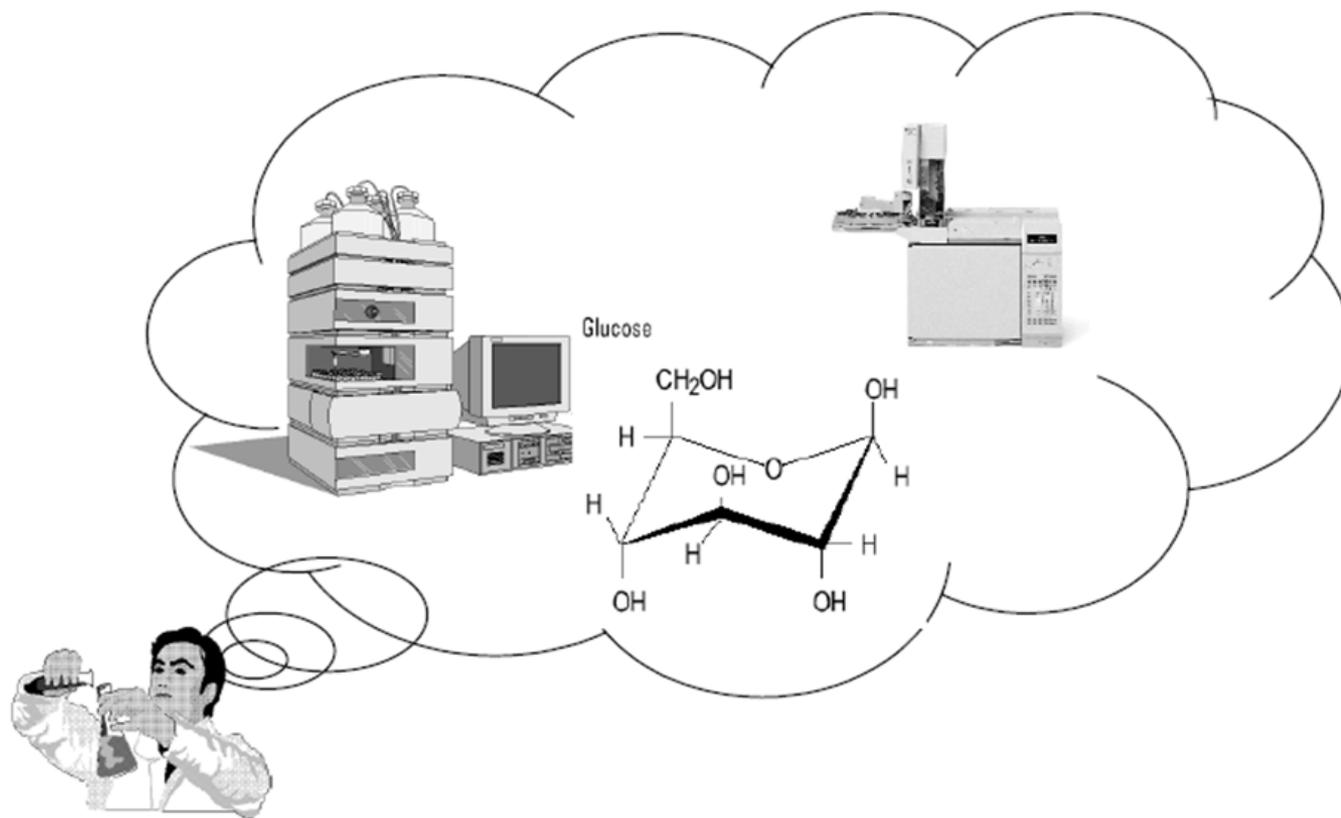


# **FUNDAMENTOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN. ACOPLAMIENTO A DETECTORES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS**



***Manuel Gayo González***  
***Responsable de Ventas Zona Centro***  
***Consultor GCMS&GCQQQ***

# TÉCNICAS DE SEPARACIÓN



Tengo dos técnicas de separación en mi laboratorio, HPLC y GC. ¿Cuál debo utilizar?

# TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

## Sample Volatility

### HPLC

- No volatility requirement
- Sample must be soluble in mobile phase



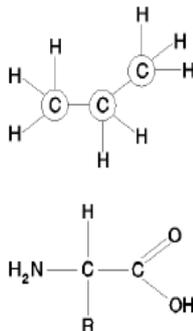
### GC

- Sample must be volatile

## Sample Polarity

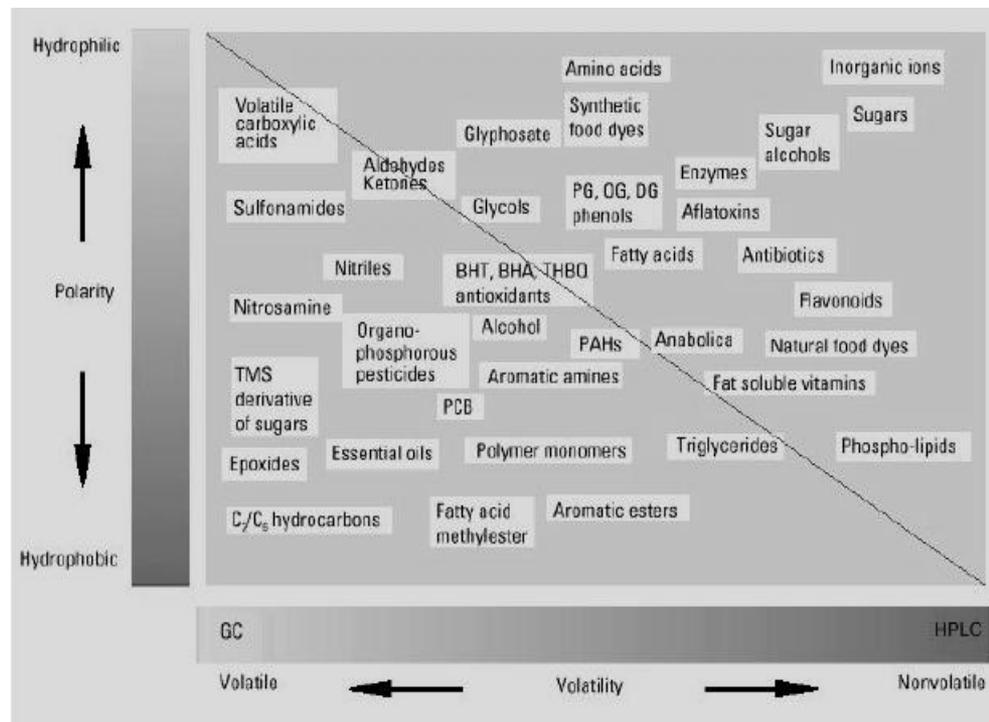
### HPLC

- Separates both polar and non polar compounds
- PAH - inorganic ions



### GC

- Samples are nonpolar and polar



---

# Definición de Cromatografía de Líquidos

En cromatografía de líquidos, los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una **fase estacionaria** y una **fase móvil**.

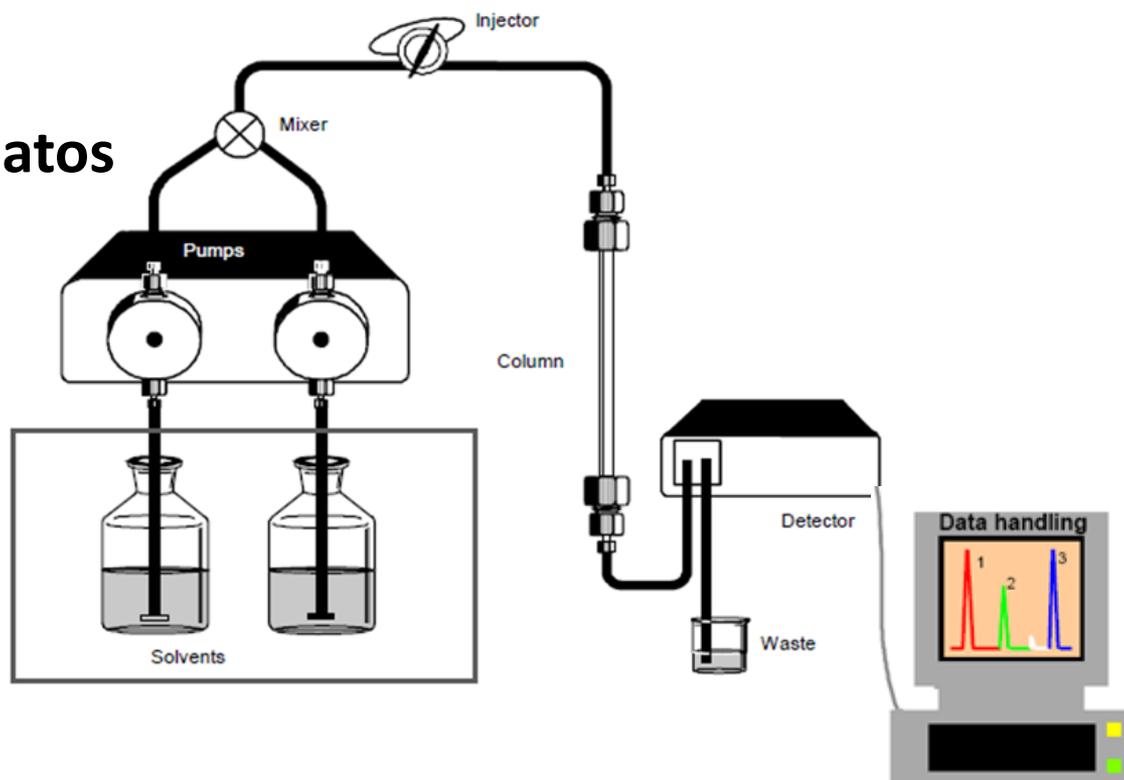
Los componentes se separan debido a la **diferencia de migración** entre la fase estacionaria y la fase móvil. La fase móvil introduce los analitos en la columna y a través del sistema.

Como fase móvil se utilizan líquidos.



