



mr
manual de referencia

ARTE

HPLC INSTRUMENTAL

Adrián García de Marina Bayo
Dolores Julia Yusá Marco

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

HPLC instrumental

Adrián García de Marina Bayo

Dolores Julia Yusá Marco

2016

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Los contenidos de esta publicación han sido evaluados mediante el sistema *doble ciego*, siguiendo el procedimiento que se recoge en:
<http://www.upv.es/entidades/AEUPV/info/891747normalc.html>

Colección *Manual de Referencia*

Primera edición, 2016 (versión impresa)
Primera edición, 2016 (versión electrónica)

© Adrián García de Marina Bayo
Dolores Julia Yusá Marco

© 2016, Editorial Universitat Politècnica de València
distribución: Telf.: 963 877 012 / www.lalibreria.upv.es / Ref.: 6234_11_01_02

ISBN: 978-84-9048-356-5 (versión impresa)

ISBN: 978-84-9048-357-2 (versión electrónica)

Queda prohibida la reproducción, la distribución, la comercialización, la transformación y, en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de la totalidad o de cualquier parte de esta obra sin autorización expresa y por escrito de los autores.

Deseamos expresar nuestro más profundo agradecimiento a todos quienes nos han ayudado en la realización de esta obra, especialmente a Julián de la Mata (*Agilent Technologies*), Jorge Puente (*Perkin Elmer*), Begoña Arribas (*Perkin Elmer*) y Pablo Castillo (*Proquimur S. A., Grupo Biomaster*).

ÍNDICE

PREFACIO.....	3
1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE HPLC	5
2. EL CROMATÓGRAFO DE HPLC	11
3. LA LÍNEA FLUÍDICA.....	15
3.1. Filtros y frits en la línea fluidica.....	22
3.2. Reservorios de fase móvil.....	23
4. SISTEMAS DE BOMBEO Y DE GRADIENTES	25
4.1. Bombas de pistón	26
4.2. Atenuadores de pulsos	54
5. INYECTORES Y AUTOINYECTORES	57
5.1. Aspectos cuantitativos del sistema de inyección	57
5.2. Inyectores manuales.....	59
5.3. Inyectores automáticos.....	62
6. COLUMNAS Y PRECOLUMNAS	67
6.1. La columna cromatográfica.....	67
6.2. Protocolos de chequeo, limpieza y regeneración de columnas	71
6.3. Precolumnas	74
6.4. Optimización y aspectos prácticos de las columnas.....	75
6.5. Verificación, mantenimiento y cebado de columnas.....	77
6.6. Consideraciones de la fase móvil	78
6.7. Equilibrado y acondicionamiento de columnas.....	79
7. DETECTORES DE HPLC	81
7.1. Consideraciones generales	81
7.2. Detectores espectrofotométricos UV-VIS	92
7.3. Detectores diode array.....	109
7.4. Detectores fluorimétricos	117
7.5. Detectores refractométricos.....	126
7.6. Detectores polarimétricos	134
7.7. Detectores láser.....	140
7.8. Detectores electroquímicos	142

7.9. Detectores conductimétricos.....	163
7.10. Detectores radiométricos	168
7.11. Detectores viscosimétricos	191
7.12. Detectores de light scattering	196
7.13. Detectores de quimioluminiscencia	206
7.14. Detectores de ultrasonidos	209
8. ACOPLAMIENTO DE HPLC CON OTRAS TÉCNICAS	213
8.1. Consideraciones generales	213
8.2. LC-MS	214
8.3. HPLC - RMN	262
8.4. HPLC - FTIR	270
8.5. HPLC - ICP	274
9. MÓDULOS ACCESORIOS	281
9.1. Hornos	281
9.2. Colectores de fracciones	284
9.3. Cámaras de reacción y derivatización	286
9.4. Recicladores de fase móvil	288
9.5. Válvulas selectoras de línea	289
9.6. Desgasificadores	292
10. SISTEMAS DE DATOS CROMATOGRÁFICOS	297
APÉNDICES Y TABLAS	321
ÍNDICES	327
Índice conceptual	327
Índice de acrónimos	341
Índice onomástico	347
Índice institucional.....	351

PREFACIO

HPLC es una herramienta fundamental en el laboratorio analítico, capaz de analizar prácticamente cualquier molécula. Antes técnica deseada, hoy los estudiantes de Ciencias, Ingenierías y Salud la conocen bien, qué muestras puede analizar y la utilizan habitualmente. Muchos laboratorios, especialmente los de control de calidad, poseen varios cromatógrafos, existiendo en centros y usuarios una notable “cultura cromatográfica”. La presente obra continúa la línea trazada en HPLC FUNDAMENTAL¹, donde establecíamos los fundamentos teóricos de la técnica, presentando aquí la instrumentación propia de HPLC con las novedades más recientes y con el doble objetivo de ser hilo conductor para el cromatografista, experimentado o novel, así como servir de consulta ante temas puntuales, esencialmente instrumentales y operativos. Confiamos en que contribuya, junto con su primera parte, a que el lector pueda realizar muchos y provechosos análisis por HPLC.

Dado que todos los días aparecen novedades tecnológicas, equipos con mejores especificaciones, noticias de mercado, fusiones entre marcas, etc., durante mucho más que mucho tiempo hemos prolongado el periodo de escritura con el afán de incorporar “en tiempo real” las últimas primicias instrumentales, por lo que ha resultado arduo decidir el momento de poner el punto final.

¹García de Marina, A. y Yusá, D.J.: *HPLC Fundamental*, Editorial UPV, Universidad Politécnica de Valencia, ISBN978-848363-216-1, 2008.

1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE HPLC

La más que secular cromatografía líquida ha visto varias generaciones de equipos instrumentales desde que Tsvet, auténtico “padre de la cromatografía”, y particularmente de la cromatografía líquida, revelase en 1903 esta técnica². Los términos *cromatografía líquida de alta resolución, de alta presión, de alta eficacia, de alta eficiencia o cromatografía líquida moderna* han devenido en el más sencillo, genérico, descriptivo y lógico de *cromatografía líquida (LC, Liquid Chromatography)*.



Figura 1. Sistemas de HPLC (imágenes cortesía de *Agilent Technologies* y *Perkin-Elmer*).

El desarrollo instrumental de HPLC no cesa en la búsqueda de mejor sensibilidad y selectividad en la detección, mayor rapidez en los análisis y necesidad de menor cantidad de muestras y disolventes. HPLC separa y determina analitos (solutos) orgánicos e inorgánicos en muestras de prácticamente cualquier naturaleza, pues su principal ventaja y propiedad inherente es precisamente determinar cualquier compuesto disuelto en cualquier líquido³.

Entre 1966 y 1967 los trabajos de Horváth y Lipsky alumbraron los primeros prototipos de cromatógrafos de HPLC, concretados durante los siguientes cinco años por Huber, Kirkland, Majors, Snyder, Unger y Karger en la llamada *primera generación* de equipos, propiciando la denominación “*HPLC moderna*”. Se trataba

² Hesse, G. y Weil, H.: *M. Tswett's First Paper on Chromatography*. Editorial Woelm Eschwege, 1954.

³ Meyers, R.A., Ed.: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Editorial John Wiley & Sons Ltd., 2000.

de grandes instrumentos con lenta puesta en marcha, al tiempo que se popularizaban las columnas de fase ligada.

El *segundo periodo* en la historia de HPLC, entre 1973 y 1980, estuvo marcado por un rápido desarrollo de la instrumentación, surgiendo equipos compactos al tiempo que comenzaban a utilizarse rellenos de partículas de 10 μm de diámetro. Aquella *segunda generación* hizo HPLC más fiable, asequible y comprensible, mientras se multiplicaba el número de trabajos en la hoy imprescindible publicación *Journal of Chromatography*. Los fabricantes comprendieron la magnitud del mercado que tenían ante sí, que crecía exponencialmente, comenzando numerosas compañías la fabricación de equipos de HPLC con cotas sobresalientes de fiabilidad, sensibilidad, automatismo y facilidad de manejo.

El *tercer periodo* instrumental comenzó en 1984, cuando la práctica totalidad de fabricantes decidió crear equipos modulares, a medida de las necesidades de los análisis y analistas. Se fue estabilizando el anterior desenfrenado crecimiento exponencial, convirtiéndose HPLC en la técnica más empleada, con más patentes, aplicaciones y publicaciones. Surgieron nuevos rellenos columnares, siempre dominados por el octadecilsilano (C18). Las nuevas técnicas, como la electroforesis capilar⁴ o la cromatografía de fluidos supercríticos⁵, afectaron menos de lo previsto a HPLC.

Por último, el *cuarto periodo* instrumental alumbró la actual generación de cromatógrafos al incorporar un ordenador personal en los equipos, ya mayoritariamente modulares, permitiendo dos importantes funciones: el control integral de todos los parámetros instrumentales de cada módulo y, por otra parte, la capacidad de adquirir y almacenar los cromatogramas, con la posibilidad de reprocesarlos y realizar todos los cálculos y sistematizar los procesos de validación⁶.

Y luego... El desarrollo de nuevas columnas ha acertado increíblemente los tiempos de análisis, como ha sucedido en las técnicas de UHPLC, el segmento de mayor crecimiento, cuyos primeros beneficiarios son los laboratorios farmacéuticos. También la incorporación de técnicas hibridadas, principalmente con espectrometría de masas (LC-MS), ha dotado por fin a las técnicas cromatográficas de la selectividad necesaria. Finalmente, el desarrollo instrumental ha mejorado la sensibilidad, sobrepasando con creces el arquetípico límite de detección de las ppm. En suma, podemos afirmar que las últimas mejoras tecnológicas de HPLC

⁴ Altria, K.D.: *Capillary Electrophoresis Guidebook*. Editorial Humana Press, Totowa, New Jersey, 1996.

⁵ Smith, R.M., Ed.: *Supercritical Fluid Chromatography*. Editorial Royal Society of Chemistry, Loughborough (Reino Unido), 1968.

⁶ McDowall, R.D.: *Validation of Chromatography Data Systems, Meeting Business and Regulatory Requirements*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, 2008.

residen en tres pilares: automatización, UHPLC y LC-MS⁷. Paralelamente el mercado de columnas es el segmento con mayor crecimiento (más de 300 millones de euros solo en Europa). La industria farmacéutica emplea el 35% de los equipos⁸, en un entorno donde se ha simplificado el número de fabricantes, desde los más de cincuenta habidos durante la eclosión de firmas del siglo pasado a un número mucho menor, en aplicaciones tan diversas que resultaría imposible reseñarlas aquí. HPLC se ha convertido en la técnica analítica más popular, capaz de aislar, identificar y cuantificar el 80% de las sustancias conocidas, conformando el mayor mercado de instrumentación analítica, un mercado maduro que aún crece, con más de 230.000 equipos instalados en todo el mundo, 80.000 de ellos en Europa. Este gran mercado de HPLC integra equipos completos (isocráticos, con gradientes, analíticos, para procesos, preparativos, industriales o en continuo, para cromatografía capilar, *microbore*, multidimensional o UHPLC, para radiocromatografía, GPC, de alta temperatura, híbridos con técnicas espectroscópicas, mayoritariamente con espectrometría de masas...), así como sus componentes “sueltos” (bombas y sistemas de bombeo, detectores, hornos, sistemas de control y adquisición de datos, dispositivos de preparación y manipulación de muestras), junto a columnas, reactivos y disolventes, y también servicios cromatográficos (realización de análisis, consultoría de aplicaciones, financiación y *leasing* de equipos, desarrollo, validación y cualificación de métodos y equipos, obtención, purificación y aislamiento de muestras, reparación, mantenimiento y revisiones de los equipos, y cursos de adiestramiento de sus usuarios).

Los desarrollos instrumentales más recientes han buscado mayor productividad en ensayos *HTA*, *High Throughput Analysis*, acortar los tiempos de análisis y mejorar la resolución⁹. La introducción de columnas y equipos de UHPLC (ultra HPLC, inicialmente UPLC) en el año 2000, con tamaño de partículas de fase estacionaria de 2 μm o menores, utilizando los ancestrales principios teóricos sentados empíricamente por Van Deemter¹⁰, incrementó sobremedida, sin renunciar a la resolución, la velocidad de los análisis, permitiendo llevarlos a cabo en 1 ó 2 minutos, evidentemente, con la servidumbre de multiplicar por 10 la precisión exigida a los tiempos de retención¹¹. Las inherentes altísimas altas presiones de UHPLC hizo diseñar equipos que soportasen más de 3.000 bares (cuando el límite de HPLC convencional era de 400 bares) y técnicas de alta temperatura, de hasta 90° C¹².

⁷ Wixom, R.L. y Gehrke, C.L., Eds.: *Chromatography: A Science of Discovery*. Editorial Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, 2007.

⁸ Kazakevich, Y.V. y LoBrutto, R., Eds.: *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Editorial Wiley, Hoboken, New Jersey, 2010.

⁹ Snyder, L.R., Kirkland, J.J. y Dolan, J.W.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Editorial John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2010.

¹⁰ Van Deemter J.J., F.J. Zuiderweg y A. Klinkenberg: *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271.

¹¹ Guillaume, D., Veuthey, J.L. y Smith, R.M., Eds.: *UHPLC in Life Sciences*. Editorial de la Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012.

¹² Smith, R.M., Ed.: *High Temperature Liquid Chromatography, A User's Guide for Method Development*. Editorial RSC, Cambridge, 2010.

Recíprocamente han surgido nuevas generaciones de detectores, sobre todo ópticos, y técnicas hibridadas. El desarrollo de fotodiodos de silicio para los detectores espectrofotométricos y nuevas fuentes de radiación de descarga de gas (Hg, Zn, Cd) han mejorado el nivel de ruido de los detectores y, por tanto, su sensibilidad, obligando a replantearse su diseño, electrónica y termostatación, y a desarrollar nuevos sistemas de adquisición de datos. La necesaria miniaturización de celdas de los detectores compatibles con UHPLC y HPLC micro y nano¹³ se ha combinado con nuevas generaciones de columnas ultrarrápidas¹⁴, mientras se ha hecho habitual la hibridación de HPLC con espectrometría de masas (LC-MS), estandarizándose las interfaces de presión atmosférica (electrospray, ionización química, fotoionización). Asimismo, la búsqueda de mejor sensibilidad y selectividad ha conducido a desarrollar nuevas metodologías de enriquecimiento de muestras¹⁵, automáticas (*on-line*) y discontinuas (*off-line*), nuevos tipos de fases estacionarias y técnicas cromatográficas multidimensionales¹⁶, sistemas LC-MS en tándem (con el paradigma del triple cuadrupolo) e hibridaciones antes impensables (LC-RMN y LC-FTIR) han permitido análisis en matrices complejas, fundamentales en la determinación de fármacos y productos medicinales¹⁷, exigiendo la ingente información generada avances informáticos de análisis multivarianza¹⁸. Se ha establecido una cierta estandarización instrumental en los sistemas modulares, formados por sistemas de bombeo con formación de gradientes en baja presión, inyector automático, detector *diode array* y sistema de datos informatizado, con la citada prevalencia de fabricantes, en su mayoría estadounidenses.

En cuanto a las aplicaciones futuras, HPLC proseguirá analizando moléculas muy diversas, mayoritariamente en laboratorios farmacéuticos y centros de investigación, imprescindible en la exploración de nuevos biofármacos¹⁹. Los equipos de HPLC se automatizarán cada vez más y continuarán siendo una herramienta crucial, prolongando su posición de liderazgo en el mercado de instrumentación analítica. La esperada proliferación de nuevas aplicaciones en control de calidad de alimentos y sus posibles contaminantes originarán una cantidad colosal

¹³ Lee, J.W. y Foote, R.S.: *Micro and Nano Technologies in Bioanalysis*. Editorial Humana Press, Totowa, New Jersey, 2009.

¹⁴ DeStefano, J.J., Schuster, S.A., Bichlmeier, R.S. y Johnson, W.L.: *Particle Size Considerations in Superficially Porous Particles*. Eastern Analytical Symposium, Somerset, New Jersey, 2013.

¹⁵ Snyder, L.R., Kirkland, J.J. y Glajch, J.L.: *Practical HPLC Method Development*. Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, 1997.

¹⁶ Eggink, M et al., *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 216-226.

¹⁷ Kümmerer, K., Ed.: *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*, Tercera Edición. Editorial Springer-Verlag, Berlín, 2008.

¹⁸ Erikson, L., Johansson, E., Kettaneh, N., Trygg, J., Wikstrom, C. y World, S.: *Multi and Megavariante Data Analysis Part II*, Segunda edición. Editorial Umetrics, Umea (Suecia), 2006.

¹⁹ Martin, A.R., Delgado, J.N. y Remers, W.A., Eds.: *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Editorial Lippincott, Filadelfia, 1991.

de análisis. Será imprescindible la validación de métodos²⁰, reflejada en guías detalladas de “buenas prácticas”²¹, aplicadas desde la primera Conferencia Internacional de Armonización (ICH, *International Conference of Harmonization*), celebrada en 1990 en Bruselas, donde representantes de las agencias reguladoras y asociaciones de la industria europea, estadounidense y japonesa contemplaron iniciativas reguladoras conjuntas, discutidas un año antes en París durante la Conferencia de Agentes Reguladores, inicio formal de las guías ICH²², con el fin de armonizar la seguridad, calidad y eficacia de los productos medicinales, en una nueva forma de entender la calidad de los productos fabricados, principalmente farmacéuticos²³.

En este contexto hay quien bromea dejando caer que el término HPLC, además de su significado usual de cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*) o el histórico de cromatografía líquida de alta presión (*High Pressure Liquid Chromatography*), concita otras dos curiosas acepciones: cromatografía líquida de alto precio (*High Price Liquid Chromatography*) y cromatografía líquida con grandes problemas (*High Problems Liquid Chromatography*). Respecto al precio, un equipo medio de HPLC viene a costar entre 40.000 y 50.000 €, dependiendo del número y características de sus módulos. Por otra parte, es preciso desdramatizar los aludidos “altos problemas”: puesto que todo sistema de HPLC comprende cinco o más módulos (sistema de bombeo, inyector, columna, detector y sistema de datos), si cada uno de ellos trabaja en condiciones óptimas para la aplicación para la cual se emplea, alcanzando buenos resultados, por ejemplo, en el 95% de las ocasiones, el conjunto tendrá buenos resultados en el $(0,95)^5$ de los casos, es decir, el 77,3% de las veces. Y si cada módulo lo hiciese en el 90% de las ocasiones, el conjunto logrará resultados óptimos en el $(0,90)^5$ de los casos, o sea, el 59,0% de las veces. Esto quiere decir que durante el otro 41% de las ocasiones, el sistema no conseguirá buenos resultados, es decir, “tendrá problemas”.

HPLC constituye un grupo de métodos y técnicas (tabla 1), capaces de separar analitos en una enorme variedad de muestras y matrices, proporcionando información cualitativa y cuantitativa cada vez más completa y mejor²⁴. Siempre ob-

²⁰ Coombes, P.: *Laboratory Systems Validation, Testing and Practice*. Editorial Davis Horwood International Publishers, Storrington, West Sussex (Reino Unido), 2002.

²¹ Schwartz, M.E. y Krull, I.: *Analytical Method Development and Validation*. Editorial CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1997.

²² International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guideline, *Impurities in New Drug Substances*, 2006.

²³ U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Pharmaceutical CGMPs for the 21st Century – A Risk-Based Approach, Final Report*, September 2004.

²⁴ Giddings, J.C.: *Dynamics of Chromatography, Volumen I*. Editorial Marcel Dekker, Nueva York, 1965.

servará cuatro reglas operativas: en primer lugar, la fase móvil y la fase estacionaria han de poseer naturaleza (polaridad) opuesta, pues de otra forma la fase móvil disolvería el relleno columnar; en segundo lugar, los analitos (solutos) han de ser totalmente solubles en la fase móvil (con igual polaridad que ésta), para que los pueda arrastrar compitiendo con la fase estacionaria; en tercer lugar, ha de existir propagación de los analitos a lo largo de la columna saliendo de la columna antes del final del análisis (elución), y, en cuarto lugar, y solo como objetivo deseable, los analitos deberán separarse (migración diferencial)²⁵.

Tabla 1. Nombres y definiciones de técnicas de HPLC.

Diámetro columnar	Flujo	Nombre
4-7,5 mm	2-10 ml/min	semipreparativa
7,5-21 mm	10-50 ml/min	preparativa
>21 mm	50-1000 ml/min	industrial
3,2-4,6 mm	0,5-2,0 ml/min	analítica
1,5-3,2 mm	100-500 µl/min	narrowbore
0,5-1,5 mm	10-100 µl/min	HPLC micro
150-500 µm	1-10 µl/min	HPLC capilar
10-150 µm	10-1000 nl/min	HPLC nano

²⁵ Karger, B.L., Snyder, L.R. y Horváth, C.: *An Introduction to Separation Science*. Editorial Interscience, Nueva York, 1973.

2. EL CROMATÓGRAFO DE HPLC

El equipo instrumental, que llamaremos “*cromatógrafo de HPLC*” o “*cromatógrafo de líquidos*”, siempre se compone de, al menos, cinco módulos (figura 2), unidos mediante tubería de acero o de otros materiales, usualmente con diámetro externo de 1/16” y ocasionalmente de 1/32” (en sistemas de alta resolución) o de 1/8” (en sistemas preparativos). Esos cinco ineludibles módulos son: el sistema de bombeo (una o varias bombas, con o sin formación de gradientes), el inyector de muestras (manual o automático), la columna (con o sin precolumna), el detector (uno o más de uno) y el procesador de datos, que exhibe los cromatogramas con los cálculos oportunos.

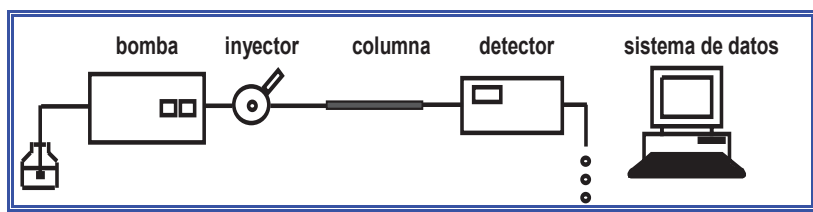


Figura 2. Los cinco módulos ineludibles de cromatógrafo de HPLC: bomba, inyector, columna, detector y sistema de recogida de datos.

Quizá una de las primeras cuestiones a preguntarnos y que define globalmente el tipo de equipo de HPLC, es si éste es *modular* (figura 3) o, por el contrario, *integrado*. En los equipos integrados un gran “chasis” alberga el conjunto de sus componentes, mientras que en los equipos modulares cada módulo posee una “caja” independiente con sus propias conexiones eléctricas, teclado e interfaz con el sistema de control. Tal modularidad ha hecho posible en alto grado la cantidad y variedad de aplicaciones de HPLC: los cromatógrafos de HPLC, mayoritariamente modulares, pueden configurarse para distintas necesidades y aplicaciones, admitiendo compartir módulos, intercambiarlos o reemplazarlos por otros, permitiendo desarrollarse al incorporar un inyector automático, un segundo detector, un horno de columnas, gradientes, etc. La modularidad ha permitido a los fabricantes flexibilizar y optimizar su producción y gestión, pues fabricar sistemas integrados, cada uno con una configuración específica, supone gestionar muchos equipos.



Figura 3. Sistema de HPLC (imagen cortesía de *Agilent Technologies*).

Además, los equipos de HPLC pueden montar otros módulos complementarios, indispensables para algunas aplicaciones, siendo los más comunes un horno de columnas, un colector de fracciones, válvulas para automatizar los procesos, módulos de derivatización, preparación o concentración de las muestras, etc. Junto a estos, debemos considerar un cierto número de pequeños accesorios, siempre útiles, a veces presentes en los equipos y otras veces sustituidos por buenas dosis de imaginación, habilidad y bricolaje: soportes del inyector y de columnas (ocasionalmente reemplazados por unas modestas pinzas de laboratorio), reservorios de fase móvil (frecuentemente las mismas botellas donde se suministran las fases móviles), restrictores de presión a la salida del detector (esporádicamente un simple tubo capilar enrollado); filtros intermedios, etc.

Un 25% del total de los equipos se adquieren para satisfacer necesidades analíticas concretas y otro 25% para reponer instrumentos obsoletos. Los usuarios avezados necesitan configuraciones específicas, en sistemas llamados coloquialmente "*equipos mecano*". El 50% restante de los cromatógrafos se adquieren para absorber más cantidad de análisis y dedicarse a determinaciones de rutina (el 21% para nuevos tipos de análisis y el 19% por necesidades de automatización o crecimiento instrumental). El mayor número de cromatógrafos de HPLC se encuentra en laboratorios farmacéuticos, biotecnológicos y químicos, más que en laboratorios clínicos y de hospitales, por lo cual el 31% de las aplicaciones de HPLC determinan productos farmacéuticos²⁶. Los usuarios valoran, además del coste (en configuraciones relativamente estándar), la exactitud y fiabilidad, junto a las mejoras de los detectores, mayormente de sensibilidad. Los analistas experimentados

²⁶ Ahuja, S. y Dong, W.E., Eds.: *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Editorial Elsevier/Academia Press, Amsterdam, 2005.

suelen apreciar las innovaciones tecnológicas, mientras que los noveles consideran las referencias de otros, líderes de opinión o vecinos en el espacio o en la aplicación.

Si bien inicialmente podría juzgarse el sistema de bombeo como el elemento clave de un sistema de HPLC, en los criterios de decisión técnicos la bomba ocupa un modesto tercer lugar, dominando la decisión, como hemos visto, la sensibilidad del detector, máxime si es selectivo y el equipo se dedicará a aplicaciones concretas. El segundo módulo en importancia de decisión es el *software*, por poseer el laboratorio otros similares, cuando no iguales, apreciándose su capacidad, innovación, facilidad de manejo y unión con otros *softwares* de gestión, LIMS (*Laboratory Information Management System*) u ofimática. Evidentemente, en los laboratorios de rutina recae gran importancia de la decisión sobre el inyector automático. Más del 70% de los usuarios desean todos los módulos del equipo de la misma marca y modelo por razones de compatibilidad, comunicaciones, control desde un *software* común y única asistencia postventa y de aplicaciones, siendo fase reversa el método más extendido, mayoritariamente con columnas analíticas, el 70% de ellas con precolumna.

En 1988 anticipábamos en *HPLC, Cromatografía Líquida de Alta Resolución*²⁷ que «la principal actividad cromatográfica en los próximos años será el desarrollo de nuevos equipos instrumentales, cada vez más adecuados a los problemas analíticos». Un cuarto de siglo después ambas aseveraciones se han manifestado en las nuevas generaciones de cromatógrafos.

²⁷ García de Marina Bayo, A. y Del Castillo García, B.: *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Editorial Limusa, México, 1988.

3. LA LÍNEA FLUÍDICA

Los diferentes módulos del cromatógrafo de HPLC se unen mediante tubos, cuyo conjunto conforma la “línea fluidica”, por la que discurre la fase móvil, atravesando todos los componentes del sistema en la secuencia bomba-inyector-columna-detector. Los módulos y tramos de tubería se enlazan en uniones o “juntas”, en el esquema tubo-cono-tuerca (figuras 4 y 5)²⁸. Existen distintos tipos de uniones, propias de diferentes fabricantes (*Valco, Rheodyne, SSI, Swagelok, Upchurch, Waters, Parker...*), de las cuales *Valco* es la más universal (aunque no siempre), mientras que los inyectores y válvulas *Rheodyne* emplean fluidicas de la misma marca. Es conveniente utilizar el tipo recomendado por el fabricante del módulo donde se realiza la unión, pues no todas las férulas (conos) son iguales, como tampoco lo son todas las tuercas, aunque pudiese parecerlo a primera vista. Utilizar conos y tuercas incorrectos conllevará inevitablemente a la aparición de fugas en la unión o a griparla.

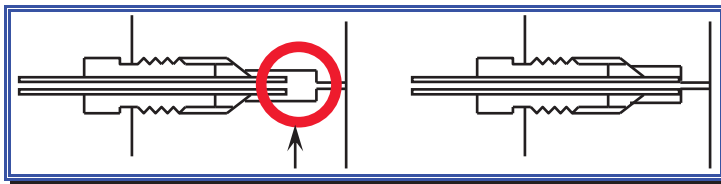


Figura 4. Las conexiones de HPLC deben cumplir dos condiciones: mínimo volumen muerto y alta presión. Izquierda: el comienzo del tubo ha quedado lejos de su asiento y ese volumen muerto hará perder eficiencia.

El aspecto más crítico de la unión tubo-cono-tuerca es su volumen muerto. Lo más importante es que el tubo quede alojado en el receptáculo exactamente en la profundidad óptima, en su asiento máximo: si lo hace *antes*, dejará un volumen muerto, una “piscina” en el argot cromatográfico, mientras que si lo hace *después*, no hará una buena junta y fugará la fase móvil (figura 5).

²⁸ Batts, J.W.: *All about fittings*. Ed. IDEX Health & Science, Oak Harbor, Washington, 2012.

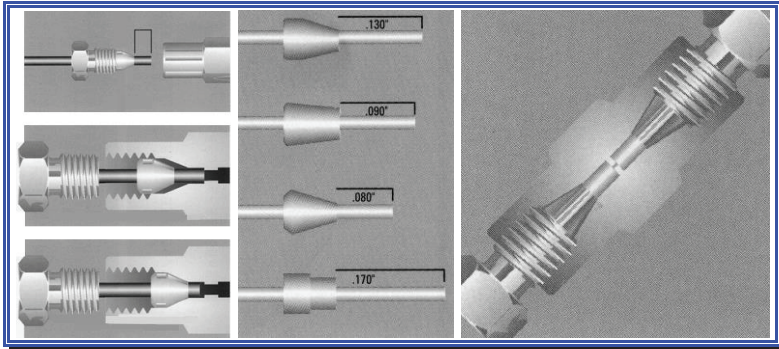


Figura 5. Conexiones de HPLC: a la izquierda, el conjunto tubo-cono-tuerca debe penetrar hasta una profundidad dada; en el centro, cuatro tipos de conos; a la derecha, conector de volumen muerto cero.

Los tubos se unen con conexiones de volumen muerto cero, receptáculos que enfrentan dos tubos, cada uno con su correspondiente unión de cono y tuerca, dejando entre ambos un mínimo canal longitudinal de volumen “casi cero”. Como queda dicho, los tubos suelen tener un diámetro externo de 1/16”, aunque también los hay más finos (de 1/32”) o más gruesos (de 1/8”). A su vez, existen tuercas de varias geometrías, que difieren en sus estrías (como el ánima del receptáculo donde encajarán). El acero inoxidable SS 316 (por *stainless steel*) es el material usual para tubos, conos y tuercas por su fiabilidad y resistencia a las altas presiones, y también el polímero PEEK (poliéter-étercetona), ideal para unir y desunir frecuentemente componentes que no requieran una presión muy alta (hasta 400 bares).

Es importante que las uniones tubo-cono-tuerca sean las adecuadas. Existen guías y directrices para la correcta manipulación de conexiones, tuercas y conos, cuya primera regla, ya dicha, es emplear conexiones de la misma marca (uniones de volumen cero, tuercas, conos, tubos): distintas conexiones en la línea fluidica podrían ser incompatibles, generando un volumen muerto o dañar las mismas conexiones. Otra regla es no sobreapretar las uniones, pues podrían griparse: las apretaremos con la mano tanto como sea posible y, luego, solo media vuelta con una llave. Como regla, hay que *apretar lo mínimo para que las conexiones no fuguen*. Además, se han popularizado conexiones que pueden cerrarse a mano sin necesidad de llaves, con férulas poliméricas que hacen cierre y se liberan al soltar el tubo, permitiendo reutilizarlas; estas uniones resisten presiones entre 150 y 450 bares. Tras hacer las conexiones, debemos comprobar la existencia de fugas. Si aún fluye líquido por la conexión, deberíamos apretar las tuercas, a razón de un cuarto de vuelta cada vez, sin sobreapretarlas, porque esto deformaría la unión y habrá que reemplazarla.

Es importante considerar el diámetro interno y la longitud de los tubos de conexión entre los módulos del equipo. Como regla, el cromatógrafo de HPLC montará tubo de diámetro interno no muy estrecho hasta el inyector, pero tras éste será de mínimo diámetro interno para evitar la difusión de los analitos, que ensancharía los picos. Y entre la salida de la columna y el detector el tubo el tubo ha de ser aún de menor diámetro interno, para que los picos continúen tan separados como la columna haya conseguido.

Ahora bien, un menor diámetro interno de los tubos provoca una presión mayor. Además, la longitud de la tubería (l) debería ser mínima, ya que conlleva un volumen muerto, el cual, a su vez, condiciona la varianza final de los picos. Como regla, cuanto menor sea el *diámetro interno de tubo* (d_t) mayor podrá ser su *longitud total* (l), que, sin embargo, no debe exceder el límite $r^4 l$, donde r es el *radio de la tubería*:

$$r^4 \cdot l \leq 6 \theta^2 \cdot \varepsilon (1+k') d_c^2 \cdot N \cdot d_p^3 \frac{h^2}{v} \quad (1)$$

θ^2 encarna la *pérdida relativa de eficiencia*, ε es la porosidad columnar, k' el factor de capacidad, d_c el diámetro columnar, d_p el diámetro medio de las partículas de fase estacionaria, h la altura de plato reducida y v la velocidad reducida de fase móvil. En un analito apenas retenido (con k' cercano a 0) y valores usuales de las otras constantes ($\theta^2=0,01$, $\varepsilon=0,8$, $h=2$, $d_c=4$ mm, $v=3$):

$$r^4 \cdot l \leq 0,01 N d_p^3 \quad (2)$$

Así, el diámetro interno de la tubería que une columnas analíticas de 5 μm de diámetro medio de partícula, en separaciones que precisen 10.000 platos teóricos, ha de ser 0,05 mm o menor²⁹.

$$r^4 \cdot l \leq 0,01 \cdot 10000 (5 \cdot 10^{-4})^3 \text{ cm}^5 = 1 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^5 \quad (3)$$

²⁹ Barber, W.E. y Birdlingmeyer, B.A.: *Interrelations Between Particle Properties and Chromatographic Performance*. International Symposium on HPLC, Anaheim, California, 2012.

Tabla 2. Materiales de los tubos de HPLC.

Metales	No metales
Acero inoxidable SS 316	PEEK (poliéter-étercetona)
Nitronic 50	PTFE (politetrafluoroetileno)
EFNI (electroformed nickel)	FEP (fluoroetilén-propileno)
Níquel 200 (aleación Ni-Cu-C-Si)	PPS (sulfuros de polifenilo)
Hastelloy C-22 (aleac. Ni-Cr-Mb)	Sílice fundida (HPLC capilar)
Inconel 600	
Titanio	
Otros metales: tántalo, zirconio	

Los tubos, tuercas y conos se construyen de diversos materiales (tabla 2) siendo el acero inoxidable, en su variedad SS 316, el material más empleado y estándar por sus excelentes propiedades de dureza física, facilidad de ser doblado sin obtenerse ni quebrarse y resistir presiones de 1.000 kg/cm². Sin embargo, es corroído por los ácidos (a partir de pH 2) y altas concentraciones salinas, aunque resiste bien los haluros. En HPLC decir “acero” es decir “SS 316”, aparte de por las citadas propiedades, por poder fabricar tubos de prácticamente cualquier diámetro interno y externo (figura 6). Además de los conos y tuercas, también se fabrican en SS 316 las carcasas de ciertos equipos y algunos pistones de bombas, aunque el acero no es el material óptimo para éstos, especialmente si montan alineadores cerámicos cilíndricos.

Otro acero no ideal para HPLC es la variedad SS 303, cuya ductilidad, manejabilidad y resistencia a la corrosión y oxidación a altas temperaturas comportan su uso en cromatografía de gases, empleándose apenas en HPLC por no resistir las altas presiones y ser atacado por los haluros. También marginales en HPLC, aunque usados en cromatografía de gases, existen tubos de *acero inoxidable recubiertos con oro o plata*, caro material inerte (cuesta un 50% más que el acero SS 316) que preserva la integridad de las muestras gaseosas³⁰.

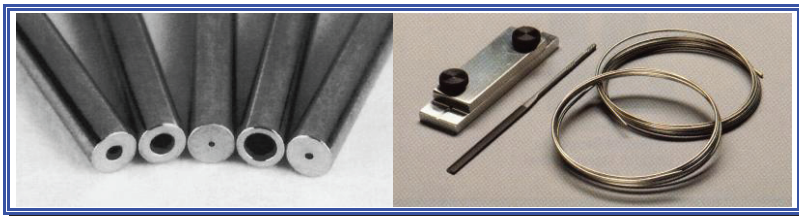


Figura 6. Izquierda: tubos de HPLC de 1/16" de diámetro externo con distinto diámetro interno. Derecha: cortatubos.

³⁰ Scott, R.P.W., Ed.: *Gas Chromatography*. Editorial Butterworths, Londres, 1960.

Vemos a continuación otros materiales metálicos ocasionales son el Nitronic 50, EFNI (*electroformed nickel*), Hastelloy C-22, Inconel 600, Monel 400, titanio, latón, tántalo o zirconio:

El Nitronic 50 es una aleación metálica muy resistente a los cloruros, sales y compuestos sulfurados, como el ácido sulfhídrico o el dióxido de azufre, tanto en solución como en vapor.

El EFNI (*electroformed nickel*) es una cara aleación de níquel con pequeñas cantidades de cobre, carbono, sílice y otros elementos. Material extremadamente inerte, es muy resistente ante las fases cáusticas (excepto el hidróxido amónico), haluros de hidrógeno, sales de haluros y otras sales oxidantes. Los tubos de EFNI se utilizan en técnicas capilares, solos o combinados con tuberías y columnas de sílice fundida, por poderse cortar sin necesidad de calentar y presentar un acabado interior muy fino, sin rugosidades. Al igual que el SS 316, se fabrican tubos de EFNI de prácticamente cualquier diámetro interno y externo.

El Hastelloy C-22 es una aleación de níquel, cromo y molibdeno, recomendable cuando pueda existir corrosión, como en climas marinos o causada por fases móviles de GPC que requieren altas temperaturas, como el o-diclorobenceno. El precio del Hastelloy C-22 triplica el del acero SS 316, pero resiste muy bien las fases ácidas (ácidos nítrico, fórmico, acético) y los oxidantes fuertes (cloruro férrico, cloruro cúprico).

El Inconel 600 es otro metal recomendable cuando se emplean soluciones concentradas de cloruro de magnesio, ácido sulfúrico o fluorhídrico, resistiendo los ambientes corrosivos en condiciones de alta temperatura, aunque tolera mal el ácido nítrico.

El Monel 400, de precio similar al Hastelloy C, es decir, tres veces más caro que el acero SS 316, es un material muy resistente ante fases ácidas o muy reductoras, ideal para muchas fases móviles, desde disolventes clorados hasta álcalis, siendo, sin embargo, atacado por las sales ácidas oxidantes y los hipocloritos.

Muchos equipos inertes o biocompatibles utilizaron titanio en lugar de acero como metal de elección de sus tubos, a pesar de cuadruplicar el precio del acero. Hasta el advenimiento del PEEK el titanio fue el material inerte por excelencia, por su gran resistencia ante la mayoría de fases móviles, orgánicas e inorgánicas, excepto ante el cloruro de aluminio. También resiste los álcalis, salvo el hidróxido potásico en caliente. En condiciones normales (temperatura ambiente, concentraciones salinas relativamente bajas) solo es atacado por el ácido fluorhídrico, resistiendo bien, entre otros, los ácidos sulfúrico, clorhídrico y fosfórico. El titanio presenta dos inconvenientes: su alto precio y su textura porosa, que gripa irremediablemente las juntas tubo - férula - tuerca, impidiendo extraer el tubo de la junta donde se enroscó, lo cual se evita intercalando una fina arandela de teflón entre la

férula y el compartimento donde se une el tubo: al desconectar éste, la arandela de teflón se destruye y debe ponerse otra, operación relativamente tediosa. También la textura porosa del titanio puede provocar fugas en la tubería. Las bombas de PEEK evitan estos problemas y son más baratas, pero solo pueden trabajar a presiones inferiores.

Otro posible material metálico es el sufrido latón, apenas usado en HPLC por su labilidad ante fases corrosivas, aunque su facilidad de manejo le hace ideal en las tuberías de cromatografía de gases. Por último, se usan marginalmente tuberías de caros metales exóticos, como el tántalo (cuyo precio cuadruplica el del acero SS 316), que tolera muy bien la mayoría de las fases móviles salinas o muy ácidas, salvo los ácidos fluorhídrico y sulfúrico en caliente, es atacado por los álcalis y se oxida por encima de 300° C, pudiéndose afirmar que posee la misma resistencia que el vidrio; también existen tubos de zirconio, muy resistentes al ácido clorhídrico y sulfúrico en caliente en concentraciones cercanas al 70% o al ácido nítrico en concentraciones del 90%, pero resulta atacado por el ácido fluorhídrico.

Entre los no metales, citamos en primer lugar al infatigable PEEK (figura 7), material polimérico inerte y biocompatible por excelencia que resiste altas presiones, aunque menores que el acero SS 316. Su resistencia química ante cualquier pH (1 a 14) y temperatura (hasta 225° C) es excelente y solo es atacado por algunos disolventes orgánicos apolares (cloroformo, cloruro de metileno, dimetilsulfóxido) y los ácidos sulfúrico y nítrico concentrados.

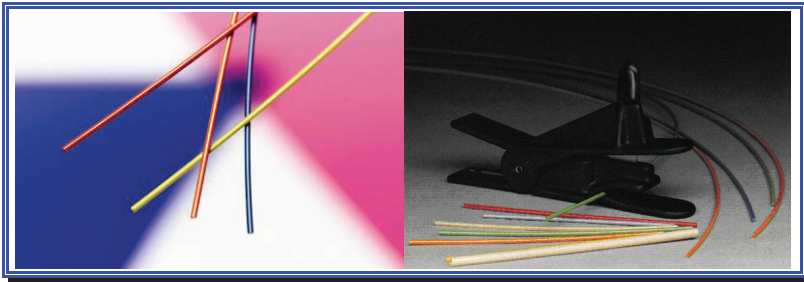


Figura 7. Tubos de PEEK. Derecha, cortatubos de tubería de PEEK.

Además del PEEK existen tubos de HPLC de los siguientes materiales no metálicos: PTFE (politetrafluoroetileno), FEP (fluoroetilén-propileno), PPS (sulfuros de polifenilo) y sílice fundida:

PTFE (politetrafluoroetileno) es el nombre genérico de dicha familia de fluoroderivados, de los cuales el más conocido es el popular teflón, utilizado en los tubos por donde discurren líquidos a baja presión, como los tubos de reacción y tubos de desecho. Algunas variedades resisten presiones hasta 460 bares, pero su inicial alta resistencia química disminuye mucho en condiciones de alta presión y alta temperatura. Tampoco es recomendable para las juntas de HPLC por su ducti-

lidad y compresibilidad, aunque alcanza mucho mayor estabilidad recubierto con fibra de vidrio. Su natural rigidez hace su manipulación difícil, inconveniente añadido al de su elevada porosidad, que permite difundir moléculas de bajo peso molecular, impidiendo el uso de tubos de PTFE en cromatografía de gases, sobre todo con hidrógeno.

FEP (fluoroetilén-propileno), también perteneciente a la familia de los fluorocarbonos, presenta propiedades similares a éstos. Con resistencia química análoga al PTFE, el FEP es más rígido, moldeándose peor, aunque el FEP es más transparente, menos poroso y menos permeable al oxígeno que el PTFE.

La familia de los sulfuros de polifenilo (PPS) engloba, entre otros, los conocidos *Fortron* y *Ryton*, materiales muy resistentes ante la mayoría de disolventes, ácidos y bases, empleándose como soporte de algunos accesorios.

Finalmente, algunos sistemas de HPLC capilar montan tuberías de sílice fundida, material frágil y relativamente dúctil, que resiste muy bien las altas temperaturas, siendo la primera elección en tubos, columnas y precolumnas capilares (como, por supuesto, en las columnas capilares abiertas de cromatografía de gases)³¹.

En cuanto a los materiales de conos y tuercas, los otros elementos de las juntas o uniones entre módulos, se fabrican con idénticos materiales que los tubos. Aparte de los antedichos al tratar de estos, citamos a continuación los materiales no metálicos:

En primer lugar, junto al paradigmático y susodicho PEEK, los polímeros de la subfamilia de PEK (poliétercetona) presentan inigualables propiedades térmicas: el PEKEKK (poliéter-cetona-éter-cetona-cetona), con también buenas características químicas, comparables al PEEK, se usa menos que este; el PAEK (poliaril-étercetona) y PEKK (polímero termoplástico de poliéter-cetona-cetona), ambos de fácil manejo, resisten presiones de 600 bares, por lo que se utilizan mucho en las conexiones de las columnas, admitiendo cualquier material de tubo.

También muy utilizados, los citados PTFE (politetrafluoroetileno, de la misma familia que el *Teflón*) y el FEP (copolímero de fluoroetilén-propileno) presentan las mismas limitaciones y resistencia química, pudiendo moldearse fácilmente durante su fabricación, aunque, a diferencia del PTFE, el FEP permanece sin sufrir contracción o histéresis asimétrica a temperatura ambiente, haciendo que las juntas de FEP sean más duraderas y presenten menor riesgo de fugas.

³¹ Dawes, P., Barnett, B. y Hibbert, R.: *Proceedings of the 34th International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva di Garda, 2010.

CTFE (cloro-trifluoro-etileno), conocido bajo el nombre comercial de *Kel-F*, resiste temperaturas de hasta 100° C y todos los líquidos corrosivos excepto la acetona, incluyendo las fases ácidas oxidantes.

ETFE (etil-trifluoro-etileno), fluoropolímero de nombre comercial *Tefzel*, utilizado para sellar zonas que puedan presentar fugas. Resiste la mayoría de los reactivos, salvo algunos agentes clorados. La mayoría de las carcasas de los equipos de HPLC se fabrican con la variedad *Tefzel T* por su excelente resistencia química ante la mayoría de los ácidos, bases y disolventes comunes de HPLC, tolerando temperaturas de hasta 200° C.

PFA (perfluoroalcoxi), fluorocarbono de propiedades químicas y mecánicas similares al FEP, es algo más rígido que éste.

La poliimida, frágil a altas temperaturas, recubre el interior de tubos y conos de titanio, que, como sabemos, podrían griparse por sí solos, y es el material de elección para recubrir tuberías de sílice fundida y grafito.

Algunas carcasas y conectores de tubos capilares se fabrican con *kynar*, nombre comercial del fluorocarbono (PVDF), material autoclavable que admite temperaturas de hasta 200° C y tolera químicamente la mayoría de los líquidos utilizados en HPLC, aunque se puede degradar con disolventes muy apolares, como algunos ésteres y cetonas.

Finalmente, el polipropileno se aplica sobremanera en aquellas zonas de los equipos que no contactan directamente con la fase móvil, pues es atacado por los oxidantes fuertes y los hidrocarburos aromáticos y clorados.

3.1. Filtros y frits en la línea fluidica

Los filtros internos de los módulos del equipo y de las columnas, denominados *fritas (frits)*, suelen fabricarse en acero inoxidable poroso comprimido. Rara vez son de vidrio (fritado), material poco recomendable en HPLC por su escasa resistencia a las altas presiones y luz de poro relativamente grande. También existen filtros más económicos de papel o de celulosa, superpuestos sobre los tradicionales de acero para resistir así altas presiones, pues en caso de contaminación se reemplaza solo el papel desechable. Otros filtros ocasionales son de grafito, utilizados en algunas aplicaciones con detectores electroquímicos.

El primer y único problema que presentan los filtros es su contaminación (obturación) y posterior limpieza. Si son de acero, se puede intentar limpiarlos con ácido nítrico 6 N y posterior tratamiento con ultrasonidos. Sin embargo, esto suele resultar imposible por haber penetrado las partículas en el interior de su estructura

reticular. Un filtro sucio en el sistema cromatográfico aumenta la presión, reduce la eficiencia (y, por tanto, la sensibilidad) y afecta, principalmente, a la reproducibilidad.

3.2. Reservorios de fase móvil

Con la misión de albergar la fase móvil previamente a ser bombeada por la bomba del equipo, muchos cromatógrafos sin reservorios especiales disponen las fases móviles sobre los módulos del sistema en las mismas botellas donde vienen los disolventes o incluso matraces (figuras 8 y 9). Sin embargo, algunos *reservorios instrumentales* permiten ciertas importantes funciones “en línea” (figura 8), viables también fuera del equipo: filtrar la fase móvil, la cual siempre debe filtrarse para evitar posibles obturaciones del sistema poniendo filtros en los reservorios, generalmente *frits* de acero inoxidable de 0,2 μm en el extremo inicial de su tubo “de pesca”, que la llevará hasta el sistema de bombeo; desgasificar, tarea obligada en sistemas de gradientes a baja presión, sobre todo en fase reversa, para asegurar una atmósfera inerte, más aún con fases móviles higroscópicas; termostatar, forzoso con fases móviles de bajo punto de ebullición o muy viscosas; desoxigenar, pues el oxígeno puede causar problemas en la detección electroquímica con fases móviles (y muestras) oxidables; agitar fases móviles resultantes de mezclar disolventes poco miscibles, disponiendo algunos reservorios de dispositivos agitadores o emplazando los reservorios sobre un agitador magnético externo.



Figura 8. Reservorios sobre un sistema de HPLC cuaternario (imagen cortesía de *Agilent Technologies*).

Los reservorios se construyen con diversos materiales, siendo el vidrio (transparente o ámbar) el más utilizado. El plástico no es un material óptimo pues

puede aportar partículas a la fase móvil³². Ocasionalmente hay reservorios de teflón o recubiertos internamente por PEEK. El reservorio ha de taparse para evitar que en la fase móvil entre polvo o incluso aire. A través del tapón discurre el “tubo de pesca”, que conduce la fase móvil al sistema de bombeo; suele ser de teflón y comienza en un filtro (la popular “alcachofa”) que garantiza la ausencia de partículas en el solvente.

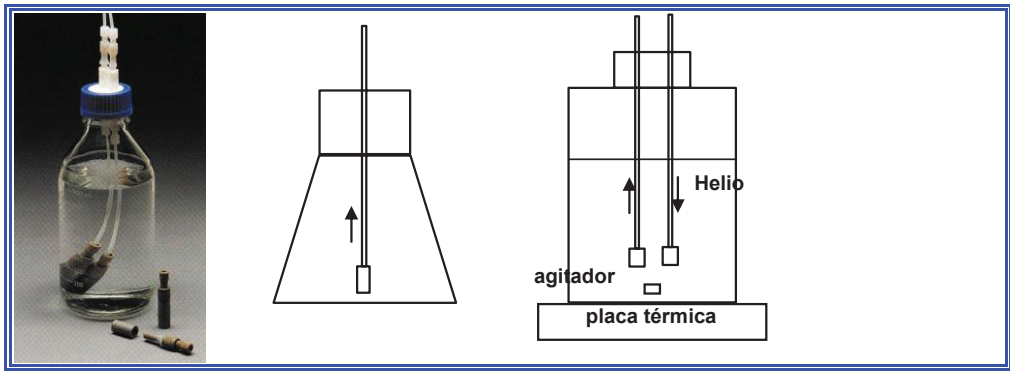


Figura 9. Reservorios de fase móvil: en el centro, un simple matraz o vaso *erlenmeyer* con su tubo de pesca y filtro de succión; a la derecha, un reservorio hermético con termostatación, agitación y borboteo de helio.

³² Brydson, J.: *Plastic Materials*, Séptima edición. Editorial Butterworth Heinemann, Oxford, 1999.

4. SISTEMAS DE BOMBEO Y DE GRADIENTES

La *bomba cromatográfica* impele la fase móvil al flujo seleccionado dotándola de la presión necesaria para atravesar la columna y el resto del sistema. Tal definición engloba varios tipos de bombas de líquidos (tabla 3), que confieren a la fase móvil alta presión (HPLC), baja presión (LPLC) o media presión (MPLC). HPLC emplea casi exclusivamente bombas de pistón, mientras que los sistemas de LPLC montan bombas peristálticas y los de MPLC bombas de jeringa, existiendo excepcionalmente disposiciones sin bomba en los equipos de Cromatografía Líquida en Columna (CLC, *Column Liquid Chromatography*), utilizados desde los albores de la cromatografía líquida, donde la fase móvil “cae” por gravedad. Además de las bombas de pistón, los demás tipos solo tienen interés histórico y a veces anecdótico, pero resulta útil conocerlos porque los podemos encontrar ocasionalmente.

Tabla 3. Tipos de bombas de líquidos.

Bombas de flujo constante	Peristálticas De pistón De jeringa Rotatorias de paletas
Bombas de presión constante	De presión directa mediante un gas De intensificador neumático De intensificador hidráulico

La tabla 3 también muestra los dos modos de bombear fases móviles: *a flujo constante* y *a presión constante*. En el primer caso la bomba traduce el flujo deseado en frecuencia de sus emboladas (en las bombas de pistón) o en velocidad de desplazamiento (en las bombas de jeringa), quedando así la presión condicionada al flujo. Las bombas de *presión constante* estiman el empuje realizado sobre un fluido intermedio, regulando el flujo para mantener un valor de presión constante según sea la resistencia opuesta por el sistema y la columna.

La primera bomba comercial de pistón para HPLC fue creación del ingeniero Burleigh M. Hutchins con su equipo de mecánicos, liderado por Louis Abrahams, todos empleados de la compañía *Waters Associates*, y presentada en la Pittcon Conference de 1972, la mayor exposición mundial sobre instrumentación científica, que organiza anualmente la Conferencia sobre Química Analítica y Espectroscopia Aplicada de Pittsburg, agrupación perteneciente a la Sociedad de Química Analítica.

ca y Espectroscopia Aplicada de esa ciudad norteamericana del estado de Pensilvania³³.

Las bombas de pistón pueden ser *de pistón sencillo* o *de doble pistón*, montando estas últimas dos pistones en serie o en paralelo. Las bombas de flujo constante son muy repetitivas y garantizan constancia del flujo liberado, a pesar de que los cambios de viscosidad o de temperatura teóricamente deberían afectar al flujo bombeado. Por su parte, las bombas de presión constante que montan ciertos sistemas de baja o de media presión producen flujos sin pulsos son de construcción sencilla y más económicas.

4.1. Bombas de pistón

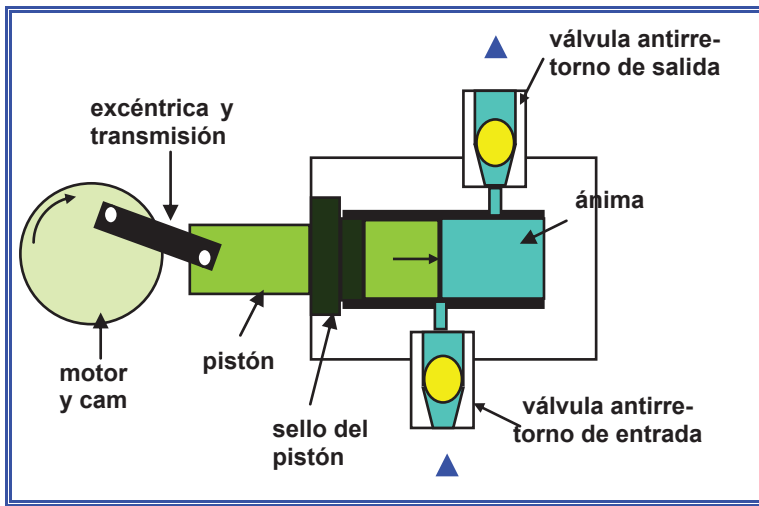


Figura 10. Esquema de una bomba de HPLC de pistón movido por un mecanismo excéntrico de avance centrífugo (cam, *centrifugal advance mechanism*), impulsado por un motor.

En este tipo de bombas un dispositivo eléctrico actúa sobre el pistón, que penetra en una cámara o ánima donde se halla la fase móvil, para comprimirla y enviarla presurizada al resto del sistema (figura 10): el flujo bombeado depende de la frecuencia de las emboladas (ciclos) y del volumen interno del ánima. El pistón es movido por un motor que, a su vez, mueve una biela de giro, denominándose *cabezal* el conjunto ánima - pistón - válvulas. Para facilitar su mantenimiento, el cabezal se suele montar externamente a la “caja” del módulo de la bomba. La biela es asimétrica para que el pistón se retraiga a una velocidad mucho mayor a la

³³ Dolan, J.W. y Snyder, L.R.: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, 2012.

positiva en la dirección de bombeo, mejorando la estabilidad del flujo. Con todo, las bombas de pistón sencillo liberan flujos oscilantes, lo cual impide su uso en aplicaciones que requieren alta sensibilidad, salvo si tras ellas se instala un *damp*er o amortiguador de pulsos. Suelen incorporar un dispositivo electrónico de medida y control de la presión, estableciendo límites de presión de trabajo, por debajo y encima de los cuales el sistema avisa y deja de bombear.

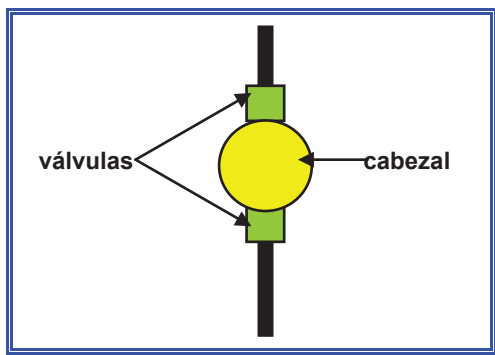


Figura 11. Esquema frontal de una bomba de un solo pistón.

El orificio por donde penetra el pistón en el ánima es sellado por una junta, llamada indistintamente "*sello*" ("*piston seal*") o "*retén*". El ánima comunica con dos *válvulas antirretorno* (figura 11). Las válvulas antirretorno simples constan internamente de una oquedad donde se emplaza una arandela y una bolita inerte, generalmente de polímero o de rubí (figura 12), razón por la cual se conocen en el argot cromatográfico como "*válvulas de bolas*", ya que existen otras válvulas antirretorno activadas eléctricamente. Cuando el pistón penetra en el ánima impele el líquido de fase móvil contenido en ella, haciendo la presión que la válvula superior deslocalice su bolita y bloquee la inferior, impidiendo el retorno del líquido al reservorio. Después, al retirarse el pistón, prosigue el movimiento inverso, haciendo vacío y aspirando líquido del reservorio, ya que la válvula inferior se abre, sin permitir el retorno de lo ya bombeado, pues la válvula superior se cierra. La precisión de las válvulas de cierre sencillas es de alrededor del 1%, pues tardan un 1% (en tiempo) en situar el rubí en la posición antirretorno y cerrarse. Las bombas de alta gama montan válvulas dobles, con doble arandela y dos rubíes, con precisión del flujo bombeado del 0,01% (1% del primer rubí y 1% del segundo sobre el primero).

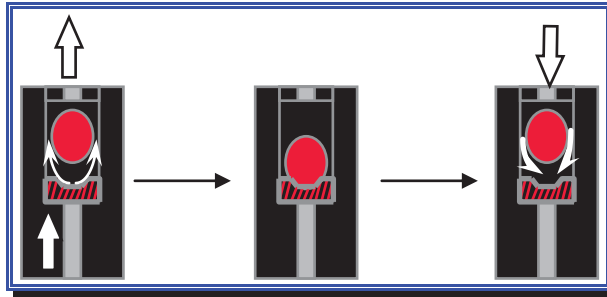


Figura 12. Posicionamiento de la bola en la válvula superior de una bomba: izquierda, deslocalizada por la empujadora deja pasar el flujo; centro, tras un momento de equilibrio, cuando el pistón se retira y succiona, “encasquilla” la bola evitando el retorno de la fase móvil (derecha).

La mayoría de las bombas de pistón utilizan *pistones cerámicos* o de *zafiro* endurecido con alúmina cristalina (99,5% de óxido de aluminio), ambos con excelente resistencia química, estabilidad térmica y resistencia mecánica ante las fases móviles habituales. Pueden ser fuente de problemas cuando las bombas se dejan en reposo y sin limpieza del cabezal (pistón, sello, válvulas). Los pistones de zafiro no son adecuados para bombear fluidos “secos”, como el hexano. El acero inoxidable SS 316, a pesar de su notable resistencia química y física, no es recomendable para los pistones ni para los dispositivos alineadores que montan algunas bombas de pistón (los diseños de pistón flotante exigen pistones cerámicos), alineadores que suelen fabricarse con *Carbon Y*, al cual atacan los oxidantes fuertes y los líquidos muy agresivos.

En cuanto a los retenes o sellos (*piston seals*) de las bombas, se fabrican (en su totalidad o solo en sus bordes, en la zona de roce con el pistón y el ánima de la bomba) con *Rulon A*, fluorocarbono saturado de PTFE, material blando y químicamente muy resistente, pues tolera muy bien la mayoría de los disolventes orgánicos, ácidos y bases fuertes. El *Rulon A* deforma los metales dúctiles, impidiendo el uso de ciertos pistones con flujos altos (alta velocidad de bombeo). Otros retenes se fabrican con bordes de *Rulon J*, variedad del anterior, también muy inerte y físicamente blando, con resistencia química relativamente buena, aunque es atacado por algunos disolventes apolares y los ácidos y bases fuertes. Finalmente, hay sellos de bombas fabricados con *Teflon*, otro fluorocarbono de excelente resistencia química, blando, moldeable, fácil de cortar y térmicamente estable, que se dilata a altas temperaturas y resulta poco adecuado para aplicaciones que tengan que soportar altas presiones.

En cualquier caso, el flujo (F) liberado por la bomba, expresado usualmente en ml/min, depende, a presión y temperatura constante, del área A de la sección del pistón y de la velocidad v de su desplazamiento en cada empujadora:

$$F = A \ v \quad (4)$$

La naturaleza oscilante del flujo liberado por las bomba de un solo pistón puede suprimirse teóricamente con bombas de dos pistones desfasados 180 grados (figura 13): cada pistón genera un flujo sinusoidal, siendo matemáticamente una línea recta la resultante de dos sinusoides desfasadas 180 grados. Cuando un pistón bombea, el otro se retira, aspirando fase móvil y cebándose; a su vez, cuando el primer pistón llega a su fin, se retira y comienza a bombear el segundo, y así sucesivamente. Cada pistón, movido por su propia excéntrica, posee su ánima y válvulas antirretorno. En el pasado existieron extravagantes diseños de bombas con tres pistones en paralelo, desfasados 120 grados.

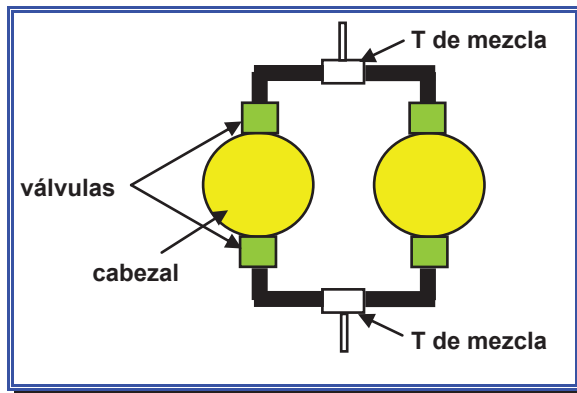


Figura 13. Vista frontal de una bomba de doble pistón en paralelo.

Si bien el resultado teórico de una bomba con dos pistones desfasados 180 grados ha de ser una línea recta, en la práctica las bombas de dos pistones generan líneas de base con ciertas oscilaciones rítmicas, denominadas “rizado” o “ruido” de bomba (figura 14), cuya razón solo puede ser una: los flujos liberados por ambos pistones no están perfectamente desfasados 180 grados (180,0000 grados), por causas físicas (precisión mecánica de la bomba y precisión de las válvulas de cierre) y químicas (compresibilidad de la fase móvil y que ésta se halle desgasificada).

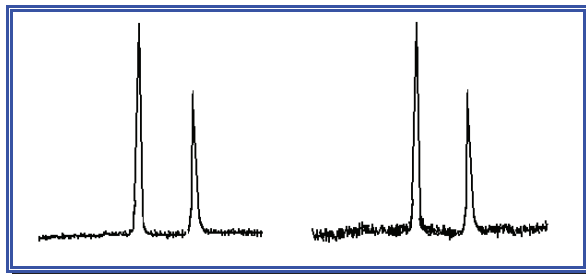


Figura 14. Ruido (rizado) en la línea de base producido por la oscilación de los dos pistones.

La precisión mecánica de la bomba se expresa en μm o en mm, como suma de las holguras existentes entre el motor y el movimiento final de los pistones, es decir, el desfase o imprecisión (en distancia) del pistón desde que su microprocesador ordena al pistón avanzar (o retroceder), hasta que éste realmente avanza (o retrocede). Evidentemente, tal holgura se manifiesta con mayor frecuencia a flujos altos. Cuanto mejor es el diseño, materiales y acabado de la bomba, menor holgura posee y es más precisa. La precisión de la bomba se estima gráficamente mediante dos aspectos: la estabilidad del flujo sin columna, en un cromatograma realizado con detección universal (refractométrica), y la estabilidad de su presión, pues la mayoría de las bombas poseen salida analógica o digital, exhibiendo un ruido o rizado recurrente, llamado *ciclo de bomba*, que, cual electrocardiograma, revela qué “enfermedades” aquejan a la bomba, auténtico “corazón” del equipo.

La compresibilidad de la fase móvil hace que parte del esfuerzo de la bomba comprima la fase móvil dentro del ánima y no la bombee, produciendo el consiguiente desfase del pistón. Las bombas con “*sistema de compensación de la compresibilidad del solvente*”, que montan la mayoría de las bombas comerciales, pallian este inevitable hecho químico gracias a varios procedimientos instrumentales. Los sistemas de compensación de la compresibilidad del solvente más habituales consisten en, conociendo la fase móvil a bombear, introducir un factor numérico en su microprocesador para embragar el pistón de forma más recia y acelerada en su recorrido inicial, “aplastando” y comprimiendo la fase móvil en un tiempo muy reducido, para, así comprimida, bombearla a continuación: la primera parte de la embolada se realiza a mayor velocidad, embolando luego la fase móvil hasta el final del recorrido a velocidad constante, para retornar rápidamente a la posición inicial con una velocidad que suele estar entre 20 y 50 veces la de la embolada. Otras bombas pretéritas montaban un sensor de presión de respuesta rápida: cuando la presión descendía ligeramente, el pistón aumentaba de velocidad para compensar ese descenso. La idea era ingeniosa, pero cuando la fase móvil contenía alguna burbuja, esas bombas, se volvían literalmente “locas”.

Algunas bombas diseñadas para aplicaciones de HPLC de flujos muy bajos (*narrowbore, microbore, capilar*) actúan con microdesplazamientos del pistón, accionando éste mediante “microempujones” de una longitud dada (y, por tanto, de un volumen dado) y retornar a la posición inicial tras un cierto número de ellos, dependiendo del volumen total de su ánima (figura 15).

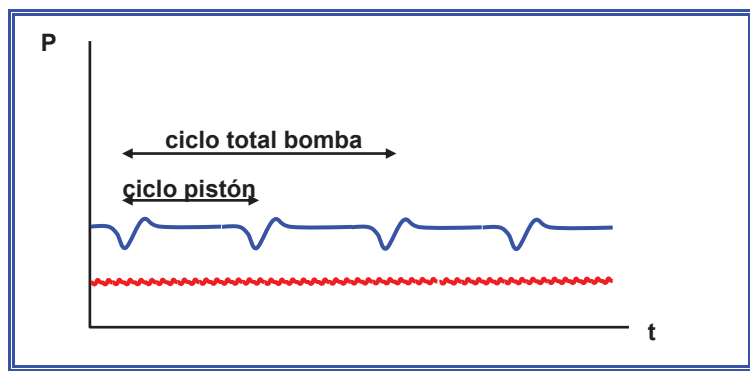


Figura 15. Comparación de la oscilación de dos bombas de doble pistón en paralelo: arriba, bomba analítica normal; abajo, bomba cuyo pistón avanza por microdesplazamientos.

Las bombas de doble pistón hacen recomendable desgasear la fase móvil, pues ésta puede contener aire disuelto, inapreciable a presión atmosférica, pero que, tras embolar la fase móvil y ponerla a alta presión, aflora como microburbujas, con la consiguiente inexactitud del flujo (y tiempos de retención) e inestabilidad del detector. Además, algunas fases móviles sufren contracción de volumen en ciertas proporciones, como las mezclas metanol – agua 55:45, algo relativamente inevitable y que se manifiesta como mayor rizado de la línea de base del cromatograma.

Uno de los caballos de batalla de las bombas es el mantenimiento de sus válvulas antirretorno, cuyo uso las vuelve imprecisas a causa de las pequeñas partículas o fases peliculares inmiscibles de la propia fase móvil, que impiden la localización de la bolita de la válvula justo cuando y donde debería hacerlo. En esos casos se debe desmontar la válvula, en las acciones de mantenimiento pertinentes que veremos más adelante. Por esta razón surgieron las bombas de doble pistón en serie, buscando simplificar el diseño de las bombas de doble pistón en paralelo y reducir costes y mantenimiento, ya que solo precisan dos válvulas, normalmente una a la entrada del primer cabezal y la segunda a la salida del segundo, existiendo también diseños con las dos válvulas sobre el primer cabezal (figura 16). La fase móvil, bombeada por el primer pistón, llega al segundo pistón, cuyo movimiento (embolada) está desfasado 180 grados respecto al primer pistón, compensando (“matando”) el segundo pistón el pulso generado por el primero. Generalmente el ánima del segundo pistón posee un volumen mitad del primer pistón, aunque algunos diseños montan pistones de ánimas de idéntico volumen.

Las prestaciones de las bombas de doble pistón en serie ocupan un puesto intermedio entre las bombas de pistón sencillo y las de doble pistón en paralelo, con un flujo menos estable que el liberado por las de doble pistón en paralelo, pero son más económicas y precisan menor mantenimiento. Por supuesto, siguen

produciendo ciclos, más apreciables que los de las bombas de doble pistón en paralelo, pero mucho menores que los de las bombas de un solo pistón. Además, siempre se puede recurrir a un atenuador de pulsos (*dampner*).

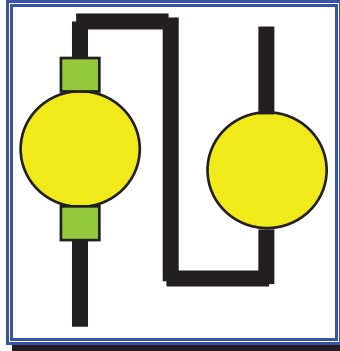


Figura 16. Bomba de doble pistón en serie, que solo precisa dos válvulas, en este caso sobre el primer pistón (primario).

En definitiva, las bombas de HPLC suelen ser de doble pistón, en serie o en paralelo, relegando ambas las de pistón sencillo. Todas montan válvulas antirretorno, dobles en las bombas más sofisticadas. Muchas disponen de circuito de lavado de los pistones para evitar su rayado y deterioro de los sellos. También es frecuente que monten sensor de fugas, que avisa en caso de fugas o goteo inesperado de fase móvil: se trata de una simple resistencia capacitativa que, cuando contacta con alguna gota fugada de fase móvil, genera una señal de alarma al tiempo que detiene el bombeo. Las bombas de HPLC generalmente monitorizan la presión de la fase móvil en bares, MPa, kgf/cm² o psi, trabajan con presiones de hasta 400 ó 450 bares y permiten establecer límites de seguridad de presión máxima y presión mínima, fuera de los cuales interrumpen el bombeo. La sobrepresión suele ser ocasionada por alguna obturación en el sistema, frecuentemente en la columna, mientras que el límite mínimo de presión se fija para evitar que la bomba funcione en vacío, sin flujo, normalmente por haberse agotado la fase móvil del reservorio. El flujo de fase móvil liberado por las bombas de pistón suele ser de 0,001 a 10 ml/min, con alta precisión (coeficiente de variación del 0,2%) y exactitud superior al 2% (la exactitud de la presión suele superar el 1%). Naturalmente, tras los autodiagnósticos al conectarla, la bomba puede trabajar en modo isocrático o con formación de gradientes (con los accesorios pertinentes, en baja presión, con una válvula previa formadora de gradientes, o en alta presión, uniendo dos o más bombas), siendo casi siempre posible programar *gradientes de flujo* en el tiempo. Dicha programación de gradientes y flujos puede ser autónoma (desde el propio teclado de la bomba) o remota (mediante un controlador externo o un ordenador con su correspondiente *software*).

La línea fluidica de las bombas de pistón suele construirse con tres materiales: acero inoxidable SS 316, el más común; PEEK, alternativa inerte para aplica-

ciones de presión moderada, y ocasionalmente titanio en los equipos "inertes" para separaciones de moléculas biológicas (enzimas). De los tres, el acero inoxidable es *la primera opción*, pues es el que mejor reúne las propiedades de resistencia frente a la corrosión, facilidad de uso y coste, tolerando bien los líquidos apolares y polares, y pH superiores a 2, aunque es corroído por los ácidos halogenados (clorhídrico) y oxidado por pH inferiores a 2 (concentraciones de ácidos fuertes 0,01 M o mayores), liberando iones férricos y crómicos, que aumentan el fondo y el ruido de la línea de base en HPLC de intercambio iónico³⁴, ocasionando los mismos efectos en detección electroquímica y deteriorando los analitos en aplicaciones biológicas, como en la separación y purificación de enzimas. Por ello, la línea fluidica de acero se puede pasivar, como veremos a continuación. El acero sin pasivar puede disminuir el 40% de la actividad enzimática, mientras que los sistemas con tuberías inertes (PEEK o titanio) conservan actividades superiores al 96%.

Así pues, es recomendable pasivar la línea fluidica de acero previamente a su uso, al instalar el equipo por primera vez, tras largos periodos de reposo o cuando se incorpora algún módulo nuevo, que también se puede pasivar externamente, manualmente. Pasivar elimina iones solubles, máxime los citados cationes crómicos y férricos que desprende el "inoxidable" acero SS 316. Para ello, se pasará por el sistema, en este orden, y a un flujo de 1 ml/min: 10 ml de agua destilada, 60 ml de isopropanol (que podría formar con el ácido nítrico un producto explosivo, exigiendo colectar la fase que sale del sistema en botellas separadas) y otros 30 ml de agua destilada. Después, se sustituye el inyector (manual o automático) por una unión de volumen muerto cero, se pasa ácido nítrico 1 M durante 10 minutos e, inmediatamente, 30 ml de agua destilada, cantidad suficiente hasta que la fase móvil no muestre acidez, comprobándolo a la salida del detector con, por ejemplo, un papel indicador de pH. Tras volver a emplazar el inyector en el sistema, se pasan 120 ml de H₂EDTA (ácido etildiamino-tetraacético) al 0,1 % y, por último, 30 ml de agua destilada. Alternativamente y solo para pasivar el inyector se puede pasar una solución quelante conjunta de Na₂EDTA al 0,2 % y NaH₂PO₄ también al 0,2 % en agua a un flujo de 1 ml/min durante no menos de dos horas en la posición de carga del inyector y otras dos horas en la posición de inyección. Opcionalmente este paso puede sustituirse pasando una solución de ácido nítrico 0,5 M a un flujo de 1 ml/min, durante 10 minutos en la posición de carga y 10 minutos en la de inyección.

Es posible pasivar más rápidamente (aunque menos rigurosamente) con 60 ml de ácido nítrico 6 N (aproximadamente 1/3 de ácido nítrico fumante en agua destilada) a un flujo de 1 ml/min, con los pasos previo y posterior de pasar agua hasta comprobar con un papel indicador de pH que la fase móvil ya no sale ácida. En este caso no se reemplaza el inyector durante la pasivación, permaneciendo la

³⁴ Small, H.: *Ion Chromatography*. Editorial Plenum Publishing, Nueva York, 1982.

mitad del tiempo que pasa el ácido nítrico en posición de carga y la otra mitad en posición de inyección, para pasivar también el bucle, si fuese de acero.

Los sistemas inertes deben montar toda su línea fluidica con material inerte (PEEK o titanio): los filtros de fase móvil de los reservorios, cabezales de las bombas, tubos, tuercas y férulas, inyector y su bucle, y celda del detector. A veces es difícil (e incluso imposible) encontrar columnas con paredes inertes, aunque las hay de acero recubierto con teflón o vidrio. Algunas bombas permiten cambiar fácilmente su cabezal (acero por PEEK o por titanio). Sin embargo, su sensor de presión muchas veces sigue siendo el mismo, en acero; algunas bombas disponen de sensores de presión especiales, otras los puentean y otras, simplemente, ignoran este hecho. Los sensores de presión inertes constan de receptáculos de PEEK, teflón o titanio rellenos de un líquido (normalmente agua), con una membrana en la zona de contacto con la fase móvil, membrana que transmite la presión de la fase móvil al líquido interno y éste al sensor de presión original de la bomba (de acero), soslayando la necesidad de sustituir este por otro inerte.

Respecto al manejo y mantenimiento de las bombas de pistón, siguiendo la máxima de que *«todo lo que se mueve se deteriora»*, la bomba es, sin duda, el módulo más susceptible de mantenimiento. Los “problemas” más comunes que el cromatografista puede esperar en las bombas de HPLC conllevan operaciones preventivas, en sus siguientes partes internas:

En primer lugar, por ser lo más frecuente, nos referiremos a los sellos de los pistones, arandelas de goma con una hendidura central (o dos aros concéntricos), donde un conjunto de “costillas” de acero (un simple muelle transversal) dota a los sellos de resistencia mecánica conservando su flexibilidad. Con el paso del tiempo, han de sustituirse los sellos de los pistones, pues al envejecer ya no sellan perfectamente la zona de retroceso del pistón, escapando gotículas de fase móvil. El fenómeno se aprecia enseguida, manifestando presión inestable, más en las bombas de dos cabezales, pues, lógicamente, un sello “se va” antes que el otro y la presión es estable hasta el instante en que embola el pistón cuyo sello está en mal estado, momento en que disminuye la presión.

En cuanto a los pistones, también pueden rayarse con el tiempo, sobre todo con sellos deteriorados, exhibiendo muescas longitudinales, apreciables con una lupa de relojero, otro de los útiles habituales del cromatografista. Antes de proceder a desarmar el cabezal puede confirmarse tal sospecha si persiste la inestabilidad de la presión tras cambiar los sellos y limpiar las válvulas. Un pistón puede rayarse por dos razones: por deficiencia mecánica o por haberse deteriorado el sello, obligando a penetrar el pistón en el ánima de la bomba ligeramente en diagonal, en vez de hacerlo perfectamente perpendicular (ambos casos son raros en bombas nuevas con sellos nuevos); la otra razón es la precipitación de tampón fosfato, empapado en fase móvil en el ánima y humedecido asimismo tras atravesar la barrera del piston seal, pero al evaporarse el disolvente (habitualmente

agua), incluso a temperatura ambiente, precipitan cristales fosfato, verdadera lija para retenes y pistones cuando una y otra vez penetran en el ánima de la bomba rozando el piston seal.

Otro componente a cuidar en las bombas son las válvulas antirretorno. Con el uso, incluso con fases móviles que reúnen todas las condiciones de pureza y limpieza, en el interior de las válvulas se forma una película que se adhiere a su bolita, impidiendo su movimiento normal de localización - deslocalización, manifestado, una vez más, como oscilaciones periódicas de la presión. Si ello sucede o, mejor aún, anticipándonos en acciones de mantenimiento preventivo, periódicamente se desatornillan las válvulas, se sumergen en un vaso de precipitados con agua, acetonitrilo u otro disolvente afín con la última fase móvil que bombeó la bomba (y que humedeció las válvulas). El vaso de precipitados con las válvulas y disolvente se sonica durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos. Si la contaminación la hubiese provocado bombear una fase móvil inmiscible con la anterior (por ejemplo, una fase orgánica apolar tras agua, que emulsionaría ésta) sin haber pasado por los intermedios necesarios (en el mismo ejemplo: agua, metanol, etanol, acetona, disolvente orgánico apolar), es necesario introducir sucesivamente 15 minutos en el baño de ultrasonidos el vaso de precipitados con la(s) válvula(s) dentro, con cada uno de esos líquidos y luego otra vez en orden inverso. Finalmente se vuelven a instalar las válvulas, limpias y operativas, en la bomba, desapareciendo el problema.

Es rara la aparición de problemas en los rodamientos de la bomba, aunque éstos, en ambientes húmedos, como sucede en los de las ruedas de los automóviles, pueden oxidarse y provocar transmisión irregular del impulso del motor, percibiéndose ruidos extraños en la bomba, que bombeará un flujo menor al dispuesto.

En todo caso, como acción de mantenimiento preventivo, se debe engrasar el motor de la bomba. Algunas bombas incluyen en su *kit* de accesorios suministrado con ellas un aceite especial para que siempre estén lubricadas. Hay que seguir cuidadosamente las instrucciones del fabricante, aplicando la cantidad de aceite en los sitios indicados, con la periodicidad sugerida.

Otra avería poco común, pero grave, es un “fallo de motor” de la bomba, que su *software* interno suele considerar ¡fallo electrónico! y que debe reparar un servicio técnico autorizado.

Respecto a la compatibilidad de materiales de pistones y sellos, las bombas de HPLC suelen montar “de fábrica” pistones cerámicos o de zafiro y sellos de grafito (GFP) o de polietileno (PE). Evidentemente, con el uso de la bomba, muchos usuarios sustituyen sellos y pistones por otros de distintos materiales, juzgando el cromatografista qué materiales de sellos y pistones son más adecuados para las distintas fases móviles utilizadas (tabla 4).

Tabla 4. Pistones y sellos de bombas de HPLC.

Fase móvil	Pistón cerámico		Pistón de zafiro	
	sello GFC	sello PE	sello GFC	sello PE
Fosfato/metanol (30-70)	+	(-)	(-)	-
Fosfato/metanol (50-50)	+	-	(+)	(+)
TFA 0,1%/agua	(+)	+	+	+
TFA 0,1%/acetonitrilo	+	+	+	+
Ácido fosfórico/solv.org	-	(-)	-	(-)
Agua	(+)	+	+	+
Metanol	+	(+)	+	(+)

+, recomendable; (+) recomendable con reservas; - no recomendable; (-) no recomendable, aunque puede usarse con reservas.

TFA: ácido trifluoroacético.

Las fases móviles polares requieren sellos de grafito, mientras que las fases móviles apolares exigen sellos de polietileno. Por ejemplo, los pistones cerámicos con fases móviles acuosas de tampón fosfato 0,1 M / metanol montan idealmente sellos de grafito, tanto con pistones de polietileno como de zafiro, en ambos casos durante periodos cortos; por el contrario, los sellos de polietileno resultan poco recomendables, pues enseguida se deterioran y aparecen fugas. Sin embargo, dado que es improbable que precipite el tampón fosfato en las fases móviles acuosas de tampón fosfato / metanol cuando el porcentaje de éste no supera el 50%, es óptimo usar sellos de grafito con pistones cerámicos, estando especialmente contraindicados los sellos de polietileno sobre los mismos pistones cerámicos y mismas fases, aunque los pistones de zafiro sí aceptan indistintamente sellos de grafito o de polietileno, con durabilidad limitada.

Las fases móviles acuosas de ácido trifluoroacético 0,1% / agua admiten todas las combinaciones de sellos sobre pistones cerámicos o de zafiro, recordando que los sellos de grafito sobre pistones cerámicos van a precisar lavado externo. Igualmente, ambos tipos de sellos, de grafito o de polietileno, son enteramente aptos sobre pistones de zafiro, tolerando también dichas fases móviles de ácido trifluoroacético 0,1% / acetonitrilo sobre pistones cerámicos o de zafiro.

En el caso de fases móviles acuosas de ácido fosfórico / solvente orgánico, en cuyos gradientes de elución son preferibles los gradientes en baja presión, el ácido fosfórico precipita fácilmente con altos porcentajes del solvente orgánico, siendo siempre problemáticas para pistones y sellos, permitiendo usar sellos de polietileno con pistones cerámicos o de zafiro solo durante periodos cortos y con cir-

cuito de lavado de la bomba. Por contra, los sellos de grafito están contraindicados para este tipo de fases móviles, pues enseguida se deterioran, apareciendo fugas.

Las fases móviles de agua al 100% son ideales los pistones cerámicos, con sellos de polietileno y también grafito, aunque la durabilidad de éstos es inferior. Con pistones de zafiro, también bombeando 100% de agua, pueden emplearse indistintamente sellos de grafito o de polietileno, mientras que con fases móviles 100% de metanol es mejor utilizar sellos de grafito, independientemente del material de los pistones y solo recurrir a los sellos de polietileno si se acepta su menor duración.

Por otra parte, en las bombas de pistón suelen aparecer cuatro tipos de problemas, de los cuales citaremos, en primer lugar, la presencia de partículas sólidas provocadas por fases que contienen sales o sustancias que precipitan fácilmente por hallarse cerca de la zona de saturación, como los tampones borato, o cuando se realizan gradientes en fase reversa y la fase orgánica se incorpora sobre una fase acuosa rica en sales o ácidos.

Otro problema común es causado por las partículas procedentes del sello de pistón, cuyo uso y rozamiento cíclico provoca que se desprendan de él micropartículas negras características, hecho considerado inevitable, razón por la que muchas bombas montan un último filtro justo antes de la salida de la fase móvil.

El tercer y último problema usual es la presencia de burbujas en la fase móvil, inconveniente que fácilmente detectado por las oscilaciones periódicas y relativamente violentas de la línea de base, en el llamado "*efecto peine*", frecuentes e irregulares subidas y bajadas de la señal sobre la línea de base, de mínima duración. Las fases móviles ya desgasificadas pueden exalar microburbujas, mostrando líneas de base solo levemente más ruidosas que en condiciones normales. También se observan oscilaciones aleatorias (no cíclicas) de la presión, indicativas de problemas en los sellos o en las válvulas. La presencia de burbujas puede comprobarse visualmente en las tuberías transparentes de teflón, siendo, evidentemente, imposible verlas en tuberías de otros materiales. Las burbujas (pero no las microburbujas) pueden apreciarse introduciendo el tubo de desecho final tras el detector, en un vaso por debajo del nivel del disolvente desechado.

Las burbujas pueden aparecer en la bomba por cuatro causas: porque *entran* previamente en la bomba, porque *se generan* en la misma bomba, porque ya *están* dentro de la bomba o porque alguna de las *conexiones* de los tubos de entrada y salida de la bomba está poco apretada. En el primer caso, cuando las burbujas entran primeramente en la bomba procedentes de fases móviles insuficientemente desgasificadas, el remedio obvio es desgasificar la fase móvil. En el segundo caso, las burbujas se generan en la misma bomba, en fases móviles mezcla, realizadas en sistemas de formación de gradientes (más en los de baja presión que en los de alta presión), que pueden sufrir contracción de volumen, apre-

ciable, por ejemplo, en mezclas isovolumétricas metanol:agua, desde proporciones 45:55 hasta 55:45. La solución, obvia también, es evitar trabajar en esas proporciones de eluyente, si la aplicación lo “resiste”; cambiar de solventes (acetonitrilo en lugar de metanol) o añadir algún modificador de la polaridad de la fase móvil para alterar las proporciones, por ejemplo, adicionar un pequeño porcentaje de tetrahidrofurano en el metanol. En el tercer caso, las burbujas ya están dentro de la bomba, ocupando recovecos en las juntas y conexiones fluidicas, que comprobaremos aflojando ligeramente la tuerca donde sospechamos la presencia de burbujas mientras la bomba está bombeando: si comienza a salir una gota transparente, la conexión estaba exenta de burbujas; pero si la gota emerge como un spray, la aflojaremos más, hasta que el líquido que brota sea translúcido y, finalmente, apretaremos la tuerca. Así lo haremos con todas y cada una de las conexiones mientras la bomba sigue funcionando en régimen normal. Finalmente, y como cuarto y último problema habitual relativo a las burbujas, puede que alguna de las *conexiones* de los tubos de entrada y salida de la bomba esté escasamente apretada y, curiosamente, en vez de producir una fuga, sifona aspirando aire. Esto es difícil de detectar, pero cuando se ha localizado la junta problemática, basta con apretarla un poquito más y el problema estará resuelto.

Bombas de jeringa

En ellas un tornillo sin fin mueve mecánicamente un pistón, en un ánima total (“*jeringa*”), comprimiendo el volumen de fase móvil que llena el ánima (figura 17). Operan, como su mismo nombre indica, como una jeringa: el pistón, movido por un tornillo sin fin (impulsado, a su vez, por el motor de la bomba) avanza por el cilindro cerrado del ánima. El motor suele ser un motor de pasos, empleando algunos modelos motores continuos de magneto permanente y de alta potencia. Las bombas de jeringa suelen tener un gran volumen interno del ánima (50 a 500 ml), liberando flujos constantes durante largos periodos con una precisión muy alta. Precisamente su principal ventaja es la estabilidad del flujo que liberan, carente de pulsaciones, mientras que sus dos principales desventajas son su elevado precio y la discontinuidad que ocurre al final de su recorrido, evitada montando sistemas con dos bombas, que funcionan análogamente a los dos cabezales de una bomba de doble pistón: cuando una bomba termina su recorrido, bombea la otra, y así sucesivamente.

A pesar de sus ventajas, solo el 6% de las bombas de jeringa se utiliza en técnicas cromatográficas, principalmente en HPLC capilar y LC-MS. El 52% del total de las bombas de jeringa se emplea en sistemas de alimentación de reactores, en condiciones extremas; otro 20% está dedicado a estudios de dureza de materiales, bombeando una fase líquida durante largos periodos (semanas, meses) sobre el material cuya resistencia se estudia (rocas, asfaltos) o infiltrando fluidos en suelos, frecuente en la industria de petróleos; otro 13% se emplea en aplicaciones

de fluidos supercríticos³⁵; un 6% en aplicaciones fluidicas especiales distintas de la cromatografía, y el 3% restante en otros campos.

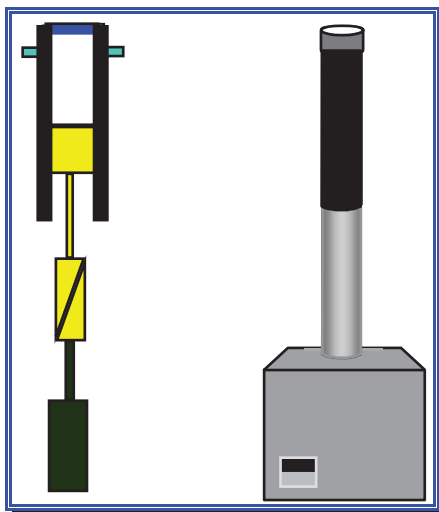


Figura 17. Esquema y bomba de jeringa.

Las bombas de jeringa presentan especificaciones impresionantes: precisión de pocos nl, ventaja inherente al diseño de tornillo sin fin, que las exime, en su principal ventaja, de presentar pulsaciones, y su asegurada estabilidad en el tiempo, pues pueden bombear flujos con una variación ¡anual! del 0,001%. Al tiempo, pueden bombear flujos extremos, desde muy pequeños (nl/min) hasta muy grandes (cientos de ml/min). Admiten solventes de cualquier viscosidad, desde fluidos supercríticos hasta asfaltos en caliente. Su morfología de grandes cilindros verticales permite fácil termostatación externa, generalmente con camisas de circulación de agua. Además, pueden trabajar a flujo constante y a presión constante.

Dado que su principal desventaja es la necesidad de parar, cerrar válvulas y volver a cebarlas al final de su recorrido, existen, como hemos anticipado, configuraciones con dos bombas que garantizan aporte continuo de flujo. También hay sistemas de dos bombas para realizar gradientes (o adición del modificador en aplicaciones de extracción supercrítica³⁶, figura 18) e, incluso, configuraciones de tres bombas, dos de las cuales garantizan aporte continuo de flujo mientras la tercera realiza gradientes.

³⁵ *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Editorial Chromatography Conferences, Inc., Nueva York, 1990.

³⁶ Taylor, L.T.: *Supercritical Fluid Extraction*. Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, 1996.

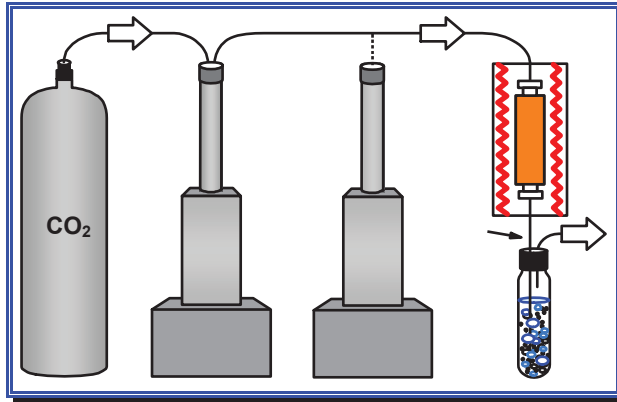


Figura 18. Dos bombas de jeringa en un sistema de extracción en fase supercrítica: la primera bomba (izquierda) bombea CO₂ de la bala y la segunda (derecha) un modificador orgánico polar (metanol).

Otras bombas

Mencionaremos también otras bombas eventualmente empleadas en HPLC, primariamente usadas en cromatografía de baja y media presión, en cromatografías LPLC y MPLC:

Bombas de intensificador neumático. En ellas la presión de un gas acciona un pistón de gran superficie que, a su vez, acciona otro de menor superficie: conservándose la igualdad de fuerzas se intensifica la presión del segundo pistón, amplificada según sea la relación de áreas de ambos pistones (por ejemplo, 20:1 ó 70:1). El sistema libera fase móvil líquida a presión constante mientras se mantenga constante la presión del aire, resultando el flujo directamente proporcional a la resistencia de la columna (e inversamente a su permeabilidad) al paso de la fase móvil. Por ello, el flujo varía en condiciones de gradientes de elución o al cambiar la temperatura; incluso en operaciones isocráticas e isotermas, el flujo puede variar por la inestabilidad del relleno de fase estacionaria o la obstrucción de los filtros en línea. En definitiva, el flujo solo será constante sin tales efectos, aunque con el inconveniente de la interrupción del flujo en cada embolada, reflejado en el cromatograma (en el detector) como un considerable bandazo. Si bien el uso de amortiguadores de pulsos minimiza el problema, este persiste (y muy apreciablemente) al trabajar con flujos bajos, pues entonces la bomba ha de iniciar su ciclo cada poco tiempo. Con su uso continuado, aparece la inevitable erosión mecánica de los pistones, debida a las partículas abrasivas que contienen los solventes insuficientemente filtrados, además de por el propio funcionamiento de la bomba, rozamiento, etc.

Bombas de intensificador hidráulico. Este tipo de bombas, conocidas como “bombas de diafragma”, se utilizó bastante en HPLC con bastante éxito (figura 19). Dejadas de fabricar en 1992, aún perviven numerosos cromatógrafos funcionando con ellas. Su principio de trabajo, análogo al de las bombas de intensificador neumático, se diferencia de estas en que la presión que mueve el primer pistón (émbolo primario) es originada por un líquido en vez de por un gas, como su propio nombre denota. Su talón de Aquiles son las fugas del líquido intermedio (un aceite), provocando reparaciones costosas. En el capacitor hidráulico los cambios de volumen (ΔV_s) y, por tanto, del flujo, derivan de los cambios de presión en el capacitor, definidos por el volumen de bomba (V_c) y la presión generada (P_s):

$$\Delta V_e = cte \cdot \Delta P_s \quad (5)$$

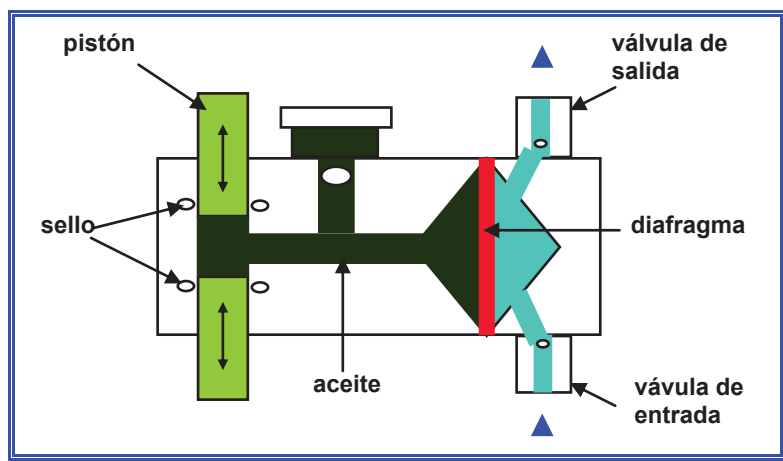


Figura 19. Bomba de diafragma.

Bombas de presión directa mediante un gas. Algunos arcaicos sistemas de bombeo de baja presión (LPLC) y media presión (MPLC) montan este tipo de bombas, disponiendo una cámara sobre un reservorio para la fase móvil, donde llega un gas a presión (generalmente desde una bala de gas), generando gran constancia del flujo y fiabilidad. Sin embargo, su principal desventaja reside en que para cambiar de fase móvil se debe desmontar el sistema, introducir nueva fase móvil y ensamblar de nuevo, tediosa operación que limita estas bombas a técnicas de LPLC (para fraccionamiento de muestras biológicas) y de cromatografía *flash* (para segmentación de muestras en procesos de síntesis).

Sea del tipo que sea, la bomba de HPLC debe de proporcionar un flujo exacto, pues la verdadera medida de la elución la otorga el difícilmente medible volumen de retención (V_R), expresado en tiempo de retención (t_R) al suponerse un flujo constante ($t_R = V_R \cdot F$). Ello exige tres comprobaciones en la bomba: el ruido del flujo bombeado, el error de flujo y la deriva del flujo.

Tabla 5. Tipos y causas del ruido de flujo en las bombas de HPLC.

Eventuales	Existencia de burbujas en la fase móvil Fugas Sello del pistón mal ajustado Válvulas en mal estado Compresibilidad del solvente Contracción de volumen del solvente
Constantes	Rozamiento mecánico de sus partes internas Holgura entre sus piezas móviles
Ajenas	Debidas al sensor de presión Debidas al detector Debidas al sistema de registro

El *ruido de flujo* es el rizado u oscilación de la línea de base. Siempre, por escaso que sea, el flujo salido de la bomba muestra oscilación en el punto donde se mide: en el sensor de presión de la bomba (en un punto de vista “teórico”) o en el detector (en un punto de vista “práctico”). La oscilación del flujo impide su verdadera constancia y puede deberse a varias causas (tabla 5), pudiendo estimarse gráficamente de dos formas: sobre el cromatograma (muchas bombas poseen salida continua de la señal de la presión para un registrador o para el *software* cromatográfico) o a partir de la señal del detector sobre el mismo cromatograma. El *error de flujo* es un error absoluto que estima la diferencia del flujo liberado por la bomba respecto al ordenado en su electrónica y puede deberse a varias causas (tabla 6).

Tabla 6. Causas de error del flujo.

Burbujas en fases móviles sin desgasificar
Burbujas en tubos de reservorios
Fugas
Efectos del diámetro de tubo
Presencia de partículas sólidas en el solvente

Finalmente, la *deriva de flujo* puede tornar en tiempos largos la línea de base ascendente, descendente o caótica, mucho más que lo esperado por el solo ruido de flujo. La deriva puede alterar los tiempos de retención (y, por tanto, los resultados cualitativos) y de áreas (y, por tanto, los resultados cuantitativos). También puede deberse a distintas procedencias (tabla 7).

Tabla 7. Causas de deriva del flujo.

Gradientes de elución o de flujo
Cambios de temperatura del entorno
Cambios de temperatura de la columna
Cambios de viscosidad de la fase móvil
Dilatación térmica
Aparición de fugas
Obturación progresiva de la columna
Evaporación parcial de fase móvil (mezcla) en el reservorio

Sistemas de gradientes

Los *gradientes de elución* modifican la composición de la fase móvil durante el cromatograma, generalmente de forma gradual, con dos propósitos: separar picos poco resueltos y, por otra parte, acortar los tiempos del análisis (figura 20). El procedimiento habitual consiste en aumentar durante el cromatograma el porcentaje de uno o varios solventes, de naturaleza menos lejana a la fase estacionaria que la fase móvil inicial.

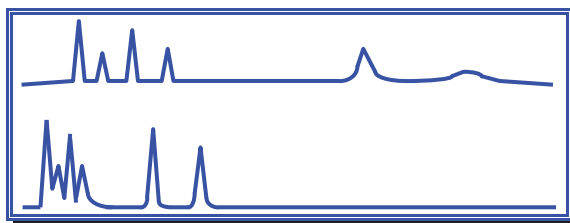


Figura 20. Dos cromatogramas isocráticos en columna C18; arriba, una fase móvil metanol:agua 60:40 causa tiempos de retención inadmisiblemente largos; debajo, una fase móvil metanol:agua 80:20, más apolar, causa una elución más rápida, pero menor resolución en la zona inicial.

Los equipos de HPLC (y la forma de trabajar con ellos) responden básicamente a dos configuraciones: isocráticas y con gradientes. Los equipos y análisis isocráticos (*isos*, igual; *cratos*, poder) utilizan la misma fase móvil a lo largo del cromatograma, con el mismo poder de elución y, por tanto, requieren una sola bomba. Los equipos con formación de gradientes de elución permiten variar la fase móvil durante el análisis, precisando un controlador programable, generalmente un *software*, donde se programa el tiempo y composición de la fase móvil (tabla 8). El 45% de las aplicaciones se realizan con gradientes de elución.

Tiempo (min)	%B	Zona
0	0%	Inicial
5	0%	Meseta inicial
10	40%	Final
12	40%	Meseta final
13	0%	Retorna
15	0%	Listo para el siguiente análisis

En los gradientes binarios el solvente de polaridad más opuesta a la columna se designa como A, denominándose “modificador” el menos opuesto (B). Por ejemplo, en fase reversa con eluyente agua - metanol, el agua, más polar y opuesta a la columna, se designa como A y el metanol, menos polar, como B. El porcentaje de A no suele especificarse, y se establece diferencialmente como $100 - \%B$. El gradiente se define en una tabla de tiempos y porcentajes de B, siendo habitual representar gráficamente, superpuesto al cromatograma, el porcentaje de B (%B) frente al tiempo (figura 21).

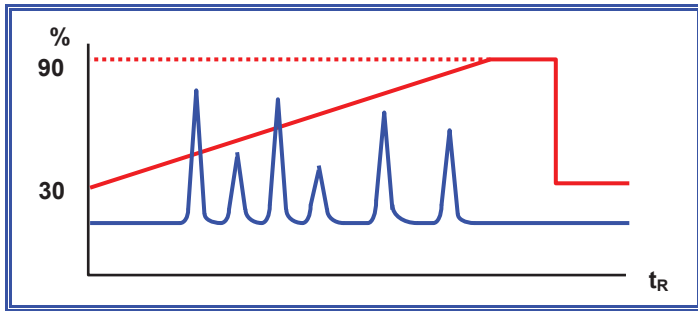


Figura 21. Cromatograma con el gráfico superpuesto de un gradiente binario, que representa en ordenadas el porcentaje de modificador (en fase reversa el menos polar).

Cada punto del gradiente es definido por dos coordenadas: el tiempo y el porcentaje de modificador B (en %, figura 22). En los gradientes ternarios o cuaternarios se especifica también, junto al % de B, la composición del tercer y cuarto solvente (% de C y % de D). Los sistemas con formación de gradientes ternarios en alta presión (con tres bombas) son raros y caros, y como la composición del tercer solvente no suele sobrepasar el 5%, podría asumirse con una ligera variación binaria de A o de B. Si, con todo, fuese imprescindible un gradiente ternario, la mejor elección instrumental será un equipo con gradientes (cuaternarios) en baja presión.

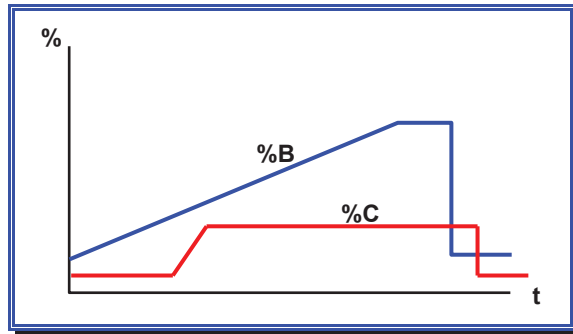


Figura 22. Gradiante ternario: el porcentaje de A siempre se establece por defecto hasta el 100%.

Juzgamos conveniente comenzar el gradiente con una meseta, en cuyo transcurso se realiza la inyección en condiciones de elución más estables que sobre la pendiente del gradiente. Tras la variación creciente del modificador suele definirse otra meseta con el porcentaje más alto de modificador, reduciéndose al finalizar el gradiente el porcentaje de B, manteniéndole en las mismas condiciones que al inicio del cromatograma para enlazar con el siguiente análisis, e un tiempo de estabilización suficiente para equilibrar la columna y el detector. Así, el sencillo gradiente lineal de un tramo se ha convertido, apenas sin sentir, ¡en un perfil de 5 segmentos! La pendiente del gradiente afecta a la vida de la columna y es mejor que sea lo más tendido posible, con menor pendiente.

