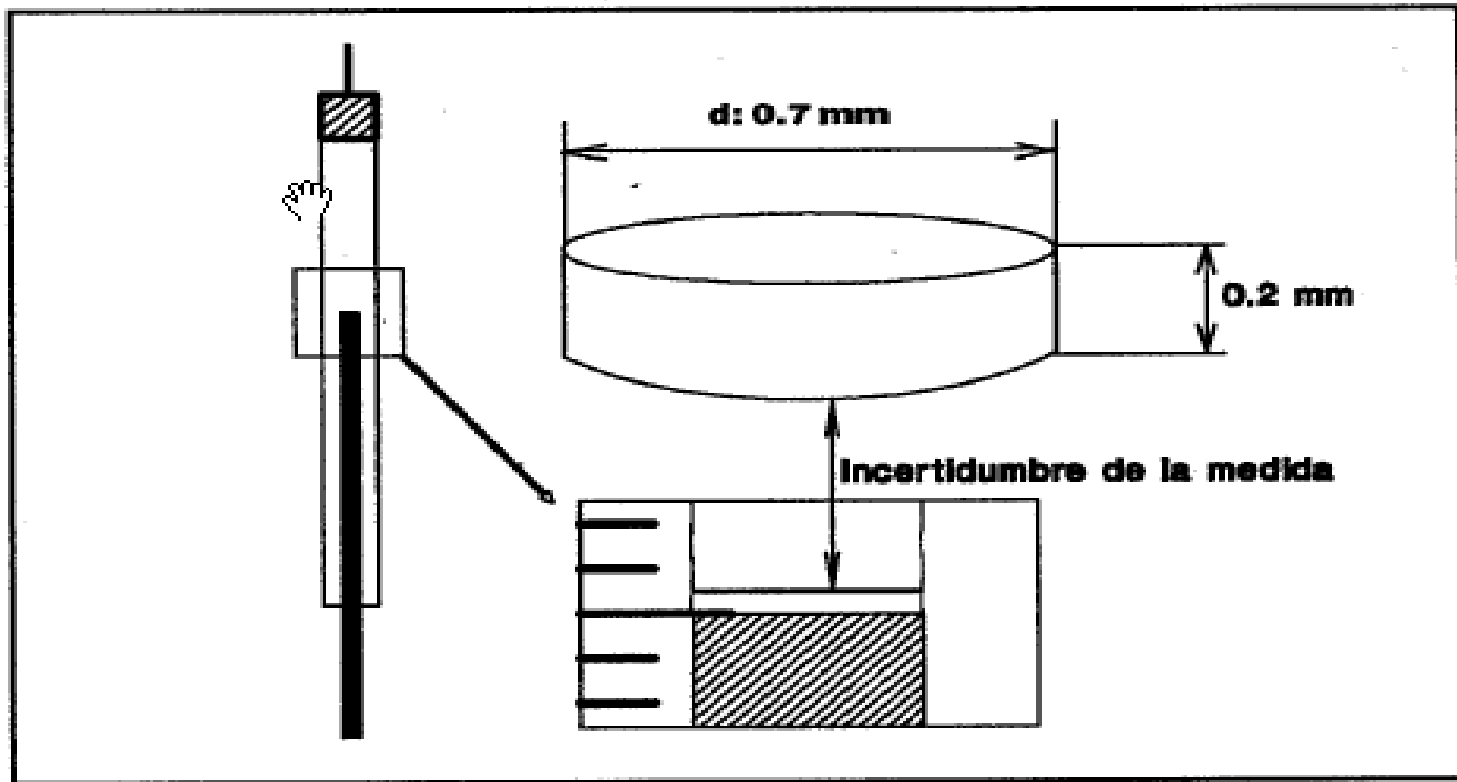


**La muestra avanza más rápidamente por el centro de la tubería (Flujo laminar)**



# Análisis cualitativo y cuantitativo

## Inyección de la muestra CLAR



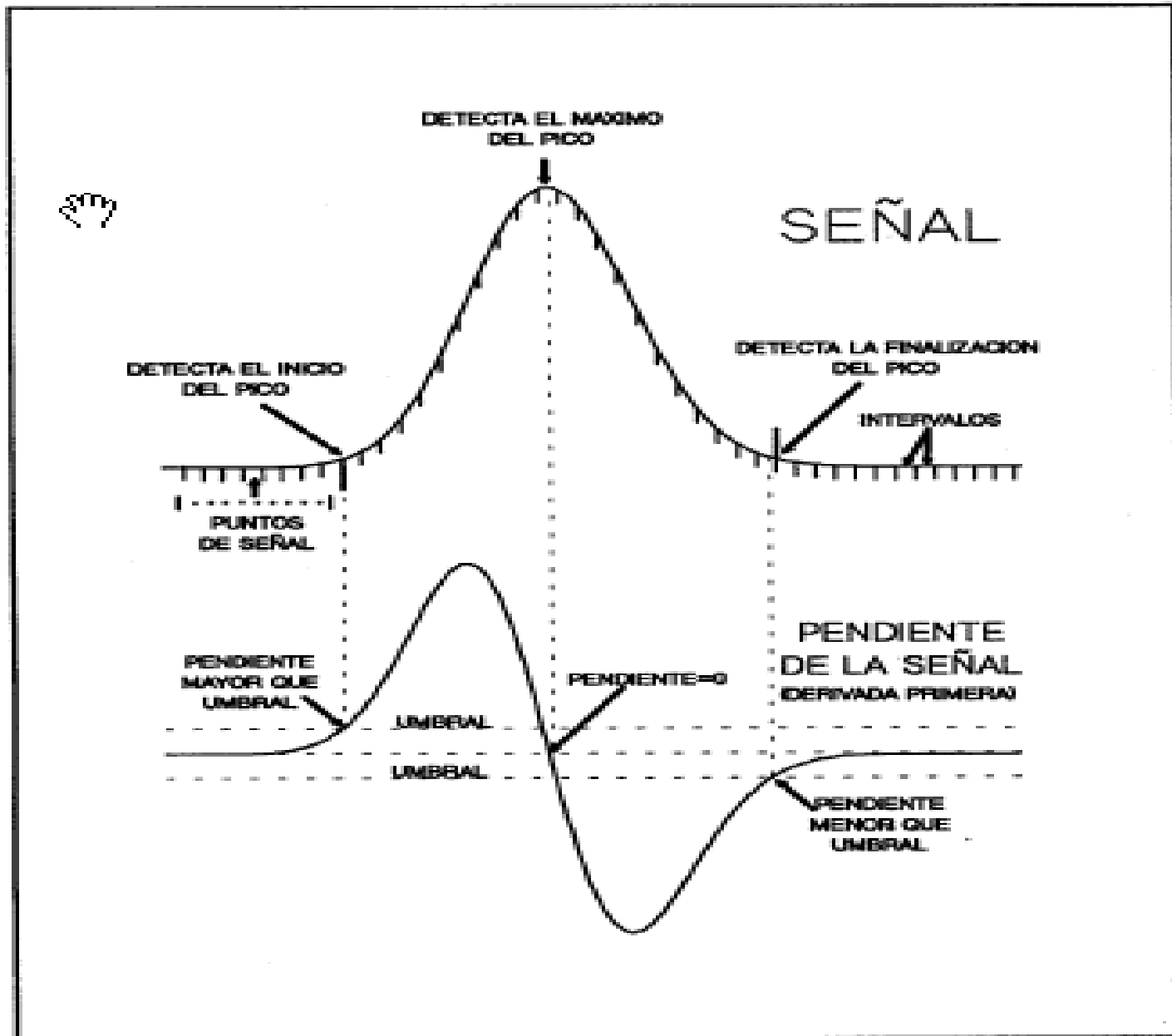
Jeringa Hamilton 25 mL

Incertidumbre=  $V = \pi r^2 l$  0.077 mL 0.3% de variación

USP marca 2%

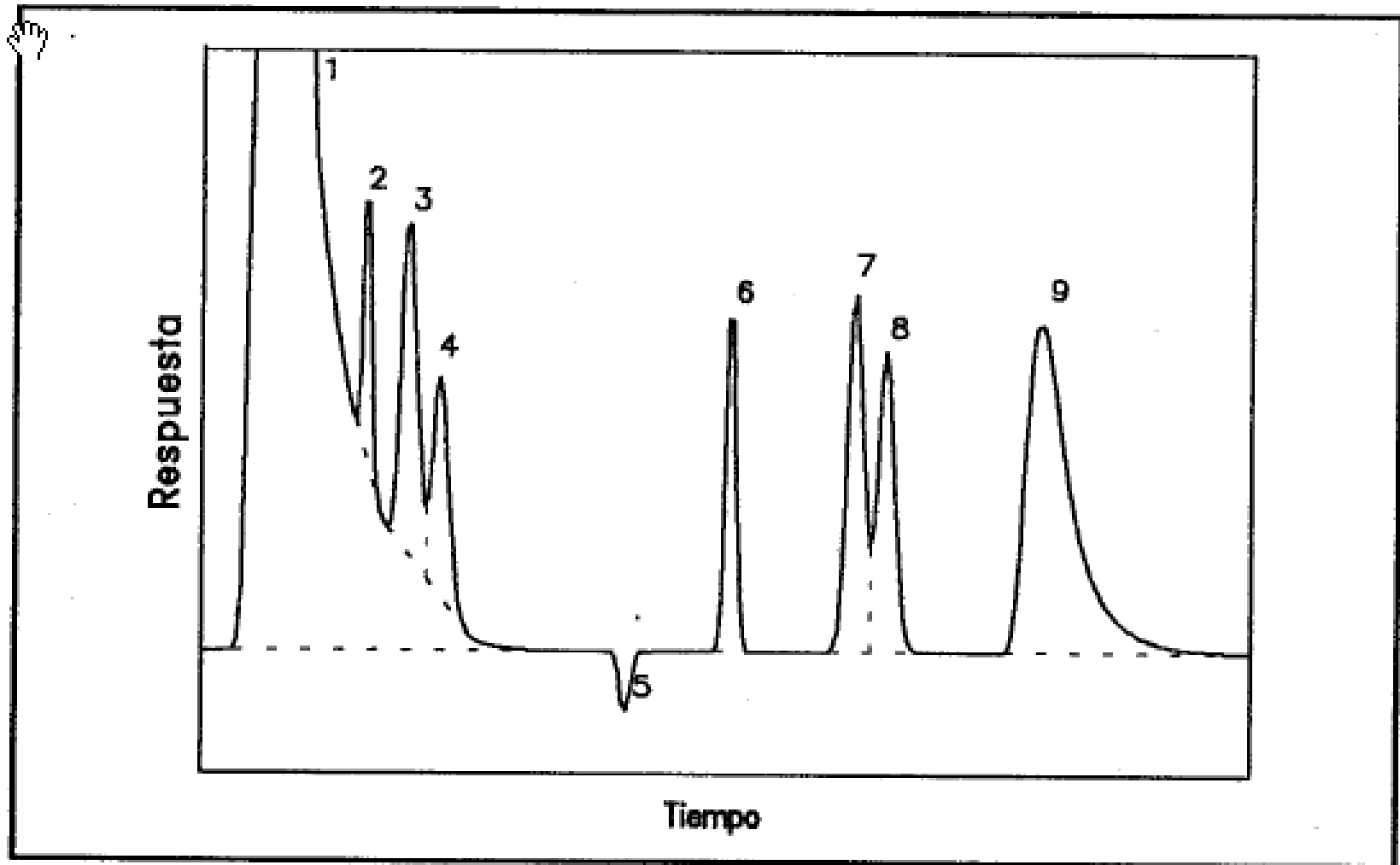
# Análisis cualitativo y cuantitativo

## Integración de picos cromatográficos



# Análisis cualitativo y cuantitativo

## Integración de picos cromatográficos



Tipos más comunes de picos en HPLC. 1) Pico del solvente. 2) Pico montado sobre la cola de otro pico. 3 y 4) Picos fundidos montados sobre la cola de otro pico. 5) Pico negativo. 6) Pico aislado bien resuelto. 7 y 8) Picos fundidos. 9) Pico asimétrico.

