

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

Parte IV.

Cuestiones Teórico-Prácticas

**Borja Alarcón Agualeles. Eva María Díaz Peña.
Mara Sacristán San Cristóbal. 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.

borjaestremera@hotmail.com evam.diaz@bio.ucm.es

marasacristan@bio.ucm.es cvicente@bio.ucm.es

melegaz@bio.ucm.es

Resumen: El planteamiento de las siguientes cuestiones teórico prácticas se hace necesario tras haber adquirido los conocimientos básicos sobre Cromatografía Líquida de Alta Resolución. La comprensión de los distintos conceptos tratados en profundidad tanto en las explicaciones teóricas como en el desarrollo de las prácticas se verá facilitada tras la resolución de dichas cuestiones. Son el reflejo de buena parte de los obstáculos con los que el alumno o cualquier usuario de la técnica pueden encontrarse a la hora de su manejo. Asimismo, hacen referencia a muchos aspectos previos a la utilización del equipo, olvidados muy frecuentemente, como puedan ser la elección del propio equipo e incluso la técnica a utilizar. También se abre la discusión sobre distintos ejemplos de cromatogramas obtenidos después del análisis y el esclarecimiento de las posibles causas por las que han sido provocados, ayudando así al usuario a la detección de errores en el diseño de su trabajo.

Palabras clave: Fase reversa. Fase normal. Tiempo de retención. Tiempo muerto. Tiempo de retención corregido. Factor de capacidad. Número de platos teóricos. Resolución. Selectividad. Altura equivalente de plato teórico. Derivatización.

CUADERNILLO DE CUESTIONES TEÓRICO-PRÁCTICAS

El alumno deberá indicar, mediante una cruz, la (s) respuesta (s) correcta (s).

1. Si preparamos una muestra de benceno, naftaleno y tolueno en una columna de octadecil sílice, empleando una mezcla de agua:metanol (50:50,v/v) como fase móvil a flujos de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, ¿Qué ocurrirá con el k' de los solutos?

- a Aumentarán al aumentar el caudal
- b Disminuirán al aumentar el caudal
- c No se modificarán al aumentar el caudal
- d Este resultado no está previsto por la teoría del efecto solvóforo

2. El aumento de la longitud de cadena hidrocarbonada en columnas de fase reversa:

- a Disminuye la retención en términos generales
- b Aumenta la retención en términos generales
- c No afecta a la retención
- d Sólo afecta a la retención de los hidrocarburos

3. Se ha preparado una columna de 15 cm de longitud, y 4,6 mm de diámetro interno rellena de partículas esféricas de sílice con $d_p = 10\mu\text{m}$, obteniéndose para ella un valor de $h = 2,5$ en el mínimo de la curva de van Deemter. No estando satisfechos con el número de platos teóricos que con ella se obtienen, se vacía y se rellena de nuevo, pero esta vez con partículas de $d_p = 5\mu\text{m}$, obteniéndose de nuevo $h = 2,5$ en el mínimo de la curva de van Deemter. ¿Cuál de las dos tiene mayor número de platos teóricos?

- a La primera
- b La segunda
- c Las dos iguales
- d Faltan datos para responder a la pregunta

4. Se ha preparado una columna de 15 cm de longitud con un soporte silíceo y partículas de fase estacionaria de $10 \mu\text{m}$, obteniéndose una eficacia de 7.500 platos en el mínimo de la curva de van Deemter. No estando satisfechos con la eficacia obtenida se vacía y se rellena con partículas de $5\mu\text{m}$, obteniéndose ahora 7.500 platos en el mínimo de la curva de van Deemter. ¿Cuál de las dos está mejor construida en el sentido de empaquetamiento?

- a La primera
- b La segunda
- c Las dos están igual de bien construidas
- d Faltan datos para responder a esta pregunta

5. Para poner a punto la separación de estrona y estradiol en orina, se ha tomado una vieja columna de ODS y se han ensayado diferentes composiciones de fase móvil formada por agua:metanol. Se ha visto que en la mejor separación conseguida en estas condiciones ($R_s = 0,8$), la selectividad de nuestro sistema cromatográfico para estos compuestos es de $\alpha = 1,1$ y que el factor de capacidad del segundo pico (el estradiol) es $k' = 2$ ¿Cuántos platos deberá tener la columna para conseguir que en estas condiciones se lleve a cabo la separación con una resolución de al menos ($R_s = 1,25$)?

