



**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS, TECNOLOGIAS E
INGENIERIAS**

**CROMATOGRAFIA
GLORIA MARIA DORIA HERRERA**

Medellín, diciembre de 2016






ASPECTOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL Y VERSIONAMIENTO

Este contenido didáctico corresponde a la primera versión diseñado en el año 2012 por la Químico y Magister en Ciencias-Química Gloria María Doria Herrera del curso, la cual presenta una primera actualización en diciembre de 2016 por la Químico Ambiental, MsC (c) Marcela Andrea Zambrano. La primera actualización corresponde a actualización de imágenes y estructura del mismo.

Este documento se puede copiar, distribuir y comunicar públicamente bajo las condiciones siguientes:

- *Reconocimiento.* Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - *No comercial.* No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - *Sin obras derivadas.* No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
 - Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los *términos de la licencia* de esta obra.
 - alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor
 - Nada en esta menoscaba o restringe los derechos morales del autor.
- 



INTRODUCCIÓN

La Cromatografía es una de las técnicas analíticas más antiguas y eficaces que se han utilizado en los últimos tiempos para separación de mezclas debido a su versatilidad y eficiencia en el tiempo.

La Cromatografía es considerada por diversos autores de libros especializados¹ en el tema, que esta técnica tiene la propiedad de separar moléculas en función de polaridad, de sus cargas moleculares, tamaños, potencial redox, constantes de disociación o si bien es cierto podría decir la estereoquímica de la molécula de interés, lo cual permite al analista tener una gama amplia de opciones que permite escoger cual es la más adecuada según sean las condiciones de trabajo.

A pesar de que varios autores dan crédito a distintos científicos que han ganado premios nobel sobre el tema, el botánico Tswett fue quien realizó los inicios de esta técnica, a pesar de no tener todos los conceptos claramente definidos sabía sobre la potencialidad de la técnica y hasta hoy es considerado el padre de la Cromatografía.

A través de la historia la técnica ha evolucionado mucho desde análisis con características bidimensionales hasta el uso de la misma para realización separaciones de compuestos de carácter bioquímico, por ejemplo en el análisis de proteínas, ya que a través de la separación hoy se pueden separar y determinar sus componentes básicos y decir con cierta certeza y veracidad el tipo de aminoácidos que lo conforma; estos importantes hallazgos han hecho que la Cromatografía sean una herramienta útil para la industria y para la humanidad.




TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
UNIDAD 1. INTRODUCCIÓN GENERAL A LA CROMATOGRAFIA	8
CAPITULO 1: DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA	11
Lección 1: Definición de la Cromatografía	11
Lección 2: Historia de la Cromatografía.	12
Lección 3: Clasificación de los métodos cromatográficos	13
Lección 4: Cromatografía de elución por Columna.	16
CAPITULO 2: VELOCIDAD DE MIGRACIÓN DE LOS SOLUTOS	20
Lección 1: Constantes de distribución.	20
Lección 2: Tiempos de retención.	21
Lección 3: Relación entre el tiempo de retención y el coeficiente de distribución	22
Lección 4: Factor de Retención y Factor de Selectividad.	23
Lección 5: Ensanchamiento de Banda: Ecuación de Van Deemter.	24
CAPITULO 3: OPTIMIZACIÓN DE LA EFICACIA DE LA COLUMNA	28
Lección 1: Resolución de la columna	28
Lección 2: Influencia de los factores de retención y sensibilidad sobre la resolución.	30
Lección 3: Efecto de la resolución sobre el tiempo de retención.	31
Lección 4: Variables q afectan la eficacia de la columna.	31
Lección 5: Aplicaciones de la Cromatografía para el análisis cualitativo y cuantitativo.	32
UNIDAD 2. APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFIA.	33
CAPITULO 4: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y EN CAPA FINA.	36
Lección 1: Generalidades de las técnicas	36
Lección 2: Métodos de detección (visualización)	40

Lección 3: Metodologías usadas para la Cromatografía en papel	40
Lección 4: Cromatografía en capa fina: preparación de placas	41
Lección 5: Aplicaciones de la cromatografía en papel y en capa fina.	41
CAPITULO 5: CROMATOGRAFIA DE GASES	43
Lección 1: Columnas y fases estacionarias de la cromatografía de gases	43
Lección 2: Instrumentación de la Cromatografía GC	46
Lección 3: Aplicaciones de la Cromatografía de Gases	47
Lección 4: Cromatografía Gas- Solido.....	48
Lección 5: Aplicaciones de la Cromatografía Gas- solido: Polímeros y tamices	48
CAPITULO 6: CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	50
Lección 1: Generalidades.....	50
Lección 2: Efectos del tamaño de partícula.....	51
Lección 3: Ensanchamiento de banda y Efectos del tamaño de muestra.	51
Lección 4: Instrumentación para la Cromatografía de Alta Resolución (HPLC)	51
Lección 5: Cromatografía de Reparto.....	55
UNIDAD 3. TECNICAS CROMATOGRAFICAS ESPECÍFICAS	56
CAPITULO 7: CROMATOGRAFIA IONICA	58
Lección 1: Generalidades.....	58
Lección 2: Equilibrios en el intercambio iónico	60
Lección 3: Rellenos de intercambio iónico	60
Lección 4: Aplicaciones.....	61
Lección 5: Cromatografía de exclusión de iones	62
CAPITULO 8: CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	63
Lección 1: Generalidades.....	63

Lección 2: Instrumentación y variables de operación	65
Lección 3: Elección del Fluido Supercrítico.....	66
Lección 4: Extracciones independientes y en línea.	67
Lección 5: Aplicaciones Relevantes del SFE	67
CAPITULO 9: ELECTROFORESIS CAPILAR	69
Lección 1: Fundamentos de las separaciones electroforéticas	69
Lección 2: Velocidades de migración y alturas de plato	70
Lección 3: Flujo electrosmótico.....	71
Lección 4: Instrumentación	71
Lección 5: Aplicaciones de la electroforesis Capilar.....	74
FUENTES DOCUMENTALES	75

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos por características de Fase Estacionaria.....	14
Tabla 2. Clasificación de los métodos cromatográficos por naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria	15
Tabla 3. Fases estacionarias comunes en Cromatografía de Gases.	45
Tabla 4. Detectores para Electroforesis Capilar	74

LISTADO DE GRÁFICOS Y FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de la separación de una mezcla de compuestos por elución de columna.	17
Figura 2. Picos Cromatográficos.	18
Figura 3. Efecto en las velocidades de migración. Consultado en el texto Analisis Instrumental, Skoog et. al., 2001.....	19
Figura 4. Cromatograma de un solo analito.....	21
Figura 5. Factor de retención y selectividad de una mezcla de compuestos	24
Figura 6. Resolución en una mezcla de compuestos	29
Figura 7. Siembra de muestra en papel.	37
Figura 8. Caracterización de la cromatografía en papel en forma ascendente y descendente	38
Figura 9. Cromatografía en Capa Fina, la placa esta inclinada, la muestra sembrada en el extremo y el disolvente, esto se da en forma descendente	39
Figura 10. Componentes del Cromatógrafo de Gases	46
Figura 11. Sistema de un Cromatógrafo HPLC.....	52
Figura 12. Estructura de resina de intercambio	61
Figura 13. Diagrama de fases donde se evidencia la presencia de los fluidos supercríticos.....	64
Figura 14. Esquema del equipo del Cromatografía de Fluidos Supercríticos	65
Figura 15. Esquema del equipo del Cromatografía de Electroforesis Capilar	71

UNIDAD 1. INTRODUCCIÓN GENERAL A LA CROMATOGRAFIA

<p>Introducción</p>	<p>En la primera Unidad se hará una descripción general de los fundamentos de la técnica tales como definición, historia, clasificación y aplicaciones más importantes de la técnica, también se discutirá velocidad de migración de los solutos, del Ensanchamiento de Banda: Ecuación de Van Deemter y de la Optimización de la Eficacia de la Columna.</p>
<p>Justificación</p>	<p>Las nociones generales sobre Cromatografía son de gran relevancia porque posiciona al estudiante en lo que hasta se ha hecho en el tema y cuáles fueron sus comienzos y porque es conceptualizado como una técnica eficaz de separación de mezclas y macromoléculas en técnicas más finas de trabajo. Cuando se trata un poco de la clasificación, se puede observar que es todas ofrecen ventajas, sin embargo, sus limitantes se asocian a condiciones inherentes al mismo proceso, por lo que es una habilidad del analista detectar cual tipo de Cromatografía brinda mayor información en el menor tiempo con buena resolución</p>
<p>Intencionalidades Formativas</p>	<p>Esta primera unidad del curso de cromatografía tiene como propósito identificar los principios y nociones de la cromatografía que permitan a los estudiantes tener un posicionamiento y contextualización inicial del tema.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>A. Determinar los conocimientos previos que posee el estudiante sobre los fundamentos de la cromatografía.</p> <p>B. Proporcionar un sentido crítico sobre los conceptos y las aplicaciones frente a problemáticas reales.</p>



	<p>C. Conocer la historia y avances que se han adquirido relacionados con la Cromatografía.</p> <p>D. Reconocer sobre las variables influyentes en la técnica y desarrollar la habilidad de manejarlas en el proceso practico.</p> <p>META DE APRENDIZAJE</p> <p>A. Establecer un diagnóstico de los conceptos previos de los estudiantes para generar actividades que vayan acorde con las necesidades del grupo de trabajo y la generación de planes de mejora para el desarrollo de los contenidos.</p> <p>COMPETENCIAS</p> <p>A. El estudiante estará en capacidad de conceptualizar acerca de los fundamentos de la cromatografía con un sentido crítico y de gran impacto para su desempeño laboral.</p> <p>B. Discriminar según los tipos de cromatografía, cual es el más acertado acorde a las necesidades y herramientas con las que cuenta en el ámbito practico.</p>
<p>DENOMINACIÓN DE CAPÍTULOS</p>	<p>Capítulo 1: Descripción General de la Cromatografía Lección 1. Definición de la Cromatografía. Lección 2 Historia de la Cromatografía. Lección 3 Clasificación de los métodos cromatográficos. Lección 4. Cromatografía de elución por Columna. 4.1 Dilución del analito 4.2 Cromatogramas 4.3 Efecto de las velocidades de migración y del ensanchamiento</p> <p>Capítulo 2: Velocidad de migración de los solutos Lección 5. Constantes de distribución</p>



Lección 6. Tiempos de retención

Lección 7. Relación entre el tiempo de retención y el coeficiente de distribución

Lección 8. Factor de Retención y Factor de Selectividad

Lección 9. Ensanchamiento de Banda: Ecuación de Van Deemter

9.1 Forma de los picos cromatográficos

9.2 Métodos para la descripción de la eficacia de la columna

9.3 Variables cinéticas que influyen en el ensanchamiento de banda.

Capítulo 3: Optimización de la Eficacia de la Columna

Lección 14. Resolución de la columna.

Lección 15. Influencia de los factores de retención y sensibilidad sobre la resolución.

Lección 16. Efecto de la resolución sobre el tiempo de retención.

Lección 17. Variables q afectan la eficacia de la columna.

Lección 18. Aplicaciones de la Cromatografía para el análisis cualitativo y cuantitativo.

CAPITULO 1: DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA

Introducción

La Cromatografía es considerado un método de separación que tiene como objetivo la separación de mezclas y se ha convertido en uno de los métodos más usados para identificar y cuantificar compuestos según sea su naturaleza y se fundamenta en los equilibrios de concentración de compuestos presentes en dos fases no miscibles relacionadas entre fases móviles y estacionarias conduciendo esto a una separación, que hoy día es considerada una de las técnicas con mayor aplicación y sin duda una herramienta importante para el análisis químico.

Lección 1: Definición de la Cromatografía

La cromatografía es un procedimiento físico químico de separación por medio del cual se da la separación de mezclas tomando como principio los equilibrios de concentración, que permite separar los componentes de una mezcla en movimiento por adsorción o separación de estos componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por adsorción o separación diferencial de estos sobre una superficie estacionaria o inmóvil.

La Cromatografía parte del principio, en el que se tiene una **fase estacionaria** que usualmente esta inmovilizada sobre un soporte y de una **fase móvil** que se desplaza al contacto con la inicial, la diferencia de velocidades conduce a la separación de compuestos mezclados (Ronbinson, *et. al*, 2005).

Las propiedades críticas de los procesos cromatográficos son:

- Inmiscibilidad entre la fase móvil y la fase estacionaria. (Rouessac, *et. al*, 2000)
- Disposición por medio del cual una mezcla está depositada en un extremo de la fase estacionaria. (Ronbinson, *et. al*, 2005)
- Flujo de la fase móvil hacia el otro extremo de la fase móvil estacionaria
- Diferentes velocidades de relación de partición para cada componente de la mezcla y algunos ciclos durante el proceso de elución. (Ronbinson, *et. al*, 2005)

Por lo que su aplicabilidad trasciende en las barreras de las aplicaciones industriales hasta herramienta vital para la consolidación del proyecto genoma humano en la separación de macromoléculas.

Lección 2: Historia de la Cromatografía.

La palabra cromatografía viene del griego *chroma*: color, *graphos*: escritura, partiendo de la experiencia del botánico ruso Mikhail Tswett que entre los años 1903-1910 sobre las ventajas de la cromatografía y sus importantes publicaciones (Domínguez, 1975).

