

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá D.C.,

Abogado
ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ

ASUNTO	Radicación	07 087 036
	Trámite	011
	Evento	378
	Actuación	519
	Oficio	
	Folios	7

E130.18

Patente de Invención	☐	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☐	Cap. I	☐ Cap. II ☐

No. Solicitud Internacional PCT/EP2006/001433
Fecha de Presentación Internacional 23/Enero/2006

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 123 a 226	24/Agosto/2007
Reivindicaciones:	Folios 227 a 230	24/Agosto/2007
	Folios 298 a 299	23/Mayo/2012
Prioridad:	EP 05356015.7	25/Enero/2005
	EP 05356031.4	11/Febrero/2005
	EP 05356216.1	16/Diciembre/2005

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Método para analizar el ácido fosforoso, el fosetil-Al, o ambos simultáneamente".

El problema planteado en esta solicitud es suministrar métodos para monitorizar el comportamiento de compuestos plaguicidas una vez se han aplicado, que sean específicos y no tengan muchas etapas de manipulación. En particular, para determinar los residuos de Fosetil-Al y su principal metabolito, el ácido fosforoso.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un método para analizar ácido fosforoso y Fosetil-Al presentes en cantidades menores o iguales a 0,00005mg/kg de una muestra, que comprende las etapas siguientes:

- Preparación de la muestra;
- Dilución opcional de la muestra preparada;

Expediente 07 087 036 2do Art 45

- Análisis directo de la muestra diluida mediante cromatografía líquida de gran resolución (HPLC)/espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): G01N 30/06 // 30/72

4. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 2 a 4 no se encuentran debidamente sustentadas en la descripción puesto que los ensayos sólo hacen referencia al análisis en muestras de agua y suelos, sin mencionar muestra de tejidos vegetales, muestra de aire, un líquido humano y una muestra de productos o tejidos animales, puesto que son matrices completamente diferentes y la preparación de la muestra posiblemente varié o quizás sea necesario un tratamiento previo o sea necesario cambiar la columna o tal vez el solvente², puesto que "la preparación de la muestra es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea el analito es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores como ser: propiedades físicas y químicas del analito, concentración de analito en la muestra, naturaleza de la matriz de la muestra, forma en que se presenta el analito en la muestra, compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico, tipo de detector, compatibilidad con el detector" (Quatrocchi, p 66, 204 – 206, folios 311, 316 – 318). El solicitante debe definir específicamente la materia y el alcance de la invención a través de las características técnicas esenciales que se encuentren enteramente soportadas en la descripción.

Las reivindicaciones 11 – 13 establecen los límites de detección en mg/kg. Lo anterior corresponde a un resultado a alcanzar por la metodología reclamada, lo cual no hace parte de las características técnicas esenciales. Puesto que es bien conocido en el estado del arte que en toda validación se establece el límite de detección del método y el límite de cuantificación, aunque este último no es mencionado, puesto que el primero permite saber la menor concentración de analito que puede ser detectado con confianza y el segundo es estrictamente la concentración más baja de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de precisión de la repetibilidad y exactitud². Por lo tanto va hacer el resultado a alcanzar por el método.

La reivindicación 1 no es clara la expresión "menores o iguales", puesto que es imprecisa, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por una expresión, un término preciso o un rango concreto

Las características técnicas esenciales del método definido en la reivindicación 1 pertenecen a métodos de validación ampliamente conocidos en el estado del arte^{1 3 4}, en donde los pasos generales son preparar la muestra, diluir la muestra de ser necesario, lo cual se encuentra estrechamente ligado a la concentración del analito a determinar y por último analizar la muestra en el cromatógrafo sea cual sea la técnica cromatográfica a emplear, lo que realmente varía son las condiciones cromatográficas. La descripción y las realizaciones preferidas evidencian que se realiza un método de validación lo cual es un protocolo general para uso rutinario del laboratorio, puesto que después de los anteriores pasos sigue optimizar las condiciones, chequear problemas y validar el método³, los cuales son pasos conocidos para el desarrollo de métodos de HPLC (Quatrocchi, p 241 – 243, 269, folio 319 – 322).

5. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: Enero 25 de 2005 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	Hernández F. et Al. Journal of Chromatography B, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol 808, Nº 2, p 229-239	An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	05/Septiembre/2004
D2	Hernández F. et Al. Journal of AOAC international, vol 86, Nº4, p 832 – 838	Rapid Determination of Fosetyl-Aluminum Residues in Lettuce by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry	2003

D1 divulga (folios 268, 270 – 271, páginas 229, 231 – 232, párrafos 2.1 – 2.5) un método para la determinación de 4-nitrofenol (PNP) (metabolito paration y metil-paration) y 3-metil-4-nitrofenol (3-Me-PNP) (metabolito fenitroton) en la orina humana por el acoplamiento cromatografía líquida en columna combinada con espectrometría de masas de tandem (LC – LC – MS/MS). Esta técnica permite la determinación de metabolitos libres a nivel de los sub – ppb por inyección de la orina directamente en el sistema y los metabolitos totales después de una hidrólisis simple enzimática. Además, proponen un método multiresiduo LC-MS/MS para evaluar los niveles de otro paration y metil-paration. Este acercamiento permite la determinación de simultánea de dimetil fosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), 4-nitrofenolsulfato y 4-nitrofenolglucorinodo sin tediosos tratamientos de la muestra.

D2 divulga (folios 279 – 281, páginas 832 – 834) un método para la determinación sensible y selectiva de residuos de fosetil-aluminio (Al) en muestras vegetales. Fosetil- Al es determinado por la cromatografía - electroespray- espectrometría de masas en tandem después de la adición de acetato de tetrabutilamonio como el reactivo que aparee el ión. El método desarrollado permite la determinación exacta y rápida de bajos niveles de residuos de fosetil-Al en la lechuga con muy poco manejo de la muestra y buena sensibilidad.

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 1 consiste en un “método para análisis simultaneo directo de ácido fosforoso y Fosetil-Al presentes en cantidades menores o iguales a 0,00005mg/kg de una muestra, que comprende las etapas siguientes:

- Preparación de la muestra;
- Dilución opcional de la muestra preparada;
- Análisis directo de la muestra opcionalmente diluida mediante cromatografía líquida de gran resolución (HPLC)/espectrometría de masas en tandem (MS/MS) ”

¹Quatrocchi Oscar A. et Al (1992). INTRODUCCIÓN A LA HPLC. Aplicación y Práctica. Argentina- Buenos aires. Capítulos 4, 9 a 12 (folios 307 – 328).

²Eurachem Working Group (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. p 17 – 19, 31 – 33 (folios 299 – 306).

³Morell Ignacio, Candela Lucia (1998). PLAGUICIDAS Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Publicaciones de la Universitat Jaume I, p 140 – 141 (folios 329 - 332).

⁴Barquero Q. Miriam (2004). MECANISMOS Y APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTO DESEMPEÑO. Editorial de la Universidad de Costa Rica, ciudad universitaria, p 10 – 11 (folios 333 – 336)

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
método	Método	Método
Preparación de la muestra	Preparación de la muestra de orina	Preparación de la muestra de lechuga
Dilución opcional de la muestra preparada	Una dilución de tres veces	Una dilución de cinco veces
Análisis directo de la muestra opcionalmente diluida mediante cromatografía líquida de gran resolución (HPLC)/espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	50µL de muestra preparada se inyectan directamente al sistema cromatografía líquida (HPLC)-espectrometría de masas en tándem	20µL de muestra preparada se inyectan directamente al sistema cromatografía líquida (Waters Alliance 2690)-espectrometría de masas en tándem

Las características **esenciales** de la composición definida en la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en D1 y D2 porque:

El documento D1 enseña un método para la determinación directa de organofosforados pesticidas, metabolitos libres de 4-nitrofenol (PNP) y 3-metil-4-nitrofenol (3-Me-PNP) en orina humana a niveles de sub-ppb mediante LC-LC-(ESI)-MS-MS (folio 268 y 270, paginas 229 y 231). Adicionalmente un método de LC-MS/MS es desarrollado para determinación simultanea de otros metabolitos como dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), 4-nitrofenolsulfato (PNP-sulfato) y 4-nitrofenolglucoronido (PNP-glucoronido) con el fin de tener una visión más amplia de la exposición humana a fenitrothion, paration y metil paration (folio 268, página 229). El procedimiento consiste en recolectar las muestras de orina de personas no expuestas y agricultores expuestos a metil paration, se prepara al muestra, se realiza una dilución de tres veces y se inyectan directamente 50µL al sistema cromatografía líquida (HPLC)-espectrometría de masas en tándem (páginas 231 – 232, párrafos 2.1 – 2.5, folios 270 – 271).

Por otro lado, el documento D2 enseña un método para la determinación sensible y selectiva de residuos de fosetil-aluminio (Al) en muestras vegetales mediante la cromatografía – electroespray – espectrometría de masas en tándem (folio 279, página 832). El procedimiento de manera general consiste en preparar las muestras de lechuga y finalmente diluir cinco veces con agua grado LC, agregar solución de acetato de TBA (folio 281, página 834). Luego 20µL de muestra se inyectan directamente al sistema cromatografía líquida (Waters Alliance 2690)-espectrometría de masas en tándem (páginas 832 – 834, folios 279 – 281). En la fase móvil del sistema LC se emplea un gradiente agua – acetonitrilo (folio 280, página 833).

En consecuencia, la reivindicación 1 carece de novedad, según lo divulgado de forma independiente en cualquiera de los documentos D1 y D2.

Las reivindicaciones dependientes 2 – 7 no mencionan alguna característica que haga nuevo al método de la reivindicación independiente 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 8 consiste en “método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la cromatografía líquida de gran resolución se lleva a cabo utilizando una fase móvil que consiste de metanol (35% a 55% v/v) y agua (45% a 65%, v/v) que contiene hasta 2% de ácido fórmico cuya fase móvil se emplea en un modo isocrático.”

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Método	Método	Método
una fase móvil que consiste de metanol (35% a 55% v/v) y agua (45% a 65%,v/v) que contiene hasta 2% de ácido fórmico cuya fase móvil se emplea en un modo isocrático	la fase móvil empleada es acetonitrilo-0,01% de ácido fórmico en agua (25:75 v/v) M1 y acetonitrilo – agua (65:35 v/v)	la fase móvil del sistema LC emplea un gradiente agua – acetonitrilo

Los documentos del estado de la técnica cercanos a la invención corresponden a D1 y D porque:

El documento D1 enseña un método un método de LC-MS/MS es desarrollado para de terminación simultanea de otros metabolitos como dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), 4-nitrofenolsulfato (PNP-sulfato) y 4-nitrofenolglucorinodo (PNP-glucoronido) con el fin de tener una visión más amplia de la exposición humana a fenitroton, paration y metil paration (folio 268, página 229). El procedimiento consiste en recolectar las muestras de orina de personas no expuestas y agricultores expuestos a metil paration, se prepara al muestra, se realiza una dilución de tres veces y se inyectan directamente 50µL al sistema cromatografía liquida (HPLC)-espectrometría de masas en tándem, donde la fase móvil empleada es acetonitrilo-0,01% de ácido fórmico en agua (25:75 v/v) M1 y acetonitrilo – agua (65:35 v/v) (páginas 231 – 232, párrafos 2.1 – 2.5, folios 270 – 271).

