

# Cromatografía planar – volver al futuro

Gertrud E. Morlock, Wolfgang Schwack

## Introducción

La importancia de la cromatografía planar y, en particular, de la cromatografía en capa fina, (TLC), se ha subestimado extraordinariamente. En este artículo subrayamos las características singulares de la cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) en comparación con tecnologías alternativas con columnas. Se describen dos aplicaciones con cromatografía planar para ilustrar el potencial de esta técnica: la detección en base a la bioactividad, y el acoplamiento a un espectrómetro de masas (MS).

La cromatografía planar celebra su 70º aniversario. La técnica data de 1938, cuando en el Instituto Farmacéutico de Kharkov, Ucrania, N.A.Izmailov y M.S.Shraiber crearon por primera vez un cromatograma en capa fina circular [1]. Con frecuencia se pasa por alto que la TLC se ha vuelto un método de alto rendimiento (HPTLC), que puede competir en términos de velocidad con métodos ultrarrápidos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La cromatografía planar es económica al solucionar problemas difíciles de forma simple. La detección en base a bio-efectos y en combinación con la espectrometría de masas de alta resolución (MS) puede identificar sustancias bioactivas con efectos dañinos, que no pueden ser detectados por técnicas analíticas, como la HPLC-MS-MS.

## Al paso con separaciones ultrarrápidas

Los beneficios de la HPTLC pueden ser demostradas por el análisis de la sucralosa en diferentes productos panificados dietéticos. Con esta tecnología se realizaron mil análisis cromatográficos en una jornada de ocho horas [2]. La cromatografía paralela (el desarrollo de 46 carriles en ambos lados de la placa en un solo paso de 15 min) y el sistema apilado (intervalos de 15 min por paso del sistema apilado) alcanza fácilmente un alto caudal. Estos análisis se completan dentro de los 20 segundos, con un consumo de cerca de 300 µL de solvente para cada análisis.

Este método se compara favorablemente con las separaciones rápidas realizadas por la HPLC más moderna donde, por ejemplo, con un gradiente de 2 min se podrían realizar 720 análisis en 24 horas. La HPTLC aun dispone de otras ventajas sobre los instrumentos más modernos, obviamente no en términos de eficiencia de separación, pero sí en términos de genialidad, creatividad y facilidad. Los componentes de las matrices de leche, biscochos, dulces, chocolates y bebidas son retenidos con fuerza en el origen del absorbente, lo que permite un tratamiento rápido de las muestras. Una matriz espesa fijada y adherida en la región de origen no influye en la HPTLC, que es de uso único, pero sí en una columna HPLC, ya que esta matriz se enriquece con cada inyección.

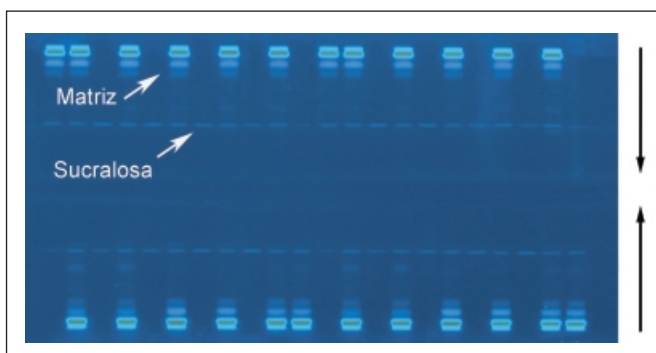
Por eso, los métodos en base a la HPLC para el análisis de sucralosa normalmente emplean la SPE para extraer la muestra; sin embargo, esto no es necesario para la HPTLC (ver figura 1).

Este método simple puede ser utilizado cuantitativamente con certeza, pues se obtuvo una desviación estándar relativa (RSDs) de 0,5 – 4,0 % para diferentes tortas y biscochos [2]. Se ha alcanzado un límite de detección (DL) de 1 mg/kg en confecciones lácteas (sin pasos de enriquecimiento), lo cual cumple con los requisitos de la legislación europea [3].

