

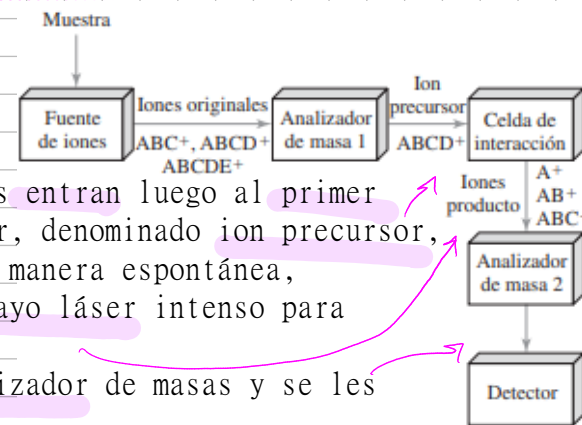
# Técnicas cromatográficas II

**Técnicas en tandem** Se pueden utilizar varias técnicas para la separación, identificación y cuantificación de un mismo analito.

- La espectrometría de masas en tandem es otra técnica que facilita la obtención de un espectro de masas de iones preseleccionados y fragmentados.

Una fuente de ionización, que a menudo es una fuente de ionización blanda, produce iones y algunos fragmentos. Éstos entran luego al primer analizador de masas, el cual selecciona un ion en particular, denominado ion precursor, y lo envía a la celda de interacción donde se descompone de manera espontánea, reacciona con un gas de choque o puede interactuar con un rayo láser intenso para generar los fragmentos, que se llaman iones producto.

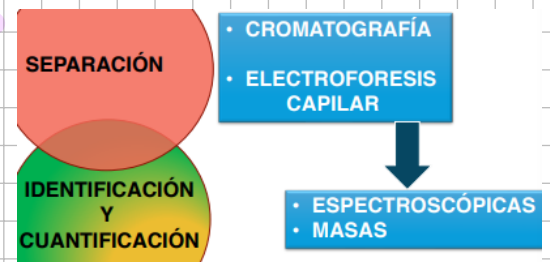
Luego se analiza la masas de estos iones en el segundo analizador de masas y se les detecta mediante el detector de iones



- Aunque la espectrometría de masas es una poderosa herramienta para la identificación de compuestos puros, es insuficiente para el análisis de mezclas debido al gran número de fragmentos con diferentes valores de  $m/z$  que se producen en cada caso. La interpretación del complejo espectro resultante es a menudo imposible. Por esta razón, los químicos han perfeccionado métodos en los que el espectrómetro de masas está acoplado a varios dispositivos efectivos con los llamados métodos acoplados.

## Cromatografía-espectrometría de masas

- La cromatografía de gases-espectrometría de masas se convirtió en una de las más poderosas herramientas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas. En este caso, los espectros de los compuestos se recolectan a medida que salen de la columna cromatográfica. Estos espectros se almacenan en una computadora para el siguiente proceso.
- La espectrometría de masas se puede acoplar también a la cromatografía de líquidos para analizar muestras que tienen componentes no volátiles.
- El principal problema que se debe superar en el desarrollo de ambos métodos acoplados es que la muestra que está en la columna cromatográfica está muy diluida por el gas o el líquido portador que atraviesa la columna. Por tanto, se han tenido que perfeccionar métodos para eliminar el diluyente antes de introducir la muestra en el espectrómetro de masas.



## Electroforesis capilar-espectrometría de masas

- Este método acoplado se convertiría en una poderosa e importante herramienta para el análisis de grandes biopolímeros.
- El efluente del capilar pasa directamente a un dispositivo de ionización por electronebulización y después los productos entran en el filtro de masas cuadrupolar para su análisis. En algunas aplicaciones se utiliza también el bombardeo con átomos rápidos en flujo continuo para la ionización.

## Aplicaciones de la esp. de masas en tandem

- La espectrometría de masas en tandem puede ofrecer algunas de las mismas ventajas que la cromatografía de gases-espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, pero es significativamente más rápida.

Las separaciones en una columna cromatográfica se realizan en un tiempo que va de pocos minutos a horas, y las separaciones que se realizan en los espectrómetros de masas en tándem tardan milisegundos y son igualmente satisfactorias.

