Cromatografía de líquidos

Objetivo de la práctica: Determinación del contenido en sorbatos y benzoatos en alimentos.

Fundamentos: La cromatografía de líquidos (LC)es una herramienta de uso muy frecuente en los laboratorios de análisis, al permitir la separación de compuestos similares que se presenten conjuntamente en una muestra. Esta técnica aprovecha las diferencias de afinidad entre los analitos y las fases móviles y estacionarias para separarlos, de manera que lleguen al módulo detector de manera individual y se puedan cuantificar sin interferencias.

En cuanto a las fases estacionarias, se acoplan al equipo en forma de columnas empaquetadas que contienen diferentes tipos de materiales de naturaleza variable: composición, tamaño de poro, longitud de columna... El parámetro más importante de las fases estacionarias es su composición, y en base a ella se separan en:

- Cromatografía de fase reversa (RP): La fase estacionaria es apolar, y la fase móvil polar.
- Cromatografía de fase normal (NP): La fase estacionaria es polar, y la fase móvil apolar.

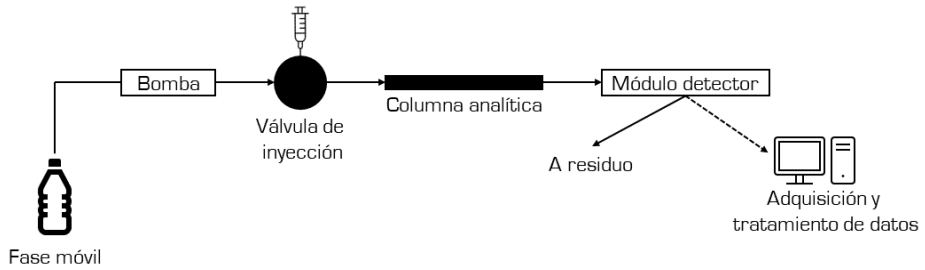

Figura 1. Componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos.

La primera de ellas, la cromatografía de fase reversa, es la de uso más extendido. En ella, las columnas se empaquetan con un material a base de sílice fundida funcionalizada con cadenas hidrocarbonadas de diferentes longitudes (C4, C8, C18...). Al inyectar en el sistema la disolución de medida con los analitos, éstos quedan retenidos en la columna de manera más o menos débil.

La 'extracción' de los analitos del sistema tiene lugar gracias al flujo constante de fase móvil. Ésta también tendrá un grado de interacción con los analitos, causando que pasen de estar adsorbidos a estar en la disolución (Figura 2). Es en ese *reparto* entre la fase estacionaria y la fase móvil que se generan diferencias entre los diferentes analitos, causando que unos tengan mayor afinidad por la fase móvil (y, por tanto, 'salgan' antes del sistema) y otros tengan una mayor afinidad por la fase estacionaria (saliendo, por tanto, más tarde). Al proceso de extraer del sistema a los analitos se le denomina **elución**.

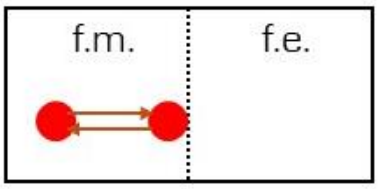

Figura 2. Representación esquemática del reparto entre fase estacionaria y fase móvil de un analito.

A medida que los analitos eluyen de la columna, llegan a un módulo detector que registra la señal analítica correspondiente. Este módulo puede ser un detector ultravioleta-visible (ver Práctica 3), un detector de fluorescencia, de conductividad, o incluso un espectrómetro de

masas. La elección del módulo detector vendrá condicionada por las características de los analitos y por los requerimientos del análisis.

En el caso de la práctica que nos ocupa, se utilizará un detector de absorbancia UV-Vis, que registrará, a cada tiempo, un valor de absorbancia a una determinada longitud de onda, y lo plasmará gráficamente en un **cromatograma**.