- a 1.000 platos teóricos
- b 3.000 platos teóricos
- c 9.000 platos teóricos
- d Faltan datos para responder a la pregunta

6. Para el análisis cromatográfico de una determinada sustancia, ¿Cuál de las siguientes columnas, que tienen igual longitud, es más eficiente y por qué?

- a Columna 1, $N = 47.330$
- b Columna 2, $N = 32.900$
- c Columna 3, $N = 9.200$

7. ¿Qué columna tendría más eficacia si construyéramos, en la misma longitud, columnas de 40, 10, 5 y 3 μm de diámetro de partícula?

- a La de 40 μm
- b La de 10 μm
- c La de 5 μm
- d La de 3 μm

8. Para mejorar la resolución (R_s) de una separación cromatográfica, ¿Qué haría usted?

- a Utilizar una columna más larga
- b Utilizar una columna más eficaz
- c Disminuir el flujo de la fase móvil

9. Un sistema de bombeo.

- a Debe tener una precisión de $10^{-3} \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- b Debe proporcionar un flujo libre de pulsaciones
- c Debe tener al menos un volumen de 0,5 mL para poder trabajar en cromatografía semipreparativa
- d Debe producir poco ruido en el detector

10. Para el funcionamiento continuado y en buenas condiciones de la bomba:

- a Es conveniente que la bomba trabaje unos minutos sin disolvente para comprobar su funcionamiento
- b Debe lavarse periódicamente con una disolución de cloruro potásico al 0.1 %
- c Deben filtrarse previamente los disolventes con un filtro de 0,2-0,5 μm
- d No debe utilizarse la bomba por encima de la presión para la que fue diseñada

11. ¿Cómo trabaja una bomba de doble pistón?

12. Las válvulas de inyección:

- a Tienen una gran reproducibilidad en la inyección
- b Permiten trabajar hasta 5.000 atmósferas
- c Son ideales para inyectar pequeñas cantidades de muestra de forma reproducible
- d Son de mediano precio

13. Para unir la salida de la columna con la entrada del detector, el procedimiento más correcto es:

- a Utilizar un tubo de 15 cm de longitud y 1 mm de diámetro interno
- b Utilizar un tubo de 15 cm de longitud y 0,25 mm de diámetro interno
- c Utilizar un tubo de 10 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro interno
- d Utilizar un tubo de 10 cm de longitud y 0,25 mm de diámetro interno.
- e Utilizar un tubo de 2 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno

14. Las características de un detector de índice de refracción son:

- a Universalidad, en el sentido de general
- b Posee una gran sensibilidad
- c Utilizable para aquellas sustancias cuya estructura molecular les permite poseer un índice de refracción característico
- d No se puede trabajar con gradientes de elución

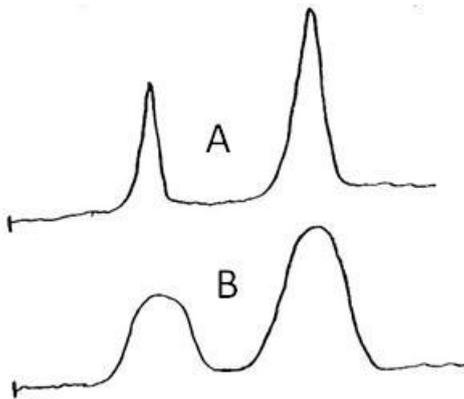
15. Las características de un detector ultravioleta-visible son:

- a Limitado a sustancias que absorban entre 190 y 350 nm
- b Dificultad en su mantenimiento y manejo
- c Compatible con los gradientes de elución
- d Gran sensibilidad para muchas sustancias en comparación con otros detectores

16. Las características de un detector de fluorescencia son las siguientes:

- a Siempre es necesario derivatizar la muestra
- b Se basa en la excitación de grupos funcionales específicos con energía de corta longitud de onda y la emisión, por parte de estos grupos, de radiación de mayor longitud de onda.
- c Son los más sensibles y específicos de los detectores ópticos
- d Son universales, en el sentido de generales

17.