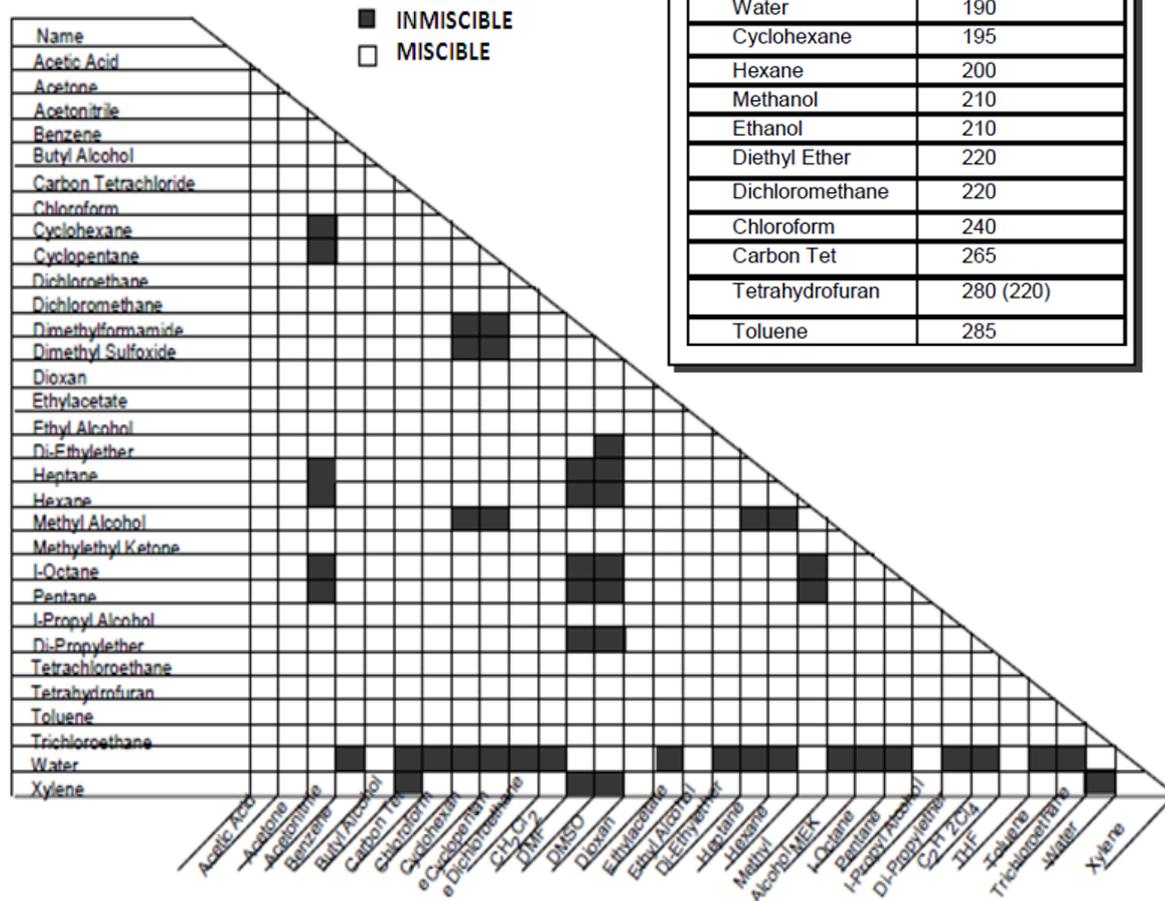
# COMPONENTES

- Disolventes
- Bomba
- Sistema de Introducción de la Muestra
- Columna
- Detector
- Adquisición de Datos



# COMPONENTES: DISOLVENTES PARA HPLC

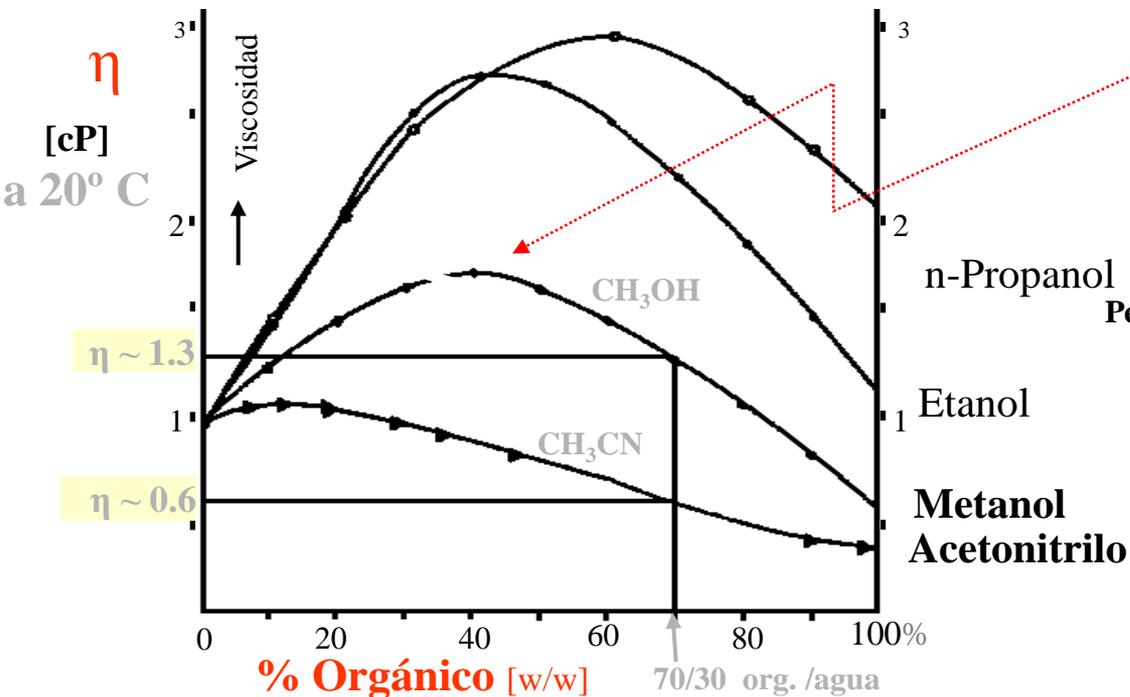
- Pureza
- Viscosidad
- Índice de Refracción
- Punto de Ebullición
- Toxicidad
- Traspirencia UV
- Solubilidad



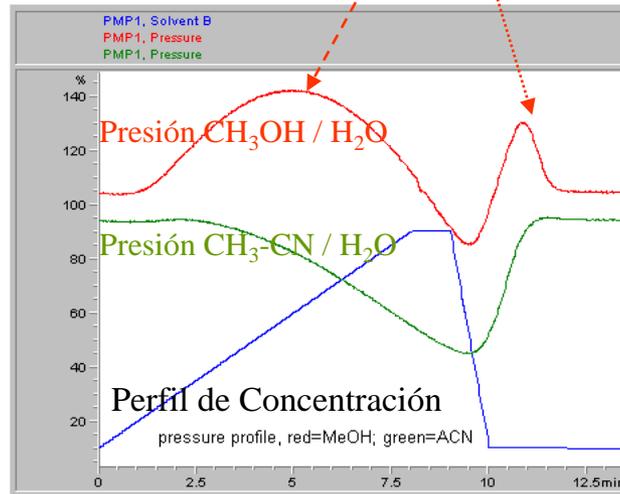
# USO PREFERENTE DE ACETONITRILO

Tener en cuenta:

► La alta viscosidad de las mezclas metanol/agua (máximo a 40/60)



Perfiles de Presión con Gradientes Concentración

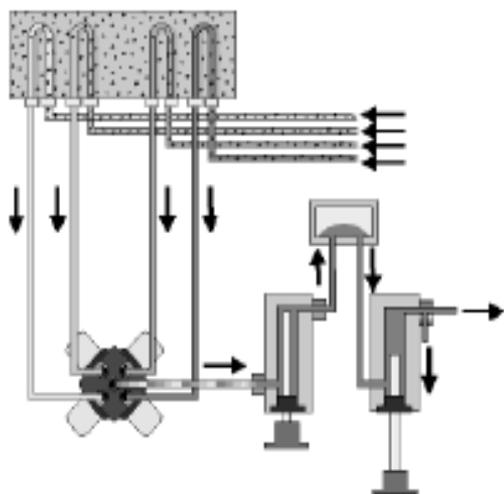


70%CH<sub>3</sub>OH → 59%ACN permite Flujo x 1.9  
poder eluotrópico equivalente

El gráfico de viscosidad “vs” % orgánico es útil para poder calcular relaciones aproximadas de viscosidad entre distintas composiciones de eluyentes y poder calcular presiones equivalentes:

p.e. 100 bars con ACN/H<sub>2</sub>O 70/30 equivalen a  $100 \times (1.3/0.6) = 217$  bars con CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70/30