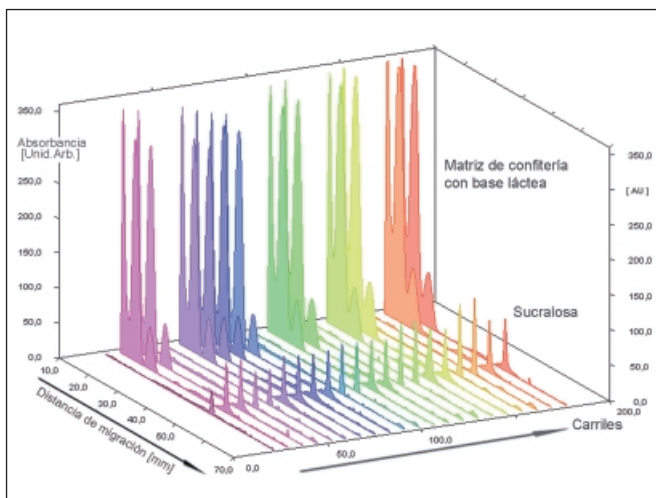
## Economizando el análisis

La HPTLC es económica. Un simple paso de derivatización permite el uso de detectores simples para la detección de un analito sin cromóforo. Con esto se evita el uso generalizado de detectores costosos, tales como el ELSD (detector evaporador de luz dispersa), el detector de aerosoles cargados o el espectrómetro de masas (MS). Por ejemplo, un análisis de rutina de sucralosa, que se suele hacer con una extracción por SPE seguida de HPLC-ELSD [4] o SPE con HPLC-MS-MS [5], y hasta de HPLC-MS-MS, empleando una sucralosa estándar marcada isotópicamente (sucralose-d<sub>6</sub>) [6]. Sigue asombrando que muchos analistas ignoren la HPTLC-vis, que puede solucionar las tareas sin algún paso de purificación SPE. Hay una tendencia generalizada a subestimar la alta selectividad ofrecida por las reacciones de derivatización. Consecuentemente, se tiende a recurrir a preparaciones más complejas de las muestras, a detectores costosos y a sistemas cromatográficos acoplados. La pregunta debería ser “¿Cómo puedo resolver esta tarea analítica de la mejor forma?”, y no “¿Cómo puedo resolver la tarea con el método que mejor manejo?”

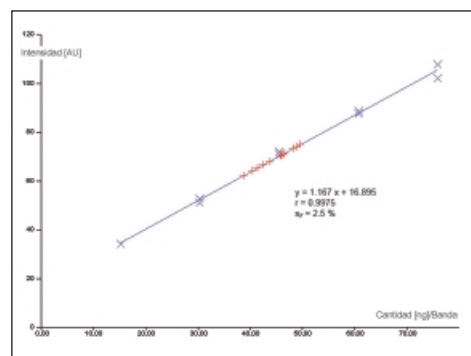
Aproximadamente el 10 – 20 % de los métodos HPLC, dependiendo del campo de aplicación, podrían ser realizados con mayor economía por HPTLC. ¿Porqué no utilizar HPTLC si la resolución está garantizada por MS y la pureza del espectro UV, haciendo una separación más alta innecesaria?



**Figura 1A:** La cromatografía paralela de 46 muestras y un mínimo de preparación de muestras (la matriz permanece en el origen) conduce al análisis cuantitativo y económico.



**Figura 1B:** Evaluación en 3D de algunos carriles de la placa



**Figura 1C:** La curva de calibración con un rango de 15 – 75 ng/Banda

## La función “Retro” de la TLC

Es sorprendente que la TLC sea tan ampliamente subestimada y concebida como un método anticuado. La mayoría de los analistas no utilizan el pleno potencial del método. La mayoría de las aplicaciones apuntan a un tamizaje en el análisis de alimentos [7] o fármacos [8], pero el método puede mucho más. Existe una falta de confianza generalizada en el método debido a una falta de experiencia en las versiones avanzadas de esta técnica. Esto también refleja la falta generalizada de actividad de investigación en cromatografía planar. El método ofrece resultados cuantitativos si se emplea la instrumentación debidamente, y el análisis es realizado apropiadamente, pero la técnica llegaría a ser más popular si existiera un mayor nivel de entrenamiento avanzado, mucho más que el ya existente “retro” entrenamiento TLC.

En este artículo se describen dos aplicaciones modernas y “avanzadas” en la cromatografía planar: el acoplamiento a un espectrómetro de masas y la detección en base a la bioactividad para ilustrar el potencial de la técnica.

