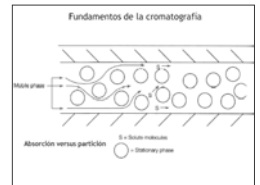


SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ **Conceptos generales.**
■ **Clasificación de los métodos cromatográficos.**
■ **Separación cromatográfica**
■ **Esquema básico de un cromatógrafo**
■ **Cromatografía líquida de alta resolución. HPLC.**
■ **Cromatografía de gases**

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **Cromatografía:** técnica de separación en la cual, los componentes de la muestra, se distribuyen entre dos fases de diferente naturaleza, como consecuencia de la variación de velocidad que se establece al ser arrastrados por una fase móvil, líquida o gaseosa, a través de una fase estacionaria, sólida o líquida.



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- Las fases cromatográficas son dos:
- *La fase móvil: que fluye a través de una fase estacionaria, arrastrando con ella a los compuestos de la mezcla.
- *La fase estacionaria: en la cual están retenidos los componentes de la muestra, y a través de la cual fluye la fase móvil arrastrando a los mismos.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

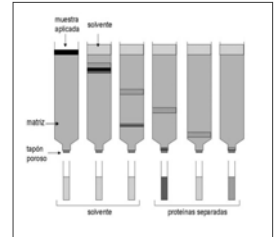
- La cromatografía fue originalmente descrita por Tswett en 1906
- Ideó un método para separar pigmentos de las plantas utilizando un tubo de vidrio lleno de CaCO_3
- Después de añadir un extracto de las plantas y lavarlo con un disolvente orgánico observó que se separaban diferentes bandas coloreadas en el interior de la columna.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- Los componentes de la muestras se distribuyen en el interior del lecho cromatográfico al ser arrastrados por la fase móvil
- Las especies individuales quedan retenidas en la fase estacionaria en función de las interacciones que tienen lugar tales como:
 - Adsorción superficial
 - Solubilidad
 - carga

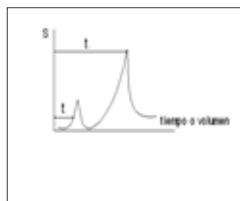
SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- La aplicación práctica de la cromatografía consiste en hacer pasar la fase móvil a través de la columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria, donde están retenidos los solutos.



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **tiempo de retención** t_R : tiempo que tarda cada sustancia en abandonar el sistema cromatográfico. Esta retención se ejerce en función de las características moleculares de cada compuesto.
- **Elución**: proceso por el cual todos los solutos terminan por abandonar la columna



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- el proceso cromatográfico depende de una constante de equilibrio:

$$K_D = \frac{C_s}{C_m} = \frac{n_s / V_s}{n_m / V_m} = \frac{n_s}{n_m} \cdot \frac{V_m}{V_s} = k' \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R = es el tiempo de retención del soluto.
 t_0 = es el tiempo de retención de la fase móvil, o tiempo que tarda la fase móvil en atravesar la columna cromatográfica.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

TIPO	F. ESTACIONARI	F. MÓVIL	INTERACCION
Adsorción	Sólido	líquido-gas	fuerzas V.W.
Cambio ionico	Resina	Líquido	f.elect.
Exclusión	Gel	líquido	tamaño part.
Afinidad	Sólido	líquido	interac bio.
Partición	Líquido	líquido-gas	solubilidad

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- También se pueden clasificar en función de la forma en la que se lleve a cabo:
- a) PLANA: La fase estacionaria se coloca sobre una superficie plana
- b) COLUMNA: se utiliza un tubo de vidrio cilíndrico como soporte de la fase estacionaria y se hace pasar a través de ella la fase móvil.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

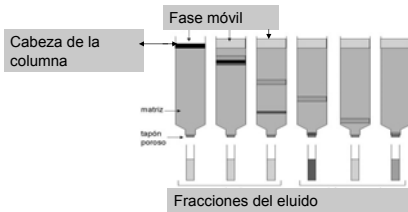
- En cromatografía líquida podemos distinguir dos modalidades básicas:
- Cromatografía en fase normal: fase móvil no polar y la fase estacionaria es polar (gel de sílice)
- Cromatografía en fase invertida: fase móvil de naturaleza polar y fase la estacionaria no polar (cadena hidrocarbonada que puede ser :
 - *Cadena larga: C-18
 - *Cadena intermedia: C-8
 - *Cadena corta: C-2