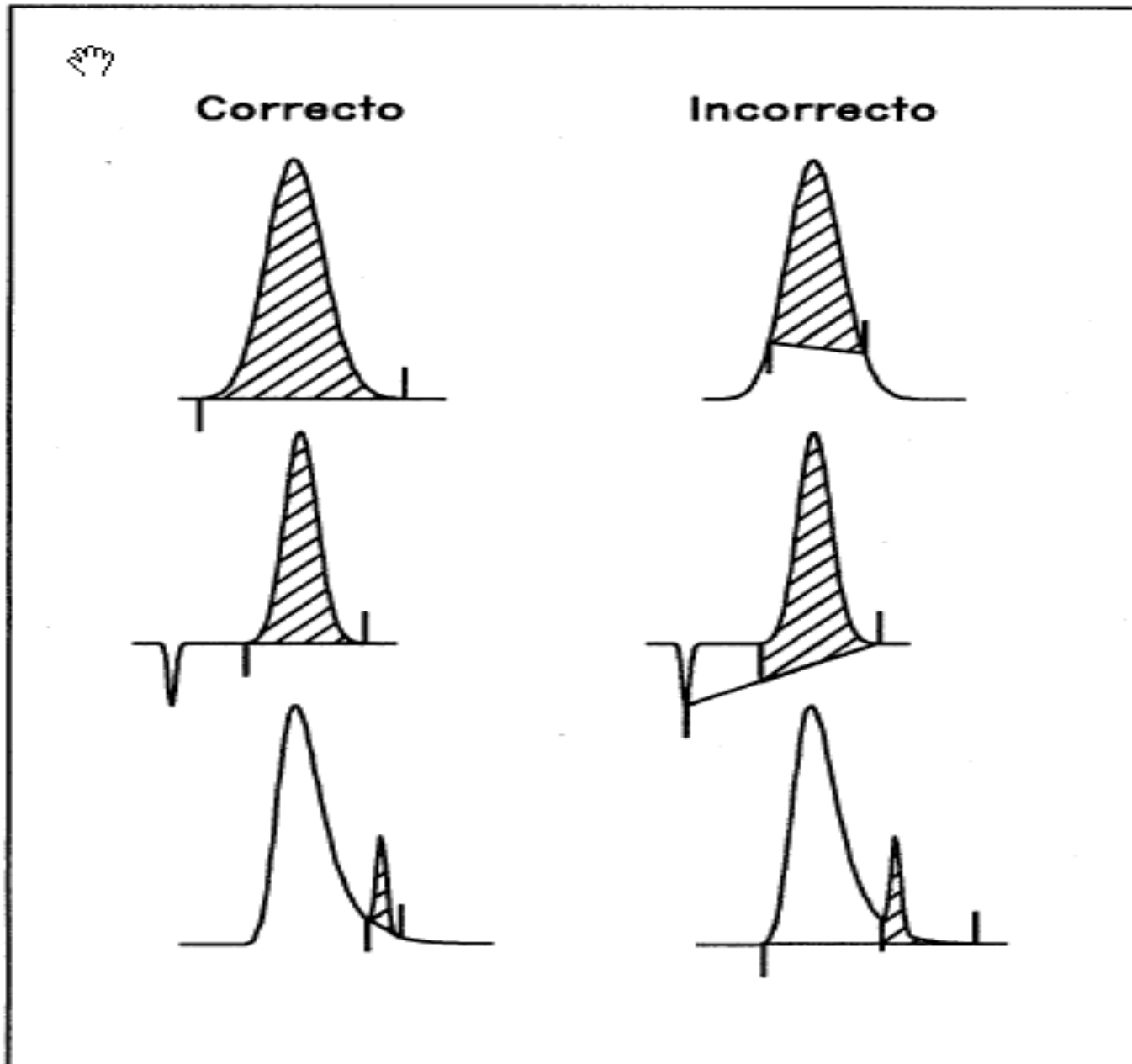
# Análisis cualitativo y cuantitativo

## Errores de integración de picos cromatográficos.

METODO	PRECISION RSD
Altura del pico	1 - 2 %
Triangulación	3 - 4 %
Altura x ancho a media altura	2 - 3 %
Corte y pesada	2 - 3 %
Planímetro	3 - 4 %
Integradores de disco	0.5 - 1 %
Integradores digitales	0.1 - 0.2 %