A pesar que los estudios realizados por Tswett no fueron de gran impacto debido a que las publicaciones de sus hallazgos no fueron revistas de carácter científicos, personajes como Willstatter químico de la época que si bien es cierto inicio una nueva faceta para el nacimiento de esta potencial técnica poco asertiva para los investigadores de la época gracias a los estudios iniciados con Tswett pudo lograr un premio nobel en Química en 1915 por sus amplios estudios sobre separación y purificación de la Clorofila. (Domínguez, 1975).

En 1931, Kuhn, Winsterstein y Lederer mostraron avances en la separación y estudios de los productos naturales (Domínguez, 1975). En 1938 Reichstein demostró la utilidad de la cromatografía líquida y Martin y Synge en 1941 realizaron estudios de separación de aminoácidos haciendo uso de la cromatografía en columna; más adelante en 1944 Martin, Conade y Gordon hablaron de los términos cromatografía en papel y en 1952 se otorgó a Martin y Synge el premio Nobel de Química por sus importantes hallazgos a través de estudios sobre esta técnica (Valpuesta, 2008). En 1956 Stahl muy interesado en la separación celular propuso el uso de un aplicador que le denominó Cromatografía de Capa Delgada que hasta en la actualidad es ampliamente usada por su versatilidad, de allí a la fecha se han dado grandes saltos en la Cromatografía, como es el uso de la cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de gases, electroforesis capilar y cromatografías bidimensional que se ampliaron en el desarrollo de este módulo.

Lección 3: Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se clasifican según la forma como la fase estacionaria (

Tabla 1) y la fase móvil (**Tabla 2**) se pone en contacto, es decir que si hablamos de cromatografía en columna, se hace uso de un tubo de vidrio estrecho que contiene la fase estacionaria a través de la cual pasa la fase móvil por presión (Skoog, 2001) dentro de estas características de clasificación las encontramos de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos por características de Fase Estacionaria.

TIPOS	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA
Cromatografía en papel	Líquido	Líquido (moléculas de agua contenidas en la celulosa del papel)
Cromatografía en capa fina	Líquido	Sólido
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de absorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Sólido

Fuente: Skoog *et. al.*, 2001

Otro tipo de clasificación se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de solutos entre las fases donde se relacionan las siguientes (Skoog *et. al.*, 2001)

Tabla 2. Clasificación de los métodos cromatográficos por naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria

TIPOS	METODO ESPECIFICO	FASE ESTACIONARIA	TIPO DE EQUILIBRIO
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA (Fase Móvil Líquida)	Líquido-Líquido (Reparto)	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos Inmiscibles
	Líquido fase Unida químicamente	Especies orgánica enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido Adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio Iónico	Resina de Intercambio Iónico	Intercambio Iónico
	Exclusión por tamaño	Líquidos en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
CROMATOGRAFÍA DE GASES (Fase Móvil: Gas)	Gas-Líquido	Líquido adsorbido en un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas- Fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada.
	Gas- sólido	Sólido	Adsorción
CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la

SUPERCRITICOS (SFC) Fase Móvil: Fluido Supercrítico)			superficie enlazada.
---	--	--	----------------------

Fuente: Skoog *et. al.*, 2001

Es de relevancia mencionar que la Cromatografía líquida se puede llevar a cabo en columnas o superficies planas y la cromatografía gaseosa y la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna (Skoog *et. al.*, 2001).

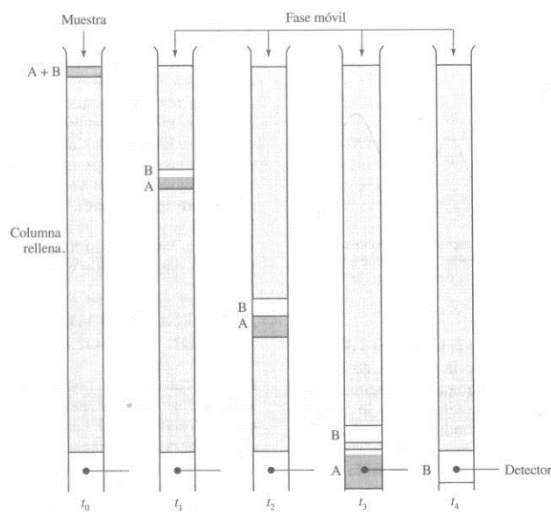
Lección 4: Cromatografía de elución por Columna.

Como se había mencionado con anterioridad, la Cromatografía en columna se emplea un tubo estrecho en donde está contenido la fase móvil y por presión se da la migración y separación de la muestra que deseamos separar, para la realización de esta actividad se siguen un número de pasos:

1. Se inmoviliza en una columna un sólido finamente dividido llamado Fase estacionaria (Rouessac, *et. al.*, 2000).
2. Se coloca en la parte superior de la Columna un pequeño volumen de muestra que hay que separar, se denomina tiempo cero (t_0) (Skoog *et. al.*, 2001).
3. Se fuerza a la mezcla disuelta a través de la fase móvil, a atravesar la columna de arriba abajo para arrastrar los diversos constituyentes (Rouessac, *et. al.*, 2000); la introducción de la fase móvil hace que una parte avance por la columna, donde tiene un posterior reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de la fase estacionaria a las que se les denomina (t_1) (Skoog *et. al.*, 2001). En esta etapa, se establece un equilibrio entre el soluto adsorbido en la fase estacionaria y el disolvente eluyente que fluye por la columna. Debido a que cada uno de los componentes de una mezcla establecerá interacciones diferentes

con la fase estacionaria y la móvil, serán transportados a diferentes velocidades y se conseguirá su separación.

Figura 1. Diagrama de la separación de una mezcla de compuestos por elución de columna.



Fuente: Skoog *et. al.*, 2001

En la **Figura 1** se muestra la separación de una mezcla A+B en donde se relaciona con el factor tiempo, estas correlaciones permiten tener información acerca de las velocidades de migración de los componentes en cuestión.

4.1 Dilución del analito

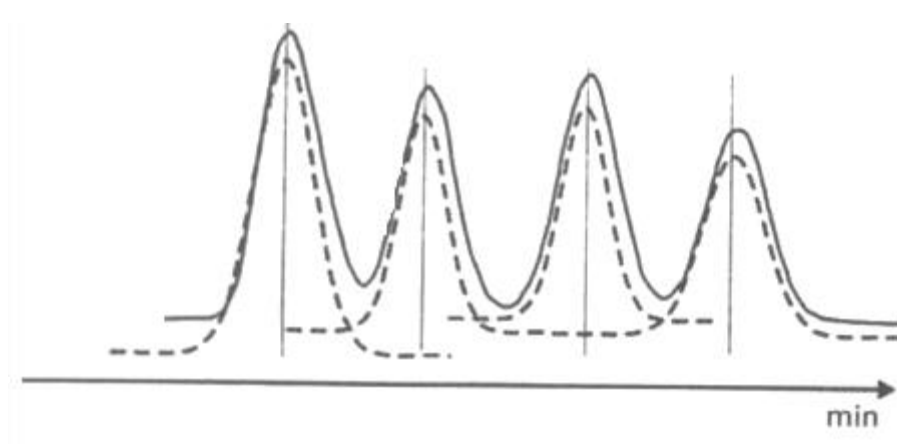
La polaridad del eluyente afecta las velocidades relativas con las que los diferentes componentes de la mezcla se mueven en la columna. Los disolventes polares compiten más eficientemente con las moléculas polares de una mezcla por los lugares polares del adsorbente. Por lo tanto, un disolvente polar desplazará las moléculas, incluyendo las más polares, rápidamente a través de la columna. Si el disolvente es muy polar la elución será muy rápida y generalmente habrá poca separación de los componentes de la mezcla. Si por el contrario el disolvente es muy apolar, no eluirán los compuestos de la columna. Por lo tanto, la elección del eluyente es crucial

para el éxito de la cromatografía en columna. A menudo se utiliza un gradiente creciente de polaridad para la elución. La cromatografía en columna se utiliza para determinar y elegir el sistema solvente adecuado para cada separación.

4.2 Cromatogramas

El cromatografía es una imagen que traduce visualmente una pantalla o en un papel la evolución en función del tiempo de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna (**Figura 2**). El tiempo (algunas veces el volumen) de elución se lleva al eje de las abscisas y la intensidad de la señal detectada al eje de las ordenadas. La *línea Base* corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto eluído. La separación se completa cuando el Cromatograma presenta tantos picos que vuelven a la línea base como compuestos hay en la mezcla de análisis. El área bajo los picos me permite cuantificar los componentes de la mezcla (Rouessac, *et.al*, 2000).

Figura 2. Picos Cromatográficos.

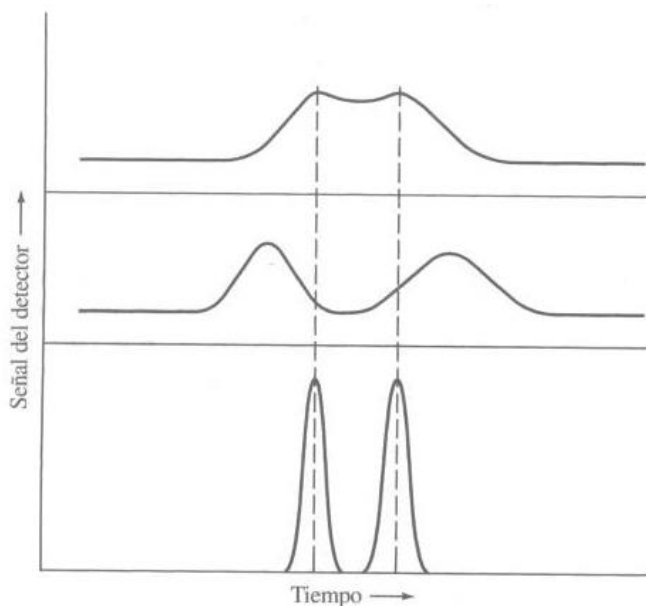


Fuente: Rouessac, *et. al*, 2000.

4.3 Efecto de las velocidades de migración y del ensanchamiento

Tomando como referente mezclas de compuestos de la figura 1, se observa que la especie b es más fuertemente retenida y por ello retrasa la migración, este puede traer como consecuencia la distancia evidente entre las dos bandas, pero puede traer consigo un ensanchamiento de ambas zonas lo que disminuye la eficacia de la separación, por lo que se considera que una disminución de las velocidades hace que en ensanchamiento se disminuya consecuentemente (**Figura 3**) (Skoog *et. al.*, 2001).

Figura 3. Efecto en las velocidades de migración.



Fuente: Skoog *et. al.*, 2001

CAPITULO 2: VELOCIDAD DE MIGRACIÓN DE LOS SOLUTOS

Introducción

Las velocidades de migración son consideradas variables importantes en el análisis cromatográficos ya que de allí depende la eficacia del procedimiento, entendida como la separación óptima de los componentes de una mezcla , por tanto en este capítulo se analizaran las variables influyentes en las velocidades de migración, considerando que las velocidades de migración están determinadas por las constantes de equilibrio anteriormente mencionadas en función de las especies distribuidas entre las fases móvil y estacionaria.

Lección 1: Constantes de distribución.

La constante de distribución también se denomina *Constante de distribución de Nerst*, se define como la constante de equilibrio obtenida de la transferencia de un analito en ambas fases, describiéndose de la siguiente manera (Skoog *et.al.*, 2001):

Ecuación 1.

$$A_{Móvil} \leftrightarrow A_{Estacionaria}$$

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

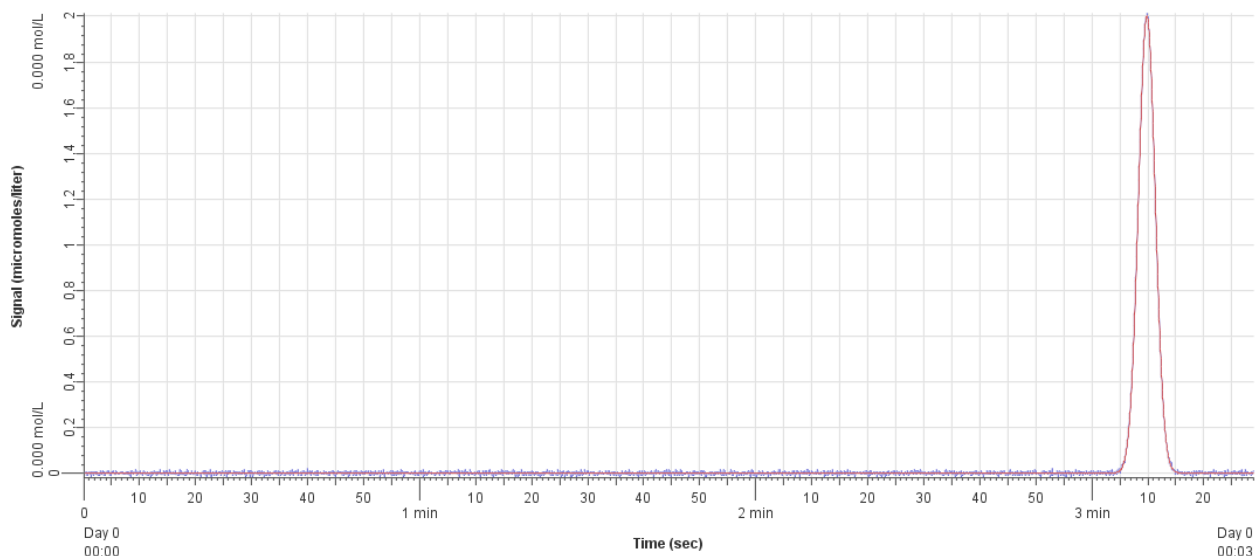
Ecuación 2.

