

Trabajo Práctico N°11

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

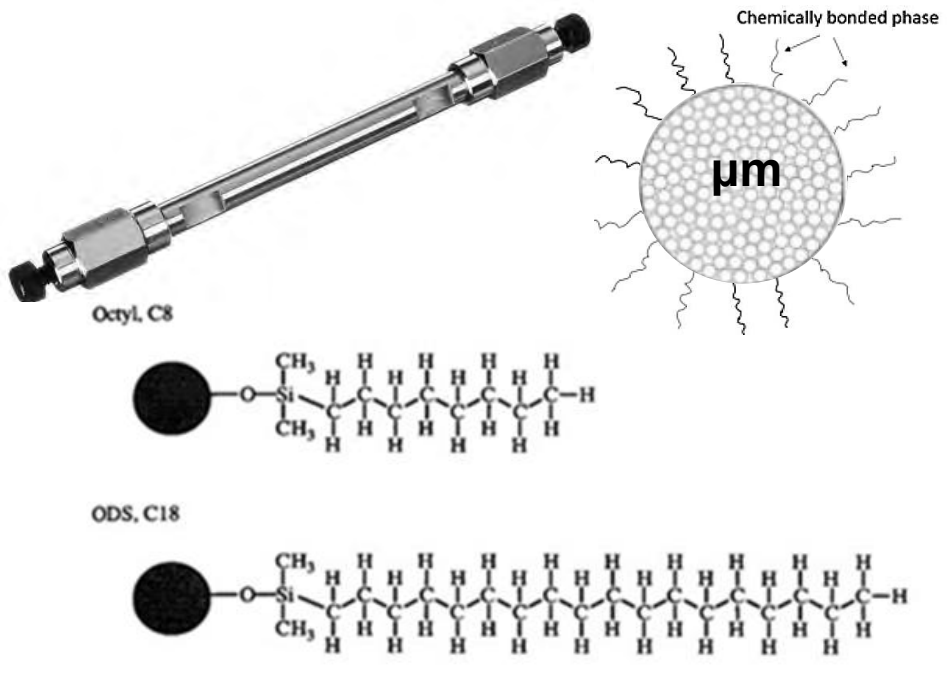
Química Analítica Instrumental
Facultad de Ciencias Exactas UNLP
Junio 2021

Bioq. Christian Byrne

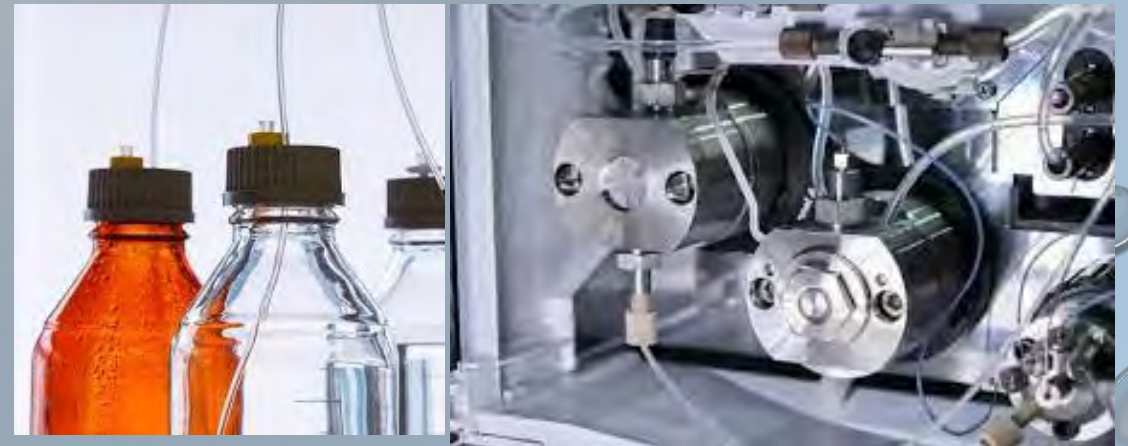


HPLC fase inversa

Analitos no polares o muy poco polares



Bombas
Alta presión



Fase estacionaria no polar

(o muy poco polar):

**Partículas a base de sílice con grupos no polares
ligados en forma covalente.**

Los más comunes son cadenas alquílicas C8 o C18

Fase móvil polar:

(A) Agua o buffer acuoso

**(B) Un modificador orgánico:
metanol, acetonitrilo o THF**

(1) Reservorios de solventes

(2) Desgasificador

Sistema HP Agilent 1100

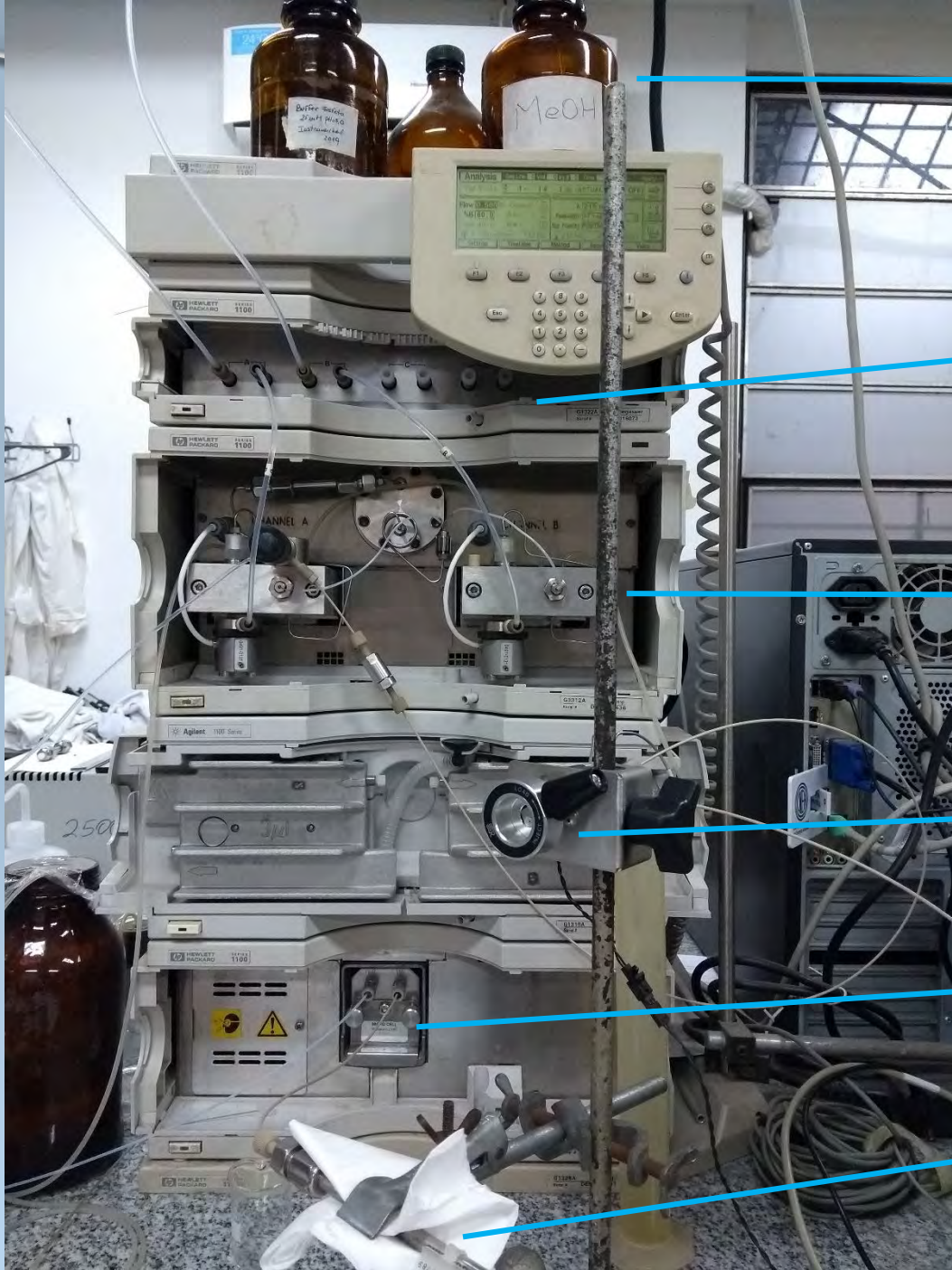
(3) Bomba

(4) Inyector

(6) Detector

(5) Columna

(7) Registro – Análisis de datos (software cromatográfico)



(1) Reservorios de solventes

(2) Desgasificador

Sistema HP Agilent 1100

(3) Bomba

(4) Inyector

(6) Detector

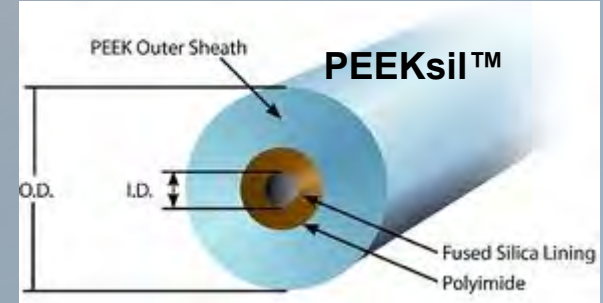
(5) Columna

(7) Registro – Análisis de datos (software cromatográfico)



Sistema HP Agilent 1100

Tuberías (tubing)



Tuercas de unión (fittings)

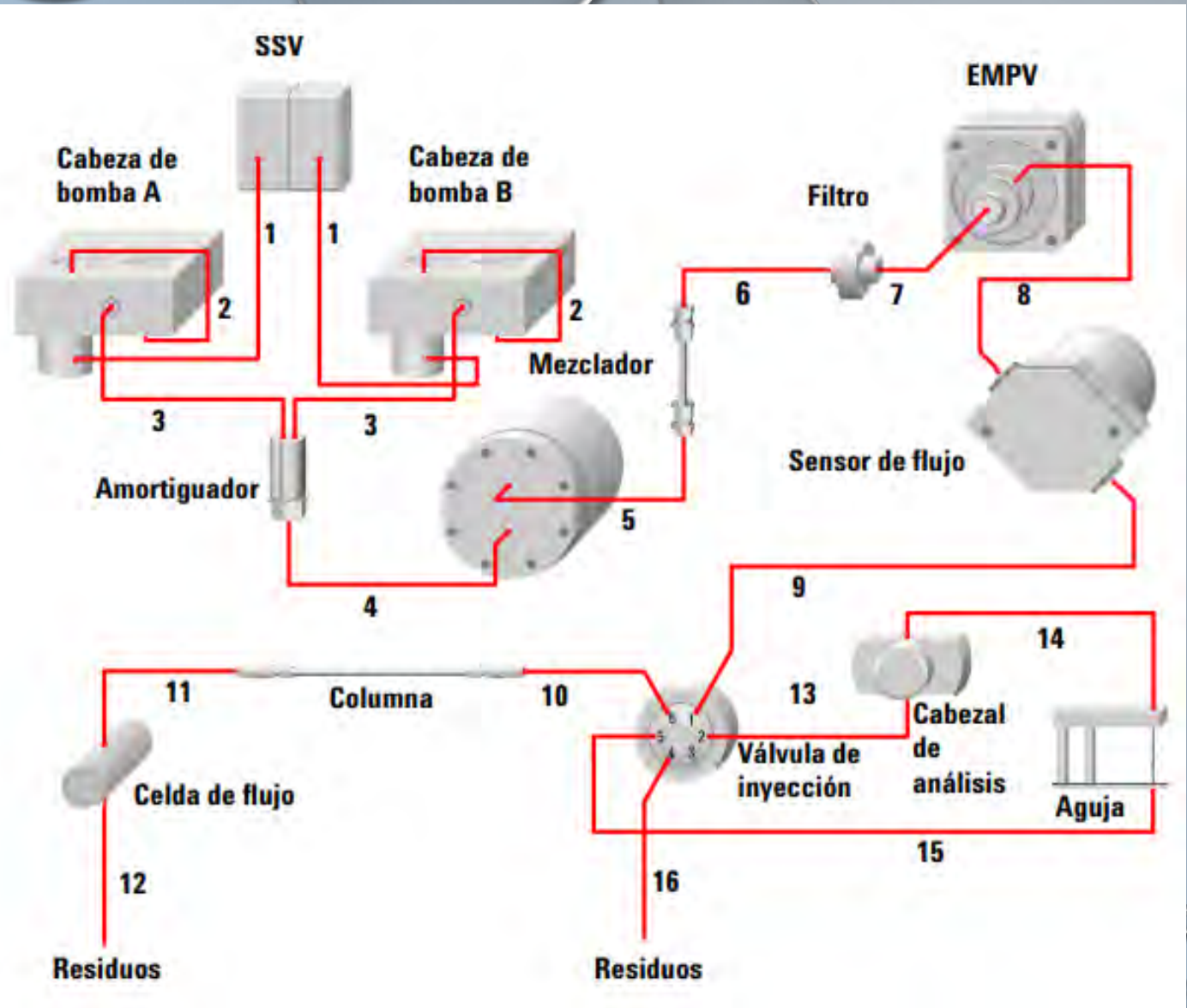


Diagrama de flujo capilar del sistema de cromatografía líquida capilar Agilent 1100

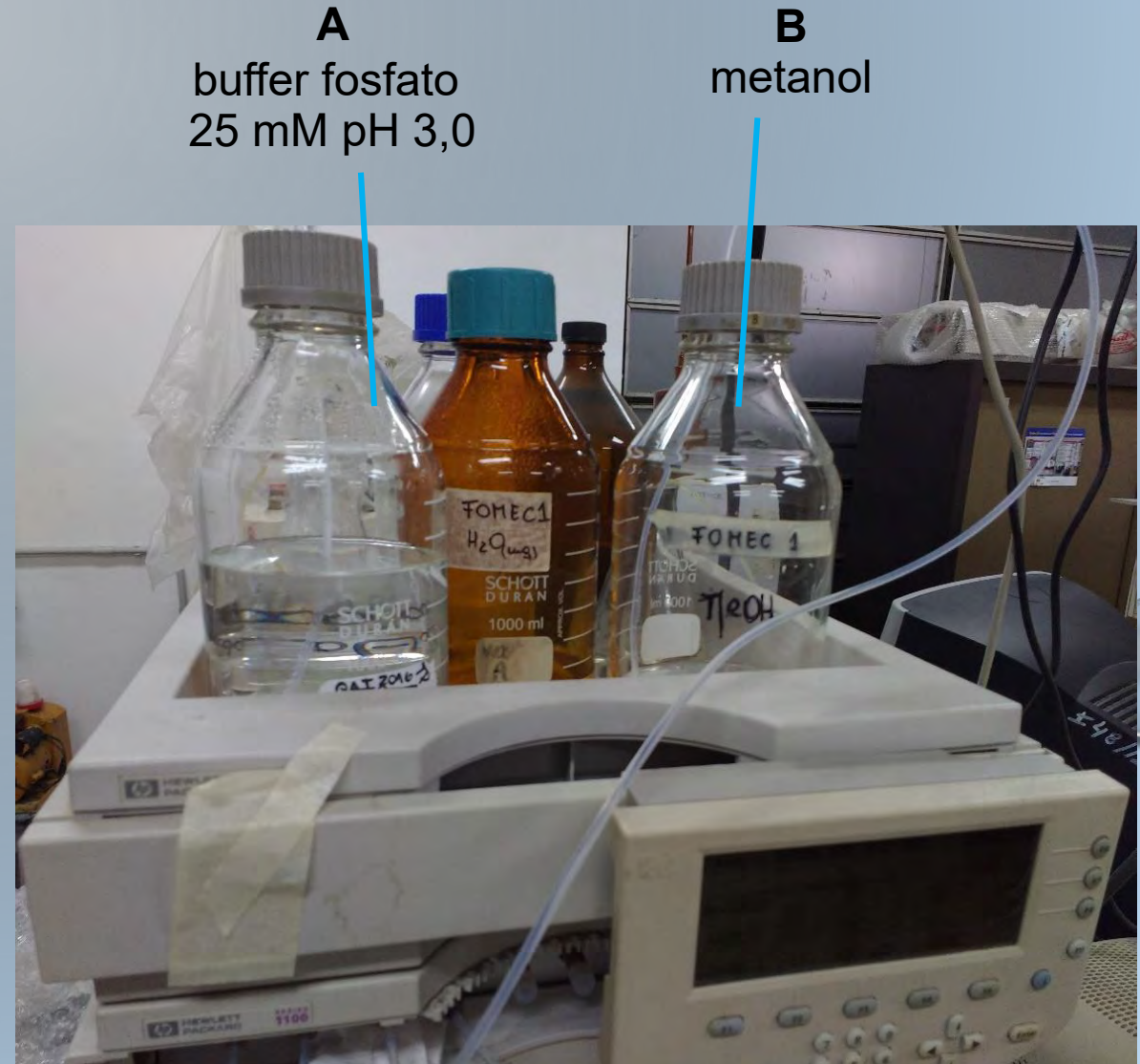
(1) Reservorios de solventes

La fase móvil en HPLC fase inversa (RPLC) consiste en una mezcla:

solvente A: de agua o un buffer acuoso

solvente B: un modificador orgánico que suele ser metanol, acetonitrilo o THF.

En este caso el solvente A va a ser buffer fosfato 25 mM pH 3,0, mientras que el solvente B será metanol.



(1) Reservorios de solventes

Los solventes empleados deben ser de alta pureza (calidad HPLC)



(1) Reservorios de solventes

La fase móvil (A+B, o A y B por separado) debe filtrarse por membranas de 0,45 o 0,22 μm de tamaño de poro para eliminar partículas que pueden ocasionar obstrucciones.



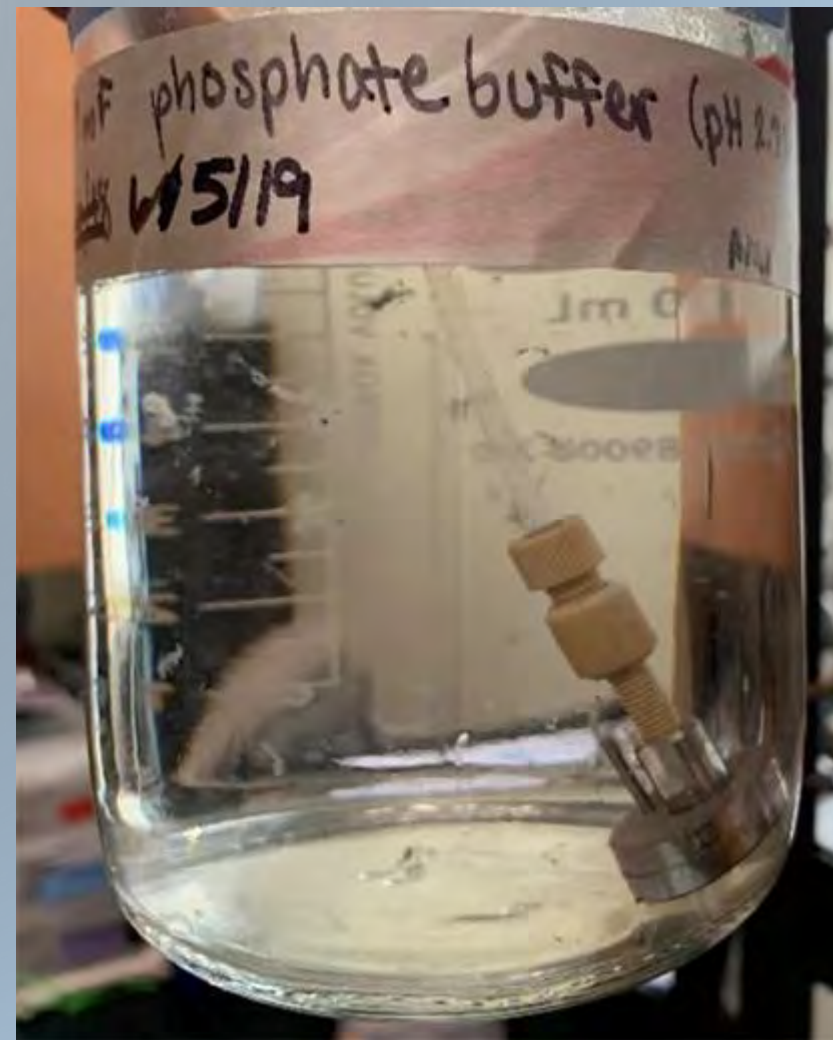
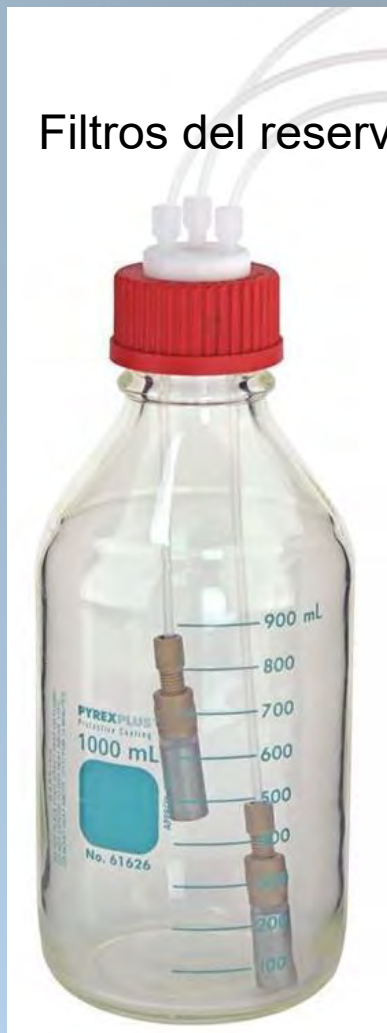
(1) Reservorios de solventes

La fase móvil (A+B, o A y B por separado) debe filtrarse por membranas de 0,45 o 0,22 μm de tamaño de poro para eliminar partículas que pueden ocasionar obstrucciones.



(1) Reservorios de solventes

Filtros del reservorio de solventes



(2) Desgasificador

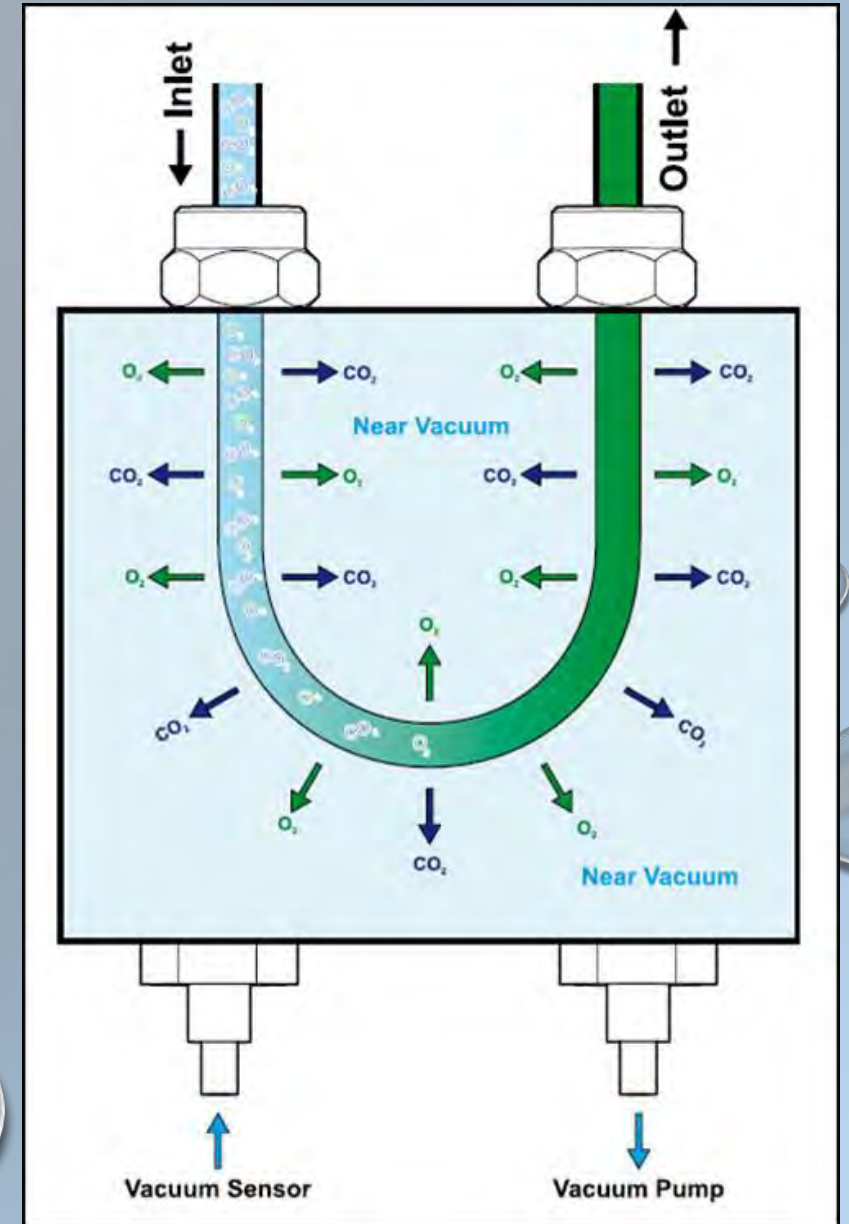
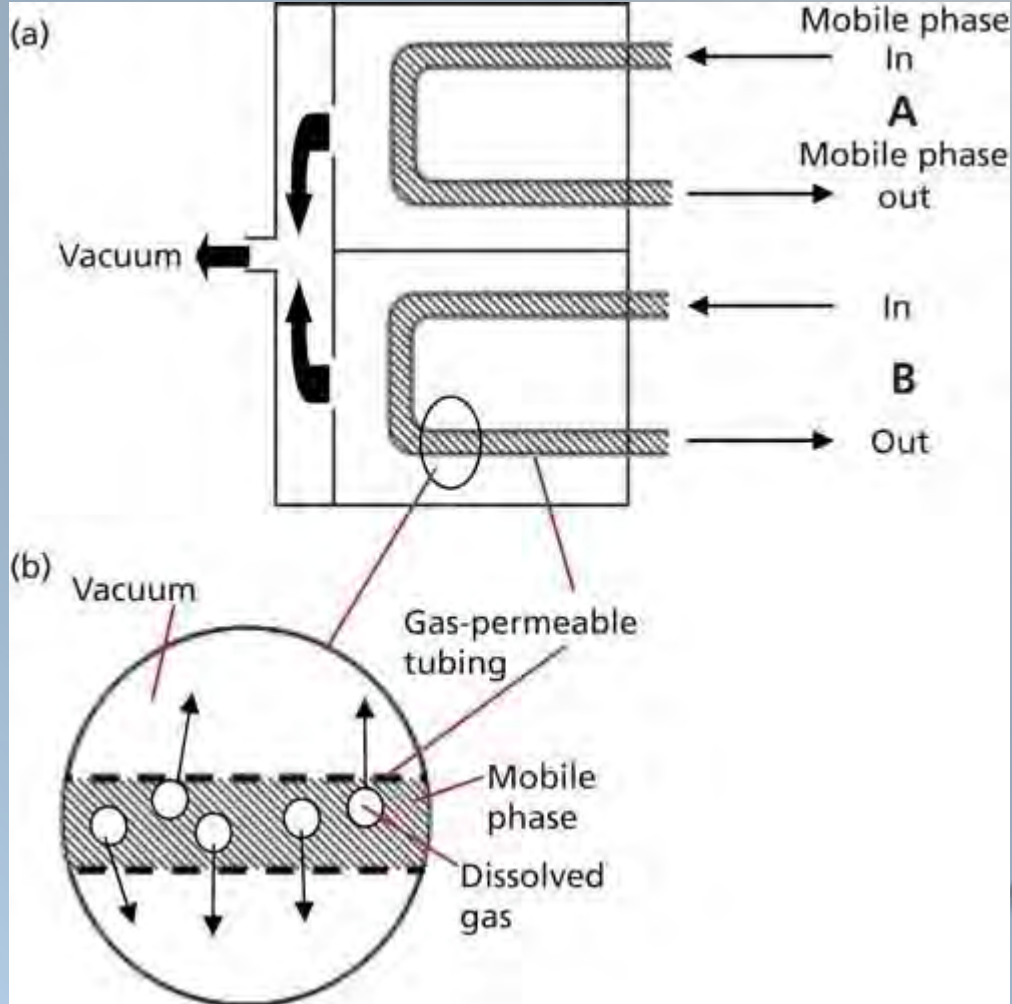
Las burbujas de aire pueden deteriorar el relleno de las columnas y producir inestabilidad en la señal del detector. Asimismo, la presencia de burbujas en la zona de la bomba (pistones) puede hacer que esta bombee en falso o erráticamente.

