

GUIA DE LABORATORIO

**CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)
Y CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)**

Autora: Martha Lucia Ruiz Benitez

Programa académico: Química y Farmacia

Agosto 2020

Universidad Simón Bolívar



PRÁCTICA N° 3
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC) Y
CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Pág. 1 de 7

Fecha vigencia:
Agosto 3/2020

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alto rendimiento o alta resolución y la cromatografía de gases son técnicas mayormente empleadas en las áreas de bioquímica, química y farmacia, toxicología, y química analítica, usadas para separar los componentes de una sustancia, dependiendo de su estabilidad térmica, actividad biológica de los analitos, permitiendo su identificación y posterior cuantificación.

Las técnicas empleadas presentan dos fases: la fase estacionaria y la fase móvil, y dependiendo del tipo de cromatógrafo la fase móvil puede ser o un líquido o un gas; y es de gran importancia el conocimiento de estos equipos ya que mediante estos cromatógrafos pueden detectarse componentes específicos en muestras de interés en el campo científico y en el campo industrial.

2. OBJETIVOS

- ❖ Conocer la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, sus fundamentos y principios.
- ❖ Conocer la técnica de cromatografía de gases, sus fundamentos y principios.
- ❖ Conocer las diferentes técnicas de separación, identificación y cuantificación de sustancias mediante el uso de la cromatografía.

3. MATERIALES

- ❖ Cromatógrafo HPLC
- ❖ Cromatógrafo de gases
- ❖ Muestras
- ❖ Agua
- ❖ Diluyentes
- ❖ Etanol
- ❖ Acetona
- ❖ Acetato de etilo
- ❖ Acetonitrilo



4. FUNDAMENTOS

- **Cromatografía líquida de alto rendimiento (resolución)-HPLC**

La cromatografía líquida de alto rendimiento o de resolución HPLC por sus nombres en inglés *high-performance liquid chromatography* permite la separación de compuestos de una mezcla mediante las interacciones específicas con la fase estacionaria permitiendo el paso, identificación y análisis de los compuestos de las sustancias en estudio (Figura 1). Este tipo de cromatografía es indicada para el análisis de compuestos poco volátiles, iónicos y termolábiles. El HPLC se caracteriza por la utilización de presión, ya que ayuda a incrementar la velocidad de los compuestos dentro de la columna y en consecuencia de esto, este equipo tiende a ser sofisticado y caro en comparación con una cromatografía líquida convencional en columna.

Dentro de sus principales características del HPLC se encuentra su versatilidad ya que este tipo de cromatografía separa macromoléculas, grupos polifuncionales y especies iónicas; también es selectiva y de alto costo, pero efectiva: y dentro de sus aplicaciones se encuentran: el estudio de fármacos (analgésicos, antibióticos, esteroides), estudio de biomoléculas como las proteínas (aminoácidos), carbohidratos, ésteres, estudio de la composición de los productos de alimentación como aditivos, edulcorantes, antioxidantes, estudio de contaminantes como los plaguicidas, estudios de química forense y en la medicina clínica.

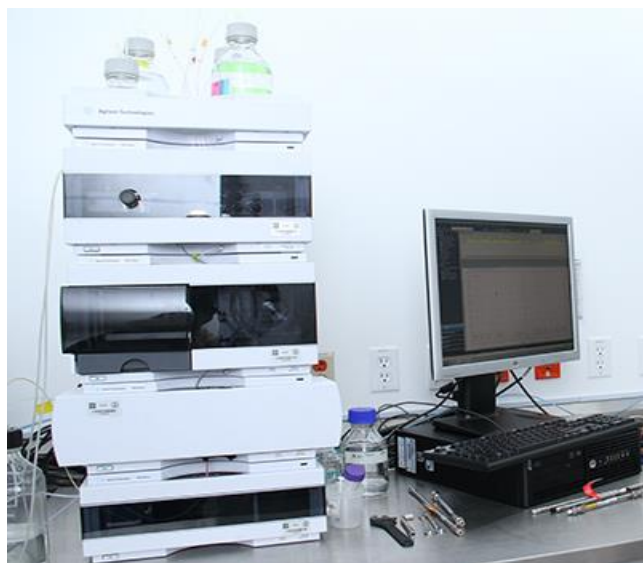


Figura 1. Cromatógrafo HPLC

Fuente de la imagen: Víctor Javier Zaldívar Machorro (Identificación y cuantificación de sustancias por HPLC)



