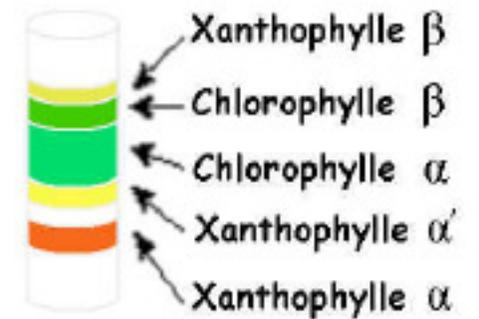
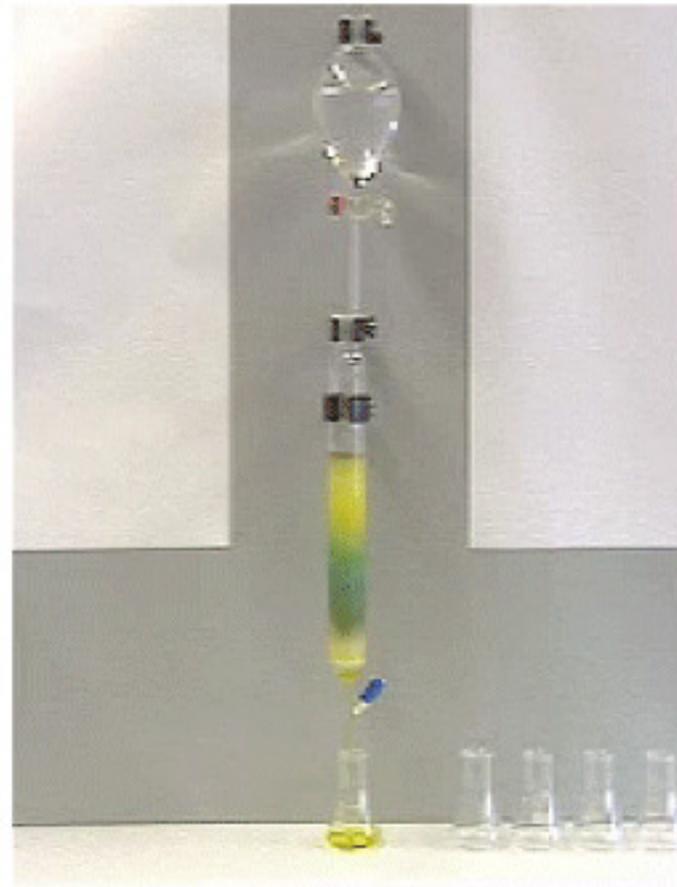
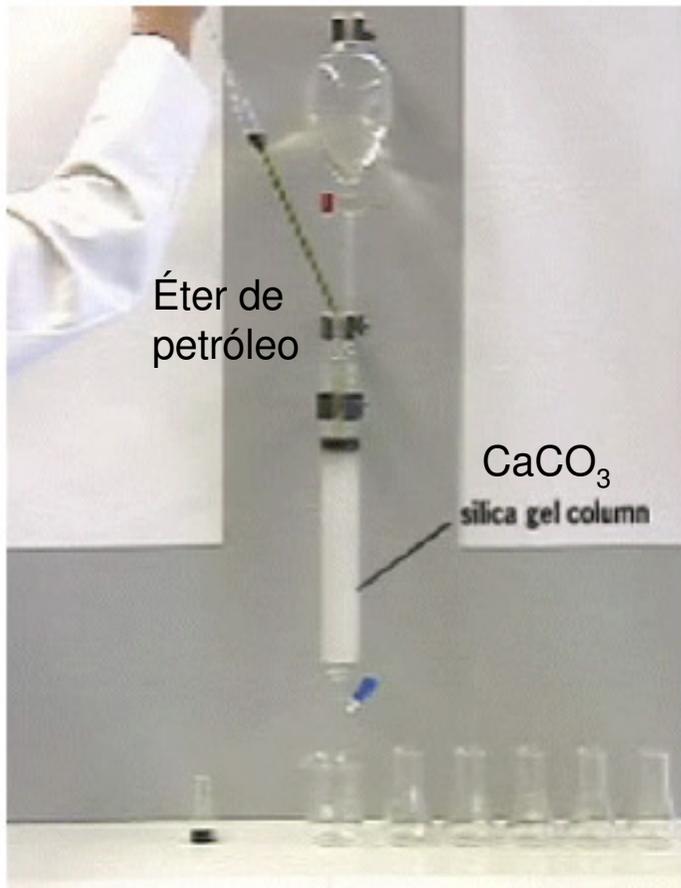


CROMATOGRAFÍA

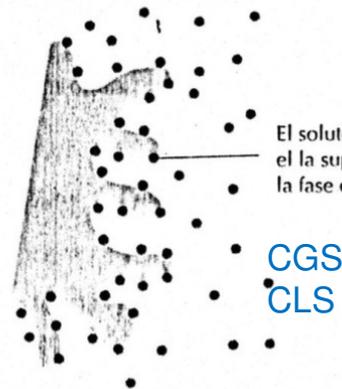
Conceptos generales

Invención de la cromatografía: Mikhail Tswett (1906)



La separación proviene de las distintas velocidades de migración de los componentes una mezcla.