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- También en cromatografía de partición hay que establecer otra distinción según sea la retención de la fase estacionaria líquida sobre el sólido soporte:
- Convencional o clásica cuando la fase estacionaria líquida está retenida por adsorción sobre el sólido soporte
- Fases ligadas cuando la fase estacionaria líquida está retenida por un enlace químico sobre el sólido soporte.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ Cromatografía Clásica:



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- Modalidad Clásica.
- Es un proceso lento
- Es un proceso poco eficaz tanto por la capacidad de separación, como por el número de solutos que se pueden separar.
- Es una técnica laboriosa
- No proporciona directamente la composición de las fracciones
- Solo se pueden separar muestras del orden de gramos a mgr.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ Cromatografía Moderna:

- Aumentar la eficacia de la separación
- Se reduce el tiempo de separación
- Permite acoplar un sistema de detección continuo a la salida de la columna, (on line)
- Permite separar sustancias que estén en el orden de los μg

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- Hay dos teorías para explicar el proceso cromatográfico:
 1. Teoría clásica o estática
 2. Teoría cinética o dinámica
- Teoría clásica o estática: propuesta en 1941, en la cual se asimila la columna cromatográfica con una columna de destilación.
- Teoría cinética o dinámica: propuesta en 1956 por Van Deemter, que considera el proceso dinámico de la separación.

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- Teoría clásica o estática: se considera un sistema estático en equilibrio, en el cual el soluto recorre la columna mediante una serie de equilibrios, cada uno de los cuales se alcanza, en toda su extensión, en un segmento o porción de la columna, llamado plato teórico.
- se supone que la columna cromatográfica está dividida en una serie de segmentos o platos teóricos, donde se producen un equilibrio de distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria.



SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- Dado que la separación se produce como consecuencia de estas transferencias, la eficacia de la columna dependerá del número de equilibrios que tiene lugar en el interior de la columna durante la elución, es decir, depende del número de platos teóricos que tenga la columna, N.
- Cuanto más estrecho sea el plato teórico, mayor número de ellos habrá para una longitud L de columna, por tanto, la eficacia de la columna será inversamente proporcional a la altura equivalente del plato teórico:

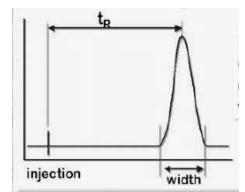
$$\blacksquare AEPT = H = L/N$$

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- Cuando los solutos viajan a través de la columna los picos se ensanchan, y mas cuanto mas larga es la columna, por tanto para determinar si una separación es posible tenemos que tener en cuenta dos factores:
 1. La diferencia en la velocidad de migración de los solutos, que determina la posición de los picos en el cromatograma.
 2. La velocidad finita que tarda en alcanzarse el equilibrio en cada plato teórico, que traerá el ensanchamiento en las bandas del cromatograma.

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- TEORÍA CINÉTICA O DINÁMICA
- La eficacia de la columna para separar los componentes de la muestra vendrá dada por dos factores:
 1. La diferencia de la velocidad de migración de los solutos de la mezcla, que origina la separación física entre los picos
 2. La velocidad que tarda en alcanzarse el equilibrio en cada plato teórico que traerá consigo un ensanchamiento del pico cromatográfico.



$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- El ensanchamiento de la banda depende de la velocidad de transferencia finita del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria en cada plato teórico. Este ensanchamiento se debe a un avance diferente de las moléculas de un mismo soluto a través de la columna.
- No todas las moléculas de un mismo soluto fluyen de igual forma en el mismo instante de tiempo, es decir, no presentan un comportamiento ideal. Este comportamiento no ideal se debe a tres factores:
 1. difusión en remolino.
 2. difusión longitudinal.
 3. Resistencia a la transferencia de materia.

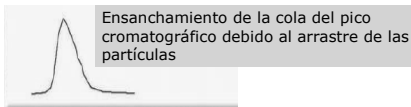
SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **DIFUSIÓN EN REMOLINO:** Se debe a los distintos caminos que toman las moléculas del soluto al atravesar la fase estacionaria. Aquellas partículas de soluto que atraviesen canales más amplios, viajarán más rápido con la fase móvil, y aquellas que vayan por canales más estrechos viajarán más lentamente.