La variación de la fase móvil durante el gradiente (el “perfil del gradiente”) puede hacerse de forma lineal o curva (con perfil cóncavo o convexo), que los equipos realizan como múltiples segmentos lineales de distinta pendiente (figura 23).

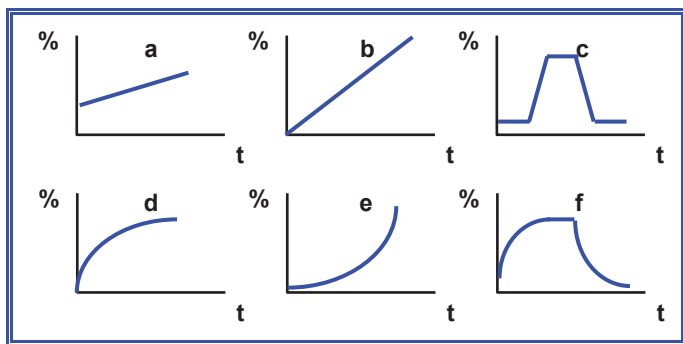


Figura 23. Perfiles de gradientes de elución: (a) lineal, (b) lineal de 0 a 100%, llamado “gradiente universal”, (c) lineal por etapas, (d) cóncavo, (e) convexo, (f) mixto.

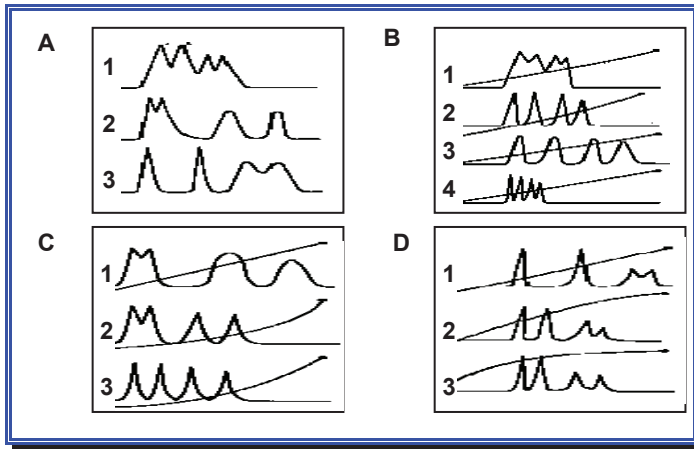


Figura 24. Cuatro situaciones paradigmáticas al aplicar gradientes.

La figura 24 esquematiza cuatro situaciones paradigmáticas con gradientes. El gráfico A refleja la situación de partida isocrática: A-1, situación inicial; A-2, cambiar la fase móvil por otra menos lejana a la fase estacionaria empeora la resolución al comienzo del cromatograma; A-3, otra fase móvil logra buena resolución inicial, pero deficiente al final del cromatograma. A su vez, el gráfico B, refleja otras cuatro situaciones de gradiente binario: B-1, los picos eluyen demasiado pronto, con mala resolución; B-2, un gradiente menos drástico los resuelve; B-3, un gradiente aún más tendido ensancha los picos; B-4, con un gradiente más agresivo y con mayor pendiente los picos eluyen demasiado pronto, impidiendo su total separación. El gráfico C muestra gradientes cóncavos, cuando un gradiente lineal es insuficiente: C-1, situación de partida con gradiente lineal; C-2, un gradiente curvo con menor pendiente inicial y mayor al final solo resuelve los últimos picos; C-3, un cierto retardo previo (*delay*) al gradiente logra resultados óptimos. Por último, el gráfico D muestra gradientes convexos, útiles cuando un gradiente lineal es insuficiente: D-1, situación de partida con gradiente lineal; D-2, una parte cóncava prematura es agresiva; D-3, la zona cóncava final resulta adecuada en muchos casos.

Los gradientes de elución pueden clasificarse instrumentalmente en “gradientes en alta presión”, montando el cromatógrafo dos bombas (raramente tres), cada una de las cuales bombea un solvente distinto para mezclarlos luego, ya en alta presión, en una cámara de mezcla y “gradientes en baja presión”, donde una válvula previa a la bomba, unida a otros tantos reservorios de fases móviles, alterna la succión variable de los mismos a presión atmosférica antes de bombearlos una única bomba (figura 25).

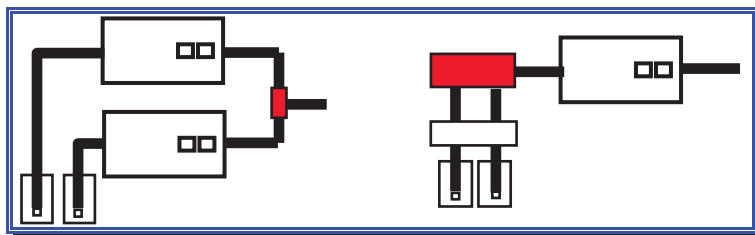


Figura 25. Sistemas de gradientes: izquierda, en alta presión (con dos bombas); derecha, en baja presión (con una bomba y una válvula de selección previa a un mezclador o *mixer*).

En los sistemas de bombeo con formación de gradientes en alta presión cada bomba impulsa una fase móvil a un flujo dado, variando la composición de la fase móvil en el gradiente al modificar el flujo individual de cada bomba (tabla 9). Por el contrario, en los sistemas de bombeo con formación de gradientes en baja presión la válvula proporcional previa, unida a tantas fases móviles como canales posee la válvula, se abre más o menos tiempo a una(s) de ella(s), llevándolas como vagones líquidos sucesivos a la bomba, que las impele al resto del sistema (inyector). Inicialmente las válvulas fueron binarias, luego ternarias y las actuales suelen ser cuaternarias: unidas, por tanto, a cuatro fases móviles, forman junto a la bomba las denominadas “*bombas cuaternarias*”, cuyo precio supera, evidentemente, el de una bomba isocrática.

Tabla 9. Ejemplo de gradiente binario en alta presión.

Tiempo (min)	Flujo total (ml/min)	Flujo bomba A (ml/min)	Flujo bomba B (ml/min)	%B (%)
0	1,0	1,0	0,0	0
5	1,0	1,0	0,0	0
10	1,0	0,6	0,4	40
12	1,0	0,6	0,4	40
13	1,0	1,0	0,0	0
15	1,0	1,0	0,0	0

En los sistemas de gradientes binarios en alta presión los líquidos bombeados por cada bomba se juntan en un punto común, que, de más completo a más sencillo, puede ser un mezclador dinámico (con agitación magnética interna), un mezclador laberíntico (el flujo recorre un circuito más o menos tortuoso, a veces, de diversos volúmenes a elegir), un mezclador en “T” (que puede ser una simple T de volumen muerto cero, existiendo algunas cuyos canales de entrada presentan muescas para tornar el flujo turbulento helicoidalmente, que aseguran mezclas más homogéneas al toparse ambos flujos en sentido contrario). El volumen interno

del mezclador o cámara de mezcla resulta crítico: un volumen mayor homogeneiza mejor la mezcla (figura 26), pero aporta mayor difusión y retardo del gradiente.

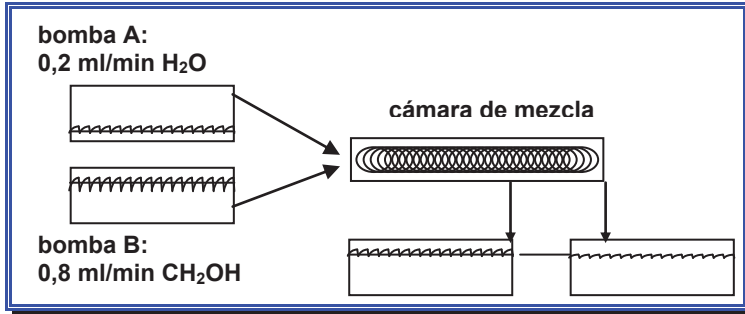


Figura 26. Volumen de la cámara de mezcla y su efecto sobre la línea de base: un volumen mayor mejora el ruido de la línea de base.

En principio, un sistema de gradientes de alta presión es la mejor elección, pues mezcla en la fase móvil resultante dos solventes en las mismas condiciones (alta presión) con que llevará luego la muestra del inyector a la columna. Asimismo presenta menor trayecto fluídico que los sistemas de gradientes en baja presión, con menor difusión del gradiente (y mayor precisión del mismo) y menor tiempo muerto (retardo desde que se ordena en el *software* o controlador hasta que llega a la columna) entre la cámara de mezcla del sistema de bombeo hasta el inyector, mínimo al unir ambos con un corto tubo capilar *ad hoc*.

La composición de la fase móvil en un sistema de gradientes en alta presión depende del flujo liberado por ambas bombas. Por ejemplo, si el flujo total es 1,000 ml/min y la composición de la fase móvil un 10% de B, la primera bomba libera 0,900 ml/min y la segunda 0,100 ml/min. De aquí surge una primera limitación de los sistemas en alta presión: la precisión del gradiente depende del flujo aplicado y, por tanto, de la especificación de flujo mínimo (límite) de las bombas. Por ejemplo, para un flujo total de 0,100 ml/min y composición del 15% de B, la primera bomba bombeará 0,085 ml/min y la segunda 0,015 ml/min; si ambas bombas pueden bombear flujos mínimos de 0,001 ml/min, el gradiente tendrá una precisión de $\pm 0,001$, es decir, del 1%. Ahora bien, si el flujo mínimo de cada bomba es 0,005 ml/min, el gradiente tendrá una precisión de $\pm 5\%$, pero si el flujo mínimo de cada bomba es 0,01 ml/min, la precisión será de $\pm 10\%$. Así, en los tres supuestos anteriores, programando un gradiente lineal de 0 a 100% con flujo total de 1,000 ml/min, las bombas que poseen un flujo mínimo de 0,001 ml/min lo realizarán como 1.000 escalones sucesivos crecientes, 200 escalones en las bombas que poseen un flujo mínimo de 0,005 ml/min y 100 escalones en las bombas que poseen un flujo mínimo de 0,01 ml/min. Y si el flujo total fuese 0,100 ml/min, los gradientes

mostrarán respectivamente 100, 20 y 10 escalones, rozando lo admisible cromatográficamente³⁷.

Por el contrario, los sistemas de bombeo con formación de gradientes en baja presión forman el gradiente, como vimos en la figura 25, en una válvula proporcional de pasos antes de ser bombeado por una única bomba, abriendo la válvula proporcional un tiempo dado las respectivas vías conectadas a cada solvente, liberando vagones sucesivos de solventes. Los sistemas de gradientes a baja presión más sofisticados pueden controlar el tiempo o frecuencia con que cambia la válvula y se “abre” a cada solvente, regulando así el volumen de cada vagón líquido. En todo caso, conviene homogeneizar la fase móvil resultante emplazando tras la bomba un homogeneizador laberíntico o un mezclador con agitación interna.

La mayoría de las válvulas comerciales formadoras de gradientes en baja presión son de cuatro vías, pudiendo conectarse, por consiguiente, a cuatro reservorios, razón por la que se denominan indistintamente “LPGE” (*Low Pressure Gradient Elution*), “sistemas cuaternarios” o “bombas cuaternarias”. Con ello ofrecen como primera ventaja respecto a los gradientes en alta presión (binarios) el número de solventes cuya proporción puede variarse durante los análisis, además de poder realizar otras funciones, como equilibrar la columna, dejarla en una fase adecuada al terminar los análisis, hacer lavados de la columna, etc.

Otra ventaja, más supuesta que real, de los sistemas de gradientes en baja presión es su precio. Ciertamente es que una válvula formadora de gradientes cuesta aproximadamente la tercera parte que una bomba de HPLC. Pero los sistemas de gradientes en baja presión con máximas prestaciones deben añadir un buen mezclador-homogeneizador y un desgasificador, pues los gradientes y mezclas realizados en baja presión *exigen* desgasificar las fases móviles *on-line*, dado que el principal inconveniente operativo de la formación de gradientes en baja presión es la formación de burbujas de gas (aire) disuelto en las fases móviles, que aflora tras mezclarlas y bombearlas luego, mucho más que cuando se mezclan a alta presión, haciendo indispensable desgasificar en continuo. Con ello, el coste de válvula, mezclador y desgasificador, aunque inferior, acerca el precio total de un sistema de gradientes en baja presión al de un sistema en alta presión.

Los gradientes en baja presión presentan menor precisión (difusión del gradiente) y mayor retardo del gradiente (figura 27) que los realizados en alta presión, por su mayor volumen muerto entre el punto de mezcla y el inyector. Excepto por su precio y capacidad de realizar gradientes con 4 (ó 3) canales, cromatográficamente siempre son ventajosos los sistemas en alta presión, que presentan menor difusión de los gradientes, que son más precisos (salvo a flujos muy bajos), homogéneos y con menor retardo, y no suelen presentar el problema de las burbujas,

³⁷ Snyder, L.R. y Dolan, J.W.: *High Performance Gradient Elution*. Editorial John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

excepto con determinadas composiciones de fase móvil. Sin embargo, el talón de Aquiles de los sistemas en alta presión, aparte de su precio, es que la precisión del gradiente depende del flujo total, factor limitante, especialmente a flujos muy bajos (tabla 10).

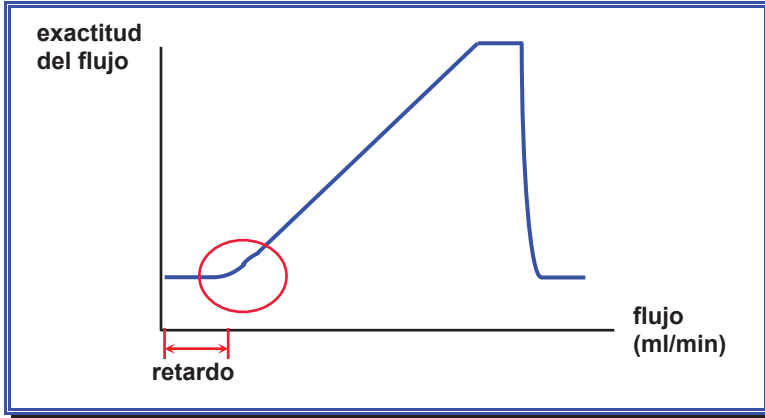


Figura 27. Gradiente agua-fase acuosa con 0,1% de acetona: desde “ordenar” la ejecución del gradiente, transcurre un retardo, necesario para atravesar la línea fluidica hasta que el detector acusa los cambios. La difusión redondea la pendiente en su inicio.

Tabla 10. Comparación de sistemas de gradientes: +, adecuado; -, poco adecuado.

Parámetro	En alta presión	En baja presión
Burbujas		-
Flujos muy bajos	-	
Difusión	+	
Flexibilidad	+	+
Homogeneidad		
Mantenimiento	-	-
Número de solventes		+
Precio		+
Precisión	+	
Retardo del gradiente	+	

Ambos sistemas, en alta y baja presión, son, ciertamente flexibles: los sistemas binarios en alta presión, porque poseen dos bombas y en un momento dado pueden desdoblarse en dos sistemas isocráticos; los sistemas en baja presión, porque poseen mayor número de canales y solventes. En ambas configuraciones el mantenimiento es un factor a tener en cuenta. En los sistemas de gradientes en alta presión, al montar dos bombas, el número de cuidados relativos a sellos, pis-

tones, válvulas y bombas en sí se multiplica por dos. En los equipos con gradientes en baja presión el mantenimiento solo es el de una bomba, pero alcanza también a la válvula formadora de gradientes, el mezclador-homogeneizador (que suele llevar filtros intermedios, susceptibles de obturarse), además del forzoso desgasificador.

Sea del tipo que sea, siempre es deseable un sistema de gradientes, incluso para aplicaciones isocráticas, donde muchas veces la fase móvil es una mezcla de dos solventes. Un equipo con gradientes trabajando en modo isocrático realiza la mezcla con precisión y exactitud constante, mientras que en los sistemas isocráticos (con una sola bomba) el analista debe realizar la mezcla manualmente, en una probeta, procedimiento sujeto a posibles variaciones (si es verano o invierno, la temperatura provocará dilatación de los líquidos y de la misma probeta; el modo de enrasar por parte del usuario, etc.). Como siempre que se compara un aparato con un analista, es posible que un experto consiga mejor precisión y exactitud, pero un aparato lo hará siempre igual, sin error humano, que, como sabemos de sobra, es aleatorio. Más aún: puede que un equipo desajustado realice una mezcla inexacta, por ejemplo, 68:32 en vez de 70:30, proporción que, en tal caso, podrá corregir el *software* o controlador del sistema las veces que sean precisas hasta que el cromatograma resulte conforme, pero ya *siempre* la mantendrá igual. La electrónica y *software* de los equipos permiten ligar periodos isocráticos con gradientes, pre-programados o definidos por el analista, lineales, cóncavos o convexos. Todo es posible, sin olvidar que lo más sencillo siempre es lo más efectivo, y lo más sencillo es un gradiente lineal que lleve a la columna una fase móvil con poder de elución linealmente creciente (LSS, *Linear Solvent Strength Gradient*), donde los valores de capacidad (k') de los analitos son fácilmente predecibles y extrapolables. Otros gradientes emplean fases móviles politípicas, utilizando varios modos cromatográficos (SEC, IEC, interacción hidrofóbica, afinidad) en una misma columna, cuyo relleno suele ser una resina hidrofóbica rígida macroporosa, recubierta por una fase estacionaria orgánica ligada covalentemente, variando el solo cambio de fase móvil el modo de separación, para lograr así la resolución deseada.

Tabla 11. Parámetros cromatográficos con y sin gradientes.

	con gradientes	sin gradientes
Tiempo de retención	$t_R = t_0(1 + k')$	$t_R = t_0 k'_{1/2} \ln \frac{k'_0}{k'_{1/2}}$
Anchura de pico	$\sigma = V_m(1 + k')\sqrt{N}$	$\sigma = \frac{1}{2}V_m(1 + k'_{1/2})\sqrt{N}$
Resolución	$R = \frac{\sqrt{N}}{4}(\alpha - 1) \frac{k'_2}{1 + k'_2}$	$R = \frac{\sqrt{N}}{4}(\alpha - 1) \frac{k'_{1/2}}{1 + k'_{1/2}}$
Capacidad	$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$k' = \frac{t_G}{\Delta\phi S t_0} = \frac{t_G F}{\Delta\phi S V_m}$

Con y sin gradientes los principales parámetros cromatográficos se estiman de distinto modo (tabla 11), resultando difícil predecir los resultados finales con gradientes, por lo que habitualmente se determinan las condiciones óptimas del análisis en régimen isocrático mediante inyecciones sucesivas de un patrón (y rara vez de la muestra), comenzando con la fase móvil más afín. Por ejemplo, en fase reversa se podría comenzar con un 100% de acetonitrilo, luego un 90% de acetonitrilo en agua, un 80% de acetonitrilo en agua y así hasta que los analitos queden excesivamente retenidos, con valores muy altos del factor de retención (k'). Idealmente, k' debe hallarse entre 1 y 20, mucho mejor entre 2 y 10. La retención puede predecirse en función del factor de retención del analito en 100% de agua (k'_{H_2O}), una constante (S) propia de cada analito (que toma un valor cercano a 4 en moléculas pequeñas, de peso molecular inferior a 1.000) y del porcentaje del solvente B (Φ), en una ecuación binaria que puede resolverse simplemente con dos inyecciones en modo isocrático, difiriendo solo en el porcentaje del disolvente B, procedimiento que constituye la base de algunos *softwares* comerciales de optimización³⁸. De esta forma pueden calcularse S y k'_{H_2O} , aunque para tal fin suelen hacerse tres inyecciones:

$$\log k' = \log k'_{H_2O} S \Phi \quad (6)$$

Con gradientes, el factor de retención sufre cambios análogos (y, por tanto, el cromatograma), pudiendo definirse el factor de retención (k') a partir del tiempo del gradiente (t_G), flujo (F), volumen columnar (V_M), el intervalo del gradiente ($\Delta\%B$) y la citada constante específica de cada muestra (S):

$$k' = \frac{t_G F 100}{V_M S \Delta\%B} \quad (7)$$

Frecuentemente se realizan inyecciones de exploración de los gradientes³⁹. Si, como acabamos de ver, en condiciones isocráticas solamente dos (o tres) inyecciones pueden predecir qué fuerza del solvente proporciona óptima capacidad, con gradientes:

$$t_G = \frac{k' V_M S \Delta\%B}{100F} \quad (8)$$

³⁸ Glajch, J.L. y Snyder, L.R., Eds: *Computer-assisted Method Development for High Performance Liquid Chromatography*, Editorial Elsevier, Amsterdam, 1990.

³⁹ Schoenmakers, P.J.: *Optimization of Chromatographic Selectivity, A Guide to Method Development*. Editorial Elsevier, Amsterdam, 1986.

En condiciones normales y columnas analíticas:

$$t_G = \frac{20V_M \Delta\%B}{100F} \quad (9)$$

El volumen columnar óptimo depende de la longitud columnar (L) y del diámetro interno columnar (d_c), con valores óptimos de k' alrededor de 5, por lo que:

$$V_M \cong 0,5Ld_c^2 \quad (10)$$

El volumen de columnas analíticas “cortas” de 15 cm por 4,6 mm es de 1,6 ml: en ellas, con flujo de 1,5 ml/min, el tiempo del gradiente (t_G) para que resulte efectivo es $t_G = 20 \times 1,6 \text{ ml} \times 95 / (1,5 \text{ ml/min} \times 100) = 20$ minutos. La capacidad, que condiciona la selectividad, ha mantenerse constante durante todo el cromatograma y, si se modifica el flujo por cambiar de columna, junto a t_G también deberán cambiarse otros parámetros para mantener constante k' . Por ejemplo, un flujo de 1,5 ml/min, al cambiar de columna (la de 15 cm por 4,6 mm y 5 μm por otra columna de 10 cm por 2,0 mm y 3 μm), el flujo se escalará por un factor de cinco veces, reduciéndose de 1,5 ml/min a 0,3 ml/min. Pero cambiar de columna también variará el volumen columnar (V_M): en el caso del ejemplo, de 1,6 ml a 0,2 ml, requiriendo la segunda columna gradientes más cortos, de $t_G = 20 \times 0,2 \text{ ml} \times 95 / (0,3 \text{ ml/min} \times 100) = 12,7$ minutos. En consecuencia, reducir dos veces el diámetro columnar permite reducir el flujo cinco veces, manteniendo la retención con gradientes un 40% más cortos.

En columnas ultrarrápidas o miniaturizadas los *gradientes balísticos* (por parabólicos) aceleran los análisis: por ejemplo, columnas de 1,5 cm por 2,1 mm y 3,5 μm proporcionan entre 1.000 y 2.000 platos teóricos, con un exiguo volumen columnar (V_M). Los gradientes parabólicos deterioran las columnas, acortando su vida útil, aunque pueden lograrse valores de $k' = 5$ con gradientes de solo 2 minutos. Para tener máxima resolución hay que considerar que el número de platos teóricos se acorta al disminuir la longitud columnar, aunque empíricamente podría resultar satisfactorio⁴⁰.

Otros dos factores pueden complicar tales aseveraciones: los efectos extracolumnares y el volumen estático del sistema. Los efectos extracolumnares reflejan todos aquellos factores ajenos a la columna que contribuyen al ensanchamiento de los picos, fundamentalmente los volúmenes muertos del inyector, tubos de unión y celda del detector. En las columnas de 15 cm por 4,6 mm y 5 μm el en-

⁴⁰ Neue, U.D., McCabe, D., Ramesh, V., Pappa, H. y DeMuthc, J.: *Transfer of HPLC Procedures to Suitable Columns of Reduced Dimensions and Particles Sizes*. Pharmacopeial Forum, 35 (6), 2009.

sanchamiento del pico debido a efectos extracolumnares reduce el número de platos teóricos un insignificante 5%, que el cromatografista suele pasar por alto. Con columnas ultrarrápidas de 1,5 cm por 2,1 mm y 3,5 μm el mismo equipo pierde ¡un 60% de platos teóricos!, razón por la cual las columnas ultrarrápidas demandan mayor cuidado en las conexiones y tuberías del equipo para evitar pérdida de resolución, exigiendo, sobre todo, menores volúmenes de inyección y celda del detector. En equipos con gradientes en alta presión el volumen estático existente entre el mezclador de fase móvil y la cabeza de la columna debe englobar el volumen del propio mezclador más el de la tubería y el bucle del inyector, conjunto que suele sumar entre 0,5 y 2,5 ml. Los sistemas con formación de gradientes en baja presión requieren más tubería y, además, hay que añadir el volumen interno de la bomba, alcanzando volúmenes estáticos del sistema entre 3 y 6 ml, más del doble que los sistemas similares con formación de gradientes en alta presión. Así, los equipos con volumen estático de 3 ml y flujos de 1,5 ml/min precisan 2 min de condiciones mantenidas antes de lanzar el gradiente, es decir, aproximadamente dos veces el volumen columnar de las columnas de 15 cm por 4,6 mm. En las columnas analíticas convencionales de 25 cm por 4,6 mm el volumen estático es menos importante, aunque al transferir sin más precauciones métodos a columnas miniaturizadas los efectos pueden ser desastrosos. Una columna ultrarrápida de 1,5 cm por 2,1 mm tiene un volumen de unos 0,03 ml, la centésima parte del volumen estático del equipo anterior (3 ml), exigiendo esperar a que pase dicho volumen para reequilibrar la columna y comenzar el gradiente. Reequilibrar una columna *microbore* con un flujo de 0,3 ml/min puede llevar 1 min, pero si el mismo cromatógrafo posee un volumen estático de 3 ml se necesitarán otros 10 min, pasando la duración de cada análisis de los ideales 2 min a 12 min.

4.2. Atenuadores de pulsos

Aunque el mejor atenuador de pulsos es la propia columna cromatográfica, las bombas de pistón producen inevitables pulsos cíclicos. Existen varias opciones para minimizarlos, siendo habitual su uso, obligado cuando las fases móviles las forman solventes o mezclas de solventes compresibles. Un atenuador de pulsos contribuye a líneas de base más estables, necesarias en alta sensibilidad o con detectores muy sensibles a la presión, sendo usual instalar en la salida de la bomba uno de los siguientes atenuadores:

El damper más sencillo es un simple tubo capilar enrollado en espiral, por ejemplo, liando 1 m de tubo alrededor del mango de un destornillador, un bolígrafo, un grifo o en el mismo dedo del cromatografista, en círculos de diámetro de unos 2 cm, formando al paso de la fase móvil una verdadera resistencia hidrodinámica, que genera una presión que homogeneiza la fase móvil. Existen atenuadores de pulsos de recorrido laberíntico con el mismo fundamento, así como columnas rellenas con pequeños cristales.

Otra variante muy sencilla de *dampers* consiste en una simple T, interpuesta a la salida de la bomba, conectando su tercer extremo a un tubo grueso (de diámetro 1/8") y ciego. El tubo está lleno de aire, que se comprime hasta un cierto punto (el aire es muy compresible) cuando la bomba comienza a bombear.

Por último, los atenuadores de pulsos más empleados son los de membrana de teflón. Son anchos cilindros que atraviesa la fase móvil, en cuya parte superior montan una membrana de teflón, que debe apretarse mediante un tornillo lateral. La membrana de teflón promedia los pulsos iniciales de la bomba, atenuándolos. Al otro lado de la membrana se dispone metanol líquido con azul de metileno ("metanol azul"), pues si la membrana no se aprieta antes de su uso se agrieta, fugando el escandaloso metanol azul, permitiendo identificar el problema.

5. INYECTORES Y AUTOINYECTORES

Interpuesto entre la salida de la bomba y la columna, el inyector ha de ser un dispositivo hermético, capaz de incorporar la muestra a la fase móvil previamente a la columna sin pérdidas de presión que puedan alterar el flujo proporcionado por la bomba. Prácticamente todos los equipos utilizan inyectores de válvulas, por su reproducibilidad, capacidad de inyectar volúmenes muy amplios (desde nl a ml) y resistir las altas presiones.

5.1. Aspectos cuantitativos del sistema de inyección

En principio, el inyector ideal es aquel que permite introducir más cantidad de muestra, es decir, mayor volumen de inyección, sin retardar los tiempos de análisis. El inyector, como cualquier otra parte del cromatógrafo, aporta una varianza (σ_{iny}^2) a la varianza total del pico, contribución dependiente del *volumen de muestra inyectado* (V_{iny}) y de la *densidad de muestra en el inyector* (λ), constante ésta para cada tipo de inyector, que toma habitualmente valores cercanos a 2, aunque en una inyección ideal deberían aproximarse a 3,5:

$$\sigma_{iny}^2 = \frac{V_{iny}^2}{\lambda^2} \quad (11)$$

El volumen de inyección (V_{iny}) nunca excederá el *volumen máximo de muestra* (V_{max}) que tolera la columna:

$$V_{iny} \leq V_{max} \quad (12)$$

Por otra parte, el *volumen máximo de inyección* ($V_{iny\ max}$) condiciona la *máxima cantidad de muestra detectable* (Q_{max})

$$V_{iny\ max} = V_{max} = f(Q_{max}) \quad (13)$$

Q_{max} depende de la sección columnar, expresada por el diámetro interno columnar (d_c), del factor de capacidad (k'), la porosidad (ϵ) y *compacidad* (θ) propios de cada relleno, la longitud columnar (L) y la altura equivalente entre dos platos teóricos (H):

$$Q_{max} = \sqrt{L H} \frac{\pi \theta d_c^2}{4} \epsilon (1+k') \quad (14)$$

Por tanto,

$$V_{iny\ max} = Q_{max} = \sqrt{L\ H} \frac{\pi\theta\ d_c^2}{4} \varepsilon (1+k') \quad (15)$$

Sustituyendo la altura equivalente entre dos platos teóricos (H) por la altura reducida de plato (h):

$$V_{iny\ max} = \sqrt{N} h d_p \frac{\pi\theta\ d_c^2}{4} \varepsilon (1+k') \quad (16)$$

Expresiones que definen el *volumen máximo de inyección* genérico del inyector, que modifica la densidad de muestra presente en el inyector (λ), constante para cada tipo de inyector:

$$V_{iny\ max} = \frac{V_{max}}{\lambda} \sqrt{N} h d_p \frac{\pi\theta\ d_c^2}{4} \varepsilon (1+k') \quad (17)$$

Agrupando constantes, con sus valores habituales:

$$V_{iny\ max} \cong 0,02 d_p \sqrt{N} \quad (18)$$

A su vez, paralela y análogamente, $V_{iny\ max}$ concreta el *volumen máximo de celda del detector* ($V_{det\ max}$):

$$V_{det\ max} = V_{iny\ max} \cong 0,02 d_p \sqrt{N} \quad (19)$$

El límite superior del volumen a inyectar (y detectar) parece obvio. Pero ¿hasta donde se cumple la ecuación anterior? En columnas analíticas la cantidad de muestra inyectada y luego detectada es sorprendentemente reducida; incluso valores poco exigentes de diámetro de partícula (d_p), altura equivalente reducida (h) y número de platos teóricos (N) conllevan un valor de V_{iny} de 60 μ l, manteniéndose la eficiencia, aunque a duras penas, inyecciones de 100 μ l.

Empero, algunas variables operativas del inyector pueden mejorar estos valores, sobre todo el *tiempo máximo que debe durar la inyección* ($t_{iny\ max}$):

$$t_{iny\ max} = \frac{\theta\ \lambda}{\sqrt{N}} t_R \quad (20)$$

5.2. Inyectores manuales

Inyectores de válvulas o de bucle

Prácticamente todos los inyectores de HPLC, manuales o automáticos, son “de válvulas” y solo en casos raros, experimentales o históricos, se emplean otros inyectores, que expondremos al final de este capítulo.

Conocidos indistintamente bajo dos acepciones, “*inyectores de válvulas*” o “*inyectores de bucle*”, dos fabricantes (*Rheodyne* y *Valco*) monopolizan este módulo. Su precisión, por inyectar siempre el mismo volumen (el de su bucle), les exime de errores humanos o del volumen de la jeringa de inyección. Mantiene la presión conferida por la bomba a la fase móvil, siendo mínimo su volumen interno y sus piezas internas son fácilmente reemplazables, al igual que el mismo inyector entero. Resisten presiones de 500 bares, su fundamento es sencillo y su precio razonable, dada su utilización casi universal. Inicialmente, los diseños respondían estrictamente al esquema de una válvula de seis vías, interconectando un rotor interno (*rotor seal*) alternativamente dos posiciones adyacentes. En la posición de carga (*load*) una jeringa introduce en el inyector las muestras líquidas, que llenan el bucle sin tocar aún con la fase móvil, que continua llegando a la columna, saliendo el exceso de muestra por un desagüe. El hecho físico de *inyectar* consiste en girar posteriormente 60° el rotor interno (*rotor seal*) en el sentido de las agujas del reloj, accionando el mango del inyector: con ello, la fase móvil llega al bucle y arrastra su contenido (la muestra) hasta la columna. Si por error se inyectase más muestra desde la posición de inyección (*inject*), ésta iría directamente al desagüe. La arquetípica válvula de seis vías dio paso al diseño con dos desagües (figura 28): a la izquierda se aprecia cómo se carga la muestra en el bucle, mientras que en la parte derecha vemos que, al girar 60° , la muestra se incorpora (inyecta) en la línea fluídica. El diseño de dos desagües evita el pico de presión causado por el giro interno de 60° , que, aunque muy rápido, bloquearía momentáneamente los conductos internos del *rotor seal*.

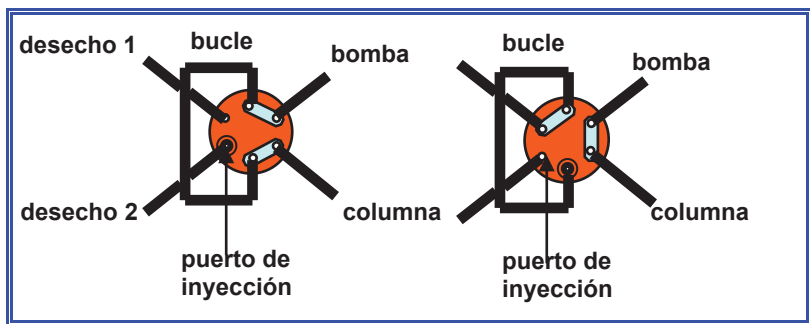


Figura 28. Esquema de una válvula de inyección de seis vías.

La gran precisión de los inyectores de válvulas (superior al 0,2%) hace que en HPLC se cuantifique habitualmente mediante técnicas de patrón externo, a diferencia de la cromatografía de gases, donde se suele cuantificar por patrón interno⁴¹. En HPLC solo se cuantifica mediante patrón interno en análisis de complicada preparación de muestras, para evaluar la recuperación (*recovery*).

Los inyectores manuales han establecido un volumen estándar de inyección de 5 ó 10 μl (su volumen de bucle) en aplicaciones analíticas. Generalmente se accionan manualmente, mientras que la activación de la válvula de seis vía de los inyectores automáticos es eléctrica. HPLC *narrowbore* y capilar requieren volúmenes de inyección de 1 μl o menores, hecha en inyectores especiales de bucle interno. Es importante cebar muy bien el bucle y, como regla, se debe inyectar un volumen de, al menos, el doble del propio bucle, mejor si es el triple (figura 29).

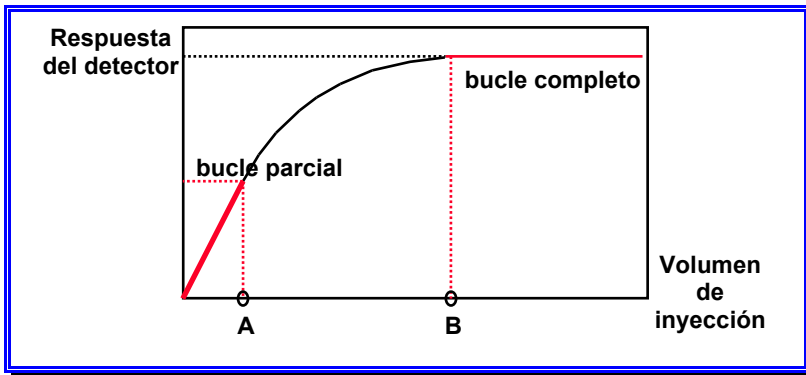


Figura 29. Volumen de inyección y respuesta en el detector: A, al llenar el 50% del volumen del bucle; B, al llenar tres veces el bucle.

La gran precisión de los inyectores de bucle lleva a pasar por alto su exactitud, pues siempre se inyectan patrones y muestras en *el mismo volumen* de bucle. Con todo, la exactitud del bucle o del inyector en conjunto puede evaluarse mediante análisis gravimétricos, pesando el volumen del líquido contenido en el bucle, siendo, sin embargo, más fiable (aunque tedioso y requiere medios adicionales) el conteo radiométrico de un patrón de actividad conocida dispuesto en el bucle.

La posición externa del bucle permite su fácil acceso, haciendo muy sencillo su reemplazo por otro de volumen más conveniente para la aplicación. Se han ido estandarizando bucles cada vez más capilares, más largos y de menor diámetro interno, verdaderas resistencias hidrodinámicas por sí mismos, donde las muestras sufren mínima difusión (figura 30). También el mismo cromatografista puede construir bucles de un volumen dado, bastando conocer el diámetro interno del tu-

⁴¹ Jennings, W.: *Analytical Gas Chromatography*. Editorial Academic Press, Orlando (Florida), 1987.

bo y realizar los cálculos correspondientes o, más fácil aún, tomar un tubo del mismo diámetro interno que el bucle usado y determinar por proporción la longitud que precisa el volumen de bucle deseado.



Figura 30. Inyector, bucles de inyector, estator y rotor seals (imágenes cortesía de Agilent Technologies).

Otros inyectores

Antaño, algunos fabricantes montaron en sus equipos inyectores de resistencia hidrodinámica, abandonados en favor de los inyectores de válvulas. En aquellos, una resistencia hidrodinámica dificulta el paso del flujo (figura 31), obligado por un grupo de válvulas a pasar por la resistencia hidrodinámica. Para acoger las muestras estos inyectores montaban un bucle helicoidal de gran volumen, es decir, en principio, sin límite de volumen a inyectar. Cualquier exceso de muestra desaguaba por la salida libre, útil también para purgar el inyector. Una vez depositada la muestra, se abrían las válvulas para obligar a la fase móvil a pasar por el bucle trasero del inyector, arrastrando la muestra a la columna.

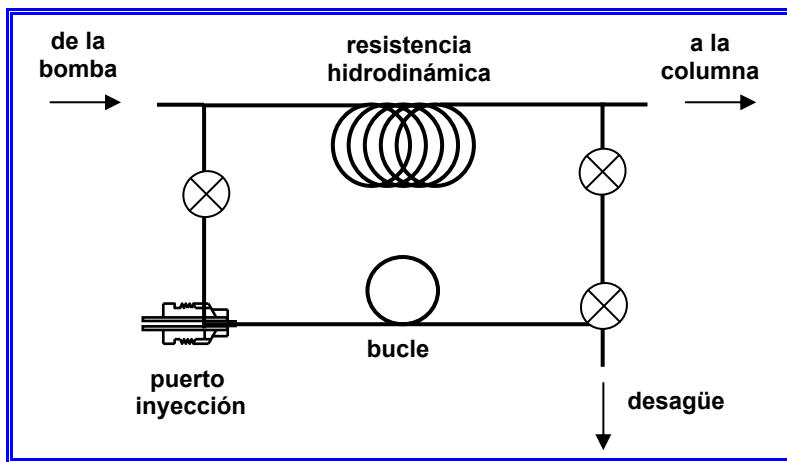


Figura 31. Inyector de resistencia hidrodinámica.

5.3. Inyectores automáticos

Este módulo automatiza definitivamente el equipo de HPLC, para poder trabajar 24 horas al día, incluyendo fines de semana, fiestas y vacaciones. En 1968 se fabricó el primer autoinyector para equipos de aminoácidos, apareciendo en 1976 la primera generación de inyectores automáticos capaces de trabajar en condiciones de alta presión. Sin embargo, el autoinyector fue un módulo escaso antes de 1980 (lo montaban menos del 1% de los equipos), pero enseguida se popularizó su uso. Cada vez hay más equipos con inyector automático, adquiriéndose con autoinyector el 40% de los equipos nuevos.

El cromatografista exige al autoinyector capacidades obvias, principalmente volúmenes de inyección variables y robotización para poder manipular las muestras, realizar diluciones, derivatizaciones, mezclas entre viales, extracciones, etc. Es como tener un esclavo “pipeta en mano”, pues los inyectores automáticos pueden succionar la muestra de los viales para llevarla (inyectarla) al puerto de inyección mediante una jeringa y una línea de transferencia. La jeringa suele ser externa, unida a una válvula de tres vías, siendo, evidentemente, uno de sus extremos la jeringa, el segundo extremo un reservorio con un líquido de lavado para evitar efectos de memoria y el tercero se conecta a la línea de transferencia. El tamaño de la jeringa ha de ser adecuado al volumen de muestra a inyectar. La precisión del conjunto jeringa - motor de pasos (que mueve la jeringa) establece la precisión del inyector. Es imprescindible que la jeringa esté cebada y ajuste fuertemente para evitar que tome burbujas durante su funcionamiento, que restarían precisión, además de que las burbujas podrían ser inyectadas.

Así, la mayoría de los inyectores automáticos son pequeños “robots” de procesado de muestras, donde pueden disponerse múltiples viales o tubos de muestras, en uno o varios soportes (racks), mientras cae sobre ellos la aguja de una jeringa, para perforarlos y luego succionar la muestra en movimientos XYZ (el de la aguja en las tres direcciones del espacio, figura 32). Posteriormente la aguja se desplaza hasta el puerto de inyección, que no es sino un inyector de seis vías de bucle, accionado eléctricamente, donde se inyecta la muestra. Otros autoinyectores más sencillos, aunque menos habituales, son del tipo XY: las muestras se depositan en un plato giratorio (carrusel), que se mueve en movimiento de cadena dejando la muestra a inyectar bajo la aguja, que baja, entra en el vial de muestra, la succiona y lleva al puerto de inyección. Los autoinyectores robotizados de mecanismo XYZ, más rápidos, permiten secuencias aleatorias, al igual que algunos del tipo XY, aunque éstos necesitan más tiempo. Existen cuatro tipos de inyectores automáticos, cuyos ejes XYZ definen los movimientos de la aguja de succión y transporte de muestra (Y, en altura; X, en anchura; Z, en profundidad): en primer lugar, autoinyectores de rack fijo y aguja con movimiento XYZ; en segundo lugar, autoinyectores de rack móvil (Z) y aguja con movimiento YX; en tercer lugar, autoinyectores de carrusel giratorio y aguja con movimiento YX, y en cuarto lugar, autoinyectores de carrusel de tipo cadena y aguja con movimiento YX. La mayoría

pueden realizar programas de tratamiento previo a la inyección de las muestras (diluciones, derivatizaciones), con secuencias de pipeteado para evitar efectos debidos a la matriz de las muestras o a la viscosidad del solvente, permitiendo programar las velocidades de succión de muestra y de dispensación de la misma.



Figura 32. Inyectores automáticos (imágenes cortesía de *Agilent Technologies* y *Perkin-Elmer*).

Por otra parte, según la zona de inyección, los inyectores automáticos pueden ser de tres tipos: de bucle; con línea de transferencia, y de bucle con línea de transferencia.

Los inyectores automáticos de bucle presentan las mismas propiedades ventajosas y adversas que los inyectores manuales de válvulas o de bucle (figura 33). Algunos montan un circuito de *bypass* para asegurar el aporte continuo de fase móvil a la columna y evitar que ésta sufra el “golpe de presión” cuando la válvula gira al inyectar. El *bypass* actúa como un divisor de flujo, permitiendo pasar por el inyector solo un pequeño porcentaje del flujo (5%) o la totalidad de la muestra (100%) cuando el inyector gira desde la posición de carga a la de inyección o viceversa, o se halla en algún punto intermedio del giro.

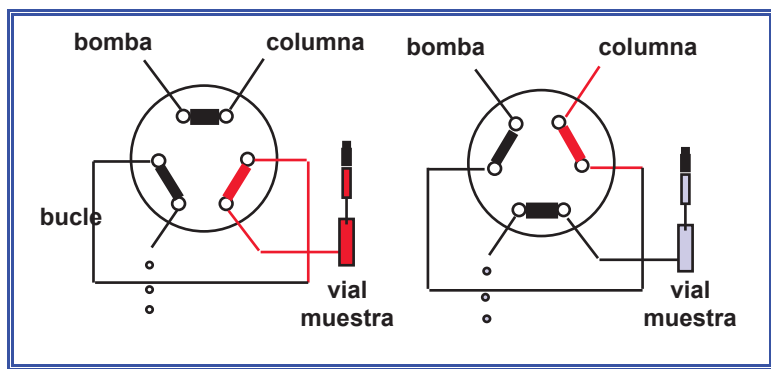


Figura 33. Circuito fluídico de la válvula de seis vías de un autoinyector: izquierda, carga de muestra; derecha, al girar 60° la muestra se inyecta.

Los inyectores automáticos de bucle pueden inyectar de tres modos: con el bucle totalmente lleno (*total loop*), parcialmente lleno (*partial loop*) o con inyección de tipo *sandwich*, circundando la muestra con sendas burbujas de un solvente fuerte, denso y poco afín con la muestra, para evitar de este modo su difusión.

La inyección con el bucle totalmente lleno se realiza haciendo pasar por el bucle un volumen de muestra de, al menos, el doble del volumen del bucle, como en los inyectores de bucle manuales. La inyección con el bucle parcialmente lleno exige que éste sea un capilar muy estrecho, que actúa como restrictor hidrodinámico para evitar la difusión de la muestra en el volumen total del bucle, el cual será el máximo volumen inyectable, pudiéndose inyectar volúmenes inferiores: por ejemplo, bucles muy capilares de 50 μl permiten inyectar desde 50 hasta 1 μl , o incluso menos. Finalmente, en la inyección de tipo *sandwich*, frecuente en los autoinyectores de los cromatógrafos preparativos, se atrapa la muestra entre dos segmentos de DMSO (dimetilsulfóxido) para protegerla de una eventual precipitación o difusión en fase móvil.

Además, los inyectores automáticos suelen permitir programar los volúmenes, veces y velocidades de aspirado de las muestra, lavados y cebados. Sus principales propiedades instrumentales conllevan, según los distintos modelos, alta capacidad de muestras (100 ó más muestras), con varias inyecciones (repeticiones) de cada una; volúmenes variables de las inyecciones, programables para cada muestra o series de muestras (entre 1 ml y 1 μl , a veces incluso 0,1 μl); máxima precisión y reproducibilidad (con mínimo coeficiente de variación, usualmente entre 0,1% y 0,5%); pequeñísima contaminación entre muestras, para lo cual pueden lavar su puerto de inyección una o más veces de forma programada, evitando *efectos de recuerdo* de las muestras anteriores (figura 34), obviando la *praxis* de comenzar inyectando las muestras más concentradas para terminar con las más diluidas, práctica inviable cuando se desconoce *a priori* la concentración de las muestras. Además, es de agradecer que puedan albergar varios tipos de viales: grandes (de varios ml, con fines preparativos o repetitivos), analíticos (de 1 a 2 ml), micro (menores de 1 ml o con conos interiores en los viales analíticos) e incluso placas *microtiter*.

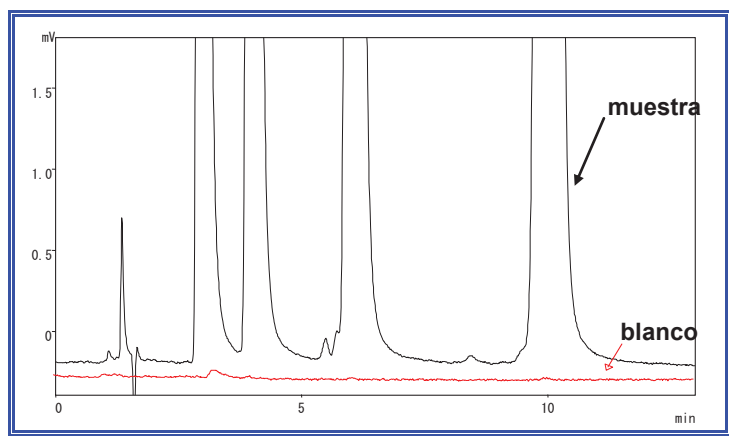


Figura 34. Efectos de “recuerdo” entre muestras (contaminación cruzada) en un autoinyector: arriba, muestra inicial; abajo, el siguiente cromatograma, al inyectar un blanco, no presenta efectos de recuerdo.

Muchos autoinyectores pueden complementarse con accesorios de enfriamiento de las muestras. Por ejemplo, al cargar 100 muestras cuyo cromatograma dura 20 minutos, la última muestra quedaría expuesta a la temperatura ambiente más de 30 horas y podría alterarse. Otro punto clave es cuánta muestra adicional precisa el inyector automático para cebar su circuito antes de inyectar, aspecto importante en aplicaciones en que se dispone de muy poca cantidad de muestra⁴², precisando algunos autoinyectores solo un exceso de muestra de 0,1 μl . También es deseable que incorporen sensores de fugas y menús de seguridad y, al igual que otros módulos del equipo, que posean control autónomo para poderlos instalar en cualquier cromatógrafo, a pesar de que la mayoría se automatizan desde la estación de datos cromatográfica o desde un módulo de control. Finalmente, es conveniente que el inyector automático muestre los errores o problemas ocurridos durante las inyecciones y que al iniciarse active un protocolo de autodiagnósticos, que informa de su uso, correcta configuración, etc. Además, los materiales de su línea fluidica deben garantizar su uso con solventes agresivos o niveles extremos de pH.

⁴² Pérez-Bendito, D. y Rubio, S.: *Environmental Analytical Chemistry*. Editorial Elsevier, Comprehensive Analytical Chemistry Vol. XXXII. Amsterdam, 1999.

6. COLUMNAS Y PRECOLUMNAS

6.1. La columna cromatográfica

Tratamos aquí las columnas de HPLC desde un punto de vista instrumental, más morfológico que químico. La columna, un cilindro usualmente metálico que alberga micropartículas con la fase estacionaria (figuras 35 y 36) es la parte más importante del sistema cromatográfico: recordemos que Tsvet, padre de la cromatografía, llamó “cromatografía” a la misma columna. Aunque algunos la consideramos una parte del cromatógrafo, hoy la columna solo es un consumible, demandada casi “por receta”, de precio muy inferior a cualquier otro módulo instrumental del equipo ¡aproximadamente un 1% del total del equipo!, cuyos módulos carecerían de sentido y razón de ser si la columna pudiese trabajar en condiciones ideales. Pero ¡ay! nunca es así, precisando los equipos caros y sofisticados módulos instrumentales, capaces de superar airosamente las condiciones más eclécticas⁴³.

Cronología de las columnas de HPLC

Sin el desarrollo de las columnas hubiese sido impensable el de los equipos de HPLC y viceversa, pues históricamente ambos aspectos han discurrido paralelos, complementándose, en los siguientes periodos⁴⁴:

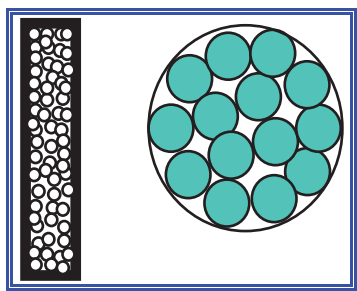


Figura 35. La columna cromatográfica rellena de micropartículas.

Antes de 1969. Martin y Syngue observaron en 1941 que la velocidad de difusión diferencial de los solutos en los líquidos limitaba su velocidad de separación.

⁴³ Neue, E.D.: *HPLC Columns, Theory and Practice*. Editorial Wiley-VCH, Weinheim, 1997.

⁴⁴ *Milestones in Analytical Chemistry*. Editorial American Chemical Society, Washington, 1994.

ción, en incipientes técnicas de cromatografía líquida en baja presión (LPLC) con fases estacionarias porosas derivadas de polisacáridos: Sorber y Peterson en la Universidad de San Luis con fases estacionarias derivadas de la celulosa, y Porath y Flodin en Suecia con dextranos. Ya se lograban separaciones aceptables, aunque demasiado sensibles a los cambios de presión, con tiempos de análisis muy largos, de horas.

Periodo posterior de ontogenia. En él se establecieron, aproximadamente en la forma en que hoy las conocemos, las condiciones del relleno, morfología, etc. de las columnas, principal razón del rápido auge de la técnica. Los rellenos pelliculares reemplazaron las fases porosas, al tiempo que aparecía una primera generación de equipos con elementales bombas de pistón recíproco y detectores espectrofotométricos, ya con diseño específico de flujo continuo. Aquellas columnas pergeñaban un prometedor futuro inmediato, con rellenos con tamaño de partícula de 100 μm . En 1963 Horváth demostró que los rellenos microparticulares con un núcleo duro y lecho poroso externo permitían mayores velocidades de fase móvil, comercializándose enseguida diversos medios columnares de este tipo (tabla 12), el primero de los cuales fue el popular Pellosil, fabricado en la compañía que el mismo Horváth había fundado junto a Lipsky, coautores del primer artículo científico sobre HPLC en 1966. En 1967 el físico James “Jim” Logan Waters apostó decididamente por la nueva tecnología, fabricando un equipo con bombas rudimentarias y detector refractométrico para caracterizar polímeros y ácidos orgánicos. Mientras, la firma de Nebraska *Instrumentation Specialities Corporation (Isco)* también iniciaba la construcción de equipos. Varias compañías decidieron entrar en el floreciente negocio comprando la tecnología a fabricantes menores: *Varian* adquirió *Picker-Nuclear* en 1971; *Perkin-Elmer* compró *Nester-Faust* en 1972; *Hewlett-Packard* absorbió *Hupe-Busch* en 1973, el mismo año que *Spectra-Physics* hizo lo mismo con *Chromatronix*.

Tabla 12. Aparición de rellenos comerciales para HPLC.

Año	Fase estacionaria	Investigadores y nombre comercial
1967	IEC, 40 μm	Horváth, Lipsky Pellosil
1969	Poroso, 40 μm	Kirkland Zipax
1970	Lechos porosos	Bombaugh, Little Corasil
1970	Fases ligadas	Bombaugh, Little Durapak
1971	Sílice, 5-10 μm	Majors Micropak
1972	Sílice esférica, 7 μm	Kirkland Zorbax
1972	Ligada químicamente	Kirkland Permpase

Década 1970-1980. Comenzó con el reto de conseguir columnas microparticulares con tamaño de partícula de 10 μm , hilo conductor que permitió llegar al durante mucho tiempo estándar analítico de 5 μm , con las conocidas ventajas de estabilidad, rapidez, eficiencia y capacidad. Los rellenos de fase ligada hicieron

desaparecer los de fase pelicular, normalizándose el procedimiento de rellenar columnas mediante “escurrido” (*slurry*), en detrimento de los precedentes. Los geles esféricos de sílice desplazaron las fases estacionarias irregulares, convirtiéndose en los más usados por su gran consistencia y reproducibilidad, a pesar de su mayor precio.

Década 1980-1990. En aquella “década de la bioquímica”, el gran interés por purificar macromoléculas biológicas impelió a la búsqueda de nuevas fases con base polimérica y poros anchos para aumentar la velocidad del análisis. Fue capital el desarrollo de materiales base-desactivados y la aparición de las columnas de fase reversa “*end-capping*” sin grupos silanol libres reactivos⁴⁵. Otro hecho importante fue la difusión de los métodos de extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), gran ayuda en la preparación, limpieza y purificación de las muestras⁴⁶. Si antes la cromatografía líquida analítica había evolucionado desde largas columnas de acero a las habituales de 25 a 30 cm, con diámetro interno de 4 a 4,6 mm, rellenas con fases estacionarias microparticulares esféricas, los años ochenta del siglo pasado alumbraron muchas patentes de tubos, tuercas y diseños para las columnas, con nuevos materiales y también para los equipos, como el PTFE, *Hastelloy*, aceros inoxidables distintos del clásico SS 316, titanio, diversos materiales acrílicos y poliméricos, incluso vidrios inertes y biocompatibles, especialmente diseñados para resistir las altas presiones. La tubería de PEEK sustituía muchas veces al acero, por ser resistente a la mayoría de los disolventes, polares o apolares. A finales de la década apareció un nuevo PEEK, insoluble en todos los solventes conocidos, incluso en el suyo propio.

Década final de siglo (1990-2000). En aquella “década de las columnas específicas” se buscó (y logró) mayor eficiencia, velocidad y capacidad en análisis concretos, sobre todo medio ambientales⁴⁷ y con nuevos medios quirales⁴⁸. Continuamente aparecían *columnas específicas*, cuya composición ocultaban celosamente los fabricantes. Las columnas alcanzaron gran durabilidad, conservando eficiencia y capacidad, antes de que, en 1990, surgiese la idea revolucionaria de los medios de perfusión, técnica denominada *Purificación de Biomoléculas a Alta Velocidad* y luego *Cromatografía de Perfusión* o “*de poros*”⁴⁹, que dotó de gran ve-

⁴⁵ Neue, U.D., Carmody, J., Cheng, Y.F., O’Gara, J., Alden, B.A., Walter, T.W., Bouvier, E.S.P y Crowley, R.: *Packing With Minimal Silanol Activity*. International Symposium of High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. HPLC 1999, Granada, 1999.

⁴⁶ Simpson, N.J.K., Ed.: *Solid Phase Extraction, Principles, Techniques and Applications*. Editorial Marcel Dekker, Nueva York, 2000.

⁴⁷ Millar, G.T.: *Living in the Environment*. Editorial Wadsworth-Thomson Learning, Belmont, Estados Unidos, 2002.

⁴⁸ Ahuja, S., Ed.: *Chiral Separation Methods for Pharmaceutical and Biotechnological Products*. Editorial Wiley, Hoboken, New Jersey, 2011.

⁴⁹ Cunico, R.L., Gooding, K.M. y Wehr, T.: *Basic HPLC and CE of Biomolecules*. Editorial Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond, California, 1998.

locidad a los análisis, aspecto vital en biofarmacia y bioquímica⁵⁰. Hasta entonces los cromatografistas tenían la espinita (también la esperanza, pero también la cruz) de las técnicas *narrowbore*, con columnas de pequeño diámetro interno (entre 0,5 y 2 mm), buscando mejorar la sensibilidad y reducir el consumo de fase móvil, aspectos que permitirían abrir las puertas de HPLC a los detectores de estado gaseoso y espectrometría de masas. Las técnicas *narrowbore* alcanzaron cierto éxito, diseñándose equipos específicos. El gasto de disolventes comenzó a juzgarse importante y más de la mitad de los cromatografistas contemplaron seriamente las técnicas *narrowbore* como una opción de futuro cercano. Mientras, se examinaban las técnicas capilares con columnas de diámetro interno entre 100 y 0,32 mm, incluso de 0,25 μm , semejantes a las columnas capilares de cromatografía de gases, aunque aquí rellenas de fase estacionaria microparticulada. El avance menos arrollador de lo esperado de la electroforesis capilar contribuyó a enlentececer las aplicaciones con columnas capilares y muchos cromatografistas propusieron trasladar los análisis hechos con columnas analíticas a columnas ultrarrápidas (*fast*) del mismo diámetro interno (4 a 4,6 mm), pero mucho más cortas (5 cm) y con partículas de 3 μm ; sin embargo, los esperados beneficios teóricos de flujos altos propios de las técnicas *fast* (5 ml/min o superiores) quedaron empañados por la desventaja de verse afectados grandemente por los efectos extracolumnares, relegándolas a laboratorios de control de calidad (en su mayoría en la industria farmacéutica) y aplicaciones de cinéticas rápidas⁵¹.

Sin embargo, los objetivos perseguidos con columnas *fast* de menor longitud llevaron a investigar fases estacionarias de diámetros de 2 μm o inferiores, origen de las técnicas de UHPLC, *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (inicialmente UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*), que enseguida exigieron adecuar los equipos instrumentales y finalmente diseñar cromatógrafos específicos. La “química de pequeñas partículas” que supuso UHPLC dio un vuelco y un nuevo frescor a HPLC: algunas columnas incorporaban un microchip con información individual de esa columna (su test de control de calidad y certificado de análisis, número de inyecciones, presiones sufridas durante los análisis, historial de mantenimiento, etc.). Además de reducir hasta diez veces los tiempos de análisis, UHPLC permitió inyectar volúmenes mucho menores y garantizar, por tanto, mínima contaminación entre muestras, con triple sensibilidad en la detección, obligando a los detectores a disponer de microceldas mucho menores para evitar la dispersión cromatográfica. Durante los últimos años también se han implementado técnicas multicolumna de HPLC bidimensional (HPLC 2-D). Los últimos avances en tecnología de columnas, con microcolumnas monolíticas polimé-

⁵⁰ Walsh, G.: *Biopharmaceuticals – Biochemistry and Biotechnology*. Editorial John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.

⁵¹ Dai, J. y Zhang, Q.: *Strategies for Using Fast Liquid Chromatography in Method Development*. Pittsburgh Conference 2008.

ricas empaquetadas⁵² han llevado a desarrollar equipos, fluidica y accesorios, básicamente hacia su miniaturización.



Figura 36. Columnas de HPLC (imagen cortesía de *Agilent Technologies*).

En perspectiva, las columnas de HPLC han sufrido continuas mejoras e innovaciones que han contribuido a alargar su vida útil, rellenas con partículas más rígidas y robustas, de diámetro cada vez menor y tamaño más homogéneo. Existen rellenos porosos con gran variedad de diámetros de poro, nuevos núcleos poliméricos, de zirconio, titanio, carbón poroso, hidroxapatito, alúmina, etc., en rellenos más uniformes cuya superficie particular mejor recubierta presentan menores niveles de metales residuales. Han aparecido nuevas fases (fenil, C30, carbamato, amida, quirales), con *end-capping*, mejores y más efectivas, así como materiales estructurales de las carcasas columnares alternativos al acero (vidrio, plástico, polímeros), revolucionarias combinaciones con precolumnas y nuevos diseños de sus *frits* y discos.

6.2. Protocolos de chequeo, limpieza y regeneración de columnas

Cada cierto tiempo se debe verificar el estado de la columna mediante un test específico con patrones⁵³, comprobando los límites de cada parámetro cromatográfico, sobre todo aquellos que afectan a la eficiencia y resolución, mediante pruebas de idoneidad (*Suitability Test*), que nunca están de más para confirmar la eficiencia de cada columna nueva o la calidad de fabricación del lote. En general, cada columna viene acompañada de su “documentación”, que incluye un cromatograma de comprobación, realizado con ella o con un prototipo de ella. En las columnas caras, parte de su precio reside en el test hecho en fabrica individualmente a cada una, comercializándose solo las que satisfacen el test. A las columnas corrientes se realiza un test genérico, que podría incumplir la recién comprada.

⁵² Poole, C.F.: *Essence of Chromatography*. Editorial Elsevier Science, Amsterdam, 2002.

⁵³ ISO Guide 35: *Reference Materials, General and Statistical Principles for Certification*, 2006.

Tras su uso, es conveniente “limpiar” o “lavar” la columna cada cierto tiempo de las impurezas acumuladas durante su utilización, para lo cual, lo mejor es bombear una fase móvil de naturaleza lo menos lejana a su fase estacionaria. Veamos a continuación unas útiles “recetas” para regenerar columnas de varios tipos:

Regeneración de columnas de gel de sílice, de fase normal:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de tetrahidrofurano a un flujo de 1 ml/min; 100 ml de metanol a un flujo de 1 ml/min; otros 100 ml de tetrahidrofurano, ahora a un flujo de 2 ml/min; 100 ml de cloruro de metileno a un flujo de 1 ml/min; finalmente, 100 ml de benceno o n-hexano a un flujo de 1 ml/min.
3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

Regeneración de columnas de gel de sílice, de fase reversa:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Pasar 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min.
3. Realizar cuatro inyecciones sucesivas de 20 µl de dimetilsulfóxido.
4. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min; 100 ml de mezcla agua:metanol (50:50) a un flujo de 0,5 ml/min; 100 ml de mezcla agua:cloroformo (saturada) a un flujo de 0,5 ml/min; finalmente, otros 100 ml de mezcla agua:metanol (50:50) a un flujo de 0,5 ml/min.
5. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

Regeneración de columnas de exclusión para fases polares:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 50 ml de tolueno o tetrahidrofurano a un flujo de 0,5 ml/min; finalmente, 200 ml de ácido mercaptoacético en tolueno (1%) o tetrahidrofurano a un flujo de 0,5 ml/min.

3. Si en vez de una columna tenemos una batería de varias columnas en serie, multiplicaremos las cantidades anteriores por el número de columnas, teniendo en cuenta que la presión en cabeza de la primera columna englobará la presión total de todo el lote de columnas.

4. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

Regeneración de columnas de intercambio catiónico:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.

2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min; 100 ml de mezcla agua:metanol (50:50) a un flujo de 0,5 ml/min; finalmente, 100 ml de mezcla agua:cloroformo (saturada) a un flujo de 0,5 ml/min.

3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

Regeneración de columnas de intercambio aniónico:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.

2. Hacer pasar sucesivamente los siguientes disolventes, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante: 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 0,5 ml/min; cuatro inyecciones sucesivas de 20 µl de dimetilsulfóxido; 100 ml de agua destilada y desionizada a un flujo de 1 ml/min; finalmente, 100 ml de tetrahidrofurano a un flujo de 1 ml/min.

3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

Regeneración de columnas específicas para separaciones de ácidos grasos:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.

2. Hacer pasar sucesivamente 75 ml de tetrahidrofurano a un flujo de 0,5 ml/min, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante.

3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

Regeneración de columnas específicas para separaciones de hidratos de carbono:

1. Reemplazar los filtros de la columna por otros nuevos.
2. Hacer pasar sucesivamente 100 ml de TRISMA (acetato) de pH 7,0 a un flujo de 0,5 ml/min, sin que la presión sobrepase 150 bares o el límite especificado por el fabricante.
3. Comprobar la eficiencia (número de platos teóricos), factor de capacidad y factor de asimetría con un patrón formado por varios solutos adecuados.

6.3. Precolumnas

La precolumna aumenta el tiempo útil de la columna cromatográfica, especialmente en condiciones de alta presión, que provocan en el relleno columnar un *espacio en cabeza*, motivo de ensanchamiento de los picos. Wehril estudió cuanta sílice disolvían los disolventes habituales, constatando que los geles de sílice se disolvían más lentamente que la sílice pura, en forma de gel, siendo en ambos casos la cantidad disuelta inversamente proporcional a su recubrimiento químico (fase ligada de los grupos silanol). Posteriormente y junto a Hildebrand, Wehrli comprobó que las aminas y soluciones de hidróxido amónico disolvían una porción del relleno columnar, acortando la vida de la columna y demostrando que *«la cantidad de sílice disuelta, en partes por millón, equivale aproximadamente al tanto por ciento de agua en el eluyente»*, hecho por el que propuso el acetonitrilo como humectante de elección. Atwood analizó en experimentos similares cuánta sílice solubilizaba la fase móvil anteponiendo una precolumna (figura 37): así la fase móvil disolvía una parte mínima de fase estacionaria de la precolumna, avanzando hacia la columna saturada en sílice, siendo imposible que disolviese más sílice en la columna.

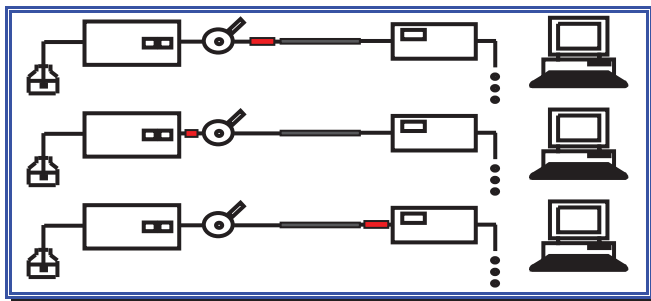


Figura 37. Emplazamiento de precolumnas: arriba, ubicación clásica, precediendo a la columna; centro, previa al inyector, captura componentes de fase móvil que podrían perjudicar las muestras; abajo, antes del detector.

En definitiva, la precolumna asume las siguientes funciones: *físicamente* representa dos filtros más, es decir, dos barreras adicionales ante cualquier contaminación u oclusión causada por partículas y, puesto que aumenta la presión ligeramente, amortigua algo los pulsos de la bomba en un *efecto damper* adicionado al que causa su propio relleno; *químicamente* la precolumna satura la fase móvil en fase estacionaria (aunque *grosso modo* ambas sean insolubles, pero por nimio que sea siempre existirá un producto de solubilidad), exigiendo que los rellenos de precolumna y columna sean exactamente iguales (es insuficiente que “solo” sean similares: por ejemplo, si a una columna C18 se antepone una precolumna C8, menos hidrofóbica, ésta podría no retener algunas sustancias indeseables, que mostrarán retención en la columna); *cromatográficamente* el conjunto alcanza más platos teóricos y mayor resolución, por ser idénticos sus rellenos; *económicamente* el precio de las precolumnas es muy inferior al de las columnas con igual relleno y, además, las precolumnas se suelen vender en paquetes de varias unidades, y comprar por paquetes siempre resulta más barato). Por tanto, de “morir” alguien, mejor que sucumba la precolumna.

Las precolumnas, con fases estacionarias idénticas a las de “sus” columnas, son mucho más cortas que éstas (1,5, 3 ó 5 cm) y de diámetro similar para evitar fenómenos de difícil interpretación. Aunque similar, el relleno de la precolumna suele tener un tamaño de partícula algo superior al de la columna, para no causar demasiada sobrepresión, pero nunca será demasiado alto, para no ensanchar los picos y empeorar la resolución. Evidentemente, en la precolumna hay que evitar cualquier volumen muerto, tanto por falta de relleno (meniscos en su cabeza o final) o conexiones mal hechas. Los diseños de tipo cartucho integran precolumna y columna con un volumen muerto despreciable, al tiempo que exigen menos recambios de juntas y conexiones. Otras veces se unen mediante capilares de mínimo diámetro interno (0,05 ó 0,10”).

6.4. Optimización y aspectos prácticos de las columnas

El pragmático factor del precio de columnas, precolumnas y fases móviles preocupa al cromatografista, pues muchos laboratorios utilizan ininterrumpidamente varios equipos de HPLC, siendo importante optimizar el gasto: muchos aspectos de ello giran en torno a la elección de la columna, no olvidando que las columnas comprobadas en fábrica son siempre más caras. Así, se puede alargar la vida de las columnas empleando precolumnas robustas y de calidad; rellenos poliméricos que permiten limpiezas (lavados) de las columnas menos dañinas; fases estacionarias de alta estabilidad que exhiban menor hidrólisis; columnas base-desactivadas que eviten adicionar bases a la fase móvil. Además, las columnas de fase reversa con cadena alquílica más corta y menor contenido carbónico acortan la cantidad de modificador necesario: emplear *fases estacionarias menos hidrofóbicas*, con menos contenido carbónico (por ejemplo, C8 o incluso C4 en vez de

C18) también exigirá menos fase móvil orgánica para la elución de los analitos. Por último, se podría transferir el método a otra técnica de HPLC que requiera menor cantidad de solvente.

Tabla 13. Flujo y diámetros internos de columna.

Diámetro interno (mm)	Área transversal (mm²)	Flujo usual (ml/min)
1,0	0,79	0,05
2,0	3,14	0,19
3,0	7,07	0,42
4,6	16,60	1,00
7,8	47,80	1,87
22,4	394,00	23,70

El primer factor que afecta al gasto de fase móvil es el diámetro de la columna: las columnas *microbore* permiten menores flujos de trabajo (tabla 13), mientras que las columnas *fast*, más cortas y con menor diámetro de partícula causan tiempos de elución menores y, por tanto, menor gasto de solvente.

Otro factor que optimiza el gasto debido a las fases móviles es utilizar, si la aplicación lo permite, disolventes filtrados de “calidad no-HPLC” (simple agua destilada), más económicos. En el caso de ese agua, comprobaremos su calidad pasando 100 ó 200 ml de ella por la columna y realizando luego un gradiente de elución con metanol (de 0% a 100% de metanol): si el agua es “buena” no aparecerán picos “raros”, vistos mejor con un detector refractométrico (universal). Cuando se emplean grandes volúmenes de agua, por ser ésta la fase móvil, disolvente y diluyente de las muestras, mejor que comprar cara agua de calidad HPLC, conviene obtenerla en el propio laboratorio, purificándola por filtración, ósmosis inversa o, simplemente, pasándola por una columna de HPLC vieja, previamente lavada con acetonitrilo.

Asimismo la limpieza de las muestras puede reducir los tiempos de elución y, por tanto, el consumo de disolventes. Algunas muestras se deben acondicionar antes de ser inyectadas. La presencia de compuestos muy retenidos (incluso irreversiblemente retenidos) en las muestras es el principal factor de reducción de la vida operativa de las columnas; evitar esos compuestos prolonga la vida de la columna y acorta los tiempos de análisis, incluso puede que permita métodos isocráticos en vez de gradientes o gradientes más suaves que, a su vez, alargarán la vida de la columna. La limpieza de las muestras previa a su inyección (*clean-up*), se puede realizar mediante extracción en fase sólida (*SPE, Solid Phase Extraction*), extracción líquido - líquido (*LLE, Liquid-Liquid-Extraction*), extracción supercrítica

con CO₂ (*SFE, Supercritical Fluid Extraction*) o extracción acelerada de solventes⁵⁴.

Intercalar filtros en la tubería del equipo disminuye la agresión particular. Los filtros *on-line*, normalmente de 0,45 µm y ocasionalmente de 0,2 µm, se suelen disponer antes y tras el inyector, y en ocasiones antes de la celda del detector, si es de volumen muy pequeño. Tal acción solo requiere dos comprobaciones: que la conexión aporte un volumen muerto despreciable y que los filtros no se vayan obturando, aumentando la presión⁵⁵.

6.5. Verificación, mantenimiento y cebado de columnas

Continuamente la vida útil de las columnas de HPLC ha ido aumentando, más que su precio. Nueve de cada diez columnas son de fase reversa, principalmente de C18. Encuestas realizadas a los usuarios muestran que la población mayoritaria cambia de columna cada seis meses, seguida de cerca por quienes cambian de columna anualmente. Cada nueva columna comercializada sale al mercado con el objetivo de, entre otros, ser más resistente y duradera, al haber mejorado la química de las reacciones ligantes fase estacionaria - núcleo de sílice (tabla 14).

Tabla 14. Factores que aumentan la vida de la columna.

Mejoras químicas de la reacción fase ligada – núcleo de sílice
Utilización generalizada de precolumnas
Comprensión de las limitaciones de la fase estacionaria ante pH
Mejor preparación de las muestras, previa a su inyección
Mayor uso de columnas con núcleo polimérico
Mejoras en el diseño de la carcasa

Cada vez que recibamos una nueva columna, en primer lugar examinaremos su caja externa, comprobando si sufrió algún golpe o está dañada. Luego, verificaremos que la columna trae puestas sus propias tuercas, que impiden la evaporación del disolvente en que se conserva la columna tras su fabricación, ya que algunas fases estacionarias son sensibles a permanecer secas algún tiempo y el disolvente asegura su estabilidad durante su almacenaje y transporte (tabla 15).

⁵⁴ Mitra, S., Ed.: *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Editorial Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, 2003.

⁵⁵ United States Pharmacopeial Convention, Capítulo General 1226 *Verification of Compendial Procedures*. Rockville, Estados Unidos, 2012.

Tabla 15. Solventes en los que se guardan las columnas.

Fase estacionaria	Solvente de almacenamiento
Amino	1 % acetato de etilo en hexano
Diol	1 % acetato de etilo en hexano
C18, C8, ODS	60% agua : 40% acetonitrilo
Sílice	1 % acetato de etilo en hexano
Ciano	4% isopropanol en hexano

Cada columna nueva debe chequearse al recibirla con idénticos patrones al test del fabricante o, en caso de no disponer de ellos, los utilizados durante la validación. Tales chequeos deben repetirse periódicamente para verificar que el relleno de las columnas continúa en buenas condiciones.

Las columnas suelen mostrar una flecha indicativa de la dirección del flujo cuando se rellenaron en fábrica. Lo correcto es mantener el flujo de fase móvil en la misma dirección de la flecha, sabiendo que las columnas se empaquetaron en fábrica a presiones varias veces superiores a su “teórico” límite de presión, que consta en el manual de la columna y que tendremos en cuenta durante el trabajo diario. Las columnas emplazan *frits* en sus dos extremos, el inicial para evitar oclusiones. La porosidad de esos *frits* debe ser menor que el límite más bajo de la distribución de partículas del relleno. Asimismo, las partículas más pequeñas podrían formar un volumen muerto si se invierte la columna.

Los efectos extracolumnares afectarán negativamente a la eficiencia de las columnas, por lo que deben minimizarse, máxime en columnas de UHPLC, cortas, ultrarrápidas o *microbore*, donde el volumen medio de pico es de 1 a 50 picolitros. Es importante usar tubería de diámetro interno de 0,12 a 0,19 mm para unir la columna con el inyector y el detector.

6.6. Consideraciones de la fase móvil

Tras la columna, la variable más importante en HPLC es la composición y calidad de la fase móvil. Durante su uso pasan muchos litros de fase móvil por la columna, que puede acumular impurezas en su cabeza. Las impurezas orgánicas podrían quedar muy retenidas en la columna y eluir cuando menos se espera, ocasionando picos extraños en los cromatogramas, sobre todo con gradientes de elución, así como deriva e inestabilidad de la línea de base en régimen isocrático, incluso sin inyectar muestras.

Debemos cerciorarnos de que los solventes no atacan los materiales plásticos que conforman muchos accesorios del laboratorio, en cuyo caso contrario podrían aparecer picos fantasmas en los cromatogramas. Algunos solventes contienen pequeñas cantidades de aditivos: por ejemplo, el tetrahidrofurano suele contener antioxidantes para prevenir la formación de peróxidos y el cloroformo suele contener etanol para prevenir la formación de fosgeno. Esos aditivos pueden variar entre fabricantes y afectar a los tiempos de retención y línea de base de los cromatogramas.

Muchos solventes de grado HPLC son de alto grado de pureza, limitando, sobre todo, las impurezas que absorben radiación UV. Los solventes de grado HPLC se suministran filtrados, sin partículas. En el caso de emplear como reservorios las mismas botellas de solvente, la presencia de partículas puede causar problemas. Cuando los usuarios hacen sus propias fases móviles, especialmente si son tamponadas, aumenta el riesgo de presencia en la fase móvil de partículas extrañas procedentes del tampón o introducidas durante el proceso de pesada, al transferir la sal al matraz donde se disolvió o al ponerla en el reservorio de solvente.

6.7. *Equilibrado y acondicionamiento de columnas*

Antes de su uso la columna debe ser “equilibrada” con suficiente fase móvil. Tras leer el manual de la columna veremos qué fases móviles son compatibles, desde el disolvente inicial (que debería contener la columna nueva o almacenada) al de trabajo, pasando sucesivamente disolventes intermedios compatibles y solubles entre sí. Podemos comprobar que una fase móvil es miscible con la siguiente sencillamente juntándolas en un matraz o tubo de ensayo: si son inmiscibles, intercalaremos otro disolvente intermedio, perfectamente miscible con ambas.

Una columna se equilibra bombeando aproximadamente 10 veces su volumen columnar: por ejemplo, 25 ml en el caso de las columnas analíticas (de 250 x 4,6 mm), pues su volumen interno es, aproximadamente, 2 ml. Con todo, las columnas de sílice para fase normal requieren mayor cantidad de fase móvil para equilibrarse. En cualquier caso, el primer signo de equilibrado es alcanzar un valor de presión constante en el sistema de bombeo, siendo el segundo obtener una línea de base estable y plana, y el tercero y definitivo la estabilidad de los tiempos de retención de patrones.

Limpieza y regeneración de columnas

Con el uso, algunas moléculas irreversiblemente retenidas van recubriendo paulatinamente las partículas del relleno columnar, causando su deterioro y pérdida de capacidad, resolución y eficiencia. El filtro inicial, posicionado en cabeza de columna, se va obturando y la presión aumenta con el uso. A veces se recurre a “dar la vuelta” a la columna para “sacar” picos considerados irreversibles, aunque no deberíamos confiar que siempre será así. Otro procedimiento es bombear una fase móvil de polaridad más parecida (menos alejada) a la columna, por ejemplo, tetrahidrofurano en columnas de fase reversa, menos polar que el metanol o el acetonitrilo. Si el equipo dispone de horno de columnas, una temperatura relativamente alta (40° C) podría coadyuvar a la limpieza de las columnas.

7. DETECTORES DE HPLC

7.1. Consideraciones generales

La cromatografía solo fue autónoma e independiente cuando incorporó detectores a los equipos: esto ocurrió por primera vez en 1940, cuando Tiselius y Claesson idearon unir la salida de la columna cromatográfica a un refractómetro modificado para realizar medidas en régimen de flujo continuo. Con ello la cromatografía líquida tuvo un verdadero renacimiento: empleando inicialmente detectores refractométricos, el desarrollo posterior de otros detectores fue lento, fundamentalmente por las bajas concentraciones de los analitos y sus propiedades moleculares, que exigían a los detectores responder a una propiedad común de los solutos y hacerlo con aceptable sensibilidad, precisión y linealidad⁵⁶. El detector de HPLC precisa dos propiedades, que no por evidentes son excusables: responder ante muestras en estado líquido y hacerlo en régimen de flujo continuo, para generar los cromatogramas, gráficos *on-line* de su señal continua frente al tiempo cuando las muestras atraviesan su celda de flujo continuo, aunque algunos detectores que también lo hacen de forma discontinua (*off-line*).

Los detectores de HPLC pueden dividirse en *detectores diferenciales*, donde los analitos producen una señal “diferente” a la ocasionada en ellos por la fase móvil, y *detectores integrales*, que generan cromatogramas como una serie de escalones crecientes, que representan el valor acumulado aditivamente (integrado) de su señal frente al tiempo.

Más lógicamente, los detectores de HPLC pueden dividirse en: *detectores universales*, que acusan cambios de una propiedad física común a todas las especies analizadas, sean analitos, disolventes o contaminantes, caso de, por ejemplo, los detectores refractométricos; *detectores selectivos*, que solo detectan aquellos compuestos que presentan una determinada propiedad, como, por ejemplo, absorber la radiación de una longitud de onda dada, y *detectores específicos*, donde solo muestran señal los analitos deseados, siendo insensibles a otros compuestos (otros analitos, contaminantes, metabolitos, disolventes, etc.). Evidentemente, los detectores específicos no dejan de ser detectores selectivos.

También, por su efecto sobre las muestras, distinguiremos *detectores no destructivos* y *detectores destructivos*.

Sin embargo, más académico y habitual es clasificar los detectores por su fundamento físico-instrumental en: *detectores ópticos*, basados en la interacción

⁵⁶ Parrott, D., ed.: *A Practical Guide to HPLC Detection*. Academia Press, San Diego, 1993.

de una radiación con los analitos (detectores UV-VIS, *diode array*, fluorimétricos, refractométricos, polarimétricos, de *light-scattering*); *detectores eléctricos*, basados en la medida de una propiedad eléctrica (electroquímicos, conductimétricos); *otros detectores específicos* (radiométricos, viscosimétricos), y *detección hibridada*, acoplando HPLC a otras técnicas (LC-MS, LC-ICP, LC-RMN, LC-FTIR, etc.). Esta clasificación instrumental es preferible, ya que en HPLC el término *selectivo* resulta ambiguo respecto a las muestras analizadas y, sobre todo, porque el fundamento de cada técnica instrumental ya implica si es selectiva o universal, siendo la selectividad deseable en análisis donde sabemos muy bien qué solutos esperamos (como en análisis de control de calidad), pero la situación cambia en investigación, donde pueden aparecer metabolitos, derivados, etc. El detector refractométrico es paradigma de detector universal, mientras que los detectores fluorimétricos y electroquímicos lo son de detectores selectivos y LC-MS de detección hibridada. En todos ellos la sensibilidad depende de la selectividad, pues los sistemas de datos cromatográficos pueden exhibir aumentada la señal del detector *ad libitem*, pero para que una señal muy amplificadas resulte útil debe exhibir bajo nivel de ruido, haciendo preferible definir la sensibilidad en términos de *relación señal - ruido*.

Por último, otra pragmática clasificación de los detectores de HPLC los agrupa en: *habituales* (espectrofotométricos UV-VIS), *selectivos* (fluorimétricos, electroquímicos, radiométricos), *menos habituales* (refractométricos, conductimétricos), *ocasionales* (viscosimétricos, ultrasónicos) o *hibridados* (espectrómetros de masas, resonancia magnética nuclear, espectrofotometría FTIR).

Un buen detector de HPLC, junto a las propiedades inherentes de responder ante muestras en estado líquido y trabajar en condiciones de flujo continuo, debe mostrar mínima deriva y ruido, alta sensibilidad, rápida respuesta, varios órdenes de linealidad, pequeño volumen muerto, acusar poco los cambios externos (de flujo, de temperatura, de fase móvil), ser robusto, tener un manejo sencillo y comprensible, no ser destructivo para las muestras, capaz de detectar todos los analitos objeto del análisis y mostrar cierta selectividad ante los posibles contaminantes (tabla 16).

Tabla 16. Detectores de HPLC y Mínima Cantidad Detectable (MCD).

Detector	Aplicabilidad	MCD	Linealidad
UV-VIS	selectivo	ng	10 ⁴
Diode array	selectivo	ng	10 ⁴
Fluorimétrico	muy selectivo	pg	10 ⁶
Refractométrico	universal	µg	10 ³
Polarimétrico	muy selectivo		
Electroquímico	muy selectivo	fg	10 ⁶
Conductimétrico	universal	ng	
Radiométrico	muy selectivo	pg	
Viscosimétrico	polímeros		
Light scattering evapor.	universal		
Light scattering láser	polímeros		
Quimioluminiscencia	muy selectivo		

Sin embargo, no existe un detector ideal de HPLC. Según la selectividad y sensibilidad buscadas se utilizan unos más que otros, imperando los espectrofotométricos UV-VIS. De todos los posibles detectores de HPLC citaremos los realmente utilizados, por su potencial analítico, aplicaciones y número de fabricantes.

Aspectos cuantitativos del detector de HPLC

Los requerimientos generales cuantitativos del detector quedan supeditados a seis aspectos importantes, comunes a todo detector de HPLC, expuestos a continuación: número máximo de picos detectados, su volumen de celda, su constante temporal, concentración detectable, sensibilidad y linealidad de su respuesta⁵⁷.

Número máximo de picos detectados

Aunque podría esperarse infinito el número máximo de picos “vistos” por el detector, en la práctica existe un número máximo de picos o *capacidad de picos en el detector* (n), definida por:

⁵⁷ Matthew, S.: *Analytical Method Development by HPLC for Starters*, Primera edición. E-book, Amazon Digital Services, Seattle, Washington, 2012.

$$n = 1 + \frac{\text{Pendiente de la recta de calibración}}{\sigma} \quad (21)$$

Para que el análisis dure un tiempo razonable, interesa fijar un límite aceptable del factor de capacidad (k'), que condiciona el tiempo de retención en la archiconocida expresión:

$$t_R = t_0(1 + k') \quad (22)$$

Valores excesivos de k' supondrán altas retenciones, disminuyendo la dispersión intracolumnar la altura de los picos y aumentando su anchura, empeorando la resolución. Por ello, el *número máximo de picos (n)* o *capacidad de picos en el detector* está en relación directa respecto al factor de capacidad (k'):

$$n = f(1+k') \quad (23)$$

Volumen de celda del detector

La *celda de flujo continuo (microcámara, microcelda o microceldilla)* es el ensanchamiento de la tubería procedente de la columna en la zona de medida del detector, usualmente de pocos microlitros de volumen interno, el cual, junto a su tamaño y sensibilidad ante el volumen inyectado de muestra condicionan su uso. Algunos detectores acusan más que otros las pulsaciones de las bombas, limitando su sensibilidad; inyectar más volumen de muestra para aumentar la sensibilidad podría empeorar la eficiencia, limitación más severa de lo que puede juzgarse a rimería vista. En el mismo sentido, el tamaño de celda es condicionante: por ejemplo, aunque en los detectores espectrofotométricos UV-VIS serían ideales celdas de gran paso óptico (por estar su medida regida por la ley de Lambert-Beer), rara vez sobrepasan los 5 mm, tal vez 10 mm, por el ancho adicional que aportarían a los picos. Por otra parte, la integración al cuantificar convierte los picos del cromatograma en histogramas múltiples, siendo óptimo rebanar cada uno en 15 o más secciones, y celdas de gran volumen causarán difusión de los solutos en la fase móvil. Como regla, *el volumen de celda ha de ser, al menos, 100 veces menor que el volumen muerto de la columna*: como las columnas analíticas poseen un volumen de unos 2 ml, la celda del detector debe ser de 20 μ l o menor.

La celda de flujo del detector ha de aunar un compromiso intermedio entre ser un microtubo o una microcámara. La celda del detector contribuye a un eventual aumento de la anchura de pico, expresada como su varianza total σ_t^2 , dependiente del volumen de celda del detector (V_d) y del flujo (F):

$$\sigma_t = \frac{V_d}{F} \quad ; \quad \sigma_t^2 = \frac{V_d^2}{F^2} \quad (24)$$

Además, el flujo es proporcional al diámetro de tubo (d_c), que hace aumentar la varianza, ensanchando los picos:

$$F = f(d_c) \quad (25)$$

La celda del detector de HPLC admite un *volumen máximo* ($V_{d \max}$), de forma análoga a como vimos respecto al *volumen máximo de inyección* ($V_{i \max}$), en este caso también dependiente de la conformación del detector, que marca la densidad de muestra en el detector (λ) y del volumen máximo de muestra aceptado por la columna (V_{\max}), junto a las mismas variables columnares de eficiencia (N); capacidad (k'); morfología (d_p , d_c), porosidad (ε) y permeabilidad del relleno (θ):

$$V_{d \max} = \frac{V_{\max}}{\lambda} \sqrt{N} h d_p \frac{\pi \theta d_c^2}{4} \varepsilon (1+k') \quad (26)$$

Columnas con menor tamaño de partícula exigen celdas de menor volumen, condicionando éste la eficiencia de la separación:

$$\sqrt{N} = \frac{V_{d \max}}{\pi \theta d_c} 4 \frac{1}{h d_p} \frac{1}{\varepsilon (1+k')} \quad (27)$$

En principio la mayoría de las columnas proporciona un alto número de platos teóricos, y si el análisis exhibe pocos platos teóricos, casi seguro que esa pérdida de eficiencia se deberá más a fenómenos extracolumnares, de los cuales los más influyentes son los debidos a volúmenes inadecuados del inyector y celda del detector, cuyos tubos de entrada han de ser del menor diámetro y longitud posible. Las celdas del detector suelen exhibir las marcas “in” y “out” para que el flujo discurra por ellas en un sentido óptimo. Empero, algunos detectores montan largos tubos de entrada para estabilizar la línea de base.

Constante temporal, constante de integración

Si bien podría parecer que el cromatograma exhibe la señal del detector de forma continua, la electrónica de éste entrega su señal cíclicamente, con una cierta frecuencia, reflejada en los cromatogramas como matriz bidimensional de puntos señal del detector – tiempo. Sin embargo, cada uno de los datos que el detector envía al sistema de datos no es un solo punto (que el cromatograma muestra como punto individual), sino la media de varios, que el detector entrega a su circui-

tería durante un intervalo dado, denominado *constante de integración* (τ) o *constante temporal del detector*. Valores pequeños de τ contribuirán a aumentar el ruido (rizado) de la línea de base, pero valores grandes podrían hacer que los cromatogramas pierdan detalle, pasando desapercibidos algunos hombros o valles del cromatograma (figura 38).

Las columnas analíticas suelen demandar valores de constante de integración de aproximadamente un segundo (tabla 17): con ello, el sistema de datos recibe un solo punto que, repetimos, es la media de muchos puntos que procesó el software interno del detector. Evidentemente, técnicas más rápidas (UHPLC, capilar, narrowbore, *fast*) exigen menores constantes de integración, mientras que, por el contrario, las técnicas preparativas o semipreparativas, cuyos cromatogramas son largos y muestran picos muy anchos, hacen innecesario penalizar el ruido de la línea de base y la memoria de la estación de datos con constantes de integración menores de 5 segundos.

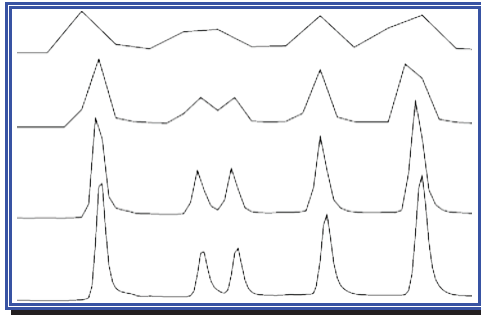


Figura 38. Frecuencia del muestreo de datos y resolución: de arriba hacia abajo, constantes de integración de 1, 2, 5 y 10 puntos/segundo.

Tabla 17. Constantes de integración ideales.

Técnica de HPLC	Valor (segundos)
analítica	0,5 - 2
preparativa	> 5
capilar	< 0,1

La constante de integración del detector afecta a la resolución aparente del cromatograma, única información primaria para el cromatografista. El tiempo de retención (t_R) y la eficiencia del pico definen la constante de integración máxima del detector, agrupando en θ la suma de todas las varianzas (σ^2) debidas a cada módulo del equipo:

$$\theta = \Sigma \sigma^2 \quad (28)$$

El máximo valor de constante de integración (τ_{max}) puede estimarse tomando los valores de tiempo de retención y eficiencia del primer pico del cromatograma como⁵⁸:

$$\tau_{max} = \theta \frac{t_R}{\sqrt{N}} \quad (29)$$

Así, los tiempos de retención pueden sufrir un incremento relativo aparente, en parte proporcional al *máximo valor de la constante de integración* posible (τ_{max}) y por otra, a θ/\sqrt{N} . Aceptando valores de θ próximos al 1%, tiempos de retención entre 5 y 10 minutos y eficiencia entre 5.000 y 10.000 platos teóricos, la constante de integración toma el valor de 0,4 segundos:

$$\tau_{max} = 0,01 \frac{5}{\sqrt{5000}} = 0,4 \text{ segundos} \quad (30)$$

Juzgando cómo afecta la sola electrónica del detector al valor de su constante de integración obviando el tiempo (τ) requerido por la fase móvil para llenar el volumen de la celda:

$$\tau \geq 40 \text{ milisegundos} \geq \tau \quad (31)$$

Esto es aplicable a detectores con respuesta lineal, pudiendo definirse la señal instrumental (SI) de los detectores de respuesta no lineal como la producida por una concentración (c) en un supuesto intervalo de proporcionalidad lineal (a , pendiente de la recta de calibrado) y una constante propia del equipo (cte):

$$SI = cte \cdot c(1 - ac) \quad (32)$$

Y la varianza del pico aumentará por un nuevo factor (f):

$$f = 0,4 \frac{a h}{cte} \quad (33)$$

Suponer que la respuesta del detector es siempre lineal respecto a la concentración (en sistemas de primer orden) es mucho suponer, así como la de los amplificadores y registradores de la señal, que a veces generan respuestas condicionadas por una o varias funciones matemáticas exponenciales. Todo ello redefine el *tiempo de respuesta del detector* como el *tiempo necesario para poder ob-*

⁵⁸ Kirkland, J.J., Ed.: *Modern Practice of Liquid Chromatography*. Editorial Wiley Interscience, Nueva York, 1971.

servar un aumento en la señal de salida del 10% al 90%, cuando ésta aumenta a la máxima velocidad que el detector puede: así calculados, los valores de constante de integración (τ) resultan más del doble de los teóricos para un detector de tipo lineal o de primer orden.

Concentración detectable

Casi todos los detectores exhiben respuesta lineal en una determinada zona de concentración, mostrando otras zonas sin proporcionalidad constante, donde las variaciones de concentración provocan respuestas distintas entre sí. El límite por encima del cual los sucesivos aumentos de concentración no se corresponden con los de la señal del detector marca un momento a partir del cual se dice que "el detector se ha quedado ciego". La detectabilidad la limita cuantitativamente una concentración máxima del analito, dentro de los límites de detección. Es difícil una solución genérica, pues la composición de la muestra es limitante. No obstante, podríamos establecer algunos presupuestos acudiendo a la máxima cantidad de muestra detectable (Q_{max}) (16) y al máximo volumen de muestra inyectada ($V_{d\ max}$, 26) magnitudes ambas relacionadas por la densidad de muestra en el detector (λ):

$$\lambda = \frac{Q_{max}}{V_{d\ max}} \quad (34)$$

Por tanto:

$$Q_{max} = \lambda \cdot V_{det\ max} = \lambda \sqrt{L H} \frac{\pi \theta d_c^2}{4} \varepsilon (1+k') \quad (35)$$

Y puesto que, como sabemos, el tiempo de retención (t_R) es función del tiempo muerto (t_0) y del factor de capacidad (k') en $t_R = t_0(1+k')$ (22), como análogamente lo es el volumen de retención $V_R = V_0(1+k')$, se llega a:

$$V_R = V_0(1+k') = \frac{\pi d_c^2}{4} \varepsilon L (1+k') \quad (36)$$

Definiendo c_{max} como la máxima concentración del analito en el detector y c^* como la concentración del analito en la muestra:

$$c_{max} = \frac{\lambda \theta}{\sqrt{2\pi}} c^* \quad (37)$$

La capacidad de retención de la fase estacionaria condiciona el valor límite de concentración y, dado que la máxima cantidad de muestra (Q_{max}) depende del valor del tiempo de retención, el valor real de Q_{max} será el del primer compuesto eluido, cuyo valor de capacidad (k') se aproxima a cero, por lo que:

$$Q_{max} = \lambda \sqrt{Hhd_p} \frac{\pi \theta d_c^2}{4} \varepsilon (1+k') \quad (38)$$

Con ello puede cuantificarse finalmente la concentración máxima detectable como:

$$c_{max} \cong \frac{\lambda \theta}{(1+k') \sqrt{2\pi}} c \quad (39)$$

Sensibilidad del detector

La *sensibilidad de un detector de HPLC* la establece en general la pendiente de la recta de calibrado de la señal instrumental (*SI*, en el eje de ordenadas) frente a la concentración (*c*, en el eje de abscisas) según el “gusto europeo” (el “gusto americano” representa las concentraciones en el eje de ordenadas y la señal instrumental en el eje de abscisas). En cualquier caso, las áreas de los picos deberían expresarse en unidades de tiempo (minutos) por la señal del detector (mV), siendo números razonablemente altos, en tanto que las concentraciones son números razonablemente pequeños (1 ppm, 10 ppb, etc.), por lo cual, la pendiente de la calibración (que constituye el *factor de respuesta*) resulta un número alto y fácil según el “gusto europeo”, mientras que siguiendo el “gusto americano” resultará un número muy pequeño. Con todo:

$$\text{Sensibilidad} \approx \text{Pendiente Gráfica Calibrado} \quad (40)$$

Empero, aun con la misma pendiente (y misma “sensibilidad”), rectas de calibración construidas con distinto grado de correlación (y, por tanto, de precisión de sus puntos, estimada por su desviación estándar σ) difieren en *sensibilidad analítica* (figura 39):

$$\text{Sensibilidad analítica} = \frac{\text{Pendiente Recta Calibrado}}{\sigma} \quad (41)$$

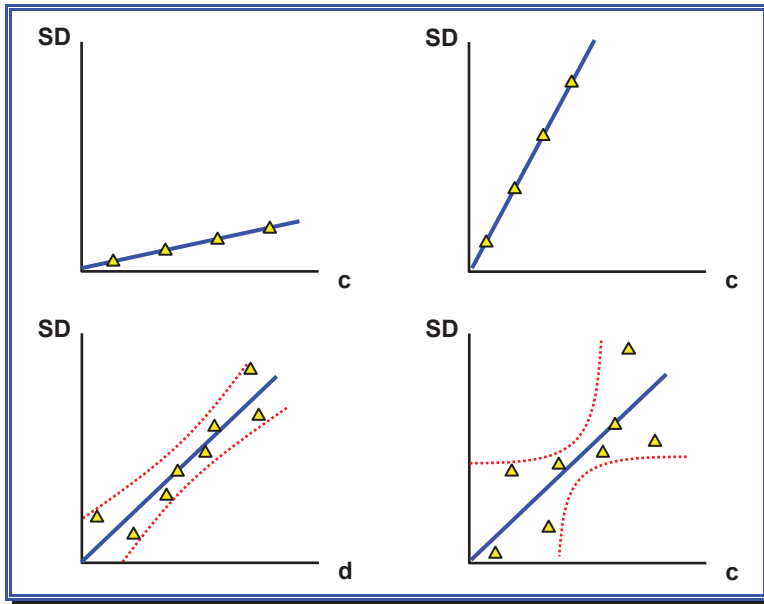


Figura 39. Pendientes de las rectas de calibrado de la señal del detector (*SD*) frente a la concentración (*c*): arriba, entre dos rectas de calibrado la de mayor pendiente (derecha) otorga mayor sensibilidad a la técnica; abajo, entre dos pendientes análogas la de menor variabilidad (izquierda) otorga mayor sensibilidad analítica.

Muchas veces la sensibilidad del detector constituye el principal factor de decisión. Sin embargo, es preciso recordar que la sensibilidad del detector difiere de la mínima cantidad detectable, la cual puede variar en función de las condiciones cromatográficas e instrumentales, por lo que sería mejor hacerlo en términos de *relación señal - ruido* sobre la línea de base. El ruido cromatográfico es producido por diversas causas (oscilaciones eléctricas, inestabilidad de la lámpara, de los potenciómetros, de la temperatura, etc.), y suele medirse en un tramo de línea de base entre dos picos bien resueltos, normalmente adyacentes. También interesa cuantificar la deriva de la línea de base del cromatograma exclusivamente provocada por el detector, estimada en tiempos relativamente largos, muy superiores a la anchura de pico de los analitos. Así, por ejemplo, la deriva de un sufrido detector espectrofotométrico UV-VIS, estimada en mA/hora, expresa su estabilidad.

La respuesta del detector puede establecerse como medida de su sensibilidad *respecto a la masa* o *respecto a la concentración* del analito. La *respuesta de un detector sensible a masa* (*R*) se expresa en mV/masa del analito a partir de la altura del pico (*h'*, en mV), su desviación estándar (σ , en cm, semianchura tomada al 60,7% de la altura), la masa de analito inyectado (*M*, en gramos) y la frecuencia de muestreo de datos que envía el detector al *software* cromatográfico o al registrador (*v*, en cm/min):

$$R = \frac{h' \sigma}{vM} \quad (42)$$

Análogamente, la *respuesta de un detector sensible a concentración* (R') se expresa en mV/masa/unidad de volumen y depende de las mismas variables, junto al flujo (F , en ml/min):

$$R' = \frac{h' \sigma F}{vM} = F \cdot R \quad (43)$$

Linealidad de la respuesta

La señal o respuesta del detector, modificada por la presencia de los analitos, debe ser lineal respecto de la concentración de éstos dentro de unos límites, para poderla cuantificar fácilmente. El *límite inferior de detección* (LID) y el *límite superior de detección* (LSD) pueden relacionarse con la sensibilidad, expresada en función de la varianza de señal en el detector (σ_d^2):

$$\sigma_d^2 = 4 \frac{LSD^2}{LID^2} \quad (44)$$

También es importante estimar la capacidad del detector de mantener su respuesta lineal durante varios órdenes de magnitud de concentración mediante dos límites: su *intervalo (rango) lineal* y su *intervalo (rango) dinámico*. El *límite (rango) lineal* (R) se expresa en función de la sensibilidad del detector (S , pendiente de la gráfica de calibrado), la concentración (c) y su respuesta con la concentración más baja detectable de analito (R_0):

$$R = Sc + R_0 \quad (45)$$

Un detector totalmente lineal no exhibe respuesta ("*respuesta cero*") sin concentración del analito ("*concentración cero*"):

$$R = Sc \quad ; \quad S = \frac{R}{c} \quad (46)$$

En un detector lineal la sensibilidad parece *constante para cualquier concentración, en cualquier respuesta*. Sin embargo, variaciones no lineales apartan al detector más del 5% de las condiciones de linealidad. Según las normas ASTM (*American Society for Testing and Materials*), el *intervalo (rango) dinámico del detector es aquel intervalo (rango) de concentraciones en que una variación de con-*

centración varía su señal, desde un límite inferior (el nivel de ruido del detector) hasta un límite superior (en teoría, la respuesta máxima del detector). En la práctica, el límite inferior es la respuesta del detector ante una concentración que posee una pendiente nula o cercana a cero.