Además, las técnicas cromatográficas requieren la dilución de la muestra con una gran cantidad de fase móvil y la eliminación posterior de ésta, lo que incrementa en gran medida la probabilidad de introducir interferencias. Por consiguiente, la espectrometría de masas en tándem es potencialmente más sensible que cualquiera de las técnicas cromatográficas acopladas porque el ruido químico que se produce es generalmente menor

## HPLC-MS

La combinación de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas parecería ser una fusión ideal de separación y detección.

Como en la cromatografía de gases, un espectrómetro de masas puede ser de gran ayuda en la identificación de especies a medida que salen de la columna cromatográfica. Sin embargo, la espectrometría de masas requiere una muestra en fase gaseosa, y la salida de la columna de cromatografía de líquidos es un soluto disuelto en un solvente. Como primer paso, el solvente se tiene que convertir en vapor. Cuando está vaporizado, el solvente de cromatografía de líquidos produce un volumen de gas que es de 10 a 1000 veces mayor que el gas portador en cromatografía de gases. Por consiguiente, la mayor parte del solvente se tiene que eliminar.

Las fuentes de ionización más comunes son la ionización por electroaspersión y la ionización química a presión atmosférica

### HPLC- MS

La combinación de cromatografía de líquidos de alta resolución y la espectrometría de masas ocasiona una alta selectividad porque los picos no resueltos se pueden aislar al supervisar sólo una masa seleccionada.

#### Más complejo que GC-MS

- por baja volatilidad de analitos
- EI y CI no son adecuadas

- Necesita desolvatación previa a MS.

La técnica de LC-MS tiene la capacidad de proporcionar huellas dactilares de un producto particular sometido a elución en lugar de confiar en el tiempo de retención como sucede en la HPLC ordinaria.

• Moving-belt interface	1977
• Direct-liquid-introduction interface	1980
• Thermospray interface	1983
• Frit FAB/continuous-flow FAB interface	1985/1986
• Atmospheric-pressure chemical ionization interface	1986
• Particle-beam interface	1988
• Electrospray interface	1988

La combinación también proporciona masa molecular, información estructural y análisis cuantitativo exacto.

Cuando se combinan con cromatografía de líquidos, los sistemas de espectrometría de masas en tándem reciben el nombre de instrumento de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas-espectrometría de masas.

los espectrómetros de masas en tándem son sistemas cuadrupolares triples o espectrómetros cuadrupolares de trampa de iones.

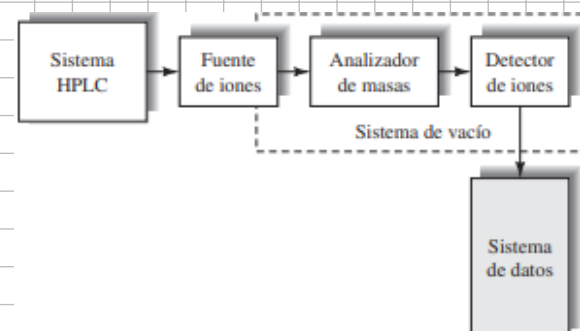
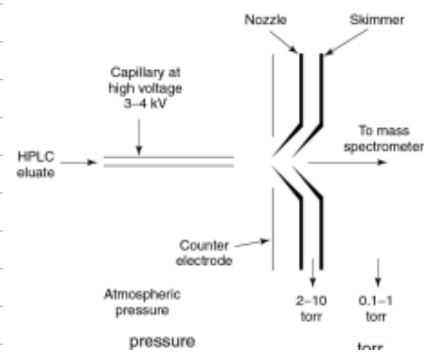


FIGURA 28.13 Diagrama de bloques de un sistema LC-MS. El efluente de la columna de cromatografía de líquidos se introduce en una fuente de ionización a presión atmosférica, como un electroaspersor o una fuente de ionización química. Los iones producidos se clasifican mediante el analizador de masas y son detectados por el detector de iones.

## Interfase Electrospray



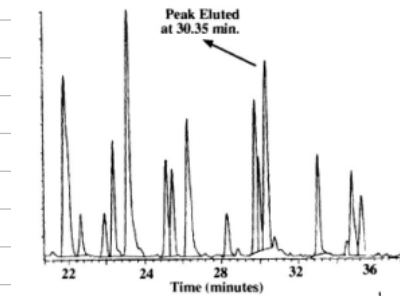
La velocidad del flujo que llega al detector es un factor importante.

Compuestos polares o iónicos.