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **DIFUSIÓN LONGITUDINAL** Este es un término más importante en cromatografía de gases. Se debe a que las moléculas del soluto se mueven en distintas direcciones en la fase estacionaria debido a la porosidad de las partículas que la forman. Esto hace que algunas moléculas del soluto salgan retrasadas de la columna respecto a la mayoría



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

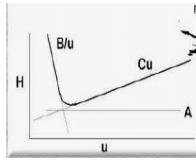
- **RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE MATERIA:** Se debe a que al pasar la fase móvil por un canal entre las partículas de la fase estacionaria, no todas las moléculas del soluto se transfieren a igual velocidad entre la fase móvil y la fase estacionaria en cada plato teórico
- Si el comportamiento fuese ideal:

$$C_s = K_D \cdot C_m$$

$$C_s = K_D \cdot C_m \cdot x f(t)$$

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- Podemos agrupar estos efectos en una ecuación simple, que es la ecuación de Van Deemter:
- $H = A + B/u + C/u$
- Donde
- H: altura equivalente del plato teórico
- A: DIFUSIÓN EN REMOLINO
- B: DIFUSIÓN LONGITUDINAL
- C: RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE MATERIA
- U : velocidad de la fase móvil



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

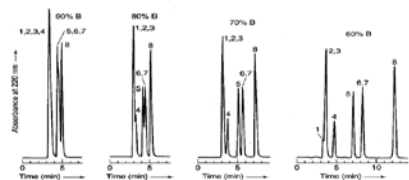
- Separación de una mezcla:
- resolución de una columna cromatográfica
- capacidad que presenta para separar dos componentes de una muestra, no siendo muy diferentes las propiedades intrínsecas de los mismos
- dos posibilidades:
 - 1.- modalidad isocrática
 - 2.- modalidad no isocrática.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **modalidad isocrática:** condiciones experimentales constantes, lo que significa composición constante de la fase móvil (polaridad constante) lo que equivale a temperatura constante en cromatografía de gases (separación isoterma)
- **En modalidad no isocrática:** variación gradual durante el proceso cromatográfico
- Dos parámetros fundamentales: la *composición de la fase móvil* (c. líquida) y la *temperatura de la columna* (c.gases). Vamos a representar estos dos parámetros por la letra griega φ .

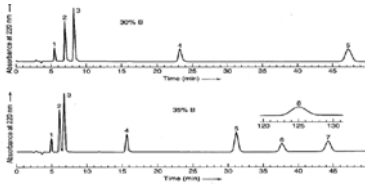
SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- valores de φ altos \implies favorece el paso de los solutos a la fase móvil, con lo que se obtiene un cromatograma con picos fuertemente solapados, que tiene un factor de retención o capacidad bajos.



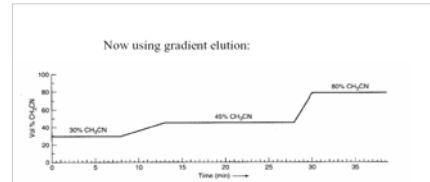
SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- valores de φ bajos \Rightarrow los solutos con factores de retención bajos se obtienen bien separados, pero los solutos fuertemente retenidos dan lugar a picos achatados y mal definidos.



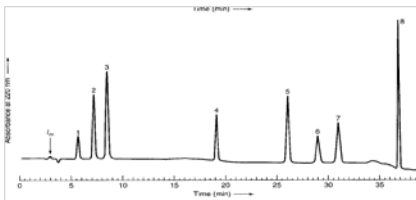
SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **En modalidad no isocrática:** variación gradual durante el proceso cromatográfico del parámetro φ . Cuando se trabaja en esta modalidad, se consigue una mejor resolución de los picos cromatográficos.

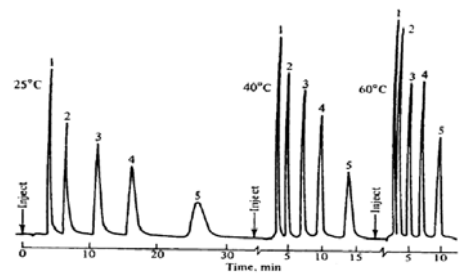


SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- se varían las condiciones de φ para que los picos que tiene un menor factor de capacidad, salgan en un tiempo adecuado que permita su separación. En este caso se dice que se trabaja en gradiente.