Para evitar estos inconvenientes los solventes deben desgasificarse. Por lo general los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de solvente por vacío que se conectan en línea.



Agilent 1100 HPLC G1322A Degasser

(2) Desgasificador



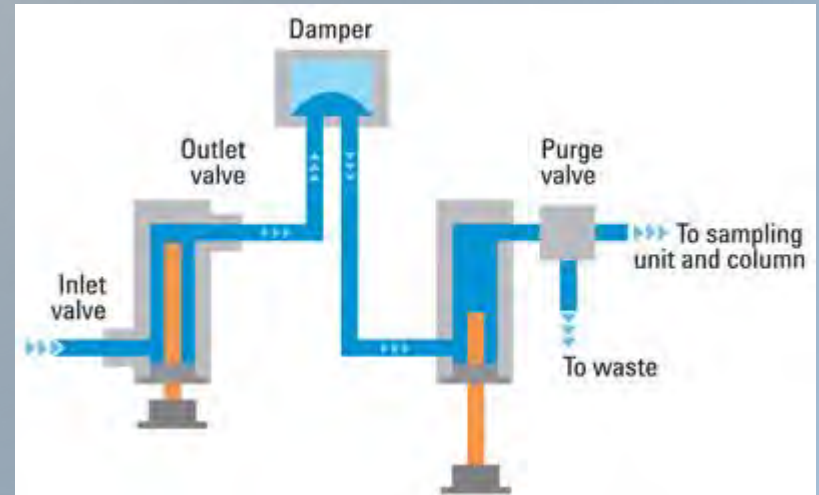
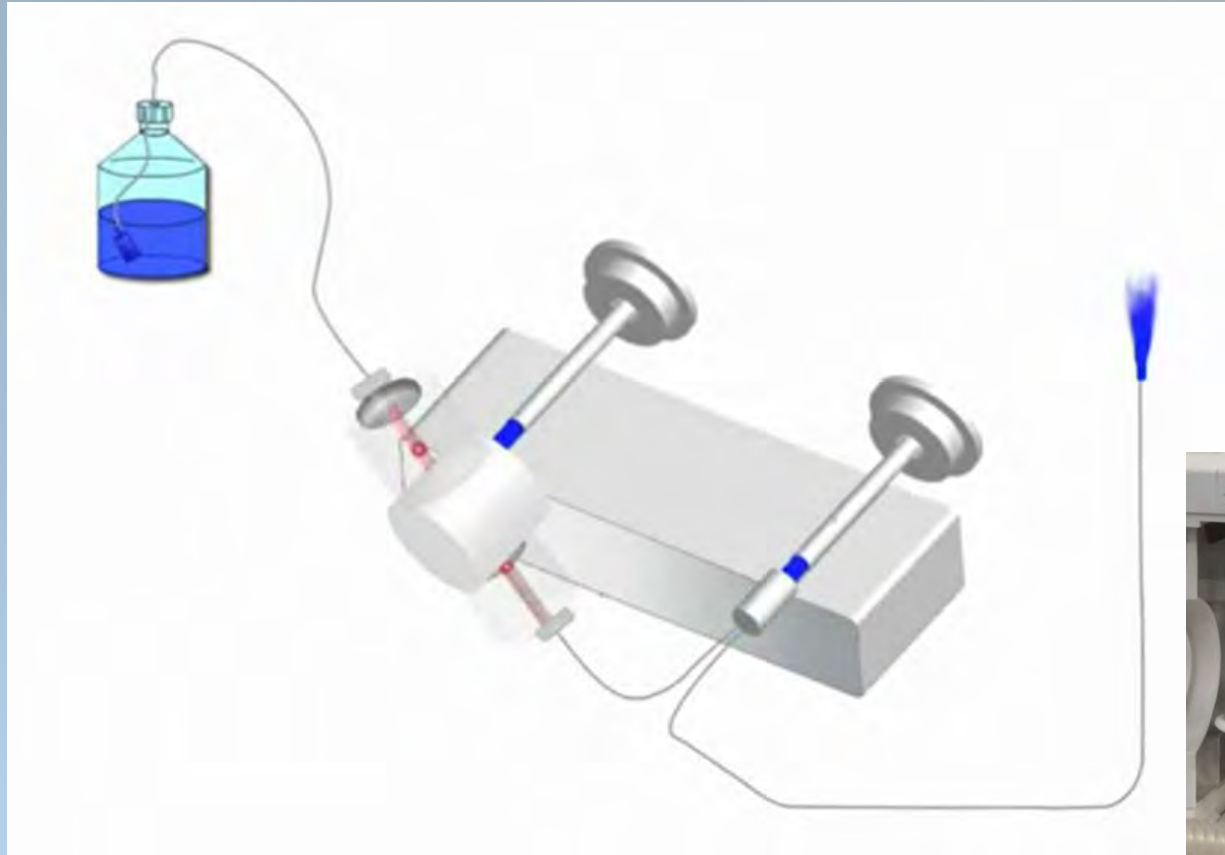
(3) Bomba

La finalidad de la bomba es impulsar la fase móvil a lo largo de todo el sistema cromatográfico. Debido al pequeño tamaño de partícula del relleno de las columnas, este movimiento de la fase móvil va asociado a un gran gradiente de presión.



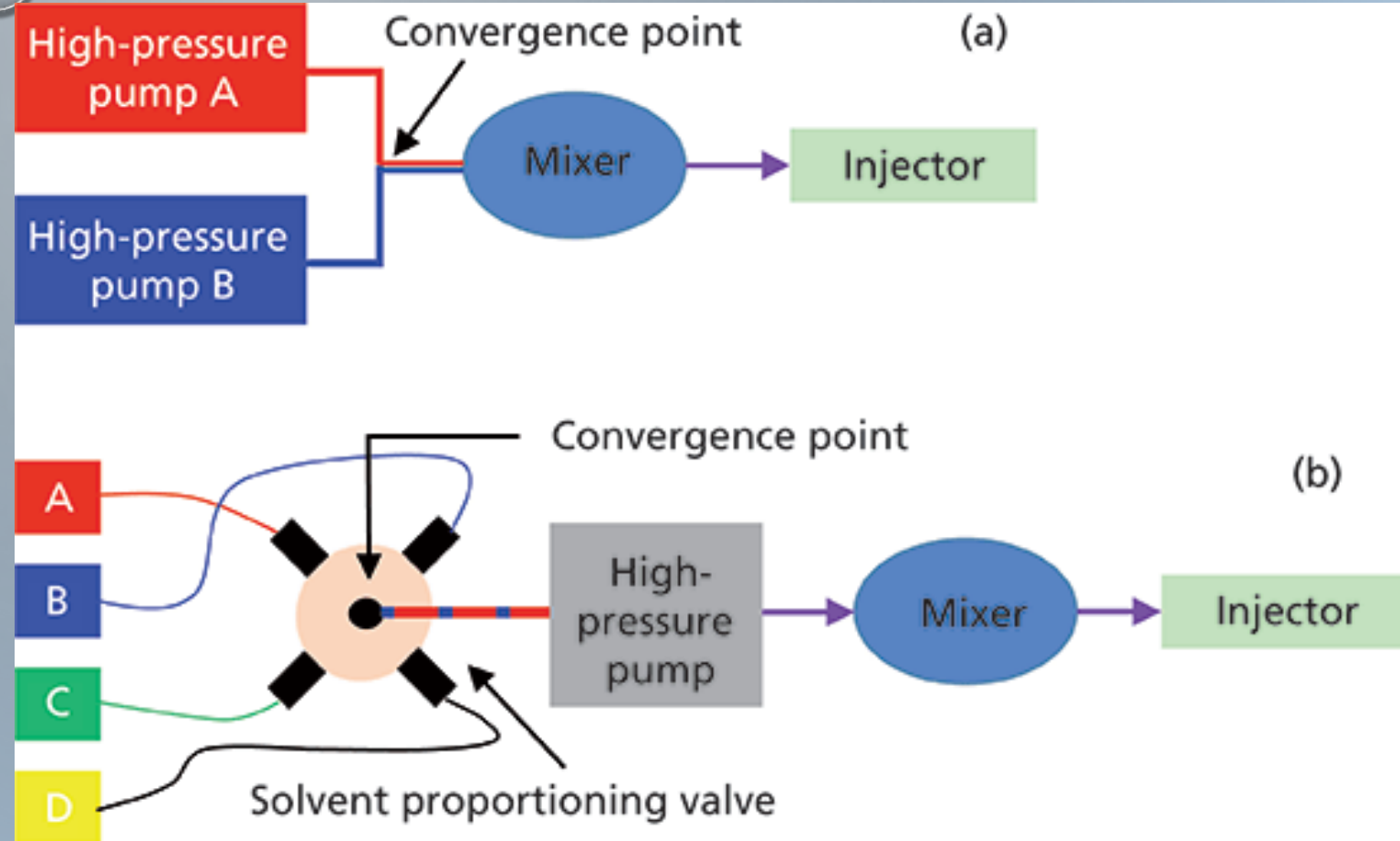
(3) Bomba

El diseño de bomba más sencillo es la **bomba isocrática**, la cual tiene sólo un canal de disolvente; es decir, no se puede modificar la composición durante un método.



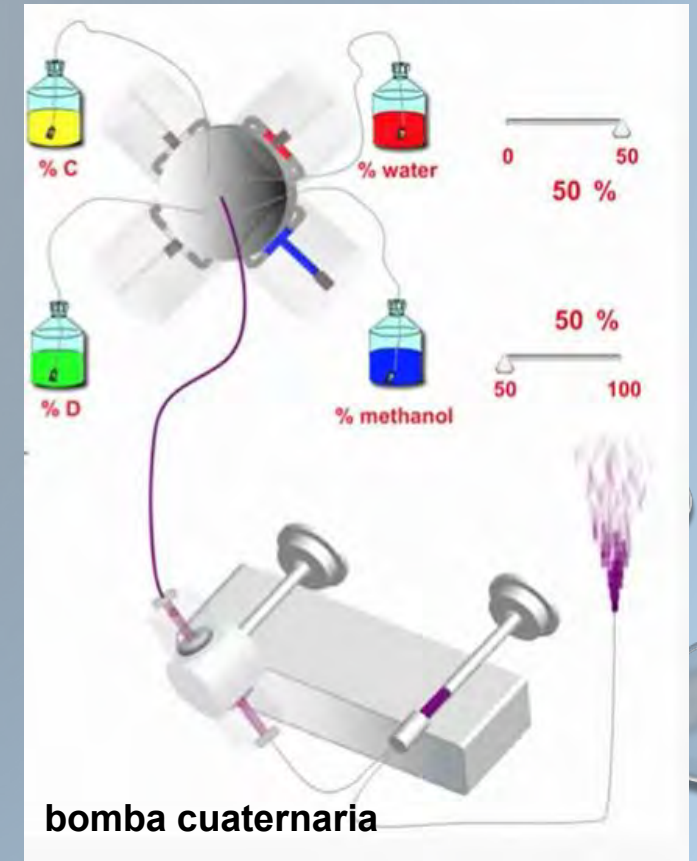
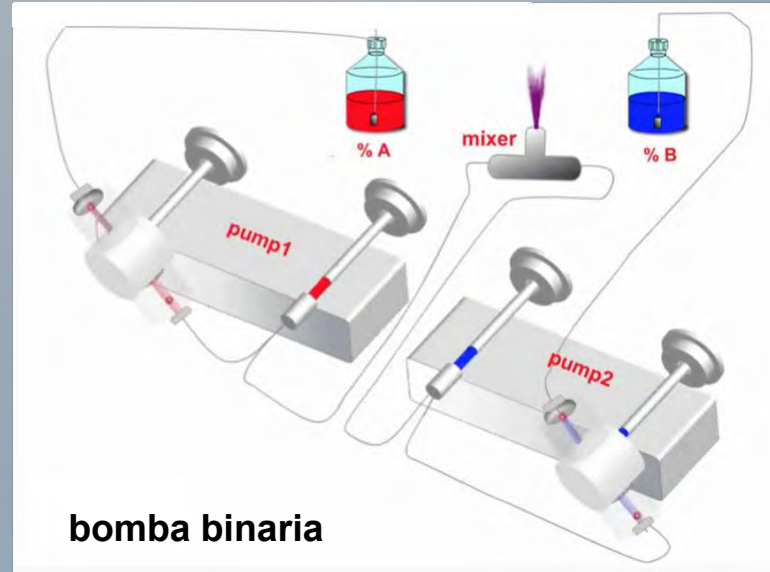
(3) Bomba

La figura muestra los dos diseños de bomba más utilizados hoy en día cuando se requiere un gradiente: (a) una **bomba binaria**, en donde cada uno de los dos constituyentes de la fase móvil es impulsado por una bomba y luego se mezclan en condiciones de alta presión, y (b) una **bomba cuaternaria**, en donde dos o más fluidos se mezclan a baja presión y luego son impulsados por una única bomba



(3) Bomba

La figura muestra los dos diseños de bomba más utilizados hoy en día cuando se requiere un gradiente: (a) una **bomba binaria**, en donde cada uno de los dos constituyentes de la fase móvil es impulsado por una bomba y luego se mezclan en condiciones de alta presión, y (b) una **bomba cuaternaria**, en donde dos o más fluidos se mezclan a baja presión y luego son impulsados por una única bomba



https://www.youtube.com/watch?v=wXpS9VZ_vqA

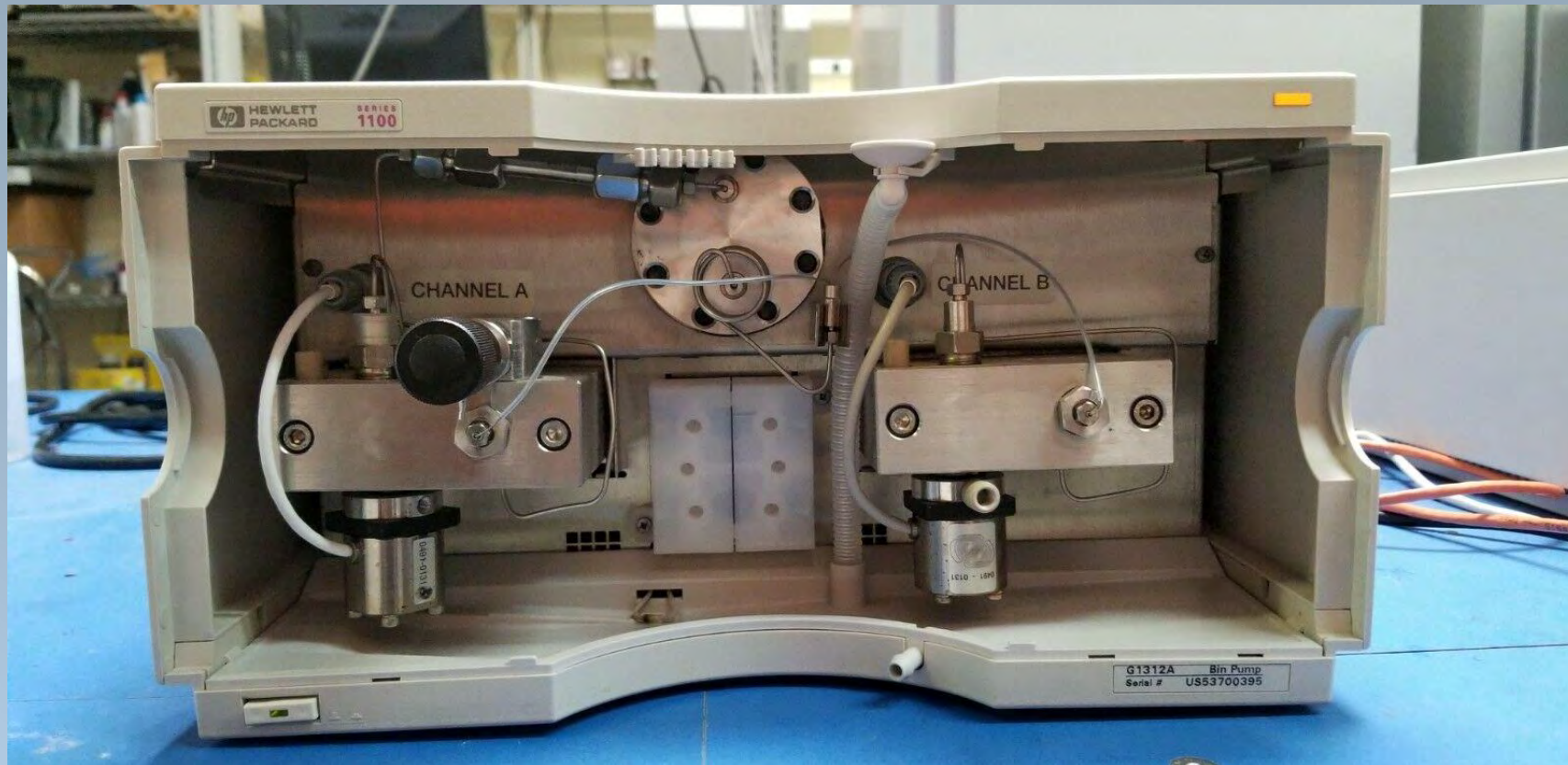
(3) Bomba

El equipo que vamos a emplear posee una bomba binaria. La bomba binaria se compone de dos bombas idénticas integradas en una única carcasa: A para el buffer acuoso y B para el modificador orgánico.



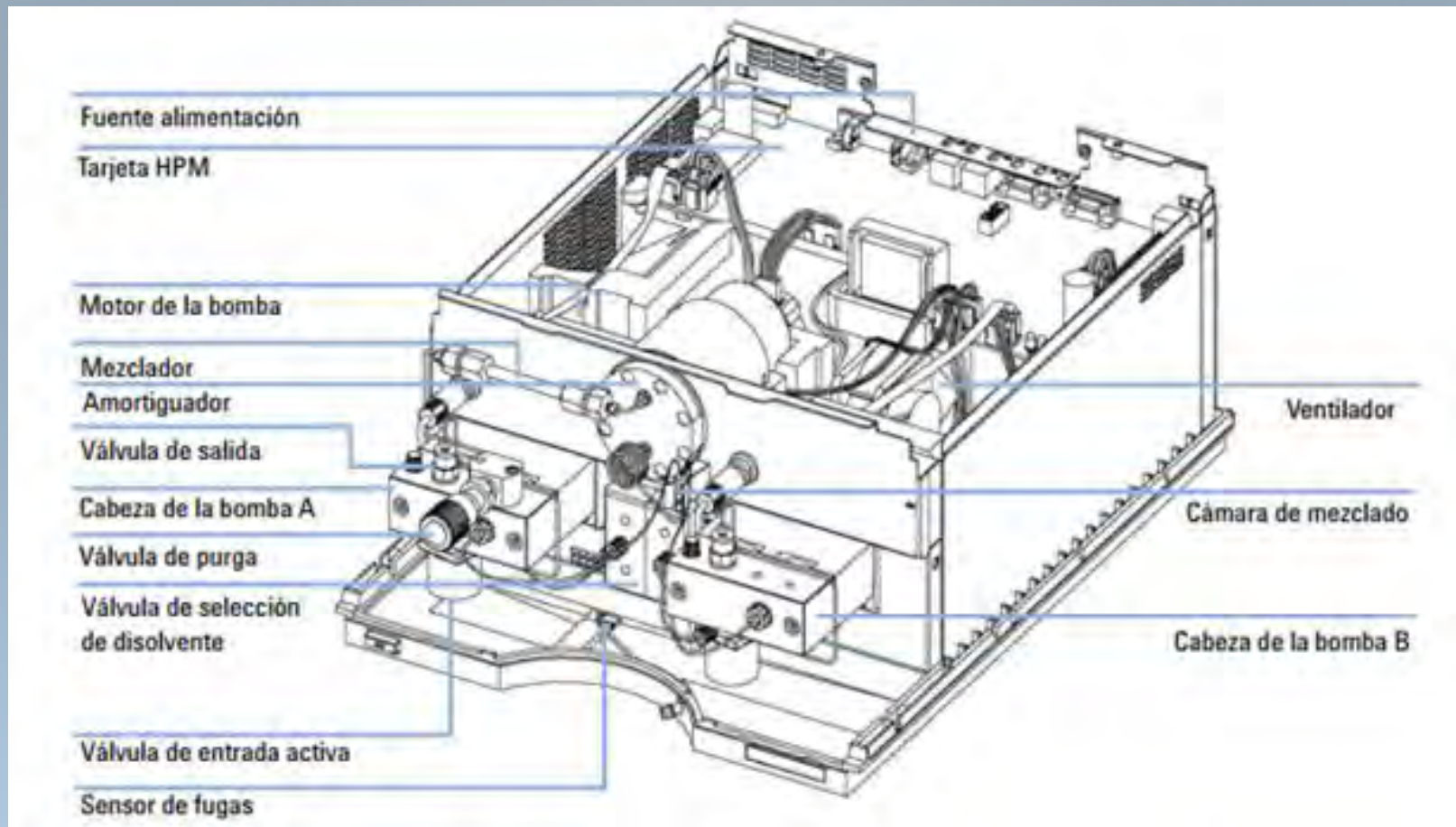
(3) Bomba

El equipo que vamos a emplear posee una bomba binaria. La bomba binaria se compone de dos bombas idénticas integradas en una única carcasa: A para el buffer acuoso y B para el modificador orgánico.



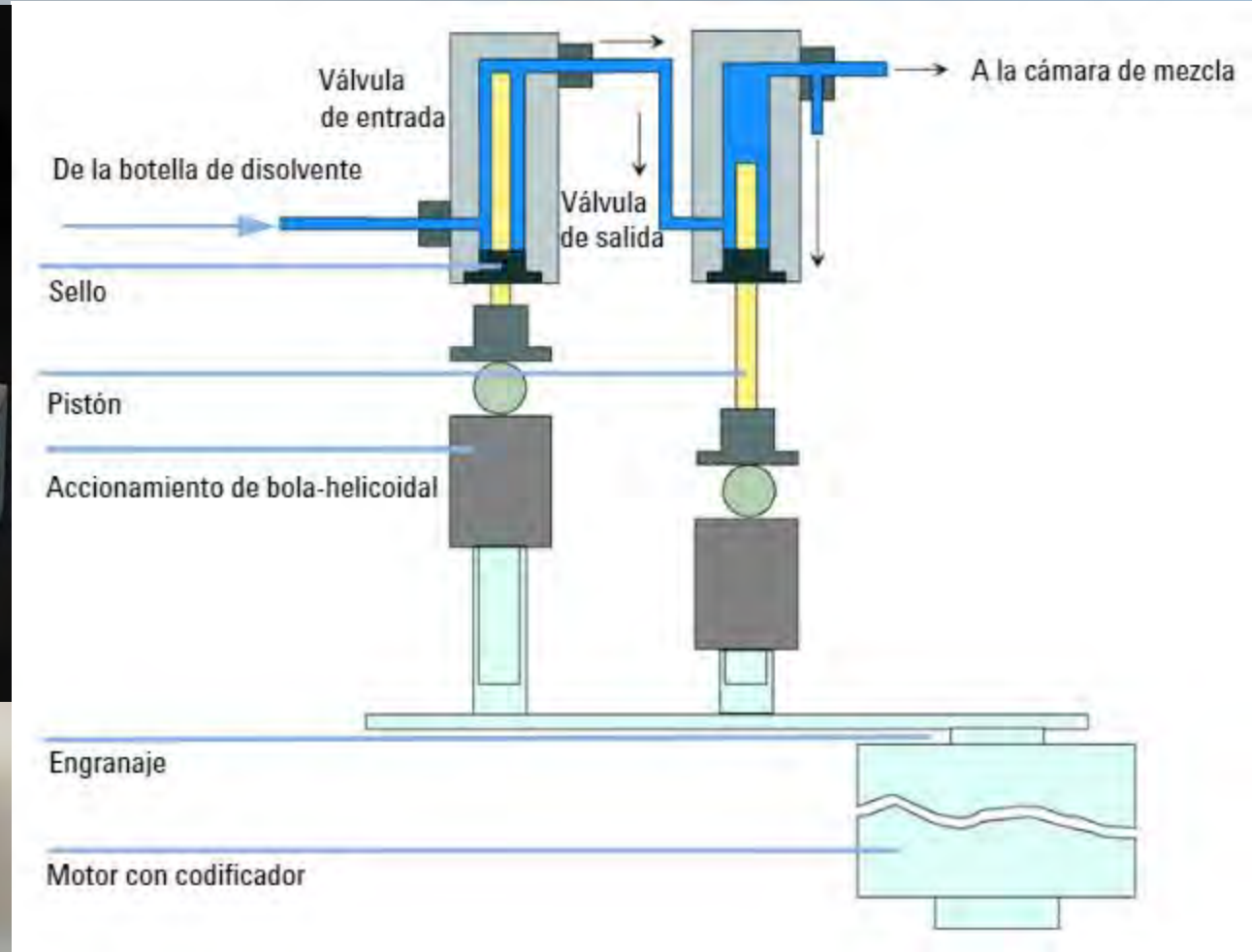
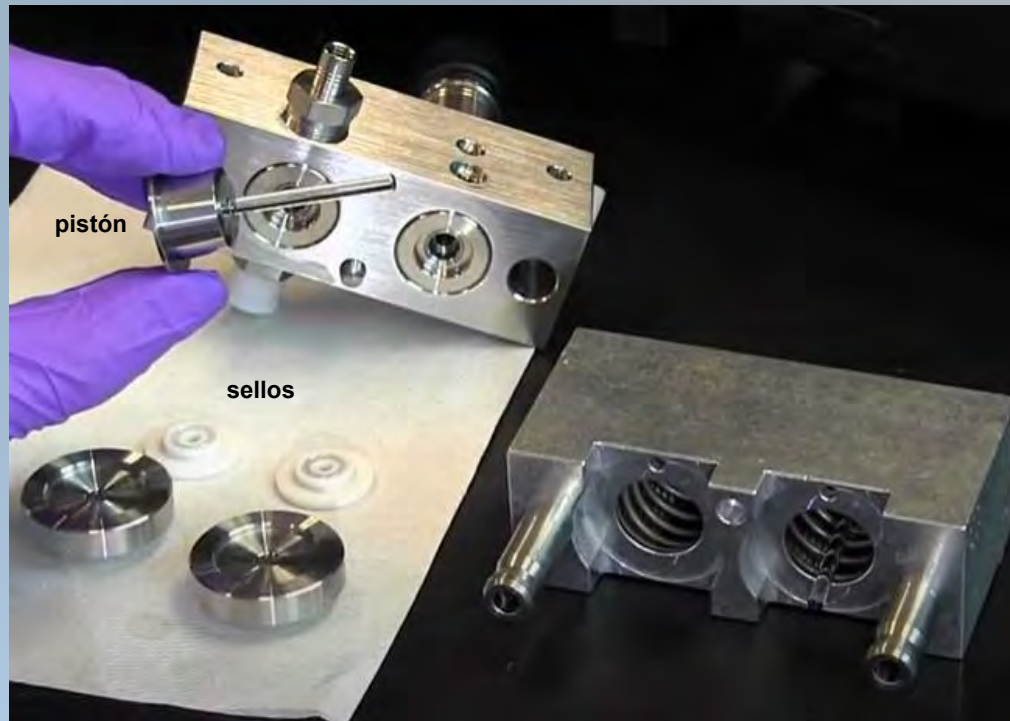
(3) Bomba

El equipo que vamos a emplear posee una bomba binaria. La bomba binaria se compone de dos bombas idénticas integradas en una única carcasa: A para el buffer acuoso y B para el modificador orgánico.



