

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

Parte I.

Introducción y práctica de laboratorio: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter

**María Estrella Legaz González. Mara Sacristán San Cristóbal.
Eva María Díaz Peña. Borja Alarcón Aguares. Carlos Vicente Córdoba.**

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología.
Universidad Complutense de Madrid. Avenida José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid. España.
melegaz@bio.ucm.es marasacristan@bio.ucm.es
evam.diaz@bio.ucm.es borjaestremera@hotmail.com cvicente@bio.ucm.es

Resumen: En el presente curso de HPLC se plantean tres prácticas de laboratorio, de la más fácil a la más compleja, publicadas en tres partes en las que el alumno trata de resolver los problemas iniciales que cualquier investigador debe plantearse a la hora de realizar un análisis cromatográfico. En la primera práctica: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter (Parte I), se calcula el flujo de fase móvil óptimo, coincidente con la menor altura equivalente de plato teórico. En la segunda práctica: análisis cuantitativo básico (Parte II), se estudia la respuesta del detector en función de la masa de analito inyectada. La obtención de ecuaciones, por regresión lineal, permite el cálculo de masas desconocidas de analitos inyectados cuando se interpola en las mismas. La tercera práctica: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil (Parte III), trata de resolver la separación de una muestra patrón de seis sustancias, de naturaleza semejante, en sus componentes individuales. Para ello se realizan separaciones con fases móviles isocráticas o en gradiente. El curso se completa con una serie de cuestiones teórico-prácticas (Parte IV), elaboradas a partir de separaciones reales en las que el alumno debe discutir las posibles respuestas a las preguntas que se formulan.

Palabras clave: Fase estacionaria. Fase móvil. Columna analítica. Analito. HPLC. Eficiencia. Platos teóricos. Tiempo de retención. Masa inyectada. Análisis en gradiente. Análisis isocrático.

PRESENTACIÓN

El origen y la base de este curso fue la asignatura que la Prof. Legaz impartió como curso de Doctorado en la Facultad de Biología de la UCM bajo el título de “Fitoquímica Experimental”, después denominada “Análisis Fitoquímico: Cromatografía y Técnicas Afines”, con una duración de 75h, desde 1983 a 2006, veintitrés años consecutivos.

Con las ampliaciones y adaptaciones necesarias para la finalidad que perseguía, la Prof. Legaz impartió el curso de “Especialización de Instrumentación en Tecnología Ambiental: Cromatografía de Gases y Líquidos y Espectrometría de masas”, durante 5 años académicos, con una duración de 90h, en el Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA) de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1986 a 1991. Cuando este Centro estableció su Master Universitario bianual en Ciencias Ambientales, pionero de los Masters Complutenses, este mismo curso fue impartido entre 1992 y 1994.

A requerimiento de diferentes Universidades Iberoamericanas, se hicieron modificaciones del curso, de acuerdo con las necesidades de cada Centro y fue impartido:

- En la Universidad de La Habana (Cuba) en Junio de 1988, con el título de “I Curso de Postgrado "Cromatografía de Gases y Líquidos”.
- En la Universidad de La Habana (Cuba) en Octubre de 1989, con el título de “IV Curso Internacional de Postgrado: Curso Teórico-Práctico sobre Cromatografía Líquida de Alta Resolución”, en colaboración con el Instituto de Investigaciones Nucleares.
- En la Universidade Federal da Paraíba (Pb, Brasil) en Mayo de 1988, con el título de “II Curso de Postgrado "Curso Internacional do Cromatografía Líquida de Alta Pressao (HPLC)”, aprobado por el Conselho Superior de Ensino (Resolução No 023/88).
- En el Laboratorio de Tecnología Farmacêutica de la Universidade Federal da Paraíba (Pb, Brasil) en Septiembre de 1991, con el título de “V Curso Internacional Teórico-Práctico de Cromatografía de Alta Resolução”.
- En el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina), en Marzo de 1989, con el título de “III Curso Teórico-Práctico sobre Cromatografía Líquida de Alta Resolución”.
- En el Departamento de Botânica, Centro de Ciencias Biológicas, de la Universidad Federal de Pernambuco (PE, Brasil) en Noviembre de 1993, con el título de “VI Curso Internacional de HPLC e bases teóricas de Electroforese Capilar”.
- En el Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional

Autónoma de México en Diciembre de 1993, con el título de “VII Curso Teórico-Práctico: Cromatografía Líquida de Alta Presión de Biomoléculas con bases teóricas de Electroforesis Capilar”.

- Y, finalmente, en la Universidade de Tiradentes (Aracaju, SE, Brasil), en Marzo de 2010, con el título de “VIII Curso teórico-Práctico sobre Cromatografía Líquida de Alta Resolución”.

Desgloses de este curso han sido módulos de enseñanza en el Colegio Oficial de Biólogos (Delegación de Madrid), impartándose el “Curso Electroforesis Capilar, Nivel I”, en Diciembre de 1996, el “Curso HPLC, Nivel I”, en Abril de 1998 y el curso “Electroforesis Capilar, Nivel I”, en Mayo de 1998.

En resumen, las diferentes versiones, modificaciones y actualizaciones de este curso han constituido Curso de Doctorado (23 años), asignatura de Master (7 años), curso Internacional de Postgrado (8 años) y cursos de iniciación (3 años). Parte de la experiencia adquirida durante este largo periodo de docencia teórico-práctica constituye el núcleo fundamental de estas páginas.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El término cromatografía deriva de las palabras griegas “chroma” (color) y “graphein” (escribir), aludiendo a que los pigmentos vegetales separados originalmente por Mikhail Semenovitch Tswett se ponen de manifiesto como bandas coloreadas. No obstante, el mismo Tswett indicó (Tswett, 1906) que también podían separarse sustancias incoloras por el mismo procedimiento. Sin duda, la cromatografía es uno de los métodos de separación más poderosos que se hayan descubierto. La I.U.P.A.C. la define como:

"Un método utilizado inicialmente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido sobre un soporte sólido, o un gel. La fase estacionaria puede estar contenida en una columna, extendida en forma de capa o dispuesta en forma de película. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida".

La cromatografía es una técnica cuyo campo de aplicación se extiende a todas las áreas de investigación, Química, Bioquímica o Biología, entre otras, aplicándose a escala macro o micro.

Los métodos cromatográficos se clasifican atendiendo a la naturaleza de la fase móvil (gas o líquido), de la fase estacionaria (líquido o sólido), del soporte utilizado (columna, papel o placa), del mecanismo de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico o permeación en gel) e incluso del tipo de soluto (iones, proteínas,

polímeros, etc.). En cromatografía líquida, utilizando como mecanismo de separación el reparto, cuando la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil el sistema se denomina fase reversa y, por tanto, los analitos polares tienen menos afinidad por la fase estacionaria que los apolares, eluyendo en primer lugar. Este sistema es el utilizado en la mayoría de las separaciones líquido-líquido de alta resolución (HPLC) y el que se empleará en las tres prácticas propuestas. El mecanismo de separación será, principalmente, el reparto, por lo que los solutos se repartirán entre una fase estacionaria líquida y apolar y una fase móvil también líquida, más polar que la anterior, si bien no se descarta una cierta adsorción. En cualquier caso, la separación se produce porque las moléculas de soluto se distribuyen entre las dos fases en función de su solubilidad relativa en cada una de ellas. En su desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico, los solutos se mueven a diferentes velocidades, dependiendo de su afinidad por la fase estacionaria respecto a la fase móvil. Cada analito, por tanto, se distribuirá entre ambas fases según un equilibrio caracterizado por una constante denominada “constante de distribución”, “coeficiente de distribución” o “coeficiente de reparto” (K). Para un soluto, s,

$$K_s = [s_s]/[s_m]$$

donde, $[s_s]$ es la concentración de soluto, s, en fase estacionaria y $[s_m]$ es la concentración de soluto, s, en fase móvil. Cuanto mayor sea el valor de K, mayor será la afinidad del soluto por la fase estacionaria y, por tanto, menor la velocidad de desplazamiento a través de la columna. La concentración de cada analito, medida a la salida de la columna mediante un sistema de detección, se representa en función del volumen de la fase móvil o del tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra, obteniéndose una gráfica denominada cromatograma que contiene diferentes picos, cada uno de los cuales se corresponde con un analito diferente.

Cuanto mayor sea el tiempo de permanencia de un soluto en la columna, mayor será su coeficiente de reparto y más ancho será el pico representado en el cromatograma. El porqué del ensanchamiento de los picos y la optimización del sistema cromatográfico para evitar este fenómeno en la medida de lo posible, será tratado en la [Práctica 1: “Cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter”](#) (ver Parte I).

Aunque la cromatografía es uno de los métodos de separación por excelencia, también es posible su empleo en análisis cualitativo (aplicando sistemas de detección específicos como espectrómetros de masas, infrarrojos o resonancia magnética nuclear, entre otros) y, sobre todo, cuantitativo. Las aplicaciones cuantitativas de la cromatografía en columna, como la que se propone, se basan en la comparación de la altura o el área del pico del analito, obtenido en el cromatograma, con respecto a los patrones de concentración conocida. Normalmente se utiliza la medida del área del pico, ya que la mayoría de los sistemas cromatográficos modernos están acoplados a sistemas de integración eléctricos mediante “softwares” específicos que permiten este cálculo. En sistemas cromatográficos que utilizan detectores ultravioleta, la respuesta de éstos depende de la absorptividad de los correspondientes analitos, por lo que

normalmente se utilizan los denominados factores de respuesta. El cálculo de estos factores, así como la cuantificación basada en la construcción de rectas de calibrado será objeto de la [Práctica 2: “Análisis cuantitativo básico”](#) (ver Parte II).

El fin último que persigue la cromatografía, como se ha comentado ampliamente, es la separación. En un sistema cromatográfico, empleando como mecanismo de separación el reparto y con una fase estacionaria determinada apolar, la única posibilidad que se nos ofrece para optimizar el sistema, sin modificar la temperatura, es variar la fase móvil, bien modificando su velocidad o su composición.

Si la composición de la fase móvil no varía durante el análisis, se habla de “sistema de fase móvil isocrático”, mientras que si ésta varía durante la elución, se denomina “sistema de fase móvil en gradiente”. La variación de la composición puede ser lineal, cóncava o convexa en sus múltiples formas (respecto al porcentaje de disolvente principal en el otro u otros) en el tiempo. Los sistemas de fase móvil isocráticos se utilizan cuando el número de analitos de la muestra problema no es demasiado grande, mientras que si éste es elevado, para conseguir condiciones óptimas de separación se debe recurrir a sistemas de fase móvil en gradiente. En estos casos puede ocurrir que se consigan buenas condiciones para la separación de algunos analitos pero que esto vaya en detrimento de otros. El objetivo de la [Práctica 3: “Optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil”](#) (ver Parte III) es justamente éste, tratar de buscar el gradiente de fase móvil adecuado que permita la separación de todos los compuestos en el menor tiempo de análisis y con la máxima eficiencia.