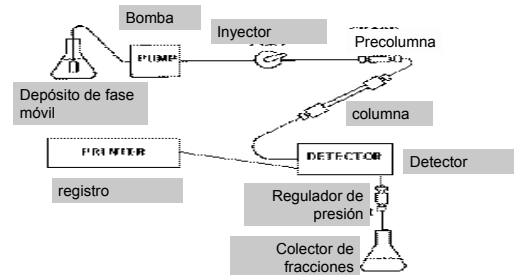
SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA



SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- También para mejorar la separación cromatográfica:
- Reacciones de derivación pre-columna: someter a los solutos a una serie de reacción para modificar las características intrínsecas de los mismos de manera que se aumentan las diferencias entre ellos y por tanto se consigue aumentar la resolución del sistema.
- Mediante técnicas de separación previas a la columna: acoplar al sistema una técnica de separación previa puede ser una extracción o cromatografía de preparación.
- Mediante reacciones de derivatización post-columna: que consiste en aplicar algún tipo de reacción selectiva a algunos componentes de la muestra y sean sensibles al detector.

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA



SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- **Recipiente de la fase móvil:** de vidrio o plástico
- capacidad de ½ o 2 litros.
- **Fase móvil:**
- Fase normal, (fase estacionaria polar y fase móvil no polar), los disolventes más polares eluyen rápidamente a los solutos que tengan mayor tendencia a quedar retenidos.
- En fase invertida, cuanto más polar sea el disolvente, menor es su poder de elusión, porque disuelve menos a los solutos no polares
- A la hora de separar se debe elegir, la fase móvil de manera que se consiga la mejor separación de los solutos en un tiempo de análisis adecuado.

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- **La bomba:**
- ofrecer un amplio rango de presiones de trabajo
- poder utilizarse con distintos caudales de fase móvil,
- originar un flujo de fase móvil libre de pulsaciones,
- ser químicamente inertes, no reaccionar con la fase móvil ni con los solutos, su interior es de acero inoxidable o de teflón

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ SISTEMA DE INYECCIÓN

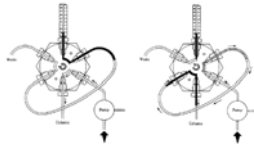
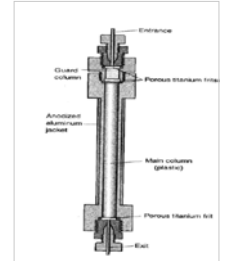
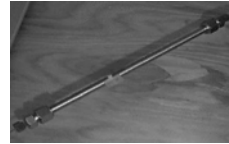
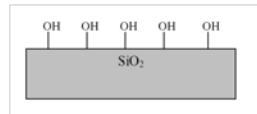


Figure 21.10. Diagrams showing sample injection into HPLC. The arrows indicate the path of solvent flow. Courtesy of Fisher Scientific.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ DETECTOR:

- Las características que debe poseer un detector son:
- Altamente sensible a bajas concentraciones de soluto
- Debe ser universal
- Alto rango de linealidad en la respuesta

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- Todos los detectores producen una señal que se relaciona con la concentración de las especies en disolución
- El t_R nos sirve desde el punto de vista cualitativo para determinar la presencia de una determinada sustancia en la muestra
- Se utiliza un estándar interno para comparar los tiempos de retención y la respuesta del detector con la concentración



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

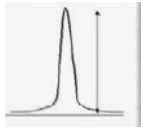
- En algunos casos, podemos suponer que la altura del pico es proporcional a la concentración

Ventajas:

Rápidez de cálculo;
simplicidad

Desventaja:

Reproducibilidad (la altura es mas variable que el área)



SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

LC Detector	Commercially Available	Mass LOD (commercial detectors)*	Mass LOD (state of the art) [†]
Absorbance	Yes [‡]	100 pg-1 ng	1 pg
Fluorescence	Yes [‡]	1-10 pg	10 fg
Electrochemical	Yes [‡]	10 pg-1 ng	100 fg
Refractive index	Yes	100 ng-1 µg	10 ng
Conductivity	Yes	500 pg-1 ng	500 pg
Mass spectrometry	Yes [‡]	100 pg-1 ng	1 pg
FT-IR	Yes [‡]	1 µg	100 ng
Light scattering [§]	Yes	10 µg	500 ng
Optical activity	No	—	1 ng
Element selective	No	—	10 ng
Photoionization	No	—	1 pg-1 ng