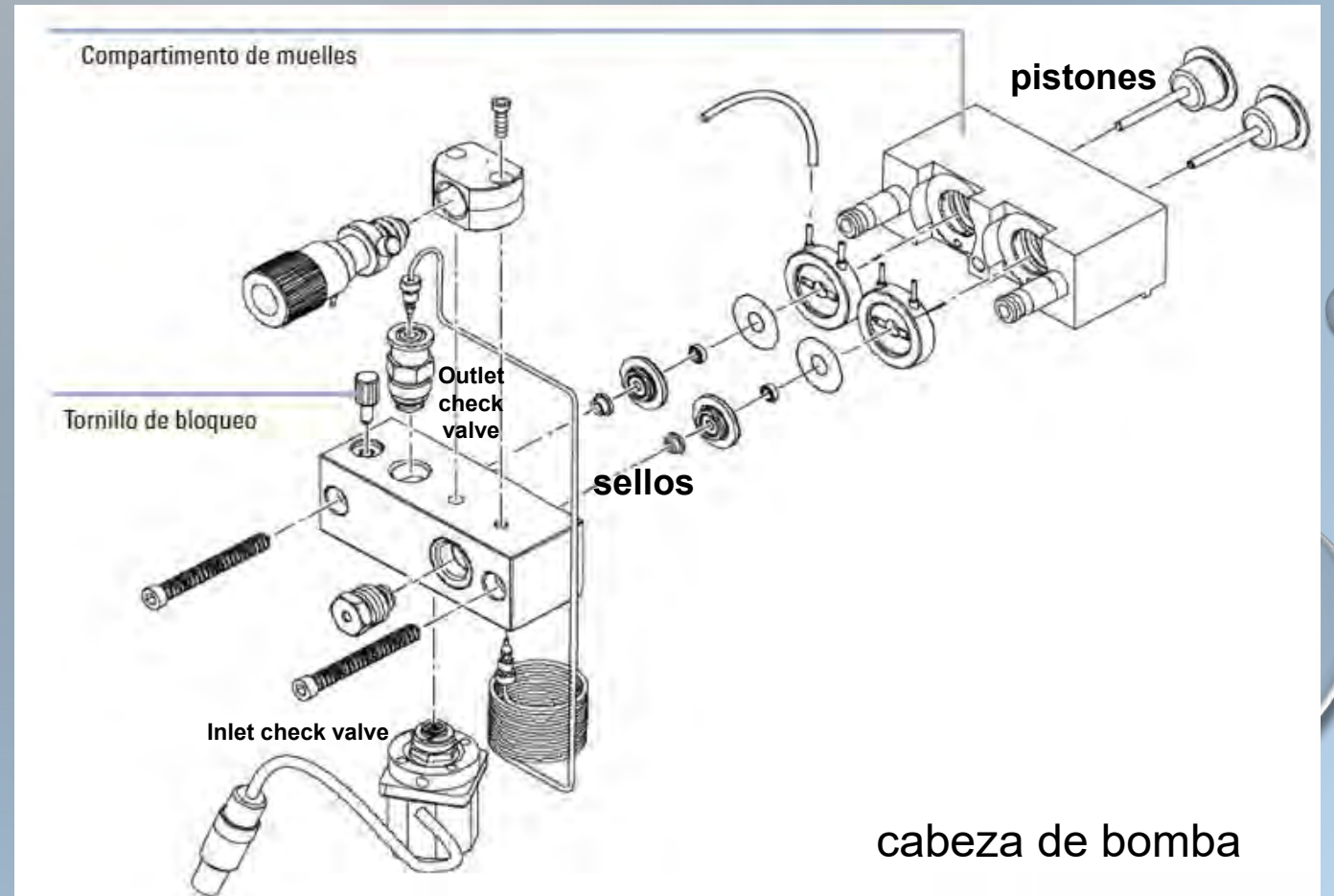
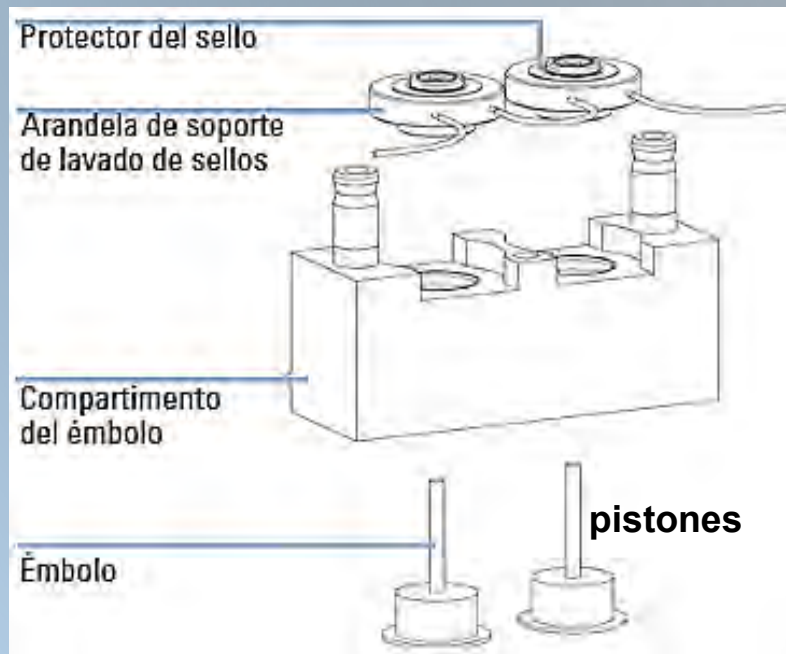
(3) Bomba

Cada unidad de bomba es del tipo alternante (o recíprocante), e incluye un accionamiento de bola-helicoidal y una cabeza de bomba con dos pistones de zafiro en serie.



(3) Bomba

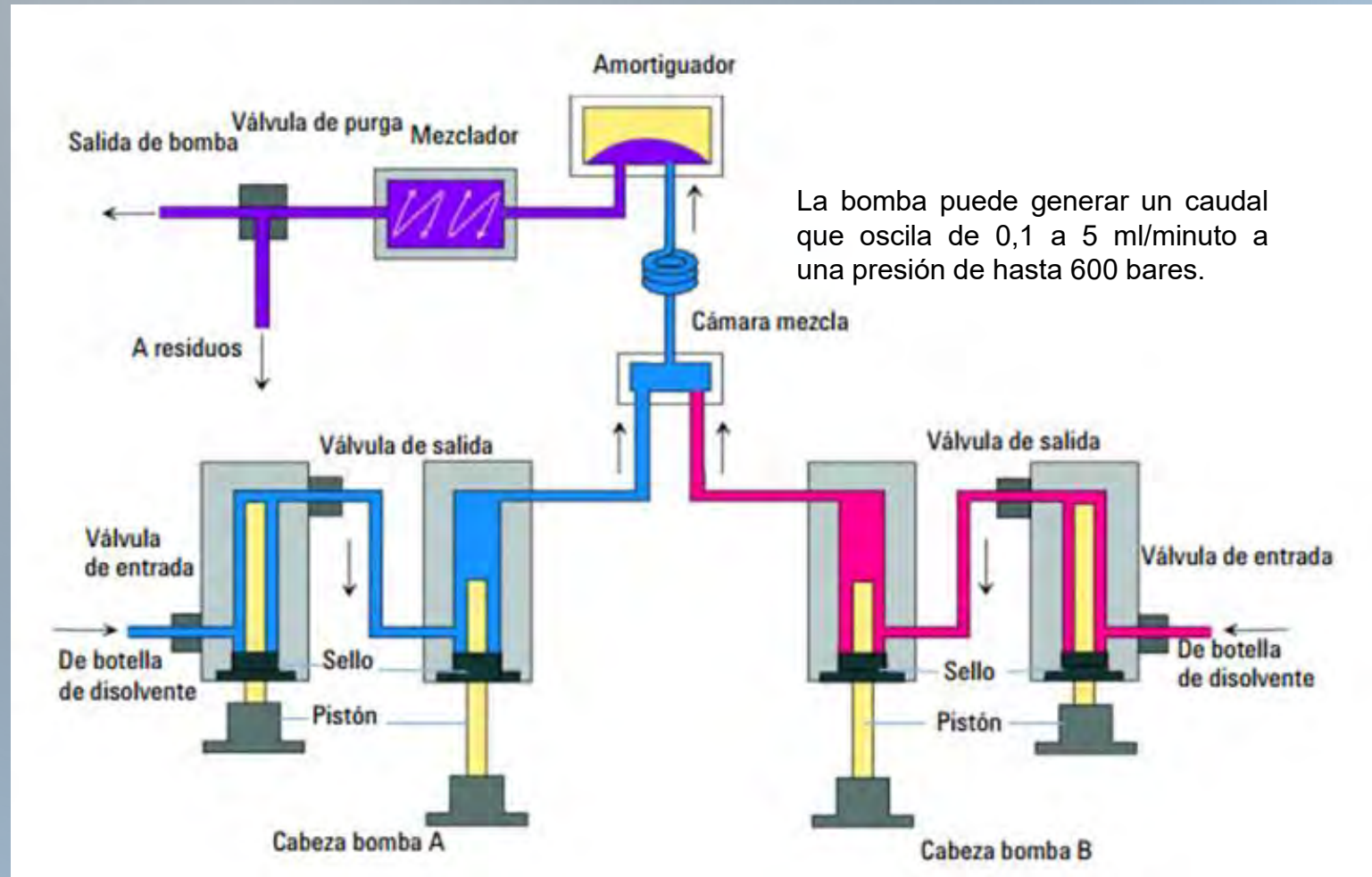
Cada unidad de bomba es del tipo alternante (o recíprocante), e incluye un accionamiento de bola-helicoidal y una cabeza de bomba con dos pistones de zafiro en serie.



(3) Bomba

Los solventes A y B son impulsados por sus respectivas bombas, y luego estos se mezclan a alta presión en una cámara de mezcla de poco volumen, que está conectada por una bobina capilar de restricción a una unidad de amortiguamiento y a un mezclador.

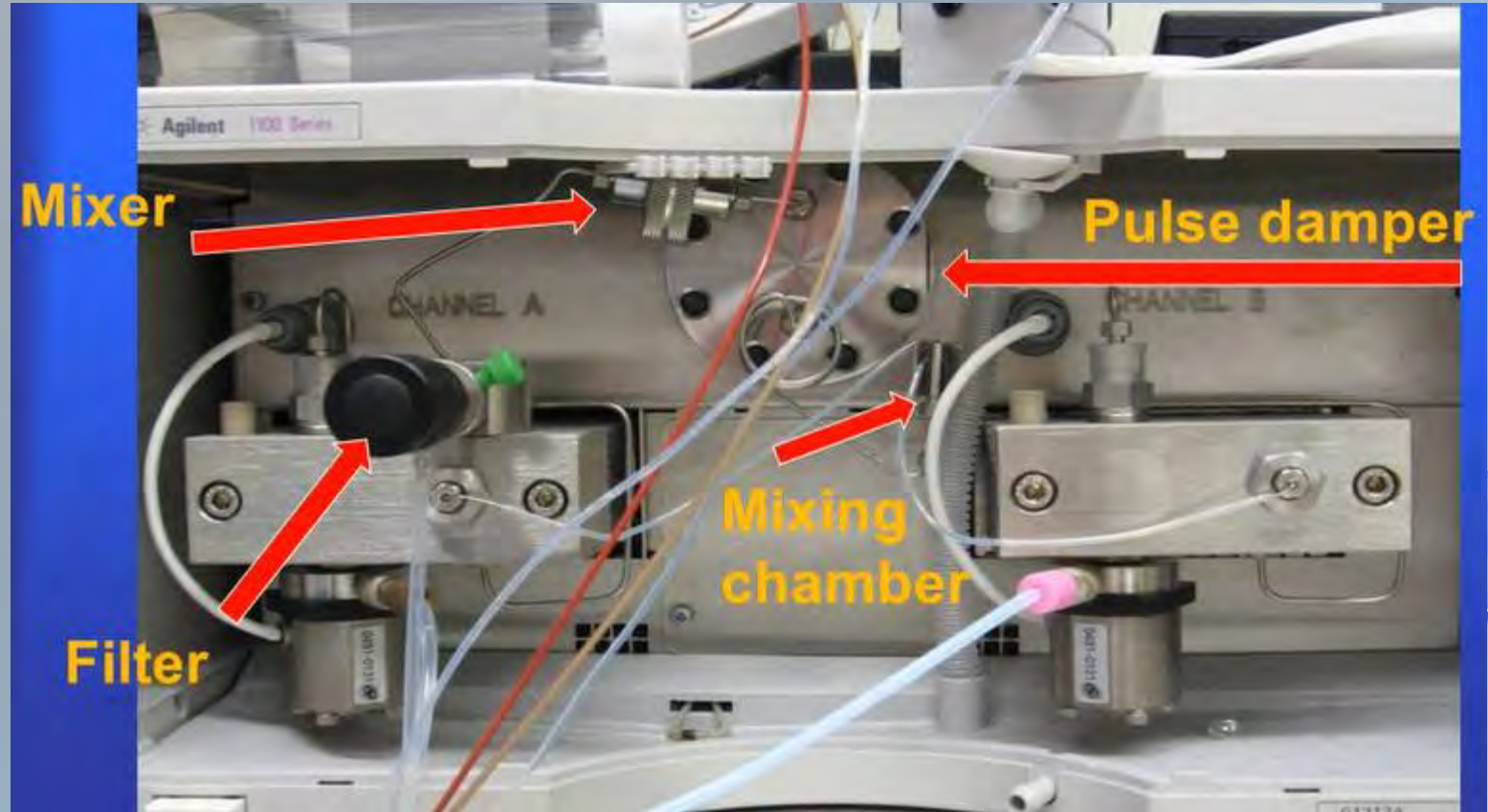
En este caso nuestra fase móvil va a ser 40% A y 60% B.



(3) Bomba

Los solventes A y B son impulsados por sus respectivas bombas, y luego estos se mezclan a alta presión en una cámara de mezcla de poco volumen, que está conectada por una bobina capilar de restricción a una unidad de amortiguamiento y a un mezclador.

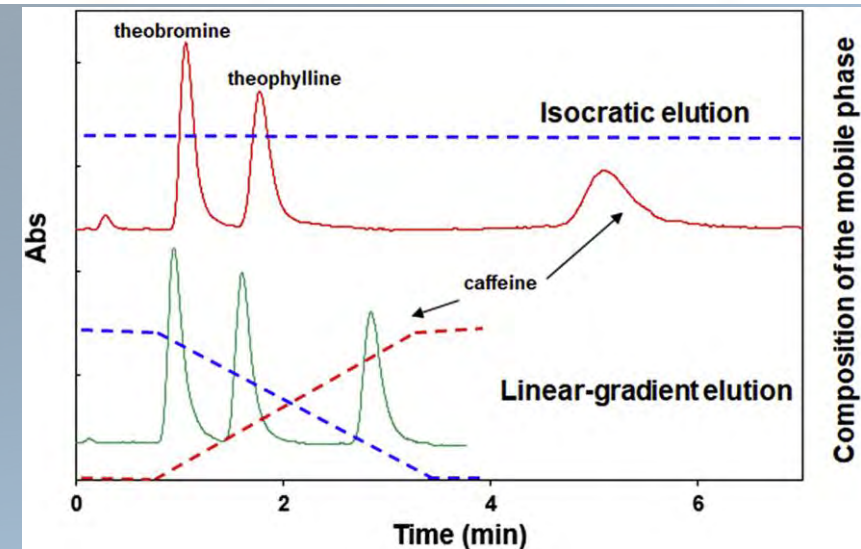
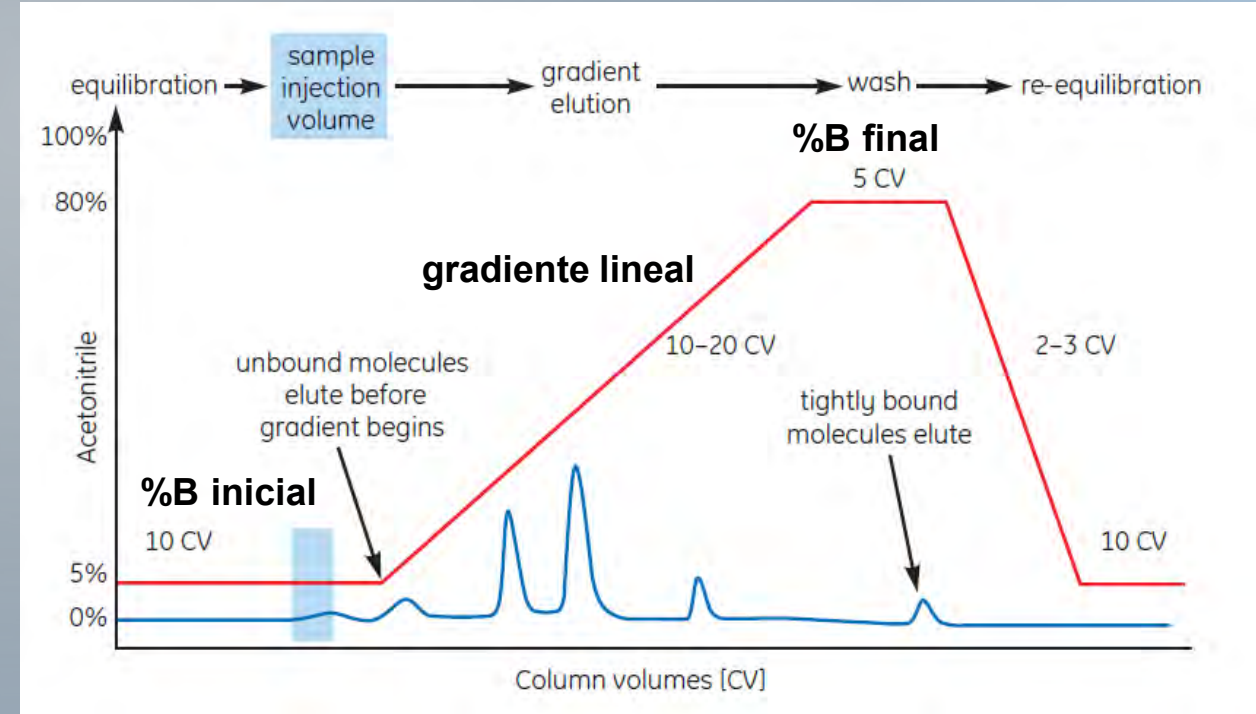
En este caso nuestra fase móvil va a ser 40% A y 60% B.



(3) Bomba

Cuando durante toda la separación se utiliza siempre la misma composición de fase móvil, como en este caso, la corrida se denomina **isocrática**.

Sin embargo, es muy común programar el equipo para que esa composición vaya variando en el tiempo, es decir, las bombas varíen sus caudales de manera tal que se genere un gradiente de B. En el caso de mezclas complejas, realizar un **gradiente de composición de la fase móvil** a lo largo de la cromatografía permite mejorar la eficiencia y acortar la duración del proceso.





> Practical HPLC simulator

Practical HPLC simulator : Software for simulation in liquid chromatography

- HPLC
- HPLC Calculator
- HPLC Teaching Assistant
- Practical HPLC simulator**
- LC Multicolumn Optimizer
- CE
- zeecal
- Metabolomics
- ROMANCE

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Viscosity (cP): 0.90

HPLC system

DHPLC system

pH: 7.0

20 mM phosphate buffer

acetonitrile

UV DETECTOR

UV cell volume: 13.0 µL
Wavelength: 220 nm
Time constant: 1000 ms
Acquisition rate: 2 Hz

COLUMN OVEN

L col: 150 mm
dc col: 4.6 mm
dp col: 5.0 µm
Chemistry: C18

Temperature: 30°C
Porosity: 0.70
t₀ (min): 1.76

INJECTOR

sample: Mix 3 - Lidocaine formulation
sample diluent: 20% organic solvent

V_{inj}: 20.0 µL
[C]: 0.100 mg/mL

Outlet tubing: L_{tot}: 50 cm, d_{int}: 250 µm
Inlet tubing: L_{tot}: 50 cm, d_{int}: 250 µm

WASTE

PRACTICAL HPLC

Absorbance (mAU) vs Time (min)

OUTPUT DATA

Compound	t _r (min)	k	W _{0.05} (min)	N	Asymmetry	T _r	Height (mAU)	Peak Area	Noise	S/N
Methylparaben	10.10	4.79	0.211	12 454	1.07	-	39.8	130.1		240
2,6-dimethylanisole	25.88	13.55	0.505	13 981	1.00	18.46	11.6	92.1		70
Propylparaben	50.58	28.18	1.006	14 191	1.05	14.87	9.7	154.7		59
Lidocaine	64.72	35.81	1.268	14 217	1.05	4.98	6.0	119.9	0.100	86

Methylparaben

Absorbance (mAU) vs Wavelength (nm)

Mobile phase pH

PRACTICAL HPLC SIMULATOR V1.0

HPLC system

UHPLC system

Viscosity (cP) 0.85

pH 7.0
20 mM phosphate buffer

Acetonitrile

UV DETECTOR

UV cell volume 13.0 µL
Wavelength 220 nm
Time constant 1000 ms
Acquisition rate 2 Hz

COLUMN OVEN

L col 150 mm
dc col 4.6 mm
dp col 5.0 µm
Chemistry C18

Temperature 30°C
Porosity 0.70
t₀ (min) 1.74

INJECTOR

sample Mix 4 - cannabinoids
sample diluent 20% organic solvent

V_{inj} 20.0 µL
[C] 0.100 mg/mL

PUMP

Isocratic 40 %B

Flow rate 1.0 mL/min
u (mm/s) 1.43 mm/s
Pressure 57 bar
V_d 1500 µL

CHROMATOGRAM

OUTPUT DATA

Compound	tr (min)	k	W _{50%} (min)	N	Asymmetry	Rs	Height (mAU)	Peak Area	Noise	S/N
CBD-A	17.66	9.12	0.352	13,918	1.07	-	53.2	63.6		116
CBG-A	23.71	12.59	0.469	14,155	1.03	6.27	38.8	61.5		84
THC-A	47.22	26.06	0.927	14,383	1.11	14.33	19.6	62.0		43
CBD	174.64	99.08	3.419	14,455	1.06	24.95	4.2	48.7	0.166	9
CBN	244.85	139.32	4.793	14,458	1.13	7.28	4.5	74.2		10
THC	299.46	170.61	5.862	14,459	1.07	4.36	2.3	46.7		5

PERFORMANCE

Average column efficiency for all peaks 14,305

CONTRIBUTION TO EXTRA-COLUMN VOLUME

%N loss 1

Contribution: 75%, 50%

THC

λ_{max} 220

pKa 9.34

Chemical Structure: CC1=C(C)C=C(C2=CC(=C(C=C2)O)CCCC)O1

Corrida isocrática con bajo %B: compuestos con mayor carácter no polar muy retenidos, picos anchos y tiempos de análisis largos (análogo a lo que pasa en una corrida isotérmica a baja T en CG)

PRACTICAL HPLC SIMULATOR V1.0

UV DETECTOR

pH 7.0
20 mM phosphate buffer

Acetonitrile

Viscosity (cP) 0.54

UV cell volume 13.0 μ L
Wavelength 220 nm
Time constant 1000 ms
Acquisition rate 2 Hz

COLUMN OVEN

L col 150 mm
dc col 4.6 mm
dp col 5.0 μ m
Chemistry C18

Temperature 30°C
Porosity 0.70
 t_0 (min) 1.74

INJECTOR

sample Mix 4 - cannabinoids
sample diluent 20% organic solvent

V_{inj} 20.0 μ L
[C] 0.100 mg/mL

PUMP

Isocratic 80%B

Flow rate 1.0 mL/min
u (mm/s) 1.43 mm/s
Pressure 36 bar
Vd 1500 μ L

CHROMATOGRAM

OUTPUT DATA

Compound	t_r (min)	k	$W_{50\%}$ (min)	N	Asymmetry	R_s	Height (mAU)	Peak Area	Noise	S/N
CBD-A	1.75	0.00	0.076	2,960	1.07	-	240.1	2448.8	0.166	523
CBG-A	1.75	0.01	0.076	2,966	1.03	0.01	232.8	2364.5		507
THC-A	1.82	0.04	0.076	3,158	1.11	0.39	230.6	2385.8		503
CBD	3.54	1.03	0.095	7,648	1.06	8.51	147.8	1888.6		322
CBN	5.82	2.33	0.129	11,307	1.13	8.65	166.4	2901.8		363
THC	7.58	3.34	0.158	12,782	1.07	5.23	86.5	1831.4		189

THC

λ_{max} 220

pH

pKa 9.34

PERFORMANCE

Average column efficiency for all peaks 6,803

Contribution to extra-column volume %N loss

Reason? retention outside 1kk<10

Corrida isocrática con alto %B: los tiempos de análisis se acortan significativamente, pero la fuerza de la FM es tan grande que los compuestos más polares son poco retenidos y no son resueltos (análogo a lo que pasa en una corrida isotérmica a alta T en CG)

PRACTICAL HPLC SIMULATOR V1.0

UV DETECTOR

UV cell volume: 13.0 µL
Wavelength: 220 nm
Time constant: 1000 ms
Acquisition rate: 2 Hz

COLUMN OVEN

L col: 150 mm, dc col: 4.6 mm, dp col: 5.0 µm, Chemistry: C18
Temperature: 30°C, Porosity: 0.70, t_0 (min): 1.74

INJECTOR

sample: Mix 4 - cannabinoids
sample diluent: 20% organic solvent
 V_{inj} : 20.0 µL
[C]: 0.100 mg/mL

PUMP

Flow rate: 1.0 mL/min
 u (mm/s): 1.43 mm/s
Pressure: 57 bar
 V_d : 1500 µL

Time	%A	%B
0.00	60 %	40 %
20.00	0 %	100 %

CHROMATOGRAM

OUTPUT DATA

Compound	t_r (min)	k	$W_{50\%}$ (min)	N	Asymmetry	R_s	Height (mAU)	Peak Area	Noise	S/N
CBD-A	7.22	-	0.096	1.07	-	-	191.6	1012.0	0.166	418
CBG-A	7.73	-	0.096	1.03	2.23	185.9	979.0	405		
THC-A	9.78	-	0.101	1.11	8.88	175.7	986.0	383		
CBD	15.20	-	0.114	1.06	21.42	124.2	778.4	271		
CBN	17.34	-	0.119	1.13	7.81	179.1	1185.5	390		
THC	18.45	-	0.121	1.07	3.92	111.7	747.0	243		

THC

λ_{max} : 220

pH

pK_a : 9.34

PERFORMANCE

Gradient: Peak capacity: 122

Contribution to extra-column volume: %N loss ##

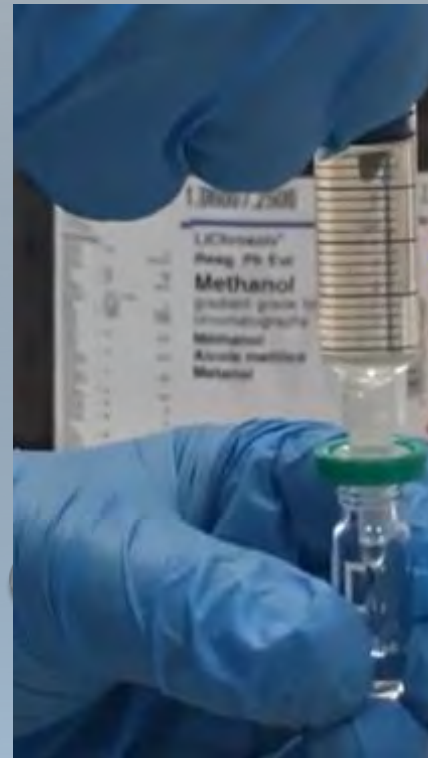
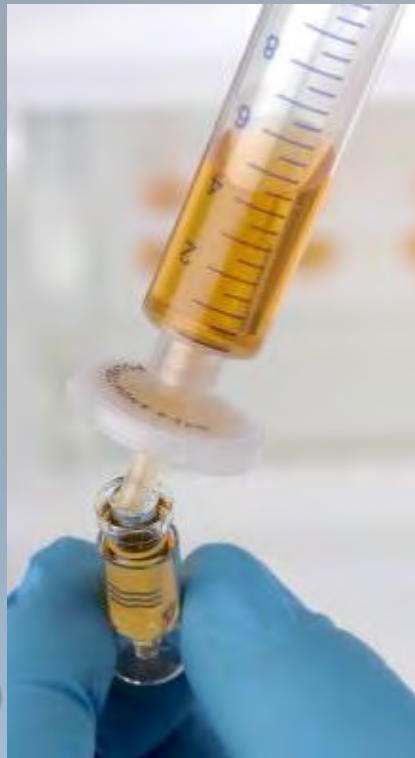
Corrida con un gradiente de %B: los picos son bien resueltos y en un tiempo aceptable

(4) Inyector

La inyección de la muestra puede hacerse en forma manual o automática.