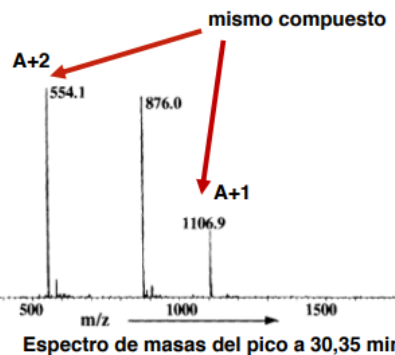
Alto contenido de agua puede ser un problema

## TÉCNICAS EN TANDEM

## HPLC- MS



Cromatograma en modo TIC (total ion current) de una digestión de lisozima.



Espectro de masas del pico a 30,35 min

- Complementaria a ESI: compuestos no polares o poco polares.
- Ionización suave
- Permite velocidades de flujo hasta  $2 \text{ mL min}^{-1}$
- Más tolerante a buffers que ESI
- Más tolerante a condiciones experimentales que ESI
- Presenta la presencia de aductos como  $(M+NH_4)^+$  o  $(M+CH_3COO)^-$
- Hasta 2000 Da

Velocidad de flujo: afecta tamaño y la distribución de las gotas en el proceso de ESI  $\Rightarrow$  cantidad de cargas. 5 a  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  es mayor la eficiencia en ESI.

- \* Utilizar columnas de diámetro reducido (microbore) Mantener el mismo tiempo de retención que en una analítica (d.i.  $4,6 \text{ mm}$ ; flujo  $1 \text{ mL/min}$ )

$$\text{flujo} = \left(\frac{r}{4,6}\right)^2 \times 1,0$$

- \* Dividir el flujo.

En general, a bajos flujos ESI es sensible a concentración y a flujos altos es sensible a masa

MS-MS

## Cromatografía de afinidad

- ! Utiliza un agente 'biológico' como fase estacionaria.
- ! Purificación y análisis de componentes de una mezcla.
- ! Interacciones no covalentes, reversibles. Es decir, no se formaran enlaces entre las moléculas, y reversibles porque en cualquier momento se puede romper la interacción cambiando la fase móvil

- Se requiere el enlace covalente de un reactivo, llamado ligando por afinidad, con un soporte sólido. Los ligandos por afinidad característicos son anticuerpos, inhibidores de enzimas u otras moléculas que en forma reversible y selectiva se enlazan a las moléculas del analito en la muestra.

- Cuando esta última pasa por la columna, sólo son retenidas las moléculas que se unen de manera selectiva al ligando por afinidad. Las moléculas que no se unen atraviesan la columna con la fase móvil.

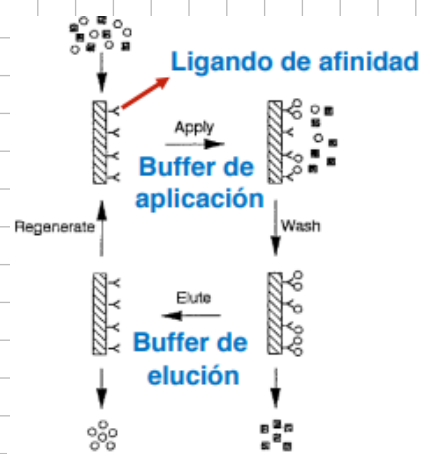
- Después de que se eliminan las moléculas indeseables, los analitos retenidos pueden ser arrastrados cambiando las condiciones de la fase móvil.

En una etapa se aísla un ion de interés y en otra etapa se utiliza para obtener relaciones entre este ion con otros (padre e hijos).

- Ion hijo
- Ion padre
- Pérdida de masa constante
- Selección de monitorear descomposición

Permite realizar determinaciones en metabolómica, estructuras de biomoléculas.

estudio científico de los procesos químicos que involucran metabolitos.

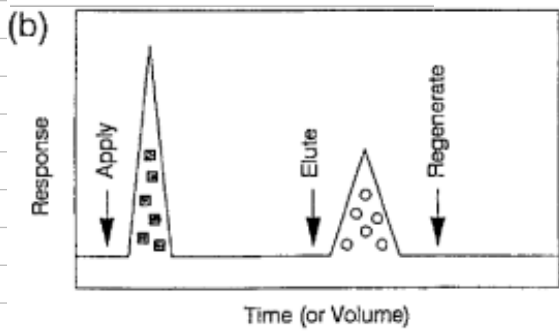


La fase estacionaria para la cromatografía por afinidad es un sólido como la agarosa o cuentas de vidrio poroso en las que el ligando por afinidad está inmovilizado.

