

Desarrollo de métodos en Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC). Estrategias de optimización.

Profesor responsable	
Cecilia Castells, Prof. Titular, Inv. Principal	
Docentes participantes	
Participarán los siguientes docentes en el dictado de módulos teóricos (profesores) y en los distintos turnos de TP (en carácter de responsables de los Trabajos Experimentales): Dres. Mario Reta, Sonia Keunchkarian, Leonardo Gagliardi, Lilian Romero, Carlina Lancioni, Agustín Acquaviva, Rocío Pellegrino Vidal, y los/as Licenciado/as Daiana Prince, Sofia Peirano, Sol Giovannoni, Sebastián Caruso, Belen Cingolani, Federico Castañeda y Clara Parzanese.	
Característica del curso	Teórico y práctico
Modalidad del curso	Combinada. Teorías virtuales sincrónicas (70%); los Trabajos experimentales (TP), consultas y evaluación serán presenciales.
Duración total	50 horas (35 horas teoría, 12 horas de TPs y 3 horas evaluación).
Objetivos del curso	
El objetivo primario de este curso es impartir conocimientos básicos de operación en relación con la cromatografía de líquidos (HPLC) y optimización de métodos de análisis. El curso será de carácter teórico en un 75% y práctico en un 25%. Se propone un curso donde los contenidos respecto de conceptos fundamentales de cromatografía de líquidos estén incluidos de manera básica y práctica, incluyendo conocimiento de los componentes de un instrumento, como funciona cada módulo de un equipo y principales dificultades operativas, descripción de los modos separativos más comunes (fases inversa, normal e HILIC, y cromatografía de iones), manejo de solventes, uso de equilibrios secundarios, gradiente de elución y pretratamientos de las muestras más usuales (fundamentos y prácticas). Finalmente se discutirán métodos cuantitativos y conceptos básicos de validación. Se propondrán problemas reales y su resolución. Los trabajos experimentales estarán integrados a los conceptos teóricos discutidos previamente. El objetivo es que adquieran solvencia para operar un cromatógrafo de líquidos y comprender el efecto que las variables químicas y físicas: columna (química y geometría), temperatura, solventes, pH, distintos aditivos tienen sobre el análisis de una muestra compleja.	

Programa

1. *Introducción.* El proceso cromatográfico, migración diferencial y dispersión en la columna, retención y selectividad. Eficiencia de la columna: ensanchamiento de bandas, influencia de la velocidad de la fase móvil, efectos intra y extra columna, efecto del tamaño de muestra. *Resolución:* ¿Cuánta resolución es necesaria para el análisis? Resolución vs. condiciones experimentales: a) fuerza del solvente, b) selectividad de la fase móvil, c) tipo de columna y temperatura. Capacidad de picos. Tiempo de análisis y limitaciones instrumentales.

2. *Descripción del equipamiento básico.* Bombas: bombas de pistón simple y doble, pistones en tandem, bombas a jeringa y de diafragma. Mezclado a alta y baja presión. Volumen de retardo. Tratamiento de la fase móvil: diferentes tipos de degasado, filtración. Inyectores y autoinyectores: diseño y operación. Ejemplos comerciales. Detectores más comunes: UV-visible, arreglo de diodos, fluorescencia, índice de refracción, electroquímico, dispersión de luz y detector de masas. Tuberías y acoples: tipos, construcción de una conexión típica. Prevención y solución de algunos problemas comunes en el uso del instrumento.

3. *Desarrollo del método cromatográfico.* Naturaleza de la muestra, pretratamiento y detección. Objetivos de la separación. Selección del método y condiciones iniciales. Selección de la columna: propiedades físicas y químicas de los materiales empleados como relleno. Diseño de columnas. Importancia de las características geométricas de la columna.

4. *Preparación de la muestra.* Tipos de muestra. Pretratamiento de muestras sólidas y líquidas. Muestras bioquímicas: aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Extracción en fase sólida (SPE) y extracción en fase sólida dispersiva (DSPE), microextracción en fase sólida (SPME), QuEChERS, extracción con barra agitadora (SBSE), microextracción en sorbente empaquetado (MEPS), microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLE), extracción acelerada con solventes (ASE) y con microondas (MASE).

5. *Elección del tipo de cromatografía en función de las características de la muestra.* Muestras no-iónicas: fase normal y fase inversa. Optimización de la separación. Muestras iónicas: fase inversa, par iónico e intercambio iónico. Control del pH, empleo de buffers y modificadores orgánicos. Desarrollo del método. Breve descripción de otros tipos de cromatografía con fases líquidas.

6. *Elución en gradiente para el desarrollo del método cromatográfico.* ¿Separación isocrática o en gradiente? Variables experimentales en un gradiente de elución: pendiente, condición inicial y final, tiempo de demora. Estimación de las condiciones óptimas para el análisis final. Separaciones fáciles, típicas y difíciles.

7. *Análisis cuantitativo.* Detectabilidad. Influencia de las condiciones experimentales. Detectabilidad versus resolución. Métodos de cuantificación. Método del estándar interno, del estándar externo y método del sobreagregado. Ventajas y desventajas de cada uno. Curvas de calibración. Conceptos básicos de validación. Cifras de mérito: límite de detección y de cuantificación, rango lineal, sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión y robustez.

Trabajos Prácticos

TP1: Simulación cromatográfica. Influencia de las distintas variables operacionales.

TP2: Análisis cualitativo de una mezcla estándar. Descripción y manejo del instrumento. Influencia de la composición y tipo de solvente orgánico en la retención, selectividad y resolución de una

mezcla real. Importancia del volumen extracolumna.

TP3: Pretratamiento de una muestra mediante extracción en fase sólida. Análisis de hidrocarburos poliaromáticos en agua por gradiente de elución. Cálculo del factor de enriquecimiento.

TP 4: Determinación cuantitativa de paracetamol en medicamento para niños. Validación de datos.

Bibliografía

- Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd. Ed., L R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Wiley Interscience, 2010
- HPLC Columns. Theory, Technology and Practice, U. D. Neue, Wiley, 1997
- Practical High-Performance Liquid Chromatography, V. R. Meyer, 4th edition, Editorial: Wiley Interscience, 2004.
- Comprehensive Sampling and Sample Preparation, 2nd edition, 2025. Editorial: Elsevier; DOI: 10.1016/B978-0-443-15978-7.00123-5.

Evaluación

Evaluación escrita al finalizar el curso.