Como colofón a esta segunda parte del curso de HPLC, se proponen “[Cuestiones Teórico-Prácticas](#)” (ver Parte IV), en las cuales se piden posibles respuestas a unos supuestos prácticos obtenidos de separaciones reales, que el alumno deberá discutir. La experiencia a lo largo de todos estos años en los que el curso se ha venido impartiendo a diferentes niveles, nos dice que éstas constituyen un complemento indispensable de las prácticas de laboratorio.

PRÁCTICA DE LABORATORIO

CÁLCULO DE LA EFICIENCIA Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ECUACIÓN DE van DEEMTER

Resumen: En la práctica que se plantea, el alumno calcula diferentes parámetros cromatográficos sobre el pico de ácido *p*-hidroxibenzoico, según el flujo de fase móvil empleado, entre 0,2 y 1 mL·min⁻¹. Se realiza la representación gráfica de la ecuación de van Deemter (altura equivalente de plato teórico (H) frente a flujo de fase móvil), con objeto de precisar el mínimo de la curva. La máxima eficiencia del pico se corresponde con el flujo de fase móvil que proporciona el mínimo valor de H.

Palabras clave: analito. Columna analítica. Eficiencia fase estacionaria. Fase móvil. HPLC. Platos teóricos. Tiempo de retención.

INTRODUCCIÓN

La mayor o menor retención de los analitos de una muestra en la fase estacionaria depende de las correspondientes afinidades de éstos. Estas afinidades, a su vez, dependen de diversos factores entre los que cabe mencionar: interacciones iónicas entre especies de carga opuesta, interacciones de van der Waals, del tipo dipolo-dipolo o dipolo-dipolo inducido, interacciones por fuerzas de dispersión o formación de enlaces de hidrógeno.

La banda cromatográfica, expresada en forma de picos en el cromatograma, cuando es "ideal" muestra una gran semejanza con las curvas de error normal o Gaussianas que se pueden atribuir a la combinación aditiva de los movimientos aleatorios de las numerosas moléculas de soluto durante el proceso. Mientras sucede el desplazamiento por el interior de la columna cromatográfica, un analito experimenta miles de transferencias entre las fases móvil y estacionaria. El tiempo que pasa en cada una es muy irregular y depende de que gane accidentalmente suficiente energía térmica del medio para que se produzca la transferencia. Dado que la molécula sólo eluye cuando reside en la fase móvil, su migración a través de la columna es muy irregular. Unas moléculas se desplazan con rapidez y otras se retrasan debido a que se retienen mayor tiempo que el promedio en la fase estacionaria. La consecuencia de estos procesos individuales aleatorios es una dispersión simétrica de las velocidades alrededor del valor medio, originándose un pico Gaussiano en el que casi el 96% del área se encuentra dentro del intervalo comprendido entre más y menos dos veces la desviación estándar alrededor del máximo (Fig. 1 A).

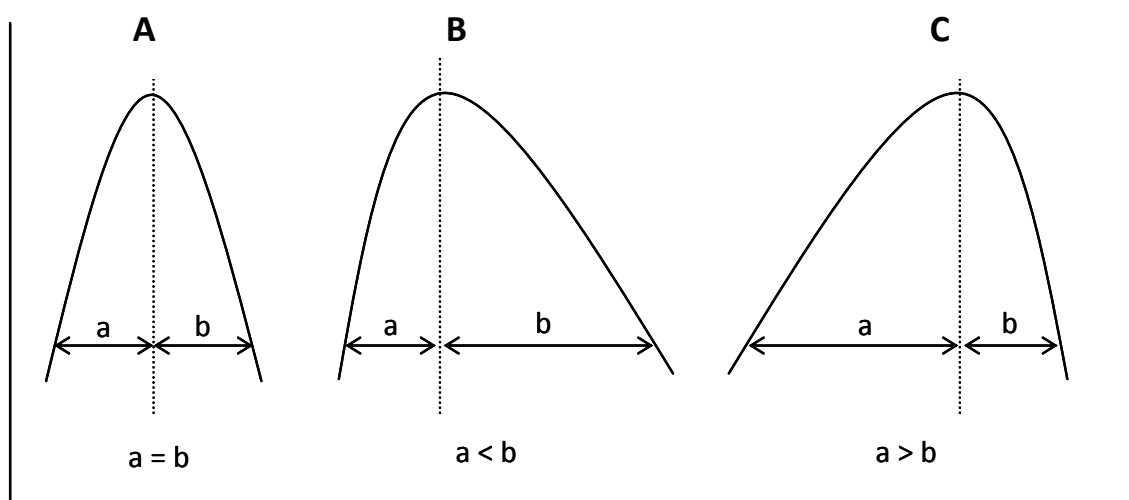


Figura 1. Forma de los picos cromatográficos. A, pico Gaussiano ideal con $\omega_b=4\sigma$. B, pico con "tailing". C, pico con "fronting".

Sin embargo, no siempre sucede así y los picos pueden presentar distintas formas. Por ejemplo, cuando se produce retención excesiva del soluto en la fase estacionaria, debido a multitud de causas, se habla del fenómeno "tailing" (Fig. 1 B), mientras que si existen problemas físicos en el interior de la columna que distorsionan la trayectoria de paso, se habla del fenómeno "fronting" (Fig. 1 C), hechos que se comentarán más adelante cuando se trate la triangulación de los picos.

La anchura de una banda cromatográfica aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre dentro de ella, mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello, la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna e inversamente con la velocidad a la que eluye la fase móvil.

Desde el descubrimiento de la cromatografía se han propuesto diferentes teorías para explicar el modelo cromatográfico. Una de las más conocidas es la "Teoría de platos", propuesta por Martin y Synge en 1941 que, aunque antigua, permite describir de forma sencilla la separación.

Teoría de platos

La teoría de platos consiste en considerar la columna cromatográfica compuesta de un número de zonas adyacentes en cada una de las cuales hay suficiente espacio para que un analito esté en equilibrio entre las dos fases. Cada una de estas zonas se denomina "plato teórico" (de los que hay N en cada columna de longitud, L). Es importante recordar que, aunque los platos no existen realmente sino que son producto de la imaginación, nos ayudan a comprender el proceso. Su significado proviene de la teoría de platos descrita para explicar el fenómeno de la destilación fraccionada o de la extracción en contracorriente.

La longitud de una columna contiene una HETP (altura equivalente de plato teórico), H, expresada en unidades de longitud, normalmente μm . El valor numérico de N y H, para cada columna en particular, es propio de cada analito. H está relacionada con la anchura del pico del analito y la distancia que recorre dentro de la columna, X, de tal manera que:

$$H = \sigma^2 / X \quad \text{*, del inglés, High Equivalent to a Theoretical Plate}$$

donde, σ , es la desviación estándar del pico Gaussiano. Para los picos Gaussianos simétricos, la anchura en la base (ω_b) es igual a 4σ y la anchura del pico en el punto de inflexión, $\omega_{1/2}$, es igual a 2σ . Por tanto, el valor de H puede ser calculado desde el cromatograma midiendo la anchura del pico. El número de platos teóricos en la columna entera viene dado por:

$$N = L/H = L X / \sigma^2$$

donde, L, es la longitud de la columna.

Si consideramos la posición del pico a $X=L$ con el hecho de que la anchura del pico en su base es ω_b , obtenida de las tangentes dibujadas desde los dos puntos con más pendiente del pico,

$\omega_b = 4 \sigma$ la ecuación anterior se convierte por tanto en:

$$N = 16 L^2 / \omega_b^2$$

Si en lugar de medir L y ω_b en unidades de longitud, se hace en unidades de tiempo, la ecuación queda

$$N = 16 (t_R / \omega_b)^2$$

Si dividimos la longitud de la columna, L , por el valor de HETP, H , se obtiene el número de platos en la columna

$$N = L/H$$

La eficiencia de una columna para separar solutos depende del número de platos teóricos (N). A mayor valor de N , mejor es la separación. Para una columna de longitud dada, la eficiencia de la separación (es decir, el número de transferencias del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria) será tanto mejor cuanto menor sea la altura equivalente de plato teórico (HETP o H).

La teoría de platos explica satisfactoriamente la forma de los picos cromatográficos pero falla al intentar justificar el ensanchamiento de los mismos. En las expresiones consideradas hasta el momento, sólo se ha tenido en cuenta la naturaleza del soluto y de las fases móvil y estacionaria para alcanzar los sucesivos equilibrios. Sin embargo, la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria con una cierta velocidad. Por tanto, el movimiento del soluto no puede ser completamente descrito en términos de equilibrio pues se estaría suponiendo que el equilibrio se alcanza de forma infinitamente rápida. Por tanto, es de suponer que la velocidad de la fase móvil debe tener incidencia en el avance de los solutos, su dispersión y, por tanto, en la eficiencia de la separación.

Teoría cinética

La teoría cinética considera que el ensanchamiento de las bandas cromatográficas (picos) es una consecuencia de que el desplazamiento del soluto a lo largo de la columna ocurre a velocidad finita. La forma de las bandas, por tanto, es afectada por la velocidad de elución y depende de los siguientes factores:

Término A. Difusión turbulenta o en remolino o Difusión de Eddy. Es debida a las múltiples trayectorias seguidas por la fase móvil. Al ser columnas empaquetadas con diferentes tamaños y formas de partículas, éstas se asientan de manera irregular por lo

que la trayectoria seguida por la fase móvil puede ser múltiple. El término A es independiente de la velocidad de la fase móvil,

$$A = \lambda dp$$

donde, λ , es una constante que depende de las dimensiones, geometría y uniformidad del empaquetamiento de la columna y dp es el diámetro medio de las partículas de fase estacionaria.

Término B/u. Difusión longitudinal del soluto a lo largo de la columna. Es debido a la tortuosidad de los canales en las columnas empaquetadas y el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase móvil. Se produce como consecuencia de que la concentración de soluto es menor en los bordes de la banda que en el centro y, entonces, el soluto tiende a difundir hacia los bordes de la zona. Cuanto menor es la velocidad lineal media de la fase móvil, mayor es el ensanchamiento. Este término suele ser despreciable en cromatografía líquida, siendo

$$B = 2 \gamma D_m$$

donde, γ , es un factor de impedimento que depende de las características del relleno de la columna (0,7 para columnas de relleno) y D_m el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase móvil.