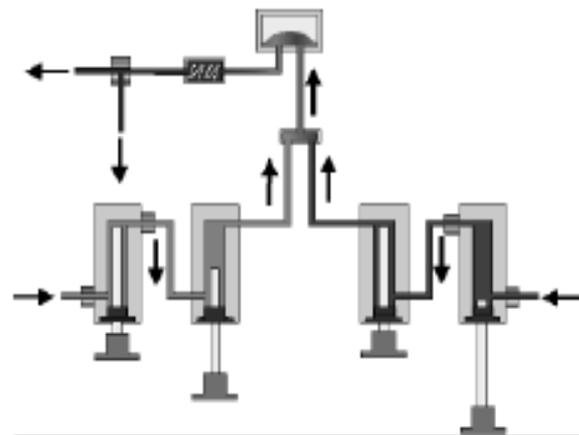
# COMPONENTES: BOMBA DE HPLC



Gradiente a baja Presión



BOMBA CUATERNARIA



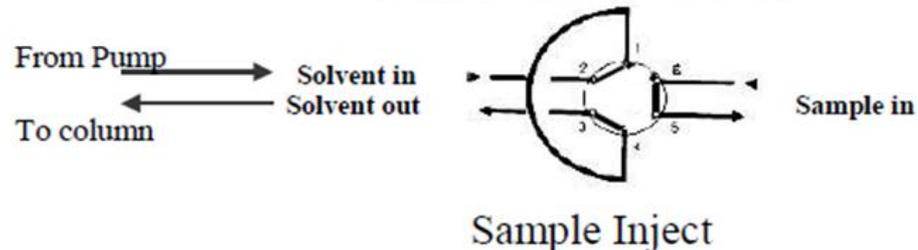
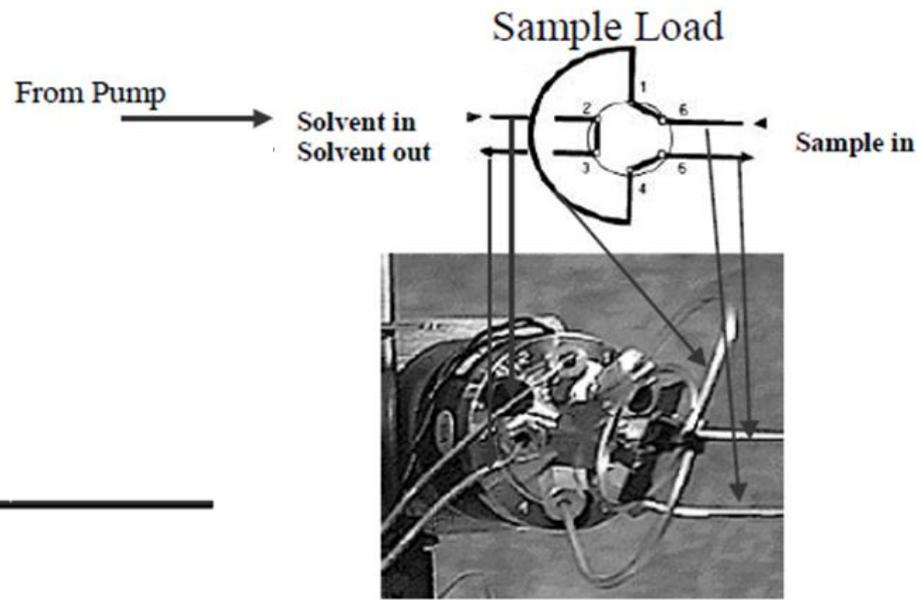
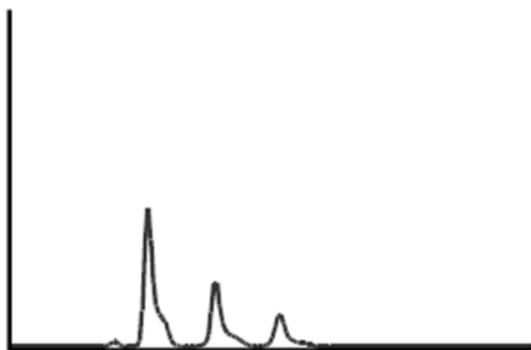
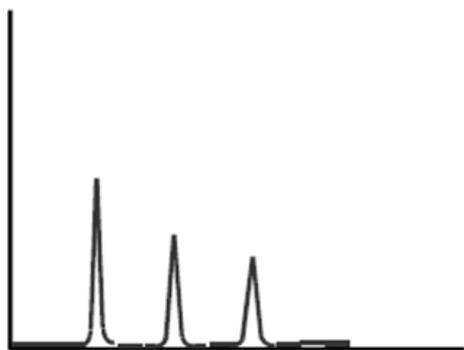
Gradiente a alta Presión



BOMBA BINARIA

# COMPONENTES: SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA

- Disolver la muestra en la fase móvil o en un disolvente miscible
- Disolver la muestra en la mínima cantidad posible de disolvente



# COMPONENTES: COLUMNA

- Tipo de Fase Estacionaria

- Dimensiones

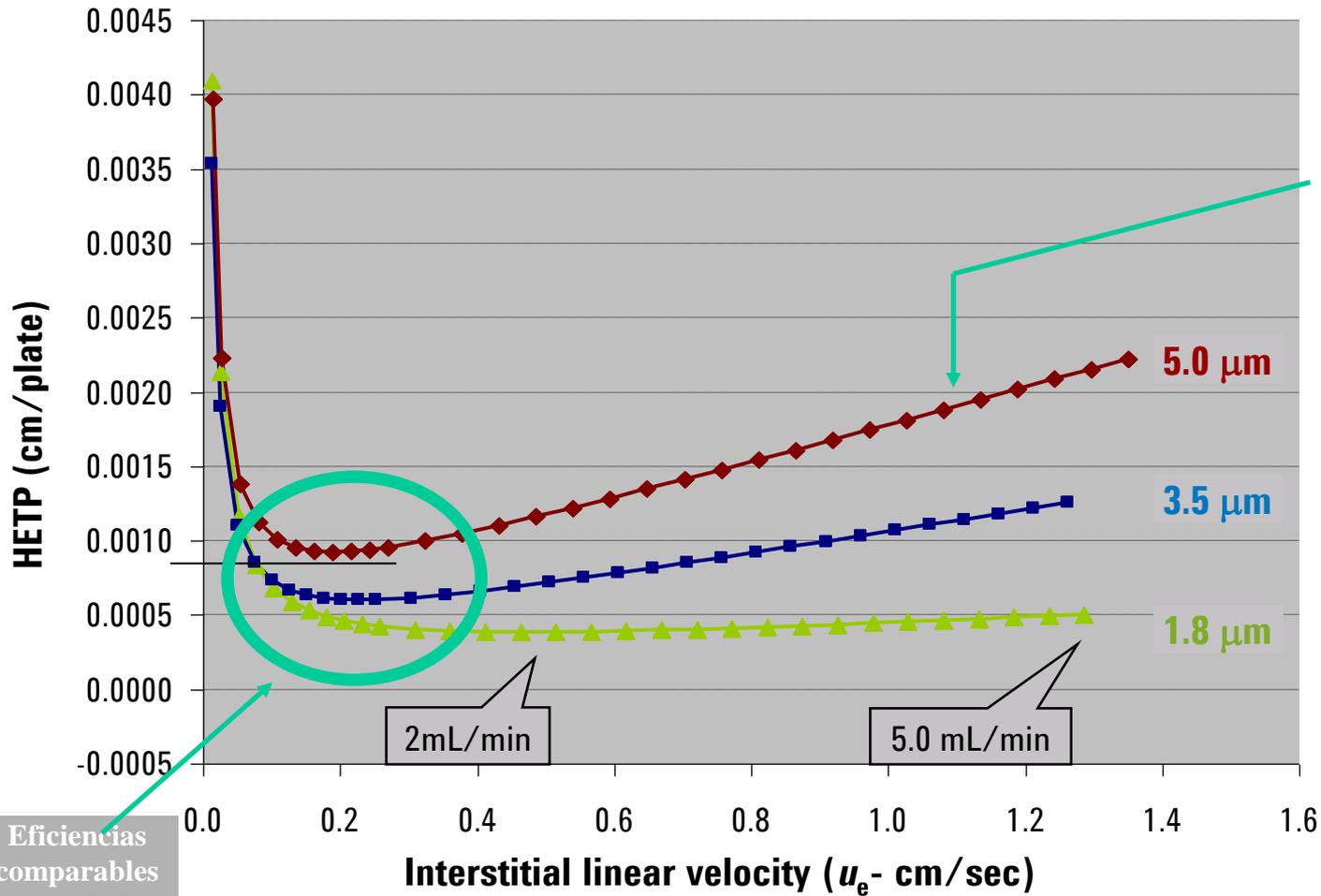
- Tamaño de partícula:

Término	Abrev.	Columna	Tamaño Partícula	D.I.
		Longitud		
Rapid Resolution LC	RRLC	< 2µm*	1 – 4.6mm	15 – 150mm
Ultra-fast LC**	UFLC	< 2µm*	1 – 4.6mm	15 – 50mm
HPLC convencional	HPLC	> 2 – 10µm	1 – 4.6mm	15 – 300mm

\* 1.8µm = Tamaño Partícula de las Columnas Agilent Zorbax

\*\* Requiere Detectores con Frecuencias Adquisición > 10Hz

# Importancia del tamaño de partícula



Pérdidas de eficiencia con incrementos de flujo

## Mayor Velocidad

- Inyecciones en columnas mas cortas con menores tamaños de partícula a mayores velocidades
- Ganancias en velocidad: 5-10x

Partícula	$H_{\min}$
5.0 $\mu\text{m}$	9.3 $\mu\text{m}$
3.5 $\mu\text{m}$	6.0 $\mu\text{m}$
1.8 $\mu\text{m}$	3.8 $\mu\text{m}$

# Selección del D.I. de la Columna según Tipo de Sistema de Bombeo

	Aplicación	D.I. Columna	Flujo típico	Ganancia Teórica en Sensibilidad UV	
<b>CUATERNARIA</b> Mezcla a baja presión	LC Estándar	4.6 mm	1000 µl/min	~ 1	
	Muy utilizadas en ESI →	2.1 mm	200 µl/min	~ 5	
<b>BINARIA</b> Mezcla alta presión	Micro LC	1 mm	40 µl/min	~ 20	
		800 µm	20 µl/min	~ 30	
	LC Capilar	300 µm	4 µl/min	~ 200	
		180 µm	2 µl/min	~ 600	
	Nano LC	100 µm	500 nl/min	~ 2000	
75 µm		250 nl/min	~ 3500		
50 µm		100 nl/min	~ 8500		

Requerirá HPLC's adecuados

Capilar

Nano

# Selección de la Longitud Columna y Tamaño de Partícula del Relleno “versus” Eficacia

- La Eficacia aumenta con la reducción del tamaño de partícula (  $N = f(L / 2d_p)$  )
- El tiempo de análisis se reduce acortando la longitud de la columna. (  $Tr = f(L / F)$  )
- Reduciendo Longitud y Tamaño de partícula, pero manteniendo flujo y n° platos proporcionados por la columna, se conseguirá reducir el tiempo de análisis y consumo de disolvente sin perder Resolución.

Tiempo Análisis*		Longitud (mm)	Eficacia N(5 µm)	Eficacia N(3.5 µm)	Eficacia N(1.8 µm)	
-		<u>150</u>	12,500	21,000	36.000	↑ + Eficacia (N)  + Presión
- 33%	- Tiempo Análisis	100	8,500	14,000	24,000	
- 50%	- Volumen Pico	75	6000	10,500	18.000	
- 67%		50	4,200	7,000	12,000	
- 80%	- Consumo Solvente	30	2.500	4,200	6,500	
- 90%		15	1.250	2,100	2,500	

\* Reducción con respecto a una columna de 150 mm

# Aportaciones de la Temperatura en HPLC

- Permite trabajar a flujos mayores.
- Aumenta el “poder de elución” de la fase móvil.
- Aporta un parámetro adicional para cambiar la selectividad y mejorar la resolución en la separación de algunos compuestos.
- Traslada el flujo óptimo a valores mayores.
- Reduce la pérdida de eficacia al trabajar a flujos elevados.

