

Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas.

Parte II.

Práctica de laboratorio: análisis cuantitativo básico

Eva María Díaz Peña. Mara Sacristán San Cristóbal.

Borja Alarcón Agualeles. Carlos Vicente Córdoba.

María Estrella Legaz González.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología.
Universidad Complutense de Madrid. Avenida José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid. España.

evam.diaz@bio.ucm.es marasacristan@bio.ucm.es

borjaestremera@hotmail.com cvicente@bio.ucm.es

melegaz@bio.ucm.es.

Resumen: En la práctica que se plantea, el alumno realiza dos tipos de calibración, una absoluta y otra relativa que permiten cuantificar un analito cuya concentración en la muestra problema se desconoce. En la calibración absoluta se emplean concentraciones crecientes de ácido *p*-hidroxibenzoico analizando la respuesta del detector. En el caso de la calibración relativa se emplean concentraciones crecientes de ácido gálico en presencia de una concentración fija de ácido *p*-hidroxibenzoico que actúa como patrón interno.

Palabras clave: Analito. Columna analítica. Cuentas de área. Detector. Fase estacionaria. Fase móvil. HPLC. Masa inyectada. Tiempo de retención.

INTRODUCCIÓN

Desde la incorporación de modernos detectores a la salida de la columna y el acoplamiento de sistemas de integración, la técnica de HPLC ofrece la posibilidad de realizar análisis cuantitativos. Los sofisticados sistemas de integración proporcionan resultados de forma rápida y relativamente sencilla. Sin embargo, es importante resaltar que la decisión final sólo puede ser tomada por el usuario experto en cromatografía, quien analizará toda la información contenida en el cromatograma.

El pico cromatográfico representa una Gaussiana, que es una distribución de las moléculas que eluyen a lo largo del tiempo. La cuantificación del pico conlleva la evaluación del número de moléculas de cada soluto (cada pico) y, por tanto, la cantidad o concentración de la misma. El análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura, o el área, del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas. El uso de una u otro

dependerá de las características de la banda obtenida, altura en el caso de picos muy agudos y, normalmente, área. Siempre y cuando la resolución (R_s) sea adecuada, el área del pico es el parámetro cuantitativo fundamental. Ésta se mide, bien triangulando el pico, como se comentó en la Práctica del cálculo de la eficiencia o mediante un sistema de integración digital electrónico en línea con un ordenador. Para realizar un buen análisis cuantitativo hay que tener en cuenta dos aspectos fundamentales: correcto calibrado del equipo instrumental y las posibles causas de error en las mediciones. Teniendo estos dos aspectos controlados, existen cinco métodos de análisis cuantitativo que se discuten brevemente a continuación.

Calibración directa, absoluta, o de patrón externo

Para realizar el cálculo de la composición de la muestra, se inyectan masas exactas y conocidas de analito puro (patrón) y se determina su área (A_p). A continuación se hace una gráfica relacionando el área del pico (A_p) con su masa (m_p), obteniendo entonces una curva de calibración que debe ser lineal y pasar por el origen del eje de coordenadas (Fig. 1). Así se realizará después con cada uno de los patrones.

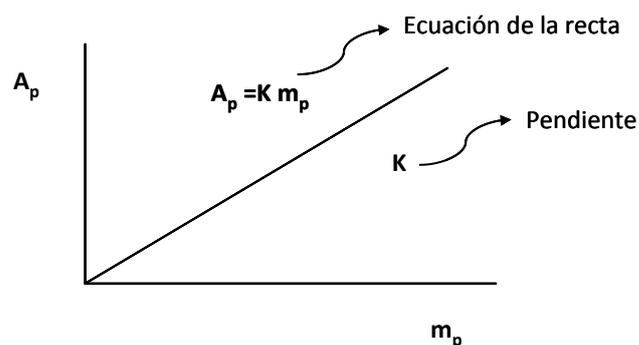


Figura 1. Recta de calibración directa.

Se inyecta entonces una masa exacta de la muestra problema (m_x) y se determina el área del componente a analizar (A_x). La masa de cada componente se obtendrá interpolando el valor del área en la ecuación correspondiente a cada patrón, de forma que:

$$m_p = A_p/K$$

Normalización de área

Como indica su nombre, es un método que permite establecer el porcentaje de cada componente en la muestra. Se calcula dividiendo el área de cada componente entre el área total y multiplicando por 100. Es decir:

$$\%X = (A_x / \sum_i A_i) \times 100$$

donde, A_x es el área del componente X y en el denominador, la suma de todas las áreas. Para que este método sea preciso, se debe cumplir que todos los analitos eluyan, se detecten y tengan la misma sensibilidad bajo el detector. Normalmente, sólo se aplica a compuestos de una serie homóloga.