Término Cu. Resistencia a la transferencia de masa. Es debido al lento equilibrio del soluto entre las fases móvil y estacionaria. Las columnas cromatográficas siempre trabajan alejadas del equilibrio entre las dos fases. El término C se descompone en dos, C_s y C_m , según se considere la transferencia de masa en la fase estacionaria y móvil, respectivamente.

$$C_s = d_f^2/D_s$$

donde, d_f , es el espesor de la película y D_s el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase estacionaria.

$$C_m = dp^2/D_m$$

donde, dp , es el diámetro de la partícula y D_m el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase móvil.

Esta influencia de la fase móvil en el ensanchamiento de banda y, por tanto, en la eficiencia queda reflejado en la primera ecuación cinética, formulada por van Deemter quién la desarrolló para columnas empaquetadas en cromatografía de gases (van Deemter *et al.*, 1956).

$$H = A + B/u + C u \quad \text{Ecuación de van Deemter}$$

donde $u = L/t_M$, en $(\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$, siendo L, la longitud de la columna.

Posteriormente, Giddings (1965) elaboró su propia ecuación, basada en la anterior pero con discrepancia en cuanto a la descripción de las propiedades de dispersión de la fase móvil, considerando que la difusión de Eddy y la resistencia a la transferencia de masa debían ser tratadas de forma dependiente.

$$H = [A/1 + (E/u)] + B/u + C u \quad \text{Ecuación de Giddings}$$

Horvath y Lin (1976) y Knox (1977) también elaboraron sus propias teorías. Recientemente, Miyabe (2007) formula las nuevas ecuaciones del momento utilizando fases estacionarias de diferentes características estructurales.

La Fig. 2 muestra la representación gráfica, determinada experimentalmente, de HETP (H) en función de la velocidad lineal media de fase móvil (u), para cromatografía de gases y de líquidos. En el inserto de la Fig. 2 se muestra la contribución de los tres términos explicados anteriormente, A, B y C que contribuyen al ensanchamiento de banda.

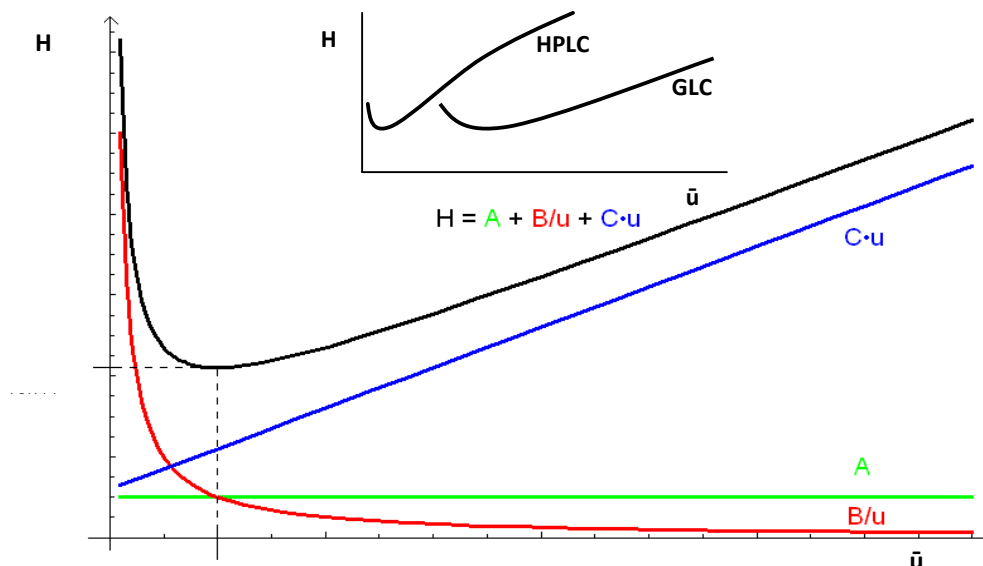


Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de van Deemter. En el inserto, las diferencias existentes entre Cromatografía Gas-Líquido (GLC) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

En las dos curvas, para cromatografía de gases (GLC) y de líquidos (HPLC), existe un valor mínimo de H para una velocidad de fase móvil determinada (condición óptima de trabajo). En cromatografía de gases, las separaciones se hacen normalmente cerca del punto óptimo. Sin embargo, en cromatografía de líquidos, normalmente se trabaja a velocidades medias superiores al mínimo valor de H, con objeto de reducir el tiempo de análisis. En la práctica, la representación de van Deemter se determina experimentalmente utilizando valores de tiempos de retención y anchuras de pico, con objeto de obtener valores de N y H a distintas velocidades de fase móvil.

Existen además otros factores extra-columna que también contribuyen al ensanchamiento de la banda cromatográfica, como son el sistema de inyección de muestra y los volúmenes muertos de los diferentes tubos de conexión, que no son objeto de estudio en este momento.

En resumen, a la hora de obtener alto valor de eficiencia en una separación cromatográfica determinada, habría que trabajar con pequeños diámetros de partícula (d_p), con empaquetamientos uniformes (λ), con capas finas de fase estacionaria (d_f), de baja viscosidad, a temperaturas elevadas, minimizando los volúmenes muertos de las conexiones y aplicando la muestra en una zona lo más estrecha posible en la cabeza de la columna.

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

Se calculará el flujo óptimo de la fase móvil, (en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), con objeto de obtener la máxima eficiencia (mayor número de platos teóricos o mínimo valor de HETP) en el análisis del ácido *p*-hidroxibenzoico utilizando una concentración del mismo de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se realizarán las siguientes representaciones gráficas:

1. Curva de van Deemter. HETP (H) frente a flujo de fase móvil (u), en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).
2. Presión en cabeza de columna (P), en (bar), frente a flujo de fase móvil (u), en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).
3. Tiempo de retención (t_R) del ácido *p*-hidroxibenzoico, en (min) y (mm), frente a flujo de fase móvil (u), en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).
4. Tiempo de retención (t_R) del ácido *p*-hidroxibenzoico, en (min) y (mm) frente a presión (P), en (bar).
5. Respuesta del detector (cuentas de área) frente a anchura de pico en la base (ω_b), en mm y frente a flujo de fase móvil (u), en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).
6. Tiempo de retención (t_R) del ácido *p*-hidroxibenzoico, en (min) frente a anchura de pico en la base (ω_b), en (mm).
7. Eficiencia del pico, medida como número de platos teóricos (N), frente a respuesta del detector en (cuentas de área) y frente a anchura de pico en la base (ω_b), en (mm).

Para realizar la representación de van Deemter, es necesario calcular primero el valor del número de platos teóricos (N) y el de HETP (H) en cada condición de flujo de fase móvil y, para ello, triangular el pico. La triangulación del pico se hace prolongando la línea base y después trazando las tangentes al punto de inflexión, según el esquema

que se presenta en la Fig. 3. El triángulo formado tiene una base que es la porción de la línea base intersectada por las tangentes dibujadas en el pico y una altura desde esta base hasta el punto de corte con las tangentes. De esta manera se obtiene el valor de la anchura en la base ($\omega_b=4\sigma$) y a media altura ($\omega_{1/2}=2,35\sigma$). Mediante esta representación, también se calcula la altura del pico (h), desde el punto de corte de las tangentes hasta la anchura en la base. La altura a media anchura ($h_{1/2}$) es justo la mitad del valor de h .

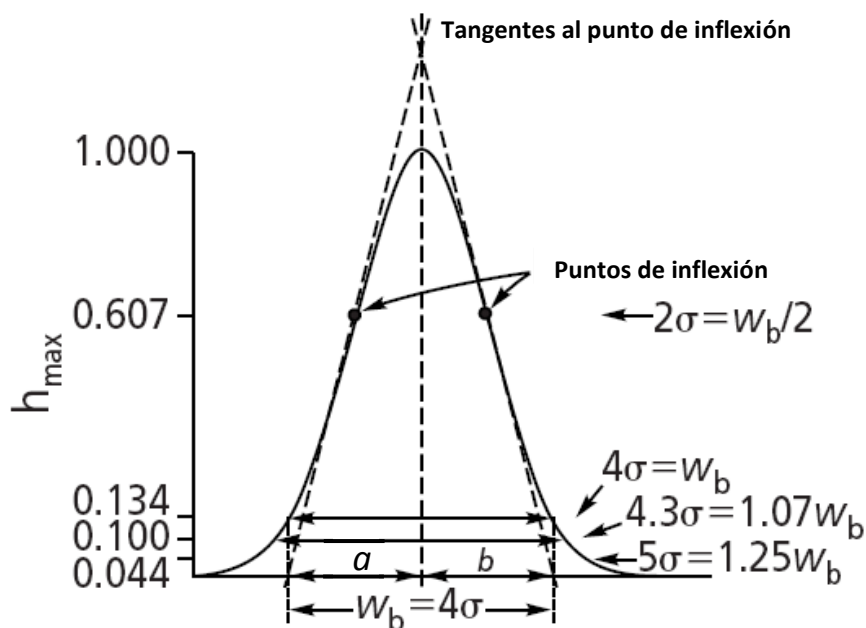


Figura 3. Esquema de triangulación de un pico Gaussiano, indicando los valores de la anchura (ω) a diferentes alturas.

La anchura en la base, (ω_b), está dividida en dos partes por la perpendicular trazada desde el punto de corte de las tangentes, la parte izquierda (a) y la derecha (b), de forma que ($\omega_b = 4\sigma = a + b$). En el caso de un pico Gaussiano simétrico (Fig. 1 A), $a=b$. Si el pico es asimétrico (Figs. 1 A y 1 B), $a \neq b$. En el caso de pico con "tailing" (Fig. 1 B), $a < b$ y en el caso de pico con "fronting" (Fig. 1 C), $a > b$. Según la definición de Dal Nogare y Chiu (1962), el factor de asimetría (A_s) se expresa como:

$$(A_s) = (a+b)/2a$$

Para un pico Gaussiano, $A_s = 1$, para un pico con "tailing", $A_s > 1$ y para un pico con "fronting", $A_s < 1$.

