

Empleo de un simulador como herramienta didáctica para la enseñanza de conceptos de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

EJE N° 5

Relato de experiencia pedagógica

Christian Byrne
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata
byrne@quimica.unlp.edu.ar

RESUMEN

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica analítica muy poderosa para la separación y cuantificación de una gran variedad de analitos. Existe un conjunto de inconvenientes de orden práctico como el costo del equipamiento e insumos, el tiempo relativamente extenso desde el punto de vista académico que requieren los ensayos, y la complejidad instrumental que involucra un manejo por parte de personal especializado, que dan lugar a que el uso de programas de simulación sea una buena alternativa a la hora de estudiar los conceptos fundamentales de esta técnica y cómo impactan las diversas variables en una determinada separación cromatográfica. En el presente trabajo se describe el empleo del software interactivo gratuito *Practical HPLC simulator* v1.0 como complemento de las actividades prácticas de HPLC realizadas en la asignatura Química Analítica Instrumental de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. La resolución de una serie de situaciones problemáticas mediante el mismo, de manera tanto grupal como individual, permitió a nuestros alumnos aplicar los diversos aspectos teórico-prácticos estudiados durante la cursada en situaciones reales concretas, afianzando conceptos y desarrollando estrategias para resolver problemas.

PALABRAS CLAVE: cromatografía líquida; HPLC; química analítica; simuladores

INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta eficiencia (*high performance liquid chromatography*, HPLC) es una de las técnicas analíticas estudiadas y utilizadas durante el desarrollo de la cursada de Química Analítica Instrumental, asignatura que forma parte del tercer año del plan de estudios de varias carreras de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

La HPLC se basa en la separación de diferentes analitos según su afinidad relativa por una fase fija que se halla en una columna, llamada fase estacionaria, y una fase móvil que fluye a través de la columna impulsada por una bomba. En la denominada *HPLC de fase inversa* la fase estacionaria posee características no polares (típicamente consiste en partículas de sílice recubiertas por cadenas hidrocarbonadas tales como C18), mientras que la fase móvil tiene características polares. De acuerdo a esto, los analitos con mayor carácter no polar serán más retenidos, mientras que los más polares tendrán poca afinidad por la fase estacionaria y eluirán antes. La fase móvil consiste en una mezcla de agua o un buffer acuoso (solvente A) con un modificador orgánico (menos polar que el agua) que suele ser metanol o acetonitrilo (solvente B). Mientras mayor sea el porcentaje de ese modificador mayor será la denominada fuerza de la fase móvil, lo que se traduce en una disminución del tiempo que los analitos pasan dentro de la columna (llamados tiempos de retención). La composición de la fase móvil puede permanecer constante en el tiempo, hablándose así de una corrida isocrática, o bien puede variar, hablándose en este caso de un gradiente de composición de la fase móvil.

Una dificultad de esta técnica asociada a la cuestión práctica en el ámbito académico es su carácter complejo y costoso, tal como señala Ortiz Miranda (2017):

Un recurso didáctico fundamental para llevar a cabo estas prácticas es el manejo de equipamiento en el laboratorio, pero su uso es limitado porque los equipos son costosos y de manejo complejo, lo que constituye un problema para lograr que los estudiantes adquieran habilidades y destrezas en la parte experimental (p. 2).

Otra dificultad es la que plantea Boswell *et al.* (2013) y retoman Páez y Carp (2015): para que un estudiante obtenga una idea intuitiva de cómo los parámetros experimentales importantes y su interacción afectan las separaciones por HPLC, se necesitaría llevar a cabo una gran cantidad de experimentos. Dado el tiempo que lleva cada separación individual y las limitaciones de una sesión típica de laboratorio de química analítica, es prácticamente imposible que los estudiantes adquieran este tipo de experiencia.