# Análisis cualitativo y cuantitativo

## Errores de integración de picos cromatográficos.



# Análisis cualitativo y cuantitativo

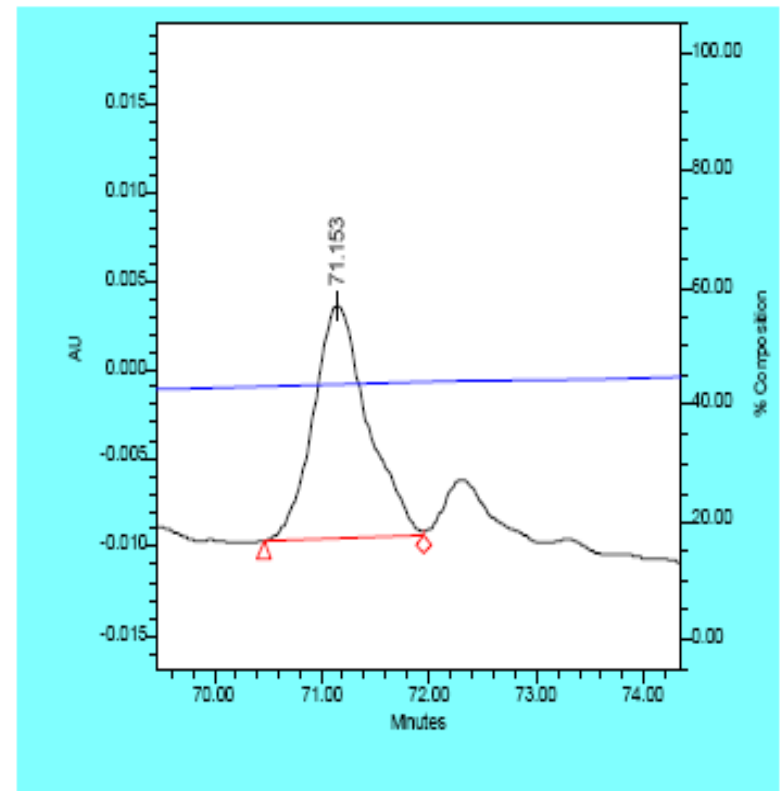
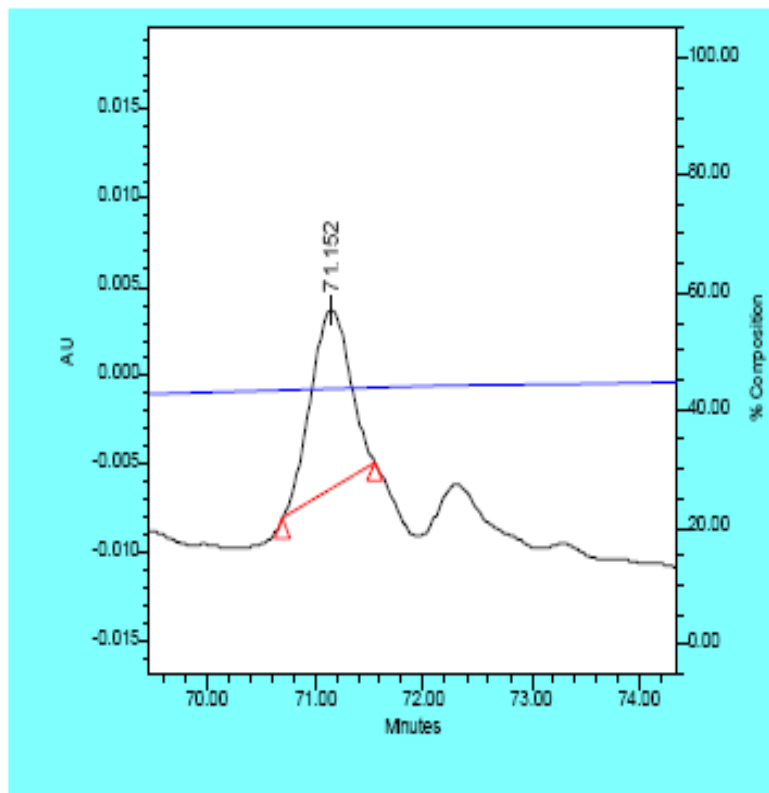
## Errores de integración de picos cromatográficos.

VARIABLE	Se modifican			
	k'	w	h	A
Composición del solvente	si	si	si	no
Temperatura	si	si	si	no
Compresión en la cabeza de la columna	no	si	si	no
Contaminación en la cabeza de la columna	no	si	si	no