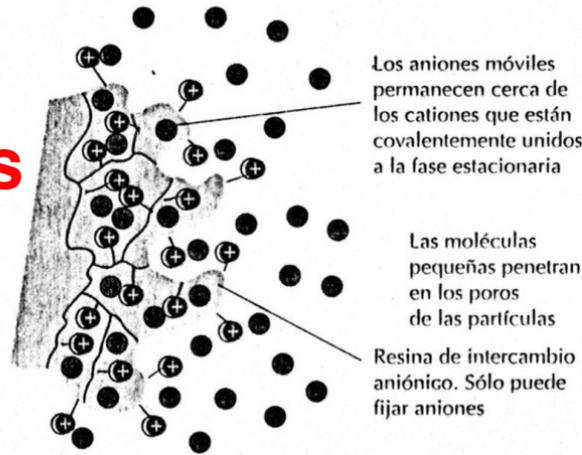
Distintos mecanismos de separación



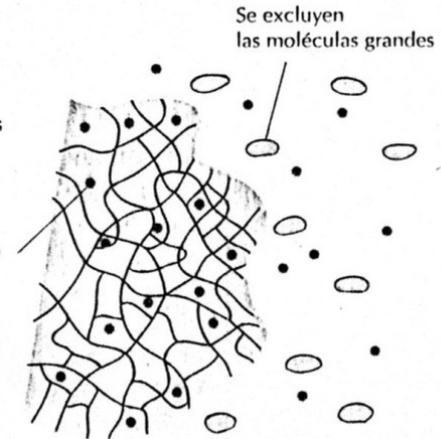
Cromatografía de adsorción



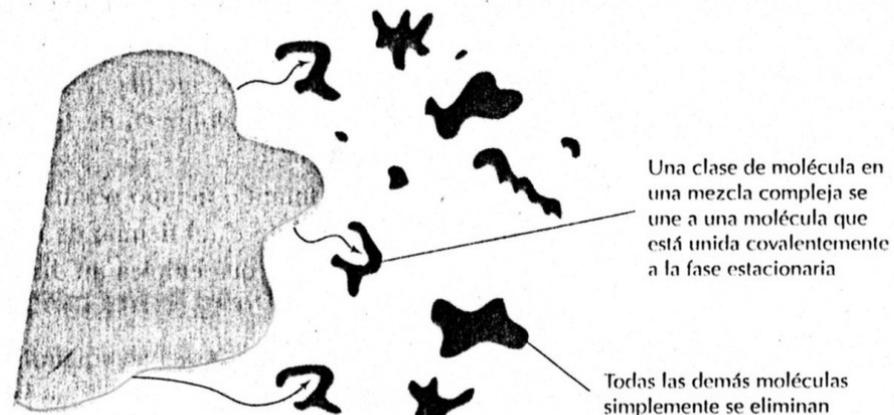
Cromatografía de reparto



Cromatografía de intercambio iónico



Cromatografía de exclusión molecular



Cromatografía de afinidad

Clasificación según el tipo de fase móvil



Cromatografía gaseosa

CGL

CGS

Reparto gas/ líquido

adsorción



Cromatografía líquida

CLL

CLS

CII

CE

Partición entre
líq. inmiscibles

adsorción

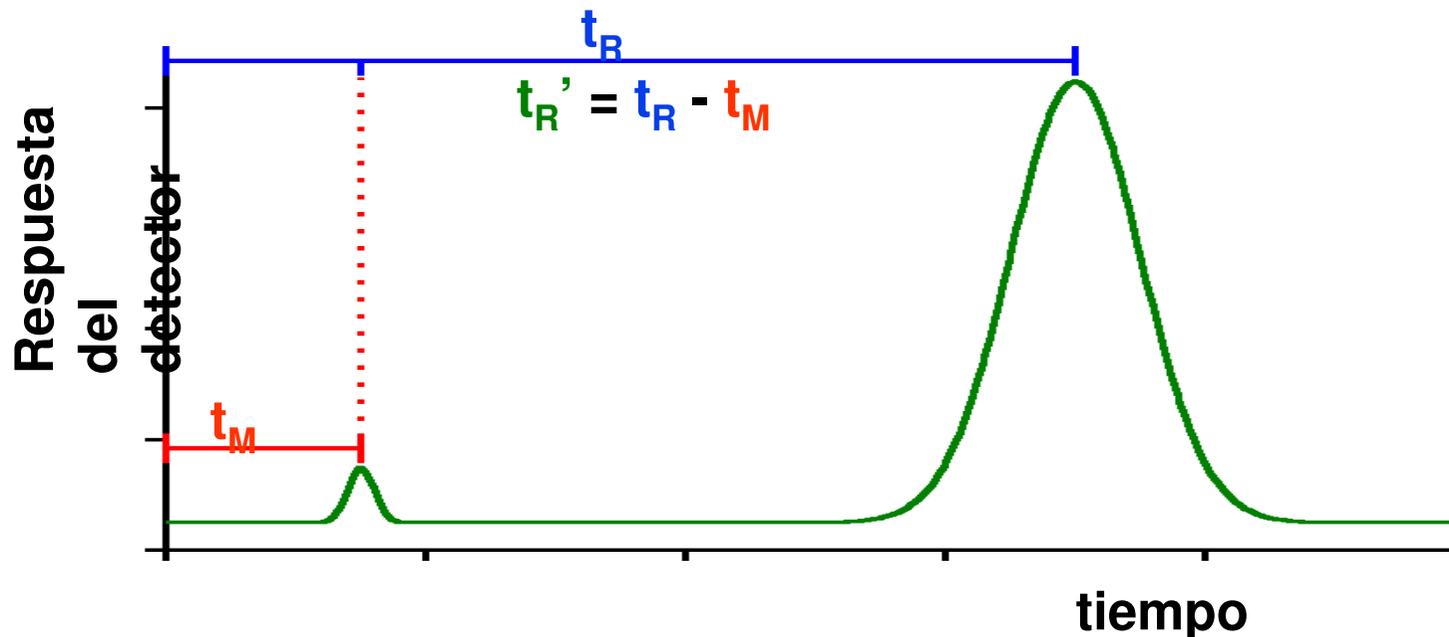
Int. iónico

tamizado

Qué es un cromatograma?