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

■ Cromatografía líquida en columna

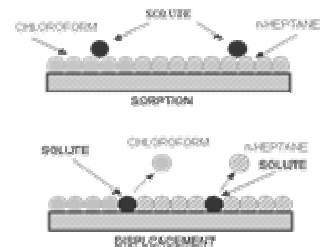
■ La fase estacionaria

- Sólidos muy porosos con capacidad adsorbente: Gel de sílice (SiO₂); Alúmina (Al₂O₃)

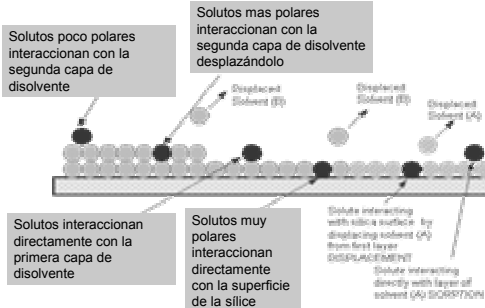


- La superficie del gel de sílice interacciona con los compuestos orgánicos mediante interacciones de **carácter polar**.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA



SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA



SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- La sílice cumple dos misiones en cromatografía de líquidos:
- Como **fase estacionaria activa** en cromatografía de adsorción. En este caso, se establece una competencia entre las moléculas del soluto y las moléculas de la fase móvil por ocupar los sitios activos de la superficie de la sílice (grupos silanol).
- Puede actuar como **sólido soporte de la fase estacionaria líquida en la cromatografía de partición**. En este caso, la porosidad en la superficie de la sílice retiene la fase estacionaria líquida.

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- **fase móvil**: la fase móvil es una mezcla de disolventes: **ELUYENTE**
- la fase móvil fluye arrastrando los compuestos que están retenidos en la fase estacionaria.
- En cromatografía de líquidos la naturaleza del eluyente tiene una gran importancia
- **Eluyentes polares**: Arrastran más eficazmente los compuestos más retenidos en la fase estacionaria.
- Arrastran más rápidamente a los compuestos.
- **Eluyentes menos polares**: Arrastran muy lentamente a los compuestos.

SEPARACIONES POR CROMATOGRFÍA

- La serie eluotrópica: Mayor poder de elución
- hexano < tolueno < cloroformo < diclorometano < acetona < acetato de etilo < etanol < metanol < H₂O

Hexano: Acetato de etilo, 100: 1

Hexano: Acetato de etilo, 20: 1

Hexano: Acetato de etilo, 10: 1

Hexano: Acetato de etilo, 1: 1

Mayor poder de elución ↓

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **Cromatografía de partición líquido-líquido.**
- **fase móvil es un líquido, y la fase estacionaria es un líquido retenido sobre un sólido soporte.**
- Se puede llevar a cabo en la fase normal cuando la fase móvil es no polar y la fase estacionaria es fuertemente polar, o en las fases invertidas (fase móvil polar y la fase estacionaria disolvente no polar). Este tipo de cromatografía en fase inversa es la que tiene más aplicación ya que muchas muestras de interés actual tienen naturaleza hidrofílica.

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- La fase estacionaria líquidas usadas, en fase normal son disolventes polares, que forman enlaces por puente de hidrógeno, con los grupos silanol de la superficie de la sílice.
- *En la modalidad invertida, se usan fases móviles polares, y fase estacionaria no polares como hidrocarburos.
- Mayor aplicación: cromatografía de partición de fases ligadas en la que existe un anclaje químico entre el sólido soporte y la fase estacionaria líquida.
- Como fase estacionaria líquida se utilizan cadenas hidrocarbonadas que pueden ser:
 - *Cadena larga: C-18
 - *Cadena intermedia: C-8
 - *Cadena corta: C-2

SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA

- **Ventajas**
- Gran estabilidad de la fase estacionaria
- No existen fuerzas de retención elevada:
- Permite una velocidad de muestreo alto.
- No se producen procesos de retención irreversibles y por tanto, no hay deterioro de la columna.
- El sistema cromatográfico es simple: no se necesitan precolumna para equilibrar las fases.
- Tiene un gran campo de aplicación:
- Además permite la separación de compuestos con matrices acuosas, permitiendo su aplicación a campos de gran interés como: químico, farmacológicos, industrial, medioambiental..
-