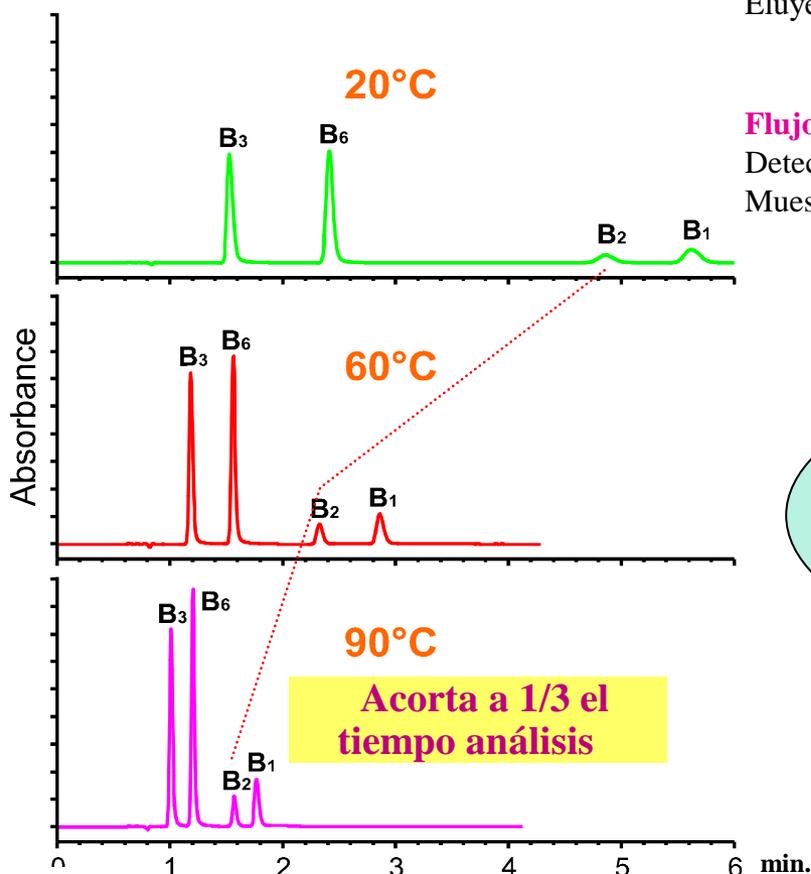


# Reducción del Tiempo de Análisis mediante Incremento de la Temperatura

Baja  
Temperatura

Optimización  
Método

Alta  
Temperatura



Columna: **Zorbax SB-C18, 4.6 x 75 mm, 5  $\mu$ m**

Eluyente: 74% 7.4 mM hexano sulfonato y  
0.07% ácido fosfórico  
26% MeOH

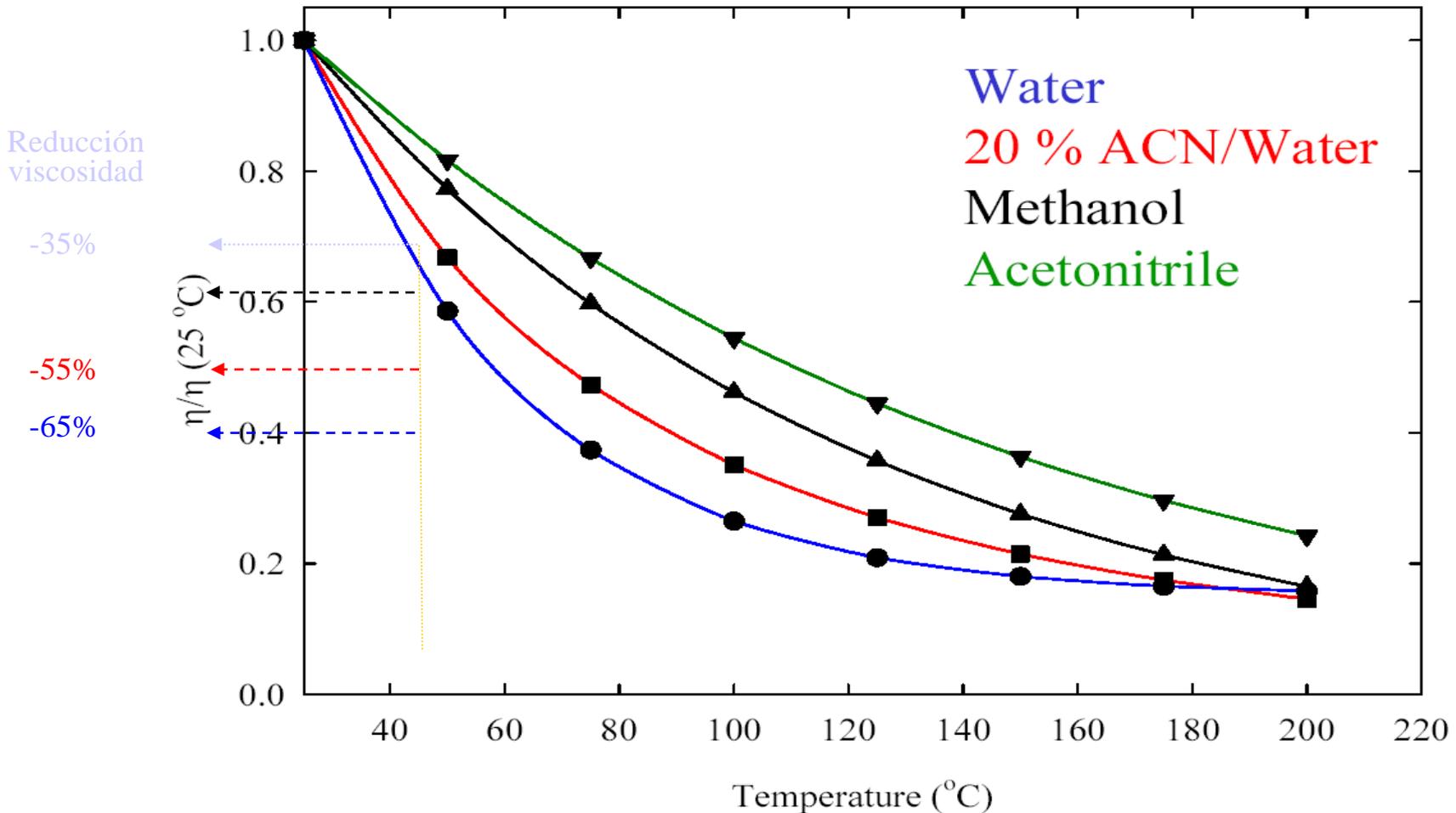
Flujo: **1 mL/min** (constante)

Detección: UV 280 nm

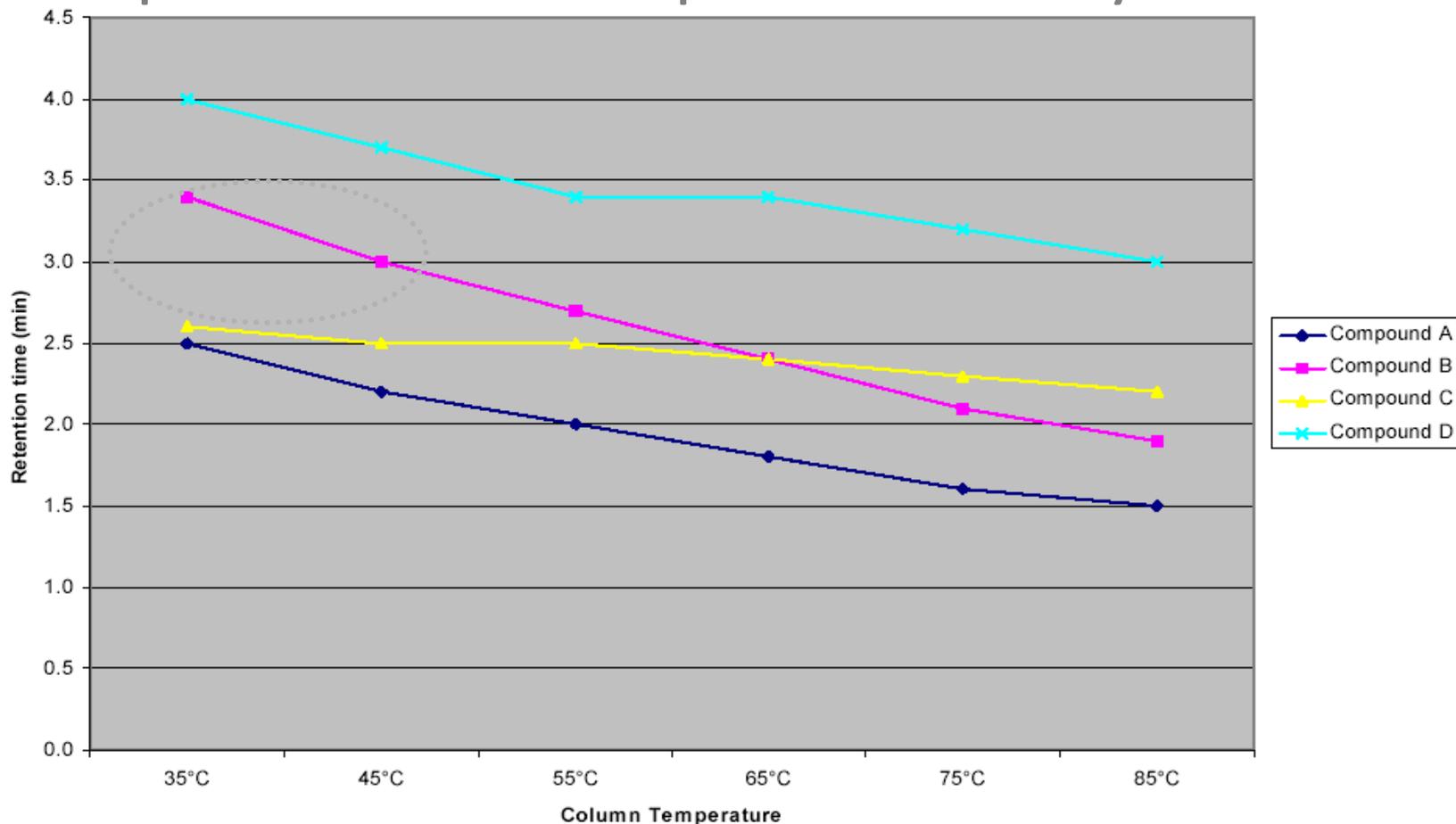
Muestras: Vitaminas B

Trabajar a temperaturas más altas permitirá reducir considerablemente los tiempos de análisis y en ocasiones cambiar la selectividad de la separación.