PRÁCTICA N° 3
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC) Y
CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Pág. 3 de 7

Fecha vigencia:
Agosto 3/2020

Las columnas analíticas implementadas son hechas con acero inoxidable con un diametro interno uniforme entre 2 y 60 mm, presentan una longitud entre 5 y 30 cm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3.5 μm y 10 μm .

Los rellenos de estos absorbentes son químicamente inertes, pueden ser de naturaleza hidrófoba o polar y existen en HPLC dos tipos de relleno: el relleno pelicular y de partícula porosa, donde el relleno pelicular consiste en bolas de vidrio o polimero, no porosas, esféricas y que su superficies presenta capas porosa y delgadas de alúmina, sílice o una resina de intercambio iónico; y los rellenos de partículas porosas están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm . El uso de estos rellenos provoca la separación de los componentes a medida que fluyen fuera de la columna y para aumentar la vida de la columna es recomendable el uso de pre-columnas que sirven para eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes y su composición es similar a la columna analítica.

En relación con la fase móvil, ésta consta de reservorios (disolventes), contenidos en recipientes de vidrio y cada recipiente presenta 500 mL de diluyente de alta pureza (grado HPLC), estables, desgasificados, compatibles con la muestra y compatible con el detector utilizado en el equipo, proporcionando transparencia óptica en el caso del uso de detectores de UV. La eficiencia de la separación se aumenta por la utilización de dos o más disolventes (mediante el cambio de la composición de la fase móvil durante el proceso de separación) con una polaridad significativamente distinta, llamada elución con gradiente, en comparación con una separación en que la fase móvil permanece constante durante el estudio de las muestras, llamada elución isocrática.

Por otro lado, el equipo presenta sistemas de bombeo que son capaces de generar altas presiones por encima de 400 atm, donde las bombas reciprocas impulsan el disolvente mediante un movimiento de vaivén y existen válvulas que regulan la entrada y salida del disolvente.

En relación con el sistema de inyección, la muestra debe estar en estado líquido o en solución siendo compatible con la fase móvil, así como también con la fase estacionaria, y normalmente se inyecta entre 5 μL y 10 μL . Esta inyección de la muestra se puede realizar mediante jeringas de alta presión o con el sistema de válvulas inyectoras y los componentes de la muestra se mueven a través de la columna a diferentes velocidades. Posteriormente a eso, el analito que sale de la columna es detectado mediante el detector, el cual permite monitorar los solutos a medida que eluyen, generando una señal eléctrica, en donde los detectores de fluorescencia detectan diversos tipos de compuestos como el tolueno, benceno, fenol, clorobenceno, entre otros y los detectores UV detectan compuestos como bifenilo, antraceno, aminas, insaturaciones alifáticas, entre otros (Figura 2).