## Experimental

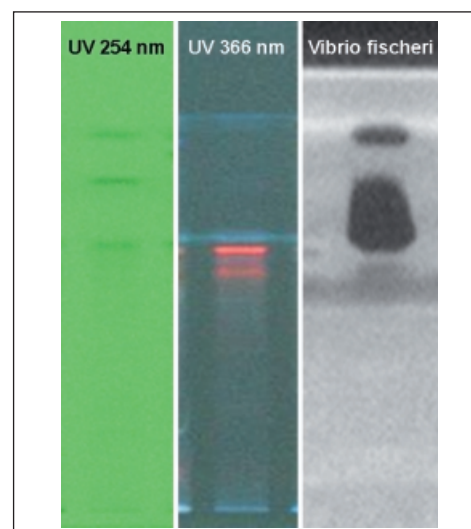
Se aplicaron carriles de 6 mm utilizando el TLC Sampler 4 (ATS 4, CAMAG Suiza). La cromatografía fue realizada sobre placas HPTLC de sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemania) utilizando un gradiente de 15 pasos en base a metanol, diclorometano y n-hexano por AMD2 (CAMAG). La detección en base a efecto y por inmersión automatizada (ChromaDex, Boulder Co. EE UU) y la imagenología por BioLuminizer (CAMAG) han sido seguidas por una documentación digitalizada con el sistema DigiStore 2 (CAMAG). Los espectros de masa fueron obtenidos dentro de segundos de la placa HPTLC utilizando el análisis directo en tiempo real (DART, IonSense, Danvers MA, EE UU) con los siguientes parámetros en el modo de iones positivos: flujo de helio 1,8 L/min, distancia de muestreo 1 cm (utilizando la tecnología separadora de gas iones - GIST - con el tubo de cerámica), calefacción del gas a 350° C, segundo electrodo perforado 100 V, cátodo 250 V. El LTQ Orbitrap XL híbrido FT-MS (espectrómetro de masas por transformada de Fourier de Thermo Fisher Scientific) se utilizó en el modo de barrido completo ( $m/z$  100 – 1000) para la identificación de compuestos.

## Resultados y discusión

**La detección en base a la bioactividad:** cada día se usan 100 000 compuestos químicos [9] y un número significativo de ellos entra potencialmente en el medio ambiente a través de fuentes locales. Para los analistas, el universo de los productos químicos está en expansión debido a la necesidad de identificar metabolitos y productos transformados al evaluar el riesgo de un compuesto químico. Por eso, es importante abrir nuevos caminos y aplicar la detección en base a la bioactividad como una técnica analítica complementaria al análisis enfocado al analito. Es así que,

tanto el analito buscado como un amplio rango de compuestos desconocidos, incluyendo los metabolitos, productos secundarios, contaminantes del proceso, productos adulterados o de migración, generan un efecto diferente – se detectan en mezclas complejas, en el rango de picomoles en, por ejemplo, agua de desechos, muestras forenses, cosméticos, bienes de uso o alimentos. Varios tipos de sistemas de detección en base a bio-efectos se pueden acoplar fácilmente a la cromatografía planar. El área de investigación actual se centraliza en microorganismos recombinantes (sistemas de genes reporteros) que indican un efecto específico, tales como la toxicidad, la mutagenicidad o los daños oxidativos. Un sistema indicador para sustancias bioactivas en general es el sistema BioLuminex, que usa la bacteria *Vibrio Fischeri*. Las bacterias *Vibrio Fischeri* son bien conocidas en el campo del análisis medioambiental, porque se las usa en el ensayo Microtox. Sin embargo, siendo un ensayo de cubeta, ellas sólo indican la suma de la bioactividad de una muestra y no los compuestos singulares bioactivos. Esta suma de parámetros puede conducir a resultados erróneos si en la muestra hay compuestos que amplifican o inhiben la luminiscencia. Por eso es razonable combinar estos ensayos con una cromatografía para obtener información fiable y para evitar el aislamiento fastidioso de componentes singulares, seguido de ensayos para determinar los efectos biológicos. El protocolo del análisis en base a efectos se realiza en cuatro pasos automatizados. Tras la aplicación y el desarrollo múltiple automatizado, la placa se introduce automáticamente en una suspensión de la bacteria luminiscente *Vibrio Fischeri*, para detectarla posteriormente.