# Efecto de la Temperatura en la Viscosidad del Eluyente y Presión de Trabajo



# Reducción de los Tiempos y Cambios de Selectividad con la Temperatura. Efecto de la Temperatura en Tiempo Retención y Resolución



---

## ***COMPONENTES: DETECTORES***

### **Características del detector ideal:**

- **Sensible**
- **Selectivo**
- **Lineal**
- **Información cuantitativa**
- **Fiable**
- **Facil de usar**
- **Universal**

**UV-VIS**

**Fluorescence**

**Refractive Index**

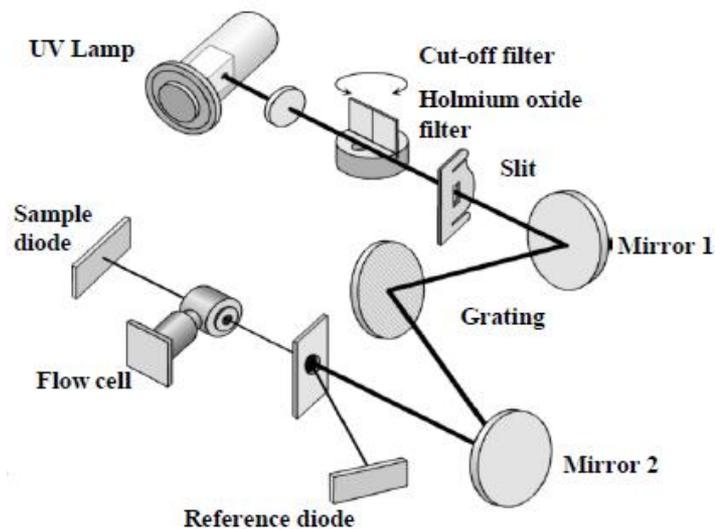
**Light Scattering Detector**

**Electrochemical**

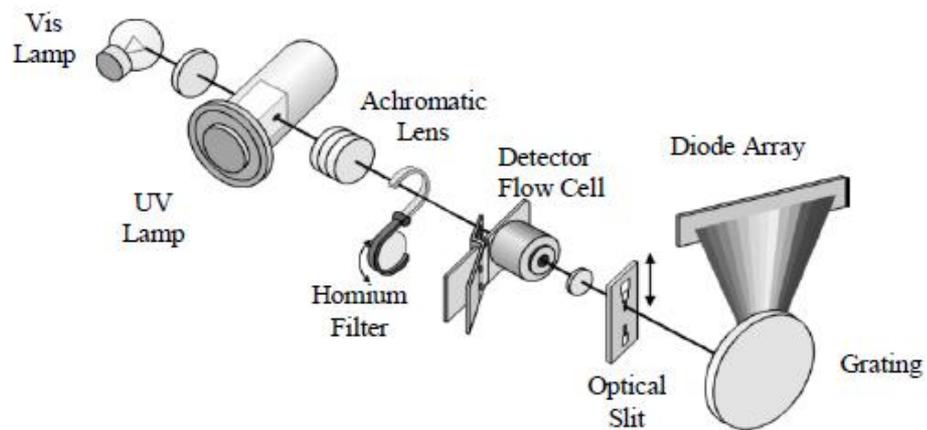
**MSD**

# COMPONENTES: DETECTORES

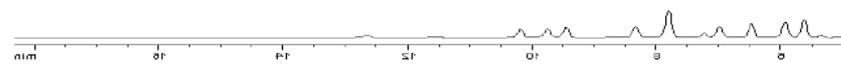
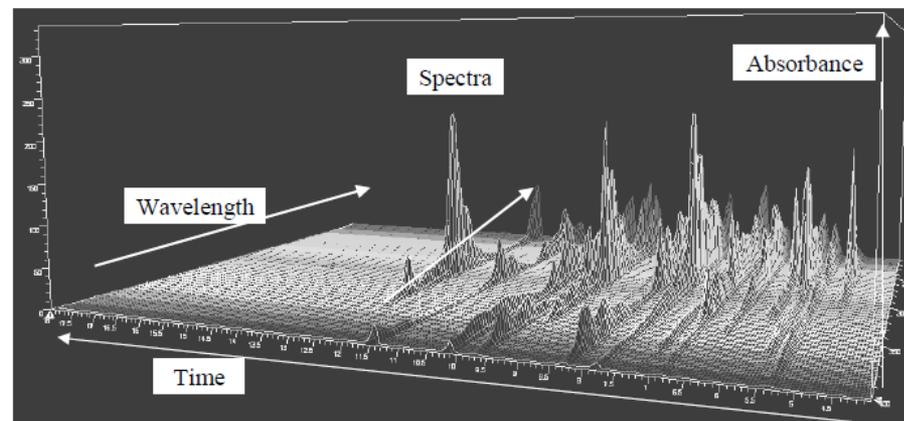
## • Detectores de UV-Vis:



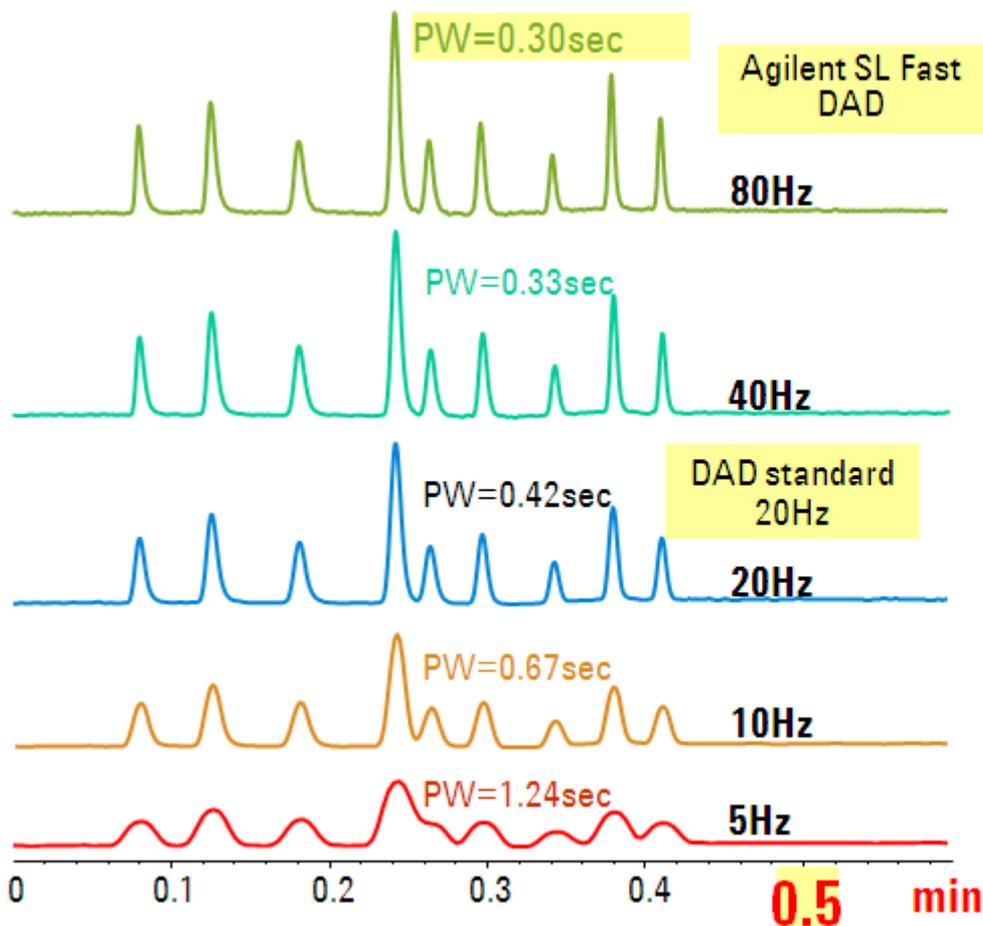
Detector de longitud de onda variable



Detector de Diode Array



# PARAMETROS DEL DETECTOR: Frecuencia de Adquisición



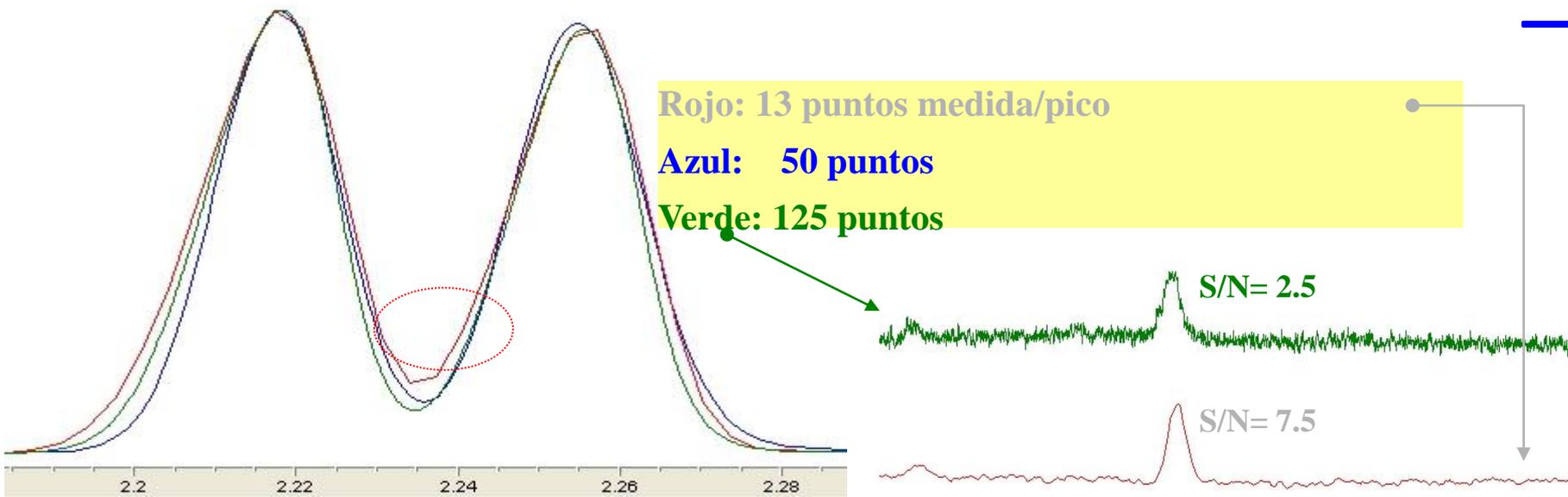
Frec. Adq.	Ancho pico (seg.)	Resolución	Capacidad sep. picos
80 Hz	0.300	2.25	60
40 Hz	0.329	2.05	55
20 Hz	0.416	1.71	45
10 Hz	0.666	1.17	29
5 Hz	1.236	0.67	16