Normalización de área con factor de respuesta

Cuando se dispone de los patrones, éstos se pueden analizar en las mismas condiciones, con objeto de calcular los factores de corrección (= factores de respuesta), f . Una sustancia (puede ser un analito de la muestra) se elige como patrón y a su factor de respuesta, f_p , se le da un valor arbitrario de 100. El cálculo del factor de respuesta se realiza experimentalmente de la siguiente forma. Se hacen mezclas, pesadas, que contienen una cantidad conocida del patrón y uno de los otros analitos y se cromatografían; así con cada uno de ellos. Las áreas de los dos picos, A_p (del patrón) y A_x (del analito desconocido), se miden y se calcula el factor de respuesta relativo del analito desconocido (f_x) de la forma:

$$f_x = f_p (A_p / A_x) (m_x / m_p)$$

donde, m_x / m_p , es el cociente de masas del analito desconocido respecto al patrón. Cuando se cromatografía la muestra problema, cada área obtenida se multiplica por su factor. Entonces, el porcentaje se calcula como antes:

$$\%X = [(A_x f_x) / \sum_i (A_i f_i)] 100$$

Calibración indirecta, relativa o método del patrón interno

En este método, el patrón elegido no puede ser un analito de la muestra. Este patrón se añade a la muestra a analizar en una concentración conocida; de ahí el nombre de patrón interno. Este patrón interno debe cumplir una serie de requisitos: eluir cerca de los picos de interés, estar resuelto de ellos, ser de naturaleza química similar a los analitos de interés y no reaccionar con ellos y debe existir en estado puro.

La forma experimental de realizar este proceso es la siguiente: se preparan muestras que contengan dos patrones, uno, el del analito presente en la muestra a concentración variable y otro, el elegido como patrón interno, a una concentración fija. Se cromatografían estas muestras y se realiza una curva de calibración que debe ser lineal. A continuación, se representa el cociente de áreas del analito patrón a concentración variable (A_x), respecto al patrón interno, a concentración fija (A_{pi}), frente a la masa variable del analito patrón (m_x). La calibración se representa en la Fig. 2. Cuando se cromatografía la muestra problema en presencia de una concentración dada de patrón interno, se obtienen las áreas del analito problema y del patrón interno. Basta entonces, interpolar el cociente de áreas en la recta de calibración para conocer la masa del analito problema.

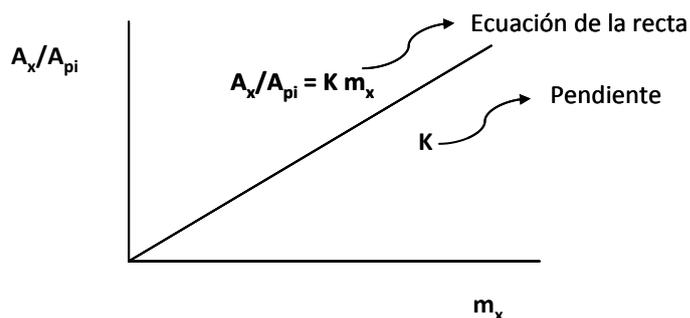


Figura 2. Recta de calibración indirecta.

Método de adición de patrón externo

En este método también se añade un patrón a la muestra problema, pero la naturaleza química del patrón es la misma que la del analito de interés. Se requiere una alta reproducibilidad en el volumen de muestra inyectada.

El principio de este método es que la señal extra, producida por la adición de patrón, es proporcional a la señal original. La Fig. 3 muestra de forma gráfica este método. Nótese que hay señal cuando no hay adición de patrón externo; esta representa la concentración original que es el objeto de determinación. A medida que aumenta la cantidad de patrón externo (m_{pe}) añadido a la muestra, la señal incrementa (Área de pico), produciendo una línea recta de calibración.

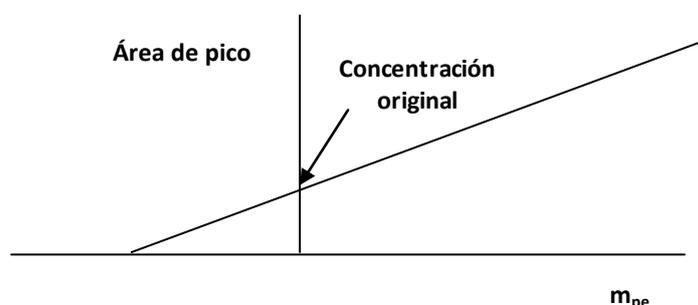


Figura 3. Recta de calibración por adición de patrón externo.

Para encontrar la cantidad original desconocida de analito, se extrapola la línea recta hasta cortar con el eje de abscisas en la zona negativa. Este valor en el eje de abscisas, cambiado de signo, representa la cantidad (masa) de analito presente en la muestra antes de la adición de cualquier cantidad de patrón externo.

En la práctica que se plantea a continuación, se realizarán cuantificaciones mediante el método de calibración directa y mediante el método de calibración indirecta.