Antes de introducirlas en el sistema, las muestras deben ser convenientemente filtradas, para lo cual se usan filtros de jeringa.

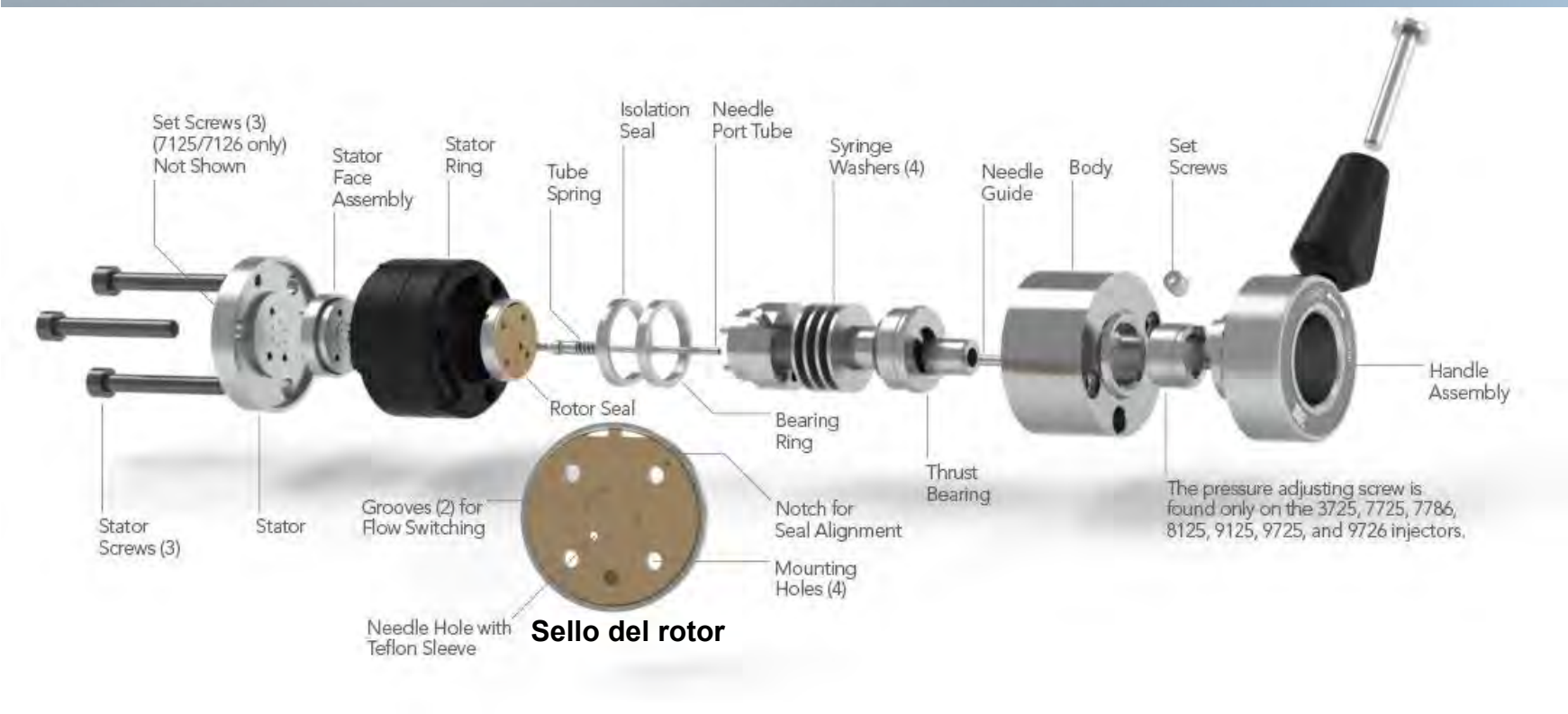


(4) Inyector

La inyección manual se realiza empleando una válvula inyectora Rheodyne de 6 vías. El diseño de esta válvula permite introducir un volumen perfectamente definido de muestra en condiciones de alta presión.



(4) Inyector



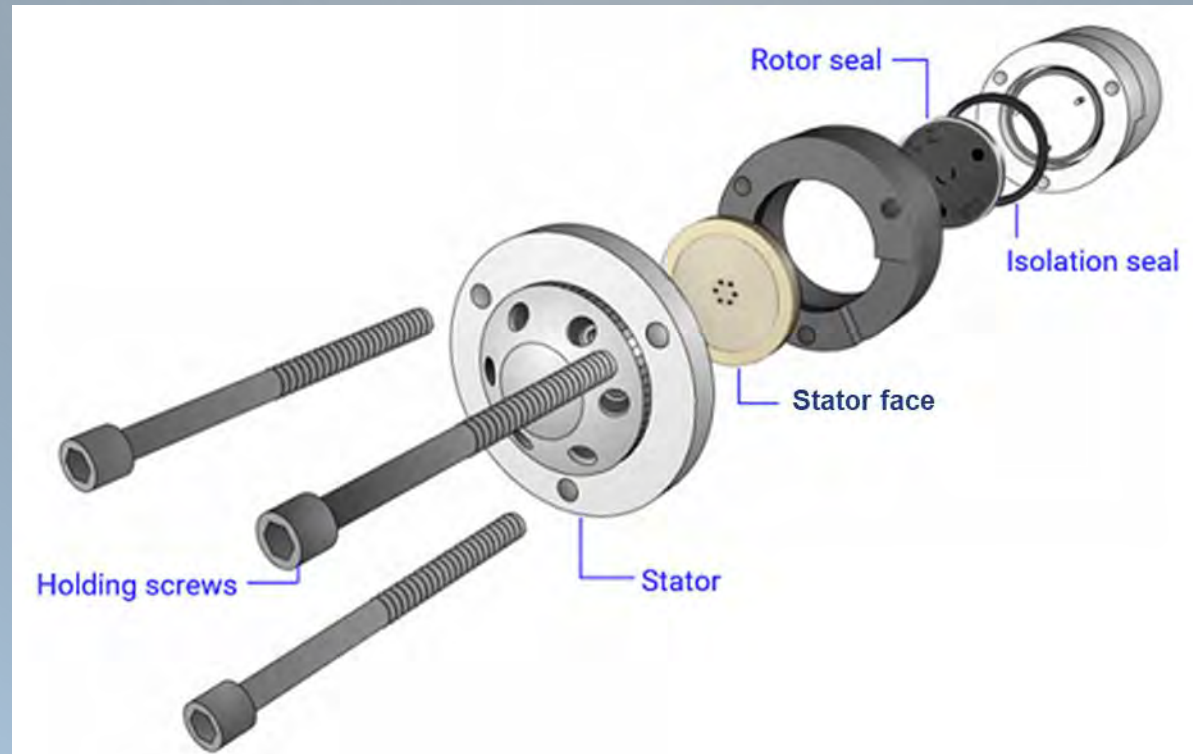
(4) Inyector



Sello del rotor (rotor seal)



estator (stator)

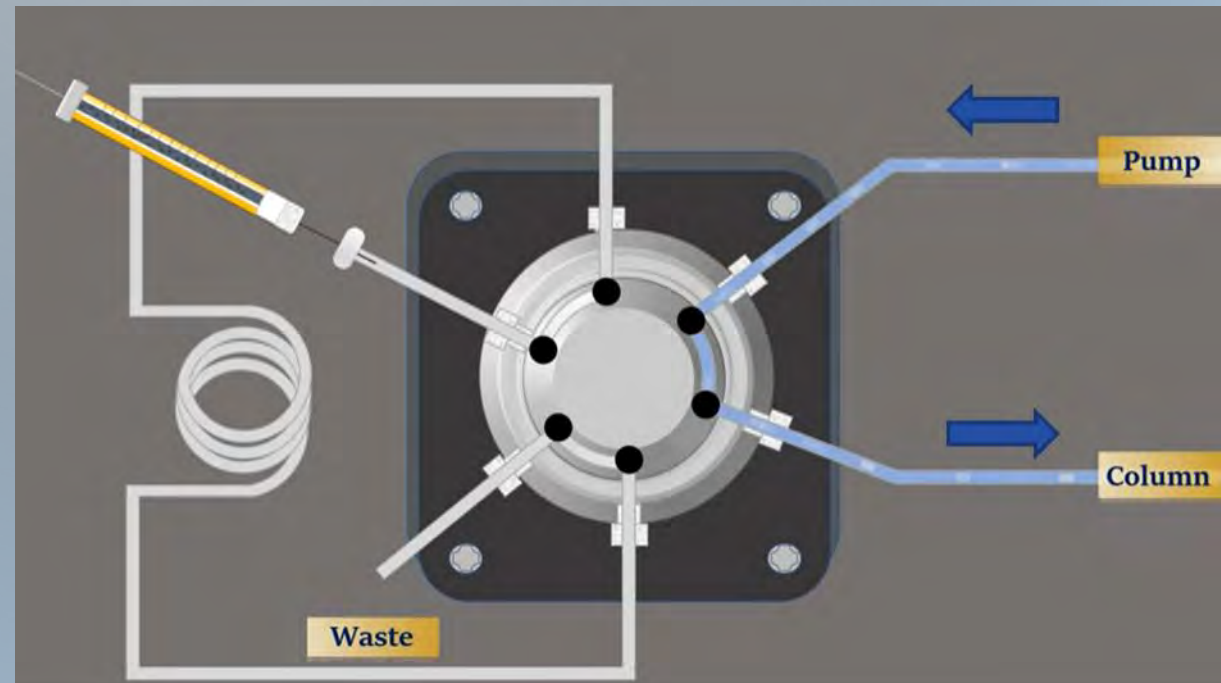


Cara del estator (stator face)



(4) Inyector

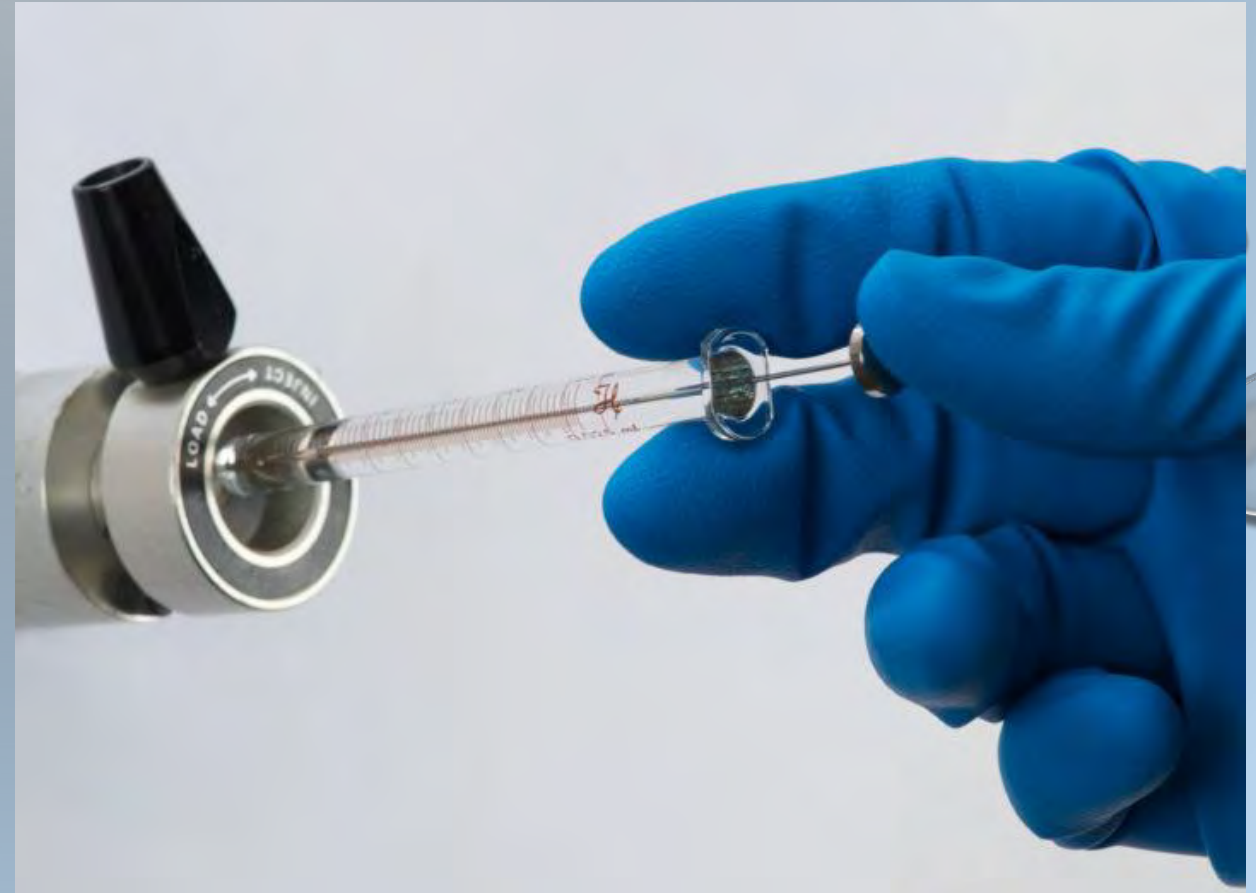
Inicialmente la válvula debe colocarse en la posición LOAD (carga). En esta posición la fase móvil que viene de la bomba pasa directamente hacia la columna.



LOAD

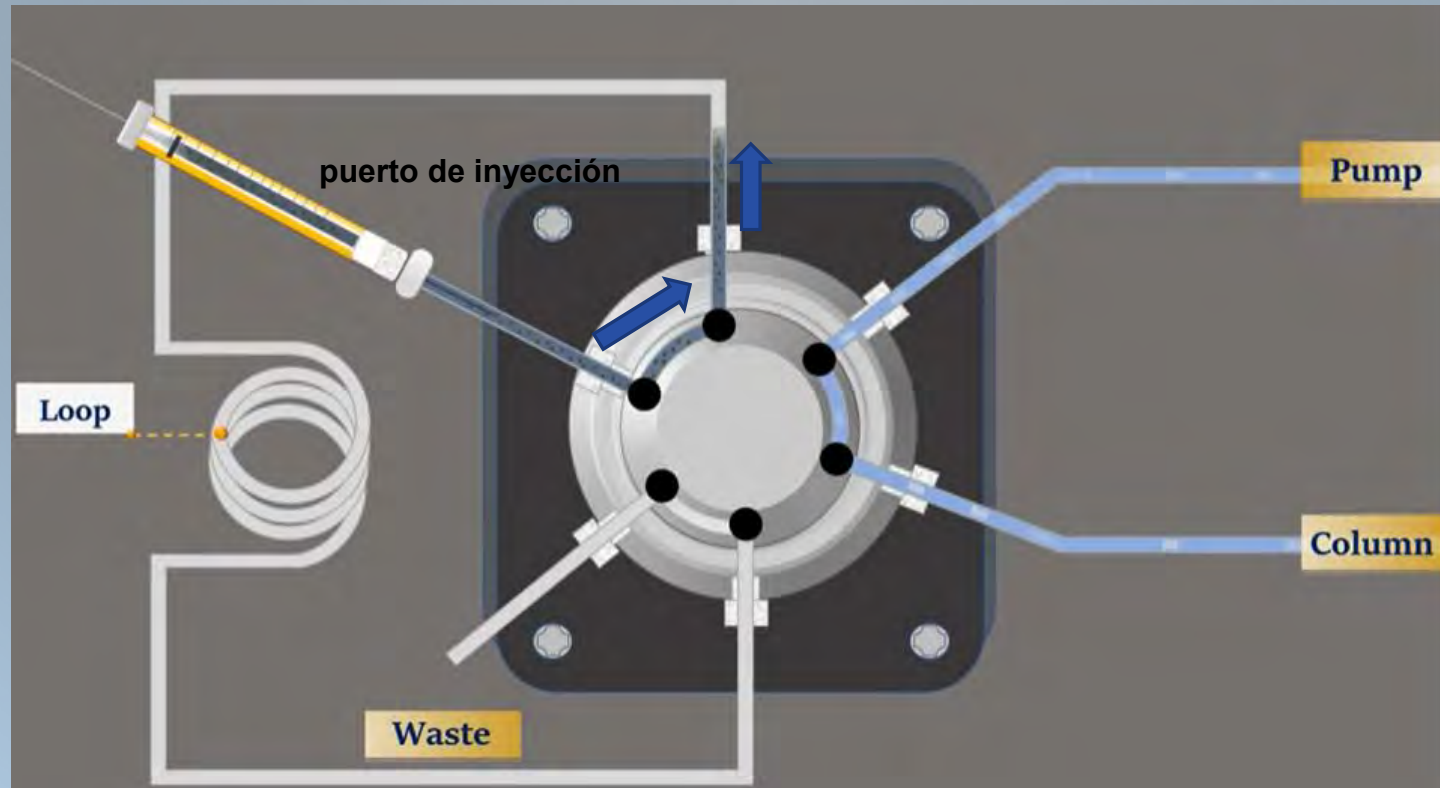
(4) Inyector

La muestra se toma mediante una microjeringa de punta roma y esta se introduce en el puerto de inyección.



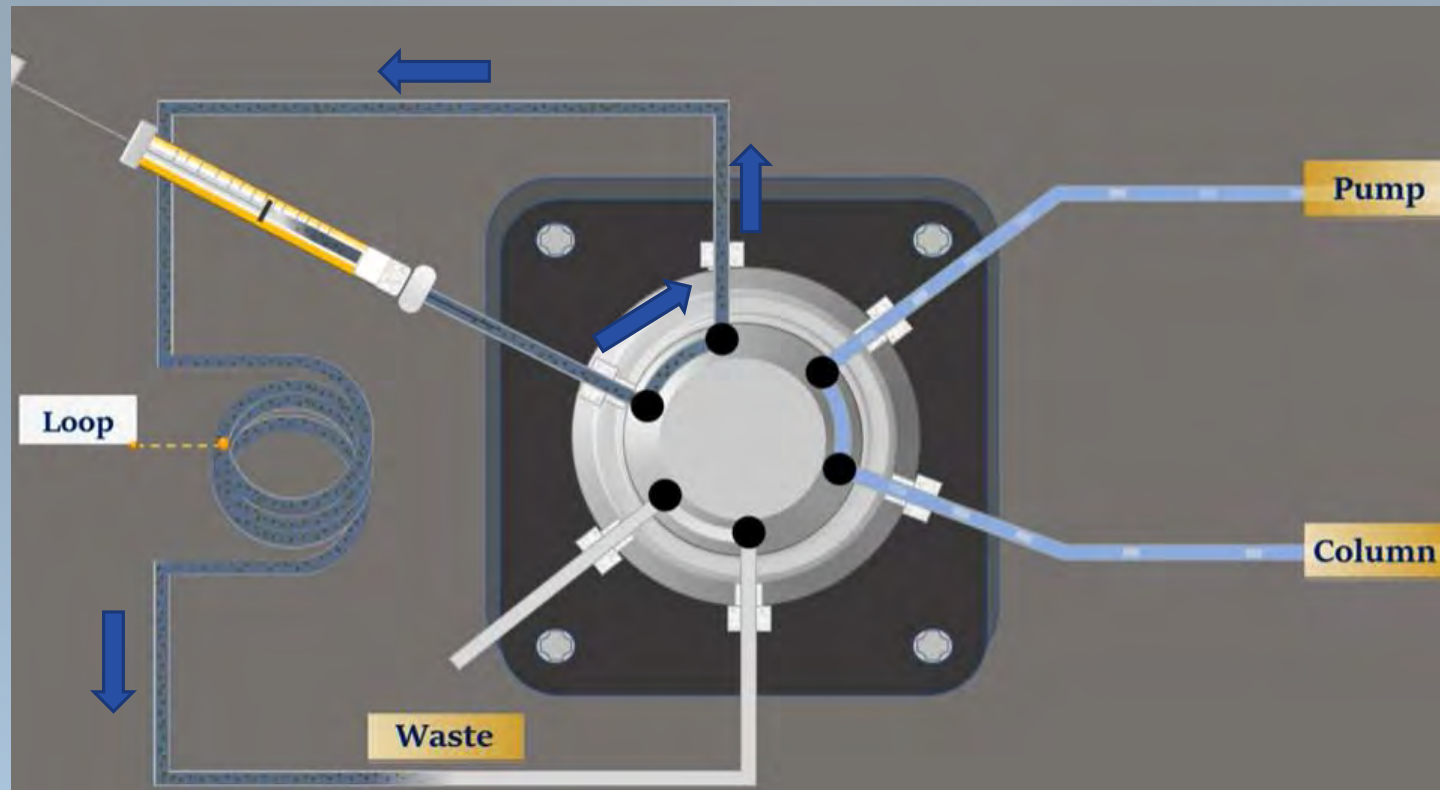
(4) Inyector

Al descargar la muestra se llena un loop (bucle o rulo) de volumen definido. El loop puede llenarse parcialmente o por completo, siendo esto último lo más frecuente y exacto. El exceso de muestra sale por una tubería de descarte (waste).



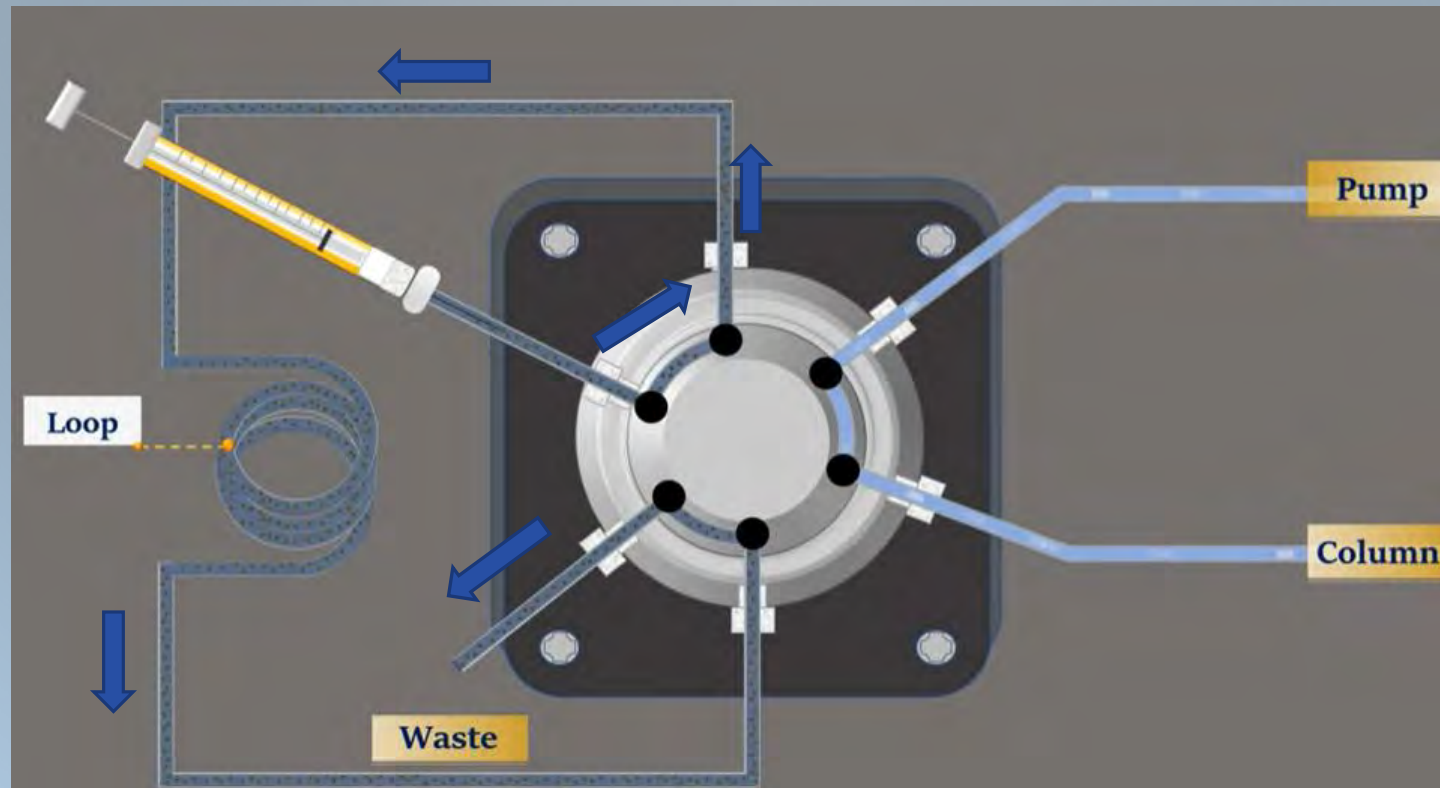
(4) Inyector

Al descargar la muestra se llena un loop (bucle o rulo) de volumen definido. El loop puede llenarse parcialmente o por completo, siendo esto último lo más frecuente y exacto. El exceso de muestra sale por una tubería de descarte (waste).