El documento D2 enseña un método para la determinación sensible y selectiva de residuos de fosetil-aluminio (Al) en muestras vegetales mediante la cromatografía – electrospray – espectrometría de masas en tándem (folio 279, página 832). El procedimiento de manera general consiste en preparar las muestras de lechuga y finalmente diluir cinco veces con agua grado LC, agregar solución de acetato de TBA (folio 281, página 834). Luego 20µL de muestra se inyectan directamente al sistema cromatografía liquida (Waters Alliance 2690)-espectrometría de masas en tándem (páginas 832 – 834, folios 279 – 281). En la fase móvil del sistema LC se emplea un gradiente agua – acetonitrilo, en donde el porcentaje de acetonitrilo fue cambiando 0 min, 5%; 4,6min, 15%; 4,7min, 60%; 7min 60%; 7,1min, 5% y 11min, 5% (folio 280, página 833).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 8, y el método de D1 consiste en que se emplea metanol en la fase móvil y las proporciones entre los disolventes, mientras que en D1 se emplea acetonitrilo y otras proporciones.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 8, y el método de D2 consiste en que se emplea metanol y ácido fórmico en la fase móvil y las proporciones entre los disolventes, mientras que en D1 se emplea acetonitrilo y otras proporciones.

No existe evidencia que las diferencias de fase móvil y las proporciones entre el método de D1 o el de D2 y la fase móvil del método de la reivindicación 8 introduzcan un efecto técnico inesperado, que represente para la persona de nivel medio versada en la materia una mejor eficiencia en la determinación de ácido fosforoso y Fosetil-Al, en cuanto a rendimiento, manipulación y especificidad.

Además es conocido en el estado de la técnica que la elección de solventes dependerá de diferentes factores y de sus propiedades, tales como poder solubilizante de las muestras, baja reactividad, compatibilidad con el detector, adecuado punto de ebullición, baja viscosidad, seguridad y alto grado de pureza. Además tanto el metanol como el acetonitrilo son solventes habituales en HPLC;

además la escogencia de la fase móvil dependerá del tipo y magnitud de interacción por lo tanto dependiendo la muestra y otros factores se pude emplear el triangulo de selectividad de solventes propuesto por Snyder; por lo tanto un cambio en la selectividad es fácilmente modificable siguiendo una serie de pasos donde los cromatogramas resultantes indicaran si el cambio de selectividad fue satisfactorio como para reemplazar el solvente inicial o inclusive considerar una mezcla ternaria (Quatrocchi, p 66, 68, 74 y 284 – 288, folios 311 – 313, 323 – 327).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo a resolver es plantear una alternativa a la fase móvil del método conocido según D1 o D2 para mejorar la eficiencia en la determinación de ácido fosforoso y Fosetil-Al, en cuanto a rendimiento, manipulación y especificidad.

En consecuencia, el experto en la materia, teniendo en cuenta las enseñanzas en cuanto a selección de fase móvil y características de los solventes fácilmente realizara ensayos para cambiar el acetonitrilo del método de D1 o D2 por metanol para llegar así al objeto de la reivindicación 8 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 9 – 10 no mencionan características inventivas adicionales, tampoco pueden ser consideradas inventivas.

Conclusión:
Las reivindicaciones 8 – 10 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

7. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Hernández F. et Al. Journal of Chromatography B, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol 808, N° 2, p 229-239	1 – 45	Novedad
D2	Hernández F. et Al. Journal of AOAC international, vol 86, N°4, p 832 – 838	1 – 45	Novedad

8. Respuesta a los argumentos del solicitante

1. Afirma el solicitante que “la expresión menores o iguales... de ninguna manera es imprecisa ya que lo que pretende es limitar la invención”

Se aclara al solicitante que se está contradiciendo puesto que si bien es cierto, tal como lo expresa, que dicha expresión está en la parte caracterizante y por lo tanto no afecta la definición de la reivindicación, aunque si da características implícitas, por otro lado menciona que con dicha expresión se está limitando la invención. Por lo tanto seria claro que esta expresión es imprecisa y todo corresponderá al resultado a alcanzar por el método, que sería determinar simultáneamente ácido fosforoso y Fosetil-Al en cantidades menores o iguales a 0,00005mg/kg.

2. Afirma el solicitante que “ninguno de los documentos citados D1 o D2 describe tal análisis simultaneo directo de los dos compuestos mencionados”

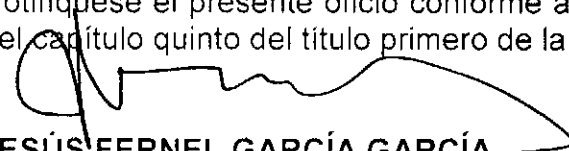
Se aclara que la parte caracterizante de la reivindicación 1 consiste en una serie de etapas como lo son: preparación de la muestra, dilución y análisis en el cromatógrafo, las cuales son etapas ampliamente conocidas en el estado del arte; Expediente 07 087 036 2do Art 45

por lo tanto tal como en frases anteriores lo cito el solicitante "dicha expresión está en la parte caracterizante y por lo tanto no afecta la definición de la reivindicación", tal como sucede con la frase análisis simultaneo directo de ácido fosforoso y Fosetil-Al y por lo tanto dichos documentos si afectan la novedad de la reivindicación.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante y presentarla por escrito

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


JESÚS FERNEL GARCÍA GARCÍA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

27 JUL 2012

Elaborado por: Mayra Alejandra Quintero
Revisado por: Gloria Jacqueline Alfonso

OK

The Fitness for Purpose of Analytical Methods

A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics



This document has been developed by a EURACHEM Working Group from a draft originally produced by LGC. The membership of the EURACHEM group is

Prof P de Bievre	IRMM, Belgium
Dr D Böttger	Hoechst AG, Germany
Dr C Eastwood	Zeneca Specialties, UK
Prof J Hlavay	University of Veszprem, Hungary
Mr M Holmgren	SP, Sweden (Eurolab Secretariat)
Dr W Horwitz	Food and Drug Administration, USA
Dr M Lauwaars	AOAC International, The Netherlands
Dr B Lundgren	SP, Sweden
Prof L Massart	Vrije Universiteit Brussel, Belgium
Prof J Miller	University of Loughborough, UK
Dr J Morkowski	EMPA, Switzerland
Dr B te Nijenhuis	Working Party on Analytical Chemistry (Secretary), The Netherlands
Ms B Nyeland	National Environment Research Institute, Denmark
Dr R Philipp	BAM, Germany
Dr P Radvila	EMPA St Gallen, Switzerland
Prof J Smeyers-Verbeke	Vrije Universiteit Brussel, Belgium
Dr R Stephany	RIVM, The Netherlands
Dr M Suchanek	Prague Institute of Chemical Technology, Czech Republic
Ms C Vandervoort	Dr L Willems Instituut vzw, Belgium
Dr H Verplaetse	Ministry of Economic Affairs - Central Laboratory, Belgium
Ms H Wallien	VTT, Finland
Dr M Walsh	The State Laboratory, Ireland
Prof W Wegscheider	Leoben University of Mining & Metallurgy, Austria
Dr D Westwood	Environment Agency, UK
Mr H J van de Wiel	RIVM, The Netherlands

First Internet Version, December 1998

First English Edition 1.0 - 1998

analytes of interest

Limit of Detection (see Annex A for definitions)

- 6.20 Where measurements are made at low analyte or property levels, e.g. in trace analysis, it is important to know what is the lowest concentration of the analyte or property value that can be confidently detected by the method. The importance in determining this, and the problems associated with it, arise from the fact that the probability of detection does not suddenly change from zero to unity as some threshold is crossed. The problems have been investigated statistically in some detail and a range of decision criteria proposed. Additional confusion arises because there is currently no universal agreement on the terminology applicable. The terms 'limit of detection' or 'detection limit' are not generally accepted although they are used in some sectoral documents^[9,10]. ISO uses as a general term 'minimum detectable value of the net state variable' which for chemistry translates as 'minimum detectable net concentration'^[11]. IUPAC is cautious in the use of 'detection limit', preferring 'minimum detectable (true) value'^[12].
- 6.21 For validation purposes it is normally sufficient to provide an indication of the level at which detection becomes problematic. For this purpose the "blank + 3s" approach will usually suffice. Where the work is in support of regulatory or specification compliance, a more exact approach such as that described by IUPAC^[12] and various others^[13-14] is likely to be appropriate. It is recommended that users quote whichever convention they have used when stating a detection limit.

Limit of Detection (LoD) Quick Reference	
What to analyse	What to calculate from the data
a) 10 independent sample blanks measured once each or b) 10 independent sample blanks fortified at lowest acceptable concentration measured once each	<i>Sample standard deviation 's'</i> of a) sample blank values, or b) fortified sample blank values Express LoD as the analyte concentration corresponding to a) mean sample blank value + 3s or b) $0 + 3s$
This approach assumes that a signal more than 3s above the sample blank value could only have arisen from the blank much less than 1% of the time, and therefore is likely to have arisen from something else, such as the measurand. Approach a) is only useful where the sample blank gives a non-zero standard deviation. Getting a true sample blank can be difficult.	
c) 10 independent sample blanks fortified at lowest acceptable concentration, measured once each	<i>Sample standard deviation 's'</i> of the fortified sample blank values

Express LoD as the analyte concentration corresponding to sample blank value +4.65s (derives from hypothesis testing)
The 'lowest acceptable concentration' is taken to be the lowest concentration for which an acceptable degree of uncertainty can be achieved.
Assumes a normal practice of evaluating sample and blank separately and correcting for the blank by subtracting the analyte concentration corresponding to the blank signal from the concentration corresponding to the sample signal.
If measurements are made under repeatability conditions, this also gives a measure of the repeatability precision (Annex A, A20)

- 6.22 Note that both the mean and the standard deviation of the sample blank are likely to be dependant on the matrix of the sample blank. Limit of detection will therefore be matrix dependent. Similarly, where such criteria are used for critical decisions, the relevant precision values will need to be re-determined regularly in line with actual operating performance.
- 6.23 For qualitative measurements, there is likely to be a concentration threshold below which specificity becomes unreliable. The threshold may vary if the experiment is repeated at another time with different reagents, fortification, spiking materials, etc. In the example shown in Table 2, positive identification of the analyte has ceased to be 100% reliable below 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Limit of Detection (LoD) - Qualitative Measurements - Quick Reference	
What to analyse	What to calculate from the data
Sample blanks spiked with the analyte at a range of concentration levels. At each concentration level, it will be necessary to measure approximately 10 independent replicates Measurement of the replicates at the various levels should be randomised	A response curve of % positive (or negative) results versus concentration should be constructed, from which it will be possible to determine, by inspection, the threshold concentration at which the test becomes unreliable.

Table 2: Qualitative Analysis - Illustration of how cut-off (i.e. threshold) concentration is determined

Concentration/ $\mu\text{g.g}^{-1}$	No. of replicates	Positive/negative results
200	10	10/0

100	10	10/0
75	10	5/5
50	10	1/9
25	10	0/10

Limit of Quantitation (see Annex A for definitions)

- 6.24 The 'limit of quantitation' (LoQ) is strictly the lowest concentration of analyte that can be determined with an acceptable level of repeatability precision and trueness. It is also defined by various conventions to be the analyte concentration corresponding to the sample blank value plus 5, 6 or 10 standard deviations of the blank mean. It is also sometimes known as 'limit of determination'. LoQ is an indicative value and should not normally be used in decision making.
- 6.25 Note that neither LoD nor LoQ represent levels at which quantitation is impossible. It is simply that the size of the associated uncertainties approach comparability with the actual result in the region of the LoD.