Estas dificultades ocasionan que sea necesario recurrir a programas que permitan simular el empleo de un cromatógrafo líquido. Estos simuladores poseen la ventaja de que muchos de ellos son gratuitos (en contraste con los costosos equipos y consumibles reales), son generalmente fáciles de usar, no consumen reactivos y solventes, no hay riesgo alguno de dañar instrumentación, requieren menos supervisión por parte de un instructor, y brindan una retroalimentación instantánea, lo que los hace muy atractivos para nuestros alumnos (Boswell *et al.*, 2013). Los simuladores de HPLC posibilitan de esta manera una mejor comprensión del impacto de los distintos parámetros puestos en juego en una separación cromatográfica. Por supuesto, nunca van a ser capaces de reemplazar el uso de instrumentación real de HPLC en el laboratorio, sino que, más bien, deben ser considerados como una herramienta complementaria para mejorar el valor del tiempo dedicado a un instrumento real. De hecho, según Zendler y Greiner (2020), los hallazgos empíricos muestran que el aprendizaje con simulación por computadora funciona de manera similar al método experimental, por lo que ambos métodos instruccionales deberían verse como complementarios.

Múltiples simuladores de HPLC se han desarrollado con fines ya sea comerciales o académicos. Estos simuladores cuentan con controles e indicadores intuitivos para una amplia gama de condiciones experimentales. Asimismo, muestran un gráfico con el correspondiente cromatograma, por lo que proporcionan retroalimentación inmediata cada vez que se cambian los parámetros experimentales (Boswell *et al.*, 2013). Se ha comprobado recientemente que la implementación de todo el proceso de separación cromatográfica en una plataforma de software fácil de usar y universalmente extendida como MS Excel puede ser más atractiva para fines didácticos (Fasoula, Nikitas y

Pappa-Loisi, 2017). Dentro de la variedad de simuladores que se basan en una hoja de cálculo de Excel con macros, seleccionamos *Practical HPLC simulator* v1.0. Se trata de un software gratuito (freeware) desarrollado en noviembre de 2020 por el grupo de análisis farmacéutico de la Universidad de Ginebra, Suiza, presidido por el Dr. Davy Guillaume (Dong, 2021). El sistema cromatográfico simulado se ubica hacia la izquierda de la hoja de cálculo, e incluye los módulos que habitualmente se encuentran en un sistema de HPLC: bomba, inyector, horno de columna, detector, columna cromatográfica y frascos con fases móviles (Figura 1, izquierda).



Figura 1. Izquierda: Sistema cromatográfico del software *Practical HPLC simulator* v1.0.

Derecha: Cromatograma simulado y tabla con parámetros correspondientes a los distintos analitos

En la parte superior tenemos los reservorios de solventes. A es un buffer acuoso, para el cual podemos seleccionar distintos valores de pH: 2,7 (ácido fórmico 0,1%), 4,5 (buffer acetato 20 mM), 7 (buffer fosfato 20 mM) y 9 (buffer amonio 20 mM). El modificador orgánico B puede ser acetonitrilo o metanol. En la bomba (pump) podemos seleccionar si trabajamos de manera isocrática (con una fase móvil de composición constante a lo largo del tiempo) o bien trabajamos con un gradiente de elución (en donde el %B va cambiando con el tiempo). Si se trabaja de modo

isocrático debe indicarse el %B utilizado, mientras que si se trabaja en modo gradiente debe indicarse el %B inicial, el %B final y el tiempo de gradiente. Otro parámetro que se puede modificar en el módulo de la bomba es el caudal (flow rate) de la fase móvil. En el sitio correspondiente a la columna podemos seleccionar la fase estacionaria (C18, C4 o fenil), la longitud de la columna (entre 30 y 300 mm), el diámetro de la columna (entre 0,5 y 20 mm) y el tamaño de partícula (entre 1,5 y 10 μm). También puede ajustarse la temperatura y la porosidad de la fase estacionaria. En la parte correspondiente al inyector se puede elegir entre 7 tipos de muestras (mix): parabenos, antiinflamatorios no esteroideos, formulación de lidocaína, cannabinoides, salbutamol e impurezas, vitaminas liposolubles y drogas que se utilizan en el doping. Puede seleccionarse asimismo el porcentaje de solvente orgánico en el que la muestra está disuelta, la concentración de la muestra y el volumen de inyección. El cromatograma simulado en las condiciones utilizadas se muestra en la parte central del software (Figura 1, derecha). A continuación, aparece una tabla azul con la lista de compuestos presentes en el cromatograma, su tiempo de retención (t_r), el factor de retención (k), la anchura de los picos a media altura ($W_{50\%}$), la eficiencia (N), la asimetría, la resolución (R_s), la altura de los picos y su correspondiente área. En la parte derecha del software, hay dos gráficos grises. Aquí es posible seleccionar un compuesto contenido en la mezcla a analizar, para ver tanto su espectro UV como su perfil de ionización (estado de carga en función del pK_a). Por último, el software tiene un botón rojo "reset" en la esquina superior derecha, que restablece los valores originales del programa.