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

Se realizarán dos rectas de calibración, una directa y otra inversa. En la calibración directa, se cuantificará la concentración de ácido gálico utilizando una gama de concentraciones variable. En la calibración indirecta, se cuantificará la concentración de ácido gálico, utilizando como patrón interno ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración fija. Se realizarán las siguientes representaciones gráficas:

1. Recta de calibración directa de ácido gálico.
2. Recta de calibración indirecta de ácido gálico, utilizando ácido *p*-hidroxibenzoico como patrón interno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipo cromatográfico. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

Cromatógrafo líquido. Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), con un "loop" de inyección de 20 μ L.

Bomba. SP 8810 LC (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), eléctrica alternante de pistón recíproco.

Fase estacionaria.

Columna: Mediterranea sea C18 (Teknokroma, S.C.L. Spain).

Tipo: Fase Reversa.

Longitud (L): 120 mm.

Diámetro de partícula (dp): 5 μ m.

Diámetro interno (di): 4,6 mm.

Temperatura. 25 $^{\circ}$ c.

Fase móvil.

Reservorio A: Acetonitrilo (ACN).

Reservorio B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

Fase móvil: 30% de A y 70% de B, en condiciones isocráticas.

Flujo de fase móvil: 1,0 mL \cdot min $^{-1}$.

Detector SP 8490 UV-Visible (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA).

Longitud de onda de análisis: 270 nm (según el máximo de absorbancia obtenido en el espectro de absorbancia de ácido gálico, ver Fig. 6). A esta longitud de onda, el ácido *p*-hidroxibenzoico también muestra una absorbancia relativamente alta (ver Fig. 5).

Rango (UAFE): 0,005 unidades.

Sistema de integración. DataApex Clarity Lite™ software para Windows (DataApex Ltd., Praha, Czech Republic).

Muestras empleadas. ácido gálico (M.M.=170,1), en la recta de calibración directa y ácidos gálico y *p*-hidroxibenzoico (M.M.=138,1) en la calibración indirecta. En la Fig. 4 se muestran las estructuras moleculares de dichos ácidos.

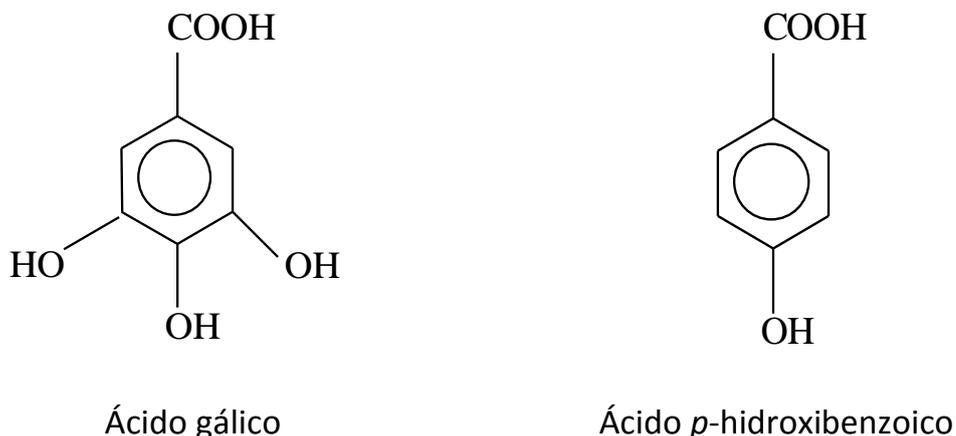


Figura 4. Fórmulas estructurales del ácido gálico y del ácido *p*-hidroxibenzoico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de realizar la cuantificación, se debe hacer el espectro de absorbancia de los analitos a utilizar, disueltos en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v), para poder escoger la longitud de onda más adecuada. En el caso que nos ocupa, tenemos dos analitos, ácidos gálico y *p*-hidroxibenzoico y no necesariamente tienen por qué tener un espectro idéntico. El ácido gálico presenta un máximo de absorbancia principal a 270 nm (Fig. 6), mientras que el ácido *p*-hidroxibenzoico posee un máximo principal de absorbancia a 256 nm (Fig. 5). No obstante, éste último tiene casi un 50% de absorbancia a 270 nm, respecto al 100% de absorbancia a 256 nm. En situaciones de este tipo debe escogerse una longitud de onda de análisis donde todos los analitos muestren una señal apreciable de absorbancia. El espectro de absorbancia de un analito es una característica del analito en cada disolvente, un mismo analito puede tener espectros de absorbancia ligeramente distintos, dependiendo del disolvente en el que se haya disuelto. En esta práctica, se ha elegido una longitud de onda de 270 nm, dado que el analito problema, ácido gálico, tiene aquí su máximo y el ácido *p*-hidroxibenzoico, que se utilizará como patrón interno, también absorbe lo suficiente como para poder ser detectado.