Limit of Quantitation (LoQ) - Quick Reference	
What to analyse	What to calculate from the data
a) 10 independent sample blanks measured once each	Sample standard deviation 's' of sample blank value Express LoQ as the analyte concentration corresponding to the sample blank value plus either: i) 5s, ii) 6s, iii) 10s Getting a true sample blank can be difficult.
b) Fortify aliquots of a sample blank at various analyte concentrations close to the LoD.	Calculate the standard deviation 's' of the analyte value at each concentration. Plot s against concentration and put assign a value to the LoQ by inspection.
Measure, once each, 10 independent replicates at each concentration level.	Express LoQ as the lowest analyte concentration which can be determined with an acceptable level of uncertainty.
Normally LoQ forms part of the study to determine working range. It should not be determined by extrapolation below the lowest concentration fortified blank. If measurements are made under repeatability conditions, a measure of the repeatability precision at this concentration is also obtained.	

(f) The tools of validation

- 6.48 **Blanks:** Use of various types of blanks enable assessment of how much of the measured signal is attributable to the analyte and how much to other causes. Various types of blank are available to the user:
- 6.48.1 **Reagent blanks:** Reagents used during the analytical process (including solvents used for extraction or dissolution) are analysed in isolation in order to see whether they contribute to the measurement signal. The measurement signal arising from the analyte can then be corrected accordingly.
- 6.48.2 **Sample blanks.** These are essentially matrices with no analyte. They are difficult to obtain but such materials are necessary to give a realistic estimate of interferences that would be encountered in the analysis of test samples.
- 6.49 **Samples / test materials:** Test materials taken from real samples are useful because of the information they yield on interferences *etc.* which could be realistically encountered in day-to-day work. If the true analyte content of a test material is accurately known it can be used as a way of assessing the accuracy of the method. However the true analyte content is usually difficult to determine unless there is the possibility of using other methods which are known to show negligible bias.
- 6.50 **Fortified materials / solutions:** These are materials or solutions which have been fortified with the analyte(s) of interest. The fortification is usually made by spiking. These materials or solutions may already contain the analyte of interest so care is needed lest fortification inadvertently leads to levels outside of the range of applicability of the method. Fortification with a known amount of analyte enables the increase in response to the analyte to be measured and calculated in terms of the amount added (assuming 100% recovery), even though the absolute amounts of analyte present before and after the fortification are not known. Note that most methods of fortification add the analyte in such a way that it will not be as closely bound to the sample matrix as it would be if it was present naturally. Therefore, recovery determinations obtained by fortification can be expected to be over-optimistic.
- 6.51 **Spiked materials:** These are similar to fortified materials, indeed to some extent the terms are interchangeable. Spiking does not necessary have to be restricted to the analyte of interest. It could include anything added to the sample in order to gauge the effect of the addition. for example the sample could be spiked with varying amounts of a particular interference in order to
-

-
- judge at what concentration of the interferent, determination of the analyte was adversely affected. The nature of the spike obviously needs to be identified.
- 6.52 **Incurred materials:** These are materials in which the analyte of interest may be essentially alien, but has been introduced to the bulk at some point prior to the material being sampled. The analyte is thus more closely bound in the matrix than it would be had it been added by spiking. The analyte value will depend on the amounts of analyte in contact with the material, the rates of take-up and loss by the matrix and any other losses through metabolism. The value of incurred sample for calibration purposes depends on how well the analyte value can be characterised. The following are examples of incurred materials:
1. Herbicides in flour from cereal sprayed with herbicides during its growth.
 2. Growth promoters in meat derived from beast fed with feeds containing the promoters
 3. Active ingredients in pharmaceutical formulations added at the formulation stage.
- 6.53 **Independently characterised materials:** It is difficult to determine the bias of a method without knowing the true analyte content of the test material. If a material has been characterised by other means, for example, by a method which is known to have negligible bias, then it can be used as a reference material, a comparison can be made and the bias of the method under examination assessed.
- 6.54 **(Measurement) Standards:** Care must be taken when referring to standards as the term is also commonly used to refer to written standards, such as ISO standards. Where the term is used to refer to substances used for calibration or identification purposes it is convenient to refer to them as measurement standards or calibrants. These are traditionally thought of as solutions of single substances but in practice can be anything in which a particular parameter or property has been characterised to the extent it can be used for reference or calibration purposes. The term standard includes items in which a range of physical parameters may be calibrated (e.g. a calibrated thermometer). Strictly, these are physical standards.
- 6.55 **Reference materials:** It is commonplace to confuse **reference materials** with **certified reference materials** ^[22] (and see Annex A). *Reference materials* can be virtually any material used as a basis for reference, and could include laboratory reagents of known purity, industrial chemicals, or other artefacts. The property or analyte of interest needs to be stable and homogenous but the material does not need to have the high degree of characterisation, traceability and certification more properly associated with certified reference materials.
- 6.56 **Certified reference materials:** The characterisation of the parameter of interest in a **certified reference material** is generally more strictly controlled than for a **reference material**, and in
-

addition the characterised value is certified with a stated uncertainty by a recognised institution. Characterisation is normally done using several different methods, so that as far as possible, any bias in the characterisation is reduced or even eliminated.

- 6.57 **Statistics:** This is useful for analysing the variability inherent in analytical measurements. Analysts should familiarise themselves with at least the more basic elements of statistical theory particularly as an aid to evaluation of accuracy, precision, linear range, limits of detection and quantification and measurement uncertainty. A number of useful books introducing statistics for analytical chemistry are listed in the bibliography.

- 6.57.1 **Replication:** Properly used, this gives the analyst more information on the underlying statistics behind a particular measurement. Experiments involving replicate analysis should be designed to take into account all of the variations in operational conditions which can be expected during routine use of the method. The aim should be to determine typical variability and not minimum variability.

7. Using validated methods

- 7.1 When using someone else's method, whether it is a method developed elsewhere within the laboratory, a published method, or even a standard or regulatory method, there are two issues which need to be considered. Firstly is the existing validation data adequate for the required purpose or is further validation necessary? Secondly, if the existing validation data is adequate, is the laboratory able to achieve the level of performance claimed possible in the method? In other words is the analyst sufficiently competent? Are the available equipment and facilities adequate? If the method has been validated by extensive testing under all extremes of operating conditions, then a new competent analyst will probably operate satisfactorily within the existing performance data, although actually it is more relevant to check the analyst's performance against what is required by the analytical specification, rather than against the existing published data. However, this should always at least be checked. It is the level of performance the analyst can achieve with the method that is important, not what other analysts have achieved in the past.
- 7.2 Usually, standard methods are generally produced by some form of collaborative study and the standardisation bodies which produce them frequently have statistical experts to help ensure that validation studies are correctly designed, performed and evaluated. The level of validation of methods is improving but it is dangerous to assume that just because a method is standard that you can take for granted that its published validation will be adequate.



Introducción a la HPLC

Aplicación y Práctica

Oscar Alberto Quattrocchi
Laboratorios Dr Gador, Buenos Aires
Argentina

Sara Inés Abelaira de Andrizzi
Laboratorios Farmerit, Buenos Aires
Argentina

Raúl Felipe Laba
Laboratorios Dr Gador, Buenos Aires
Argentina

Reservados todos los derechos.

Este libro no puede reproducirse, total o parcialmente, por ningún método gráfico, electrónico o mecánico, incluyendo los sistemas de fotocopia, registro magnetofónico o de alimentación de datos.

Queda hecho el depósito que previene la ley

© 1992, Oscar Quattrocchi, Sara Abelaira, Raúl Laba

IMPRESO EN LA ARGENTINA

en Artes Gráficas Farro SA, California 2750/52,
(1289) Buenos Aires

Contenido

Capítulo 1.	Introducción	3
Capítulo 2.	Instrumental	9
Capítulo 3.	Bases de la Separación	39
Capítulo 4.	Solventes	65
Capítulo 5.	Cromatografía de Fase Ligada	89
Capítulo 6.	Cromatografía en Fase Normal	137
Capítulo 7.	Cromatografía de Intercambio Iónico	153
Capítulo 8.	Cromatografía de Exclusión Molecular	175
Capítulo 9.	Preparación de las Muestras	203
Capítulo 10.	Análisis Cuantitativo	241
Capítulo 11.	Desarrollo de Métodos	267
Capítulo 12.	Validación de Métodos	301
Capítulo 13.	Resolución de Problemas	329
Glosario		385
Índice Alfabético		389

Capítulo 4

Solventes

4.1	Introducción	66
4.2	Propiedades de los solventes	66
	Poder solubilizante de las muestras	66
	Reactividad	67
	Compatibilidad con el detector utilizado	67
	Punto de ebullición	68
	Viscosidad	69
	Seguridad	69
	Pureza	70
	Propiedades químicas	70
4.3	Solventes y aditivos de fase reversa	71
	Agua	71
	Metanol	74
	Acetonitrilo	74
	Tetrahidrofurano	74
	Dioxano	75
	Aditivos: Sales y reactivos de IPC	75
4.4	Solventes de fase normal	77
	Eteres	78
	Hidrocarburos halogenados	78
	Hidrocarburos alifáticos	79
4.5	Preparación de las fases móviles	79
	pH y pH aparente	80
	Filtración	82
	Desgasificación	84
	Métodos de desgasificación	85
	Referencias	88

4.1 Introducción

La fase móvil en HPLC cumple un rol fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero “motor” de las separaciones en fase reversa^{1,2}. De hecho, ésta es la principal diferencia que existe entre la GC y la HPLC, porque en GC la fase móvil es simplemente un carrier de los solutos y su elección depende solamente del detector a utilizar. La única herramienta para modificar la selectividad de una separación es la columna y, por ello, suele utilizarse una columna para cada tipo de separación. Como contrapartida, en HPLC es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan sólo variando la composición de la fase móvil.

4.2 Propiedades de los solventes

Se debe tener en cuenta que no todos los solventes son adecuados para trabajar en HPLC, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para HPLC debe cumplir con algunos requisitos, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- Alto poder solubilizante de las muestras
- Baja reactividad
- Compatibilidad con el detector utilizado
- Adecuado punto de ebullición
- Baja viscosidad
- Seguridad
- Alto grado de pureza

Todas estas características se detallarán a continuación conjuntamente con las propiedades químicas que se deben evaluar para seleccionar un solvente.

Poder solubilizante de las muestras

Es evidente que en LC, la muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible, y de hecho muchas veces no lo es, debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la posible precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil. Es así que, cuando se trabaja con muestras de origen biológico, se debe, en primera instancia, eliminar las

trazas de benceno, y no puede utilizarse como fase móvil en HPLC a longitudes de onda menores a 250 nm.

SOLVENTE	CORTE UV nm	R.I. 25°C	P.E. °C	VISCOSIDAD cps a 25°C
Agua		1.333	100	0.89
Acetona	330	1.356	56	0.30
Acetonitrilo	190	1.341	82	0.34
Ciclohexano	200	1.423	81	0.90
Ciclopentano	200	1.404	49	0.42
Cloroformo	245	1.443	61	0.53
Cloruro de Metileno	233	1.421	40	0.41
Dimetilsulfóxido	268	1.477	189	2.00
Dioxano	215	1.420	101	1.20
Etanol	210	1.359	78	1.08
n-Heptano	195	1.385	98	0.40
n-Hexano	190	1.372	69	0.30
Isooctano	197	1.389	99	0.47
Isopropanol	205	1.384	82	1.90
Metanol	205	1.326	65	0.54
n-Pentano	195	1.355	36	0.22
n-Propanol	240	1.385	97	1.90
Tetrahidrofurano	212	1.405	66	0.46
Tolueno	285	1.494	110	0.55

Tabla 4.1. Propiedades de los solventes habituales de HPLC.