PROPUESTA DIDÁCTICA

Habitualmente se dedica un total de 8 horas semanales al tratamiento de esta técnica cromatográfica, las que se distribuyen en 3 horas de clases teóricas, 2 horas dedicadas a un seminario de resolución de problemas y 3 horas en donde se realiza un trabajo práctico (TP) de laboratorio. En el correspondiente TP, el total de los alumnos de una Comisión (30-40) recibe una explicación previa en el Laboratorio de Química Analítica Instrumental, en donde se detallan los fundamentos de la técnica, el equipamiento utilizado y las actividades experimentales a realizar. Luego el conjunto



de alumnos se divide en pequeños grupos (de no más de 10 personas), los cuales concurren secuencialmente a un laboratorio especializado dentro de la misma Facultad, en donde se halla el equipo real de HPLC con el que se realizará un estudio cuantitativo. La separación de los alumnos en grupos ocasiona que el tiempo de permanencia de los mismos frente al equipo sea extremadamente corto. Por otro lado, la complejidad del equipo y el hecho de que ya estén establecidas las condiciones en las que se efectuará la separación ocasionan que los alumnos prácticamente no presenten oportunidad de manipular el mismo. Con el fin de subsanar estos inconvenientes y posibilitar a nuestros alumnos una mayor capacidad de experimentación durante el transcurso del TP, en el presente año se llevaron a cabo una serie de actividades complementarias que involucraron el manejo del simulador descrito previamente.

Una semana previa a la realización del TP los alumnos recibieron (a través de un mensaje en el foro del aula virtual Moodle) un tutorial acerca de este simulador, en el que se indicó el procedimiento para su descarga y los detalles para su utilización.

Durante el desarrollo del TP, en el Laboratorio de Química Analítica Instrumental se procedió a la resolución de una serie de situaciones problemáticas haciendo uso del simulador, trabajando de manera grupal con cada conjunto de alumnos que estaba esperando su turno para operar el equipo real. Para realizar estas actividades, se utilizó el simulador en la notebook de un docente, conectada a un proyector para permitir la visualización de la pantalla al conjunto de la clase. En cada una de estas situaciones estudiadas de manera grupal, tal como señala Lion (2005):

Es el docente quien desde su conocimiento experto plantea nuevos interrogantes y aporta criterios para el análisis de los problemas sugeridos (...)

En este sentido, es el recorte de la problemática que el docente realiza desde su experticia en la disciplina y el andamiaje que brinda al estudiante en la resolución de los problemas, los que guían una construcción certera del conocimiento por parte del estudiante (p. 56-62).

En primer lugar se les propuso a los alumnos inyectar el mix 4, cannabinoides, planteando una situación problemática basada en el análisis por HPLC fase inversa de