# Análisis cuantitativo CLAR

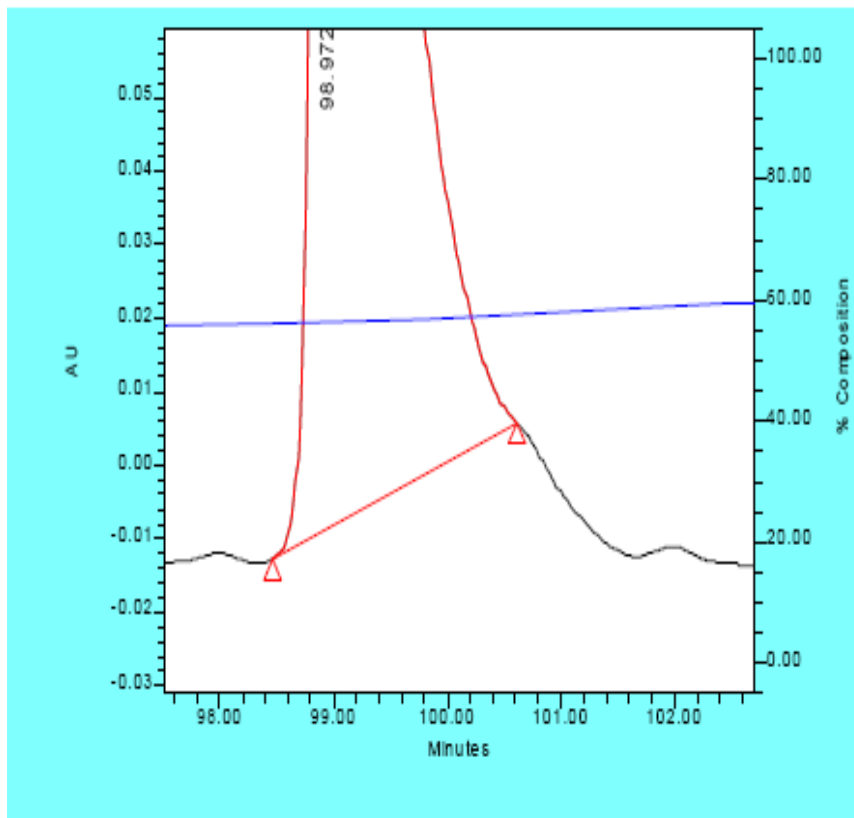
Threshold=300

Threshold=75

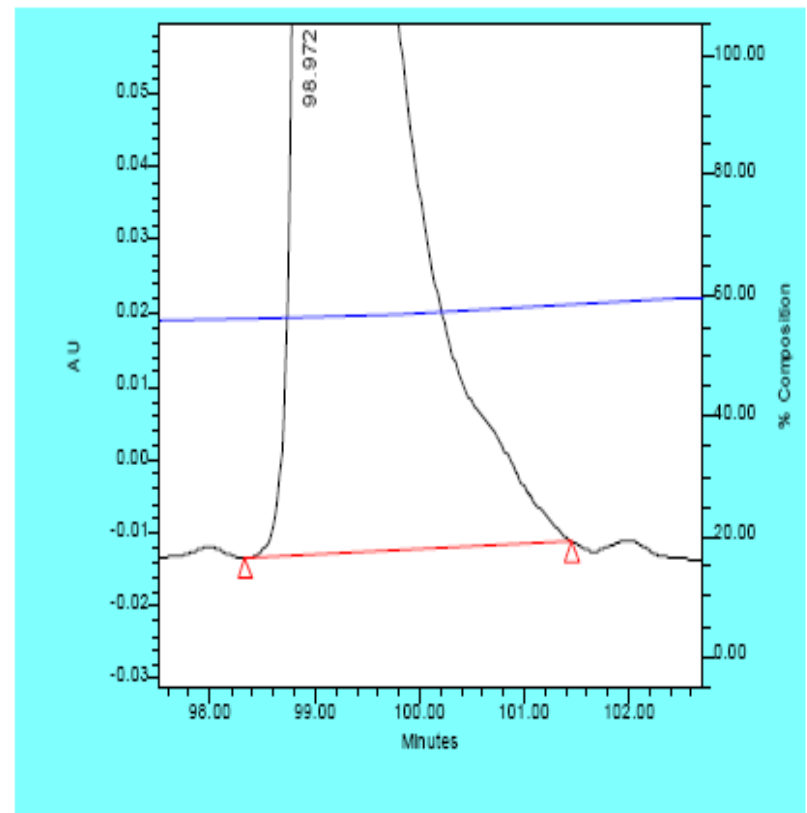


# Análisis cuantitativo CLAR

Peak Width = 30



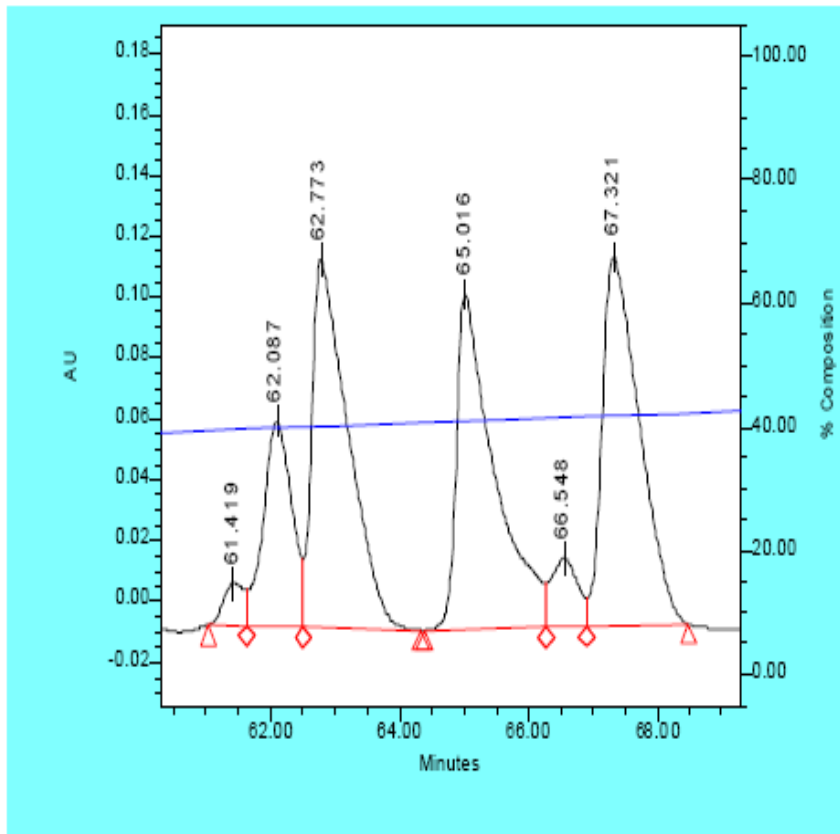
Peak Width = 120