Punto de ebullición

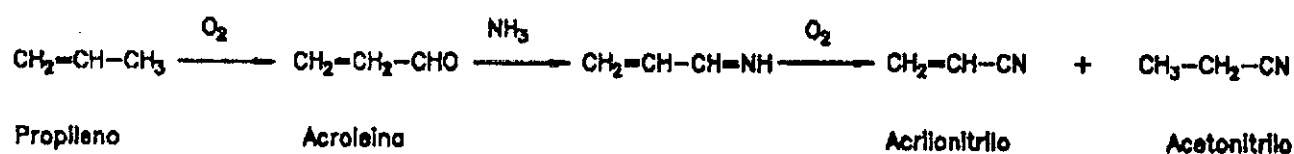
En general, se prefieren los solventes de punto de ebullición intermedio. Si el solvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por otra parte, el ciclo de descompresión en una bomba recíproca puede llevar a la formación de burbujas, lo que se asocia con irregularidades del caudal, atascamiento de pistones, etc. Por el contrario, un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general, con alta viscosidad. Esto último es sinónimo de alta presión (con ello menor vida media de los componentes del instrumento) y baja eficiencia. Sin embargo, un solvente viscoso puede resultar muy útil para modificar la selectividad del sistema, y puede ser apropiado si se emplea en baja proporción.

Metanol

El metanol es el modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffers. Por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico, se lo prefiere frente al acetonitrilo en IPC o cuando es necesario utilizar altas concentraciones salinas. Es poco tóxico y fácil de purificar industrialmente, siendo el solvente orgánico de grado HPLC más barato. Sus principales desventajas con respecto al acetonitrilo residen en que genera presiones algo mayores y tiene mayor afinidad por el oxígeno.

Acetonitrilo

El acetonitrilo tiene, por sus propiedades químicas, una selectividad muy diferente a la del metanol, y constituye, en general, la primer alternativa ensayada cuando se busca cambiar la misma. El solvente de calidad HPLC se comercializa puro, es decir, sin conservadores. Se debe almacenar al abrigo de la luz y bien cerrado porque es muy higroscópico. Su baja longitud de onda de corte (190 nm) lo convierte en el solvente de elección cuando se debe trabajar a longitudes de onda cortas. Es un solvente caro por las dificultades que presenta su purificación. Se lo obtiene como subproducto de síntesis del acrilonitrilo, materia prima para la producción de cauchos sintéticos y plásticos.



La síntesis consiste en la oxidación al aire, a unos 450 °C, de propileno y amoníaco en presencia de óxidos de Bismuto y de Molibdeno como catalizadores. Por lo tanto, las impurezas probables del acetonitrilo serán acrilonitrilo y sus subproductos. Carlsen y col.¹², por medio de estudios con GS-MS, encontraron impurezas de acrilonitrilo, propionitrilo, alcohol alílico y benceno. Estos autores sugieren para su purificación una destilación con octanoato de sodio en octanol para eliminar el acrilonitrilo seguido de una destilación en medio ácido sulfúrico para eliminar el alcohol alílico y benceno. Por último el solvente obtenido se seca en una columna de alúmina activada y se envasa en recipientes secos. El rendimiento de este proceso es del 70 % obteniéndose un solvente equivalente a un grado espectrofotométrico.

Tetrahidrofurano

El tetrahidrofurano (THF), es un solvente que tiende a formar rápidamente peróxidos, por lo cual se lo suele comercializar con antioxidantes. Los antioxidantes más utilizados son el butilhidroxitolueno (BHT) y la hidroquinona. Estos compuestos tienen una elevada absorción UV por lo cual el THF estabilizado no debe utilizarse con el detector UV. Puede

Capítulo 9

Preparación de las muestras

- 9.1 Introducción 204
- 9.2 Metodologías Convencionales 206
 - Tratamiento previo 206
 - Desproteínización 207
 - Extracción líquido-sólido 208
 - Extracción líquido-líquido 209
 - Filtración 211
- 9.3 Extracción en Fase Sólida 211
 - Columnas de extracción 211
 - El Proceso de la Extracción 213
 - Metodología para la Extracción 216
 - Aplicaciones 218
- 9.4 Intercambio de Columnas 218
 - Modos de operación 220
 - Selección de Columnas 221
 - Contracorriente 222
 - Clean up de las Muestras 224
 - Métodos de Enriquecimiento 225
 - Metodologías de Corte 226
 - Cromatografía de Reciclo 227
 - Cromatografía Multidimensional 227
- 9.5 Derivatización 228
 - Derivatización pre-columna 231
 - Derivatización post-columna 232
 - Mezcladores 233
 - Reactores 233
 - Aplicaciones 235
- Referencias 236

9-1 Introducción

La preparación de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. La selección del método más apropiado depende de muchos factores como ser:

- **Propiedades físicas y químicas del analito**

El conocimiento de algunas de las características fisicoquímicas del analito es esencial en el diseño de un método para la preparación de las muestras. Es conveniente conocer su estructura química, peso molecular, solubilidad, propiedades ácido base (pK_a) y respuesta frente al tipo de detector seleccionado. Muchos analitos tienen respuestas bajas o directamente nulas frente a los detectores de uso más común como el detector UV y el de fluorescencia. En estos casos, especialmente si la concentración de analito es baja, encontraremos sin lugar a dudas un problema de detección, y consecuentemente, de cuantificación. Este problema puede resolverse derivatizando alguno de los grupos funcionales presentes en la molécula (sección 9.5).

- **Concentración de analito en la muestra**

Este factor tiene importancia decisiva. Para analitos en altas concentraciones en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones, por su parte, pueden requerir metodologías más elaboradas que involucren numerosas operaciones para lograr una solución cuya concentración sea "aceptable" como para inyectarse en el cromatógrafo.

- **Naturaleza de la matriz de la muestra**

La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde la concentración de analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta, cuando existen impurezas cuyos picos interfieren el pico de analito en la muestra, o cuando existen sustancias que pueden dañar irreversiblemente los instrumentos o las columnas cromatográficas.

- **Forma en la que se presenta el analito en la muestra**

Es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra para poder diseñar un método apropiado de preparación. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal sino unido a proteínas transportadoras (análisis de fármacos en suero o plasma), metabolizado como éster, amida o éter de los ácidos sulfúrico o glucurónico (análisis de diversas sustancias en orina) o metabolizado a otra sustancia diferente. En estos casos sus propiedades químicas pueden cambiar radicalmente. Es así que una sustancia totalmente no polar e insoluble en agua puede presentarse como un glucurónido polar y soluble en la orina, pero vuelve a comportarse como tal después de una hidrólisis con la enzima β -glucuronidasa (esta enzima hidroliza la unión entre el analito y el ácido glucurónico).

- **Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico**

En HPLC se requiere que la solución a inyectar sea compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil o, en su defecto, un solvente débil (por ejemplo agua en fase reversa). Teniendo en cuenta este hecho es posible que se eviten numerosos problemas. Si se disuelve la muestra en un solvente fuerte, es posible que algunas sustancias precipiten al entrar en contacto con fases móviles acuosas. Al efectuarse inyecciones posteriores es posible que esas sustancias, por la presencia del solvente fuerte, migren dentro de la columna volviendo a precipitar y a redisolverse cíclicamente contaminando así el material de relleno de la columna en su totalidad. Además, la inyección de solventes más fuertes que la fase móvil puede producir deformaciones en los picos (sección 13.3).

Muchos de los métodos que se utilizan para la preparación de las muestras involucran la extracción líquido-líquido del analito desde un medio acuoso hasta un medio orgánico ya sea por sus características no polares propias o adquiridas regulando el pH del medio. En estos casos la muestra final se encuentra disuelta en un solvente lipofílico (cloroformo, hexano, éter) por lo cual no resulta conveniente inyectarlo en un sistema convencional de fase reversa que contiene mezclas de solventes orgánicos y agua como fase móvil. En este caso se puede evaporar el solvente hasta sequedad y disolver el residuo en fase móvil (con el consecuente error que esta operación acarrea) o inyectar en fase normal la solución resultante. Aún teniendo especial cuidado, en este punto suelen presentarse problemas. Por ejemplo en el análisis de residuos de pesticidas se requiere, habitualmente, una extracción con solventes no polares seguida de una adsorción en Florisil o Alúmina, y una evaporación del solvente orgánico. Se ha reportado¹ que al disolver el residuo en una fase móvil acuosa es posible que se presenten problemas si el material de partida contiene aceites o grasas y, si se intenta disolver el residuo con solventes puros como metanol o acetonitrilo, es posible que se obtengan picos distorsionados debido a los efectos de solvente (sección 13.3).

- **Tipo de detector**

La sensibilidad y selectividad del detector tienen un rol muy importante en el diseño de los métodos para la preparación de las muestras. Los detectores poco selectivos como el detector de índice de refracción generalmente requieren muestras mucho más "limpias" que los detectores más selectivos como el de fluorescencia. Por su parte, los detectores más sensibles (fluorescencia, amperometría) requieren menos pasos de preconcentración que aquellos menos sensibles (índice de refracción).

- **Compatibilidad con el detector**

En la selección de un medio para la solubilización del analito debe considerarse su compatibilidad con el detector a utilizar. No es conveniente utilizar solventes como la acetona o el tolueno si se ha de emplear un detector UV porque estos solventes

poseen una elevada absorción de base, y pueden producir picos espurios o señales importantes en el frente del solvente. Igualmente no resulta muy prudente utilizar fases móviles de elevada conductividad si se desea emplear un detector conductimétrico.

En este capítulo hemos de tratar la preparación de las muestras desde un punto de vista práctico. Mencionaremos someramente las operaciones clásicas de la química analítica (sección 9.2), y nos dedicaremos en mayor profundidad a las preparaciones de muestras que se refieran exclusivamente a HPLC o que involucren pasos relativamente nuevos como la extracción en fase sólida (sección 9.3), el empleo de válvulas de intercambio de columnas (sección 9.4), la derivatización química pre y post-columna y los detectores de reacción (sección 9.5).

9.2 Metodologías convencionales

Tratamiento Previo

La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar. Si la muestra es líquida puede, como primera aproximación, inyectarse directamente previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario molerlo y homogeneizarlo apropiadamente, y posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz sólida deben solubilizarse en un solvente adecuado. Estos solventes deben seleccionarse por su poder solubilizante del analito y su bajo poder solubilizante de los componentes de la matriz de la muestra o de aquellas sustancias que puedan dañar las columnas o el equipo cromatográfico.

Tanto para el tratamiento previo de las muestras, como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las operaciones conocidas de la química analítica como: liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación, y solubilización. La **liofilización** y la **evaporación** son operaciones que se utilizan para remover el vehículo líquido en el cual se encuentra el analito con el fin de concentrarlo. La evaporación requiere que el analito sea estable térmicamente y que no se volatilice junto con el solvente, y generalmente se realiza después de secar la muestra apropiadamente con algún material desecante como el sulfato de sodio anhidro. Analitos termolábiles deben liofilizarse mientras que analitos oxidables pueden evaporarse con la ayuda de una corriente de nitrógeno. La **filtración** y la **centrifugación** son operaciones que se utilizan para la separación de líquidos y sólidos. La **precipitación** se utiliza habitualmente para separar del analito sustancias que pueden interferir, contaminar las columnas o el equipo cromatográfico.