Se entiende que la constante de distribución es la razón de los *coeficientes de distribución*, donde C_S es la concentración molar del soluto en la fase estacionaria y la C_M es la concentración molar en la fase móvil (Skoog *et. al.*, 2001).

Lección 2: Tiempos de retención

Se denomina tiempo de retención al tiempo transcurrido después de la inyección de la muestra hasta que el pico alcance su máxima área visualizado a través del Cromatograma, se simboliza t_R (**Figura 4**). En algunas ocasiones se observan en los Cromatogramas picos pequeños haciendo relación a especies que no fueron retenidas, a este tiempo se le denomina *tiempo muerto* simbolizado como t_M , la velocidad de migración de la especie no retenida coincide con la velocidad promedio de las moléculas de la fase móvil (Skoog *et. al.*, 2001).

Figura 4. Cromatograma de un solo analito



Fuente: HPLC Simulator., 2016

La velocidad lineal de migración del soluto promedio \bar{v} es:

Ecuación 3
$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

Donde L es la longitud de la columna que esta rellena, así mismo la velocidad lineal del movimiento de las moléculas en la fase móvil es:

Ecuación 4
$$u = \frac{L}{t_M}$$

Considerada como el tiempo necesario para que una molécula en la fase móvil pase a través de la columna.

Lección 3: Relación entre el tiempo de retención y el coeficiente de distribución

Para lograr la correlación del tiempo de retención y el coeficiente de distribución, se relaciona la velocidad de migración del soluto expresada como una fracción de la velocidad de la fase móvil:

Ecuación 5
$$\bar{v} = u \times \text{fracción de tiempo que el analito reside en la fase móvil}$$

Pero esta fracción se expresa como los moles del soluto en la fase móvil y los moles totales del soluto, obteniendo una ecuación con las siguientes características:

Ecuación 6
$$\bar{v} = u \times \frac{\text{moles de soluto en la fase móvil}}{\text{moles totales de soluto}}$$

Si se correlaciona los moles totales como el producto de la concentración molar y el volumen molar y se mira de manera similar para la fase estacionaria, se obtiene una ecuación de la siguiente magnitud:

Ecuación 7

$$\bar{v} = u \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + \frac{C_S V_S}{C_M V_M}}$$

Expresándolo en términos de constante de distribución obtenemos la siguiente ecuación:

Ecuación 8

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + \frac{K V_S}{V_M}}$$

Lección 4: Factor de Retención y Factor de Selectividad

El factor de retención o también llamado factor de Capacidad describe las velocidades de migración de los solutos en las columnas. Durante la migración de los compuestos en una columna, las cantidades permanecen constantes, su cociente denominado factor de Capacidad o de retención es fijo (Rouessac, *et. al*, 2000):

Ecuación 9.

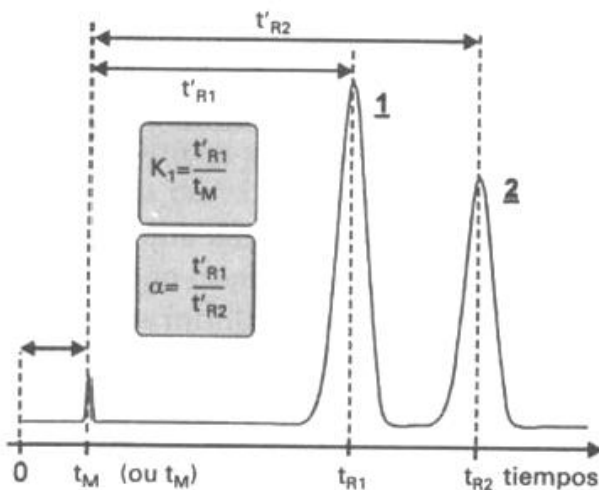
$$k = \frac{t_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}; \quad t_R = t_M(1+k)$$

Donde K es un parámetro que varía con las condiciones de operación, considera la capacidad de la columna para retener cada compuesto. Cuando los tiempos son menores que la unidad es demasiado rápido y no es posible calcular los tiempos de retención y cuando el factor es demasiado grande el tiempo de elusión es excesivo, por lo que se considera ideal factores de retención entre 2 y 10 (Skoog *et. al.*, 2001).

Por otro lado, *el factor de selectividad*, permite precisar las posiciones relativas de los picos adyacentes en un Cromatograma, es utilizado para

cuantificar el grado de mezcla de las sustancias contenidas en las bandas eluidas (**Figura 5**) (Rubinson, *et. al*, 2001)

Figura 5. Factor de retención y selectividad de una mezcla de compuestos



Fuente: Skoog *et. al.*, 2001.

También es importante señalar el factor de **resolución**, se define como una separación entre dos componentes, es considerada como la calidad de la separación. Numéricamente se define como:

Ecuación 10.

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_1 + w_2}$$

Lección 5: Ensanchamiento de Banda: Ecuación de Van Deemter

La primera ecuación cinética que explicaba la influencia de la velocidad de la fase móvil fue propuesta en 1956 por Van Deemter quien desarrollo columnas empaquetadas para Cromatografía gaseosa.

El modelo explica la variación de H, dependiente de la velocidad media lineal de la fase móvil v , es una medida de la relación entre el ancho de una banda y su tiempo de retención; también se puede interpretar como un reflejo del ancho de una zona cromatográfica por unidad de tiempo en la columna y es inversamente proporcional a la eficacia (Rubinson, *et. al*, 2001).

Ecuación 11.
$$H = A + \frac{B}{v} + C * v$$

5.1 Forma de los picos cromatográfico.

Un pico de elución ideal es un Cromatograma con un aspecto muy parecido a una campana gaussiana con distribución normal y errores aleatorios, esta forma ideal se puede atribuir a las combinaciones aditivas de los movimientos aleatorios de las numerosas moléculas de soluto en una banda cromatográfica (Skoog *et. al.*, 2001).

Los Cromatogramas reales están lejanos de ser picos de aspectos gaussianos, ya que usualmente se presenta una irregularidad en la concentración de la zona de depósito de la sustancia que se encuentra en la cabeza de la columna, además la velocidad de la fase móvil es nula en las paredes de la columna y máxima en el centro de esta, la simetría se mide por dos parámetros denominados factor de simetría (F_a) y factor de cola (F_c) medidos ambos al 10% de altura. (Rouessac, *et. al*, 2000)

Ecuación 12.
$$F_a = \frac{b}{a}$$

Ecuación 13.
$$F_c = \frac{a+b}{2a}$$

5.2 Métodos para la descripción de la eficacia de la columna.

Para definir la eficacia de una columna se acuden a dos términos muy correlacionados, que son altura de plato (H) y número de plato (N), las dos están relacionados en la siguiente ecuación:

Ecuación 14.
$$N = \frac{L}{H}$$

Donde L es la longitud en centímetros de la columna usada. La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos y cuanto menor sea la altura de plato. La eficacia cromatográfica N es el parámetro que cuantifica la preferencia por las bandas estrechas (Rubinson, *et.al*, 2001).

Recordemos que la eficacia cromatográfica, se define también como una medida de retención relativa de soluto comparada con el ancho de pico.

Ecuación 15.
$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

La altura equivalente de un plato teórico H se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 16.
$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Donde σ^2 es la varianza y L la longitud de la columna.

5.3 Variables cinéticas que influyen en el ensanchamiento de banda.

Dentro del proceso de ensanchamiento de banda se ha encontrado la necesidad de ajustar variables experimentales, dentro de estas variables se menciona:

- **Influencia del caudal en la fase móvil**, menciona sobre el tiempo de contacto entre la fase estacionaria y la fase móvil, el cual a su vez depende del caudal de la fase móvil, este describe la gráfica entre la altura de plato y la velocidad lineal de la fase móvil, mostrando que a medida que aumenta el caudal se disminuye la eficacia, por tanto es necesario determinar el caudal óptimo para cada muestra (Skoog *et. al.*, 2001).

- **Procesos cinéticos que contribuyen al ensanchamiento de banda**, dentro de los que se destacan: términos del camino múltiple, argumentando que los caminos por donde puede moverse la molécula son múltiples, por lo que el tiempo que dura en la misma también es variable, provocando un ensanchamiento de banda y es directamente proporcional con el diámetro de las partículas que componen el relleno de la columna, a velocidades pequeñas las moléculas no se dispersan apreciablemente por el camino natural del relleno; el término difusión longitudinal, es una causa de ensanchamiento por la que los solutos difunden desde las zonas central donde es mayor la concentración hacia las regiones más diluidas, esta resulta ser inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil, si se aumenta el caudal es menor el tiempo en la columna y se disminuye este riesgo.

Los coeficientes de transferencia de masa propician el ensanchamiento de banda debido a muchas corrientes de flujo que tiene la fase móvil en el interior de la columna, como consecuencia se requiere un tiempo para que las moléculas se difundan produciendo transferencia de masa, estas dependen de la velocidad de difusión (Skoog *et. al.*, 2001).

CAPITULO 3: OPTIMIZACIÓN DE LA EFICACIA DE LA COLUMNA

Introducción

Como se ha revisado en los anteriores capítulos, la optimización de la eficacia de la columna esta intrínsecamente asociado con las variables de operaciones, teniendo como principal objetivo una óptima separación en el menor tiempo, reduciendo problemas asociados como son el ensanchamiento de banda y velocidades de migración de los componentes, por lo que estudiaremos con más detalles en este capítulo estas variables.

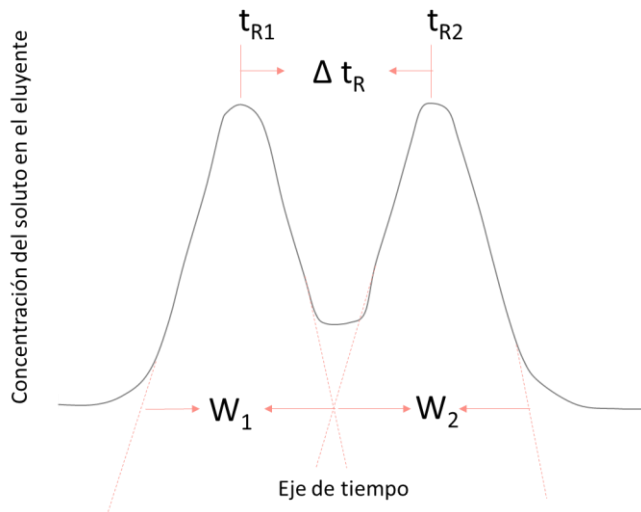
Lección 1: Resolución de la columna

La resolución es una medida de la capacidad de separar dos analitos (**Figura 6**); el grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos de las bandas (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas, el cual se puede definir a través de la siguiente ecuación:

Ecuación 17.

$$R_s = \frac{(t'_{R,2} - t'_{R,1})}{[(0.5 * (W_2 + W_1))]}$$

Figura 6. Resolución en una mezcla de compuestos



Fuente: Zambrano, M. 2016.

Las bandas de soluto se ensanchan gradualmente conforme emigran a través de la columna cromatográfica. La resolución de los solutos individuales en bandas discretas ocurre solamente si las bandas se ensanchan en menos medida que lo que se separan los máximos de los picos. Los valores en la línea base de los anchos de bandas adyacentes son casi constantes, esto es, $W_2 = W_1$. Puesto que el ancho de la banda en la línea base es igual a cuatro desviaciones estándar, para una banda dada la resolución también se puede expresar como:

Ecuación 18.

$$R_s = \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{4 * \sigma}$$

Si es inadecuada, la resolución de picos adyacentes puede mejorarse ya sea aumentando la separación entre los picos o disminuyendo los anchos de los picos individuales. Esto involucra la selectividad de la columna cuando se alejan más los picos y la eficiencia cuando se intenta disminuir el ancho del pico. Mejorar la selectividad implica alterar la termodinámica del sistema cromatográfico. Mejorar la cinética del sistema aumenta la eficiencia de la separación.

Lección 2: Influencia de los factores de retención y sensibilidad sobre la resolución.

La resolución es una función de tres factores separados: 1) un factor de la selectividad de la columna que varía con α , 2) una velocidad de migración o factor de capacidad de retención y 3) un factor de eficiencia que depende de L/H (o el número de platos teóricos). Cada factor puede ser calculado directamente del Cromatograma registrado y se puede ajustar en forma más o menos independiente. Los primeros dos factores son por esencia termodinámicos, mientras que el término L/H está principalmente asociado a los aspectos cinéticos de la cromatografía.

Los cambios en α y k' se logran seleccionando diferentes fases estacionarias y móviles o variando la temperatura y (con menor frecuencia) la presión. Adicionalmente, k' puede variarse cambiando las cantidades relativas de las fases móvil y estacionaria dentro de la columna. Cuando se optimiza una separación en particular el término de k' debe ser considerado en primer lugar. El intervalo óptimo de valores de k' va de 1 hasta 10. Por desgracia, en una mezcla compleja con muchos componentes, a menudo sólo es posible optimizar las condiciones de separación para un par de ellos. La única solución efectiva de este problema cuando se trabaja con muestras complejas reales es la programación de k' .