Estos dos cromatogramas, dibujados con una alta velocidad de papel, se han obtenido con la misma columna y en las mismas condiciones, pero con dos detectores de U.V. de marca distinta, funcionando a 254nm. El resultado se debe a que:

- a Los dos detectores tienen diferente sensibilidad
- b El segundo cromatograma se ha obtenido con un detector de mayor volumen de célula
- c Las lámparas tienen características distintas

18. Los disolventes en HPLC deben ser:

- a Solventes de la muestra
- b De punto de ebullición superior a la temperatura de trabajo
- c De alta absorción en el ultravioleta a 254 nm
- d De un valor de cut-off muy alto
- e Compatibles con el detector, en el sentido de producir poco ruido en éste

19. La fuerza eluotrópica de una fase móvil depende de:

- a La fase estacionaria
- b La fase móvil
- c La muestra que se utilice para medirla
- d La fase móvil y la fase estacionaria
- e La fase móvil, la fase estacionaria y la muestra que se utilice para medirla

20. ¿Qué tipo de mecanismo de separación cromatográfica representan los siguientes esquemas de fase móvil?

- a Acetonitrilo 100%
- b hexano:cloroformo (50:50, v/v)
- c metanol:agua (30:70, v/v)
- d acetonitrilo:diclorometano:agua (45:5:50, v/v)

21. ¿Cuál de las siguientes mezclas hará eluir antes un determinado soluto apolar en cromatografía líquido-sólido sobre sílice desactivada en parte?
(Utilice las series eluotrópicas)

- a cloruro de metileno:hexano (40:60, v/v)
- b éter etílico:hexano (30:70, v/v)
- c éter etílico:cloruro de isopropilo (5:95, v/v)
- d Ninguna de las anteriores

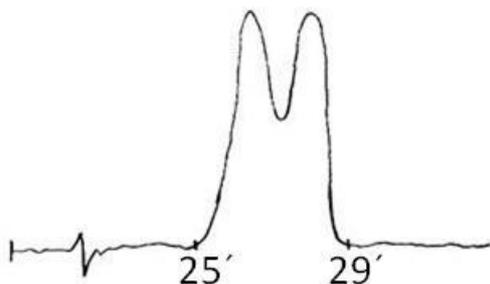
22. La selectividad o factor de separación en HPLC está relacionado:

- a Solamente con la naturaleza de la fase móvil
- b Solamente con la naturaleza de la fase estacionaria
- c Con la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria
- d Con el diámetro de la partícula y la naturaleza de la fase móvil

23. ¿Por qué se achatan y ensanchan los picos a medida que la banda cromatográfica se desplaza por la columna?

24. ¿Por qué puede incrementar el t_R de un pico utilizando la misma columna (misma fase estacionaria) y el mismo sistema de fase móvil?, ¿por qué puede disminuir?

25.



El cromatograma de la figura corresponde a dos miembros de una serie homóloga de solutos muy polares, separados sobre octadecil sílice, empleando como fase móvil una mezcla de agua:acetonitrilo (90:10, v/v). Para aumentar la selectividad o factor de separación ¿Qué hay que hacer?

- a Aumentar el % de agua en la fase móvil
- b Aumentar el % de acetonitrilo en la fase móvil
- c Aumentar el flujo de la fase móvil
- d Utilizar como fase móvil una mezcla de agua y metanol de la misma composición que la de agua y acetonitrilo que estamos usando
- e Realizar un gradiente lineal de agua y acetonitrilo entre 0 y 100% de acetonitrilo en 30 minutos
- f Realizar un gradiente de agua y acetonitrilo, donde el agua varía entre 90 y 100% con pendiente alta y a tiempos más cortos (10 minutos)
- g Otro, por ejemplo...

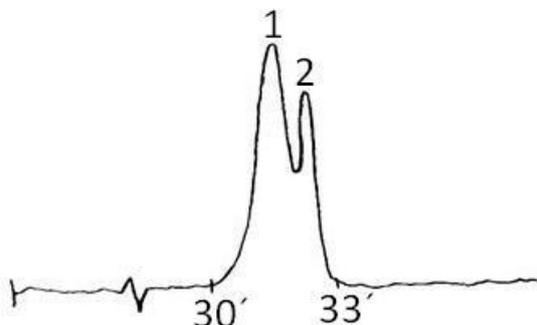
26.



Si en la puesta a punto de una separación sobre una columna de sílice se obtiene un cromatograma como el de la figura ¿Qué haría usted?

