

CROMATOGRAFIA

1. Introducción
2. Cromatografía en columna
3. Cromatografía en papel
4. Cromatografía en capa delgada
5. Cromatografía de gases
6. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
7. Cromatografía de exclusión
8. Definiciones e interpretación de los cromatogramas
9. Aptitud del sistema
10. Ajustes de las condiciones cromatográficas en sistemas isocráticos de cromatografía líquida de alta eficiencia

DEFINICIONES E INTERPRETACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS

Cromatograma: Un cromatograma es una representación gráfica o de otro tipo de la respuesta del detector, de la concentración del o los analitos en el efluente u otra cantidad usada como una medida de concentración en el efluente en función del volumen de este o del tiempo. En la cromatografía planar se puede usar el término, cromatograma para referirse al papel o capa con las zonas separadas.

La Figura 1 representa una separación cromatográfica típica de dos sustancias, 1 y 2. t_{R1} y t_{R2} son los tiempos de retención respectivos; y h es la altura, $h/2$ la mitad de la altura y $W_{h/2}$ el ancho del pico a la mitad de la altura. W_1 y W_2 son los anchos de los picos 1 y 2, respectivamente, en la línea base. Los picos de aire son una característica de los cromatogramas de gases y corresponden al frente de la fase móvil en la cromatografía de líquidos. El tiempo de retención de estos picos de aire o componentes no retenidos se denomina t_M . (NOTA: emplear las mismas unidades de medida en las diferentes determinaciones).

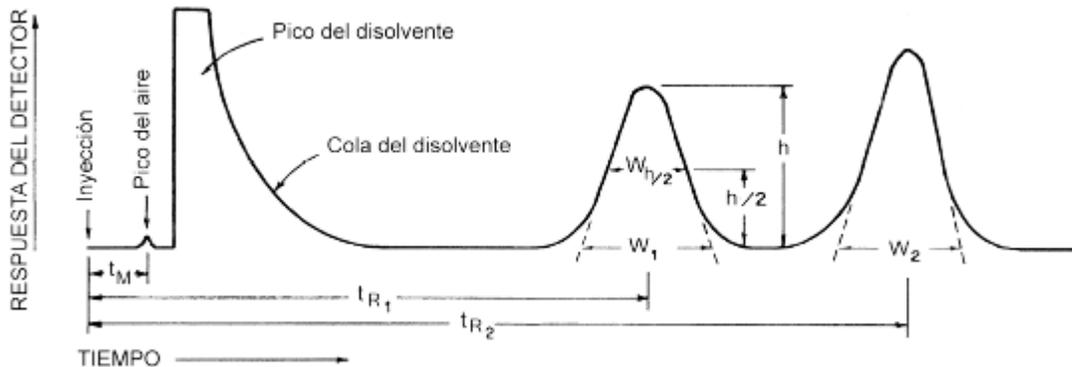


Figura 1. Separación cromatográfica de dos sustancias (ver PAHO) OPS

Pico: El pico es la porción del cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna. El pico puede ser definido por su área, altura y ancho a la mitad de la altura, o altura y ancho en la línea de base. Si la separación es incompleta, se puede registrar la elución de dos o más componentes como un pico no resuelto.

Volumen de Residencia (D): El volumen de residencia (también conocido como volumen de demora en elución a gradiente) es el volumen entre el punto en el que se encuentran los eluyentes y la entrada de la columna. **Evaluar la posibilidad de eliminarlo, dado que puede llevar a confusión.**

Tiempo Muerto (t_M): El tiempo muerto es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido (ver la *Figura 1*, mostrado como un pico de aire o de componente no retenido, con la escala de la línea base en minutos).

Volumen Muerto (V_M): El volumen muerto es el volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido. Se puede calcular a partir del tiempo muerto y la velocidad de flujo F , en ml/min:

$$V_M = t_M \times F$$

En la cromatografía de exclusión por tamaño, se usa el símbolo V_0 .

Tiempo de Retención (t_R): En cromatografía líquida y cromatografía de gases, el tiempo de retención, t_R , se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar t_R como un parámetro para identificación. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado varían de un cromatograma al siguiente.

Volumen de retención (V_R): es el volumen de fase móvil requerido para la elución de un componente. Se puede calcular a partir del tiempo de retención y de la velocidad de flujo en ml/min:

$$V_R = t_R \times F$$

Número de Platos Teóricos (N): es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos, se calcula por la ecuación:

$$N = 16(t_R/W)^2$$

en donde t_R es el tiempo de retención de la sustancia y W es el ancho del pico en su base, que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos del pico hasta la línea de base. El valor de N depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones operativas, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna, y, para columnas capilares, el espesor de la película de fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna. Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar el número de platos teóricos por la ecuación:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

donde $W_{h/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura. Sin embargo, en caso de discrepancias, sólo se deben usar las ecuaciones basadas en el ancho del pico en la línea base.