La fase móvil en la cromatografía por afinidad desempeña dos papeles distintos. Primero, debe soportar el fuerte enlace de las moléculas del analito con el ligando. Segundo, una vez que se han eliminado las especies indeseables, la fase móvil debe debilitar o eliminar la interacción analito-ligando de modo que el analito pueda ser eluido.

Con frecuencia se aprovechan los cambios en el pH o la potencia iónica para modificar las condiciones de elución durante las dos etapas del proceso.

La principal ventaja de la cromatografía por afinidad es que es muy específica. Se utiliza de modo principal para aislar con rapidez biomoléculas durante el trabajo de preparación.



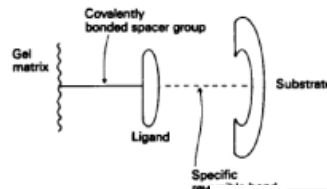
Common Ligands Used in Affinity Chromatography	
Type of ligand	Examples of retained compounds
<b>High-Specificity Ligands</b>	
Antibodies	Various agents (drugs, hormones, peptides, proteins, viruses, etc.)
Enzyme inhibitors and cofactors	Enzymes
Nucleic acids	Complementary nucleic acid strands and DNA/RNA-binding proteins
<b>General Ligands</b>	
Lectins	Small sugars, polysaccharides, glycoproteins, and glycolipids
Protein A and protein G	Intact antibodies and Fc fragments
Boronates	Catechols and compounds which contain sugar residues, such as polysaccharides and glycoproteins
Synthetic dyes	Dehydrogenases, kinases and other proteins
Metal chelates	Metal-binding amino acids, peptides, or proteins

**La fase estacionaria:**

- El ligando
- El soporte

**Baja eficiencia (en columna): ej. Geles basados en carbohidratos.**

**Alta eficiencia (HPAC): ej. sílica, poliestireno hidroxilado vidrio.**



la fase estacionaria es un ligando y el soporte debe tener baja eficiencia en columna y/o alta eficiencia (HPAC).

Los ligandos que se utilizan son anticuerpos o enzimas, entre otros

## El método de inmovilización

### A- Activación

### B- Acoplamiento

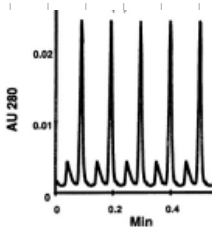
**Se debe evitar:** unión múltiple; orientación incorrecta; impedimento estérico.

❖ Solventes con pH, polaridad y fuerza iónica similar a ambiente natural.

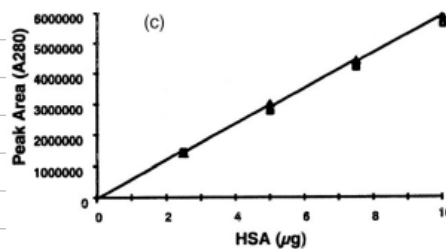
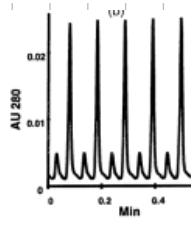
❖ Elución no específica: disminuir K

❖ Elución bioespecífica: competencia con el soluto (normal)  
competencia con el ligando (reversa)

Primeros 5 análisis



Últimos 5 análisis de un total de 5000



**FASE ESTACIONARIA:** Anticuerpo policlonal anti-HSA inmovilizado sobre epoxi.  
**SOLVENTE DE APLICACIÓN:** PBS (buffer fosfato)  
**SOLVENTE DE ELUCIÓN:** 12 mM HCl con 150 mM NaCl.  
**MUESTRA:** 10 g HSA a 1mg/mL.