El parámetro directamente medible de retención de un analito es el

TEMPO DE RETENCIÓN CORREGIDO, t_R' :

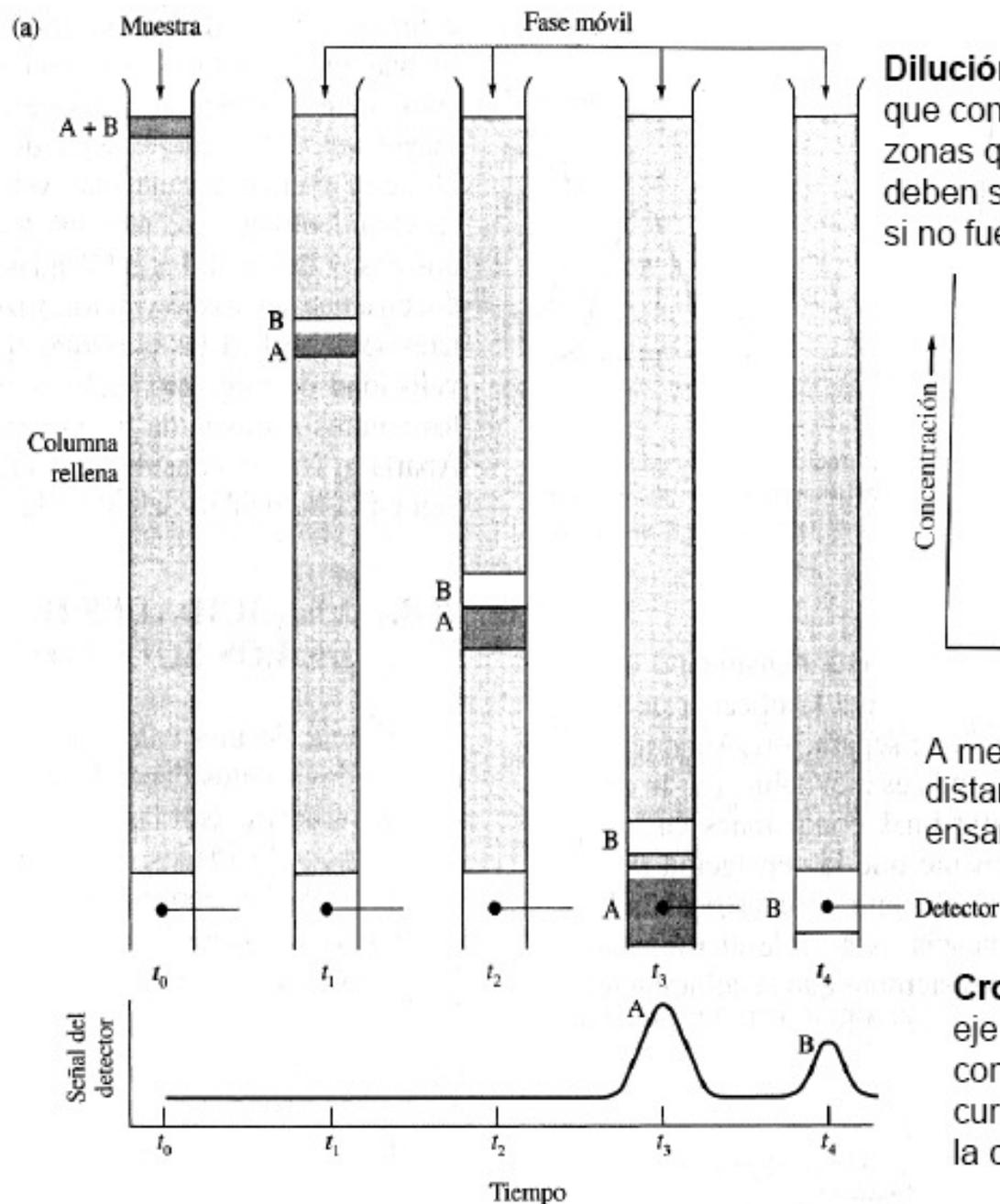


t_R = **Tiempo de Retención** (tiempo entre la inyección y el máximo de un pico cromatográfico)

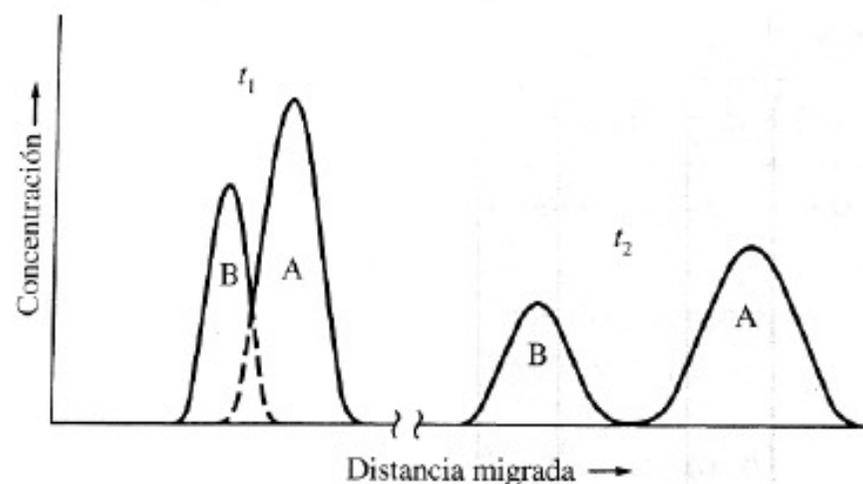
t_M = **Tiempo de Retención de un Compuesto No Retenido** (tiempo para que un compuesto que no interactúa con la FE pase a través de la columna)

t_R' = **Tiempo de Retención Corregido** (tiempo medio que el analito pasa retenido en la FE)

Elución en columna



Dilución del analito: el tamaño de la banda original que contiene los analitos es más pequeña que las zonas que llegan al detector. Por lo tanto los detectores deben ser más sensibles que los que serían necesarios si no fuera imprescindible la separación.