Una vez realizada la triangulación del pico en cada condición de flujo de fase móvil, se calcularán los siguientes parámetros cromatográficos:

1. Tiempo de retención (t_R), en (mm) y en (min).
2. Altura de pico (h'), en (mm).
3. Altura de pico a media altura ($h'_{1/2}$), en (mm).
4. Ancho del pico en la base (ω_b), en (mm).
5. Ancho del pico a media altura ($\omega_{1/2}$), en (mm).
6. Número de platos teóricos (N).
7. Altura equivalente de plato teórico (H).
8. Altura reducida de plato teórico (h).

A continuación se detallan las fórmulas matemáticas que nos permiten el cálculo de dichos parámetros, así como diferentes unidades de expresión de la presión y la conversión entre ellas.

FÓRMULAS MATEMÁTICAS PARA EL CÁLCULO DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

1. **Tiempo de retención, t_R (min) o (mm)**. Es el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la detección del máximo número de moléculas de cada soluto.

2. **Tiempo muerto, t_M (min) o (mm)**. Es el tiempo requerido para que eluya un compuesto no retenido por la columna. También se conoce como tiempo cero o tiempo de retención del disolvente.

3. **Tiempo de retención corregido, t'_R (min) o (mm)**. Representa el tiempo que el soluto pasa "absorbido" dentro del empaquetamiento de la columna.

$$t'_R = t_R - t_M$$

4. **Factor de capacidad, k' (adimensional)**. Representa el número de moléculas que, en el equilibrio, pasan a la fase estacionaria respecto a las que permanecen en la fase móvil. También se denomina relación de capacidad o factor de retención.

$$k' = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M$$

5. **Selectividad, α (adimensional)**. Determina la separación entre picos y representa una relación de la retención relativa de dos compuestos que eluyen uno a continuación del otro. Un valor de α igual a 1 representa tiempos de retención iguales y por lo tanto no existe separación. Un número más grande representa una columna más selectiva. Cuanto más alejado de "1", mayor separación.

$$\alpha_{2:1} = (t_R - t_M)_2 / (t_R - t_M)_1 = t'_{R2} / t'_{R1}$$

6. **Resolución, R_s (adimensional)**. Es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos. Un valor de 1,5 representa una separación hasta la línea base de ambos picos y un valor de 1,0 representa una resolución del 90%. En algunos casos esto es

suficiente para los cálculos del área de los picos (análisis cuantitativo). Valores de $R_s < 1$ indican solapamiento; valores de $R_s \geq 1$ indican separación. Existen diferentes expresiones para calcular la resolución; las más utilizadas son las siguientes:

$$R_s = (\sqrt{N} / 4) (\alpha / \alpha - 1) (k'_2 / 1 + k'_2)$$

$$R_s = (2\Delta t_R) / (\omega_{b1} + \omega_{b2})$$

$$R_s = (\sqrt{N} / 2) [(k'_2 - k'_1) / (k'_2 + k'_1 + 2)]$$

$$R_s = (\sqrt{N} / 2) [(V'_{R,2} - V'_{R,1}) / (V'_{R,2} + V'_{R,1})]$$

7. Número de platos teóricos, eficiencia, N (adimensional). Es la longitud de columna requerida para que se establezca un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. Es una medida estimada de la agudeza del pico y es característico de cada soluto en cada sistema cromatográfico.

$$N = 16 (t_R / \omega_b)^2 \approx 5,54 (t_R / \omega_{1/2})^2$$

8. Número de platos efectivos, eficiencia, N_{eff} (adimensional). Considerando t'_R en lugar de t_R .

$$N_{\text{eff}} = 16 (t'_R / \omega_b)^2 \approx 5,54 (t'_R / \omega_{1/2})^2$$

9. Altura equivalente de plato teórico, H (mm). Es la distancia que separa dos platos consecutivos o, dicho de otra manera, el largo de columna requerido por un plato teórico.

$$H = L / N$$

L = longitud de la columna (mm)

10. Altura efectiva de plato teórico, H_{eff} (mm). Considerando N_{eff} en lugar de N.

$$H_{\text{eff}} = L / N_{\text{eff}}$$

11. Altura reducida de plato teórico, h (adimensional). Es la distancia que separa dos platos consecutivos en función del diámetro de partícula.

$$h = H / dp$$

dp = diámetro de partícula (mm)

12. Altura reducida efectiva de plato teórico, h_{eff} (adimensional). Considerando H_{eff} en lugar de H.

$$h_{\text{eff}} = H_{\text{eff}} / dp$$

13. Sección de la columna, s (mm^2).

$$s = \pi r^2$$

donde, r , es el radio de la columna.

La presión en cabeza de columna no debe exceder el límite impuesto por el fabricante. Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del flujo de fase móvil empleado, la presión puede alcanzar diferentes valores. Es conveniente fijar en el equipo, antes de empezar a trabajar, los límites de presión inferior y superior que no deben ser excedidos. Se detalla a continuación la conversión entre unidades de presión ya que, dependiendo del equipo cromatográfico pueden ser unas u otras.

UNIDADES DE PRESIÓN

1 MPa = $1 \cdot 10^6$ Pa = 10 bar.

1 Pa = $1 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$ = $1 \cdot 10^{-5}$ bar.

1 bar = $1 \cdot 10^5$ Pa = 0,9869 atm = 14,5038 lb·pul⁻² = 1,0197 kg·cm⁻² = 0,1 MPa.

1 psi = 1 lb·pul⁻² = 0,06895 bar = 0,06805 atm.

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 μL .

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 μm .

Diámetro interno (di): 4,6 mm.

Temperatura. 25°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: de 0,2 mL·min⁻¹ a 1,0 mL·min⁻¹.

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

Longitud de onda de análisis: 256 nm (según el máximo de absorbancia obtenido en el espectro de absorbancia).

Rango (UAFE): 0,005 unidades.

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

Muestra empleada. Ácido *p*-hidroxibenzoico (M.M.=138,1).

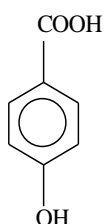


Figura 4. Fórmula estructural del ácido *p*-hidroxibenzoico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se procede a realizar el espectro de absorbancia de la muestra que vamos a emplear, el ácido *p*-hidroxibenzoico, disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v), con objeto de adecuar la longitud de onda de análisis. En la Fig. 5 se muestra dicho espectro, donde se observa un pico de densidad óptica máxima a 256 nm.

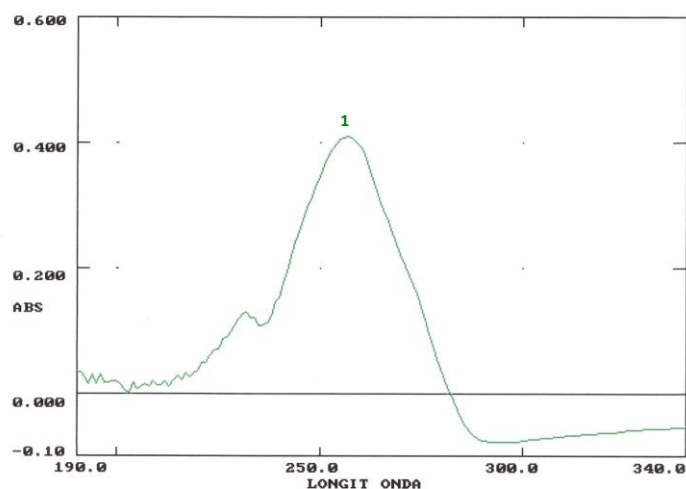


Figura 5. Espectro de absorbancia del ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración de 5 µg·mL⁻¹ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, el número 1 representa el máximo principal de absorción a 256 nm.

Una vez seleccionado el máximo de absorbancia o, por lo menos, el entorno de longitudes de onda que muestran una cierta absorbancia, se procede a inyectar la muestra, ácido *p*-hidroxibenzoico, a una concentración fija de 0,05 mg·mL⁻¹, empleando diferentes flujos de fase móvil, entre 0,2 y 1,0 mL·min⁻¹. En las siguientes Figs. (6, 8, 10, 12 y 14) se muestran los cromatogramas obtenidos en cada una de las condiciones. Después de cada una de estas Figs., aparece la Tabla que muestra el porcentaje y las cuentas de área de cada pico (Tablas 1, 2, 3, 4 y 5). Con objeto de poder realizar la triangulación del pico mayoritario, ácido *p*-hidroxibenzoico, se obtiene un cromatograma ampliado, copia del original pero con mayor aumento. Las Figuras 7, 9, 11, 13 y 15 muestran estas ampliaciones en las cuales, 1 min equivale a 33,5 mm., de tal manera que el alumno pueda triangular directamente los picos sobre las Figuras.

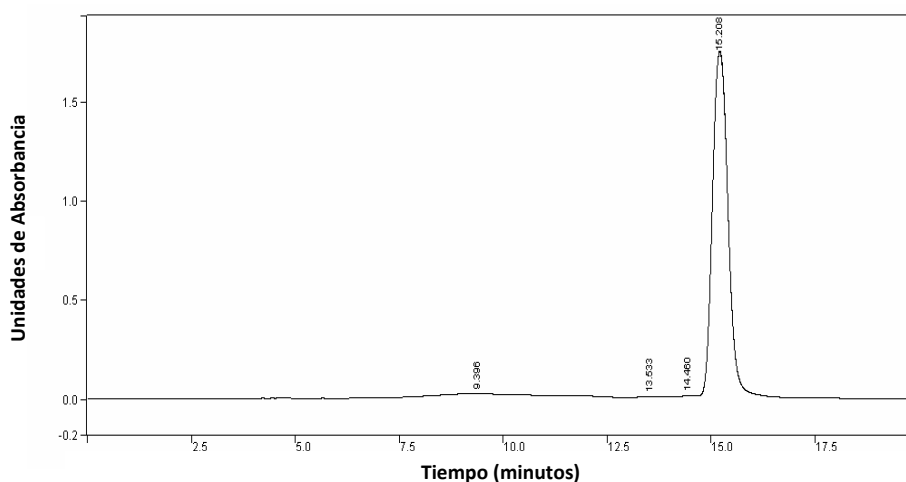


Figura 6. Cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ con un flujo de fase móvil 0,2 mL·min⁻¹.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	10,46	9,39	56,56
2	1,2	13,53	6,51
3	0,93	14,46	5,01
4	87,4	15,21	472,42

Tabla 1. Resultados del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ y un flujo de fase móvil 0,2 mL·min⁻¹.