El término L/H se ajusta para proporcionar la máxima eficiencia compatible con un tiempo de análisis razonablemente corto. Los valores más altos de L/H siempre darán una mejor resolución, siendo los demás factores iguales. La resolución puede mejorarse aumentando la longitud de la columna, pero sólo conforme a la raíz cuadrada de la longitud de aquella. La altura del plato debe disminuirse por medio de las características cinéticas de la operación de la columna, quizá disminuyendo el flujo de la fase móvil (pero no por debajo de un mínimo). Cualquier acción que aumente la eficiencia de la transferencia de masa de los solutos entre las fases estacionaria y móvil disminuirá la altura del plato y por lo tanto mejorará la resolución.

Lección 3: Efecto de la resolución sobre el tiempo de retención.

Idealmente se pretende tener una buena resolución en el menor tiempo posible, pero en la realidad no es posible obtener tales beneficios; el tiempo necesario para completar una separación se determina por la velocidad u_B del soluto que se mueve más lentamente y viene dado por la siguiente ecuación (Skoog *et. al.*, 2001):


Ecuación 19.
$$\bar{u}_B = \frac{L}{(t_R)_B}$$

Donde el $(t_R)_B$ es el tiempo necesario para que salga de la columna el pico de B cuando la velocidad de la fase móvil es μ . Al reordenarse la ecuación encontramos (Skoog *et. al.*, 2001):

Ecuación 20.
$$(t_R)_B = \frac{NH(1+k'_B)}{u}$$

Lección 4: Variables q afectan la eficacia de la columna.

Una de las variables más significativas que pueden afectar la eficiencia de la columna son los efectos cinéticos que pueden conducir a un ensanchamiento de banda y los efectos termodinámicos de los constituyentes a separar. Sin embargo se puede utilizar estrategias tales como el cambio de columna por una de mayor longitud, se puede alterar el caudal de la fase móvil, el tamaño de partícula del relleno, la viscosidad de la fase móvil, espesor de la película del líquido adsorbido que constituye la fase estacionaria. (Skoog *et. al.*, 2001).




Una de las mejores formas de mejorar la resolución es aumentando el número de platos teóricos en la columna, esto conlleva a una reducción de la altura de plato y consecuentemente mejora la eficacia de la columna.

Lección 5: Aplicaciones de la Cromatografía para el análisis cualitativo y cuantitativo

La Cromatografía ha llegado ser uno de los métodos de separación más conocidos dado su aplicabilidad de forma cualitativa y cuantitativa dentro de las aplicaciones más características encontramos:

En el ámbito cualitativo, la cromatografía permite evidenciar la presencia de mezclas y que numero de especies están presentes en una muestra problema. También, posee importantes características como son los tiempos de retención, ya que una muestra no le aparece un pico en el mismo tiempo de retención a las mismas condiciones con el patrón primario, se puede asumir la ausencia de esa especie de interés. En el caso del análisis cuantitativo, es considera una técnica muy eficaz ya que al analizar alturas de pico o áreas de pico podemos determinar la concentración de los mismo haciendo uso de patrones de calibración, empleando metodologías tales como el método de patrón interno o el método de normalización de áreas muy útil para la cuantificación de métodos cromatográficos (Skoog *et. al.*, 2001).



UNIDAD 2. APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFIA

<p>Introducción</p>	<p>La Cromatografía como concepto enmarca varias áreas de estudio, sin embargo, dependiendo de la naturaleza del analito se puede usar diferentes tipos de cromatografías ajustadas a las necesidades reales del análisis.</p> <p>Dentro de la temática a tratar en esta unidad se parte del tipo de cromatografía elemental, ampliamente usado en el monitoreo de síntesis y reacciones de compuestos químicos hasta la elucidación y cinética de estos compuestos a través de la técnica con características más robustas de trabajo.</p>
<p>Justificación</p>	<p>Para el desarrollo de esta segunda unidad, se inicia con la Cromatografía de papel y de capa fina técnicas utilizadas ampliamente para establecer presencia de especies de interés, además tienen un sinnúmero de aplicaciones por la rapidez y confiabilidad que brindan sus resultados.</p> <p>Luego se estudian las técnicas instrumentales más usadas como son la Cromatografía gaseosa y la cromatografía líquida infaltable en un laboratorio de análisis químico ya que posee diversas aplicaciones que las han convertido en técnicas de presencia y cuantificación de analitos; se estudiará sus fundamentos, conceptos teóricos que las apoyen, equipos y automatización usados para implementar y las diversas aplicaciones que tienen estas técnicas posicionadas alrededor mundial.</p>
<p>Intencionalidades Formativas</p>	<p>El propósito de esta unidad es reconocer las aplicaciones más utilizadas de la Cromatografía, fundamentos teóricos, funcionamiento instrumental</p>

y demás aplicaciones relacionadas con estas cromatografías.

Objetivos Específicos

- A.** Conceptuar sobre los fundamentos de la Cromatografía de papel y de la Cromatografía en Capa Fina.
- B.** Descubrir soluciones ante problemas planteados frente a la aplicación de los conceptos de la Cromatografía de papel y de la Cromatografía en Capa Fina.
- C.** Establecer los conceptos de la Cromatografía de Gases, funcionamiento instrumental y aplicaciones relevantes.
- D.** Reconocer las bases de la Cromatografía de líquida HPLC, funcionamiento instrumental y aplicaciones.

META DE APRENDIZAJE

- A.** Desarrollar habilidades y sentido crítico de las aplicaciones y conceptos que se desarrollan en estas técnicas para que se formen como analista e Investigadores integrales.

COMPETENCIAS

- A.** El estudiante estará en capacidad de conceptuar acerca de los fundamentos de las principales aplicaciones Cromatográficas.
- B.** Reconocer dentro de las diversas aplicaciones Cromatográficas cuál es la más acertada según las necesidades del análisis y la disponibilidad de los recursos con los que cuentan en su entorno.

**DENOMINACIÓN
DE CAPÍTULOS**

Capítulo 4: Cromatografía en Papel y en Capa Fina

Lección 19. Generalidades de las técnicas
 Lección 20. Métodos de detección (visualización)
 Lección 21. Metodologías usadas para la Cromatografía en papel
 Lección 22. Cromatografía en capa fina: preparación de placas
 Lección 23. Aplicaciones de la cromatografía en papel y en capa fina.

Capítulo 5: Cromatografía de Gases (GC)

Lección 25. Columnas y fases estacionarias de la cromatografía de gases
 Lección 26. Instrumentación de la Cromatografía GC
 Lección 27. Aplicaciones de la Cromatografía de Gases
 Lección 28. Cromatografía Gas- Sólido
 Lección 29. Aplicaciones de la Cromatografía Gas-sólido: Polímeros y tamices

Capítulo 6: Cromatografía de Alta Resolución (HPLC)

Lección 30. Generalidades
 Lección 31. Efectos del tamaño de partícula.
 Lección 32. Ensanchamiento de banda y Efectos del tamaño de muestra.
 Lección 33. Instrumentación para la Cromatografía de Alta Resolución (HPLC).
 Lección 34. Cromatografía Gas- Líquido (GLC)

CAPITULO 4: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y EN CAPA FINA

Introducción

Uno de las aplicaciones con mayor importancia en la síntesis de reacciones, análisis de metabolitos secundarios entre otras, ya que es da una información inmediata y certera de la separación de componentes en una mezcla y consecuentemente información acerca del compuesto de interés.

En la actualidad hay técnicas que poseen detectores capaces de brindar no solo información de la eficiencia de la separación, también de las concentraciones de las especies involucradas, comparados con patrones primarios de estos posibles componentes evidenciando una veracidad de la información obtenida del análisis químico.

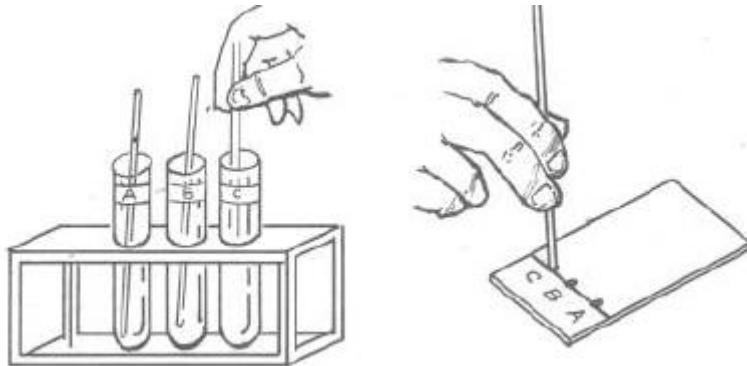
Lección 1: Generalidades de las técnicas

La cromatografía de papel, se define como la separación de sustancias o mezcla de compuestos que se dan por una migración diferencial sobre la superficie de un papel con ciertas características de porosidad, usualmente se utiliza papel filtro. En el caso de la cromatografía de capa fina, esta migración se da en una superficie delgada y rígida recubierta de un material adsorbente.

Estos conceptos nos definen las condiciones de separación sin embargo, este tipo de cromatografía se asocian con otras variables tales como son las condiciones de los disolventes, la polaridad, solubilidad, características del soporte utilizado, técnicas de sembrado de muestra entre otros.

La cromatografía de papel, experimentalmente se debe colocar solo una gota de la muestra, a unos 2 o 3 cm del borde de la hoja o tira de donde se hará el análisis, este lugar en donde se hará el sembrado debe ser marcado con una lápiz de grafito debido a que al utilizar lapiceros, estos están compuestos por tintes y al tener contacto con los disolvente se descomponen y no daría un buen análisis (**Figura 7**) (Domínguez, 1975).

Figura 7. Siembra de muestra en papel.



Fuente: Cromatografía en Papel y Capa Delgada (Domínguez, 1975).

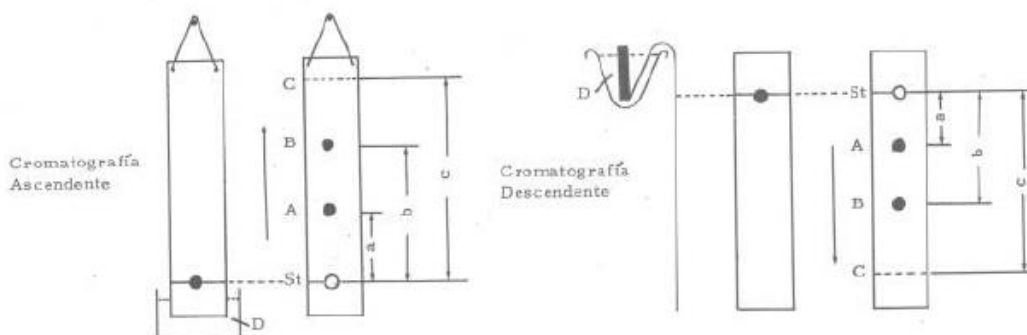
El punto de siembra de la muestra no debe tener contacto con el disolvente, se tapa el recipiente y se evidencia por capilaridad la ascendencia o descendencia del disolvente y la separación de los diferentes componentes de la mezcla a distintas velocidades de migración:

Si se da una cromatografía de características ascendentes se saca el papel cuando haya recorrido no más de 20 a 30 cm y si es de características descendentes se saca cuando se aproxime de 1 a 2 cm del borde opuesto a donde se sembró la muestra.

Dentro de las variables analizadas en la cromatografía de papel se encuentran:

- a) *Características del papel utilizado.* El papel usado para cromatografía es considerado decisivo en un buen análisis, las características de un papel ideal es el que posee un buen porcentaje de celulosa, y desde el punto de vista operacional en algunos casos se lava previamente; dependiendo de la naturaleza de la muestra, se usan papeles especiales como son los papeles impregnados.
- b) *Selección del disolvente.* El disolvente es una parte importante en la cromatografía de papel ya que los disolventes determinan la selectividad del sistema cromatográfico, se miran aspectos como la viscosidad y polaridad del disolvente. Por lo general, los disolventes están constituidos por dos fases, una fase orgánica y una fase acuosa, donde la fase acuosa satura la cámara fotográfica y la fase orgánica, facilita el desarrollo del Cromatogramas. Por lo que se puede deducir que los solutos polares se separan en fase directa con un disolvente polar y los solutos hidrófobos se separan mediante sistema de fase invertida (**Figura 8**).

Figura 8. Caracterización de la cromatografía en papel en forma ascendente y descendente

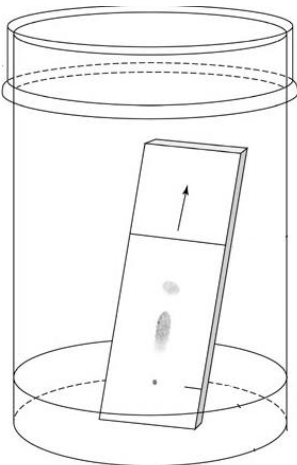


Fuente: Cromatografía en Papel y Capa Delgada (Domínguez, 1975).

Para el caso de la cromatografía en capa fina, a pesar de utilizar los mismos principios de la cromatografía en papel, pero se utiliza una placa que es considerado el soporte para el análisis cromatográfico. Las separaciones se dan en placas de vidrio o plástico que se recubren con una capa delgada y adherente de partículas finamente divididas, que en este caso es la fase estacionaria (Skoog, *et. al.*, 2001).

El desarrollo de la placa es muy similar a la Cromatografía de papel, se pone en una cámara saturada del disolvente, se marca con un lápiz, se siembra la muestra y se procede a poner en contacto con el disolvente y por capilaridad se da el proceso (**Figura 9**).