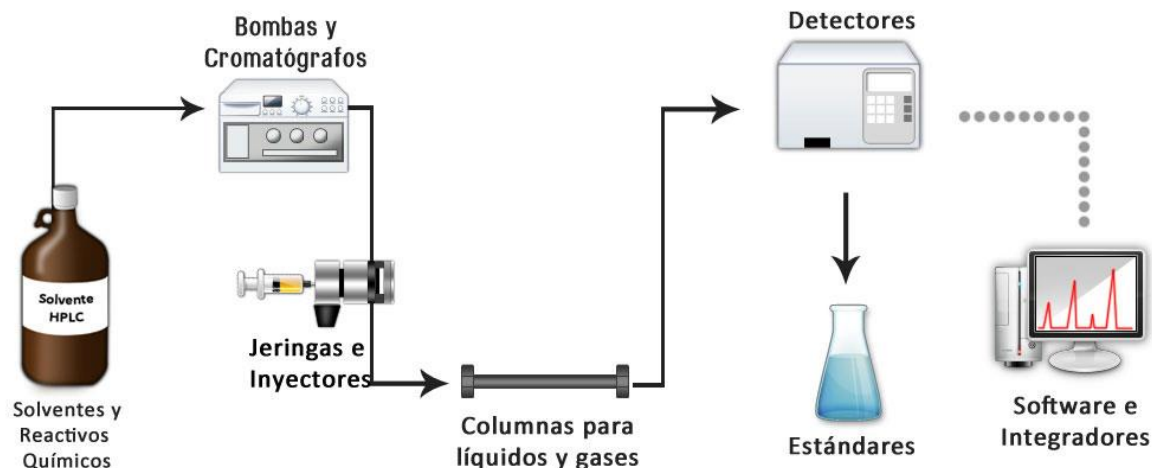


Figura 2. Partes de un cromatógrafo de HPLC

Fuente: cromatografia.com.mx

- **Cromatografía de gases (CG)**

Este tipo de cromatografía consta de un equipo de (a temperaturas de hasta 350-400°C) mediante la distribución de los componentes en dos fases: la fase fija (estacionaria) y la móvil. En este caso, y en comparación con la técnica de HPLC este tipo de cromatografía (CG) usa como fuente móvil un gas inerte cuya función es transportar los componentes de la muestra, permitiendo que éstas fluyan a través de la columna de fase fija.

A parte de la fase móvil y estacionaria esta CG está compuesta por detectores en el cuál evidencian la presencia o ausencia de analitos presentes en una muestra determinada, conociendo así la cantidad separación que permite el análisis de mezclas de sustancias volátiles, semivolátiles y térmicamente estables presente en la muestra de estudio, todo en función con comparaciones de patrones ya conocidos (Figura 3).

Existen dos tipos de cromatografía de gases, está la CGS (Cromatografía de Gas-Sólido) y la CGL (Cromatografía de Gas-Sólido) y la diferencia entre estas es la aplicación de las fases estacionaria y de forma general, la cromatografía de gases tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales, es una técnica rápida en comparación con HPLC.

En relación con las aplicaciones de la cromatografía de gases, esta técnica permite determinar los componentes en el sector de alimentación y de perfumería (verificando sus componentes, su pureza, calidad de los productos, sus fragancias y aromas), en cuantificar la cantidad de gases presentes del efecto invernadero, muy usados en el área de química industrial (derivados de petróleo, análisis de hidrocarburos) y en la biociencia.



PRÁCTICA N° 3
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC) Y
CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Pág. 5 de 7

Fecha vigencia:
Agosto 3/2020

Por otro lado, en las ciencias forenses o criminalísticas, en la industria farmacéutica es muy usado para análisis de calidad, para buscar esas impurezas que pueden estar interfiriendo con la calidad del producto y en el análisis de lotes de medicamentos fabricados



Figura 3. Cromatógrafo de gases (CG)

Fuente de la imagen: <https://www.is-analitica.com/cromatografia-de-gases/cromatografo-de-gases-gc-2010-plus/>

Para el análisis cromatográfico la muestra debe ser volatilizada (mediante el uso de altas presiones de vapor) para su posterior estudio en el cual esta es inyectada en la cabeza de la columna cromatográfica mediante una microjeringa en el cual libera de manera inmediata la muestra (μL). Posteriormente se realiza la elución en el cual la muestra es transportada por un gas inerte en el cual pueden ser usados el nitrógeno, hidrógeno, argón y el más usado es el helio que actúan como fase móvil y que no interacciona con las moléculas del analito, solo cumple la función transportadora del analito y arrastra los componentes de la mezcla. Estos analitos presentes en la muestra pasan por la columna (fase estacionaria) que normalmente presenta 1mm de diámetro y 30 metros de longitud y su fabricación está a base de acero inoxidable, aluminio y cobre. La columna puede tener forma de U o puede estar empacada como una espiral y el uso de las columnas (de su composición) dependen de la polaridad de los componentes que se desean separar y estudiar, si se quiere estudiar una muestra apolar debe escogerse una columna con una fase estacionaria lo menos polar.