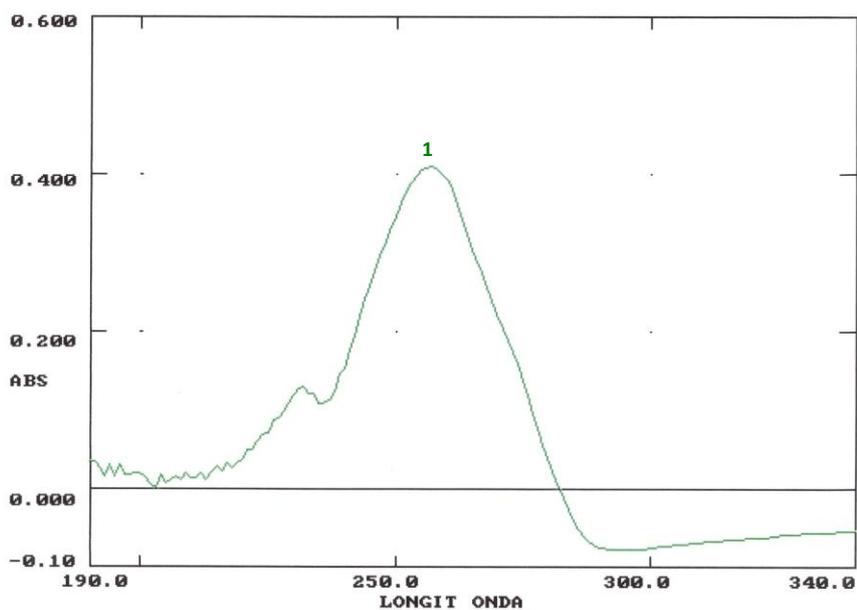


Figura 5. Espectro de absorción del ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, el número 1 representa el máximo principal de absorción a 256 nm.

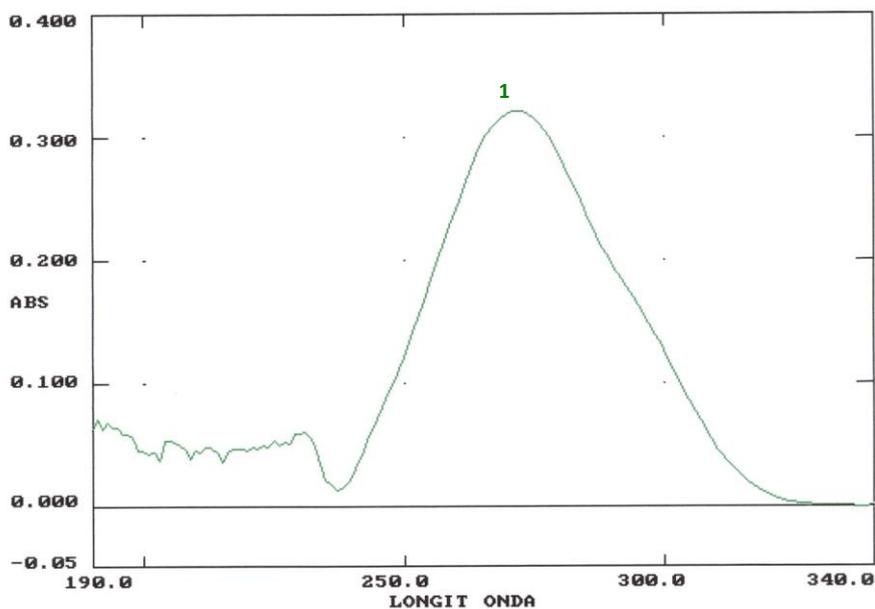


Figura 6. Espectro de absorción del ácido gálico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, el número 1 representa el máximo principal de absorción a 270 nm.

Recta de calibración directa

El analito problema es el ácido gálico. En este tipo de calibración se procede experimentalmente de la siguiente manera: Se prepara una disolución madre de ácido

gálico disuelto en fase móvil (4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v) y de ésta se van haciendo tantas diluciones como puntos se quieran realizar en la recta de calibración. En este caso concreto, se preparará una disolución madre de ácido gálico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y, diferentes diluciones, para conseguir concentraciones de $0,005$; $0,01$; $0,02$; $0,03$; $0,04$ y $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada una de estas disoluciones se inyecta en el cromatógrafo en las condiciones descritas y se obtiene el resultado de la respuesta del detector, expresada en cuentas de área.

Recta de calibración indirecta

El analito problema es el ácido gálico. En este tipo de calibración se utiliza también un patrón interno, ácido *p*-hidroxibenzoico, que cumple los requisitos expresados con anterioridad. La forma de proceder experimentalmente es la siguiente: Se prepara una “disolución madre” de ácido gálico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y las diferentes diluciones para obtener la gama de concentraciones expuesta anteriormente en la calibración directa, es decir, $0,005$; $0,01$; $0,02$; $0,03$; $0,04$ y $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A cada una de estas disoluciones se les añade una concentración fija de ácido *p*-hidroxibenzoico de $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada una de estas disoluciones se inyecta en el cromatógrafo en las condiciones descritas y se obtiene la respuesta del detector expresada en cuentas de área.