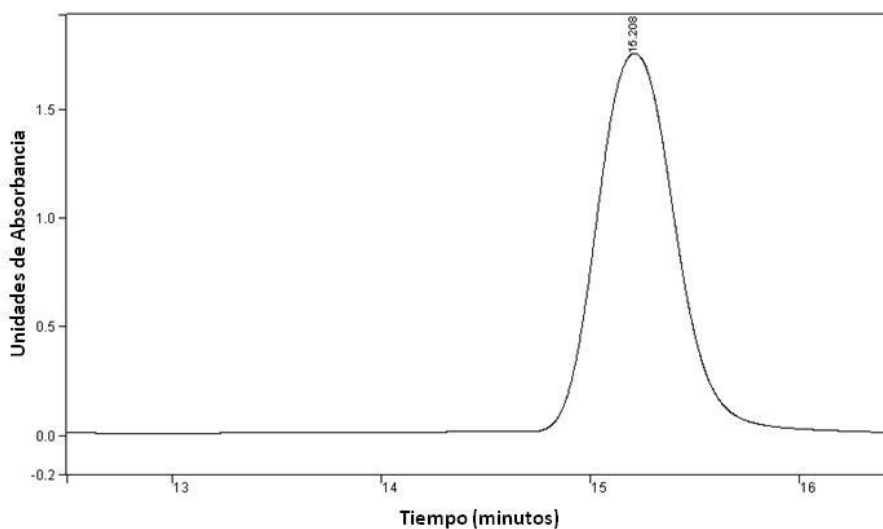


Figura 7. Ampliación del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ y un flujo de fase móvil 0,2 mL·min⁻¹.

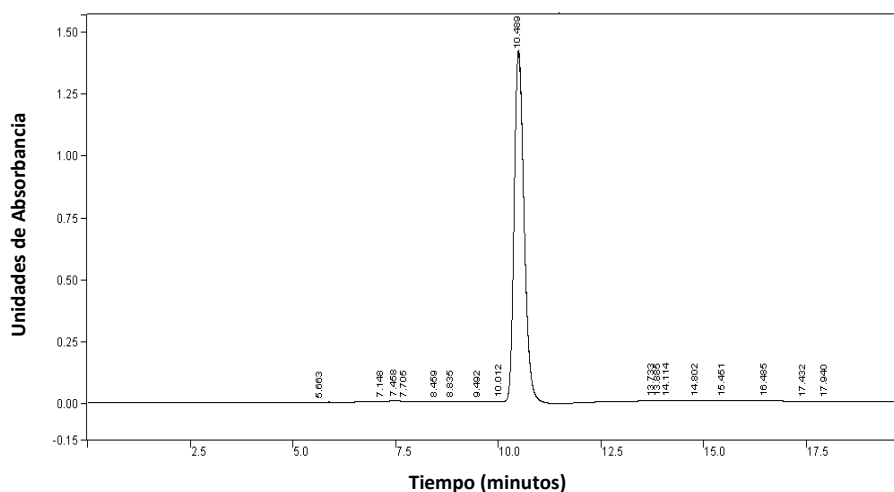


Figura 8. Cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ con un flujo de fase móvil 0,4 mL·min⁻¹.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	1,01	8,49	2,88
2	1,15	8,83	3,27
3	85,16	10,49	241,61
4	2,91	13,73	8,28

Tabla 2. Resultados del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ y un flujo de fase móvil 0,4 mL·min⁻¹.

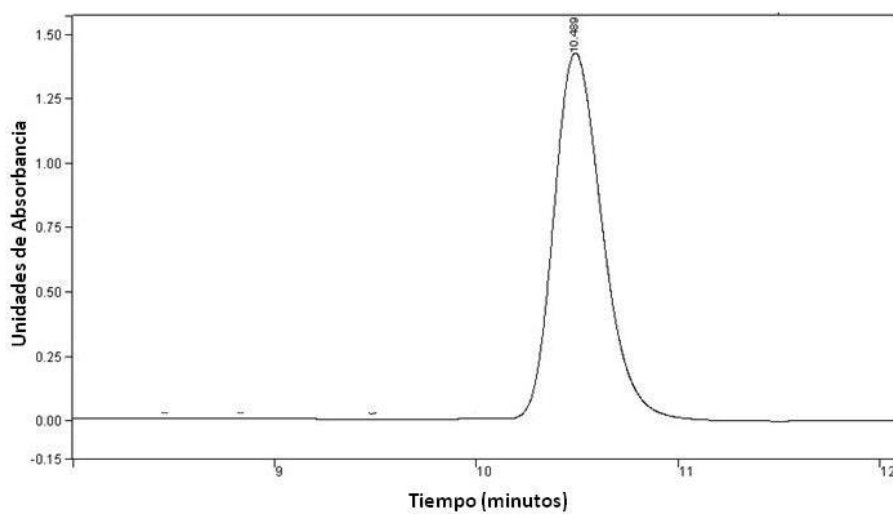


Figura 9. Ampliación del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ y un flujo de fase móvil 0,4 mL·min⁻¹.

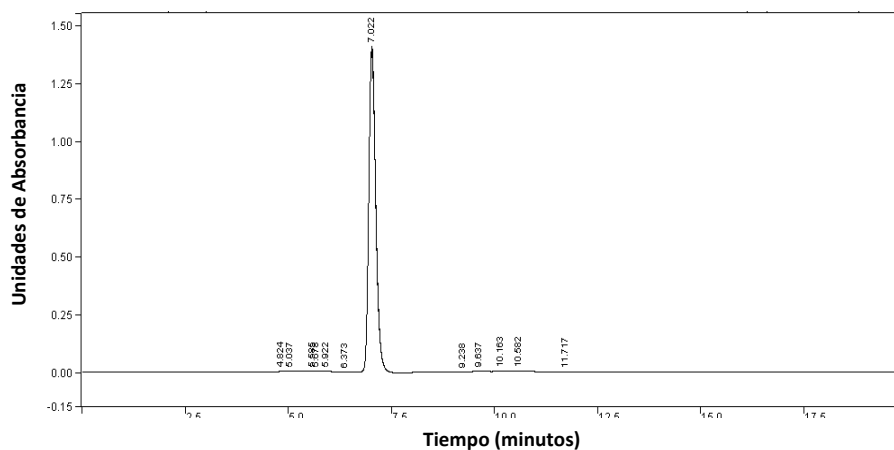


Figura 10. Cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ con un flujo de fase móvil 0,6 mL·min⁻¹.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	1,05	5,04	1,92
2	90,15	7,02	165,05
3	1,59	9,24	2,9
4	2,82	10,58	5,15

Tabla 3. Resultados del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración 0,05 mg·mL⁻¹ y un flujo de fase móvil 0,6 mL·min⁻¹.

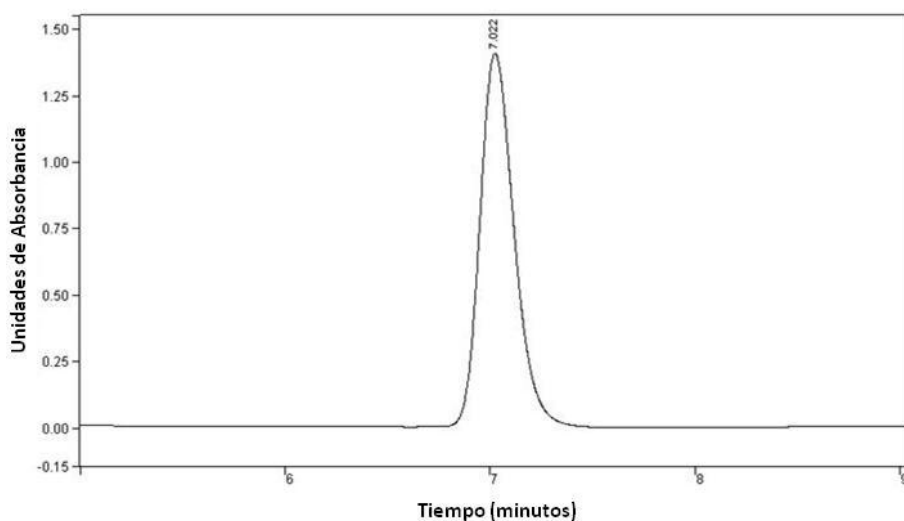


Figura 11. Ampliación del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un flujo de fase móvil $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

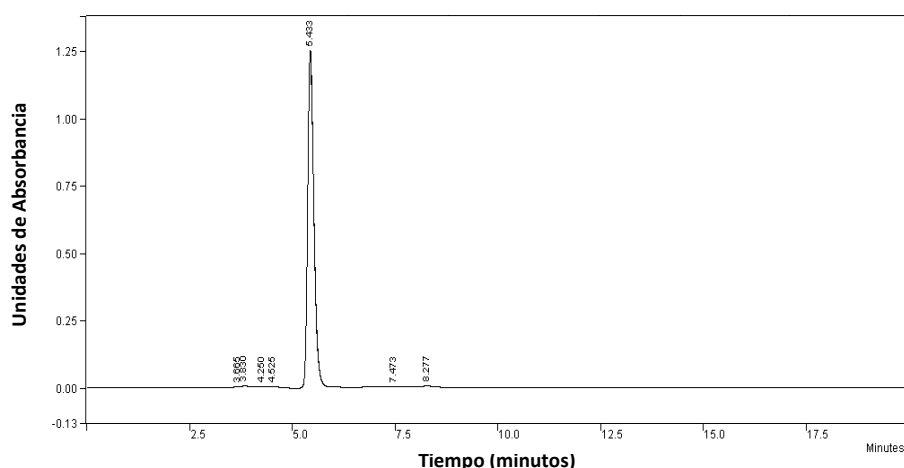


Figura 12. Cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un flujo de fase móvil $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	1,19	3,83	1,64
2	1,06	4,52	1,47
3	95,49	5,43	131,78
4	0,73	8,28	1,01

Tabla 4. Resultados del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un flujo de fase móvil $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

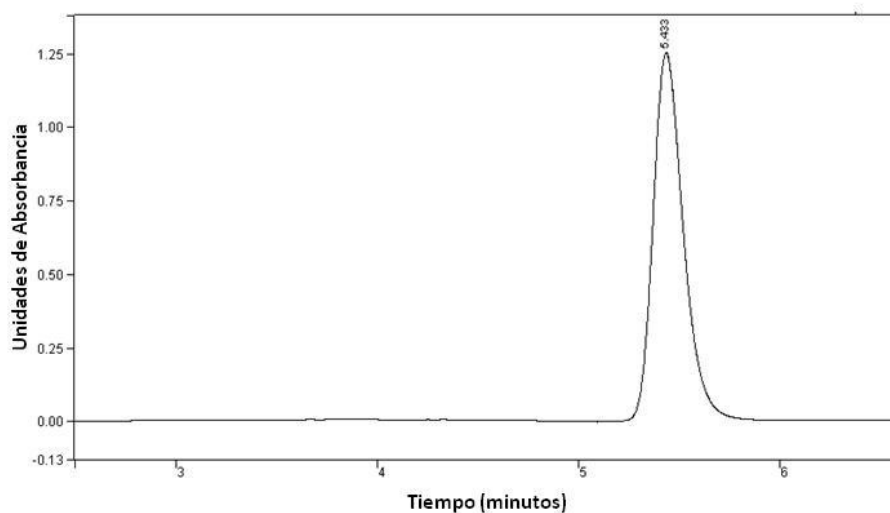


Figura 13. Ampliación del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un flujo de fase móvil $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