La linealidad del detector puede evaluarse de dos modos: *off-line* (*linealidad estática*) y *on-line* (*linealidad dinámica*). En el test estático, el detector se desconecta de la columna de HPLC, introduciendo con una jeringa sucesivamente en su celda patrones de las concentraciones más baja, más alta e intermedia de la *concentración objetivo* (la esperada en las muestras): la aguja de la jeringa, con cono y férula *ad hoc*, se une a la celda del detector mediante un conector de volumen muerto, colocando un restrictor de presión a la salida del detector. Si el detector fuese destructivo para las muestras, se procede al test dinámico, que se realiza inyectando la muestra en el inyector del cromatógrafo. En ambos casos, el comúnmente denominado *rango lineal dinámico* (*RLD*) es la zona donde el detector exhibe respuesta lineal respecto a la concentración, conservando la pendiente (sensibilidad) un valor constante. El rango lineal dinámico se expresa como la máxima respuesta del detector (R_{max}) dividida por su ruido:

$$RLD = \frac{R_{max}}{\text{ruido}} \quad (47)$$

Aplicándolo, por ejemplo, a un detector espectrofotométrico *diode array* capaz de entregar señales lineales de hasta 2,50 UA (Unidades de Absorbancia) y ruido fotométrico de $1,0 \cdot 10^{-5}$ UA, tendrá un rango lineal dinámico de 250.000 (adimensional).

7.2. Detectores espectrofotométricos UV-VIS

Los detectores espectrofotométricos (UV-VIS y de cualquier otro tipo) se basan en la absorción de la radiación, regida por la conocida *ley de Lambert-Beer*, cuyo enunciado establece que «*la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromático es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria*». La *ley de Bourger* (1729) y la *ley de Lambert* (1760) lo habían hecho parcialmente respecto al espesor de sustancia absorbente, mientras que la *ley de Bernard* (1852) y la *ley de Beer* (1852) lo relacionaron con la concentración del cuerpo adsorbente. Aunándolas, la ley de Lambert-Beer relaciona la absorción de una radiación de intensidad (I) con la concentración (c) y el espesor (b) del material absorbente que el haz radiante encuentra a su paso: así, la disminución de intensidad (dI/I) es proporcional al espesor del material adsorbente (b) y a la concentración (dc), junto a una constante de proporcionalidad (K):

$$-\frac{dI}{I} = -K \cdot b \cdot dc \quad (48)$$

Integrando respecto a la concentración, desde un valor 0 hasta un valor c , la intensidad resultante lo será desde un valor de intensidad incidente (I_0) hasta un valor I :

$$\int_{I_0}^I -\frac{dI}{I} = K b \int_0^c dc \quad (49)$$

Resolviendo ambas integrales:

$$[\ln I - \ln I_0] = Kb[c - 0] \quad ; \quad \ln \frac{I_0}{I} = K b c \quad (50)$$

Agrupando en un término denominado ε la constante K y la conversión numérica de logaritmos a logaritmos decimales:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon b c \quad (51)$$

Al definir la *absorbancia* (A) como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (52)$$

Se llega a la popular expresión de la *ley de Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon bc \quad (53)$$

La constante ε recibe el nombre de *coeficiente de absorción* de la sustancia absorbente, llamada *coeficiente de extinción molar* o *absortividad molar* cuando la concentración en la fórmula final de la ley de Lambert-Beer (53) se expresa en unidades de molaridad, variando, aparte de con la naturaleza de la sustancia adsorbente, con la longitud de onda aplicada y los disolventes donde se halla. Al representar la absorbancia frente a la concentración se obtiene una recta que pasa por el origen, de pendiente $\varepsilon \cdot b$ (figura 40).

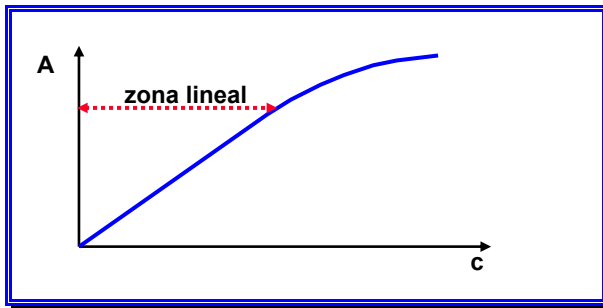


Figura 40. Linealidad de la ley de Lambert-Beer de un analito en un detector espectrofotométrico.

La ley de Lambert-Beer es la piedra angular que explica y cuantifica *cualquier proceso de absorción de radiación*, sea UV-VIS, IR, NIR, etc. Su importancia radica en que, en primer lugar, rige todos los procesos de absorción de la radiación electromagnética; en segundo, es válida para todo tipo de muestras, sean líquidas, disoluciones, gases o sólidas; en tercero, la absorbancia A es una propiedad aditiva y, cuando coexisten dos especies absorbentes en una solución, su absorbancia es la suma de la debida a cada especie, por lo que dos picos que coeluyen y absorben a la longitud de onda de trabajo muestran en el cromatograma un pico cuya señal (área, altura) engloba la absorbancia de ambas; en cuarto lugar, el coeficiente de extinción molar (ϵ) es constante y depende de la naturaleza de la sustancia absorbente y también de la longitud de onda de la medida, denominándose, como acabamos de ver, *coeficiente de extinción molar* o *absortividad molar* cuando el espesor o paso óptico se expresa en cm y la concentración en molaridad (M), si bien cuando la concentración se indica en porcentaje (%) u otras unidades diferentes de molaridad, ϵ se denomina *coeficiente de extinción específico* (el espesor o paso óptico siempre se expresa en cm); en quinto y último lugar, la *transmitancia* (T) es la fracción de radiación incidente transmitida:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (54)$$

La transmitancia se expresa muchas veces en *tanto por ciento de transmitancia* (% T), siendo la absorbancia el logaritmo de la inversa de la transmitancia:

$$\%T = 100 \cdot T \quad (55)$$

$$A = -\log(T) = \text{anti log}(-A) = \frac{1}{\text{antilog } A} \quad (56)$$

La linealidad de la ley de Lambert-Beer es su propiedad más importante, que justifica el empleo cuantitativo de los métodos absorciométricos. La absorbancia es una propiedad extensiva, propia de cada muestra y variable con el espesor y la concentración de dicha muestra, mientras que el coeficiente de extinción molar es una propiedad intensiva, propia de la sustancia absorbente e independiente de la concentración, del espesor e incluso de la intensidad de la radiación incidente (I_0). Para que la ley de Lambert-Beer se cumpla, es decir, para que la relación $A=\epsilon bc$ sea lineal, deben cumplirse las llamadas *cinco premisas de la ley de Lambert-Beer*: la radiación incidente ha de ser monocromática y paralela; las sustancias deben absorber independientemente entre sí; el medio absorbente ha de ser homogéneo; el índice de refracción no debe depender de la concentración, y la única interacción de la radiación con la materia debe ser la absorción. Sin embargo, es imposible determinar qué efecto ejercen otros factores sobre la ley de Lambert-Beer, tales como la temperatura, longitud de onda, pH o los disolventes. En la práctica, hay desviaciones positivas y negativas de la ley de Lambert-Beer, cuyo estudio importa mucho en HPLC, pudiendo ser dichas desviaciones de cuatro tipos:

Desviaciones reales de la ley de Lambert-Beer: la expresión $A=\epsilon bc$ es solo aplicable a *soluciones suficientemente diluidas*, pues a altas concentraciones aparece el efecto de *filtro interno*, que impide llegar la radiación a las últimas moléculas absorbentes. Otra causa de desviación real es el efecto del índice de refracción (n), que modifica el coeficiente de extinción molar en un *coeficiente de extinción molar real* (ϵ_R):

$$\epsilon_R = \frac{\epsilon n}{(n + 2)^2} \quad (57)$$

Desviaciones causadas por la instrumentación: la radiación aplicada nunca es totalmente monocromática, sino de un valor nominal con un cierto ancho de banda, resultando la absorción observada en el detector (que, no olvidemos, es aditiva) la suma de las posibles absorciones en ese intervalo de longitudes de onda. Otra desviación instrumental de la ley de Lambert-Beer se debe a la presencia de *luz parásita*, cuya intensidad (I_p) se suma a la incidente sobre la muestra (I_0) y también a la emergente (I), provocando un error en las medidas de absorbancia (figura 41), más acusado a mayores absorbancias y, evidentemente, a mayores valores de luz parásita. Conviene tener en cuenta la especificación de luz parásita del detector, sobre todo en medidas cuantitativas muy precisas de analitos que absorben grandemente (tabla 18).

Tabla 18. Influencia de la luz parásita sobre la absorbancia. Absorbancias y % de error con valores de intensidad de luz parásita (I_p) de 0%, 0,2%, 1% y 5%.

0%	error _{0%}	0,2%	error _{0,2%}	1%	error _{1%}	5%	error _{5%}
0,001	0,000%	0,001	0,002%	0,001	0,010%	0,001	0,050%
0,010	0,000%	0,010	0,002%	0,010	0,010%	0,010	0,051%
0,100	0,000%	0,100	0,002%	0,100	0,011%	0,100	0,056%
1,000	0,000%	1,000	0,008%	1,000	0,039%	0,998	0,195%
2,000	0,000%	1,999	0,043%	1,996	0,214%	1,979	1,049%

$$A = \log \frac{I_0 + I_p}{I + I_p} \quad (58)$$

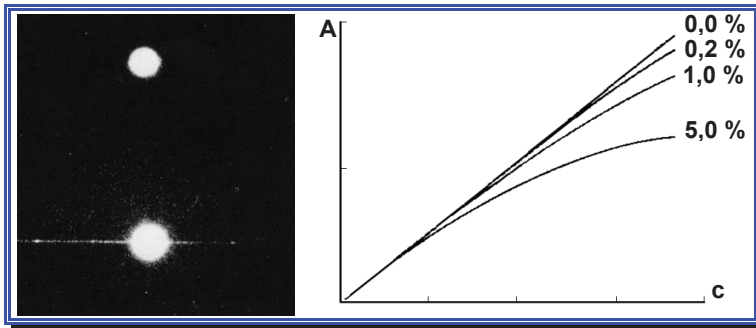


Figura 41. Izquierda: el haz inferior muestra luz parásita. Derecha: sin luz parásita la linealidad es perfecta, pero cuanto mayor es el valor de luz parásita antes se pierde linealidad en la ley de Lambert-Beer.

Desviaciones químicas: las reacciones químicas (asociación, polimerización, disociación), pueden provocar que las moléculas resultantes absorban de forma distinta a la prevista inicialmente. También causan desviaciones químicas la temperatura (la dilatación disminuye la concentración), solvatación (también disminuye la concentración), fotodescomposición (igualmente disminuye la concentración), fluorescencia (hay excitación en vez de absorción), *light scattering*, etc.

Desviaciones por incumplimiento de las cinco premisas de la ley de Lambert-Beer, ya que la radiación incidente, que debería ser monocromática y paralela, siempre es algo policromática y divergente; asimismo, la absorción de unos analitos condiciona la de otros, el medio absorbente es heterogéneo, el índice de refracción depende de la concentración y, además de la absorción, pueden existir otras interacciones de la radiación con la materia.

Longitud de onda e intensidad de absorción de la radiación UV-VIS

Los espectros UV-VIS exhiben bandas, suponiendo cada una de ellas una transición electrónica, con pequeñas diferencias entre sus estados vibracionales y rotacionales (figura 42). La intensidad de las bandas de los espectros resulta mayor cuando existe alta probabilidad (ψ^2) de que el analito se acople con la radiación UV-VIS incidente y haya transición, provocando la excitación un aumento de momento dipolar ($\Delta\mu$), que, a su vez, depende de la densidad electrónica. En cada molécula (x) el efecto es distinto (ϵ_x), como también lo es para cada longitud de onda (ϵ_λ).

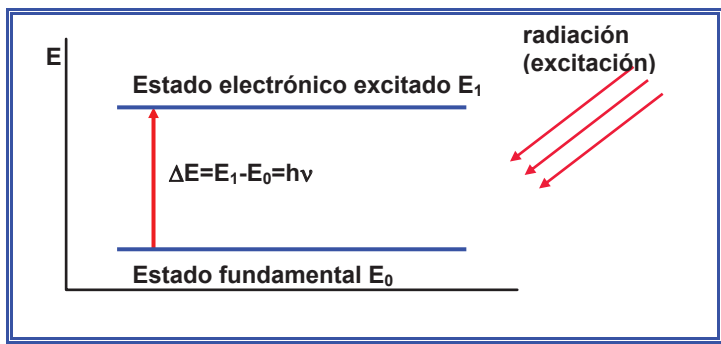


Figura 42. Excitación y transición electrónica.

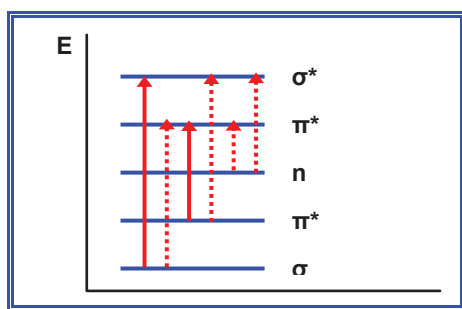


Figura 43. Posibles transiciones electrónicas permitidas (líneas continuas) y prohibidas (líneas discontinuas) por las leyes de la Mecánica Cuántica.

En principio, los electrones de enlace de las moléculas pueden hallarse en cinco niveles electrónicos (σ , π , n , π^* , σ^*), ordenados de menor a mayor energía potencial (figura 43). Al absorber la energía de la radiación UV-VIS, los electrones de enlace son promocionados a un nivel superior, mediante seis posibles transiciones (tabla 19): dos permitidas por las leyes de la Mecánica Cuántica ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$), con alta probabilidad (ψ^2), que producen altos ϵ por suponer continuidad del enlace. Sin embargo, las otras cuatro transiciones están prohibidas ($\sigma \rightarrow \pi^*$,

$\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \sigma^*$), teniendo baja probabilidad (ψ^2) y exhibiendo bajos ϵ , por suponer cambios del tipo de enlace.

Tabla 19. Transiciones electrónicas UV-VIS.

transiciones	permitidas	energía	λ
$n \rightarrow \pi^*$	prohibida	baja	UV-VIS
$\pi \rightarrow \pi^*$	permitida	baja	UV-VIS
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	permitida	muy alta	UV al vacío
$\sigma \rightarrow \pi^*$	prohibida	alta	UV al vacío
$\pi \rightarrow \sigma^*$	prohibida	muy alta	UV al vacío
$n \rightarrow \sigma^*$	prohibida	alta	UV al vacío

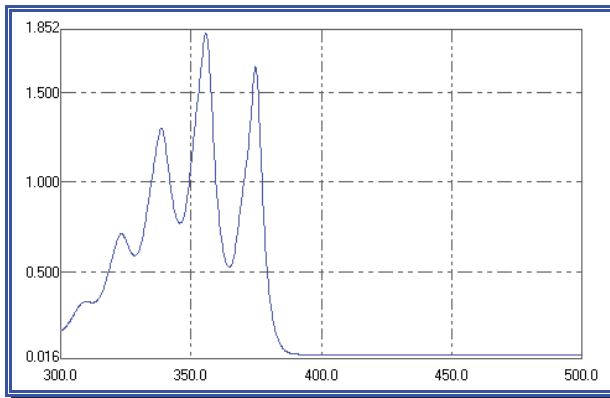


Figura 44. Espectro de absorción UV-VIS del antraceno.

En el espectro UV-VIS el máximo de una banda de absorción se denomina *longitud de onda de absorción* (figura 44). De las seis transiciones posibles, dos requieren poca energía ($n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$), propia de las radiaciones UV-VIS, mientras las otras cuatro requieren gran energía ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$), exigiendo aplicar longitudes de onda inferiores a 200 nm, en la región de UV al vacío. Como regla, *la radiación UV-VIS provoca normalmente transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$* (en dobles y triples enlaces), por tener longitud de onda adecuada y alta intensidad (altos valores de ϵ) y en menor grado transiciones $n \rightarrow \pi^*$, con baja capacidad absorbente (bajo valor del coeficiente de extinción ϵ) por ser una transición prohibida por las leyes de la Mecánica Cuántica. Por consiguiente, los detectores espectrofotométricos son óptimos para detectar moléculas con dobles o triples enlaces. El espectro UV-VIS es relativamente sencillo, con pocas bandas, aunque las moléculas complejas presentan espectros con más bandas, por la absorción de los grupos funcionales independientes entre sí más las debidas a sus interferencias mutuas. Los

grupos funcionales de las moléculas pueden absorber una o varias longitudes de onda y fueron denominados por Witt *grupos cromóforos* (tablas 20 y 21), mientras que se llaman *auxocromos* los grupos funcionales que, sin absorber radiación, modifican la de los grupos cromóforos, desplazando la longitud de onda de absorción de éstos (figura 45, tabla 22) hacia valores mayores (en *efectos batocrómicos* o *desplazamientos al rojo*) o menores (en *efectos hipsocrómicos* o *desplazamientos al azul*), así como aumentar o disminuir el valor del coeficiente de extinción (en *efectos hipercrómicos* o *hipocrómicos*).

Tabla 20. Absorción de grupos funcionales.

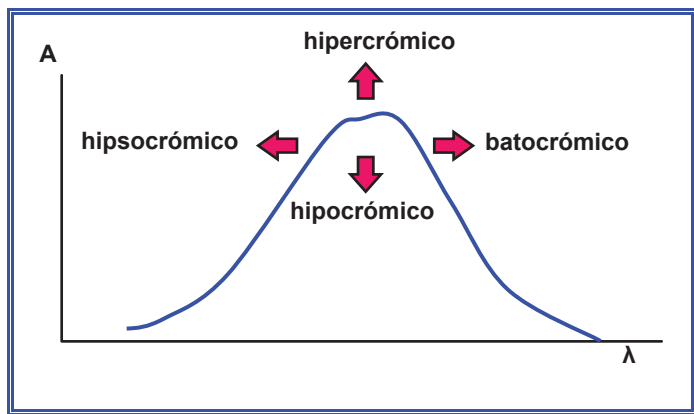
cromóforo	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)
C=C	185	8.000
C=O	188	900
-NH ₂	195	2.500
-N=N-	285-400	3.025
-CHO	210	20
-COOR	205	50
-COOH	205	60
-NO	252	8.000
-NO ₂	300	14
-Br	208	300
-S-S-	194	5.500
-O-	185	1.000
-C=N	160	-

Tabla 21. Saltos electrónicos y absorción de algunos cromóforos.

nivel	molécula	transición	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)
σ	etano	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	135	-
n	agua	$n \rightarrow \sigma^*$	167	7.000
n	metanol	$n \rightarrow \sigma^*$	183	500
n	1-hexanotiol	$n \rightarrow \sigma^*$	224	12
π	etileno	$\pi \rightarrow \pi^*$	165	10.000
π	acetileno	$\pi \rightarrow \pi^*$	173	6.000

Tabla 22. Efecto de la sustitución sobre la molécula del benceno (C_6H_6).

	C_6H_6	C_6H_5-OH	$C_6H_5-O^-$	C_6H_5-OAc	$C_6H_5-NH_2$	$C_6H_5-NH_3^+$
λ (nm)	255	270	287	261	284	253
ϵ ($cm^{-1} M^{-1}$)	300	1.400	2.600	300	1.500	160

Figura 45. Desplazamientos espectrales UV-VIS⁵⁹.

Los grupos auxocromos suelen provocar tres efectos: el *efecto de la sustitución*, que hace variar los máximos de absorción de moléculas voluminosas (tabla 22); el *efecto de la conjugación*, que reduce la energía de la transición al aproximar los orbitales π , n , π^* , llevándola a longitudes de onda mayores, fenómeno apreciable en los analitos que poseen electrones π deslocalizados y estructuras resonantes (figura 46), y, por último, el *efecto solvatocrómico*, donde los solventes utilizados varían la longitud de onda y el coeficiente de extinción, en un fenómeno distinto del *efecto del fondo*, una simple adición que puede restarse matemáticamente: por ejemplo, la promoción $n \rightarrow \pi^*$ de la acetona $CH_3-CO-CH_3$ disuelta en hexano se produce a 279 nm, en etanol a 272 nm y en agua a 264,5 nm, ya que los solventes polares forman enlaces puente de hidrógeno con los grupos $C=O$, aportando estabilidad y disminuyendo la energía del nivel n .

⁵⁹ Pavia, D. L.: *Introduction to Spectroscopy*, Editorial Saunders Golden Sunburst, Nueva York, 1979.

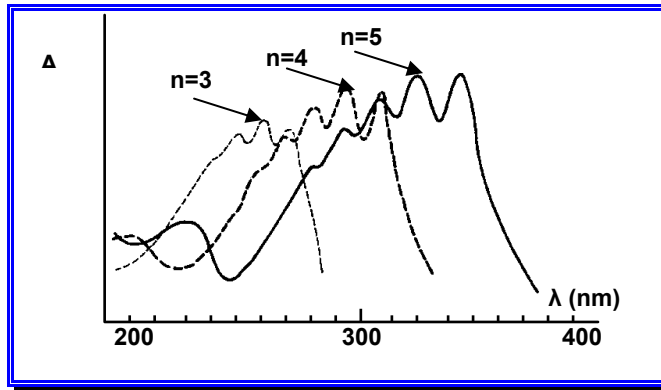


Figura 46. Desplazamiento batocrómico de tri, tetra y penta dimetilpolienes $\text{CH}_3\text{-(CH=CH)}_n\text{-CH}_3$.

En suma, la mayoría de los compuestos orgánicos pueden detectarse con detección espectrofotométrica UV-VIS, siempre que su molécula posea algún doble enlace, razón por la que dos de cada tres detectores de HPLC son espectrofotométricos UV-VIS. Incluso las moléculas carentes de dobles enlaces se pueden *derivatizar* con algún “reactivo fotogénico”, rico en cromóforos fuertes. La detección UV-VIS puede estimar la concentración molar del analito ($A = \epsilon bc$, por lo que $c = A/\epsilon b$) si previamente se conoce su coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de la determinación. Como la concentración se expresa en molaridad, se puede calcular el peso molecular (*PM*) del analito a partir de la concentración obtenida y de su volumen y peso en la solución inyectada:

$$c = M = \frac{g/PM}{l} \quad ; \quad PM = \frac{c(M)l}{g} \quad (59)$$

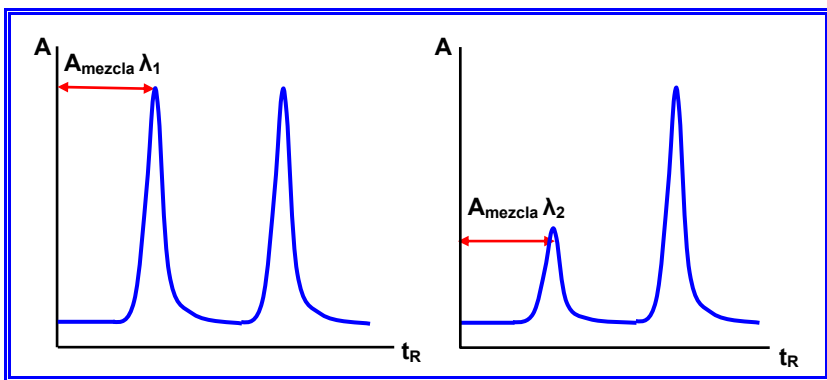


Figura 47. En un análisis de multicomponentes el primer pico muestra distintas áreas a dos longitudes de onda.

Por otra parte, la detección espectrofotométrica UV-VIS permite conocer la composición de un pico bajo el cual coeluyen dos analitos, siempre y cuando sepamos de cuáles se trata y su coeficiente de extinción molar, caso, por ejemplo, de un analito que se descompone en un metabolito cuyo espectro molecular de absorción UV-VIS difiere del de la molécula inicial: para ello, se realizan dos cromatogramas a dos longitudes de onda distintas (figura 47); previa o posteriormente, se inyectan por separado dos patrones de concentración conocida de cada una de ambas sustancias, viéndose su absorbancia en los cromatogramas a las dos longitudes de onda utilizadas en la determinación para calcular sus respectivos coeficientes de extinción molar a cada longitud de onda. En ambos cromatogramas, puesto que la absorbancia es una propiedad aditiva, puede establecerse un sencillo sistema de ecuaciones binario con dos incógnitas: la concentración del analito y la del metabolito. Si fuesen tres los componentes que coeluyen, para calcular sus respectivas concentraciones se precisarían tres cromatogramas a tres longitudes de onda. Generalizando, se precisarían n cromatogramas a otras tantas longitudes de onda, tantas como coeluyentes queramos determinar:

$$\text{Del cromatograma a } \lambda_1: A_{mezcla} = A_1 + A_2 = \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 \quad (60)$$

$$\text{Del cromatograma a } \lambda_2: A'_{mezcla} = A'_1 + A'_2 = \varepsilon'_1 bc_1 + \varepsilon'_2 bc_2 \quad (61)$$

Otra utilidad de la detección espectrofotométrica UV-VIS en HPLC es el cálculo de pKa en analitos cuyo espectro difiere en su forma ácida y básica (figura 48): se inyecta el analito a múltiples pH (al menos cinco), representando gráficamente la altura o área de pico frente al pH (figura 49), estimándose el pKa como el valor de pH en el punto medio de la curva (descendente si el analito muestra picos menores a pH mayores, pero análoga y creciente con analitos que muestren picos menores a pH menores).

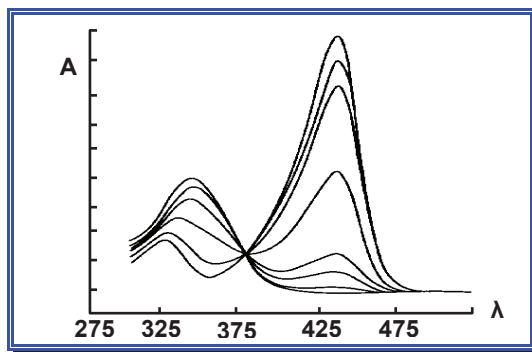


Figura 48. Espectros del fenol a distintos pH: mayores pH provocan desplazamientos hipocrómicos en la zona visible (derecha), al contrario que en la zona UV (izquierda), donde causan desplazamientos hipercrómicos tras el punto de cruce central en 383 nm (punto isobéptico).

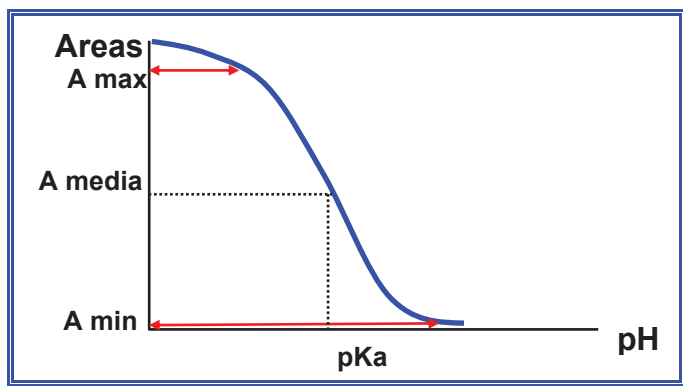


Figura 49. Gráfico de áreas frente al pH.

Instrumentación

Los detectores UV-VIS suelen presentar valores de sensibilidad alrededor de 10^{-8} a 10^{-9} g/ml del analito. Como se ha dicho, en cualquiera de sus modalidades, equipan dos de cada tres sistemas de HPLC. De ellos existen varios tipos (tabla 23): fotómetros de longitud de onda fija (generalmente a 254 nm, típica longitud de onda de absorción de los dobles enlaces); espectrofotómetros de longitud de onda variable, muchos de los cuales permiten programar y variar la longitud de onda durante el cromatograma; espectrofotómetros de barrido rápido (*RSD, Rapid Scanning Detectors*), que realizan espectros durante la elución de los picos, cambiando las condiciones de su monocromador; espectrofotómetros UV-VIS con transformada de Fourier⁶⁰, y detectores *diode array*.

⁶⁰ Marshall, A.G.: *Fourier, Hadamard and Hilbert Transforms in Chemistry*. Editorial Plenum Press, Nueva York, 1978.

Tabla 23. Componentes instrumentales de los detectores UV-VIS.

óptica	equipo	características
de haz simple	fotómetros	de filtros
	colorímetros	de filtros
	espectrofotómetros	de monocromador
de haz doble	espectrofotómetros con espejo semitransparente espectrofotómetros con chopper	
diode array		

Un detector espectrofotométrico de HPLC consta secuencialmente de las siguientes partes (figura 50): *fuentes de radiación*, generalmente dos, una que emite radiaciones UV (lámparas de deuterio) y otra radiaciones visibles (lámparas de tungsteno-halógeno), aunque algunos montan una sola lámpara de vapor de xenón para ambas regiones UV-VIS. Estas fuentes emiten radiación policromática, que un *selector de longitud de onda* reduce a radiación monocromática. El selector puede ser de varios tipos, desde un simple filtro hasta los más complicados *monocromadores*. Algunos pocos equipos son “de doble haz”, en los que un *divisor* parte el haz inicial en dos, haces que atraviesan respectivamente la zona de muestra con el eluyente y una zona de referencia cebada con fase móvil. Los divisores pueden oscilar desde un simple espejo semitransparente hasta un *chopper*, análogo a un ventilador cuyas aspas reflejan el haz para atravesar la muestra, mientras que el espacio entre aspas permite continuar la radiación inicial hacia la zona de referencia. El divisor de espejo semitransparente genera un doble haz de forma continua, con intensidad del 50% de la radiación emergente, a diferencia del *chopper*, que genera radiación alterna entre la zona de muestra y la de referencia, con intensidad del 100% de la radiación incidente. Tras el divisor se emplazan las *celdas* de muestras, que han de ser de flujo continuo, en configuraciones en T, Z o Π , precediendo en tal configuración “normal” al detector de radiación, que suele ser un diodo (fotocélula) o un tubo fotomultiplicador (fototubo) en los equipos más sofisticados, a diferencia de los detectores con “óptica invertida” (como los *diode array*), que emplazan su celda de medida a continuación de la fuente de radiación, antes del elemento dispersante y éste antes el detector (un fotodiodo o un fotomultiplicador). Los detectores más sencillos montan como selectores filtros interferométricos y algunos más económicos montan filtros de absorción. Sin embargo, la mayoría montan selectores monocromadores, sean de prisma (en montajes Bunsen, Cornu o Littrow), de red de difracción de transmisión o de red de difracción de reflexión (en montajes Littrow, Ebert, Czerny-Turner o círculo de Rowland).

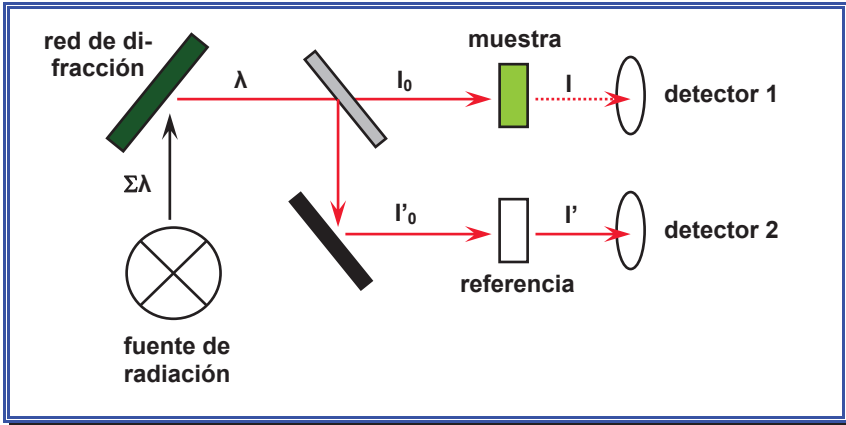


Figura 50. Óptica de un detector espectrofotométrico de doble haz.

En los infrecuentes detectores espectrofotométricos UV-VIS de doble haz, el haz de referencia atraviesa una celda de referencia, mientras que otro haz atraviesa paralela y simultáneamente la celda de flujo continuo con el eluyente, compensando simultáneamente cualquier oscilación instrumental. Suelen montar un solo detector, donde confluyen de forma alterna las radiaciones que han atravesado ambas zonas, de muestra y de referencia. Otros equipos montan dos económicos fotodiodos.

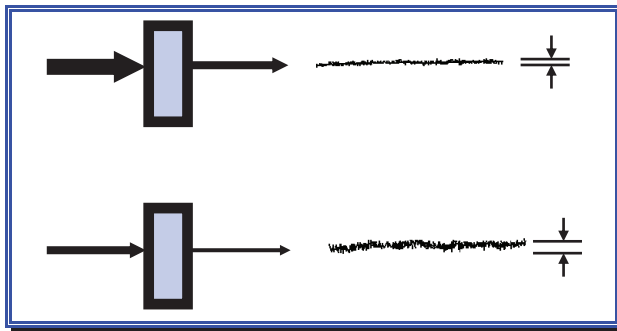


Figura 51. El ruido fotométrico de un detector UV-VIS es inversamente proporcional a la emisión de su fuente de radiación.

Para los cromatografistas es clave el ruido fotométrico del detector, estimador que determina cuán sensible es el detector. La figura 51 esquematiza dos detectores con precisión de absorbancia de $\pm 0,1\%$: en el de la zona superior, teniendo en cuenta que a su celda llega una intensidad del 100%, la muestra absorbe un 50% y se transmite otro 50%, exhibe un ruido (expresado en porcentaje de absorbancia) de $A = \log [50/(100 \pm 0,1)]$, esto es, la absorbancia puede oscilar entre 0,3019 y 0,3002, por lo que su ruido fotométrico es la diferencia, 0,0017. En el de-

ector de la zona inferior de la misma figura 51 llega a su celda una intensidad del 50%, la muestra absorbe un 25% y se transmite otro 25%, exhibiendo un ruido (expresado en porcentaje de absorbancia) de $A = \log [25/(50 \pm 0,1)] = 0,3028$ a $0,2993$, por lo que su ruido fotométrico es $0,0035$ en absorbancia, aproximadamente el doble del detector de la zona superior.

Las celdas estándar de los detectores espectrofotométricos UV-VIS suelen tener un paso óptico de 5 ó 10 mm. La mayoría permite cambiar de celdas para determinaciones de cromatografía analítica, semi-micro, preparativa o ultrarrápida, así como seleccionar el valor de su constante temporal o de integración, ajustes de cero (autocero y desplazamiento manual de línea de base) y cambios de polaridad en la salida de su señal. Casi todos disponen de salidas analógicas para unirse a un registrador o integrador, mientras que otros disponen de salidas digitales para conectarlos directamente con la estación de datos cromatográficos.

Fotómetros de longitud de onda fija

Son los detectores UV-VIS más sencillos y baratos. Montan una lámpara, muchas veces de vapor de mercurio, que emite a $253,7$ nm entre otras longitudes de onda de emisión más débil. Posteriormente uno o varios filtros, generalmente interferométricos, aíslan la longitud de onda adecuada para los analitos, habitualmente 254 nm, que absorben los compuestos con dobles enlaces, donde se evalúa su ruido fotométrico, que según norma ASTM no debería superar $0,0001$ unidades de absorbancia (UA), pico-pico, con constante de integración de $1,5$ segundos. Tras el imprescindible periodo de calentamiento de unos 15 minutos, exhiben valores de deriva inferiores a $0,0001$ UA/hora, y pueden adecuarse para HPLC, LPLC o MPLC sencillamente cambiando su celda. Pueden trabajar a tantas longitudes de onda como filtros dispongan y también pueden montar diversas lámparas (de Hg, Cd, Zn), apropiadas para las longitudes de onda de los analitos. Raramente son de doble haz, compensando su celda de referencia derivas o cambios de fase móvil. Algunos pueden conectarse a un colector de fracciones, al cual envían continuamente su señal de absorbancia, permitiendo *colección por umbral* o *colección por pendiente*, según sea, respectivamente, absoluta o relativa la variación de la absorbancia frente al tiempo.

Espectrofotómetros de longitud de onda variable

Seleccionar la longitud de onda de los analitos es importante para trabajar en condiciones de máxima sensibilidad y discriminar picos indeseables. Programar la longitud de onda variándola durante los análisis admite detectar todos los analitos de interés, aunque absorban a longitudes de onda distintas, o hacerlo con má-

xima sensibilidad, seleccionando la longitud de onda en que cada soluto muestra un máximo de absorción (figura 52). Esto es posible porque montan un monocromador como selector de longitud de onda, que permite seleccionar la longitud de onda manualmente o, en la mayoría, de forma motorizada y programable desde su propio teclado y *software* interno, o desde la estación de datos cromatográficos. Un factor importante en estos detectores es su capacidad de minimizar el efecto de los gradientes, que podría ocasionar deriva en la línea de base, tanto más a bajas longitudes de onda o a máxima sensibilidad, efecto que minimizan ensamblando lentes en vez de prismas en las partes externas de sus celdas, que coliman la radiación incidente y emergente.

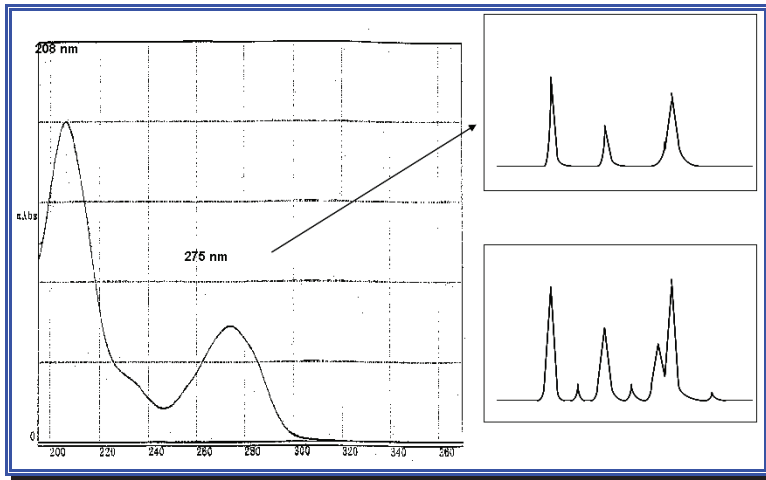


Figura 52. Conociendo el espectro de absorción UV-VIS se puede decidir la longitud de onda de trabajo: arriba, una longitud de onda generalmente pequeña es selectiva, para fines cuantitativos; abajo, una longitud de onda más universal y menos selectiva, para fines preparativos.

Los detectores espectrofotométricos UV-VIS de HPLC, como indica su propio prefijo (*espectro*), permiten trabajar entre, al menos, 190 y 800 nm, obligando a montar dos fuentes de radiación, una de deuterio (UV) y otra de tungsteno (VIS) o una sola de vapor de xenon (UV-VIS), todas generalmente con indicador del tiempo de uso para saber cuando deben reemplazarse. Las lámparas suelen ser prealineadas para que el cromatografista pueda cambiarlas sin depender de un servicio técnico. Muchos detectores admiten desplazar la zona de cambio de lámparas (frecuentemente 370 nm) para evitar trabajar exactamente en el inestable punto de cambio. Suelen montar filtros de corte automáticos entre 370 y 600 nm para impedir radiaciones de segundo orden. Por otra parte, su ancho de banda espectral es grande (10 nm o más) comparado con los espectrofotómetros de sobremesa, mientras que la exactitud de la longitud de onda suele ser de 1 nm, con reproducibilidad de $\pm 0,1$ nm. Su sensibilidad, cuantificada como ruido fotométrico, muestra valores inferiores a $1 \cdot 10^{-5}$ UA y su estabilidad se estima como oscilación del ruido fotométrico a largo plazo, generalmente durante una hora.

Algunos detectores espectrofotométricos UV-VIS pueden realizar barridos espectrales, así como medidas simultáneas a dos longitudes de onda y *cromatogramas cociente (ratio)* entre esas dos longitudes de onda distintas para comprobar la pureza de picos (figura 53), ajustando el *tiempo de alternancia de las dos longitudes de onda*, que suele ser aproximadamente un segundo.

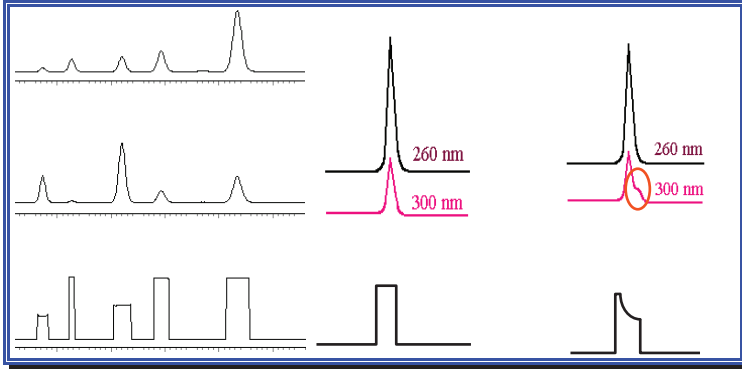


Figura 53. Izquierda: cromatograma cociente obtenido al dividir el cromatograma superior por el inmediatamente inferior. Derecha: cromatogramas cociente obtenidos dividiendo dos cromatogramas a sendas longitudes de onda, denotando un cociente plano un pico puro, a diferencia de cuando muestra un hombro irregular.

Los detectores con capacidad de realizar barridos espectrales suelen poder almacenar en su memoria interna el espectro de la línea de base, considerado como “fondo”. Algunos utilizan tres o más espectros para corregir los de los analitos (en la línea de base, otro de una zona determinada y un tercero resultante al sustraer de éste el espectro del fondo). La velocidad de barrido espectral puede seleccionarse según la resolución deseada y cuán rápidos eluyen los picos en el cromatograma.

Canibalizados por los detectores *diode array*, existieron detectores espectrofotómetros de multilongitud de onda (MWD, *Multiple Wavelength Detectors*), capaces de monitorizar continua y simultáneamente varias longitudes de onda (algunos hasta doce), llevadas simultáneamente a la celda de muestra por su compleja óptica, principalmente con el fin de determinar la pureza de los picos del cromatograma.

Asimismo, hubo espectrofotómetros de barrido rápido (RSD, *Rapid Scanning Detectors*), variante instrumental de los detectores espectrofotométricos clásicos (con monocromador) que permitía realizar barridos espectrales UV-VIS. Análogamente a los detectores de multilongitud de onda, fueron fagocitados por los detectores *diode array* cuando la sensibilidad de éstos se emparejó con la de los detectores espectrofotométricos. Los detectores espectrofotométricos de barrido rápido (RSD) permitían obtener espectros durante la elución de los analitos moviendo rá-

pidamente su monocromador: como es fácil de imaginar, esto es sencillo; de hecho, hemos visto que muchos detectores UV-VIS permiten realizar espectros. Los detectores de barrido rápido precisaban dos algoritmos en el *software* cromatográfico: uno, para “decidir” capturar automáticamente el espectro cuando la línea de base superaba un umbral previamente fijado a la longitud de onda de trabajo en la zona ascendente del pico, capturando igualmente otro espectro cuando la línea de base descendía del umbral fijado en la zona final del pico. Comparando ambos espectros se apreciaba la pureza del pico.

El segundo algoritmo permitía corregir la línea de base de los espectros obtenidos para compensar el efecto de la concentración. Cuando el detector de barrido rápido iniciaba la captura del espectro, lo hacía en una situación de baja concentración, que aumentaba durante la elución del pico, por lo que los espectros realizados en la zona ascendente de los picos cromatográficos presentaban pendiente positiva. Lo mismo sucedía, en negativo, al capturar espectros en las zonas descendentes de los picos. Con estos algoritmos los detectores RSD compensaban el efecto de concentración durante la captura de los espectros, que resultaban razonablemente planos.

7.3. Detectores diode array

Siempre con el objetivo de proporcionar una *confirmación positiva* de los picos eluidos y resolver eventuales problemas de coelución, y como paso consecutivo a los detectores de barrido rápido, surgieron los detectores *diode array*, en la actualidad los más extendidos en los equipos de HPLC (figura 54).



Figura 54. Detector *diode array* (imagen cortesía de *Agilent Technologies*). A la derecha, con sus lámparas y celda desmontadas.

Los detectores *diode array* poseen “óptica invertida”, pues disponen su celda de medida a continuación de la fuente de radiación y antes del elemento dispersante. Constan de una o dos fuentes de radiación, una de deuterio para la zona ultravioleta y otra de halógeno-tungsteno para la zona visible (o una sola de vapor

de xenón). Posterior a ellas, un colimador enfoca la radiación de las lámparas sobre la celda de flujo continuo. A veces un *shutter* o cuña reduce el área de la radiación incidente sobre la cubeta de flujo continuo, cuya arquitectura generalmente es en Z y con lentes a ambos lados para minimizar la deriva causada por los gradientes, principalmente a bajas longitudes de onda. Tras la celda, la óptica de los detectores *diode array* finaliza en un *policromador*, que alinea un conjunto de diodos en serie (figura 55).

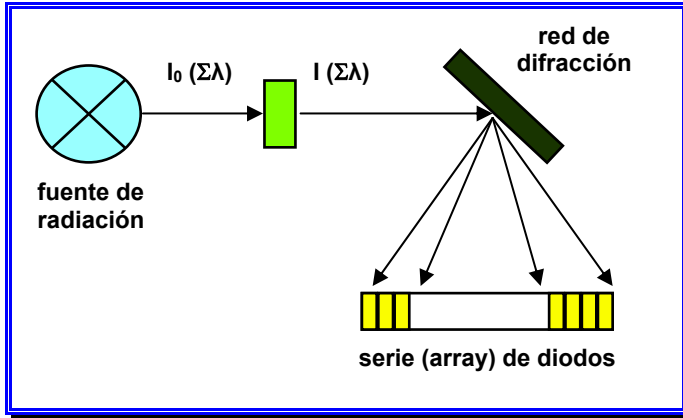


Figura 55. Esquema óptico de un detector *diode array*.

Los detectores *diode array* introducen una tercera dimensión en la detección espectrofotométrica de los análisis cromatográficos, permitiendo disponer de más información (los espectros de los analitos y algunos cálculos realizados con ellos) y, sobre todo, la confirmación de los resultados. Trabajan generando espectros continuamente, pues el barrido electrónico de los diodos sucede en pocos milisegundos: generalmente entregan cada 100 ms o menos un espectro completo, promedio de muchos espectros individuales, dependiendo de su constante de integración.

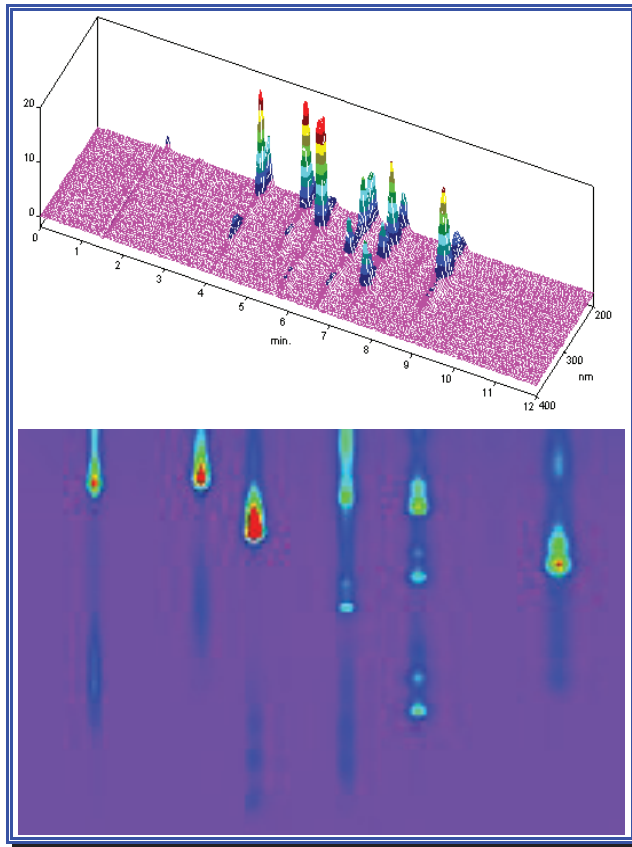


Figura 56. Arriba, clásica información tridimensional (3-D) que proporciona un detector *diode array*: eje x, tiempo; eje y, absorbancia; eje z, longitud de onda. Abajo, el mismo cromatograma a vista de pájaro (isograma) como un gráfico cartográfico con curvas de nivel, cuyos colores (de frío a cálido) dan idea de la altura (absorbancia) de los espectros.

Los resultados que proporciona un detector *diode array* son mucho más que cromatogramas convencionales a una o varias longitudes de onda, algo que, evidentemente, también puede realizar este tipo de detectores, aunque eso sería infrutilizarlos: así, exhiben una representación tridimensional tiempo (de retención) – longitud de onda – absorbancia, que, si bien puede hacerse rotar en todas las direcciones, en determinadas condiciones presenta el inconveniente de que *los picos impiden ver los valles*, es decir, picos grandes, con mucha absorción, pueden ocultar las zonas inmediatamente detrás de ellos, que podrían ser de interés analítico. Por ello suele preferirse la visión cenital “a vista de pájaro” como *isograma*, también denominado *mapa* o *contour*, que representa longitudes de onda en uno de sus ejes, tiempo (de retención) en el otro y la tercera dimensión muestra la ab-

sorbancia continuamente, exhibida gráficamente como curvas de nivel (figuras 56 y 57).

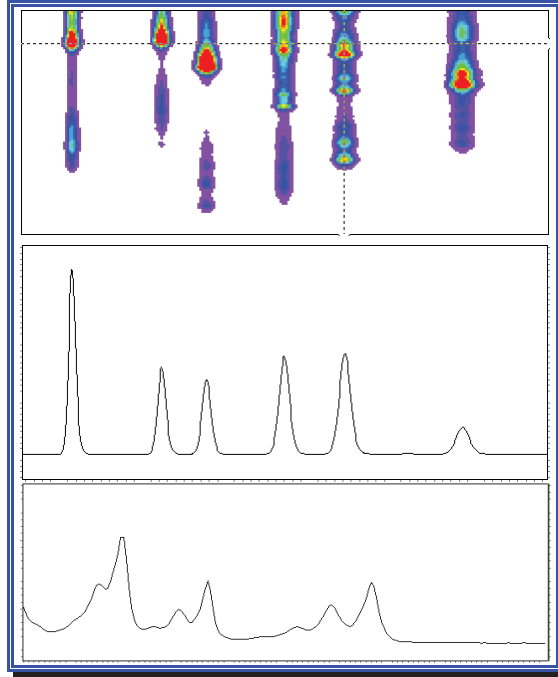


Figura 57. El *contour* o isograma de un detector *diode array* (arriba) exhibe un cursor horizontal y otro vertical, para seleccionar respectivamente cromatogramas (centro) y espectros (abajo).

Un detector *diode array* procesa la señal de la siguiente forma: en primer lugar, activa todos sus diodos en un proceso que tarda pocos milisegundos (20 ms o menos); luego, realiza un *barrido electrónico* de los diodos, leyendo el voltaje de todos y cada uno, en un tiempo doble al de activación (unos 40 ms), proceso durante el cual el detector convierte el voltaje leído en señal digital, calcula la constante temporal para poder integrar correctamente los picos cromatográficos y estima el *bunching factor*, una constante temporal que actuará sobre la resolución espectral. A continuación, calcula el ancho de banda, los valores de absorbancia y transmite los datos al ordenador. Por último, el detector “descarga” los diodos para ponerlos de nuevo en condiciones de repetir el proceso cíclicamente.

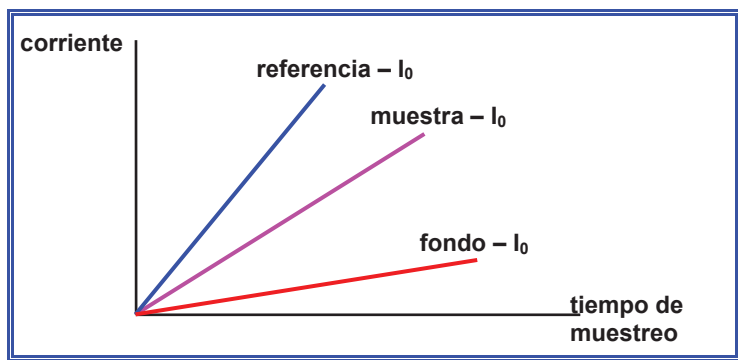


Figura 58. Curva lineal de corriente frente al tiempo de muestreo en un detector *diode array*.

Para que los diodos proporcionen un espectro real debe sustraerse a cada diodo la absorbancia debida al ruido electrónico (fondo), siendo también deseable sustraer el espectro de un blanco o referencia, que suele ser la propia fase móvil, tanto más con gradientes (figura 58). La corriente de fondo (D , *dark*) modifica la clásica expresión de la absorbancia (52):

$$A = \log \frac{I_0 + D}{I + D} \quad (62)$$

La sensibilidad de los detectores *diode array* actuales, expresada como ruido fotométrico (figura 59), no difiere mucho la de los detectores espectrofotométricos de longitud de onda variable, permitiendo emplearlos como detectores de multilongitud de onda. La principal característica de los detectores *diode array* es la gran información que proporcionan, realizada por su propio *software*, habitualmente incluido en el mismo *software* cromatográfico de la estación de datos, aunque esporádicamente pueden verse equipos con dos ordenadores, uno para el detector *diode array* y otro para el resto del sistema de HPLC.

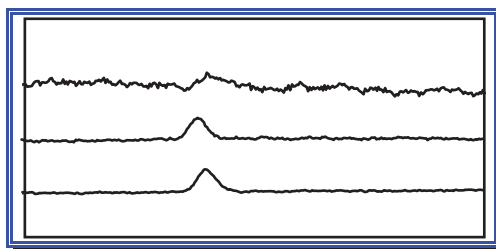


Figura 59. Cromatogramas obtenidos a 254 nm en tres detectores *diode array* con distinta especificación de ruido fotométrico: arriba, $2,5 \times 10^{-5}$ UA; centro, $1,5 \times 10^{-5}$ UA; debajo, $0,8 \times 10^{-5}$ UA.

La resolución de un detector *diode array* se estima por el *índice Nyquist*, cociente de sus límites de longitud de onda, dividido por el número de sus diodos: por ejemplo, un detector que trabaja entre 200 y 800 nm y posee 600 diodos, exhibe, para cualquier longitud de onda, una resolución espectral (R) de $\pm 1,00$ nm, ancho de banda real o intervalo de longitudes de onda que recibe cada diodo, siendo en este ejemplo numérico el *índice Nyquist* de 2,00 nm, valor absoluto doble de la resolución:

$$R = \frac{800 - 200}{600} = 1,00 \text{ nm} \quad (63)$$

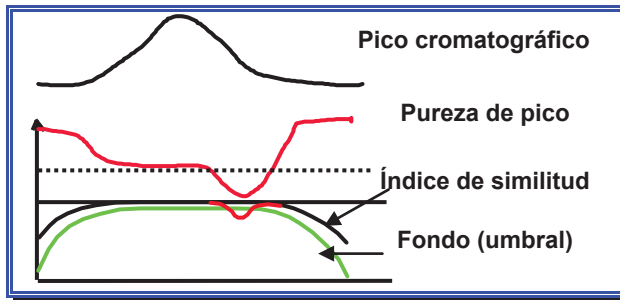


Figura 60. Las curvas de pureza a lo largo de un pico estiman el "índice de similitud", cociente del espectro durante el tiempo de retención del pico dividido por el espectro tomado en su ápice. El valle que muestran ambos gráficos denota la existencia de una impureza⁶¹.

Así pues, las ventajas de los detectores *diode array* pueden resumirse en tres: en primer lugar, su capacidad de obtener cromatogramas a todas las longitudes de onda UV-VIS, mostrando la absorbancia de *todas y cada una* de las longitudes de onda del espectro UV-VIS y enviarlas al ordenador, que las memoriza, y si aparecen inesperados analitos, metabolitos o contaminantes, que podrían absorber a otras longitudes de onda distintas, el detector *diode array* las podrá detectar al reprocesar los datos sin necesidad de reinyectar la muestra. La segunda ventaja es permitir seleccionar la longitud de onda óptima para el análisis e incluso la respuesta integral de varias, para trabajar de forma *muy selectiva* (con cromatogramas en zonas en que solo absorben los analitos de interés) o *muy universal* (en zonas donde absorben todos los picos detectados). La tercera y última ventaja de un detector *diode array* es poder calcular de forma inmediata la pureza de picos, como cociente múltiple entre varias longitudes de onda (figura 60).

Por el contrario, el principal inconveniente de los detectores *diode array* es ser destructivos para las muestras fotosensibles, ya que su diseño de óptica invertida hace incidir sobre la celda de muestras toda la radiación de las fuentes, a to-

⁶¹ Ahuja, S.: *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*. Editorial Marcel Dekker, Nueva York, 2006.

das las longitudes de onda. Asimismo, puede limitar su uso su ligera menor sensibilidad que los detectores espectrofotométricos convencionales.



Figura 61. Detector *diode array* (imagen cortesía de *Perkin-Elmer*).

Los detectores *diode array* corresponden enfáticamente a módulos del tipo “caja negra”, sin teclado ni display (figura 61); ejecutándose todo su manejo y funciones desde un ordenador con *software* específico, que responde a requerimientos largamente deseados por los cromatografistas: obtener, exhibir, imprimir y almacenar datos tridimensionales e isogramas con alta resolución, presentándolos desde ángulos variables, extraer tras el análisis cromatogramas convencionales a cualquier longitud de onda y ancho de banda para reintegrarlos, compararlos, etc. Asimismo permiten capturar y obtener espectros tras el análisis a cualquier tiempo de retención y ancho de banda, con los que se crearán librerías o se realizará búsqueda espectral. Es muy útil la captura sistemática de varios espectros en cada pico, tras concretar su umbral, pendiente y anchura, pues superponerlos (normalizados) arroja una primera estimación de su pureza. Espectros y cromatogramas suelen normalizarse a fondo de escala o a un valor definido por el cromatografista. También es muy pertinente sustraer el fondo del disolvente en los espectros.

Otras útiles capacidades de los detectores *diode array* es obtener *cromatogramas virtuales*, que representan en cada momento la máxima longitud de onda de absorción frente al tiempo, así como hacer *zoom* sobre cualquier pantalla gráfica (cromatogramas, isogramas, espectros) para apreciar con nitidez todos los detalles del análisis. También es deseable que su *software* genere reportes a medida de cada laboratorio o usuario. En este sentido, los datos proporcionados por los detectores *diode array* deben ser susceptibles de realizar con ellos test de idoneidad o *suitability test*, e interaccionar con herramientas informáticas para exportarlos a hojas de cálculo y procesadores de textos, compartirlos con herramientas OLE (*Object Linking and Embedding*) para vincular objetos en entorno *Windows*, integrándolos con otras aplicaciones.

Otra interesante propiedad de los detectores *diode array* es poder realizar derivadas de cromatogramas y espectros. La simple visión de la derivada de un espectro (figura 62) y de un cromatograma permite decidir si el pico es puro o no,

y si presenta coelución, siguiendo la sempiterna máxima de que “cualquier conclusión negativa lo es al 100%, mientras que cualquier conclusión positiva debe esperar más confirmaciones”.

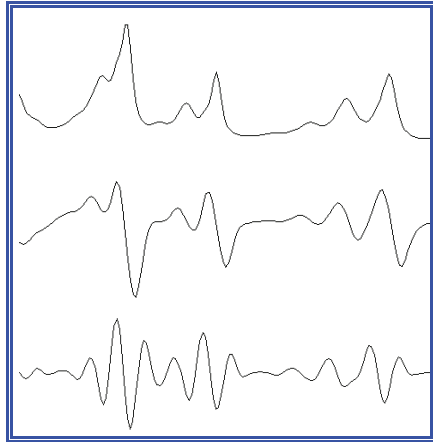


Figura 62. Espectro obtenido con un detector diode array: de arriba abajo, el espectro, su primera derivada y su segunda derivada.

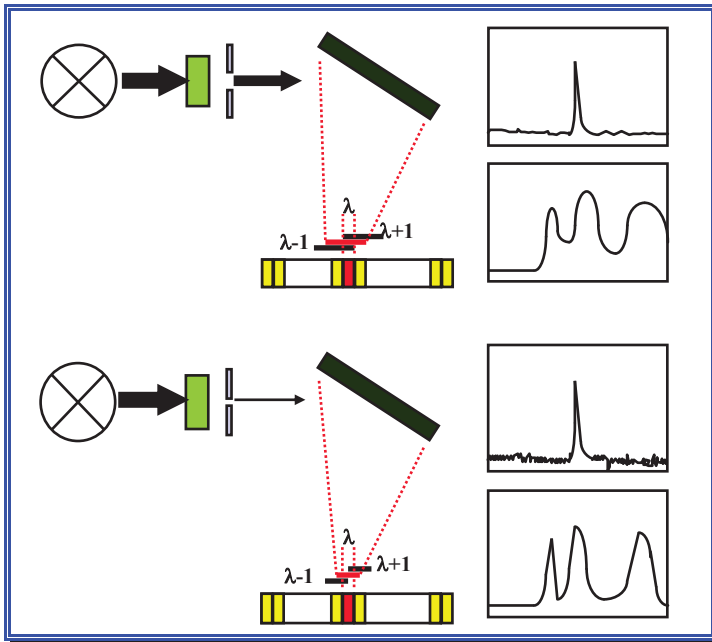


Figura 63. Importancia del ancho de rendija de entrada al policromador: arriba, rendijas anchas originan espectros de baja resolución y cromatogramas poco ruidosos; abajo, rendijas estrechas originan espectros de alta resolución y cromatogramas más ruidosos.

En suma, los detectores *diode array* pueden trabajar simultáneamente con alta resolución espectral y alta sensibilidad en toda la zona UV-VIS. Generalmente poseen entre 500 y 1.000 diodos, con exactitud fotométrica de 1 nm. También hay tener en cuenta es la anchura de la rendija del policromador y el ancho de banda espectral, no olvidando que en los detectores *diode array* la sensibilidad está refiada con la resolución espectral (figura 63).

Los detectores *diode array* habitualmente montan lámparas y celdas prealinhadas para que el mismo usuario pueda reemplazarlas y suelen disponer de autodiagnósticos de verificación de la exactitud de la longitud de onda, energía y tiempo de uso de las lámparas y del sensor de fugas. Como queda dicho, su manejo, control y adquisición de datos se realiza en un ordenador con un *software* dedicado, que posibilita la elucidación de estructuras, crea librerías y búsquedas espectrales, cálculos de pureza de pico y reprocesan cromatogramas, espectros, cromatogramas tridimensionales e isogramas. Además, algunos detectores *diode array* disponen de uno o varios canales analógicos para remitir cromatogramas convencionales de otras tantas longitudes de onda a un registrador o a un colector de fracciones. La salida espectral normal de un detector *diode array* es *digital*, que envía al ordenador tras ser procesada por sus circuitos internos. Determinados detectores *diode array* comprimen los cromatogramas e isogramas, inicialmente excesivamente grandes, que saturarían el disco duro del ordenador. Evidentemente, los detectores *diode array* pueden montar distintas celdas, tanto analíticas, como *narrowbore* o preparativas, construidas con los materiales usuales o inertes.

7.4. Detectores fluorimétricos

La detección fluorimétrica es fantástica para detectar con gran selectividad y sensibilidad moléculas grandes, planas, rígidas y con dobles enlaces conjugados, siendo ejemplos paradigmáticos los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las tetraciclinas. Esta detección es mil veces más sensible que la espectrofotometría UV-VIS, llegando a 10^{-10} g/ml. Las moléculas que exhiben fluorescencia absorben la energía de un fotón en un proceso de *excitación* para promocionar un electrón de enlace desde su estado electrónico fundamental y vibracional más bajo ($E=0$, $V=0$), “subiendo” a un estado vibracional excitado del nivel electrónico inmediatamente superior y también a otros estados vibracionales superiores ($E=1$, $V>0$). La molécula excitada evoluciona posteriormente mediante alguno de los siguientes tres procesos: *emisión resonante*, emitiendo exactamente la misma energía (y, por tanto, la misma longitud de onda) que absorbió, proceso habitual en moléculas gaseosas a presiones bajas; *relajación vibracional*, por el cual el electrón de enlace de la molécula excitada, promocionado hasta un nivel electrónico excitado y, dentro de él, en un subnivel vibracional también excitado, pierde el exceso de energía vibracional mediante colisiones con las moléculas del medio circundante (usualmente el disolvente) para retornar al estado vibracional más bajo del nivel electró-

nico excitado; por *conversión interna*, proceso no radiante que desactiva el electrón excitado desde un nivel vibracional inferior del estado electrónico excitado a otro nivel vibracional superior del estado electrónico inferior, usualmente el nivel electrónico inicial (estado fundamental).

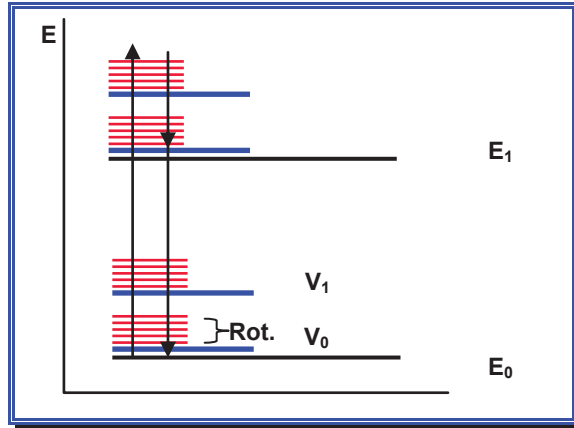


Figura 64. El diagrama de Jabłoński explica gráficamente el proceso de emisión de fluorescencia.

Las moléculas excitadas del analito retornan al estado fundamental desde el estado vibracional más bajo del nivel electrónico excitado (donde han llegado por un proceso de relajación vibracional) mediante alguna de las siguientes alternativas (figura 64): en primer lugar, mediante *emisión fluorescente* ("fluorescencia"), emitiendo un fotón menos energético (por la relajación vibracional) que el absorbido en la excitación, por lo que la longitud de onda de fluorescencia es mayor que la de excitación (*ley de Stokes*); por un proceso de desactivación no radiante o *conversión externa*, al colisionar con otras moléculas del entorno; por *disociación*, cuando el electrón se excita tan fuertemente que el enlace se rompe; por *predisociación*, cuando tras un proceso de conversión interna la diferencia de energía vibracional puede ser suficiente para romper el enlace; por último, las moléculas excitadas del analito pueden volver al estado fundamental mediante un *cruce entre sistemas*, desapareándose los electrones apareados y pasando la molécula de un estado singlete excitado a un triplete excitado, desde el cual regresan al nivel fundamental emitiendo el exceso de energía en forma de emisión de *fosforescencia*, tránsito poco probable ("prohibido" por las leyes de la Mecánica Cuántica), por lo cual es minoritario y la desactivación resulta lenta.

Así, la emisión de fluorescencia depende de la probabilidad de que se produzca una absorción seguida de una excitación. La probabilidad por unidad de tiempo de que el electrón vuelva al estado fundamental emitiendo fluorescencia es un tránsito regido por una constante de equilibrio (K_F), cuya inversa ($1/K_F$) cuantifica el intervalo medio en que el electrón permanece en el estado excitado, denomi-

nándose *tiempo de vida de fluorescencia* o *tiempo de fluorescencia* (τ) el tiempo de vida intrínseca del estado excitado:

$$\tau = \frac{1}{K_F} \quad (64)$$

Ahora bien, esto sería válido si la fluorescencia fuese el único fenómeno de desactivación del estado excitado. En la práctica, el *tiempo real de vida de fluorescencia* ($\tau < \tau_0$) incluye, además de la fluorescencia, otros procesos (*interferencias*, K_I), algunos condicionados por la concentración $[c]$ de moléculas interferentes:

$$\tau = \frac{1}{K_F + K_I} = \frac{1}{K_F + K_{Conv.Int.} + K_{Cruce Sist.} + K_{Conv.Ext.} [c] + K_{Pre disoc.} + K_{Disoc.}} \quad (65)$$

La concentración del estado singlete (M^*), expresada en molaridad, disminuye en el tiempo al cesar la excitación:

$$-\frac{dM^*}{dt} = (K_F + K_I)M^* \quad (66)$$

La *intensidad de fluorescencia* (I_F) decae exponencialmente en el tiempo, siguiendo una sencilla cinética de primer orden:

$$\frac{I_F}{I_F_0} = e^{t/\tau} = e^{-(K_F + K_I)t} \quad (67)$$

Definiendo el *rendimiento cuántico de fluorescencia* (ϕ_F) como el cociente de los fotones emitidos por ésta frente a los absorbidos por excitación:

$$\phi_F = \frac{\text{fotones emitidos por fluorescencia}}{\text{fotones absorbidos en la excitación}} = \frac{K_F}{K_F + K_I} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (68)$$

En ausencia de otros procesos interferentes competitivos ($K_I = 0$) el rendimiento cuántico de fluorescencia toma un valor unitario, aunque en la práctica siempre resulta menor a la unidad, por ir siempre acompañado el proceso fluorescente de alguna o varias interferencias.

Profundicemos en las dos grandes ventajas de la detección fluorimétrica, muchas veces decisivas: su gran selectividad y gran sensibilidad. Ésta dimana de aquella, ya que la fluorescencia utiliza parámetros dobles (longitudes de onda de excitación y de emisión) e, incluso, puede ser más selectiva empleando otros parámetros, como el tiempo de vida de fluorescencia (τ) y el rendimiento cuántico de

fluorescencia (ϕ_F). Otra ventaja de la detección fluorimétrica es su “seguridad”, pues no es destructiva ni genera productos peligrosos o tóxicos. La razón de por qué la fluorimetría es mil veces más sensible que la espectrofotometría UV-VIS reside en que los fotomultiplicadores detectan a partir de 10^{-10} UA, mientras que el límite de detección de la espectrofotometría UV-VIS es de 10^{-5} UA, en moléculas con coeficiente de absorción (ε) de 10^4 a 10^5 . Altos rendimientos cuánticos de fluorescencia permiten detectar concentraciones entre 10^{-14} y 10^{-17} M; empero, la pureza de los solventes comerciales “solo” deja ese valor entre 10^{-11} y 10^{-13} M.

Cuantitativamente la *señal de fluorescencia* (SF) es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida y, por tanto, a la diferencia de intensidad entre las radiaciones incidente y emitida:

$$SF = K(I_0 - I) \quad (69)$$

Según la ley de Lambert-Beer

$$I = I_0 \exp(-Kbc) = I_0 e^{-kbc} \quad ; \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon bc} \quad (70)$$

Por lo que

$$SF = cte(I_0 - I_0 \cdot 10^{-\varepsilon bc}) = KI_0(1 - 10^{-\varepsilon bc}) = KI_0(1 - e^{-2,303 \varepsilon bc}) \quad (71)$$

En este desarrollo de Taylor, si $x \rightarrow 0$, entonces $e^{-x} \cong 1-x$. En términos prácticos, este límite matemático se considera 0,05 y así:

$$x = \varepsilon bc \leq 0,05 \quad (72)$$

Por lo que la *concentración máxima* (c_{max}) es:

$$c_{max} = \frac{0,05}{\varepsilon bc} \quad (73)$$

La *ecuación de Kavanagh* relaciona de forma lineal la señal de fluorescencia con la concentración, con la referida limitación (72) de $\varepsilon bc \leq 0,05$:

$$SF = KI_0(1 - (1 - 2,303\varepsilon bc)) = KI_0 2,303\varepsilon bc = cte(c) = K \cdot c \quad (74)$$

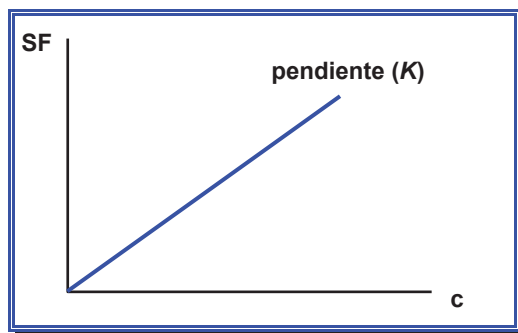


Figura 65. La ecuación de Kavanagh relaciona linealmente la señal de fluorescencia (SF) y la concentración (c).

Por tanto, el gráfico de la señal de fluorescencia frente a la concentración forma una recta que pasa por el origen (figura 65), cuya pendiente es un término constante (K). Cuanta mayor pendiente exhibe la recta hay mayor sensibilidad (una concentración dada exhibe mayor señal). La constante de la ecuación de Kavanagh (K) depende de la naturaleza de las moléculas fluorescentes, determinada por su coeficiente de extinción a dicha longitud de onda (ϵ) y el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ), pero también depende del equipo instrumental: intensidad de la radiación incidente (I_0) de la fuente de radiación, el espesor (b) de la zona absorbente, que rige la excitación por la ley de Lambert-Beer; el ángulo sólido del detector (α) con la zona donde se produce la emisión fluorescente y, naturalmente, la longitud de onda (λ):

$$SF = f(I_0, b, \alpha, \lambda, \epsilon, \phi) \quad (75)$$

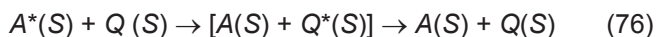
Factores que afectan a la fluorescencia en HPLC

Seis factores afectan a la señal de fluorescencia y, consecuentemente, a la sensibilidad de la detección fluorimétrica en HPLC: la presencia de átomos pesados externos, el *quenching* o amortiguación de fluorescencia, el efecto de filtro interno, la interacción del analito fluorescente con la fase móvil y la temperatura.

La presencia de átomos pesados externos (como los halógenos) favorece el cruce entre sistemas, aumentando la fosforescencia en detrimento de la fluorescencia⁶². También el oxígeno puede oxidar los analitos, cambiando sus propiedades espectroscópicas.

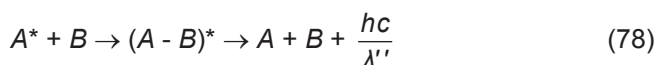
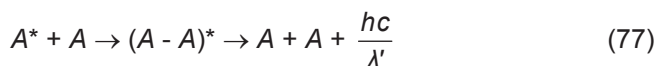
⁶² Horváth, A.: *Halogenated Hydrocarbons*. Editorial Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1982.

El *quenching* o amortiguación de fluorescencia transfiere la energía del analito excitado (A^*) a una molécula externa Q (*quencher* o *amortiguador* de fluorescencia, en estado singlete S):



El *quencher* excitado $Q^*(S)$ se desactiva emitiendo “su” fluorescencia a otra longitud de onda (*fluorescencia sensibilizada*) o mediante otros procesos alternativos, como colisiones, tautomerías, etc. La disminución de fluorescencia por *quenching* a veces la hace desaparecer y depende mucho del entorno, que condiciona la transferencia de energía del analito excitado al amortiguador. Además, los analitos excitados pueden transferir su exceso de energía al amortiguador por colisión, proceso dependiente de la difusión y viscosidad del medio. Por último, puede tener lugar una *transferencia Förster* cuando analito y *quencher* se hallan a una distancia crítica (60 Å), proceso también muy dependiente de la viscosidad de la fase móvil.

Otro posible *quenching* puede ocurrir por la formación de excímeros (dímeros) a altas concentraciones del analito (77) o por la formación de excímeros mixtos (78):



Previendo la presencia de *quenchers* y tensoactivos, nunca lavaremos con jabón o detergentes los matraces de muestra, botellas de fase móvil, jeringas, etc.

El tercer factor que afecta a la señal de fluorescencia (y a la sensibilidad de la detección fluorimétrica) es el efecto de *filtro interno*, habitual en altas concentraciones del analito, haciendo que la señal de fluorescencia aumente menos de lo debido o, incluso, disminuya (figura 66), pues la gran absorbancia en la zona previa a la emisión fluorescente impide llegar radiación a la intersección del haz excitador con el haz de emisión, con la consiguiente disminución de I_0 en la zona que debería emitir fluorescencia.

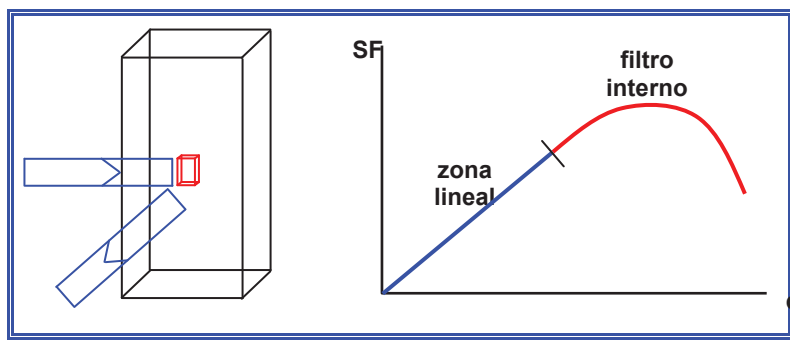


Figura 66. El efecto de filtro interno hace perder linealidad a la señal de fluorescencia al aumentar mucho la concentración.

La quinta causa que afecta a la señal de fluorescencia emitida por el analito se debe a la interacción de éste con la fase móvil, que puede desplazar la longitud de onda de excitación del analito y, por tanto, la de emisión, por diversos motivos: interacciones dipolo - dipolo, cuando analito y fase móvil son polares; interacciones dipolo - dipolo inducido, si analito o fase móvil son apolares; establecimiento de enlaces puente de hidrógeno; formación de complejos moleculares, etc. Como regla, cuando el estado excitado (A^*) es más polar que el estado fundamental (A), las fases móviles (polares) suelen desplazar la longitud de onda de emisión.

Finalmente, la temperatura puede alterar la señal de fluorescencia: menores temperaturas implican mayor rigidez, aumentando la emisión de fluorescencia al favorecer la relajación vibracional al tiempo que mejoran la resolución del espectro de fluorescencia, con bandas más estrechas. Sin embargo, en HPLC es de esperar lo contrario: mayores temperaturas pueden ocasionar *fluorescencia retardada* al aparecer un segundo compuesto fluorescente con la misma longitud de onda de fluorescencia, pero con mayor tiempo de vida, que aumenta unas milésimas de segundo.

Pero vayamos a lo positivo: entre los factores que favorecen la señal de fluorescencia encontramos, en primer lugar, la presencia en los analitos de grupos cromóforos capaces de absorber fuertemente la radiación UV-VIS, con lo cual existirá mayor posibilidad de lograr una emisión fluorescente más intensa. Una mayor magnitud del cromóforo aumenta la longitud de onda de absorción y, por tanto, la de fluorescencia. Como regla a recordar, *en los compuestos con anillos condensados cada anillo suele aumentar la longitud de onda en 100 nm*. Si los grupos cromóforos son muy planos y simétricos, proporcionan mayor rigidez molecular, la cual, a su vez, también aumenta la señal de fluorescencia.

Fluorímetros y espectrofluorímetros

Los detectores de fluorescencia montan dos selectores de radiación: uno primario, que selecciona la longitud de onda de excitación, y otro secundario, que selecciona la longitud de onda de emisión. En HPLC existen dos tipos de detectores fluorimétricos: los sencillos y más asequibles *fluorímetros* (o *fluorómetros*), con óptica de filtros, dedicados a aplicaciones concretas, y los más habituales *espectrofluorímetros*, caros, sofisticados y versátiles, con dos monocromadores (uno para seleccionar la longitud de onda de excitación y el otro para seleccionar la longitud de onda de emisión). Siempre la emisión fluorescente se detecta a 90° (figura 67), lo más alejada posible de la radiación incidente que causa la excitación, obligando a las celdas de flujo continuo de los detectores fluorimétricos a disponer dos ventanas de cuarzo perfectamente perpendiculares, razón por la que toleran solo presiones moderadas, de hasta unos 20 bares, y condicionan su volumen, algo mayor que las celdas de los detectores espectrofotométricos UV-VIS. Tanto los sencillos fluorímetros (con filtros interferométricos como selectores) como los versátiles espectrofluorímetros (con selectores de red de difracción), la fuente de radiación suele ser una lámpara de vapor de Xenón a presión, para ensanchar las líneas de emisión del espectro del Xenón. Algunos espectrofluorímetros de sobremesa admiten celdas de flujo continuo para ser empleados ocasionalmente como detectores de HPLC, a veces con filtros para medir fluorescencia polarizada o dispositivos para medir fosforescencia.

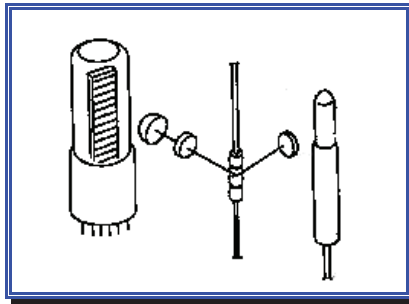


Figura 67. Esquema de un detector fluorimétrico de filtros, con su lámpara de xenón a la derecha y su fotomultiplicador a la izquierda.

Generalmente los detectores fluorimétricos de HPLC suelen ser espectrofluorímetros, capaces de trabajar en cualquier zona del espectro UV-VIS y programar las longitudes de onda de emisión y excitación durante el cromatograma. Su sensibilidad se estima mediante la relación señal - ruido del pico Raman de la molécula de agua, que toma valores de 500:1 o superiores en los detectores más sensibles. La selectividad espectral se expresa en términos de exactitud de la longitud de onda, usualmente de pocos nm, con reproducibilidad de pocas décimas de nm. Su *software* interno o externo suele permitir cambiar la escala de su respuesta, realizar espectros, programar autoceros durante los cromatogramas, etc.

Además, como cualquier otro módulo de HPLC, realizan autodiagnósticos, comprobaciones de mantenimiento y calibraciones internas. Corrientemente incorporan sensores de detección de fugas, sensores de calentamiento y del encendido y apagado de la lámpara para optimizar y alargar su vida operativa. Para mantener alta sensibilidad, algunos disponen de dispositivos específicos que compensan posibles fluctuaciones en la intensidad de la lámpara de xenón, mientras que otros controlan (y a veces fuerzan) el potencial aplicado en su fotomultiplicador, con la misma finalidad.

Derivatización y marcadores fluorescentes

La ventajosa detección fluorimétrica tiene la limitación de detectar solo moléculas fluorescentes. Ahora bien, también se pueden detectar moléculas no fluorescentes recurriendo a derivatizarlas con “*marcadores fluorescentes*”, *reactivos fluorogénicos* que forman complejos fluorescentes con los analitos:



La elección del marcador de fluorescencia debe juzgar, en primer lugar, que, si éste fuese fluorescente, sus longitudes de onda de excitación y de emisión deberán diferir de las del complejo final (*AM*), así como tener un alto rendimiento cuántico de fluorescencia para alcanzar gran sensibilidad en la detección; finalmente, marcador y complejo deben ser estables químicamente. La figura 68 muestra los marcadores de fluorescencia más empleados.

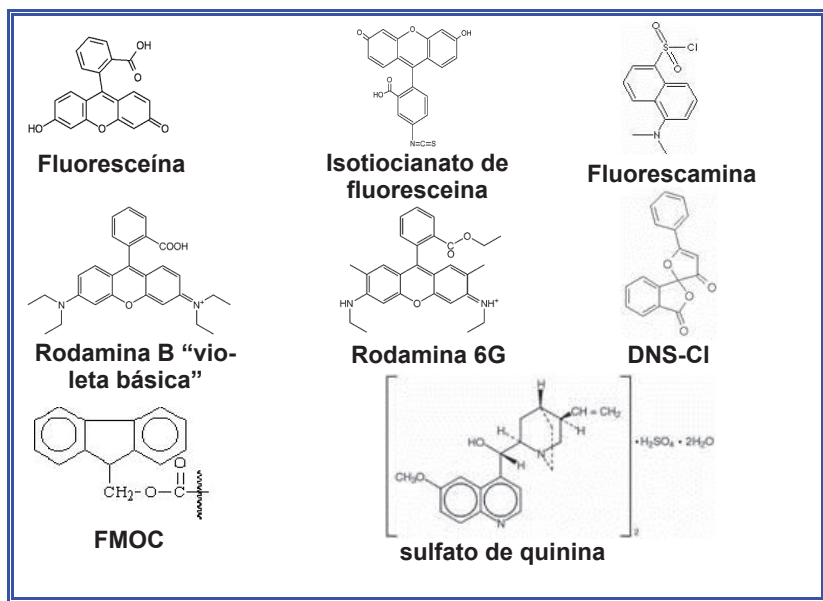


Figura 68. Marcadores fluorescentes, serie finalizada con el sulfato de quinina, arquetípico patrón de fluorescencia.

En HPLC con derivatización fluorogénica son clásicas, entre otras aplicaciones, la determinación de aminoácidos, moléculas que en su mayoría no son fluorescentes por sí mismas, pero se derivatizan con reactivos fluorogénicos previamente a su paso por la columna ("*derivatización pre-columna*"); otros compuestos, como glifosatos y carbamatos, se derivatizan tras haberse separado en la columna cromatográfica ("*derivatización post-columna*"). Si bien pocas moléculas poseen fluorescencia *per se*, la extraordinaria sensibilidad de la detección fluorimétrica, con niveles de sensibilidad de ppb o inferiores, justifica los tediosos procesos de derivatización, pudiéndose ver detectores fluorimétricos en equipos de HPLC dedicados.

7.5. Detectores refractométricos

Los detectores refractométricos, por ser universales, podrían utilizarse como detectores *únicos*, en detrimento de cualquier otro detector. Sin embargo, su limitada sensibilidad (que, como máximo, ronda 10^{-7} UIR, Unidades de Índice de Refracción) limita su uso a analitos que carecen de otras propiedades que permitan

detectarlos con otros detectores más sensibles, caso de, por ejemplo, azúcares, polímeros o moléculas sin dobles enlaces⁶³.

El fenómeno físico de la *refracción* desvía la radiación cuando pasa de un medio a otro de distinta densidad (figura 69), acercándola o alejándola de la trayectoria normal (perpendicular) en función de la diferencia de densidad de ambos medios, resultando proporcionales los ángulos incidente y resultante de dicha radiación a su velocidad de propagación en ambos medios (v_1 y v_2).

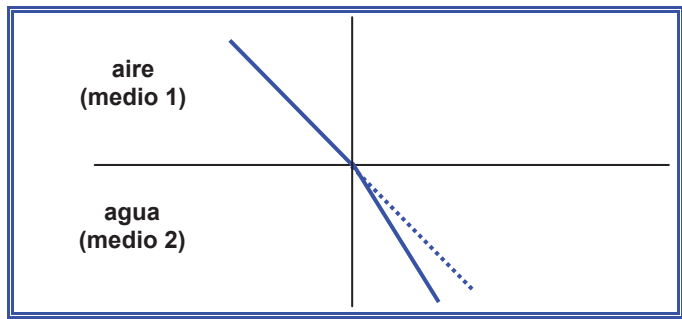


Figura 69. Desviación de la radiación al cambiar de medio.

$$\frac{\text{sen}\theta_1}{\text{sen}\theta_2} = \frac{v_1}{v_2} \quad (80)$$

Además, existe una acción recíproca entre el campo eléctrico de la radiación y los electrones del medio transparente atravesado, haciendo que la velocidad de propagación de la radiación en cualquier medio (v) siempre sea menor que en el vacío (c):

$$\frac{v_{REM \text{ vacío}}}{v_{REM \text{ medio}}} = \frac{c}{v} > 1 \quad (81)$$

El *índice de refracción* (n) de todo material se define como el cociente de la velocidad de la luz en el vacío (c), respecto a la velocidad de la luz en dicho material (v), tratándose de una constante física propia del material, como lo son el punto de fusión y el de ebullición, el peso molecular, etc.

$$n = \frac{c}{v} \quad (82)$$

⁶³ Lide, D.R., Ed: *Handbook of Chemistry and Physics*. Editorial CRC, Boca Ratón, Florida, 2004.

Que, aplicado sobre la anterior expresión (81):

$$\frac{c/n_1}{c/n_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (83)$$

Cuando el primer medio es el vacío:

$$\frac{\text{sen}\theta_1}{\text{sen}\theta_2} = \frac{c}{v_2} = n_2^0 \quad (84)$$

Donde n^0 expresa el *índice de refracción absoluto* del segundo medio. La mayoría de los valores de índice de refracción que aparecen en las tablas de propiedades físicas de los materiales y etiquetas de los reactivos expresan valores de índices de refracción respecto al aire. Sin embargo, HPLC no trabaja en condiciones de vacío. Empíricamente, el índice de refracción suele estimarse como (n_D), al aire, con radiación procedente de la línea D (amarilla) de una lámpara de vapor de sodio (589,3 nm), permitiendo calcular el *índice de refracción absoluto al vacío* (n^0):

$$n^0 = 1,00027 \cdot n_D \quad (85)$$

La temperatura, longitud de onda de la radiación empleada y presión a la que está sometido el analito son las tres variables que más afectan a la medida del índice de refracción. Respecto a la temperatura, varía la precisión de las medidas de índice de refracción, pues modifica la velocidad de transmisión de la radiación en el medio atravesado (tabla 24), exigiendo termostatar los detectores refractométricos y disponer obligadamente un horno de columnas en los equipos de HPLC.

Tabla 24. Efecto de la temperatura en las medidas refractométricas.

variación de temperatura	precisión en la medida de n
0,2° C	4 decimales
0,02° C	5 decimales
0,002° C	6 decimales

En cuanto al efecto de la longitud de onda, evidentemente, fuentes de radiación distintas varían la medida del índice de refracción. Aunque los refractómetros de sobremesa emplean frecuentemente la línea D emitida por una lámpara de sodio, los detectores refractométricos de HPLC suelen utilizar fuentes de radiación visibles (rojas) o infrarrojas.

La presión también influye sobre las medidas del índice de refracción: una presión mayor causa mayor densidad aparente, aumentando, por tanto, el valor del índice de refracción, aspecto importante en HPLC, aunque menos de lo que podría parecer, ya que un detector refractométrico trabaja a presiones bajas, entre 1 y 10 bares. Oscilaciones de ± 1 bar en cabeza de columna provocan cambios de $1 \cdot 10^{-6}$ unidades en el índice de refracción, obligando a instalar un atenuador de pulsos a la salida de la bomba. Además, la naturaleza conceptual de la celda de medida (un prisma) hace que ésta resista presiones muy someras, escasamente 10 bares, por lo que cualquier obturación en el tubo de salida del detector provocará una sobrepresión que hará “estallar” la celda, rajándola. Lo malo es que esto sucede en el interior del detector y el cromatografista podría ignorarlo hasta percibir un charquito bajo el módulo: por ello, los detectores refractométricos incorporan obligatoriamente sensores internos de fugas de líquidos.

Como es preceptivo en HPLC, los detectores refractométricos miden continuamente la variación del índice de refracción en su celda de flujo continuo. Para ello, se ajusta el valor “cero” de la línea de base con fase móvil sola, para que, cuando eluyan solutos de índice de refracción distinto al de la fase móvil, el cromatograma muestre picos (positivos si el índice de refracción de éstos fuese superior al de la fase móvil, o negativos en el caso contrario), por lo que la práctica totalidad de los detectores refractométricos permiten invertir la polaridad de su señal para tener una visión “normal” de los cromatogramas. Las medidas son más sensibles cuanto mayor es la diferencia (positiva o negativa) entre los índices de refracción de los analitos y la fase móvil. Cuantitativamente, la concentración del analito cambia la señal del detector refractométrico y, con ello, la altura y área del los picos. Si la fase móvil cambiase durante las medidas (en eventuales gradientes), la línea de base se alteraría tan drásticamente que resultaría imposible estabilizarla, obligando a que los análisis con detección refractométrica sean siempre isocráticos. Por ser detectores universales, su estabilidad es delicada, exigiendo desgasificar la fase móvil (las burbujas producen un *efecto peine* en la línea de base), mantener su composición (aún isocrática, si es una mezcla y se evapora parcialmente uno de sus componentes, veremos gran deriva en la línea de base), buen equilibrio de la columna (existirá deriva mientras no esté perfectamente equilibrada), además de la citada estabilidad ante temperatura y presión.

Existen varios tipos de detectores refractométricos comerciales, como veremos a continuación: casi todos son diferenciales; algunos por deflexión y, menos, interferométricos, láser o “múltiples”, combinando éstos en un mismo módulo un detector refractométrico con otro tipo de detección.

Detectores refractométricos por reflexión

Postergados por los detectores refractométricos diferenciales, aún podemos encontrarlos en cromatógrafos arcaicos. Se basan en el mismo principio que los refractómetros Fresnel de sobremesa, al cambiar de dirección el haz de radiación (visible) emitido por una fuente de radiación tras incidir sobre la muestra.

Detectores refractométricos diferenciales

Los detectores refractométricos diferenciales (figura 70) sustraen ópticamente la señal que genera la sola fase móvil a la de ésta con los analitos, solución instrumental de mayor garantía que desplazar el “cero” electrónicamente, como hacen los detectores refractométricos por reflexión, lo cual pone la detección en situaciones límites y coarta su dinámica en las medidas cuantitativas. La celda de los detectores refractométricos diferenciales posee dos caras: su parte interna (zona de referencia) se ceba bien con fase móvil, mientras que por la otra zona discurre el eluyente (fase móvil con analitos). Si ambos líquidos fuesen iguales, el haz proseguiría recto hasta el detector (generalmente un foto-resistor), pero si difieren (por la presencia de solutos) el haz cambia su dirección un cierto ángulo, alterando la corriente generada en el foto-resistor. La filosofía *diferencial* también minimiza otros efectos, sobre todo los causados por cambios de temperatura, pareja en ambas zonas de medida. Según los distintos modelos, la celda de referencia puede cebarse manualmente o mediante una válvula eléctrica: la operación manual presenta el inconveniente de que, al realizarse con una jeringa, al retirarse ésta para cerrar la línea fluídica, provoca la aparición de burbujas, con la consiguiente inestabilidad de la línea de base.

Empero, la mayoría de los detectores refractométricos diferenciales ceban el canal de referencia con fase móvil (o con un blanco) mediante una válvula eléctrica, procedimiento más rápido, sencillo, limpio y elegante, con la limitación de que la válvula debe actuar un periodo de tiempo corto, pues de lo contrario se calienta y puede evaporar la fase móvil que la atraviesa, generando indeseables burbujas. La operación es sencilla: el equipo bombea fase móvil con la columna instalada y equilibrada, y cuando tengamos la seguridad de que el eluyente salido de la columna es estable, se activa la válvula, obligando a pasar el eluyente por la línea de referencia. Tras un minuto, se desactiva la válvula para que el eluyente pase por la línea de muestra. Un minuto debería bastar para cebar la zona de referencia: un flujo de fase móvil de 1 ml/min llenará enseguida la celda de medida (de pocos μ l, aunque de volumen ligeramente superior a la de otros detectores). Por otra parte, un minuto no es mucho tiempo para que la válvula se caliente y haga evaporar la fase móvil que la atraviesa.

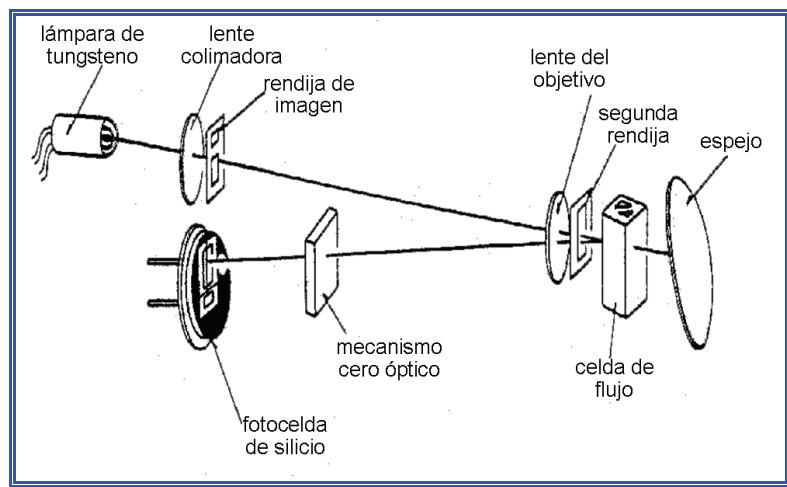


Figura 70. Óptica interna de un detector refractométrico diferencial, en cuya celda hay dos zonas para contenidos líquidos, una para el eluyente con muestra y otra de referencia.

Detectores refractométricos por deflexión

Con óptica semejante a la de los detectores refractométricos por reflexión, los detectores refractométricos por deflexión montan un prisma que focaliza el máximo de radiación sobre la celda de medida, que, a su vez, es diferencial (figura 71). Dicha óptica permite trabajar con muestras que contienen analitos poco concentrados junto con otros relativamente concentrados, admitiendo aplicaciones analíticas y preparativas sin cambios internos. Al comparar las ópticas de un detector refractométrico sin deflexión con otro con deflexión, apreciamos en éste como primera diferencia un componente instrumental más, encargado de realizar el *balance óptico* o *cero óptico*, que garantiza que el haz procedente de la fuente de radiación llegue perfectamente centrado, sin ninguna desviación previa, a la celda de muestra y referencia, obviando que la fase móvil desvíe el haz por sí misma, y así lograr medidas más estables y, por tanto, más sensibles.

Además de su proverbial respuesta universal, los detectores refractométricos por deflexión presentan propiedades ventajosas, básicamente su relativa insensibilidad a eventuales posos y burbujas residuales en su celda, obviando limpiarla frecuentemente (mantenimiento necesario en los detectores refractométricos) y la mayor amplitud de su respuesta. Empero, su sensibilidad no alcanza la de otros detectores refractométricos más sofisticados, que veremos a continuación. La óptica diferencial con deflexión de la mayoría de los detectores de este tipo es programable, ajustando el balance óptico (manual o automáticamente) para permitir trabajar en técnicas analíticas, semipreparativas y preparativas. Suelen al-

bergar su óptica en compartimentos internos sellados, donde puede establecerse a voluntad un valor óptimo de temperatura, que se mantendrá estable durante los análisis.

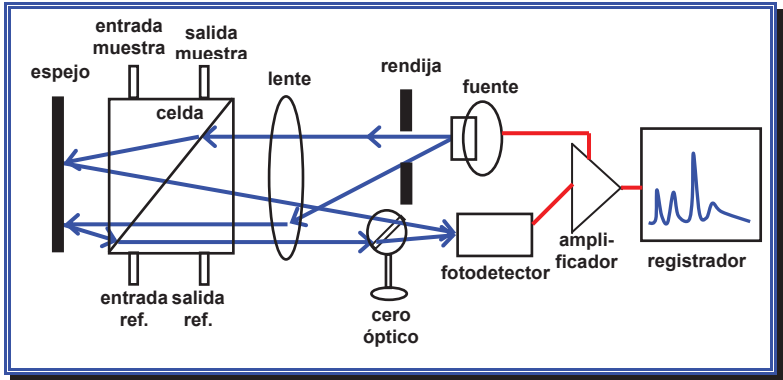


Figura 71. Esquema de un detector refractométrico por deflexión.

Detectores refractométricos interferométricos

Poco extendidos, su ventaja de mostrar superior linealidad a otros tipos de detectores refractométricos queda ensombrecida por su mayor complejidad instrumental, que los encarece y complica su manejo. Su óptica consta de un divisor primario que fracciona una radiación monocromática en dos haces, que atraviesan luego, respectivamente, las zonas de muestra y de referencia de la celda. Posteriormente el haz desdoblado confluye en un divisor secundario invertido, que mide diferencias (interferométricas) de la distancia recorrida por ambos haces como múltiplos de la longitud de onda utilizada (figura 72) para, finalmente, llegar a un fotomultiplicador.

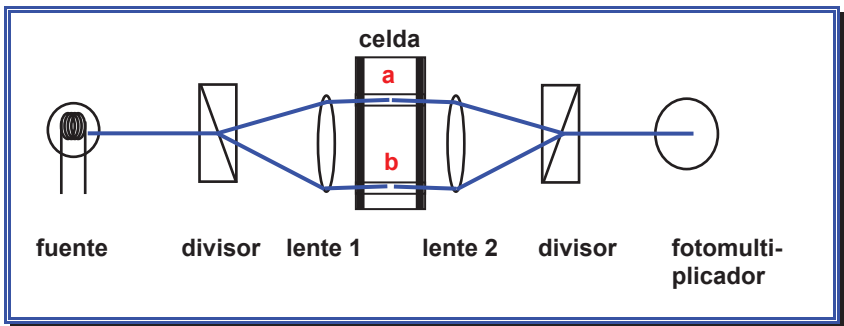


Figura 72. Esquema de un detector refractométrico interferométrico, con su canal de muestra (a) y su canal de referencia (b).

Detectores refractométricos láser

Pueden ser detectores refractométricos diferenciales o por deflexión, que montan una fuente de radiación láser (visible o infrarroja), la cual garantiza una máxima intensidad de emisión con mínima dispersión durante el recorrido óptico, permitiendo velocidades de flexión superiores a 1.000 s^{-1} , permitiendo su uso en determinaciones cromatográficas de moléculas voluminosas (polímeros, biomoléculas). Su alta sensibilidad (10^{-8} UIR) les hace ideales en determinaciones a bajas concentraciones, abarcando su linealidad, al menos, el 0,25% del fondo de escala. Su temperatura interna generalmente se puede controlar y seleccionar.

Aplicaciones de la detección refractométrica

La detección refractométrica se utiliza habitualmente en la determinación de azúcares (figura 73), polímeros y otros analitos carentes de propiedades más directas, como grupos cromóforos, fluorescencia, ionicidad o comportamiento electroquímico. También otros análisis clásicos con detección refractométrica son la determinación de azufre en cauchos sintéticos, para comprobar insaturaciones en ellos, o la evaluación del rendimiento de técnicas de destilación y de extracción. Asimismo realizan determinaciones cualitativas, identificando sustancias desconocidas mediante las *gráficas densidad - índice refracción* o calculando la *refracción molar*, suma de las *refracciones atómicas*.

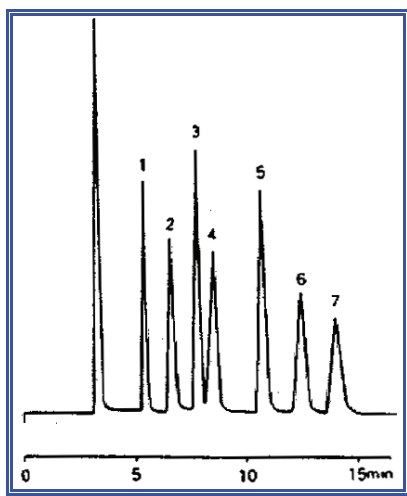


Figura 73. Clásico cromatograma de azúcares obtenido con un detector refractométrico en columna amino y fase móvil acetoniitrilo:agua (70:30): 1. glicerol, 2. xilosa, 3. fructosa, 4. glucosa, 5. sacarosa, 6. manosa, 7. lactosa, 8. galactosa.

7.6. Detectores polarimétricos

La necesidad de determinar mediante HPLC quiral moléculas con poder rotatorio óptico ha llevado al uso, cada vez mayor, de los detectores polarimétricos, que estiman el porcentaje de los distintos enantiómeros presentes en una muestra y su rotación específica. La polarimetría engloba un conjunto de técnicas, la primera y original de las cuales es la propia *polarimetría*, medida cuantitativa de la desviación del plano de la luz polarizada⁶⁴. A ella hay que añadir otras dos técnicas polarimétricas: la *dispersión rotatoria óptica*, que estudia la desviación del plano de luz polarizada en función de la longitud de onda, y el *dicroísmo circular*, que evalúa cómo las moléculas absorben de forma distinta las radiaciones dextrógiras y levógiras. Todas estas técnicas estiman la modificación o alteración de una radiación polarizada al atravesar una muestra que contiene *moléculas ópticamente activas*, es decir, con *poder rotatorio óptico*. La radiación polarizada puede ser *dextrógira*, cuando avanza trazando helicoides en el sentido de su avance en el mismo sentido de las agujas del reloj, o *levógira*, cuando lo hace de forma contraria a las agujas del reloj. Al penetrar la radiación electromagnética en un material transparente ópticamente activo se enlentece uno de los dos componentes (eléctrico o magnético), desfasando su desviación hacia la derecha y hacia la izquierda, provocando una rotación (α) del plano de la luz polarizada. En la definición vista anteriormente del índice de refracción para ambos componentes (89), levógiro (n_L) y dextrógiro (n_D):

$$n = \frac{c}{v} \quad ; \quad n_L = \frac{c}{v_L} \quad ; \quad n_D = \frac{c}{v_D} \quad (86)$$

Aunando los dos últimos:

$$\frac{v_L}{v_D} = \frac{n_D}{n_L} \quad (87)$$

El desfase (φ) entre ambos componentes, dextrógiro y levógiro, que hace variar el plano de luz polarizada (α) de una radiación de frecuencia dada (ν) durante su trayecto o paso óptico (b) a través de una muestra puede cuantificarse como diferencia de ambas, y multiplicando y dividiendo por la velocidad de la luz (c):

$$\varphi = \frac{2\pi b\nu}{v_D} - \frac{2\pi b\nu}{v_L} = \frac{2\pi b\nu c}{v_D c} - \frac{2\pi b\nu c}{v_L c} \quad (88)$$

⁶⁴ Aboul-Enein, N.Y. y Ali, I.: *Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Techniques*. Editorial Marcel Dekker, Nueva York, 2011.