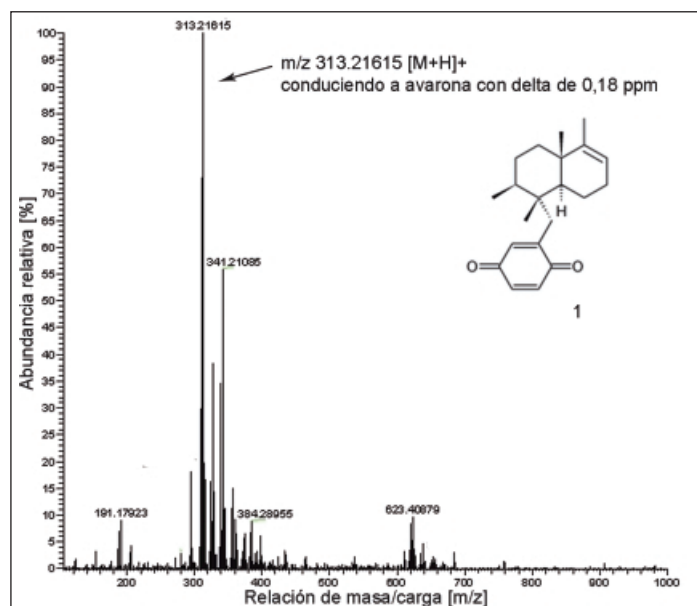
El formato planar de la fase estacionaria y el principio de operación por lote de la HPTLC son especialmente aptos para este tipo de ensayos post-cromatográficos. Obviamente existen varias y diferentes ventajas de la HPTLC sobre la HPLC acoplada a bioensayos: la fase orgánica móvil, que pudiese causar desactivación de enzimas u organismos vivos, se evapora y no puede impedir la detección (es decir no existe una limitación); y los sistemas de ensayo en base a efectos (enzimas, receptores, sustratos, bacterias genes reporteros) pueden aplicarse lenta y deliberadamente, dosificando la meta después de la cromatografía, y no de forma continua durante toda la operación del HPLC. Además, los bioensayos pueden tomarse el tiempo necesario para la incubación sin consideración alguna de los parámetros operacionales del instrumento. Hasta ahí, los acerca-



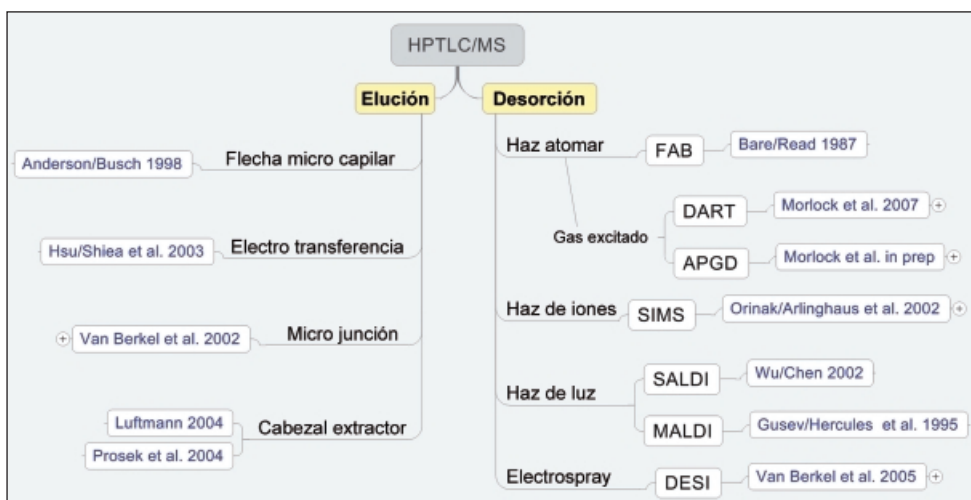
**Figura 2:** Detección del mismo carril con UV a 254 nm y 366 nm, seguido por la detección por bio-efecto con la bacteria luminiscente *Vibrio Fischeri*. Los componentes bioactivos en el análisis de productos naturales no se detectan necesariamente con detectores regulares, pero definitivamente son detectados por sistemas en base a efectos.

mientos prácticos ya ofrecen resultados prometedores en el campo de la cosmética [10] y de productos naturales, ver figura 2 [11].

**Acoplar un espectrómetro de masas según la necesidad:** Una vez detectada una sustancia bioactiva, la pregunta siguiente será ¿Qué es? Habrá que identificar zonas desconocidas pero tóxicas al *Vibrio Fischeri*. Esto implica que la HPTLC deberá ser acoplada a un MS apto para la elucidación de la composición elemental y



**Figura 3:** Espectro del HPTLC/DART-LTQ XL (modelo de iones positivos) de una zona bioactiva, previamente detectada con la bacteria *Vibrio Fischeri*, conduciendo a avarona (1) con una masa monoisotópica de 313,21621 para la molécula protonizada.



**Figura 4:** Acoplamiento de cromatografía planara con espectrometría de masas puede dividirse en dos secciones: técnicas de elución y de desorción.

estructural, como un TOF (MS de tiempo de vuelo), que produce información exacta sobre las masas. El acoplamiento de la cromatografía planar con un espectrómetro de masas es fundamental para la detección en base a la bioactividad, ver figura 3.