un aceite de cannabis comercial. Se les solicitó emplear una columna C18, una detección en el UV a 220 nm, un volumen de muestra a analizar de 20 μ l, y una concentración de la muestra de 0,1 mg/ml. Asimismo, se les proporcionó la estructura química de los 6 analitos de la mezcla: cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), tetrahidrocannabinol (THC), ácido cannabidiólico (CBDA), ácido cannabigerólico (CBGA) y ácido tetrahidrocannabinólico (THCA). En base a estas estructuras, los alumnos debieron escoger de manera justificada el pH del buffer acuoso y el tipo de modificador orgánico a utilizar, teniendo en cuenta sus mecanismos primarios de interacción (seleccionaron correctamente pH 2,7 para que los analitos estén en su forma neutra no disociada, y metanol que interacciona vía puentes de H). Luego se halló una corrida isocrática con una composición tal que permitió una buena resolución de los analitos en un tiempo razonable. Se comprobó asimismo que al cambiar el modificador orgánico (por acetonitrilo) no existe una condición isocrática que permita resolver el sistema. También se estudió cómo influye la longitud de la columna y el caudal de fase móvil sobre la retención, y el efecto del tamaño de partícula sobre la presión.

A continuación se propuso inyectar el mix 7, agentes de dopaje. Como se trata de una mezcla de compuestos con muy diferentes estructuras, polaridades y propiedades ácido-base, se verificó que no existe una condición isocrática (tanto con metanol como con acetonitrilo como solvente B) que permita la correcta separación de estos analitos en un tiempo razonable. Con bajos %B los compuestos con mayor carácter no polar son muy retenidos, resultando picos anchos y tiempos de análisis largos. Al aumentar el %B los tiempos de análisis se acortan significativamente, pero la fuerza de la fase móvil es tan grande que los compuestos más polares son poco retenidos y no son resueltos. Los alumnos reconocieron entonces que para resolver este problema, denominado *problema general de la elución*, es necesario trabajar en modo gradiente. Se les pidió entonces que encuentren algunas condiciones del gradiente que permitan una adecuada separación. Asimismo, se les solicitó que comparen la forma de los picos obtenidos en modo gradiente con la resultante de una elución isocrática (al usar un gradiente los picos son más angostos y prácticamente todos de un mismo ancho). Finalmente se procedió a trabajar con el mix 3, antiinflamatorios no esteroideos. Analizando los perfiles de ionización en el simulador, se hizo visible otra vez la

necesidad de trabajar a pH 2,7 para que los analitos se encuentren en su forma neutra. Nuevamente, se comprobó la necesidad de emplear un gradiente. Se verificó también el efecto de la longitud de onda de detección seleccionada sobre el área de los picos en el cromatograma. Por ejemplo, al cambiar la longitud de onda de 220 a 250 nm se observó una intensificación de los picos correspondientes a ibuprofeno y ketoprofeno, a costa de una gran atenuación de los demás.

Con el fin de evaluar la adquisición de las capacidades pretendidas en cuanto al manejo de los conceptos de HPLC a través del simulador, se les proporcionó a los alumnos una situación problemática individual, para resolución en el hogar a través del aula Moodle. Para ello debieron usar el simulador ya sea en una PC, notebook o teléfono celular, ensayando diversas condiciones en cuanto a pH del solvente A, naturaleza del solvente B, columna empleada, caudal, %B, necesidad o no de un gradiente, etc. En todos los casos debieron justificar adecuadamente las condiciones elegidas, lo que desalentó la selección de condiciones al azar o un abuso de ensayos por prueba y error. Asimismo, debieron adjuntar un informe en el aula Moodle, en el que tuvieron que incluir una comparación entre las distintas situaciones testeadas y las conclusiones que pudieron obtener a partir de este análisis. Para facilitar dicho análisis, se les recomendó adjuntar capturas de pantalla de los cromatogramas obtenidos en cada condición. Finalmente, cada estudiante recibió un mensaje de retroalimentación personalizado por parte de un docente, con las correspondientes observaciones, reflexiones y sugerencias, siempre orientadas a la mejora de los procesos de aprendizaje.