Por ser la longitud de onda (λ) el cociente de la velocidad de la luz (c) frente a la frecuencia de la radiación (ν), y el índice de refracción (n) el cociente de la velocidad de la luz (c) frente a la velocidad de la radiación (ν):

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad ; \quad n = \frac{c}{\nu} \quad (89)$$

Resulta posible redefinir el desfase φ , en ángulos de 0 a 360°:

$$\varphi = \frac{2\pi b n_D}{\lambda} - \frac{2\pi b n_L}{\lambda} = \frac{2\pi b}{\lambda} (n_D - n_L) \quad (90)$$

Siendo el ángulo de la parte positiva (α), de 0 a 180° ($\alpha = \varphi/2$):

$$\alpha = \frac{\pi b}{\lambda} (n_D - n_L) \quad (91)$$

Por otra parte, la concentración (c) acentúa la rotación, cuantificada en las técnicas polarimétricas por la *Ley de Biot*, expresión análoga a la Ley de Lambert-Beer de la espectrofotometría. La *Ley de Biot* establece que la rotación de la luz polarizada depende de la concentración del analito y de su estructura molecular, que concreta su poder rotatorio específico o “rotación específica” ($\{\alpha\}$), constante para cada molécula y parámetro analítico de gran utilidad (tabla 25):

$$\alpha = \{\alpha\}bc \quad ; \quad \alpha_\lambda^T = \{\alpha\}_\lambda^T bc \quad (92)$$

Las unidades de rotación específica ($\{\alpha\}$), a partir de la rotación (α), paso óptico (b) y concentración (c), son, en primera aproximación, *grados/[dm·(g/ml)]*, es decir, *grados·[dm⁻¹(g/ml)⁻¹]*, finalmente *10⁻¹·[grados cm² g⁻¹]*.

Tabla 25. Utilidad de la rotación específica $\{\alpha\}$ en control de calidad de fármacos y estudios de conformaciones de péptidos y proteínas:

Confirmar una separación quiral
Determinar la pureza de los picos cromatográficos
Comprobar pureza de mezclas óptimamente activas
Su distinto valor a lo largo de un pico indica coelución
Cuantificar porcentajes de racemización
Demostrar que hubo transformación del analito

La rotación específica ($[\alpha]$) es el parámetro clave que establece el comportamiento polarimétrico de cada molécula, determinando cuántos grados desvía (gira) el plano de la luz polarizada al atravesar una solución del analito de concentración normalizada, grados que mide el polarímetro. La rotación específica (y, por tanto, la medida de rotación observada) es afectada por las variaciones de temperatura, longitud de onda, disolvente, pH y concentración del analito. Precisamente por ser extremadamente sensible ante dichas condiciones experimentales, los cromatografistas han usado poco la polarimetría, además de por su moderada sensibilidad. La Ley de Biot establece que la rotación específica de una molécula depende de la longitud de onda de la radiación polarizada y, por tanto, de la fuente de radiación del detector; muchos detectores polarimétricos emplean emisión visible procedente de un diodo láser (a 670 nm o a 426 nm), que garantiza mínima variabilidad de la rotación específica y escasas interferencias ópticas, mientras que otros detectores montan fuentes de radiación de Xenón-Mercurio, pues el mercurio emite fuertemente a 365 nm y, presurizadas, emiten continuamente entre 350 y 900 nm.

Los analitos susceptibles de detección polarimétrica han de ser moléculas *ópticamente activas*, con *centros de asimetría* en su estructura. Las moléculas simétricas, ópticamente inactivas, poseen planos de simetría a modo de espejos, donde la mitad de la radiación se desvía hacia un lado y la otra mitad hacia el otro, anulando la eventual desviación del plano de la luz polarizada. Básicamente existen dos tipos de actividad óptica: la que presentan algunas moléculas en forma cristalina, como el cuarzo, y la propia de moléculas en cualquier estado físico. La figura 74 muestra dos isómeros del butanol activos (de los que se dice que son *enantiomorfos*), mientras que el 3-hidroxiopropanal es ópticamente inactivo, pues carece de carbonos asimétricos o centros de asimetría.

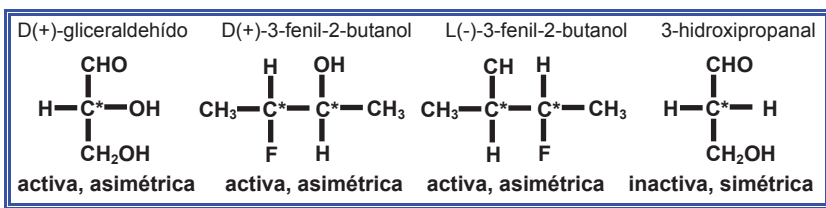


Figura 74. Ejemplos de moléculas ópticamente activas e inactiva.

Tabla 26. Utilidad de la detección polarimétrica en HPLC.

Diferenciar formas moleculares por su distinta actividad biológica
Determinar qué enantiómero tendrá máxima actividad terapéutica
Comprobar toxicidad en enantiómeros
Monitorizar procesos de síntesis identificando moléculas semejantes

Tradicionalmente los polarímetros de sobremesa han proporcionado valiosa información en la industria farmacéutica, de alimentación, biotecnología y laboratorios clínicos (tabla 26), pues el poder de rotación de las moléculas ópticamente activas es cosignificante con su actividad biológica (tabla 27). Las moléculas de muchos fármacos poseen centros de asimetría, conteniendo una misma fórmula genérica varios enantiómeros, pudiendo ser farmacológicamente activa una de las dos formas, dextro o levo, mientras que la otra puede presentar menor actividad terapéutica, carecer de ella, inhibir la de las formas activas o incluso ser tóxica. La posología de los fármacos debería contemplar el porcentaje presente del enantiómero activo respecto a las otras formas, como sucede, por ejemplo, en algunos antibióticos⁶⁵.

Tabla 27. Ventajas de la detección polarimétrica.

Es específica de moléculas ópticamente activas
Puede analizar enantiómeros poco separados cromatográficamente
Gran selectividad que permite matrices complejas y biológicas
No suele requerir derivatización
Excelente sensibilidad con óptica láser
Calcula la rotación específica como parámetro de identificación
Ideal combinada con columnas quirales

La temperatura altera la rotación óptica, pues esta expresa la diferencia de índice de refracción entre las dos radiaciones polarizadas (dextrógira y levógira) y, al afectar la temperatura el índice de refracción, modifica, por tanto, la rotación específica. A diferencia de los clásicos polarímetros de sobremesa, que trabajan con volúmenes de muestra de varios ml y se equilibran lentamente, un detector polarimétrico de HPLC se equilibra térmicamente con gran rapidez. En todo caso, el efecto de la temperatura (T , en grados centígrados) puede corregirse aplicando un coeficiente (Z) de temperatura de rotación, específico de cada analito:

$$[\alpha]^T = [\alpha]^{20} + Z(T - 20) \quad (93)$$

El entorno de la molécula también puede variar la actividad óptica al originar la concentración del analito interacciones molécula-molécula, despreciables en concentraciones inferiores a 10 mM, en cuyo caso solo afectan a la rotación específica las interacciones molécula-disolvente, siendo importante considerar la influencia de la polaridad de la fase móvil, su pH y fuerza iónica sobre el poder rotatorio específico (tabla 28).

⁶⁵ Baselt, R.C.: *Disposition of Toxic Drugs in Chemicals in Man*, Séptima Edición. Editorial Biomedical Publications, Foster City, California, 2004.

Tabla 28. Rotación (α) de la molécula de nicotina en varias fases móviles.

Fase móvil	Rotación
Agua	+24,0
Metanol	+13,0
Etanol	+8,5
Propanol	+7,0
Tolueno	+5,5
Cloroformo	-2,5
Bromuro de etileno	-12,0

Además de la rotación específica, que diferencia moléculas semejantes, la *rotación molar* (Φ) contempla el peso molecular (M) del analito, permitiendo diferenciar moléculas muy parejas. Por ejemplo, enantiómeros de análogos estructurales y de peso molecular similar, como fármacos que solo difieren en un radical externo (hidroxilo o metilo), muestran distinta rotación específica:

$$\Phi = \frac{M}{1000} \text{ grados cm}^2 \text{ mol}^{-1} \quad (94)$$

Instrumentalmente los detectores polarimétricos suelen montar fuentes láser de emisión visible junto a dispositivos para medir la magnitud y dirección de la rotación óptica. La celda de flujo continuo es voluminosa comparada con otros detectores de HPLC, muchas veces con volumen de 50 μl y paso óptico de 50 mm. Respecto a su sensibilidad, por ejemplo, un analito de peso molecular de 100 g/mol, poder rotatorio específico de 50 y concentración de 10 mM produce una rotación de 0,025 grados en celdas polarimétricas de 5 mm de paso óptico. Hagamos nuestros propios cálculos pensando que habitualmente la escala más sensible de un detector polarimétrico es de diezmilésimas ($1 \cdot 10^{-4}$) de grados ópticos.

La mayoría de las fases móviles carecen de actividad óptica, eximiendo a la detección polarimétrica de derivas y ajustes del cero de la línea de base entre análisis sucesivos de muestras distintas. A veces el detector polarimétrico se dispone en serie tras un detector espectrofotométrico o *diode array*, que exhiben cromatogramas y realizan cálculos cuantitativos “familiares” mientras el detector polarimétrico estima la relación enantiomérica, la rotación específica y la pureza de los picos cromatográficos, confirmando la presencia de especies enantiómeras, obviando la necesidad de realizar separaciones quirales⁶⁶. Precisamente la mayor venta-

⁶⁶ Subramanian, G., Ed.: *Chiral Separations Techniques, A Practical Approach*, Tercera Edición. VCH, Weinheim, 2007.

ja de la detección polarimétrica reside en poder calcular el porcentaje y pureza de cada forma enantiómera en variadas muestras y analitos, permitiendo diversos tipos de determinaciones, incluso de enantiómeros que solo se separan parcialmente por HPLC, y establecer su rotación específica con fines cualitativos, resultando ideales para separaciones con columnas quirales (tabla 29). La detección polarimétrica láser presenta las ventajas adicionales de una mejor sensibilidad (con límites de detección de 10 mM, lo cual evita derivatizar los analitos) y linealidad de 2 ó 3 órdenes de magnitud. La fuente láser viene a durar unas 20.000 horas y el detector polarimétrico, cuyo manejo es fácil y sencillo, requiere mínimos ajustes y es térmicamente estable, resultando válido para cualquier tipo de cromatografía, Análisis por Inyección en Flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*) y medidas estáticas. Su desventaja, eventualmente derivada de su escasa difusión, es su precio, más del doble que un detector *diode array* y cuatro veces el de un detector espectrofotométrico UV-VIS.

Detectores de dicroísmo circular

Las moléculas con centros quirales y grupos cromóforos suelen exhibir dicroísmo circular, siendo ópticamente activos y absorbiendo en distinta medida la radiación polarizada levógira y la dextrógira. Aunque la diferencia entre ambas absorbancias es exigua, la puede determinar un detector de dicroísmo circular, medida que, evidentemente, depende de la longitud de onda. Instrumentalmente los detectores de dicroísmo circular pueden trabajar con radiaciones menores de 200 nm, pero las interferencias de los analitos con los disolventes y fases móviles impiden trabajar por debajo de 230 nm (el *cut-off* UV del n-heptano es 220 nm, del acetonitrilo 200 nm, del agua 190 nm, del etanol 210 nm y del metanol 220 nm). Como norma, debe utilizarse una longitud de onda lo menor posible para analitos con cromóforos débiles y, aún no siendo óptima, 230 nm debería resultar suficiente.

Aplicaciones cuantitativas

Las aplicaciones cuantitativas exhiben, como siempre, la señal instrumental del detector, en este caso, la rotación (α) frente a la concentración (c) en una recta que, idealmente, cumpla la ecuación de Biot. La industria farmacéutica es la principal usuaria de HPLC con detección polarimétrica: así se determinan las anfetaminas (su forma dextrógira es un potente estimulante del sistema nervioso central), la epinefrina (su forma levógira es un vasoconstrictor diez veces más activo que la forma dextrógira), el propanolol (bloqueante adrenérgico racémico, siendo activo solo el isómero *levo*), el propoxifeno (su isómero dextrógiro es analgésico y el levógiro antitúxico), el ácido ascórbico (su isómero dextrógiro es la vitamina antiescorbuto, mientras que la forma levógira es farmacológicamente inactiva) y las penicilinas comerciales (muchas contienen un aglomerado de penicilina G,

ampicilina, carbenicilina y ticarcilina). En la industria de alimentos, el isómero dextrógiro de la asparagina tiene un sabor agradable, mientras que el levógiro es amargo; el isómero levo del limoneno es el responsable del aroma y sabor a limón, mientras que el dextro sabe a naranja⁶⁷. En la industria química, algunos pesticidas también se determinan por HPLC con detección polarimétrica. En biología, que precisa determinaciones estructurales de aminoácidos y péptidos, un sistema de HPLC con detección polarimétrica puede determinar el poder rotario específico tras realizar reacciones químicas específicas. Finalmente, la detección polarimétrica permite gradientes de elución, gran ventaja frente a la alternativa de la detección refractométrica, donde son imposibles. En las azucareras y otras fábricas de alimentos, generalmente pequeñas empresas, es frecuente ver sistemas de HPLC isocráticos con detectores refractométricos para determinar azúcares⁶⁸, cuando, sin embargo, la mayoría disponen de polarímetros analíticos de sobremesa y sueñan con tener HPLC con detección polarimétrica, capaz, también, de determinar analitos “quirales”, sin actividad óptica por carecer de centros de asimetría, pero que pueden derivatizarse de forma similar a las clásicas derivatizaciones en detección fluorimétrica.

Tabla 29. Aplicaciones de HPLC con detección polarimétrica.

Estimar rotación específica de compuestos enantiopuros o mezclas
Selección de productos quirales
Identificación positiva de enantiómeros
Monitorizar cambios de rotación específica en cinéticas
Monitorización de reacciones y síntesis orgánicas
Monitorización de generación de péptidos sintéticos
Evaluación de productos adulterados en control de calidad
I+D farmacéutica (antibióticos, sacáridos, fármacos en general)
Estudios toxicológicos (pesticidas, herbicidas, metabolitos)
Análisis de productos naturales (azúcares, vitaminas, terpenos)
Análisis de proteínas

7.7. Detectores láser

Disponer de detectores láser en HPLC fue una ilusión largamente imaginada, que la eclosión de las técnicas capilares convirtió en necesidad. Una parte fundamental (y en ocasiones modular) de los detectores ópticos es su fuente de

⁶⁷ Belitz, H.D. y Grosch, W.: *Food Chemistry*. Editorial Springer-Verlag, Berlín, 1999.

⁶⁸ Gilbert, J., Ed.: *Analysis of Food Contaminants*. Editorial Elsevier Applied Science, Essex, 1984.

radiación, donde puede habilitarse un láser, radiación que aporta nítidos beneficios en HPLC, sobre todo una mejor sensibilidad (relación señal - ruido), selectividad y resolución. Por el contrario, se trata de equipos más sofisticados y, lógicamente, más caros. Por el contrario, hay casos donde las altas energías de la radiación láser pueden causar inconvenientes efectos térmicos, empeorando la sensibilidad (mayor ruido). Existen detectores láser de diversos tipos:

Detectores de absorción fotoacústica inducida por láser

La *detección fotoacústica láser (LIPA, Laser Induced Photoacoustic)* utiliza diferentes láser de argón, principalmente de 488 nm, radiación que atraviesa la celda de flujo continuo, previa a un detector fotoacústico que mide cuánta radiación absorbe la muestra. Dicha celda es relativamente sencilla, resistente a la corrosión de las fases móviles usuales de HPLC y con geometría optimizada para la detección fotoacústica que induce la fuente láser. Esta detección no es destructiva para las muestras y resulta dos veces y media más sensible que la sufrida espectrofotometría UV-VIS, llegando, por ejemplo, a límites de detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos de 100 ppb.

Detectores de fluorescencia inducida por láser

También este tipo de detectores resulta más sensible que los espectrofluorímetros habituales, utilizándose sobre todo en los análisis de trazas por su mejor relación señal - ruido. La fluorescencia puede proceder de técnicas de *fluorescencia con excitación de un solo fotón (OPEF, One Photon Excited Fluorescence)* o de *dos fotones (TPEF, Two Photon Excited Fluorescence)*, en la cual se absorbe un par de fotones. En ambos casos los detectores pueden montar celdas de flujo continuo de diversos tipos (por goteo, de flujo laminar o de fibra óptica), generalmente con diámetros internos de 100 μm . En los detectores por fluorescencia inducida por láser (LIF o LIFD, *Laser Induced Fluorescence Detector*) el proceso de excitación (ultravioleta) es realizado por un láser, habitualmente de He/Cd, logrando una excitación mucho más eficiente, con la subsiguiente mejora de los límites de detección, que alcanzan concentraciones de femtomoles e incluso de attomoles (10^{-18} M), con relaciones señal-ruido superiores a 10.

Detectores refractométricos láser

Como se dijo en la sección de los detectores refractométricos, la mayor diferencia de los detectores refractométricos láser respecto a los detectores refractométricos convencionales reside en que los primeros se basan en medidas interfe-

rométricas: un láser monocromático induce cambios del índice de refracción en un *interferómetro de Fabry-Perot* mientras la muestra pasa por una celda de flujo continuo que, a su vez, atraviesa dicha radiación, transmitida luego al detector (un fotomultiplicador). El *software* del detector calcula la posición de máxima interferencia, convirtiendo la señal en un cromatograma *quasi convencional*, que representa variaciones del índice de refracción frente al tiempo.

Detectores de light scattering láser

Este tipo es el más consolidado de los detectores con fuentes láser, basado en medidas de dispersión Rayleigh (*light scattering*), en sus modalidades LALLS (*Low Angle Laser Light Scattering System*), RALLS (*Right Angle Laser Light Scattering System*) o MALLS (*Multiple Angle Laser Light Scattering System*) para determinaciones en GPC, que veremos más adelante.

Detectores de emisión Raman inducida por láser

La dispersión Raman es directamente proporcional a la intensidad de la fuente de radiación, pues es un porcentaje de esta. Se emplean fuentes láser visibles o ultravioleta, cuya longitud de onda se corresponde con la energía vibracional de los analitos en un estado excitado, induciendo una *dispersión Raman resonante* (RRS, *Resonance Raman Scattering*) que exhibe bandas más intensas que la *emisión Raman normal* (NRS, *Normal Raman Scattering*), por lo que resulta más sensible.

Detectores de actividad óptica por láser

Como acabamos de ver en la sección anterior de Detectores Polarimétricos, se trata de polarímetros, espectropolarímetros o micropolarímetros con celda de flujo continuo y fuente láser, que alcanzan mayor selectividad y sensibilidades cuatro veces superiores a las de los polarímetros convencionales. Es preciso recordar que la fase móvil ha de ser un líquido sin actividad óptica.

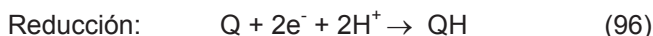
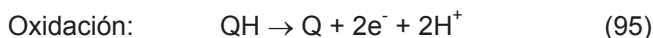
7.8. Detectores electroquímicos

El conjunto de detectores basados en la medida de una propiedad eléctrica comprende diversos tipos, cuyos nombres indican la propiedad eléctrica que miden o las unidades de ésta. Veremos en primer lugar los *detectores electroquími-*

cos, en sus dos variedades: *amperométricos*, que estiman la corriente eléctrica producida al mantener un potencial constante en la celda de medida y *coulombimétricos* (o “*coulométricos*”), que miden la cantidad de electricidad consumida al suceder una reacción electroquímica en la muestra; en segundo lugar trataremos los *detectores conductimétricos*, que determinan la *conductividad* (*conductancia*), capacidad de una disolución de conducir corriente eléctrica mientras se mantiene un potencial constante de corriente alterna entre sus electrodos; a su vez, los *detectores potenciométricos* (o *pHmétricos*) evalúan el voltaje o potencial eléctrico existente entre dos electrodos mientras se mantiene una corriente constante entre los mismos; finalmente, existen *detectores voltamétricos*, en los que se varía el potencial de forma regular mientras se mide la corriente, siendo un tipo de ellos los *detectores polarográficos*, con electrodos de metal líquido, de mercurio.

Los detectores eléctricos, especialmente los electroquímicos, exigen en los equipos de HPLC que los montan muy convenientemente, e imprescindible en análisis que buscan alta sensibilidad, *pasivar* el sistema, pues, como dijimos al tratar de la línea fluidica (sección donde el lector podrá seguir la secuencia de cómo pasivar el sistema), las partes metálicas de acero inoxidable de ésta pueden oxidarse, liberando iones férricos y crómicos, que aumentarán la señal de fondo en el cromatograma y pueden causar deriva en la línea de base.

La detección electroquímica es muy selectiva y, por tanto, muy sensible, pues aporta mínima señal de fondo a la línea de base de los cromatogramas, a diferencia de los poco selectivos detectores conductimétricos, que monitorizan continuamente la conductividad global de la fase móvil. Las medidas que exhiben los detectores electroquímicos resultan de las reacciones redox sucedidas en sus electrodos, reacciones que generan una corriente proporcional a la concentración del analito. Por ejemplo, la quinona (Q) puede reducirse a hidroquinona (QH) y ésta oxidarse a quinona, en una reacción reversible. Empero, no todas las reacciones redox son reversibles:



Los detectores electroquímicos también son muy precisos y exactos, y pueden regularse variando sus condiciones experimentales, con el inconveniente de que su señal depende bastante de la temperatura y exige fases móviles conductoras. Además, la detección electroquímica suele ser incompatible con los gradientes de elución. Con la característica clave de su gran selectividad y, a partir de ella, su sensibilidad, los detectores electroquímicos combinan un potencióstato y un conversor analógico – digital que puede multiplicar su señal prácticamente *ad libitum* hasta límites insospechados, pues el conversor solo aporta un ruido (rizado) mínimo a la línea de base.

Así, la detección electroquímica se utiliza por su altísima selectividad y sensibilidad (de 10^{-12} a 10^{-13} g/ml), siendo el potencial redox impuesto en su celda la variable que establece el cromatografista, de forma análoga a la longitud de onda en un detector espectrofotométrico (figura 75). Ese potencial redox produce la reacción de oxidación o de reducción de los analitos, que deben ser fácilmente ionizables, permitiendo su detección en matrices complejas o sucias, en diversas aplicaciones: análisis de catecolaminas en plasma, orina o líquido cefalorraquídeo, antioxidantes, carbohidratos y oligosacáridos, fármacos, drogas de abuso, contaminantes y productos naturales (vitaminas C y K). Otros compuestos, sin carácter electroquímico *per se* pueden derivatizarse, como los aminoácidos primarios, derivatizados precolumna con OPA.

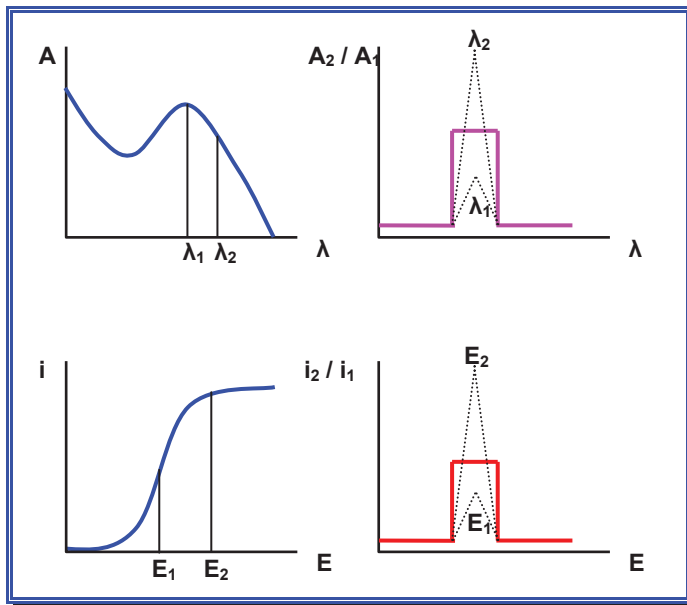


Figura 75. Abajo: la detección electroquímica se basa en la selección del potencial en el voltamograma, de modo similar a como la detección espectrofotométrica (arriba) se basa en la selección de la longitud de onda en el espectro de absorción UV-VIS.

La fase móvil en la detección electroquímica

La composición de la fase móvil es crítica para optimizar la sensibilidad y selectividad en la detección electroquímica, pues pequeños cambios afectan mucho a la respuesta del detector electroquímico. La mayoría de las aplicaciones con detección electroquímica siguen *recetas* que precisan ajustes posteriores, principalmente en la optimización de la fase móvil. Ésta, como hemos dicho, debe conducir la electricidad, por lo que debe contener un electrolito, frecuentemente lla-

mado “*electrolito soporte*”, a veces un par iónico y otras veces una sal inorgánica, por ejemplo, perclorato de litio⁶⁹. Fases móviles sin electrolito soporte, habituales en fase reversa, como agua, metanol o acetonitrilo al 100%, son incompatibles con la detección electroquímica, aunque pudiesen separar satisfactoriamente los analitos. La pureza de la fase móvil es muy importante, pues la presencia de oxígeno, metales, haluros e impurezas, incluso en el nivel de trazas, puede ocasionar una considerable corriente de fondo, manifestada como ruido y deriva en la línea de base (y no olvidemos que la detección electroquímica suele utilizarse precisamente para poder trabajar con alta sensibilidad), siendo también necesario ajustar cuidadosamente el pH de la fase móvil. Evidentemente, se deben emplear siempre solventes y reactivos de la máxima pureza, al menos, del 99,9%: agua muy pura, de “calidad HPLC” y, si fuese posible, pasarla previamente por una columna C18, que retendrá cualquier impureza orgánica (el agua pura, sin electrolitos, debería mostrar, al menos, una resistencia de $18 \Omega/\text{cm}^2$); preparar la fase móvil en recipientes de vidrio de calidad, perfectamente limpios; asegurar que no contaminan la fase móvil las distintas partes fluídicas del equipo (bombas, inyector, celdas, filtros, tubos, conexiones); como queda dicho, siempre es aconsejable pasivar la línea fluídica de acero inoxidable al instalar por primera vez el equipo; intercalar filtros en la línea fluídica para impedir la llegada al detector de partículas procedentes de la fase móvil, sellos de los pisones, muestras o de los mismos “finos” del relleno; filtrar siempre la fase móvil previamente a su uso con filtros de $0,2 \mu\text{m}$. Una vez que la fase móvil proporciona resultados aceptables, mantener su modo de preparación y uso, y continuar utilizando solventes y reactivos del mismo lote.

Una forma práctica de comprobar la idoneidad de la fase móvil consiste en bombear una solución que contiene ¡la muestra a analizar!, activando en el detector los valores de potencial con que luego se detectará dicha muestra: cuando se establezca la señal, sea la que sea, pondremos el flujo en cero, esperaremos cinco minutos y comprobaremos que la corriente de fondo ha disminuido apreciablemente; si es así, podremos afirmar que la fase móvil contenía impurezas electroactivas, posible causa de pérdida de sensibilidad en los análisis, pero, por el contrario, si la corriente de fondo continua mostrando aproximadamente el mismo valor, podremos utilizarla tranquilamente.

En cuanto a los solventes orgánicos, debemos de tener en cuenta que en detección electroquímica los analitos suelen ser polares, exigiendo fases móviles también polares, en métodos de fase reversa y par iónico, muchas veces con modificador orgánico para mejorar la separación, como metanol, acetonitrilo o alcoholes de cadena mayor, como el etanol, propanol y hexanol.

Respecto al agua utilizada como fase móvil, nuestra experiencia de muchos años atestigua que la mejor agua para detección electroquímica es la inicialmente

⁶⁹ Karapetian, Y.A. y Eichis, W.N.: *Physical Chemistry Properties of Electrolytes*. Editorial Khimia, Moscú, 1989.

tomada del grifo (excepto en poblaciones donde el agua de consumo es muy “dura”), posteriormente desionizarla pasándola por una resina, después bidestilarla y, por último, purificarla en un equipo de ósmosis inversa. Una vez abierta la botella de agua, debe usarse en el momento, porque puede contaminarse con bacterias⁷⁰. La alternativa de usar agua de “calidad HPLC” resulta caro, pues se empleará como fase móvil y también para disolver, preparar y diluir las muestras.

Las soluciones acuosas de tampones, pares iónicos, etc. también han de ser de la máxima pureza. En la detección electroquímica la concentración de los tampones suele oscilar entre 50 y 100 mM para minimizar la corriente de fondo, deriva y ruido, que comprobaremos siempre junto a la selectividad cromatográfica. Prepararemos fases móviles tamponadas, en primer lugar, con reciente agua de calidad HPLC; conservaremos el mismo proveedor de reactivos para mantener la pureza en la “receta” a seguir, pues frecuentemente resulta difícil hallarlos con suficiente grado de pureza, requiriendo preparar las soluciones por procedimientos alternativos. En todo caso, intentaremos emplear reactivos “normales” (fosfato, acetato) sin recurrir a reactivos “exóticos” (cloroacetato, sales de cerio): los reactivos normales precisamente lo son porque muchos cromatografistas los usan con buenos resultados.

Si la aplicación exige tamponar la fase móvil, los tampones deben usarse con pH próximos a sus pKa. Por ejemplo, los tampones acetato son efectivos entre pH 4 y 6, pero si se usan fuera de ese intervalo, pequeños cambios en el pH supondrán grandes cambios en el poder de elución de la fase móvil.

En el caso de que la fase móvil contenga sustancias volátiles, oxidables o degradables, evitaremos que permanezca mucho tiempo *dentro* del equipo, preparándola frecuentemente y siguiendo los consejos ya expuestos para el agua y preparación general de disolventes en la detección electroquímica.

Defendemos reciclar la fase móvil, sobre todo si su preparación es compleja o caros sus componentes. En ese caso, vigilarémos la corriente de fondo, estableciendo un valor límite, por encima del cual será necesario preparar nueva fase móvil. Siempre es positivo desgasificarla, mediante los procedimientos habituales.

Ocasionalmente la fase móvil puede ocasionar efectos indeseables: columnas ya con muchos análisis pueden albergar sustancias que van quedando muy retenidas y pueden eluir al cambiar de fase móvil, originando picos fantasmas o, cuanto menos, variar el fondo y ocasionar deriva en las líneas de base. Ello se evitará bombeando de vez en cuando fase móvil con una proporción alta de otro solvente o de modificador orgánico (por ejemplo, metanol para los tampones) y asegurar la completa elución de los solutos.

⁷⁰ *Standard Guide for Ultrapure Water Used in the Semiconductor and Electronics Industry*, ASTM D-5127-98, West Conshohoken, Estados Unidos, 1998.

DETECTORES AMPEROMÉTRICOS

Los detectores electroquímicos amperométricos miden la intensidad de corriente generada durante la reducción u oxidación de los analitos al aplicar un potencial eléctrico en la celda del detector. A pesar de que en principio podría bastar teóricamente una configuración mínima de dos electrodos (uno de medida y otro de referencia), los detectores amperométricos montan en sus celdas desde siempre tres electrodos, configuración denominada “*configuración moderna de tres electrodos*”, ya presente en el primer detector electroquímico comercial de HPLC, aparecido en 1974: el primero (*electrodo de trabajo*) provoca la electrolisis del analito, el segundo (*electrodo auxiliar*) recibe el haz de electrones generados en el proceso y el tercero (*electrodo de referencia*) es una semipila electrolítica que conforma una pila electrolítica completa con el electrodo auxiliar (figura 76).

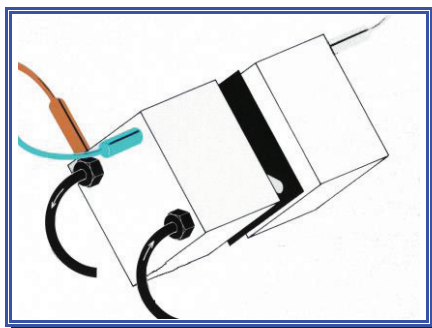
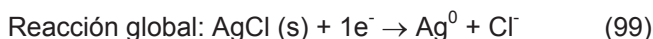


Figura 76. Celda de un detector amperométrico con sus tres electrodos.

Los electrodos de referencia de los detectores amperométricos suelen ser del tipo metal - sal insoluble del metal, imperando los de *plata - cloruro de plata*, que contienen plata metálica, cloruro de plata en exceso (insoluble) y una solución de cloruro potásico, donde ocurren los siguiente procesos electródicos y global:



La reacción solo depende como única variable de la actividad (concentración) de iones cloro $[\text{Cl}^-]$. Una solución de agua saturada en cloruro potásico asegura una concentración de cloruros constante, provocando un potencial constante del electrodo, definido por la ecuación de Nerst.

Ocasionalmente se emplean otros electrodos de referencia, como el *electrodo de calomelanos*, que dispone mercurio metálico (Hg^0) en calomelanos (sal

insoluble de cloruro de mercurio, Cl_2Hg_2), estando el conjunto en contacto con una solución que contiene cloruros (cloruro potásico), cuya concentración define los tres tipos de electrodos de calomelanos existentes (tabla 30), en los cuales suceden las siguientes reacciones electródicas y global:

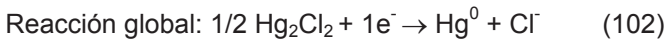
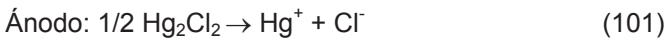


Tabla 30. Electrodos de referencia “sal insoluble de un metal”.

electrodo de referencia	solución de llenado		potencial
plata – cloruro de plata	KCl	0,1 M	0,288 V
	KCl	1,0 M	0,222 V
	KCl	saturado	0,198 V
plata – bromuro de plata	KBr	1,0 M	0,071 V
plata – yoduro de plata	KI	1,0 M	- 0,152 V
calomelanos	KCl	0,1 M	0,336 V
	KCl	1,0 M	0,283 V
	KCl	3,5 M	0,250 V
	KCl	saturado	0,245 V
mercurio – óxido de mercurio	NaOH	0,1 M	0,165 V
	NaOH	1,0 M	0,140 V
mercurio – sulfato de mercurio	KCl	saturado	0,655 V
	K_2SO_4	saturado	0,658 V

También existen *electrodos de referencia de hidrógeno*, donde los protones (H^+) procedentes del eluyente, el hidrógeno generado al reducirse éste (H_2 , gas) y los electrones formados por los procesos electródicos rodean la superficie de un soporte inerte conductor (un hilo de platino o virutas de paladio). El electrodo normal de hidrógeno es el electrodo de referencia universal y, aunque se usa más en potenciometría, también se emplea en la detección electroquímica. En él, dos electrodos (uno de hidrógeno y otro indicador o *de trabajo*) forman una pila electrolítica

ca, midiéndose la diferencia de potencial entre ambos, potencial surgido de la reacción reversible $1/2 \text{H}_2 (\text{gas}) \rightarrow \text{H}^+ + 1\text{e}^-$. Por convenio, en condiciones normalizadas de solvente (agua), temperatura (25° C), actividad de protones (a_{H^+} 1N) y presión de hidrógeno gas (P_{H_2} 1 atmósfera), el potencial del electrodo estándar de hidrógeno es de cero voltios. También por convenio, en Europa todos los potenciales son de reducción, respondiendo a la reacción $\text{M}^{n+} + \text{ne}^- \rightarrow \text{M}^0 + \text{V}$. Sin embargo, el convenio americano es justo al revés y, puesto que la mayoría de fabricantes de equipos y detectores son estadounidenses o se hallan bajo su área de influencia, cuando en el detector electroquímico se establece un potencial de signo positivo, será un potencial de oxidación, provocando en los analitos la correspondiente reacción de oxidación (si sobrepasa su potencial de oxidación). Análogamente, cuando en el detector electroquímico se establece un potencial de signo negativo, se tratará de un potencial de reducción, que provocará la correspondiente reacción de reducción en los analitos, también si sobrepasa su potencial de reducción (tabla 31).

Tabla 31. Signo del potencial en el detector electroquímico.

signo del potencial	reacción al sobrepasarlo
+	oxidación
-	reducción

El detector electroquímico exige la activación de sus electrodos para que pueda producirse transferencia de electrones en los procesos de reducción y de oxidación. Con el uso, pierden efectividad los procesos de transferencia de electrones en la superficie de los electrodos, disminuyendo la señal del detector. La reactivación de los electrodos puede realizarse mediante cuatro procedimientos: *mecánicos*, frotando y puliéndolos con alúmina, tarea habitual y rutinaria de mantenimiento; *térmicos*, aumentando considerablemente la temperatura; *químicos*, adicionando reactivos que sustraigan los contaminantes electrodepuestos, y *electroquímicos*, mediante la aplicación de un potencial dado. Las leyes de Faraday cuantifican la cantidad (w) de analito que electrodepone sobre el electrodo al aplicar en él una corriente eléctrica (i) durante un tiempo (t), teniendo en cuenta su magnitud molecular (M) y el número de electrones (n) de la reacción electroquímica, junto con una constante (F , *número de Faraday*):

$$w = \frac{itM}{nF} \quad (103)$$

El potencial eléctrico se debilita al alejarse del electrodo por la difusión que van sufriendo los solutos: la *primera ley de Fick* cuantifica el trabajo (J) realizado por el electrodo ante un gradiente de concentración espacial desde su superficie (dc/dx), regido por el coeficiente de difusión (D) del analito:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (104)$$

Considerando la intensidad de la reacción electrolítica en el electrodo a partir de la ecuación de Faraday:

$$i = nFAJ = nFAD \frac{dc}{dx} \quad (105)$$

La concentración, decreciente desde la superficie del electrodo, condiciona una distancia efectiva (δ) donde ocurre la reacción electroquímica (*Plano de Helmholtz*):

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c - c_0}{\delta} = \frac{c}{\delta} \quad (106)$$

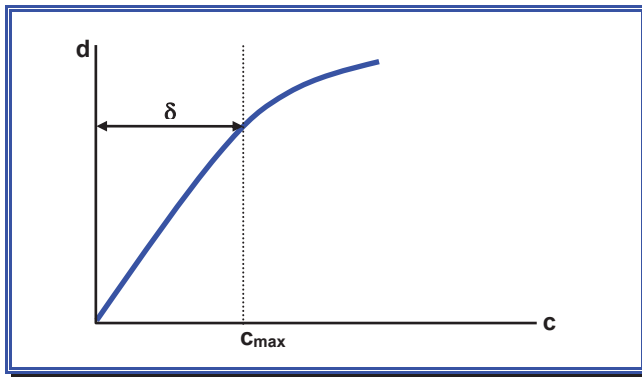


Figura 77. Evolución lineal de la concentración (c) de los analitos en el proceso electroquímico con respecto a la distancia desde el electrodo (d), hasta hacerse finalmente asintótica (c_{max}).

La concentración de analito que sufre el proceso electroquímico alcanza un valor máximo (c_{max}). Por tanto, existe un límite de concentración donde la ecuación de Faraday muestra un valor de corriente límite (i_{lim}), que permanecerá asintótico (figura 77): por muchas moléculas de analito que haya en el interior de la celda del detector electroquímico, si estas distan del electrodo más allá del límite del plano de Helmholtz, la señal del detector continuará imperturbable.

$$i_{lim} = nFA \frac{c}{\delta} \quad (107)$$

La difusión (δ) es la variable que fija el tiempo en que se alcanzan las concentraciones máximas sobre la superficie del electrodo (figura 78) y que claramen-

te condiciona lograr procesos más rápidos, tanto por la eficiencia de los procesos electródicos como por el diseño de los electrodos.

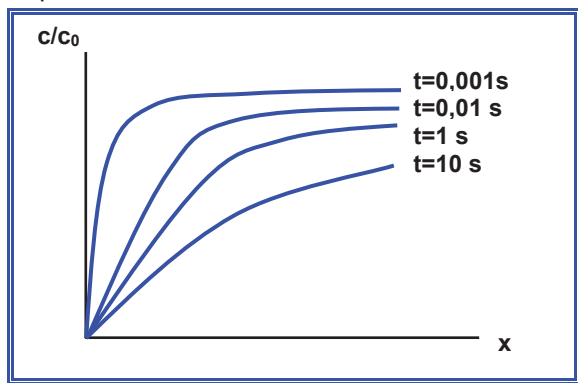


Figura 78. Variación cinética de la concentración (c/c_0) del analito respecto a la distancia de éste con el electrodo (x).

La ecuación de Cottrell estima la variación de corriente eléctrica durante el tiempo en que transcurre la reacción redox, medida dependiente de la velocidad con que difunde el analito en el electrodo (figura 79):

$$i(t) = i_d(t) = nFA\sqrt{D} \frac{c}{\sqrt{\pi t}} \quad (108)$$

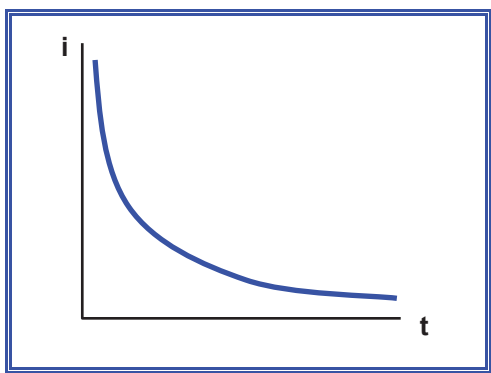


Figura 79. Evolución de la corriente eléctrica (i) con el tiempo (t).

El potencial aplicado en el detector electroquímico condiciona su selectividad y, por tanto, su sensibilidad. Puede establecerse a partir de las *curvas voltamétricas*, que representan el potencial aplicado (en el eje de abscisas) frente a la intensidad generada y medida (en el eje de ordenadas) (figura 80). En estas curvas el “potencial cero” no es un potencial nulo, sino un potencial como otro cual-

quiera, que puede provocar fenómenos de oxidación o de reducción según sean las curvas voltamétricas de los analitos.

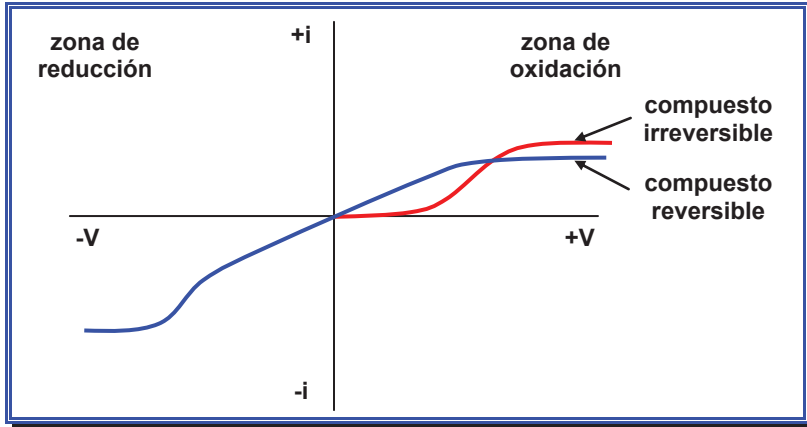


Figura 80. Las curvas voltamétricas muestran la variación de la intensidad (i) frente al voltaje aplicado (V).

Muchas de las reacciones electródicas que suceden durante la detección electroquímica son reversibles. Un analito muestra comportamiento reversible cuando existe equilibrio entre su estado oxidado y reducido (por ejemplo, el par quinona - hidroquinona o el par ferrocianuro - ferricianuro); también existe comportamiento reversible cuando un pequeño cambio de potencial (teóricamente infinitesimal) cambia el sentido de la reacción redox. Así, los compuestos reversibles muestran curvas voltamétricas con dos zonas, una debida al proceso de reducción y otra debida al de oxidación, cuya superposición conforma la curva voltamétrica total del analito (figura 80). En ambos extremos las curvas voltamétricas terminan de forma asintótica, es decir, aunque aumente mucho el potencial, la intensidad producida (y, por tanto, la señal del detector) aumenta muy poco o nada. Como norma, *seleccionaremos el potencial a partir del cual la respuesta de intensidad se hace asintótica, al comienzo de la meseta o plateau*, y detectar a un potencial mayor no aportará mayor respuesta, pero sí mayor ruido de fondo.

Por todo ello, los distintos modelos de detectores amperométricos centran sus especificaciones en ofrecer diseños de celda y electrodos que reducen las habituales y tediosas operaciones de pulido de sus electrodos, en los borrosos términos de “alta sensibilidad” o “alta estabilidad”. Por nuestra parte, juzgamos deseable que la celda del detector amperométrico sea independiente y externa, para poderla termostatar en un horno. Evidentemente, casi todos los detectores pueden programar en el tiempo los potenciales de trabajo y su polaridad (en valores positivos o negativos), para que los cromatogramas muestren picos ascendentes, así como escalas y autoceros. Muchas veces permiten establecer la temperatura de trabajo de la celda, cuyo volumen suele ser muy pequeño, seleccionado mediante

un sencillo espaciador de Mylar (poliéster de tereftalato de polietileno), predominando para los electrodos de trabajo y de referencia configuraciones de pasta vitrificada de carbono, mientras que el electrodo auxiliar suele ser de acero inoxidable.

Detectores con celda “wall jet”

Esta estructura responde literalmente a la mencionada *configuración moderna de tres electrodos* que, a pesar de su nombre, se viene utilizando desde hace más de 40 años: la celda suele ser cúbica, en tres de cuyas caras se introducen los tres electrodos (referencia, auxiliar y de trabajo), disponiéndose la entrada y salida del eluyente en las otras dos caras, evitando que estén en línea (en ángulo de 180 grados) con alguno de los tres electrodos. En el interior del cubículo se tallan microcanales, en cuya parte central comunica el eluyente con los tres electrodos, enfrentando el electrodo auxiliar al de referencia, que recibe el choque de la corriente: de esta forma, el electrodo de trabajo, perpendicular al auxiliar y de referencia, se halla en una posición privilegiada que le permite medir pequeñas variaciones de corriente con alta sensibilidad. El flujo procedente de la columna choca con la única pared cerrada del cubo, que encuentra de frente. Esta configuración consiente, de forma sencilla y económica, un flujo turbulento, que mejora la inherente limitación de los detectores amperométricos de flujo laminar, la de oxidar o reducir un pequeño porcentaje del analito, el que discurre cercano al electrodo, un exiguo 5% del total.

Los tres electrodos en T de una celda *wall jet* son pequeños cilindros, comunicados mediante cables con un potencióstato externo, de donde reciben el potencial que se aplica sobre ellos, de los cuales solo el electrodo de trabajo ocasionará la señal, cuya intensidad procesa el potencióstato, justificando el epíteto “amperométrico”. También los detectores *wall-jet* montan electrodos de diversas clases y materiales: el electrodo de referencia suele ser de plata - cloruro de plata, en tanto que los electrodos de trabajo y auxiliar son exactamente iguales, de carbón vitificado. La superficie de los tres electrodos es susceptible de envenenamientos y electrodeposiciones, como sucede en las celdas amperométricas superficiales clásicas, requiriendo cada cierto tiempo extraerlos y pulirlos con polvo de alúmina sobre una superficie esmeril.

DETECTORES AMPEROMÉTRICOS PULSANTES

Aún así, algunos analitos, en cuanto reciben un potencial dado, se dirigen irreversiblemente hacia el electrodo de carga contraria, electrodeponiendo sobre él: por ejemplo, los azúcares, que son reductores y pueden medirse en oxidación, inmediatamente se fijan sobre el electrodo que los oxida. Empero, dichos analitos

se pueden analizar venciendo la limitación causada por eventuales electrodeposiciones con celdas pulsantes, donde se aplican tres potenciales sucesiva y cíclica-mente: en primer lugar, un *potencial de medida* los oxida o reduce durante un tiempo relativamente largo (medio segundo), cuya primera parte sirve para acondi-cionar el electrodo, tomándose la medida analítica (intensidad) en su último tramo; en segundo lugar, se aplica brevemente un *potencial de despolarización o de lim-pieza*, de signo igual al de medida, pero más intenso; finalmente, se aplica de for-ma también muy rápida un *potencial de acondicionamiento*, asimismo denominado *de despolarización o de regeneración* del electrodo, de signo contrario al anterior y de valor igual o superior a éste (figura 81 y tabla 32, donde E_{dst} representa el po-tencial de comienzo, previo a la oxidación; E_{dmx} el potencial máximo, para una oxi-dación óptima; E_{dnd} el potencial final, más negativo, que oxida la solución; E_{ox} el potencial de oxidación, que forma un “óxido de limpieza”, y E_{red} el potencial de re-ducción, que inicia la disolución del óxido inerte).

Los detectores electroquímicos amperométricos pulsantes admiten cuatro formas de trabajo básicas (figura 82): simple (PAD, *Pulse Amperometric Detec-tion*), reversa (RPAD, *Reverse Pulse Amperometric Detection*), con activación (APAD, *Activation Pulse Amperometric Detection*) e integral (IPAD, *Integrated Pul-se Amperometric Detection*). La optimización de los potenciales pulsantes suele exigir programarlos *ad hoc*, en ondas cuadradas, crecientes, decrecientes o com-binadas. Anulando la actuación de los potenciales de despolarización o regenera-ción, el detector amperométrico pulsante se convierte en un detector amperométri-co “normal”. Debemos recordar que los potenciales con valor cero no dejan de ser potenciales electroquímicos y el efecto pulsante se puede anular disponiendo el mismo potencial en las tres zonas o establecer tiempos cero para las dos últimas.

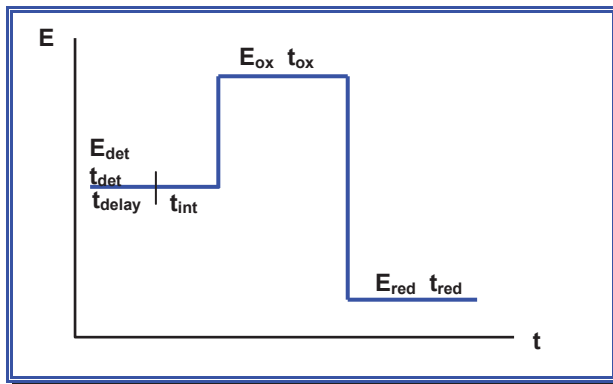


Figura 81. Variación del potencial (E) del electrodo frente al tiempo (t) en un detector electro-químico amperométrico pulsante.

Tabla 32. Ejemplo de valores de potencial en amperometría pulsante con electrodo de referencia Ag / AgCl.

Potenciales (mV)	Tiempos (ms)
E_{det} : -200 a +400	$t_{\text{det}} > 40$ $t_{\text{delay}} > 20$ $t_{\text{int}} > 20$
E_{ox} : +300 a +800	$t_{\text{ox}} > 60$
E_{red} : -800 a +100	$t_{\text{red}} > 60$

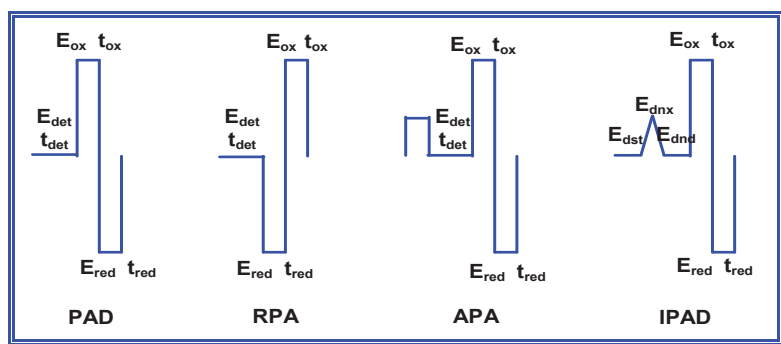


Figura 82. Formas de trabajo en detección amperométrica pulsante.

DETECTORES COULOMBIMÉTRICOS

Como queda dicho, la detección amperométrica (estática o pulsante) exige flujo laminar de la fase móvil para mantener constante en el tiempo el flujo de difusión, proporcional al gradiente de concentración (dC/dx) mediante el coeficiente de difusión (D), expresado en metros cuadrados por segundo como vimos en la *primera ley de Fick* (104), cuyo signo negativo indica que la dirección de difusión es opuesta al gradiente de concentración del analito en las proximidades del electrodo del detector. Ahora bien, las pequeñas grietas existentes en la superficie de los electrodos amperométricos impiden un flujo perfectamente laminar en la celda, por lo que la oscilación del flujo de difusión y del gradiente de difusión del analito ocasionan la acumulación o el agotamiento de las moléculas que difunden. Las condiciones de flujo turbulento (no laminar) se rigen por la *segunda ley de Fick*, ecuación de derivadas parciales $dc/dt = (dc/dx) \cdot D(dc/dx)$ simplificada en $dc/dt = D(d^2c/dx^2)$ cuando el coeficiente de difusión del analito es independiente de su es-

estructura y se cumplen tres premisas: antes de la difusión, todos los átomos de analito están uniformemente distribuidos; el valor de x , distancia del analito respecto al electrodo en la superficie del electrodo, toma valores cercanos a cero y, por último, el tiempo se empieza a contar desde el instante en que comienza la difusión. Como hemos visto antes, la *primera ley de Fick* cuantifica la intensidad de la reacción redox en la superficie del electrodo como dependiente de δ (lecho donde existe difusión), permitiendo estimar el valor óptimo de la distancia al electrodo (figuras 83 y 84) y los valores de concentración respecto de esta distancia, ya vistos en la figura 77.

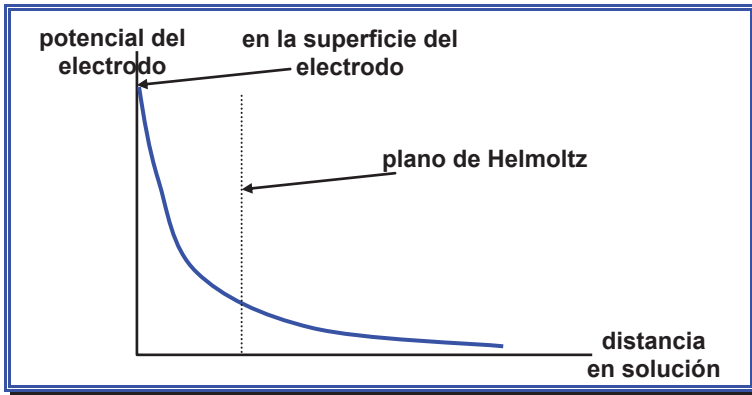


Figura 83. Despolarización del electrodo de un detector electroquímico.

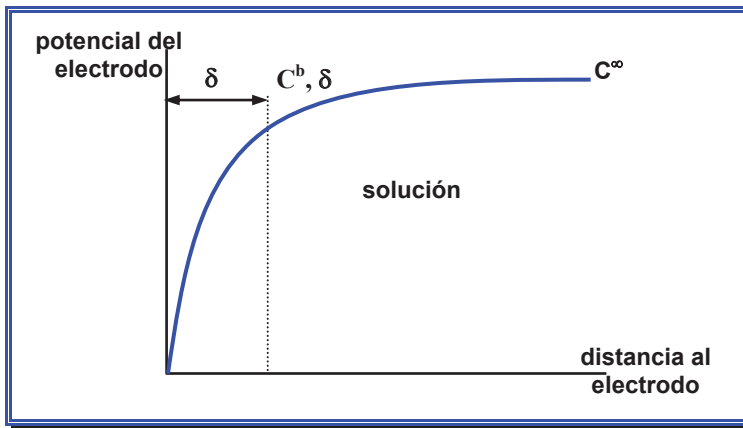


Figura 84. Valor óptimo de potencial respecto a la distancia al electrodo.

La respuesta de un detector electroquímico planar también puede aplicarse a otro tipo de electrodos, ya sean esféricos, tubulares cilíndricos o rectangulares, cuantificados como sabemos por la *ecuación de Cottrell* (108).

La *ley de Faraday* es la ecuación fundamental que rige la coulombimetría: la cantidad de carga total transferida (Q , en coulombios) es igual al número de electrones (n) implicados en la reacción redox total y el número de equivalentes (e) de la sustancia que sufre el proceso, mediante la constante (F) de Faraday (96.500 coulombios/equivalente):

$$Q = nFe \quad (109)$$

Si la corriente (i) que muestra el detector es función del tiempo, la carga transferida total (Q) se puede corresponder con el área del pico cromatográfico (A):

$$Q = i \quad di = f(A) \quad (110)$$

La eficiencia de un detector electroquímico, en forma de intensidad eléctrica, depende de los parámetros anteriores y también de la velocidad de la fase móvil (u), es decir, del flujo (F) con que ésta atraviesa su celda:

$$i = nFCu \quad (111)$$

A la hora de cuantificar y, puesto que el electrodo de trabajo mantiene un potencial constante durante la medida, es esencial optimizar los parámetros que condicionan sensibilidad y estabilidad. Los procesos redox que sufre el analito en los electrodos se rigen por una cinética de primer orden, donde la concentración de analito transformado (c_t) a partir de la inicial (c_0), en un determinado tiempo (t), depende de la *constante de la celda electroquímica* (k), cuantificándose el grado de electrolisis del analito en función de su tiempo de residencia en el detector como:

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-kt} \quad (112)$$

En los detectores electroquímicos amperométricos la constante de la celda (k) es proporcional al área del electrodo (A), el volumen de la celda (V), el coeficiente de difusión (D) y la anchura de pico, susceptible de causar la difusión en el medio (δ):

$$k = \frac{A D}{V \delta} \quad (113)$$

En una separación dada se mantienen constantes el coeficiente de difusión y el volumen de celda del detector, por lo que agrupando los términos constantes:

$$k = cte \frac{A}{\delta} \quad (114)$$

Tabla 33. Parámetros característicos de las celdas amperométricas y coulombimétricas.

	δ (μm)	A (cm^2)	$k=A/\delta$
coulombimétricas	0,3	5	>170
amperométricas	30	0,1	< 3×10^{-3}

Para que en un detector electroquímico se cumpla la ley de Coulomb deben sufrir el proceso redox *todas* las cargas y, por tanto, *todas* las moléculas del analito. Esto solo puede conseguirse con *electrodos de tipo filtro*, que atraviesa la fase móvil en régimen turbulento. Dichos electrodos dan sentido a los detectores electroquímicos coulombimétricos, cuya primera y gran diferencia con los amperométricos reside en sus respectivos valores de difusión (δ), muy reducidos en regímenes (flujos) turbulentos pero muy elevados en flujo laminar (tabla 33), hecho que condiciona la estabilidad de las medidas de los detectores amperométricos, basados en la existencia de flujo laminar de la fase móvil que discurre entre sus electrodos, que son de tipo “placa” o “de superficie”, mientras los detectores coulombimétricos trabajan con flujo turbulento en electrodos porosos, con morfología de filtro que atraviesa la fase móvil (figura 85), hecho a partir del cual surgen sus restantes diferencias respecto a los amperométricos.

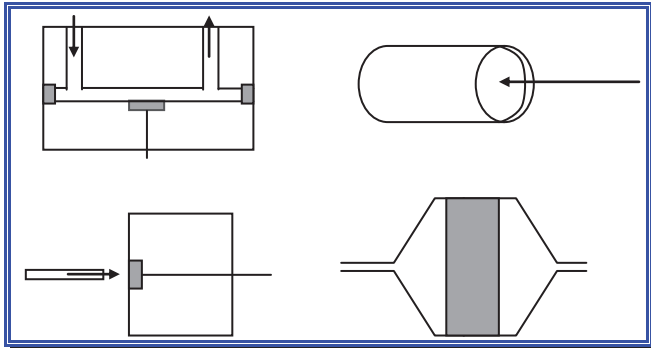


Figura 85. Desde arriba hacia abajo y de izquierda a derecha, electrodos electroquímicos planar *thin-layer*, tubular cilíndrico, *wall-jet* y poroso.

Así pues, la celda de medida de un detector coulombimétrico es un filtro conductor que atraviesa la fase móvil en régimen turbulento y sobre el cual se aplica un potencial, causante de que, en principio, prácticamente el 100% de los analitos pueda sufrir la reacción de oxidación o reducción. Ahora bien, en el supuesto de que, por ejemplo, se establezca un potencial de oxidación, si la fase móvil oxida *per se* los analitos, éstos ya no podrán oxidarse más; del mismo modo, será imposible detectarlos por reducción si la fase móvil fuese reductora. Este hecho impide elegir entre una técnica de oxidación o de reducción en los detectores

amperométricos planares, cuando una de los dos modos podría resultar más conveniente cuantitativa o cualitativamente. Además, si la fase móvil oxida, por ejemplo, el 80% del soluto, la sensibilidad máxima detectable solo será del 20% restante. Puesto que en un electrodo coulombimétrico de tipo filtro sufre la reacción redox el 100% de las moléculas del analito, se puede colocar antes de la celda de medida *otra celda de acondicionamiento* similar, imponiendo en ella un potencial igual o superior al de la celda de medida *pero de signo contrario*, que asegura la llegada de los solutos en condiciones redox óptimas (contrarias al potencial del detector) para poderlos detectar, algo inviable en los electrodos planares de los detectores amperométricos, de flujo laminar, donde solo se oxidan o reducen los analitos próximos o muy próximos al electrodo, un 3% a un 10% del total, por lo que en ellos resulta baldía una oxidación previa para luego intentar la detección por reducción, ya que es imposible que coincidan exactamente las moléculas previamente oxidadas en la siguiente celda. De esta forma, si el analito es un electrolito reversible, en un detector coulombimétrico se puede elegir trabajar en reducción o en oxidación si uno de ambos modos es más sensible o la fase móvil presenta menos interferencias o fondo.

Y más aún: las celdas coulombimétricas de medida poseen dos subceldas, que son en realidad dos detectores coulombimétricos independientes. La primera subcelda es grande, de alta capacidad, mientras que la segunda suele ser de menores dimensiones, permitiendo medidas altamente estables, traducidas en una extraordinaria sensibilidad. Así, se puede establecer en la primera zona un potencial del mismo signo que el de medida, pero algo menor, para eliminar total o parcialmente posibles interferentes. El “juego” de los tres potenciales, de la celda de acondicionamiento y la primera y segunda zona de la celda de medida, permite técnicas de *detección electroquímica con discriminación* (figura 86).

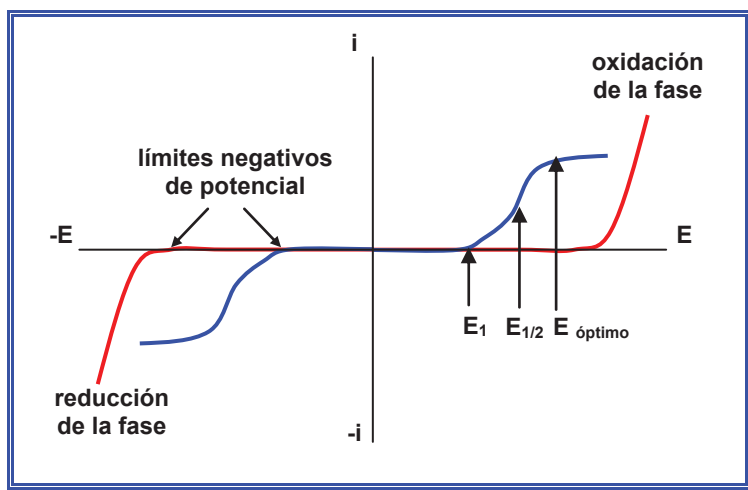


Figura 86. Selectividad de las curvas voltamétricas de los analitos.

Si bien los detectores amperométricos montan un electrodo de referencia del tipo metal - sal insoluble de ese metal (generalmente de plata - cloruro de plata, cuyo potencial es 0,2458 V), los detectores coulombimétricos suelen montar un electrodo de referencia hidrógeno - iones hidrógeno, creado alrededor de virutas de paladio, que adsorben hidrógeno y oxígeno, distribuidas en el cuerpo del electrodo, no olvidemos que con geometría de filtro. El potencial del electrodo de referencia hidrógeno - iones hidrógeno, determinado por la ecuación de Nerst, resulta cercano a cero y, consecuentemente, cuando detecta en oxidación el potencial de trabajo de un detector coulombimétrico resulta unos 0,25 V superior al de un detector amperométrico y, por el contrario, cuando detecta en reducción es unos 0,25 V menor, con la correspondiente mejora de ruido y fondo en el cromatograma.

Por todo lo expuesto, las principales ventajas de los detectores coulombimétricos respecto los amperométricos residen fundamentalmente en la estabilidad de su respuesta, por hallarse sus electrodos exentos de electrodeposiciones y envenenamientos, típico inconveniente de los electrodos de los detectores amperométricos, que obliga a pulirlos periódicamente con alúmina en polvo, práctica que puede crear microgrietas en la superficie de los electrodos, perdiendo laminaridad el flujo que le atraviesa y, por tanto, estabilidad en el detector, perdiendo sensibilidad un electrodo pulido respecto al inicial, exigiendo tras cada pulido su recalibración o, como mínimo, aplicar un factor de corrección sobre las calibraciones anteriores. Sin embargo, las celdas coulombimétricas “mueren” por desorción de la fijación catalítica de la viruta de paladio, como sabemos, soporte del electrodo interno de referencia (H_0/H^+) sobre el grafito del electrodo: cuando comienza a decaer la sensibilidad, es mejor reemplazar la celda por otra nueva.

Naturalmente, las áreas y alturas de pico de los cromatogramas generados por los detectores coulombimétrico son muy reproducibles y predecibles gracias a la gran estabilidad de su señal, permitiendo amplificarla mucho, pues sus niveles de ruido son ínfimos. Como ejemplo revelador, los detectores coulombimétricos puede detectar catecolaminas en plasma (pg), mientras que los amperométricos solo detectan catecolaminas en orina, donde se hallan mucho menos diluídas.

Otra ventaja de los detectores coulombimétricos reside en sus cortos tiempos de equilibrado, acondicionamiento y calentamiento, cortos a la vez que concretos, pues tras conectalos se tienen operativos en 30 minutos.

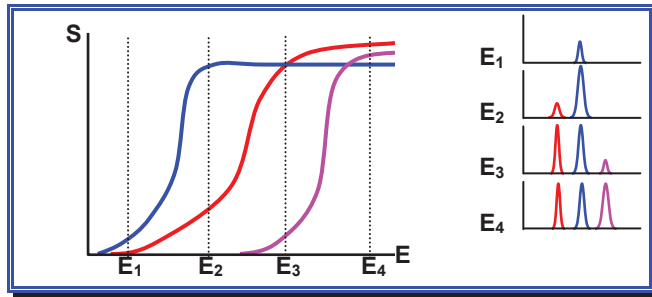


Figura 87. Selectividad cromatográfica según el potencial (E) aplicado.

Los detectores coulombimétricos permiten obtener las curvas voltamétricas de los analitos al variar sucesivamente los potenciales y representar gráficamente su área o altura (medida en intensidad) frente al potencial (figura 87). Algunos pueden realizar curvas voltamétricas automáticamente, variando el potencial continua y cíclicamente, mientras se bombea la muestra sin columna o se fija en su celda, con un restrictor de presión tras ella (figura 88).

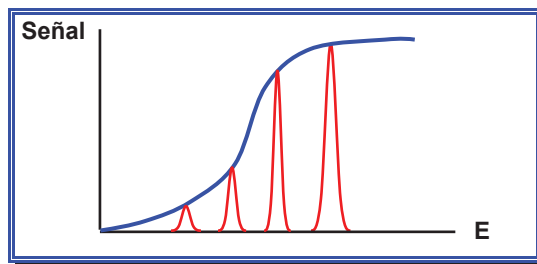


Figura 88. Curvas voltamétricas a partir de los picos cromatográficos.

Empero, los detectores coulombimétricos presentan algunas desventajas, principalmente su precio, derivado de su patente de exclusividad, pues solo existe un único fabricante. Cuando comenzaron a comercializarse, su precio doblaba el de *cualquier* detector electroquímico existente y, por ser novedosos, aún no aparecían en los artículos científicos. Sin embargo, con el tiempo sus ventajas permitieron su aceptación.

Otra desventaja reside en que cualquier partícula, por pequeña que sea, obtura los electrodos coulombimétricos de tipo filtro, incluso las procedentes de los sellos de las bombas, exigiendo instalar filtros *on line* en la línea fluidica antes de las celdas (con su consiguiente mantenimiento). Estos filtros en línea aumentan algo la presión de trabajo, que podría sobrepasar el límite de presión máxima que resisten algunas bombas inertes, presión que, en todo caso, acorta la vida de la columna y de la misma bomba.

Finalmente, comprender la filosofía y manejo de un detector coulombimétrico resulta algo más complicado que la de un detector amperométrico simple.

Detectores coulombimétricos múltiples en serie “coulo-array”

Desde 1993 existen detectores coulombimétricos múltiples, conocidos como “*coulo-array*”, nacidos a partir de las tradicionales determinaciones de hormonas y neurotransmisores con detectores coulombimétricos y la necesidad de poder disponer varios sensores coulombimétricos en serie. Las muestras fisiológicas son muy complejas: por ejemplo, un líquido cefalorraquídeo exhibe cromatogramas con casi un centenar de picos, muchos cromatográficamente irresolubles, al tiempo que sobre todos ellos, resueltos o no, pende la duda de la coelución, siendo imposible disponer de patrones para identificarlos. Por eso el objetivo, previo a “identificar picos”, es obtener buenos perfiles de los cromatogramas en muestras específicas. El detector *coulo-array*, también fabricado bajo patente exclusiva, muestra cromatogramas múltiples, cada uno procedente de una celda coulombimétrica, hasta un máximo de 16, modesto número comparado con los cientos de diodos que poseen los detectores *diode array*. Sin embargo, en electroquímica el papel de cada sensor difiere de la espectrofotometría, pues cada sensor *sí* afecta la respuesta (y comportamiento) de los analitos en el siguiente: por ejemplo, si en el primer sensor se establece un potencial de reducción alto, es improbable que haya más reducción en los siguientes sensores; sin embargo, en un detector *diode array* la absorción de radiación de una longitud de onda es bastante indiferente a que otros analitos de la muestra absorban radiaciones de otras longitudes de onda.

Tabla 34. Simetría de los potenciales de celda de un detector *coulo-array*.

Crecientes a intervalos regulares
Decrecientes a intervalos regulares
Con un máximo (central o excéntrico)
Con un mínimo (central o excéntrico)
Crecientes a intervalos irregulares
Decrecientes a intervalos irregulares

El potencial de los sensores de los detectores *coulo-array* se establece en virtud de una cierta simetría (tabla 34), relacionando su *software* las áreas (o alturas) de los picos que aparecen con el mismo tiempo de retención en los diferentes canales, ingente información, en cierto grado similar a la generada por los detectores *diode array*. Los detectores *coulo-array* permiten trabajar con gradientes de elución, necesarios en la mayoría de las ocasiones, dada complejidad de las muestras, que también suelen obligar a que el sistema posea horno, capaz de al-

bergar los sensores coulombimétricos, columna e inyector. Así, los detectores *coulo-array* proporcionan datos relevantes de muestras toxicológicas, investigación sanitaria, medicina forense y metabolismos oxidativos; análisis de fármacos procedentes de productos naturales y estabilidades fisiológicas⁷¹; en neurología determinan simultáneamente monoaminas y aminoácidos en cromatogramas con perfiles característicos de ciertas afecciones (hipertensión, diabetes, feocromocitoma); en alimentación (determinación de flavonoides y compuestos fenólicos) o medioambiente (análisis de pesticidas y herbicidas). Evidentemente, también se puede recurrir a derivatizar compuestos con escaso comportamiento electroquímico *per se*.

7.9. Detectores conductimétricos

Martin y Randall fueron pioneros en la utilización de un detector conductimétrico en cromatografía líquida en 1951, antes de la aparición de HPLC. Sabido es que los conductores pueden ser metálicos (átomos con electrones libres) o electrolíticos (iones en solución). Al disponer dos electrodos de carga contraria y establecer entre ellos una diferencia de potencial, el transporte de los iones genera una corriente eléctrica, cuya intensidad toma el sentido contrario al movimiento de los electrones, dirigiéndose los aniones al ánodo y los cationes al cátodo, estableciéndose una conductancia (L , en Ω^{-1}), parámetro inverso a la resistencia eléctrica (R , en Ω), como también la conductividad específica (K) es inversa de la resistencia específica (ρ , en $\Omega^1 \text{ cm}^{-1}$):

$$L = \frac{1}{R} \quad ; \quad K = \frac{1}{\rho} \quad (115)$$

La resistencia (R , en ohmios Ω) contempla tres variables: la *resistencia específica* del medio conductor (ρ), su *longitud* (l , en cm) y su *superficie* (S , en cm^2), agrupados en el término C_v , denominado *constante de la celda conductimétrica*, por estimar inalterable la distancia entre los electrodos (l) y su área (S):

$$R = \rho \frac{l}{S} \quad ; \quad R = \rho \cdot C_v \quad (116)$$

De aquí surge la expresión básica de la conductividad (L):

$$L = \frac{K}{C_v} \quad (117)$$

⁷¹ Huynh-Ba, K.: *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development*. Editorial Springer, Berlín, 2009.

La detección conductimétrica en HPLC exige fases móviles conductoras, habitualmente soluciones electrolíticas, que generan en la celda una intensidad de la corriente eléctrica, tanto para los aniones como para los cationes, proporcional a la superficie de los electrodos, velocidad de los iones, su carga y su concentración. Internamente un detector conductimétrico es un mero *punte de Wheatstone* (figura 89), donde R_4 es la resistencia de la cubeta conductimétrica. Al estar en serie en la misma rama, $V_A=V_B$ y $V_{LA}=V_{LB}$, por lo que $I_1 R_4 = I_2 R_1$, $V_{DA}= V_{DB}$ y $I_1 R_3 = I_2 R_2$, y así:

$$R_4 = R_3 \frac{R_1}{R_2} \quad (118)$$

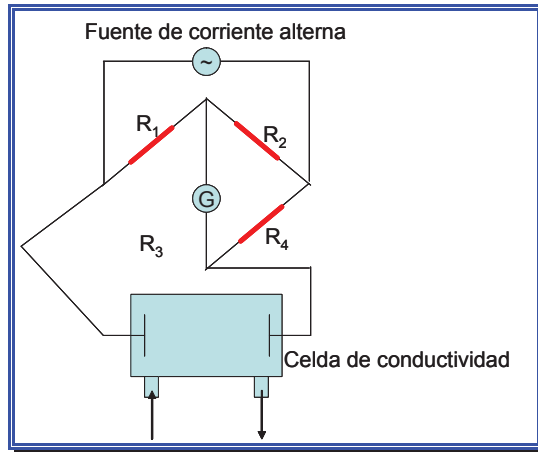


Figura 89. Esquema un detector conductimétrico, basado en un puente de Wheatstone.

Los detectores conductimétricos de HPLC trabajan en régimen de corriente alterna de alta frecuencia (20.000 Hz), olvidando los clásicos 50 Hz, que polarizarían los electrodos de sus celdas. En este sentido, la ley de Ohm establece que la intensidad de su respuesta depende del voltaje:

$$V = RI \quad (119)$$

La sensibilidad de la detección conductimétrica la concreta la naturaleza y concentración de los iones, cuya conductancia específica (K), como ya se ha dicho, es inversa de la resistencia específica ($K=1/\rho$), como la conductividad (L) lo es respecto de la resistencia eléctrica ($L=1/R$), por lo que la resistencia eléctrica del analito disuelto en fase móvil en la celda del detector depende de su resistencia específica, la superficie de los electrodos (S) y la distancia entre ellos (l), reunidos en su *constante de la celda* (C_V):

$$R = \rho \frac{l}{S} = \rho \cdot C_V \quad ; \quad L = K \frac{S}{l} = \frac{K}{C_V} \quad (120)$$

Por tanto, podría decirse que la conductancia específica es la conductancia que presenta un electrolito en una celda conductimétrica cuyos electrodos, de 1 cm^2 de sección, están separados 1 cm . Por otra parte, la *conductancia equivalente* (Λ) es la conductancia de un equivalente-gramo. Expresando la concentración (c) en normalidad (N), pues V_e es el *volumen equivalente*, volumen que ocupa un equivalente gramo:

$$c = N = \frac{\text{eq g}}{l} = \frac{1}{V_e} \quad (121)$$

$$V_e = \frac{1}{c} (\text{litros}) = \frac{1000}{c} (\text{cm}^3) \quad (122)$$

Tomando la conductancia equivalente (Λ) unidades de $\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ N}^{-1}$, o sea, $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ eq}^{-1}$:

$$\Lambda = K \cdot V_e = K \frac{1000}{c} \quad (123)$$

Extrañamente, la conductancia equivalente depende de la concentración, aunque la conductividad de un equivalente-gramo de un electrolito siempre debería ser la misma. Representando gráficamente la concentración frente a la conductancia equivalente se obtiene una curva, cuya parte final es asintótica, pero, extrapolada a concentración cero (condición de "dilución infinita"), la conductancia equivalente (Λ) toma un valor denominado *conductancia equivalente a dilución infinita* (Λ_0). El perfil de las curvas varía según el electrolito de que se trate (figura 90), consintiendo tal extrapolación solo los electrolitos fuertes, que muestran prácticamente una recta sin influencia apreciable de la concentración. La relación entre conductancia equivalente (Λ) y conductancia equivalente a dilución infinita (Λ_0) ha de ser, por fuerza, el *grado de disociación del electrolito* (α):

$$\alpha = \frac{\Lambda}{\Lambda_0} \quad (124)$$

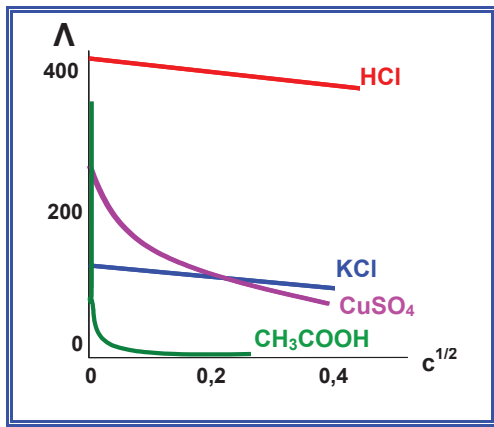


Figura 90. La conductancia equivalente a dilución infinita (Λ) se obtiene extrapolando la conductancia equivalente a una concentración cero.

En 1876 Kohlrausch comprobó que la diferencia de conductividad equivalente a dilución infinita de dos electrolitos que compartían un ion común era idéntica (tabla 35), enunciando en las que luego se llamarían *leyes de Kohlrausch*, que «a dilución infinita, todo ion contribuye de forma definida a la conductancia equivalente a dilución infinita (Λ_0) en solución, independientemente del otro ion» y, por otra parte, que «a dilución infinita, la conductancia equivalente a dilución cero (Λ_0) es la suma de las conductancias iónicas límites del catión (λ_0^+) y del anión (λ_0^-)»:

$$\Lambda_0 = \lambda_0^+ + \lambda_0^- \quad (125)$$

Tabla 35. Conductividad equivalente a dilución infinita de electrolitos con iones comunes.

sal	Λ_0	sal	Λ_0
KCl	130,0	NaCl	108,9
KNO ₃	126,3	NaNO ₃	105,2

Existen tablas con valores de *conductancias iónicas límites a dilución infinita* (λ_0) con temperaturas y solventes normalizados, respectivamente a 20 ó 25° C y agua (tablas 36 y 37). Como vemos, la conductividad equivalente de muchos aniones supera la de la fase móvil, por lo que sus picos aparecerán en los cromatogramas en sentido ascendente, a diferencia de lo que sucede con muchos cationes, cuya conductividad equivalente es inferior al eluyente, razón por la que los detectores conductimétricos suelen permitir cambiar la polaridad de su señal.

Tabla 36. Conductancias iónicas límites (λ) en agua a 25° C.

Catión	λ^+ ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)	Anión	λ^- ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
H ⁺	349,8	OH ⁻	198,3
Li ⁺	38,6	F ⁻	55,4
Na ⁺	50,1	Cl ⁻	76,4
K ⁺	73,5	NO ₃ ⁻	71,5
NH ₄ ⁺	73,5	SO ₄ ²⁻	80,0
Ag ⁺	61,9	CO ₃ ²⁻	69,3
Cu ²⁺	53,6	CO ₃ H ⁻	44,5
Pb ²⁺	69,5	CH ₃ COO ⁻	40,9

Tabla 37. Variación de la conductancia límite (λ) de soluciones acuosas entre 25 y 50° C.

Disolución	% cambio por cada 1° C
Agua ultrapura	4,55
KCl	2,01
NaCl	2,12
5% NaOH en agua	1,70
Amonio diluido	1,88
10% HCl	1,32
5% H ₂ SO ₄	0,96
98% H ₂ SO ₄	2,84

Las técnicas de HPLC con detección conductimétrica son siempre isocráticas, pues cualquier gradiente causaría una deriva inadmisibles en la línea de base del cromatograma. Además, los posibles problemas de la detección conductimétrica suelen localizarse en la celda del detector (figura 91), que podría obturar o ensuciar las muestras viscosas, exigiendo un generoso lavado posterior con fase móvil. En el caso en que la fase móvil fuese una solución tamponada, nunca se dejará el sistema sin bombear más de 12 horas, pues la sal del tampón podría cristalizar, aunque se puede recircular bombeándola a un flujo muy bajo.

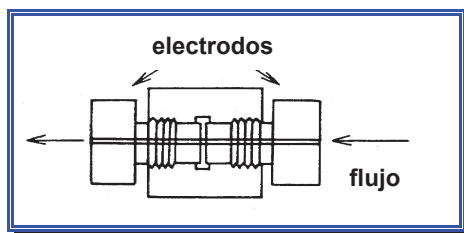


Figura 91. Esquema de la celda de un detector conductimétrico.

El volumen de la celda de los detectores conductimétricos de HPLC suele ser muy pequeño, inferior a $1 \mu\text{l}$, permitiéndoles realizar toda clase de técnicas cromatográficas. Dadas sus dimensiones, su *constante de celda* (C_V) suele ser de decenas de cm^{-1} , tolerando bastante bien altas presiones. La detección conductimétrica (a temperatura constante, pues la temperatura condiciona la precisión de las medidas conductimétricas) permite sensibilidades de $\mu\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a fondo de escala), con ruido menor de $10^{-9}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ y deriva inferior a $10^{-9}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}/\text{hora}$. Algunos detectores conductimétricos permiten controlar la temperatura de su celda, externa, ligeramente superior a la de la columna, ubicándola dentro de un horno. Por último, y extensible a todos los detectores basados en medidas eléctricas, es indispensable la estabilidad de la línea eléctrica externa y disponer de una toma de masa efectiva.

7.10. Detectores radiométricos

Las acepciones “*detector radiométrico*”, “*detector de radiactividad*” o “*detector radioquímico*” describen en realidad un contador de centelleo de flujo continuo, utilizándose esta detección en la determinación de analitos radiactivos o marcados, en áreas de investigación bioquímica, pesticidas y farmacocinéticas que requieren alta sensibilidad (10^{-9} a 10^{-10} g/ml en los isótopos más habituales, tabla 38) y mejor especificidad. Los detectores radiométricos convierten en fotones los pulsos de radiación de los emisores beta o gamma, detectando algunos modelos también emisiones alfa. Posteriormente un fotomultiplicador procesa dichos pulsos, convirtiéndolos en señal eléctrica convencional, que permite determinaciones cuantitativas y cualitativas de cualquier forma de radiactividad, principalmente beta.

Tabla 38. Tipo de emisiones radiactivas.**1. Emisiones beta de baja energía:**- ^3H - ^{14}C - ^{35}S **2. Emisiones beta de alta energía:**- ^{32}P

- Emisiones de positrones

3. Emisiones gamma:- ^{125}I - ^{131}I - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ **4. Emisiones alfa**

Existen dos tipos de celdas en los detectores radiométricos, que concretan dos modalidades de trabajo: celdas y detección homogénea, y celdas y detección heterogénea. En la *detección homogénea* se adiciona a la fase móvil *post-column*, en una T dispuesta entre la columna y la celda del detector, un líquido externo o *cocktail de centello* impulsado por una bomba adicional. En el *cocktail* de centello las emisiones radiactivas beta (electrones) de los analitos generan emisión de fotones que captan dos fotomultiplicadores opuestos entre sí, emplazados a cada lado de la celda del detector, en una disposición instrumental denominada “ 2π ” que veremos más adelante. A la entrada del detector, puesto que la adición de *cocktail* de centelleo es destructiva para la muestra, se suele montar un divisor o *splitter* para salvaguardar una parte mayoritaria de ella, llevándola inalterada a un detector espectrofotométrico en paralelo o a un colector de fracciones.

Por otra parte, la *detección heterogénea* se realiza sobre *celdas heterogéneas* (*celdas Cerenkov*): la celda de medida monta internamente un tubo o bucle (de medidas inusuales para HPLC, con capacidad incluso de ml), bucle enjaulado entre dos cristales de un *centelleador sólido* (por ejemplo, cristales de talio), capaz de producir fotones al recibir las radiaciones. Esta modalidad de detección es menos eficiente que la homogénea, pero evita la manipulación, la bomba adicional y la posterior eliminación de los *cocktail* de centelleo.

Medidas con radiaciones beta

El tritio, isótopo del hidrógeno, es paradigma representativo de la detección radiométrica de emisores beta. El tritio difiere del hidrógeno en el número de neu-

trones de su núcleo y es radiactivo porque emite simultáneamente dos partículas: un electrón (llamado “beta” por haberse originado en el núcleo) y un *neutrino*. La energía entre ambas partículas, 18,6 keV, es característica de la emisión radiactiva del tritio y promedio de la energía del electrón beta y el neutrino, el cual carece de interés en la detección radiactiva. Por tanto, la emisión (del electrón) beta del tritio exhibe una energía entre 0 y los susodichos 18,6 keV. Un electrón voltio (eV) equivale a $1,603 \times 10^{-12}$ ergios y es una unidad de energía (o de trabajo), que no de voltaje, siendo la cantidad de energía cinética ganada por un electrón cuando es acelerado a través de un campo eléctrico en el que se ha establecido una diferencia de potencial de 1 voltio. Dicha energía es cinética, ya que, como otros cuerpos en movimiento, las partículas beta disipan su energía mediante colisiones con el medio donde se hallan (en disolución), pudiendo absorber el medio ese exceso de energía mediante calor, ionización o excitación electromagnética. Este último proceso es la clave del proceso de centelleo, haciendo que el *centelleador* sea precisamente un líquido o solución para garantizar un contacto íntimo y eficiente con las partículas emisoras y tomar de ellas la energía beta, que las promociona, a su vez, a un estado electrónicamente excitado desde donde retornan al estado fundamental emitiendo fotones. La figura 92 representa el número de eventos (emisiones, electrones) por nivel de energía, con un valor característico de 18,6 keV en el tritio (y de 156 keV en el ^{14}C).

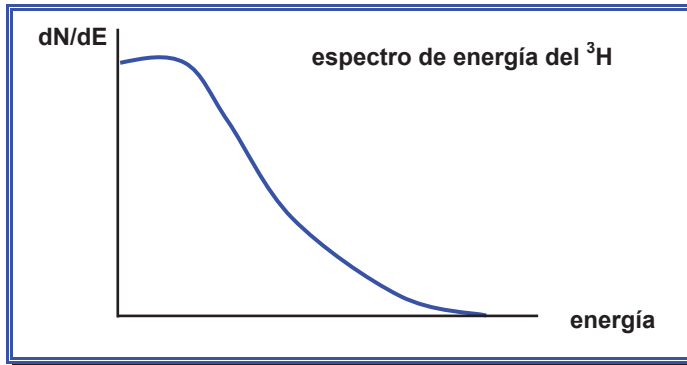


Figura 92. Espectro de emisión de energía del tritio.

El *proceso de centelleo* refleja el número total de fotones emitidos por el líquido de centelleo, cuya intensidad es proporcional a la de la emisión de las partículas beta, recogida luego por el fotomultiplicador (o fotomultiplicadores), originando un pulso eléctrico de intensidad proporcional al número de fotones emitidos por el líquido de centelleo y, por tanto, al número de electrones beta del analito. Así, en primera instancia, registrando el número de pulsos eléctricos sucedidos en el tiempo tendremos idea de cuántos eventos radiactivos van sucediendo.

Sin embargo, hay que tener presentes tres primeras limitaciones de la técnica: la primera y clásica limitación es inherente a los tubos fotomultiplicadores, que,

aun perfeccionados desde que Iworykin⁷² describiera el primero en 1936, consiste en la aparición de pequeños pulsos, incluso sin emisión de fotones, dado que el fotomultiplicador es tan sensible que al aplicar un voltaje entre sus electrodos se generan pequeños *pulsos de ruido*, una de las principales contribuciones al fondo en las medidas radiométricas.

Los cambios térmicos del entorno de la muestra y del líquido de centelleo (en el *efecto termoiónico*) constituyen otro factor de ruido, segunda limitación de los fotomultiplicadores. La migración de electrones causada por la temperatura se manifiesta como pulsos aleatorios que pueden confundirse con los procedentes de la muestra o, cuanto menos, contribuir al fondo de las medidas.

Por último, una tercera limitación es la distancia entre el fotomultiplicador y la celda de muestra, inversamente proporcional a la intensidad de las medidas.

El primer contador de centelleo, evidentemente aún sin la capacidad de analizar muestras en régimen de flujo continuo, sino en un simple vial, fue ideado por Hayes en 1953. En la posterior fabricación de equipos comerciales, Kallman y Accardo⁷³ resolvieron el problema de los pulsos coincidentes al enfrentar dos fotomultiplicadores en una “*configuración 2 π* ” (figura 93) previa a un circuito electrónico lógico, disposición presente en la práctica totalidad de los contadores de centelleo y detectores radiométricos actuales.

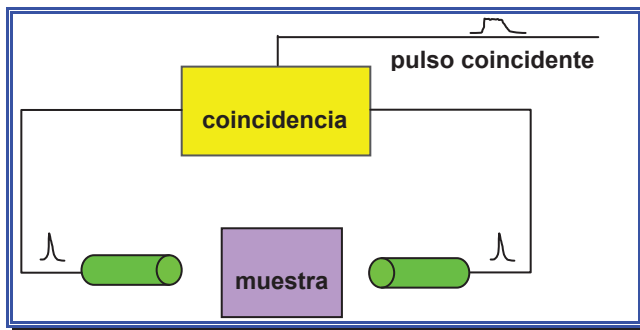


Figura 93. Circuito de coincidencia de pulsos “ 2π ” de un detector radiométrico.

Las muestras radiactivas, al pasar por la celda del detector, producen aproximadamente 10 fotones por cada keV, cuya energía se disipa rápidamente, en unos 5 ns, produciendo casi instantáneamente señal eléctrica en el fotomultiplicador. Si coincide la señal salida de ambos fotomultiplicadores por haberse producido exactamente en el mismo tiempo (teniendo en cuenta el retardo electrónico del propio circuito, unos 20 ns), se tratará de un “*pulso coincidente*”, distinto de los pulsos accidentales provocados por la electrónica y cada fotomultiplicador. El de-

⁷² Iworykin, V. K., Morton, G., A. y Malter, L.; Proc. IRE, 24 (1936) 351.

⁷³ Kallman, H. Y Accardo, A.; Rev. Sci. Inst., 27 (1950) 48.

ector excluye los pulsos coincidentes, mejorando sobremanera la eficiencia de la detección (por ejemplo, la del tritio pasa del 30% al 45%).

Otro aspecto básico de los detectores radiométricos es que deben realizar la conversión de partículas beta a fotones de forma lineal. Una partícula de 100 keV produce unos 1.000 fotones, es decir, con un factor de 10 fotones/keV. Por tanto, cada una de las partículas beta de 150 keV producirá una respuesta un 50% mayor que otra de 100 keV.

Finalmente, el detector radiométrico acumula durante el proceso de medida las *cuentas*, que representan el espectro de energía total del radionúclido: cuanto mayor es el tiempo de medida frente a los fotomultiplicadores (o cuanta mayor actividad posee la muestra), el detector proporciona señales mayores.

Unidades de las medidas radiométricas

Antes de nada, es buena *praxis* calcular el volumen exacto de la celda del detector radiométrico, corregido posteriormente, sobre todo para condiciones de alta sensibilidad con muestras de baja actividad, multiplicando el volumen de celda calculado por un factor de 0,50, aunque para condiciones de alta resolución y condiciones extremas de sensibilidad el factor será $0,50^2$, esto es, 0,25. El volumen exacto de la celda del detector puede calcularse empíricamente a partir de dos picos adyacentes del cromatograma, determinando el volumen de fase móvil (el volumen de retención) existente entre ellos y el de uno de los dos, usualmente del pico más estrecho de dicho par (figura 94). En el ejemplo de la figura el volumen de celda máximo para conservar la resolución entre ambos picos es el tiempo de retención transcurrido desde el comienzo del pico hasta el final del mismo, multiplicado por el flujo ($2 \text{ min} \times 1 \text{ ml/min} = 2 \text{ ml}$), suponiendo que la celda es sólida, es decir, sin más volumen que el de la fase móvil con los analitos. En determinaciones con *cocktail* de centelleo la distancia entre ambos picos será la diferencia de sus tiempos de retención, multiplicada por la suma del flujo de fase móvil más el de la bomba que adiciona el líquido de centelleo (que suele ser el triple del flujo cromatográfico, 146), es decir, $2 \text{ min} \times (1 + 3 \text{ ml/min}) = 8 \text{ ml}$. En ambos casos el volumen así calculado es el *volumen total de la celda* del detector radiométrico.

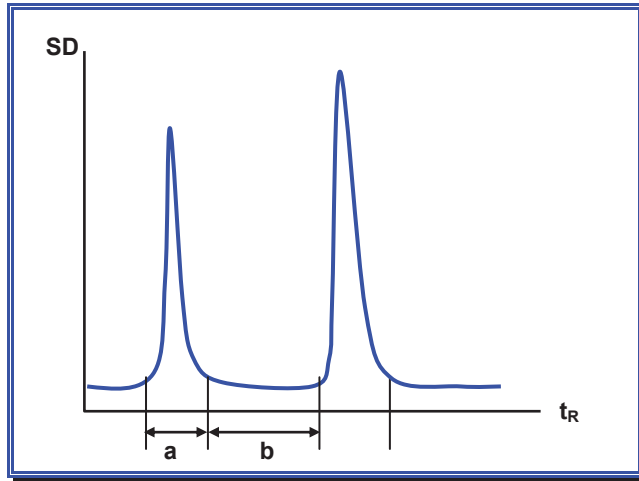


Figura 94. El volumen de retención entre ambos picos (b) es 2 min x 1 ml/min = 2 ml, siendo el volumen de retención del primer pico (a) 1 min x 1 ml/min = 1 ml. El flujo de fase móvil fue 1 ml/min y el de *cocktail* 3 ml/min.

$$V_{total} = \Delta t_R \cdot F \quad (126)$$

$$V_{total} = \Delta t_R (F + F_{cocktail}) \quad (127)$$

Ahora bien, la corrección para condiciones extremas contempla dos factores de corrección: para alta sensibilidad (f_1) y para alta resolución (f_2). Ambos pueden tomar un valor de 0,5 si las exigencias son "altas", aunque en condiciones normales tomarán un valor unitario y pueden obviarse:

$$V_{celda} = f_1 \cdot f_2 \cdot \Delta t_R \cdot F \quad (128)$$

$$V_{celda} = f_1 \cdot f_2 \cdot \Delta t_R (F + F_{cocktail}) \quad (129)$$

Los detectores radiométricos muestran su señal en alguna de las siguientes unidades, en ordenadas del cromatograma:

Becquerel o *Becquerelio* (Bq): unidad básica de radiactividad del Sistema Internacional de Unidades, equivale a una desintegración por segundo. La Comisión de Electrotécnica Internacional prefiere el término *becquerelio*, aunque el Diccionario de la Real Academia Española (de la Lengua) solo cita *becquerel*, rindiendo pleitesía ambos términos al físico parisino Antoine Henri Becquerel, descubridor de la radiactividad en 1896.

Curie o *Curio* (*Ci*): unidad llamada así en honor de Marie y Pierre Curie, descubridores del radio en 1898. Un curie equivale exactamente a $3,7 \times 10^{10}$ dps (desintegraciones por segundo), que corresponden al número de desintegraciones de 1 gramo de radio. Por tanto, un curie equivale también a $3,7 \times 10^{10}$ becquerel:

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ dps} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq} \quad (130)$$

Cuentas por minuto (*Cpm*): medida usual que muestran los (radio)cromatogramas en ordenadas. Son los pulsos o cuentas totales, correspondientes a las desintegraciones o emisiones ocurridas durante un minuto al paso del analito por la celda del detector, divididas por el tiempo de residencia:

$$Cpm = \frac{\text{cuentas}}{t_{\text{residencia}}} \quad (131)$$

A su vez, el tiempo de residencia ($t_{\text{residencia}}$) es el volumen de la celda, que ya se ha calculado, dividido por el flujo. En técnicas sin adición de *cocktail* de centelleo el flujo es el de la bomba del sistema de HPLC, pero con adición de *cocktail* de centelleo, el flujo es la suma del de la fase móvil más el del líquido de centelleo:

$$t_{\text{residencia}} = \frac{V_{\text{celda}}}{F} \quad ; \quad t_{\text{residencia}} = \frac{V_{\text{celda}}}{F + F_{\text{cocktail}}} \quad (132)$$

Desintegraciones por minuto (*Dpm*): desintegraciones ocurridas en un minuto, calculadas dividiendo las cuentas totales (*Cpm*) por la eficiencia, muchas veces expresada en porcentaje:

$$Dpm = \frac{Cpm}{\text{Eficiencia}} \quad ; \quad \%Dpm = \frac{Cpm}{(\% \text{Eficiencia} / 100)} \quad (133)$$

Desintegraciones por segundo (*Dps*): menos usadas, son simplemente las desintegraciones por minuto (*Dpm*) divididas por sesenta:

$$Dps = \frac{Dpm}{60} \quad (134)$$

Eficiencia del conteo (*CE*, *Counting Efficiency*): relación entre el número de partículas o fotones detectados en el fotomultiplicador del detector (*Cpm*) respecto al número de partículas (o fotones) del mismo tipo emitidas por la muestra (*Dpm*). La eficiencia del conteo varía entre isótopos, radionúclidos detectados, composición de la muestra, modelo de detector, tipo de *cocktail*, relación del flujo de fase móvil respecto al de *cocktail*, composición de la fase móvil, interferencias, gradiente, su perfil, en qué punto del gradiente se hace la medida y qué cambios de vis-

cosidad comporta, tipo de celda, valor del fondo de las medidas, etc. Bajas energías de conversión conllevan mala eficiencia del proceso de centelleo. Empero, la energía de conversión siempre es un valor pequeño: aún habiéndola optimizado, solo se convierte en fotones el 4% de la energía de una emisión β , incluso en los *cocktail* de centelleo más eficientes. El cálculo de la eficiencia es fundamental en el proceso de detección radiométrica: en primer lugar, se monitorizan las cuentas por minuto (*Cpm*) de un patrón conocido, cuyas desintegraciones por minuto (*Dpm*) se conocen o se han tomado externamente de un contador de centelleo para calcular con ellas la eficiencia (en porcentaje); así, un sistema 100% eficiente es capaz de monitorizar *todas* las emisiones radiactivas o pulsos que ocurren en la muestra. Evidentemente, los valores reales de eficiencia siempre quedan por debajo del 100%, por procesos de *quenching* u otras causas que interfieren en el proceso de transferencia de energía entre el núclido y el *cocktail*, más las que puedan inhibir la transmisión de fotones desde la celda del detector al fotomultiplicador:

$$\%Eficiencia = 100 \frac{Cpm}{Dpm} \quad (135)$$

Número total de cuentas (GC, Gross Counts): número de cuentas acumuladas en el conteo durante el periodo de medida.

Número neto de cuentas (NC, Net Counts): También expresadas como *Cpm netas*, son el número total de cuentas menos las cuentas del fondo durante el periodo de medida:

$$NC = \frac{Cuentas - Fondo}{t_{residencia}} \quad (136)$$

Actividad mínima detectable (AMD, en ingles MDA, Minimum Detectable Activity): este estimador suele tomar un valor doble del fondo específico del detector, condiciones a partir de las cuales los picos son detectables. Expresada en *Dpm*, se calcula a partir del valor de la medida del fondo en las condiciones del análisis (en *Cpm*), la anchura del pico cromatográfico del analito (*a*), el tiempo de residencia ($t_{residencia}$, en minutos) y la eficiencia:

$$AMD = \frac{Fondo(Cpm) \cdot a}{t_{residencia} \left(\frac{\%Eficiencia}{100} \right)} \quad (137)$$

Rad: unidad de dosis de radiación adsorbida, un *Rad* equivale a 100 ergios/gramo del medio.

Roentgen Equivalent Man (REM): unidad de dosis de radiactividad usada como parámetro límite. La dosis equivalente en REM es numéricamente igual a la adsorbida en Rad, multiplicada por un factor de cualidad, otro de distribución y otros específicos. Para fuentes externas de electrones y partículas beta, la suma de dichos factores se supone 1,0.

Relación óptima del cocktail de centelleo (R): cociente entre el flujo de la bomba que impulsa el *cocktail* de centelleo, que causa un valor máximo de cuentas netas (*NC*) en el pico del analito, dividido por el flujo de fase móvil, por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, etc.

$$R_{\text{centelleo}} = F/F_{\text{cocktail}} \quad (138)$$

Como queda dicho, la escala de los cromatogramas suelen expresarse en *Cpm* o *Dpm* en el eje de ordenadas (figura 95).

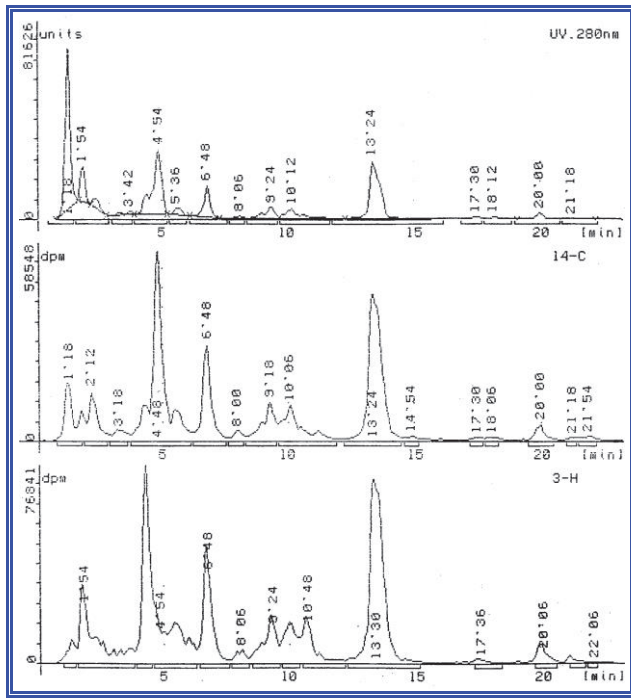


Figura 95. Detección radiométrica con *cocktail* de centelleo: arriba, detección espectrofotométrica UV a 280 nm; centro, radiocromatograma de ^{14}C ; debajo, radiocromatograma de ^3H .

Aspectos que afectan a la sensibilidad de las medidas radiométricas

Dos aspectos básicos afectan la sensibilidad de la detección radiométrica, creando entre ambos un umbral mínimo de detección de 1 keV, llamado “*umbral de coincidencia*”, debido al proceso de discriminación de pulsos que limita la sensibilidad de las medidas. Cada partícula beta posee suficiente energía para generar, al menos, dos fotones, pudiendo interactuar cada uno de ellos con cada fotomultiplicador. Evidentemente, la emisión de fotones se produce en todas las direcciones del espacio, estimándose normal una generación de 7 u 8 fotones por cada keV, siendo ideal, como antes expusimos, una producción de 10 fotones/keV.

El segundo aspecto es la eficiencia cuántica del fotomultiplicador, es decir, la eficiencia del proceso de conversión de partículas beta a fotones, que suele ser un modesto 30%.

Además, otros fenómenos contribuyen al fondo de las medidas y pérdida de sensibilidad en la detección: la presencia de radiaciones cósmicas, variables según las condiciones barométricas; la contaminación radiactiva ambiental; la actividad natural de las paredes internas de los fotomultiplicadores; finalmente, y por esotérico que parezca, los materiales del edificio, instrumentos, muestras, etc., del propio laboratorio;.

Medidas cuantitativas y cualitativas

Desde hace más de setenta años se sabe que la distribución de los pulsos difiere significativamente de la distribución teórica de los pulsos, principalmente en la zona de bajas energías del espectro de emisión de la radiación beta⁷⁴ (figura 96).

⁷⁴ Horrocks, D.L.; Nuc. Instru. Meth., 27, 253, 1964.