## 80Hz "versus"

- |                         | 10Hz  | 20Hz   |
|-------------------------|-------|--------|
| • Ancho pico:           | -55%  | (-30%) |
| • Resolución:           | +90%  | (+30%) |
| • Capacidad sep. picos: | +120% | (+40%) |
| • Eficiencia aparente:  | +260% | (+70%) |

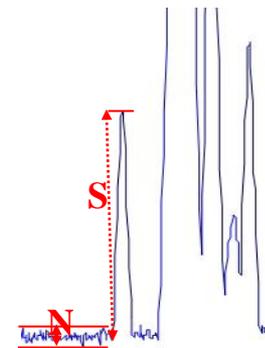
Muestra: Mezcla de Fenolas  
 Columna: Zorbax SB-C18, 4.6x30, 1.8um  
 Gradiente: 50-100% ACN en 0.3min  
 Celda det.: 5ul

# PARAMETROS DEL DETECTOR: Ajuste Frecuencia de Adquisición



Una pequeña pérdida en resolución mejora considerablemente la sensibilidad

RSD% requerido	Mín. S/N (p/p)
1%	100
2%	50
5%	20
10%	10



# MODOS DE OPERACIÓN EN HPLC



Types of Compounds	Mode	Stationary Phase	Mobile Phase
Neutrals Weak Acids Weak Bases	Reversed Phase	C18, C8, C4 cyano, amino	Water/Organic Modifiers
Ionics, Bases, Acids	Ion Pair	C-18, C-8	Water/Organic Ion-Pair Reagent
Compounds not soluble in water	Normal Phase	Silica, Amino, Cyano, Diol	Organics
Ionics Inorganic Ions	Ion Exchange	Anion or Cation Exchange Resin	Aqueous/Buffer Counter Ion
High Molecular Weight Compounds Polymers	Size Exclusion	Polystyrene Silica	Gel Filtration- Aqueous Gel Permeation- Organic