Capítulo 10

Análisis Cuantitativo

10.1	Introducción	242
10.2	Muestreo	242
10.3	Preparación de la muestra	243
10.4	Inyección de la muestra	243
10.5	Separación cromatográfica	246
	Errores asociados a la separación	249
10.6	Detección	250
10.7	Integración de la señal	251
	Integración manual	251
	Integración automática	252
	Errores asociados a la integración	256
	Medición de área o altura de pico	257
10.8	Cálculo de la concentración de analito	259
	Normalización interna	261
	Estándar Externo	262
	Estándar Interno	263
	Estándar Agregado	264
	Referencias	266

10.1 Introducción

La cromatografía líquida de alta performance, como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento que este método analítico ha experimentado en las últimas décadas, si bien se debe a diversos factores, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen por HPLC resultados cuantitativos. Actualmente la HPLC es capaz de cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes con niveles de precisión tan bajos como 0.5 %, y aún menores. Como todo método de análisis cuantitativo, está compuesto de diversos pasos, cada uno de los cuales debe estudiarse apropiadamente. Estos son:

- Muestreo
- Preparación de la muestra
- Inyección de la muestra
- Separación Cromatográfica
- Detección
- Integración de la Señal
- Cálculo de la Concentración de Analito

En este Capítulo trataremos cada uno de ellos desde el punto de vista cromatográfico, de manera tal de ofrecer al lector una guía práctica para resolver los errores de cuantificación más comunes.

● 10.2 Muestreo

El muestreo es una etapa crítica en todo método de análisis. Los líquidos pueden muestrearse directamente, previa homogeneización y los sólidos o semisólidos deben someterse a algún procedimiento que permita asegurar que la muestra extraída sea representativa. De acuerdo a lo expresado por el comité de la ACS-SEAC¹, la operación de muestreo debe presentar, como mínimo, las siguientes características:

- Diseño estadístico apropiado que tenga en cuenta los objetivos del estudio, sus certezas e incertidumbres.
- Instrucciones para la recolección de las muestras, etiquetado, conservación y transporte para facilitar el análisis.
- Entrenamiento del personal en las técnicas de muestreo y en los procedimientos específicos.

La operación de muestreo ha sido detallada en la literatura¹⁻³ y no se refiere estrictamente a la cromatografía por lo cual no será tratada más extensamente en este libro.

10.3 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es una etapa muy importante dentro del análisis cuantitativo. Debido a la diversidad de situaciones que pueden presentarse dependiendo de la concentración de analito y la naturaleza de la matriz de la muestra se le ha dedicado un Capítulo aparte (Capítulo 9).

10.4 Inyección de la muestra

La inyección de la muestra líquida y homogénea dentro del cromatógrafo es una de las fuentes de error más importantes dentro de la HPLC. En general, cuanto mayor sea el volumen de inyección mejor será la precisión, aunque se debe tener en cuenta que, aumentándolo por encima de cierto valor, aumenta el ensanchamiento del pico causando una pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna. La influencia del volumen de inyección en el ensanchamiento del pico cromatográfico ha sido detallado en la literatura⁴.

Habitualmente, el volumen de inyección se selecciona de acuerdo a la longitud y diámetro de la columna que se desea utilizar, así, para la inyección de muestras disueltas en fase móvil, en columnas de 4 mm de diámetro interno, se utilizan como máximo los siguientes volúmenes:

- 100 μl en columnas de 25 cm de longitud
- 50 μl en columnas de 12.5 cm de longitud
- 20 μl en columnas más cortas

Se ha sugerido⁵ que el volumen de inyección no debe ser mayor que el 20 a 30 % del volumen del primer pico de interés en el cromatograma. Evidentemente, la medición de volúmenes tan pequeños tiene un efecto muy importante dentro de la precisión del método de análisis, pero no resulta tan crítico como en cromatografía gaseosa donde los volúmenes son aún menores y la pérdida de muestra puede ser importante.

Tanto el diseño del inyector como la metodología empleada para la inyección cumplen un rol muy importante en la precisión del análisis. Como se ha visto en la sección 2.7, existen básicamente dos tipos de inyectores: los inyectores manuales y los automáticos. Utilizando un inyector manual la muestra puede introducirse en el sistema cromatográfico de tres diferentes modos: por llenado total del loop, por llenado parcial del loop, y por el método de la burbuja conductora.

Utilizando el método de llenado total del loop, éste se llena por completo con la muestra, y su contenido se transfiere al sistema. En este caso, existe una inexactitud en el volumen nominal (por ejemplo, un loop de 20 μl puede contener 19.5 ó 20.5 μl). Sin embargo, en

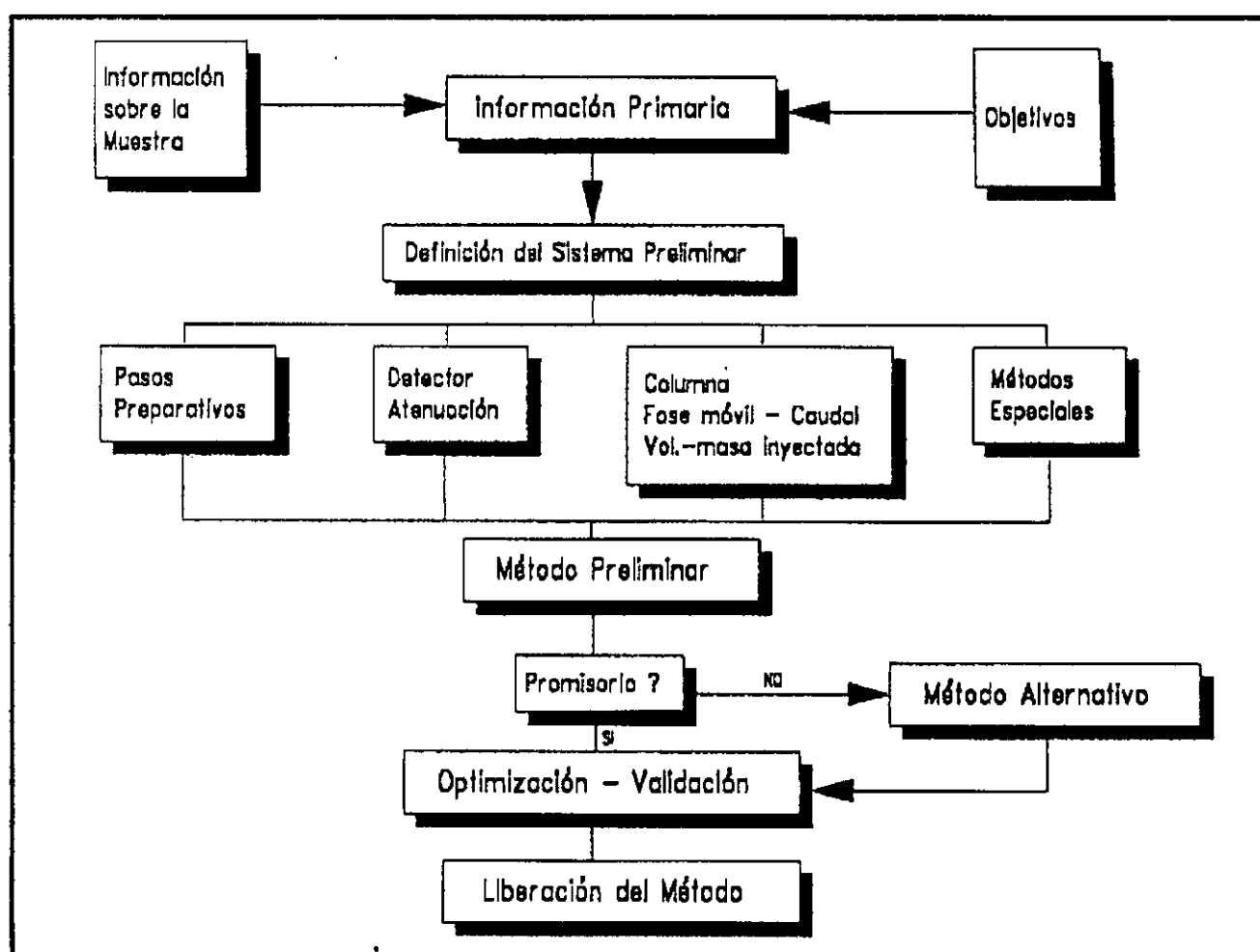


Fig. 11.1. Pasos en el desarrollo de métodos por HPLC.

dichos objetivos, por ejemplo

- ¿Se requiere identificación, screening o cuantificación?
- ¿Cuál es el nivel presente (macro o microcomponentes)?
- ¿Cuál es la precisión requerida?
- ¿Cuántos componentes se desean valorar?
- ¿Cuántas muestras se desea procesar?

Evidentemente, no será igual el hecho de informar que el análisis de orina de un atleta contiene o no restos o metabolitos de un anabólico, o que una bebida contiene un 90 o un 110 % del edulcorante declarado.

El número de componentes a valorar tiene que ver con el “espacio” útil en el cromatograma. Los métodos isocráticos son incapaces de dar cabida a más de 10-12 picos, por lo cual en casos más complejos se prefiere trabajar con gradiente de elución.

El número de muestras a evaluar puede no ser relevante para pocos ensayos, pero largas rutinas pueden indicar la necesidad de contar con equipos automáticos.

Con respecto a la muestra, es importante o conveniente conocer:

- Identidad de componentes de interés.
- Rango de pesos moleculares de los componentes de interés.
- Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV.

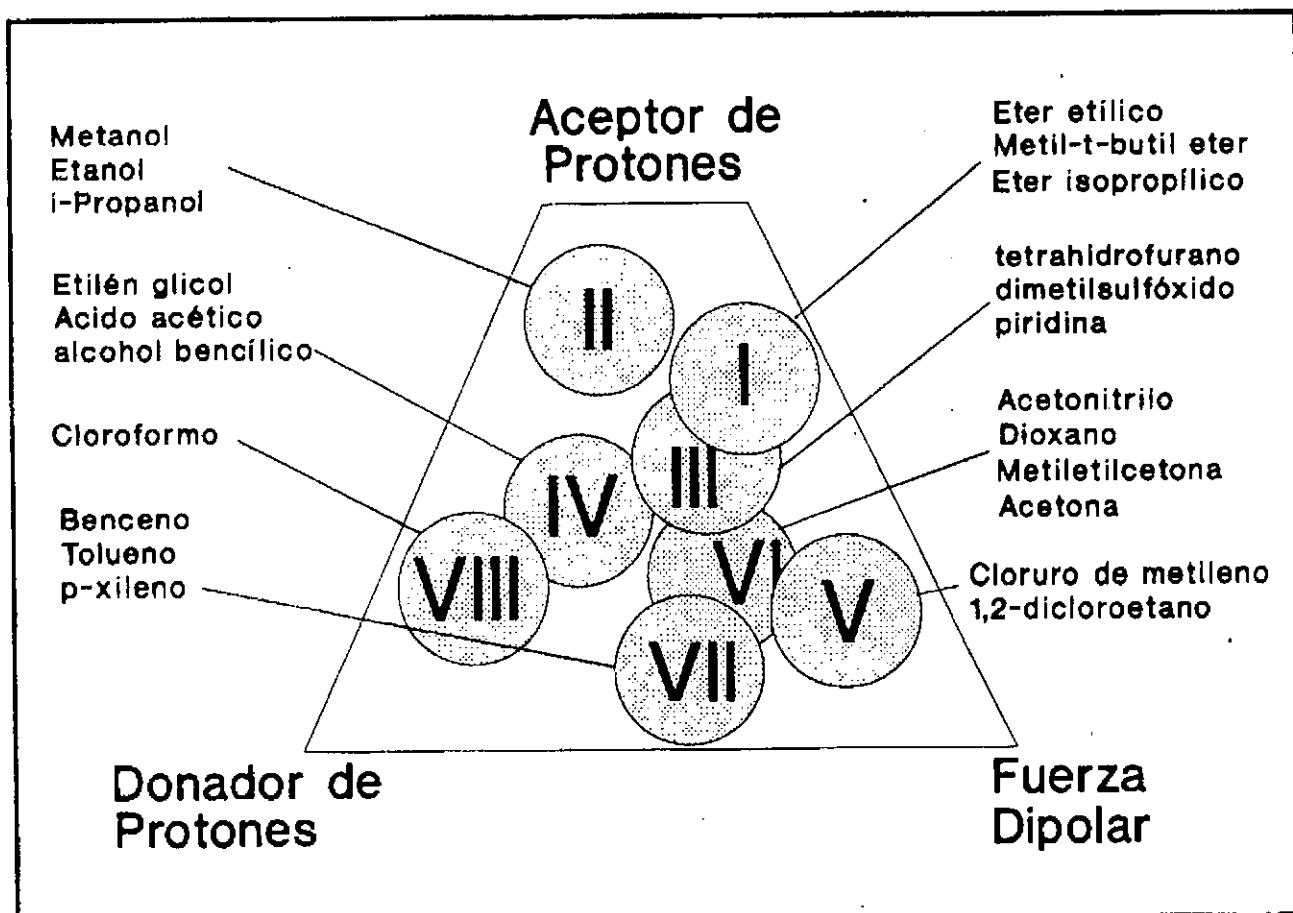


Fig. 11.9. Triángulo de selectividad de solventes propuesto por Snyder¹³ según el tipo y magnitud de interacción. Adaptado de ref. 19, con permiso del editor.