(4) Inyector

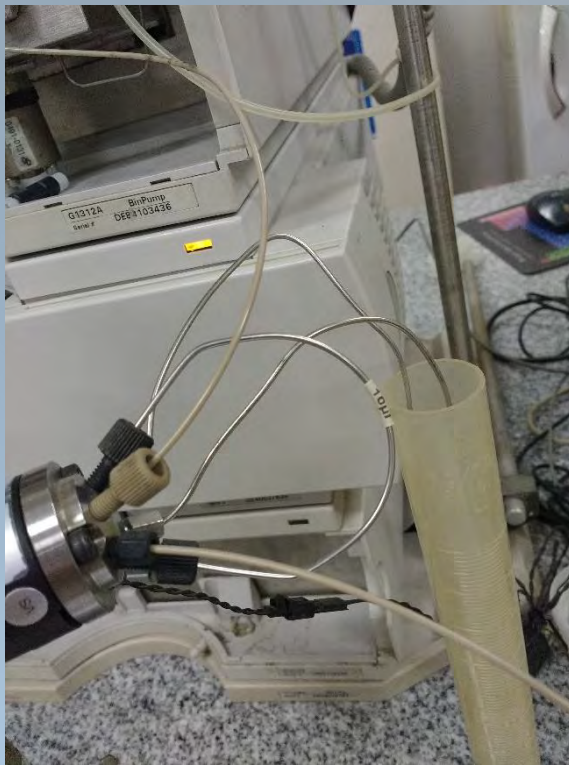
Al descargar la muestra se llena un loop (bucle o rulo) de volumen definido. El loop puede llenarse parcialmente o por completo, siendo esto último lo más frecuente y exacto. El exceso de muestra sale por una tubería de descarte (waste).



LOAD

(4) Inyector

Al descargar la muestra se llena un loop (bucle o rulo) de volumen definido. El loop puede llenarse parcialmente o por completo, siendo esto último lo más frecuente y exacto. El exceso de muestra sale por una tubería de descarte (waste).



(4) Inyector



loops comerciales de acero inoxidable o PEEK, de diversos volúmenes

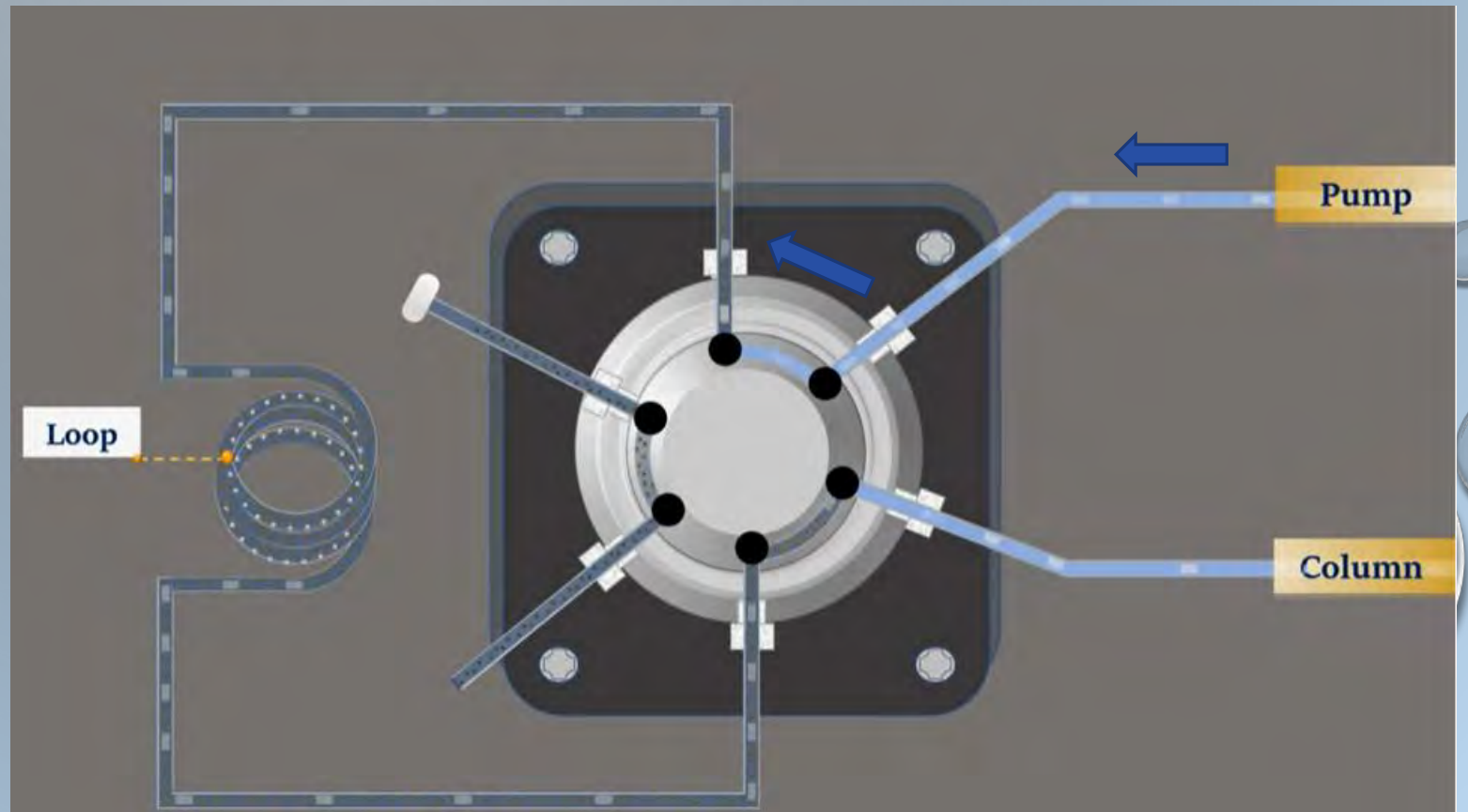


(4) Inyector

Al girar la válvula a la posición INJECT (inyección) la fase móvil que viene de la bomba ahora atraviesa el loop, introduciendo de esta manera la muestra en la columna.



INJECT

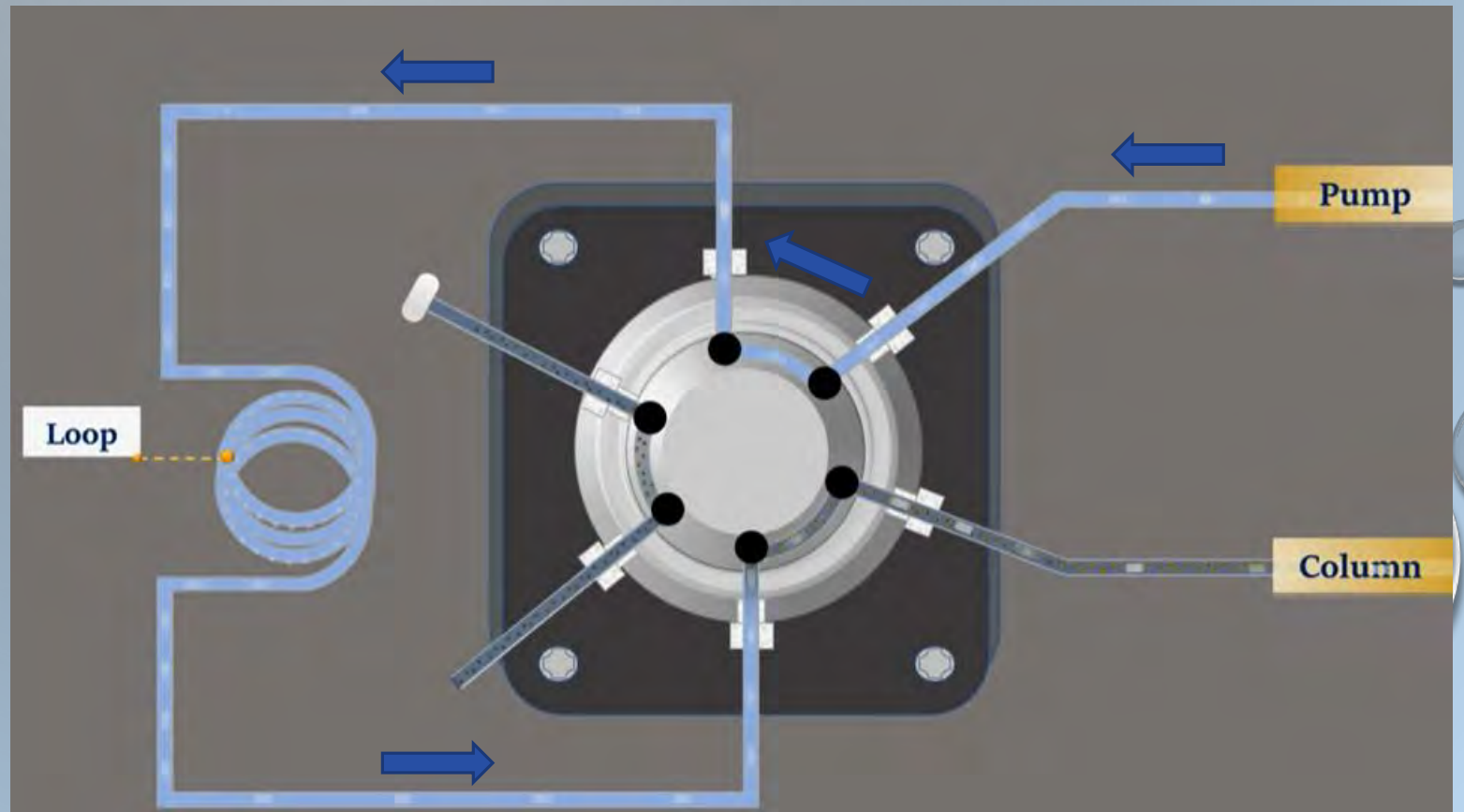


(4) Inyector

Al girar la válvula a la posición INJECT (inyección) la fase móvil que viene de la bomba ahora atraviesa el loop, introduciendo de esta manera la muestra en la columna.



INJECT

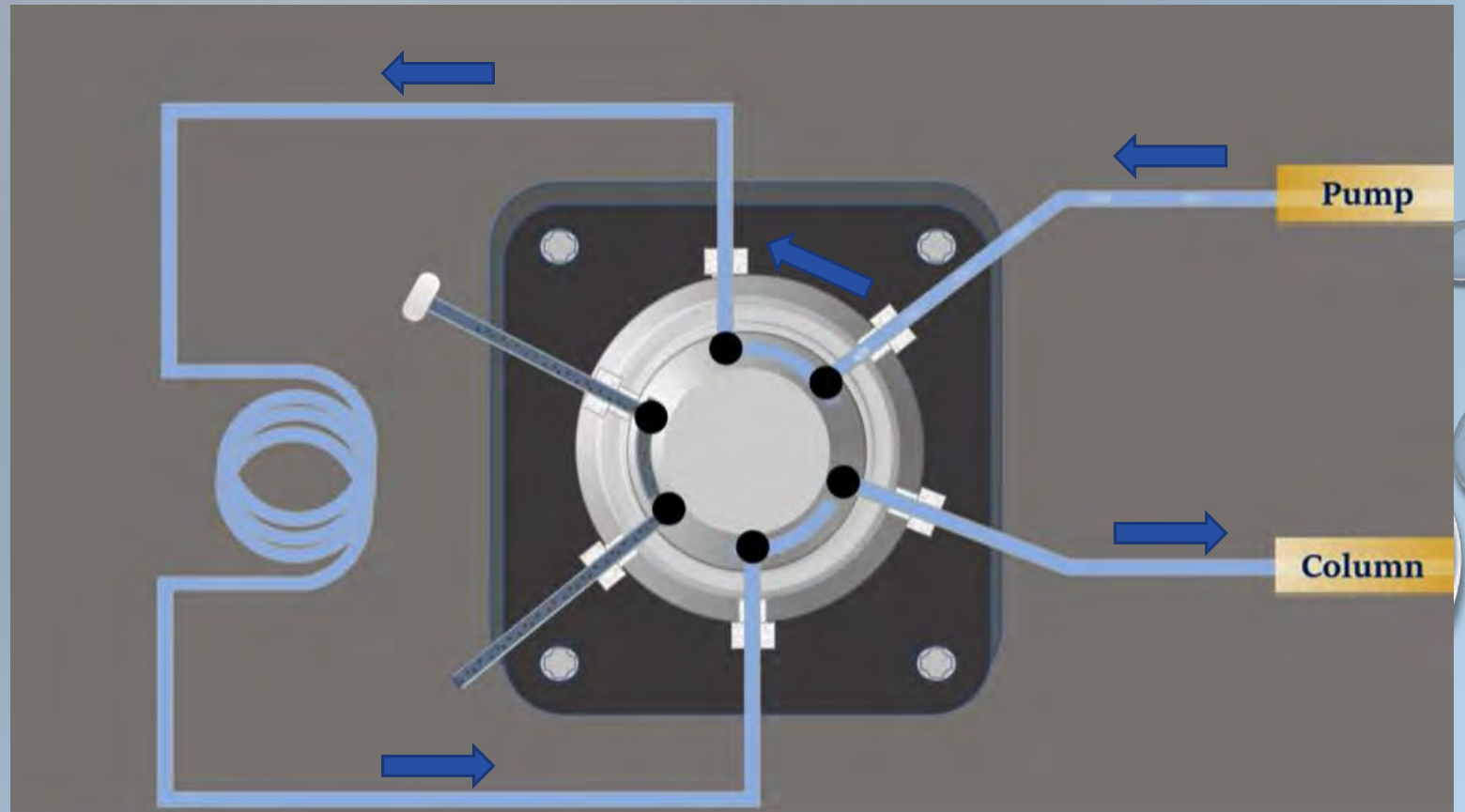


(4) Inyector

Al girar la válvula a la posición INJECT (inyección) la fase móvil que viene de la bomba ahora atraviesa el loop, introduciendo de esta manera la muestra en la columna.



INJECT



(4) Inyector

Inyección automática



Screw vials



Shell vials

(4) Inyector

Inyección automática

1



2



3

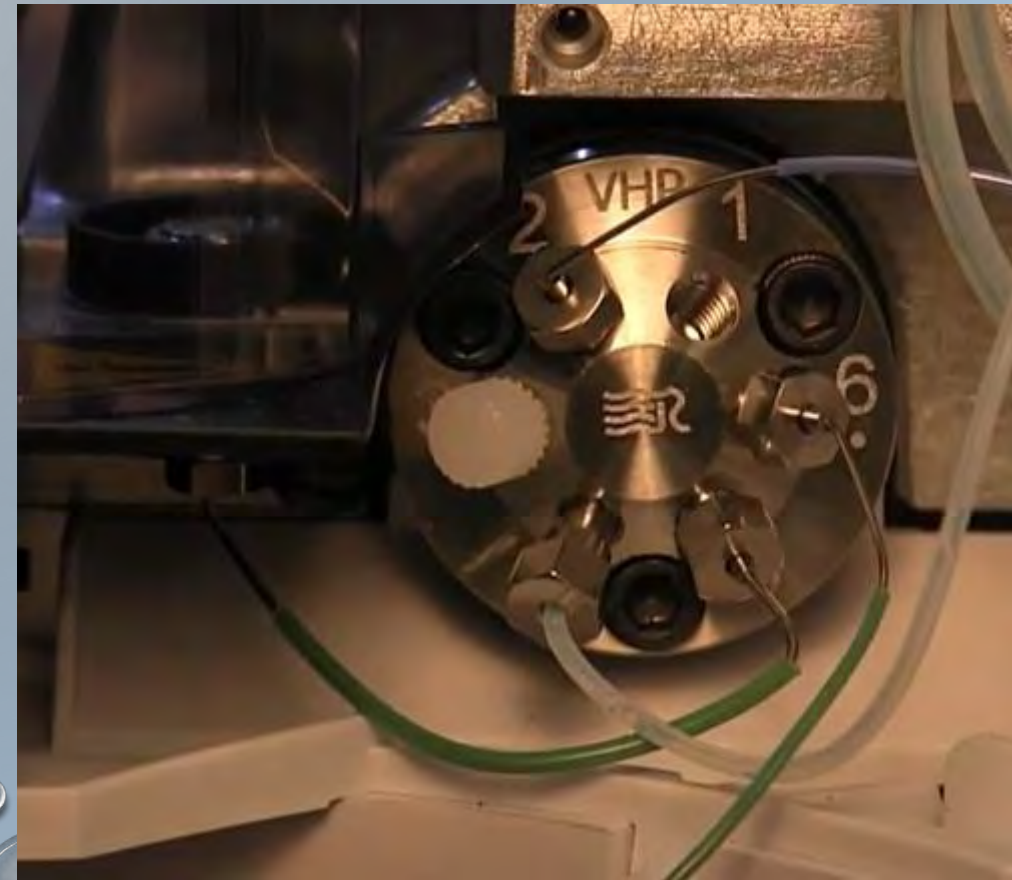


4



(4) Inyector

Inyección automática



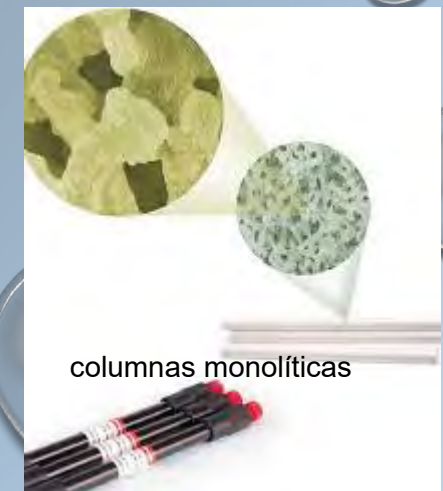
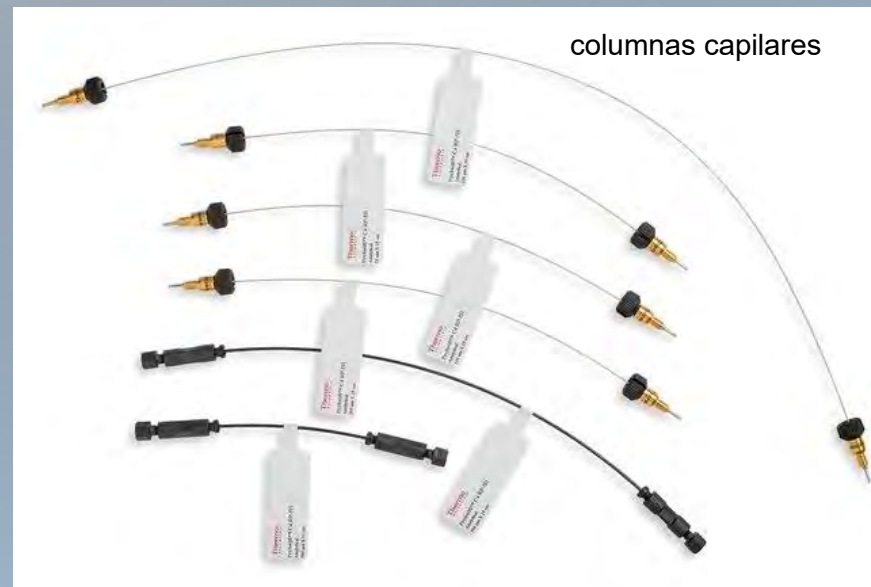
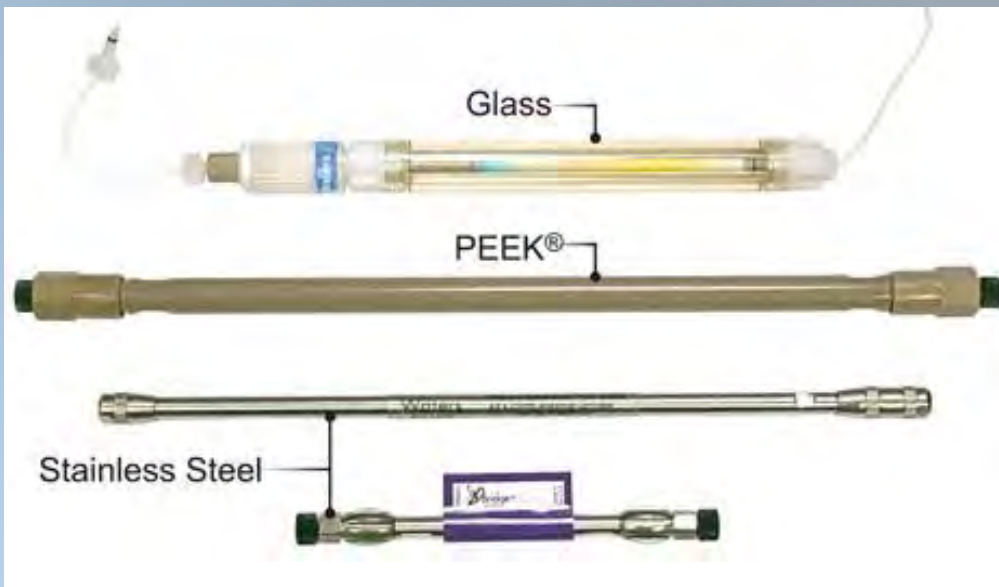
<https://www.youtube.com/watch?v=ZbvZP5eB9hE>

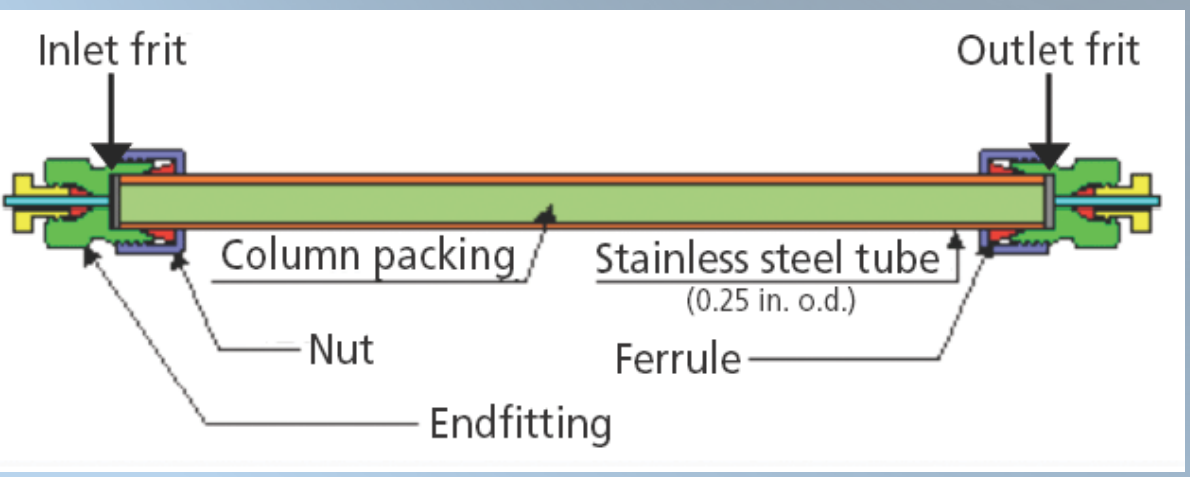
(5) Columna

Las columnas contienen la fase estacionaria.

La mayoría de las columnas usadas en HPLC son rellenas y de acero inoxidable, ya que resiste altas presiones. PEEK™ y vidrio soportan menos presión, pero pueden ser utilizados cuando se requieren superficies inertes en estudios químicos o biológicos.

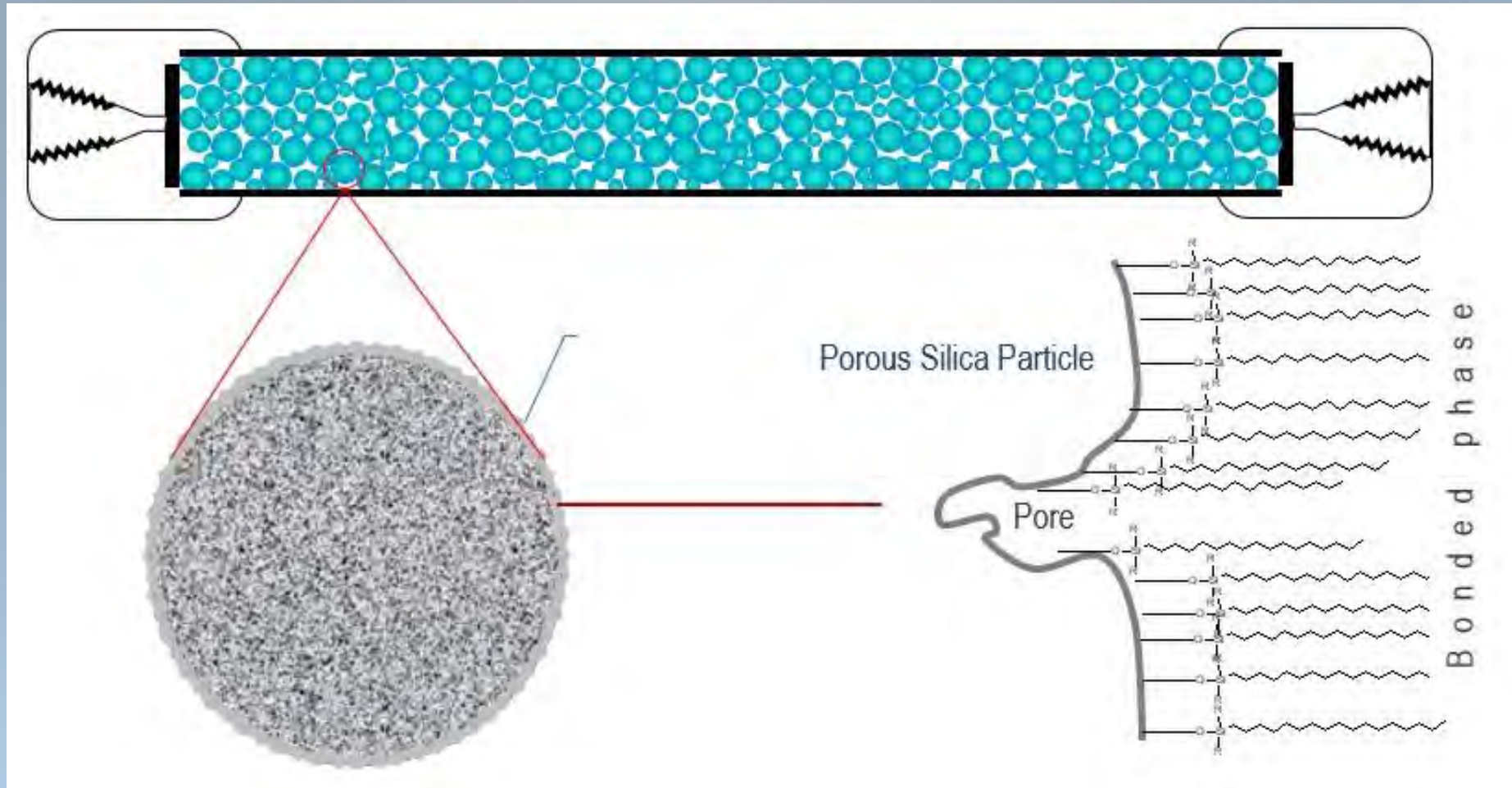
También existen columnas monolíticas y capilares.