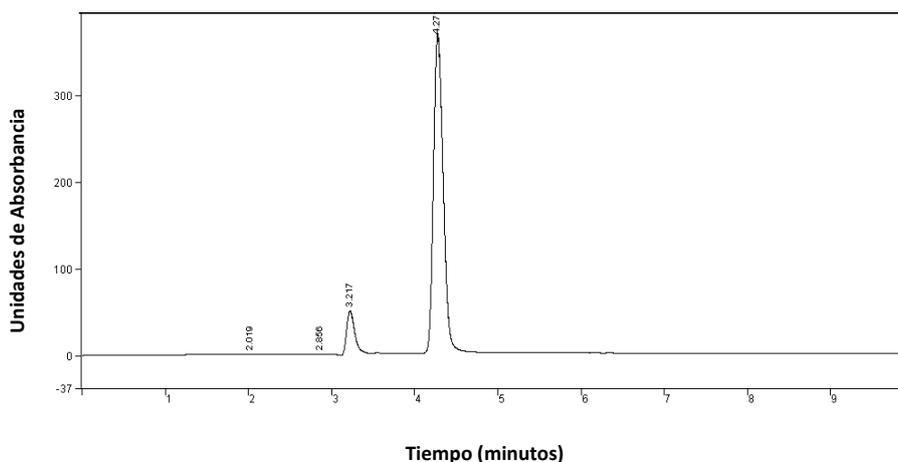


Figura 7. Cromatograma de ácido gálico $0,005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	11,5	3,22	4,2
2	85,57	4,27	31,23

Tabla 1. Resultados de la cuantificación del cromatograma de ácido gálico $0,005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Por razones de economía, se muestran los cromatogramas obtenidos de las disoluciones preparadas para la calibración indirecta, exclusivamente (Figs. 33 a 38). En las Tablas 7 a 12 se muestran los resultados de cuantificación de los picos, obtenidos mediante el “software” correspondiente.

El ácido gálico eluye con un t_R de $3,22 \pm 0,2$ min y el ácido *p*-hidroxibenzoico con un t_R de $4,31 \pm 0,5$ min. El pico (área) del ácido gálico aumenta a medida que aumenta la concentración (masa inyectada en el “loop” de 20 μ L), mientras que el pico de ácido *p*-hidroxibenzoico se mantiene constante ya que su concentración no varía en cada una de las inyecciones. A continuación se muestran estos resultados en las Figs. 7 a 12 y en las tablas 1 a 6. En este caso, todas las condiciones de análisis se mantienen y lo único que varía es la concentración inyectada del analito problema.

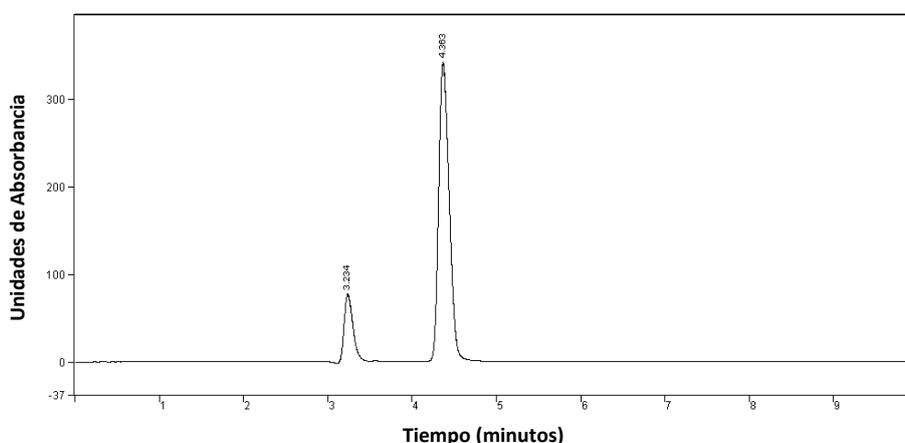


Figura 8. Cromatograma de ácido gálico $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	16,71	3,23	6,55
2	83,29	4,36	32,67

Tabla 2. Resultados de la cuantificación del cromatograma de ácido gálico $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

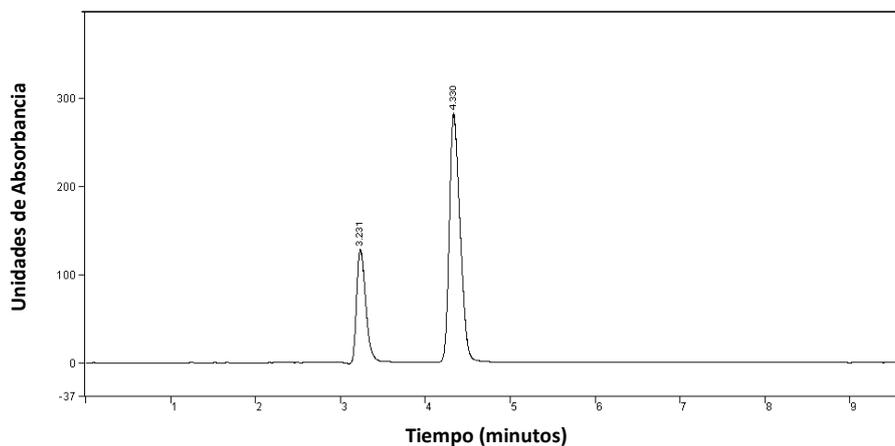


Figura 9. Cromatograma de ácido gálico $0,02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	28,32	3,25	9,9
2	71,68	4,36	25,05