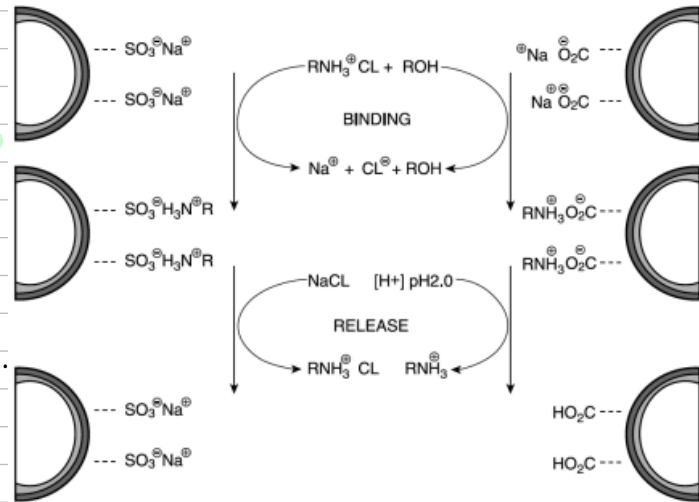


# Cromatografía por intercambio iónico

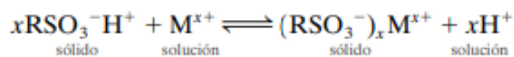
- ❖ Fase modificada con sitios catiónicos o aniónicos.
- ❖ Separación de compuestos iónicos.
- ❖ Interacciones electrostáticas.
- ❖ Fase acuosa.

- 1. Separar y determinar iones en columnas con relativamente baja capacidad de intercambio iónico o aniónico
- 2. Columnas para HPLC rellenas con resinas de intercambio aniónico o de intercambio iónico
- 3. La investigación sobre las columnas de baja capacidad de intercambio facilitó el uso de fases móviles de baja potencia iónica que podrían ser además desionizadas (ionización inhibida) para permitir la detección por conductividad de alta sensibilidad.
- 4. Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una solución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble.

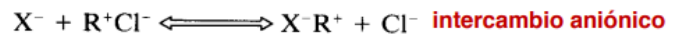
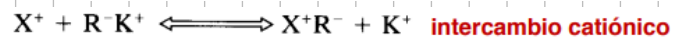
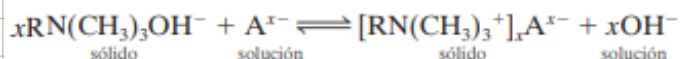
- 5. A mediados de los años treinta se fabricaron por primera vez resinas de intercambio iónico sintéticas para disminuir la dureza del agua, para la desionización de la misma y para la purificación de las soluciones. Los sitios activos más comunes en las resinas de intercambio catiónico son los grupos de ácido sulfónico  $-\text{SO}_3-\text{H}^+$ , un ácido fuerte, y los grupos del ácido carboxílico  $-\text{COO}-\text{H}^+$ , un ácido débil. Los intercambiadores aniónicos contienen grupos amino terciarios fuertemente básicos  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3+\text{OH}^-$  o grupos amino primarios débilmente básicos  $-\text{NH}_3+\text{OH}^-$ .



Cuando un intercambiador iónico de ácido sulfónico se pone en contacto con un solvente acuoso que contiene un catión  $\text{M}^{x+}$ , se establece un equilibrio de intercambio que puede expresarse mediante



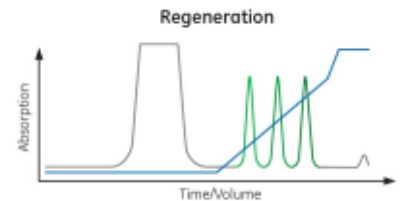
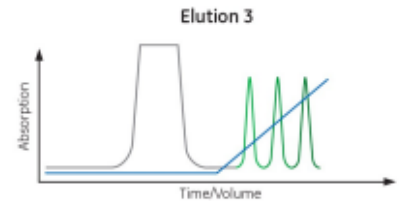
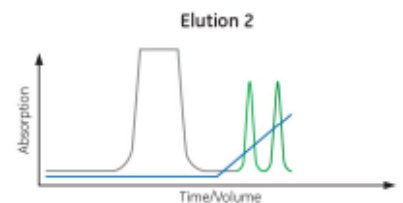
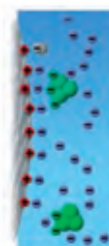
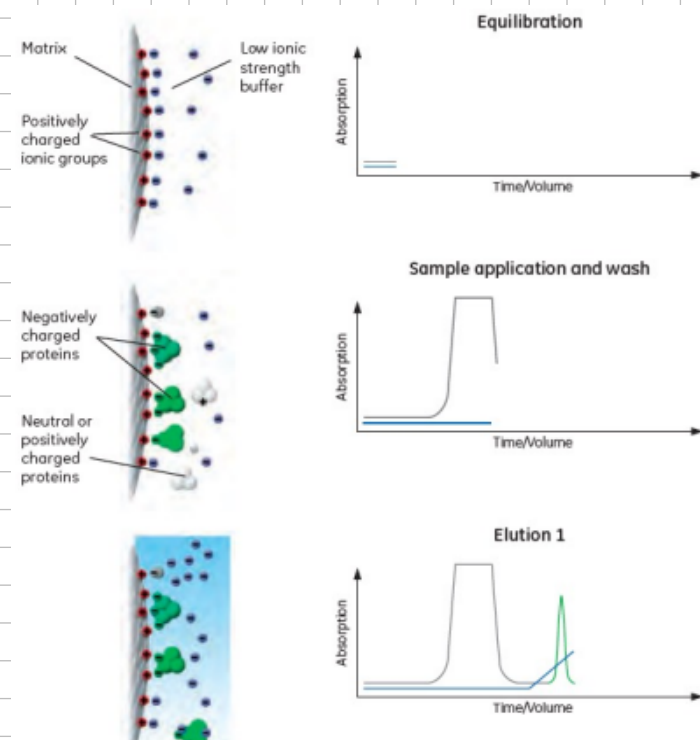
De forma semejante, un intercambiador de base fuerte interacciona con el anión  $\text{A}^{x-}$  de acuerdo con la siguiente reacción