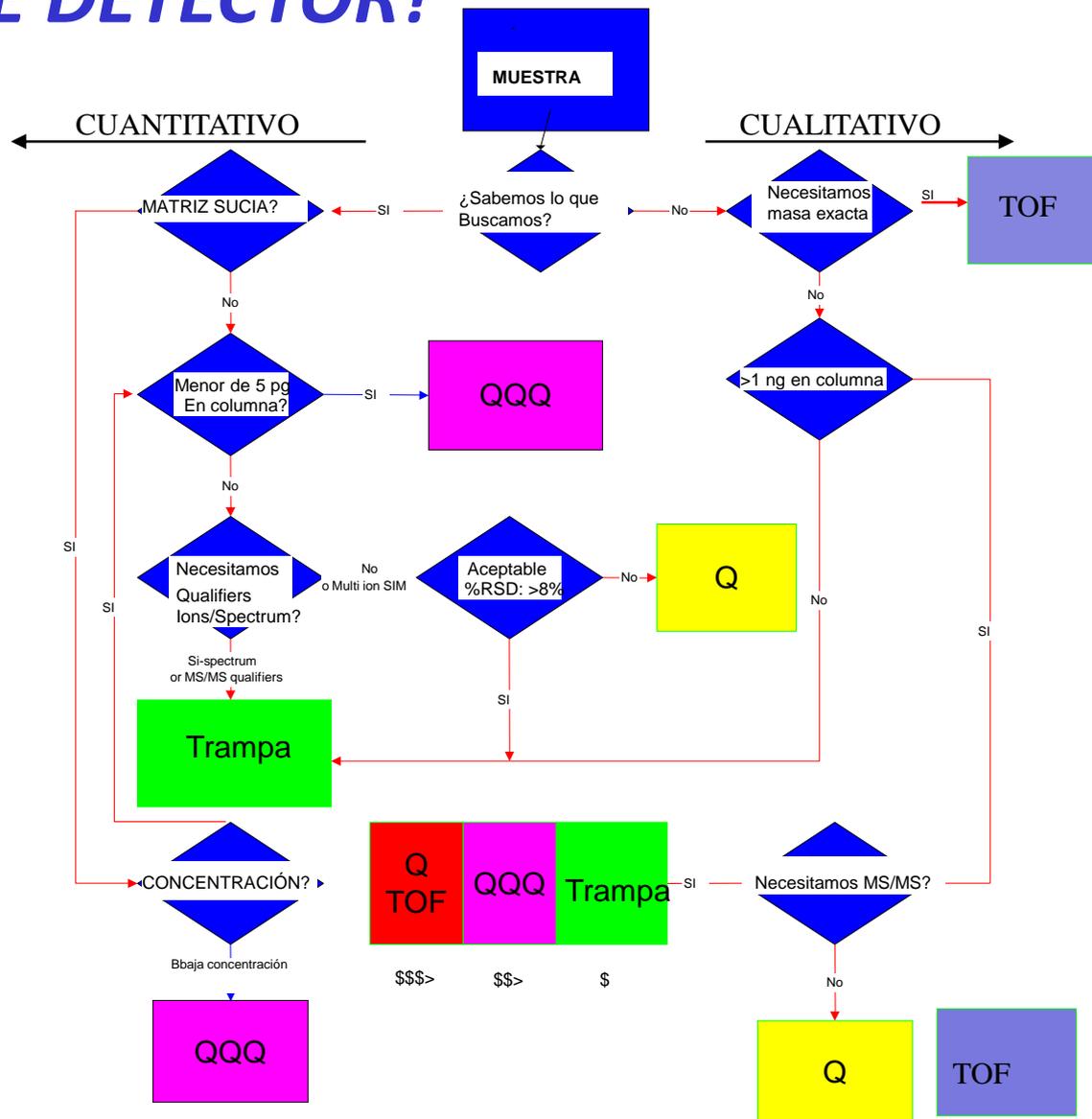
---

# *ACOPLAMIENTO DE DETECTORES DE ESPECTROMETRIA DE MASAS*

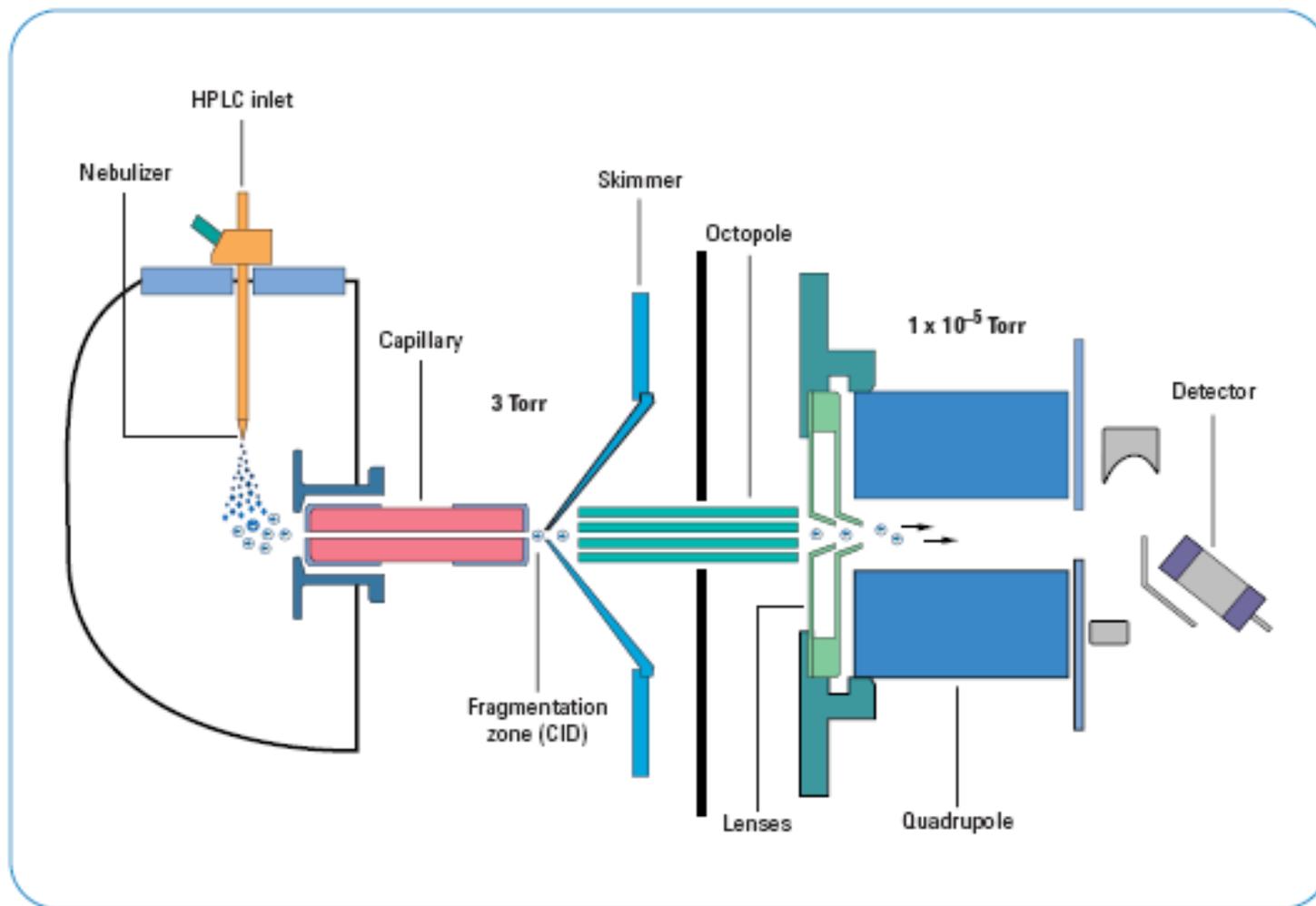
---



# ¿PERO QUÉ DETECTOR?

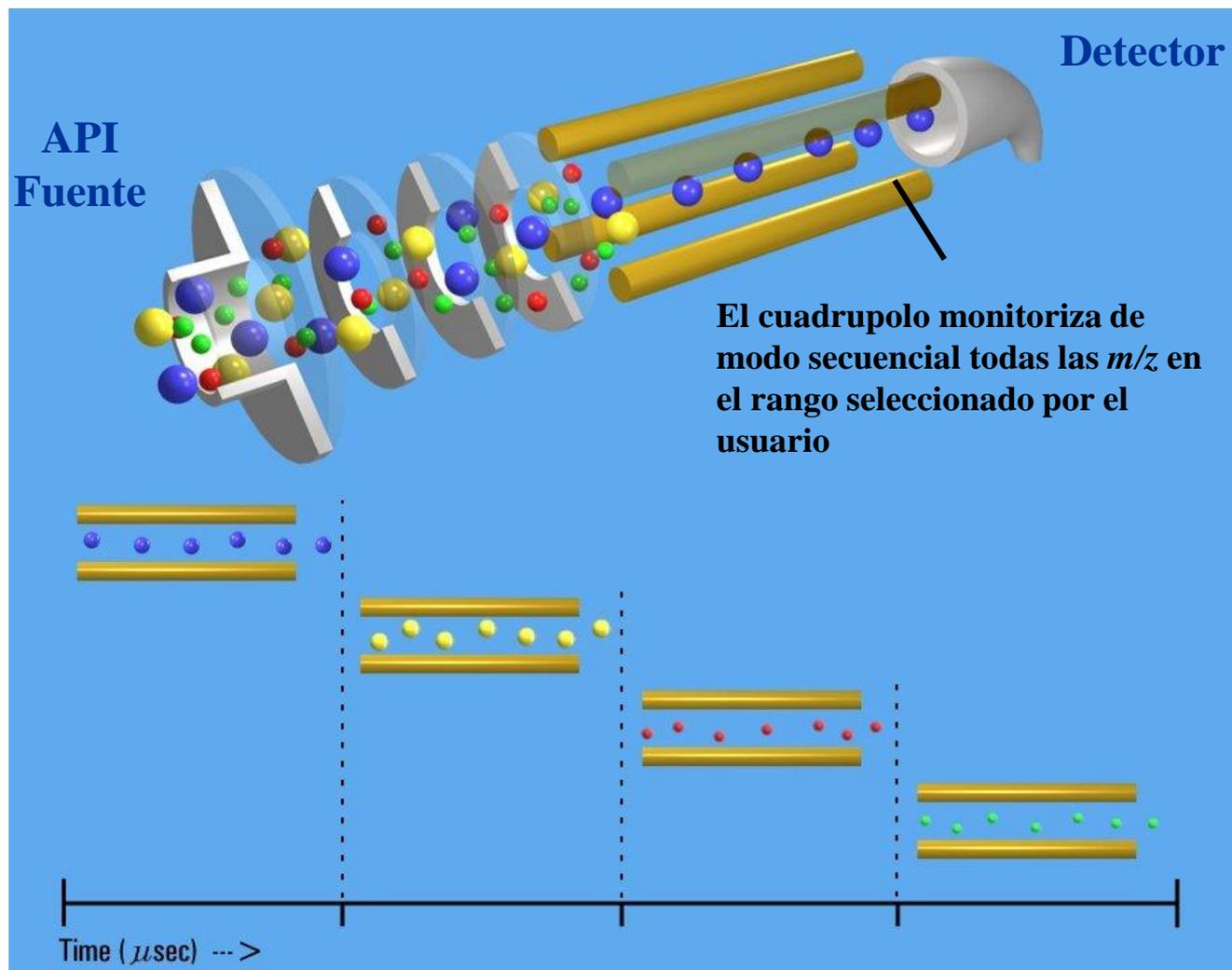


# ESQUEMA DEL DETECTOR DE CUADRUPOLO SIMPLE



video

# Modos de trabajo. *Cuadrupolo Simple: Full Scan MS*



# Modos de trabajo.

## *Cuadrupolo Simple: Trabajo en SIM*

La mejor sensibilidad para cuantificación

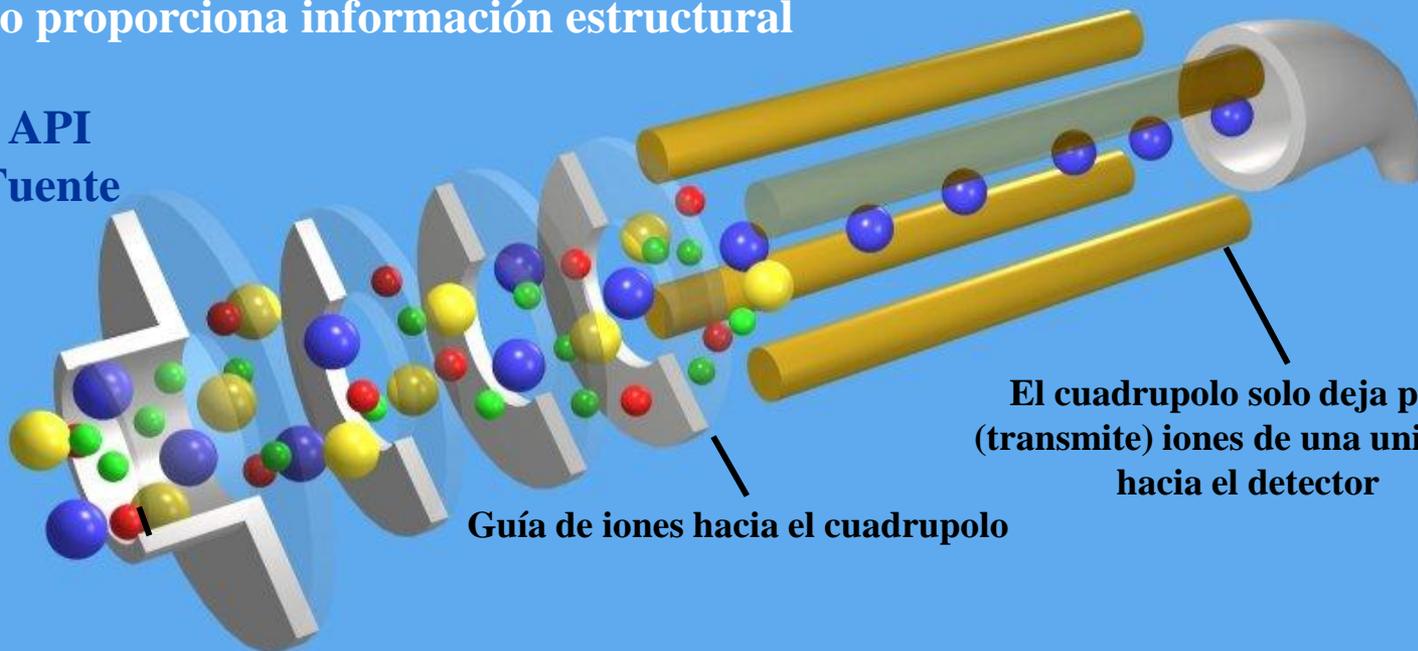
Buena selectividad

La cromatografía puede mejorar la especificidad

No proporciona información estructural

API  
Fuente

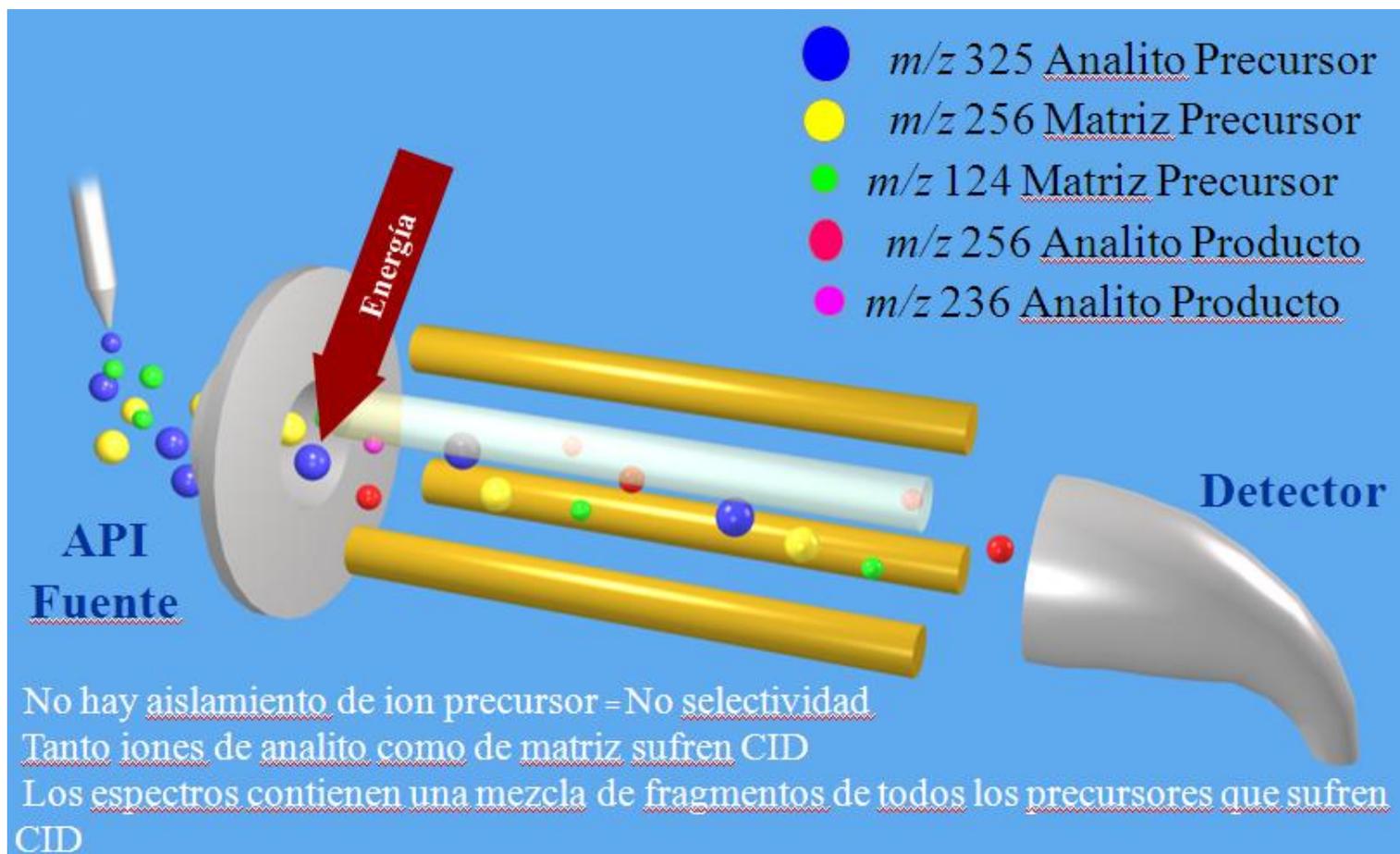
Detector



El cuadrupolo solo deja pasar  
(transmite) iones de una única  $m/z$   
hacia el detector

Formación de iones +/- y de  
especies neutras

# Modos de trabajo. *Cuadrupolo Simple: CID en la fuente*



# Fuentes en LCMS

**Multimodo simultaneo ESI/APCI**

**HPLC-Chip +sensibilidad**

**APCI**

**"Single & Dual" Electrospays (ESI)**

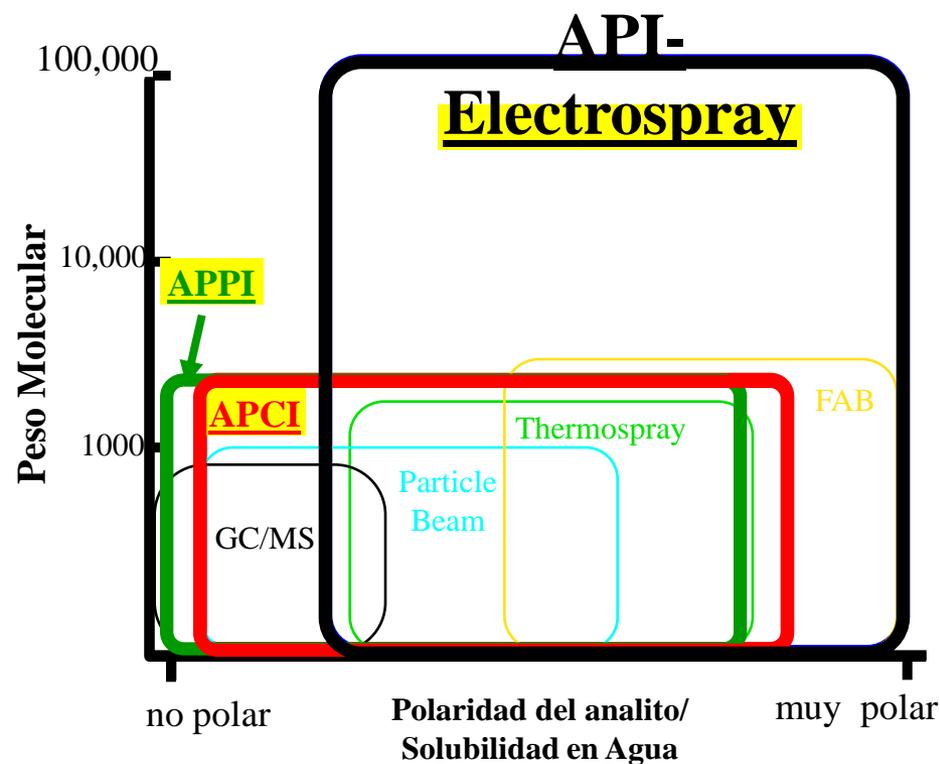
**"Single & Dual" Nanosprays (Nano-ESI)**

**APPI**

**PDF-MALDI**

**JetStream ESI**

# Aplicabilidad relativa de las técnicas de ionización LC/MS



Las interfases LC/MS tipo API (Electrospray /APCI) son hoy en día las más utilizadas

## API-Electrospray:

- La técnica de ionización más suave.