A medida que aumenta la migración, aumenta la distancia entre las bandas, pero estas se ensanchan, disminuyendo la eficacia de la columna.

Cromatograma: La *posición* de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra y el *área* bajo la curva proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

Ejemplo: CGL

Columna cromatográfica: serie de etapas independientes donde se establece el equilibrio entre el analito disuelto en la fase estacionaria y el gas portador:



Ocurre un “cuasi-equilibrio” entre el analito retenido por la FE y el presente en el gas portador.

$$K_c = \frac{[A]_s}{[A]_M}$$

K = Constante de Distribución

$[A]_s$ = concentración de analito en FE

$[A]_M$ = concentración de analito en el gas

↓ *Afinidad por la FE*



↓ $[A]_s$

MENOR RETENCIÓN !!!

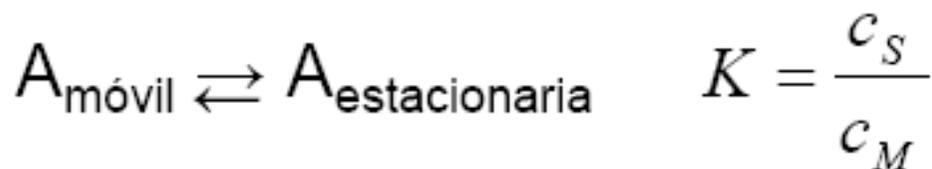
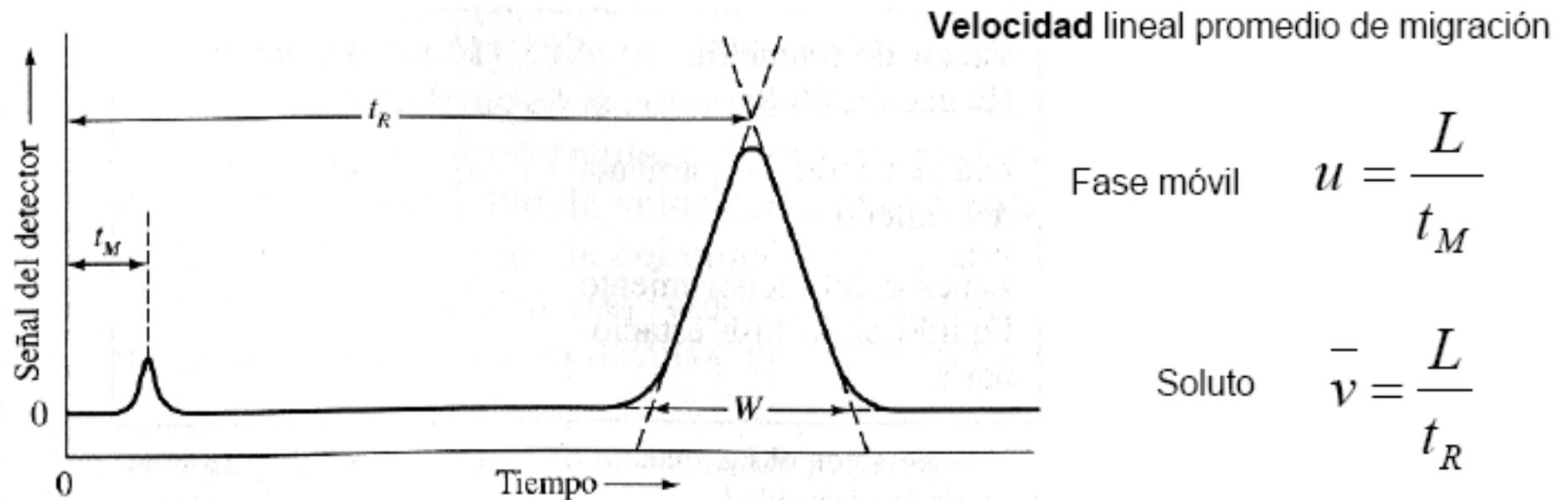
↑ *Volatilidad*



↑ $[A]_M$



Velocidades de migración de los solutos



constante de distribución: cromatografía lineal

Tener en cuenta que NO hay un equilibrio ya que no se puede alcanzar con la fase móvil moviéndose continuamente

K' : factor de retención o de capacidad

α : retención relativa o factor de selectividad

$$\frac{L}{v} = \frac{L}{t_R} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + K V_S / V_M} = u \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

Factor de retención o de capacidad

Factor de selectividad (definido mayor que 1)