$$k = \frac{K}{[\text{contraion}]^z}$$

La retención de un soluto iónico de carga  $z$  a la resina de intercambio está relacionada a la [contraion] en la fase móvil.

$$\log k = \log K + z \log (1/[\text{contraion}])$$



Las fases estacionarias son resinas modificadas covalentemente. Con el objetivo de activar el polímero frente a los iones, a la estructura se le unen químicamente grupos funcionales ácidos o básicos. Los grupos más comunes son el ácido sulfónico y las aminas cuaternarias

Ejemplos de matriz soporte en fases estacionarias:

- La fase móvil puede ser afectada por:
- fuerza iónica
  - composición de sales
  - pH
  - flujo
  - temperatura
  - modificador orgánico

Partículas no porosas  
Mayor resolución  
Evita difusión

Partículas porosas  
Alta capacidad de interacción

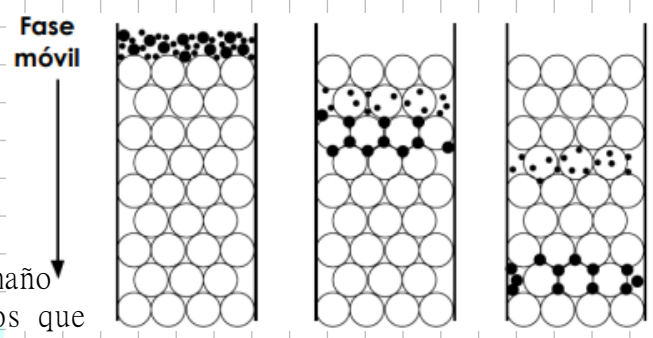
- A mayor fuerza iónica; mayor fuerza del solvente
- Composición de sales, fuerza de desplazamiento  
 $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Ag^{+} > K^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} > H^{+}$   
 $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > NO_3^{-} > Br^{-} > Cl^{-} > CH_3COO^{-} > OH^{-} > F^{-}$
- Aumento del pH, mayor ionización de ácidos, mayor retención como aniones; Disminución de pH, mayor retención de base como cationes.
- Flujo puede afectar resolución.
- A mayor temperatura, mayor intercambio
- Modificador orgánico tiene efecto para compuestos más hidrofóbicos.

### Cromatografía por exclusión de tamaño

- ❖ Separación de compuestos por diferencias en tamaño o volumen hidrodinámico.
- ❖ Biomoléculas, distribución de PM en polímeros.

Se aplica en particular a especies de elevada masa molecular.

Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaño son pequeñas partículas (10 µm) de sílice o de polímeros que contienen una red de poros uniforme en los que se pueden difundir las moléculas del soluto y el solvente. Las moléculas quedan atrapadas en los poros y son eliminadas del flujo de la fase móvil.

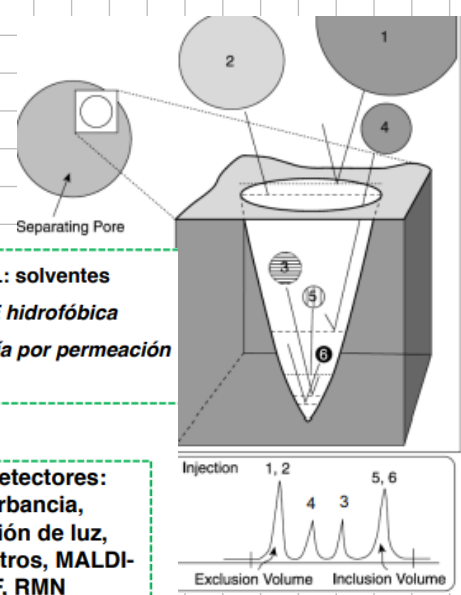


El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas del analito.