Con respecto a la detección de las muestras el detector responde con una señal a la presencia del analito analizado la cual se amplifica y representa a través de un cromatograma. Existen los detectores como los detectores de conductividad térmica (TCD) y el detector de ionización de flama (FID- Flame Ionization Detector) donde este es

mayormente usado y los cromatogramas obtenidos tanto en CG y HPLC se pueden analizar las señales, sus formas y alturas en función del tiempo (Figura 4).

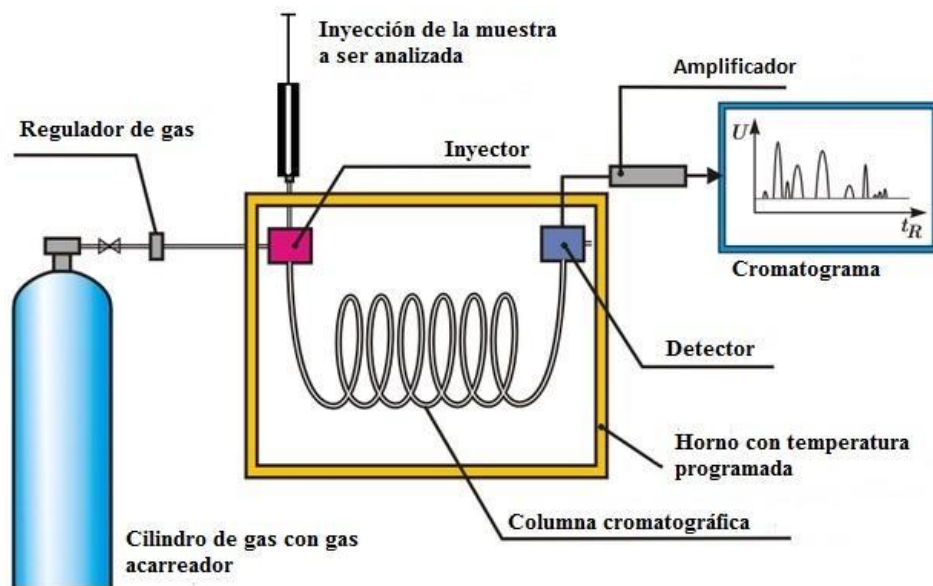


Figura 4. Partes de un cromatógrafo de gases

Fuente: No machine-readable author provided. Dz assumed (based on copyright claims). [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) or CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], via Wikimedia Commons

5. BIBLIOGRAFÍA

- Giraldo, Francisco; Cataño, Carlos; Morales, Gladys; López, Carlos; Galeano, Elkin Determinación de azadirachtina por cromatografía líquida de alta eficiencia. (HPLC) en semillas de árbol de neem (*A. indica*) cultivadas en Colombia. *vitae*, vol. 9, núm. 1, 2002, pp. 59-63.
- Gutiérrez A., Del Rio, J.C., Gonzalez-Villa, F.J. y Martín, F. "Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography". *Journal of chromatography* 1998.
- <https://www.is-analitica.com/cromatografia-de-gases/cromatografo-de-gases-gc-2010-plus/>



PRÁCTICA N° 3
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC) Y
CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Pág. 7 de 7

Fecha vigencia:
Agosto 3/2020

- Koog Douglas A, Holler F. James , Crouch Stanley R. (2008). Principios de Análisis Instrumental. Cengage Learning Editores.
- No machine-readable author provided. Dz assumed (based on copyright claims). GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) or CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>), via Wikimedia Commons).
- Pérez Calderón Ruth. Estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina a en alimentos infantiles instantáneos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Rev Med Exp 2000; 17 (1-4).
- Thet K. & Woo N. (30 de junio de 2018). Gas chromatography. Chemistry LibreTexts. Recuperado de: chem.libretexts.org
- Villarroel G Oriolis. Detección de toxinas paralizante, diarreica y amnésica en mariscos de la xi región por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y bioensayo en ratones. Cienc. Tecnol. Mar, 27 (2): 33-42, 2004.

PREGUNTAS

1. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la cromatografía líquida de alto rendimiento?
2. ¿A que hace referencia la sigla GC-MS y en qué consiste?
3. ¿Qué diferencia hay entre la cromatografía en columna preparativa con la cromatografía por HPLC?