Relación Pico/Valle (p/v): La p/v se pueden emplear como un criterio de aptitud del sistema en una prueba de sustancias relacionadas cuando no se logra la separación entre dos picos en la línea base. La Figura 2 representa una separación incompleta de dos sustancias, donde H_p es la altura del pico menor por encima de la línea base extrapolada y H_v es la altura en el punto más bajo de la curva que separa los picos menor y mayor por encima de la línea base extrapolada:

$$p/v = H_p/H_v$$

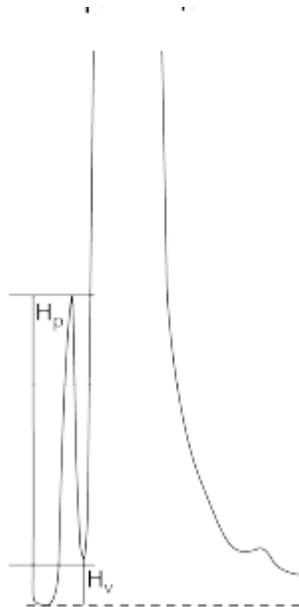


Figura 2. Determinación de la relación pico/valle.

Retardo Relativo (R_{ret}): es el cociente de la distancia (b) recorrida por el analito y la distancia (c) recorrida simultáneamente por un compuesto de referencia (ver la Figura 3) y se usa en una cromatografía planar.

$$R_{ret} = b / c$$

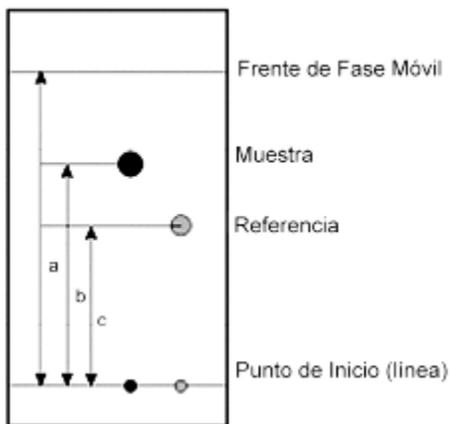


Figura 3. Cromatografía planar típica.

Retención relativa (r): Es el cociente entre el tiempo de retención ajustado de un componente y el de otro usado como referencia obtenido en condiciones idénticas:

$$r = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M)$$

donde t_{R2} es el tiempo de retención medido desde el punto de inyección del compuesto de interés; t_{R1} es el tiempo de retención medido a partir del punto de inyección del compuesto usado como referencia; y t_M es el tiempo muerto, todos determinados en condiciones experimentales idénticas en la misma columna.

Tiempo de retención relativo (RRT): También conocido como tiempo relativo no ajustado. **Las comparaciones en esta farmacopea** se realizan en términos de retención relativa no ajustada, a menos que se indique de otro modo.

$$RRT = t_{R2}/t_{R1}$$

El símbolo r_G también se usa para designar los valores de retención relativa no ajustados.

Factor de Retardo (RF): El factor de retardo es el cociente entre la distancia (b) recorrida por el centro de la mancha y la distancia (a) recorrida simultáneamente por la fase móvil y se usa en cromatografía planar. Usando los símbolos de la *Figura 3*:

$$RF = b/a$$

Factor de Retención (k): Al factor de retención también se le conoce como el factor de capacidad (k'). Se define como:

$$k = \frac{\text{cantidad de sustancia en la fase estacionaria}}{\text{cantidad de sustancia en la fase móvil}}$$

o

$$k = \frac{\text{tiempo de la sustancia en la fase estacionaria}}{\text{tiempo de la sustancia en la fase móvil}}$$

El factor de retención de un componente se puede determinar a partir del cromatograma:

$$k = (t_R - t_M)/t_M$$

Resolución (RS): La resolución es la separación de dos componentes en una mezcla, calculada por:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Donde t_{R2} y t_{R1} son los tiempos de retención de los dos componentes; y W_2 y W_1 son los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea de base.

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar la resolución, mediante la ecuación:

$$R_s = 1,18(t_{R2} - t_{R1}) / (W_{1,h/2} + W_{2,h/2})$$

Factor de Separación (α): el factor de separación es la retención relativa calculada para dos picos adyacentes (por convención n , el valor del factor de separación siempre es >1):

$$\alpha = k_2 / k_1$$

Factor de Simetría (*): El factor de simetría (también conocido como factor de asimetría o factor de cola) de un pico (ver la *Figura 4*) se calcula por:

$$A_s = W_{0,05} / 2f$$

donde $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde de la línea base.