Selección de la fase móvil

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. Las interacciones pueden ser de tipo dispersivo, dipolar, por puente de hidrógeno, interacciones dieléctricas, o una combinación de ellas. No solo la "polaridad" sino la suma todas estas propiedades es la que define la afinidad de la fase móvil por un analito dado, que tendrá a su vez determinadas características dipolares, aceptoras o donadoras de protones.

La magnitud de las interacciones para cada solvente está tabulada^{16,17}, y fue a la vez clasificada por Snyder¹⁸ según su selectividad (ver figura 11.9) en 8 grupos distintivos desplegados en un diagrama triangular.

Visto de ese modo es claro que si la resolución con un determinado solvente es insuficiente, es poco el cambio que se conseguirá al cambiar ese solvente por otro del mismo grupo, ya que el tipo de interacción con la muestra será similar. Por ejemplo, si se desea cambiar la selectividad de una mezcla hidrometanólica, no debe cambiarse el metanol por otro alcohol sino por un solvente perteneciente a otro grupo, preferentemente alejado de aquel cuya respuesta se conoce, por ejemplo, acetonitrilo o tetrahidrofurano en fase reversa.

Así, los vértices del triángulo (solventes de mayor diferencia de selectividad) en fase

Solvente	Fuerza de elución
Agua	0.0
Metanol	2.6
Acetonitrilo	3.2
Tetrahidrofurano	4.5

Tabla 11.III. Fuerza de elución de solventes en fase reversa (de referencia 28).

reversa son MeOH, AcN y THF, empleando agua como solvente de soporte, mientras en fase normal son el eter (se prefiere el empleo de metil-isobutil éter y no éter etílico), cloroformo y cloruro de metileno en mezcla con hexano, o FC-113 (1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano), sugerido por Glajch¹⁹ por su baja inflamabilidad, toxicidad y buena transparencia al UV.

Para conseguir un cambio efectivo de selectividad en fase reversa se procede del siguiente modo:

1. Se ajusta la concentración del modificador (por ejemplo para una fase móvil agua-metanol) para conseguir un k' comprendido entre 2 y 10.
2. Se calcula la composición de las mezclas agua-acetonitrilo y agua-THF de igual fuerza de elución. Esto se consigue calculando la fuerza total de cada mezcla según Snyder:

$$ST = \sum_{i=1}^n S_i \Phi_i \tag{11-7}$$

Donde ST es la fuerza total de la fase móvil, S_i la fuerza (indicada en la tabla 11.III) y Φ_i la fracción en volumen del solvente i. Así, para la mezcla hidrometanólica:

$$ST_{MeOH} = S_{MeOH} \Phi_{MeOH} + S_{H_2O} \Phi_{H_2O} \tag{11-8}$$

$$S_{MeOH} \Phi_{MeOH} = S_{AcN} \Phi_{AcN} = S_{THF} \Phi_{THF} \tag{11-9}$$

$$\Phi_{AcN} = \frac{S_{MeOH} \Phi_{MeOH}}{S_{AcN}} \tag{11- 10}$$

$$\Phi_{AcN} = \frac{S_{MeOH} \Phi_{MeOH}}{S_{AcN}} \tag{11- 11}$$

Por ejemplo, una mezcla agua-MeOH (30:70) tendrá aproximadamente la misma fuerza de elución que una mezcla agua-AcN (43:57) o una mezcla agua-THF (60:40).

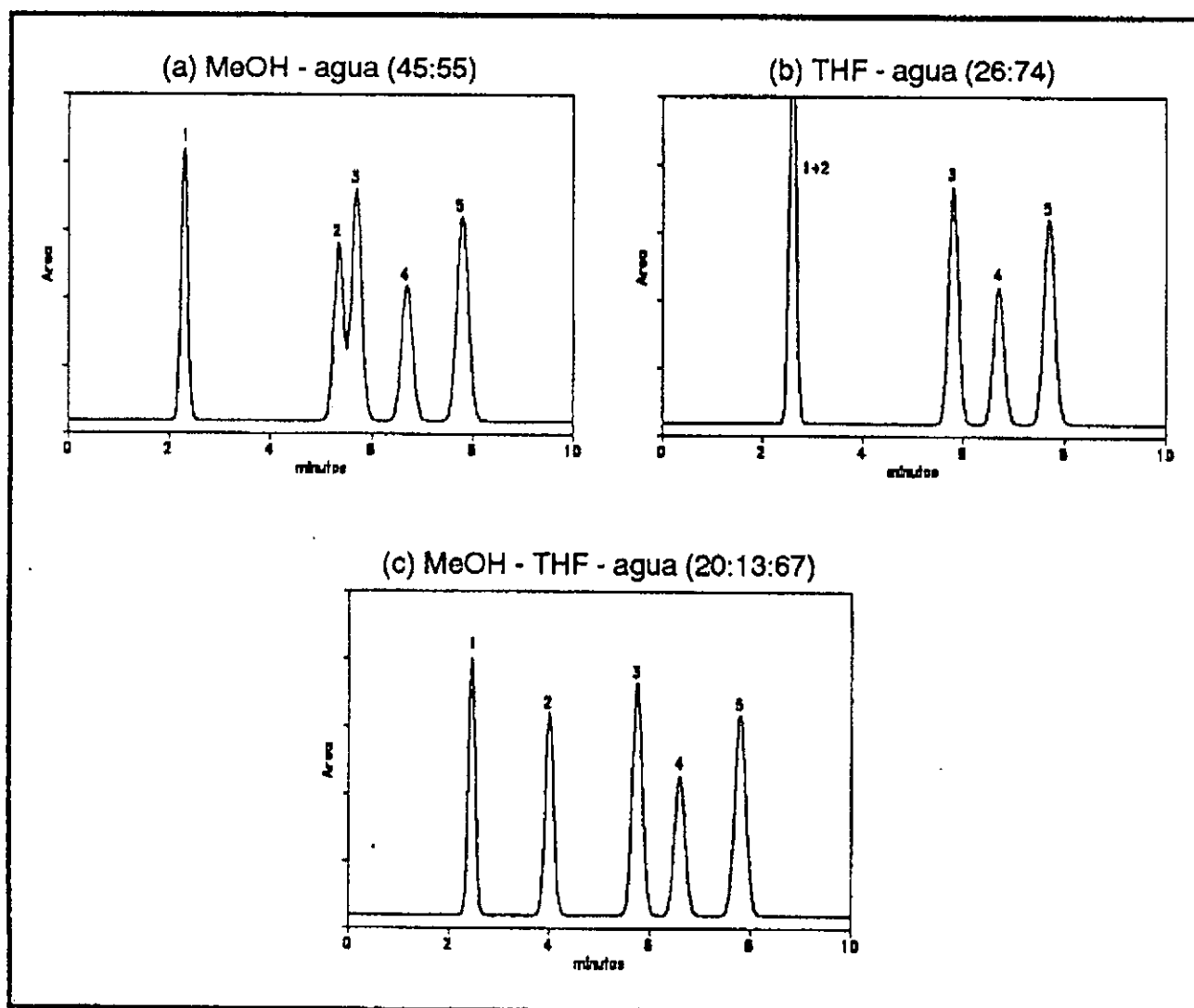


Fig. 11.10. Efecto del modificador orgánico sobre la resolución y selección de una fase móvil ternaria en base a los resultados.

3. Se efectúan ensayos empleando las mezclas agua-AcN y agua-THF.

La simple observación de los cromatogramas resultantes indicará si el cambio de selectividad fue satisfactorio como para reemplazar el solvente inicial o inclusive, si cabe considerar una mezcla ternaria compuesta por mezcla 1:1 del primero (MeOH-agua) con el segundo (AcN-agua) o con el tercero (THF-agua), o bien del segundo con el tercero. Los cromatogramas de la figura 11.10 muestran un problema resuelto de esta forma.

Mapas de Resolución

Los casos más complejos que no pueden resolverse por apreciación directa son tratados en forma más conveniente por medio de mapas de resolución, con ayuda de una computadora. Este modelo de optimización fue propuesto por Snee²⁰, y aplica un diseño factorial, en el cual estudia la respuesta sobre un triángulo (figura 11.11) definido por los tres solventes en 10 puntos característicos:

los 3 vértices del triángulo, los 3 puntos medios de cada cara, el punto medio (mez-