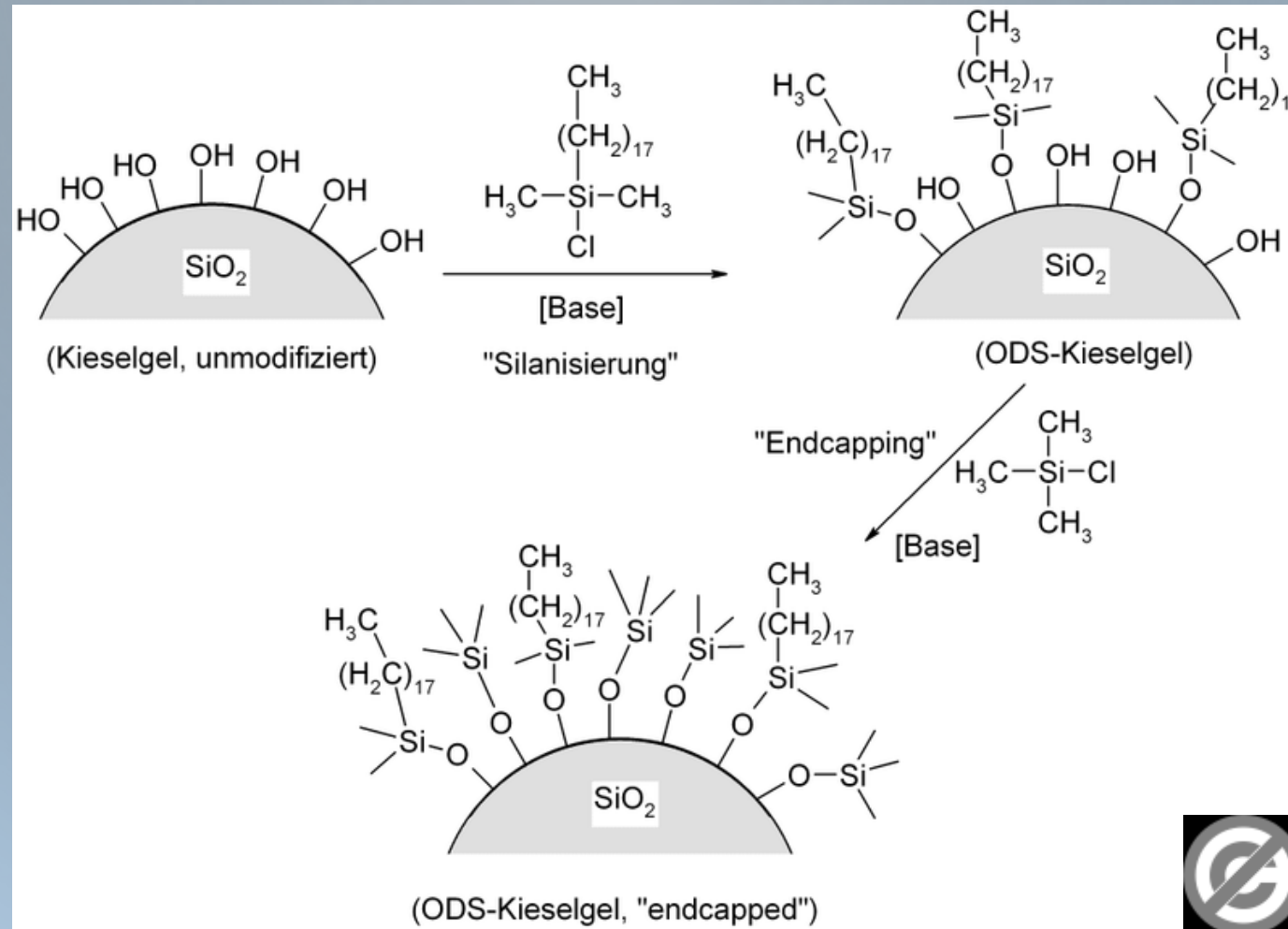
(5) Columna

Las columnas tradicionales para RPLC poseen un relleno con partículas a base de sílice con grupos no polares ligados en forma covalente.



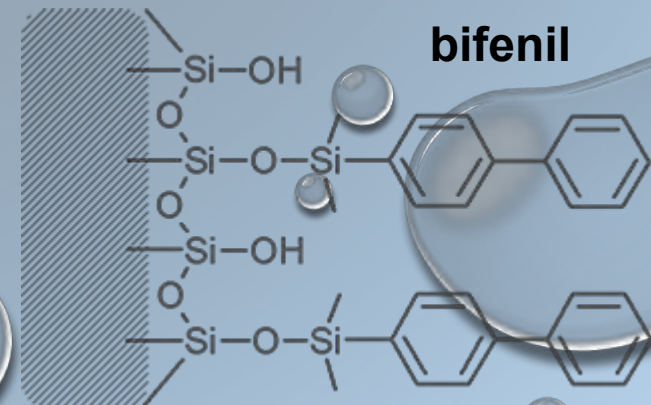
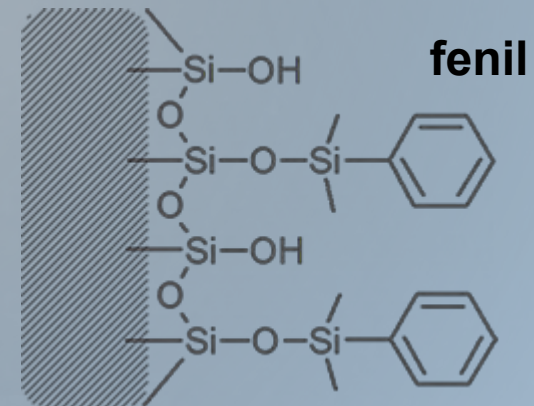
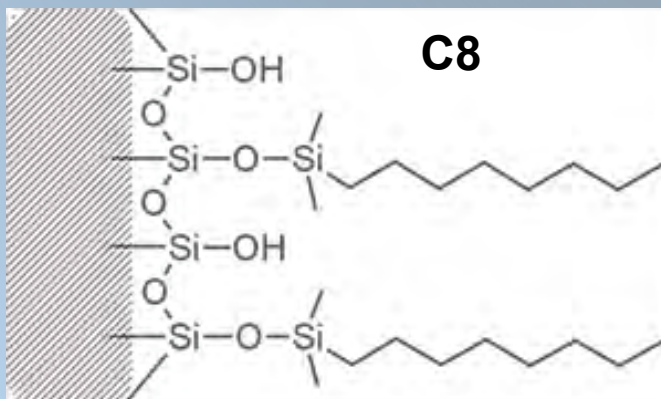
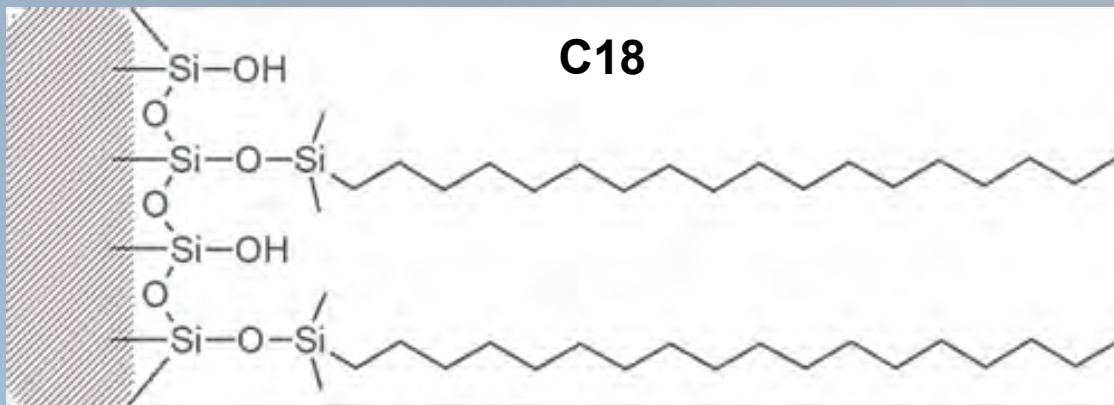
(5) Columnna

Las columnas tradicionales para RPLC poseen un relleno con partículas a base de sílice con grupos no polares ligados en forma covalente.



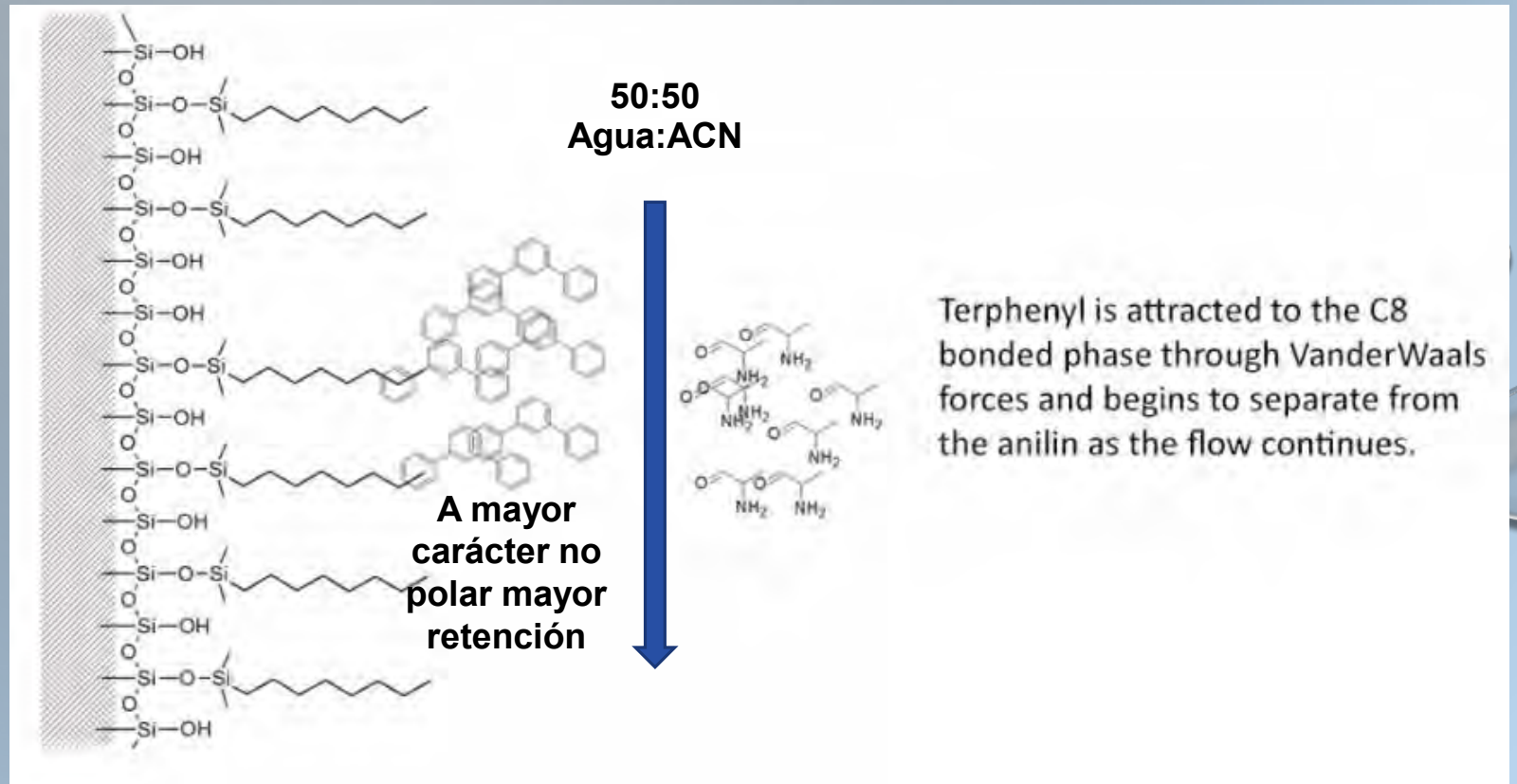
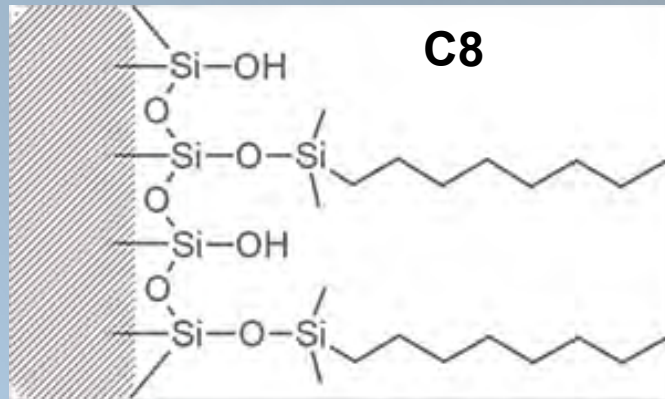
(5) Columna

Las columnas tradicionales para RPLC poseen un relleno con partículas a base de sílice con grupos no polares ligados en forma covalente.



(5) Columna

En el TP usamos una columna C8, en donde los grupos ligados son n-octil.



(5) Columna

En el TP usamos una columna C8, en donde los grupos ligados son n-octil.

Shim-pack GIST C8

■ Ultra-High Inertness, High Durability

Shim-pack GIST C8 is packed with high-purity porous spherical silica for delivering the same extreme inertness to elute either basic or acidic compounds without undesired adsorption. Low retentivity and no sample adsorption enable analysis of natural samples.

Shim-pack GIST C8 is the ideal choice for the rapid analysis of hydrophobic compounds.

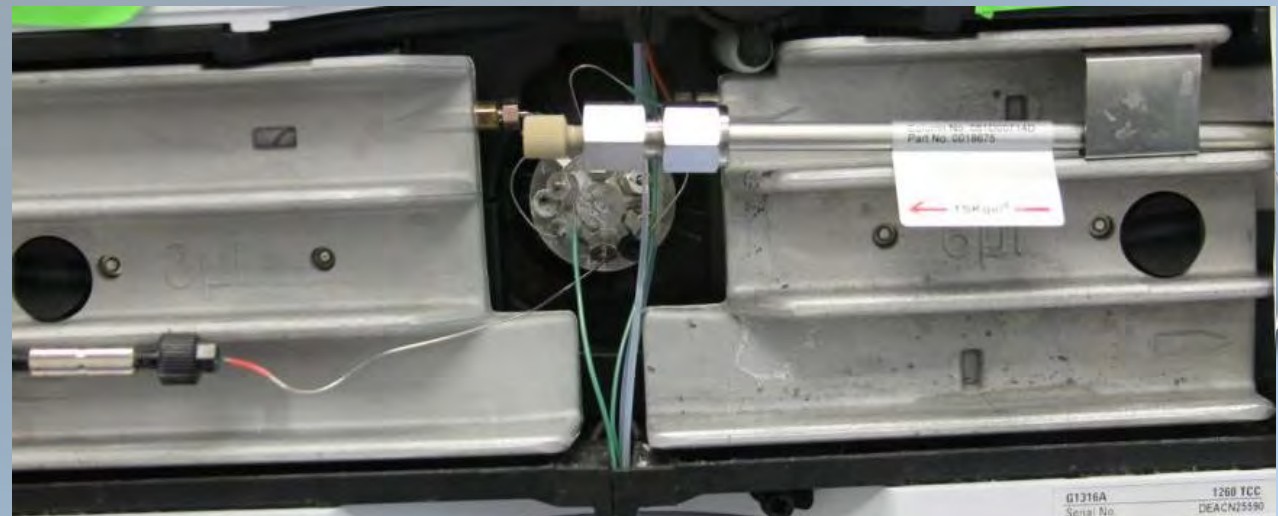
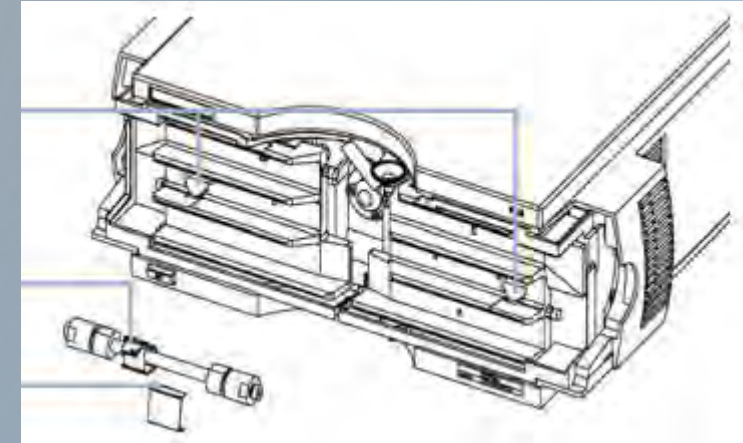
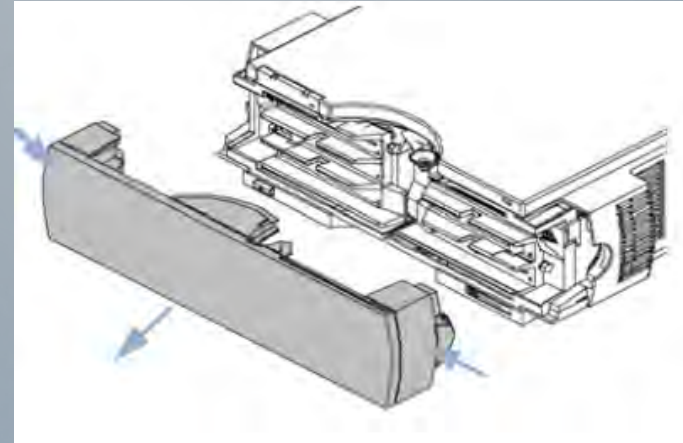
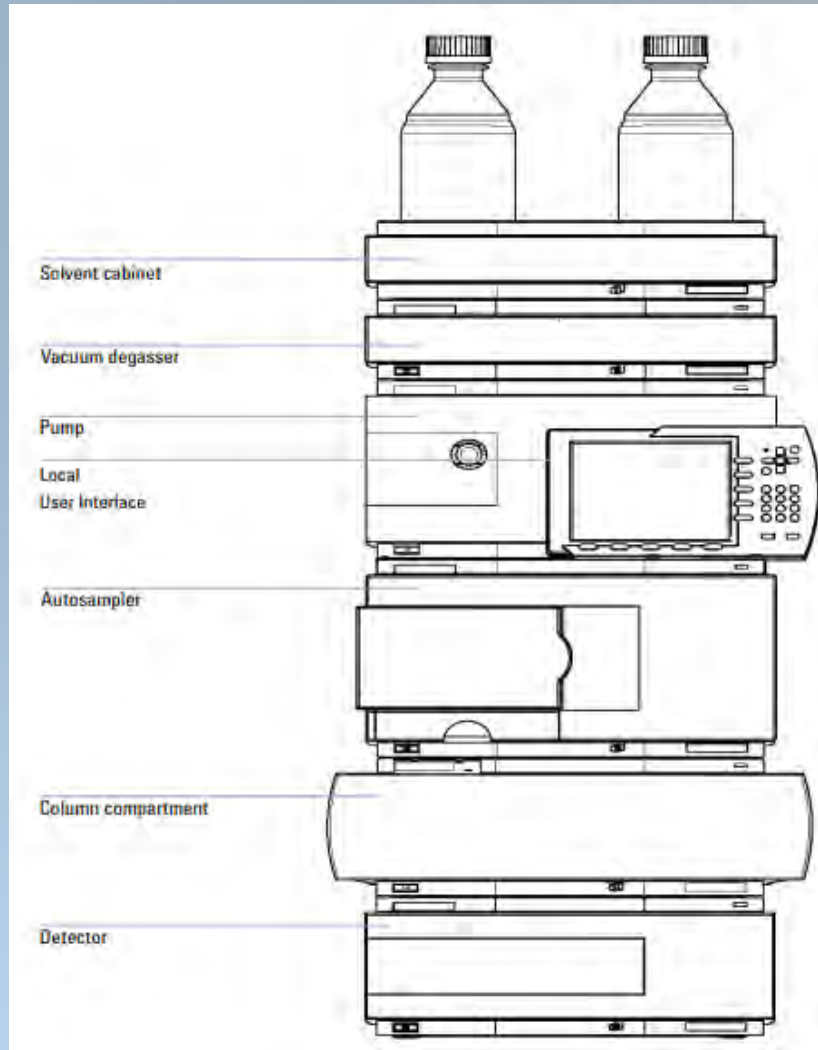
Bonded Phase	Octyl Group
Particle Size	2 μm , 3 μm , 5 μm
Pore Size	10 nm
Surface Area	350 m ² /g
Carbon Loading	8 %
End-capping	Yes
pH Range	1 to 10
USP Code	L7

Analytical Columns

Particle Size (μm)	I.D. (mm)	1.0	1.5	2.1	3.0	4.0	4.6
	Length (mm)						
3	20	-	-	227-30164-01	227-30165-01	227-30166-01	227-30167-01
	30	227-30162-01	227-30163-01	227-30164-02	227-30165-02	227-30166-02	227-30167-02
	50	227-30162-02	227-30163-02	227-30164-03	227-30165-03	227-30166-03	227-30167-03
	75	227-30162-03	227-30163-03	227-30164-04	227-30165-04	227-30166-04	227-30167-04
	100	227-30162-04	227-30163-04	227-30164-05	227-30165-05	227-30166-05	227-30167-05
	125	-	-	227-30164-06	227-30165-06	227-30166-06	227-30167-06
	150	227-30162-05	227-30163-05	227-30164-07	227-30165-07	227-30166-07	227-30167-07
	250	227-30162-06	227-30163-06	227-30164-08	227-30165-08	227-30166-08	227-30167-08
5	20	-	-	227-30170-01	227-30171-01	227-30172-01	227-30173-01
	30	227-30168-01	227-30169-01	227-30170-02	227-30171-02	227-30172-03	227-30173-02
	50	227-30168-02	227-30169-02	227-30170-03	227-30171-03	227-30172-04	227-30173-03
	75	227-30168-03	227-30169-03	227-30170-04	227-30171-04	227-30172-05	227-30173-04
	100	227-30168-04	227-30169-04	227-30170-05	227-30171-05	227-30172-06	227-30173-05
	125	-	-	227-30170-06	227-30171-06	227-30172-07	227-30173-06
	150	227-30168-05	227-30169-05	227-30170-07	227-30171-07	227-30172-08	227-30173-07
	250	227-30168-06	227-30169-06	227-30170-08	227-30171-08	227-30172-09	227-30173-09

(5) Columna

Lo habitual es colocar la columna dentro de un compartimento termostático u horno



Agilent Thermostatted Column Compartment

(5) Columna

Lo habitual es colocar la columna dentro de un compartimento termostático u horno



Waters Column Heater



Shimadzu Column Oven

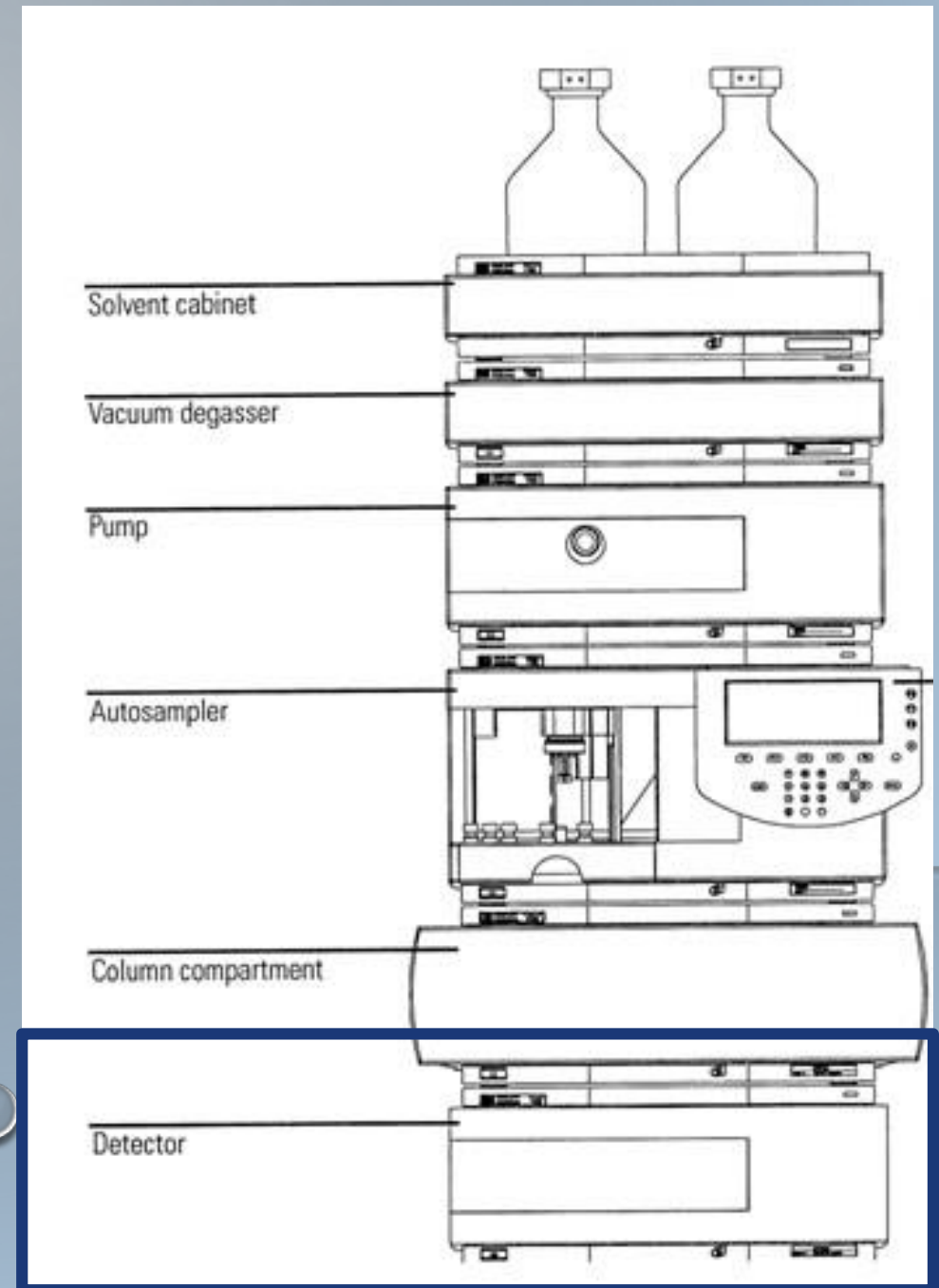
(5) Columna

Sin embargo, nosotros vamos a trabajar con la columna a temperatura ambiente, sujeta a un soporte fuera de la carcasa del equipo, de manera tal que resulte claramente visible. Recordemos que en HPLC la temperatura no es un parámetro tan relevante como en CG.