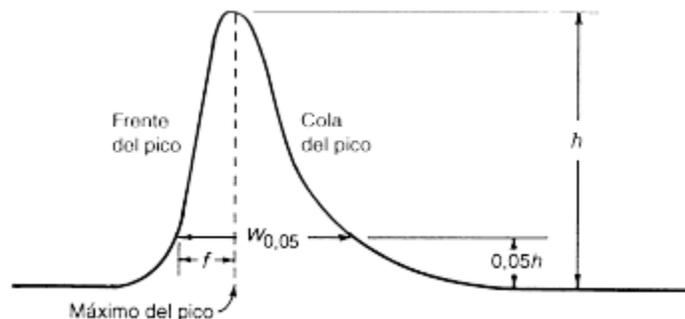


Figura 4. Pico cromatográfico asimétrico.

*definición de sigla que lo identifique: FC, FA, FS, T, F

APTITUD DEL SISTEMA

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar.

Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal.

Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Los factores que pueden afectar el comportamiento cromatográfico incluyen lo siguiente:

- ⌚ Composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente de la fase móvil.
- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión.
- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico (basado en partículas o monolítico), tamaño de partícula, tamaño de poro y área específica.
- En fase reversa y otras modificaciones superficiales de las fases estacionarias, el grado de modificación química (según se expresa mediante recubrimiento exhaustivo (end-capping), carga de carbono, etc.)

La resolución R , es una función de la eficiencia de la columna N , y se especifica para asegurar que las sustancias que eluyan muy cercanas se resuelvan entre sí y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de las sustancias a ensayar. La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay un solo pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, importante para detectar componentes en baja concentración.

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar u otras soluciones estándar se comparan entre sí para determinar si se cumplen los requisitos de precisión. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular la desviación estándar relativa, S_R , se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0 % o menor, y seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es mayor de 2,0 %. La desviación estándar relativa S_R , se calcula según la fórmula siguiente:

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{x}} \left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \right)^{1/2}$$

Para la Valoración en una monografía de un fármaco donde el valor es 100% para la sustancia pura, y no se especifica una desviación estándar relativa máxima, se

calcula la %RSD máxima permitida para una serie de inyecciones de la solución de referencia como:

$$\%RSD = KB\sqrt{n}/t_{90\%, n-1}$$

donde K es una constante (0,349), obtenida a partir de la expresión $K = (0,6/\sqrt{2}) \times (t_{90\%,5}/\sqrt{6})$, en la que $0,6/\sqrt{2}$ representa la desviación estándar relativa porcentual después de seis inyecciones para $B = 1,0$; B es el límite superior provisto en la definición de la monografía individual menos 100%; n es el número de inyecciones repetidas de la solución de referencia ($3 \leq n \leq 6$); y $t_{90\%, n-1}$ es el valor t de Student al 90% del nivel de probabilidad (dos colas) con n-1 grados de libertad.

A menos que se indique de otro modo, la desviación estándar relativa máxima permitida no excede del valor apropiado provisto en la tabla de requisitos de repetibilidad. Este requisito no se aplica a las pruebas para sustancias relacionadas.

Requisitos para Desviación Estándar Relativa

B (%)	Número de Inyecciones Individuales			
	3	4	5	6
	RSD Máxima Permitida			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27

El factor de asimetría F , una medida de la simetría del pico, es 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada (ver Figura 2). En algunos casos, pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la asimetría del pico, la integración y la precisión se tornan menos confiables.

Estos datos se obtienen a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifique en la monografía correspondiente.

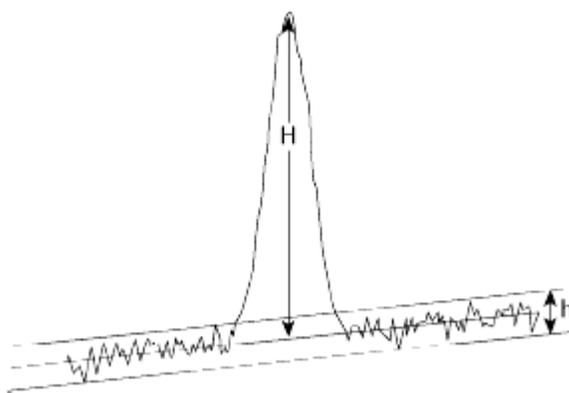


Figura 5. Ruido y pico cromatográfico, componentes de la relación S/N

La relación señal-ruido (S/N) es un parámetro útil de aptitud del sistema. La S/N se calcula según se indica a continuación:

$$S/N = 2H/h$$

dónde H es la altura del pico medido a partir del ápice del pico hasta la línea base extrapolada sobre una distancia ≥ 5 veces el ancho del pico a su altura media; y h es la diferencia entre el valor de ruido más grande y más pequeño observados sobre una distancia ≥ 5 veces el ancho del pico a su altura media y, si fuera posible, igualmente distribuida a ambos lados del pico de interés (ver la Figura 5).