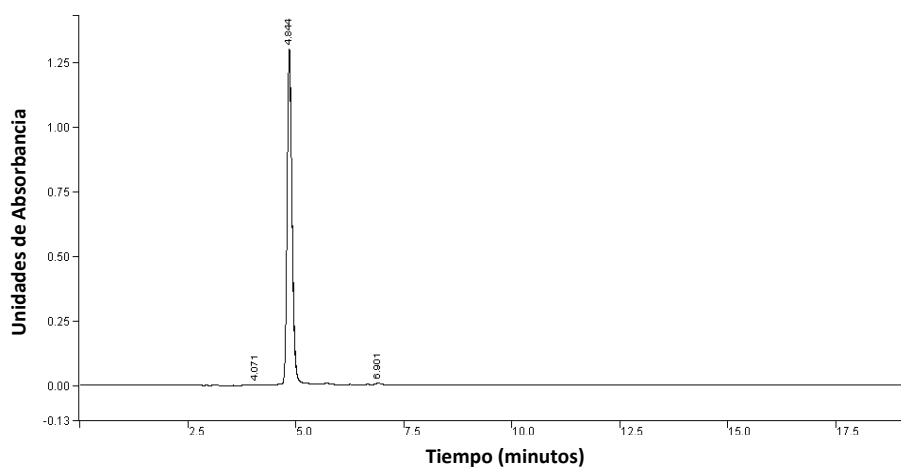


Figura 14. Cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un flujo de fase móvil $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	0,8	4,07	0,85
2	98,64	4,84	104,61
3	0,55	6,9	0,59
4	0,8	4,07	0,85

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

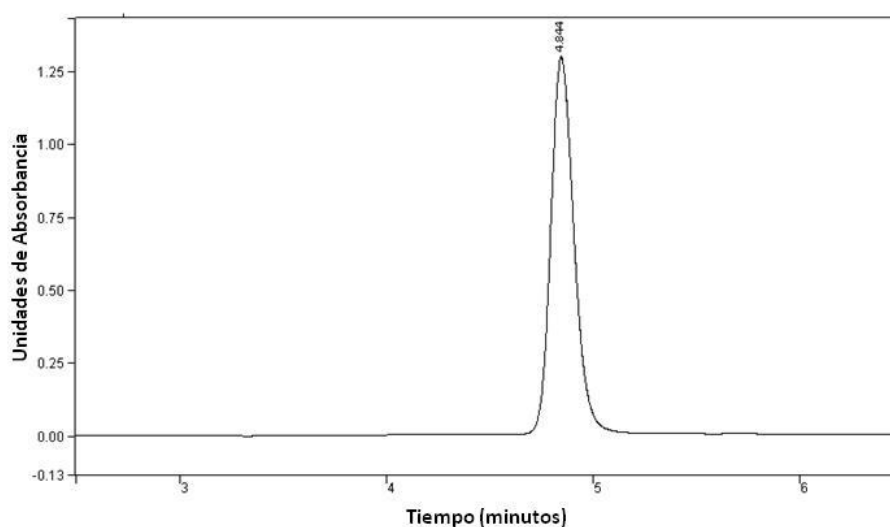


Figura 15. Ampliación del cromatograma de ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un flujo de fase móvil $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Una vez triangulado el pico del ácido *p*-hidroxibenzoico en los cromatogramas ampliados obtenidos con cada flujo de fase móvil, se procede al cálculo matemático de *N* y *H*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

F ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	P (bar)	t_R (min)	t_R (mm)	h' (mm)	$h'_{1/2}$ (mm)	ω_0 (mm)	$\omega_{1/2}$ (mm)	N (adim)	H (μm)	h (adim)	Cuentas de area ($\times 10^6$)
0,2	63	15,21	524,68	76,5	38,25	24	12	10.590	23,6	4,72	472,42
0,4	103	10,59	351,38	67	33,5	15	8	10.687	23,4	4,68	241,61
0,6	141	7,02	235,2	70,5	35,25	11	5	12.265	20,4	4,07	165,05
0,8	175	5,43	179,29	68,5	34,25	9,5	4,7	8.061	31	6,2	131,78
1	219	4,84	162,67	64,5	32,25	7	4	9.117	27,4	5,48	104,61

Tabla 6. Cálculo matemático de algunos de los parámetros cromatográficos que influyen en la eficiencia del pico, obtenida mediante el sistema de triangulación de picos, en los cromatogramas ampliados.

Nota importante. Los valores que se muestran en la Tabla 6, se han obtenido como resultado de la triangulación de cada uno de los picos de ácido *p*-hidroxibenzoico en las diferentes velocidades de fase móvil, una vez ampliado el cromatograma (Figs. 7, 9, 11, 13 y 15), para mayor comodidad en el tratamiento de las medidas. Cualquier alteración de la imagen que pudiera modificar estas medidas, repercutiría en los resultados. Se recomienda, por tanto, que la impresión en papel se haga conservando el tamaño del cromatograma.

Con los resultados obtenidos, se procede a realizar las diferentes representaciones gráficas:

1. Curva de van Deemter. HETP (*H*) frente a flujo de fase móvil (*u*), en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

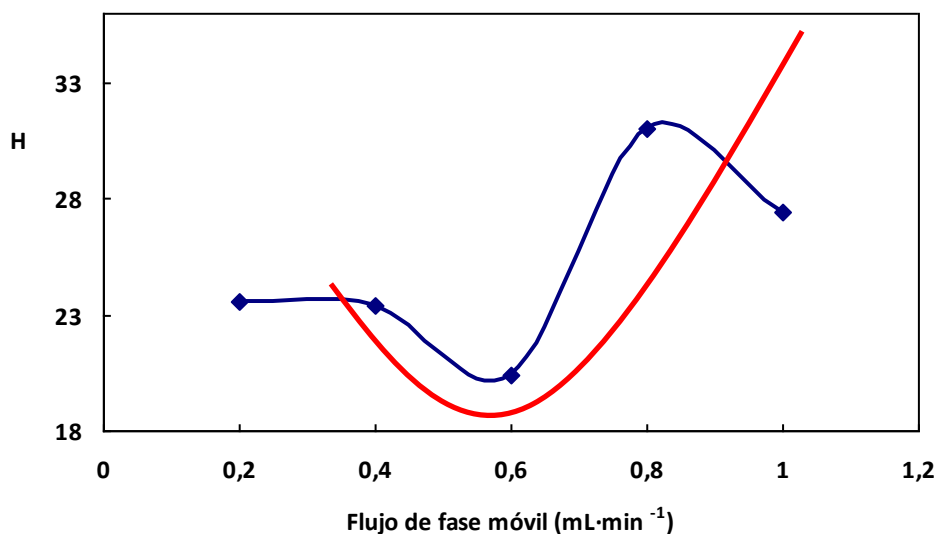


Figura 16. Representación gráfica de la ecuación de van Deemter.

Según se observa en la Fig. 16, la máxima eficiencia (menor valor de H y mayor valor de N) para la separación de ácido *p*-hidroxibenzoico, en las condiciones experimentales descritas, se alcanza a valores de flujo de fase móvil de 0,6 mL·min⁻¹. Ya se ha comentado que, por razones de ahorro de tiempo y disolvente, se suele trabajar a valores un poco más altos. Los valores en color azul corresponden a los datos experimentales sin ajustar; la curva en color rojo representa el mejor ajuste de los datos experimentales obtenidos. Por razones obvias, siempre se expresarán los valores experimentales que se obtengan sin ningún tipo de modificaciones. Los valores experimentales, en la generalidad de los casos, siempre sufren una dispersión que hace que no se ajusten obligatoriamente a las gráficas teóricas. El valor de esta variación experimental es tan necesario y valioso como la exacta interpretación de los mismos. Además, para una práctica de iniciación a la cromatografía, como para cualquier otra técnica, estas desviaciones experimentales tienen un valor psicológico añadido: el alumno que por primera vez realiza la experimentación no debe desmoralizarse si sus datos no proporcionan una “curva perfecta”.

2. Presión en cabeza de columna (P), en (bar), frente a flujo de fase móvil (u), en (mL·min⁻¹).

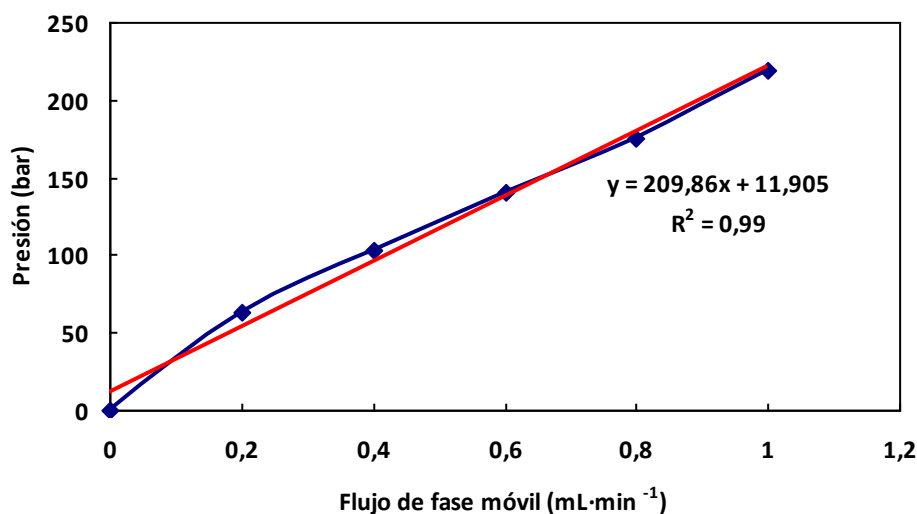


Figura 17. Variación de la presión en cabeza de columna respecto al flujo de fase móvil.

La presión en cabeza de columna es directamente proporcional al flujo de fase móvil, según se muestra en la Fig. 17. En color azul se representan los resultados experimentales. En color rojo se representa la recta, obtenida por regresión lineal, de los datos experimentales. Como puede observarse, los resultados experimentales se ajustan a una recta con un alto valor de coeficiente de regresión, cuya ecuación también se muestra en la Fig. 17.