Tabla 3. Resultados de la cuantificación del cromatograma de ácido gálico $0,02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

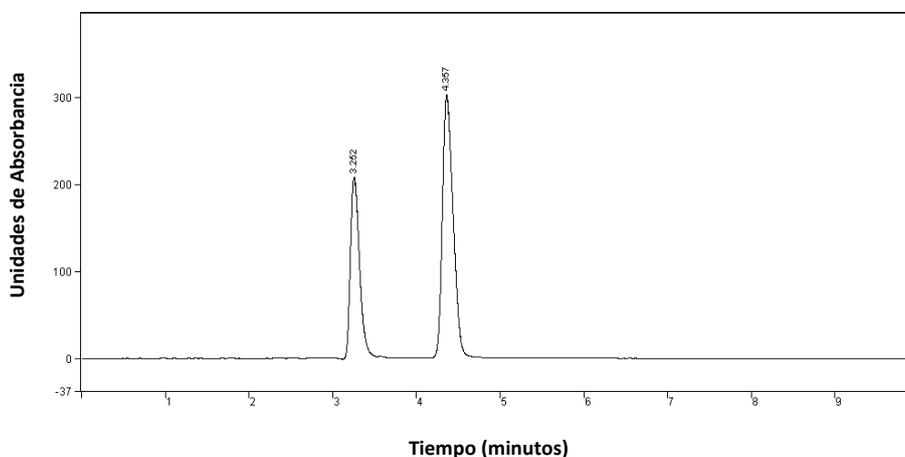


Figura 10. Cromatograma de ácido gálico $0,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	37,2	3,23	16,07
2	62,8	4,33	27,12

Tabla 4. Resultados de la cuantificación del cromatograma de ácido gálico $0,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

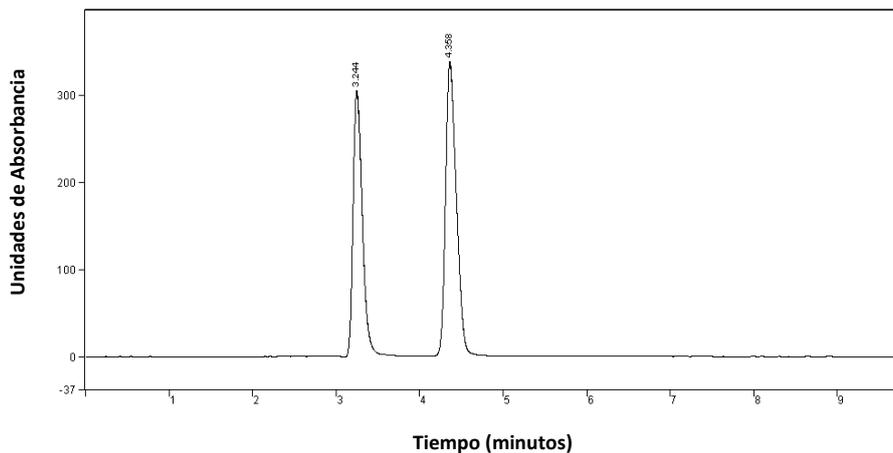


Figura 11. Cromatograma de ácido gálico $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	43,67	3,24	23,71
2	56,33	4,36	30,58

Tabla 5. Resultados de la cuantificación del cromatograma de ácido gálico $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

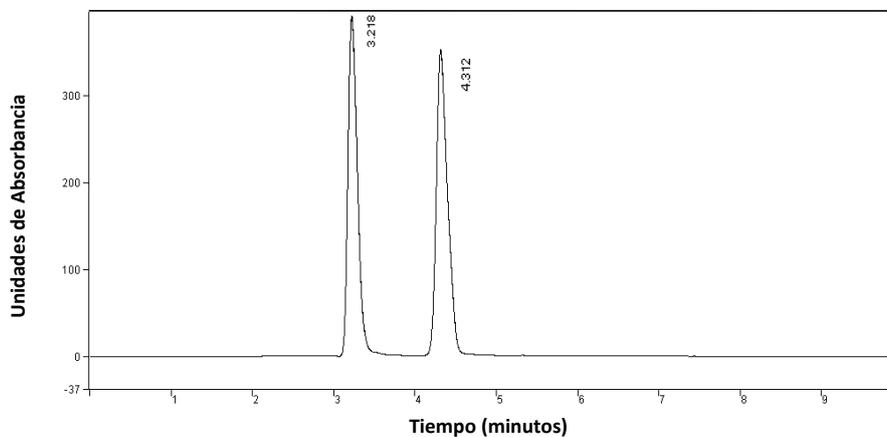


Figura 12. Cromatograma de ácido gálico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	48,37	3,22	31,92
2	51,62	4,31	34,07