Figura 9. Cromatografía en Capa Fina, la placa esta inclinada, la muestra sembrada en el extremo y el disolvente, esto se da en forma descendente



Fuente: Consulta en la página web: <https://goo.gl/0N38PX>

Lección 2: Métodos de detección (visualización)

El procedimiento para visualizar los resultados por Cromatografía de papel, se debe sacar el papel de la cámara, se marca el mismo, se deja secando en un desecador, campana extractora, si los solutos son incoloros se deben apoyar en otras técnicas: calentamiento para completar la reacción, uso de agentes cromógenos¹, utilización de lámparas UV entre otras.

En el caso de la Cromatografía de Capa Fina se procede a nebulizar la placa con yodo o de ácido sulfúrico, ya que ambos reaccionan ante compuestos orgánicos dando productos de oscuros, también se usa ampliamente reactivos como la ninhidrina; también ha tomado auge la aplicaciones de reactivos fluorescentes en la fase estacionaria y se coloca bajo la lámpara UV para revisar la separación de los componentes de la mezcla (Skoog, *et. al.*, 2001).

Lección 3: Metodologías usadas para la Cromatografía en papel

Dentro de las metodologías usadas para el análisis de cromatografía en papel destacamos los siguientes aspectos:

- La cantidad de muestra es de 1 a 100mg se disuelve en la menor cantidad posible de líquido orgánico volátil, los solventes más usados son etanol, acetona, éter etílico, cloroformo y cloruro de metileno. Para la siembra de la muestra, el volumen de la muestra es importante, por lo que si es necesario aplicar muestra varias veces es mejor secar y se vuelve a aplicar. Para el desarrollo del análisis se puede realizar de forma ascendente, descendente, cromatocaja, horizontal, circular alcance múltiple, por gradiente y bidimensional.

¹ Se denominan agentes cromógenos son sustancias coloreadas que tienen poder de tinción y que poseen afinidad con el analito que se quiere teñir.


Por otro lado, la cromatografía preparativa, utilizada cuando se cuenta con muy poca muestra, en el cual se hace en repetidas ocasiones, luego las manchas correspondientes al analito se eluyen, se elimina el solvente y con el cristalizado se hacen análisis para la elucidación del compuesto de interés.

Lección 4: Cromatografía en capa fina: preparación de placas


En muchos casos un solo Cromatograma no proporciona la suficiente información acerca de la naturaleza de las especies implicadas en el análisis, ya que existe la posibilidad que dos solutos puedan presentar un mismo factor de retardo, los que no daría la suficiente información, por lo que se sugiere el uso de patrones que permitan dar claridad de las características de la separación así como el uso de análisis de confirmación de presencia de compuestos; también se puede usar como estrategia, el raspado de la muestra de la placa, se adiciona un solvente adecuado y luego se separa por centrifugado dando lugar a análisis que elucidación que apoyen la presencia de los analitos de interés.

Lección 5: Aplicaciones de la cromatografía en papel y en capa fina.

En el caso de la cromatografía de papel se encuentran diversas aplicaciones como la industria farmacéutica y en análisis biológicos ya que es considerada una técnica eficaz para el análisis de macromoléculas, pero tiene limitantes como el tiempo de análisis ya que puede demorar hasta 24 horas para dar un análisis veraz, se ha evidenciado que se puede cuantificar a través de esta metodología haciendo Cromatogramas comparativos con el patrón de la muestra que esta presentes teniendo resultados importantes en los análisis. En el caso de limitantes como son las cantidades obtenidas de un analito se puede recortar y pesar así como aplicar Soxhlet para obtener muestras puras.



En el caso de la cromatografía de capa fina, también ha sido utilizada para el análisis de compuestos de características bioquímica, además para la síntesis de compuestos con aplicaciones farmacéuticas, se ha utilizado para el análisis de aminoácidos la cromatografía bidimensional en el cual se pone una muestra se analiza se deja secar se gira 90 grados y luego se analiza con un segundo disolvente, se nebuliza con ninhidrina obteniendo resultados más certeros de las especies presentes en la mezcla (Skoog, *et. al.*, 2001).



CAPITULO 5: CROMATOGRAFIA DE GASES


Introducción

La cromatografía gaseosa es una de las técnicas con mayor utilidad en la actualidad y tiene más de 40 años ya que remonta desde 1941 con Martin y Synge de su implementación y se ha convertido en una técnica en constante avance; la cromatografía gas- líquido que se conoce como GC, los compuestos deben estar en estado gaseoso provocados por el calentamiento a que deben ser sometidos; La importancia de esta técnica se debe a que posee gran sensibilidad, rapidez y automaticidad. Las aplicaciones son numerosas y los desarrollos de la cromatografía gaseosa avanzan rápidamente lo que la hace mayor impacto en la Comunidad científica.

Dentro de la instrumentación de la Cromatografía Gas-liquido también denominada Cromatografía Gaseosa **GC** encontramos tres componentes básicos: inyector columna y detector, en el cual la fase móvil que arrastra la muestra a través de la columna es un gas llamado **gas portador**, al controlar los caudales se logran tiempos de retención muy precisos, se inyecta la muestra, pasa por la columna en estado vapor, pasa al detector y se obtiene el análisis de las mezcla. En esta unidad revisaremos todos los aspectos relacionados con el análisis de GC su componente instrumental.

Lección 1: Columnas y fases estacionarias de la cromatografía de gases

Desde 1977 se han reportado invenciones sobre columnas, sin embargo las compañías dedicadas al tema de suministros de instrumentación se han preocupado por mejorar las columnas existentes en el mercado dentro de las que encontramos:

- 
- a) **Columna Abierta:** Las columnas abiertas también conocida como columnas capilares, se conocen dos básicos denominados *columnas abierta de pared recubierta* (WCOT) y *columna abierta recubierta con soporte* (SCOT). La columna abierta de pared recubierta son capilares recubierta con una fina capa de la fase estacionaria, en el caso de las columnas abiertas recubiertas con soportes están recubiertas con un soporte, tienen varias fases estacionarias que tienen una columna con mayor capacidad de carga (Skoog, *et. al.*, 2001).
 - b) **Columnas rellenas:** Las columnas rellenas están fabricadas con fibra de vidrio, metal rellenas con un soporte solido que puede ser de tierras diatomeas que sirven para retener y ubicar la fase estacionaria liquida de tal manera que tenga mayor superficie de contacto con la fase móvil.

En el caso de la fase estacionaria, se considera ideal una fase que tenga baja volatilidad, estabilidad térmica, químicamente inertes y con características de disolvente, en la Tabla 3 se hace énfasis algunas fases estacionarias comunes en la cromatografía liquida (Skoog, *et. al.*, 2001):




Tabla 3. Fases estacionarias comunes en Cromatografía de Gases.

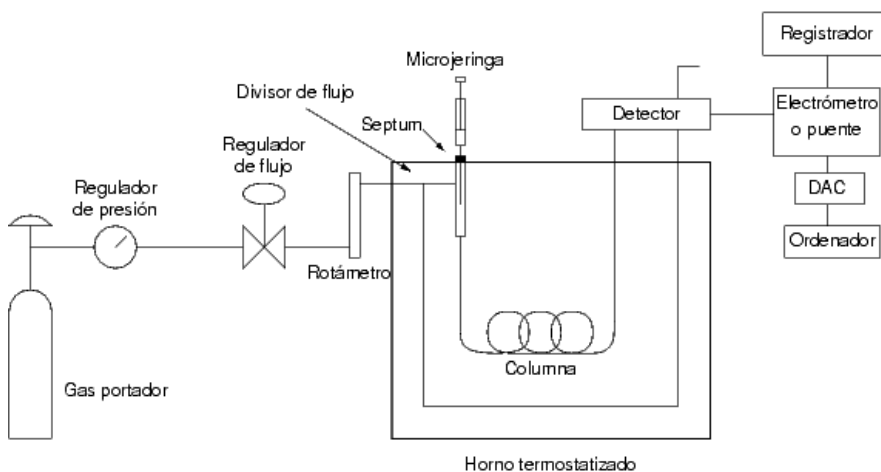
Fase Estacionaria	Nombre Comercial	Temperatura máxima °C	Aplicaciones Comunes
Polidimetilsiloxano	OV-1, SE 30	350	No polar usado para hidrocarburos, aromáticos, polinucleares, fármacos, esteroides.
Poli(fenilmetildimetil) siloxano	OV-3,SE 52	350	Esteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, fármacos, compuestos halogenados.
Poli(fenilmetil) siloxano	OV-17	250	Fármacos, esteroides, pesticidas y glicoles.
Poli(trifluoropropil dimetil) siloxano	OV-210	200	Aromáticos, clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos
Polietilenglicol	Carbomax 20M	250	Ácidos libres, alcoholes, éteres, aceites esenciales, glicoles.
Poli(dicianoalildimetil) siloxano	OV-275	240	Ácidos grasos, poliinsaturados, ácidos libres, alcoholes, ácidos de la colofonia.

Fuente: Skoog, *et. al.*, 2001

Lección 2: Instrumentación de la Cromatografía GC

Los instrumentos básicos para tener un Cromatógrafo se puede observar en la **Figura 10**.


Figura 10. Componentes del Cromatógrafo de Gases



Fuente: Consultado en la página web: <https://goo.gl/82Foow>

Como se aprecia, se inicia el proceso con el gas portador, que tienen como características ser químicamente inertes entre los que se destacan el Helio, Nitrógeno e Hidrógeno, la escogencia de este gas portador depende en gran medida del detector; en el caso de los caudales se miden a través de un regulador de presión y un regulador de presión conectado al Cromatógrafo.

Luego se sigue con el sistema de inyección, este se da a través del septum o goma de silicona, en una cámara de vaporización situada en la cabeza de la columna (la temperatura de esta cámara debe estar 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra), en la mayoría de los casos hay un sistema divisor que toma una porción de la muestra y el resto la desecha (Skoog, *et. al.*, 2001).



En el caso de la temperatura de la columna, se usa un termostato para que la separación pueda efectuarse a una temperatura reproducible, esta temperatura deberá para lograr una buena separación y reproducibilidad en el análisis, según GIDDINS² el tiempo de retención se duplica por cada 30°C que disminuye la temperatura de la columna, evidenciando que entre más baja es la temperatura es mejor la separación (Mcnair, 1981).


Seguidamente, se tienen los detectores, considerados dispositivos que miden la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a la concentración, las características importantes al momento de usar un detector: sensibilidad, ruido, respuesta, recorrido lineal, simplicidad, costo, disponibilidad y durabilidad (Mcnair, 1981). Dentro de los detectores más conocidos en el mercado encontramos:


- Detectores de ionización de llamas FID
- Detectores de conductividad térmica TCD
- Detectores de quimioluminiscencia del azufre SCD
- Detectores de captura de electrones ECD
- Detectores de emisión atómica AED
- Detectores termoiónicos TID
- Detectores fotométricos de llama FPD

Lección 3: Aplicaciones de la Cromatografía de Gases

Dentro de las aplicaciones de la Cromatografía Gaseosa es considerada una herramienta valiosa para la separación de especies en una muestra que tengan características organometálicas y bioquímicas que posean

² Stuart P. Cram, T. H. Risby, L. R. Field, Wei-Lu Yu; Gas chromatography; *Anal. Chem.*, 1980, 52 (5), pág. 324R–360R.





características volátiles o que se deriven de sustancias volátiles (Wanna, *et. al.*, 1995).


También se ha evidenciado la versatilidad lo cual ha permitido combinarse con técnicas espectroscópicas y electroquímicas que conllevan a dar resultados inmediatos a los analistas, uno de los más comunes es el acoplamiento GC-EM (Espectrometría de masas), el cual se acopla al equipo de GC un detector de masas, obteniendo espectros de masa en tiempo real, esta metodología es usada ampliamente en productos naturales, farmacia y alimentos.


Lección 4: Cromatografía Gas- Solido

La Cromatografía Gas Solido se basa en la adsorción de sustancias gaseosas sobre superficies sólidas, considerada útil para la separación de especies que no se retienen en columnas gas- liquido tales como sulfuro de hidrogeno, aire, monóxido, dióxido entre otros. Se lleva a cabo en ambos tipos de columnas usando dos tipos de adsorbentes: tamices moleculares y polímeros porosos (Skoog, *et. al.*, 2001).


Lección 5: Aplicaciones de la Cromatografía Gas- solido: Polímeros y tamices

Los tamices moleculares son intercambiadores de iones de silicatos de aluminio cuyo tamaño de poro depende del tipo de catión presente. Los tamices se clasifican según el diámetro de las moléculas que pueden penetrarlos y de allí obtener los Cromatogramas resultados del análisis. Por otro lado los polímeros se fabrican de estireno polimerizado con divinilbenceno, el tamaño de los mismos depende del grado de





polimerización, ampliamente usados en especies gaseosas polares (Skoog, *et. al.*, 2001).



CAPITULO 6: CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Introducción

La Cromatografía de alta eficacia es una de las técnicas Cromatográficas cuya fase móvil es líquida que ha sido más usada y reconocida, su aplicación toca la Cromatografía gaseosa incluyendo compuestos que tienen características termosensibles y aquellos con masas elevadas y con gran polaridad; es considerada una técnica cromatográfica eficaz porque posee gran precisión sobre la buena selectividad de las especies implicadas en mezclas. Este Capítulo permitirá conocer los fundamentos de la técnica y sus ventajas para el análisis de muestras.