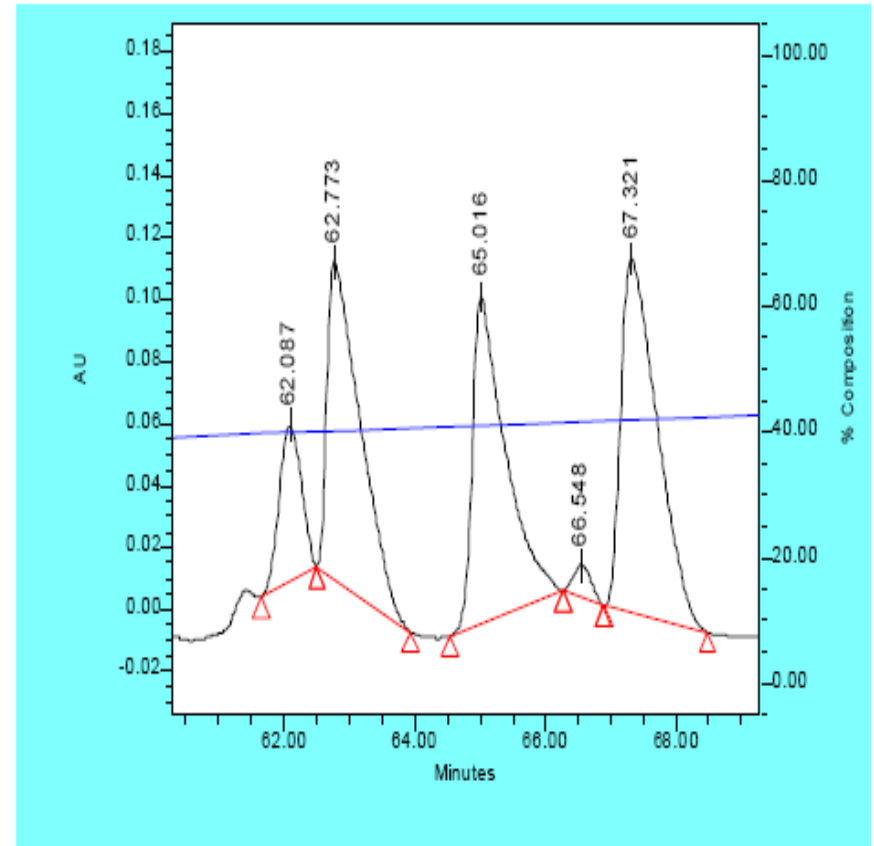


# Análisis cuantitativo CLAR

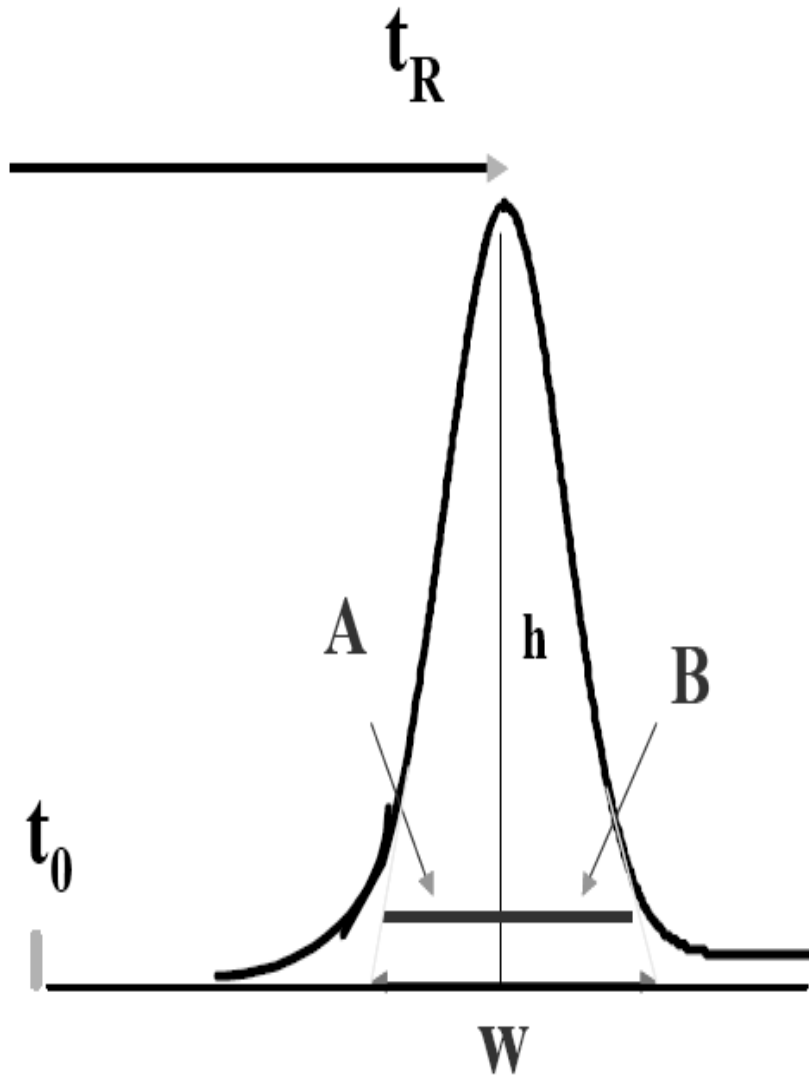
Original



Valle a Valle



# Análisis cuantitativo CLAR

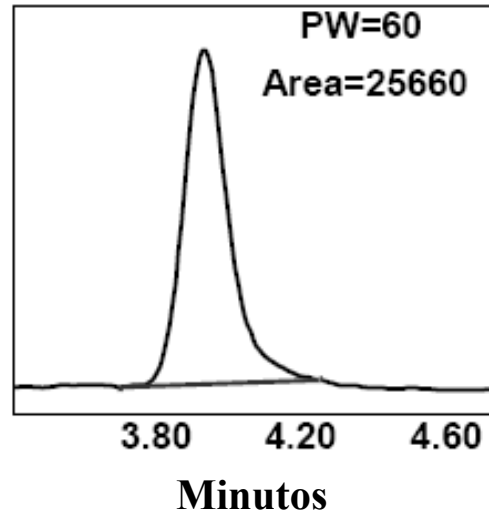
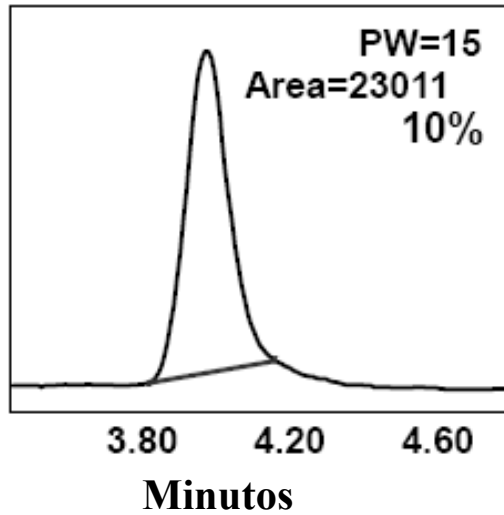


