

TEMA 17: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

- Razone por qué es necesario trabajar a alta presión en HPLC.
- Indique qué tipo de cromatografía líquida sería más adecuada para la separación de mezclas de compuestos con las siguientes propiedades:
 - Masa molecular mayor de 2000, solubles en agua y con carácter no iónico (Sol. de Geles).
 - Masa molecular menor de 2000, solubles en agua y con carácter iónico (Sol. de intercambio iónico).
 - Masa molecular igual a 340, soluble en agua y con carácter no iónico (Sol.: Reparto fase enlazada normal).
 - Masa molecular igual a 1000, soluble en acetonitrilo. (Sol. Reparto fase enlazada normal)
- Explique qué diferencia existe entre trabajar en modo de elución isocrática y en modo gradiente.
- Explique en qué se diferencia la LC de reparto en fase normal y en fase reversa. Indique asimismo como aumentaría la fuerza de la fase móvil en ambos modos de trabajo.
- Indique los componentes principales de la instrumentación empleada en LC y la función de cada uno de ellos.
- La separación de cuatro vitaminas del grupo de las cianocobalaminas se llevó a cabo mediante LC en fase reversa, de modo que fueron eluidas con tiempos de retención de 3,9; 5,1; 7,0 y 8,5 min que correspondían a hidroxocobalamina (Cbl-OH), cianocobalamina (Cbl-CN), adenosilcobalamina (Cbl-Ade) y metilcobalamina (Cbl-Me), respectivamente. Se quiere determinar la concentración de estas cuatro vitaminas en una muestra de hígado de pollo, para ello se toman 5 g de la misma de los que se extraen las vitaminas, diluyendo el extracto obtenido hasta 25 mL, inyectándose en el cromatógrafo un volumen de 20 μ L, que proporcionó un cromatograma cuyos datos en área aparece en la tabla siguiente.
 La tabla muestra asimismo los datos obtenidos para 5 disoluciones estándar conteniendo los cuatro compuestos en concentraciones perfectamente conocidas. Para la preparación de dichas disoluciones se partió de una disolución concentrada que contenía 10, 25, 20 y 12 ppm de Cbl-OH, Cbl-CN, Cbl-Ade, Cbl-Me, respectivamente, de la que se tomaron 25, 50, 75, 100 y 125 μ L y se diluyeron hasta 25 mL, inyectándose en el cromatógrafo un volumen de 20 μ L de cada una de estas disoluciones.

Especie	Área					Muestra problema
	Disolución 1	Disolución 2	Disolución 3	Disolución 4	Disolución 5	
Cbl-OH	10,0	20,3	29,8	41,1	49,5	25,4
Cbl-CN	4,90	10,8	15,1	19,8	24,7	11,3
Cbl-Ade	15,4	29,8	45,8	60,7	75,9	50,4
Cbl-Me	3,90	8,10	11,9	16,1	20,5	15,9

(Sol.: [Cbl-OH]=0,126 µg/g; [Cbl-CN]=0,278 µg/g; [Cbl-Ade]=0,331 µg/g; [Cbl-OH]=0,24 µg/g)

7. Para calcular la concentración de las vitaminas en un preparado farmacéutico presentado como solución oral, prescrito en casos de retraso en el crecimiento, se inyectaron 20 µL de la muestra que previamente había sido diluida tomando 2 mL y enrasando hasta 10 mL con agua. En el cromatograma obtenido aparecieron dos picos cromatográficos a los tiempos 3,9 y 7,0 min, de áreas 43,2 y 60,9, respectivamente. Calcule la concentración de las vitaminas en la muestra.
(Sol.: [Cbl-OH]=0,215 µg/mL; [Cbl-CN]<límite de detección para Cbl-CN; [Cbl-Ade]=0,4 µg/mL; [Cbl-Me]<límite de detección correspondiente)
8. Los datos de la tabla siguiente se obtuvieron durante la determinación de antraceno en salmón, empleando LC en fase reversa y detección fluorimétrica. Se adicionó un compuesto como patrón interno a cada disolución estándar y a la muestra.

Concentración de antraceno, ng/mL	Área de pico del analito	Área de pico del patrón interno
0,1	25,5	32,1
0,2	35,9	31,8
0,3	39,7	28,4
0,4	55,0	32,3
0,5	81,8	40,9
Muestra	49,3	39,4

Determine la concentración de antraceno en la muestra para la obtención del correspondiente cromatograma se tomaron 2 g de salmón, que fueron sometidos a digestión suave en microondas y la disolución obtenida enrasada a tratándose 10 mL.

(Sol.: 1,24 ng/g).