3. Tiempo de retención (t_R) del ácido *p*-hidroxibenzoico, en (min) y (mm), frente a flujo de fase móvil (u), en (mL·min⁻¹).

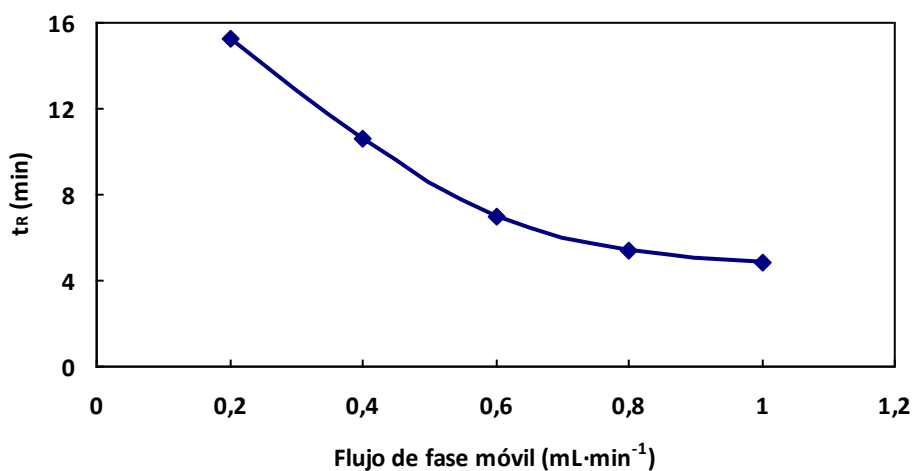


Figura 18. Variación del tiempo de retención (en min) en función del flujo de fase móvil.

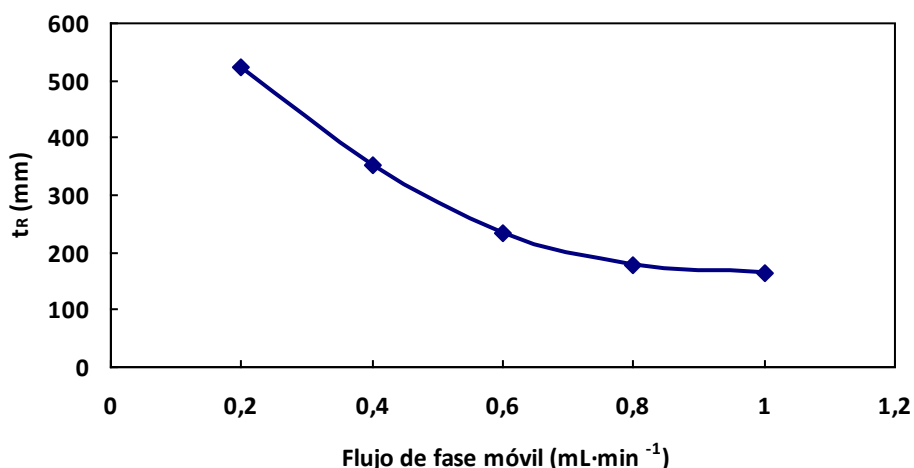


Figura 19. Variación del tiempo de retención (en mm) en función del flujo de fase móvil.

El tiempo de retención, tanto expresado en min (Fig. 18) como en mm (Fig. 19) no es directamente proporcional al flujo de fase móvil, puesto que la retención de un soluto y sus distintos equilibrios entre la fase estacionaria y la fase móvil no sólo dependen de la velocidad de flujo de ésta última sino de muchos más parámetros, según se ha comentado previamente.

4. Tiempo de retención (t_R) del ácido *p*-hidroxibenzoico, en (min) y (mm) frente a presión (P), en (bar).

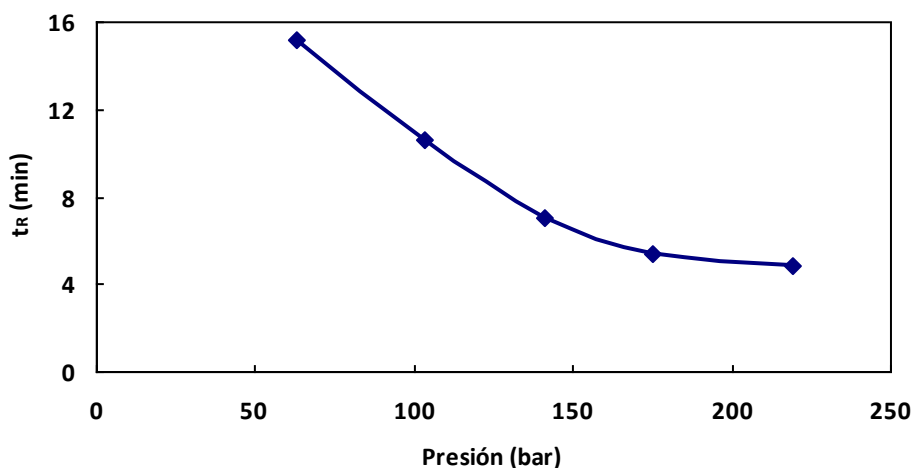


Figura 20. Variación del tiempo de retención (en min) en función de la presión en cabeza de columna.

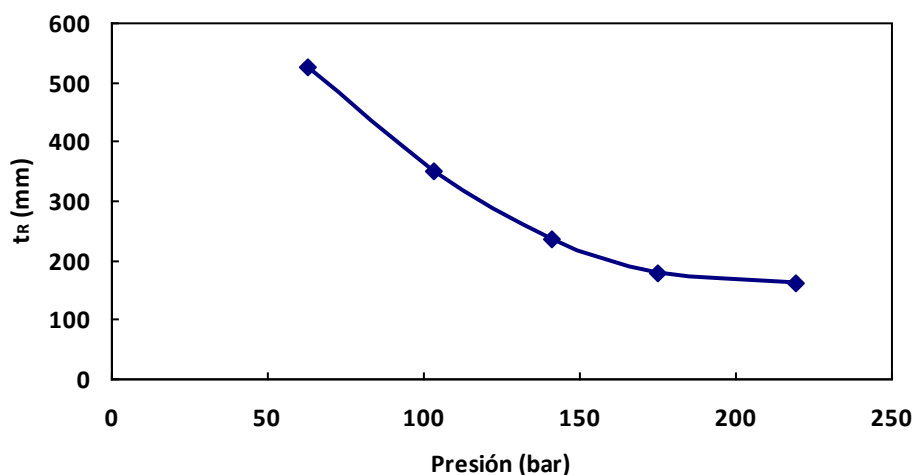


Figura 21. Variación del tiempo de retención (en mm) en función de la presión en cabeza de columna.

Ya que la presión en cabeza de columna y el flujo de fase móvil son directamente proporcionales, según se observó en la Fig.17, la expresión de tiempo de retención, tanto en min (Fig. 20) como en mm (Fig.21), en función de la presión en cabeza de columna, tampoco es directamente proporcional. En la salida de un soluto de la columna intervienen muchos más factores que la mera velocidad de arrastre ocasionada por la fuerza (presión) de la fase móvil.

5. Respuesta del detector (cuentas de área) frente a anchura de pico en la base (w_b), en (mm) y frente a flujo de fase móvil (u), en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

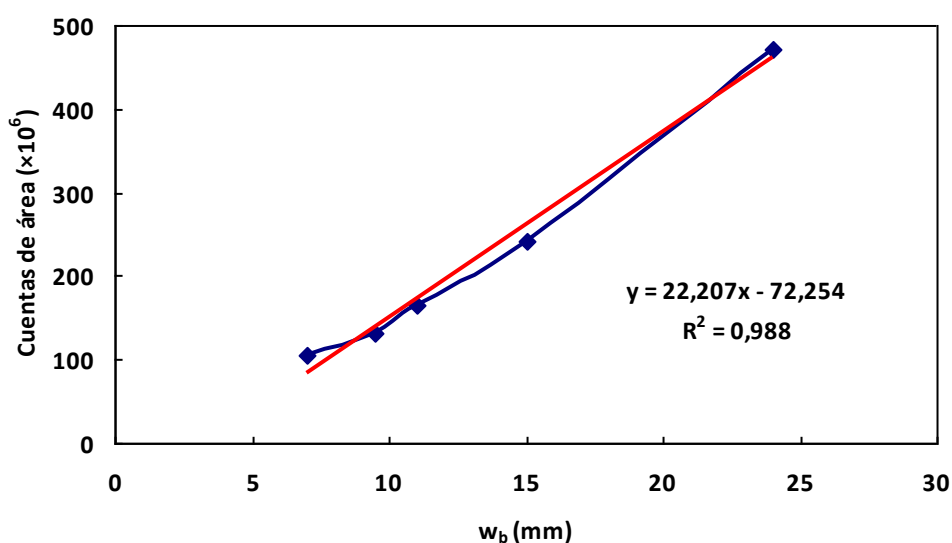


Figura 22. Variación de las cuentas de área en función de la anchura del pico.

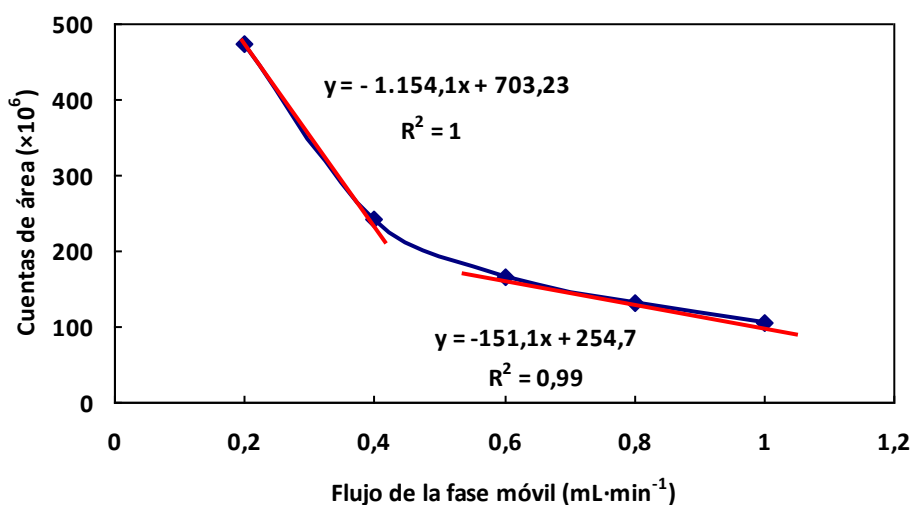


Figura 23. Variación de las cuentas de área en función del flujo de fase móvil.