Lección 1: Generalidades

La Cromatografía líquida de alta eficacia llamada de forma abreviada **HPLC** deriva de la Cromatografía preparativa en términos de selectividad y resolución, en los inicios de la Cromatografía líquida se podía obtener mayor eficacia en las columnas cambiando el tamaño de las partículas del relleno. Dentro de sus características encontramos:

- a) Las muestras deben ser solubles con la fase móvil, no requiere volatilización, convirtiéndose en una ventaja para poder analizar muestras de muy alto peso molecular, de características orgánicas e inorgánicas, iónicos o covalentes (McNair, *et. al.*, 1973).
- b) La HPLC es más costosa y menos sensible que la CG sin embargo tiene mayor aplicación dada la versatilidad de las condiciones de la muestra (McNair, *et. al.*, 1973).



Lección 2: Efectos del tamaño de partícula.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta a medida que se disminuye el tamaño de partícula de la fase estacionaria, el tamaño típico para HPLC es de 3 a 10 μ m, y de manera consecuente al disminuir el tamaño de partícula se reduce la altura de plato permitiendo un flujo uniforme al interior de la columna y menor es la distancia de recorrido para difundirse el soluto en la fase móvil (Harris, 2007).

Lección 3: Ensanchamiento de banda y Efectos del tamaño de muestra.

En HPLC se da un ensanchamiento de banda significativo fuera del relleno de la columna denominado ensanchamiento de banda extra-columna, se da cuando se transporta el soluto a través de tubos como los usados para la inyección y en los distintos componentes del sistema. Este ensanchamiento proviene de las diferencias de velocidad de flujo de las capas de líquidos adyacentes a las paredes del tubo y las del centro, trayendo como consecuencia la parte central de la banda se mueve con más rapidez que las periferias (Skoog, *et. al.*, 2001).

Lección 4: Instrumentación para la Cromatografía de Alta Resolución (HPLC)

En la **Figura 11** se evidencia un ensamblaje de un HPLC básico en donde se muestran los componentes más importantes, a continuación se explica el funcionamiento de cada uno de sus componentes:




Figura 11. Sistema de un Cromatógrafo HPLC

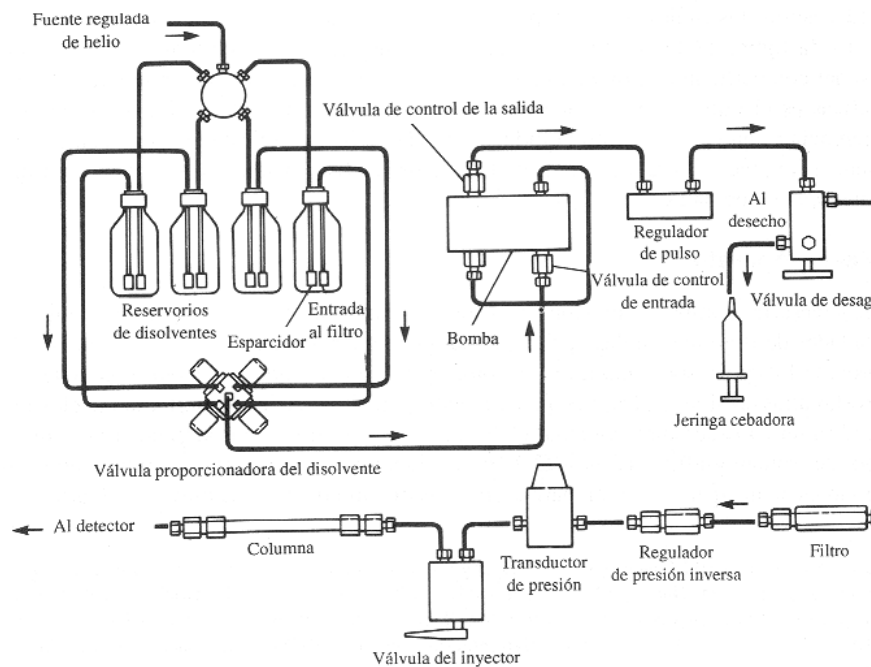


Figura 11. Consultado en la página web: <https://goo.gl/bXrdIi>

Inicialmente, se parte de los recipientes de la fase móvil conllevan a un sistema de purga para que se eliminen las burbujas que pueden provocar ensanchamiento de banda o causen interferencias en el detector, este sistema arrastra los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de gas inerte de baja solubilidad. En el caso del disolvente, se recomienda dos o tres disolventes con polaridad distinta, se gradúa la más adecuada y se varía los componentes del disolvente para que la muestra pueda separarse.

Para el sistema de bombeo, se usan bombas para impulsar a la fase móvil y deben cumplir los siguientes requisitos (Skoog, *et. al.*, 2001):

- Deben vencer altas presiones.
- Proporcionar caudales estables entre 0,1 y 10mL/min.
- Deben estar libres de pulsaciones y tener volúmenes muertos pequeños.
- Deben estar construidas de materiales resistentes a la presión y a las agresiones químicas.
- Fácil manejo y mantenimiento.


Se utilizan tres tipos de bombas: Bombas recíprocas, Bombas de desplazamiento y Bombas neumáticas. Como parte del sistema de bombeo tiene por ordenador un dispositivo para controlar el caudal mediante la caída de presión mediante un restrictor a la salida de la bomba (Skoog, *et. al.*, 2001).

El sistema de inyección de la muestra, es el encargado de introducir la muestra en la cabeza de la columna de forma reproducible y adecuada, hay dos tipos de inyectores:

- Septum: Inyecta la muestra mediante una jeringa. Se usa poco y no permite mucha presión.
- Bucle de muestreo: Este dispositivo normalmente se encuentra integrado en el equipo cromatográfico y existen bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra.

Luego seguimos con las columnas usadas para HPLC, dentro de esta clasificación encontramos: las columnas analíticas, precolumnas, columnas termostalizadas (Skoog, *et. al.*, 2001).

Las columnas analíticas, tienen buena rapidez y no consumen demasiado disolvente, tienen una longitud de 10 a 30 cm. Generalmente son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro




interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 μ m.

Las precolumnas, se colocan delante de la columna para eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno debe ser semejante al de la columna. Aunque el tamaño de partícula es mayor para minimizar la caída de presión. En muchas ocasiones se usan para aumentar la vida de la columna.

Las columnas termostalizadas no necesitan control estricto de la temperatura, por lo que se puede trabajar con ellas a temperatura ambiente. Los empaquetados más comunes son de partículas de sílice pero también se usa la alúmina, polímeros porosos y resinas de intercambio iónico.

En el caso de los detectores, en HPLC no existen detectores tan universalmente aplicables, ni tan fiables tampoco. En HPLC existen dos tipos básicos de detectores:

- Los basados en una propiedad de la disolución: Que corresponden a una propiedad de la fase móvil, como el índice de refracción, la constante dieléctrica, la densidad (Skoog, *et. al.*, 2001).
 - Los basados en una propiedad del soluto: Es decir, responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil (Skoog, *et. al.*, 2001). Dentro de esta clasificación se destacan:
 - Detectores de absorbancia
 - Detectores de fluorescencia
 - Detectores Electroquímica
 - Detectores de índice de refracción
 - Detectores de Espectrometría de masas
 - Detectores de FT-IR
- 

- Detectores de Dispersión de Luz
- H. Detectores de Actividad óptica
- Detectores Selectivo de elementos
- J. Detectores de Fotoionización

Lección 5: Cromatografía de Reparto

La cromatografía de reparto se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y Cromatografía de fase unida químicamente, la diferencia radica en la forma como se retiene en la fase estacionaria sobre las partículas de relleno. En la cromatografía líquido- líquido se da por adsorción física y en la Cromatografía de fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente con la superficie del soporte.

Con relación a las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto:

- a) Cromatografía en fase reversa. En la cromatografía de fase reversa se da la separación en esta especie de capa líquida es depositada químicamente como consecuencia de la distinta solubilidad relativa entre la fase estacionaria (apolar) y la fase móvil (polar).
- b) En el caso de la fase normal, La retención también (como la de fase reversa) tiene lugar en esa especie de capa líquida depositada químicamente, como consecuencia de la distinta solubilidad relativa en la fase estacionaria (polar) y la fase móvil (apolar). Donde el analito menos polar será el primero que se eluye y el más polar el último en eluir (Skoog, *et. al.*, 2001).

UNIDAD 3. TECNICAS CROMATOGRAFICAS ESPECÍFICAS

<p>Introducción</p>	<p>Las técnicas Cromatográficas Especificas que aunque son bastante usadas en el análisis investigativo e industrial son más selectivas en lo relacionado con la naturaleza de la muestra, se revisaran los fundamentos, instrumentación y aplicación, mostrando así que la Cromatografía ha tenido grandes avances en toda su historia.</p>
<p>Justificación</p>	<p>En esta unidad tres se trabajaran técnicas Cromatográficas que si bien es cierto son poco conocida sus aplicaciones y ventajas son enormes porque permiten tener un amplia visión de las ventajas de usar estas técnicas para ciertas características en mezclas, por lo que da un valor agregado conocer su funcionamiento ya que estas técnicas tienen un importante impacto en la industria.</p>
<p>Intencionalidades Formativas</p>	<p>El propósito de esta unidad es Establecer las ventajas de estas técnicas Cromatográficas, funcionamiento instrumental y demás aplicaciones que se tienen actualmente para estas brindando herramientas de construcción para los analistas e Investigadores.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>A. Reconocer los fundamentos de la Cromatografía Iónica, sus mecanismos y principales aplicaciones.</p> <p>B. Identificar los principios de la Cromatografía de fluidos Supercríticos, sus fundamentos y aplicaciones.</p> <p>C. Conceptuar sobre los fundamentos de la Electroforesis Capilar y las aplicaciones desde el punto de vista instrumental y del análisis químico.</p>

	<p>META DE APRENDIZAJE A. Desarrollar competencias en los saberes relacionados con la Cromatografía aplicada y específica</p> <p>COMPETENCIAS A. El estudiante estará en capacidad Reconocer técnicas Cromatográficas aplicadas así como sus ventajas y limitaciones como técnicas. B. Conceptuar sobre las teorías establecidas para las diferentes técnicas y generar opiniones sobre la temática.</p>
<p>DENOMINACIÓN DE CAPÍTULOS</p>	<p>Capítulo 7:Cromatografía Iónica Lección 35. Generalidades Lección 36. Equilibrios en el intercambio iónico Lección 37. Rellenos de intercambio iónico Lección 38. Aplicaciones Lección 39. Cromatografía de exclusión de iones</p> <p>Capítulo 8:Cromatografía de Fluidos Supercríticos Lección 40.Generalidades Lección 41.Instrumentación y variables de operación Lección 42. Elección del Fluido Supercrítico Lección 43. Extracciones independientes y en línea. Lección 44. Aplicaciones Relevantes del SFE</p> <p>Capítulo 9:Electroforesis Capilar Lección 45. Fundamentos de las separaciones electroforéticas. Lección 46. Velocidades de migración y alturas de plato. Lección 47. Flujo electrosmótico. Lección 48. Instrumentación. Lección 49. Aplicaciones de la electroforesis Capilar.</p>

CAPITULO 7: CROMATOGRAFIA IONICA

Introducción

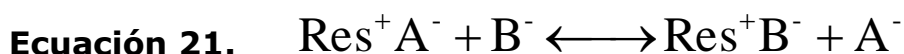
La Cromatografía de intercambio iónico esta conceptualizada como proceso que permite la separación de iones y moléculas polares basadas en las propiedades de carga de las moléculas. Puede ser usada en casi cualquier tipo de molécula cargada. En la actualidad presenta varias aplicaciones dentro de las que se destacan las aplicaciones bioquímica e industriales.

Lección 1: Generalidades

La cromatografía de intercambio iónico se basa en las interacciones electrostáticas y permite la separación de macromoléculas en función de sus cargas mediante su interacción diferencial con una fase estacionaria de naturaleza iónica.

En este tipo de Cromatografías, la fase estacionaria es una resina de intercambio iónico que contiene grupos cargados, teniendo la propiedad de separar especies ionizadas (Cationes o Aniones); la Fase Móvil es generalmente una solución amortiguadora de pH. En proteínas la cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado.


La reacción que simboliza el equilibrio ocurrido en la Cromatografía de Intercambio iónico es:



La fase estacionaria consta de *intercambiadores iónicos* (Res+), que son grupos cargados unidos covalentemente a un soporte o matriz. Están

asociados a iones de carga opuesta o *contraiones* (A-); la asociación reversible de éstos se intercambia y está en equilibrio con la de moléculas de los solutos de su misma carga presentes en la muestra (B-), entre los que está nuestra molécula de interés. La carga y naturaleza química de los intercambiadores determina la carga de los solutos iónicos que se unen a ellos y la fuerza con que lo hacen. Por su parte, la interacción de los solutos con los intercambiadores es más fuerte a medida que su relación carga/masa es mayor. Esta técnica cromatográfica es una de las más empleadas en Bioquímica, por la versatilidad que proporcionan la gran variedad de grupos intercambiadores disponibles, y sus respuestas a condiciones cambiantes de pH y concentración iónica. Está muy indicada en las primeras etapas de los procesos de purificación, por su buena resolución y alta retención de solutos, aunque por la misma razón se puede usar en cualquier momento. Según la *carga de la fase estacionaria*, se encuentra:

- Cromatografía de intercambio aniónico, en la que el intercambiador es un catión o base, es decir, una matriz con un grupo cargado positivamente, al que se unen aniones y polianiones. Los contraiones también son aniones (Cl⁻, acetato, OH⁻).
- Cromatografía de intercambio catiónico, si el intercambiador es un anión o ácido, o sea, una matriz con un grupo cargado negativamente, al que se unen cationes y policationes. Los contraiones también son cationes (Na⁺, K⁺, H⁺).
- Según la *influencia del pH en la carga* de los intercambiadores, éstos pueden ser fuertes o débiles, lo que en la práctica delimita el intervalo de pH en el que pueden ser manejados.
- *Fuertes*: sus grupos están totalmente ionizados en un amplio rango de pH (más básico en catiónicos y más ácido en aniónicos), de forma que su actividad o capacidad de intercambio se mantiene al máximo en todo ese rango. Entre ellos están TEAE (trietil aminoetil, aniónico), QAE (aminoetil cuaternario, aniónico) y SP (sulfopropilo, catiónico).
- *Débiles*: sus grupos están ionizados en un rango de pH más estrecho. La disociación, que define su carga y por tanto su capacidad de intercambio, varía mucho con el pH; en determinados rangos, la



capacidad disminuye enormemente ante un aumento (aniónicos) o disminución (catiónicos) de una unidad de pH. Entre ellos están DEAE (dietilaminoetil, aniónico) y CM (carboximetilo, catiónico). Los rangos de pH aproximados de uso son, para intercambiadores fuertes entre pH 2 y 12, para los catiónicos débiles entre pH 5,5 y 12 y para los aniónicos débiles entre pH 2 y 8,5.