Estas pruebas de aptitud del sistema se realizan recolectando datos a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifica en la monografía individual.

La especificación de parámetros definidos en una monografía no excluye el uso de otras condiciones de operación aptas. Se permiten ajustes únicamente cuando:

- Se encuentran disponibles estándares adecuados (incluyendo Estándares de Referencia) para todos los compuestos usados en la prueba de aptitud; y
- Esos estándares muestran que los ajustes mejoraron la calidad de la cromatografía con respecto a los requisitos de aptitud del sistema.

No se deben realizar ajustes a los sistemas cromatográficos a fin de cumplir con los requisitos de aptitud del sistema para compensar fallas en la columna o mal funcionamiento del sistema.

3. Cromatografía en papel

El mecanismo predominante en Cromatografía en papel es la partición, esto se debe a que el papel posee un contenido natural de agua que puede ser considerada como fase estacionaria. Sin embargo, en la práctica, las separaciones frecuentemente son el resultado de la combinación de efectos de adsorción y partición.

Fase estacionaria: La fase estacionaria es una hoja de papel de textura y espesor adecuados. El desarrollo puede ser ascendente, en cuyo caso el disolvente se desplaza hacia arriba por el papel mediante fuerzas de capilaridad, o descendente en cuyo caso el flujo del disolvente se ve ayudado por la fuerza de gravedad. La orientación de las fibras del papel con respecto al flujo del disolvente se debe mantener constante en una serie de cromatogramas. (Por lo general, el fabricante indica la dirección de máquina).

Aparato: El equipo esencial para cromatografía en papel comprende una cámara

hermética al vapor (generalmente construida de vidrio, acero inoxidable o porcelana) provista de entradas para agregar el disolvente y una gradilla de material resistente a la corrosión aproximadamente 5 cm más corta que la altura interior de la cámara.

La gradilla sirve como soporte para la cubeta de disolvente y para las varillas antisifón que, a su vez, sostienen las hojas cromatográficas. El fondo de la cámara está cubierto con la mezcla de solventes o fase móvil indicada. La saturación de la cámara con el vapor del disolvente se facilita revistiendo las paredes del interior con un papel humedecido con la fase móvil indicada.

Siembra: La sustancia o sustancias a ser analizadas se disuelven en un disolvente adecuado. Se aplican volúmenes convenientes, medidos con micropipetas adecuadas, solución resultante que contengan normalmente de 1-20 ug del compuesto, en zonas de 6 a 10 mm de diámetro y con una separación de no menos de 3 cm.

Procedimiento para Cromatografía Descendente en Papel

- (1) Suspender la hoja cromatográfica sembrada en el aparato, usando la varilla antisifón para sostener el extremo superior de la hoja en la cubeta de disolvente [NOTA—Asegurar que la porción de la hoja que cuelga por debajo de las varillas esté suspendida libremente en la cámara sin tocar la gradilla o las paredes cámara o el líquido que está en el interior de la cámara.]
- (2) La cámara se sella para permitir su equilibrio (saturación) y el del papel con el vapor del disolvente. Liberar cualquier exceso de presión, si fuera necesario.
- (3) Después de equilibrar la cámara, la fase móvil previamente preparada se introduce en la cubeta a través de la entrada.
- (4) Cerrar la entrada y dejar que la fase móvil se desplace hacia abajo la distancia deseada sobre el papel.
- (5) Retirar la hoja de la cámara.
- (6) Marcar rápidamente la ubicación de la fase móvil y secar la hoja.
- (7) Observar el cromatograma y medir directamente o después del revelado adecuado para localizar las manchas del fármaco o de los fármacos aislados.

Procedimiento para Cromatografía Ascendente en Papel

- (1) Agregar la fase móvil al fondo de la cámara.
- (2) La cámara se sella para permitir su equilibrio (saturación) y el del papel con el vapor del disolvente. Liberar cualquier exceso de presión, si fuera necesario.
- (3) Sumergir el borde inferior de la fase estacionaria en fase móvil para permitir que la fase móvil ascienda la hoja cromatográfica por capilaridad.
- (4) Cuando la fase móvil haya alcanzado la altura deseada, abrir la cámara, retirar la hoja, marcar rápidamente la ubicación del frente de la fase móvil, y secar la hoja.
- (5) Observar el cromatograma y medir directamente o después del revelado adecuado para localizar las manchas del fármaco o de los fármacos aislados.