Tabla 6. Resultados de la cuantificación del cromatograma de ácido gálico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ácido *p*-hidroxibenzoico $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a un flujo de fase móvil de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Representación gráfica de la recta de calibración directa de ácido gálico

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la cuantificación del ácido gálico, obtenidos de los cromatogramas mostrados anteriormente. Como se observa, las cuentas de área del pico, que son directamente proporcionales a su concentración (masa inyectada), aumentan al aumentar ésta. En la tabla también se muestra la ligera variación del t_R , así como la masa inyectada. Por convenio, a la hora de hacer la representación gráfica de la calibración directa, en el eje de abscisas se mostrará la masa inyectada (m_i) en lugar de la concentración. Ésta se calcula en función del volumen de muestra inyectada en la columna a través del “loop” de inyección, 20 μL en este caso.

t_R ácido gálico (min)	Masa inyectada (μg)	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
3,22	0,1	0,005	4,2
3,23	0,2	0,01	6,55
3,23	0,4	0,02	9,9
3,21	0,6	0,03	16,07
3,24	0,8	0,04	23,71
3,22	1	0,05	31,92

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de ácido gálico inyectado a diferentes concentraciones.

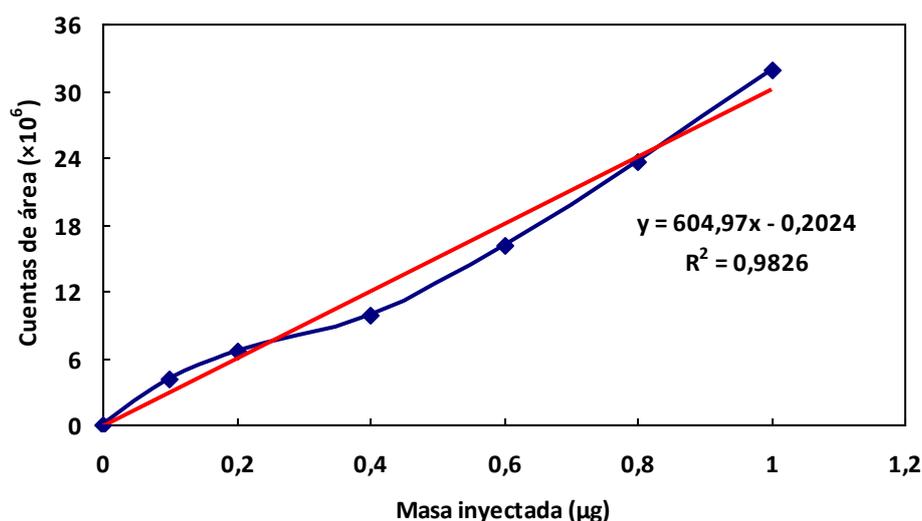


Figura 13. Variación de las cuentas de área en función de la concentración de ácido gálico (en color azul). En color rojo se muestra el ajuste, por regresión lineal, de esta curva así como la ecuación de la recta obtenida.

La representación de los valores mostrados en la Tabla 7 da una curva que se ajusta, por regresión lineal, a una recta cuya ecuación se observa en la Fig. 13. Por tanto, el ácido gálico en el rango de concentraciones ensayadas produce una respuesta lineal en el detector, esto es, a mayor masa inyectada, mayor respuesta.

Este tipo de calibración se utiliza siempre y cuando haya certeza de que en la muestra problema existe un determinado analito y éste además esté comercializado en forma pura. En el caso que nos ocupa, el analito presente en la muestra es el ácido gálico, el cual además existe comercializado como patrón puro. De esta forma, una vez obtenida la ecuación de la recta correspondiente a la calibración directa, cualquier valor de cuentas de área de ácido gálico presente en la muestra problema puede ser interpolado para obtener la masa inyectada (concentración) de ácido gálico presente en la muestra.

Representación gráfica de la recta de calibración indirecta de ácido gálico utilizando ácido *p*-hidroxibenzoico como patrón interno.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la cuantificación de ácido gálico a concentración variable, empleando como patrón interno una concentración fija de ácido *p*-hidroxibenzoico. También se muestran las ligeras variaciones que pueden darse en el tiempo de retención de los dos analitos y la masa inyectada, consecuencia de la inyección en el "loop" de 20 μ L. En el caso de la calibración indirecta, en el eje de ordenadas se representa la respuesta del detector expresada en cuentas de área relativas; esto es, la respuesta en el detector del analito problema respecto a la del patrón interno y en el eje de abscisas, la masa inyectada de analito problema.

t_r ácido gálico (min)	Masa inyectada ácido gálico (μ g)	Concentración ácido gálico ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	t_r ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (min)	Masa inyectada ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (μ g)	Concentración ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cuentas de área relativas (C.a. ácido gálico / C.a. ácido- <i>p</i> -hidroxibenzoico)
3,22	0,1	0,005	4,27	1	0,05	0,13
3,23	0,2	0,01	4,36	1	0,05	0,2
3,23	0,4	0,02	4,33	1	0,05	0,39
3,21	0,6	0,03	4,36	1	0,05	0,59
3,24	0,8	0,04	4,36	1	0,05	0,77
3,22	1	0,05	4,31	1	0,05	0,94

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de ácido gálico, inyectado a diferentes concentraciones, en presencia de una concentración fija de ácido *p*-hidroxibenzoico.