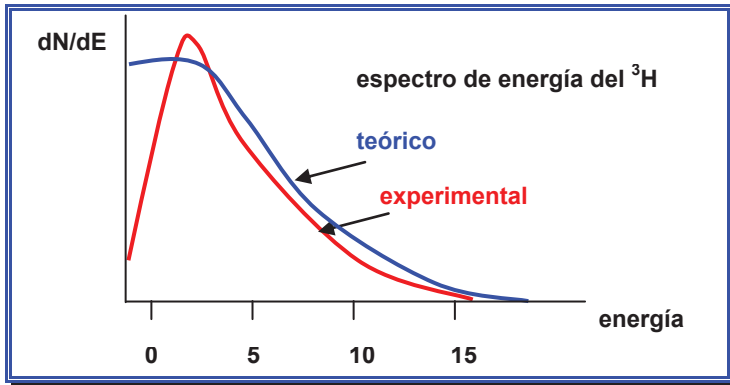


Figura 96. Comparación de los espectros de emisión teórico y experimental del tritio.

Por otra parte, a causa del umbral del fotocátodo y de la suma de pulsos, la altura (dN/dE) del espectro de energía dista de ser lineal respecto de la energía. Si, como hemos dicho, la eficiencia cuántica del fotomultiplicador es del 30%, 100 fotones producidos en el proceso de centelleo producirán 30 fotoelectrones reales; sin embargo, la eficiencia para un único fotón, si es que es detectado, es de un único fotoelectrón. Por esta razón la mayoría de los detectores y contadores de centelleo emplean una escala logarítmica (figura 97), desventajosa en ciertos aspectos respecto a una escala lineal "normal": el origen de la escala logarítmica se sitúa en un valor superior a 0 keV; distorsiona algunos espectros, por ejemplo, el del tritio; los valores altos de energía quedan cada vez más comprimidos; los amplificadores logarítmicos se estabilizan más lentamente que los lineales, y, por último, la representación gráfica difiere del aspecto "normal", exigiendo al cromatógrafo habituarse a ella.

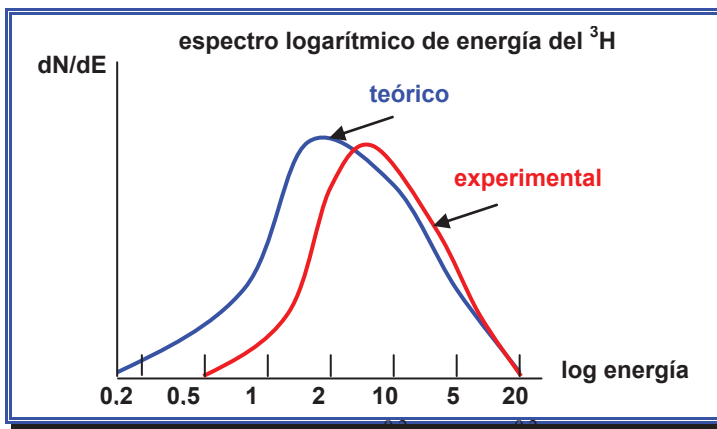


Figura 97. Comparación de los espectros de emisión teórico y experimental del tritio en escala logarítmica.

En el espectro "lineal" existen cuatro zonas características (figura 98), observadas por primera vez en 1972 por Mantel⁷⁵: una primera zona de *energía máxima de las partículas beta* (E_{max}), que corresponde al punto final de la distribución, cuya medida suele ser imprecisa, pues existen escasas partículas en la zona final del espectro, exigiendo técnicas de estimación o de regresión⁷⁶; la segunda zona se refiere a la *altura de pulso en el punto de energía máxima* (E_p), cuya determinación tampoco es precisa y se estima por regresión; la tercera zona la constituye el punto de inflexión en la zona superior de energía, denominado "*número H*"; la última zona es la altura de pulso media, denominada *índice espectral* (E_{av}), que es en realidad una energía cinética calculada a partir del número de partículas de energía ($N(E)$), que es, a su vez, la energía de la partícula:

$$E_{av} = \frac{\int_0^{E_{max}} E \cdot N(E) \cdot dE}{\int_0^{E_{max}} N(E) \cdot dE} \quad (139)$$

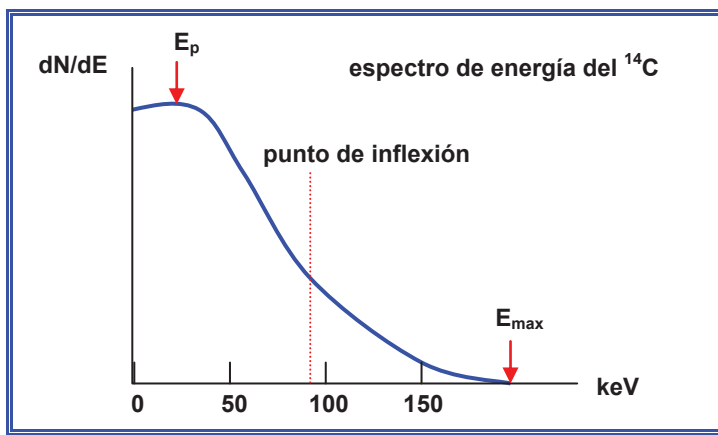


Figura 98. Espectro teórico de emisión de energía del carbono 14.

Sin embargo, los detectores radiométricos calculan un valor normalizado de E_{av} con un factor de proporcionalidad (K) que depende del número de cuentas $n(\chi)$, pulsos comprendidos entre dos valores cuya diferencia es proporcional al número de partículas beta, la altura de pulso (x), también proporcional a la energía de las partículas beta, y al nivel superior de la distribución de pulsos o punto final (u):

⁷⁵ Mantel, J.; Int. J. Of Applied Rad. and Isotopes, 23 (1972) 407.

⁷⁶ Birks, J. B.: *The Theory and Practice of Scintillation Countings*. Editorial Pergamon Press, Londres, 1964.

$$E_{av} = K \frac{\sum_{x=0}^u x n(x)}{\sum_{x=0}^u n(x)} \quad (140)$$

También hay que considerar que los espectros pueden provenir de las emisiones sumadas de dos o más núclidos, frecuentemente las emisiones beta del tritio y del carbono 14 (figura 99).

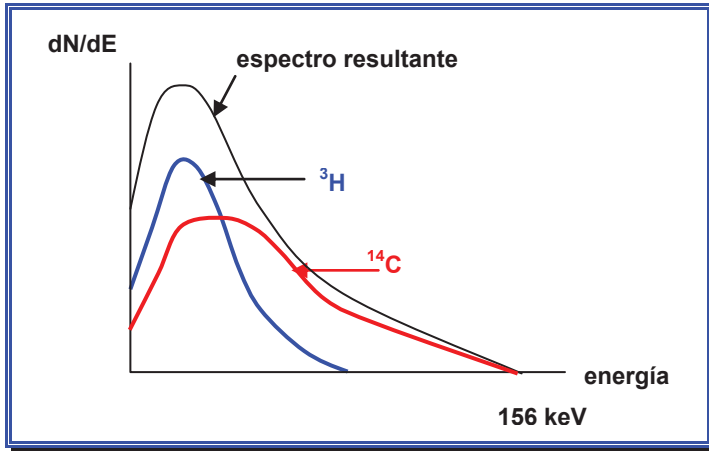


Figura 99. Espectros mixtos de emisión del tritio y del carbono 14.

Muestras emisoras de radiaciones gamma

Estas muestras interesan en biología, biomedicina y radioinmunoensayo, pues el marcaje con ¹²⁵I es más específico que con tritio. Los emisores gamma exigen frecuentemente técnicas de corrección "por *quenching*": los *cocktail* de centelleo orgánicos poseen baja densidad de átomos (1 g/cm³) de bajo número atómico (H, C, O), por lo que absorben mucho menos la radiación gamma que los inorgánicos, como el yoduro de sodio o el talio. La absorción fotoeléctrica es pequeña en energías superiores a 30 keV, dominando hasta 2.000 keV la dispersión Compton.

Los pulsos gamma se observan en dos regiones: en primer lugar, por debajo de 30 keV, donde hay conversión de electrones (caso del ⁵⁷Co y ⁵¹Cr) y electrones Auger (caso del ¹²⁵I, figura 100), originados en la nube de electrones que rodean el núcleo y que han adquirido suficiente energía para separarse de él; en segundo lugar, como acabamos de decir, en la zona entre 30 keV y 2.000 keV se producen electrones por dispersión Compton.

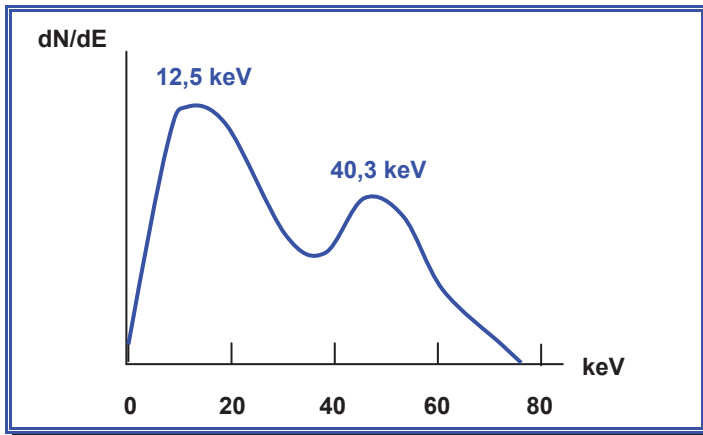
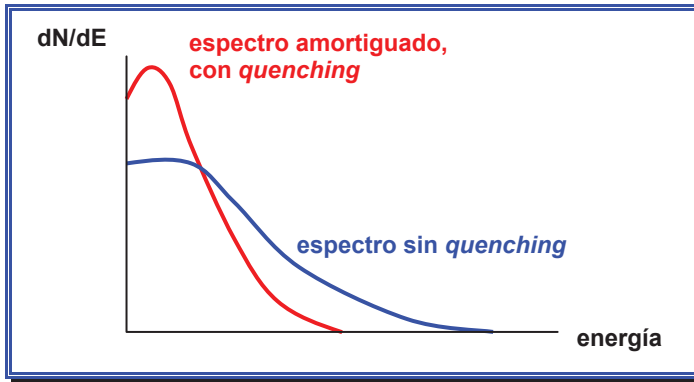


Figura 100. Espectro gamma del ^{125}I con eficiencia de centelleo del 75%, utilizando un *cocktail* de tipo emulsión.

También en los espectros gamma pueden definirse cuatro puntos característicos, al igual que en los espectros beta: la energía máxima de partículas gamma (E_{max}), la altura de pulso en el punto de energía máxima (E_p), el punto de inflexión en la zona superior de energía (“*número H*”) y la altura de pulso media o índice espectral (E_{av}). Sin embargo, los espectros gamma exhiben numerosas interferencias inherentes al proceso de centelleo, que pueden agruparse en cinco apartados: *quenching* de la eficiencia, luminiscencia, electricidad estática, efectos de pared de las celdas y ruido de fondo accidental.

En primer lugar, existen procesos de amortiguación de la eficiencia, cuyo efecto conjunto podemos sintetizar bajo la denominación de *quenching*, ya que manifiestan una reducción aparente del número de fotones procedentes del analito (figura 101). Se trata fundamentalmente de dos procesos: “*amortiguación química*” (*quenching químico* o *quenching debido a impurezas*), que causa pérdidas de energía al transferir ésta desde el solvente al analito, y, por otra parte, *amortiguación del color* (*quenching de color*), atenuación de los fotones emisores en solución.

Figura 101. *Quenching* en los espectros gamma.

En segundo lugar, hay interferencias debidas a luminiscencia, muy presente en los detectores radiométricos, proceso que genera fotones por reacciones químicas en ausencia de analitos radiactivos, con el consiguiente error en las medidas. La luminiscencia es un proceso muy a tener en cuenta con los solubilizadores alcalinos tisulares añadidos a los *cocktail* de centelleo y también por la presencia de oxidantes en las muestras. Existen dos variantes de luminiscencia: *quimioluminiscencia* (producción de radiación por reacciones químicas, sobre todo a pH alcalinos o en presencia de peróxidos, habituales en los *cocktail* de centelleo de tipo emulsión) y *fotoluminiscencia* (resultante de la activación del *cocktail* al ser expuesto a la luz). La quimioluminiscencia desaparece lentamente, generalmente tras media hora, mientras que la fotoluminiscencia lo hace en pocos minutos, manifestando ambas efectos aparentemente iguales en los espectros (figura 102). Los detectores radiométricos incorporan algoritmos basados en la coincidencia de pulsos para discriminar y corregir la luminiscencia, ya sea quimio, bio o fotoluminiscencia. En todo caso, interesa recoger y memorizar el espectro debido únicamente a luminiscencia para luego restarlo a los espectros de emisión radiactiva. También el cromatografista debe tener en cuenta la temperatura, que condiciona mucho la emisión de luminiscencia, siendo recomendables altas temperaturas al usar detectores sencillos, sin corrección de luminiscencia. También, para minimizar la fotoluminiscencia, es preciso dejar en reposo y en oscuridad el *cocktail* de centelleo un día completo (24 horas), en la llamada "*adaptación a la oscuridad*".

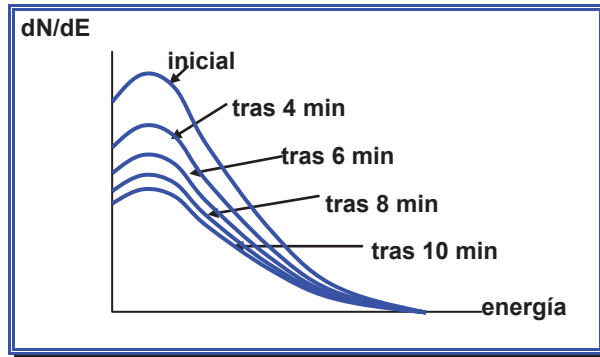


Figura 102. Efectos de la luminiscencia en un espectro gamma.

En tercer lugar, aparecen interferencias causadas por la electricidad estática y descargas electrostáticas, generadas al separar dos materiales no conductores cuando uno desarrolla carga positiva y el otro negativa. Las descargas electrostáticas generan electrones interferentes en la detección radiométrica, apareciendo en el espectro de radiación como saltos erráticos y sin lógica aparente, haciendo más ruidosa la línea de base de los cromatogramas gamma.

En cuarto lugar, los disolventes orgánicos usuales en los *cocktail* de centelleo penetran en las paredes de plástico y de teflón de las celdas produciendo efectos de pared que afectan a la exactitud de las medidas, especialmente a su espectro Compton (más que al propio espectro gamma de los analitos), por ejemplo, en la zona de 40 keV del espectro del ^{137}Cs .

Por último, pueden aparecer interferencias debidas a algún ruido de fondo accidental, frecuentemente causadas por la electrónica del equipo, interferencias evaluadas sin analitos para memorizarlas y luego restarlas de los espectros de las muestras, con lo que estos quedan corregidos (figura 103).

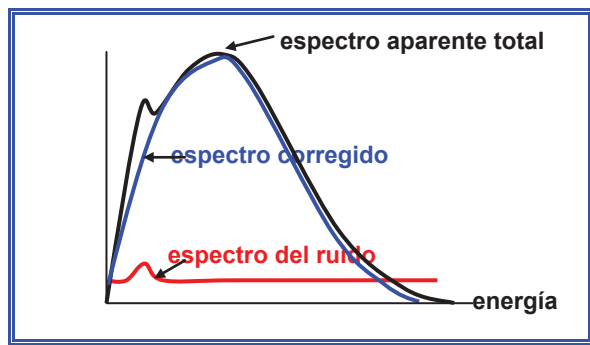


Figura 103. Incidencia del ruido accidental en los espectros gamma.

Ruido de fondo en las medidas gamma

Varias causas instrumentales pueden provocar cierta *señal de fondo* en las medidas de radiactividad gamma: en primer lugar y como acabamos de decir, pueden deberse al instrumento y a su electrónica, afectando a los valores de menor energía del espectro y contribuyendo hasta en un 15% del fondo indeseable; en segundo lugar, pueden deberse al “*ruido de cruce*”, pues los eventos de centelleo, objeto de la medida radiométrica, pueden producir fotones que ve el otro fotomultiplicador, hecho que representa más del 20% del fondo indeseable y que también afecta más a la zona de menor energía del espectro; en tercer lugar, la ventana superficial del fotomultiplicador por donde penetran los fotones ha de ser lo más delgada posible para evitar reflexiones internas y estar lo más próxima posible a la muestra (su “*ángulo sólido*”) para capturar todas sus emisiones. La contribución de la superficie del fotomultiplicador al fondo indeseable es del 35% y puede falsear las medidas en la zona de medias y altas energías. Finalmente, afectan a la señal de fondo de las medidas de radiactividad gamma los pulsos debidos al propio *cocktail* de centelleo y causados por radiaciones cósmicas, el entorno, etc., que pueden llegar a contribuir a un 30% del fondo indeseable en la zona de medias y altas energías.

Señal que producen los detectores radiométricos

Los detectores radiométricos pueden generar señal de dos tipos: *analógica* (“convencional”), variable entre 0 y 1 V, para integradores y registradores externos, o *digital*, para ser llevada a un sistema de datos cromatográficos. La mayoría de los *softwares* de estos detectores exhiben tiempos de ciclo para contar los pulsos junto al tiempo total del cromatograma, y pueden exhibir varios canales simultáneamente, para muestras marcadas con varios isótopos, usualmente ^3H y ^{14}C (en actividades absolutas, Dpm o Bq), junto al cromatograma de luminiscencia e, incluso, un cromatograma “convencional” procedente de un detector espectrofotométrico, como vimos en la figura 95. Este *análisis multicanal* permite observar la actividad de las muestras en todo el espectro y confirmar la ausencia de impurezas indeseables e interferencias debidas a quimioluminiscencia. Durante los análisis cualitativos los detectores radiométricos adquieren información espectral continuamente y tiempo real, durante la elución de los picos de los analitos. Dependiendo de los modelos, exhiben 2^n canales cromatográficos (2, 4, 8), para cuantificar analitos marcados con varios isótopos, discriminando su energía en valores reales de keV, caracterizar y eliminar la contribución del fondo al espectro, especialmente la luminiscencia presente en el líquido de centelleo. Además, también suelen corregir la curva de eficiencia superponiendo la del gradiente, que podría desvirtuar el conteo al usar líquidos de centelleo. En suma, el conjunto detector radiométrico-*software* suele incorporar todas o algunas de las siguientes prestaciones: análisis multicanal en varios radiocanales, con umbrales de discriminación

para cada canal; detección con corrección de luminiscencia; capacidad de procesar la señal de otro detector auxiliar (por ejemplo, espectrofotométrico, permitiendo corregir su desfase temporal con el detector de radiactividad); entregar cromatogramas convencionales analógicos; definir tiempos y ventanas de un colector de fracciones; control de la bomba del líquido de centelleo, de un *splitter* con relación variable y programable, la activación de válvulas de desecho y, en fin, de todo el equipo de HPLC.

La cuestión clave de reducir el ruido de fondo para aumentar la sensibilidad conlleva continuamente a la búsqueda de nuevos procedimientos, sobre todo de técnicas heterogéneas. Si bien los detectores radiométricos tradicionales se basan en un análisis de pulsos bidimensional (altura del pulso y las cuentas de éste), otros detectores añaden como tercera dimensión un “índice de pulsos” que mide los *pulsos retardados*, asociados al tiempo en que se genera la señal de fondo: al medir los pulsos retardados de baja intensidad se discriminan en el líquido de centelleo las emisiones verdaderas de las cuentas debidas al fondo, mejorando la sensibilidad y permitiendo usar celdas de menor volumen, que mejoran la resolución cromatográfica y los límites de detección, celdas denominadas *de detección por mínima actividad detectable* que reducen el ruido de fondo un 65%.

Celdas de muestras

Como hemos dicho, existen dos tipos de celdas radiométricas, según la naturaleza de la sustancia centelleadora respecto a la fase móvil: *celdas homogéneas*, que emplean líquidos o *cocktail* de centelleo, y *celdas heterogéneas*, donde un relleno sólido es el mismo centelleador (un cristal de talio). Cambiar de celdas ha de ser rápido y sencillo, por lo que suelen ser de tipo *cassette*, similares a las de los detectores espectrofotométricos.

Las *celdas homogéneas* suelen utilizarse para determinaciones de tritio. Su uso implica una detección destructiva, total o parcial, al mezclar los analitos con el *cocktail* de centelleo en una T de mezcla *pre-columna*. No obstante, puede salvarse una parte de muestra haciendo una división (*split*) previa a la incorporación del *cocktail*. La sensibilidad de las celdas homogéneas es directamente proporcional a su área, enfrentando sus dos lados a dos grandes tubos fotomultiplicadores, en torno a los cuales se halla construido el detector, como sabemos, en “*configuración 2 π* ”. El volumen de las celdas homogéneas es alto en comparación con otros detectores de HPLC, por ejemplo, desde 35 μ l hasta 5 ml. Celdas de mayor volumen permiten inyectar mayor cantidad de muestra y que ésta quede más tiempo expuesta frente a los fotomultiplicadores, logrando mayor sensibilidad absoluta, aunque los efectos extracolumnares perjudican la eficiencia cromatográfica. Puesto que volúmenes de celda menores ganan resolución, pero pierden sensibilidad, hay que arbitrar un compromiso respecto al volumen de celda a utilizar. En cual-

quier caso, la eficiencia de las celdas homogéneas para ^3H supera el 50% y para ^{14}C el 90%.

Las *celdas heterogéneas* presentan respuestas inferiores. Sin embargo, su gran ventaja, junto a su naturaleza no destructiva para las muestras, es obviar los *cocktail* o centelleadores líquidos, caros, tóxicos y que luego han de eliminarse, con el correspondiente coste. A pesar de ello, su mayor inconveniente es la limitada vida del contelleador sólido interno, que obliga a remitir las celdas al fabricante para “regenerarlas” tras un cierto periodo de uso, reensamblándolas con nuevo centelleador sólido. La eficiencia de las celdas heterogéneas supera el 10% para ^3H y el 70% para ^{14}C . Una última desventaja reside en su propia construcción, un tubo con un sólido empaquetado en su interior, que obliga a filtrar cuidadosamente las muestras para no obturarlas, sobre todo si sus pesos moleculares superan 150.000 dalton.

Finalmente, existen celdas de diseño especial, tanto homogéneas como heterogéneas, para aplicaciones que precisan presiones muy altas o flujos muy altos.

Características de los cocktail de centelleo

El *cocktail* o líquido de centelleo tiene la misión de producir fotones a partir de emisiones radiactivas, fotones que llegan al fotomultiplicador en un proceso más complejo de lo que parece y sujeto a numerosas interferencias. La acepción “*cocktail de centelleo*” indica que se trata de una mezcla de hasta cuatro componentes líquidos: un *solvente primario*, que convierte la energía cinética de las radiaciones en energía de excitación; un *solvente secundario*, que mantiene las moléculas radiactivas cerca del solvente primario; un *centelleador primario*, que convierte la energía de excitación en radiación, y un *centelleador secundario*, que desplaza la longitud de onda producida en el centelleador primario a longitudes de onda compatibles con los detectores.

Los solventes primarios más eficientes son hidrocarburos aromáticos, cuyo paradigma es el tolueno, estimándose la eficiencia relativa de la conversión de energía de los solventes primarios por sus valores de altura de pulso comparados con los del tolueno, en *RPH*, *Relative Pulse Height* (tabla 39) El tolueno es la elección inicial de solvente primario en los *cocktail* de centelleo por su excelente pureza y coste moderado, aunque es problemático su punto de ebullición, inferior a la temperatura ambiente. Es importante el punto de congelación de los solventes primarios, pues las bajas temperaturas reducen su capacidad de transferir la energía.

Tabla 39. Solventes primarios de los cocktail de centelleo.

Solventes primarios	RPH
Opti-fluor	0,91
Pseudocumeno	1,12
P-xileno	1,10
M-xileno	1,07
Xileno (varios isómeros)	1,05
Tolueno	1,00
O-xileno	0,98
Benceno	0,85
1,4 Dioxano – naftaleno	0,65
1,4, Dioxano	0,20

Empero, los xilenos son los solventes primarios más utilizados por su alta eficiencia en el proceso de conversión de energía, variable entre sus tres isómeros (orto, meta, para-xileno) o entre las mezclas de estos, por lo que habitualmente se selecciona uno de ellos puro, añadiéndose sobre él proporciones conocidas de los otros dos. Los xilenos, líquidos inflamables, tienen una temperatura de ebullición superior a la temperatura ambiente. El p-xileno apenas se emplea porque congela a 12° C.

El benceno es otro solvente primario, empleado en medidas de ¹⁴C. Producto de síntesis del carbono, incorpora la radiactividad de éste al solvente primario, siendo su gran ventaja permitir la adición de grandes cantidades de carbono al *cocktail*.

El dioxano ha sido muy usado como solvente primario por ser uno de los pocos compatibles con muestras acuosas. Sin embargo, nunca se emplea como tal, sino con naftaleno disuelto en él, aunque la presencia de ciertos analitos puede precipitar "su" naftaleno. Aun apreciando su compatibilidad con muestras acuosas, el dioxano presenta inconvenientes, principalmente precipitar las proteínas y sufrir auto-oxidación, generando peróxidos, que, como sabemos, desarrollan intensa quimioluminiscencia e inhiben la señal radiométrica por varios procesos de *quenching*.

También es bastante popular el pseudocumeno (1,2,4-trimetilbenceno) por su gran capacidad de conversión de energía. No obstante, su clasificación legal como combustible comporta restricciones de transporte y almacenamiento.

Tabla 40. Solventes secundarios de los *cocktail* de centelleo.

Solventes (alcoholes)	Metanol
	Etanol
	Etoxietanol
Emulsificantes	Triton X-100
	Insta-Gel
	Pico-Fluor 15
	Pico-Fluor 30

Respecto a los solventes secundarios de los *cocktail* de centelleo (tabla 40), se suelen usar alcoholes cuando las muestras contienen pequeños volúmenes de agua (hasta 100 μ l). Para muestras acuosas de analitos muy polares (polietilenglicoles) suelen emplearse como solventes secundarios alcoholes complejos, como el etoxietanol. También son solventes secundarios comunes de los *cocktail* de centelleo los emulsificantes (tensoactivos y detergentes), como el Triton X-100, emulsificante no iónico muy utilizado, aunque puede contener impurezas que afectan a su eficiencia. Muchos *cocktail* comerciales contienen tensoactivos no iónicos disueltos en xileno, mientras que los tensoactivos iónicos, mejor disueltos en pseudocumeno, son adecuados para muestras que contienen sales.

Tabla 41. Centelleadores primarios de los *cocktail* de centelleo.

Centelleador primario	Nombre comercial
2,5-difenil-oxazol	PPO
2-(4-terbutilfenil)-5-(4-bifenil)-1,3,4-oxadiazol	Butil-PBD
2,5-bis-2-(terbutilbenzoxazolil)-tiofeno	BBOT

Entre los centelleadores primarios de los *cocktail* de centelleo (tabla 41), el más utilizado es el PPO (2,5-difenil-oxazol), presente en prácticamente todos los *cocktail* comerciales por su gran eficiencia ante pequeñas concentraciones de los analitos, su solubilidad en los solventes del *cocktail*, su coste y escasa reactividad con el resto de constituyentes del mismo. Para muestras sin *quenching* suelen bastar 3 gramos de PPO por litro de tolueno; cantidades del doble (6 gramos por litro de tolueno) generan *cocktail* con gran resistencia al *quenching*, pero concentraciones superiores a 15 gramos por litro de tolueno hacen que el PPO actúe por sí mismo como *autoquencher*.

Ahora bien, el butil-PBD es el centelleador primario más eficiente de los tres aquí expuestos, aunque su coste (doble que el del PPO) y la concentración necesaria (también doble que la del PPO) cohiben su empleo. El butil-PBD se emplea

en concentraciones de 7 a 20 gramos por litro (de tolueno), pero al ser reactivo con los ácidos, bases y aminas, frecuentes en las soluciones de las muestras, la concentración real del butil-PBD disminuye. El butil-PBD genera con las bases un color pardo característico.

Por último, el BBOT (2,5-bis-2-(terbutilbenzoxazolil)-tiofeno) es el centelleador primario que más radiación emite en la región visible y al que menos afecta el *quenching* en la región ultravioleta. Su eficiencia es solo un 80% de la del PPO y cuesta el doble que éste, además de exigir mayores concentraciones en el *cocktail* (7 a 10 gramos por litro). El BBOT reacciona con los ácidos, mostrando un color verde característico.

Tabla 42. Centelleadores secundarios de los *cocktail* de centelleo.

Centelleador secundario	Nombre comercial
p-bis-(o-metilestiril)benceno	bis-MSB
1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno	POPOP
1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno	dimetil-POPOP

Entre los centelleadores secundarios más utilizados en los *cocktail* comerciales (tabla 42) está el muy soluble bis-MSB (p-bis-(o-metilestiril)benceno). Bastante inerte con la mayoría de los líquidos de *cocktail* y muestras, se emplea en bajas concentraciones (0,5 a 1,5 gramos por litro). A altas concentraciones puede actuar como centelleador primario, complementando la concentración del PPO y aumentando la resistencia del *cocktail* a la inhibición del *quenching*.

Por su parte, el POPOP (1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno) es el centelleador secundario más empleado en los contados laboratorios que preparan sus propios *cocktail*. Su baja solubilidad limita su uso general, además de que se disuelve muy lentamente. Inerte con la mayoría de compuestos, suele emplearse en cantidades de 0,1 a 0,2 gramos por litro.

Derivado del POPOP, el dimetil-POPOP (1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno) es más soluble que aquél y se solubiliza más rápido. En cantidades de 0,2 a 0,5 gramos por litro reacciona con los ácidos, generando un color característico amarillo-verdoso.

Además de los citados cuatro componentes fundamentales de un *cocktail* de centelleo, pueden adicionarse otras sustancias con cometidos específicos: estabilizantes, anticongelantes, compuestos que mejoran la eficiencia gamma, sustancias que atrapan el dióxido de carbono y solubilizantes de proteínas. Entre los estabilizantes, el más empleado es el Cab-O-Sil, gel tixotrópico que se añade al tolueno en concentraciones entre 3% y 4% para suspender eventuales partículas insolubles, como el carbonato bórico. Entre los anticongelantes, el etilenglicol es el

más frecuente. Respecto a los compuestos que se añaden ocasionalmente al *cocktail* para mejorar la eficiencia gamma, destacaremos el tetrabutyl-estaño. Finalmente, al *cocktail* pueden añadirse otras sustancias que atrapan el quimioluminiscente dióxido de carbono, generalmente soluciones de sales inorgánicas y bases (NaOH 1 N en agua y KOH 2 N en metanol), existiendo otras sustancias comerciales con gran capacidad para adsorber el CO₂, como la saga de los compuestos aminados Carbosorb (capaces de adsorber 5 milimoles de CO₂ por litro de muestra), etanolamina y fenetilamina, aunque su carbamato es poco soluble en metanol o en tolueno.

Con todo, la principal cualidad a evaluar en un *cocktail* de centelleo es su eficiencia, máxima para usar menor volumen de él en los análisis y permitir celdas menores, con mayor resolución, y que tras los análisis haya que eliminar menos volumen de mezcla *cocktail* – fase móvil. Sin “receta” cromatográfica, parecería razonable comenzar bombeando un flujo de *cocktail* igual al del eluyente; si esa proporción fuese poco eficiente, subiríamos a 2:1, doble en coste y con doble cantidad de centelleador a eliminar. Por el contrario, si el *cocktail* es óptimo, la proporción inicial puede invertirse a 1:2 ó 1:3, con las obvias ventajas contrarias.

Entre las características ideales del líquido de centelleo, aparte de las evidentes desde un punto de vista radiométrico (alta eficiencia, mínimo quenching, alta capacidad de carga o concentración de los analitos), hay que tener en cuenta ciertas características físicas, como su miscibilidad con la fase móvil, que generalmente es un líquido polar (metanol, agua, acetonitrilo, tampones). Algunas fases móviles, sobre todo con alto contenido de fluoruro amónico, aceptan con dificultad los *cocktail* normales, teniendo que recurrir a otros menos frecuentes, pero más miscibles y con aceptable eficiencia (30% para ³H). También hay que considerar la máxima concentración de fosfato amónico, sal típica en separaciones con detección radiométrica, cuya concentración condiciona la miscibilidad del *cocktail*. También los *cocktail* han de poseer baja presión de vapor y alto punto de ebullición, si puede ser superior al del agua, así como baja viscosidad para evitar sobrepresión en la celda del detector. Además, deben ser biodegradables, por motivos ecológicos⁷⁷, y agradables de manejar, sin malos olores.

Elección del cocktail de centelleo

En la detección radiométrica cuantitativa con *cocktail* de centelleo la elección de éste es el principal factor a considerar, juzgando su compatibilidad con las muestras, coste, seguridad, toxicidad y proporción utilizada respecto a la fase móvil, incluso su ecología. Entre estos factores, la primera decisión a tomar por el

⁷⁷ Anastas, P.T. y Warner, J.C.: *Green Chemistry, Theory and Practice*. Editorial Oxford University Press, Nueva York, 1998.

cromatografista en términos globales es la compatibilidad del *cocktail* de centelleo con las muestras. Es posible analizar solutos que no se hayan solubilizado totalmente en el *cocktail*, pero, sin duda, es mejor que lo hagan del todo, a ser posible con el solvente primario: de esta forma el analito estará en fase homogénea. Una fase no homogénea implica un estado multifase de difícil predicción y los radionúclidos que pudiesen precipitar serán adsorbidos o quedarán en una fase distinta, mostrando menores eficiencias. La capacidad de muestra por el *cocktail* se expresa en porcentaje:

$$\text{capacidad (\%)} = 100 \frac{\text{analito (ml)}}{\text{analito (ml)} + \text{cocktail (ml)}} \quad (141)$$

Aplicaciones con detección radiométrica homogénea

La detección radiométrica es una herramienta fundamental para el seguimiento de moléculas marcadas en fármacos y metabolitos, en procesos de monitorización y biotransformación *in vivo* o *in vitro*, casi siempre en matrices complejas, como tejidos, sangre y orina. Su especificidad y sensibilidad son el principal argumento a favor de la detección radiométrica, aunque la renuencia a trabajar con isótopos radiactivos ha buscado sustituirla por otros métodos igualmente específicos y sensibles, como la fluorimetría y la espectrometría de masas, métodos que, sin embargo, también presentan ciertas insuficiencias: por ejemplo, LC-MS, técnica potentísima sobre el papel para monitorizar metabolitos y biodisponibilidades, se ha demostrado poco eficaz cuantitativamente, por diferir la ionización de cada metabolito. Sin embargo, la respuesta de un detector radiométrico es directamente proporcional a la concentración de los analitos (metabolitos) manteniendo las mismas condiciones de trabajo. Las técnicas de HPLC capilar, *microbore* y UHPLC contribuyen, además de su proverbial ventaja de menor gasto de fase móvil, a utilizar menores cantidades de analitos radiactivos y menor cantidad de *cocktail* de centelleo: por ejemplo, una columna *microbore* de diámetro interno de 2,0 mm trabaja con flujos de 0,2 ml/min, alcanzando sensibilidades cinco veces superiores a las logradas con una columna analítica de diámetro interno de 4,6 mm trabajando con flujos de 1 ml/min, y una columna más estrecha, de diámetro interno de 0,5 mm, aumenta la sensibilidad 50 a 100 veces. En esas condiciones, la cantidad de fase móvil es mucho menor, así como la del *cocktail*, que suele triplicar la de fase móvil.

7.11. Detectores viscosimétricos

La determinación de la viscosidad de muestras poliméricas interesa particularmente en áreas de polímeros, alimentación, industria pesada y petróleos para

establecer pesos moleculares. Las aplicaciones de HPLC (GPC) con detección viscosimétrica se han expandido desde básicas determinaciones físico-químicas a procesos, control y garantía de calidad. La característica más obvia de las soluciones de polímeros de alto peso molecular es su viscosidad, mayor que la de los disolventes puros y como tal se puede medir, incluso en concentraciones diluidas⁷⁸. Históricamente la viscosimetría, realizada sobre capilares de vidrio y tiempo de goteo en viscosímetros de tipo Ubbelohde, Ostwald, Cannon-Fenske o Schott, ha sido la técnica de elección para determinar pesos moleculares de polímeros⁷⁹. Aun subsisten estos viscosímetros por goteo, limitados por su lentitud operativa, pues precisan una limpieza a fondo entre cada muestra, así como el estrecho intervalo dinámico de las viscosidades que exhiben. Afortunadamente la detección viscosimétrica en HPLC (o GPC) es capaz de determinar viscosidades con exactitud y rapidez⁸⁰.

La influencia real de los analitos en solución sobre la viscosidad de las muestras se manifiesta en varios parámetros de viscosidad (tabla 43), el primero de los cuales es la *viscosidad intrínseca* ($[\eta]$ ó *IV*), que relaciona la viscosidad con el peso molecular y las diferencias moleculares estructurales intrínsecas. Otro parámetro de medida básico es la *viscosidad relativa* (η_{rel} ó *RV*), cociente de la viscosidad de la solución dividida por la viscosidad del disolvente, por lo que resulta adimensional y sin variaciones debidas a la temperatura y viscosidad del disolvente. A partir de la viscosidad relativa se puede calcular el resto de viscosidades en solución: la *viscosidad específica* (η_{sp}), que expresa la contribución del analito al aumento de viscosidad de la solución, pues sustrae la viscosidad del disolvente a la de la solución de muestra, normalizándola luego respecto a la concentración del analito; la *viscosidad reducida* (η_{red}) y la *viscosidad inherente* (η_{inh}), que eliminan los efectos debidos a pequeñas variaciones de concentración de la muestra al dividirse por ésta última; finalmente, su extrapolación a *dilución infinita* permite obtener la deseada *viscosidad intrínseca* ($[\eta]$)⁸¹.

⁷⁸ Van Krevelen, D.W.: *Properties of Polymers*. Editorial Elsevier, Amsterdam, 1990.

⁷⁹ Wu, C.S., Ed.: *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*. Editorial Marcel Dekker, Nueva York, 2004.

⁸⁰ Mon, S. y Barth, H.G.: *Size Exclusion Chromatography*. Editorial Springer-Verlag, Berlín, 1999.

⁸¹ Walton, D. y Lorimer, P.: *Polymers*. Editorial Oxford Science Publishers, Oxford, 2000.

Tabla 43. Definiciones de los parámetros de viscosidad⁸².

Parámetro y definición	Unidades	Símbolo
viscosidad de una solución	cp, centipoises	η
viscosidad del solvente	cp, centipoises	η_0
viscosidad relativa	adimensional	η_{rel}
$\eta_{rel} = \eta / \eta_0$		
viscosidad específica	adimensional	η_{sp}
$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = (\eta - \eta_0) / \eta_0$		
viscosidad reducida	dl/g	η_{red}
$\eta_{red} = \eta_{sp} / c$		
viscosidad inherente	dl/g	η_{inh}
$\eta_{inh} = (\eta_{rel}) / c$		
viscosidad intrínseca	dl/g	$[\eta]$
$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{rel}) / c$		

Los detectores viscosimétricos miden en continuo la viscosidad intrínseca ($[\eta]$) para determinar el peso molecular, distribución y tamaño de polímeros en soluciones diluidas mediante la *ecuación de Mark-Houwink* (otras veces denominada de *Mark-Houwink-Sakurada* o de *Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada*), que relaciona la viscosidad ($[\eta]$) con el peso molecular (M) y el *parámetro de conformación del polímero* (a):

$$[\eta] = KM^a \quad (142)$$

Las medidas de la viscosidad intrínseca, inherente, relativa, reducida y absoluta se utilizan como procedimiento de control en la determinación de pesos moleculares de polímeros, sustituyendo imparablemente a los viscosímetros tradicionales por goteo (de Ubbelohde o similares) que precisan para hallar la viscosidad preparar diluciones a diferentes concentraciones, medir y calcular los valores de viscosidad reducida y de viscosidad inherente, representarlos gráficamente (en una gráfica de Higgins) y extrapolarlos a concentración cero para determinar la viscosidad intrínseca, que la ecuación de Mark-Houwink relacionará con el peso molecular⁸³.

⁸² Brandrup, J. e Immergut, E.H., Eds.: *Polymer Handbook*. Editorial Wiley, Nueva York, 1989.

⁸³ Striegel, A.M., Yau, W.W., Kirkland, J.J. y Bly, D.D.: *Modern Size Exclusion Chromatography*, Segunda edición. Editorial Wiley, Nueva York, 2009.

Instrumentalmente un detector *viscosimétrico relativo* de HPLC monta dos capilares de acero inoxidable, monitorizando el primero la presión diferencial (P_1), siendo el capilar de referencia, cebado con solvente, mientras que por el segundo capilar (P_2) pasa el eluyente con los analitos. La medida de presión en ambos capilares (P_1 y P_2) permite hallar la viscosidad del eluyente, según la *ley de Poiseuille*, condicionada por el flujo (F) y una constante geométrica de capilaridad (k):

$$P_1 = k_1 F \eta_0 \quad ; \quad P_2 = k_2 F \eta \quad (143)$$

Considerando la longitud (L) y radio interno (R) de ambos capilares:

$$k_1 = \frac{8L_1}{R_1^4} \quad ; \quad k_2 = \frac{8L_2}{R_2^4} \quad (144)$$

En igualdad de flujo (F), el cociente de las señales de ambos transductores de presión puede determinar la viscosidad relativa (η_{rel}), en unidades de volumen por unidad de masa, que representa el volumen específico de moléculas en solución (y es inversa a la densidad molecular):

$$\frac{P_1}{P_2} = \frac{k_2 F \eta_0}{k_1 F \eta} = \frac{k_2}{k_1 (\eta/\eta_0)} = K \eta_{rel} \quad (145)$$

$$\eta_{rel} = \frac{1}{K} \cdot \frac{P_2}{P_1} \quad (146)$$

La constante instrumental de un viscosímetro $K=k_2/k_1$ relaciona matemáticamente las constantes geométricas de ambos capilares y debe determinarse experimentalmente antes de cada inyección como cociente de sus señales de presión al pasar disolvente puro por ambos capilares:

$$K = \left(\frac{P_2}{P_1} \right)_{\text{fondo del solvente}} \quad (147)$$

En consecuencia, la viscosidad relativa (η_{rel}) que muestra un detector viscosimétrico relativo de doble capilar resulta independiente del flujo empleado, exhibiendo su señal escasísimo ruido en la línea de base de los cromatogramas, ruido provocado principalmente por los pulsos del sistema de bombeo. De este modo proporciona medidas con alta sensibilidad ($1 \cdot 10^{-4}$ unidades de η) que permiten determinar la viscosidad intrínseca con un solo punto de medida. También obvia las fluctuaciones causadas por variaciones de temperatura al medir simultáneamente la viscosidad de disolvente y muestras en un mismo entorno, y exhibir el cociente de ambas señales de presión (P_2/P_1). Por otra parte, la viscosidad intrínseca (IV),

propiedad física fundamental del polímero (como su peso molecular y tamaño), se relaciona con su *volumen hidrodinámico* (V_h) en solución (volumen definido por su peso molecular y tamaño), expresándose el tamaño de los polímeros en solución en función de su *radio de giro* (R_g^3). En 1967 Benoit demostró que la detección viscosimétrica permite trabajar en GPC con *calibración universal* para cualquier polímero independientemente de su estructura, sustituyendo las tediosas calibraciones convencionales con baterías de patrones de peso molecular conocido.

En 1983 Haney desarrolló un detector viscosimétrico de cuatro capilares para medir la viscosidad intrínseca (η_{sp}) en flujo continuo, en un diseño de capilares análogo a un puente de Wheatstone eléctrico (figura 104), donde la fase móvil procedente de la columna llena tres capilares R_1 , R_2 y R_3 , mientras un reservorio con solvente puro ceba R_4 , proporcionando el cociente de presiones P_1 y P_2 la viscosidad intrínseca en condiciones de dilución infinita, y relacionando el cálculo de la concentración (c) la viscosidad intrínseca (η_{sp}) con la viscosidad de la solución (η):

$$\eta_{sp} = 2 \frac{P_1}{P_2} \quad (148)$$

$$[\eta] = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad ; \quad c = \frac{\eta_{sp}}{[\eta]} \quad (149)$$

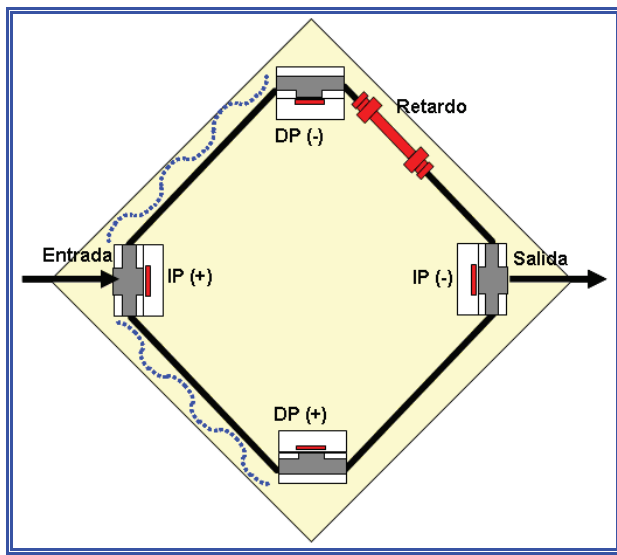


Figura 104. Esquema de un detector viscosimétrico de cuatro capilares.

El detector viscosimétrico de cuatro capilares de Haney se comercializó al año siguiente, en 1984, con deslumbrantes capacidades: trabajando en condiciones cromatográficas muy diversas podía efectuar cálculos de viscosidad intrínseca, pesos moleculares, tamaños moleculares (R_g) y constantes de Mark-Houwink, junto con la conformación, ramificación y agregación de los polímeros. Además, se podía unir a sistemas cromatográficos de alta temperatura (150° C) mediante una línea termostatzada desde la columna, o bien unirse directamente a detectores refractométricos o de *light scattering*, en serie o en paralelo. Por otra parte, su gran celda (de 50 μ l) era fácil de purgar y limpiar, exhibiendo buena relación señal - ruido, emitiendo señal "normal" (analógica) para un registrador externo. Aunque caro, inmediatamente tuvo gran éxito y complementó los detectores existentes de *light scattering* para GPC, que miden pesos moleculares *directamente* sin calibración en columna, mientras el detector viscosimétrico podía analizar prácticamente *todos* los polímeros y determinar sus factores estructurales (ramificación y conformación), además de sus pesos moleculares mediante calibración universal.

Posteriormente, en 1990, comenzó a comercializarse un detector de viscosidad sencillo, que gozó de escasa difusión por su diseño simplista, sin zona de referencia, que impedía obviar en él los pulsos de las bombas, exigiendo instalar uno o varios *damper*. Ocasionalmente exhibía resultados anómalos al pasar el polímero por su celda (el capilar de medida), generando una sobrepresión que desplazaba los picos del cromatograma, en el *efecto LeSec*⁸⁴.

7.12. Detectores de light scattering

Los detectores de *light scattering* pueden detectar el 80% de los polímeros, excepto los ramificados, sin mostrar tampoco resultados sobre su conformación. Cuando una fuente de radiación emite un haz que interacciona con las partículas de los analitos, parte de esa radiación se puede reflejar, absorber, transmitir o dispersar. En este último caso la *dispersión de la radiación (light scattering)* puede estimarse como medida de emisión de dos modos (figura 105): en primer lugar, a un ángulo lo más apartado posible al de incidencia, normalmente a 90° ó 120°; en segundo lugar, a ángulos múltiples. Además, desde un punto de vista instrumental, existen dos tipos genéricos de detectores de *light scattering*: los analíticos *detectores evaporativos de light scattering* y los *detectores láser de light scattering*, aplicados en análisis de macromoléculas por GPC.

⁸⁴ J. Lesec, M. Millequant, T. Havard, *Single-capillary Viscometer Used for Accurate Determination of Molecular-weights and Mark-Houwink Constants*, ACS Symp. Ser., 521 (1993) 220-230.

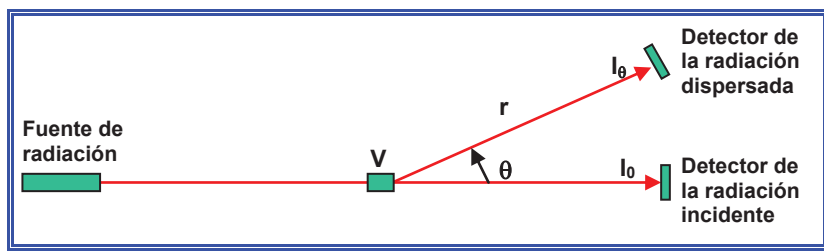


Figura 105. Fundamento de las medidas de *light scattering*.

Detectores evaporativos de *light scattering*

Detectar analitos carentes de absorción ultravioleta-visible, cualidades conductimétricas o electroquímicas supedita inicialmente su detección a realizarla con detectores universales refractométricos en cualquiera de sus variantes, que, como ya vimos, resulta poco sensible y muy dependiente de eventuales variaciones de la temperatura externa y del propio sistema cromatográfico, siendo, además, incompatible con gradientes de elución. La búsqueda de mejores alternativas que posibiliten el análisis de moléculas tan importantes como azúcares, polímeros, ácidos grasos y aminoácidos condujo a la búsqueda de un detector óptico basado en los efectos dispersivos (*light scattering*) que toda sustancia posee sobre una radiación. Así pues, se trata de un modo de detección universal, cuyo primer prototipo, aparecido en 1978, era capaz de estimar la energía luminosa dispersada por las micropartículas sólidas o líquidas del analito en una fase gaseosa o *spray*, permitiendo la detección de cualquier compuesto, incluso los poco o nada volátiles. El detector precisa nebulización previa del eluyente (con los analitos), seguida de la evaporación de la fase móvil. Los solutos no volatilizados forman una niebla de micropartículas que atraviesa un haz luminoso, dispersando dicha radiación, cuya intensidad constituye la señal del detector. Sobre ésta influyen diversos factores, como la matriz y distribución de gotículas en la zona nebulizada, la fuente de radiación, la elección del ángulo donde se mide la radiación dispersada emitida, la amplitud o ángulo sólido de dicha medida, etc. Las micropartículas han de tener entre 0,1 y 10 mm para dispersar la radiación de forma apreciable.

La primera generación de detectores evaporativos de *light scattering* fue inmediatamente bautizada con el periodístico nombre de *detectores de masa* o *detectores mágicos* por su capacidad de exhibir respuesta mágica ante series homólogas, sustituida con el tiempo por el nombre actual de *detector de light scattering evaporativo*. Cronológicamente, desde la entrada en él del eluyente con los analitos, el detector monta tres zonas: un sistema de nebulización neumática del eluyente líquido procedente de la columna cromatográfica, un tubo evaporador termostático que evapora la fase móvil y un detector alejado del eje de la radiación

incidente, normalmente un fotomultiplicador emplazado a 90 ó 120 grados de la fuente de radiación, que entrega la señal a la electrónica del equipo. Los analitos no volátiles presentan una fina distribución de micropartículas que dispersa la radiación incidente.

La cámara de nebulización elimina las gotículas de tamaño superior al óptimo, que quedan adheridas al tubo central y luego elimina un sifón (figura 106), formando una niebla homogénea que avanza hacia el tubo evaporador, donde se volatilizan los solventes. Un aporte de gas adicional colateral (aire) consigue un efecto concéntrico y concentrador frente al haz de la fuente de radiación.



Figura 106. Cámara de nebulización.

Es preciso evaporar totalmente el solvente, evitando la volatilización de los analitos. El tiempo total que tardan los analitos en nebulizarse formando el spray depende de la temperatura en el tubo evaporador, del radio de las partículas nebulizadas y de la misma volatilidad del soluto. Cuando la temperatura del tubo sobrepasa un valor límite se produce una enorme caída de la señal del detector. Dicha temperatura límite será aún menor para concentraciones menores de analito (o diámetros inferiores), por lo que debe evitarse esa temperatura límite (dependiente de la concentración) aplicando temperaturas algo inferiores (o emplear tubos evaporadores de mayor diámetro), que permitirán la eliminación total del eluyente (45° C si la fase móvil es agua). Detectores con tubos evaporadores más cortos o con temperaturas superiores podrían degradar térmicamente algunos analitos o volatilizarlos parcialmente, con la correspondiente pérdida de señal. Un alto aporte de gas nebulizador (2 litros/minuto) garantiza tiempos cortos de permanencia en el detector (2 segundos).

Con ello los detectores evaporativos de *light scattering* presentan innegables ventajas para el cromatografista: fácil manejo, detección universal, evaporar los eluyentes a baja temperatura, trabajar sin degradaciones térmicas, ser compatibles con sales sublimables y aceptar solventes que absorben la radiación UV, aunque quizá su principal ventaja sea poderlos utilizar con gradientes de elución. Asimismo, pueden adaptarse en técnicas de HPLC, LPLC o SFC, en un amplio

espectro de determinaciones de, entre otros, azúcares, triglicéridos (figura 107), ácidos, grasas, lípidos, fosfolípidos, polímeros, esteroides, alcaloides, tensoactivos, lubricantes y polietilenglicoles de interés cosmético.

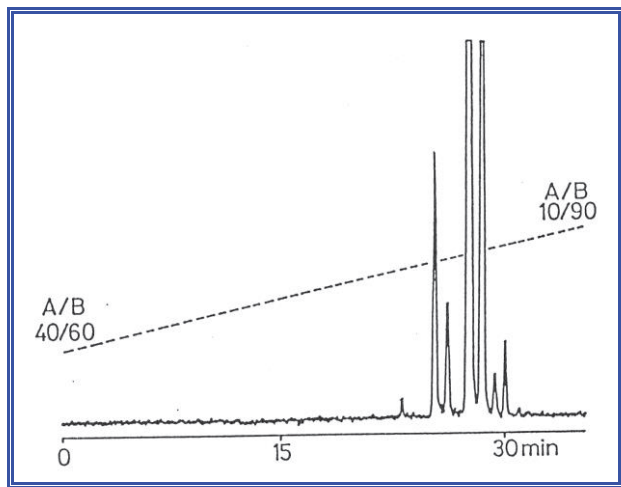


Figura 107. Análisis de los triglicéridos de aceite de oliva con gradiente de elución: de izquierda a derecha, triglicéridos de los ácidos linoleico, palmítico, linolénico, oleico, mirístico y esteárico, en columna Zorbax ODS de 25 cm x 9,4 mm y diámetro de partícula de 7 μm . Volumen de inyección, 20 μl . Flujo, 1,5 ml/min. Fase móvil: A, acetonitrilo; B, cloruro de metileno. Temperatura del detector y columna: 30° C.

Detectores de light scattering láser para GPC

Light scattering es la detección de elección en la determinación de pesos moleculares de macromoléculas en solución⁸⁵, gobernada por la ecuación de Rayleigh, donde la *relación Rayleigh* (R_θ) relaciona la intensidad dispersada (I_θ , a un ángulo de dispersión θ) con la intensidad dispersada en línea con la incidente (I_0), el volumen de solución (V), cuya dispersión “ve” el detector (figura 105) y el radio hidrodinámico molecular (r):

$$R_\theta = \frac{I_\theta r^2}{I_0 V (1 + \cos^2 \theta)} \quad (150)$$

La *relación Rayleigh* (R_θ) “normaliza” la intensidad de radiación dispersada por unidad de volumen de la solución de muestra respecto a la intensidad de la

⁸⁵ McIntyre, D., Ed.: *Characterization of Macromolecular Structure*. Editorial National Academy of Science, Washington, 1968.

radiación incidente. El término $\cos^2\theta$ no precisa radiación polarizada, pero es difícil su estimación exacta en el volumen de solución (V) en las pequeñas celdas de medida propias de HPLC (GPC). También es difícil medir con exactitud la exigua relación I_θ/I_0 , por lo que la mayoría de los detectores de *light scattering* estiman la relación Rayleigh R_θ de forma relativa, sencillamente calibrando una constante instrumental K .

$$R_\theta = K \frac{I_\theta}{I_0} \quad (151)$$

Cuando las moléculas dispersantes son de dimensiones mucho menores que la longitud de onda de la radiación incidente las moléculas se comportan virtualmente como un punto de dispersión de la radiación, resultando una dispersión simétrica y permitiendo igualar $R_\theta \cong R_0$ sin error. La exactitud de la ecuación de Rayleigh depende del ángulo θ y del tamaño de la macromolécula: por ejemplo, un ángulo θ de 90 grados exhibe R_θ menor de 15 nm, que es el radio molecular de las macromoléculas lineales de 150.000 dalton, mientras que en moléculas esféricas, como las proteínas, un R_θ de 15 nm se corresponde con pesos moleculares de 25 millones de dalton. Sin embargo, las grandes macromoléculas exhiben dispersión de la radiación asimétrica y R_0 puede estimarse a partir de la función de dispersión (P_θ):

$$P_\theta = \frac{R_\theta}{R_0} \quad (152)$$

En este contexto existen tres formas de obtener R_0 (o P_θ), que se corresponden con los tres tipos de detectores comerciales de *light scattering* de HPLC (o GPC) existentes: detectores láser de *light scattering* de ángulo bajo (LALLS, *Low Angle Laser Light Scattering System*), también conocidos como SALLS (*Small Angle Laser Light Scattering System*); detectores láser de *light scattering* de ángulo múltiple (MALLS, *Multiple Angle Laser Light Scattering System*), y detectores láser de *light scattering* de ángulo recto (RALLS, *Right Angle Laser Light Scattering System*).

Detectores LALLS (SALLS)

En 1971 Kaye dispuso por primera vez una fuente láser en determinaciones de dispersión, pensando que la escasa luz difusa emitida por el láser permitiría medir mejor la intensidad de la radiación dispersada tras atravesar pequeños volúmenes de polímeros en solución. Emplazando un detector (un fotomultiplicador) en un ángulo bajo respecto a la dirección del haz incidente, logró mejorar sustancialmente las medidas de *light scattering*, simplificándolas, así como sus cálcu-

los⁸⁶. Cuatro años después, en 1975, surgía el primer detector comercial de *light scattering* de este tipo para GPC, llamado inmediatamente *detector láser de light scattering de bajo ángulo* (LALLS, *Low Angle Laser Light Scattering System*), con respuesta proporcional al peso molecular, permitiendo determinar la distribución de pesos moleculares sin calibración en columna. Enseguida se dispuso en serie con un detector de concentración (refractométrico o espectrofotométrico), que complementaba la determinación directa de distribuciones de pesos moleculares de polímeros con su concentración. Los detectores LALLS llegaron a ser muy populares, siendo durante algún tiempo los *únicos* detectores láser de *light scattering* en GPC, aunque posteriormente su difusión experimentó cierto declive, tanto por motivos instrumentales (limitada sensibilidad por la oscilación de su señal, complicado mantenimiento y difícil puesta en marcha) y comerciales (alto precio y política comercial de los fabricantes). Resurgido, permite determinar pesos moleculares, aunque en él las moléculas pequeñas exhiben poca sensibilidad y se torna ruidoso con la presencia de partículas de polvo en su celda. Los detectores LALLS/SALLS comerciales emplean radiación polarizada verticalmente, permitiendo simplificar la ecuación de Rayleigh en:

$$R_{\theta} = \frac{I_{\theta} r^2}{I_0 V} \quad (153)$$

La constante óptica (K) de la ecuación de Rayleigh es independiente del *scattering*, tomando el valor:

$$K = \frac{2\pi^2 n^2}{\lambda^4 r^2 N} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (154)$$

El incremento relativo del índice de refracción específico (dn/dc) debe estimarse a la misma longitud de onda con que se realizan las medidas de *light scattering*. El término (dn/dc) se determina gráficamente, representando $(n_i - n)/c$ frente a c_i y extrapolando a concentración cero, siendo n el índice de refracción del disolvente y n_i el índice de refracción de cada concentración c_i . De este modo se obvia la contribución debida al disolvente del total de la solución, puesto que la finalidad de la detección es medir el poder dispersante de polímeros y macromoléculas, denominándose el resultado de tal sustracción *factor Rayleigh por exceso* (R_{θ}):

$$R_{\theta} = R_{\theta \text{ solución}} - R_{\theta \text{ solvente}} \quad (155)$$

Así la ecuación de Rayleigh da lugar a otra expresión con dos variables, el ángulo de medida (θ) y la concentración (c), requiriendo doble extrapolación (en el

⁸⁶ Ready, J.F.: *Effects of High Power Laser Radiation*. Editorial Academic Press, Nueva York, 1972.

método conocido como *gráfica de Zimm*) para obtener el peso molecular promedio (M_w), de radio r^2 y segundo coeficiente viral (A_2), fijando el ángulo sólido de la detección entre el fotomultiplicador y la cubeta de muestras:

$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c \quad (156)$$

Si R_θ se mide en ángulos bajos (inferiores a 7 grados) con radiación coherente y monocromática, $P(\theta)$ toma un valor cercano a la unidad, con lo que:

$$\frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c \quad (157)$$

De esta forma puede determinarse el peso molecular promedio (M_w) a partir del ángulo dispersado. Las medidas de los detectores LALLS no aportan información sobre el radio de giro molecular, pero dispuestos en serie con un detector de *concentración* (refractométrico o espectrofotométrico) permiten estimar los valores de R_θ y c para cada valor de volumen de elución. La ecuación anterior permite determinar gráficamente (en las gráficas de Zimm) el peso molecular del analito a partir de la constante óptica K y del segundo coeficiente viral. Con una resolución ideal, la concentración (c_i) y el peso molecular para cada incremento dado del volumen de elución (M_i) es:

$$M_x = \frac{\sum c_i M_i^x}{\sum c_i M_i^{x-1}} \quad (158)$$

Los valores de x determinan el parámetro de peso molecular calculado. Cuando $x=0$, entonces $M_x=M_n$, denominándose M_n *peso molecular promedio en número*. Cuando $x=1$, entonces $M_x=M_w$, denominándose M_w *peso molecular promedio en peso*. Cuando $x=2$, entonces $M_x=M_z$, denominándose M_z *peso molecular promedio "z"*, y cuando $x=3$, entonces $M_x=M_{z+1}$, denominándose M_{z+1} *peso molecular promedio "z+1"* (tabla 44).

Tabla 44. Cálculos de pesos moleculares en HPLC-GPC.

x	equivalencia	peso molecular calculado (tipo)
x=0	$M_x=M_n$	peso molecular promedio en número
x=1	$M_x=M_w$	peso molecular promedio en peso
x=2	$M_x=M_z$	peso molecular promedio "z"
x=3	$M_x=M_{z+1}$	peso molecular promedio "z+1"

Sin embargo, la resolución cromatográfica pocas veces es ideal y la resolución *real* modifica la ecuación previa en:

$$M_x = \frac{\sum c_i M_{wi}^x}{\sum c_i M_{wi}^{x-1}} \quad (159)$$

También es importante conocer el grado de ramificación de los polímeros, que los detectores viscosimétricos expresaban como *índice de ramificación de Zimm-Stockmayer* (g'), calculado a partir de las viscosidades del polímero ramificado (η_b) y lineal (η_l) de un mismo peso molecular:

$$g' = \left(\frac{\eta_b}{\eta_l} \right)_M \quad (160)$$

Los detectores LALLS modifican esta expresión en la siguiente, aplicable cuando la calibración universal resulta válida y que contempla los pesos moleculares del polímero ramificado (M_i) y lineal (M_b), el volumen de elución (V_i) y el exponente de la ecuación de Mark-Houwink del polímero lineal (a).

$$g' = \left(\frac{M_i}{M_b} \right)_{V_i}^{a+1} \quad (161)$$

Detectores MALLS

Casi dos décadas después de la aparición del detector LALLS, primer detector comercial de *light scattering* para GPC, en 1984 surgió un prototipo de *detector láser de light scattering de ángulo múltiple* (MALLS, *Multiple Angle Laser Light Scattering System*) con medidas de dispersión simultáneas a 15 ángulos (figura 108), capaz de mostrar mayor sensibilidad, señal más estable a ángulos altos y no precisar limpieza frecuente de su celda ante la eventual presencia de polvo⁸⁷. Los detectores MALLS se utilizan especialmente en determinaciones de polímeros de altos pesos moleculares, cuya dependencia angular, que condiciona su radio molecular, es limitada; asimismo se utilizan para determinar pesos moleculares de polímeros condensados (poliestirenos) menores de 150.000 dalton y R_g de unos 15 nm, que presentan poca o ninguna dependencia angular.

⁸⁷ Wyatt, P. J., Jackson, C. y Wyatt, G. K., Am. Lab., 20 (5) (1988), 86.

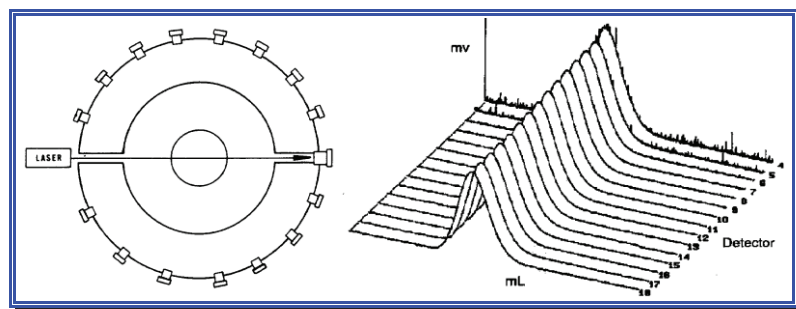


Figura 108. Arquitectura de un detector MALLS de 16 detectores con el cromatograma tridimensional resultante.

Detectores RALLS

Posteriormente, en 1992, apareció el primer *detector láser de light scattering de ángulo recto* (RALLS, *Right Angle Laser Light Scattering System*), cuyo detector (un fotomultiplicador) opera a 90° de la fuente láser, mostrando ciertas ventajas sobre los anteriores diseños: ser más compacto, sencillo y económico, mayor sensibilidad (90° es el ángulo que exhibe máxima relación señal – ruido), así como mejor precisión instrumental (figura 109). Entre sus desventajas, los detectores RALLS solo actúan como detectores de HPLC, mientras que los otros diseños pueden trabajar como espectrofotómetros de *light scattering* de sobremesa. Además, la señal de los detectores RALLS precisa correcciones, por la viscosidad de las muestras. Empero, estos detectores complementan muchas veces la señal de los detectores viscosimétricos. Su fuente de radiación es un diodo láser visible de baja potencia, con volumen de celda de $10 \mu\text{l}$. Su único fabricante (*Viscotek Co.*, luego absorbido por *Malvern Instruments Ltd.*) abandonó su fabricación en el año 2001 en favor de detectores LALLS/SALLS combinados con detección viscosimétrica.



Figura 109. Esquema de un detector RALLS.

Triple detección en GPC

Esta detección múltiple combina un detector viscosimétrico, otro de *light scattering* y otro convencional (refractométrico o espectrofotométrico UV-VIS), logrando medidas directas de viscosidad intrínseca, distribución de tamaño de muestras poliméricas sin necesidad de curvas de calibración y pesos moleculares muy precisos, propiedades físicas de los analitos estimadas directamente sin influencia de la mayoría de las variaciones experimentales usuales en HPLC (GPC), como cambios de flujo, ensanchamiento de los picos, degradación columnar, etc. El peso molecular y la viscosidad intrínseca permiten calcular el radio hidrodinámico y el radio de giro de las moléculas de cadena lineal, parámetros necesarios para estudiar con precisión la conformación y ramificación de las muestras poliméricas.

Alinear en serie tres detectores independientes separados sería en principio complejo y costoso, y su puesta en marcha llevaría mucho tiempo, aparte de precisar tres ordenadores para la adquisición de datos y cálculos posteriores, uno por detector. El desarrollo de detectores triples y un único *software* que procesa conjuntamente la señal de los tres detectores, combinarlas y superponerlas, permite desarrollar en menos tiempo y más sencillamente metodicas de determinación de tamaños y pesos moleculares, así como viscosidades intrínsecas, ventajas que han relegado la opción de tres detectores independientes. Las medidas de un triple detector son absolutas, no requieren calibración en columna y proporcionan resultados exactos y precisos de, entre otros, pesos moleculares, viscosidad intrínseca, valores de a y K , α , K' y R_g en cálculos de ramificación y de conformación de los polímeros. La principal ventaja de estos detectores reside en su flexibilidad, pues si fuese inviable utilizar alguno de los tres detectores, se puede trabajar con los dos restantes. La triple detección permite comprender mejor las estructuras poliméricas, exigencia de este nuestro "mundo de plásticos", al comparar sus respuestas en los tres detectores: como sabemos, la respuesta del detector de *light scattering* es proporcional al peso molecular y la concentración, mientras que la del detector viscosimétrico lo es respecto a la viscosidad intrínseca y la concentración; como la respuesta de ambos es proporcional a la concentración de las muestras, exigen combinarlos con un detector de concentración (generalmente refractométrico, aunque podría ser espectrofotométrico). Los sistemas triples con detección refractométrica, viscosimétrica y de *light scattering*, monitorizan continuamente en los tres detectores la señal del eluyente con los analitos poliméricos en tres dimensiones, que, juntas, describen muy bien la estructura molecular: la primera dimensión es el propio proceso cromatográfico (GPC), que separa los polímeros por su peso molecular; la segunda dimensión es la respuesta del detector de *light scattering*, función del peso molecular, mientras que la tercera dimensión es la del detector viscosimétrico, inversa a la densidad molecular (figura 110).

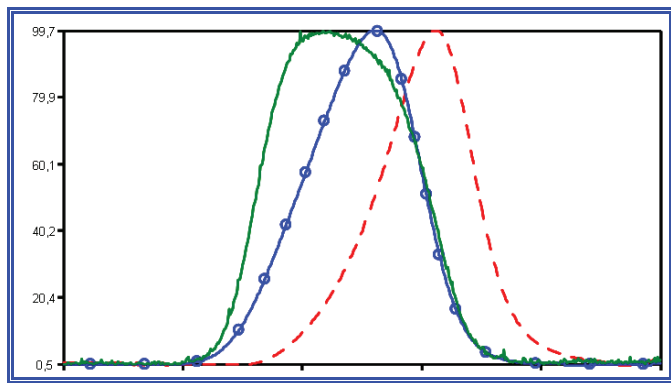


Figura 110. De izquierda a de derecha, señales relativas de un triple detector de *light scattering*, viscosimétrico y refractométrico (dn/dc : 0,138) de una muestra de ácido poliacrílico en concentración 2,210 mg/ml, con columna TSK PWxL, fase móvil 10% de acetonitrilo en agua con 50 mM de Na_2SO_4 , flujo 0,800 ml/min y volumen de inyección de 100 μl .

7.13. Detectores de quimioluminiscencia

La detección mediante quimioluminiscencia en un detector de quimioluminiscencia (CLD, *Chemiluminescence Detection*, *Chemiluminescence Detector*) hace reaccionar selectivamente algunos de los analitos de la muestra (en la fase móvil eluída) con un reactivo específico para formar un compuesto emisor de radiación *quimioluminiscente*, en una reacción (química) de derivatización post-columna que sustituye la excitación característica de la fluorescencia, aminorando la inconveniente radiación difusa (*light scattering*) y el ruido de fondo. Además, la excitación química de la quimioluminiscencia conlleva un detector de diseño más sencillo, más sensible y con mayor intervalo dinámico que los detectores fluorimétricos convencionales, permitiendo detectar cantidades muy pequeñas (10^{-15} moles) con reactivos de quimioluminiscencia de alta eficiencia, haciendo de la detección por quimioluminiscencia una buena alternativa de detección en HPLC, con alta sensibilidad y alta selectividad, ideal para analitos que coeluyen o se hallan en matrices complejas.

La quimioluminiscencia, menos usada y conocida que la fluorescencia, compite con ésta y ambas con la detección radiométrica, recomendándose para determinaciones en que una detección inicial espectrofotométrica o fluorimétrica precisa límites de detección mucho menores. A diferencia de la fotoluminiscencia, como la emisión fluorescente, la quimioluminiscencia genera una señal homogénea, muy poco dispersa, y aporta exigua señal de fondo (ruido) a la línea de base de los cromatogramas.

Sin embargo, la detección mediante quimioluminiscencia presenta dos inconvenientes: en primer lugar, exige derivatización post-columna, emplazando una T de mezcla en la salida de la columna, donde el reactivo quimioluminiscente se une al eluyente, así como una bomba impulsora del reactivo quimioluminiscente, que supone un gasto adicional y también su eliminación posterior. El segundo inconveniente es que la detección por quimioluminiscencia resulta destructiva para las muestras, soslayada, sin embargo, instalando un divisor de flujo o *splitter* previo al detector, como en la detección radiométrica. La reacción química que causa la quimioluminiscencia obvia la fuente de radiación con su posterior selector que excita el analito en los detectores fluorimétricos; Ocasionalmente puede detectarse quimioluminiscencia con éstos, anulando la radiación de excitación, a veces mediante “bricolaje instrumental” manual. Los fotones procedentes de la desactivación por emisión quimioluminiscente se detectan contra un *fondo limpio* sin radiación en el fotomultiplicador, resultando relaciones señal - ruido muy altas, bienvenidas en determinaciones de trazas en lípidos, nucleótidos, óxidos nitrosos (NO_x) y catecolaminas.

El *rendimiento cuántico de quimioluminiscencia*, análogo al *rendimiento cuántico de fluorescencia*, estima la eficiencia de la reacción de quimioluminiscencia, con valores entre 10⁻¹⁵ (quimioluminiscencia apenas perceptible) hasta casi la unidad. El rendimiento cuántico de quimioluminiscencia engloba dos eficiencias: la fracción de moléculas del analito que produce la molécula excitada y la eficiencia luminiscente. La *quimioexcitación* que provoca la quimioluminiscencia es un proceso rápido, de prácticamente la misma duración que la fotoexcitación de la fluorescencia, por lo que acota el tiempo en que se mezclan los reactivos en la reacción previa (de derivatización) y se detecta la quimioluminiscencia resultante, que disminuye hasta el consumo total del reactivo inductor de quimioluminiscencia.

Modos de detección quimioluminiscente

Existen tres modos de análisis con detección quimioluminiscente en HPLC, el primero de los cuales y más habitual es la generación de quimioluminiscencia en una reacción post-columna, derivatizando el analito con un reactivo específico de quimioluminiscencia (luciferina, luminol), impulsado por una bomba adicional. La reacción se lleva a cabo en una cámara de reacción, desde una sencilla T hasta una espira de reacción, generalmente termostataza.

En la segunda opción, la quimioluminiscencia se produce al catalizar el analito otra emisión quimioluminiscente. Por ejemplo, así se detecta el clásico reactivo de quimioluminiscencia luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona), separado o junto a otros analitos, interferentes o que coeluyen con él. El luminol reacciona con los oxidantes, por ejemplo, con agua oxigenada (H₂O₂) en presencia de una base y un catalizador metálico, para generar 3-aminofalato (3-APA) en estado ex-

citado, molécula que emite radiación de 425 nm. Si el analito es el luminol, la bomba adicional bombea una solución con iones metálicos, por ejemplo, de cobre (II) o hierro (III), hasta la cámara de reacción, emplazada justo tras la columna, mientras que una segunda bomba de reactivo envía la solución con el oxidante (H_2O_2 , hipocloritos) y una base. El catalizador elegido condiciona el tiempo requerido para lograr máxima emisión y su evolución posterior, expresada como extinción o tiempo de vida de quimioluminiscencia, habiéndose de optimizar la distancia entre el mezclador y la celda de detección, especialmente en determinaciones que requieren alta sensibilidad.

La tercera y última opción de detección por quimioluminiscencia consiste en determinar el *quenching* o supresión de la quimioluminiscencia, gracias a una reacción por parte del analito. Esta modalidad suprime la radiación debida al fondo *quimioluminiscente*. Muchas moléculas orgánicas acomplejan cationes metálicos, catalizando menos la reacción con el luminol. Al analito, usualmente moléculas orgánicas, se adicionan concentraciones constantes de un catión metálico, luminol, una base y un oxidante, creándose un fondo de radiación constante. La salida de la columna se conecta al mezclador y la cantidad de radiación detectada disminuye conforme eluye de la columna el analito orgánico y se va acomplejando con el ion metálico, resultando la disminución de radiación proporcional a la cantidad de analito. Aunque el exceso de ion metálico no se acompleje completamente, la radiación permanece constante, sin disminuir. El sistema se configura como antes, con el catalizador metálico procedente de una primera bomba de reactivo, emplazando un segundo mezclador antes del primero para que las moléculas orgánicas eluidas (por ejemplo, aminoácidos) tengan suficiente tiempo para cebar el sistema con el catalizador metálico antes de mezclarlo con los otros reactivos. Otra segunda bomba de reactivo adiciona luminol, base y oxidante. Cuando el complejo molécula orgánica-metal llega al segundo mezclador y luego a la celda del detector, la radiación de la línea de base decae proporcionalmente a la cantidad de analito eluido.

Instrumentalmente los detectores de quimioluminiscencia son básicamente fluorímetros modificados, normalmente con celdas inertes (de PTFE), contiguas a un fotomultiplicador de alta sensibilidad. Como hemos dicho, en una cámara de reacción se incorpora al eluyente colateralmente el reactivo luminiscente, impulsado por una sencilla bomba de pistón, generándose una emisión luminiscente, cuyos pulsos de emisión, muy rápidos y energéticos, acusa un fotomultiplicador, muy eficiente y muy próximo a la celda, en un gran ángulo sólido.

El diseño de la celda es importante en los detectores de quimioluminiscencia. Generalmente emplaza un tubo inerte, inmediatamente frente a la ventana inicial del fotomultiplicador, para optimizar la señal de la reacción quimioluminiscente producida. Otros detectores de quimioluminiscencia montan celdas de flujo en espiral, que permiten mezclar directamente en ellas el analito con el reactivo, hecho diferencial con otros detectores de HPLC.

Tabla 45. Reactivos de quimioluminiscencia.

Reactivo	Reacción	Analitos	Emisión (nm)
bipiridil-Ru(III)	reducción	aminas, alcaloides	610 (naranja)
luciferasa	oxidación	ATP- luciferina	560 (amarilla)
lucigenina	oxidación	agua oxigenada	440 (azul)
luminol	oxidación	dimetil sulfóxido	500 (verde)
luminol	oxidación	álcalis	425 (azul)
KMnO ₄	oxidación	alcaloides	600 (naranja)

La quimioluminiscencia generada es *tiempo-dependiente*: en cuanto el reactivo quimioluminiscente reacciona con el analito, alcanza un valor máximo para luego disminuir, exigiendo controlar muy bien el tiempo de respuesta del detector. Además, tras el proceso de quimioexcitación, la molécula excitada puede desactivarse emitiendo fotones (por quimioluminiscencia), pero también por desactivación térmica. Los reactivos usuales de quimioluminiscencia son luminol, lucigeneno o lofina, mientras que los oxidantes comunes son agua oxigenada, hipocloritos o ferrocianuro, empleándose generalmente como catalizador el imidazol (tabla 45).

Entre las aplicaciones más frecuentes con detección quimioluminiscente encontramos las de moléculas de nueva síntesis, principalmente las sintetizadas biotecnológicamente a partir de enzimas a temperatura ambiente.

7.14. Detectores de ultrasonidos

La espectroscopia ultrasónica de alta resolución, reciente modo no destructivo de detección en HPLC y potencialmente universal, estima simultáneamente la variación de velocidad ultrasónica de una frecuencia dada (entre 1 y 20 MHz) en régimen de flujo continuo⁸⁸, logrando sensibilidades de 200 ppb. El "detector del detector" es un pequeño transductor pulso-eco de contacto directo, con glicerina como medio de acoplamiento. Esta detección cuantitativa y cualitativa se fundamenta en la medida de velocidad y atenuación de las ondas ultrasónicas (su frecuencia, en MHz) cuando se propagan atravesando las muestras, proporcionando análisis rápidos y no destructivos de muestras muy diversas, como las determinaciones de tamaño de partícula de analitos en sistemas coloidales. Su alta resolución y gran intervalo dinámico permiten su aplicación en análisis de materiales, una amplia gama de analitos, de altos y bajos pesos moleculares, orgánicos, inorgánicos, coloides y polímeros, con la ventaja de no requerir transparencia óptica ni

⁸⁸ Petculescu, P.: *Investigation of the austenitic structures by ultrasonic spectral analysis*. NDT.net, Vol. 3, No.11, 1998.

actividad óptica de los analitos, exigidas en los detectores ópticos. Este aspecto resulta muy útil en HPLC preparativo, pues las ondas ultrasónicas son meras deformaciones mecánicas y permiten analizar sistemas ópticamente opacos.

El sonido, onda mecánica que se transmite rectilíneamente, necesita un medio para propagarse. Llamamos “sonido” a las ondas (sónicas o auditivas) de frecuencia entre 20 y 20.000 Hz, por encima de las cuales se denominan *ultrasonidos*, definidos por su velocidad, frecuencia, longitud de onda y amplitud: la primera de estas propiedades, la velocidad, es la rapidez con que la onda sónica viaja a través de un medio, medida en cm/segundo y condicionada por la densidad del medio (1.540 m/s en las ondas ultrasónicas); la frecuencia es el número de ciclos por unidad de tiempo (2 a 13 MHz en las ondas ultrasónicas); la longitud de onda es la distancia entre dos puntos en fase de una misma onda, que en las ondas ultrasónicas oscila entre 0,6 μm (en ondas de 2,25 MHz), 0,31 μm (en ondas de 5,0 MHz) y 0,15 μm (en ondas de 10,0 MHz); finalmente, la amplitud es la altura de la onda, que determina su intensidad en un tiempo dado y disminuye con la profundidad o espesor del medio atravesado.

Normalmente se utilizan *ultrasonidos pulsantes* (o “pulsados”), obtenidos mediante procedimientos de “*pulso-eco*” al generar un transductor ondas ultrasónicas discontinuas, en pulsos, que atraviesan el analito, interaccionando con él para retornar al transductor por reflexión, causada por la diferencia de impedancia acústica (z) entre el eluyente y el analito. La reflexión es mayor cuanto mayor es la diferencia de impedancia acústica entre ambos medios, no habiendo reflexión sin diferencia de impedancia acústica. Además, la falta de homogeneidad del medio puede dispersar las ondas ultrasónicas, redireccionándolas en trayectorias múltiples, haciendo que solo retorne al transductor una parte de la onda. Las medidas *pulso-eco* suelen realizarse por métodos *pulso-eco de superposición*, que colectan señales sucesivas de ecos de reflexión, luego superpuestas en un osciloscopio.

La detección ultrasónica, midiendo la velocidad ultrasónica en una celda de flujo continuo, permite caracterizar prácticamente cualquier sustancia homogénea, pues las ondas ultrasónicas se propagan a una velocidad y atenuación específicas del material que atraviesan, permitiendo su identificación y delatando sus propiedades. Los cromatogramas monitorizan valores de velocidad (o de atenuación) de las ondas ultrasónicas en el tiempo, debiendo conocerse con precisión el espesor de la celda de medida para estimar la correspondiente velocidad ultrasónica, pues la velocidad de propagación en medios homogéneos se altera al variar el *camino acústico* o distancia de propagación y, por tanto, el *tiempo de vuelo* empleado en recorrer dicho camino. Por el contrario, los medios no homogéneos presentan dispersión, obligando a distinguir entre la velocidad de propagación que presenta el medio para cada frecuencia (*velocidad de fase*) y la velocidad con que se propaga un grupo de ondas (*velocidad de grupo*).

De este modo la detección mediante espectroscopia ultrasónica de alta resolución monitoriza dos parámetros independientes: la velocidad ultrasónica y la atenuación ultrasónica. El primero de ellos, la *velocidad ultrasónica*, la determina la densidad y compresibilidad del eluyente con los analitos, lineal a bajas concentraciones de éstos y sin límite superior de saturación. Por otra parte, la *atenuación ultrasónica* la determina la dispersión y absorción de las ondas ultrasónicas por la muestra, permitiendo determinar tamaños de partículas en suspensión y pesos moleculares de polímeros en solución. Ambas variables pueden medirse simultáneamente. La figura 111 muestra un cromatograma, algunos de cuyos cuatro picos no puede detectar un espectrofotométrico UV-VIS, en tanto que la figura 112 muestra cómo el flujo de dos analitos eluidos presenta un rápido aumento de velocidad ultrasónica, diferenciando dos fracciones poliméricas de bajo peso molecular.

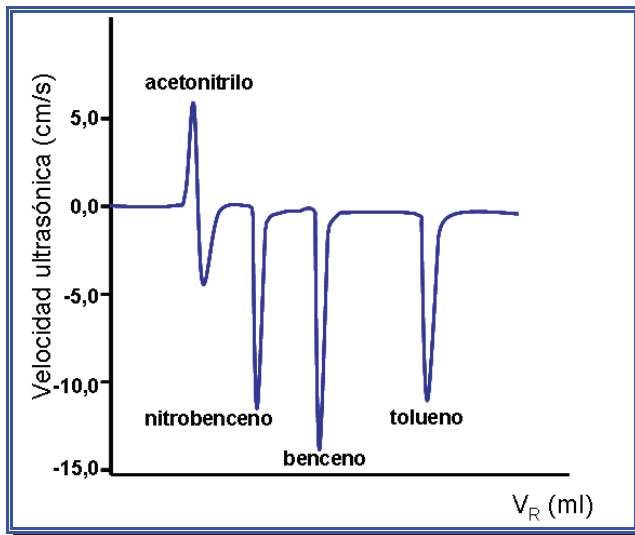


Figura 111. Cromatograma de disolventes de bajo peso molecular en columna ODS de 4,6mm x 15cm y diámetro de partícula de 5 μ m, volumen de inyección de 20 μ l, fase móvil isocrática metanol-agua 70-30, flujo de 0,8 ml/min y volumen de celda de 30 μ l.

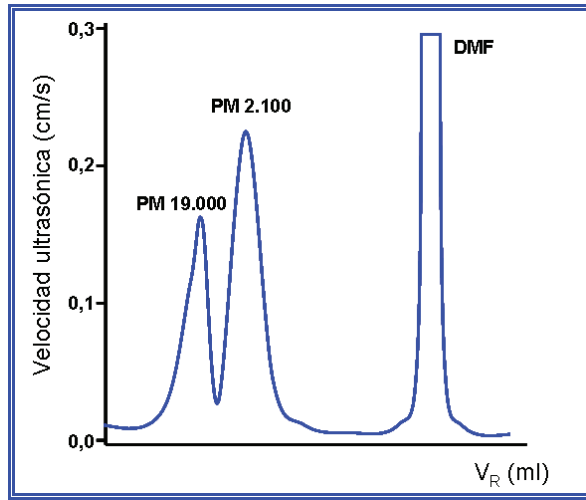


Figura 112. Cromatograma de una mezcla de dos polímeros de bajo peso molecular y dimetilformamida (DMF) disueltos en THF, en columna de GPC de diámetro de partícula de $5\mu\text{m}$, volumen de inyección de $100\ \mu\text{l}$, fase móvil isocrática 100% de tetrahidrofurano, flujo de $0,4\ \text{ml/min}$ y volumen de celda ultrasónica de $30\ \mu\text{l}$.

8. ACOPLAMIENTO DE HPLC CON OTRAS TÉCNICAS

8.1. Consideraciones generales

Las técnicas hibridadas (*hyphenated techniques*) acoplan en línea (*on-line*) un método de separación cromatográfico (HPLC, GC, también electroforesis capilar CE) con un método espectroscópico sofisticado (MS, RMN, FTIR, Raman, NIR, ICP...), incluso hay quien sostiene que esta categoría debería comprender la detección *diode array* (DAD). Denominadas *técnicas hibridadas* por proceder de dos precursores muy diferentes, en la libérrima traducción del término inglés *hyphenation*, acuñado por Hirschfeld⁸⁹ en 1980 pensando que definía perfectamente la unión de dos técnicas instrumentales, una de separación y otra espectroscópica, pues *hyphen* significa “marca de puntuación”, *hyphenated* “con guión” o “con separación” e *hyphenate* “escribir con guión”, “poseer guión”, “unir con guión” o “separar con guión”. Similarmente a un texto “*hyphenated*”, las técnicas hibridadas conforman un conjunto instrumental dedicado, gobernado desde un único ordenador con su *software*. Las técnicas hibridadas, al aunar las propiedades analíticas de sus dos partes (cromatográfica y espectroscópica), las mejoran (por ejemplo, la selectividad), siendo técnicas hibridadas LC-MS, LC-RMN o LC-FTIR, como también lo son GC-MS o CE-MS, entre otras, definición extensible a otras técnicas instrumentales de preparación y acondicionamiento de muestras, como la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), microfiltración, inmunoafinidad o el acoplamiento GC-LC. Idealmente la cromatografía segmenta la muestra en fracciones puras, enviándolas a la técnica espectroscópica, que proporciona rica información estructural y es altamente selectiva, permitiendo una rápida “identificación positiva” de los analitos, obviando la eterna duda de su posible coelución. De hecho, frecuentemente se exige *validar* la ausencia de coelución mediante LC-MS, tanto en determinaciones analíticas como en la aceptación de trabajos científicos.

Combinar dos o más técnicas tan distintas exige una interfaz sofisticada, un capilar que transporta el eluyente desde el sistema de separación al detector espectrométrico, evidentemente sin descomponer ni alterar los analitos. Precisamente gracias a las interfaces, las técnicas hibridadas han podido asumir gran protagonismo instrumental, permitiendo analizar ventajosamente, con gran selectividad y sensibilidad, muestras complejas, analitos desconocidos y metabolitos en matrices asimismo complejas y determinaciones de trazas, siendo, de lejos, el acoplamiento LC-MS el más extendido, precursor de otras hibridaciones.

⁸⁹ Hirschfeld, T.: *The Hyphenated Methods*. Analytical Chemistry, Vol. 52, No. 2 (1980) 297A-312A.

Las técnicas híbridadas pueden clasificarse en tres grandes grupos: *separación-separación*, *separación-identificación* e *identificación-identificación*, todas ellas extraordinarias herramientas a la hora de determinar muestras difíciles, coleccionar fracciones, reprocesar datos y buscar analitos objetivo, analíticamente o en las librerías generadas en el mismo instrumento, reorientándose en los últimos tiempos al “mundo nano”, cuyo mínimo requerimiento de volumen de muestra ha llevado a los cromatografistas de I+D, control de calidad, genómica o *Drug Discovery* a reconsiderar la finalidad de sus análisis⁹⁰, pues la correspondiente microfluídica nano ha revolucionado la sensibilidad de sus análisis, contribuyendo las técnicas microanalíticas a modificar las exigencias de sensibilidad en regulaciones oficiales⁹¹.

8.2. LC-MS

El epígrafe *LC-MS* describe el acoplamiento de un sistema de HPLC con un detector espectrométrico de masas (MS, *Mass Spectrometry*, figura 113). Esta hibridación de dos técnicas aparentemente incompatibles fue un sueño desde los primeros trabajos, en 1968, de Tal'roze y Karpov⁹². Nuevas interfaces solucionaron los problemas iniciales que la espectrometría de masas planteaba en HPLC⁹³: en 1980 la hibridación fue una realidad, tal como hoy la conocemos, presentada durante la conferencia anual de la American Society of Mass Spectrometry cuando Vestal mostró en la interfaz de *thermospray* cómo ionizar un eluyente al atravesar un filamento. El primer detector comercial de masas para HPLC fue presentado dos años más tarde, en 1982, muy específico y pensado para cromatografistas expertos. Durante los años siguientes la técnica avanzó sobremanera al comercializarse las interfaces (fuentes) de *thermospray*, *particle beam* y atmosféricas⁹⁴. En poco tiempo los fabricantes de espectrómetros de masas los adaptaron como detectores de HPLC, logro que acogió la industria farmacéutica con los brazos abiertos, pues por primera vez HPLC podía generar “confirmación positiva” de los analitos. Enseguida LC-MS volvió sus ojos a las ciencias “ómicas” (proteómica, genómica). Las emergentes técnicas híbridadas multidimensionales GC-LC-MS y GC-LC-RMN, que previsiblemente veremos en un futuro no muy lejano⁹⁵ contribuirán a acelerar los procesos de investigación y monitorizar mejor la calidad de los productos.

⁹⁰ Wells, D.A.: *High Throughput Sample Preparation Methods and Automatization Strategies*. Editorial Elsevier, Amsterdam, 2003.

⁹¹ Zhang, D., Zhu, M. y Humphreys, W.G., Eds.: *Drug Metabolism*. Editorial John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.

⁹² Tal'roze, V.L. y Karpov, G.V.: *Russian J. Phys. Chem.* 42 (1968) 1658-1664.

⁹³ Henion, J.D.: *Anal. Chem.*, 50 (12) (1978), 1687-1693.

⁹⁴ Gross, J.H.: *Mass Spectrometry, A Textbook*. Editorial Springer-Verlag, Berlín, 2004.

⁹⁵ Mondello, L., Lewis, C. y Bartle, K.D.: *Multidimensional Chromatography*. Editorial John Wiley & Sons, Chichester, U.K., 2001.



Figura 113. Sistema de HPLC acoplado con un detector de espectrometría de masas (imagen cortesía de *Agilent Technologies*).

La detección cromatográfica mediante espectrometría de masas se basa en la separación de los fragmentos moleculares de los analitos. La masa molecular, propiedad física fundamental e inalterable de los compuestos químicos, la estima el espectrómetro de masas al generar, separar y detectar en fase gaseosa (o *quasi-gaseosa*) los distintos iones o fragmentos moleculares procedentes del analito, con igual o distinto número de cargas. La interfaz del espectrómetro de masas convierte el eluyente líquido procedente del sistema de HPLC en un haz de iones en estado gaseoso (o *quasi-gaseoso*), separando posteriormente dichos iones y fragmentos iónicos por su relación masa-carga, informando de la masa nominal del analito y de la abundancia relativa de los iones producidos, verdadera huella digital de cada molécula analizada. Ello otorga a LC-MS tres grandes ventajas: en primer lugar, estima masas mejor que cualquier otra técnica; en segundo lugar, proporciona información estructural de los analitos, y en tercer lugar, provee su “confirmación positiva” cualitativa, en su ventaja más decisiva (figura 114). Estas capacidades hacen de LC-MS una de las mejores herramientas analíticas en la determinación de moléculas orgánicas e inorgánicas⁹⁶, sin parangón en la determinación de muestras complejas, con límites de detección entre 10^{-8} y 10^{-10} g/ml. Sin embargo, la espectrometría de masas es destructiva, pues requiere ionizar las muestras, actualmente mediante *interfaces de ionización a presión atmosférica*. A pesar del precio (que aproximadamente quintuplica el de un detector *diode array*), veremos en los próximos años muchos sistemas LC-MS sencillos y con parco mantenimiento, trabajando como equipos analíticos de rutina en laboratorios de control de calidad junto a otros detectores específicos, asumiendo el espectrómetro de masas la función de detector universal.

⁹⁶ Adams, F., Gijbels, R. y Van Grieken, R.: *Inorganic Mass Spectrometry*, Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, 1988.

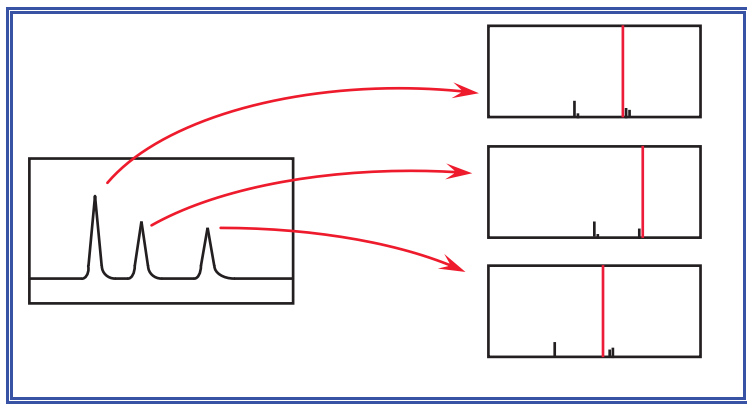


Figura 114. Cada pico tiene su espectro de masas, confiriendo la selección de masas selectividad o universalidad a los cromatogramas.

Los sistemas LC-MS son controlados en su totalidad desde un ordenador con su correspondiente *software*, cuyo ineludible atributo de facilidad de manejo simplifica la interpretación de la ingente cantidad de información que producen⁹⁷, al tiempo que soslaya la necesidad de contratar a un verdadero experto en espectrometría de masas, realizando los análisis cualquier cromatografista o analista. Frente a la creencia de que la parte de HPLC de un equipo LC-MS constituye un caro y sofisticado sistema de adecuación de muestras para el espectrómetro de masas, entendemos que éste es, ni más ni menos, *otro detector* de HPLC, caro y sofisticado: así, los sistemas LC-MS son más cromatógrafos que espectrómetros y sus usuarios más cromatografistas que físicos.

El *espectro de masas* (o *gráfico de fragmentación*) que proporciona el espectrómetro representa gráficamente la intensidad de señal (abundancia de iones detectados) frente a la relación masa-carga de éstos, representativos de la molécula inicial del analito (figura 115). El espectro de masas completo muestra el ion molecular y otros fragmentos iónicos, pudiendo ser la fragmentación molecular de dos tipos, *homolítica* y *heterolítica*, cumpliéndose la “*regla de paridad*”, pues los átomos tienden a aparear electrones y los enlaces los forma un número par de electrones.

⁹⁷ McLafferty, F.W.: *Interpretation of Mass Spectra*. Editorial University Science Books, Mill Valley, California, 1980.

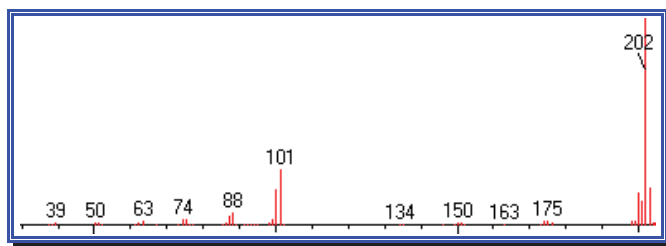


Figura 115. Espectro de masas del pireno.

La espectrometría de masas (y, por tanto, LC-MS) maneja una terminología propia. En primer lugar, los espectrómetros exhiben masas en *Dalton* (Da) o unidades de masas (*uma*): 1 Dalton equivale a 1/12 de la masa del átomo ^{12}C , el isótopo más común del carbono, cuya masa atómica es exactamente 12,0000 uma, obviando la existencia sus otros dos isótopos naturales, el ^{13}C y ^{14}C , motivo de su abundancia relativa del 98,89 %. Así, cada elemento tiene una única masa “decimal” excepto el carbono, al cual, por convenio y definición, se asignan exactamente 12,0000 unidades de masa atómica. Además, la masa del átomo de hidrógeno es 1,00783 uma, algo mayor que la unidad con que se supone trabajan los espectrómetros de masas de baja resolución, exigiendo aplicar en éstos, para compensar tal desviación en sus resultados, un *factor de compensación del hidrógeno*,⁹⁸ que varía las asignaciones de masa en espectros y cromatogramas.

Los aludidos conceptos terminológicos son: la *masa atómica*, masa que promedia las masas de todos los isótopos de un elemento según su abundancia relativa, comúnmente usada en los cálculos estequiométricos (H, 1,0080; C, 12,011; O, 15,994, etc.); la *masa molecular media*, suma de la media ponderada de las masas atómicas de los elementos de la molécula del analito, teniendo en cuenta en ellas la abundancia de todos sus isótopos naturales; la *masa nominal*, expresada en números enteros y calculada a partir del isótopo natural más abundante; la *masa molecular exacta*, medida con gran exactitud y precisión (decimales) en espectrómetros de masas de alta resolución y utilizada para la asignación de fórmulas moleculares; la *masa atómica exacta*, asimismo determinada con gran precisión; la *masa monoisotópica*, masa exacta del isótopo natural más estable de un elemento, equivaliendo la suma de las masas monoisotópicas de cada elemento a la *masa de la fórmula empírica*⁹⁹; por último, la *masa de la molécula neutra* (*M*), donde, por convenio, las sales deben incluir el correspondiente contraión¹⁰⁰.

⁹⁸ McLafferty, F.W.: *Registry of Mass Spectral Data*, Novena edición. Editorial Wiley-Blackwell. Hoboken, New Jersey, 2009.

⁹⁹ IUPAC: *Isotopic Composition of the Elements*. Pure Appl, Chem.; 63 (7) (1991), 991–1002.

¹⁰⁰ McNaught, A.D. y Wilkinson, A.: *Compendium of Chemical Terminology in Union of Pure and Applied Chemistry*. Editorial Research Triangle Park, Carolina del Norte, 1997.

A su vez, los iones producidos pueden ser de cinco tipos: la *molécula protonada*, ion con número de electrones par, resultante de la adición de un protón a la molécula; el *ion pseudomolecular* (o *ion quasi molecular*), que designa los iones derivados del ion molecular; el *pico base*, ion mayoritario en el espectro de masas, que se suele utilizar para cuantificar el analito, pues permite hacerlo con la máxima sensibilidad; el *ion diagnóstico*, ion típico de cada familia de analitos, que sirve para identificar grupos de compuestos; finalmente, el *ion característico*, que proporciona información estructural típica de cada compuesto.

Criterios analíticos

En LC-MS son básicas, por excluyentes si no se alcanzan, los criterios de exactitud y sensibilidad. La *exactitud* del detector de masas la define su capacidad (la de su analizador) de asignar fielmente la masa de los fragmentos iónicos que detecta, cuantificando la exactitud como diferencia entre la masa teórica y la masa medida: como suelen ser exiguas, esa diferencia se multiplica por 1.000.000 (10^6), expresándose la exactitud en partes por millón. Por ejemplo, una masa teórica de 1.000, que el espectrómetro de masas exhibe como 999,9, tendrá una exactitud absoluta de 0,1, comportando un error de $0,1 / 1.000 = 10^{-4} = 100$ ppm.

Por otra parte, la *sensibilidad* del detector de masas se estima como la cantidad mínima de un patrón (reserpina o cafeína) capaz de aumentar la señal en él; usualmente se determina la relación señal - ruido inicialmente con patrones y posteriormente con los analitos. Tras comprobar el ruido electrónico, el dato inicial de sensibilidad sirve para optimizar los parámetros instrumentales del detector de masas y mejorar su sensibilidad. Además, el *intervalo dinámico* del detector espectrométrico estima entre qué valores de masa muestra señal creciente cuando aumenta la cantidad (concentración) de analito que le llega¹⁰¹.

Respecto a la resolución de los espectros de masas, existen sistemas de alta y baja resolución. Estos últimos muestran valores enteros (nominales) de masa-carga, obviando los decimales debidos a la riqueza isotópica de cada átomo. Trabajar a baja resolución puede ser suficiente en muchos casos y solo la determinación de la composición elemental de una molécula exige equipos de alta resolución, que exhiben masas con cuatro decimales, cuyas combinaciones numéricas permiten al *software* del espectrómetro calcular y proponer su fórmula empírica. Por su parte, los "utilitarios" espectrómetros de baja resolución, como los compactos de cuadrupolo, pueden trabajar con precisión de $\pm 0,01$ uma y referenciar un patrón de masa conocida con exactitud de $\pm 0,0001$ uma, empleando la asignación de masas y exactitud del patrón para centrar correctamente la ventana de masas

¹⁰¹ Gross, M.L. y Caprioli, R.M., Eds.: *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. Editorial Elsevier, Amsterdam, 2005.

nominales, en la práctica de ajuste denominada *tuning*. La asignación de masas puede variar hasta 0,15 uma en un par de días, haciendo imprescindible ¡y cotidiano! el *tuning*, realizado generalmente *por infusión*: una bomba de jeringa introduce directamente en el espectrómetro una solución de patrón disuelta en fase móvil sin pasar por la columna cromatográfica, en “inyección directa del patrón”. Muchas veces se utiliza un patrón de *autotuning* de PEG 600, nomenclatura del polietilenglicol indicativa de que éste fue preparado disolviendo 60 μl de PEG en un solvente adecuado, así como PEG 400 indica que se disolvieron 40 μl de PEG en el solvente y PEG 1.000 indica una solución con 100 μl de PEG.

Además de los patrones para el *tuning* del espectrómetro, deberíamos disponer de otros patrones para evaluar la sensibilidad del equipo, usualmente de reserpina. Se prepara una solución madre disolviendo 2,5 mg de reserpina en 100 ml de metanol:agua al 50%, que se diluye en pasos sucesivos de 10 veces en más metanol:agua al 50%.

Para las calibraciones de masas altas a alta sensibilidad se suele utilizar un patrón de mioglobina desgasificado y reciente (pues se descompone fácilmente) a partir de una solución de 0,5 ml de ácido acético en 50 ml de agua, donde se disuelven 17 mg de mioglobina comercial pura, añadiendo luego 50 ml de metanol.

Por otra parte, la sensibilidad de los espectrómetros de masas difiere mucho entre las distintas moléculas. LC-MS aprecia muy bien ciertos analitos (sus picos cromatográficos) en concentraciones muy bajas, siendo indetectables otros compuestos en las mismas concentraciones. La sensibilidad de los analitos depende solo de su capacidad de producir iones: como regla, una mayor fragmentación produce iones más estables, mayor señal detectable y, por tanto, mejor sensibilidad.