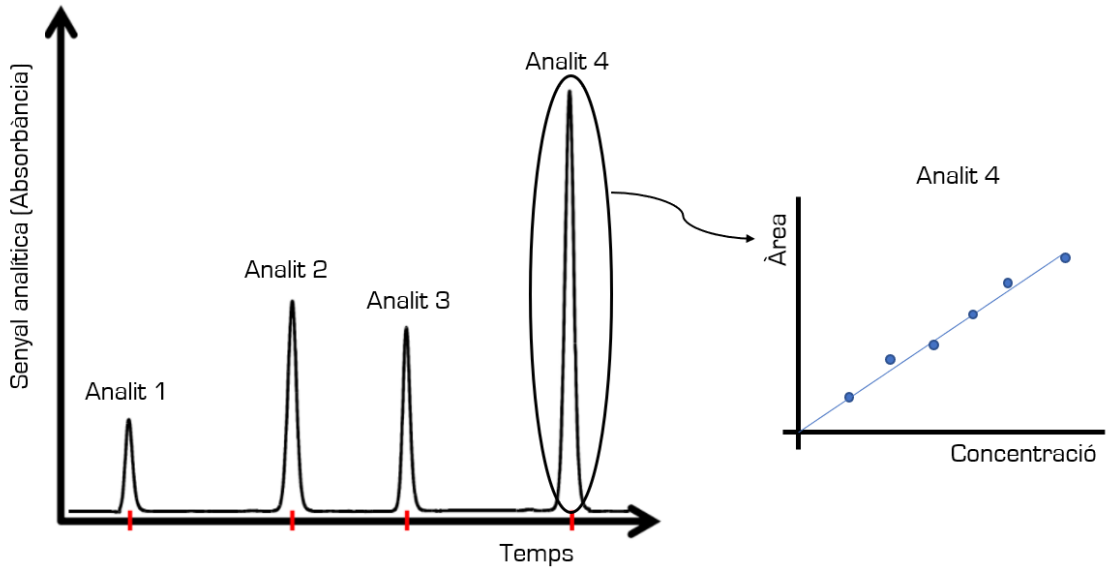

Figura 3. Representación de un cromatograma separando 4 compuestos, y la calibración para el Analito 4. En rojo se marcan los tiempos de retención de cada analito.

En el cromatograma se puede observar que, a cada compuesto, se le asigna un **tiempo de retención** característico: el tiempo que 'tarda' en salir de la columna. Esta es la variable cualitativa en cromatografía, y permite identificar los diferentes compuestos.

A modo de señal analítica (variable cuantitativa), en cromatografía de líquidos se pueden utilizar el **área** y la **altura** de los diferentes picos de los compuestos en el cromatograma. Sin embargo, el uso de la altura no se recomienda, debido a que puede variar dentro de una misma secuencia de análisis por factores externos (temperatura, pequeñas variaciones en el flujo de la bomba...) y el uso del área de los picos está normalizado.

Para obtener el área de los picos obtenidos en los cromatogramas existen herramientas informáticas proporcionadas por el fabricante del equipo que permiten **integrar** los picos: trazar una línea imaginaria en la base del mismo que le indica al *software* dónde empieza y dónde acaba el pico (Figura 4).

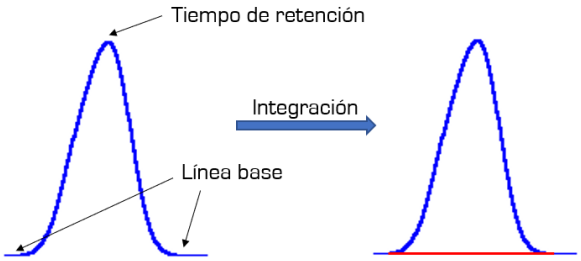

Figura 4. Integración de un pico de cromatografía. Observar que la el límite ha de ir de línea base a línea base.

Preguntas

1.- En un análisis cualitativo, se inyectó un patrón multicomponente y se registraron los tiempos de retención de todos ellos. A continuación, una disolución de composición desconocida se analiza en las mismas condiciones instrumentales. ¿Cuáles son los componentes encontrados en la muestra?

Disolución patrón multicomponente	
Analito	Tiempo de retención (min)
A1	1,7
A2	2,0
A3	2,6
A4	4,1
A5	6,6
Disolución muestra	
X1	2,1
X2	4,15
X3	5,7

2.- Se pretende analizar un edulcorante en una bebida comercial, para lo cual se pipetearon 3 mL y se introdujeron en un matraz de 50 mL de volumen total. De esa disolución, 20 µL fueron inyectados en un cromatógrafo de líquidos, registrando la absorbancia a 315 nm. Previamente, se preparó un calibrado que se midió en las mismas condiciones. Los datos de calibración y de disoluciones de medida se muestran en la tabla, ¿Qué concentración de aditivo se tiene inicialmente en la bebida?

Patrones		
Patrón	[Aditivo]	Área
P0	0	0
P1	10	327
P2	15	490,5
P3	20	660
P4	30	979
P5	50	1631,7
Réplicas de muestra		
R1	-	659,7
R2	-	649,5
R3	-	655,1