A continuación se muestra la representación gráfica de la recta de calibración indirecta, empleando un patrón interno a concentración fija, que es capaz de corregir los posibles errores en la cuantificación. Como en el caso de la calibración directa, la gráfica se ajusta a una recta. En la Fig. 14 se muestra la representación gráfica de la curva de calibración indirecta, donde se observa que las cuentas de área relativas son directamente proporcionales a la masa de ácido gálico inyectada en la columna (color azul); estos valores ajustados, por regresión lineal, dan una recta (color rojo) con un coeficiente de ajuste prácticamente igual a la unidad.

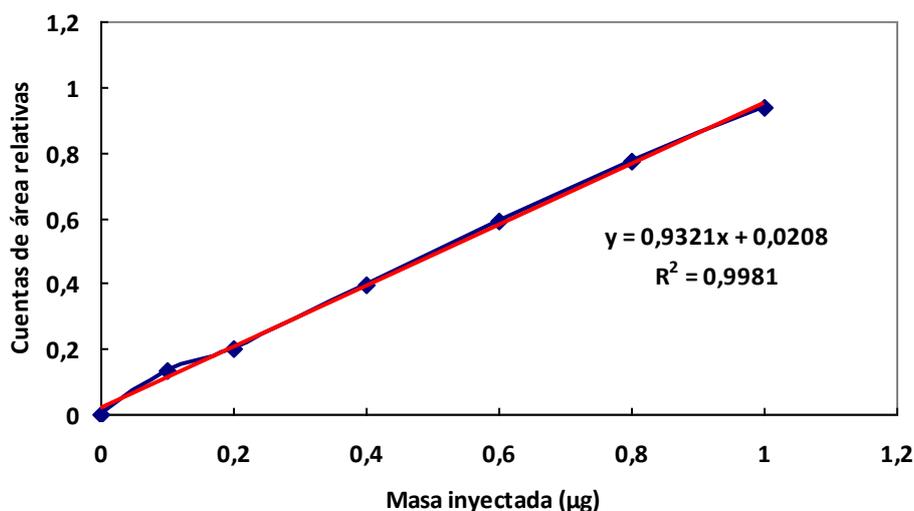


Figura 14. Variación de las cuentas de área relativas en función de la concentración variable de ácido gálico y fija de ácido *p*-hidroxibenzoico, como patrón interno (en color azul). En color rojo se muestra el ajuste, por regresión lineal, de esta curva así como la ecuación de la recta obtenida.

En la práctica, las muestras problema a las cuales se adiciona una concentración fija del patrón interno, son inyectadas en el sistema cromatográfico y el detector produce una respuesta cuantitativa expresada en cuentas de área. Se calcula entonces el cociente entre las cuentas de área del analito problema y las del patrón interno y se interpola en la recta con objeto de obtener la masa inyectada (concentración) del analito problema.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Dolan, J. W. y Snyder, L. R. 1989 *Troubleshooting LC Systems: A Comprehensive Approach to Troubleshooting LC Equipment and Separations*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Dong, M.W. 2006. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley and Sons, New York.
- García de Marina, A. y del Castillo, B. 1988. *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Ed. Limusa, Méjico.
- Krokhin, O. V. y Spicer, V. 2009. Peptide Retention Standards and Hydrophobicity Indexes in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Peptides. *Analytical Chemistry*, 81(22): 9522-9530.

Lloyd, R., Snyder, L. R., Glajch, J. L. y Kirkland, J. J. 1997. *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York.

McMaster, M. C. 2005. *LC/MS: Practical User's Guide*, John Wiley and Sons, New York.

Meyer, V. R. 2004 *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley and Sons, New York.

Miller, J.M. 1988. *Chromatography: Concepts and Contrasts*. John Wiley and Sons, New York.

Saunders, D. L. y McCaslin, P. C. 1999. *CLC-70 Identification and Quantification Techniques in HPLC*, Version 2.1, SAVANT Audiovisuals Inc.

Snyder, L. R. 1997. *HPLC Method Development*. John Wiley and Sons, New York.

Snyder, L. R. y Dolan, J. W. 2007. *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Dolan, J. W. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd Ed., John Wiley and Sons, New York.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/program.html>

Study HPLC. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.studyhplc.com/index.php>

LCGC's Chrom Academy. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.chromacademy.com/>

Chemguide. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.chemguide.co.uk/>

HPLC. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.separationsnow.com/coi/cda/list.cda?catId=2737&type=Link&sort=az&chId=4>

Recibido: 14 junio 2010.

Aceptado: 3 de agosto 2011.