Factor de asimetría

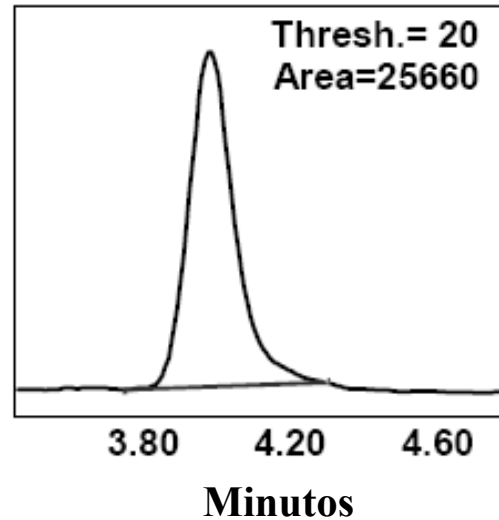
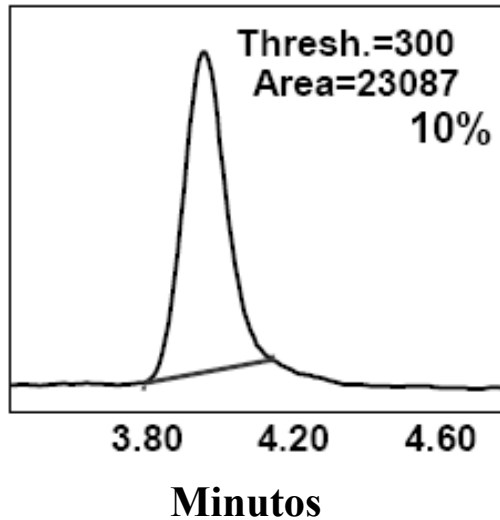
$$A_f = \frac{B_{(10\% h)}}{A_{(10\% h)}}$$