Por el contrario, los valores de masa que exhiben los espectros de masas de alta resolución difieren apenas en centésimas, milésimas, diezmilésimas, etc., exigiendo antes de barrer la zona espectral de interés añadir a la muestra como calibrador interno un ion puro de masa exacta conocida. Los usuarios de los equipos de alta resolución suelen ser expertos en espectrometría de masas más que cromatografistas.

La definición clásica de *resolución de masas* expresa una masa (M) dividida por la anchura de su pico de masa (ΔM) en el espectro de masas. Los espectrómetros de masas de alta resolución miden la anchura del pico de masa en su semialtura: por ejemplo, exhibirán una resolución de 3.000, tanto si discernen valores de masa (m/z) entre 2.998,0 y 3.000,0, entre 1.499,0 y 1.500,0 ó entre 299,8 y 300,0. En ello hay dos puntos importantes: en primer lugar, dos picos de masa estarán “bien resueltos” si su resolución es aproximadamente el doble del valor de masa-carga (m/z) que los separa. Por ejemplo, en dos masas bien diferenciadas de 598,85 y 599,85 uma la resolución será de 1 uma (“*resolución unidad*”), redon-

deándose el valor de m/z a 600 uma. Según la anterior definición “clásica” de la resolución ($M/\Delta M$), ésta sería 1.200, es decir, $600/0,5$ (la diferencia de 1 uma entre ambos picos se descompone en 0,5 para cada uno de ellos). En segundo lugar, la resolución del espectrómetro de masas disminuye al aumentar el valor de m/z , aunque *los espectrómetros de masas de cuadrupolo mantienen la misma resolución durante todo el intervalo de masas de trabajo* sin modificar ningún parámetro instrumental. Los equipos de alta resolución resuelven mejor las masas pequeñas que las altas, por lo que su especificación instrumental de resolución siempre se refiere al mayor valor de m/z . La resolución de masas clásica resulta útil en equipos de alta resolución, pero menos en equipos de baja resolución (por ejemplo, de cuadrupolo).

Ahora bien, en los sistemas LC-MS el detector espectrométrico de masas es “solo” el detector del cromatógrafo, con la función primaria de identificar las masas de los analitos comparativamente, por lo que casi nunca precisa resoluciones menores de 1 uma, aunque las pudiese alcanzar. Literalmente, cualquier acotación a la especificación de la resolución del pico de masa debería comenzar con la muletilla “al menos” o “mejor de”. La típica definición “ $2M$ ” del detector que aparece en la literatura y catálogos de los equipos puede resultar confusa: si, por ejemplo, la masa M es 300, entonces la resolución es 600; y si se mide a 700, la resolución es 1.400. Por tanto, especificar la resolución de masas como “ $2M$ ” carece de sentido real en espectrómetros de baja resolución.

Las líneas aparentes de masa que exhibe el espectro de masas obtenido en el espectrómetro son en realidad “picos de masa”, distribuciones gaussianas de los iones de cada masa en el tiempo, cuya varianza (son picos) se debe a tres razones: el haz de iones de las moléculas que se ionizan tiene, de entrada, un cierto ancho (es un haz); los iones de igual masa pueden ionizarse en distintos lugares de la cámara de ionización; finalmente, los iones de igual masa pueden pasar a través de las lentes electrostáticas de aceleración a diferentes ángulos, describiendo trayectorias ligeramente distintas hasta el detector. Como el pico de masa del espectro representa la masa exacta de los fragmentos iónicos, el valor m/z del pico de masa completo, basado en el punto central de la gaussiana, denota la capacidad del instrumento para diferenciar valores de masas muy cercanos.

Modos de trabajo en LC-MS

Básicamente los detectores de masas pueden trabajar en algunos o varios de los siguientes modos (tabla 46):

Tabla 46. Modos de trabajo en LC-MS.**Barrido (*scan*)****Multicromatograma (SIM, *Selected Ion Monitoring*)****Disociación por colisión inducida (CID, *Collision Induced Dissociation*), en modo masas-masas****Detección de iones positivos y negativos**

El modo *barrido* o *scan* parece el más obvio y natural, pues captura continuamente espectros de masa. Primero, deben establecerse los límites de masas entre los cuales se realizarán los barridos o espectros, así como el intervalo de tiempo entre cada barrido: el analizador varía sus condiciones para focalizar continuamente sobre su detector en dicho intervalo temporal todo el intervalo de masas (espectro), generando cromatogramas específicos de cualquier masa (masa-carga). La suma de todos esos cromatogramas constituye una respuesta global, la de *todos* los iones formados en la ionización del analito eluido, mostrando un *cromatograma global de iones (TIC, Total Ion Chromatogram)* en que cada uno de sus puntos contiene tridimensionalmente un espectro de masas, que el *software* puede exhibir en todo momento, en cualquier tiempo de retención, permitiendo *moverse dentro de los picos del cromatograma de masas*. Naturalmente, se puede restar a cada espectro el de la línea de base o de cualquier otra zona y, si se sospecha coelución de algún pico cromatográfico, basta comparar los espectros a lo largo de ese pico o, más sencillamente, superponer los espectros del inicio, ápice y final del pico. Habitualmente se resta el espectro obtenido en la zona descendente final del pico (cola) al de cualquier otra zona, muchas veces la inicial y pocas veces el ápice.

El segundo modo de trabajo es con “*selección previa de masas objetivo*”, que genera *cromatogramas SIM (Selected Ion Chromatogram)*. En esta modalidad no se capturan espectros, sino solamente uno o varios cromatogramas a distintos valores de masa-carga (m/z), seleccionados previamente en el detector, como sucedía para distintas longitudes de onda en los detectores espectrofotométricos *diode array*. Para tener la seguridad de que los picos aparecidos en los cromatogramas SIM pertenecen a los analitos buscados, se suelen realizar varios (cinco o más) cromatogramas SIM de las masas esperadas para los analitos, vistas previamente en sus espectros de masas en el mismo equipo en modo *scan* o tomadas de la bibliografía. La suma de todos los cromatogramas SIM refleja un cromatograma también llamado TIC (*Total Ion Chromatogram*), pero en esta modalidad de trabajo sin adquisición de espectros, solamente cromatogramas. SIM es una técnica selectiva porque las impurezas, incluso las que coeluyen, no afectan a las medidas de los analitos, ya que solo estos exhiben señal al valor m/z seleccionado. Posteriormente se comprueba cuál de las masas (cromatogramas SIM) resulta más conveniente desde el punto de vista de la selectividad o para su confirmación

positiva. De las varias masas SIM se escogerá una (*pico base*) para las determinaciones cuantitativas.

Tabla 47. Factores que afectan a la corriente de fondo de los cromatogramas de masas.

iones procedentes de la fase móvil
iones procedentes del tampón modificador de la fase móvil
iones que coeluyen con los analitos
Otros componentes neutros excitados

En general, el modo SIM es más sensible que el modo *scan*. Si fuese cuantitativamente posible, estaríamos encantados de trabajar en modo *scan*, que siempre exhibe los espectros de masas de cualquier tiempo de retención. Algunos usuarios aventuran que SIM es diez veces más sensible, otros que veinte y otros que más de cien. Como el lector estará esperando un número prosaico, puntualizaremos que SIM representa una medida más estable: extremando esto, SIM podría dejar el analizador en condiciones fijas para detectar una sola *m/z* (un solo ion), algo infrecuente pues difícilmente varios solutos generarán iones con el mismo valor *m/z*. Por tanto, el modo SIM parece de entrada más sensible que el modo *scan*, por ser instrumentalmente más estable, provocando menor oscilación en la línea de base. Como sabemos, en cromatografía el límite de detección se expresa como *relación señal - ruido*, cociente de la señal del pico frente a la variación, ruido o *rizado* de la línea de base, siendo en LC-MS el cociente de la corriente generada por el analito dividida por la corriente de fondo del equipo (en la línea de base, ajustada al valor cero). La corriente de fondo de los cromatogramas de masas oscila en el tiempo por varios factores, destacando la naturaleza de la fase móvil, con o sin sales o tampones, los iones que coeluyen con los analitos y otros componentes neutros (tabla 47). Un valor cualquiera de corriente de fondo puede ajustarse al valor cero con una mera sustracción electrónica, fiable cuando la línea de base es perfectamente constante, proporcionando una línea totalmente plana. Expresando la oscilación de la línea de base como desviación estándar (σ), producto de un valor constante de carga eléctrica (q) en el detector en el inicio de la línea de base, zona donde el detector solo “ve” fase móvil sin analitos, multiplicado por el ancho (Δa) de los “picos y valles” que conforman el rizado de la línea de base:

$$\sigma = e \cdot \Delta a \quad (162)$$

El ancho de banda de la oscilación en el rizado de la línea de base (Δa) disminuye con el tiempo: en modo *scan* ese tiempo es aproximadamente el intervalo en que se realiza un barrido de 1 unidad de masa, mientras que en modo SIM el ruido se suma al tiempo de permanencia del detector en las condiciones de medida de la masa seleccionada, por lo que en ambos casos:

$$\sigma_{scan} = e_{scan} \cdot \Delta a_{scan} \quad ; \quad \sigma_{SIM} = e_{SIM} \cdot \Delta a_{SIM} \quad (163)$$

Supongamos que para evaluar el ruido de fondo en ambos modos, SIM y *scan*, la corriente generada en el detector en ausencia de picos es idéntica ($e_{SIM} = e_{scan}$). Siendo el ruido directamente proporcional a la frecuencia (Δf) de las medidas en ambas modalidades y éstas, a su vez, inversamente proporcionales al periodo en que se realiza cada medida (Δt), la relación de ruidos de ambas modalidades resulta inversa a la raíz cuadrada del producto de la velocidad de barrido (1 *uma* en *scan*), por el tiempo de permanencia en las condiciones de medida de los iones del modo SIM:

$$\frac{\text{ruido}_{SIM}}{\text{ruido}_{scan}} = \sqrt{\frac{\Delta f_{SIM}}{\Delta f_{scan}}} = \sqrt{\frac{1/t_{SIM}}{1/t_{scan}}} = \sqrt{\frac{1}{v_{scan} \cdot t_{SIM}}} \quad (164)$$

Esto demuestra que cuanto mayor es la especificación numérica de la velocidad de barrido del detector, éste, en igualdad de condiciones, es más sensible. SIM monitoriza exactamente el valor nominal máximo de la masa seleccionada, mientras que en un barrido se promedia la intensidad de los iones detectados a lo largo de todo el intervalo de medida. Así, resulta un factor de correspondencia cercano a $2^{1/2}$ para los iones diferenciados por el analizador. *Scan* también aporta un *ruido debido a centrado*, pues el ruido se suma varias veces, dependiendo de cuándo se ha detectado un pico al sobrepasar el umbral en la detección, asociado exactamente a un “ruido” en vez de al fondo, tanto al comienzo del pico como al final del mismo. El efecto de todos estos factores hace que el modo *SIM presente una relación señal - ruido aproximadamente veinte veces mejor que el modo scan*.

El tercer modo de trabajo en detección espectrométrica de masas, específico de los sistemas de masas-masas (“*sistemas MS-MS*”), consiste en refragmentar en un *módulo de disociación por colisión inducida* (*CID, Collision Induced Dissociation*) los iones iniciales (*iones padre*, entonces) en *iones hijos*, en un proceso de fragmentación secundaria (*disociación por colisión inducida*), muy útil tanto para lograr información complementaria de los analitos como para su confirmación positiva. Para ello, se dispone tras la primera zona de ionización una *celda de colisión* con un gas a alta presión (helio), donde éste impacta con los *iones padre*, fragmentos precursores procedentes del primer analizador del espectrómetro de masas, refragmentándolos en *iones hijos*, que discrimina el último analizador del espectrómetro, mostrando los espectros tres tipos de iones: *iones padre*, *iones hijos* e *iones perdidos*, que causan pérdida de un cierto fragmento neutro. La técnica de *masas-masas*, procedimiento cuantitativo habitual de los sistemas de triple cuadrupolo y también presente en un solo analizador en los equipos de trampa de iones, donde puede inducirse una fragmentación secundaria durante la permanencia de los iones primarios, es un proceso que puede repetirse varias veces, hablándose de (MS)ⁿ. Los cada vez más extendidos equipos de triple cuadrupolo suelen realizar en el primer cuadrupolo la selección de los iones padre, en el se-

gundo cuadrupolo el proceso de disociación por colisión inducida (CID) y en el tercero la discriminación de los iones hijos, más en modo SIM, aunque también es posible *scan* en estudios estructurales de moléculas complejas, como la determinación secuencial de péptidos. Las técnicas de masas-masas pueden trabajar con una cantidad mínima de muestra de 1 mg.

Finalmente, como modalidad de trabajo en LC-MS, citaremos la detección de iones positivos y negativos. La mayoría de los compuestos orgánicos forman iones positivos durante el proceso de ionización y pocas veces generan iones negativos, por lo que los equipos se configuran en principio para trabajar con iones positivos. Sin embargo, los compuestos ácidos producen iones negativos al perder un protón, como, por ejemplo, las moléculas con radicales carboxílicos. Mínimos cambios en el detector del espectrómetro permiten detectar iones negativos, como veremos más adelante a tratar del módulo detector del espectrómetro de masas, anticipando aquí que muchos equipos pueden realizar *técnicas de ionización química pulsantes (PPINICI, Pulsed Positive-Ion Negative-Ion Chemical Ionization)*, cambiando los voltajes antes de cada barrido para generar alternativamente cromatogramas (o zonas del cromatograma) de iones positivos y negativos. Hay casos en que es importante decidir y controlar el modo de ionización, positiva o negativa, posible en la mayoría de los equipos LC-MS para luego seleccionar la más conveniente.

Sensibilidad óptima

Existen tres estrategias para mejorar la sensibilidad de los análisis¹⁰²: en primer lugar, aumentar la cantidad de analito disponible mediante técnicas de enriquecimiento, acoplamiento de columnas o montar válvulas de selección de solventes, cuya cuidadosa selección es exigible en el espectrómetro, así como de los eventuales aditivos y modificador; una segunda estrategia consiste en mejorar la eficiencia cromatográfica con columnas de alta resolución, siendo siempre aconsejables en fase reversa las fases *end capping*; la última alternativa para mejorar la sensibilidad es optimizar las condiciones operativas del detector de masas, trabajando en modo SIM o, en caso de que sea preceptivo realizar barridos, barrer solo una pequeña zona, en varios *miniscan* en vez de todo el intervalo de masas del detector.

¹⁰² Duncan, M.W., Gale, P.J. y Yergey A.L.: *Principles of Quantitative Mass Spectrometry*. Editorial Denver, Rockpool, 2008.

EL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

El origen de la espectrometría de masas se remonta a 1912, cuando Joseph John “J. J.” Thomson observó que, al atravesar un campo magnético átomos de neón de dos masas distintas (Ne^{20} y Ne^{22}), éstos describían dos parábolas desiguales, impresionando sendas bandas sobre una placa fotográfica en un rudimentario *espectrógrafo*. El método, luego desarrollado por Aston (ayudante de Thomson) y Dempster, quedó en manos de físicos, aplicado al descubrimiento de nuevos isótopos para determinar sus masas y abundancias relativas; de hecho, años después el primer espectrómetro de masas de cuadrupolo se desarrolló para separar los isótopos del uranio. Durante el cuarto de siglo comprendido entre 1960 y 1985 fue casi una quimera intentar unir de forma artesanal grandes espectrómetros de masas con bombas e inyectores de HPLC para analizar moléculas orgánicas, tropezando los analistas con los problemas propios de combinar dos tecnologías tan distintas, además del complejo manejo del espectrómetro de masas, que ciertamente lo era para los cromatografistas. Tales dificultades llevaron a trabajar con introducción directa de muestras líquidas en el espectrómetro de masas, renunciando a la separación cromatográfica. Huelga decir que esto ya no es así, desde la aparición, entre 1986 y 1988, de los primeros sistemas comerciales LC-MS, tal como hoy los conocemos, inicialmente adaptando los espectrómetros de masas que ya se fabricaban, asumiendo en HPLC el espectrómetro de masas el papel de un *simple detector*, con extraordinarias expectativas. Otros fabricantes de espectrómetros de masas, que nunca antes habían fabricado sistemas GC-MS, desarrollaron equipos de LC-MS. Al final del siglo pasado comenzaron las alianzas comerciales, al tiempo que llegaban las primeras noticias sobre las interfaces atmosféricas, que luego se impondrían. Bruins patentó en 1987 el *ionspray* y Dole el *electrospray*, ya utilizado en la industria automovilística, pinturas por spray e impresoras de chorro de tinta. El *thermospray* desapareció a finales de la década, reemplazado por las deseadas interfaces atmosféricas. El mercado crecía, demandando equipos de precio aceptable. Surgieron progresivamente interfaces de presión atmosférica que admitían flujos analíticos, necesitaban menos cantidad de muestras y podían ionizar moléculas polares. El mercado hacía cada vez mayor hincapié en la facilidad de manejo de los sistemas LC-MS, demandando sistemas “para simples cromatografistas”. Los analizadores de tiempo de vuelo se incorporaron a este juego en 1993, al tiempo que aparecía el primer *software* de LC-MS que gobernaba un detector *diode array*, combinando sus datos con los del detector de masas (cada vez más coexisten ambos en los sistemas LC-MS). Finalmente, la manufactura de equipos LC-MS se ha trasladado desde las compañías fabricantes de grandes espectrómetros de masas a los más tradicionales productores de equipos de HPLC, en un mercado creciente de equipos parejos.

Tabla 48. Principales componentes instrumentales de un sistema LC-MS.

Cromatógrafo de HPLC
Sistema de introducción de muestras
Interfaz LC-MS y método de ionización
Analizador de masas
Software

Un sistema LC-MS une dos conjuntos bien diferenciados: el equipo de HPLC y el detector de masas (tabla 48). Éste precisa las muestras en estado gaseoso (o “quasi-gaseoso”), ionizadas para discriminar los iones producidos por su relación masa-carga, comprendiendo tres unidades funcionales: la *fente de iones* o *cámara de ionización*, la cual, a su vez, persigue el triple objetivo de generar en la muestra iones representativos de los analitos, acelerarlos y, por último, dislocarlos en fragmentos menores, característicos de la muestra inicial; la segunda unidad instrumental es el *analizador de masas*, que clasifica y ordena los iones por su relación masa-carga, siendo la tercera y última unidad instrumental el *detector* (de iones), que convierte los iones llegados a él en señal eléctrica, que luego puede ser amplificada (figuras 116 y 117).

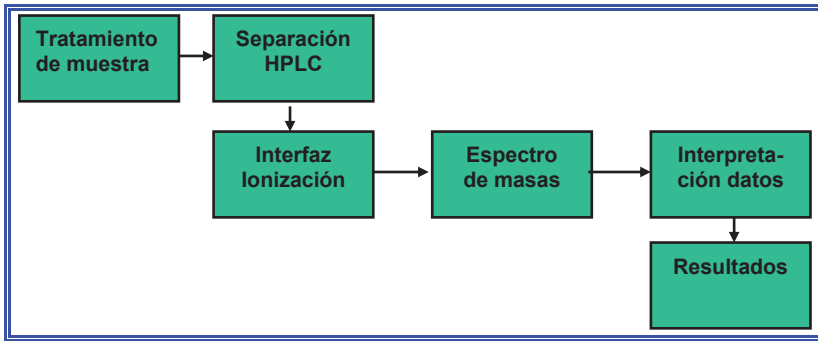


Figura 116. Diagrama de flujo del proceso analítico en LC-MS.

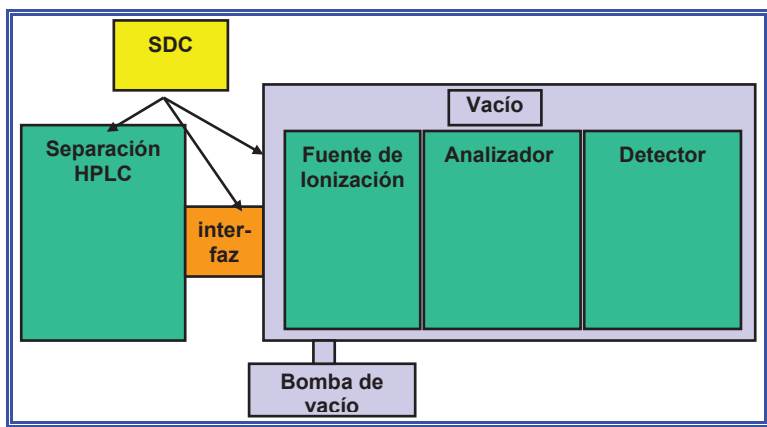


Figura 117. Componentes instrumentales de un sistema LC-MS.

Explicamos a continuación la razón de estar en el espectrómetro cada uno de sus módulos instrumentales, ordenados respecto al paso de los analitos por ellos, qué funciones realizan y qué opciones instrumentales existen de cada uno. Además del sistema de introducción de muestras, la zona o cámara de ionización, las lentes electrostáticas aceleradoras de los iones, el analizador de masas, el detector de iones y estación de datos (con el correspondiente *software*), los espectrómetros precisan un sistema de alto vacío para eliminar los iones (detectados y no detectados).

La interfaz con el sistema cromatográfico

La interfaz une el espectrómetro de masas con el sistema de HPLC mediante un tubo capilar de sílice, acero o PEEK. Muchos equipos LC-MS también montan un detector UV-VIS (*diode array* o espectrofotométrico) para tener una visión familiar de los analitos eluidos. La entrada del eluyente al detector espectrométrico de masas se realiza en continuo (*on-line*), aunando la interfaz dos capacidades: introducir la muestra en el espectrómetro en un estado óptimo, y también ionizarla, proceso imprescindible en el espectrómetro, que además precisa que las muestras estén en estado gaseoso o *quasi* gaseoso. Por ello, los sistemas GC-MS son razonablemente sencillos, con pequeñas dimensiones y presentan escasos problemas y mantenimiento, mientras que los sistemas LC-MS son más complejos, con mayores dimensiones y presentan frecuentes problemas y mayor mantenimiento, siendo su precio muy superior. Sin embargo, sus ventajas analíticas superan tales inconvenientes, especialmente la confirmación positiva de los analitos. Recordemos que las dos decisiones instrumentales iniciales que juzgan adecuado (o no) un equipo LC-MS para un análisis dado son el tipo de ionización (interfaz) que monta y el analizador de masas que posee.

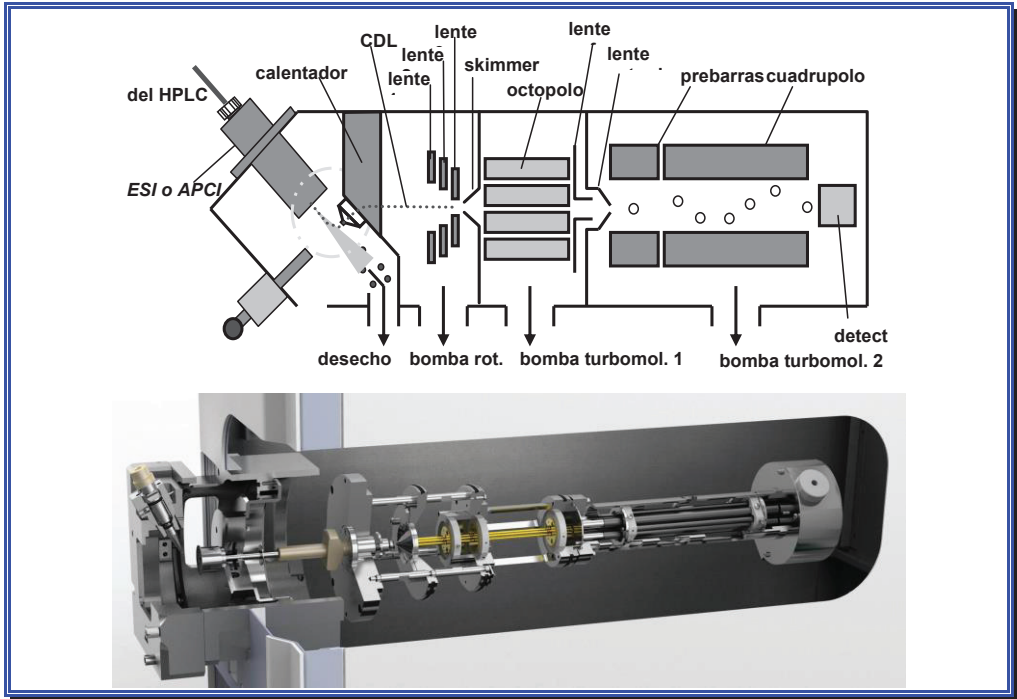


Figura 118. Esquema de un detector de LC-MS con geometría ortogonal en su interfaz. Debajo: imagen cortesía de *Perkin-Elmer*.

Se denomina *interfaz*, *fuentes de iones*, *fuentes de ionización* o simplemente *fuentes* al módulo que introduce, ioniza y fragmenta los analitos llegados desde el sistema de HPLC (figura 118). Unir y acoplar el espectrómetro al cromatógrafo de HPLC persigue dos finalidades, condiciones necesarias para el espectrómetro de masas: convertir el flujo del eluyente líquido procedente de la columna del sistema de HPLC en un flujo gaseoso o semigaseoso (un spray) e ionizar los analitos. Históricamente han ido surgiendo diversas interfaces, transportando las actuales eluyente a presión atmosférica, lo cual conserva la integridad de los analitos. Inicialmente se intentó alinear, literalmente, la salida de la columna al espectrómetro de masas; sin embargo, tal alineación tan simple no resultó óptima, y sí disponer el tubo capilar que transporta el eluyente desde la salida de la columna al espectrómetro perpendicular a éste, en una geometría ortogonal de 90 grados.

Tabla 49. Interfaces (fuentes) de LC-MS.

A. Fuentes estándar de presión atmosférica: Ionización por electrospray (ESI) Ionización química a presión atmosférica (APCI) Fotoionización a presión atmosférica (APPI)
B. Fuentes pretéritas: Thermospray (TSP) Particle beam
C. Fuentes MALDI
D. Otras fuentes ocasionales: Ionización por impacto de electrones (EI) Ionización química (CI) Bombardeo con átomos acelerados (FAB) Ionización por campo (FI) Desorción en un campo (FD)

El tipo de ionización de las muestras está condicionado por la interfaz (tabla 49), mayoritariamente en técnicas de *ionización a presión atmosférica* (API, *Atmospheric Pressure Ionization*), como son las de *Electrospray* (ESI, *Electrospray*), *Ionización Química a Presión atmosférica* (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical ionization*) y la más reciente APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*), junto a las fuentes MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), decidiéndose cual por la información buscada en las muestras, su masa molecular y la capacidad de ionizar los analitos (función de su magnitud molecular), volatilidad y propiedades en solución, máxime por su polaridad (figura 119), difiriendo los distintos tipos de interfaces en sus mecanismos de generación de iones, presentando una misma muestra distintas respuestas en ellas. El desarrollo futuro de las fuentes de ionización expandirá LC-MS; de momento, los espectrómetros de masas admiten varias interfaces, para optimizar la desolvatación y generación de iones.

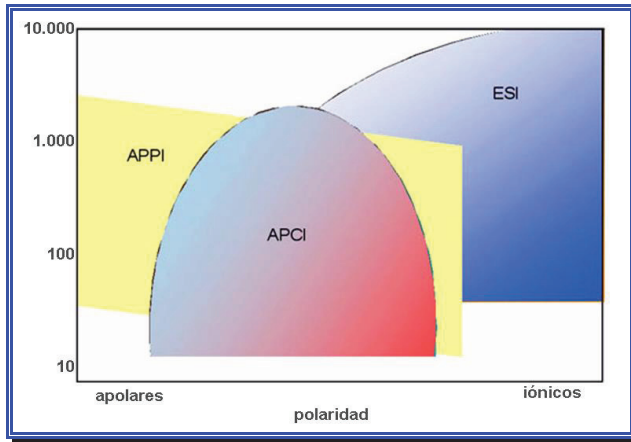


Figura 119. Aplicabilidad de las interfaces de LC-MS.

Las fuentes de presión atmosférica ionizan (a presión atmosférica) las moléculas de los analitos *antes* del sistema de vacío por dos razones ventajosas: la transferencia de calor es más eficiente, pues evaporan mejor el disolvente, y, en segundo lugar, evitan imponer campos eléctricos altos, que ocasionarían fuertes descargas en condiciones de vacío o de muy baja presión. La ionización a presión atmosférica origina espectros de masas donde predominan los *iones pseudomoleculares*, fruto de la escasa fragmentación. Cuando la energía adquirida por la molécula sobrepasa el potencial de ionización, el exceso de energía se distribuye dentro de la molécula y al igualar la energía de disociación de los enlaces químicos tiene lugar la *fragmentación* de los analitos, que proporciona su información estructural, conservando su masa molecular en forma de ion protonado, el cual muestra una sensibilidad bastante buena, aunque los analitos difieran en peso molecular, volatilidad, polaridad o ionicidad. Con ello se precisa poca cantidad de muestra, a diferencia de otras técnicas de determinación de masas moleculares, como GPC. En LC-MS la información de pesos moleculares es un dato más, que habrá que contrastar, pues algunos de los analitos podrían tener el mismo peso molecular. La identificación positiva de un compuesto mediante LC-MS exige su espectro de masas o *espectro de fragmentación* y compararlo con espectros de patrones en *librerías de espectros*. Las fuentes API de ionización a presión atmosférica suelen generar iones pseudomoleculares, que se fragmentan al romperse sus enlaces más débiles, como las uniones C-N y C-O. Los iones se extraen a presión atmosférica de la zona de ionización de la fuente hacia la zona de vacío del espectrómetro, donde se aceleran hacia un *skimmer* y luego al analizador. Sin embargo, para la identificación absoluta de los analitos por sus espectros, las fuentes API distan de la paradigmática ionización por impacto de electrones (EI), clásica en GC-MS, cuyos espectros son mucho más ricos en información e idénticos en distintos equipos y condiciones, por lo que permiten compararlos con librerías comerciales.

Interfaces de Electrospray (ESI)

La primera noticia de generar iones mediante electrospray data de los trabajos de Fenn¹⁰³ en 1984, aunque la primera publicación que describía un electrospray data ¡de 1917!¹⁰⁴ La interfaz de electrospray que había detallado Fenn, específica para LC-MS y conocida bajo el acrónimo ESI (*Electrospray ionization*) se mostró excelente para analizar proteínas de alto peso molecular¹⁰⁵ y revolucionó LC-MS definitivamente; al menos, así lo creemos ahora. Enseguida se confirmaron sus ventajas (tabla 50), permitiendo analizar pequeñas moléculas termolábiles. Por su sensibilidad, robustez, repetitividad cuantitativa y ser aplicable a muchos tipos de analitos, el electrospray pronto se popularizó. Trabaja siempre en condiciones de presión atmosférica y precisa microflujos para no sobrecargar el electrodo responsable de la ionización. Las moléculas pequeñas, menores de 1.000 uma, generan iones positivos $[M+H]^+$ o iones negativos $[M-H]^-$, permitiendo, por tanto, trabajar con detección de iones positivos y negativos. Las moléculas grandes, de 100.000 uma o mayores, producen iones con cargas múltiples, lo cual permite su análisis, “revolución”, gran ventaja y mejor argumento, fundamental en los análisis de péptidos y proteínas. Desde su creación, la interfaz de electrospray ha sido la más usada y la primera elección para analizar moléculas en disolución de alto peso molecular, termolábiles y polares. Al requerir flujos de fase móvil muy bajos, su uso conllevó la aparición de accesorios para adaptar los sistemas de HPLC convencionales a flujos capilares. ESI es un método de ionización *suave*, por trabajar a presión atmosférica y temperatura ambiente, que precisa menos de 1 picomol de muestra, detectando 1 femtomol en modo SIM.

Tabla 50. Ventajas de las interfaces de electrospray.

Sensibilidad
Informa de pesos moleculares
Apta para compuestos polares e incluso iónicos
Apta para grandes polímeros biológicos y sintéticos

El mecanismo que explica la ionización del analito en la interfaz de electrospray, tal vez debatible desde un punto de vista fisicoquímico purista, data de 1976 y fue denominado *evaporación iónica*¹⁰⁶. Consta de tres etapas: en la primera el eluyente con los analitos pasa por un capilar (“*aguja*”), que termina en un orificio de acero extraordinariamente pequeño (*cono de Taylor*), donde se aplica una alta diferencia de potencial (de 3 a 5 kV) que repele las gotículas (figura 120); en la segunda etapa las fuerzas de repulsión de éstas exceden las fuerzas electrostáti-

¹⁰³ Fenn, J.B.: J. Phys. Chem., 88 (1984) 4451.

¹⁰⁴ Zeleny, J.: Phys. Rev. 10 (1917) 1.

¹⁰⁵ Meng, C.K., Mann, M. y Fenn, J.B.: Proc. 36th ASMS, San Francisco, 1988.

¹⁰⁶ Iribarne, J. V. y Thomson, B.A.: J. Chem. Phys. (1976) 64 2287.

cas, ocasionando una *explosión Coulomb* de las gotículas que evapora el disolvente y genera gotículas hijas altamente cargadas en su superficie; por fin, en la tercera y última etapa ese campo iónico en la superficie de las gotículas supera la tensión superficial de las mismas en una *explosión Rayleigh* que ioniza los analitos.



Figura 120. Interfaz de electrospray en disposición ortogonal (imagen cortesía de *Perkin-Elmer*).

De este modo el electrospray nebuliza el líquido al final del capilar, justificando el vocablo *electrospray*. Los solutos (polares), están en el eluyente precisamente por hallarse, de una manera u otra, en forma ionizada. Como el espectrómetro de masas precisa las muestras en fase gaseosa, es preciso evaporar el disolvente de las gotículas y luego vaporizar los mismos analitos, lo cual se logra aplicando en la fuente un *gas desecante* (nitrógeno en caliente) en sentido coaxial, alrededor del capilar. El spray generado ("*gas de nebulización*") adquiere una determinada velocidad y aceleración, precisando una discriminación previa a su paso al analizador mediante un laberinto o *skimmer*, donde también se impone un gradiente de potencial eléctrico que dirige y acelera los iones aspirados hacia el interior del espectrómetro de masas (figura 121). El *skimmer* atrapa gran parte del gas de nebulización, ingresando el resto en el sistema de alto vacío del espectrómetro, que lo succiona hacia el analizador y detector. El conjunto *skimmer* – sistema de vacío separa cinéticamente los solutos, más pesados que el disolvente y el gas de desecado (nitrógeno).

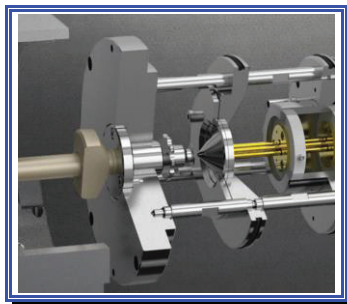


Figura 121. *Skimmer* en un espectrómetro de masas (imagen cortesía de *Perkin-Elmer*).

El punto clave en la generación de iones es la aplicación del campo eléctrico sobre las gotículas que emergen del capilar, dispersándolas en un aerosol con carga. El flujo de gas desecante (nitrógeno a alta velocidad) actúa como un nebulizador neumático concéntrico. Tras formarse el aerosol cargado el disolvente se evapora y disminuye el tamaño de las gotículas, al tiempo que aumenta la densidad de cargas en su superficie, hasta el punto en que las fuerzas de repulsión electrostáticas igualan su tensión superficial: al exceder el *limite de estabilidad* o *limite Rayleigh*, las gotículas *explotan* en gotículas más pequeñas. El campo eléctrico de la superficie de esas minúsculas esferas es tan alto que los iones de soluto pasan a estado vapor (figura 122). Dos modelos fisicoquímicos explican la evaporación de los iones: según el primero, los iones son expulsados de la superficie de las gotículas en fase gaseosa por la repulsión electrostática existente entre los iones de muestra y los de la fase líquida; según el segundo modelo, los iones pasan a fase gaseosa cuando las moléculas del disolvente se evaporan y bombardean los analitos, continuando el proceso hasta que la mayoría del disolvente se evapora de la gotícula, quedando un único ion.

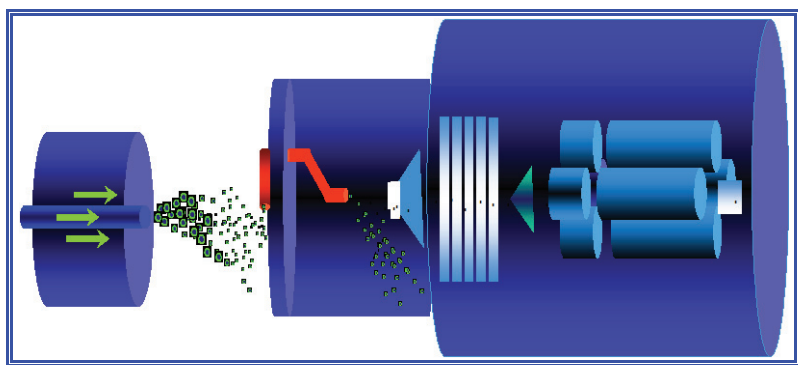


Figura 122. Esquema de una interfaz de electrospray (ESI).

Este método de ionización permite detectar y cuantificar todas las moléculas susceptibles de cargarse (o protonarse), así como determinar sus pesos molecula-

res, incluso aunque excedan del límite máximo operativo del detector, ya que genera iones muy protonados $[M+nH]^{n+}$ cuya relación masa-carga es inferior al límite instrumental del detector. Por ejemplo, un analizador con límite máximo de masas de 2.000 uma *puede ver* fragmentos de 20.000 uma de solutos que forman iones con diez cargas, o de 40.000 uma si forman iones con veinte cargas. Los análisis de compuestos péptidos, proteínas y oligonucleótidos exigen fases móviles adecuadas, generalmente protonadas (por ejemplo, 50% de metanol en agua con un 2% de ácido acético).

Las suaves condiciones del electrospray producen escasa o ninguna fragmentación, mostrando los espectros ESI el *ion pseudomolecular*. En presencia de aditivos o contaminantes, como los iones amonio o sodio, algunos analitos forman aductos al incorporar NH_4^+ (M+18), Na^+ (M+23) ó K^+ (M+39), posible motivo de confusión analítica en los espectros ESI.

La presencia de iones con cargas múltiples $[M+nH]^{n+}$ en los espectros de masas obtenidos en fuentes ESI es precisamente su característica más evidente, permitiendo la detección de moléculas grandes. Por otra parte, los analitos (M) polares y menores de 1.000 uma suelen generar iones monocargados al perder o ganar un protón: los compuestos básicos (las aminas) pueden formar la molécula protonada $[M+H]^+$, de masa (relación masa-carga) M+1, que detectará el espectrómetro en *modo de iones positivos*. A su vez, los compuestos ácidos (ácidos sulfónicos) pueden formar una molécula desprotonada $[M-H]^-$, de masa (relación masa-carga) M-1, que se detectará en *modo de iones negativos*.

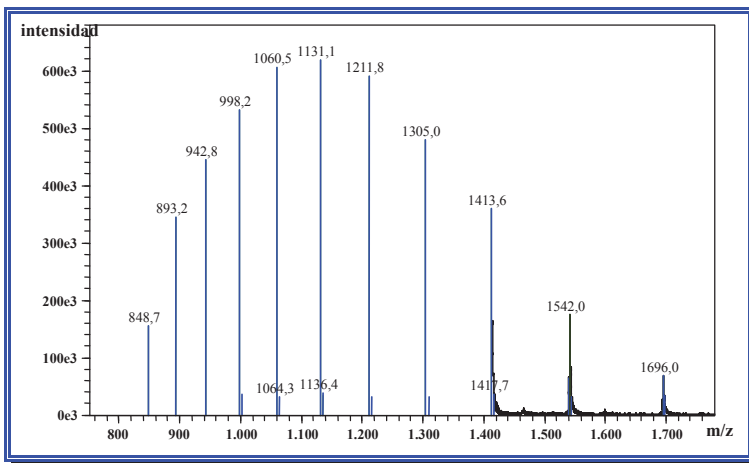


Figura 123. Espectro ESI de mioglobina de corazón de caballo.

En el clásico ejemplo del espectro de masas de la mioglobina de corazón de caballo, obtenido en una interfaz de electrospray, con cargas múltiples (figura 123), el peso molecular se puede calcular así:

$$\frac{998,2 - 1,0}{1060,5 - 998,2} = z_2 = 15,98 \cong 16 \quad (165)$$

Es decir, hay 16 cargas positivas, siendo el peso molecular:

$$PM = 16 \cdot (1060,5 - H) = 169520 \quad (166)$$

Esta propiedad extiende sobremanera los límites de masa de los analitos analizados por LC-MS. Es verdad que en principio puede desconocerse el número de cargas, pero podemos basarnos en el hecho de que cualquiera de los dos iones adyacentes en una serie de iones con múltiples cargas difiere solo en una carga. Los *softwares* de los equipos son capaces de estimar valores de cargas (n) y masa (M), y predecir la posición de otros miembros de la misma serie de iones con múltiples cargas. El valor del peso molecular se promedia del de cada par de picos en una serie junto con su desviación estándar. También existen otras técnicas de cálculo, como la que transforma el espectro m/z en un gráfico de pesos moleculares para procesarlo por *deconvolución*, modo que extrae componentes individuales y sus espectros, logrando óptima resolución¹⁰⁷.

Aunque las interfaces de electrospray capacitan LC-MS ante la mayoría de las muestras, sobre todo con analitos polares y termolábiles, su punto negro sigue siendo la imposibilidad de introducir muestras disueltas en fases móviles salinas, especialmente tampones fosfato, pues en fuentes ESI *exigen muestras solubles y estables en solventes próticos*. Se puede concluir que la interfaz de electrospray sirve para pequeñas cantidades de moléculas voluminosas o lábiles (péptidos, proteínas, organometálicos, polímeros). Como acabamos de ver los espectros ESI pueden contener iones positivos o negativos, con límites de detección variables para cada analito. ESI permite cualquier fase móvil de fase reversa, como agua o acetonitrilo, ocasionalmente cloroformo y THF. Si se desconocen inicialmente las condiciones de elución, un buen punto de partida cromatográfico es comenzar con una fase móvil agua - acetonitrilo 50:50. Teóricamente ESI acepta fases móviles con agua al 100%, pero su sensibilidad mejora añadiendo un porcentaje de modificador orgánico (por ejemplo, de 5 a 10% de metanol o acetonitrilo), que incrementa la estabilidad del proceso de nebulización. El electrospray también produce iones en fases móviles 100% orgánicas (metanol, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo o mezclas entre estos). Por el contrario, el dimetilsulfóxido disminuye su sensibilidad porque compite con la ionización. Los análisis de proteínas, habitualmente en concentraciones de 10 pmol/microlitro, suelen exigir fases móviles agua:acetonitrilo 50:50 con 0,1% de ácido fórmico. Si la muestra carece inicialmente de carácter iónico se la puede añadir un donador de protones. Los compuestos aniónicos se suelen analizar con soluciones básicas de amoniaco al

¹⁰⁷ National Institute of Standard and Technology: *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, 2008.

0,3%. Otros compuestos, como las porfirinas y organometálicos, se analizan con cloroformo añadiendo a veces un 0,1% de ácido fórmico para aumentar su generación de iones positivos, en concentración de 100 pmol/microlitro.

Las muestras concentradas han de diluirse hasta lograr una concentración adecuada previa a su inyección, entre 1 y 300 pmol/microlitro. Las fases móviles tamponadas, fundamentalmente con metales alcalinos (Na^+ , K^+), disminuyen la sensibilidad del electrospray al competir con la ionización de los analitos. Los tampones clásicos (fosfatos, TRIS) están contraindicados en la fase móvil, incluso en porcentajes muy pequeños, porque interfieren en la ionización de los analitos, aceptándose solo tampones *volátiles* (acetato amónico) en concentraciones bajas. Los detergentes (derivados de polietilenglicol y de polipropilenglicol) también son poco recomendables en ESI.

Interfaces de ionización química (APCI)

En 1974 Horning dio a conocer la primera fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI), perfeccionada después por Thomson. La principal ventaja de las interfaces APCI es poder *trabajar con flujos analíticos* de fase móvil (hasta 2 ml/min, con columnas analíticas convencionales de diámetro interno de 4,6 mm), mientras que ESI requiere flujos pequeños (0,1 ml/min), pero siempre es más delicado usar o manipular microcolumnas. Antes de la eclosión de UHPLC utilizar flujos analíticos supuso una gran ventaja, esencialmente en la transferencia de métodos de HPLC hechos con detectores convencionales. Desde 1989 las fuentes APCI complementan las de electrospray, suministrándose muchos equipos de LC-MS con ambas interfaces. El número de aplicaciones con fuentes APCI, inicialmente menor que con fuentes ESI, tiende a equilibrarse.

En una interfaz APCI los iones se forman mediante transferencia de carga desde un ion reactivo a los analitos. La interfaz APCI comienza con un capilar donde el eluyente se encuentra coaxialmente con un gas nebulizador (nitrógeno) en una zona calentada que evapora el disolvente y deseca las muestras, siendo este efecto térmico menor de lo que podría esperarse sobre los analitos, aunque los termolábiles podrían sufrir fragmentación térmica.

La suma de calor y gas nebulizador provoca un aerosol con las moléculas de los analitos y disolvente residual que comienza a evaporarse rápidamente. En la zona final de la interfaz se emplaza una "uña" o aguja de metal perpendicular al capilar, a la que se aplica un voltaje entre 2,5 a 3,0 kV, cuya descarga ioniza los analitos al formar una zona (nube) de *descarga en corona* en esa región de presión atmosférica alrededor de la aguja metálica, plasma de gas reactivo originado por colisiones y transferencias de carga que exige la volatilidad de los analitos analizados en fuentes APCI, contrariamente a los analizados en fuentes ESI.

Los analitos que pasan por esta zona se ionizan por transferencia de un protón, formando iones positivos $[M+H]^+$ o negativos $[M-H]^-$ y ocasionalmente fragmentos iónicos térmicos (figura 124).

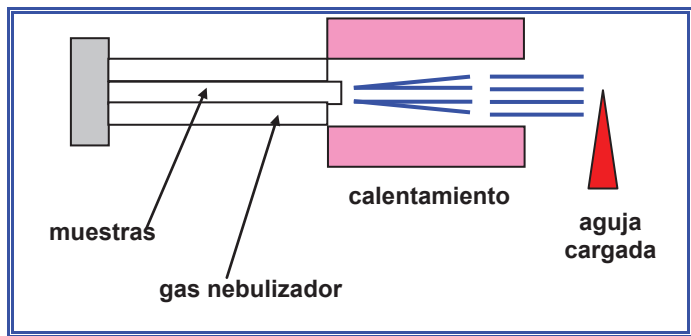


Figura 124. Funciones realizadas por una interfaz APCI.

En la secuencia normal de una reacción de ionización con generación de iones positivos en una interfaz APCI (figura 125), primeramente se originan *hidratos protonados* ($H_3O^+(H_2O)_n$) en un rápido proceso en cascada (1 ms) que involucra los *iones primarios* (N_2^+ , N_4^+ , NO^+ , H_2O^+ , O_2^+) formados por impacto electrónico con los electrones creados en la esfera exterior de la gotícula. Al final de este proceso en cascada los hidratos protonados, altamente cargados, ionizan los analitos por transferencia de carga y transferencia protónica.

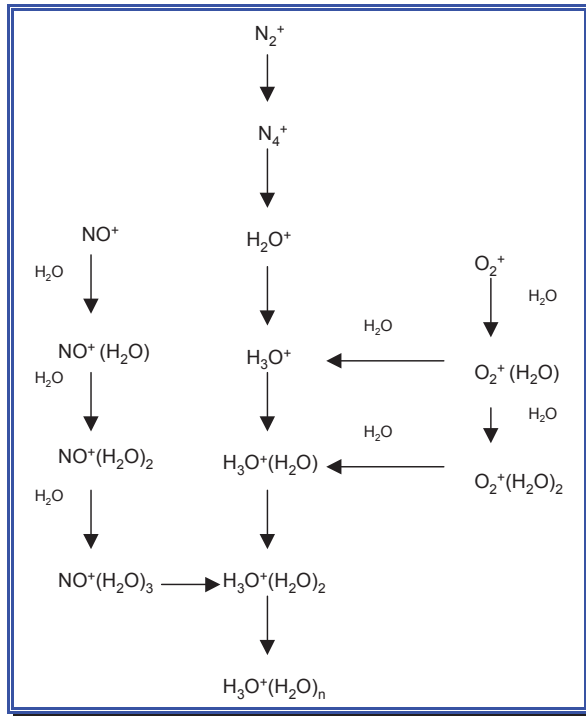


Figura 125. Proceso de generación en cascada de los hidratos protonados en una interfaz APCI.

Las fuentes APCI permiten también ionización negativa: la descarga exterior produce electrones térmicos, que pierden rápidamente su exceso de energía colisionando con las especies neutras y capturarlos los analitos electronegativos: por ejemplo, el O_2 forma O^- y O_2^- , siendo éste O_2^- la mayor fuente de iones negativos, junto con los hidratos correspondientes ($O_2^-(H_2O)$ y $O_2^-(O_2)_2$).

La sensibilidad de las fuentes APCI depende en gran medida de la química del ion molecular del analito y de los *iones reactivos* formados con la fase móvil y el aire ambiente. Los espectros obtenidos en las interfaces APCI son relativamente parecidos a los de las fuentes de electrospray, aunque APCI no puede analizar moléculas de altos pesos moleculares (proteínas), que no producen iones con cargas múltiples. APCI aplica alta temperatura (energía térmica) en el proceso de generación de iones, por lo que ioniza compuestos relativamente apolares mejor que un electrospray, pero es peor en el análisis de compuestos muy polares, siendo APCI la fuente de elección para muestras de polaridad intermedia y poco volátiles, que no se volatilizan al atravesar la primera zona de la fuente, zona de alto voltaje que crea la descarga en corona y forma aductos de los iones del analito, solvataados o protonados (figura 126).

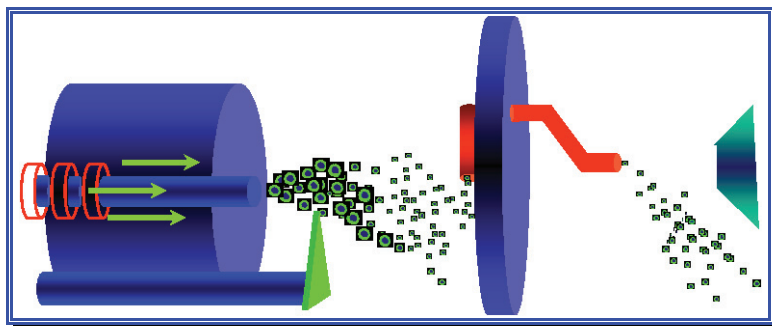


Figura 126. Esquema de una interfaz APCI.

Las dos ventajas básicas que muestran las interfaces APCI son la citada capacidad de trabajar con flujos analíticos y ser una técnica “suave” que conserva el *ion cuasi-molecular* $[M+H]^+$, garantizando la determinación de pesos moleculares de los analitos. Ocasionalmente, aumentando el voltaje de la interfaz puede inducirse una fragmentación secundaria, útil en determinaciones estructurales complejas.

Tras la interfaz APCI, igual que en la de electrospray, un *skimmer* extrae los iones hacia el analizador del espectrómetro.

Muchos analitos pueden analizarse indistintamente por ambas interfaces, APCI y ESI, resultando difícil decidir cual es la más adecuada o sensible. Sin postular reglas, *APCI parece más sensible para compuestos menos polares que ESI*, siendo ésta la primera elección para determinar masas moleculares de solutos volátiles. APCI resulta poco adecuada para el análisis de compuestos de alto peso molecular por su imposibilidad de originar iones con cargas múltiples, al presentar menor afinidad por los protones de la fase móvil que por los del analito, haciendo que la fase móvil transfiera un protón al analito para formar un ion $[M+H]^+$ en un proceso de ionización específico que hace improbable la generación de cargas múltiples, pues es difícil que otro metabolito ionizado transfiera una segunda carga, por lo que la mayoría de los iones generados por fuentes APCI exhiben una sola carga.

Morfológicamente el capilar o “aguja” de las fuentes APCI es algo más corto que el de las fuentes ESI. La señal de las fuentes APCI es dependiente de la masa, aunque permite flujos cromatográficos entre 0,2 y 2 ml/min, pero es mejor si son pequeños. Cambiar de fuente (APCI por ESI o viceversa) es sencillo, pues ambas son de bayoneta.

En consecuencia, las interfaces APCI resultan adecuadas para moléculas pequeñas, de peso molecular inferior a 1.000 uma, mientras que las interfaces ESI lo son para grandes moléculas de biopolímeros; las fuentes de electrospray for-

man iones con cargas múltiples, mientras que las de APCI forman iones monocargados; el electrospray ioniza principalmente moléculas polares (fármacos), mientras que APCI ioniza esencialmente moléculas apolares.

Interfaces de fotoionización (APPI)

En la más reciente interfaz APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*) una radiación UV (de 10 eV ó 10,6 eV), generalmente procedente de una lámpara de kriptón, es la responsable de la ionización de los analitos. Es frecuente combinar fuentes APPI y APCI, provocando simultáneamente una ionización UV (en APPI) a la vez que una descarga en corona (en APCI). Las fuentes APPI ionizan analitos apolares o de baja polaridad, que no ionizan otras fuentes de ionización, pudiendo ionizar muchos analitos en condiciones de alta temperatura (entre 250 y 350°C), excluyendo algunas moléculas termolábiles, como las proteínas.

La lámpara UV puede ionizar los analitos por tres formas: por ionización directa (*APPI directa*), fotoionización minoritaria en que los fotones de la lámpara, muy energéticos, al exceder su energía la energía de ionización del analito (M) ionizan directamente a éste ($M + hv \rightarrow M^{++} + e^-$). El ion monocargado (M^+) enseguida recibe un protón del disolvente, formando un ion protonado $(M+H)^+$. En la segunda forma de ionización (*APPI indirecta*) las moléculas de un solvente (S) ionizan indirectamente el analito, en el proceso $M + S + hv \rightarrow [M+H]^+ + [S-H]$, obligando a controlar como variable la naturaleza del disolvente, pues distintos disolventes causan diferente ionización. Como el número de moléculas del disolvente es muy superior al de moléculas del analito, se produce un número enorme de colisiones a presión atmosférica, donando un protón el disolvente excitado para protonar el analito, ocasionando dos tipos de iones (M^{++} y $[M+H]^+$), que discriminará el analizador del espectrómetro de masas. En la tercera modalidad de ionización, denominada *APPI con dopaje*, una molécula "dopante" (D), de energía de ionización inferior a la del analito, ioniza a este mediante dos posibles modos: en el primero, un dopante, muy concentrado para favorecer más colisiones, dona un protón al analito ($D + hv \rightarrow D^{++} + M \rightarrow [M+H]^+ + [D-H]^+$), mientras que en la otra modalidad, el ion dopante recibe un electrón del analito ($D + hv \rightarrow D^{++} + M \rightarrow M^{++} + D$).

Físico-químicamente, la secuencia del proceso de fotoionización a presión atmosférica contempla tres etapas: en la primera, el analito se mezcla con el disolvente, cuya elección condiciona una ionización eficiente; en la segunda etapa, un gas de nebulización (nitrógeno) vaporiza la fase móvil que penetra en la cámara de ionización a presión atmosférica; por último, en la tercera etapa, la lámpara UV (generalmente de kriptón) irradia fotones sobre el eluyente con los analitos sin ionizar las moléculas de aire ni del entorno (cuya ionización requiere más energía), pasando solo los iones del analito al resto del espectrómetro de masas.

Interfaces MALDI

Las interfaces MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) resultan especialmente adecuadas para ionizar grandes biomoléculas, previamente a su determinación en el analizador del espectrómetro. MALDI es la técnica de elección para moléculas de alto peso molecular: péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polímeros, productos naturales y muchos compuestos orgánicos y organometálicos. Suele ser la fuente de ionización de los espectrómetros de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight Mass Spectrometer*), en los conjuntos MALDI-TOF, cuyos usuarios se refieren a ellos coloquialmente con la paronomasia “malditos”. En la interfaz MALDI, primeramente la muestra (unos 0,5 μl , con cantidades totales de cada analito de 1 pmol) se disuelve en un disolvente adecuado (agua, con un 0,1% de TFA en el caso de proteínas y péptidos), que luego evapora una corriente de gas, habitualmente aire. Después la muestra se mezcla en cantidad minoritaria (en proporción 1:100) con una *matriz* adecuada, cuya selección condiciona grandemente la eficiencia de la desorción: son matrices habituales el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico) y el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (4HCCA).

Ambas soluciones, de muestra y matriz, se mezclan íntimamente, co-cristalizando. La matriz debe ser sólida (están contraindicadas las matrices líquidas) y debe absorber la radiación UV. El conjunto matriz-analito se dispone sobre una superficie metálica, en la misma cámara de vacío del instrumento, incidiendo sobre la placa un rápido pulso láser, cuya energía absorbe la muestra para desecarse primero y luego desorber e ionizar los analitos (ya en fase gaseosa), generando iones y moléculas neutras en un microplasma de iones. Posteriormente los iones derivados del analito son acelerados hacia el interior del espectrómetro (figura 127).

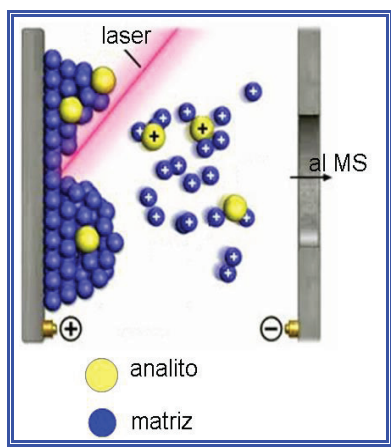


Figura 127. Esquema del proceso MALDI.

MALDI también se emplea como técnica de ionización cualitativa *off-line*, pues es una ionización “blanda” que conserva el ion molecular, protonado o desprotonado. En todo caso, MALDI ioniza una gran variedad de analitos, hasta 350.000 uma, con límites de detección variables, que dependen del analito. La exactitud de masas es del 0,1% (0,05% con patrón interno). La cantidad de muestra que precisan las fuentes MALDI depende de la magnitud molecular de los analitos, exigiendo menores cantidades los de alto peso molecular (tabla 51).

Tabla 51. Cantidad de muestra que precisan las fuentes MALDI.

Concentración (pmol/μl)	Peso molecular (uma)
1 - 10	1.000
5 - 10	20.000
1	60.000 - 100.000

MALDI exhibe las masas medias de los analitos (M) en espectros de masas que muestran mayoritariamente iones *quasi* moleculares monocargados: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, los primeros de los cuales ($[M+H]^+$) son los que suelen generar los analitos de bajos pesos moleculares. MALDI también puede generar iones negativos ($[M-H]^-$) e iones con cargas múltiples (muchas veces +3), dímeros, trímeros, etc.

Las muestras no deben tener contaminantes, como sales, tampones o detergentes, aunque MALDI admite su presencia en pequeñas cantidades, menores del 2%. Si fuese necesario tamponar la fase móvil, se hará con un tampón volátil, por ejemplo, carbonato amónico. Evidentemente, MALDI tolera los solventes clásicos utilizados como fases móviles en HPLC de fase reversa, como agua, acetonitrilo, metanol, THF y otros líquidos orgánicos, estando siempre contraindicados DMSO y DMF.

Con tales precauciones MALDI resulta una fuente ideal para compuestos puros y mezclas de grandes biomoléculas. Proporciona de forma rápida sus masas (a partir de 10 uma) e informa sobre su estructura molecular. Sin duda, la principal utilidad de los espectrómetros MALDI-TOF es el estudio de péptidos, a partir de cuyos fragmentos puede deducirse con fines predictivos la secuencia de aminoácidos característicos de cada péptido¹⁰⁸.

¹⁰⁸ Mant, C.T. y Hodges, R.S.: *High Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides: Separation, Analysis and Conformation*. Editorial CRC Press, Boca Ratón, California, 1990.

Otras interfaces

Sabiendo que en LC-MS imperan las actuales interfaces de ionización a presión atmosférica, citaremos a continuación otras interfaces de ionización que existen o han existido en LC-MS:

La primera interfaz de LC-MS fue la de *correa móvil (moving belt)*. El eluyente se depositaba sobre una correa móvil, donde se evaporaba antes de llegar a la cámara de ionización. La distinta volatilidad y labilidad de disolventes y muestras manifestaron los primeros problemas de esta interfaz, bastante mecánica, pero adaptable a la mayoría de los espectrómetros de masas coetáneos. Tras transportar la correa móvil la muestra al espectrómetro de masas, éste solía ionizarla mediante impacto de electrones, entonces la técnica de ionización más clásica, antigua y usada.

En 1980 apareció la interfaz de *inyección líquida directa (DLI, Direct Liquid Injection)*, un simple puerto de inyección emplazado sobre la misma cámara de ionización, cuyas condiciones de vacío (o presión muy baja) evaporaban el disolvente. Prácticamente desaparecida, esta interfaz solo era compatible con técnicas de ionización química y precisaba flujos muy bajos, tolerados por los sistemas de vacío de los espectrómetros de masas contemporáneos. Ocasionalmente se utilizaron divisores de flujo, que, al procesar solo parte de las muestras, exhibían menor sensibilidad; como mejor alternativa, se emplearon bombas de jeringa para conseguir flujos reducidos estables.

Blakely y Vestal crearon la interfaz de *Thermospray* en 1983, que revolucionó LC-MS al montar un sistema de alto vacío mejorado, capaz de trabajar ¡por fin! con flujos analíticos de hasta 2 ml/min. Empero, las primeras fuentes de *thermospray* eran inestables y sus resultados impredecibles. La ionización surgía de la transformación de la muestra en gotículas en un nebulizador, en caliente (200° C), produciendo la ionización térmicamente. A pesar de que la temperatura afectaba la estabilidad térmica de las muestras y ser el *thermospray* incompatible con los tampones habituales, obligando a sustituirlos por tampones volátiles, importante limitación cromatográfica, esta interfaz fue bastante popular, más que sus antecesoras de correa móvil y de inyección líquida directa.

Un año después, en 1984, Willoughby y Browner idearon la interfaz de *particle beam*, enseguida “rebautizada” con el periodístico nombre de *MAGIC (Mono-disperse Aerosol Generating Interface for Chromatography)*, de manejo más sencillo y propiedades más ventajosas, previamente una fuente de ionización de impacto electrónico, entonces usuales en los GC-MS de cuadrupolo.

Una versión posterior y mejorada del *particle beam* fue la interfaz *thermo-beam*, aparecida en 1987. Aplicaba alta temperatura y pronto quedó relegada a aplicaciones donde se disponía de poca cantidad de muestra, pues solo permitía

flujos capilares y escasos picogramos de muestra. El *thermobeam* eliminaba la fase móvil por *desolvatación* previa y se enlazaba directamente con una cámara de ionización por impacto de electrones (EI, *Electron Ionization*): inicialmente un nebulizador térmico generaba un aerosol de la muestra combinando concéntricamente calor y helio a lo largo de un capilar de sílice fundida. El aerosol llegaba a una región de expansión calorífica, donde proseguía la desolvatación, ingresando las partículas en el circuito de vacío, que terminaba de eliminar el solvente y también arrastraba los analitos a la cámara de ionización de impacto de electrones, donde la muestra, ya gaseosa, era bombardeada con un haz de electrones acelerados, muy energéticos, que fragmentaban las moléculas de los analitos en iones positivos, fragmentación tan intensa que apenas dejaba iones del analito sin fragmentar, impidiendo apreciar su ion molecular. La ionización por impacto de electrones aplicado en las interfaces de *thermobeam* era (y es) la ionización tradicional de los espectrómetros de masas y equipos de GC-MS, adecuado para sustancias volátiles apolares o poco polares y térmicamente estables, pero inviable con moléculas termolábiles o de alto punto de ebullición. Las muestras, ya fuesen inicialmente soluciones, líquidos, sólidos o gases, finalmente debían hallarse en estado gaseoso, motivo del éxito de la ionización por impacto de electrones en GC-MS. El es una ionización “dura”, que genera un espectro de masas característico de cada analito y exhibe un pico minoritario del *ion molecular* (M^+) junto a muchos fragmentos menores.

Otra posible ionización es la producida en las fuentes de *bombardeo con átomos acelerados* (FAB, *Fast Atom Bombardment*): un *cañón de átomos*, generalmente un haz de átomos neutros de xenón, acelerados por un voltaje de 8 kV, se enfoca sobre una placa metálica donde se halla la muestra disuelta en el solvente. La muestra debe tener alta viscosidad, lograda artificialmente adicionando a la fase móvil glicerol, tioglicerol o alcohol 3-nitrobencílico, solubles en la matriz y compatibles con el sistema de vacío; ocasionalmente se añade ácido trifluoroacético a la matriz para mejorar la formación de iones protonados. El espectrómetro de masas requiere flujos muy lentos (de 2 a 20 $\mu\text{l}/\text{min}$), obtenidos con sistemas de bombeo micro, bombas de jeringa o instalando un divisor de flujo. El *cañón de xenón* puede remplazarse por un *cañón de iones cesio* cuando se precisa alta sensibilidad a masas altas, mayores de 5.000 uma. Los cañones de iones cesio de alta energía generan también *iones secundarios líquidos*. FAB es un modo de ionización “suave”, pues produce mayoritariamente iones moleculares sin fragmentar y complementa otros modos de ionización, aplicándose en determinaciones de analitos polares y termolábiles, muchas veces de alto peso molecular, como péptidos, biomoléculas, derivados sulfónicos, iones organometálicos u otras moléculas complejas. Los enmarañados espectros FAB están formados por iones *quasi* moleculares $(M+H)^+$, fragmentos, grupos residuales de la matriz y aductos provocados por la interacción de ésta con los analitos. Los espectros FAB de muestras que contienen sales también exhiben aductos $(M+Na)^+$ y $(M+K)^+$, aunque un alto contenido salino degrada las muestras, impidiendo su determinación. Algunas muestras exhiben espectros FAB de iones negativos mejores que con iones positivos, siendo

el ion *quasi* molecular (M-H)⁺. La cantidad de muestra suele ser menor de 1 mg, mostrando resoluciones de 1.000 los espectros de baja resolución, y 10.000 los de alta resolución.

Otra posible técnica de ionización es la *ionización por campo* (FI, *Field Ionization*), donde los compuestos volátiles generan iones moleculares dominantes, también con escasa o nula fragmentación. El dispositivo monta estrechos filamentos de tungsteno de pocas (10) micras, sobre los se va aplicando paulatinamente un gradiente de campo eléctrico (de 10^8 V/cm) que ioniza los analitos por un *efecto túnel de electrones*. La ionización por campo se emplea en determinaciones de isótopos (^2H , ^{13}C , ^{18}O , etc.), para calcular su porcentaje en las muestras. La ionización por campo es poco sensible y suele trabajar con baja resolución. Frecuentemente se utilizan sondas de introducción directa de muestras, que precisan pocos miligramos de ésta. Las medidas de relación isotópica se realizan barriendo en modo continuo una región adecuada de iones moleculares, requiriendo patrones de cada analito, procesados simultáneamente con las muestras enriquecidas con isótopos para evitar desviaciones debidas a factores instrumentales¹⁰⁹.

La *ionización por desorción en un campo* (FD) complementa la ionización FAB y suele ser el paso sucesivo a una *ionización por campo* (FI, *Field Ionization*). La *desorción en un campo* (FD) es recomendable para ionizar compuestos escasamente volátiles y de baja polaridad. FD y FI utilizan el mismo emisor, pero el filamento se sumerge dentro del vial que contiene la muestra, aunque otras veces se suspende una gota de muestra sobre el filamento. Las muestras para FD deben ser altamente solubles en el solvente (1 mg en 100 microlitros), requiriendo pocos mg de muestra. Los espectros se obtienen aumentando la corriente en el emisor (lo que genera calor), logrando espectros para cada valor de intensidad, en gráficos de miliamperios frente a la relación masa-carga.

También existen fuentes de *desorción en un plasma* (PD, *Plasma Desorption*), que bombardean las muestras con átomos de californio 252, muy energéticos e ideales para péptidos y proteínas pequeñas, entre 20.000 y 30.000 uma. En general, las ionizaciones FI, FD y PD requieren flujos bajos, capilares o *microbore*.

ANALIZADORES DE MASAS

El *analizador de masas*, también llamado *filtro de masas*, es el penúltimo componente instrumental del espectrómetro, siendo el último el detector. El anali-

¹⁰⁹ Hobby, K. y Bateman, R. : *The Use of Isotope Ratio Measurements to Reduce the Number of Candidate Elemental Composition from Accurate Mass Determination*. 54th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Applied Topics. Seattle, Washington, 2006.

zador ordena, clasifica y lleva secuencialmente al detector los fragmentos iónicos generados previamente en la interfaz y fuente de iones, separándolos por su relación masa-carga al aplicar un campo magnético o eléctrico. El analizador es el módulo más importante del espectrómetro, que condiciona el resto del instrumento. Existen distintos diseños, ya sean con un solo analizador o sistemas híbridos que combinan varios analizadores en serie, cada uno con sus ventajas y limitaciones, como veremos a continuación. Los equipos con un solo analizador más utilizados son los de cuadrupolo (Q, *Quadrupole*), trampa iónica (IT, *Ion Trap*) y de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*). Desde hace unos años se están imponiendo por sus ventajas analíticas los sistemas que combinan varios analizadores, sobre todo los de triple cuadrupolo (QQQ). Los analizadores se caracterizan por sus propiedades de resolución, precisión, intervalo (rango) de masas, sensibilidad y selectividad, que concretan su elección.

Sin embargo, previo al analizador, pero perteneciente a él (por lo cual lo tratamos exactamente aquí) éste ha de disponer un dispositivo de *Guías Iónicas*, cuyo potencial eléctrico, de signo contrario al de los fragmentos iónicos generados en la fuente de ionización (interfaz), atrae a éstos, enfocándolos rápidamente al analizador. Una de las primeras providencias que debe cumplir el sistema de guías iónicas es evitar cualquier eventual pérdida de iones entre la fuente y el analizador. Existen varios tipos de guías iónicas, que aseguran la introducción efectiva de los fragmentos iónicos en el analizador del espectrómetro, atraídos por su voltaje contrario: la *Lente de Turner-Kruger*, que montan los equipos de los fabricantes *Agilent* y *Shimadzu*, semejante a un tubo cilíndrico de rayos catódicos; las lentes magnéticas, basadas en un campo magnético radial; las guías iónicas multipolo (hexapolo, octapolo o cuadrupolo), esta última la *Guía Iónica Brubaker de Radiofrecuencias* que montan los equipos de la marca *Waters*; los *Embudos Electrodinámicos Iónicos*, desarrollados para interfaces ESI, y, finalmente, el dispositivo denominado *Lente de Einzel*.

Analizadores de masas de cuadrupolo

El analizador de un solo cuadrupolo (Q, *Quadrupole*) es el más extendido y popular entre los sistemas LC-MS por su diseño sencillo (figura 128), que permite su unión a varios tipos de interfaces, reducido tamaño, facilidad de uso, escaso mantenimiento y simplicidad en la interpretación de sus datos. Sus especificaciones (tabla 52) contemplan requerimientos de vacío, voltajes aceleradores de los iones y eficiencia en el procesado de los iones formados antes en la fuente¹¹⁰.

¹¹⁰ Dawson, P.H., Ed.: *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications*. Editorial Elsevier, Amsterdam, 1976.



Figura 128. Detector espectrométrico de masas de cuadrupolo para HPLC (imagen cortesía de Perkin-Elmer).

Descrito en 1956 por los investigadores de la Universidad de Bonn Paul y Steinwedel como un “filtro de masas de cuadrupolo”, enseguida fue reconocido su principio enfocador de masas sometidas a fuertes campos eléctricos, idea ya propuesta en 1948 por Christofilos y patentada por éste precisamente en 1956. En 1952 Courant, Livingston y Snyder habían separado haces de partículas cargadas (iones) aplicando gradientes de campos magnéticos en cuadrupolos, idea que permitió a Post y Heinrich desarrollar al siguiente año un diseño de espectrómetro de masas y a Good ese mismo año “un dispositivo separador de partículas”. Por tanto, los analizadores de cuadrupolo son “dinámicos” por influir en las trayectorias de los iones fuerzas eléctricas dinámicas dependientes del tiempo. Los iones, sometidos a un campo cuadrupolar (por la disposición espacial del potencial en su interior), se enfocan en el centro del dispositivo, incrementando la linealidad al desplazarse desde su origen en un movimiento vibratorio, ya descrito ¡en 1868! por Mathieu¹¹¹, fenómeno estudiado posteriormente por Dawson y Whetten en 1968; Lawson, Todd y Bonner en 1975; Campana en 1980, y March, Hughes y Todd en 1989. Las relaciones matemáticas habían sido descritas por McLachlan en 1947 y Campbell en 1955, para definir regiones de “estabilidad e inestabilidad”, que, aplicadas al cuadrupolo, concretan las trayectorias de los iones en el interior de éste, pudiendo establecerse el campo cuadrupolar sobre filtros de masas de cuadrupolo bidimensionales, tridimensionales u otros “multipolos” (hexapolos y octapolos).

¹¹¹ Mathieu E.: *Mémoire Sur Le Mouvement Vibratoire d'une Membrane de Forme Elliptique*. Math Pure Appl. Editorial J. Liouville, 1868.

Tabla 52. Características instrumentales de los analizadores de cuadrupolo.

Sencillos y robustos, a un precio razonable
Idóneos en aplicaciones cuantitativas
Fácil acoplamiento con fuentes API
Exigen bajos voltajes en la fuente de ionización
Resolución: 1.000 a 4.000
Exactitud de masas: 0,050 uma
Vacío moderado (10^{-5} torr)
Velocidad de barrido: 1 espectro/segundo

El cuadrupolo está formado por cuatro cilindros de superficie hiperbólica, agrupadas en dos pares y llamados coloquialmente *barras*, que limitan una sección interna cuadrada (figura 129). Las barras opuestas (en diagonal) reciben inicialmente un voltaje V_{dc} (como diferencia de potencial) positivo de corriente continua (DC) y otro voltaje V_{rf} causado por radiofrecuencias (RF, de aproximadamente 1 MHz), en tanto en que las otras dos barras reciben voltajes iguales a las primeras, pero opuestos (negativo el de corriente continua y el causado por radiofrecuencias desfasado 180° respecto al primer par, siendo valores típicos $V_{dc} = 500$ V y $V_{rf} = 6$ kV de pico a pico). Dichos voltajes forman un campo eléctrico bidimensional en el cuadrupolo, haciendo que los iones de distinta relación masa-carga que entran en él queden sometidos a la oscilación del campo eléctrico, atraídos y repelidos alternativamente por las barras de forma muy rápida. Los iones que poseen una masa-carga dada describen un movimiento helicoidal estable hasta el final del cuadrupolo, que atraviesan hasta el posterior detector de iones sin tocar las barras. Todos los demás iones “caen” sobre las barras y, al tocarlas, su carga se neutraliza: neutros, los succiona el sistema de (alto) vacío. Variando progresivamente los valores de voltaje de corriente continua y el causado por radiofrecuencias (pero manteniendo constante la relación entre ambos voltajes) se controla la relación masa-carga (m/z) y pueden realizarse barridos de masas, generalmente desde las masas más altas hasta las masas más bajas.

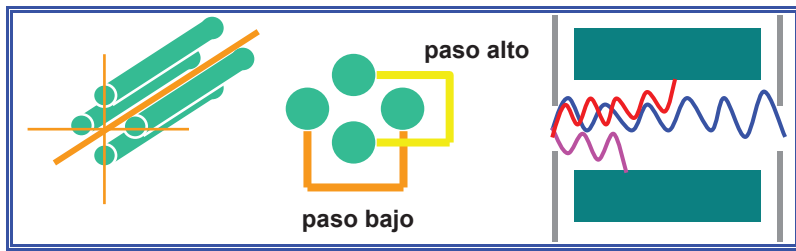


Figura 129. Esquema de un analizador de cuadrupolo.

La velocidad de los iones a través del cuadrupolo resulta de los voltajes de las lentes, masa del ion y carga de éste, ya que los voltajes aplicados en el cuadrupolo no añaden fuerza alguna a los iones que atraviesan el conjunto de las cuatro barras, cuya energía potencial, tomada del voltaje de la lente aceleradora (V), multiplicado por la carga del ion (x_1, x_2, x_3 , etc.), iguala la energía cinética ganada por el ion ($1/2mv^2$), donde m es su masa y v su velocidad. Por tanto, todos los iones poseen la misma energía por unidad de carga, dependiendo sus velocidades solo de sus masas y cargas. Aunque el cuadrupolo no dota de velocidad a los iones que atraviesan las cuatro barras, sí los clasifica por sus velocidades, tomadas de las guías iónicas, responsables de acelerar los iones a lo largo del eje del cuadrupolo: así, los iones de masa $2m$ y carga $2e$ atraviesan el cuadrupolo con la misma velocidad que los iones de masa m y carga e .

El camino de un ion de una masa-carga dada se denomina *paso estable*, mientras que las trayectorias de los otros iones de diferente relación masa-carga se denominan *pasos inestables*. Las superficies de los cuatro cilindros simétricos de un cuadrupolo son tangentes respecto de un teórico cilindro central, produciendo en este espacio cilíndrico los campos electromagnéticos un camino estable para la relación masa-carga seleccionada. En la práctica, la diferencia de eficiencia de los cuadrupolos cilíndricos (reales) respecto a los hiperbólicos (teóricos) es insignificante. Un par de cilindros se considera *par positivo* y el otro, *par negativo*.

Algunos cuadrupolos montan *pre-barras* en la parte inicial de cada uno de sus cuatro cilindros, pre-barras aisladas eléctricamente de los cilindros principales y a las que solo se les aplica voltaje RF. Las pre-barras ayudan a los iones procedentes de la fuente de iones a penetrar en el campo que bordea el final del cuadrupolo y a entrar en él por su eje central, así como a mantener los cilindros limpios de otros iones distintos de los seleccionados, que caen lejos del centro de la trayectoria antes de entrar en los cilindros del cuadrupolo.

Los analizadores de cuadrupolo y, por tanto, los espectrómetros de este tipo, muy utilizados en LC-MS, presentan las características instrumentales que vimos en la tabla 52, con las ventajas e inconvenientes que muestra la tabla 53:

Tabla 53. Ventajas y desventajas de los analizadores de cuadrupolo.

Ventajas:

Compactos, muy utilizados, económicos y de fácil manejo

No son afectados por la energía y distribución espacial de los iones

Método de barrido simple

Emplean potenciales bajos, que permiten presiones altas y sistemas de vacío sencillos

Facilidad para ser acoplados con otros analizadores de masa

Intervalo de masas hasta m/z 4.000

Desventajas:

Baja resolución, no pueden determinar masas exactas

Fragmentación de algunos compuestos limitada a un único ion

Analizadores de trampa de iones (IT)

La *trampa de iones*, también denominada *trampa iónica* o en una terminología más completa *cuadrupolo de trampa iónica*, “*trampa*” en el argot analítico habitual, es en cierto modo un “cuadrupolo de trampa iónica”. Este tipo de analizadores monta internamente tres electrodos (uno anular, otro de entrada y otro de salida), sobre los que se aplican distintos voltajes para generar un campo eléctrico tridimensional que atrapa y concentra los iones, cuya trayectoria oscilante depende del potencial de los electrodos y de la relación masa-carga de los fragmentos iónicos. Modificando los potenciales de los electrodos se van alterando las trayectorias de los iones para expulsarlos finalmente de la trampa secuencialmente en dirección axial y realizar los espectros de masas. La principal característica y ventaja de los analizadores de trampa iónica es su capacidad para aislar un ion dado, lo que posibilita su refragmentación y posterior detección en técnicas *masas-masas* (MS/MS). Naturalmente, la trampa iónica puede monitorizar masas-cargas previamente definidas, en modo SIM.

La curiosidad que supuso la trampa iónica, entonces denominada “cuadrupolo de trampa iónica”, surgió cuando George Stafford, Jr., investigador de la compañía *Finnigan Corp.*, presentó en 1979 su hallazgo en la Sociedad Americana de Espectrometría de Masas, continuando los estudios de Armitage. Cuatro años más tarde, en 1983, *Finnigan Corp.* fabricó el primer cuadrupolo de trampa iónica comercial como detector de GC-MS, acoplado posteriormente en LC-MS tras una interfaz de electrospray.

Tras la ionización previa realizada en la fuente, el potencial pulsante de las lentes o guías electrostáticas obliga a los iones a entrar en la trampa. Una vez dentro, el potencial de radiofrecuencias del electrodo anular (potencial RF) confiere una trayectoria circular a los iones, atrapándolos durante un tiempo indefinido en su centro, lo cual permite refragmentarlos mediante un gas de colisión. Posteriormente los iones con diferente relación masa-carga son eyectados al detector variando el potencial de radiofrecuencias (RF), comenzando por los de menor masa-carga. El diseño del analizador de trampa de iones presenta tres ventajas fundamentales: mayor sensibilidad al optimizar el tiempo de permanencia de los iones en la trampa; la posibilidad de refragmentar los iones iniciales en técnicas masas-masas sin límite (MS^n , aunque instrumentalmente es MS^5), y una excelente especificidad (tabla 54).

Tabla 54. Ventajas y desventajas de los analizadores de trampa de iones.

Ventajas:

Elevada sensibilidad en barridos MS y MS/MS

Altísima velocidad de barrido (27.000 uma/s)

Conmutación de polaridad +/- muy rápida (0,5 seg)

Capacidad MS^n

Fácil interpretación de los espectros

Desventajas:

Sistemas de baja resolución

Mayores tiempos de permanencia pueden ocasionar reacciones ion-molécula

Derivado del analizador de trampa iónica, el analizador *Orbitrap*, aparecido en 2005, dispone un electrodo interior coaxial husiforme capaz de discriminar los iones con altísima precisión de masas (1-2 ppm) y también altísima resolución (200.000). Los iones entran tangencialmente entre los electrodos, atraídos electrostáticamente hacia el electrodo interior, que los atrapa haciéndoles avanzar girando alrededor del electrodo husiforme central con una frecuencia inversamente proporcional a su $(m/z)^{1/2}$.

Analizadores de tiempo de vuelo (TOF)

Los analizadores de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*) montan un tubo relativamente largo y sin carga eléctrica, donde los iones “vuelan” impulsados por un campo eléctrico impuesto en el extremo inicial del tubo: los de mayor masa-carga vuelan más lentamente que los de menor masa-carga, llegando separados

al detector situado en el extremo final del tubo. Estos espectrómetros son fácilmente reconocibles, pues el tubo se dispone vertical para aprovechar mejor el espacio del laboratorio (figura 130).



Figura 130. Sistema de HPLC acoplado a un espectrómetro TOF (imagen cortesía de *Agilent Technologies*).

En 1946 William Stephens presentó un primer diseño de Espectrómetro lineal de Tiempo de Vuelo (TOFMS, *Time Of Flight Mass Spectrometer*) en la Sociedad Americana de Física¹¹². Cinco años después, en 1951, Goudsmit demostró que aplicando en él un campo magnético permitía medidas de masas exactas (con el tercer decimal) de isótopos de xenón¹¹³. En 1953 Wolff y Stephens publicaron un nuevo diseño de TOFMS lineal que permitía adquirir espectros de masas¹¹⁴, esbozo publicado por Wiley y McLaren en 1955 y germen del primer instrumento comercial¹¹⁵, presentado en septiembre de 1958 en Londres durante la Primera Conferencia Internacional de Espectrometría de Masas¹¹⁶.

Los analizadores de tiempo de vuelo permanecieron sin innovaciones apreciables durante las siguientes tres décadas, hasta que en la década 1980-90 fue una necesidad analizar masas atómicas con mayor exactitud para determinar composiciones isotópicas e identificar moléculas por sus pesos moleculares. Esto requería analizadores con alta resolución de masas y alta eficiencia en la transmi-

¹¹² Stephens, W.: *Phys. Rev.*, 69 (1946) 691.

¹¹³ Goudsmit, A: *Phys. Rev.*, 84(4) (1951) 824-829.

¹¹⁴ Wolff y Stephens.: *Rev. Sci. Instrum.*, 24(8) (1953) 616-617.

¹¹⁵ *Rev. Sci. Instrum.*, 16(12) (1955) 1150-1157.

¹¹⁶ Waldron, J.D. Ed.: *Advances in Mass Spectrometry, Vol. 1*, Editorial McMillan Co., Nueva York, 1959.

sión de los iones, lograda al reducir la velocidad de transmisión de éstos, inyectándolos de modo pulsante en un campo electromagnético estático, pudiéndose así caracterizar masas por su tiempo de vuelo con precisión, denominándose los nuevos analizadores “espectrómetros de masa exacta”. Aquellos nuevos *TOF de energía asincrónica*, exigida a los espectrómetros de alta gama, sustituyeron en muchas ocasiones a los espectrómetros de sector magnético. La inicial escasa resolución de masas ($\pm 0,5-1$ Dalton) de los TOF lineales (figura 131) obligaba a disponer tubos de la mayor longitud posible, pues sus medidas condicionan el potencial de aceleración. Tal limitación la superó el *reflectrón*, variante instrumental donde los analitos sufren reflexión en la pared distal del tubo (figura 132): el TOF de *reflectrón*, con anillos múltiples en su tubo, alargó la trayectoria de los iones en múltiple reflexiones y sectores eléctricos, permitiendo analizar iones lentos.

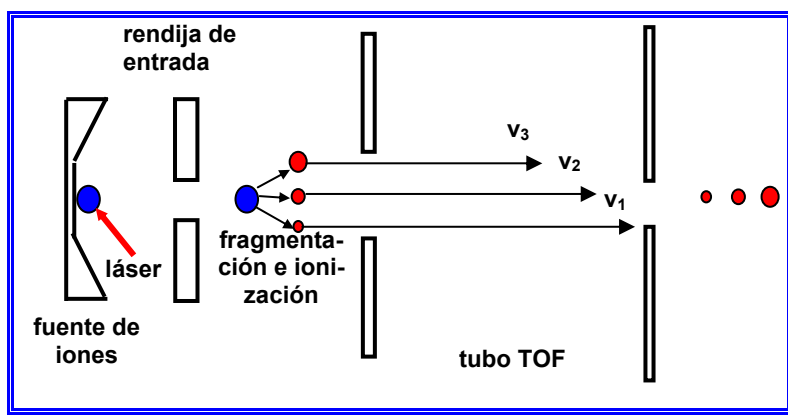


Figura 131. Esquema de un espectrómetro MALDI-TOF. A igualdad de carga los fragmentos, fruto de la ionización, adquieren mayor velocidad cuanto menor es su masa ($v_1 > v_2 > v_3$).

El *tiempo de vuelo* (t) que tardan los iones de una relación masa-carga dada en recorrer la totalidad del tubo equivale a la distancia recorrida (L , longitud del tubo), dividida por la velocidad (v) de los iones en el tubo. Por tanto, el tiempo en que los iones llegan al detector, al final del tubo de vuelo, estima sus relaciones masa-carga. La energía cinética de los iones puede cuantificarse al igualarla con la adquirida gracias al voltaje de aceleración (V_s), que dota a todos los iones de una misma energía cinética inicial, tomando los iones de distinta relación masa-carga una velocidad desigual en su trayectoria a lo largo del tubo de vuelo:

$$E_c = \frac{mv^2}{2} = qV_s = zeV_s \quad (167)$$

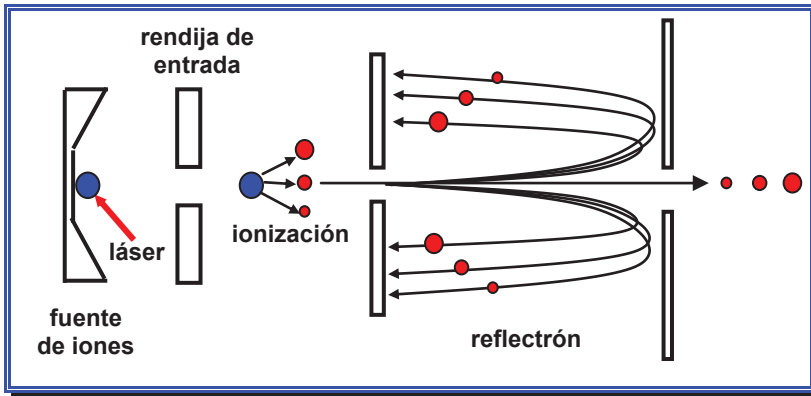


Figura 132. Esquema de reflectrón de un espectrómetro MALDI-TOF.

Los analizadores de tiempo de vuelo no presentan límite de masa superior, mientras que la alta eficiencia de la transmisión iónica les confiere alta sensibilidad en la detección (tabla 55).

Tabla 55. Ventajas y desventajas de los analizadores de tiempo de vuelo (TOF).

Ventajas:

- Altísima velocidad de barrido (20.000 scan/s)**
- Sin limitación de masa**
- Conmutación de polaridad +/- muy rápida (0,5 seg)**
- Capacidad MSⁿ**
- Fácil interpretación de los espectros**

Desventajas:

- Sistemas de baja resolución**
- Largos tiempos de almacenamiento favorecen posibles reacciones ion-molécula**

La variante instrumental presente en los analizadores de Tiempo de Vuelo por Pulso Retardado (DPE, *Delayed Pulse Extraction*) es una "Extracción Pulsante" al tiempo que una "Extracción Dinámica" (*Pulsed Ion Extraction*) que mejora la resolución, aunque solo en un intervalo de valores m/z , ya que el retardo (*delay*) entre la formación del ion y su extracción hace que los iones de igual relación masa-carga absorban la dispersión de energía cinética que les mueve. Los iones de un mismo fragmento, inicialmente separados por su energía cinética en la primera región libre de campo, reciben luego un pulso eléctrico que aumenta la menor energía cinética de los iones más lentos, igualando a todos los iones de igual m/z .

Por tanto, es necesario optimizar (generalmente disminuyéndolos) el retardo y el pulso, dependientes de m/z , para lograr enfocar mejor los iones de pequeña relación masa-carga.

Otros analizadores

Los analizadores de *Resonancia de Ion Ciclotrón* (ICR, *Ion Cyclotron Resonance*) montan dos placas semicirculares perpendiculares huecas dentro de un campo magnético uniforme en condiciones de vacío. Posteriormente, al aplicar un campo de radiofrecuencias oscilante sobre las placas se genera entre ellas un campo eléctrico oscilante que acelera los iones próximos a uno de los electrodos, donde un campo magnético les obliga a recorrer una trayectoria circular, reapareciendo en la región intermedia. Algunos analizadores de *Resonancia de Ion Ciclotrón* operan con Transformada de Fourier en sistemas FTMS (*Fourier Transformed Mass Spectrometer*), excitando simultáneamente todos los iones del ciclotrón para luego realizar un barrido rápido de todas las frecuencias, obligando a todos los iones a tomar una trayectoria (en fase) perpendicular a la órbita. Finalmente la Transformada de Fourier analiza la compleja función de onda procedente del detector del espectrómetro, dependiente del tiempo, con la que se cimienta el espectro de masas.

Por último, los analizadores “de sector” (magnético, eléctrico o magnetoeléctrico) que montan los espectrómetros de alta resolución trabajan con barridos de voltaje y barridos de campo magnético. El *barrido de voltaje* resulta ideal para conocer la composición elemental del analito, pues otorga masas muy precisas, con varios decimales, analizando el analito simultáneamente con un patrón múltiple (por ejemplo, una mezcla de perfluoroalcanos), llegando simultáneamente analito y patrones a la fuente de iones, tras cuya ionización el analizador realiza un barrido de voltaje en la zona esperada para ambos. La masa del analito, intermedia entre dos de los patrones del patrón múltiple, se determina interpolando la de éstos. Con barridos de voltaje se consiguen resoluciones de 5.000 y exactitud de masas de 0,002 uma. Los espectrómetros de alta resolución de sector magnético realizan *barridos de campo magnético*, calculando la fórmula empírica de la mayoría de los iones del espectro de masas en un modo de trabajo semejante al de los equipos de barrido por voltaje.

DETECTORES DE IONES

Este último componente instrumental del espectrómetro de masas, en el recorrido cronológico de los iones, genera una señal eléctrica proporcional al número de iones que llegan a él. Normalmente se emplean *detectores multiplicadores de*

electrones, de funcionamiento análogo a los tubos fotomultiplicadores: los iones, separados previamente en el analizador, chocan con la superficie de una primera placa con un elemento alcalino (óxido de cesio), de la que cada ion arranca un electrón, el cual, acelerado hacia un segundo elemento, arranca de éste 10 electrones. Montando seis (o más) elementos, los multiplicadores de electrones logran una ganancia o multiplicación de la señal de 10^6 veces la corriente inicial de los iones, como cantidad equivalente de electrones, que convierte en voltaje un electrómetro pre-amplificador situado a la salida del multiplicador de electrones. La mayoría de los multiplicadores de electrones amplifica la señal en aproximadamente 10^6 voltios/amperio.

Otro tipo de detector más reciente es el detector de microcanales, consistente en una placa o superficie sólida porosa de un material semiconductor con millones de pequeños poros, de diámetro entre 5 y 10 μm . Cada poro o "*microcanales*" funciona de forma similar a un multiplicador electrones. Al unirlos eléctricamente en paralelo los microporos expulsan electrones, ocasionando un efecto avalancha que multiplica el número de electrones generados por una relación de, generalmente, 10^5 .

Finalmente, mencionaremos la histórica *copa de Faraday*, el detector menos sensible de los espectrómetros de masas. Se trata de un sencillo y robusto dispositivo metálico cóncavo de forma balística que recibe el haz de iones. Al incidir un ion o partícula cargada sobre el dínodo interior de la copa (de BeO, GaP o CsSb), éste induce la emisión de electrones secundarios de manera temporal, generando un flujo de electrones, pequeña corriente eléctrica que necesita ser amplificada. Los detectores de copa de Faraday trabajan a presiones de unos 10^{-4} mbar, exhiben una respuesta muy lineal y detectan una corriente mínima de 10^{-14} amperios. Muchos espectrómetros de masas de Relación Isotópica (IRMS, *Isotopic Ratio Mass Spectrometer*) montan colectores múltiples, formados por una batería de copas de Faraday, cada una de las cuales detecta una sola masa.

Como anticipamos al comienzo de este capítulo, la fuente ioniza los analitos generando en principio iones positivos, cuya presencia acusa el detector en las condiciones arriba expuestas. Sin embargo, puede que algunos analitos se ionicen mejor (y, por tanto, se detecten mejor) como iones negativos. Tal detección es más sencilla de lo que parece: una placa adicional previa a un detector "normal" de iones positivos (un multiplicador de iones o de microcanales) genera un ion positivo cuando incide sobre ella un ion negativo, detectando aquél en modo de iones positivos. Y si los analitos se ionizan produciendo iones positivos, éstos simplemente "rebotan" sobre la superficie de la placa auxiliar, continuando su detección en modo de iones positivos. Muchos espectrómetros permiten técnicas pulsantes PPINICI (*Pulsed Positive-Ion Negative-Ion Chemical Ionization*), cambiando los voltajes antes de cada barrido para detectar iones positivos y negativos en el mismo cromatograma.

EL SISTEMA DE VACIO

El espectrómetro de masas debe disfrutar en su interior de un vacío eficiente, vital para el rendimiento del equipo, pues elimina la mayoría de los iones neutralizados en el analizador, los fragmentos neutros, los iones capturados en el *skimmer* previo al analizador y los mismos iones detectados. Por eso, el espectrómetro precisa condiciones de “alto vacío” en su interior, con presiones de 10^{-5} a 10^{-6} Torr, alcanzadas conectando una primera bomba de difusión “de bajo vacío” (a veces, dos) a una bomba turbomolecular que impone el “alto vacío”. Sin alto vacío los iones analizados podrían colisionar con otras moléculas, causando espectros de masas inexactos y mayor ruido en el detector, con la consiguiente peor sensibilidad. Se trata de condiciones exigentes, pues un flujo de agua de 1,0 ml/min genera más de 1.000 ml/min de vapor, obligando alta capacidad de vacío en los equipos LC-MS.

Las hoy imprescindibles bombas turbomoleculares (TMP, *Turbomolecular Pump*) surgieron en 1958 cuando Becker mejoró antiguos diseños de bombas de Gaede (1913), Holweck (1923) y Siegbahn (1944), haciendo colisionar las moléculas repetidamente con las superficies sólidas de múltiples pares de rotores en serie, “cuchillas” cuyo rápido giro, como una turbina, consigue una compresión diez veces superior, alcanzando condiciones desde “vacío intermedio” (10^{-2} Pa) hasta “ultra-alto vacío” (10^{-8} Pa). Los rotores poseen una superficie áspera de aluminio o de fibra de carbono para impedir cualquier rebote o reflexión, girando con velocidades de rotación entre 20.000 y 90.000 rpm. Como precaución, se debe vigilar eventuales fugas del aceite de la bomba rotatoria previa, que podría contaminar la bomba turbomolecular, muchas veces al detenerla. Si bien trabajar en condiciones de baja temperatura podría parecer conveniente, pues menores temperaturas causarían mayor compresión, se debe evitar la condensación del vapor de agua (presente en la atmósfera circundante), que podría formar hielo sobre las cuchillas, acortando la vida de la bomba turbomolecular, vida que se suele garantizar entre 20.000 y 40.000 horas, siendo usuales los intercambios estándar.

EQUIPOS EN TÁNDEM

La opción de refragmentar los primeros iones (iones padre) generados por la fuente de iones en iones hijos permite análisis MS-MS, que confieren alta selectividad a la detección espectrométrica de masas y, por tanto, una extraordinaria sensibilidad. Refragmentar es posible en un solo analizador, modalidad denominada “*tándem en tiempo*”, presente, como hemos visto, en ciertos analizadores: trampa de iones, resonancia de ion-ciclotrón o transformada de Fourier. También es posible refragmentar disponiendo dos analizadores en serie en un “*tándem en espacio*”, intercalando entre ambos un *módulo de Disociación por Colisión Inducida* (CID, *Collision Induced Dissociation*), donde se refragmentan los iones genera-

dos en el primer analizador. Inicialmente se probó acoplar dos espectrómetros distintos, “basto” montaje que pronto devino en acoplar dos o más analizadores de masas en serie en el interior de un mismo instrumento, caso paradigmático de los equipos de triple cuadrupolo (QQQ), y también de los espectrómetros de sector eléctrico - sector magnético (EB), de sector eléctrico - cuadrupolo (EqQ), de sector magnético - tiempo de vuelo (BTOF) o de cuadrupolo - tiempo de vuelo (QTOF, figura 133).

Los sistemas más frecuentes, paradigmáticos y arquetípicos son los espectrómetros de triple cuadrupolo (QQQ, en realidad QqQ, pues el cuadrupolo intermedio no se comporta como analizador sino como cámara de refragmentación CID). Estos instrumentos han revolucionado hasta límites antes impensables la sensibilidad de muchas determinaciones: por ejemplo, la determinación de pesticidas en aguas de bebida¹¹⁷ exigía concentrar 500 ml de agua en 1 ml mediante extracción en fase sólida o micro-extracción en fase sólida¹¹⁸, pero es factible en un cromatógrafo con triple cuadrupolo inyectando directamente un microlitro de muestra. MS/MS permite interesantes beneficios analíticos: menor gasto operativo por análisis, exige menos cantidad de muestra y menor preparación de las mismas, análisis más rápidos, revisión de los resultados más fácil y rápida, con menos probabilidad de confusión¹¹⁹, crear métodos complejos para análisis de rutina y evitar sobrecostes por la aparición de falsos negativos y positivos.



Figura 133. Detectores de triple cuadrupolo, el de la derecha acoplado con un TOF (imágenes cortesía de *Agilent Technologies*).

¹¹⁷ Nollet, L.M.L., Ed.: *Handbook of Water Analysis*. Editorial Marcel Dekker, Nueva York, 2000.

¹¹⁸ Pawliszyn, J.: *Solid Phase Micro Extraction, Theory and Practice*. Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, 1997.

¹¹⁹ Papoulis, A.: *Probability, Random Variables and Stochastic Processes*. Editorial McGraw-Hill, Nueva York, 1965.

Aspectos prácticos en LC-MS

Veamos en primer lugar qué disolventes y tampones son los más empleados en los análisis por LC-MS. Ante todo, es imprescindible desgasificar las fases móviles, que deben almacenarse siempre tapadas para evitar el polvo. *La elección de las fases móviles en LC-MS depende solo de criterios cromatográficos, pero no todas ellas son compatibles con LC-MS.* En general, podemos dividir las fases móviles utilizadas en LC-MS en tres categorías: las utilizadas *habitualmente*, las *incompatibles* con LC-MS y las *recomendables* cromatográficamente.

Entre las fases móviles utilizadas habitualmente citaremos los “tres grandes” de la fase reversa, agua, acetonitrilo y metanol, también ideales en LC-MS. Altos porcentajes de agua exigen aumentar la temperatura de la fuente para ayudar a la desolvatación, siendo usual que contengan un 1% de ácido acético o fórmico para mejorar la resolución, aunque ambos ácidos pueden suprimir la ionización con detección de iones negativos. En los análisis de compuestos débilmente ácidos con detección de iones negativos se puede mejorar la sensibilidad con una fase móvil muy poco o nada ácida añadiendo NH_4OH (en soluciones de amoníaco o de hidróxido amónico) para aumentar el pH de la fase móvil. El volátil acetato amónico, sal substitutiva de los tampones fosfato, incompatibles con LC-MS, debe utilizarse en cantidades inferiores a 0,1M.

En segundo lugar, entre las fases móviles incompatibles con LC-MS tenemos los tampones poco o nada volátiles, que pueden cristalizar en la fuente de iones, como sucede con los tampones fosfato. Si una metódica cromatográfica anterior, con otro tipo de detección, se describe con tampón fosfato (excelente en la detección espectrofotométrica por su transparencia a la radiación UV-VIS), puede substituirse por otro tampón volátil compatible con la espectrometría de masas, como, por ejemplo, acetato amónico. En este mismo apartado de sustancias incompatibles con LC-MS consignamos los detergentes y agentes tensoactivos, que pueden suprimir la ionización de algunos analitos: los detergentes, por su propia naturaleza, se concentran en la superficie de un líquido, serio problema en las fuentes de electrospray. Finalmente, en LC-MS resultan inadecuados los ácidos inorgánicos, como el ácido sulfúrico o el fosfórico, substituidos en ciertas aplicaciones por una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (<0,005%). Los ácidos inorgánicos siempre presentan problemas de corrosión, incluso a bajas concentraciones, y pueden alterar la ionización al adicionarlos como tales o sus sales. Si es imprescindible utilizarlos, la cámara de ionización debe limpiarse con mayor frecuencia.

En tercer y último lugar, están las fases móviles utilizadas recomendables cromatográficamente. Descritas específicamente para interfaces atmosféricas y limitadas a aplicaciones especiales, tenemos en primer lugar los alcoholes menos polares que el metanol, como el 2-propanol (IPA), el 2-metoxietanol y el etanol; con uso limitado, el ácido trifluoroacético (TFA), clásico en los análisis de péptidos y proteínas por LC-MS, pero con niveles superiores al 0,1% reduce la ionización

de las muestras en modo de iones positivos y suprime por completo la ionización en modo iones negativos, empeorando siempre la sensibilidad; la trietilamina, aditivo en algunas aplicaciones, provoca un intenso ion pseudomolecular $[M+H]^+$ de m/z 102, además de reducir (y a veces suprimir) la ionización de los analitos menos básicos en modo iones positivos, aunque, por contra, en análisis en modo iones negativos su basicidad mejora la ionización de algunos analitos; finalmente, el tetrahidrofurano, clásica fase móvil de GPC y modificador de fase reversa, empeora la resolución espectrométrica y está contraindicado con fuentes APCI que utilizan aire como gas nebulizador. El tetrahidrofurano ataca las tuberías de PEEK de los capilares de algunas interfaces, recomendándose insertar antes del detector espectrométrico, mediante una "T", una solución de acetato amónico en metanol, que, además, mejorará la sensibilidad. Por otra parte, a pesar de existir muchas menos aplicaciones de LC-MS en fase normal que en fase reversa, las hay con diclorometano, hexano, tolueno y mezclas de cloruro de metileno en metanol.

En LC-MS es importante la preparación de las muestras: idealmente éstas deberían ser puras, pues los iones moleculares y fragmentos de impurezas o contaminantes podrían enmascarar o suprimir los de los analitos, causando espectros confusos. Asimismo las muestras no deben contener apenas sales (los fosfatos son fatales para las fuentes ESI, FAB y MALDI), debiendo utilizarlas en cantidad mínima. Entre los análisis las muestras deben guardarse en viales con tapa de aluminio o teflón, inatacables por los solventes de acondicionamiento de las muestras. La cantidad de muestra varía según el modo de ionización y el instrumento, aunque suele bastar 1 mg de analito. Las muestras radioactivas analizadas por espectrometría de masas exigen un nivel máximo de 86 microcurios para ^3H (0,015% en muestras de 1 mg) y 43 microcurios para ^{14}C (7,0% en muestras de 1 mg).