Lección 2: Equilibrios en el intercambio iónico

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, se han usado ampliamente las zeolitas y arcillas; los puntos más activos de los grupos del ácido sulfónico como ácido fuerte, los ácidos carboxílicos como ácidos débiles, en el caso de los intercambiadores aniónicos contienen grupos aminos terciarios fuertemente básicos o grupos aminos primarios como débilmente básicos (Skoog, *et. al.*.2008)

Lección 3: Rellenos de intercambio iónico

Usualmente se han empleado esferas de características porosas que se forman por la copolimerización del estireno y el divinilbenceno en emulsión, con la finalidad de provocar la activación del polímero frente a los iones, a la estructura se le une químicamente grupos funcionales ácidos o básicos (**Figura 12**).


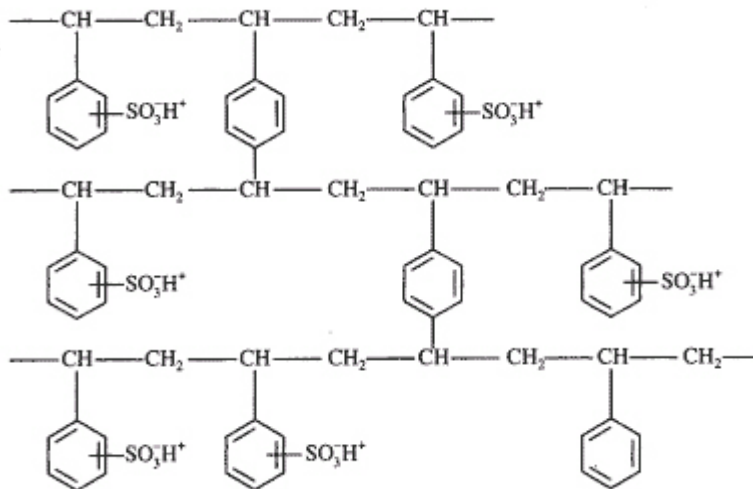


Figura 12. Estructura de resina de intercambio



Fuente: Consultada en la página web: <https://goo.gl/nNo1sW>

Las partículas poliméricas porosas no resultan por completo satisfactorias con rellenos cromatográficos debido a la baja velocidad de difusión de las moléculas de analito a través de los microporos de la matriz polimérica y la compresibilidad de la matriz, por lo que se proponen nuevos materiales recubierta con resinas sintéticas de intercambiadores de iones. También se usa el sílice pero los rellenos de polímeros tienen mayor capacidad que los de sílice y pueden usarse en varios intervalos de pH, sin embargo los de sílice son más eficaces pero son más sensibles a los cambios de pH.

Lección 4: Aplicaciones


La Cromatografía de Intercambio iónico tiene un sinnúmero de aplicaciones de orgánicos y bioquímicos como fármacos metabolitos además del uso para separaciones de macromoléculas



Lección 5: Cromatografía de exclusión de iones

Los métodos de exclusión por tamaño se dividen en cromatografía de filtración sobre gel y la cromatografía de penetrabilidad sobre gel. En el primer tipo se utilizan disolventes acuosos y rellenos hidrofílicos. En el último, se emplean disolventes orgánicos no polares y los rellenos son hidrofóbicos. Los métodos son complementarios en el sentido que en un caso se aplican a muestras hidrosolubles, y en el otro a sustancias solubles en disolventes orgánicos menos polares.

Una de las aplicaciones más útiles del procedimiento de exclusión por tamaño consiste en separación de las moléculas de alto peso molecular de productos naturales de las especies de bajo peso molecular y de las sales.



CAPITULO 8: CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Introducción

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una técnica que combina lo mejor de la cromatografía de gases (GC) y la Cromatografía líquida de alta resolución HPLC. Específicamente, aplica para compuestos no volátiles o térmicamente inestables que no pueden ser separados mediante GC, o aquellos que contienen grupos funcionales que imposibilitan su detección en HPLC trayendo consigo múltiples aplicaciones que lo hacen técnicamente apreciado para el análisis químico.

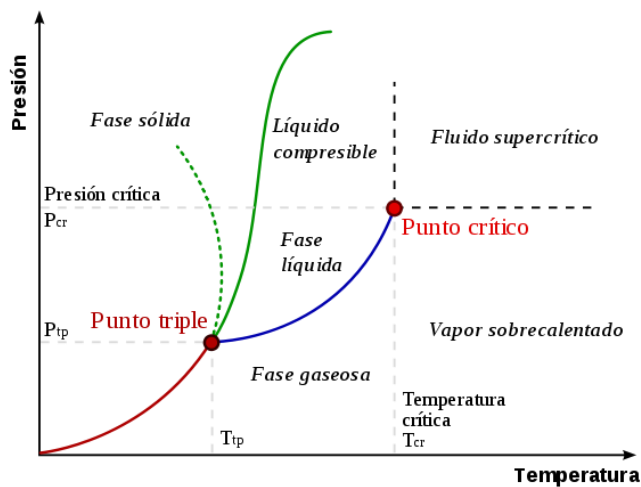
Lección 1: Generalidades

Desde la década de 1990, en la bibliografía química se ha visto un aumento en la publicación de trabajos que describen las propiedades y aplicaciones de los fluidos supercríticos, en particular dióxido de carbono y agua supercrítica. Uno de los estímulos para este interés es la búsqueda de disolventes verdes que sustituyan los compuestos orgánicos volátiles.

En la **Figura 13**, se muestra un diagrama de fases presión-temperatura para un sistema de un componente. Las líneas continuas representan los límites entre las fases. La línea discontinua pone de manifiesto la distinción entre vapor y gas; un vapor puede ser licuado aumentando la presión, un gas no. Por encima de la temperatura crítica, $T_{crítica}$, el gas ya no puede ser licuado independientemente del aumento de la presión. Si se observa una muestra al alcanzar el punto crítico, el menisco de la interfase líquido-gas desaparece lo que significa que ya no hay distinción entre las dos fases. A temperatura y presión por encima de la temperatura y presión críticas (es decir, por encima del punto crítico), una sustancia se convierte en un fluido supercrítico. Un fluido supercrítico posee propiedades de disolvente que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a las

de un gas. De esta manera, un fluido supercrítico no solo puede disolver solutos sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar en los poros de los sólidos. Los fluidos supercríticos tienen una viscosidad más baja y un coeficiente de difusión más elevado que los líquidos. La densidad de un fluido supercrítico aumenta al aumentar la presión y, al aumentar la densidad, la solubilidad de un soluto en el fluido supercrítico aumenta de manera espectacular. El hecho de que las propiedades puedan ajustarse variando la presión y la temperatura tiene ventajas para la aplicación de estos fluidos como agentes de extracción.

Figura 13. Diagrama de fases donde se evidencia la presencia de los fluidos supercríticos



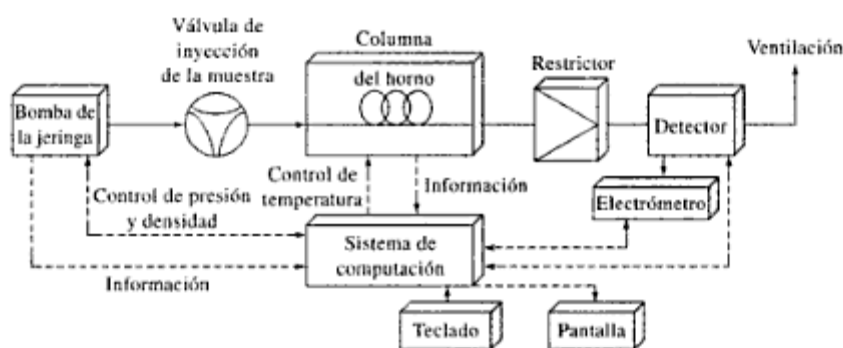
Fuente: Consultado en la página web: <https://goo.gl/JbmLaj>

Lección 2: Instrumentación y variables de operación

Las presiones y las temperaturas son variables importantes para el análisis Cromatográficos de fluidos supercríticos (**Figura 14**), pero dentro de su funcionamiento encontramos variables importantes: el empleo de un horno termostático para poder controlar con precisión la temperatura de la fase móvil; el uso de un *restrictor*, empleado para poder mantener por una parte la presión en el interior de la columna y por otra parte permitir la bajada de la presión a la salida para que el fluido supercrítico (SF en adelante) pase al estado gaseoso y pueda ser detectado adecuadamente el analito.

Las variaciones de presión en cromatografía de fluidos supercríticos tienen un efecto muy marcado sobre el factor retención o de capacidad, k' . Este efecto es una consecuencia del incremento de la densidad de la fase móvil a medida que aumenta la presión. Tal incremento de la densidad origina un aumento de la capacidad disolvente de la fase móvil, lo cual acorta los tiempos de elución.

Figura 14. Esquema del equipo del Cromatografía de Fluidos Supercríticos



Fuente: Análisis Instrumental, Skoog *et. al.*, 2001.

La mayoría de los perfiles de presión utilizados en cromatografía de fluidos supercríticos son: presión constante (isobárica) para un período de tiempo dado seguida de un aumento lineal o asintótico de la presión hasta alcanzar el valor de la presión final.

2.1 Fases estacionarias.

En SFC se emplean tanto las columnas abiertas como las columnas rellenas, aunque las primeras son las más empleadas. Las columnas abiertas son similares a las columnas de sílice fundida con recubrimientos internos de varios tipos de siloxanos enlazados y de enlaces cruzados. Las columnas tienen una longitud de 10 a 20 m y un diámetro interno de 0,05 a 0.10 mm. El espesor de la película varía entre 0.05 a 1 micrómetro.

2.2 Fases móviles.


La fase móvil más utilizada en SFC es el CO_2 . Es un disolvente excelente para un conjunto de moléculas orgánicas no polares. Además, es una sustancia transparente en el ultravioleta, es colora, no tóxica, fácilmente disponible y muy barata cuando se compara con otras fases móviles cromatográficas. La temperatura crítica del CO_2 ES 31°C y su presión crítica 72,9 atmósferas, lo cual permite jugar con una banda amplia de temperaturas y presiones sin superar las condiciones de operación de un equipo de HPLC moderno. Sustancias como etano, butano, óxido nitroso, diclorodifluorometano, éter dietílico, amoníaco y tetrahidrofurano han sido utilizadas como fases móviles de cromatografía de fluidos supercríticos.

2.3 Detectores.

La principal ventaja de la SFC frente al HPLC es que se pueden utilizar como en la cromatografía de gases, detectores de ionización de llama. Este detector es de respuesta universal a compuestos orgánicos, de elevada sensibilidad. Los espectrómetros de masas también se pueden adaptar como detectores más fácilmente para SFC que para HPLC. Otros detectores utilizados son de absorción en el ultravioleta y en el infrarrojo, de emisión de fluorescencia, termoiónicos y fotométricos de llama.

Lección 3: Elección del Fluido Supercrítico

De entre los fluidos supercríticos más usuales el que más se encaja con todas estas propiedades es el CO_2 , con la salvedad de su apolaridad que, en



principio, limita su poder solvente para sustancias polares. Como todas las sustancias, el CO_2 es susceptible de ser polarizado al variar la densidad, es decir, al variar la presión y la temperatura. Pero la polarizabilidad del CO_2 es mucho menor que la de los hidrocarburos.


Lección 4: Extracciones independientes y en línea.


Para recuperar analitos luego de la extracción se tienen dos metodologías: Independientes y en línea. En la recolección independiente, que es considerada la más simple de los dos, los analitos se recogen sumergiendo el restrictor en unos pocos mililitros de solvente dejando que el fluido supercrítico gaseoso se escape a la atmósfera. Los analitos también pueden ser recogidos con adsorbentes como la sílice. Los analitos adsorbidos son arrastrados después en un pequeño volumen de solvente líquido. Estos analitos obtenidos y separados se analizan por cualquier método óptico, cromatográfico o electroquímico.

En el método de recuperación en línea, el efluente proveniente del restrictor, después de la despresurización, se transfiere directamente a un sistema cromatográfico. Las principales ventajas de un sistema en línea son la eliminación del manejo de las muestras entre la extracción y la medición y la potencial mejora de la sensibilidad debido a que no se produce dilución de los analitos.