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

definición

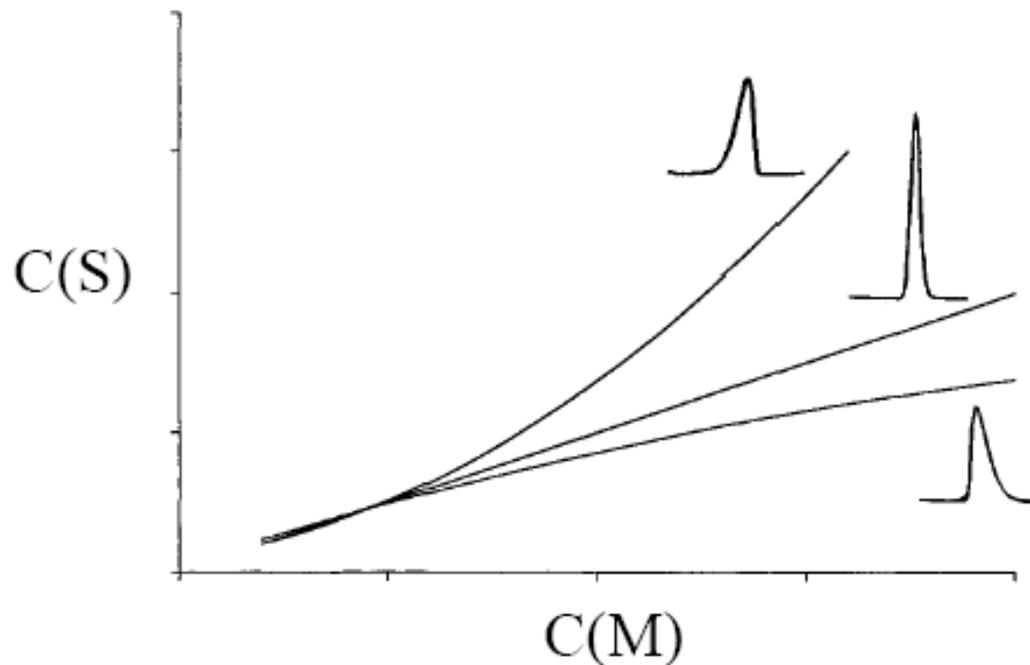
2 \square k' \square 5

Cómo se calcula del cromatograma

Forma de los picos cromatográficos

Se asume que la constante de distribución es constante y por lo tanto un gráfico de $C(S)$ vs $C(M)$ es lineal.

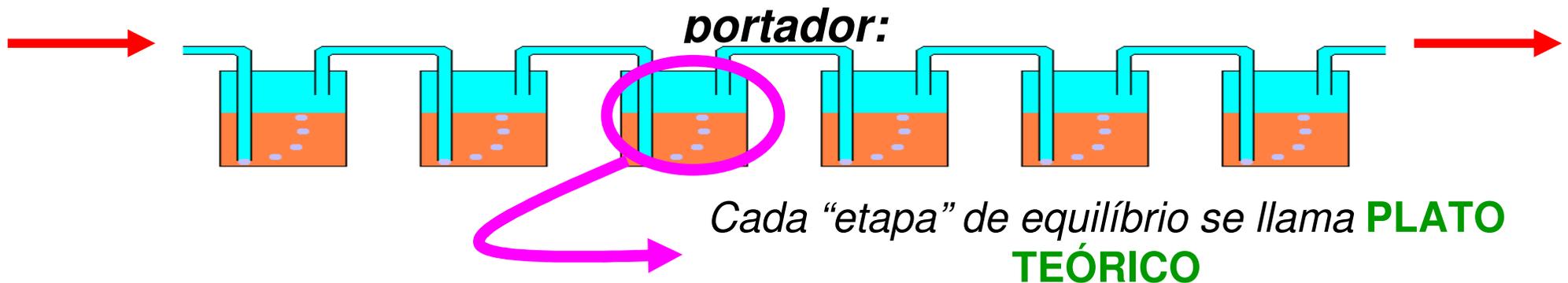
Isotermas no lineales ($C(S)$ vs $C(M)$ a T cte) se observan en ciertos casos y resultan en picos asimétricos y tiempos de retención que dependen en la concentración del analito en la fase móvil y por lo tanto en el tamaño de las muestras inyectadas.



Descripción de la eficiencia de la columna

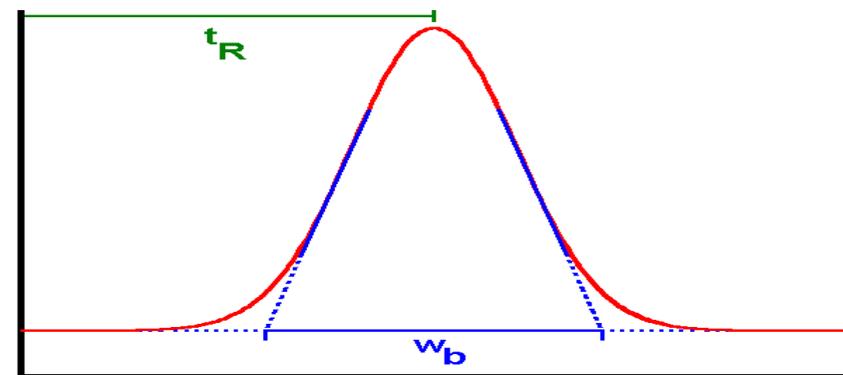
Teoría de los platos (Martin y Synge, 1941)

Suponiendo la columna cromatográfica como una serie de pasos separados donde ocurre el equilibrio entre el analito, la FE y el gas portador:

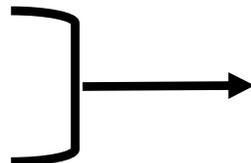


El número de platos teóricos de una columna (N) puede ser calculado:

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



↑ t_R
↓ w_b



↑ **N**

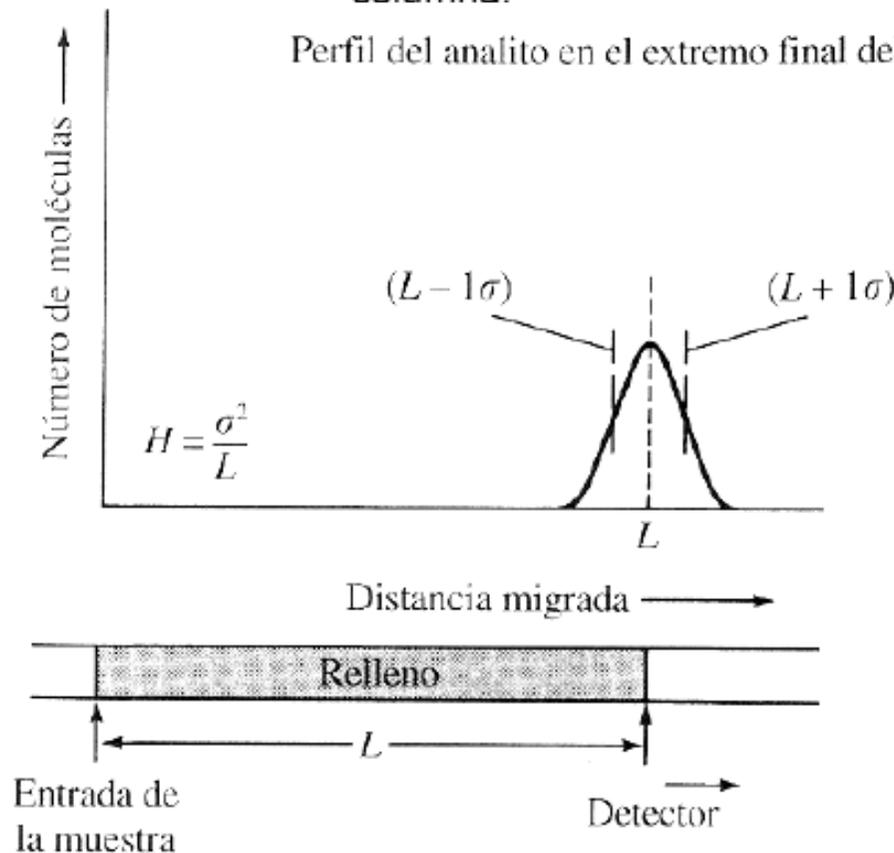


Columna más eficiente

Teoría de los platos (Martin y Synge, 1941)

$$N = \frac{L}{H}$$

La eficacia de la columna aumenta cuanto mayor es el número de platos (N) y cuanto menor es la altura del plato (H). (L es la longitud del relleno de la columna). Tanto N como H se toman como medidas de la eficacia de la columna.



El ancho de la curva gaussiana está relacionado con la varianza o la desviación estándar. Y definimos la eficacia en los términos de la varianza por unidad de longitud

$$W = 4\sigma$$

Por lo tanto, H y N se pueden determinar a partir de un cromatograma:

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

- Explica la forma Gaussiana de los picos
- No explica el ensanchamiento de las bandas

Teoría cinética de la cromatografía (Van Deemter, 1956)

Tomamos a H como una medida inversa de la eficacia de la columna

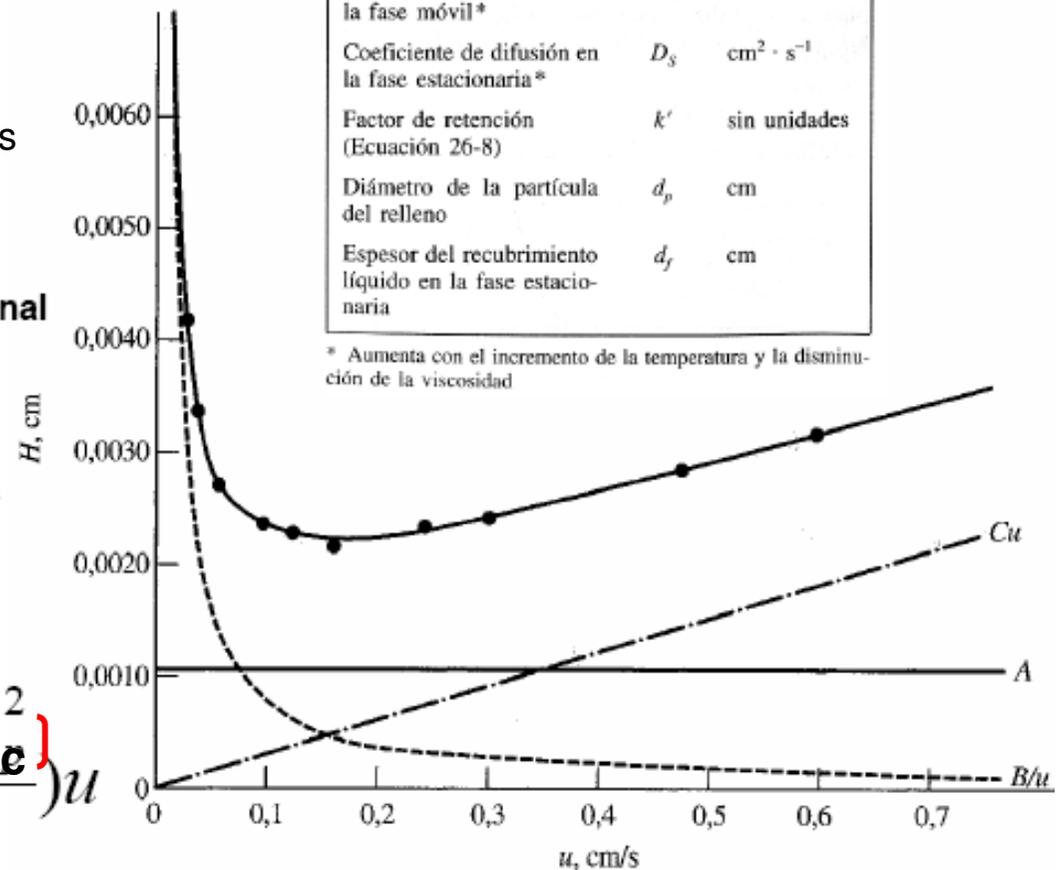
$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