Respecto a las condiciones ambientales y aporte de gas, diremos que bajo el equipo LC-MS se instala la bomba rotatoria que genera la primera etapa de vacío, previa a la bomba o bombas turbomoleculares internas del detector espectrométrico. Es conveniente dejar un espacio adicional razonable alrededor del equipo para las acciones de mantenimiento. Los gases procedentes de la bomba rotatoria y de la fase móvil vaporizada se eliminan colocando un tubo grueso que sale al exterior. También en la salida de la bomba rotatoria se suele colocar un filtro de aceite para evitar molestas conjuntivitis. Fases móviles vaporizadas constituidas por gases tóxicos requieren que el tubo que los elimina como gas borbotee en un recipiente grande que contenga un solvente adecuado, para su eliminación posterior. El equipo debe trabajar en condiciones estables de temperatura y humedad, siendo recomendable que se encuentre en una habitación con aire acondicionado.



Figura 134. Generador de nitrógeno para LC-MS (imagen cortesía de *Perkin-Elmer*).

El aporte de gas nitrógeno es importante en los equipos con interfaces atmosféricas, que casi siempre emplean nitrógeno como gas de nebulización, de pureza del 99% o superior, exento de humedad, aceites e hidrocarburos; si se halla en la clásica y familiar bala de gas, es conveniente intercalar filtros de humedad entre la bala y el equipo. La presión con que el nitrógeno debe llegar al espectrómetro, sin ser alta, debe ser razonable. Los usuarios se preocupan por el *gasto* de nitrógeno, unos 5 litros/minuto, por lo que una bala de nitrógeno dura poco, con el consiguiente sobresalto del usuario novel. Como es mejor ponerse una vez colorado que cien amarillo, al adquirir un equipo LC-MS con interfaz atmosférica es relativamente obligado comprar un generador de nitrógeno (figura 134). Todos los fabricantes de generadores de gases poseen uno o dos modelos específicos para equipos LC-MS.

Sistemas LC-MS con diode array

Muchos sistemas LC-MS montan en serie un detector *diode array*, utilizado en el modo tradicional para comparar tiempos de retención, tener espectros UV-VIS de los analitos, calcular su pureza y homogeneidad, y cuantificarlos, funciones “familiares” que complementan las del espectrómetro de masas, capaz, por otra parte, de cuantificar tan bien como un detector *diode array*. Es posible que solo dispongamos de métodos descritos con detector *diode array*, en cuyo caso, antes de cambiar la metodología podemos plantearnos mantenerla igual en el sistema LC-MS. Muchos métodos pueden usarse directamente sin modificaciones y, como hemos visto, los que emplean tampones poco volátiles precisarán cambiar el tam-

pón a otro volátil, estando contraindicados los tampones fosfato, que deben sustituirse por ácidos volátiles, como fórmico, acético y trifluoroacético.

APLICACIONES

Como sabemos, las interfaces atmosféricas trabajan muy bien con flujos pequeños; flujos mayores, propios de cromatografía preparativa, requieren un divisor de flujo en el sistema LC-MS, siempre que se mantenga la sensibilidad de la detección. Hay descritas multitud de aplicaciones LC-MS con interfaces atmosféricas: trazas de fármacos en plasma, proteínas, péptidos, herbicidas, algunas con par iónico. La especificidad de LC-MS es enorme, permitiendo desarrollar rápidamente nuevas separaciones con excelente resolución, aspecto importante desde el punto de vista de la productividad y coste por análisis, siendo poco limitante, por una vez, el problema cromatográfico de la coelución. También, LC-MS se utiliza como técnica de rutina para muestras con matrices complejas: en biotecnología detecta, identifica y cuantifica pequeñas moléculas, péptidos, proteínas y oligonucleótidos en sistemas con fuentes de ionización atmosféricas en prácticamente todos los tipos de analizadores o combinaciones de varios de ellos. Por masas-masas se analizan muchos fármacos y muestras biológicas, por su excelente señal-ruido y niveles de detección (50 pg/ml en plasma o tejidos). Las fuentes de electrospray permiten analizar proteínas, péptidos y oligonucleótidos, extendiendo su aplicabilidad a la electroforesis capilar, por su capacidad de generar fragmentos con cargas múltiples, llevando el límite de masas más allá del límite nominal del espectrómetro (MALDI-TOF no produce iones múltiples). Las interfaces de electrospray permiten monitorizar muy bien reacciones de pérdida de radicales y modificaciones de la posición de los mismos en polímeros, péptidos, proteínas y oligonucleótidos. Como sabemos, los solutos polares con altos pesos moleculares, como péptidos, proteínas, fármacos y metabolitos, exhiben buenos resultados con fuentes ESI¹²⁰, mostrando mejores resultados con fuentes APCI los analitos poco polares de bajo peso molecular.

8.3. HPLC - RMN

La espectroscopía de *Resonancia Magnética Nuclear* (RMN, *NMR Nuclear Magnetic Resonance*) estudia el comportamiento de los núcleos atómicos que varían de spin al absorber una radiación de radiofrecuencias (entre 4 y 900 MHz) cuando se aplica un campo magnético exterior. Los niveles de energía de los núcleos de los átomos de los analitos dependen de qué núcleo se trate, su entorno

¹²⁰ Korfmacher, W.A., Ed.: *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies*. Editorial CRC Press, Nueva York, 2006.

electrónico y de los otros núcleos circundantes. RMN posee gran valor en la identificación y elucidación de estructuras de moléculas orgánicas, organometálicas y de interés bioquímico, así como en estudios teóricos y fisicoquímicos, bastando el espectro RMN para identificar el analito, complementando muy bien las determinaciones realizadas por espectrometría de masas, espectrofotometría infrarroja FTIR o análisis elemental. RMN no requiere patrones muy puros, pero es una técnica instrumental más cara y menos sensible que otras, permitiendo pocas aplicaciones cuantitativas (con coeficientes de variación entre 1 y 5%), pero sí determina multi-componentes y análisis elemental incluso en instrumentos de baja resolución.

Ya Pauli sugirió en 1924 que un campo magnético podía interactuar con ciertos núcleos atómicos por sus propiedades de spin y de momento magnético. Las ideas de Pauli fueron verificadas experimentalmente por Rabi y Ramsey en 1939, tanto para los electrones como para los núcleos, concluyendo que los núcleos de los átomos sometidos a un campo magnético externo *sí* podían absorber radiación electromagnética. En 1946 Bloch en la Universidad de Standford y Purcell en la de Harvard confirmaron el fenómeno por separado, lo que les valió el Premio Nobel de Física de 1952. Tras los estudios iniciales con espectros de onda continua, cuya frecuencia es constante y varían solo la intensidad del campo aplicado, a partir de 1970 sugieron equipos FT-RMN, con transformada de Fourier, que aplican radiofrecuencias pulsantes perpendiculares al campo magnético, relegando a los equipos de onda continua a aplicaciones de rutina, como la determinación del porcentaje de hidrogenación de petróleos o la cantidad de agua (humedad) en aceites, alimentos y productos agrícolas.

El espectro molecular característico que proporciona RMN exhibe la intensidad de radiación absorbida frente a la frecuencia del campo externo, generado al aplicar tres campos perpendiculares entre sí: un primer campo magnético estacionario externo a la molécula (eje X), que hace que sus núcleos vayan inclinándose cuando giran, en un movimiento de precesión como una peonza; un segundo campo alterno de radiofrecuencias (eje Z), que cuando se encuentra en fase con el campo que causa el movimiento de precesión se suma a éste, haciendo que el núcleo se incline a un ángulo diferente, "bamboleo" que detecta un tercer campo eléctrico (eje Y), inducido por una bobina metálica.

Tabla 56. Núcleos con spin $I = \frac{1}{2}$ estudiados por RMN.

nº protones	nº neutrones	nº spin (I)	núcleos
par	par	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
impar	par	1/2	^1H , ^{19}F , ^{31}P
impar	par	3/2	^{11}B , ^{79}Br
par	impar	1/2	^{13}C
par	impar	3/2	^{127}I
impar	impar	1	^2H , ^{14}N

Todos los núcleos tienen carga, pues poseen protones, y giran sobre un eje, ocasionando un cierto spin, cuyo sentido define un momento angular cuantizado (p) en un número semientero o entero de $h/2\pi$: 0, 1/2, 1, 3/2, etc., siendo h la constante de Planck. El valor 0 de p indica ausencia de spin, condicionando los posibles valores de p el número cuántico de spin (I), ostentando cada núcleo $2I+1$ estados degenerados de igual energía, con valores $I-1, I-2, I-3\dots$, hasta $-I$. Al poseer cada protón y neutrón su propio spin, cuando el número total de protones y neutrones es par, I será 0 ó par. En el caso de que el número total de protones sea par y también sea par el número total de neutrones, entonces I será 0, caso de los núcleos de ^{12}C y ^{16}C , incompatibles con RMN. Sin embargo, si la suma total de protones y neutrones es impar, I será un número semientero (1/2, 3/2, 5/2, etc.), caso de los núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F ó ^{31}P , susceptibles de analizarse por RMN, pues poseen $I=1/2$ y, por tanto, una distribución de carga uniforme esférica (tabla 56). Teóricamente existen 200 isótopos con momento magnético, aunque casi todas las determinaciones RMN son de ^1H , menos de ^{13}C y residuales de ^{19}F , ^{31}P y ^{29}Si (tabla 57).

Tabla 57. Utilidad de los núcleos estudiados por RMN.

núcleo	campo aplicado	finalidad
^1H	Orgánica, Inorgánica, Bioquímica	Grupos funcionales
^{13}C	Orgánica, Inorgánica, Bioquímica	Esqueleto molecular
^{31}P , ^{15}N , ^{19}F	Orgánica, Bioquímica, Biología	Investigac. específicas
^2D , ^{11}B , ^{23}Na , ^{15}N , ^{29}Si , ^{109}Ag , ^{199}Hg , ^{113}Cd , ^{207}Pb		Investigación selectiva

Evidentemente, la distribución de cargas condiciona un número cuántico magnético (m), que puede tomar dos posibles valores, $+1/2$ y $-1/2$. Un núcleo cargado provoca que su spin cree un campo magnético (μ), como lo hace una corriente eléctrica al pasar por una espira. Por tanto, el campo magnético (μ) depende del momento angular cuantizado (p), mediatizado por la relación giromagnética (γ) propia de cada núcleo:

$$\mu = \gamma \cdot p \quad (168)$$

Puesto que el momento angular p está cuantizado en un número semientero o entero de $h/2\pi$, la energía potencial (E) de cada núcleo puede definirse por la intensidad del campo magnético aplicado (B_0), el número cuántico magnético del núcleo (m) y su relación giromagnética (γ), junto a las otras constantes h (constante de Planck) y π :

$$E = -\frac{\gamma m h}{2\pi} B_0 \quad (169)$$

Los susodichos dos valores que puede tomar el número cuántico magnético del núcleo (m), $+1/2$ y $-1/2$, ocasionan dos niveles energéticos al aplicar un campo magnético, uno con m paralelo a B_0 , y el otro con m contrario a B_0 :

$$E_0 = -\left(\frac{1}{2}\right)\frac{\gamma h}{2\pi}B_0 \quad ; \quad E_1 = -\left(-\frac{1}{2}\right)\frac{\gamma h}{2\pi}B_0 \quad (170)$$

Los núcleos pueden absorber la radiación de radiofrecuencias para promocionarse desde el estado con energía E_0 a un estado excitado con energía E_1 , cuya diferencia de energía ΔE es:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = \left(\frac{1}{2}\right)\frac{\gamma h}{2\pi}B_0 - \left[-\left(\frac{1}{2}\right)\frac{\gamma h}{2\pi}B_0\right] = \frac{\gamma h}{2\pi}B_0 \quad (171)$$

Cualquier transición provocada por una radiación electromagnética implica una diferencia de energía $\Delta E = h\nu$, en este caso para promocionar el núcleo desde el estado con energía E_0 al estado excitado con energía E_1 :

$$\Delta E = h\nu = \frac{\gamma h}{2\pi}B_0 \quad (172)$$

Cada transición resulta proporcional al campo magnético mediante una constante de proporcionalidad que contempla la relación giromagnética (γ) propia de cada núcleo ($k = \gamma / 2\pi$). Sin campo magnético, $B_0 = 0$ y, por tanto, $\Delta E = 0$, mientras que con campo magnético, $B_0 \neq 0$, habiendo entre ambos una diferencia de energía ΔE que orienta los núcleos. Por la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{N_i}{N_0} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad ; \quad N_i = N_0 e^{-\Delta E / kt} = N_0 e^{-\gamma h B_0 / 2\pi kT} \quad (173)$$

Así, una modesta magneto de 200 MHz (con B_0 de 4,69 T), presenta una relación $N_i/N_0 = 0,999967$, por lo que $N_0/N_i = 1,000033 = 33$ ppm, diferencia irrisoria en otras técnicas espectroscópicas, razón de la tardanza en el desarrollo histórico de la espectroscopia de RMN. Las magnetos actuales tienen 14 T, permitiendo mejor sensibilidad, si rehacemos el cálculo anterior.

El campo que actúa sobre los núcleos puede estar apantallado por otros núcleos circundantes, haciendo que sobre el núcleo a determinar actúe un campo efectivo (B_{ef}), resultante al restar al campo inicial (B_0) el campo que apantalla el entorno (B_{ap}):

$$B_{ef} = B_0 - B_{ap} \quad (174)$$

Definiendo una constante de apantallamiento (σ), variable según sea la estructura molecular del analito, su distribución espacial y su entorno, el apantallamiento realizado por los radicales circundantes disminuye con la distancia de éstos al núcleo analizado, pudiendo despreciarse el apantallamiento de radicales distantes del núcleo analizado en 4 ó más posiciones (enlaces):

$$B_{ef} = B_0 - B_{ap} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (175)$$

Con ello, ahora con B_{ef} , el incremento de energía de la transición (ΔE) queda:

$$\Delta E = hv = \frac{\gamma h}{2\pi} B_{ef} \quad (176)$$

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma) = cte(1 - \sigma) \quad (177)$$

Asimismo los analitos presentan $\nu = k(1 - \sigma)$, pero se precisa una referencia para estimar ν_0 y definir y centrar la escala de los espectros de RMN. Tal patrón interno (de ^1H) suele ser el tetrametilsilano (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$), molécula inerte y apolar, magnéticamente isotrópica, volátil y soluble en disolventes orgánicos, cuyos doce protones idénticos hacen que el TMS exhiba un pico muy alto y agudo en el espectro RMN. El TMS absorbe radiación al aplicar campos superiores a la que absorben los protones de casi todas las moléculas orgánicas, por lo que la aparición del pico RMN del TMS se fija en el inicio del espectro RMN. Como el tetrametilsilano es apolar y, por tanto, soluble en solventes orgánicos apolares, las muestras polares exigen un patrón de DSS, sal sódica del ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NaSO}_3$, soluble en agua y habitualmente disuelto en metileno deuterado, cuyos nueve protones equivalentes (del metilo) exhiben pequeños picos por el apantallamiento que causan los protones de los grupos metilenos.

Así, en el patrón de TMS $\nu_{TMS} = k(1 - \sigma_{TMS})$, siendo la diferencia $\nu - \nu_{TMS} = k(\sigma_{TMS} - \sigma)$. En términos relativos:

$$\frac{\nu - \nu_{TMS}}{\nu_{TMS}} = \frac{\sigma_{TMS} - \sigma}{1 - \sigma_{TMS}} \quad (178)$$

Que, al ser $\sigma_{TMS} \ll 1$, queda:

$$\frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} = \sigma_0 - \sigma \quad (179)$$

La diferencia $\sigma_0 - \sigma$ se denomina *Desplazamiento Químico* (δ), adimensional y expresado en ppm, que anula las diferencias (desplazamientos) entre diferentes equipos con distintos MHz, por ejemplo, de 400 ó de 600 MHz:

$$\delta = (\sigma_0 - \sigma) 10^6 \text{ ppm} \quad ; \quad \delta = \delta \cdot 10^{-6} \quad (180)$$

Tabla 58. Desplazamiento químico (δ) de distintos núcleos.

Núcleos	Valores de δ
^1H	1 a 13 ppm
^{13}C	200 a 400 ppm
^{31}P	más de 300 ppm
^{19}F	400 a 800 ppm

El espectro clásico de RMN exhibe en ordenadas la absorción en una escala relativa y en abscisas el desplazamiento químico δ (ocasionalmente en ν por diferencia histórica) en una escala lineal (tabla 58), con el pico del TMS en su inicio. La escala de desplazamientos químicos es decreciente, por lo que frecuentemente se reemplaza por $\tau = 10 - \delta$, también en ppm.

Los espectros de alta resolución desdoblan los picos por la *multiplicidad* de los spines nucleares, multiplicidad de protones magnéticamente equivalentes (tabla 59). Se utilizan tablas para la identificación de las zonas, siendo conscientes de que aplicando un mayor campo (B_0) se logra una mayor diferencia entre grupos, manteniéndose idéntica la distancia entre los subpicos.

Tabla 59. Multiplicidad de los protones magnéticamente equivalentes de los radicales metilo y metileno.

radical	nº picos	relación de áreas
metilo	3	1:3:1
metileno	4	1:3:3:1

La interpretación de los espectros de primer orden debe observar cuatro reglas: en primer lugar, la multiplicidad hace aparecer $(n+1)$ subpicos, siendo n el número de protones; en segundo lugar, los núcleos equivalentes no deben reaccionar entre sí; en tercer lugar, la interacción básica sobre un átomo común (por ejemplo, el C del CH_3) queda limitada a menos de cuatro enlaces de distancia, siendo irrelevante a mayores distancias; en cuarto lugar, la constante de acoplamiento es independiente del campo magnético aplicado (B). Por otra parte, los espectros de segundo orden suelen mostrar desplazamientos químicos (δ) entre 0,1

y 0,15 unidades, mientras que los espectros de primer orden suelen mostrar desplazamientos químicos (δ) entre 7 y 10 unidades.

Tabla 60. Frecuencias para distintos núcleos.

Núcleos	Frecuencia (MHz) para 23.500 gauss
^1H	100,04 (60,0 MHz para 14.000 gauss)
^{19}F	94,13
^{13}C	25,15
^{31}P	40,48

Los equipos montan una potente magneto con un preciso campo (B_0) con un oscilador de radiofrecuencias que produce la frecuencia que absorberán los distintos núcleos (tabla 60); un detector y receptor que exhibe qué frecuencias han absorbido; un ordenador o sistema de control y adquisición de datos, y una sonda de muestras, generalmente con receptáculo motorizado cuyo movimiento giratorio homogeneiza las muestras en el campo magnético. Los nuevos desarrollos en LC-RMN se centran en la búsqueda de nuevas celdas de flujo con espira para alta sensibilidad y en nuevos sistemas para la supresión múltiple de disolventes.

Los sistemas LC-RMN emplean dos modos de medida: *off-line* (*stop-flow*) y *on-line*. El primero de ellos, más sensible, colecta fracciones en bucles (*loop collection*), cuya elución posterior permite análisis ulteriores en el mismo u otro equipo de RMN *off-line*. Esta modalidad *stop-flow* implica tiempos de análisis altos, pues almacena las muestras ya separadas en bucles, deteniendo el flujo mientras el espectrómetro RMN barre y hace espectros; un familiar detector UV, inmediatamente detrás de la columna, estima los tiempos de retención. La segunda modalidad de medida, *on-line*, en régimen de flujo continuo, exige que los equipos monten una válvula previa a la sonda de RMN, pero esto resulta poco sensible, con niveles de detección de 1 a 5 μg de analito en columna.

Existen espectrómetros de Resonancia Magnética Nuclear de baja resolución, con imanes de campo inferiores a 1 T, sencillos y de precio moderado, y también espectrómetros de alta resolución, con imanes de campo entre 1,4 y 14 T, entre 60 y 1.000 MHz. Desde 1970 los equipos de onda continua, con imanes permanentes o electroimanes, han sido sustituidos en su práctica totalidad por sistemas FT-RMN de transformada de Fourier, que reemplazan con superconductores los solenoides de aquéllos, para determinaciones de ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P , en equipos distintos para cada uno de estos núcleos. Respecto a las sondas de muestras, las hay monoelemento y multielementos, para muestras líquidas o sólidas, frecuentemente criosondas y ocasionalmente para microimagen.

En 1957 se empezó a explorar la posibilidad de aplicar RMN en núcleos de ^{13}C , que exhiben escasa señal RMN por su insignificante abundancia en la Natura-

leza y exigua relación giromagnética, la cuarta parte de la generada por los protones ^1H . Hasta 1970 no hubo instrumentos comerciales de alta resolución de RMN suficientemente sensibles para ^{13}C , con el fin de determinar el esqueleto molecular de los analitos (^1H estudia los radicales funcionales periféricos), con desplazamientos químicos de 200 MHz (para ^1H es hasta 10 ó 15 MHz). En tales determinaciones el ^{13}C no exhibe desplazamiento homonuclear, pues es rara la presencia de dos ^{13}C adyacentes en una misma molécula, ni tampoco aparecen desplazamientos heteronucleares con ^{12}C , cuyo spin es 0.

En 1998 Sarker y Bahar idearon acoplar un equipo de RMN a un sistema LC-MS, buscando mejores análisis estructurales en muestras de matrices complejas. HPLC-RMN-MS es una herramienta analítica extremadamente potente siempre que observe un riguroso tratamiento previo de las muestras para optimizar la eficiencia de las medidas de RMN y de MS, muchas veces con cambios automáticos de columnas. Los espectrómetros RMN de los sistemas LC-RMN-MS suelen ser de 400 MHz, con campos de 9,4 T, pero también hay de 500, 600 y 800 MHz, con sondas estándar de ^1H y muchas veces de ^{13}C , ^2H , ^{19}F y ^{31}P . El frecuente detector UV-VIS, generalmente un *diode array*, trabaja como detector primario para mostrar los tiempos de retención de los analitos recién eluidos, cumpliendo la celda UV, previa al *splitter*, dos cometidos básicos: iniciar la siguiente etapa tras detectar el analito el espectrómetro de RMN, y sincronizar la llegada del pico a éste, en determinaciones en modo *stop-flow* y colección de fracciones en bucles, para lo cual es crucial optimizar la separación realizada en el sistema de HPLC. Es preciso recordar que la sensibilidad LC-RMN, inferior a otras técnicas hibridadas, exige máxima resolución en el sistema de HPLC para concentrar el analito.

El equipo de RMN puede ligarse con el espectrómetro de masas *en serie* o *en paralelo*. Ligarlos en serie hace que el eluyente pase secuencialmente por ambos sistemas, con la desventaja de la difícil correlación de los resultados obtenidos en ambos "detectores" para cada analito, que llega y es analizado a distintos tiempos; otro inconveniente es la posibilidad de fugas en la sonda de RMN por la diferencia de presión entre ambos equipos. El otro modo de trabajo liga RMN con el espectrómetro de masas en paralelo, dividiendo el flujo (*split*) entre ambos sistemas, exigiendo ajustar la relación de *split* para detectar los analitos simultáneamente, pues el espectrómetro de masas los "ve" rápidamente.

Aún no siendo difícil conectar los equipos de RMN y MS, tanto en serie como en paralelo (tener un sistema un LC/RMN/MS dedicado podría ser un lujo), pueden surgir problemas en el espectrómetro de RMN, siendo el principal la necesidad de suprimir la señal RMN de la fase móvil, que enmascara la de los analitos, demandando usar caros disolventes deuterados (agua deuterada, acetonitrilo deuterado, metanol deuterado), que podrían mostrar falsas medidas de masa en el espectrómetro de masas. Asimismo, en la fuente de iones de éste pueden precipitar las sales fosfato, obligando a utilizar otro modificador acuoso, como ácido trifluoroacético o ácido fórmico. La mayoría de las aplicaciones LC-RMN se realizan

en fase reversa, isocráticas o con gradientes de elución, con fases móviles polares, cuyos protones pueden causar grandes problemas en el espectrómetro de RMN, incapaz de gestionar señales tan intensas junto con la de los analitos, poco concentrados. Esto puede solucionarse usando solventes poco protonados (H₂O, ACN, MeOH) o deuterados, así como tampones poco protonados (TFA, acetato amónico) o reactivos de par iónico con pocos protones (terbutilo)¹²¹.

Como queda dicho, el límite de detección de RMN para ¹H es de 1 a 5 µg en columna, a diferencia del límite de detección del espectrómetro de masas, que es de pocos ng en columna, por lo que el *split* tras el sempiterno detector UV debería llevar el 2% al 5% de la muestra al espectrómetro de masas y el resto al equipo de RMN, cuya sensibilidad óptima demanda máxima resolución en el sistema de HPLC. Cada una, RMN o MS, solventan por sí mismas el 80% de los problemas analíticos, por lo que, potencialmente, un sistema LC-RMN-MS no resolverá el 20% restante. Además, no existen equipos comerciales LC-RMN-MS y el mantenimiento y formación del usuario debe hacerse por separado.

Existen desarrollos embrionarios de sistemas HPLC-UV-RMN-IR-MS y también hibridando en vez de HPLC equipos de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)¹²² o de electroforesis capilar (CE), sistemas con extracción en fase sólida SPE *on line*, análogos a la colección en bucles, que emplean disolventes no deuterados y solo deuterados durante la elución SPE. Los últimos desarrollos instrumentales han dado lugar a nuevos bucles de colección, espiras de los espectrómetros, diseños de celdas de flujo continuo para alta sensibilidad, nuevos sistemas de radiofrecuencias, métodos de supresión de solventes y colección de picos más eficiente en los bucles, técnicas RMN homo y heteronucleares bidimensionales (2D) y magnetos de campos de alta potencia, de 800 ó 900 MHz. LC-RMN es cada vez más conocida, pero no excesivamente extendida ni aceptada por su sensibilidad y coste¹²³.

8.4. HPLC - FTIR

La hibridación LC-FTIR acopla un espectrofotómetro de absorción infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-Transform Infrared*) a un sistema de HPLC en una detección quizá menos sensible que otras, pero muy específica y con alta velocidad espectral, mostrando espectros en tiempo real en cualquier punto del cromatograma. Los espectrofotómetros FTIR, no destructivos para las mues-

¹²¹ Mun, J. y Sim, H., Eds.: *Handbook of Ionic Liquids, Properties, Applications and Hazards*. Editorial Nova Science Publishers, Hauppauge, Nueva York, 2012.

¹²² Gino, K., Ed.: *Hyphenated Techniques in Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Editorial Elsevier, Amsterdam, 1992.

¹²³ Grushka, E. y Grindgerb, N., Eds.: *Advances in Chromatography*. Editorial CRC Press, Boca Ratón, Florida, 2009.

tras, son equipos sencillos, asequibles y de fácil manejo, que aceptan tampones no volátiles. Desde este punto de vista parece estupendo acoplar HPLC con FTIR para realizar medidas cualitativas y cuantitativas basadas en las transiciones moleculares vibracionales características de las moléculas orgánicas, que absorben la región media del espectro infrarrojo para exhibir numerosas bandas, características y muy estrechas, debidas a sus grupos funcionales, que permiten su rápida "identificación positiva". Sin embargo, los sistemas LC-FTIR son escasísimos porque las fases móviles usuales de HPLC absorben la radiación infrarroja, restringiendo la sensibilidad y la información espectral, sobre todo en esa zona media del espectro infrarrojo, exigiendo complejas interfaces para eliminar los disolventes. Dichas interfaces realizan primeramente una micro deposición directa del eluyente sobre un film dispuesto sobre un disco móvil de un material transparente al infrarrojo (ZnSe), enfriado criogénicamente, donde la muestra se deseca, y luego se intercala en el haz infrarrojo. La velocidad del disco rotatorio determina la concentración de muestra depositada, siendo fundamental su temperatura criogénica para lograr deposiciones de mínimo espesor con el fin de mantener la resolución cromatográfica. Estas interfaces permiten usar librerías convencionales de espectros FTIR en fase sólida.

Sin embargo, parece un reto lógico disponer celdas de flujo continuo *on-line* tras la columna cromatográfica para monitorizar cromatogramas y adquirir y exhibir espectros infrarrojos en tiempo real. A pesar de la limitación que circunscribe el uso de celdas de flujo continuo con fases móviles orgánicas de suficiente *transparencia IR*, que restringen LC-FTIR a aplicaciones en fase normal o GPC, junto con la imposibilidad de aplicar gradientes de elución por la imposibilidad de sustraer los espectros de fondo en una fase móvil cambiante, existen *celdas de transmisión* de flujo continuo para LC-FTIR *on-line* con ventanas de cristales de diversos materiales, elegidos en función de la aplicación y que deben resistir una presión moderada, tolerar químicamente los eluyentes de HPLC y mantener suficiente transmitancia infrarroja. Los tradicionales cristales "*IR-transparentes*" de KBr y NaCl no resisten la presión y, al ser muy higroscópicos, toleran solo eluyentes orgánicos, obligando a sustituirlos por caros cristales de CaF₂, ZnSe y Ge, con los cuales se construyen las *celdas de transmisión* de flujo continuo para LC-FTIR *on-line*, de sencilla morfología, yuxtaponiendo dos ventanas de estos materiales, que atraviesa perpendicular la fase móvil. El cristal de cada ventana se perfora creando una estrecha oquedad (menor de 1 mm), que atraviesa perpendicular el haz infrarrojo. A ambas ventanas las separa un espaciador metálico o polimérico, usualmente de Mylar (poliéster de tereftalato de polietileno), y de grosor variable, que determina el paso óptico y volumen interno de la celda. Los espaciadores estándar tienen grosor entre 0,001 y 2 mm, existiendo celdas de alta resolución, de volumen interno inferior a 1 μ l.

Otra alternativa para poder utilizar la detección infrarroja en HPLC es emplear fases móviles con caros solventes deuterados, como agua deuterada (D₂O) o metanol deuterado (MeDH).

La región infrarroja se extiende desde la zona visible (800 nm) hasta la zona de radiaciones de microondas (0,3 mm). La radiación infrarroja próxima y media representa una cantidad de energía equivalente a la diferencia entre niveles vibracionales, mientras que la radiación infrarroja lejana lo es entre niveles vibracionales-rotacionales o rotacionales. Ambas radiaciones proporcionan información estructural de las moléculas (figura 135), expresándose en *número de onda*, parámetro recíproco de la longitud de onda, fraccionando la región infrarroja en tres zonas: *infrarrojo cercano* (4.000 a 12.500 cm^{-1}), *infrarrojo medio* (400 a 4.000 cm^{-1}) e *infrarrojo lejano* (10 a 400 cm^{-1}), división postergada con los espectrómetros de transformada de Fourier, que cubren entre 10 y 25.000 cm^{-1} .

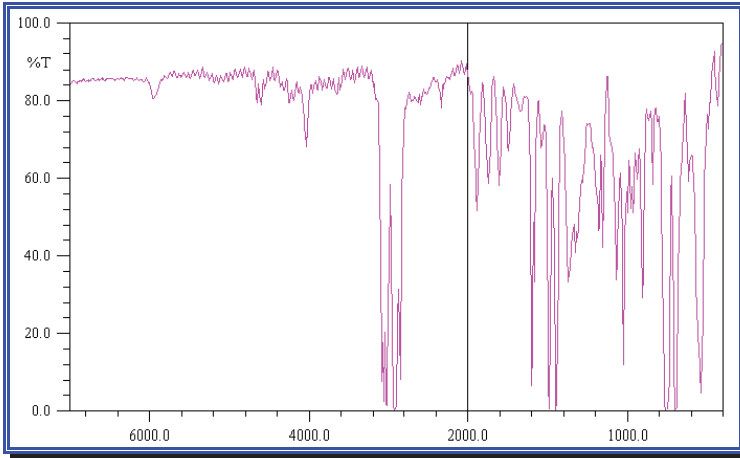


Figura 135. Espectro FTIR.

Todo el paso óptico o recorrido del haz infrarrojo debe hallarse en condiciones de vacío para evitar interferencias debidas a materiales ajenos o externos, como el agua o el dióxido de carbono presentes en el aire. Con esta precaución FTIR permite analizar multitud de muestras líquidas, filmes sólidos y gases, puras o como mezclas. El desarrollo de nuevas fuentes láser infrarrojas de estado sólido, que emiten con altísima intensidad un conjunto relativamente reducido de longitudes de onda, son ideales para aplicaciones específicas, en ciertas zonas del espectro IR.

El corazón de un espectrofotómetro FTIR es su interferómetro, dispositivo ideado por Michelson en 1881 y desarrollado por Fabry y Pérot en 1896 buscando una resolución mejor. En él, un haz incidente llega a un espejo semitransparente, que divide el haz en dos haces, reflejando uno y transmitiendo el otro. Ambos haces se prolongan hasta sendos espejos, que los reflejan para retornar al espejo semitransparente. Si el número total de oscilaciones de ambos haces es un número entero, se produce interferencia constructiva en la radiación resultante, enviada hacia la celda de muestras y luego al detector. De esta forma el interferómetro ac-

túa como un filtro que transmite un complejo conjunto de radiaciones. El espejo móvil que monta puede hacer variar el paso óptico y, por tanto, la interferencia. Registrando fotoeléctricamente la intensidad de radiación frente a la interferencia (por el movimiento del espejo) se tiene el espectro FTIR, complejo, que debe ser analizado en un ordenador. La celda de absorción, para las muestras, se monta en uno de los brazos del interferómetro, llegando simultáneamente a ella el conjunto de longitudes de onda producidas en el interferómetro, en un *interferograma*, función de la intensidad de la señal frente al tiempo. La operación matemática de la *transformada de Fourier* convierte la modulación recogida como intensidad de radiación en el detector en frecuencia o número de onda, formando el espectro de absorción. La principal ventaja de FTIR es que el espectro completo incide *simultáneamente* sobre la muestra y es detectado *simultáneamente*, logrando resultados espectrales absolutos con enorme velocidad, resolución y sensibilidad. Los espectrofotómetros FTIR pueden adaptarse a cualquier región espectral para analizar muestras muy diversas en un amplio intervalo de frecuencias. Algunos diseños instrumentales permiten estudios espectrales en función de la temperatura, presión y campos externos, magnéticos o eléctricos.

Por último, los detectores de infrarrojo cercano o NIR (*Near Infrared*) trabajan realizando barridos desde 700 a 1.100 nm, zona donde pueden observarse vibraciones y elongamientos de ciertos enlaces químicos de moléculas orgánicas. Esta técnica, que describiera en 1994 McClure¹²⁴, posee las ventajas de una gran rapidez (adquiere espectros en menos de 1 segundo), sencillez en la preparación de las muestras y permite multianálisis, sin olvidar que el infrarrojo cercano no es destructivo.

¹²⁴ McClure, W. F.; Anal. Chem., vol. 66 (1994), 44.

8.5. HPLC - ICP



Figura 136. Sistema de LC-ICP (imagen cortesía de *Agilent Technologies*).

La hibridación LC-ICP (*Inductively Coupled Plasma*), frecuentemente con detección espectrométrica de masas (LC-ICP-MS), suele emplearse como técnica de especiación de metales (figura 136). LC-ICP permite determinaciones con alta precisión, bajos límites de detección (entre 1 pg/ml y 1 µg/ml, dependiendo del elemento a determinar y la matriz de las muestras), gran intervalo dinámico y mínimos efectos debidos a las matrices de las muestras, exhibiendo respuestas analíticas independientes del ruido inespecífico. LC-ICP-MS resulta idónea para determinar especies térmicamente inestables.

La interfaz que acopla el sistema de HPLC con el “detector” de ICP, tanto si éste es óptico (OES, *Optical Emission Spectroscopy*)¹²⁵ como si es de ICP-MS es relativamente sencilla: un simple capilar de PEEK o de PFA (perfluoroalcoxi, similar en propiedades al FEP), permite desde flujos capilares (10 µl/min) hasta analíticos (2 ml/min). No obstante, ICP acepta mejor flujos pequeños, cuya introducción en la cámara de nebulización es pareja a los equipos de ICP sin hibridar con cromatografía, en este caso con el inconveniente de su volumen muerto, aunque menos crítico en los diseños recientes de nano-HPLC y UHPLC. El plasma del ICP tolera fases móviles orgánicas, en los gradientes usuales agua-acetonitrilo y agua-metanol, así como matrices orgánicas y altas concentraciones salinas de los elu-

¹²⁵ Boss, C.B., Fredeen, K.J.: *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Segunda edición. Norwalk, Perkin Elmer Corporation, 1997.

yentes tamponados durante largos periodos sin obturarse. La interfaz y el nebulizador transfieren el eluyente desde el sistema de HPLC de forma rápida y eficaz sin pérdida de resolución cromatográfica. El sistema de datos debe adquirirlos de forma veloz, permitiendo medidas múltiples dentro de un mismo pico, algo más anchos en HPLC que en electroforesis capilar o en cromatografía de gases (figura 137).

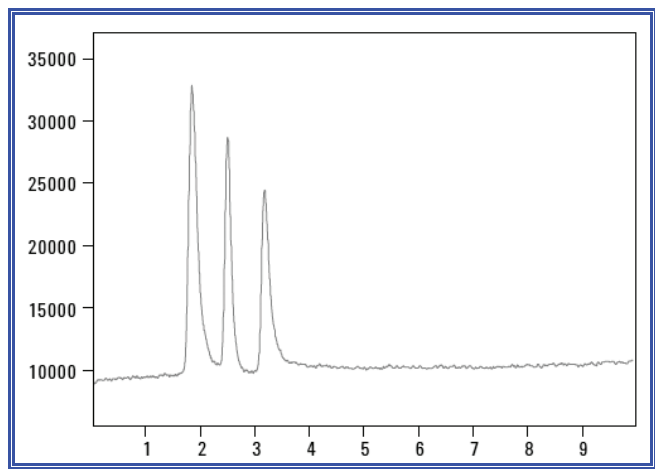


Figura 137. Cromatograma LC-ICP-MS de pesticidas con el tiempo de retención en minutos y la señal del detector en cuentas relativas de ^{31}P (imagen cortesía de *Agilent Technologies*): de izquierda a derecha, picos del ácido aminometilfosfónico, glufosinato y glifosato, columna C8 de 4,6 x 150 mm con partículas de 5 μm , fase móvil tamponada con acetato amónico 50 mM y par iónico de tetrabutilamonio al 1% en metanol a pH 4,7, flujo 1,0 ml/min, temperatura 30 °C y volumen de inyección de 100 μl .

ICP es una técnica de emisión donde los átomos de los analitos emiten radiación tras ser excitados en un plasma de argón. Un plasma es un gas altamente ionizado compuesto por iones, electrones y partículas neutras, conductor de la corriente eléctrica, donde los efectos causados por disolventes y eluyentes condicionan la elección de fases móviles óptimas.

LC-ICP-MS es un proceso generalmente oxidante, que permite analizar muchos elementos en matrices muy diversas y concentraciones de hasta ppt (trazas) con gran intervalo dinámico lineal (9 órdenes) y tiempos de análisis muy rápidos, determinando además hidruros sin requerir su generación externa, conjunto de razones que hacen de esta hibridación una potentísima herramienta analítica con obvias ventajas sobre las “tradicionales” técnicas de especiación metálica absorción atómica y fotometría de llama¹²⁶. El excepcional intervalo dinámico lineal de 9 órdenes de magnitud de ICP consiente determinaciones cuantitativas ¡con un solo

¹²⁶ Bock R.: *A Handbook for Decomposition Methods in Analytical Chemistry*. Editorial International Textbook Company Ltd, Londres, 1979.

calibrador!, bastando un único patrón de 1 ppb para obtener resultados exactos y precisos entre ppt y mg/ml¹²⁷. ICP detecta casi todos los elementos del sistema periódico, sobre todo los metálicos, presentes en suelos, aguas y aire, plomo en gasolinas, contaminación industrial, alimentos industriales, minerales... En LC-ICP la preparación de la muestra es sencilla, bastando una sencilla digestión ácida. La compatibilidad de ICP con la mayoría de los sistemas cromatográficos permite especiación, simplicidad espectral, análisis multielementos, facilidad de uso y medidas de relaciones isotópicas, aplicadas en estudios geológicos, nutricionales y de dilución isotópica, utilizados sobremanera en metalurgia e industria química. Empero, los equipos instrumentales de ICP son caros y consumen mucho argón. Quizá fuese más práctico apuntar qué elementos no determina aún ICP: H, N, O, F, Fr, Ra, Po, At; algunos metaestables, como el Pm, Ac, Pa, Np, Pu, Am, Cm, Bk, Cf, Es, Fm, Md, No o Lr, y, evidentemente, los gases nobles He, Ne, Ar, Kr, Xe, Rn¹²⁸.

El fundamento instrumental de un sistema de ICP (o de ICP-MS) comienza con la formación en el nebulizador de un aerosol a partir de las muestras líquidas, cámara de nebulización que admite flujos desde micro o nano hasta ml/min (analíticos). Al aerosol se adiciona argón gaseoso para formar un *plasma* de alta energía en el centro de una espira de radiofrecuencias (fuente RF), cuya energía provoca la colisión de los átomos de argón para generar un plasma de átomos Ar⁺ metaestables (de riqueza superior al 1%) y alta densidad de electrones (generalmente 10¹⁵) a altísimas temperaturas (6.000 a 10.000 °K), condiciones que retroalimentan el plasma, provocando colisiones térmicas que despojan de sus electrones al argón, el cual se ioniza conformando un plasma gaseoso (de argón) con propiedades físico-químicas distintas del gas no ionizado¹²⁹. Dicho plasma, compuesto por iones, electrones y partículas neutras, permite el paso de la corriente eléctrica (las llamas pueden ser “eléctricas”, como las generadas en los chispómetros de emisión por una fuente de arco o de chispa, o “normales”, como las ocasionadas por un combustible más un oxidante en los espectrofotómetros de absorción atómica). Cualquier gas luminoso puede formar un plasma siempre que contenga una fracción significativa de sus átomos ionizada. Los plasmas pueden ser estáticos (de baja frecuencia) o de alta frecuencia, inducidos en electrodos simples por corriente continua DCP (*Direct Current Plasma*) o sin electrodos, por acoplamiento inductivo de radiofrecuencias, como en ICP, o por radiaciones de microondas, como en MCP (*Microwave Coupled Plasma*). A pesar de esta diversidad instrumentalmente posible, hay que decir que el 99% de los equipos son de ICP.

¹²⁷ Hasegawa, T. y Haraguchi, H.: *ICPs in Analytical Atomic Spectrometry*. Segunda edición, Editorial Montaser & Golightly, Nueva York, 1992.

¹²⁸ Thomas, R.J.: *Practical Guide to ICP-MS*, Segunda edición. Editorial CRC Press, Boca Ratón, Florida, 2009.

¹²⁹ Atkins, P. y De Paula, J.: *Physical Chemistry*. Editorial W.H. Freeman & Co., Nueva York, 2006.

A la salida de la interfaz que une el “detector” de ICP con el sistema de HPLC un flujo de gas paralelo (o en otras ocasiones cruzado) succiona las muestras mediante efecto Venturi, arrastrándolas y formando un aerosol. Aun con bajos flujos de eluyente y de gas debe cuidarse la estabilidad de ambos, siendo también importante considerar la viscosidad del eluyente, pues pequeñas variaciones de la fase móvil podrían desestabilizar el plasma. Menos frecuentemente el aerosol (y la nebulización de las muestras) se forma mediante ultrasonidos, aunque el aumento de volumen que provoca en las muestras impide su uso en los plasmas poco potentes; también las muestras se nebulizan en dispositivos electrotérmicos semejantes a los hornos de grafito de los espectrofotómetros de absorción atómica; finalmente, existen nebulizadores láser.

Tras esta primera etapa de aspirar las muestras y llevarlas al plasma, éste aporta suficiente energía para los restantes seis procesos que sufren consecutivamente en él las muestras líquidas: una primera fase de *desolvatación* elimina el disolvente de las muestras aspiradas, dejándolas “solas” en el plasma; a continuación, la muestra desolvatada sufre una *vaporización*, en que la altísima temperatura del plasma evapora súbitamente las muestras sólidas desolvatadas para formar un aerosol en estado gaseoso ($[MX]_{\text{sólido}} \rightarrow [MX]_{\text{gas}}$); sigue una *atomización*, que disgrega las moléculas gaseosas del analito en el aerosol en átomos individuales sin carga ($[MX]_{\text{gas}} \rightarrow M + X$); continúa una *ionización*, donde los átomos neutros generados en la etapa anterior se ionizan ($M \rightarrow M^+$), pudiendo ocasionalmente estos iones recombinarse, reducirse ($M^+ + e^- \rightarrow M$) u oxidarse ($M^+ + O \rightarrow MO^+$); la posterior etapa de *excitación* promociona electrónicamente los iones de los analitos, energía que devuelven en una etapa final de *emisión* de radiación. Los ICP ópticos (OES) detectan dicha emisión, mientras que los ICP-MS trabajan a partir de la etapa anterior de ionización, extrayendo los iones con guías o lentes electrostáticas dentro del espectrómetro de masas, que “ve” intervalos de masas entre 7 y 250 uma (de Li a U) con analizadores de diversos tipos (cuadrupolo, triple cuadrupolo, TOF, DF, etc.), cuya elección debe considerar, ante todo, el número de canales simultáneos a monitorizar en el cromatograma, siendo el caso más simple la especiación de elementos, que precisa un solo canal. Los ICP ópticos discriminan en última instancia la radiación emitida mediante un selector de radiación, usualmente una red de difracción con mínima luz parásita, tras la cual llega a un tubo fotomultiplicador.

En el plasma de un ICP el argón arrastra la muestra (razón por la cual se denomina “*gas de arrastre*”) y forma el plasma (por eso también se señala como “*gas plasmígeno*”), al tiempo que refrigera el exterior del plasma (designándose asimismo como “*gas refrigerante*”). Para todos estos procesos un ICP precisa unos 15 litros/min de argón, principal factor de su carestía. Tras cebar el receptor con argón ionizado, una chispa eléctrica desencadena la llama del plasma, que luego mantiene la radiación de radiofrecuencias en las citadas condiciones de alta temperatura, haciendo girar en sentido contrario los iones argón (Ar^+) y los electrones, formando un *túnel de transporte*. En esas condiciones los iones argón

toman un electrón para formar un átomo de argón metaestable ($\text{Ar}^+ + 1e^- \rightarrow \text{Ar}^*$), siendo la misión de los electrones libres autoperpetuar el plasma y la de los iones Ar^+ liberar su exceso de energía (ΔE), mientras están equilibrio los dos estados metaestables de los átomos de argón (tabla 61).

Tabla 61. Procesos que tienen lugar en un plasma ICP¹³⁰.

Energía	Elementos y reacciones presentes
35 eV	$\text{Ar} + e^- \rightarrow \text{Ar}^+ + 2e^-$
30 eV	$\text{Ar}^+ + e^- \rightarrow \text{Ar}^* + hv \text{ continua}$
25 eV	$\text{Ar}^* \rightarrow \text{Ar}^{**} + hv$
20 eV	$\text{Ar}^* \rightarrow \text{Ar} + hv$
15 eV	$\text{Ar}^+ + X \rightarrow \text{Ar} + X^+ + \Delta E$
10 eV	$\text{Ar}^* + X \rightarrow \text{Ar} + X^{**} + e^-$
5 eV	$\text{Ar} + X^+ + e^-$

En la primera zona, de energía hasta 5 ó 10 eV, se excitan prácticamente todos los átomos del Sistema Periódico. La segunda zona, de energía entre 15 y 30 eV, solo aumenta el fondo de la señal. En la tercera zona, de energía superior a 30 eV, existen electrones libres, que, como queda dicho, mantienen el plasma.

En el plasma pueden surgir interferencias por cuatro razones: la variabilidad de tamaño de las gotículas, subordinada al flujo del eluyente y al diámetro del capilar de la interfaz; por causas químicas, mínimas en el plasma, pues su altísima temperatura produce una atomización completa sin autoabsorción; la tercera razón se localiza en la etapa de ionización, cuando algunos espectros iónicos resultan más intensos que los atómicos; finalmente, una cuarta razón espectral surge cuando existen muchas líneas de emisión, aumentando la posibilidad de solapamiento entre ellas.

ICP-MS permite determinar hasta 70 elementos, 40 de ellos muy fácilmente, sobre todo metálicos (*tóxicos*, como As, Cd, Pb, Hg, Tl o Be, regulados y legislados en muchas muestras¹³¹; *comunes*, que pueden ser tóxicos en altas concentraciones, como Al, Ni, Cu, Zn, Se, Mo o Sn; *esenciales*, como los profusos Na, Mg, P, S, K, Ca o Fe, o *raros*, como V, Cr, Co, Se o I)¹³². Asimismo puede analizar metalopéptidos (fitoquelantes de Cd, Cu y Zn, metalotioneínas o metaloenzimas) en análisis de proteínas de transporte, como albúmina y transferrina queladas con Cu

¹³⁰ Jarvis, K. E., Gray, A. L. y Houk, R. S.: *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Editorial Blackie, Glasgow, 1992.

¹³¹ Nordberg, G.: *Handbook on the Toxicology of Metals*, Tercera Edición. Editorial Elsevier, Amsterdam, 2007.

¹³² Zief, M. y Mitchel, J.W.: *Contamination Control in Trace Metal Analysis*. Editorial John Wiley and Sons, Nueva York, 1976.

o Al; metalofármacos (con Pt, Au o marcados con Tc), aminoácidos quelados (selenioaminoácidos, metaloporfirinas), derivados de ferroceno, restricción de fragmentos del DNA, orgnanoarseniales, arsenioazúcares, etc. Las interesantes propiedades ligantes de metales con polipéptidos permiten, por ejemplo, quelar hierro con hemoglobina, miohemoglobina, peroxidasa y catalasas, ferritina y transferrina; cobre con beta-amilasa, anhidrasa carbónica, ceruloplasmina, ferroxidasa, albúmina y transcupreína, metalotioneínas y dismutasa superóxido; zinc con alcohol-deshidrogenasa, anhidrasa carbónica y termolisina; calcio con calmodulina, parvalbúmina, termolisina y péptidos proteolíticos de calmodulina; cadmio con alcohol-deshidrogenadas y metalotioneínas; aluminio con transferrina y albúmina.

ICP-MS puede analizar casi cualquier tipo de muestras sin requerir una preparación compleja, digiriéndolas simplemente en ácido nítrico o clorhídrico, y ocasionalmente con otros ácidos minerales, como sulfúrico o perclórico. La preparación de las muestras en ICP es mucho más sencilla que en absorción atómica, pues no requiere modificador de las matrices ni *clean-up*. Muchos laboratorios utilizan digestión por microondas, modo más rápido, con tiempos de digestión de minutos, introduciendo las muestras en el horno de microondas junto a los ácidos de digestión en tubos de vidrio, cuarzo o PTFE transparentes a la radiación de microondas y sellados para evitar la pérdida de elementos volátiles. La "rápida" extracción por microondas descompone completamente las muestras, con menor riesgo de contaminación y controla las temperaturas y presiones de digestión¹³³.

Hibridar HPLC con ICP-MS permite rápidos análisis cuantitativos de muchos tipos de muestras con alta sensibilidad (ppt) y reproducibilidad, siendo fácilmente automatizables¹³⁴. ICP es una técnica selectiva para cada elemento, informando de su riqueza isotópica y puede determinar simultáneamente múltiples elementos. LC-ICP es universal y permite identificaciones positivas y estudios de balance másico, pero presenta los problemas potenciales de la desestabilización del plasma de argón (solo tolera gradientes suaves) y el ensanchamiento de los picos en el plasma. También puede haber interferencias poliatómicas en muestras con matrices complicadas. Su principal limitación es la detección de C, O, N, P y S, presentes en la mayoría de moléculas orgánicas.

Además, LC-ICP (o LC-ICP-MS, muchos con capacidad MS/MS) puede combinarse con determinaciones de composición elemental disponiendo un divisor (*splitter*) en el tubo de salida de la columna y sincronizando los tiempos de reten-

¹³³ ASTM Method D4309-91: *Standard practice for sample digestion using closed vessel microwave heating technique for the determination of total recoverable metals in water*. Annual Book of ASTM Standards. Editorial American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, 1991.

¹³⁴ Turner, P., Murren, T., Speakman, J. y Haines, C.: *Plasma Source Mass Spectrometry, Developments and Applications*. Editorial Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996.

ción¹³⁵. Alternativa al inmunoensayo, LC-ICP ICP es un excelente modo de detección cromatográfica que abre nuevos horizontes analíticos en el desarrollo de nuevos fármacos (*Drug Discovery*), bioanálisis, determinaciones de muestras secas (deposiciones de sangre) y perfiles metabólicos. Los análisis de especiación mediante LC-ICP-MS reducen los complejos cromatogramas a simples “*elementogramas*” (gráfica de tiempo frente a la señal del ICP de uno o varios analitos), cuantificando elementos conocidos y desconocidos. Sin embargo, las zonas fluidicas metálicas del HPLC pueden contaminar y afectar la resolución final, como también los disolventes de muestras y la preparación de éstas pueden perturbar la estabilidad y la ionización en el plasma.

¹³⁵ Montasser, A., Ed.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: An Introduction to ICP Spectrometries for Elemental Analysis*. Editorial Wiley-VCH, Berlin, 1998.

9. MÓDULOS ACCESORIOS

9.1. Hornos

Instalar un horno en el sistema de HPLC siempre es recomendable, imprescindible en aplicaciones de intercambio iónico y GPC. Lo es menos en fase reversa, pero siempre está bien controlar el máximo número de variables instrumentales, incluyendo la temperatura. Cada vez hay más equipos de HPLC con horno de columnas: una temperatura alta y constante agudiza los picos con la correspondiente mejora de resolución y sensibilidad (mayor altura a igualdad de área). Muchas aplicaciones de GPC trabajan a las altas temperaturas que precisa la total solubilidad de muchos polímeros en las concentraciones de trabajo¹³⁶, habitualmente alrededor del 1%. Además, GPC exige un control extremadamente preciso de la temperatura, pues su variación afecta a la simetría de los picos, que determina pesos moleculares y su distribución.

La constante de equilibrio termodinámico (K) rige la diferencia de energía de la interacción del analito disuelto en el eluyente menos la interacción del analito con la superficie adsorbente de la fase estacionaria, dependiente de la temperatura absoluta (T), diferencia de energía libre de Gibbs (ΔG) analito - eluyente y la constante de los gases (R):

$$K = \exp \frac{\Delta G}{RT} \quad (181)$$

Mayores temperaturas permiten menor presión en columna, requerida para vencer la pérdida de carga de ésta, pues la viscosidad de la fase móvil (η) varía con la temperatura, la velocidad de la fase móvil (u) y la longitud columnar (L), siendo inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de partícula de fase estacionaria (d_p^2) y a la compacidad del relleno (θ):

$$P = \frac{\eta L u}{\theta d_p^2} \quad (182)$$

La relación de Wilke-Chang describe la influencia de la temperatura sobre la resolución mediante el parámetro de difusión (D_m), que define la capacidad del disolvente para establecer enlaces puente de hidrógeno, condicionada por la tempe-

¹³⁶ Bregg, R.K., Ed.: *Horizons in Polymer Research*. Editorial Nova Science Publishers, Nueva York, 2005.

ratura absoluta (T), la viscosidad de la fase móvil (η), el peso molecular del solvente (M), el volumen molar del analito (V_m) y el parámetro de solubilidad (δ):

$$D_m = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{T}{\eta} \sqrt{\delta M} \frac{1}{(V_M^0)^{0,6}} \quad (183)$$

Instrumentalmente en HPLC existen tres tipos genéricos de hornos: *convectivos* (por aire), *Peltier* (por bloques metálicos) y *baños de agua* circulante.

En los hornos convectivos por aire, en cierto modo semejantes a los cromatógrafos de gases, el aire circula impulsado por un ventilador, hallándose la columna suspendida en la corriente de aire. Estos hornos presentan la ventaja de poseer muy poca masa térmica, por lo que permiten cambiar rápidamente de columna. La mayoría posee soportes y compartimentos donde se pueden instalar el inyector manual y válvulas, mantenidos a la misma temperatura de la columna. Los hornos convectivos suelen controlar automáticamente la velocidad de circulación del aire. Habitualmente solo calientan, hasta 80° C ó 100° C, aunque algunos hornos más completos también enfrían, a partir de 4° C. Mediante un sistema de *feedback* mantienen la temperatura constante, incluso si oscilase el voltaje eléctrico. En todo caso, se les exige alta precisión de la temperatura ($\pm 0,1^\circ$ C), siendo deseable que posean alta capacidad y puedan albergar varias columnas (analíticas o semipreparativas), un inyector, válvulas selectoras, el mezclador de gradientes y las celdas de ciertos detectores. Suelen montar sensores de fugas y de líquidos inflamables con ajuste regulable del nivel de alarma, pues los ambientes cargados, por ejemplo, en laboratorios que efectúan extracciones con disolventes volátiles, podrían activar indebidamente el aviso de fugas. En la mayoría de los hornos de este tipo se programan, en condiciones iniciales o variables en el tiempo, la temperatura de trabajo y los límites de seguridad de ésta, la máxima tolerada por la columna o la máxima en que la fase móvil sigue siendo un líquido. Tal regulación es doble para evitar que, en caso de fallo o avería de uno de los circuitos de seguridad, actúe el segundo dispositivo y cese de calentar *ad infinitum*, "achicharrando" el contenido del horno. Como cualquier otro módulo del sistema, es deseable que posean control autónomo por su propio teclado y menú, y remoto desde el ordenador del sistema, que se puedan programar en el tiempo y que, al conectarse, pasen un protocolo inicial de autodiagnósticos.

Los hornos Peltier sitúan en su interior un par de bloques huecos metálicos (generalmente de aluminio) donde se sitúa la columna o columnas: al contactar físicamente las columnas con los bloques, éstos transfieren directamente el calor (figura 138), alcanzando la temperatura deseada de forma mucho más rápida que los hornos convectivos. Existen diversos diseños comerciales de hornos Peltier, de varios tamaños y para múltiples columnas, normalmente dos columnas analíticas. Su inconveniente es que en ellos las conexiones de la línea fluidica que enlaza la

columna con bombas, inyector y detector quedan fuera del bloque metálico, al aire y a temperatura ambiente.

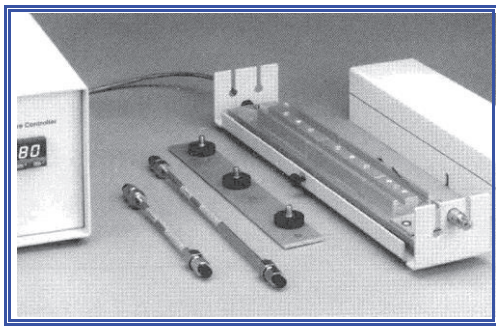


Figura 138. Horno Peltier de HPLC.

El último tipo de “hornos” de columnas, aunque el menos utilizado, corresponde a simples *baños de agua* circulante, donde se sumerge la columna sin más, resultando más eficiente colocar alrededor de la columna un tubo de vidrio *ad hoc* por el que circula agua calentada. Los baños de agua circulante presentan, además de su reducido precio, la ventaja de que la columna, conexiones y tubos están termostatizados a la misma temperatura. Además, el agua es un intercambiador de calor más eficiente que el aire. Citamos como desventajas, su difícil manipulación, la imposibilidad de apreciar posibles fugas y que el agua oxida (más en caliente) la parte exterior de la columna, con sus juntas y tuercas.

En cualquier tipo de horno, sobre todo en los convectivos, siempre es aconsejable instalar un *precalentador*, que puede ser un sencillo enrollamiento de tubo capilar previo a la columna y de longitud variable (20, 50 ó 100 cm), para que la fase móvil se termostate más eficientemente (figura 139). El capilar ha de ser de 0,01 mm de diámetro interno para evitar la difusión de los analitos, ya que se emplaza tras el inyector. Cuando la temperatura del horno sobrepasa 50° C y la del inyector es inferior, suelen observarse picos menos agudos. El uso de precalentador está recomendado con inyector automático; si el inyector es manual, éste puede instalarse dentro del horno, algo casi inviable con un inyector automático, y hay que recordar que muchos inyectores automáticos poseen accesorios enfriadores, máxime si alojan numerosas muestras biológicas.

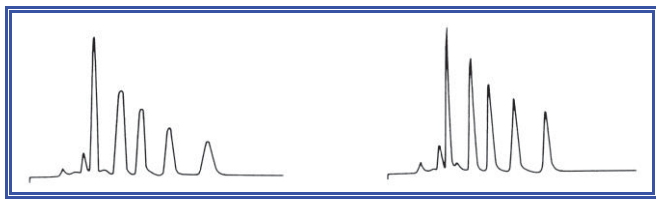


Figura 139. Derecha: efecto del precalentador sobre la anchura de los picos.

9.2. Colectores de fracciones

Finalmente el flujo de eluyente que sale del último detector puede dirigirse a tres posibles destinos: en primer lugar, se puede *tirar*, siendo recogido en un botellón de desecho para eliminarse al cabo de cierto tiempo; en segundo lugar, se puede *reciclar* hasta el reservorio; finalmente, se puede *colectar* en un colector de fracciones. Sabemos que los detectores destructivos exigen para poder coleccionar los analitos un divisor de flujo (*splitter*), que lleva parte del flujo de eluyente con los analitos al detector destructivo, mientras que el resto va por el otro canal al colector de fracciones, tanto si es un “instrumento” con múltiples tubos, como si es, en el caso más simple, la mano del cromatografista tras ver el pico de interés en el detector, guardando el retardo correspondiente. Los colectores de tipo *rack* mueven con movimientos secuenciales un brazo, que se desplaza sobre el área de colección en movimientos XY, mientras que los colectores más sencillos, de tipo carrusel, disponen los tubos de colección en una cadena sin fin (figura 140). La mayoría de los colectores permiten trabajar con muestras radiactivas y poseen control de fugas accidentales

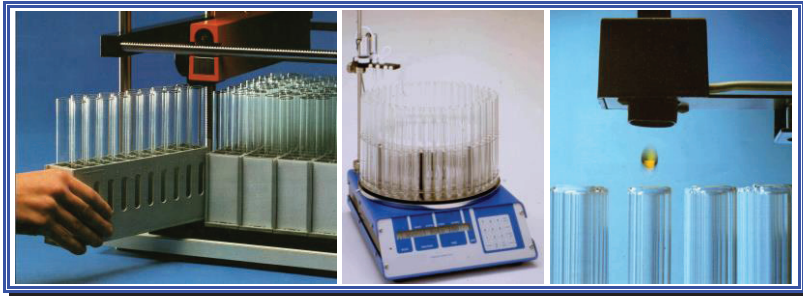


Figura 140. Colectores XY y de carrusel. Derecha, contador de gotas.

Colectar suele carecer de sentido en control de calidad, salvo que ciertos análisis contradictorios o dudosos requieran coleccionar las fracciones eluidas para luego realizar sobre ellas otros análisis más completos o concluyentes. Colectar es un verbo que en HPLC solo tiene sentido cuando se separan (purifican) muestras de interés, principalmente en HPLC preparativo.

Los colectores de fracciones pueden coleccionar en base a tres modos principales: por tiempos, por gotas y por ventanas. En la *colección por tiempos* se programan cambios del tubo de destino tras un determinado intervalo, en minutos o segundos; en la *colección por gotas*, en colectores que disponen de contador de gotas, se puede programar que cada tubo colecciona un cierto número de gotas; en la *colección por ventanas* se coleccionan unos intervalos temporales fijos, permitiendo casi todos los colectores múltiples ventanas. Además de estas programaciones genéricas, puesto que podrían aparecer en los cromatogramas zonas de elución en tiempos poco repetitivos, conviene que en combinación con el detector el colec-

tor de fracciones solo colecte cuando la señal del detector exceda un umbral dado (en mV o mA) con una pendiente dada (mV/s o mA/s), enviando el detector la orden de colección al colector, obligando a definir un retardo temporal (*delay*) entre la celda del detector y el gotero del colector de fracciones.

La mayoría de los colectores poseen microprocesador, control de eventos y de ciclos automáticos para automatizar métodos y control de válvulas, programando la colección de fracciones en base a uno o varios de los siguientes modos de colección: *colección simple* (por tiempos o por gotas), *colección multiprocedencia* (de varias columnas, con varias líneas de llegada desde varios sistemas de HPLC), *colección multitamaño* (colectando fracciones de distinto volumen o número de gotas), *colección con separación de picos* (colectando solo aquellos picos que satisfagan las condiciones de umbral, pendiente o tiempo, desechando el resto) y *colección con sustracción múltiple del fondo* (restando sobre el cromatograma la línea de base sin analitos, generalmente en gradientes de elución). Asimismo se pueden programar *colecciones automáticas repetitivas*, *superponer fracciones*, *fracciones múltiples* y con diversas escalas de la señal del detector.

Un problema habitual es la pérdida de eluyente cuando el colector pasa de un tubo a otro. Por muy rápido que sea el cambio de tubo, en técnicas preparativas o con altos flujos, puede perderse eluyente entre los tubos. Esto se minimiza con una válvula de corte previa al colector, que interrumpe brevemente el flujo, siempre teniendo en cuenta el flujo de trabajo y que esto podría perjudicar la línea de base del cromatograma; otra opción es disponer sobre los tubos de colección unas bandejas especiales con un cono o "embudo" bajo cada orificio y sobre cada tubo de colección, disminuyendo la pérdida de eluyente entre tubos (figura 141).

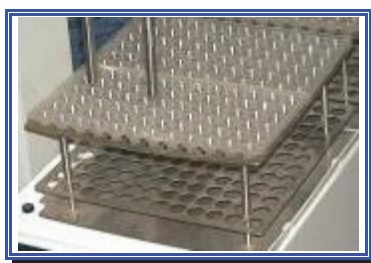


Figura 141. Bandeja con embudos de colección.

Los colectores de fracciones pueden incorporar válvulas de dos clases para automatizar el proceso de colección: válvulas *de desecho*, para coleccionar en los tubos solo los picos de interés, llevando el resto a desecho, y válvulas *de seguridad*, por si el volumen coleccionado excediese el volumen del conjunto de los tubos de colección, tirándose, lamentablemente, el exceso. Evidentemente, hay colectores simples, sin válvulas, que recogen *todo* el flujo que eluye de la columna. Algunos poseen adaptadores multicolumnas, accesorios de ensamblaje y control de relés para automatizar los métodos de colección. Bastantes colectores de fracciones

permiten trabajar en cámara fría, por la labilidad térmica de los productos (biológicos) colectados, resistiendo: estos colectores, más que la temperatura, la humedad, pues el vapor de agua ambiente condensa desde 4° C, pudiendo afectar a su electrónica.

Es deseable que el colector de fracciones posea alta capacidad. Algunos pueden montar botellones o contenedores externos para fracciones muy diversas y voluminosas, incluso de litros; tubos de gran diámetro (los tubos clásicos de colección son de 12, 13, 16 ó 18 mm de diámetro); miniviales, tubos de 1,5 ml para microcentrífugas o de 50 ml para centrífugas, viales de centelleo de 28 mm, placas microtiter de 96 pocillos e incluso permiten programar destinos de geometría diversa. La mayoría de los colectores son aptos para HPLC, LPLC y MPLC, existiendo microcolectores de fracciones especiales para fracciones muy pequeñas y valiosas (0,1 µl) en equipos de HPLC dedicados.

9.3. Cámaras de reacción y derivatización

Sobre la base de un horno convectivo (de recirculación de aire forzado), las cámaras de reacción y derivatización permiten derivatizaciones post-columna con control muy preciso de la temperatura hasta altas temperaturas, incluso superiores a 100° C. Como vimos en el apartado de los detectores fluorimétricos, un ejemplo paradigmático de derivatización es el análisis de aminoácidos por HPLC de fase reversa, derivatizados pre-columna o post-columna. En el primer caso el análisis cromatográfico no separa exactamente los analitos, sino el complejo resultante analito -reactivo fluorogénico, formado previamente a su paso por la columna¹³⁷. Para ello se dispone la muestra en un tubo o vial, sobre el cual se añade un cierto volumen del reactivo fluorogénico en una concentración dada, normalmente en exceso para garantizar cuantitativamente la reacción de derivatización. Ésta suele demandar un entorno favorable (un “*buffer de acoplamiento*”), añadido a la muestra junto con el reactivo fluorogénico, completándose la reacción de derivatización en poco tiempo para generar los respectivos complejos analito - reactivos, que separa la columna cromatográfica. Debemos saber que la fluorescencia decae (“se pasa”) con el tiempo, haciendo que la mayoría de las reacciones fluorogénicas sean “tiempo dependientes”, como también lo es, aunque en menor medida, la estabilidad de las soluciones de los reactivos fluorogénicos, por lo que el cromatógrafo debería disponer de inyector automático y, aunque no se logre máxima señal de fluorescencia, las condiciones siempre serán idénticas, mejorando la reproducibilidad del método; además, el autoinyector facilita la tediosa preparación de las muestras¹³⁸. La separación cromatográfica suele exigir gradientes de elución y

¹³⁷ Cohen, S.A. y Strydom, D.J.: Anal. Biochem. 174 (1988) 1-16.

¹³⁸ Smith, R.M.: *Handbook of Sample Preparation*. Editorial Wiley, Nueva York, 2010.

muchas veces horno de columna, pues la temperatura acelera la reacción de derivatización.

También existen procedimientos de derivatización con *reactivos fotogénicos*, cuyos correspondientes complejos analito - reactivo, que separa la columna cromatográfica, absorben la radiación UV-VIS. Aquí también se suele añadir el reactivo fotogénico en exceso, para luego desecar en corriente de aire (ya que muchos reactivos fotogénicos son volátiles) o en condiciones de vacío, redisolviendo el extracto en fase móvil e inyectando esta solución en el cromatógrafo. Así se alcanzan sensibilidades de picomoles, siendo la derivatización fotogénica menos tiempo dependiente que las derivatizaciones pre-columna fluorimétricas (figura 142).

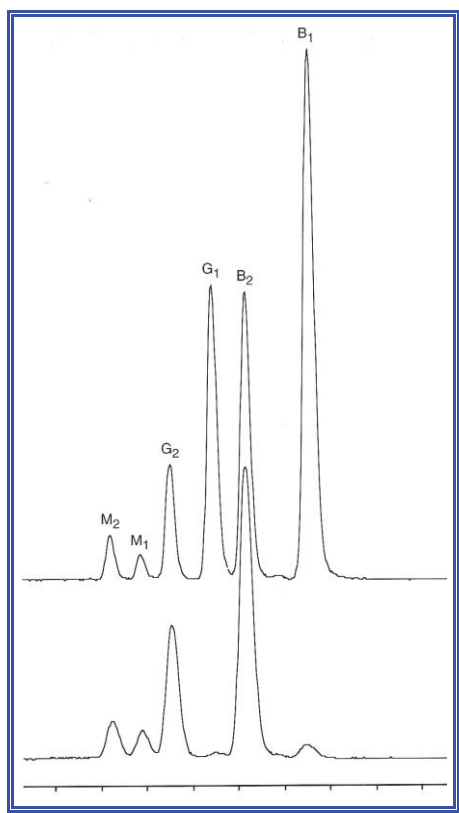


Figura 142. Cromatogramas de aflatoxinas: arriba, con derivatización post-columna y detección fluorimétrica; abajo, con detección UV-VIS.

Con derivatización fluorogénica o fotogénica pre-columna pueden determinarse aminoácidos, aminas alifáticas (metilamina, etilamina, dietilamina, propilamina, butilamina), contaminantes tóxicos industriales del aire y moléculas poten-

cialmente carcinogénicas¹³⁹ que generan olores desagradables¹⁴⁰, tradicionalmente determinadas por cromatografía de gases. Aparte de la mencionada derivatización con OPA de aminoácidos, éstos pueden derivatizarse con cloruro de dansilo DNS-Cl (cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo), FMOC-Cl (clorofornato de 9-fluorenilmetanol), DNFB (2,4-dinitrofluorobenceno), DNCB (dinitroclorobenceno) o fluoroformato de adamantilo.

9.4. Recicladores de fase móvil

Los recicladores de fase móvil consisten en una sencilla válvula de tres vías (una de entrada y dos de salida) que, en combinación con la señal del detector, retornan la fase móvil eluída al reservorio previo a la bomba o sistema de bombeo. En el módulo reciclador se establece, análogamente a como se hace en los colectores de fracciones, un umbral y una pendiente de la señal que “ve” el detector: cuando eluyen picos y la línea de base sobrepasa dichas condiciones la válvula se posiciona para llevar la fase móvil eluída a la salida de desecho; si, por el contrario, no se sobrepasan dichas condiciones, es síntoma de que no eluye ningún pico y la válvula se posiciona para que esa fase móvil “limpia” retorne al reservorio (figura 143). Evidentemente, reciclar solo es posible en condiciones isocráticas, pero imposible con gradientes de elución o fases móviles mezclas procedentes de varios reservorios.

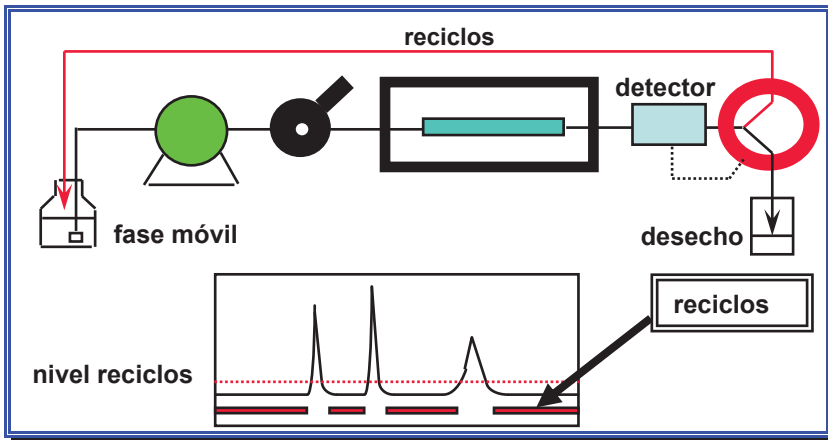


Figura 143. Fundamento de un reciclador de fase móvil.

¹³⁹ Awicki, E., Mulik, J.D. y Wittgenstein, E, Eds.: *Chromatographic Analysis of Environmental Pollutants*. Editorial Ann Arbor Science, Ann Arbor (Michigan), 1978.

¹⁴⁰ Usher, M.J.: *Odour Fade, Possible Causes and Remedies*. Editorial Elf Atochem North America Inc., Filadelfia, 1999.

9.5. Válvulas selectoras de línea

Las válvulas de selección de la línea fluidica pueden automatizar el sistema de HPLC en técnicas especiales, como, por ejemplo, reciclar o cambiar de columna durante un mismo cromatograma¹⁴¹. Las válvulas fluidicas pueden dividirse, primeramente, en válvulas *de baja presión*, previas al sistema de bombeo, y válvulas *de alta presión*, posteriores al sistema de bombeo. Por otra parte y respecto a su activación, aun siendo exactamente iguales, las válvulas pueden dividirse en *manuales* (accionadas por la mano del cromatografista), *eléctricas* (accionadas por un motor eléctrico) o *neumáticas* (antiguo modo de accionarlas por aire comprimido, obligado por un *relé* a pasar por un dispositivo que hace girar la válvula).

Internamente las válvulas deben tener escaso volumen muerto para no contribuir al ensanchamiento de los picos en los cromatogramas. Algunas pueden trabajar a altas temperaturas (*HT, High Temperature*) o a altas presiones, como las empleadas en UHPLC. Las más usuales son de 3, 4 y 6 vías o puertos, existiendo también de 8, 10, 12 y 14 vías.

Las válvulas de tres vías permiten, entre otras aplicaciones, seleccionar una línea de salida entre dos flujos de entrada para optar, previamente a la bomba, por una fase móvil entre dos; llevar la elución de dos columnas a un solo detector; al contrario también pueden seleccionar dos salidas con una sola entrada, caso de los colectores de fracciones y recicladores de fase móvil, llevar lo eluido a dos detectores, etc. (figura 144).

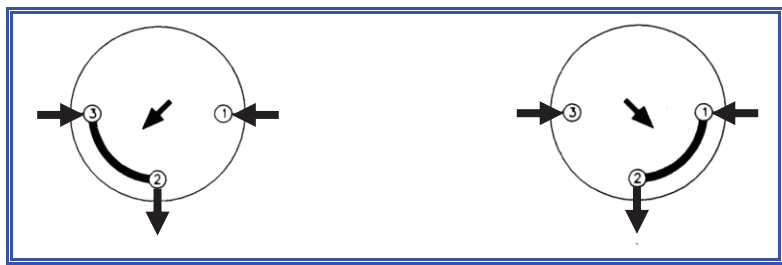


Figura 144. Ejemplo de válvula de tres vías seleccionando dos flujos de entrada en una única salida.

A su vez, las válvulas de cuatro vías permiten, por ejemplo, seleccionar dos detectores, aislar la columna de analitos procedentes de otra columna, realizar *backflush* (flujo reverso cuando la muestra tiene componentes reacios en eluir: al girar la válvula, se invierte la dirección del flujo y se minimizan los tiempos de análisis).

¹⁴¹ Berridge, J.C.: *Techniques for Automated Optimization of HPLC Separations*. Editorial John Wiley & Sons, Nueva York, 1985.

sis, figura 145), mantener el flujo en otra columna mientras se inyecta en la principal, etc.

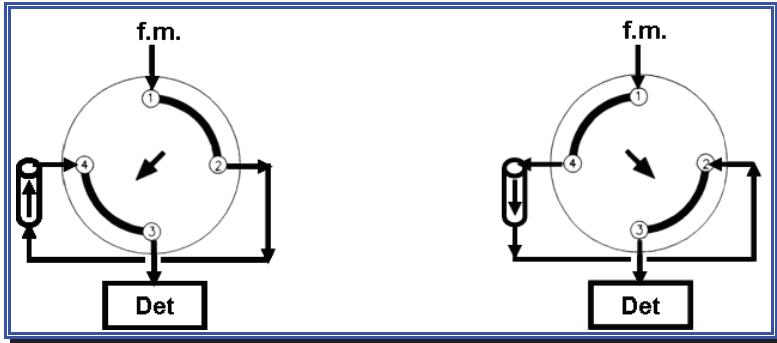


Figura 145. Ejemplo de válvula de cuatro vías realizando *backflush* de los últimos analitos en eluir.

Encontramos el ejemplo más paradigmático de válvulas fluidicas en la disposición de seis vías del inyector, por lo cual éste se denomina indistintamente “válvula de inyección” o “válvula de seis vías” (figura 146) y que, además, permite seleccionar una columna entre dos, un detector entre dos, dos bucles entre dos, añadir otra columna si una no bastase para doblar su longitud efectiva, etc.

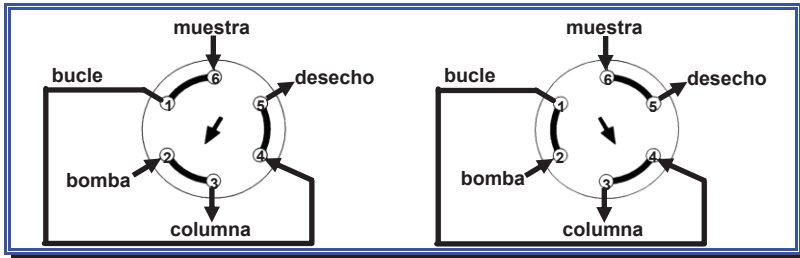


Figura 146. Válvula de seis vías operando como inyector.

Una válvula de ocho vías puede automatizar, en otro ejemplo clásico, la inyección en una columna seguida de *backflush* tras la llegada de los analitos al detector, práctica habitual para obviar gradientes (figura 147). Esta configuración es más sencilla y económica que montar dos válvulas en serie, una de seis vías para la inyección, seguida de otra de cuatro vías para el *backflush*. Otra conocida aplicación de las válvulas de ocho vías consiste en alternar dos columnas en equipos duales que montan dos columnas, cada una con *backflush*. Vemos, por tanto, que las válvulas de ocho vías son habituales en análisis que requieren *backflush*.

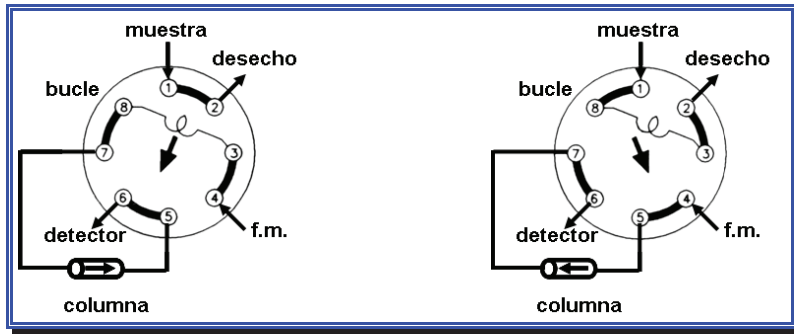


Figura 147. Ejemplo de válvula de ocho vías para inyectar en una columna, seguida de *backflush*.

Las válvulas de diez vías permiten diversas aplicaciones: seleccionar al tiempo una muestra de entre dos y una columna de entre dos para llevar lo eluido a un único detector; inyectar una muestra seleccionando a mismo tiempo una fase móvil entre dos posibles, una de dos columnas instaladas en el equipo y uno de dos detectores (figura 148). Estas válvulas también se emplean en el enriquecimiento de muestras en precolumna previo a un *backflush*. Muchas veces las válvulas de diez vías consuman aplicaciones más sencillas, como la selección de dos bucles o realizar reciclos. También existen válvulas de doce y catorce vías (figuras 149 y 150) e incluso de más vías, para automatizar procesos.

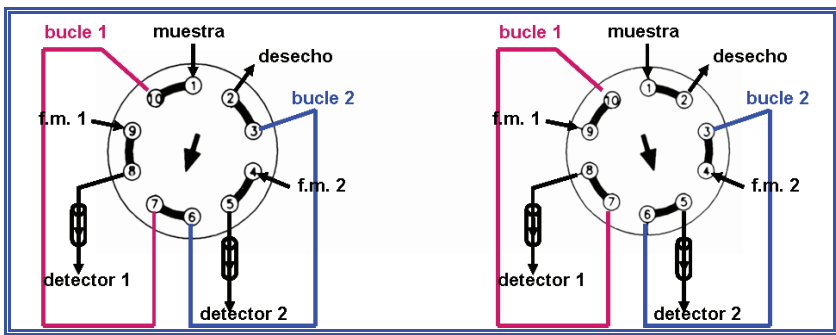


Figura 148. Ejemplo de válvula de diez vías.

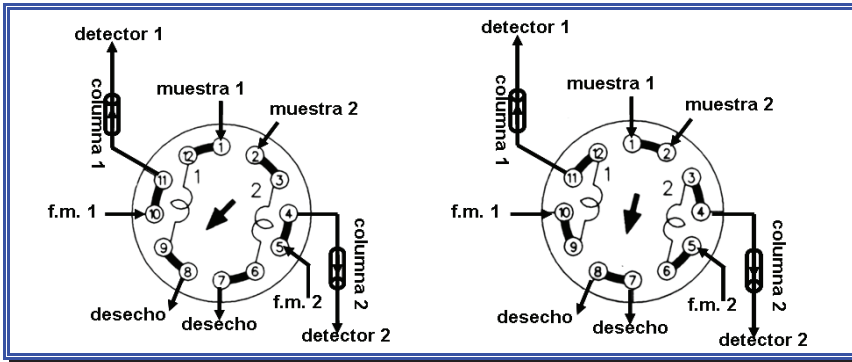


Figura 149. Ejemplo de válvula de doce vías para inyección simultánea de dos muestras en dos sistemas de HPLC.

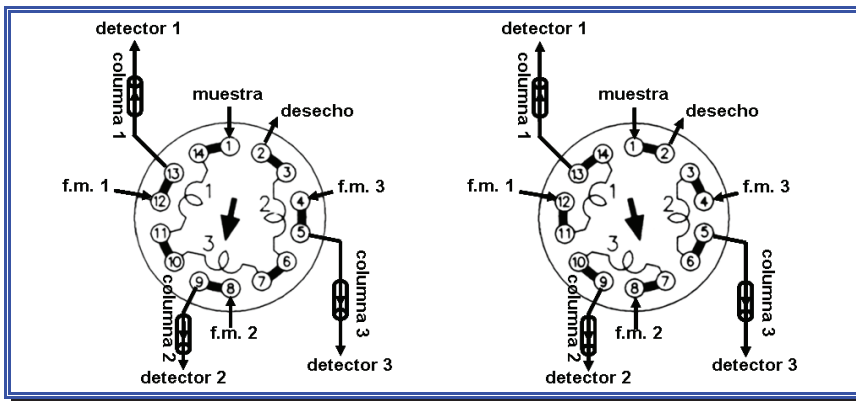


Figura 150. Ejemplo de válvula de catorce vías para realizar inyecciones simultáneas de dos muestras en tres sistemas de HPLC distintos.

9.6. Desgasificadores

La fase móvil puede llevar disuelto gas (aire), que aflora en forma de burbujas al ser bombeado, con los consiguientes trastornos en la detección, como el “efecto *peine*”, y alterar los tiempos de retención. Por ello, conviene desgasificar la fase móvil *antes* de los análisis y también *durante* los análisis, siempre y en todo momento cuando utilizemos gradientes en baja presión.

Desgasificar evita los *picos fantasmas* que suele originar el aire disuelto en la fase móvil. Esos picos fantasmas pueden minimizarse usando fase móvil como disolvente de las muestras, pues otro disolvente distinto podría llevar mayor cantidad de aire disuelto que la fase móvil y la diferente presencia de oxígeno puede

ocasionar picos fantasmas en la detección espectrofotométrica UV, especialmente a bajas longitudes de onda. Algunas muestras pueden contener hasta cinco veces más aire disuelto (y, por tanto, cinco veces más oxígeno) que la fase móvil. Una muestra "saturada en aire" en una fase móvil también saturada en aire muestra cromatogramas más o menos ruidosos (rizado), pero no verdaderos picos fantasmas. Además de esto, los disolventes de las muestras saturados en oxígeno generan grandes picos del frente en los cromatogramas. Tras desgasificar, el disolvente de las muestras contiene menos proporción de oxígeno que la fase móvil, por lo que genera un pico negativo en el frente del cromatograma. La absorbancia adicional que causa el aire disuelto varía según los solventes empleados. La magnitud de los picos fantasmas también depende de otros factores, aparte de la capacidad de disolver aire (producto de solubilidad) de los disolventes empleados como fase móvil, sobre todo por la interacción oxígeno – disolvente (figuras 151 y 152). Además de la aparición de picos fantasmas, el aire disuelto en fase móvil también puede afectar a la retención de los analitos. Para comprobar si un pico "sospechoso" es un artefacto o un pico fantasma causado por la presencia de aire disuelto en fase móvil podemos recurrir a varios procedimientos: como queda dicho, usar como disolvente de las muestras la propia fase móvil; desgasificar siempre ésta; airear la fase móvil y observar si los posibles picos fantasmas aparecidos coinciden con los previamente observados.

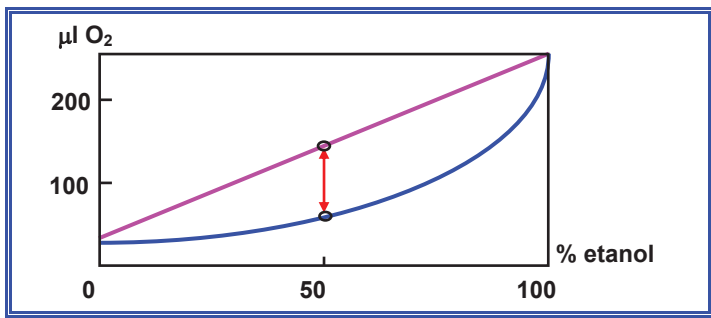


Figura 151. Solubilidad variable del oxígeno (en $\mu\text{l O}_2$) durante una fase móvil mezcla de agua-etanol.

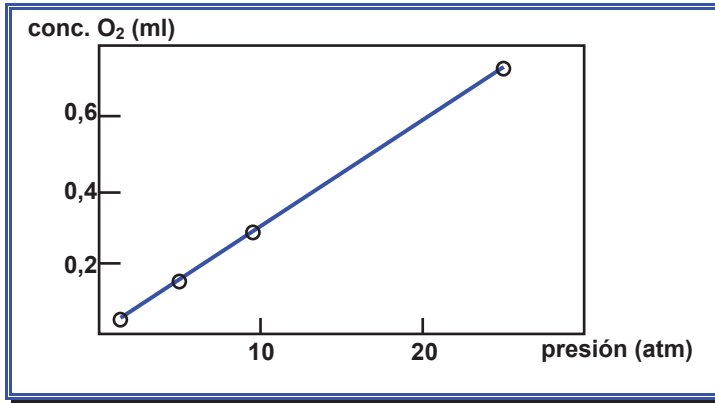


Figura 152. Efecto de la presión (en atmósferas) sobre la solubilidad del oxígeno (concentración del O₂ en ml) en 1 ml de agua.

Existen cuatro métodos de desgasificar (figura 153), que son, de peor a mejor: filtrar a vacío; sonicar en un baño de ultrasonidos; utilizar un desgasificador de membrana, y borbotear helio directamente en la fase móvil desde una bala de gas (helio) o en un económico desgasificador de helio.

En un desgasificador de membrana la fase móvil pasa a través de una cámara de vacío, separada del tubo del eluyente por una membrana especial que solo pueden atravesar los gases disueltos en la fase móvil. Los desgasificadores de membrana suelen desgasificar simultáneamente varios disolventes, generalmente cuatro. Son caros, pero apenas representan gastos adicionales.

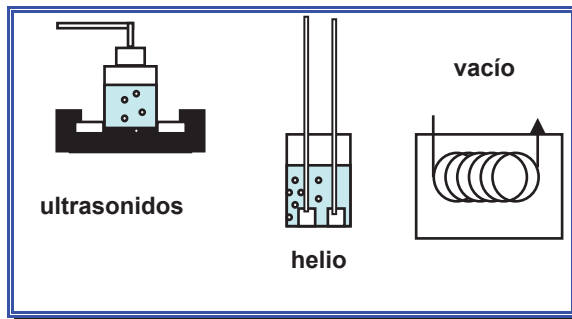


Figura 153. De izquierda a derecha, los tres tipos de desgasificadores *on-line* más utilizados: un baño de ultrasonidos sonica la fase móvil, helio borbotea en la fase móvil y un desgasificador de membrana aplica vacío.

A su vez, un desgasificador de helio purga el aire disuelto en la fase móvil al saturarla con helio, cuyo producto de solubilidad en las fases móviles habituales de HPLC es mínimo; éstas, saturadas en helio de este modo, apenas disolverán otros gases (por la ley de Raoult), mermando la formación de burbujas, derivas y

serpenteos de la línea base. Los desgasificadores de helio suelen poder controlar su puesta en marcha y parada desde ellos mismos, desde el *software* o desde la bomba del cromatógrafo.

10. SISTEMAS DE DATOS CROMATOGRÁFICOS

El último módulo importante de los sistemas de HPLC es el *Sistema de Datos Cromatográficos SDC (CDS, Chromatography Data System)*, que realiza básicamente dos tareas: *recoger* la señal del detector en cromatogramas para su posterior tratamiento y cuantificación¹⁴² (tarea denominada “*integración*”, luego veremos por qué) y *controlar* los módulos del equipo. Un SDC es el conjunto instrumental de un ordenador y sus accesorios, con el correspondiente *software* y una o varias interfaces de comunicación con los módulos del equipo cromatográfico. La rutina diaria del cromatografista exige crear en el SDC, antes de nada, un método de trabajo o cargar uno previamente creado. Ese “*método*” contiene *todas* las condiciones de trabajo de los módulos del equipo de HPLC (flujos de las bombas, condiciones de los gradientes, volumen de inyección del inyector automático, longitud de onda del detector, etc.), pero también del mismo SDC, tanto de su *hardware* (tiempo de adquisición de los datos, con qué frecuencia los adquiere, por cuantos canales simultáneos, etc.) y de su *software* (calibraciones contra las que se cuantifican los resultados, formato de los cromatogramas y listados, qué información exhibe la pantalla del ordenador, si se imprime o envía por red, etc.). Existen tres entornos o escenarios posibles: SDC basados en un ordenador personal; SDC que actúan en red con otros ordenadores o sistemas informáticos, y SDC basados en un sistema LIMS, red con un ordenador central (servidor) que guarda los datos y se comunica bidireccionalmente con cada ordenador de los equipos, a pie de éstos.

El uso del sistema de datos cromatográficos genera un gran número de ficheros de métodos (condiciones), datos (cromatogramas) y formatos (de impresión, de visualización en pantalla, de ficheros transferidos). El usuario puede almacenar los ficheros en un servidor central o en el ordenador periférico que se encuentra junto a cada cromatógrafo, forzando a una mínima organización de tantos ficheros, normalmente con un mismo nombre y extensiones distintas según la naturaleza del fichero. Por ejemplo, un fichero de análisis de leches tendrá en sus distintas secciones el nombre descriptivo “leche”: *leche.met* (el método), *leche.cal* (la calibración), *leche.rep* (el formato del reporte u hoja de resultados que imprime la impresora), *leche.inj* (los protocolos de inyección del inyector automático, con las secuencias de dilución, derivatización, cantidad de muestra a inyectar, etc.) y, naturalmente, los datos en forma de cromatogramas: *leche.001*, *leche.002*, *leche.003*, etc. (la extensión numérica es un ordinal correlativo del número de inyección de una misma muestra, que a veces puede mostrar más dígitos, que advier-

¹⁴² Felinger, A.: *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 1998.

ten del canal del detector por el que se adquirieron, si son réplicas de una misma muestra, si se trata de un “blanco” o un patrón de calibración, etc.¹⁴³.

Los distintos tipos de SDC existentes, de menos a más complejos y completos, son: integradores (“integradores - registradores”); el ordenador periférico “del” cromatógrafo con su correspondiente *software*; basados en un ordenador central que comparten varios equipos del laboratorio; una red que dispone de ordenadores periféricos para cada instrumento y un servidor central (tabla 62). Con ellos debemos plantearnos previamente cuántos datos o condiciones habrá que gestionar y manejar desde el SDC, el grado de confianza exigido a los resultados que proporciona o si conocemos bien su manejo y sus posibilidades. Un SDC solo automatiza la separación cromatográfica, pero jamás la optimizará.

Tabla 62. Tipos de SDC comerciales.

Integradores

Softwares basados en el ordenador periférico “del” cromatógrafo

Basados en un ordenador central que comparten varios equipos del laboratorio

Una red que dispone de ordenadores periféricos para cada instrumento y un servidor central

El primer dispositivo que permitió “capturar” cromatogramas fue un simple *registrador de plumilla*, con el cual nació un primer “procedimiento cuantitativo”, consistente en recortar y pesar el papel bajo cada pico para realizar los cálculos con él. La incierta exactitud y precisión de dicho procedimiento, condicionada por la densidad del papel, humedad del laboratorio, pericia del usuario en recortar los picos (por encima, por debajo o sobre la tinta de la plumilla), etc., precisaba una elevada velocidad del papel para lograr datos más precisos al exhibir picos aparentemente más anchos, para ser cortados y pesados con mayor precisión. Además de su incapacidad para realizar cálculos precisos, su gran inconveniente era no poder reprocesar cromatogramas, por ejemplo, tras cambiar el “cero” o las condiciones de calibración¹⁴⁴.

Posteriores a los registradores de plumilla aparecieron los *integradores de disco*. Los cromatogramas, estampados en un registrador, se ubicaban individualmente en la placa del integrador de disco, sobre la cual un brazuelo sostenía una plumilla; el brazuelo se movía manualmente desde la eventual línea de base hasta

¹⁴³ GAMP, *Good Practical Guide, A Risk-Based Approach to Compliant Laboratory Computerized Systems*, Segunda Edición. International Society of Pharmaceutical Engineers. Tampa (Florida), 2012.

¹⁴⁴ Dyson, N.: *Chromatographic Integration Methods*, Segunda Edición. Editorial Royal Society of Chemistry, 1998.

el trazo de los picos del cromatograma haciendo girar un disco dentado, el cual, a su vez, movía los dígitos de un visor numérico de forma análoga a los antiguos cuentakilómetros de los coches. Al volver el brazuelo a la posición de la línea de base del cromatograma el integrador de disco provocaba un avance horizontal (en la escala del tiempo de retención), progresando el cromatograma hacia su fin. Dicha secuencia se hacía tantas veces como fuese preciso para cubrir la anchura de cada pico, acumulando el dispositivo las cuentas de éste, que luego se anotaban a mano. Posteriormente se tornaba el visor a cero para repetir el proceso en los siguientes picos. Los integradores de disco se utilizaban en cualquier técnica capaz de mostrar resultados en formato señal del detector - tiempo y coexistieron junto a los registradores convencionales, *plotter* y registradores x-y.

El siguiente hito fue combinar un registrador con un disco electrónico, movido por la plumilla del registrador. Tal procedimiento, exactamente igual al de los integradores de disco, no necesitaba la mano del cromatografista, pudiendo realizarse automáticamente y en una sola vez sobre todos los picos. Estos instrumentos, aparecidos en 1970, se denominaron *integradores con microprocesador*. Inicialmente sin memoria para procesar cromatogramas con muchos picos, eran, por específicos y singulares, otro módulo del sistema cromatográfico. Pronto la electrónica los permitió realizar cálculos y calibraciones, mostrados en su papel tras el cromatograma. Con el tiempo surgieron modelos que podían dibujar sobre el cromatograma datos empíricos de los análisis (número de pico, tiempo de retención, altura, anchura, área, etc.) junto a los cálculos cuantitativos (concentración). Más adelante incorporaron en su memoria interna *ROM (Read Only Memory)* un rudimentario sistema de almacenamiento de cromatogramas y calibraciones. Enseguida acometieron un "*control a bajo nivel*" de los módulos del equipo, enviando la señal de comienzo y de final del cromatograma, incluso ordenando el inicio de los gradientes. Más adelante pudieron ciertas variables de algunos módulos del equipo (flujo de bombas, longitud de onda del detector, volumen de inyección del inyector automático). Su *ROM* interno, un chip preprogramado, realizaba los cálculos y tareas de un modo predefinido. Su principal limitación era su falta de memoria, paliada en los últimos modelos con comunicación con discos flexibles, grabadoras de cintas de *cassette* y ordenadores personales.

En 1974 comenzaron a verse los primeros equipos con un ordenador interno dedicado. Caros, poseían las ventajas inherentes de éstos: una "ilimitada" (al menos, así se creía entonces) capacidad de memorizar datos, calibraciones y condiciones, con cualquier nombre común en vez del solo número de los pocos ficheros de los antiguos integradores, abriendo la posibilidad de compartir métodos, cromatogramas y resultados numéricos con otros usuarios. Se empezó a conjugar el verbo "*reprocesar*" (reintegrar o volver a mostrar el cromatograma), realizar en los cromatogramas memorizados cambios posteriores de escala, aspecto, modos de cálculo y parámetros calculados.

Tabla 63. Esquema general de un procesador de datos de HPLC.

Hardware:	Interfaces analógicas – digitales (A/D) Interfaces de comunicaciones Contactos de cierre Protección de <i>software</i>, mochilas o <i>dongles</i> Ordenadores, impresoras, periféricos
Entorno :	Sistema operativo Capacidad multitarea Redes Programas de gestión Comunicaciones
Software:	Capacidades: control, adquisición, integrar, reprocesar Arquitectura Grupos Reportes Utilidades Configuración

LIMS

La eclosión del ordenador personal, el inevitable “PC” (*Personal Computer*) durante la penúltima década del siglo XX trajo la inmediata aparición de *softwares* de integración, relativamente universales, y también de control, relativamente específicos, pues solo los producían los fabricantes de cada marca para sus propios equipos. Enseguida se acuñó el término “SDC” o “*estación de datos cromatográficos*”, diferenciándose si era dedicada “*para control*” o “*para integrar datos*”, éstos últimos inicialmente con las mismas funciones que los registradores-integradores. Enseguida se pudieron comunicar varios ordenadores con un servidor central, con *software*, cálculos y presentaciones comunes para todos los equipos del laboratorio. Los actuales sistema de datos, basados en un ordenador personal, comprenden cuatro unidades básicas (tabla 63): *hardware*; entorno informático; *software* cromatográfico, y, en ocasiones, bases de datos genéricas del laboratorio o LIMS.

El proceso cronológico de creación y puesta en el mercado del SDC (*software* y *hardware*) precisa, tras su diseño y realización, una evaluación a fondo por su propio programador, posteriormente por otras personas y finalmente por algu-

nos usuarios seleccionados. Tras ello comienza su fabricación modularmente, cumpliendo los estándares en uso, donde se verifica individualmente cada parte (módulo) de su *software*; si tales pruebas no fuesen satisfactorias, se cambian las condiciones y se vuelve a verificar el SDC. Finalmente éste, ya completado y ligado a todos los módulos del equipo cromatográfico, se denomina *unidad o versión alfa*, que se facilita a varios usuarios expertos para que sea comprobada, denominándose entonces "*unidades o versiones beta*". Cuando dichos usuarios dan su aprobación aparece una primera versión lista para comercializar, la "versión 1.00" (uno-punto-cero), que inmediatamente se pone a la venta, comenzando su uso intensivo por muchos usuarios, con distintos requerimientos y grado de exigencia, pudiendo aparecer entonces algunos errores (*bugs*), que se comunican al fabricante para que los suprima sin cambiar el aspecto externo, surgiendo unidades o versiones cuya cifra centesimal va avanzando (1.01, 1.02, 1.03, etc.). Con el tiempo los usuarios demandarán cambios de presentación o formato, o serán anticipados por los programadores del fabricante, surgiendo nuevas versiones cuya primera cifra decimal va aumentando (versiones 1.1, 1.2, 1.3, etc.). Más adelante, al demandarse cambios más profundos, éstos darán lugar a un producto sustancialmente distinto, modificándose su número entero o versión (1.00, 2.00, 3.00, etc.). Lógicamente, productos y *softwares* comienzan a comercializarse a partir de la versión 1.00, pero también es frecuente que se lancen tras haber suprimido algunos errores y modificado formatos, por ejemplo, a partir de la versión 1.12, donde se ha corregido los posibles errores en dos ocasiones y modificado alguna parte o formato (pantalla) de presentación¹⁴⁵.

HARDWARE DE UN SDC

El *hardware* de la que podríamos llamar externamente la *estación cromatográfica* está formado por un ordenador personal con su impresora, monitor, teclado, ratón y otros periféricos, junto a ciertos componentes específicos de los sistemas de HPLC (tabla 64) que exponemos a continuación:

¹⁴⁵ Frewster, M. y Graham, D.: *Automated Software Testing*. Editorial Addison Wesley, 1999.

Tabla 64. Hardware en un sistema de datos en HPLC.

Unidad	Propiedades
interfaces	digitales (RS 232, IEEE, fibra óptica) analógicas
interfaces A/D	número de canales y bits muestreo dinámico y su frecuencia
contactos	relés de contacto accesorios externos
protección de software	dongles, mochilas
ordenador	PC, sistema central
impresoras	printer, plotters

Interfaces de comunicaciones: la mayoría de los *softwares* de HPLC (los hay que solo integran) están pensados para controlar los módulos del sistema, exigiendo comunicar y conectar su *hardware* (en general, un PC) con cada módulo mediante una interfaz (RS 232, IEEE, fibra óptica, etc.).

Convertidores analógicos - digitales (convertidores A/D): la señal de salida del detector puede ser analógica (eléctrica, en voltios) y el ordenador, para tratarla, la precisa convertida en modo digital. Los equipos de HPLC disponen de convertidores A/D, normalmente tarjetas que se instalan dentro del mismo ordenador, para uno o más canales (detectores). Como luego veremos, la calidad de la conversión A/D de los picos cromatográficos la define la resolución informática del conversor, expresada en bits.

Unidad de generación de contactos eléctricos o relés: esta sencilla opción “abre” las fronteras de los SDC a módulos de otros fabricantes, comandando generalmente en ellos un “control a bajo nivel”: tras programar en cada módulo cromatográfico sus propias condiciones, el SDC envía un pulso eléctrico de tipo contacto, por el que comienza (o se detiene) la secuencia programada de dicho módulo. La mayoría de los módulos de HPLC, cuyo control integral es esclavo de *softwares* de su misma marca, suelen permitir, entre otras, señales de tipo relé de 24 voltios), en órdenes habituales de comienzo (*start*), parada (*stop*), mantener las

condiciones (*hold*) o estar listo el módulo para comenzar el análisis al alcanzar las condiciones previas (*ready*).