- **Ideal también para compuestos lábiles.**
- Interfase con mayor sensibilidad y aplicabilidad.
- Válida para compuestos de baja-media a muy alta polaridad que se puedan ionizar en solución.
- Mediante la formación de iones con múltiples cargas, permite el análisis de compuestos de muy elevado peso molecular.

## APCI:

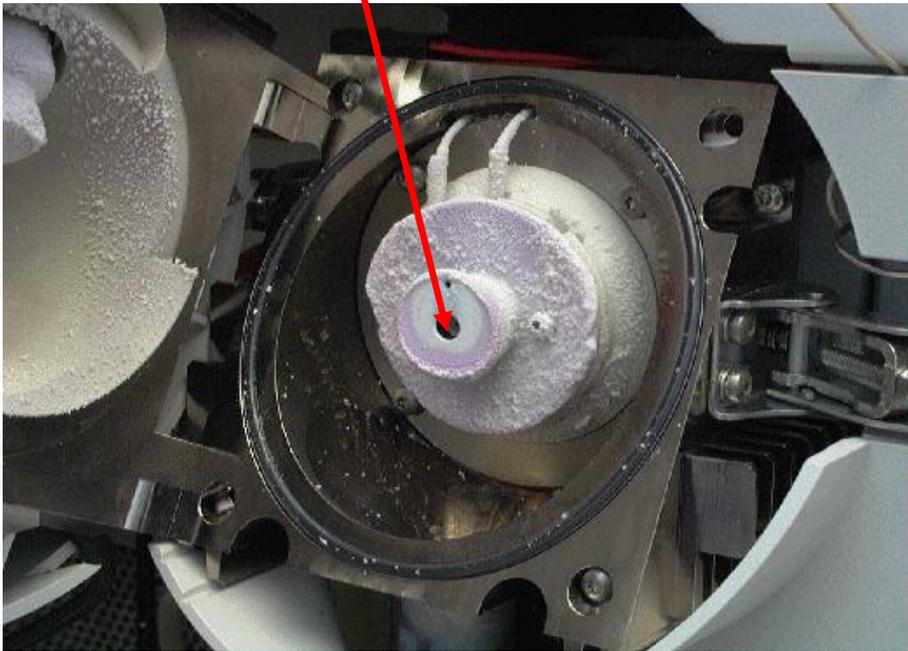
- Válida para compuestos de baja a alta polaridad; no se requiere que estén ionizados en solución.
- **Requiere compuestos con una cierta volatilidad.**
- **Buena sensibilidad para compuestos de polaridad y peso molecular intermedios.**
- Técnica que complementa a API - Electrospray para el análisis de analitos poco polares.

## APPI:

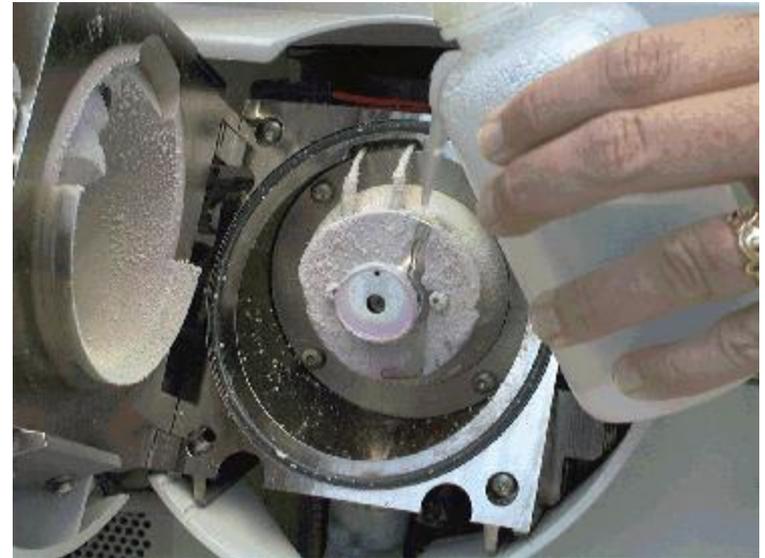
- Válida para compuestos de muy baja a alta polaridad; no requiere que estén ionizados en solución.
- Requiere compuestos con una cierta volatilidad.
- Posibilita el **análisis de compuestos apolares.**

# Robustez y Facilidad de uso

Después de 635 inyecciones de una muestra con alta concentración sales (%)

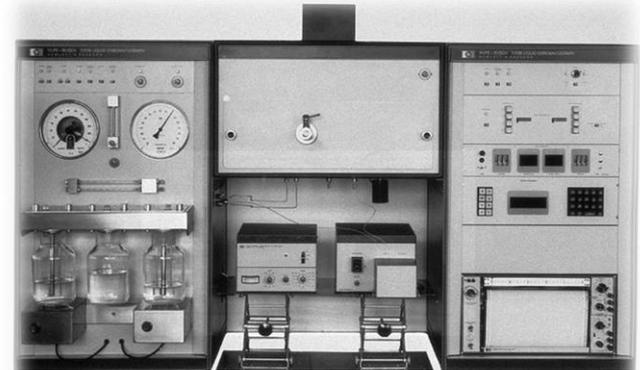


Limpieza de la Fuente



# RESUMEN: Ventajas del acoplamiento LCMS

- Operación robusta
- Identificación y confirmación
- Sensibilidad y Especificidad
- Facilidad de Uso
- Tecnología asequible



1973



LCMS 6150



LCMS6120

---

**¡GRACIAS!**