- a Realizar un gradiente
- b Desactivar la sílice añadiendo agua a la fase móvil
- c Intentar la separación en fase inversa con gradiente convexo
- d Activar la sílice deshidratando bien los disolventes
- e Aumentar la temperatura de la columna

27.

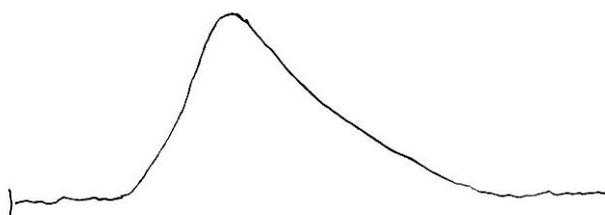


Cuando se intenta separar en octadecil sílice dos sustancias empleando como fase móvil una mezcla de metanol:agua (80:20, v/v) se obtiene el cromatograma de la figura, donde el pico 1 corresponde al cloroformo y el pico 2 al clorobenceno.

Para conseguir una buena separación de la forma más fácil posible, ¿Qué haría usted?

- a Utilizar la cromatografía de gases
- b Aumentar el contenido de agua en la fase móvil
- c Emplear una mezcla de agua y tetrahidrofurano como fase móvil
- d Utilizar una columna más eficaz
- e Aumentar el contenido de metanol en la fase móvil
- f Utilizar un gradiente de agua y acetonitrilo donde el acetonitrilo variase entre 70% y 100% con pendiente alta

28.



El siguiente cromatograma se ha obtenido utilizando una columna de fase inversa y como fase móvil metanol:agua (50:50, v/v). El detector utilizado fue un UV-visible a 254 nm ¿Cuál (es) pueden (en) ser la (s) causas (s) de la forma no Gaussiana del pico?

- a Excesiva interacción con la fase estacionaria
- b Escasa fuerza eluotrópica de la fase móvil
- c El tamaño de la celda del detector no es el adecuado
- d Excesiva cantidad de muestra

29. ¿Podría cuantificar un pico que tuviera $k' = 0$ ¿Por qué?

30. Una pre-columna:

- a Es una columna rellena de sílice y situada antes del inyector
- b Se utiliza para evitar la disolución de la fase estacionaria
- c Está rellena de la misma fase estacionaria que la columna analítica
- d Debe tener 2,5 veces la longitud de la columna analítica

31. Una columna de guarda es:

- a Una funda para guardar columnas sin usar
- b Una columna rellena de fase estacionaria dispuesta antes de la columna analítica para evitar la disolución y deterioro de ésta
- c Una columna corta, de la misma fase estacionaria que la columna analítica y colocada entre el inyector y ésta
- d Una columna como las demás pero más barata

32. Una muestra de un ácido débil tiene un pK_a de 4,3. Si queremos aumentar su retención sobre una columna de octadecil sílice ¿Qué deberíamos hacer?

- a Aumentar el contenido de agua en la fase móvil
- b Tamponar a $pH = 4,3$ la fase móvil
- c Tamponar a $pH = 2,5$ la fase móvil
- d Tamponar a $pH = 6,0$ la fase móvil

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Dal Nogare, S. y Chiu, J. 1962. A study of the performance of packed Gas Chromatography columns. *Analytical Chemistry*, 34: 890-896.

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.

Giddings, J. C. 1965. *Dynamics of Chromatography. Part. I: Principles and Theory*. (Chromatographic Science Series, vol.1). Marcel Dekker, New York.

Horváth. Cs., Lin, H.J. 1976. Movement and band spreading of unadsorbed solutes in liquids chromatography. *Journal of Chromatography*, 126: 401-420.

Knox, J. H. 1977. Practical aspects of LC theory. *Journal of Chromatographic Science*, 15: 352-364.

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.
- Martin, A. J. P. y Synge, R. L. M. 1941. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*, 35: 1358–1360.
- 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.
- Miyabe, K. 2007. New moment equations for chromatography using various stationary phases of different structural characteristics. *Analytical Chemistry*, 79: 7457-7472.
- 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.
- Tswett, M. 1906. Fiziko-khimicheskoe stroenie khlorofil. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24: 384-393.
- van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J. y Klinkenberg, A. 1956. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of non ideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, 5: 271-289.

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.