¿Cuáles son las ventajas del acoplamiento de HPTLC con MS? Al contrario de las técnicas columnares en línea, la cromatografía planar, automatizada en cada paso por separado, permite la evaluación previa del análisis. Después de evaluar o cuantificar la placa en base a efectos, se puede aplicar la MS altamente específica. La generación de un espectro de masas sólo para aquellas zonas de interés o sólo para aquellos resultados previos positivos, reduce sustancialmente los gastos para muchas aplicaciones. Pero hay otras ventajas, como el uso de la ionización por electrospray (ESI); la fase móvil puede ser seleccionada independientemente del MS, porque el medio evapora luego del paso cromatográfico.

El uso de las técnicas de acoplamiento depende de las preferencias del usuario. Existen varios acercamientos que permiten la captación directa del espectro MS, a veces dentro de segundos, de una zona de HPTLC a presión atmosférica (ver figura 4), por ejemplo, por desorción e ionización por electrospray (DESI) [12], análisis directo en tiempo real (DART) [13], desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) [14,15], o ESI utilizando un extractor en-línea [16-20], método con el cual se obtuvo un límite de detección (LODs) en el rango de pocos picogramos (pg) por banda [21].

## Conclusión

Es impresionante que la cromatografía planar pueda solucionar tareas difíciles de un modo fácil. Una matriz compleja puede dejarse en la zona de arranque de la placa, permitiendo una preparación mínima de la muestra, y aun así no cau-

sa una contaminación a la entrada de la columna. Derivatizaciones selectivas solucionan tareas analíticas, que de otra forma solamente se podrían resolver por HPLC-MS o detectores especiales. El papel de la TLC como una herramienta cualitativa debe de ser reconsiderada. Utilizando instrumentación apropiada, el método es cuantitativo. El antiguo proverbio, una imagen vale mil palabras, vale también para la potencia de las comparaciones de las imágenes digitalizadas en HPTLC, las que ahora también pueden ser usadas para una cuantificación rápida. Esta técnica puede ser validada para cumplir los requerimientos de un análisis fiable en los límites de detección exigidos en muchas aplicaciones. Cumple también con los entornos regulados tales como cGMP y cGLP. Habría que sacar la cromatografía planar del basurero de la historia y considerarla como una técnica de gran potencial.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Iris Klaiber y Jens Pfannstiel, Life Science Service Center de la Universidad de Hohenheim, por el apoyo en el uso del LTQ Orbitrap XL.

## Referencias

- [1] N.A. Izmailov and M.S. Shraiber, *Farmatsiya*, 3, 1-7 (1938).
- [2] G. Morlock and M.H. Vega, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 20, 411-417 (2007).
- [3] G.E. Morlock and S. Prabha, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7217-7223 (2007).
- [4] A. Wasik J. McCourt and M. Buchgraber, *Journal of Chromatography, A*, 1157, 187-196 (2007).

- [5] K. Hatano and A. Nakao, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 43, 267-272 (2002).
- [6] M. Heinz, P. Schreiter and M. Baumann, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 4, 166-170 (2008).
- [7] G. Morlock and W. Schwack, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 20, 399-406 (2008).
- [8] K. Ferenczi-Fodor, Z. Vegh and B. Renger, *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 25, 778-789 (2006).
- [9] M.J.F. Suter, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 1957-1958 (2008).
- [10] C. Hohl, U. Hauri and V. Baumgartner, *CBS CAMAG Bibliographic Service*, 100, 2-5 (2008).
- [11] A. Klöppel, W. Gasse, F. Brümmer, G. Morlock, *J. Planar Chromatogr.* 21 (2008) in print.
- [12] G.J. Van Berkel, B.A. Tomkins and V. Kertesz, *Analytical Chemistry*, 79, 2778-2789 (2007).
- [13] G. Morlock and Y. Ueda, *Journal of Chromatography, A*, 1143, 243-251 (2007).
- [14] K. Dreisewerd et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17, 139-150 (2006).
- [15] B. Fuchs et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 827-834 (2007).
- [16] A. Alpmann and G. Morlock, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1543-1551 (2006).
- [17] M. Aranda and G. Morlock, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1297-1303 (2007).
- [18] H. Luftmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 964-968 (2004).
- [19] H. Luftmann M. Aranda, and G. Morlock, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 3772-3776 (2007).
- [20] G. Morlock and W. Schwack, *CAMAG Bibliogr. Service CBS* 96, 11-13 (2006).
- [21] U. Jautz and G. Morlock, *Journal of Chromatography, A*, 1128, 244-250 (2006).

## Camag, Suiza

Anote el

Dr. Gertrud E. Morlock, Prof. Dr. Wolfgang Schwack  
Instituto de Química de Alimentos, Univ. de Hohenheim, Alemania

**Nota del editor:** Este artículo fue publicado originalmente en inglés en la edición de Julio 2008 por LCGC Europe [www.lcgceurope.com](http://www.lcgceurope.com).