$A = 2\lambda(d_p)$ Caminos múltiples de flujo
Difusión por remolinos

$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma(D_M)}{u}$ Difusión longitudinal
Transferencia de masa entre las fases

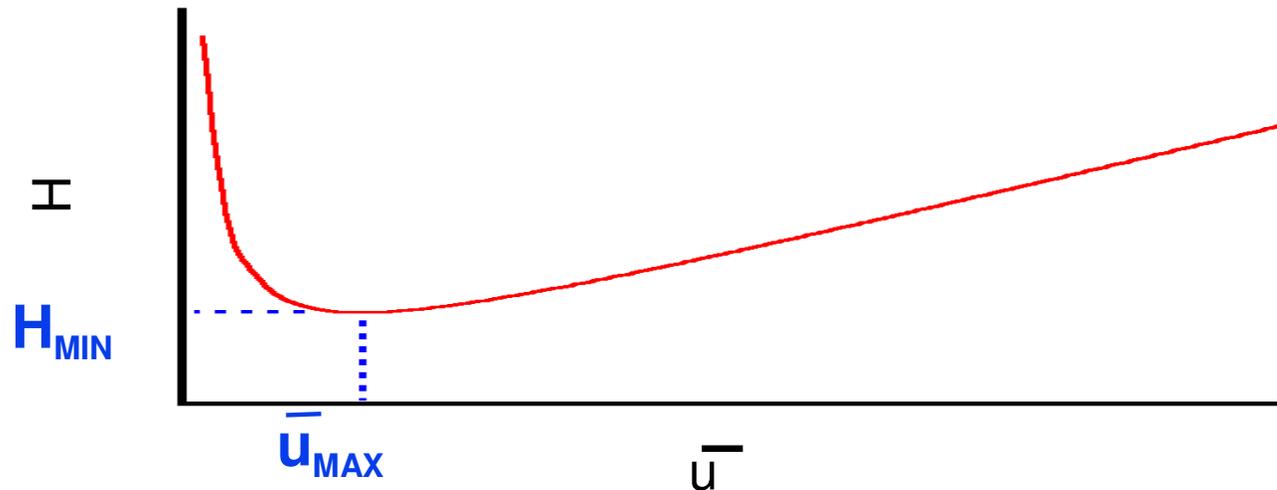
$Cu = (C_S + C_M)u =$
 $= \left(\frac{f_S(k')d_f^2}{D_S} + \frac{f_M(k')d_e^2}{D_M} \right) u$

Variable	Símbolo	Unidades habituales
Velocidad lineal de la fase móvil	u	$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Coefficiente de difusión en la fase móvil*	D_M	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Coefficiente de difusión en la fase estacionaria*	D_S	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Factor de retención (Ecuación 26-8)	k'	sin unidades
Diámetro de la partícula del relleno	d_p	cm
Espesor del recubrimiento líquido en la fase estacionaria	d_f	cm



* Aumenta con el incremento de la temperatura y la disminución de la viscosidad

La altura equivalente de plato teórico es función de la velocidad lineal media del portador \bar{u} :



El valor de H puede ser minimizado optimizando el flujo de gas de arrastre

Relaciones entre H y \bar{u}

- Columnas Empacadas: Ecuación de van Deemter

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u}$$

(A, B, C = constantes)

- Columnas Capilares

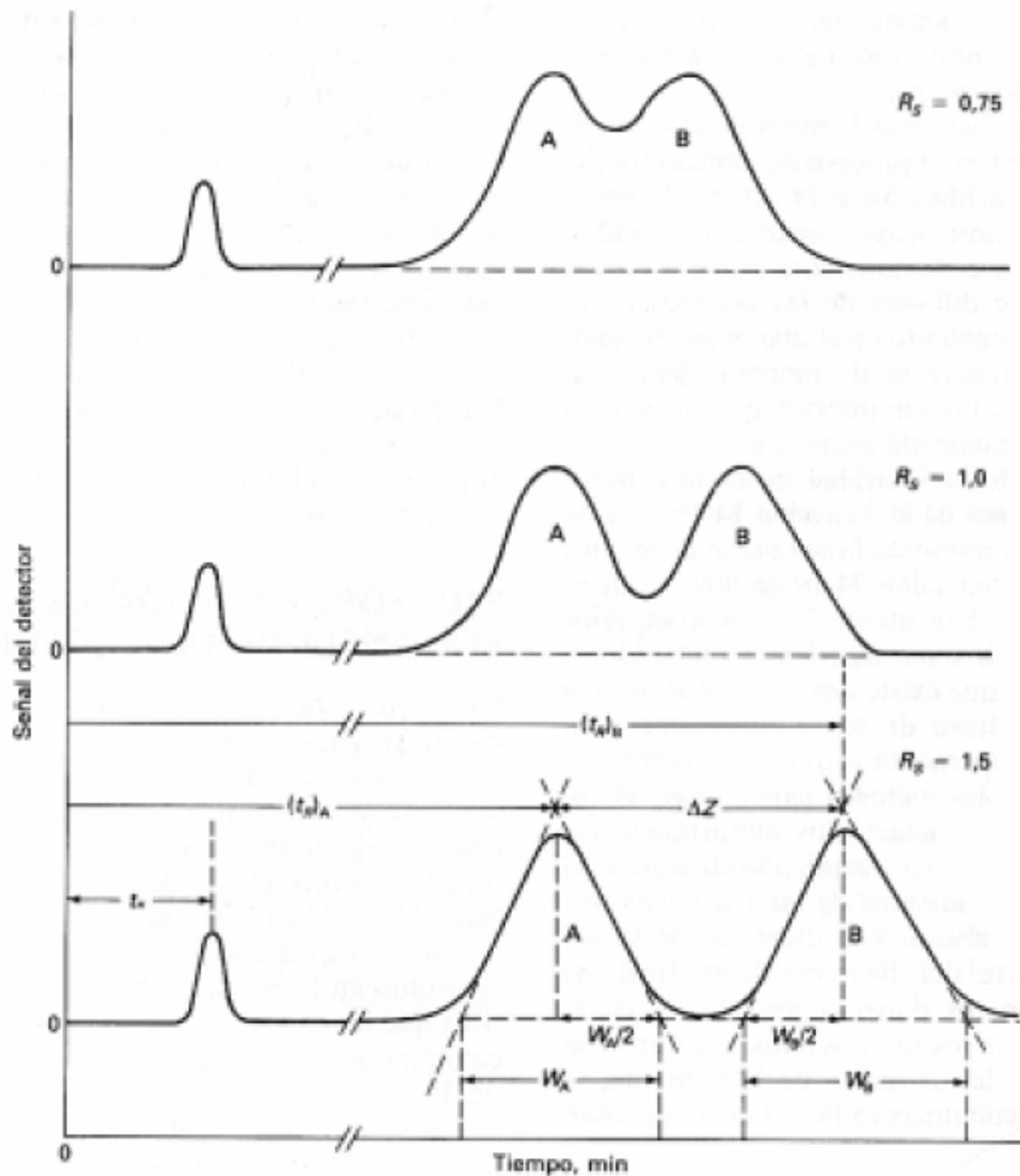
$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_M + C_S) \cdot \bar{u}$$