$$T = \frac{A_{5\% h} + B_{5\% h}}{2 \times A_{5\% h}}$$

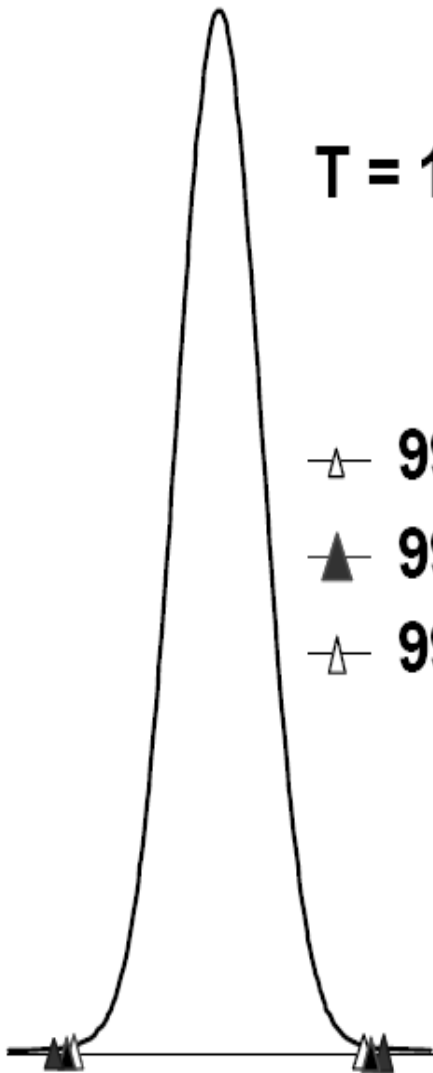
# Análisis cuantitativo CLAR



▶ AUFS = 0.003

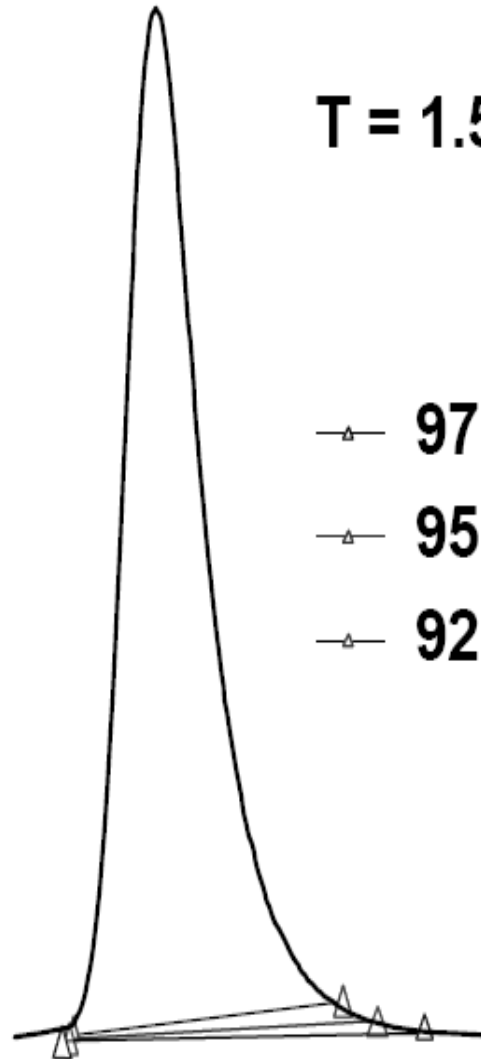


# Análisis cuantitativo CLAR



**T = 1.00**

- △— **99.9 %**
- ▲— **99.8 %**
- △— **99.6 %**

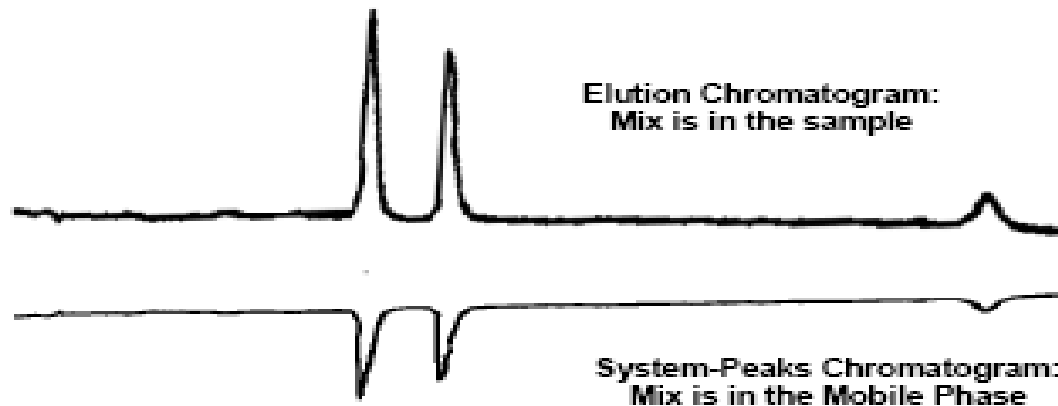


**T = 1.58**

- △— **97.8 %**
- △— **95.3 %**
- △— **92.3 %**

# Picos de sistema

- La fase móvil tiene más de 2 componentes.
- La fase móvil contiene especies adsorbentes.
- La fase móvil presenta una absorbancia de fondo apreciable.
- La muestra es diferente en composición a la fase móvil.  
(más fuerte o más débil).



# Precisión y exactitud

- **Isocrático**

F (2.00- 1.5mL/min)

Metanol: agua 50:50 v:v

- **Gradiente**

Variación de 5-95 v:v

Metanol:agua

2 mL/min

# Precisión y exactitud Isocrático

Tiempo de retención en función de la velocidad de flujo

$$t_R = \frac{L}{u} (1 + k') \approx \frac{K}{F}$$

# Precisión y exactitud

## Isocrático

Tiempo de retención en función de la composición

$$k' = \frac{K}{S}$$

$$t_R = K_1 + \frac{K_2}{S} \approx \frac{K}{S}$$



# Precisión y exactitud

## Isocrático

Área del pico como función de la velocidad de flujo

$$A = \frac{K}{F}$$

# Precisión y exactitud

## Isocrático

Área del pico como función de la composición

$$A = K$$

Si la fase móvil es más débil el pico se ensancha

Si la fase móvil es más fuerte se contrae

# Precisión y exactitud

## Isocrático

Altura del pico como función de la velocidad de flujo

$$P = \frac{K}{F^{0.3}}$$

# Precisión y exactitud Isocrático

Altura del pico como función de la composición

$$P=KS$$

Ancho del pico depende de:

•N

• $t_R$

• $t_R$  depende de composición

# Precisión y exactitud gradiente

Tiempo de retención en función de la composición

$$t_R \approx \frac{K}{S}$$

# Precisión y exactitud gradiente

Tiempo de retención en función de la velocidad de flujo

$$t_R = \frac{K(1+k')}{F}$$

# Precisión y exactitud gradiente

Área del pico como función de la velocidad de flujo

$$A = \frac{K}{F}$$

# Precisión y exactitud gradiente

Área del pico como función de la composición

$$A = K$$



# Precisión y exactitud gradiente

Altura del pico como función de la velocidad de flujo y  
composición.

$$P = \frac{K}{F^{0.3}}$$

$$P = KS$$

# Precisión y exactitud

## Conclusiones

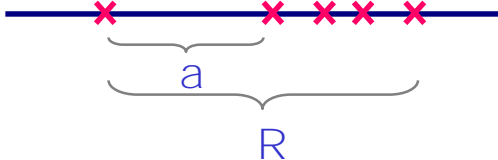
- Sí el control de flujo es malo, pero la composición de la fase móvil puede mantenerse con exactitud, medidas de altura del pico dan mejores resultados debido a que la altura del pico es relativamente independiente de la velocidad de flujo.
- Sí el control de flujo es bueno pero la composición de la fase móvil no puede controlarse con precisión, las medias de área de pico son mejores, debido a que el área del pico es relativamente independiente de la composición.
- Las mediciones de área son poco precisas sí la línea base es muy ruidosa con picos de factor de asimetría mayores de 2

## TEST Q DE DATOS SOSPECHOSOS

Aceptar o rechazar un resultado anómalo (outlier)

- ⓐ Los resultados anómalos o discrepantes son aquellos que no pertenecen a una población o que existe una probabilidad inferior a un determinado valor de que pertenezcan a ella.
- ⓐ Normalmente se producen al cometer errores o fallos en la metodología aplicada.

Se ordenan los datos en forma creciente y se calcula Q

$$Q = \frac{\text{desvío}}{\text{recorrido}} = \frac{a}{R}$$


Desvío (a): Diferencia entre el dato sospechoso y su vecino más cercano

Amplitud, rango, o recorrido (R): Diferencia numérica entre el dato de mayor valor y el de menor valor

- ⓐ Si  $Q_{\text{calculada}} > Q_{\text{tabulada}}$  el dato se rechaza

**Ejemplo:** Datos: 12.53, 12.56, 12.47, 12.67, 12.48

12.47 12.48 12.53 12.56 12.67  
a

R

$$R = 0.20$$

$$\alpha = 0.11$$

$$Q_{\text{cal}} = 0.55$$

$$Q_{\text{tab (0.10)}} = 0.642$$

$Q_{\text{calc}} < Q_{\text{tab}}$  el dato sospechoso se retiene

Nro. observaciones	$Q_{\text{critico}}$		
	90% confianza	95% confianza	99% confianza
3	0.941	0.970	0.994
4	0.765	0.829	0.926
5	0.642	0.710	0.821
6	0.560	0.625	0.741
7	0.507	0.568	0.680
8	0.468	0.526	0.634
9	0.437	0.493	0.598
10	0.412	0.466	0.568