(6) Detector

Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan por el detector, que produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia.



(6) Detector

Los detectores pueden responder a una propiedad física o fisicoquímica del soluto (UV-visible, fluorescencia, electroquímicos, dispersión de luz) o bien pueden comparar el cambio global de alguna propiedad física de la fase móvil con y sin soluto eluido (índice de refracción, conductividad).



1260 Infinity II Fluorescence Detector



1260 Infinity II Refractive Index Detector



1260 Infinity II Evaporative Light Scattering Detector

**Thermo Scientific Dionex
UltiMate 3000 Electrochemical
Detector ECD-3000RS**



(6) Detector

Los detectores más difundidos son los UV-visible



The Agilent 1100 Series UV-Visible detectors:

- 1100 Series variable wavelength detector (G1314A)
- 1100 Series multiwavelength detector (G1365B)
- 1100 Series diode-array detector (G1315B)



The Agilent 1100 Series variable wavelength detector lowers your detection limits with a simplified design optimized for high sensitivity and low baseline drift.



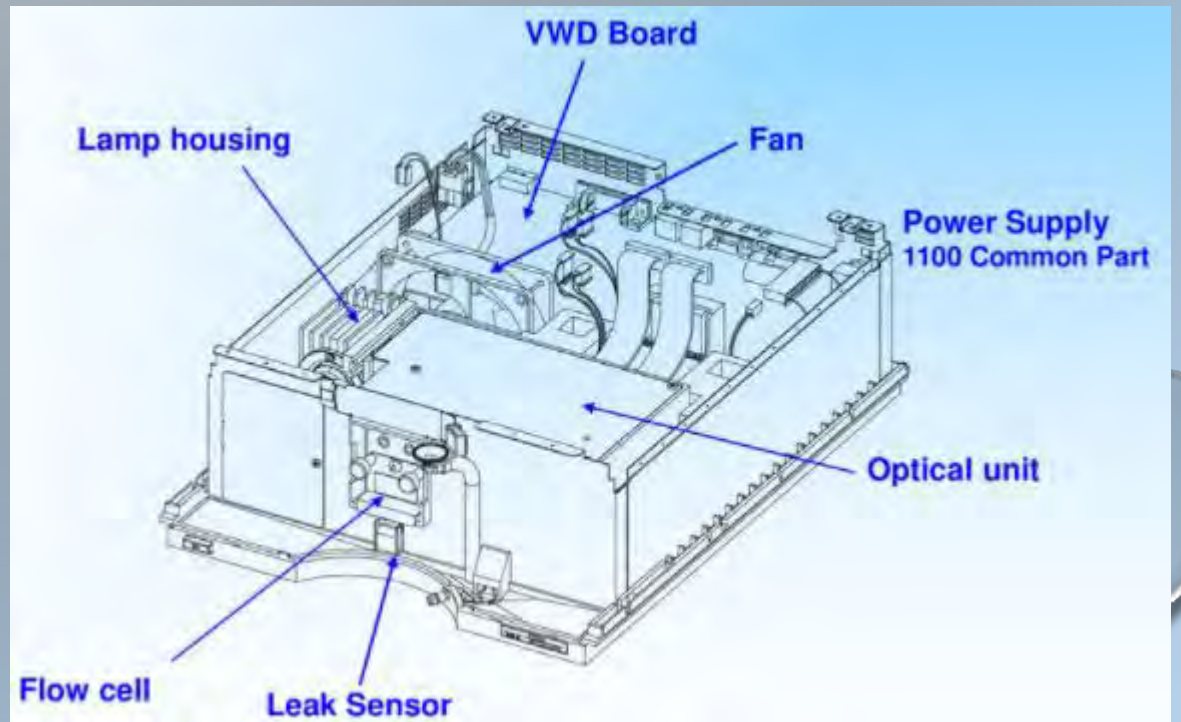
The Agilent 1100 Series multiwavelength detector lets you detect up to five different wavelengths simultaneously without sacrificing sensitivity.



The Agilent 1100 Series diode array detector gives you the full power of multi-wavelength detection and spectral information with the highest resolution and sensitivity.

(6) Detector

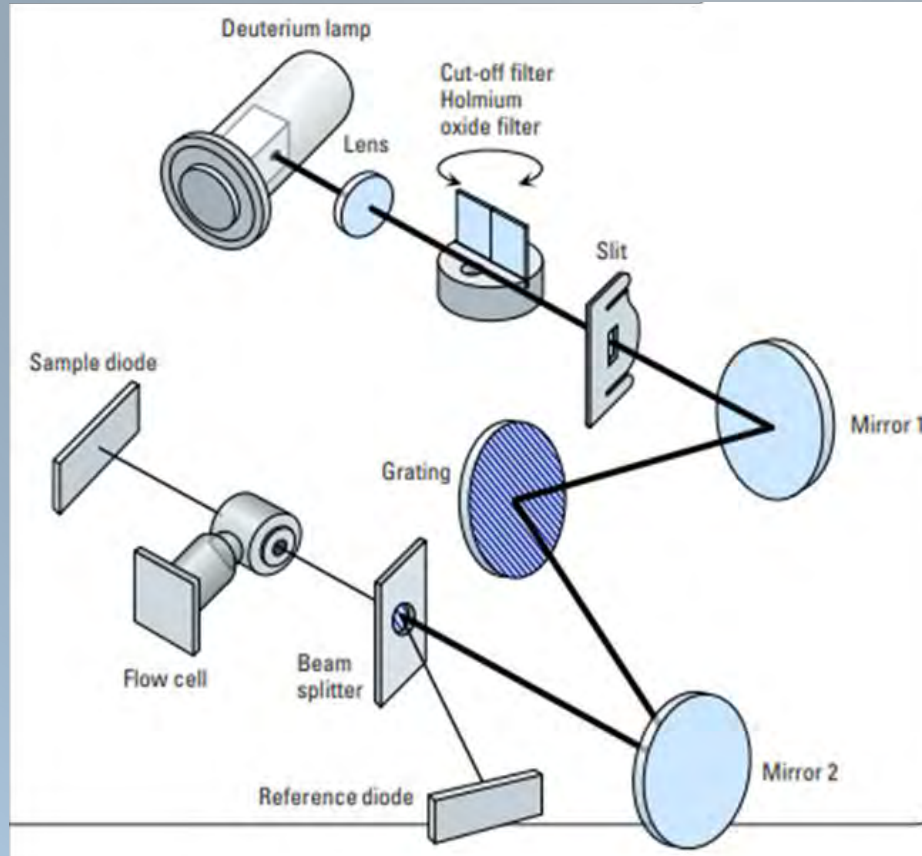
En el TP vamos a usar un detector UV-visible de longitud de onda variable. Nos va a permitir efectuar medidas de absorbancia a una longitud de onda determinada (seleccionada de manera tal que absorban nuestros analitos de interés).



Agilent 1100 Series Variable Wavelength Detector

(6) Detector

En el TP vamos a usar un detector UV-visible de longitud de onda variable. Nos va a permitir efectuar medidas de absorbancia a una longitud de onda determinada (seleccionada de manera tal que absorban nuestros analitos de interés).

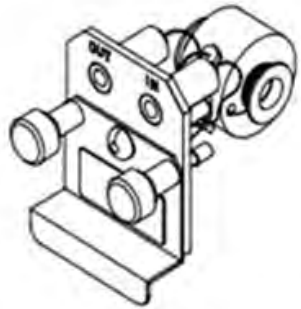


Specifications

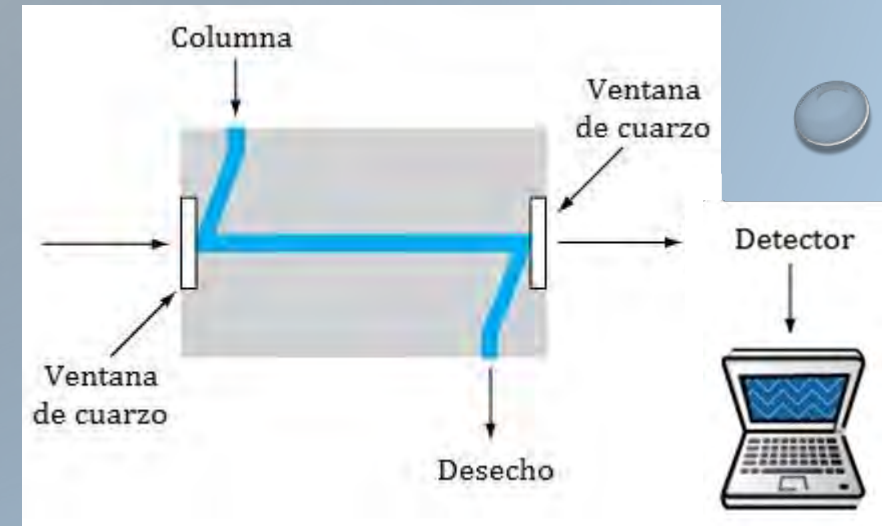
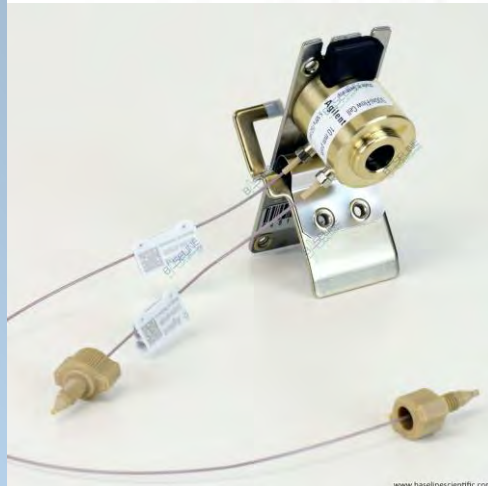
Detector type:	Double beam
Light source:	Deuterium lamp
Short-term noise:*	$\pm 0.75 \times 10^{-5}$ AU at 254 nm
Drift:*	3×10^{-4} AU/h at 254 nm
Linearity:	> 2 AU upper limit
Wavelength range:	190 – 600 nm
Wavelength accuracy:	± 1 nm, self-calibration with deuterium lines, verification with Holmium oxide filter
Slit width:	6.5 nm typical
Diode width:	not applicable
Wavelength bunching:	not applicable
Flow cells:	<ul style="list-style-type: none">• Standard 14 μl, volume, 10 mm cell path length 40 bar (588 psi) pressure maximum• Semi-micro 5 μl, volume, 6 mm cell path length 40 bar (588 psi) pressure maximum• Micro 1 μl, volume, 5 mm cell path length 40 bar (588 psi) pressure maximum• Nano Third party, contact Agilent for details• High pressure 14 μl, volume, 10 mm cell path length 400 bar (5880 psi) pressure maximum
Time programmable:	Wavelength, polarity, peak width, lamp on/off
Spectral tools:	Stop-flow wavelength scan
Analog output:	Recorder/Integrator 100 mV or 1 V, 1 output
Specials:	Optional cuvette holder

(6) Detector

La celda de flujo habitualmente está diseñada en forma de Z, contiene un volumen mínimo (entre 1 y 14 μl) y es capaz de soportar altas presiones.

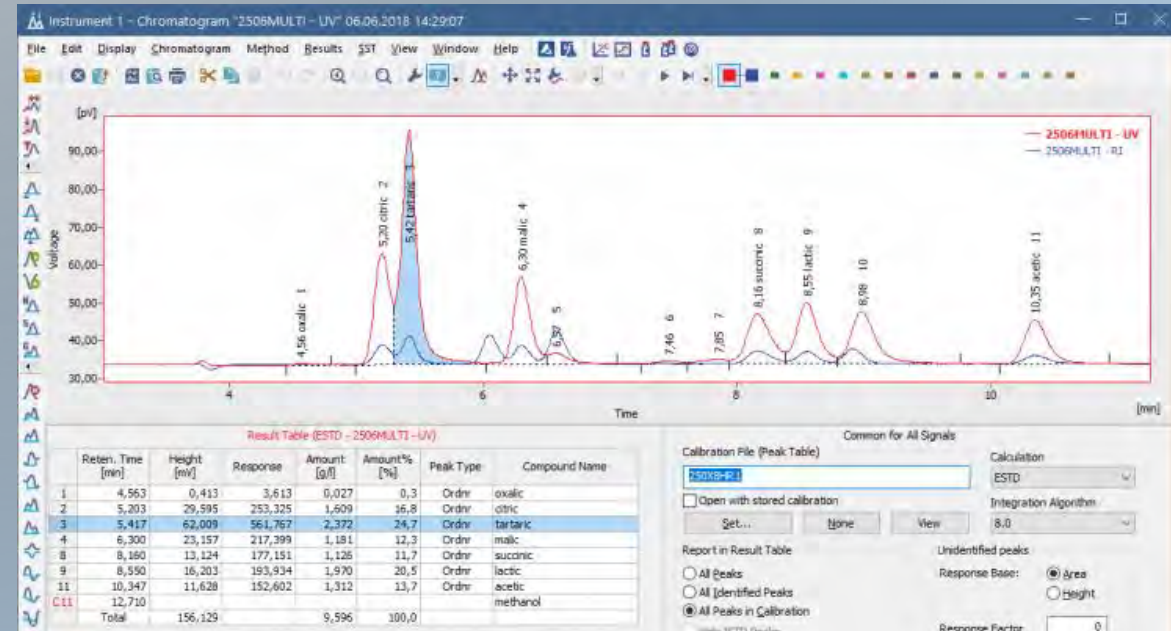


Cartridge Type Flow Cell



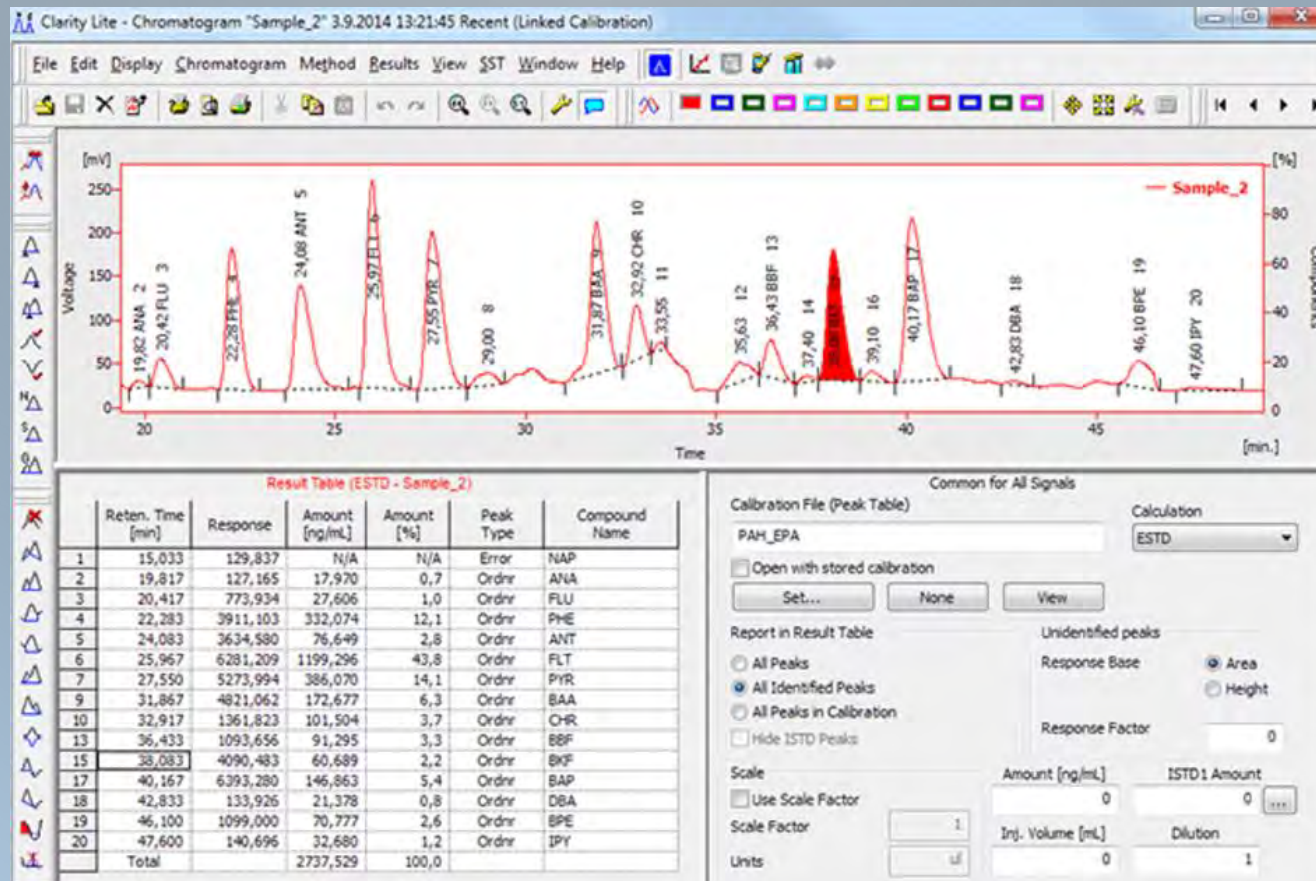
(7) Registro – Análisis de datos (software cromatográfico)

La señal del detector es registrada y procesada por un software cromatográfico, obteniéndose finalmente un gráfico de intensidad de señal en función del tiempo (cromatograma).



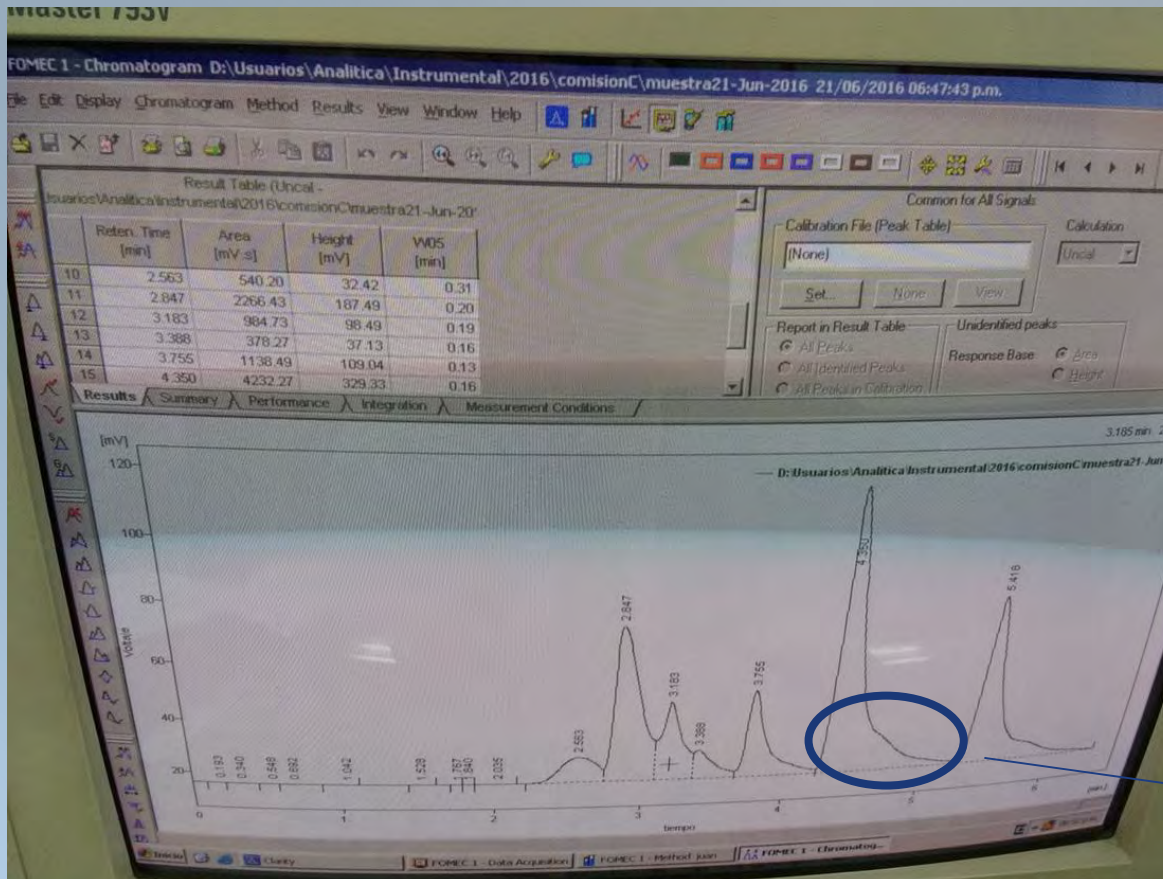
(7) Registro – Análisis de datos (software cromatográfico)

Idealmente, los picos son gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El software nos permite calcular también el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.



(7) Registro – Análisis de datos (software cromatográfico)

Idealmente, los picos son gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El software nos permite calcular también el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.



coleo (tailing) indica más de un mecanismo de retención (probablemente debido a columna envejecida)

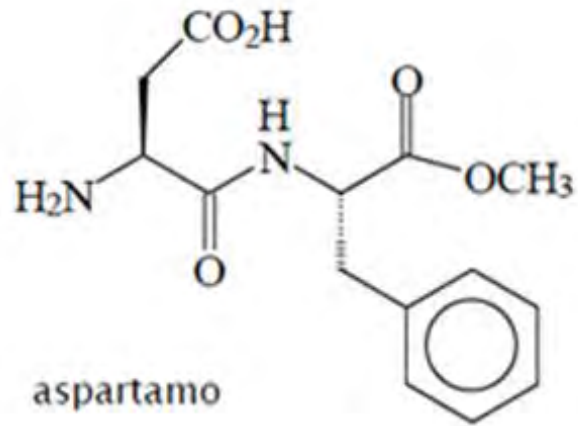
Procedimiento

El objetivo de este TP es determinar la concentración de tres analitos en la bebida Coca Cola Light: aspartamo, cafeína y ácido benzoico.

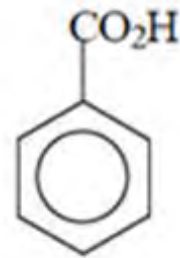


Procedimiento

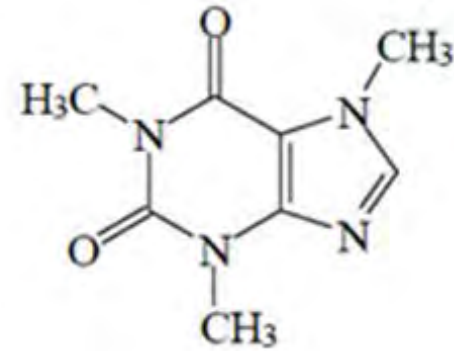
El aspartamo es un edulcorante no calórico que se deriva de dos aminoácidos: el ácido aspártico y la fenilalanina. La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas que actúa como estimulante del sistema nervioso central. El ácido benzoico es un conservante que actúa inhibiendo el crecimiento microbiano.



aspartamo



ácido benzoico



cafeína

Estructura de los analitos que se estudiarán mediante HPLC.

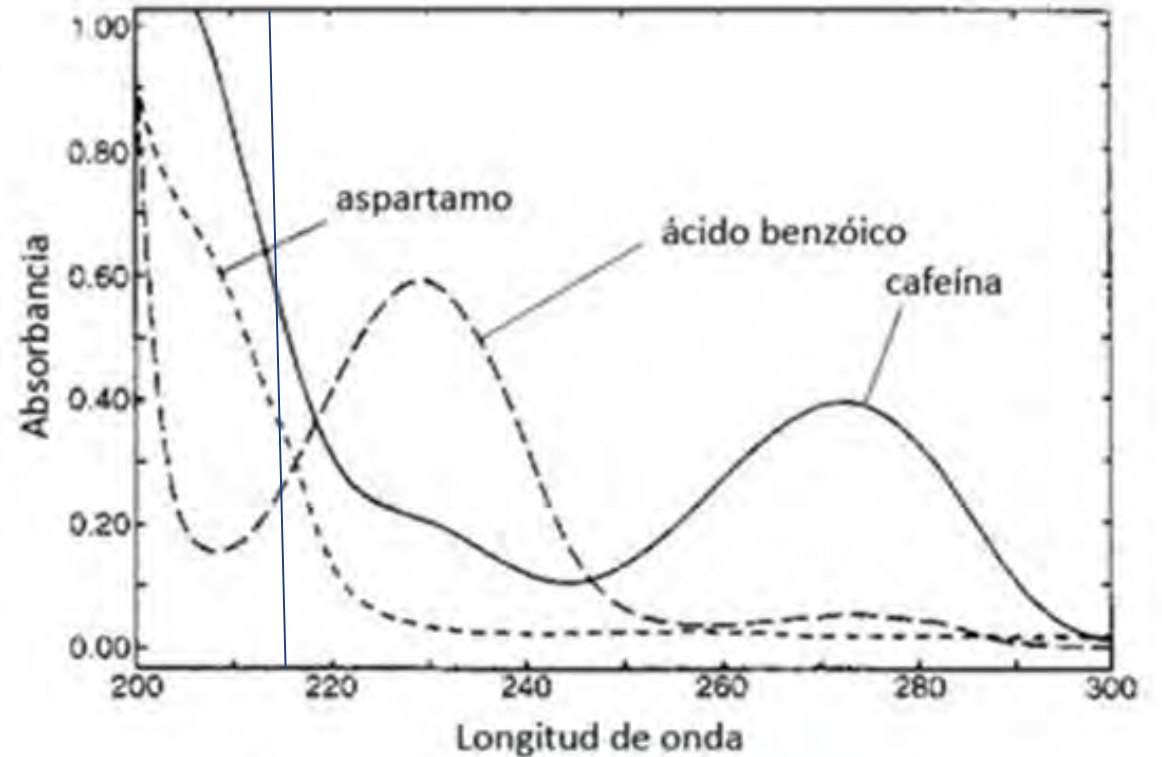
Procedimiento

Para el análisis cromatográfico vamos a emplear una columna de fase inversa C8 (Shimadzu SBC-C8 de L=15 cm, diámetro 3 mm y diámetro de partícula 3 μm) y, como fase móvil, una mezcla formada por 60% de metanol y 40% de buffer fosfato 25 mM de pH=3. El caudal de fase móvil se ajusta en 0,6 ml/ min. La inyección puede ser manual o automática, siendo el volumen de inyección de 10 μl en ambas situaciones.