4. Cromatografía en Capa Delgada (TLC por su sigla en inglés)

La Cromatografía en capa delgada es comúnmente empleada para la identificación de sustancias. El mecanismo de separación predominante es la adsorción pero dependiendo del adsorbente empleado pueden observarse también fenómenos de partición.

Esta técnica presenta varias ventajas sobre la cromatografía en papel, se pueden emplear mayores cantidades de muestra; el tiempo requerido es menor por lo tanto los riesgos de alteración de la muestra por oxidación o por acción de los solventes disminuyen y permiten el uso de adsorbentes minerales que hacen posible el empleo de reveladores agresivos, como por ej., ácido sulfúrico.

Fase Estacionaria: La fase estacionaria es una capa relativamente delgada y uniforme de material seco y reducido a polvo fino que se aplica sobre una lámina o placa de vidrio, plástico o metal (generalmente conocida como la placa), fase estacionaria para TLC tiene un tamaño de partícula promedio de 10—15 μm , y la de TLC de alta resolución (HP) tiene un tamaño de partícula promedio de 5 μm . Se puede usar placas disponibles comercialmente con una zona preadsorbente si se especifican en una monografía. La muestra es aplicada a la región preadsorbente se desarrolla en forma de bandas estrechas y definidas en la interfase entre el preadsorbente y el sorbente. Las separaciones logradas pueden basarse en la adsorción, la partición o una combinación de ambos efectos, según el tipo específico de fase estacionaria.

Aparato: Usar una cámara cromatográfica de material inerte y transparente con las siguientes especificaciones: cubeta de fondo plano o cubetas gemelas, una tapa que cierre herméticamente y un tamaño adecuado para las placas. Revestir como mínimo una pared de la cámara cromatográfica con papel de filtro. Agregar una cantidad suficiente de fase móvil a la cámara cromatográfica de modo que proporcione, después de impregnar el papel de filtro, un nivel de profundidad apropiado a la dimensión de la placa utilizada. Cerrar la cámara cromatográfica y dejar que se equilibre. [NOTA—A menos que se indique algo diferente, las separaciones se realizan en una cámara saturada.]

Detección/Visualización: A menudo se usa una fuente de luz ultravioleta (UV) adecuada para observaciones bajo la luz UV de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) así como una variedad de soluciones reveladoras para visualizar las manchas.

Siembra: Aplicar las soluciones en forma de zonas sobre la fase estacionaria (placa) en el volumen establecido en porciones lo suficientemente pequeñas para obtener manchas circulares de 2—5 mm de diámetro (1—2 mm las de HPTLC) o bandas de 10—20 mm x 1—2 mm (5-10 mm x 0,5-1 mm sobre placas de HPTLC) a una distancia adecuada del borde inferior y de los bordes laterales de la placa. [NOTA-Durante el desarrollo, la posición de la aplicación debe estar por lo menos 5 mm (TLC) o 3 mm (HPTLC) por encima del nivel de la fase móvil.] Aplicar las soluciones sobre una línea paralela al borde inferior de la placa con una separación mínima de 10 mm (5 mm en placas de HPTLC) entre los centros de las

manchas o 4 mm (2 mm en placas de HPTLC) entre los bordes de las bandas dejar que se sequen.

Procedimiento

- (1) Colocar la placa en la cámara, asegurando que las manchas o bandas estén por encima de la superficie de la fase móvil.
- (2) Cerrar la cámara.
- (3) Dejar que la fase móvil ascienda en la placa hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido tres cuartos de la longitud de la placa o la distancia indicada en la monografía.
- (4) Retirar la placa, marcar el frente de la fase móvil con un lápiz y dejar que se seque.
- (5) Visualizar los cromatogramas según se indica.
- (6) Determinar los valores del factor de retardo cromatográfico (R_f) para las manchas o zonas principales.
- (7) Se puede realizar una identificación presuntiva mediante la observación de las manchas o zonas con valores de R_f idénticos y de magnitud similar, obtenidas cromatografiando una muestra desconocida y un estándar en la misma placa. Una comparación visual del tamaño o intensidad de las manchas o zonas puede servir para una estimación semicuantitativa. Las mediciones cuantitativas se pueden efectuar mediante densitometría (mediciones de absorbancia o fluorescencia).