Lección 5: Aplicaciones Relevantes del SFE

La cromatografía de fluidos supercríticos se ha aplicado a la separación de un amplio conjunto de sustancias, entre los que se cuentan productos naturales, fármacos, alimentos, pesticidas y herbicidas, tensoactivos, polímeros, aditivos de polímeros, combustibles fósiles y explosivos y propelentes.





En un proceso de extracción industrial uno o más componentes se separan de la mezcla introducida, siendo el producto deseado tanto el extracto como el producto "refinado". Al tratarse los alimentos de mezclas altamente complejas lo más habitual es que los extractos también lo sean por lo cual es muy habitual hablar de fraccionamiento de extractos. El fraccionamiento en condiciones supercríticas consiste en una caída en cascada de la densidad con la consiguiente precipitación en cascada de los compuestos extraídos en los separadores donde se produce esta disminución de densidad.



CAPITULO 9: ELECTROFORESIS CAPILAR

Introducción

Esta técnica ha tenido importantes avances que remontan desde 1973 con los trabajos de Tiselius, quien trabajó en la separación de mezclas de proteínas (micelas cargadas eléctricamente) por su distinta movilidad en un soporte poroso al que se aplicaba un campo eléctrico. La técnica se fundamenta en el depósito sobre un medio poroso una mezcla de especies cargadas. Por aplicación de un campo eléctrico entre los extremos del soporte poroso las especies se separan en función de sus cargas y su movilidad iónica en ese medio. Cuanto más elevado sean el voltaje y la intensidad en menos tiempo se produce la separación; sin embargo, valores altos de estas variables provocan un aumento de temperatura, con la consiguiente evaporación del disolvente y acumulación de sales del tampón debidamente escogidas, también se han utilizado alúmina, lana de vidrio, almidón, agar-agar, gel de sílice, etc.

Lección 1: Fundamentos de las separaciones electroforéticas

La sección transversal del aparato de electroforesis se puede reducir de forma drástica al realizar la electroforesis en el interior de un tubo capilar de diámetro interno menor a 0.1mm y una longitud de 50cm a 1m. Es efectivo llevar de ésta forma la técnica porque la resistencia eléctrica de la disolución es tan alta que la corriente se mantiene baja, en consecuencia se pueden mantener voltajes más altos sin calentamiento excesivo. La técnica tiene gran poder de resolución y se han desarrollado métodos para llevar a cabo la electroforesis incluso en moléculas neutras no iónicas.

Además, las zonas de analitos separados por electroforesis capilar se pueden detectar de igual modo que en una cromatografía en columna. El inconveniente de utilizar un capilar es que el volumen de muestra debe ser de alrededor de un nanolitro o menos, y después de la separación, cada uno

de los analitos está en volúmenes inferiores al nanolitro. Con volúmenes de líquido tan pequeños, muy pocos métodos de detección se pueden usar eficazmente.

Hay dos tipos de modalidades de separaciones: electroforesis ordinaria y electroforesis Capilar; la primera es la metodología clásica usada para la separación de mezclas complejas, de elevada masa molecular, estas separaciones se realizan sobre una capa delgada y plana ó una placa hecha de un gel semisólido y poroso que contiene una solución amortiguadora acuosa en el interior de sus poros. Esta una de las metodologías más usadas en el área de Bioquímica y en Biología, una de las características más importantes en la Electroforesis es que las especies deben tener un campo eléctrico, lo que trae consigo que las especies neutras no serán separadas.

En el caso de la electroforesis capilar, produce separaciones de alta velocidad y alta resolución con volúmenes pequeños (0.1 a 10nL) además las muestras son eluidas desde uno de los extremos del capilar por lo que se utilizan detectores cuantitativos para poder obtener la mayor información del análisis.

Lección 2: Velocidades de migración y alturas de plato

Como se mencionó de manera generalizada la velocidad de migración de un ion depende de la fuerza del campo eléctrico aplicado. A su vez, el campo eléctrico es proporcional a la magnitud del voltaje aplicado V e inversamente proporcional a la longitud L sobre la que se aplica:

Ecuación 22.
$$v = \mu_c \times \frac{V}{L}$$

Esta relación indica que es deseable aplicar voltajes elevados para obtener migraciones ópticas y separaciones rápidas.

Lección 3: Flujo electrosmótico.

Se denomina flujo electrosmótico a la migración del líquido hacia el cátodo y se evidencia cuando se aplica voltaje a un capilar de sílice que contiene una solución amortiguadora, la velocidad es considerada apreciable. La cantidad de platos teóricos en función del flujo electrosmótico se determina por la siguiente ecuación:

Ecuación 23.

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

Donde W como en la Cromatografía es la anchura de pico medida en su base. Es posible invertir el sentido del flujo normal añadiendo tensoactivos catiónicos a la solución amortiguadora (Castagnino, 1999).

Lección 4: Instrumentación

En la se presenta un esquema del equipo de Electroforesis capilar.

Figura 15. Esquema del equipo del Cromatografía de Electroforesis Capilar



Fuente: Skoog *et. al.*, 2001.

4.1. Inyección

Inyección de la muestra: Los métodos más utilizados para la incorporación de la muestra son la inyección electrocinética y la inyección por presión. La inyección electrocinética, consiste en introducir el material empleando una combinación de la bomba electroendosmótica y la movilidad electroforética.

La **inyección por desplazamiento** puede ser realizada por aplicación de la muestra con gas inerte a presión (por ej. nitrógeno) o por vacío en el extremo del capilar. **Inyección por diferencia de altura.** Idéntico efecto puede obtenerse por cambio en las alturas relativas de la muestra o de los viales de salida del buffer (inyección por gravedad) (Castagnino, 1999).

La inyección electroforética, produce un desplazamiento iónico, una zona de muestra, con analitos de distinta concentración que en la solución de la muestra. Si la fuerza iónica de la solución muestra es más baja que el buffer electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interfase muestra-buffer producen un efecto de enfoque o *stacking*, en el cual los iones del analito aparecen concentrados alrededor de la zona de la interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos de la sensibilidad y poder de resolución (Castagnino, 1999).

En el método de inyección por presión, el extremo del capilar por donde se introduce la muestra se coloca de manera momentánea en un pequeño recipiente que la contiene y se utiliza una diferencia de presión para conducirla al interior del capilar.

4.2. Voltajes

Las fuentes estabilizadas de corriente continua generan 10 a 30 KV y elevados campos eléctricos (100 a 500 v/cm) al capilar, pueden variar de 25 a 75 μm de diámetro interno, pudiendo llegar a 300 μm de diámetro externo. Las longitudes pueden llegar a 1 m, pero normalmente no exceden los 75 cm. En algunos aparatos, el capilar se ofrece dentro de un soporte de plástico en el cual se ha prealineado el capilar con una lente de microenfocado, para obtener una detección más sensible y estable. Los

cassettes de plástico que contienen el capilar son herméticos y en su interior se hacen circular líquidos refrigerados por efecto Peltier (Castagnino, 1999). Es imprescindible mantener la temperatura a los efectos de evitar la formación de gradientes térmicos que producen distorsiones en las bandas aisladas. Las zonas de falta de definición se reducen cuando se emplean capilares de 25 a 50 μm de diámetro interno, y de esta forma se permiten definir las zonas y aumentar la sensibilidad. La alta resistencia eléctrica del capilar limita la corriente y el calentamiento interno. Se logran campos eléctricos muy elevados (100 a 500 v/cm) con mínima generación de calor. El empleo de campos eléctricos muy elevados permite reducir drásticamente el tiempo de realización del examen, y la elevada relación del área al volumen disipa en forma eficaz el calor que se pueda producir (Castagnino, 1999).

4.3 Detección

Una amplia variedad de detectores han sido desarrollados para la EC (incluyendo fluorescencia, electroquímica y conductividad) pero los detectores más usados comercialmente son los que emplean el ultravioleta y UV visible. Los detectores son similares a los de la cromatografía líquida de alta performance, usando fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas. Las fuentes de luz generalmente provienen de un haz de luz entre un fotodiodo de referencia y un microenfocado óptico en el estuche del capilar.

El scanning es a través de un detector que ilumina el capilar con luz blanca luego dispersada y analizada a través de un policromador por arreglo de fotodiodos (detector PDA para óptica reversa).

Alternativamente, el sistema óptico convencional (forward optic) puede ser empleado por una banda espectral aislada por un monocromador colocado entre la fuente de luz y el capilar. El escaneo puede ser controlado rápidamente por un sistema computarizado que controla el movimiento del monocromador en el rango espectral en el tiempo de milisegundos. Este sistema de detección produce menos ruido de fondo, y mucha más sensibilidad que el detector con arreglo de diodos PDA, dentro de la gama encontrada en el mercado tenemos (**Tabla 4**):

Tabla 4. Detectores para Electroforesis Capilar

TIPO DE DETECTOR	LIMITES DE DETECCIÓN (attomoles detectados)
Para espectrometría	
Adsorción	1-1000
Fluorescencia	1-0.01
Lentes térmicas	10
Raman	1000
Quimioluminiscencia	1-0.0001
Espectrometría de masas	1 – 0.001
Para Electroquímica	
Conductividad	100
Potenciometría	1
Amperometría	0.1


Lección 5: Aplicaciones de la electroforesis Capilar.

La Electroforesis tiene múltiples aplicaciones, se usa como técnica a la resolución de proteínas y productos de biología molecular (análisis de pureza de oligonucleótidos, terapia génica, secuenciado de DNA y análisis de productos de PCR y de química forense).


Se han encontrado múltiples aplicaciones dentro de las que destacamos su aplicación en la industria cervecera en el cual se hace una determinación directa y simultánea de analitos presentes en cerveza, además de múltiples aplicaciones Biológicas y Bioquímicas.



FUENTES DOCUMENTALES

1. BAQUERO Q.M. (2004). Mecanismos y Aplicaciones de la Cromatografía líquida de alto desempeño. Editorial Universidad de Costa Rica.
 2. BRAITHWAITE, A. Métodos cromatográficos, 4ª ed., ED. Chapman & Hall, Londres, 1985. Páginas 216-217, 271-272.
 3. BROWN, G.; Salle, E. (2004). Química Cuantitativa. Editorial Reverte.
 4. BURRIEL M.; Conde, F.; Jimeno, S.; Hernández, J. (2008). Química analítica Cualitativa. Editorial Thomson.
 5. CAREY, F.A. (2004). Organic Chemistry 5ed. New York: Mc Graw Hill.
 6. CASTAGNINO, J.M (1999). Electroforesis capilar. TEMA: BIOQUIMICA Y FISICOQUIMICA. Reimpresión del artículo publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XXXIII, No. 3, 297-329.
 7. CHARLES A. L (1996). Review. Recent advances in ion chromatography: A perspective. Journal of Chromatography A, 739 p. 3-13.
 8. DOUGLAS A. Skoog (2007). Donald M. West, Química Analítica. Editorial Thomson. Séptima Edición.
 9. DOMINGUEZ, X. (1975). Cromatografía en papel y Capa Delgada; Monografía para el Departamento de Asuntos Científicos de la Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.
 10. GAUCHER, G. M. (1969). An Introduction to Chromatography. Am. Chem. Soc.
 11. GUIOCHON, G. (2002). Review Preparative liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 965pp.129-161.
 12. GUNFER Z. (1972) chromatography; analytical chemistry.
- 

13. HARRIS, D. (2007). Análisis Químico Cuantitativo; Editorial Reverte, España.
14. KARA-MURZA, S. (1992). El rechazo de la Innovación metodológica de la Ciencia: la sinergia de los motivos (la recepción del método cromatográfico por los Químicos). Academia de Ciencias (Moscú). LLULL, vol. 16 pág. 225-239.
15. MCNAIR, H. (1981). Cromatografía de Gases; Monografía para el Departamento de Asuntos Científicos de la Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.
16. MCNAIR, Harold; ESQUIVEL Benjamín; Cromatografía Líquida de alta presión; Monografía para el Departamento de Asuntos Científicos de la Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1973.
17. PARCHER, J. F. and Chester T.L. (2000). Unified Chromatography: What Is It? Chemistry Department, University of Mississippi, University. Am. Chem. Soc.
18. ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. (2003). Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas; Editorial Mc Graw Hill.
19. RUBINSON, K.; RUBINSON, J. (2001). Análisis Instrumental; Editorial Prentice Hall.
20. RONBINSON, J.; SKELLY, E.; FRAME, G. (2005). Undergraduate Instrumental Analysis; Sixth Edition; Ed. Marcel Dekker.
21. SKOOG, N. (2009). Principios de Análisis Instrumental. Editorial McGraw Hill, Cap.5.
22. STUART P.; Risby T.; Field L.; Wei-Lu Y. (1980). Gas Chromatography. *Anal. Chem.*, 52, 324R-360R.

- 
23. VARCACEL M. (1988). Técnicas Analíticas de Separación. Editorial Reverté.
 24. VALPUESTA, J.M. (2008). A la búsqueda del secreto de la vida: Una breve historia de la Biología Molecular; Editorial Hélice.
 25. WADE L.G. (2004). Química Orgánica 5ta ed. Madrid: Pearson - Prentice Hall.
 26. WANNA, S.; MONGKON R.; SURASAK, W.; PRASAK, T.; PISAN, K.; Gas Chromatography- Mass Spectrometry of some volatile metal β -diketonates; J.Sci.Soc. Thailand 21(1995).
- 