Las que son más grandes que el tamaño medio de los poros del relleno son excluidas y, por consiguiente, no son retenidas, tales especies son las primeras en ser eluidas.

Las moléculas cuyos diámetros son significativamente menores que los poros pueden penetrar a través de ellos y así pasan mucho tiempo atrapadas; éstas son las últimas en ser eluidas.

Entre estos dos extremos están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo tiene lugar la división, que está directamente relacionada con las dimensiones de la molécula y, en cierto modo, con la forma molecular



❖ Tamaño del poro

❖ FASE MÓVIL: acuosa a velocidades de flujo bajas.  
FE hidrofílica (Cromatografía por filtración de gel) 1959

❖ FASE MÓVIL: solventes orgánicos. FE hidrofóbica (Cromatografía por permeación de gel) 1964

❖ FASE ESTACIONARIA: geles de polímeros entrecruzados semirígidos o partículas de sílica.

❖ Detector sensible a masas. Generalmente refractómetro.

Otros detectores: Absorbancia, dispersión de luz, viscosímetros, MALDI-TOF, RMN

## Límite de exclusión y Límite de penetración.

El volumen total  $V_t$  de una columna rellena con gel de sílice o con un polímero poroso es

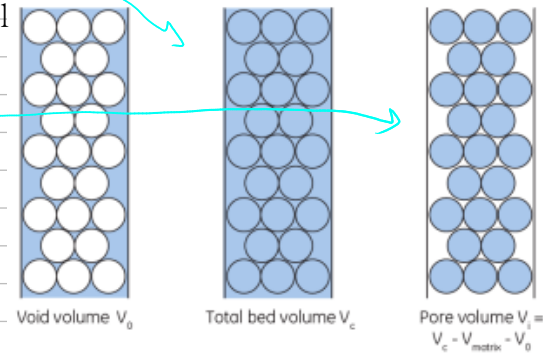
$$V_t = V_g + V_i + V_o$$

$V_g$  es el volumen que ocupa la matriz sólida del polímero o del gel,

$V_i$  es el volumen del solvente retenido en sus poros y

$V_o$  es el volumen libre exterior a las partículas

$$V_c = V_o + KV_i$$



el valor de  $K$  va entre 0 y 1, siendo 0 el valor para cuando no se retiene nada de líquido y 1 cuando se retiene todo

Si se supone que no hay mezcla ni difusión,  $V_o$  también representa el volumen teórico de solvente que se necesita para transportar a través de la columna los componentes que son demasiado grandes para entrar en los poros. Sin embargo, tiene lugar de hecho cierta difusión y mezcla, y como consecuencia de ello los componentes que no son retenidos aparecen en una banda de forma gaussiana con una concentración máxima en  $V_o$ .

En el caso de componentes muy pequeños que entran sin problema en los poros del polímero o del gel, los máximos de la banda aparecen al final de la columna con un volumen de eluyente que corresponde a  $(V_i + V_o)$ .

Por lo general,  $V_i$ ,  $V_o$  y  $V_g$  son del mismo orden de magnitud y, por tanto, una columna de exclusión por tamaño permite separar las moléculas grandes de las pequeñas en una muestra con un volumen mínimo de eluyente.

Las moléculas de tamaño intermedio tienen la capacidad de transferirse a una fracción  $K$  del solvente que ocupa los poros; el volumen de elución  $V_e$  para estas moléculas retenidas es se aplica a todos los solutos presentes en la columna.

$$V_e = V_o + KV_i$$

Para las moléculas que son demasiado grandes para entrar en los poros,  $K = 0$  y  $V_e = V_o$ ; para las moléculas que pueden entrar en los poros libremente,  $K = 1$  y  $V_e = (V_o + V_i)$ .