CONCLUSIONES

Cataldi *et al.* (2012) señalan que “la importancia de estos programas de simulación desde el punto de vista didáctico y pedagógico, reside en hacer partícipe al estudiante de una vivencia que le permita desarrollar hábitos, destrezas, esquemas mentales y competencias básicas que enriquezcan su formación” (p. 58). El simulador *Practical HPLC simulator* v1.0 constituye un método fiable para que los alumnos se acerquen a lo que sería un análisis real por HPLC. El trabajo con el mismo, de manera tanto individual como grupal, posibilita a nuestros alumnos aplicar las nociones teóricas

asociados a este tipo de cromatografía a situaciones reales concretas, afianzando conceptos y desarrollando estrategias para resolver problemas. Su empleo permite además obtener rápidamente conclusiones acerca del comportamiento de un determinado sistema, mientras que para obtener conclusiones en la práctica experimental real suele ser necesario realizar una gran cantidad de determinaciones, lo que demanda una considerable cantidad de tiempo de trabajo, sin contar los costos asociados al consumo de reactivos y solventes. Asimismo, la aplicación de este simulador resulta extremadamente útil en situaciones en las que no se dispone de un equipo o bien este no se puede usar, tal como ocurrió durante el período de aislamiento asociado a la pandemia COVID-19.

En coincidencia a los hallazgos de Boswell *et al.* (2013), los estudiantes que usaron el simulador nos proporcionaron comentarios abrumadoramente positivos acerca de la experiencia. Asimismo, todos coincidieron en que el simulador *Practical HPLC simulator v1.0* es fácil de usar e intuitivo. Ningún estudiante expresó dificultad para usar los controles, hacer cambios en las condiciones o comprender la información que emite el simulador. Aunque los resultados de esta experiencia fueron alentadores, sin duda se requieren estudios más amplios y exhaustivos para poder comprender mejor cuáles son las formas más efectivas de incorporar simuladores de este tipo en el plan de estudios de la asignatura.

BIBLIOGRAFÍA

- Boswell, P., Stoll, D., Carr, P., Nagel M., Vitha M., y Mabbott, G. (2013). An Advanced, Interactive, High-Performance Liquid Chromatography Simulator and Instructor Resources. *Journal of Chemical Education*, 90(2), 198-202. <https://doi.org/10.1021/ed300117b>
- Cataldi, Z., Dominighini, C., Chiarenza, D., y Lage, F. J. (2012). TICs en la enseñanza de la Química: Propuesta de evaluación de Laboratorios Virtuales de Química (LVQs). *Revista Iberoamericana de Educación en Tecnología y Tecnología en Educación* 7, 50-59. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18288>

Dong, M. W. (2021). "Practical HPLC Simulator": A Useful Freeware for Learning HPLC. *LC-GC North America*, 39(10), 488-493. Disponible en: <https://link.gale.com/apps/doc/A681135252/AONE?u=anon~9d817b6f&sid=googleScholar&xid=41280bd2>

Fasoula, S., Nikitas, P., y Pappa-Loisi, A. (2017). Teaching Simulation and Computer-Aided Separation Optimization in Liquid Chromatography by Means of Illustrative Microsoft Excel Spreadsheets. *Journal of Chemical Education*, 94(8), 1167-1173. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00108>

Lion, C. (2005). Los simuladores. Su potencial para la enseñanza universitaria. *Cuadernos De Investigación Educativa*, 2(12), 53-66. <https://doi.org/10.18861/cied.2005.2.12.2754>

Ortiz Miranda, G. S. (2017). Prácticas de enseñanza de cromatografía líquida de alta performance (HPLC): complementación con un programa simulador. *IV Jornadas de TIC e Innovación en el Aula (La Plata, 2017)*. Disponible en <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66330>

Páez, P. A., y Carp, D. J. (2015). HPLC Abordado desde el aprendizaje basado en problemas. *X Jornadas Nacionales y VII Jornadas Internacionales de Enseñanza de la Química Universitaria, Superior, Secundaria y Técnica (Buenos Aires, 2015)*. Disponible en <https://www.aqa.org.ar/images/anales/pdf102/cd/04-QAn-QAm/04-004.PDF>

Zendler, A., y Greiner, H. (2020). The effect of two instructional methods on learning outcome in chemistry education: The experiment method and computer simulation. *Education for Chemical Engineers*, 30, 9-19, <https://doi.org/10.1016/j.ece.2019.09.001>.