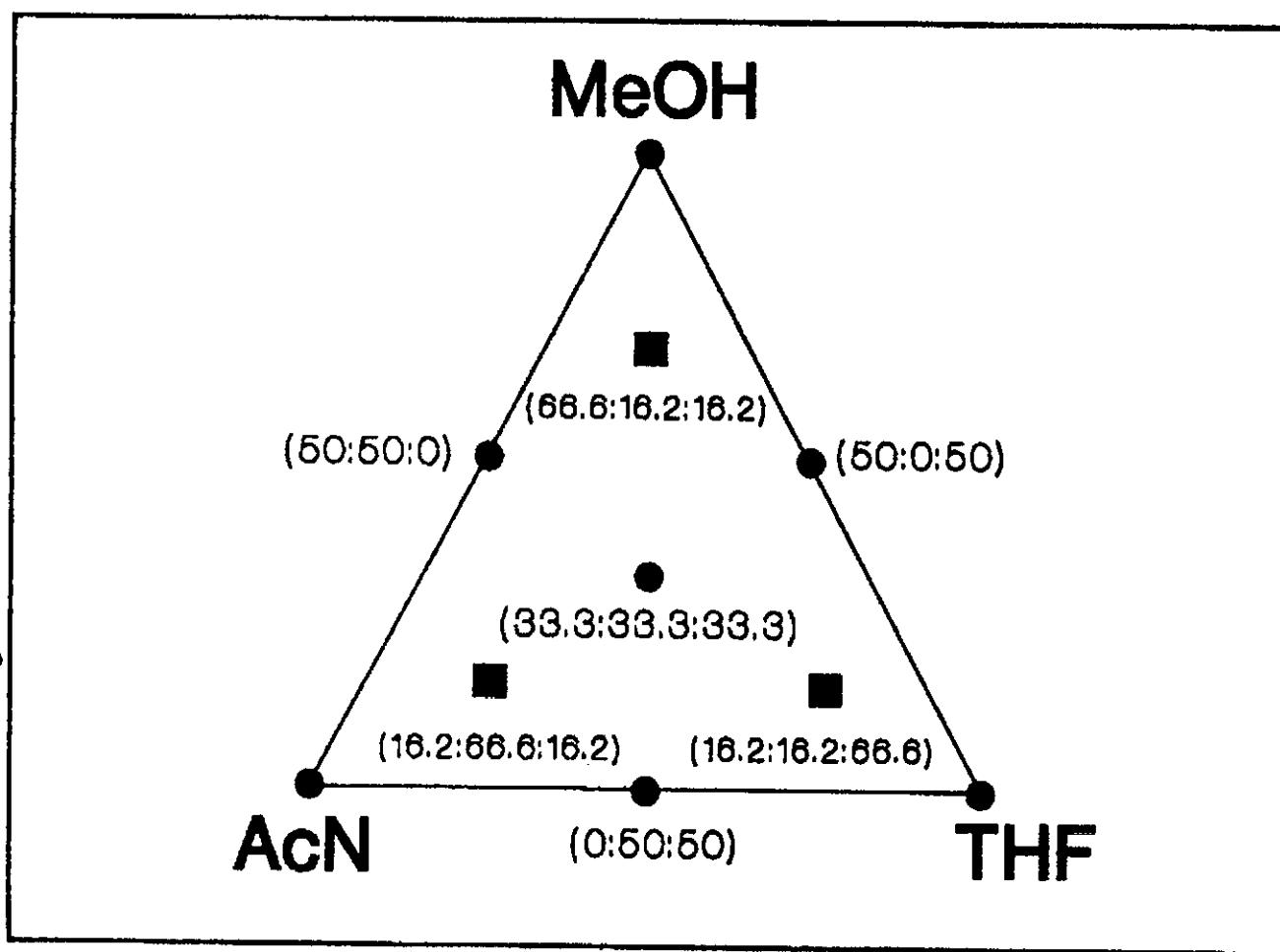


Fig. 11.11. Puntos de ensayo sobre el triángulo, mostrando los puntos para la determinación de los coeficientes polinomiales (●) y los opcionales, para la determinación del ajuste (■). (Adaptado de referencia 19, con permiso del editor).

cla 1:1:1), y los tres puntos centrales de los triángulos formados por los puntos medios (4:1:1).

Glajch y colaboradores¹⁹ adaptaron el modelo de Snee sobre el triángulo de selectividades de Snyder, evaluando la respuesta en 7 puntos y reservando los 3 restantes para comprobar el ajuste al modelo.

La secuencia del estudio comprende los tres primeros pasos descritos anteriormente para la búsqueda de las mezclas agua- modificador (MeOH-AcN-THF) con $2 < k' < 10$. Estos pasos corresponden a los vértices del triángulo, y se completan con los siguientes:

4. Aplicación del diseño estadístico para la búsqueda de la fase móvil óptima. Se efectúan 7 inyecciones de la muestra en diferentes condiciones. Los puntos se indican en la tabla IV.
5. Evaluación de los resultados.

Resulta claro que la calidad de un cromatograma puede ser juzgada por apreciación visual. Sin embargo, la evaluación cuantitativa de la calidad de separación (tomada en términos de resolución y tiempo de análisis) es indudablemente menos subjetiva, y permite aplicar evaluaciones globales y diseños de optimización como el presente.

# Ensayo	%MeOH	%AcN	%THF	COF
1	100	0	0	...
2	0	100	0	...
3	0	0	100	...
4	50	50	0	...
5	0	50	50	...
6	50	0	50	...
7	33	33	33	...

Tabla IV. Puntos de ensayo. Los solventes corresponden a los hallados en los puntos 1 a 3, y los valores de COF (ver texto), se completan con los resultados obtenidos en el punto 5.

El criterio propuesto por Glajch¹⁹ es el cálculo del factor de optimización cromatográfica (COF), dado por

$$\text{COF} = \sum_{i=1}^n A_i \ln \left(\frac{R_i}{R_{id}} \right) + B (t_m - t_i) \quad (11-12)$$

Donde R_i y R_{id} son las resoluciones obtenida y la deseada para el par de picos "i", A es un factor arbitrario de peso (para atribuir mayor o menor influencia a un par determinado), t_m el tiempo de análisis máximo aceptable, t_i la el tiempo de retención del último pico y B el factor de peso para el tiempo de análisis.

Naturalmente, si la resolución de todos los pares de picos es igualmente importante A vale 1, y si el tiempo de análisis tampoco importa, B vale cero.

Queda por definir el cálculo de la resolución, que para pares bien resueltos y simétricos está dado por la ecuación (11-2).

Sin embargo, si los picos están parcialmente solapados es preferible efectuar el cálculo tomando los anchos de picos a media altura (w_{h2} y w_{h1}), evaluando la resolución como:

$$R = \frac{1.18 (t_2 - t_1)}{(w_{h2} + w_{h1})} \quad (11-13)$$

Superposiciones muy severas o casi completas son aún difíciles de calcular por estos procedimientos, pero pueden ser aproximadas por comparación visual con gráficos simulados, como los descritos por Snyder y Kirkland¹⁷.

Calculada la resolución, y obtenidos los factores de optimización (COF), se calcula la respuesta superficial sobre el triángulo de selectividades, que sigue una ecuación polinomial de la forma:

$$Y = AX + BY + CZ + DXY + EXZ + FYZ + GXYZ$$

Capítulo 12

Validación de Métodos

12.1 Objetivos de la validación 302

12.2 Selectividad o especificidad 303

12.3 Linealidad 312

 Ejemplo 315

12.4 Precisión 316

 Límites de confianza 318

 Ejemplo 319

12.5 Exactitud 319

 Ejemplo 321

12.6 Sensibilidad 321

 Ejemplo 323

12.7 Robustez 324

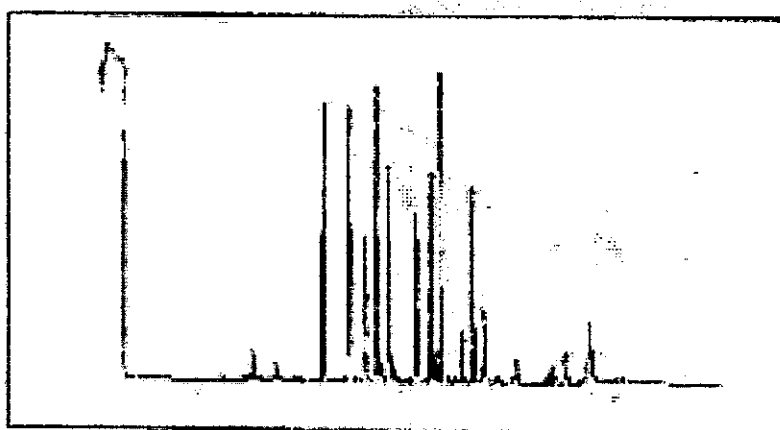
 Ejemplo 326

Referencias 328

PLAGUICIDAS

Aspectos ambientales,
analíticos y toxicológicos

Ignacio MORELL
Lucila CANDELA
(eds.)



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Col·lecció Summa. Ciències Experimentals / 5

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT JAUME I. Dades catalogràfiques

PLAGUICIDAS : Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos / Ignacio Morell, Lucila Candela (eds.). - Castelló de la Plana : Publicacions de la Universitat Jaume I, cop. 1998

p. : gráf. : cm. - (Summa. Ciències Experimentals ; 5)

Referències bibliogràfiques.

ISBN 84-8021-240-3

1. Plaguicides-Aspectes ambientals. 2. Plaguicides-Anàlisi. I. Morell, Ignacio, ed. II. Candela, Lucila, ed. III. Universitat Jaume I (Castelló). Publicacions de la Universitat Jaume I, ed. IV. Sèrie.

632.93

Cap part d'aquesta publicació, incloent-hi el disseny de la coberta, no pot ser reproduïda, emmagatzemada, ni transmesa de cap manera, ni per cap mitjà (elèctric, químic, mecànic, òptic, de gravació o bé de xerocòpia) sense autorització prèvia de la marca editorial.

© Del text: els autors, 1998

© De la present edició: Publicacions de la Universitat Jaume I, 1998

Edita: Publicacions de la Universitat Jaume I
Campus de la Penya Roja. 12071 Castelló de la Plana

Imprimeix: CASTELLÓ D'IMPRESSIÓ. S.L.
ISBN: 84-8021-240-3
Dipòsit legal: CS 387-1998



La determinación de Benomilo (methyl 1-butylcarbamoyl) benzimidazol-2-ylcarbamate, $C_{14}H_{18}N_4O_3$) en muestras de miel, larvas y alimento, se realizó de la misma forma para las tres matrices, encontrando tasas de recuperación muy similares. El procedimiento consiste en la conversión de benomilo en su metabolito principal (carbendazim) y su posterior extracción y cuantificación. La extracción se realiza en una cantidad de muestra entre 2 - 5 g, sin tratamiento previo, sobre Acetato de etilo y HCl (0.01N) en proporción 1:5, con agitación durante 15min y posterior centrifugación. Se separan ambas fases y se realiza una partición con la fase orgánica por medio de la adición de NaOH (0.1N). Se vuelve a recoger la fase orgánica. El proceso de extracción se repite otra vez. Recogidas ambas partes, se llevan a sequedad, se redisuelve con 2 mL de Metanol y se analiza por cromatografía de líquidos. La separación cromatográfica se realiza sobre una columna Nucleosil 5 C18 (15 cm de largo y 4.6 mm de d.i.). Se empleó un detector de fluorescencia molecular. (λ_{ex} : 285nm, λ_{em} 317nm). En estas condiciones se consiguió un límite de detección de 0.1 mg/L.

Determinación de Tiabendazol en Miel y Larvas de Abejas

El Tiabendazol (2-(thiazol-4-yl)benzimidazole $C_{10}H_7N_3S$, es un fungicida que puede ser una alternativa al empleo de Benomilo en el tratamiento de las colmenas infectadas. El procedimiento de análisis se basa en la extracción del Tiabendazol de la matriz en cuestión, previa alcalinización con Acetato de etilo y posterior cuantificación del analito por HPLC. Para ello sobre una cantidad de muestra aproximada entre 2 y 3g se añade NaOH 0.1N, agitando hasta homogeneización durante un tiempo aproximado de 5 min. Posteriormente, se realiza la extracción con Acetato de etilo durante 15 min. Se centrifuga con objeto de separar ambas fases y se recoge la fase orgánica. El proceso de extracción se repite otras dos veces, aunque ya no es necesario añadir más NaOH. Para facilitar la recogida de la fase orgánica se propone colocar el extracto (con las dos fases) a -18°C , con lo cual la fase acuosa se congela y la fase orgánica se vierte directamente. Por último se lleva la fase orgánica a sequedad y se redisuelve con 5 mL de Metanol. El análisis se realiza por HPLC en la misma columna utilizada en el estudio del Benomilo. Se emplea el mismo detector en las longitudes de onda apropiadas: λ_{ex} : 285nm, λ_{em} 350nm. En estas condiciones, se han conseguido unos límites de detección cercanos a los 5 $\mu\text{g/L}$.