Las cuentas de área del pico, expresión directa de la respuesta del detector, nos pueden dar una idea de su anchura en la base (ω_b), aunque no siempre suceda así (pensemos en un pico muy alto y ancho en la base pero de alta eficiencia). Según se muestra en la Fig. 22 en color azul, las cuentas de área del pico son directamente proporcionales a su anchura en la base (ω_b); los resultados se ajustan a una recta (representada en color rojo) cuyo coeficiente de regresión está próximo a la unidad. Si observamos más detenidamente, las cuentas de área no varían en exceso para valores de anchura en la base entre 7 y 11 mm pero si lo hacen en mayor proporción para valores de anchura entre 11 y 24 mm. Existe un agrupamiento de tres puntos para los menores valores de anchura y una mayor distancia entre los dos puntos que tienen mayor anchura de pico en la base.

Cuando se representan de forma gráfica las cuentas de área frente al flujo de fase móvil (Fig. 23 en color azul), se observa la misma conducta comentada anteriormente. Esto es, el ensanchamiento de un pico y por tanto el valor de sus cuentas de área aumenta proporcionalmente a medida que disminuye el flujo de fase móvil para valores de éste entre 0,2 y 0,4 mL·min⁻¹. El valor de la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal, representado en la Fig. 23 en color rojo, es de 1.154,1. Para valores de flujo de fase móvil entre 0,6 y 1,0 mL·min⁻¹, el valor de las cuentas de área no varía en la misma proporción que para valores de flujo menores. Los valores a los flujos más altos se ajustan a otra recta cuyo valor de pendiente (151,1) es cien veces menor. De alguna manera se estaría confirmando lo explicado anteriormente y observado en la Fig. 22. Existe un agrupamiento de valores de cuentas de área a velocidades de flujo bajas y de anchura en la base altas por un lado y valores de cuentas de área a velocidades de flujo altas y anchura en la base bajas, por otro. En cualquier caso, las cuentas de área de un pico no son estrictamente proporcionales al flujo de fase móvil ya que en la retención de un soluto no sólo influye éste y el

ensanchamiento de banda no es “estrictamente” proporcional al tiempo de permanencia en la fase estacionaria.

6. Tiempo de retención (t_R) del ácido *p*-hidroxibenzoico, en (min) frente a anchura de pico (w_b), en (mm).

Abundando un poco más en la explicación anterior, cuando analizamos los resultados mostrados en la Fig. 24 se observa lo siguiente. Valores de tiempo de retención altos proporcionan picos de gran anchura, mientras que picos de menor tiempo de retención tienen valores menores de anchura en la base. Los tres valores de la izquierda (tiempos de retención cortos) están más juntos entre sí; los otros dos valores (tiempos de retención mayores) que dan picos más anchos en la base, están más alejados entre sí. En color azul se representan los resultados experimentales sin ningún tipo de ajuste. En color rojo se representa la recta, obtenida mediante regresión lineal, de los datos experimentales. También se puede ver en la Fig. 24 la ecuación de la recta obtenida mediante este procedimiento.

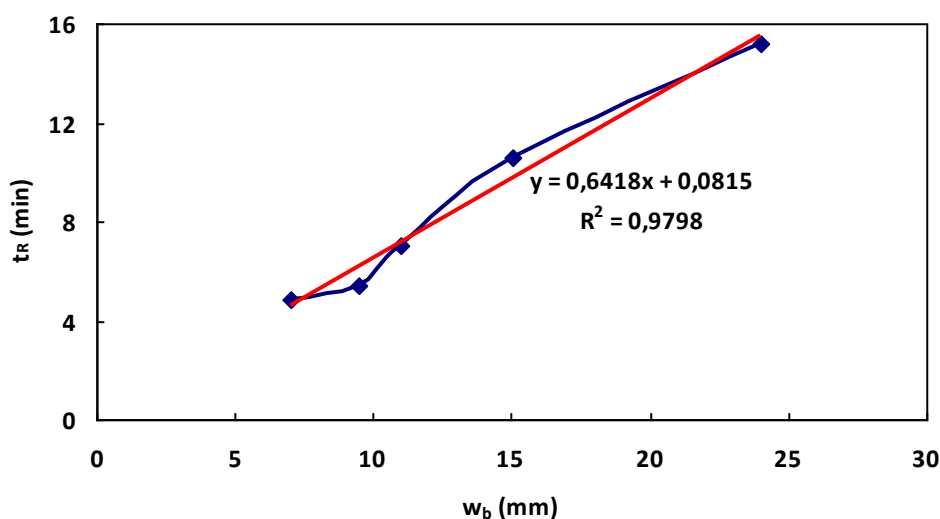


Figura 24. Variación del tiempo de retención en función de la anchura del pico en la base.

7. Eficiencia del pico, medida como número de platos teóricos (N), frente a respuesta del detector en (cuentas de área) y frente a anchura de pico en la base (w_b), en (mm).

La eficiencia, expresada como N, no es proporcional al valor de cuentas de área del pico cromatográfico (Fig. 25 en color azul). Los valores no se ajustan a una recta (representada en color rojo) pues, como se observa, el valor de R^2 es muy bajo. Dicho de forma fácil, la eficiencia de un pico es una conjugación de dos factores que deben caminar juntos, tiempo de retención y anchura en la base; recordemos ahora la expresión de N:

$$N = 16 (t_R / \omega_b)^2$$

Según se mostró en la Fig. 24, aunque proporcionales, no lo son de forma “estricta” el tiempo de retención y la anchura.

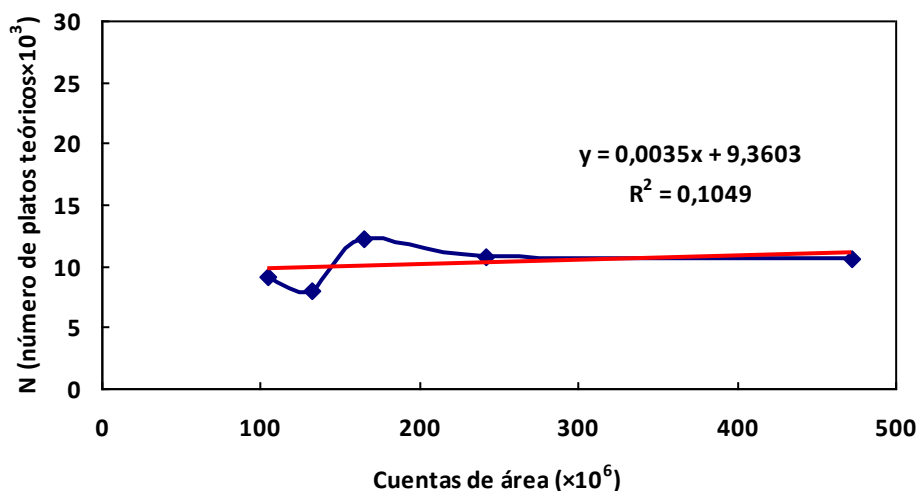


Figura 25. Variación de la eficiencia, expresada como número de platos teóricos (N) en función de las cuentas de área del pico.

También es cierto que la triangulación de picos que hace el “software” no es idéntica en todos los casos y depende mucho de su forma. Aunque las cuentas de área sean una medida de la anchura en la base del pico y en el cálculo de N se utilice la proporción (t_R / ω_b) , la eficiencia no es proporcional a las cuentas de área porque en la eficiencia de un pico intervienen multitud de factores. Baste ahora recordar que la expresión gráfica de la ecuación de van Deemter (Fig. 16), da una curva sigmoidea.

Esta idea también se justifica al observar los resultados mostrados en la Fig. 26. La eficiencia no es función lineal de la anchura de un pico en su base (ω_b), aunque el cromatografista tienda siempre a optimizar las separaciones cromatográficas sobre la base de obtención de picos estrechos.

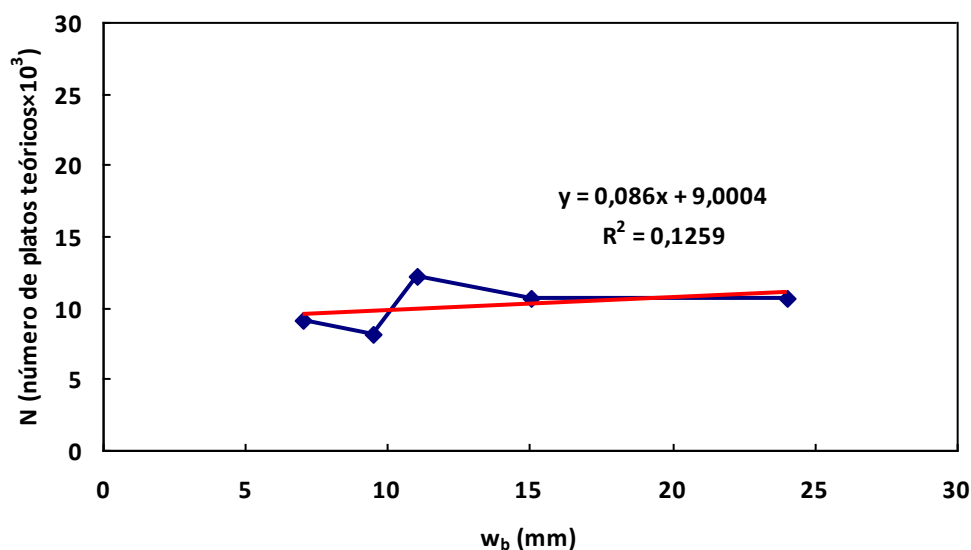


Figura 26. Variación de la eficiencia, expresada como número de platos teóricos (N) en función de la anchura del pico en la base.

El rango de variación en el valor de N oscila entre 8.061 y 12.265, mientras que el valor de w_b oscila entre 7 y 24 mm. Es decir, cuando el valor de área disminuye unas tres veces, el valor de eficiencia no se multiplica por tres.

BIBLIOGRAFÍA

- Dal Nogare, S. y Chiu, J. 1962. A study of the performance of packed Gas Chromatography columns. *Analytical Chemistry*, 34: 890-896.
- 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.
- Martin, A. J. P. y Synge, R. L. M. 1941. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*, 35: 1358-1360.
- Miyabe, K. 2007. New moment equations for chromatography using various stationary phases of different structural characteristics. *Analytical Chemistry*, 79: 7457-7472.

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.

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.

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.

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

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.