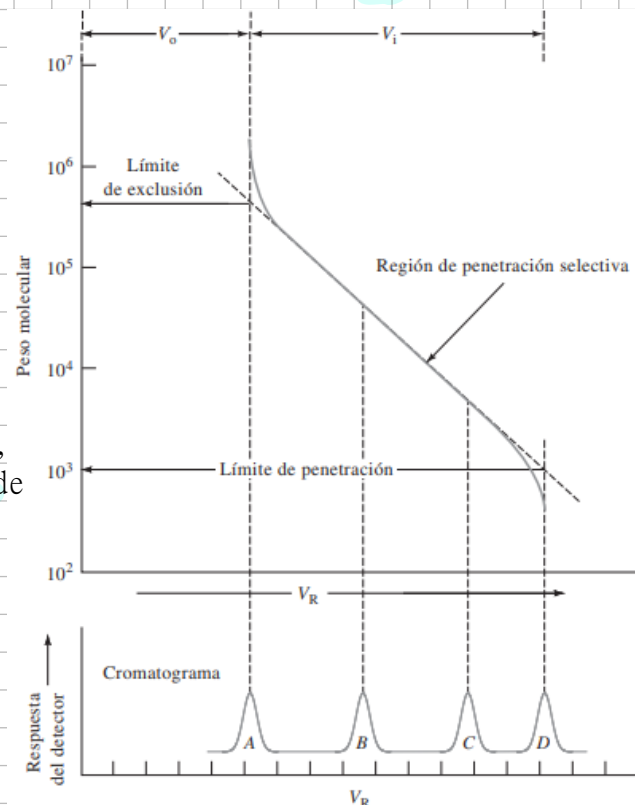
Se plantea la hipótesis de que no existe interacción alguna, como la adsorción, entre las moléculas del soluto y la superficie del polímero o del gel. Si hubiera adsorción, aumentaría la cantidad de soluto retenido intersticialmente; con las moléculas pequeñas,  $K$  tendrá entonces un valor mayor que la unidad.

Los valores de  $K$  oscilan desde cero, para las moléculas grandes totalmente excluidas, hasta la unidad, en el caso de las moléculas pequeñas.

El intervalo útil de masa molecular para un determinado relleno de exclusión por tamaño se ilustra en forma satisfactoria por medio de una curva de calibración

En este caso, la masa molecular, que está directamente relacionada con el tamaño de las moléculas de soluto, se grafica frente al volumen de retención  $V_R$ , que es el producto del tiempo de retención por la tasa de flujo volumétrico.

El límite de exclusión es la masa molecular máxima de una especie que podrá penetrar en los poros. Todas las especies cuya masa molecular es mayor que el límite de exclusión son tan grandes que no quedan retenidas,



por lo que son arrastradas juntas para dar el pico A en el cromatograma

Por debajo del límite de penetración, las moléculas de soluto pueden penetrar por completo en los poros. Por debajo de esta masa molecular todas las moléculas del soluto son tan pequeñas que son arrastradas y dan una sola banda, la marcada con D.

A medida que las masas moleculares disminuyen respecto al límite de exclusión, las moléculas del soluto pasan cada vez más y más tiempo, en promedio, en los poros que forman las partículas y, por consiguiente, se mueven progresivamente con mayor lentitud. Es en la región de penetración selectiva donde tiene lugar el fraccionamiento o división, lo que da lugar a picos de soluto individuales como los B y C del cromatograma.

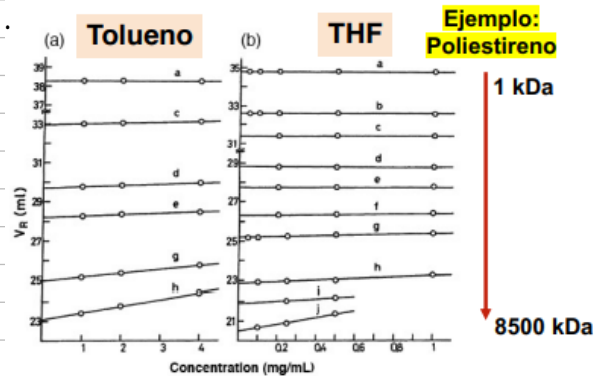
Se puede dar un efecto de sobrecarga cuando la concentración del analito es muy grande para la columna utilizada y el tamaño del poro que la componen. Esto puede solventarse modificando la velocidad del flujo o la temperatura.

También la velocidad de flujo y la temperatura pueden hacer variar los resultados del corrimiento

#### Efecto de la concentración

#### Efecto de sobrecarga

Ej. Si una columna de SEC (25 cm x 8 mm d.i) se utiliza, la concentración no debe superar 0,2%



Velocidad de flujo

Temperatura