Unidad de protección del software ante copias ilegales, en componentes conocidos como “*mochilas*” o “*dongles*”. Suelen ser una pastilla física (*hardware*) intercalada entre el ordenador del SDC y su salida paralela (de impresora). Si el *software* del SDC no detecta su presencia, impide su utilización. Muchos *softwares* suministrados en formato CD-ROM contienen todas las opciones del fabricante, habilitando las *mochilas* o *dongles* solo las opciones compradas (control de varios equipos, adquirir datos de ellos) y, si posteriormente se desean más opciones, el fabricante suministrará una nueva *mochila* con las nuevas posibilidades o herramientas (claves, *password*) para su actualización.

SOFTWARE DE UN SDC

Las características aceptadas como ineludibles del *software* de un SDC de HPLC comprenden en primer lugar su capacidad multitarea para adquirir datos de uno o varios equipos junto al control de los mismos mientras se reprocesan o cuantifican los cromatogramas previamente obtenidos, realizar nuevas calibraciones, diseñar nuevos métodos, etc. El término anglosajón “*foreground*” describe la capacidad del SDC de adquirir cromatogramas desde el equipo en tiempo real y “*background*” la de reprocesar o integrar cromatogramas memorizados en el disco duro del ordenador.

Otra propiedad apreciada es la facilidad de manejo del SDC por parte de los usuarios, que sea familiar y permita unir datos y aplicaciones desarrollados en él con otras herramientas, como bases de datos, hojas de cálculo, procesadores de texto o presentaciones. El entorno *Windows* es el más utilizado, apreciándose las capacidades *DDE* (*Dynamic Data Exchange*) y *OLE* (*Object Linking and Embedding*) para compartir datos.

En cuanto a la capacidad de controlar uno o varios equipos, no es raro que un solo usuario comande varios cromatógrafos desde un solo *hardware* y *software*. El SDC debe diseñar y memorizar la configuración de cada equipo enlazado a él así como sus accesorios específicos de *hardware* (convertor A/D, impresora, etc.), permitiendo a cada aplicación referirse a una configuración específica: por ejemplo, en sistemas con varios detectores cada método posee instrucciones precisas para el detector empleado, anulando la comunicación con los demás detectores.

Evidentemente son claves las características de la integración o cuantificación que realiza el SDC: canal, tiempo de digitalización desde un “tiempo inicial” a un “tiempo final”, frecuencia de muestreo, sustracción y tipo de la línea de línea de

base (horizontal paralela al eje, horizontal oblicua respecto al eje, segmentada, etc.), pudiéndolas variar durante los cromatogramas.

La seguridad del SDC, en la acepción denominada “*administración del sistema*”, permite definir distintos usuarios con su firma electrónica (nombre y código clave o *password*, nivel de privilegio, equipos que puede manejar de los varios unidos al SDC, etc.) y el diario de incidencias (*login*)¹⁴⁶.

Los *softwares* de los SDC disponen, en mayor o menor medida, de menús de ayuda para sus usuarios. Antaño los usuarios encontraban ayuda en los “manuales de usuario” (en papel), más o menos detallados, precisando adiestramiento y formación. Con el tiempo, de forma similar a otras aplicaciones y *softwares* de uso general, los SDC han ido incorporando una sección de ayuda (“*help*”) con los tópicos más frecuentes, solución de los problemas más habituales y el mismo manual de instrucciones. Tal ayuda se ha ido convirtiendo en documentos audiovisuales con imágenes, videos y sonidos que explican claramente cómo llevar a cabo lo que el usuario consulta, y menús de ayuda interactivos (“*wizard*”), que ejecutan al seguirlos los comandos e instrucciones precisos.

La arquitectura informática de un SDC debe ser comprensible y lógica para el usuario, con ficheros separados, pero interrelacionados: del método, con las condiciones instrumentales de cada módulo, integración, calibración y modo de cálculo; datos o puntos para construir el cromatograma; ficheros de trabajo donde se programan las inyecciones sucesivas por lotes o individuales; diseños de hojas o reportes a imprimir tras los análisis; librerías espectrales, etc. (tabla 65).

Tabla 65. Requerimientos habituales del entorno informático de un procesador de datos de HPLC.

Unidad	Propiedades
sistema operativo	DOS, Windows, Unyx, etc.
capacidad multitarea	foreground, background
redes	network, multiwork stations, LIMS
programas de gestión	bases de datos, cálculos, dibujo, textos, presentación
comunicaciones	correo electrónico

¹⁴⁶ 21 CFR 11. *Electronic Records: Electronic Signatures, final rule.* 1997.

CONTROL DEL EQUIPO

Como hemos anticipado un SDC controla el cromatógrafo de HPLC con sus diferentes módulos de dos formas: *control a alto nivel* (exhaustivo de cada unidad, con todas sus funciones, propio de los SDC del mismo fabricante) y *control a bajo nivel* (donde cada módulo debe programarse por sí mismo en su teclado, *display* y *software*, emitiendo el SDC simples órdenes de “comienzo”, “parada” o “hold” mediante cortos o relés). Los SDC suelen estar “abiertos” a otros módulos mediante interfaces comunes (en serie o en paralelo), siendo este último el caso de SDC de distinto fabricante del de los módulos del equipo.

Una buena propiedad del control que realiza el SDC es poseer un *feedback* o comprobación de retorno de que las instrucciones comandadas han sido ejecutadas y de que los módulos del cromatógrafo se encuentran en condiciones que permiten hacerlo. Normalmente los SDC *comprueban* a intervalos regulares y muy cortos (un segundo o menos) la operatividad instrumental de los módulos del equipo y su disponibilidad para ser comandados. En caso contrario emiten mensajes que avisan al usuario de que ha de esperar (a veces cuantifican ese tiempo) o, simplemente, que el equipo aún no reúne las condiciones para realizar las órdenes (por ejemplo, si las lámparas del detector espectrofotométrico estaban apagadas y se ha ordenado adquirir cromatogramas, el SDC emitirá un mensaje indicando que las lámparas se hallan apagadas). Algunos SDC, en vez de presentar ese mensaje de error o de imposibilidad, subsanan el problema y, si ello implica un cierto tiempo de inactividad, expresan un aviso: en el ejemplo anterior, el SDC activaría la lámpara del detector y emitiría el mensaje de “lámpara activada, espere tantos minutos”.

Los parámetros instrumentales que suele controlar un SDC pueden resumirse en: *feedback* con el sistema cromatográfico; control de cada módulo del cromatógrafo; programar flujos y gradientes; cambiar valores y límites; órdenes de comienzo del análisis y tiempo total del análisis; desfase temporal en la adquisición de datos; integrar el cromatograma tras la adquisición de datos o en cualquier momento a discreción; comprobar las condiciones de cada canal, y, por último, activar eventos externos.

El *hardware* en que se basa el SDC (usualmente un ordenador personal) suele conectarse en último lugar tras encender los módulos del equipo. Como regla, todo módulo que posea protocolos o *drives* de comunicación debe conectarse después de los módulos básicos: por ejemplo, en primer lugar se conectan bombas, inyector y detectores; a continuación, caso de tenerlo el equipo, el módulo de control del sistema; luego, el ordenador; por último, se arranca el *software* cromatográfico.

ADQUISICIÓN DE DATOS Y CUANTIFICACIÓN

“Adquirir datos” consiste en tomar la señal del detector para convertirla en cromatogramas, que exhibe en tiempo real algún dispositivo de visualización (pantalla del ordenador, registrador) y, a ser posible, la memoriza en el disco duro de su ordenador, en la memoria RAM del integrador o en otros dispositivos. “Integrar” expresa el cálculo de área bajo el pico, convirtiendo el gráfico de los picos en valores numéricos de área mediante un procedimiento de integración que puede ser de dos tipos: el primer tipo descompone los picos en segmentos rectangulares sucesivos a modo de histogramas (figura 154), donde cuanto mayor es el número de rectángulos en que se descompone el pico, mayor es la precisión del cálculo de su área, en unidades señal-tiempo (por ejemplo, $\text{mV}\cdot\text{min}$), sumándose finalmente el área total o integral de áreas de las n rebanadas; el segundo tipo de integración, más complejo, calcula la fórmula matemática que define el perfil del pico (una gaussiana) y la resuelve entre sus límites horizontales (escala de tiempo) y verticales (escala de señal del detector), no olvidando que la mayoría de los picos cromatográficos presentan asimetría, dificultando esta modalidad el cálculo exacto de las áreas.

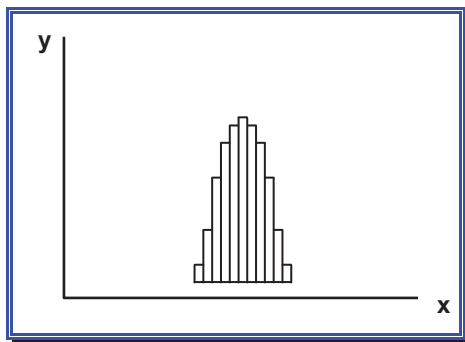


Figura 154. Cálculo habitual de áreas en los picos cromatográficos.

De este modo los datos originales (*raw data*) son digitalizados por el conversor analógico - digital A/D para luego ser cuantificados por el *software*. En algún momento durante su adquisición, al terminar esta o al ordenárselo a discreción, los datos son memorizados en el SDC. Posteriormente se pueden reprocesar y manipular, extrayendo los cromatogramas memorizados, normalmente en formato digital. En cuanto a la calidad de los datos, información necesaria para poder reprocesar con fidelidad los cromatogramas, los *softwares* suelen almacenar en el disco duro del ordenador los puntos tomados en una matriz numérica bidimensional señal - tiempo, cuyo número de puntos depende de la frecuencia de muestreo y la resolución del conversor analógico - digital. Esta es la mejor opción, que permite reprocesar cromatogramas bajo otras condiciones con resultados equivalentes a como si se hubiese hecho *durante* la adquisición de datos, en tiempo real. Otros *softwares* almacenan simplistamente los resultados de la integración y

“rehacen” los cálculos variando ciertas condiciones numéricas: por ejemplo, si se varía el factor de dilución de las muestras, el *software* simplemente multiplica por ese factor los resultados memorizados.

A continuación exponemos un *modus operandi* general de trabajar con un SDC para integrar correctamente y obtener resultados cuantitativos fiables, en los siguientes pasos sucesivos y en el orden citado:

En primer lugar, debemos lograr un cromatograma “bueno” y representativo, con los picos bien separados de un multipatrón que contenga todos analitos que se vayan a cuantificar.

En segundo lugar, integraremos el cromatograma por primera vez bajo las condiciones estándar de la SDC o iniciales del método de trabajo, observando qué parámetros de integración han de mejorarse. Tras cambiarlos, reintegraremos el cromatograma de forma óptima, con todos los picos de interés, rechazando los irrelevantes y otros distintos de los analitos, fijando un modo de integración adecuado (valle-valle, línea de base horizontal, etc.) e inhibiendo la integración en zonas irrelevantes, como el inicio (con el frente de solvente) y el final del cromatograma.

En tercer lugar, generaremos la tabla de identificación de picos con la información del nombre de cada pico, tiempo de retención y permisividad de éste. La permisividad puede expresarse en valor relativo o en valor absoluto: un valor relativo de, por ejemplo, un 5% del tiempo de retención, siendo éste 6,0 min, hace “considerar” al SDC que todo pico existente entre 5,7 y 6,3 min “es” ese pico de la tabla. Si seleccionamos un valor relativo de, por ejemplo, $\pm 0,2$ min, el SDC *accepta* que todo pico existente entre 5,8 y 6,2 min “es” ese pico de la tabla. Tras esto, debemos ajustar las propiedades de la tabla de picos con los parámetros que deseemos; evidentemente, es obligado el tiempo de retención y el nombre de cada pico, pero pueden existir más parámetros.

En cuarto lugar introduciremos los datos de concentración de los sucesivos patrones. Al inyectarlos, el SDC toma las áreas de los picos, las asocia a cada pico de la tabla de identificación y crea finalmente una ecuación de áreas – concentraciones como resultado de la calibración. Los detectores “normales” no espectrales identifican únicamente por la coincidencia de tiempos de retención de los picos del cromatograma con los de los patrones (de la tabla), mientras que los detectores espectrales (*diode array*, espectrómetros de masas) identifican los picos, además de por la coincidencia de tiempos de retención y su permisividad, comparando los espectros de los analitos con los de los patrones, memorizados en una librería, tanto por el nombre como por el índice de similitud de los espectros. La mayoría de los SDC permiten ajustar las gráficas y ecuaciones de calibración en modelos lineales, pero también cúbicos, cuadráticos o logarítmicos, difícilmente justificables en análisis convencionales.

En quinto lugar se genera la hoja de resultados con toda la información precisa del análisis: datos de la muestra y parámetros del método cromatográfico junto al cromatograma y posterior reporte o tabla numérica con las áreas y concentraciones, obtenidas al enfrentar dichas áreas contra la calibración. La práctica totalidad de los SDC pueden mostrar e imprimir simultáneamente varios canales en tiempo real y cromatogramas reprocesados. Los cromatogramas suelen (y deben) mostrar la línea de base, así como las anotaciones del tiempo de retención y marcas de principio y final de pico.

En sexto y último lugar, si el SDC lo permite, realizaremos el test de idoneidad o *suitability test*, comprobando que cada resultado obtenido se halla entre un valor mínimo y otro máximo previamente definidos, así como la tendencia (gráfica) de los resultados. Por ejemplo, si se observa una disminución continuada en el tiempo del número de platos teóricos, quizá el método resulta agresivo para la columna y podemos estimar cuando deberemos cambiarla.

Generalizar un *modus operandi genérico* resulta delicado, pues cada SDC incorpora múltiples funciones de cálculo, formato y control específicas, a diferencia de las relativamente pocas de un integrador. Las aplicaciones “de rutina” analizan muestras básicamente muy semejantes, que solo difieren entre sí en la concentración de los analitos, mientras que las aplicaciones “de investigación” analizan a fondo pocas muestras muy diferentes entre sí. Así, decidiremos si en el método de análisis prima más su repetitividad o, por el contrario, su flexibilidad. En un laboratorio de control de calidad (de rutina), tras desarrollar un método específicamente para una aplicación y validarlo, la mayor parte de los cromatogramas se adquieren sin la atenta mirada del cromatografista, obtenidos de seguido con un autoinyector o inyectados por personal subalterno; el cromatografista o “técnico” del laboratorio únicamente aprobará los resultados y solo estará frente al cromatógrafo cuando se presenten dificultades analíticas u operativas.

En la sistemática de un día cualquiera de trabajo, procederemos al arranque o inicialización del SDC y los módulos del equipo controlados por él, normalmente de modo integral, observando acciones de rutina, por ejemplo, esperar unos minutos al calentamiento de las lámparas del detector recién encendidas. Cada método debe poseer la cualidad de ser inequívocamente identificado por los usuarios, haciendo posible su uso solo para el tipo de muestras para el que fue ideado. Finalmente, cada cromatograma contendrá información identificativa: por ejemplo, el número de muestra, identidad de la misma (un texto), identificación del laboratorio (nombre, logotipo), cantidad de la muestra inyectada, patrones de calibración, número de réplicas o repeticiones con cuya media se realizan los cálculos, etc.

Propiedades de la adquisición de datos

Como sabemos, la señal o respuesta generada en el tiempo por el detector de HPLC puede ser de dos tipos: analógica y digital. La señal analógica suele ser un voltaje que produce su amplificador, generalmente variable entre 0 y 1 Voltio. Tomemos como ejemplo un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable: la radiación que llega a su fotodiodo la magnifica su amplificador aplicando un factor (logarítmico) para convertirla en absorbancia, restando el valor de un blanco; asimismo, la adapta entre unos límites mínimo (*señal nula*) y máximo, usualmente entre los referidos 0 y 1 V, pero ocasionalmente entre 0 y 100 mV, 0 y 10 mV u otros valores menos habituales. Los equipos que generan señal digital, como los detectores *diode array*, lo hacen a partir de un microprocesador, pues poseen partes específicas para tal fin. Dado que el *hardware* y *software* de los SDC (y de los integradores) realizan los cálculos (de áreas) a partir de una señal digital, el sistema de datos cromatográfico debe tener una interfaz o conversor analógico - digital (A/D), siendo los más comunes los conversores de voltaje a frecuencia, que explicamos a continuación.

La frecuencia con que los SDC toman datos a partir de la señal analógica del detector se denomina *frecuencia de muestreo*, medida en puntos por segundo (Hz). Para definir un pico correctamente se precisan no menos de 20 puntos, siendo aceptable una frecuencia de muestreo de 1 Hz en HPLC convencional (analítico), más (10-20 Hz) en HPLC capilar, *microbore*, *fast* o UHPLC, y menos (0,1 Hz) en HPLC preparativo. Menos puntos definen el pico abruptamente, resultando "cuadrado" o "triangulado" en su zona alta; sin embargo, un exceso de puntos, además de ocupar más memoria en el ordenador del SDC, ocasiona líneas de base más ruidosas, dificultando la detección del inicio y fin del pico, con el correspondiente error en el cálculo de áreas.

La resolución del conversor A/D se expresa en bits, siendo 1 bit la menor variación de señal analógica que provoca un cambio en la señal digital. La resolución suele ser de 20 bits en HPLC analítico y mayor en HPLC capilar, *fast* o UHPLC. La calidad de la conversión A/D la define su resolución, como queda dicho expresada en bits. Por ejemplo, un conversor A/D de 20 bits que actúa sobre una señal analógica de 0 a 1 V con resolución de 2^{20} puede gestionar intervalos de información (analógica) de $1/2^{20}$, aportando una resolución de $1 \mu\text{V}$ ($2^{20} = 1.048.576$; $1 \text{ V}/2^{20} \cong 1 \mu\text{V}$). En ese intervalo toda su zona, de 2^{10} (1.024), proporciona una resolución de 1 mV ($1 \text{ V}/2^{10} \cong 1 \text{ mV}$). Es fácil comprender que otros detectores menos habituales, que generan otras señales analógicas, por ejemplo, de 0 a 5 V, condicionan una resolución digital de un conversor de 20 bits de $5 \mu\text{V}$. Existen conversores A/D "autorrango", que aplican su máxima resolución sobre el ápice del pico y en las zonas inicial y final del pico, redondeándolos desde la línea de base.

La especificación del voltaje de entrada de la conversión analógica-digital debe corresponderse con la del detector: un conversor A/D de, por ejemplo, 0 a 1 V debe conectarse a esa misma salida del detector. Sin embargo, si ese mismo conversor se uniese a un detector con salida de 0 a 100 mV, los cromatogramas serían diez veces menores en altura y áreas absolutas.

Algunas aplicaciones requieren capturar simultáneamente dos o más cromatogramas, procedentes de dos detectores o de un detector dual (por ejemplo, de doble longitud de onda), exigiendo al conversor analógico - digital poseer al menos dos canales y al *software* la capacidad para procesar ambos, interrelacionando los cálculos de los dos, así como de mostrar cromatogramas y cálculos simultáneamente en pantalla e impresora.

Respecto a los *ficheros de datos (data files)* del SDC, deben contener y memorizar los puntos que definen inequívocamente el cromatograma junto a cualquier otra información precisa para los cálculos y reanálisis. Es importante recordar que las reglas de calidad deberían impedir alterar o manipular los ficheros digitales de datos memorizados en el ordenador. Como mínimo, si se manipularon, el SDC debería etiquetar en el cromatograma algún mensaje indicativo, como "*manipulado*" o "*integración manual*".

El primer paso de la integración de un cromatograma consiste en detectar y reconocer los picos correspondientes a los analitos. Para ello, se inyectarán patrones de cada analito en concentración alta, pues sería sumamente decepcionante inyectar las concentraciones objeto del análisis y no poderlas apreciar por ser exiguas. Luego, sucesivamente, se monitoriza la línea de base, se determina el ápice de cada pico y se espera hasta que la línea de base vuelva a ser plana, definiendo las siguientes variables:

Tras ello, en primer lugar decidiremos el modo genérico de cuantificar la señal del cromatograma, en áreas o en alturas. El SDC considera "pico" al exceder la señal del detector dos valores críticos, un *umbral* y una *pendiente*, cuyos mínimos se establecen previamente. El *umbral (threshold)* es un valor absoluto sobre el "cero" de la línea de base, realizado al inicio o comienzo de la toma de datos de cada cromatograma, mientras que la *pendiente* de la línea de base se expresa en mV/min. Un umbral muy bajo hace que el ruido genere muchos "picos aparentes", especialmente trabajando con alta sensibilidad, pero si es muy alto, algunos picos de interés podrían pasar inadvertidos, sin ser integrados.

En segundo lugar, estableceremos el número mínimo de puntos necesarios para definir un pico, en términos de frecuencia de muestreo (la constante temporal es parámetro propio del detector).

En tercer lugar, localizaremos los tres puntos más importantes que definen cada pico: su comienzo, ápice y final. El SDC determina el *comienzo del pico*

cuando la señal se eleva por encima de la línea de base, superando el umbral. Un modo ingenioso, aunque poco difundido, es el “*método de tangentes múltiples*”, que decide la presencia de un pico tras trazar desde cada punto del cromatograma múltiples (cien) tangentes a otros tantos puntos sucesivos. Finalmente la velocidad de captura de datos y la frecuencia de muestreo (20 puntos) definen correctamente cada pico y su ápice. Respecto a la forma de determinar el *final del pico* no debemos olvidar que prácticamente todos los picos de HPLC son asimétricos y en cierta medida asintóticos en su final. Aunque aparentemente la señal procedente del detector baje a cero, puede que el ruido (rizado) de la línea de base estime incorrectamente el final del pico. Algunos *softwares* poseen protocolos que “suavizan” los cromatogramas, reduciendo el ruido de la línea de base al tomar menos puntos (1 de cada 2, 1 de cada 5, etc.).

En cuarto lugar, se establecerán ciertas condiciones especiales, que permiten definir picos de lenta elución al final de los cromatogramas.

Ya definidos los tres puntos capitales del pico (su comienzo, ápice y fin), así como cuántos puntos ha tomado el SDC, dados por la frecuencia de muestreo, se procede a la *integración* del cromatograma, proceso que calcula las áreas (o alturas) de cada pico, en principio estableciendo la “*línea de base de pico*” como una línea recta entre su comienzo y final, a la cual luego se resta la señal total inicial del detector (en microvoltios), tomando entonces el pico cromatográfico valores absolutos. La altura de pico es simplemente el valor residual más alto en voltaje (voltios, milivoltios, microvoltios) y el área de pico la integración de las “rebanadas” de señal sobre el pico ya definido. Los algoritmos usados varían según los fabricantes, pudiendo discrepar en los valores absolutos de áreas o alturas. Las unidades usuales de altura son voltios, milivoltios, microvoltios, absorbancias o miliabsorbancias, mientras que las de área son las mismas respecto al tiempo (microvoltios por minuto o microvoltios por segundo).

Los procedimientos cuantitativos con los que trabajan los SDC pueden presentar algunas dificultades, que los usuarios deberían conocer para evitarlos, corregirlos o, como mínimo, reducirlos. Entre ellos hay dos importantes: la deriva de la línea de base y la cuantificación de picos mal resueltos.

La “*deriva de la línea de base*” de la señal procedente del detector se manifiesta en lentas y suaves subidas (*deriva positiva*) o bajadas (*deriva negativa*) en los cromatogramas durante tiempos “largos”, mayores que la anchura del pico más ancho del cromatograma. Muchas veces los cálculos de los conversores A/D obvian la deriva, alterando erróneamente los resultados de la integración, por lo que deberíamos tenerla en cuenta al fijar el umbral de detección de picos (una deriva positiva puede ser detectada y tratada como pico). Una *deriva negativa*, si la línea de base del cromatograma partió de una señal “cero”, muestra el cromatograma aparentemente plano, “rebañado” en su parte inferior, señal llamada “*muerta*” por no alcanzar el conversor A/D los límites operacionales. Para evitarlo recomen-

mos fijar un pequeño valor negativo en el conversor A/D, del 10% del máximo positivo del cromatograma (“*fondo de escala*”): por ejemplo, estableceremos una escala de -10 a 100 mV para un fondo de escala de 0 a 100 mV.

Por otra parte, la cuantificación de los picos no resueltos entre sí (“*picos fundidos*” en el argot cromatográfico) constituye uno de los principales problemas de la integración, que se puede intentar solucionar de tres formas (figura 155): fijar una línea perpendicular a la línea de base desde el mínimo entre los picos no resueltos; integrar los últimos “en cola” sobre la zona descendente del primero o “principal”, y como tercera opción, la mejor a nuestro juicio, una integración valle-valle. La pregunta, por obvia, es inquietante: ¿qué pasa con el área rechazada, bajo cada valle? Hace años aparecieron *softwares* de deconvolución de picos, capaces de obtener picos teóricos como si campeasen en ausencia de los adyacentes no resueltos; empero, apenas se utilizan y el cromatografista prefiere optimizar el método cromatográfico para lograr picos bien resueltos, por ejemplo, cambiando de fase móvil.

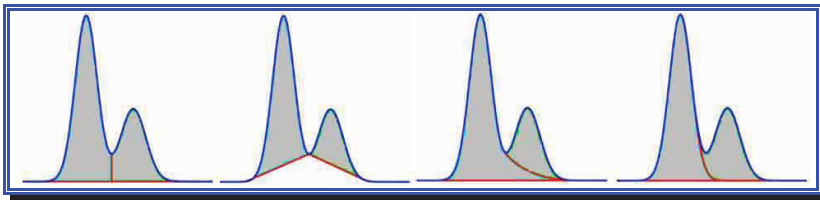


Figura 155. Integración de picos no resueltos: de izquierda a derecha, sobre la línea de base, “valle-valle” y dos modalidades con *tailing*.

Los SDC suelen contemplar la casi irrenunciable posibilidad de superponer cromatogramas para comparar visualmente los de la muestra con patrones, otras veces con distintos modos de detección o su evolución en el tiempo. Deberíamos conocer de antemano el número máximo de cromatogramas que monitoriza el SDC para planificar mejor las inyecciones y compararlas en un intervalo dado del cromatograma, menor a su tiempo total. Algunos SDC memorizan y muestran información específica del análisis con concretos parámetros *sui generis* definidos por el usuario.

Un tema candente de los SDC es su capacidad de ligarse con otros equipos cromatográficos o analizar “otros datos”, por ejemplo, enviados por Internet. El modo más fácil de hacerlo es transferir las “hojas” de información (*spreadsheet*) unidireccionalmente desde el SDC. Antes de comenzar el proceso el SDC ya realizó sus propios cálculos, que luego exporta individualmente o en conjunto a un procesador de texto para el reporte final, usualmente en pdf o como objeto.

TEST DE IDONEIDAD (*Suitability Test*)

Concebido originalmente para la industria farmacéutica y poder comprobar que los datos obtenidos en los análisis son aptos (*suitables*), el *Suitability Test* se usa de forma rutinaria en laboratorios donde es importante la calidad de los análisis. El *Suitability Test* es un procedimiento distinto de la validación, estimando juntos la aptitud del laboratorio y la reproducibilidad de los resultados.

Para realizar un *Suitability Test*, en primer lugar se cromatografía un multipatrón representativo de todos los analitos de las muestras a analizar y en la concentración buscada en las mismas ("concentración objetiva"), estableciendo en el SDC el valor mínimo y máximo de diversos parámetros cromatográficos (hay quien lo hace manualmente o con una tabla de cálculo). Tras el cromatograma de cada muestra se coteja el valor obtenido de cada uno de esos parámetros con los mínimos y máximos definidos: si en algún análisis ese valor excede el mínimo y no supera el máximo establecidos, el SDC exhibirá junto al reporte del cromatograma un mensaje de tolerancia ("*muestra aceptada*"), como lo haría manualmente el usuario que realiza el test. Por el contrario, si ese valor es inferior al mínimo o supera el máximo establecidos, el SDC emitirá junto al reporte del parámetro en el cromatograma un mensaje de alarma ("*muestra no aceptada*"), como asimismo lo haría manualmente el usuario que realiza el test.

Algunos SDC permiten cálculos estadísticos (desviación estándar, coeficiente de variación, media, etc.), representativos de réplicas o repeticiones de las muestras, y también pueden exhibir la tendencia (numérica o gráficamente) de cada parámetro para estimar su evolución temporal junto a su coeficiente de correlación¹⁴⁷. Evidentemente estos cálculos también pueden hacerse manualmente. Cuáles van a ser esos parámetros y su importancia relativa en los análisis queda a juicio del usuario: sobre todo, la resolución (que debería superar el valor de 1,5 entre dos analitos adyacentes); la repetitividad entre muestras (como coeficiente de variación de 5 ó más inyecciones); la asimetría (útil para evaluar la vida de la columna); el número de platos teóricos, indicativo de la eficiencia del método (su valor límite decidirá la conveniencia de sustituir la columna); el ruido y deriva; los límites de detección y de cuantificación; la anchura de pico; el factor de respuesta; el tiempo de retención; el área de pico; la concentración, etc.

Además, debería procederse a realizar el *test de ruido* y el *test de deriva*, estimados en los cromatogramas entre un tiempo de comienzo y otro final, intervalo en que se calcula el umbral y el ruido de la línea de base para cotejarlos el *Suitability Test* con sus valores límites, aceptando o no la aptitud de los análisis. Algunos cálculos precisan ciertos parámetros generales, como el tiempo muerto (t_0 ,

¹⁴⁷ Millar, J.C. y Millar, N.M.: *Statistics for Analytical Chemistry*. Editorial John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2004.

en minutos), la longitud columnar (en metros) o el diámetro estadístico medio de partícula de fase estacionaria (d_p , en μm).

SISTEMAS LIMS

El sistema de datos cromatográfico (SDC) se relaciona globalmente con el proceso analítico de toma de decisiones y documentación mediante una red local, mayor o menor, capaz de transferir los resultados de los equipos analíticos a un ordenador central que los da formato, memoriza y reenvía a las personas implicadas. Tal estructura constituye en suma un sistema LIMS (*Laboratory Information Management System*), conjunto de *hardware* y *software* que gestiona, almacena y da formato a la información analítica emitida por cada equipo del laboratorio. Muchos SDC se comunican con sistemas LIMS unidireccionalmente (del SDC al LIMS, de forma similar a comunicar el SDC con una hoja de cálculo) o bien en dos pasos, cargando la lista del LIMS en el SDC, donde se incorpora al fichero de inyecciones sucesivas en una secuencia tras los análisis. El ordenador central del LIMS sigue los pasos dados por cada muestra en el laboratorio (su trazabilidad), en datos de registro, recepción, preparación, análisis, validación y aprobación. Inicialmente *hardware* y *software* de los sistemas LIMS estaban pensados exclusivamente para los datos obtenidos en laboratorios. Sin embargo, dado que otros estamentos de la empresa también requieren medios parejos en sus actividades (por ejemplo, en fabricación), se utilizan cada vez más *LIMS integrales*, que aúnan toda la información de un producto a lo largo de su cadena de producción (proveedor, lote, precio, stock, fecha de fabricación, equipo de personas implicadas, canales de distribución, mayoristas, etc.), siendo su analítica solo una parte de la información. Los LIMS “de laboratorio” (o la sección correspondiente al laboratorio en un LIMS global de empresa) constan de *softwares* específicos, normalmente basados en *Windows*, que permiten monitorizar la información, series de muestras, equipos utilizados, sus IQ-OQ-PQ, resultados e historial de las muestras.

Los sistemas LIMS existen comercialmente desde 1984, con el objetivo inicial de optimizar procedimientos de gestión de las muestras en el laboratorio. Posteriormente fueron ampliando sus funciones, sobrepasando el ámbito del laboratorio. Tanto si los LIMS son centralizados como si son descentralizados, persiguen garantizar que los productos fabricados responden a sus especificaciones (por las cuales se adquieren) en programas de calidad, inspección, relaciones con los usuarios, auditorías de los suministradores, etc. y, sobre todo, la evaluación de control de calidad del proceso de fabricación, realizando muestreos en varios puntos de la cadena productiva y adjuntando sus características físicas, lote, serie, etc. Una vez que se decide que el producto es válido, el sistema LIMS genera *certificados de análisis* y *autoriza* pasar a la fase de embalaje y empaquetado.

En un simple esquema cronológico, común a todo laboratorio, las muestras se registran, reciben y almacenan, se preparan para ser analizadas, se analizan, se validan los resultados y, finalmente, éstos se aprueban. Esto obliga al sistema LIMS a poseer distintas “páginas” específicas de cada una esas tareas, más la doble capacidad de generar listados específicos y la búsqueda del historial de un determinado producto, para ver en qué fase se halla y una estimación temporal para pasar a la siguiente fase.

El precio de un sistema LIMS engloba cinco apartados: la *licencia*, el *hardware* necesario (ordenadores, impresoras, conexiones con los equipos instrumentales existentes en el laboratorio, etc.), el coste de la *instalación* (comprobación de las comunicaciones, diseño, planificación y ejecución de la validación), el *coste del soporte*, a medida de las necesidades específicas de cada laboratorio, incluyendo la formación y “reformas” periódicas del personal del laboratorio y, por último, las *actualizaciones de software* y el *coste del mantenimiento* y del servicio técnico. El precio de los servicios necesarios de un sistema LIMS ronda el 50% de su precio total. Y eso que la mayoría de los usuarios de sistemas LIMS nunca cargan en esos costes los recursos internos de la compañía compradora dedicados a mantener el sistema LIMS o el abastecimiento de datos. De ese 50% la mayor parte se destina a “implementar” el sistema, pensando en futuras demandas y necesidades, implementaciones compradas generalmente al mismo suministrador del sistema LIMS, aunque otras veces a empresas de mejora dedicadas a tal fin. Si bien la experiencia demuestra que dos tercios de los sistemas LIMS nunca reciben mejoras o implementaciones de *software*, la mayoría de futuras demandas suelen ser de *software*, estableciéndose, en una nomenclatura propia, la “*reconfiguración de software*” (automatizar algunas de sus funciones ya existentes) o “*rediseños de software*” (nuevas presentaciones y algoritmos en la gestión de las bases de datos, hojas de resultados, variaciones de los códigos de los productos, etc.).

Los sistemas LIMS, además de proporcionar toda la documentación necesaria para el laboratorio, deben hacerlo de un modo seguro: los laboratorios con “*cualificación global*” generan gran número de datos, procedentes de sus muchos equipos y frecuentemente muy distintos entre sí. Sería presuntuoso afirmar que el LIMS “puede” con todos ellos y deberíamos admitir que solo es capaz de gestionar parte de la información total del laboratorio. Habitualmente el sistema LIMS se vale de *softwares* complementarios (SDC de los equipos cromatográficos y otros *softwares*, como procesadores de texto, hojas de cálculo o bases de datos), que “filtran” o facilitan la información para su tratamiento por el sistema LIMS, lo cual exige necesariamente la *integración LIMS-SDC*.

La seguridad en los sistemas LIMS es *deseable*, muchos dirán que *imprescindible*; sin embargo, pocos sabrán y pondrán empeño en hacer que su sistema LIMS *posea seguridad*. El nivel de seguridad varía mucho entre diferentes compañías y laboratorios: en algunos prevalece la seguridad física (guardias de seguridad, alarmas en las puertas, duchas en los laboratorios), mientras que en otros

prevalece la seguridad de la información (archivos, acceso a los ordenadores, firma autorizada de los reportes). Por ejemplo, los bancos son un modelo arquetípico de seguridad, tanto física (guardias) como de la información (acceso a los ordenadores). Sin embargo, muchos laboratorios aún van a la zaga en esta forma de actuar, considerando a sus empleados más “técnicos” que “garantes” de la información interna. Generalmente los técnicos comprenden los peligros de la falta de seguridad, pero las decisiones que las competen son zanjadas por los gestores de la compañía. Internet es otro gran quebradero de cabeza en términos de seguridad, pues un experto pirata informático podría descargar información privilegiada en pocos minutos. También la detección de virus debería preocupar a usuarios y mantenedores del sistema LIMS, pues podrían colapsar el sistema y entremezclar datos y resultados creando problemas impredecibles.

El propio LIMS debería ser capaz de producir pruebas (*tests*) aleatorias para la verificación y cualificación del propio laboratorio, así como los sistemas LIMS suelen requerir nuevo personal para su uso y mantenimiento, junto a un responsable, denominado “*jefe de proyecto*”.

Tras ser obtenida, la información que se introduce en los sistemas LIMS debe ser inspeccionada y firmada por los correspondientes responsables. Las firmas de los documentos o reportes analíticos pueden ser de tres tipos: *in situ*, rubricadas por la misma persona que realizó el análisis, caso de los laboratorios pequeños, con pocos trabajadores; *sobre el mismo papel*, que firma un gestor, caso de laboratorios medios, donde los documentos generados por los equipos se apilan sobre éstos esperando su traslado a la mesa del responsable, quien los firma para ser llevados al archivo, su destino final, tránsitos de información entre departamentos susceptibles de seguridad; finalmente, *sobre un fax* o *sobre el correo electrónico* de otra persona distante, usual cuando la firma y aprobación de resultados se realiza en otro lugar diferente del laboratorio, incluso en otra ciudad o nación, caso de los laboratorios multinacionales. Respecto a las firmas electrónicas en los LIMS, muchos “técnicos” defendemos (puede que ilusamente) las ventajas de un mundo sin papeles. En 1997 la FDA (*Food and Drug Administration*) estableció en la directriz coloquialmente conocida como “*Parte 11*” (*Título 21 del Código de Regulaciones Federales, Parte 11*) las reglas respecto a los documentos en papel para que la información solo llegue a su legítimo destinatario, cómo operar con seguridad en un entorno sin papeles, evitar o minimizar las falsificaciones de datos y los criterios a seguir para considerar equivalentes los documentos electrónicos y sus firmas. Esto, por extensión, puede aplicarse a cualquier documento en formato electrónico: cómo fue creado, modificado, mantenido, archivado o transmitido. Aplicar esta norma requiere cambiar algunas cosas en los procedimientos internos de las compañías, así como en los ordenadores y sistemas electrónicos del laboratorio. Las firmas electrónicas han de contener al menos dos componentes para identificar a los firmantes: un nombre de usuario (*username*) y una palabra clave de acceso (*password*) para evitar que otros accedan a los datos y a la infor-

mación¹⁴⁸: el sistema preguntará ambas, pero luego, cada vez que solicite la firma electrónica en una misma sesión, el sistema solo preguntará la palabra clave. Tras introducir un cierto número de combinaciones erróneas de nombre y *password*, el sistema solicitará ser inicializado. Además, existen “*firmas consiguientes*” a la primera firma, en el proceso de ir incorporando toda actividad en el diario de incidencias (*login*).

Dichas normas son exigibles a los sistemas LIMS que operan en compañías farmacéuticas, que muchas veces disponen también de *dispositivos biométricos* capaces de reconocer automáticamente a los usuarios mediante varios procedimientos: verificación de la huella dactilar (lo más común) y otros que emulan métodos policíacos, como la geometría de la mano, verificación de la voz, confrontación de la firma, barrido retinal o del iris, reconocimiento facial..., para asegurar que solo los genuinos dueños y usuarios utilizarán los dispositivos y accederán a la información. La identificación (códigos y palabras clave) de los usuarios del sistema constituye la piedra angular de la seguridad en las transacciones, tanto en su uso como a la hora de imprimir listados, por lo que las aplicaciones LIMS deben poder detectar cualquier intento no autorizado y habilitar medios para su interrupción.

Las compañías multinacionales intercambian mucha información por Internet (en una filosofía opuesta a Intranet), “abriendo” sus secretos a la red, precisando “*encriptarlos*” para que solo puedan verlos legibles sus legítimos destinatarios. Existen varios modos de *encriptar* y *desencriptar* automáticamente mensajes y documentos, sometidos a la legislación de gobiernos y organismos competentes para enviar con confianza datos, reportes y mensajes por Internet: ya en 1999 la FDA compendió en “*Una Guía de Normas de Cumplimiento*” (*A Compliance Policy Guide*) qué cosas se necesitarían para el cumplimiento total de las firmas electrónicas (el referido “*Parte 11*”) y cómo deberían certificar las personas su firma electrónica antes de utilizar el sistema, normas que aceptaron inicialmente las compañías farmacéuticas norteamericanas y luego la práctica totalidad de los laboratorios farmacéuticos importantes, pues casi todos comercian en el entrono FDA. Actualmente están descritos y regulados los requerimientos para generar en los sistemas LIMS registros legibles “humanamente”, la protección de datos, su mantenimiento en el ordenador durante un tiempo dado y el acceso limitado a los usuarios autorizados.

Los reportes emitidos por los sistemas LIMS deben especificar el nombre del operador y del responsable que los autoriza o verifica, junto al día y hora de su creación y la potestad de crearlos, modificarlos o borrarlos, haciendo en principio sus dispositivos biométricos *imposible* transferir las firmas electrónicas a los documentos al identificar un solo individuo autorizado.

¹⁴⁸ FDA 21 CFR 211. *Current Good Manufacturing Practice Regulations*.

Posiblemente la adquisición de un sistema LIMS sea la decisión más importante (y quizá la compra cuantitativamente mayor) que el laboratorio haya acometido en su historia. Y más aún: cuando el sistema esté operativo alterará los protocolos de trabajo de *todos* los empleados, sea cual sea su rango y posición en la empresa, con el proverbial beneficio de evitar montañas de papeles y la seguridad en la autenticidad e imputabilidad de los datos. En la compra del primer LIMS, además de otros factores, se deben considerar los requerimientos iniciales y las expectativas futuras. La evaluación de los distintos proveedores se fija sobre todo en la “cercanía” de su filosofía a la del propio laboratorio. Algunos LIMS son diseñados para un tipo específico de laboratorio, careciendo de flexibilidad para poder trabajar con soltura en otro tipo de laboratorio. Aunque cada sistema LIMS posee en su *software* sus propias tareas y cálculos específicos, solo el 30% de los laboratorios precisan modificaciones reales; tras una primera evaluación, en el LIMS suelen surgir nuevas necesidades de *hardware* y *software* y, por tanto, mayor coste, cuya tercera parte corresponderá a implementaciones para cubrir necesidades futuras (y algunas presentes pasadas por alto). Los sistemas LIMS pueden dividirse en dos categorías: *sistemas turnkey*, de instalación sencilla por ser estándar, y cuya totalidad de funciones está ya predefinidas en su *software*, difícil de modificar o actualizar ante futuras demandas; el segundo tipo son los *sistemas programables*, la mayoría de cuyas funciones puede programar el usuario o el administrador del sistema del laboratorio, siendo su principal ventaja su flexibilidad, pero su principal desventaja el consumo de tiempo de los programadores. En ambos tipos las actualizaciones de *software* son *esenciales* para valorar la oferta del suministrador del LIMS.

Tras la adquisición se procede a la entrega, instalación y formación de los usuarios. Ciertamente es muy importante el soporte de la empresa suministradora, siendo crucial el primer año de uso: el laboratorio necesita una gran dedicación hasta que “se hace” con el sistema LIMS. Éstos son cada vez más complejos, exigiendo mayor esfuerzo del suministrador en la instalación, formación y servicio posterior. Algunas empresas soportan los sistemas LIMS que han vendido “a distancia”, por Internet o telefónicamente, abaratando los costes y aumentando la efectividad.

Tabla 66. Proceso de mejora de la base de datos de un sistema LIMS.

Formulación de los requerimientos y necesidades
Diseño conceptual
Diseño de las futuras mejoras
Diseño físico
Instalación

Un buen diseño de la base de datos, verdadero corazón del sistema LIMS y cuya capacidad de comunicación con otros *softwares* es esencial y aumentará extraordinariamente su eficiencia. Las bases de datos se actualizarán siguiendo un plan lógico. Conocer sus capacidades y limitaciones ayuda a diseñar su estructura, perfilarla (o mejorarla) en pasos (tabla 66), que, aunque análogos a cualquier base de datos, son especialmente importantes en los sistemas LIMS: la primera fase consiste en la formulación por parte de los usuarios de los requisitos del sistema (URS, *User Requirements System*), prestaciones y formatos de la información, fase crítica que suele definirse con cierta ligereza, pero si se hace sistemáticamente mejorará mucho el diseño de la base de datos. La segunda fase desarrolla los dos componentes principales de la base de datos, su estructura y funcionalidad, en una “*estructura lógica de la base de datos*” que suele definir la mayoría de sus tablas. Finalmente la tercera fase es de diseño físico, donde se decide la estructura física de la base de datos, se ajustan sus módulos informáticos y, por último, los procedimientos que permitirán mejoras futuras. En el desarrollo de cada fase los usuarios deben involucrarse al máximo para asegurar buenos resultados, confrontando el administrador de la base de datos los diseños con las eventuales necesidades de los distintos usuarios finales en numerosísimas conversaciones y reuniones, que luego habrá que estructurar e integrar. En laboratorios cuyo sistema LIMS se halla distante, en, por ejemplo, su sede central, el análisis de requerimientos (URS) se hará sobre la base de las prácticas habituales (qué datos se desea obtener de los análisis, cómo se coleccionan los datos, protocolos ya existentes en el centro, etc.), que deberán ser compendiados, revisados y actualizados¹⁴⁹, diferenciando los elementos creados y utilizados de los nuevos que se piense añadir al sistema. Esta metódica indicará la estructura natural de los datos y los procedimientos necesarios para manipularlos.

¹⁴⁹ Dong, M.W.: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Editorial Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2007.

APÉNDICES Y TABLAS

UNIDADES Y CONSTANTES

Julio (*J*)

$$1 \text{ J} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$$

$$1 \text{ J} = 1 \text{ N} \cdot \text{m}$$

$$1 \text{ J} = 1 \text{ C} \cdot \text{V}$$

Caloría (*cal*): 1 cal eleva la temperatura de 1 g de agua 1° C

$$1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$$

Número de Avogadro (N_A):

$$N_A = 6,0221 \cdot 10^{23} \text{ moléculas/mol}$$

Coulombio (*C*):

$$1 \text{ C} = 6,241 \cdot 10^{18} \text{ electrones (carga)}$$

Faraday (*F*):

$$1 \text{ F} = N_A \text{ electrones (carga)}$$

$$1 \text{ F} = 96.464 \text{ C/mol}$$

$$1 \text{ F} = 96.494 \text{ J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Constante de Boltzmann (k_B):

$$k_B = 1,3807 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$$

Constante de los gases (*R*):

$$R = N_A \cdot k_B$$

$$R = 8,3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$R = 1,9872 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$R = 0,08206 \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE VOLUMEN

	cm ³	litro	m ³	in ³	ft ³	yt ³	gal
cm ³	1	0,001	0,000001	0,06102	3,53·10 ⁻⁵	1,31·10 ⁻⁶	0,000264
ml	1	0,001	0,000001	0,06102	3,53·10 ⁻⁵	1,31·10 ⁻⁶	0,000264
litro	1000	1	0,001	61,02	0,0353	0,00131	0,264
m ³	0,000001	1·10 ⁻⁹	1·10 ⁻¹²	6,1·10 ⁻⁸	3,53·10 ⁻¹¹	1,31·10 ⁻¹²	2,64·10 ⁻¹⁰
in ³	16,39	0,01639	1,64·10 ⁻⁵	1,000118	0,000579	2,15·10 ⁻⁵	0,004327
ft ³	28300	28,3	0,0283	1726,866	0,99899	0,037073	7,4712
yt ³	765000	765	0,765	46680,3	27,0045	1,00215	201,96
gal	3785	3,785	0,003785	230,9607	0,133611	0,004958	0,99924

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE MASA

	g	kg	oz	lb
G	1	0,001	0,03527	0,002205
Kg	1.000	1	35,274	2,2046
Oz	28,3495	0,02835	1	0,0625
Lb	453,59	0,45359	16	1

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE LONGITUD

	A	cm	m	km	in	ft	milla
A	1	1·10 ⁸	1·10 ¹⁰	1·10 ¹³	2,54·10 ⁸	3,05·10 ⁹	1,61·10 ¹³
cm	1·10 ⁻⁸	1	100	100000	2,54	30,48	160900
m	1·10 ⁻¹⁰	0,01	1	1000	0,0254	0,3048	1609
km	1·10 ⁻¹³	0,00001	0,001	1	2,54·10 ⁻⁵	0,000305	1,609
in	3,94·10 ⁻⁹	0,393701	39,37008	39370,08	1	12	63346,46
ft	3,28·10 ⁻¹⁰	0,032808	3,28084	3280,84	0,083333	1	5278,871
milla	6,22·10 ⁻¹⁴	6,22·10 ⁻⁶	0,000622	0,621504	1,58·10 ⁻⁵	0,000189	1

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE ÁREA

	cm ²	m ²	km ²	in ²	ft ²	milla ²
cm ²	1	0,0001	1·10 ⁻¹⁰	0,154991	0,001076	3,86·10 ⁻¹¹
m ²	10000	1	0,000001	1549,91	10,76	3,86·10 ⁻⁷
km ²	1·10 ¹⁰	1000000	1	1,55·10 ⁹	10760000	0,386
in ²	6,451988	0,000645	6,45·10 ⁻¹⁰	1	0,006942	2,49·10 ⁻¹⁰
ft ²	929,368	0,092937	9,29·10 ⁻⁸	144,0437	1	3,59·10 ⁻⁸
milla ²	2,59·10 ¹⁰	2590674	2,590674	4,02·10 ⁹	27875648	1

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE VELOCIDAD

	cm/s	cm/min	cm/hora	in/s	ft/s	ft/min
cm/s	1	0,016667	0,000278	0,3937	0,03281	1,968
cm/min	60	1	0,016667	23,622	1,9686	118,08
cm/hora	3600	60	1	1417,32	118,116	7084,8
in/s	2,540005	0,042333	0,000706	1	0,083338	4,99873
ft/s	30,47851	0,507975	0,008466	11,99939	1	59,98171
ft/min	0,50813	0,008469	0,000141	0,200051	0,016672	1

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE FLUJO

	l/s	l/min	ml/s	ml/min	ml/h	gal/min	ft ³ /min
l/s	1	60	0,001	0,06	3,6	15,85	2,119
l/min	0,016667	1	1,67·10 ⁻⁵	0,001	0,06	0,264167	0,035317
ml/s	1.000	60.000	1	60	3.600	15.850	2.119
ml/min	16,66667	1.000	0,016667	1	60	264,1667	35,31667
ml/h	0,277778	16,66667	0,000278	0,016667	1	4,402778	0,588611
gal/min	0,063091	3,785489	6,31·10 ⁻⁵	0,003785	0,227129	1	0,133691
ft ³ /min	0,471921	28,31524	0,000472	0,028315	1,698915	7,479943	1

CONVERSIÓN DE UNIDADES DE PRESIÓN

	Pa	MPa	bar	atm	Torr	μmHg	psi
Pa	1	0,000001	$9,87 \cdot 10^{-6}$	0,009869	0,007502	7,501875	0,000145
MPa	1000000	1	9,869233	9869,233	7501,875	7501875	145,0326
bar	101325	0,101325	1	1000	760,1275	760127,5	14,69543
atm	101,325	0,000101	0,001	1	0,760128	760,1275	0,014695
Torr	133,3	0,000133	0,001316	1,315569	1	1000	0,019333
μmHg	0,1333	$1,33 \cdot 10^{-7}$	$1,32 \cdot 10^{-6}$	0,001316	0,001	1	$1,93 \cdot 10^{-5}$
psi	6895	0,006895	0,068048	68,04836	51,72543	51725,43	1

UNIDADES DE RADIATIVIDAD

símbolo	unidad	equivalencia	definición
rad	dosis rad. absorbida	0,87 rad = 1 r	energía ionizante equivalente a 100 ergios/g
r	Roentgen	1 r = 0,87 rad	rad. que produce $1,61 \times 10^{12}$ iones/g en aire
c	Curio	$1c = 10^3 mc = 10^6 \mu c$	g de núclido que desintegran $3,7 \times 10^{10}$ at/s
mc	milicurio	1 mc = 10^{-3} c	milésima parte de un curio
μc	microcurio	1 μc = 10^{-6} c	millonésima parte de un curio
dpm	desintegrac./min	1 mc = 2,2 106 dpm	núm. átomos desintegrados por minuto
cpm	cuentas/minuto	cpm = dpm-eficienc.	número de partículas β detectadas por minuto

CONVERSIÓN DE PULGADAS A UNIDADES MÉTRICAS

pulgadas	pulgadas	mm		mm	pulgadas
1/16	0,063	1,588		1	0,039
1/8	0,125	3,175		2	0,079
3/16	0,188	4,763		3	0,118
1/4	0,250	6,350		4	0,157
5/16	0,313	7,938		5	0,197
3/8	0,375	9,525		6	0,236
7/16	0,438	11,113		7	0,276
1/2	0,500	12,700		8	0,315
9/16	0,563	14,288		9	0,354
5/8	0,625	15,875		10	0,394
11/16	0,688	17,463		11	0,433
3/4	0,750	19,050		12	0,472
13/16	0,813	20,638		13	0,512
7/16	0,438	11,113		14	0,551
15/16	0,938	23,813		15	0,591
1	1,000	25,400		16	0,630
				17	0,669
				18	0,709
				19	0,748
				20	0,787

ÍNDICES

Índice conceptual

- 1,2,4-Trimetilbenceno, 187
- 1,4-Bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-
benceno, ver Dimetil POPOP
- 1,4-Bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno, ver
POPOP
- ¹²⁵I, 169, 180, 181
- ¹²C, 217, 263, 264, 269
- ¹³C, 217, 245, 263, 264, 267, 268, 269
- ¹⁴C, 169, 170, 176, 184, 186, 187, 217,
260
- 1-Hexanotiol, 99
- 2-(4-Terbutilfenil)-5-(4-bifenil)-1,3,4-
oxadiazol, ver butil-PBD
- 2,4-Dinitrofluorobenceno, ver DNFB
- 2,5-Bis-2-(terbutilbenzoxazolil)-tiofeno,
ver BBOT
- 2,5-Difenil-oxazol, ver PPO
- 2-Metoxietanol, 259
- 2-Propanol, ver IPA
- 2π, configuración, 169, 171, 185
- 3-Aminoftalato, ver 3-APA
- 3-Fenil-2-butanol, 136
- 3-Hidroxipropanal, 136
- 5-Dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo, ver
DNS
- 9-Fluorenilmetanol, ver FMOC
- Absorbancia, 92, 93, 94, 95, 96, 102,
105, 106, 111, 112, 113, 114, 122,
293, 309
- Acero inoxidable, 16, 18, 22, 23, 28, 32,
33, 143, 145, 153, 194
- Acero inoxidable variedad SS 303, 18
- Acero inoxidable variedad SS 316, 16,
18, 19, 20, 28, 32, 33, 69
- Ácido 2,2-dimetil-2-2-silapentano-5-
sulfónico, sal sódica, ver DSS
- Ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 241
- Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico,
241
- Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, ver
4HCCA
- Ácido desoxi-ribonucleico, ver DNA
- Ácido etildiamino-tetraacético, ver EDTA
- Ácido gentísico, ver Ácido 2,5-
dihidroxibenzoico
- Ácido sinapínico, ver Ácido 3,5-dimetoxi-
4-hidroxicinámico

- Actividad mínima detectable, ver AMD
- Adenosin trifosfato, ver ATP
- Adquisición de datos, 7, 8, 117, 205, 268, 305, 306, 309
- Aerosol, 233, 236, 243, 244, 276, 277
- Aerosol monodisperso, interfaz, ver MAGIC
- Agua, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 43, 44, 50, 52, 72, 73, 74, 76, 78, 99, 100, 124, 133, 138, 139, 145, 146, 147, 149, 166, 167, 188, 190, 198, 206, 207, 209, 211, 219, 234, 235, 241, 242, 257, 258, 259, 263, 266, 269, 271, 272, 274, 282, 283, 286, 293, 294, 321
- Agua deuterada, 269, 271
- Amino, fase, 78, 133
- Amperométrica pulsante, detección, ver PAD
- Análisis por inyección en flujo, ver FIA
- Analizador de masas, 226, 227, 245
- Analizadores de tiempo de vuelo por pulso retardado, ver DPE
- Anchura de pico, 51, 84, 90, 157, 313
- Ánodo, 147, 148, 163
- Auger, electrones, 180
- Becquerel y Becquerelio, 173
- Beer, ley, 92
- Benceno, 72, 100, 187
- Bernard, ley, 92
- Bioquímica, 69, 70, 168, 264
- Biot, ley, 135, 136, 139
- Boltzmann, constante, 321
- Boltzmann, ecuación, 265
- Bomba turbomolecular, ver TMP
- Bombardeo con átomos acelerados, ver FAB
- Bombas, 7, 11, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 54, 68, 84, 145, 161, 196, 225, 243, 244, 257, 260, 283, 297, 299, 305
- Bombas de flujo constante, 25, 26
- Bombas de jeringa, 25, 38, 39, 40, 243, 244
- Bombas de pistón, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 34, 37, 54, 68
- Bombas de presión constante, 25, 26
- Bombas de presión directa, 41
- Bombas rotatorias de paletas, 25
- Bourger, ley, 92
- Bromuro de etileno, 138
- Browner, interfaz, 243
- Brubaker, guía iónica 246
- Bunsen, monocromador, 104
- Butilo, fase, ver C4
- Cab-O-Sil, 189,
- Cámara de nebulización, 198, 274, 276

- Cannon, viscosímetro, 192
- Cannon-Fenske, viscosímetro, 192
- Capacidad, factor, 17, 51, 52, 53, 57, 68, 69, 72, 73, 74, 80, 84, 85, 88, 89
- Carbon Y, 28
- Carbosorb, 190
- Cátodo, 147, 148, 163
- Celdas de muestra, 104, 185
- Centelleador primario, 186, 188, 189
- Centelleador secundario, 186, 189
- Cerenkov, celdas, 169
- Ciano, fase, 78
- Cloroformo, 20, 72, 73, 79, 138, 235, 236
- Cloro-trifluoro-etileno, ver CTFE
- Compact disc, ver CD-ROM
- Compresibilidad del solvente 29, 30, 42, 211
- Compton, dispersión, 180
- Compton, espectro, 183
- Concentración detectable, 83, 88
- Conductimétricos, detectores, 82, 83, 143, 163, 164, 166, 168,
- Conductividad eléctrica, 143, 163, 164, 165, 166
- Conexiones eléctricas, 11, 315
- Conexiones fluidicas, 15, 16, 21, 37, 38, 54, 75, 145, 282, 283
- Constante de los gases, 281, 321
- Constante temporal, 83, 85, 86, 106, 112, 310
- Control de calidad, 3, 8, 70, 82, 135, 140, 214, 215, 284, 308, 314
- Corasil, 68
- Cornu, monocromador 104
- Cottrell, ecuación, 151, 156
- Coulomb, explosión, 232
- Coulomb, ley, 158
- Cromatografía de exclusión, ver GPC
- Cromatografía de fluidos supercríticos, ver SFC
- Cromatografía de gases, ver GC
- Cromatografía de gases - Cromatografía líquida acopladas a Espectrometría de masas, ver GC-LC-MS
- Cromatografía de gases - Espectrometría de masas, ver GC-MS
- Cromatografía líquida, ver LC
- Cromatografía líquida en columna, ver CLC
- Cromatografía líquida de baja presión, ver LPLC
- Cromatografía líquida de media presión, ver MPLC
- Cromatografía ultrarrápida "fast", 70, 86, 309
- Cromatógrafo de HPLC, 3, 5, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 23, 41, 46, 54, 57, 64, 65,

67, 70, 92, 130, 216, 220, 226, 228,
258, 286, 287, 295, 297, 298, 303,
305, 308

Cualificación de la eficiencia del método,
ver IQ-OQ-PQ

Cualificación de la instalación, ver IQ-
OQ-PQ

Cualificación operativa, ver IQ-OQ-PQ

Cuentas netas, ver NC

Cuentas por minuto, ver Cpm

Cuentas por minuto netas, ver Cpm
netas

Cuentas, número total (gross counts),
175

Curio (Curie), 174, 324

Czerny-Turner, monocromador, 104

Dalton, 217

Desgasificador, 49, 51, 292, 294, 295

Desgasificar, 23, 31, 37, 42, 49, 129,
146, 259, 292, 293, 294

Desintegraciones por minuto, ver Dpm

Desintegraciones por segundo, ver Dps

Desorción en plasma, ver PD

Desorción en un campo, ver FD

Desplazamiento químico, 267

Desplazamientos espectrales, 100

Detección amperométrica de pulso
reverso, ver RPAD

Detección amperométrica pulsante con
activación, ver APAD

Detector de barrido rápido, ver RSD

Detectores de HPLC, 7, 8, 9, 11, 12, 13,
15, 17, 31, 33, 34, 37, 40, 42, 45, 50,
53, 54, 58, 60, 68, 70, 74, 76, 77, 78,
81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,
91, 92, 94, 95, 98, 101, 103, 104, 105,
106, 107, 108, 109, 110, 111, 112,
113, 114, 115, 116, 117, 121, 124,
126, 127, 128, 129, 130, 131, 132,
133, 134, 136, 137, 138, 139, 140,
141, 142, 143, 144, 145, 147, 149,
150, 151, 152, 153, 154, 155, 156,
157, 158, 159, 160, 161, 162, 163,
164, 166, 167, 168, 169, 171, 172,
173, 174, 175, 178, 179, 182, 184,
185, 186, 190, 191, 193, 194, 195,
196, 197, 198, 199, 200, 201, 202,
203, 204, 208, 210, 214, 215, 218,
220, 221, 222, 223, 224, 225, 226,
227, 228, 232, 234, 236, 245, 247,
248, 250, 251, 252, 253, 255, 256,
257, 258, 260, 261, 268, 269, 270,
272, 273, 274, 275, 277, 282, 283,
284, 285, 296, 288, 289, 290, 291,
297, 298, 299, 302, 303, 305, 306,
307, 308, 309, 310, 311

Diámetro columnar, 10, 17, 53

- Diámetro interno, 17, 18, 19, 53, 57, 60, 61, 69, 70, 75, 76, 78, 191, 236, 283
- Difusión, 17, 48, 49, 50, 60, 64, 67, 69, 84, 122, 139, 149, 150, 155, 156, 157, 158, 196, 201, 257, 281, 283
- Dilatación, 43, 51, 96
- Dimetilformamida, ver DMF
- Dimetil-Sulfóxido, ver DMSO
- Dinitroclorobenceno, ver DNCB
- Diode array, detector, 8, 82, 83, 92, 103, 104, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 138, 139, 162, 213, 215, 221, 225, 227, 261, 269, 307, 309
- Diol, fase, 78
- Dioxano, 187
- Disociación inducida por colisiones, ver CID
- Dispersión Raman normal, ver NRS
- Dispersión Raman resonante, ver RRS
- Drug Discovery, 214, 280
- Durapak, 68
- Ebert, montaje, 104
- Eficiencia del contaje, ver CE
- Einzel, lente de, 246
- Electrodos, 143, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 163, 164, 165, 171, 231, 250, 251, 255, 276
- Electroforesis capilar, ver CE
- Electroforesis capilar-espectrometría de masas, ver CE-MS
- Electroquímica amperométrica pulsante integral, detección ver IPAD
- Electroquímicos, detectores, 22, 82, 83, 142, 143, 144, 147, 149, 150, 151, 154, 156, 157, 158, 161
- Electrospray, ver ESI
- Emisiones gamma, 168, 169, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190
- Emulsificantes, 188
- Equilibrado, 79, 129, 160
- Espectro FTIR, 272, 273
- Espectrofotómetros de longitud de onda variable, 103, 106, 113, 309
- Espectrometría de masas, ver MS
- Espectrometría de masas múltiple, ver MSⁿ
- Espectrómetro de masas, ver MS
- Espectrómetro de relación isotópica, ver IRMS
- Espectrómetro de sector eléctrico - cuadrupolo, ver EqQ
- Espectrómetro de sector eléctrico - magnético, ver EB
- Espectrómetro de sector magnético - tiempo de vuelo, ver BTOF

- Espectroscopía de resonancia magnética
nuclear por transformada de Fourier,
ver FT-RMN
- Esqueleto molecular, 264, 269
- Etanol, 35, 79, 100, 138, 139, 145, 188,
259, 293
- Etil-trifluoro-etileno, ver ETFE
- Etoxi-etanol, 188
- Evaporación iónica, 231
- Excitación, 96, 97, 117, 118, 119, 121,
123, 124, 125, 141, 170, 186, 206,
207, 209, 277
- Exclusión, 72
- Extracción de fluidos supercríticos, ver
SFE
- Extracción en fase sólida, ver SPE
- Extracción líquido-líquido, ver LLE
- Faraday, constante, 149, 157, 321
- Faraday, copa, 256
- Faraday, leyes, 149, 150, 157
- Fase reversa, 13, 23, 37, 44, 52, 69, 72,
75, 77, 80, 145, 224, 235, 242, 259,
260, 270, 281, 286
- Fick, ley, 149, 155, 156
- Filtros, 12, 22, 23, 24, 34, 37, 40, 51, 72,
73, 74, 75, 77, 80, 95, 104, 106, 107,
121, 122, 123, 124, 145, 158, 159,
160, 161, 245, 247, 260, 261, 273
- Firma electrónica, 304, 317
- Fluorescencia, 96, 117, 118, 119, 120,
121, 122, 123, 124, 125, 126, 133,
141, 206, 207, 286
- Fluorescencia con excitación de un solo
fotón, ver OPEF
- Fluorescencia excitada de doble fotón,
ver TPEF
- Fluorescencia inducida por láser, ver LIF
- Fluorescencia inducida por láser,
detector, ver LIFD
- Fluorimétricos, detectores, 82, 83, 117,
124, 126, 206, 207, 286
- Fluorocarbono, ver PVDF
- Fluoroetilén-propileno, ver FEP
- Fluorogénico, reactivo, 125, 126, 286
- Fortron, 21
- Fosfato, 34, 35, 36, 146, 190, 235, 236,
259, 260, 262, 269
- Fotoacústica láser, detección, ver LIPA
- Fotogénico, reactivo, 101, 287
- Fotoionización a presión atmosférica, ver
APPI
- Fotómetros de longitud de onda fija,
detectores, 103, 106
- Fourier, ver FT
- Fresnel, refractómetros, 130
- Fugas, 15, 16, 20, 21, 22, 26, 32, 36, 37,
38, 41, 42, 43, 55, 65, 117, 125, 129,
257, 269, 282, 283, 284

- Gaede, bomba, 257
- Generador de nitrógeno, 261
- Germanio, 271
- Gibbs, energía libre, 281
- Gradiente de concentración, 149, 155
- Gradiente de difusión, 155
- Gradientes de elución, 7, 8, 11, 23, 25, 32, 36, 37, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 76, 78, 107, 110, 113, 129, 140, 143, 149, 162, 167, 174, 184, 197, 198, 199, 270, 271, 274, 279, 282, 285, 286, 288, 290, 292, 297, 299, 305
- Gradiente de campo eléctrico, 245, 247
- Gradiente de elución en baja presión, ver LPGE
- Gradiente de potencial, 232
- Gradiente con poder de elución lineal, ver LSS
- Grafito, fibra rellena, ver GFP
- Hardware, 297, 300, 301, 302, 303, 305, 309, 314, 315, 318
- Hastelloy, 18, 19, 69
- Helmoltz, plano, 150
- Hibridar, hibridación, 8, 214, 270, 274, 275, 279
- Higgins, gráfica de, 193
- High performance liquid chromatography, ver HPLC
- High throughput analysis, ver HTA
- Horno, 7, 11, 12, 80, 128, 152, 162, 168, 277, 279, 281, 282, 283, 286, 287
- Identificación positiva, 140, 213, 230, 271
- Inconel 600, 18, 19
- Infrarrojo cercano, ver NIR
- Infrarrojo por transformada de Fourier, ver FTIR
- Infrarrojo, ver IR
- Insta-Gel, 188
- Integración, 84, 85, 86, 87, 88, 106, 110, 173, 297, 300, 303, 304, 306, 307, 310, 311, 312, 315
- Integradores, 106, 184, 298, 299, 300, 306, 308, 309
- Integrar, 112, 115, 299, 300, 303, 305, 306, 307, 312, 319
- Intercambio dinámico de datos, ver DDE
- Interfaces analógicas – digitales, ver A/D
- Interferómetro, 142, 272, 273
- Investigación y desarrollo, ver I+D
- Inyección líquida directa, ver DLI
- Inyectores automáticos, 8, 11, 13, 60, 62, 63, 64, 65, 283, 286, 297, 299
- Inyectores de válvulas, 57, 59, 60, 61
- Iones, 33, 143, 147, 160, 163, 164, 166, 208, 215, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236,

- 237, 238, 239, 240, 241, 242, 244,
245, 246, 247, 248, 249, 250, 251,
253, 254, 255, 256, 257, 259, 260,
262, 269, 275, 276, 277, 278, 324
- Ionización, 8, 170, 191, 215, 220, 221,
223, 224, 226, 227, 228, 229, 230,
231, 233, 235, 236, 237, 238, 239,
240, 241, 242, 243, 244, 245, 246,
248, 251, 253, 255, 259, 260, 262,
277, 278, 280
- Ionización a presión atmosférica, ver API
- Ionización por campo, ver FI
- Ionización por desorción láser sobre una
matriz, ver MALDI
- Ionización por impacto de electrones, ver
EI
- Ionización química, ver CI
- Ionización química a presión atmosférica,
ver APCI
- Isograma, 111, 112, 115, 117
- Isopropanol, 33, 78
- Jabloński, diagrama, 118
- Kavanagh, ecuación, 120, 121
- Kel-F, ver CTFE
- Kohlrausch, leyes, 166
- Kuhn–Mark–Houwink–Sakurada, ley, 193
- Kynar, ver PVDF
- Lambert, ley 92
- Lambert-Beer, ley, 84, 92, 93, 94, 95, 96,
120, 121, 135
- Lentes electrostáticas, 220, 227, 277
- LeSec, efecto, 196
- Light scattering, 83, 96, 142, 196, 197,
198, 199, 200, 201, 203, 204, 205,
206
- Límite inferior de detección, ver LID
- Límite superior de detección, ver LSD
- Linealidad, 81, 82, 83, 91, 92, 94, 95, 96,
123, 132, 133, 139, 247
- Littrow, monocromador, 104
- Longitud de onda, 81, 93, 94, 95, 97, 98,
99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 107,
108, 109, 110, 111, 113, 114, 115,
117, 118, 119, 121, 122, 123, 124,
125, 128, 132, 134, 135, 136, 139,
142, 144, 162, 186, 200, 201, 210,
221, 272, 273, 293, 297, 299, 309,
310
- Mantenimiento, 7, 26, 31, 34, 35, 50, 51,
70, 77, 125, 131, 149, 161, 201, 215,
227, 246, 260, 270, 315, 316, 317
- Marcadores fluorescentes, 125, 126
- Mark–Houwink, ecuación, 193, 196, 203
- Mark–Houwink–Sakurada, ecuación, 193
- Memoria ROM, ver ROM
- Mercurio, 106, 136, 143, 147, 148
- Metanol deuterado, 269, 271

- Metanol, 31, 35, 36, 37, 38, 40, 43, 44, 55, 72, 73, 76, 80, 99, 138, 139, 145, 146, 188, 190, 211, 219, 234, 235, 242, 259, 260, 269, 271, 274, 275
- Método, 7, 9, 13, 54, 69, 76, 95, 145, 191, 202, 210, 213, 225, 226, 231, 233, 236, 250, 258, 261, 270, 285, 286, 294, 297, 299, 303, 304, 307, 308, 311, 312, 313, 317
- Micropak, 68
- Plasma por acoplamiento de microondas, ver MCP
- Mínima cantidad detectable, ver MCD
- Monel 400, 19
- Multicromatograma, 221
- Multilongitud de onda, detector, ver MWD
- m-xileno, 187
- Mylar, poliéster de tereftalato de polietileno, 153, 271
- Narrowbore, 10, 30, 60, 70, 86, 117
- Nerst, ecuación, 147, 160
- Neurología, 163
- n-heptano, 139
- n-hexano, 72
- Níquel, 19
- Níquel 200, 18
- Níquel electroformado, ver EFNI
- Nitronic 50, 18, 19
- Número máximo de picos, 83, 84
- Nyquist, índice, 114
- Obturación, 18, 22, 23, 32, 43, 51, 77, 80, 129, 161, 167, 186, 275
- Octadecil silano, ver ODS
- Octadecilo fase, ver C18
- Octilo fase, ver C8
- Off-line, 8, 81, 92, 242, 268
- Ohm, ley, 164
- On-line, 8, 49, 77, 81, 92, 213, 227, 268, 271, 294
- Espectroscopía de emisión óptica, ver OES
- Opti-fluor, 187
- Optimización, optimizar, 11, 52, 75, 76, 125, 141, 144, 154, 157, 175, 208, 218, 224, 229, 251, 255, 269, 298, 312, 314
- Orbitrap, espectrómetro de masas, 251
- Ortoftalaldehído, ver OPA
- Ostwald, viscosímetro, 192
- o-xileno, 187
- Parámetro límite de dosis de radiactividad, ver REM
- Parte 11, 316, 317
- Particle beam, interfaz, 214, 229, 243
- Pasivación, pasivar, 33, 34, 143, 145
- p-bis-(o-metilestiril) benceno, ver MSB
- Pellosil, fase, 68
- Peltier, efecto, 282, 283

- Perfluoroalcoxi, ver PFA, 128, 168, 204, 205, 210, 217, 218,
- Peristálticas, bombas, 25 246, 251, 253, 274, 282, 198, 306
- Permphase, fase, 68
- Precolumnas, 11, 13, 21, 67, 71, 74, 75, 77, 144, 291
- Peso molecular, 21, 52, 101, 127, 138, 186, 192, 193, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 203, 205, 209, 211, 212, 230, 231, 234, 235, 238, 239, 241, 242, 244, 252, 262, 281, 282
- Pico-Fluor, 188
- pKa, 102, 146
- Planck, constante, 264
- Plasma, 144, 160, 236, 241, 245, 262, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280
- Plasma de acoplamiento inductivo, ver ICP
- Plasma de corriente continua, ver DCP
- Poliaril-étercetona, ver PAEK
- Poliéster de tereftalato de polietileno, ver Mylar
- Poliéter-cetona, ver PEK
- Poliéter-cetona-cetona, ver PEKK
- Poliéter-cetona-éter-cetona-cetona, ver PEKEKK
- Poliéter-étercetona, ver PEEK
- Polietilenglicol, ver PEG
- Polietileno, ver PE
- Politetrafluoroetileno, ver PTFE
- Precisión, 7, 27, 29, 30, 32, 38, 39, 48, 49, 50, 51, 59, 60, 62, 64, 81, 89, 105, 128, 168, 204, 205, 210, 217, 218, 246, 251, 253, 274, 282, 198, 306
- Precolumnas, 11, 13, 21, 67, 71, 74, 75, 77, 144, 291
- Propanol, 138, 145
- Pseudocumeno, ver 1,2,4-trimetilbenceno
- Puente de Wheatstone, 164, 195
- Purificación, 7, 33, 69
- p-xileno, 187
- Quenching, 121, 122, 175, 180, 181, 182, 187, 188, 189, 190, 208
- Quimioluminiscencia, 83, 182, 184, 187, 206, 207, 208, 209
- Quimioluminiscencia, detectores, 206
- Quimioluminiscente, reactivo, 207
- Rad, unidad, 175, 176, 324
- Radiofrecuencias, 246, 248, 251, 255, 262, 263, 265, 268, 270, 276, 277
- Radiométricos, detectores, 60, 82, 83, 168, 169, 171, 172, 173, 179, 182, 184, 185, 190, 191
- Raman, dispersión, 142
- Raman, emisión, 142
- Raman, espectroscopía, 213
- Raman, pico, 124
- Raman, resonancia, 142
- Ramificación, índice de Zimm-Stockmayer, 196, 203, 205

- Rango lineal dinámico, ver RLD
- Raoult, ley, 294
- Rayleigh, dispersión, 142
- Rayleigh, ecuación, 199, 294, 200, 201
- Rayleigh, explosión, 232
- Rayleigh, factor, 201
- Rayleigh, límite de estabilidad, 233
- Rayleigh, relación, 199, 200
- Reactivos, 7, 22, 69, 101, 125, 126, 128, 145, 146, 149, 189, 206, 207, 208, 209, 236, 238, 270, 286, 287
- Refractométricos, detectores, 68, 76, 81, 82, 83, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 140, 141, 196, 201, 202, 205, 206
- Refractométricos diferenciales, detectores, 130, 131
- Refractométricos interferométricos, detectores, 132
- Refractométricos láser, detectores, 133, 141,
- Refractométricos por deflexión, detectores, 130, 131, 132, 133
- Refractométricos por reflexión, detectores, 130, 131, 133
- Refragmentación, refragmentar, 223, 250, 251, 257, 258
- Regeneración de celdas, 186
- Regeneración de columnas, 71, 72, 73, 74, 80
- Regeneración de electrodos, 154
- Reportes, 115, 297, 300, 304, 308, 312, 313, 316, 317
- Representación tridimensional, ver 3-D
- Reservorios, 12, 23, 24, 27, 32, 34, 41, 42, 43, 46, 49, 62, 79, 195, 284, 288
- Resolución, 5, 7, 9, 11, 13, 43, 46, 51, 53, 54, 71, 75, 80, 84, 86, 108, 112, 114, 115, 116, 117, 123, 141, 172, 173, 185, 190, 202, 203, 209, 211, 217, 218, 219, 220, 224, 235, 245, 246, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 259, 260, 262, 263, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 275, 280, 281, 302, 306, 309, 313
- Resonancia de ion ciclotrón, ver ICR
- Resonancia magnética nuclear, ver RMN
- Retardo, 171, 254, 255, 284, 285
- Retardo del gradiente, 46, 48, 49, 50
- Roentgen, unidades, 176, 324
- Rotación óptica, 134, 135, 136, 137, 138, 139
- Rotación específica, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140
- Rotación molar, 138
- Rotación, velocidad de 257
- Rowland, círculo, 104
- Ruido de bomba, 29, 30, 33, 35
- Ruido de cruce, 184

- Ruido de flujo, 41, 42
- Ruido de fondo, 152, 160, 181, 183, 184, 185, 206, 223
- Ruido debido a centrado, 223,
- Ruido del detector, 8, 82, 92, 141, 160, 168, 171, 201, 257
- Ruido electrónico, 218
- Ruido en la línea de base, "rizado", 29, 30, 33, 37, 48, 86, 90, 143, 145, 146, 183, 194, 222, 223, 293, 309, 310, 311, 313
- Ruido espectral, 116,
- Ruido fotométrico, 92, 105, 106, 107, 113
- Ruido inespecífico, 274
- Ruido, pulsos de, 171
- Ruido, test de, 313
- Rulon A, 28
- Rulon J, 28
- Rutina, aplicaciones, 12, 13, 149, 215, 258, 262, 263, 297, 308, 313
- Ryton, 21
- Scan, modo, 221, 222, 223, 224, 254
- Schott, viscosímetro, 192
- Selected ion monitoring, ver SIM
- Selectividad, 5, 6, 8, 53, 82, 83, 117, 119, 124, 137, 141, 142, 143, 144, 146, 151, 159, 161, 206, 213, 216, 221, 246, 257
- Semiconductor, 256
- Sensibilidad óptima, 224, 270
- Sensibilidad, 5, 6, 8, 12, 13, 23, 27, 54, 70, 81, 82, 83, 84, 89, 90, 91, 92, 103, 106, 107, 108, 113, 115, 117, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 131, 133, 136, 137, 138, 139, 141, 142, 143, 144, 145, 151, 152, 153, 157, 159, 160, 164, 168, 172, 173, 177, 185, 191, 194, 201, 203, 204, 206, 208, 209, 213, 214, 218, 219, 224, 230, 231, 235, 236, 238, 243, 244, 246, 251, 254, 257, 258, 259, 260, 262, 265, 268, 269, 270, 271, 273, 279, 281, 287, 310
- Sensor de presión, 30, 34, 42
- Señal instrumental, 87, 89, 139
- Señal-ruido, 82, 90, 124, 141, 196, 207, 218, 222, 223, 262, 306
- Sílice, 18, 19, 20, 21, 22, 68, 69, 72, 74, 77, 78, 79, 227, 244
- Sílice fundida, 18, 19, 20, 21, 22, 244
- Sistema de datos cromatográficos, ver SDC
- Sistema operativo, 300, 304
- Sistemas de gestión de la información del laboratorio, ver LIMS
- Skimmer, 230, 232, 233, 239, 257
- Software, 13, 32, 35, 42, 43, 48, 51, 52, 86, 90, 107, 109, 113, 115, 117, 124,

- 142, 162, 184, 205, 213, 216, 218,
221, 225, 226, 227, 235, 295, 297,
298, 300, 301, 302, 303, 304, 305,
306, 307, 309, 310, 311, 312, 314,
315, 318, 319
- Solvente primario, 186, 187, 191,
- Sulfuros de polifenilo, ver PPS
- T de mezcla, 47, 55, 169, 185, 207, 260
- Tampones, 34, 36, 37, 79, 146, 167, 190,
222, 235, 236, 242, 243, 259, 261,
262, 270, 271
- Taylor, cono, 231
- Taylor, desarrollo, 120
- Teflón, 19, 20, 21, 24, 34, 37, 55, 183,
260
- Tefzel y Tefzel T, 22
- Temperatura, 7, 18, 19, 20, 21, 22, 26,
28, 35, 40, 43, 51, 65, 80, 82, 90, 95,
96, 121, 123, 128, 129, 130, 132, 133,
136, 137, 143, 149, 152, 166, 168,
171, 182, 186, 187, 192, 194, 196,
197, 198, 199, 209, 231, 238, 240,
243, 257, 259, 260, 271, 273, 275, 276,
277, 278, 279, 281, 282, 283, 286,
287, 289, 321
- Tetrahidrofurano, ver THF
- Thermospray, interfaz, 214, 225, 229,
243
- Tiempo de retención, 7, 31, 41, 42, 43,
51, 79, 84, 86, 87, 88, 89, 114, 115,
162, 172, 222, 261, 268, 269, 275,
292, 299, 307, 308, 313
- Tiempo de vuelo, ver TOF
- Titanio, 18, 19, 20, 22, 33, 34, 69, 71
- Tolueno, 72, 138, 186, 187, 188, 189,
190, 260
- Total Ion Chromatogram, ver TIC
- Trampa iónica, ver IT
- Transformada de Fourier, ver FT
- Transiciones electrónicas, 97, 98,
- Transmitancia, 94, 271
- Triacotano, fase, ver C30
- Trifluoroacético, ácido, ver TFA
- Triple cuadrupolo, ver QQQ y QqQ
- Triple detección en GPC, 205
- Triton X-100, 188
- Turner–Kruger, guía electrostática, 246
- Ultra Performance Liquid
Chromatography, ver UPLC
- Ultrasonidos, 22, 210, 277
- Ultrasonidos, baño, 35, 294
- Ultrasonidos, detectores, 209
- Ultrasonidos pulsantes, 210
- Ultravioleta-visible: ver UV-VIS
- Unyx, 304

- Vacío, 27, 32, 98, 127, 128, 227, 230, 232, 241, 243, 244, 246, 248, 250, 255, 257, 260, 272, 287, 294
- Válvula de catorce vías, 291, 292
- Válvula de diez vías, 291
- Válvula de doce vías, 292
- Válvula de cuatro vías, 49, 289, 290
- Válvula de inyección, 59, 290
- Válvula de ocho vías, 290, 291
- Válvula de seis vías, 59, 62, 63, 290
- Válvula de tres vías, 62, 288, 289
- Válvulas selectoras, 282, 289
- Velocidad de barrido, 108, 223, 248, 251, 254
- Viscosimétricos, detectores, 82, 83, 191, 193, 194, 195, 196, 203, 204, 205, 206
- Volumen de celda, 83, 84, 157, 172, 185, 204, 211, 212
- Volumen de inyección, 54, 57, 60, 62, 199, 206, 211, 212, 275, 297, 299
- Windows, 115, 303, 304, 314
- Xenón, 104, 107, 110, 124, 125, 136, 244, 252, 276
- Xenón, cañón, 244
- Xileno, 187, 188
- Zimm-Stockmayer, índice, 203
- Zipax, 68
- Zorbax, 68, 199

Índice de acrónimos

- 3-APA, 3-aminoftalato, 207
- 3-D, representación tridimensional, 111
- 4HCCA, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, 241
- A/D, conversor analógico-digital, 300, 302, 303, 306, 309, 310, 311, 312
- AMD, actividad mínima detectable, 175
- APAD, Activation Pulse Amperometric Detection, 154
- APCI, Atmospheric Pressure Chemical ionization, 229, 236, 237, 238, 239, 240, 260, 262
- API, Atmospheric Pressure Ionization, 229, 230, 248
- APPI, Atmospheric Pressure Photoionization, 229, 240
- ASTM, American Society for Testing and Materials, 91, 106
- ATP, adenosin-trifosfato, 209
- BBOT, 2,5-bis-2-(terbutilbenzoxazolil)-tiofeno, 188, 189
- BTOF, espectrómetro de sector magnético - tiempo de vuelo, 258
- Butil-PBD, 2-(4-terbutilfenil)-5-(4-bifenil)-1,3,4-oxadiazol, 188, 189
- C18, fase estacionaria octadecilo, 6, 43, 75, 76, 77, 78, 145
- C30, fase estacionaria terpénica, 71
- C4, fase estacionaria butilo, 75
- C8, fase estacionaria octilo, 75, 78, 275
- CAM, Centrifugal Advance Mechanism, 26
- CD-ROM, Compact Disc Read-Only Memory, 303
- CE, Capillary Electrophoresis, 213, 270
- CE-MS, Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry, 213
- CE, Counting Efficiency, 174
- CI, Chemical Ionization, 229
- CID, Collision Induced Dissociation, 221, 223, 224, 257, 258
- CLC, Column Liquid Chromatography, 25
- CLD, Chemiluminescence Detection, 206
- CTFE (cloro-trifluoro-etileno), 22
- Cpm, cuentas por minuto, 174, 175, 176, 324
- Cpm netas, cuentas por minuto netas, 175
- DCP, Direct Current Plasma, 276
- DDE, Dynamic Data Exchange, 303
- Dimetil-POPOP, 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno, 189
- DLI, Direct Liquid Injection, 243
- DMF, dimetilformamida, 212, 242

- DMSO, dimetil-sulfóxido, 64, 242
- DNA, deoxyribonucleic Acid, 279
- DNCB, dinitroclorobenceno, 288
- DNFB, 2,4-dinitrofluorobenceno, 288
- DNS, 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo, 288
- DPE, Delayed Pulse Extraction, 254
- Dpm, desintegraciones por minuto, 174, 175, 176, 184, 324
- Dps, desintegraciones por segundo, 174
- DSS, ácido 2,2-dimetil-2,2-silapentano-5-sulfónico, 266
- EB, espectrómetro de sector eléctrico - magnético, 258
- EDTA, ácido etildiamino-tetraacético, 33
- EFNI, Electroformed Nickel, 18, 19
- EI, Electron Ionization, 229, 230, 244
- EqQ, espectrómetro de sector eléctrico - cuadrupolo, 258
- ESI, interfaz de electrospray, 229, 231, 233, 234, 235, 236, 239, 246, 260, 262
- ETFE, etil-trifluoro-etileno, 22
- FAB, Fast Atom Bombardment, 229, 244, 245, 260
- FD, Field Desorption, 229, 245
- FDA, Food and Drug Administration, 316, 317
- FEP, fluoroetilén-propileno, 18, 20, 21, 22, 274
- FI, Field Ionization, 229, 245
- FIA, Flow Injection Analysis, 139
- FMOOC, 9-fluorenilmetanol, 288
- FT, Fourier Transform, 263, 268
- FTIR, Fourier-Transform Infrared, 8, 82, 213, 263, 270, 271, 272, 273
- FT-RMN, Fourier-Transform - Nuclear Magnetic Resonance, 263, 268
- GC, Gas Chromatography, 213, 214, 225, 227, 230, 243, 244, 250
- GC, Gross Counts, 175
- GC-LC, Gas Chromatography - Liquid Chromatography, 213, 214
- GC-LC-MS, Gas Chromatography - Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, 214
- GC-LC-RMN, Gas Chromatography - Liquid Chromatography - Resonancia Magnética Nuclear, 214
- GC-MS, Gas Chromatography - Mass Spectrometry, 213, 225, 227, 230, 243, 244, 250
- GFP, teflón, 35
- GPC, Gel Permeation Chromatography, 7, 19, 142, 192, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 203, 205, 212, 230, 260, 271, 281

- HPLC, High Performance Liquid Chromatography, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 49, 59, 60, 62, 67, 68, 70, 71, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 85, 86, 89, 92, 95, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 109, 113, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 129, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145, 146, 147, 163, 164, 167, 168, 169, 174, 185, 191, 192, 194, 198, 200, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 213, 214, 215, 216, 225, 226, 227, 228, 231, 236, 242, 247, 252, 262, 269, 270, 271, 274, 275, 277, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 289, 292, 294, 297, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 309, 311
- HPLC - FTIR, 270
- HPLC - ICP, 274
- HPLC - RMN, 262
- HPLC 2-D, 70
- HPLC capilar, 10, 18, 21, 38, 191, 309
- HPLC nano, 8, 10, 214, 274
- HPLC quirral, 134
- HPLC-RMN-MS, 269
- HPLC-UV-RMN-IR-MS, 270
- HTA, High Throughput Análisis, 7
- I+D, Investigación y Desarrollo, 140, 214
- ICH, International Conference of Harmonization, 9
- ICP, Inductively Coupled Plasma, 82, 213, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280
- ICR, Ion Ciclotron Resonance (Resonancia de Ion Ciclotrón), 255
- IEEE, interfaz, 302
- IPA, 2-propanol, 259
- IPAD, Integrated Pulse Amperometric Detection, 154
- IQ-OQ-PQ, Installation Qualification, Operation Qualification, Performance Qualification, 314
- IR, infrarrojo, 94, 270, 271, 272
- IRMS, Isotopic Ratio Mass Spectrometer, 256
- IT, Ion Trap, 246, 250
- LALLS, Low Angle Laser Light Scattering System, 142, 200, 201, 202, 203, 204
- LC, Liquid Chromatography, 5, 6, 7, 8, 38, 82, 191, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 235, 236, 243, 246, 249, 250, 257, 259, 260, 261, 262, 268, 269, 270, 271, 274, 275, 276, 279, 280
- LC-FTIR, 8, 82, 213, 270, 271

- LC-ICP y LC-ICP-MS, 82, 274, 275, 276, 279, 280
- LC-MS, 6, 7, 8, 38, 82, 191, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 235, 236, 243, 246, 249, 250, 257, 259, 260, 261, 262, 269
- LC-RMN, 8, 82, 213, 214, 268, 269, 270
- LID, límite inferior de detección, 91
- LIF, Laser Induced Fluorescence, 141
- LIFD, Laser Induced Fluorescence Detector, 141
- LIMS, Laboratory Information Management System, 13, 297, 300, 304, 314, 315, 316, 317, 318, 319
- LIPA, Laser Induced Photoacoustic, 141
- LLE, Liquid-Liquid Extraction, 76
- LPGE, Low Pressure Gradient Elution, 49
- LPLC, Low Pressure Liquid Chromatography, 25, 40, 41, 68, 106, 198, 286
- LSD, límite superior de detección, 91
- LSS, Linear Solvent Strength Gradient, 51
- MAGIC, Monodisperse Aerosol Generating Interface for Chromatography, 243
- MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, 213, 229, 241, 242, 253, 254, 260, 262
- MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight, 241, 242, 253, 254, 262
- MALLS, Multiple Angle Laser Light Scattering System, 142, 200, 203, 204
- MCD, mínima cantidad detectable, 83
- MCP, Microwave Coupled Plasma, 276
- MPLC, Medium Pressure Liquid Chromatography, 25, 40, 41, 106, 286
- MS, Mass Spectrometry, 6, 7, 8, 38, 82, 191, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 235, 236, 243, 244, 246, 249, 250, 251, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 269, 270, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280
- MSB, p-bis-(o-metilestiril) benceno, 189
- MSⁿ, espectrometría de masas múltiple, 251, 254
- MWD, Multiple Wavelength Detector, 108
- NC, Net Counts, 175, 176
- NIR, Near Infrared, 94, 213, 273
- NRS, Normal Raman Scattering, 142
- ODS, fase octadecil silano, 78, 199, 211

- OES, Optical Emission Spectroscopy, 274, 277
- OLE, Object Linking and Embedding, 115, 303
- OPA, ortoftalaldehido, 144, 288
- OPEF, One Photon Excited Fluorescence, 141
- PAD, Pulse Amperometric Detection, 154
- PAEK, poliáril-étercetona, 21
- PD, Plasma Desorption, 245
- PE, polietileno, 35, 36
- PEEK, poliéter-étercetona, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 32, 33, 34, 69, 227, 260, 274
- PEG, polietilenglicol, 219
- PEK, poliéter-cetona, 21
- PEKEKK, poliéter-cetona-éter-cetona-cetona, 21
- PEKK, poliéter-cetona-cetona, 21
- PFA, perfluoroalcoxi, 22, 274
- POPOP, 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno, 189
- PPINICI, Pulsed Positive-Ion Negative-Ion Chemical Ionization, 224, 256
- PPO, 2,5-difenil-oxazol, 188, 189
- PPS, sulfuros de polifenilo, 18, 20, 21
- PTFE, politetrafluoroetileno, 18, 20, 21, 28, 69, 208, 279
- PVDF, fluorocarbono, 22
- QQQ o QqQ, espectrómetros de triple cuadrupolo, 246, 358
- QTOF, Quadrupole Time of Flight Spectrometer, 258
- RALLS, Right Angle Laser Light Scattering System, 142, 200, 204
- REM, Roentgen Equivalent, 176
- RLD, rango lineal dinámico, 92
- RMN, resonancia magnética nuclear, 8, 82, 213, 214, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270
- ROM, Read Only Memory, 299, 303
- RPAD, Reverse Pulse Amperometric Detection, 154
- RRS, Resonance Raman Scattering, 142
- RS 232, Recommended Standard, 302
- RSD, Rapid Scanning Detector, 103, 108, 109
- SALLS, Small Angle Laser Light Scattering System, 200, 201, 204
- SDC, sistema de datos cromatográficos, 297, 298, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315
- SFC, Supercritical Fluid Chromatography, 198, 270
- SFE, Supercritical Fluid Extraction, 77
- SI, señal instrumental, 87, 89

- SIM, Selected Ion Monitoring, 221, 222, 223, 224, 231, 250
- SPE, Solid Extraction Phase, 69, 76, 213, 270
- TFA, ácido trifluoroacético, 36, 241, 259, 270
- THF, tetrahidrofurano, 212, 235, 242
- TIC, Total Ion Chromatogram, 221
- TMP, Turbomolecular Pump, 257
- TOF, TOFMS, Time of Flight Mass Spectrometer, 241, 242, 246, 251, 252, 253, 254, 258, 262, 277
- TPEF, Two Photon Excited Fluorescence, 141
- TRIS, tris(hidroximetil) aminometano, 236
- TRISMA, acetato, 74
- TSP, interfaz de thermospray, 229
- UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography, 6, 7, 8, 70, 78, 86, 191, 236, 274, 289, 309
- UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography, 7, 70
- URS, User Requeriments System, 319
- UV-VIS, ultravioleta-visible, 82, 83, 84, 90, 92, 94, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 114, 117, 120, 123, 124, 139, 141, 144, 205, 211, 227, 259, 261, 269, 287

Índice onomástico

- Abrahams, Louis (1918-1988), 25
- Accardo, Carl Anthony (1928-2014), 171
- Armitage, Mary Alison, 250
- Aston, Francis William (1877-1945), 225
- Atwood, James A., 74
- Auger, Pierre Victor (1899-1993), 180
- Becker, Willi (1919-1986), 257
- Becquerel, Antoine Henri (1852-1908),
173
- Beer, August (1825-1863), 84, 92, 93, 94,
95, 96, 120, 121, 135
- Benoit, Hubert C., 185
- Bernard, Claude (1813-1878), 92
- Biot, Jean-Baptiste (1774-1862), 135,
136, 139
- Blakely, Calvin R., 243
- Bloch, Felix (1905-1983), 263
- Boltzmann, Ludwig Eduard (1844-1906),
265, 321
- Bonner, R.F., 247
- Bourger, Pierre (1698-1758), 92
- Browner, Richard F., 243
- Brubaker, 246
- Bruins, Andries P., 225
- Bunsen, Robert Wilhelm (1811-1899),
104
- Campana, J.E., 247
- Campbell, P., 247
- Cannon, Michael R. (1918-1983), 192
- Cerenkov, Pavel 1904-1990), 169
- Chang, Pin, 281
- Christofilos, Nicholas Constantine (1916-
1972), 247
- Claesson, Stig Melker (1917-1988), 81
- Compton, Arthur Holly (1892-1962), 180,
183
- Cornu, Marie Alfred (1841-1902), 104
- Cottrell, Frederick Gardner (1877-1948),
151, 156
- Coulomb, Charles Augustin (1736-1806),
158, 232
- Courant, Ernest (1920-), 247
- Curie, Marie Skłodowska (1867-1934),
174
- Czerny, Marianus (1896-1985), 104
- Dalton, John (1766-1844), 217, 253
- Dawson, Peter H., 247
- Dempster, Arthur Jeffrey (1886-1950),
225
- Dole, Malcolm (1903-1990), 225
- Ebert, Hermann (1861-1913), 104
- Elmer, Charles Wesley (1872-1954), 5,
63, 68, 115, 228, 232, 233, 247, 261

- Fabry, Maurice Paul Auguste Charles (1867-1945), 142, 272
- Faraday, Michael (1791-1867), 149, 150, 157, 256, 321
- Fenn, John Bennett (1917-2010), 231
- Fick, Adolf Eugen (1829-1901), 149, 155, 156
- Finnigan Robert E. (1927-), 250
- Flodin, Per (1924-), 68
- Fourier, Joseph (1768-1830), 103, 255, 257, 263, 268, 270, 272, 273
- Fresnel, Augustin-Jean (1788-1827), 130
- Gaede, Wolfgang (1878-1945), 257
- Gibbs, Josiah Willard (1839-1903), 281
- Good, 247
- Goudsmit, Samuel Abraham (1902-1978), 252
- Haney, Max A. (1949-2011), 195, 196
- Hayes, F. Newton, 171
- Heinrich, 247
- Helmoltz, Hermann Ludwig Ferdinand Von (1821-1894), 150
- Hewlett, William 'Bill' Reddington (1913-2001), 68
- Higgins, J.S., 193
- Hildebrand, Joel Henry (1881-1983), 74
- Hirschfeld, Thomas, 213
- Holweck, Fernand (1890-1941), 257
- Horning, Evan Charles (1916-), 236
- Horváth, Csaba (1930 –2004), 5, 68
- Houwink, Roelof, (1897-1988), 193, 196
- Huber, Josef Franz Karl (1925-), 5
- Hughes, Richard J., 247
- Hutchins, Burleigh M. Jr. (1939-2013), 25
- Iworykin, Vladímír Kozmich (1889-1982), 171
- Jabłoński, Aleksander (1898-1980), 118
- Kallman, Harmut (1896-1978), 171
- Karger, Barry L. (1939-), 5
- Karpov, G.V., 214
- Kavanagh, Frederick W., 120, 121
- Kaye, Alan S., 200
- Kirkland, Joseph Jack (1925-), 5, 68
- Kohlrausch, Friedrich Wilhelm Georg (1840-1910), 166
- Kuhn, Richard (1900-1967), 193
- Lambert, Johann Heinrich (1728-1777), 84, 92, 93, 94, 95, 96, 120, 121, 135
- Lawson, Alexander M., 247
- LeSec, James (1948-2012), 196
- Lipsky, Seymour 'Sandy' Richard (1924-1986), 5, 68
- Littrow, Joseph Johann Von (1781-1840), 104
- Livingston, Milton Stanley (1905 -1986), 247
- Majors, Ronald 'Ron' E. (1942-), 5, 68
- Mantel, J., 179

- March, Raymond E.(1932-), 247
- Mark, Herman Francis (1895-1992), 193, 196, 203
- Martin, Archer John Porter (1910-2002), 67, 163
- Mathieu, Émile Léonard (1835–1890), 247
- McLachlan, Norman William (1888-), 247
- McLaren, I. H., 252
- Michelson, Albert Abraham (1852-1931), 272
- Nerst, Walther (1864-1941), 147, 160
- Nobel, Alfred Bernhard (1833-1896), 263
- Nyquist, Harry Theodor (1889-1976), 114
- Ohm, Georg Simon (1787-1854), 164
- Ostwald, Friedrich Wilhelm (1853-1932) 192
- Packard, David (1912-1996), 68
- Paul, Wolfgang (1913-1993), 247
- Pauli, Wolfgang Ernst (1900-1958), 263
- Peltier, Jean Charles (1785-1845), 282, 283
- Perkin, Richard 'Dick' Scott (1906-1969), 5, 63, 68, 115, 228, 232, 233, 247, 261
- Pérot, Jean-Baptiste Alfred (1863-1925), 272
- Peterson, Elbert A., 68
- Planck, Max Ernst Karl Ludwig (1858-1947), 264
- Porath, Jerker (1921-), 68
- Post, R.F., 247
- Purcell, Edward Mills (1912-1997), 263
- Rabi, Isidor Isaac (1898-1988), 263
- Ramsey, Norman Foster, Jr. (1915-2011), 263
- Randall, Merle (1888-1950), 163
- Raoult, François-Marie (1830-1901), 294
- Rayleigh, John William Strutt (1842-1919), 142, 199, 200, 201, 232, 233
- Roentgen, Wilhelm Conrad (1845-1923), 176, 324
- Rowland, Frank Sherwood (1927-2012), 104
- Sakurada, Ichiro (1904-1986), 193
- Sarker, Satyajit D., 269
- Siegbahn, Karl Manne Georg (1886-1978), 257
- Snyder, Lloyd Robert (1931-), 5, 247
- Sorber, Herbert Alexander (1918-1974), 68
- Stafford, George C., Jr., 250
- Steinwedel, Helmut (1921-1995), 247
- Stephens, William Ellis (1916-1984), 252
- Stockmayer, Walter H. (1914-2004), 203
- Stokes, George Gabriel (1819-1903), 118

- Synge, Richard Laurence Millington (1914-1994), 67
- Tal'roze, Viktor L'vovič (1922-), 214
- Taylor, Brook (1685-1731), 120
- Taylor, Geoffrey Ingram (1886-1975), 231
- Thomson, Joseph John 'J.J.' (1856-1940), 225, 236
- Tiselius, Arne Wilhelm Kaurin (1902-1971), 81
- Todd, John F.J. (1937-), 247
- Tsvet, Mijail Semiónovich (1872 -1919), 5, 67
- Turner, Arthur F. (1906-1996), 104, 246
- Unger, Klaus K. (1936-), 5
- Van Deemter, Jan Jozef (1918-2004), 7
- Venturi, Giovanni Battista (1746-1822), 277
- Vestal, Marvin L. (1934-), 214, 243
- Waters, James 'Jim' Logan (1925-), 15, 25, 68, 246
- Wehrli, Ernst Adolf (1892-1970), 74
- Wheatstone, Charles (1802-1875), 164, 195
- Whetten, N. R., 247
- Wiley, W.C. (1918-1996), 252
- Wilke, C.R. (1924-), 281
- Willoughby, Ross C. (1958-), 243
- Witt, Otto Nikolaus (1853-1915), 99
- Zimm, Bruno Hasbrouck (1920-2005), 202, 203

Índice institucional

- Agilent, 5, 12, 23, 61, 63, 71, 109, 215, 246, 252, 258, 274, 275
- American Society for Testing and Materials (ASTM), 91, 106
- American Society of Mass Spectrometry, 214
- Bonn, Universidad, 247
- Chromatronix Inc., 68
- Comisión de Electrotécnica Internacional, 173
- Conferencia de Agentes Reguladores, 9
- Conferencia Internacional de Espectrometría de Masas, 252
- Conferencia sobre Química Analítica y Espectroscopia Aplicada, 25
- Finnigan Corp., 250
- Food and Drug Administration (FDA), 316, 317
- Guía de Normas de Cumplimiento, 317
- Harvard, Universidad, 263
- Hewlett-Packard, 68
- Hupe-Busch (Hupe & Busch Co.), 68
- Instrumentation Specialities Corporation (Isco), 68
- International Conference of Harmonization (ICH), 9
- Journal of Chromatography, 6
- Malvern Instruments Ltd., 204
- Nester-Faust Manufacturins Corp., 68
- Parker Instruments, 15
- Picker-Nuclear (Picker International), 68
- Pittcon Conference, 25
- Premio Nobel, 263
- Real Academia Española, 173
- Rheodyne, Co., 15, 59
- San Luis, Universidad, 68
- Shimadzu Corp., 246
- Sociedad Americana de Espectrometría de Masas, ver American Society of Mass Spectrometry
- Sociedad Americana de Física, 252
- Spectra-Physics, 68
- Standford, Universidad, 263
- Signals & Systems, Inc. (SSI), 15
- Swagelok Co., 15
- Upchurch Scientific, 15
- Valco Instruments Co. Inc., 15, 59
- Viscotek Co., 204
- Waters (Waters Associates Inc.), 15, 25, 68, 246

Para seguir leyendo haga click aquí