Procedimiento

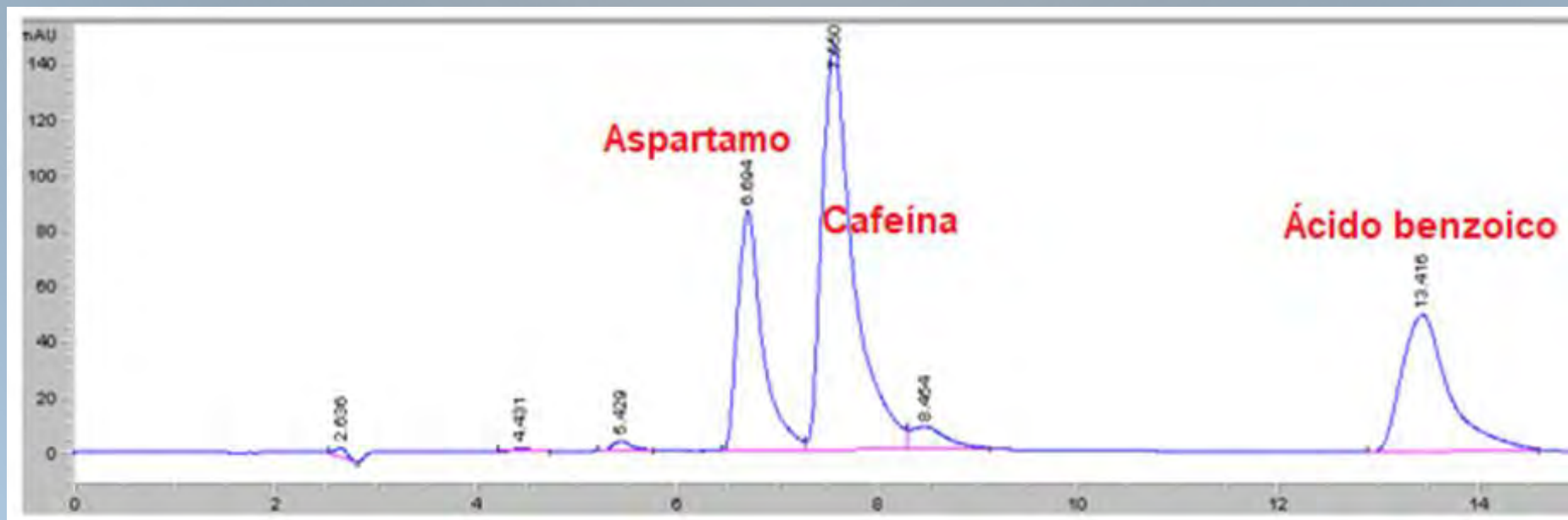
Para la detección de los tres analitos se selecciona un valor de longitud de onda para el cual todos absorban significativamente y que sea superior a la longitud de onda de corte del metanol (205 nm). Esta longitud de onda seleccionada es de 215 nm.



Espectros de absorción de soluciones ácidas (pH=2) de aspartamo, ácido benzoico y cafeína.

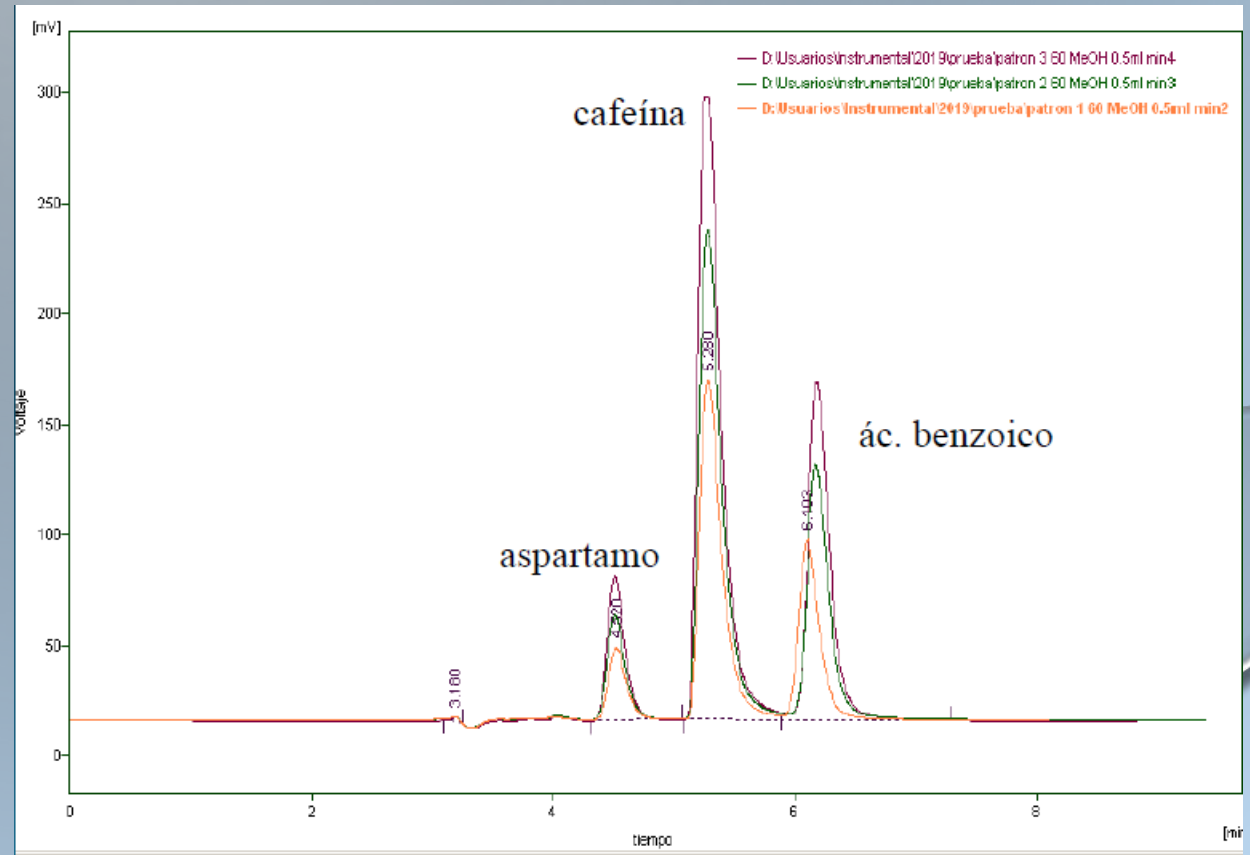
Procedimiento

Para efectuar el análisis cuantitativo usamos el método del estándar externo o curva de calibración. Para construir las curvas de calibración inyectamos tres patrones que poseen concentraciones conocidas de los tres analitos.



Procedimiento

Para efectuar el análisis cuantitativo usamos el método del estándar externo o curva de calibración. Para construir las curvas de calibración inyectamos tres patrones que poseen concentraciones conocidas de los tres analitos.



Procedimiento

Empleando el software cromatográfico determinamos el área para cada concentración conocida de analito

60% metanol 40% buffer fosfato 25 mM pH 3

F=0,6 ml/min

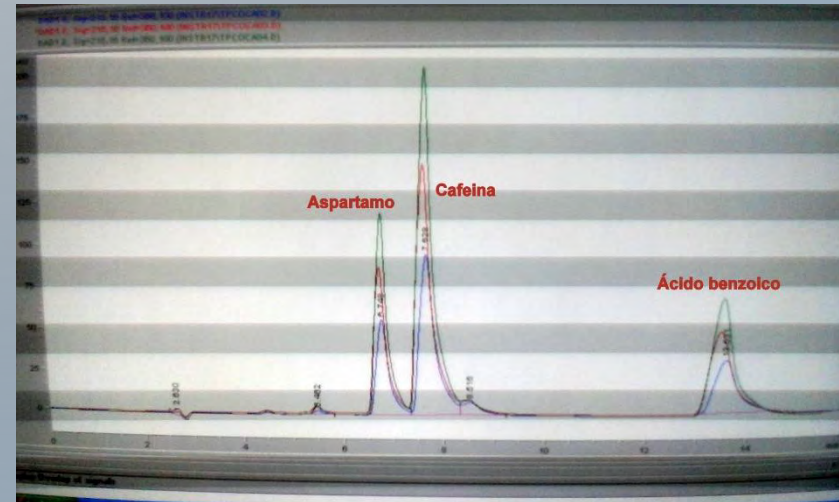
Inyección manual 10 μ l

Los t_R variaron muy poco de un cromatograma a otro

Aspartamo t_R entre 3,58 y 3,60 min

Cafeína t_R entre 4,23 y 4,27 min

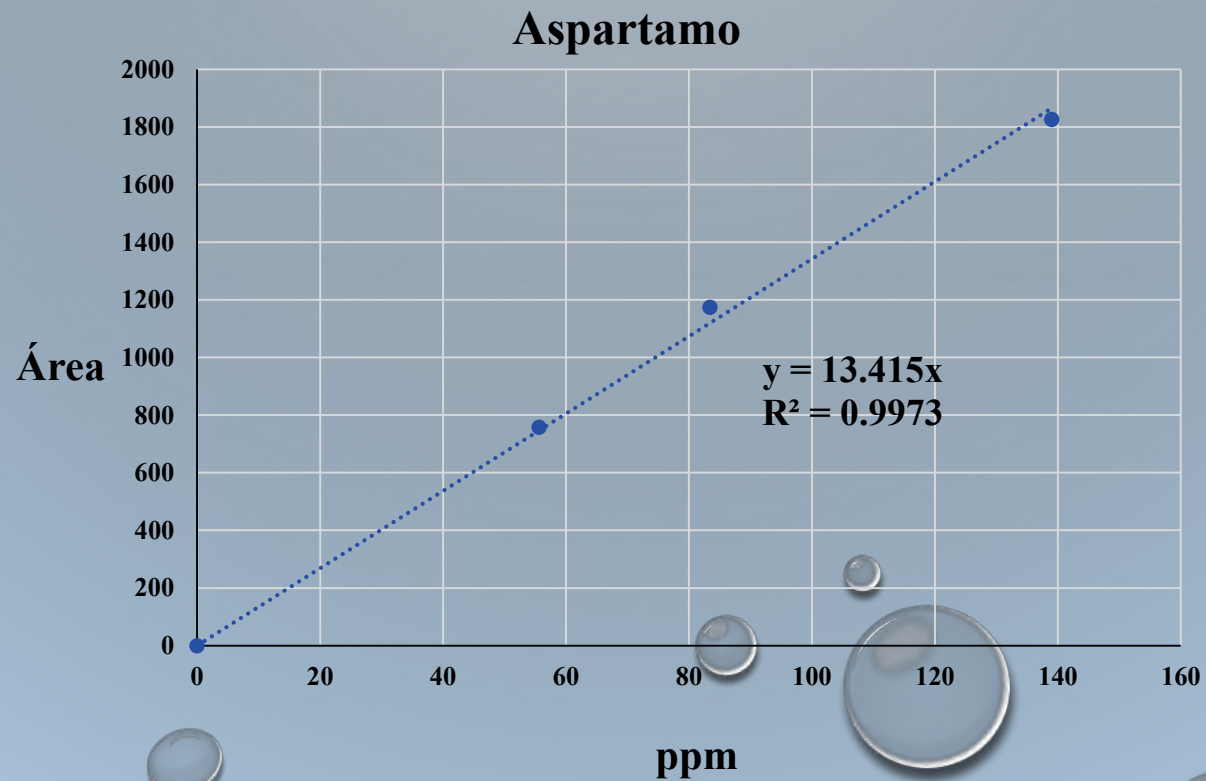
Ácido benzoico entre 5,05 y 5,11 min



Aspartamo ppm	área		Cafeína ppm	área		Benzoico ppm	área
55,6	758,4		43,6	2601,6		64	635,2
83,4	1174,7		65,4	3943,5		96	957,2
139	1826,2		87,2	5328,6		128	1339,4

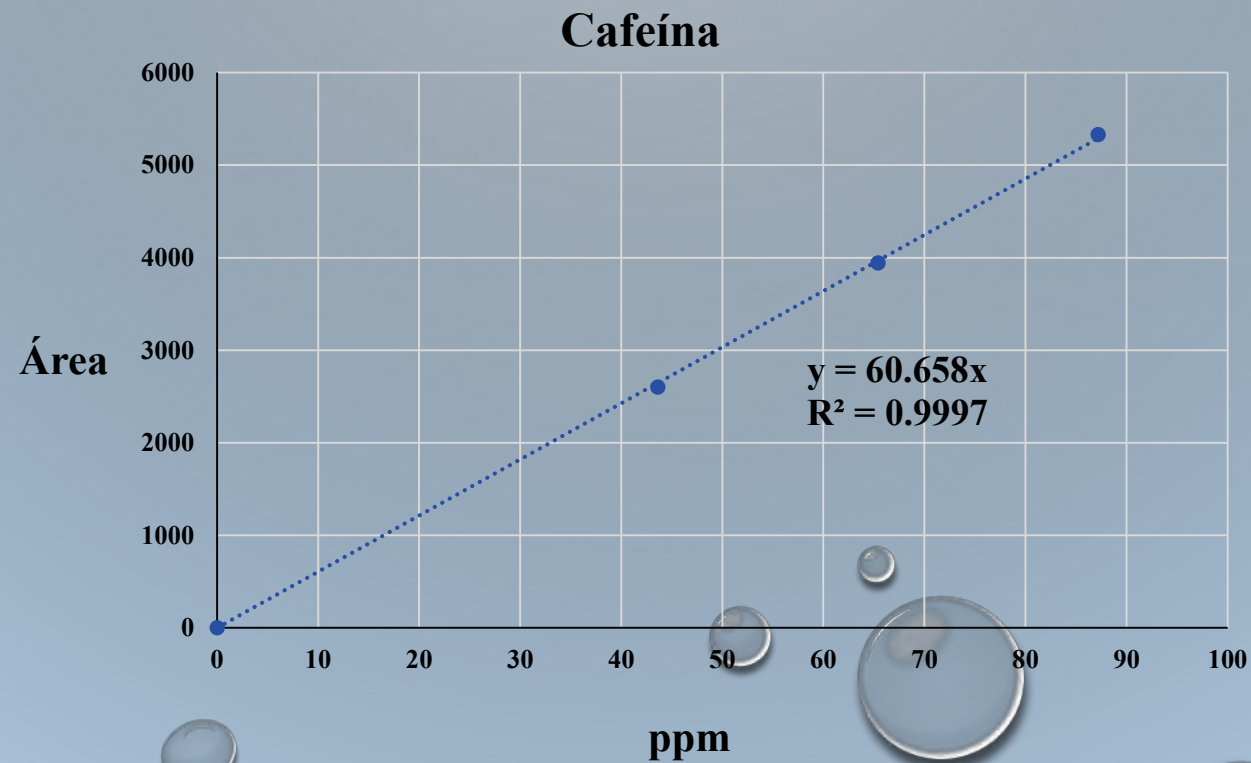
Procedimiento

Luego graficamos para cada analito el área de pico en función de la concentración, ajustando las rectas de manera tal que pasen por el origen.



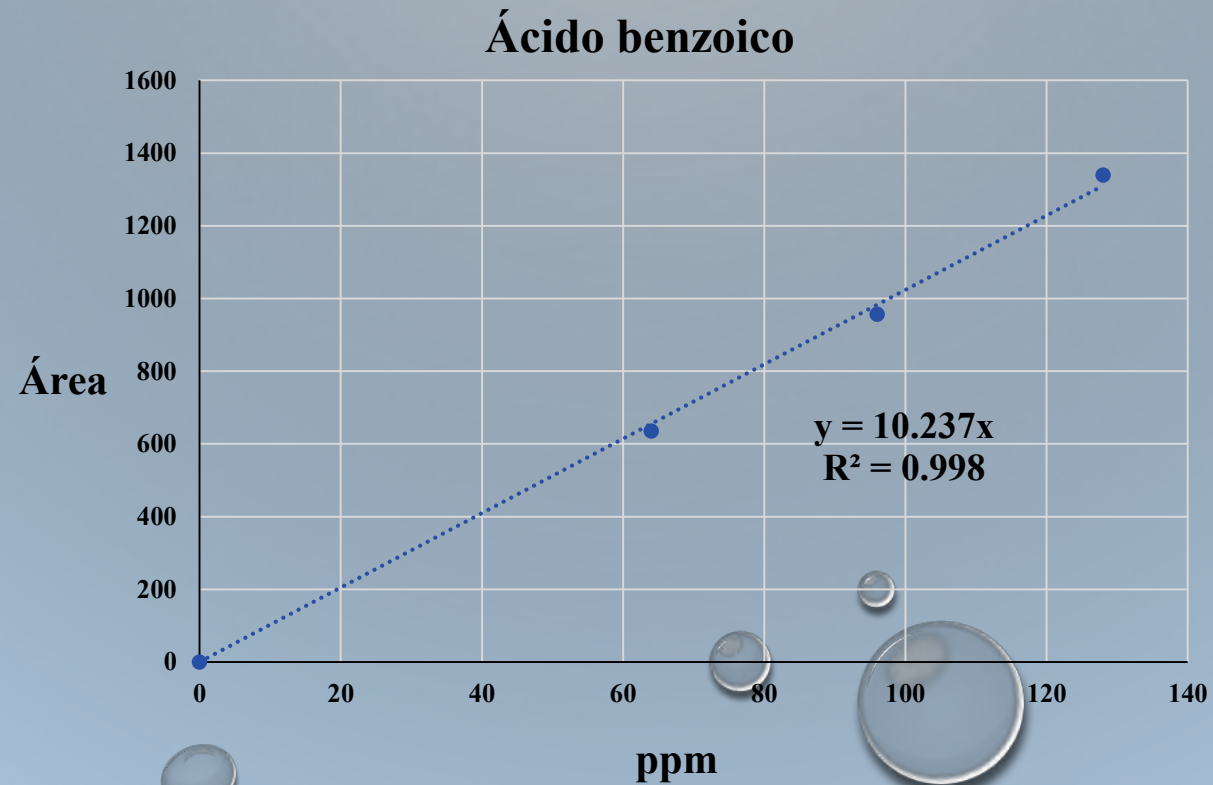
Procedimiento

Luego graficamos para cada analito el área de pico en función de la concentración, ajustando las rectas de manera tal que pasen por el origen.



Procedimiento

Luego graficamos para cada analito el área de pico en función de la concentración, ajustando las rectas de manera tal que pasen por el origen.



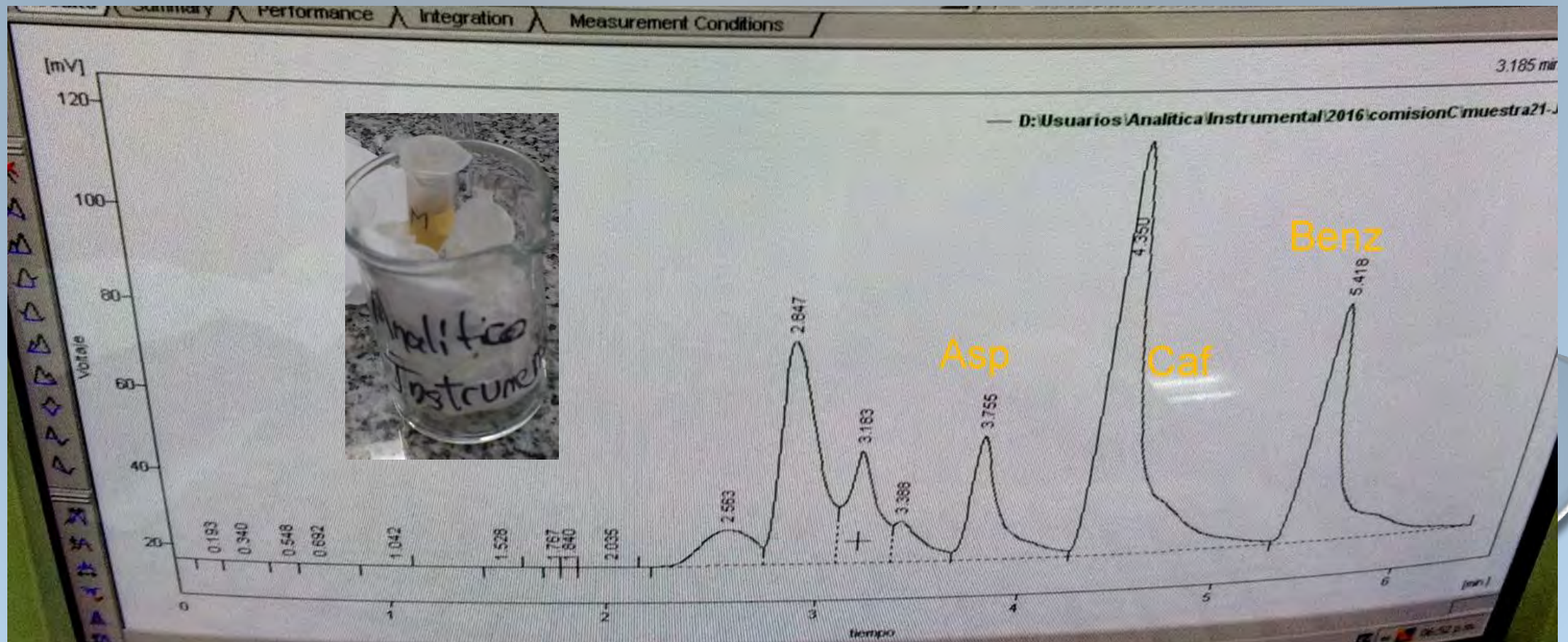
Procedimiento

Nuestra muestra va a ser la bebida Coca Cola Light, previamente descarbonatada por sonicación. Para que las concentraciones de los analitos entren dentro de las correspondientes curvas de calibración, debemos diluir convenientemente la bebida con agua calidad HPLC (dilución 10:25). Finalmente, la bebida diluida es filtrada por membrana de 0,45 o 0,22 μm .



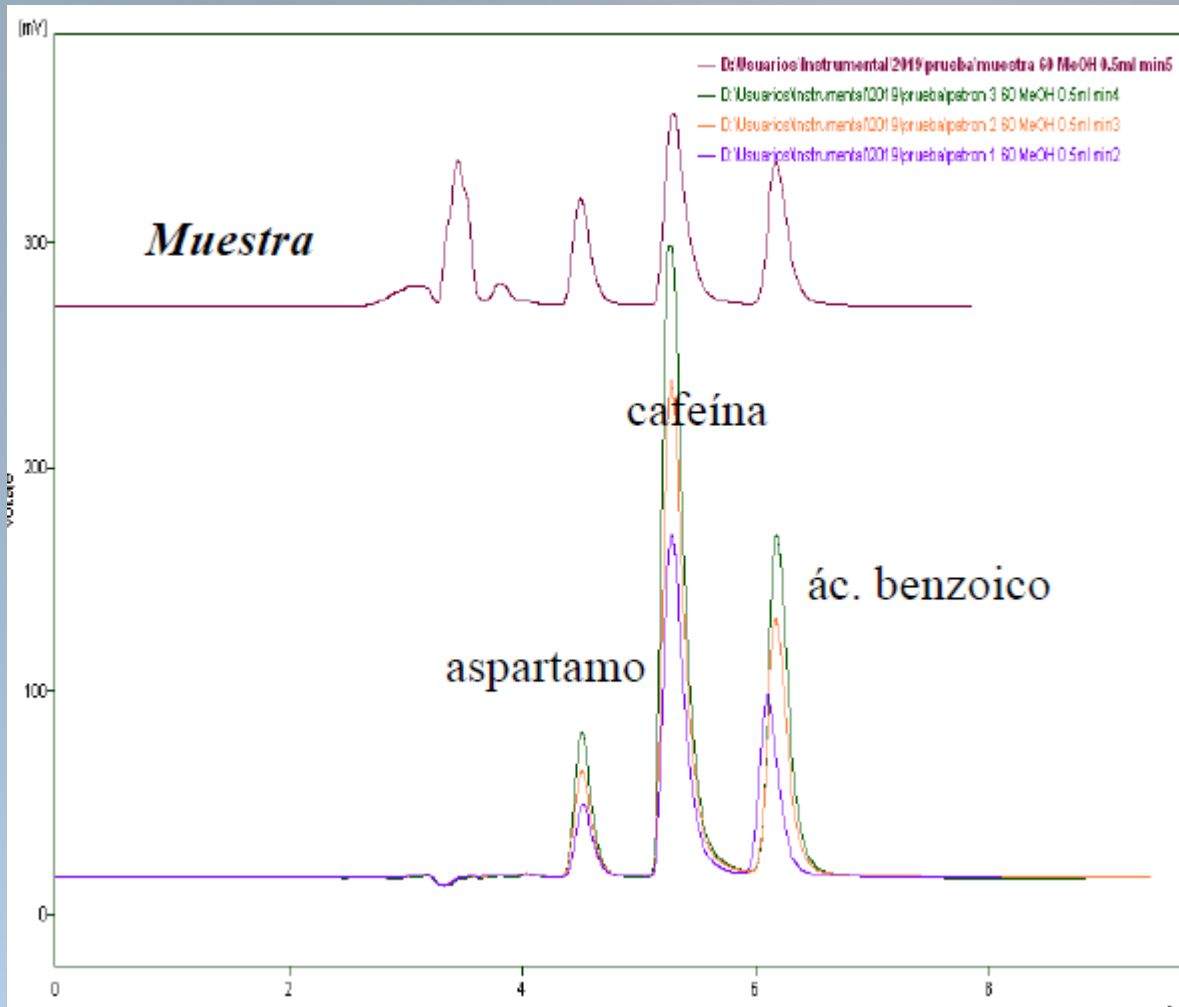
Procedimiento

A partir del cromatograma de la muestra diluida determinamos las áreas de pico de cada analito.



Procedimiento

A partir del cromatograma de la muestra diluida determinamos las áreas de pico de cada analito.



	Área dil. 10:25
Aspartamo	1406,9
Cafeína	3208,1
Ácido benzoico	1214,3

Procedimiento

Con los valores de área de cada analito ingresamos a las respectivas curvas de calibración y hallamos la concentración correspondiente. Finalmente, teniendo en cuenta la dilución, se calcula la concentración de cada analito en la muestra original (Coca Cola sin diluir).

Datos muestra diluida 10:25

	Área dil. 10:25	Conc dil. 10:25	Conc. en Coca Light
Aspartamo	1406,9		
Cafeína	3208,1		
Ácido benzoico	1214,3		

Calcular!!!



¡Gracias por su atención!