(B, C_M , C_S = constantes)

Resolución

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_B + w_A} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

Para una fase estacionaria determinada, la resolución puede aumentarse alargando la columna (y así aumentando el número de platos). La consecuencia negativa es el incremento del tiempo requerido para la separación.



$$R = f(N, \alpha, k'_B)$$

Resolución y tiempo de análisis

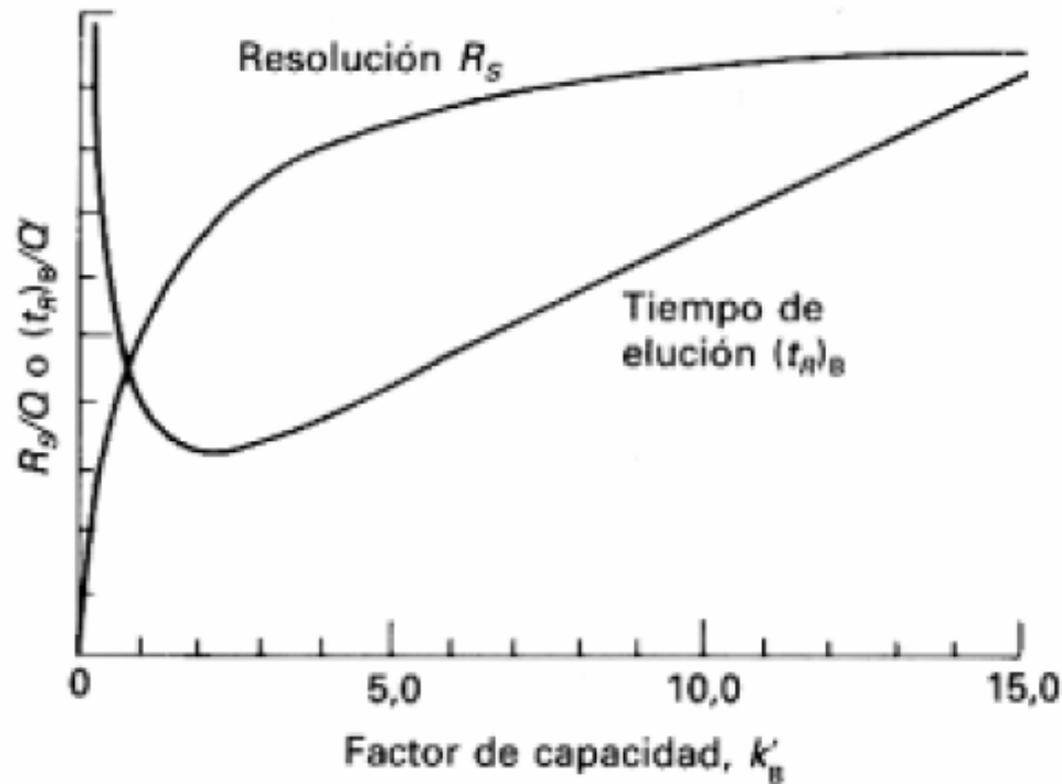
$N = L/H \rightarrow$ columna, efectos cinéticos, ensanchamiento de banda

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha_{A,B} - 1}{\alpha_{A,B}} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

Partición f.móvil/f.estacionaria, efectos termodinámicos

$$t_{R,B} = \frac{L}{v_B} = \frac{NH(1 + k'_B)}{u} = \frac{16R_S^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k'_B)^3}{k'_b{}^2}$$

Se busca alta R y bajo $t_{R,B}$



➔ k' óptimo entre 2 y 5 aproximadamente

Fase móvil **GAS** : mejorar k' por variación de T° (**programación de temperatura**)

Fase móvil **LÍQUIDO** : mejorar k' cambiando la composición del solvente (**elución en gradiente**)