FUNGICIDAS EN MUESTRAS DE PRODUCTOS HORTÍCOLAS

En la actualidad existe un gran tendencia a la utilización de los fungicidas derivados del ácido ditiocarbámico debido a su eficacia en el control de las enfermedades causadas por hongos. Si a esta eficacia como fungicida, se suma su baja toxicidad para los seres humanos, es fácil comprender la creciente demanda de utilización de estos productos. Se distinguen tres tipos de familias, dimetiltiocarbamatos {Ziram (zinc bis(dimethyldithiocarbamate), $C_6H_{12}N_2S_4Zn$) y el Ferbam (iron tris(dimethyldithiocarbamate), $C_6H_{18}FeN_3S_6$)}, etilenbisditiocarbamatos {Maneb (manganese ethylenebis(dithiocarbamate), $C_4H_6MnN_2S_4$), Nabam (disodium

ethylenbis (dithiocarbamate), $C_4H_6N_2Na_2S_4$) entre otros)) y propilenbisditio carbamatos {Propineb (polímero de zinc propylenebis (dithiocarbamate), $C_5H_8N_2S_4Zn$)_x}.

Tratamiento Previo de la Muestra

Las muestras de hortalizas (lechugas, acelgas y espinacas) eran troceadas y posteriormente liofilizadas, para ser almacenadas en el congelador hasta su tratamiento. El proceso de liofilización fue validado para este tipo de muestras y plaguicidas por medio de muestras fortificadas en el laboratorio. Las ventajas que se consiguieron con este tratamiento fueron las siguientes: a) menor cantidad de muestra en la etapa de extracción, b) menor consumo de solventes orgánicos, c) considerable ahorro de tiempo y dinero, y d) mayores tasas de recuperación.

Extracción

Aunque la metodología oficial sobre la determinación de residuos de ditiocarbamatos en material vegetal acepta que su degradación final hasta sulfuro de carbono (CS_2) y su posterior cuantificación es un procedimiento que resulta útil, es también cierto que adolece de falta de especificidad, además de implicar una metodología analítica excesivamente laboriosa que la hace desaconsejable para análisis de residuos.

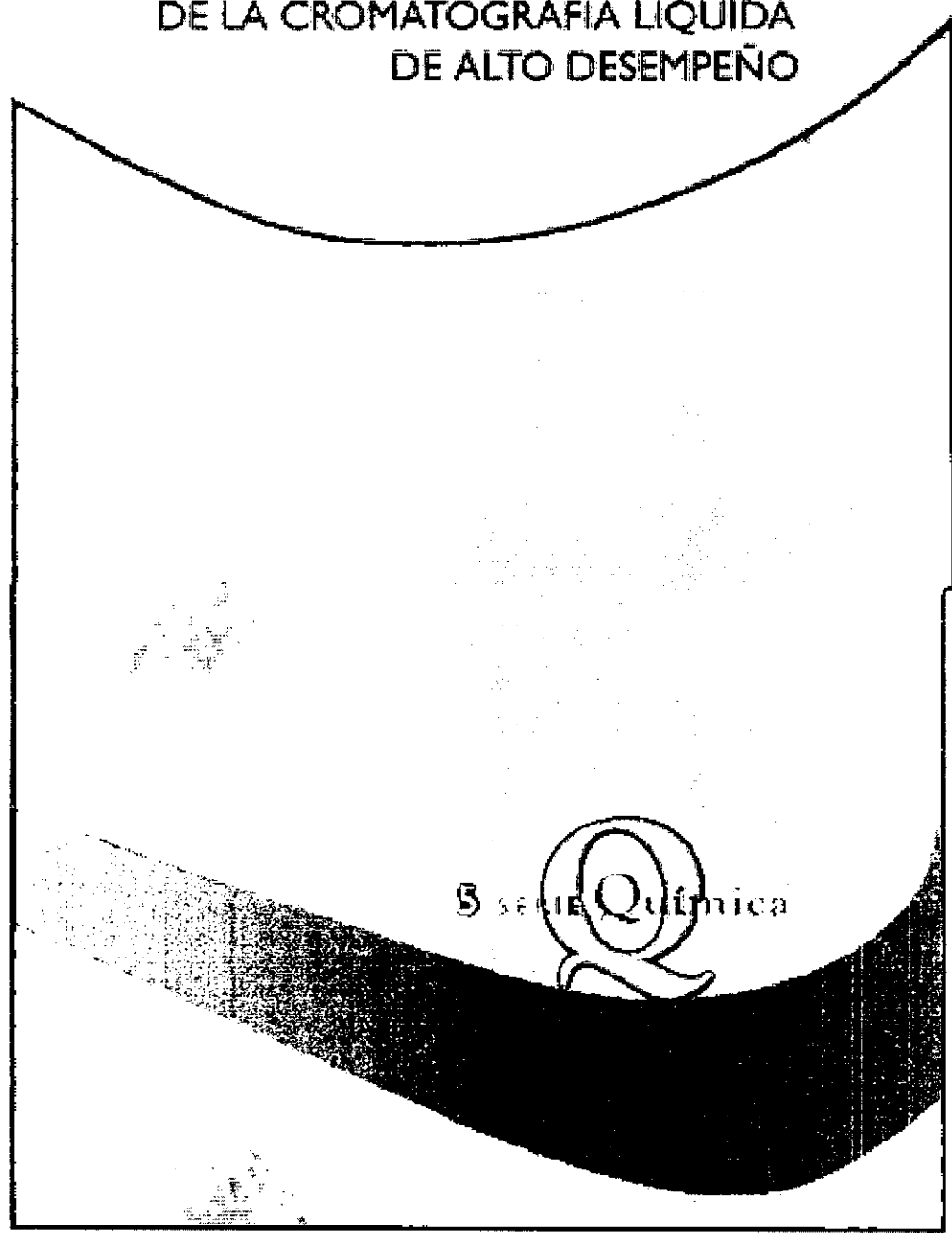
Debido a la baja solubilidad que presentan en el agua y en la mayoría de disolventes orgánicos, la mezcla AEDT (1M):Metanol a partes iguales resultó ser la mezcla extractante seleccionada para el proceso. La muestra (alrededor de 1g) se mezclaba con 10 mL de la mezcla extractante, agitándose por espacio de 10 min. La mezcla se centrifuga, recogiendo por decantación la fase líquida. El residuo sólido es extraído nuevamente con 10 mL de solución extractante. Se evapora el Metanol por medio de una corriente de nitrógeno a 35°C. El concentrado se enrasa a 10 mL con AEDT y se realiza una partición con 10 mL de Hexano. Se recoge la fase la fase líquida que después de filtrada se introduce en el cromatógrafo.

Las recuperaciones obtenidas fueron del orden del 95% con una desviación estándar relativa del orden del 3%, estudiándose también el efecto de la concentración del fungicida (1, 5 10 mg/Kg)

Análisis Cromatográfico

Se empleó la cromatografía basada en la formación de pares iónicos utilizando columnas de fase reversa. Como contraión se utilizó Cloruro de Tetrabutylamonio 1mM, a un pH de 8.25 mantenido por un tampón AEDT 0.001M. Como modificador orgánico se empleó Metanol en una proporción del 2.5%. La columna empleada fue la Spherisorb ODS 2, de 25 cm de largo y 4.6 mm de diámetro interno. La detección se realizó por medio de dos detectores colocados en serie:

MIRIAM BARQUERO QUIRÓS
MECANISMOS Y APLICACIONES
DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTO DESEMPEÑO



544.924

H267m Barquero Quirós, Miriam, 1954-

Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía
 líquida de alto desempeño / Miriam Barquero
 Quirós. - 1. ed. - San José, C.R. : Editorial de la
 Universidad de Costa Rica, 2004.

1. 57 p. : Il. - (Serie química; 5)

ISBN: 9977-67-918-5

I. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA. I. Título.

CIP/1400

CC/SIBD1.UCR

Edición aprobada por la Comisión Editorial de la Universidad de Costa Rica

Primera edición: 2004

Diseño de portada: *Elisa Guzmán V.*

© Editorial de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio".
 Apdo. 75-2060 • Tel.: 207 5310 • Fax: 207 5253 • página web: www.editorial.ucr.ac.cr
 Prohibida la reproducción total o parcial. Todos los derechos reservados. Hecho el depósito de ley

Impresión parcial de 100 ejemplares, realizados en la Sección de Impresión
 del SIEDIN en el mes de agosto de 2004

Resumen de los métodos para reducir el ensanchamiento de banda

El diámetro de las partículas del relleno y el diámetro de la columna contribuyen al ensanchamiento, se usan columnas más estrechas y partículas cada vez más pequeñas.

En GC se disminuye la temperatura y también D_M en CL este efecto no se percibe, porque la difusión longitudinal es lenta.

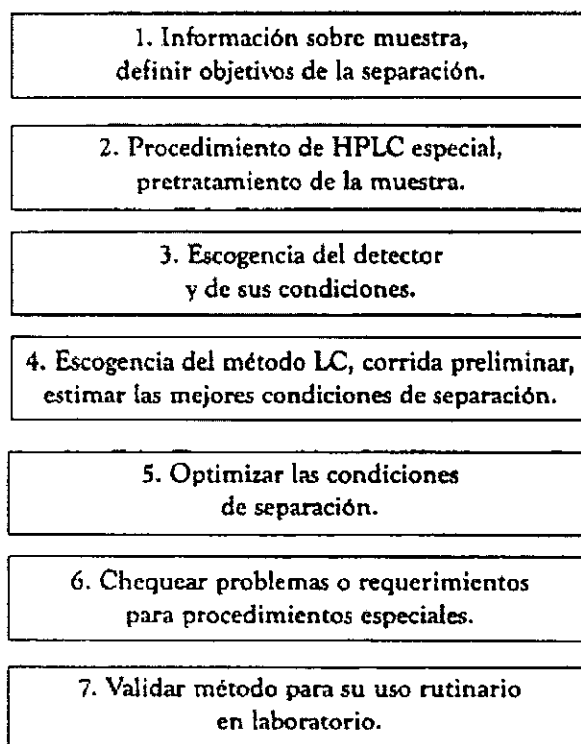
Con fases estacionarias líquidas d_f debe ser lo más pequeño posible.

Campo de aplicación de la HPLC

Los métodos que utilizan columnas con un tamaño pequeño de partícula, se conocen como cromatografía líquida de alto desempeño HPLC, esta técnica es la más usada debido a su alta sensibilidad, su adaptación a las determinaciones cuantitativas, idónea para separación de especies no volátiles o termolábiles porque trabaja a temperatura ambiente. Es de interés para estudio de sustancias en ciencia, industria y sociedad como: aminoácidos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, esteroides, hidrocarburos, drogas, proteínas, antibióticos, organo metálicos, especies inorgánicas y otros. Para lograr la separación, identificación y cuantificación de estos analitos en muestras que los contienen, la mayoría de las veces es necesario desarrollar métodos específicos, o utilizar métodos estandarizados de la literatura.

Para desarrollar un método cromatográfico es necesario conocer las características de la muestra y del analito a determinar, luego que el método se ha desarrollado y se haya logrado una separación adecuada al manejar las variables experimentales ya descritas; es necesario demostrar que el método es apto para la aplicación específica propuesta, a través de la determinación de sus parámetros de desempeño: precisión, exactitud, veracidad, límite de detección y de cuantificación, este proceso se llama validación.

Un esquema general del establecimiento y validación de un método para HPLC se muestra a continuación:



Tomada de referencia 1.

Figura 8
Pasos en el desarrollo de un método HPLC

Existen diferentes métodos cromatográficos y generalmente se clasifican por sus mecanismos, los cuales se describirán más adelante.