



Universidad Nacional de Misiones  
Facultad de Ciencias Exactas Químicas Y Naturales



## Química Analítica 2023

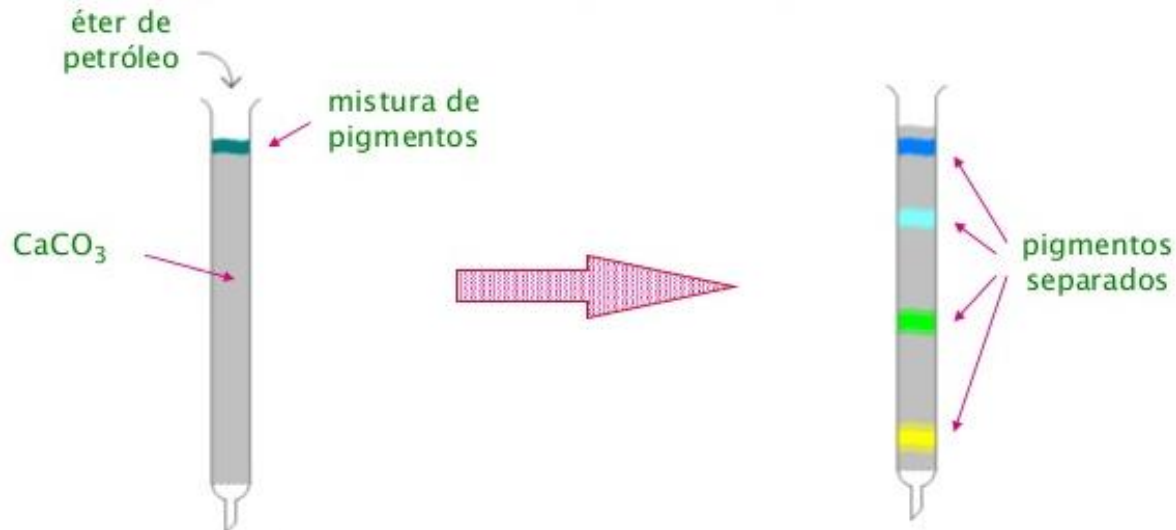
# CROMATOGRAFÍA

## PARTE 1

*Ing. Valeria D. Trela*  
*valeriatrela@gmail.com* **1**

# HISTORIA

- La CL fue la primera en aparecer.
- Botánico ruso Mikhail Tswett (1903).
- Separó componentes coloreados de un extracto de plantas



Cromatografía  
Kroma [color] + graph [escribir]  
griego

# ¿Qué es la cromatografía?

Es un método físico de **separación** basada en las interacciones de los compuestos entre dos fases, la fase móvil y la fase estacionaria pasando por un medio soporte.

Fase móvil



La fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria, acarreando una mezcla de en la que se encuentra el analito

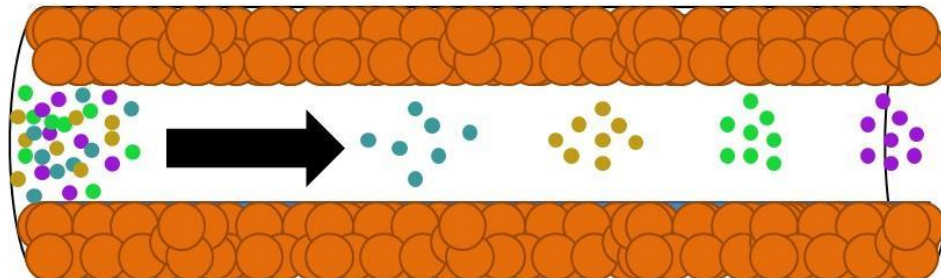
Gas  
Líquido  
FSC

Fase  
estacionaria



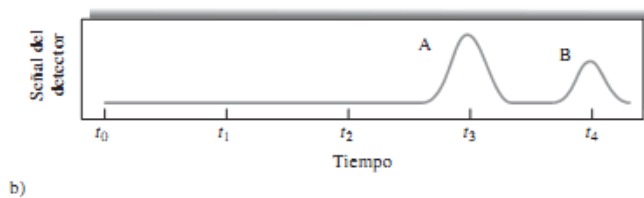
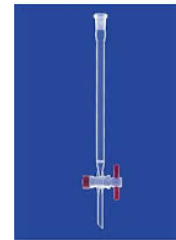
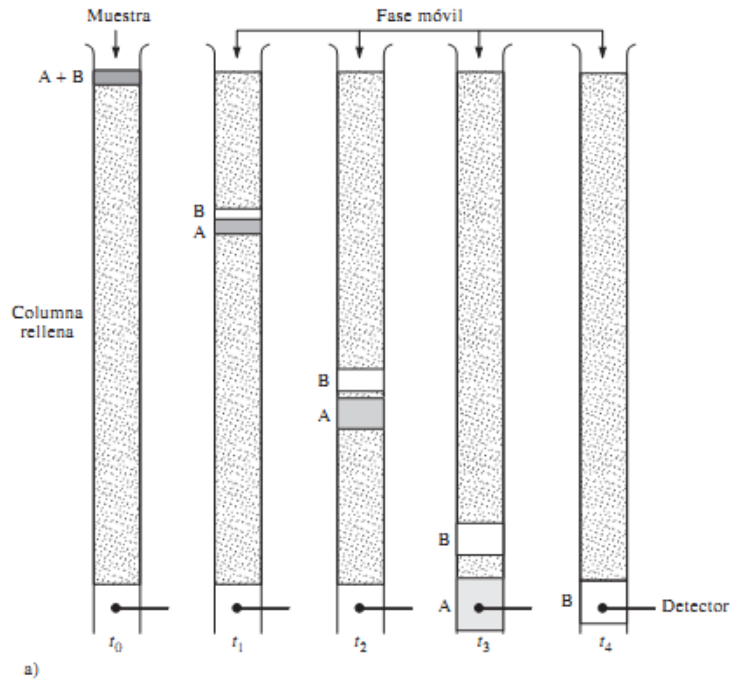
Consiste en un sólido o líquido fijado a un sólido por donde atraviesa la fase móvil.

Se adhiere a un  
medio soporte



## CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Diferencias en las propiedades de la fase móvil posibilitan que los componentes de la muestra se separen a través del material cromatográfico, con velocidades desiguales generando la separación



<https://gfycat.com/helplessserenefrogmouth-cromatografo-de-gases-fase-estacionaria>

# Clasificación de las técnicas cromatográficas:

Según naturaleza de sus fases:

Líquido-Líquido  
Gas-Líquido  
Líquido-Sólido  
Gas-Sólido

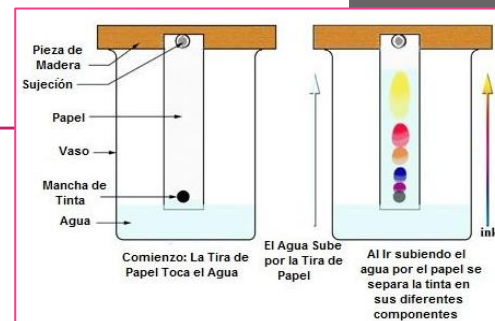
Según naturaleza  
del soporte de la FE:

## Cromatografía plana:

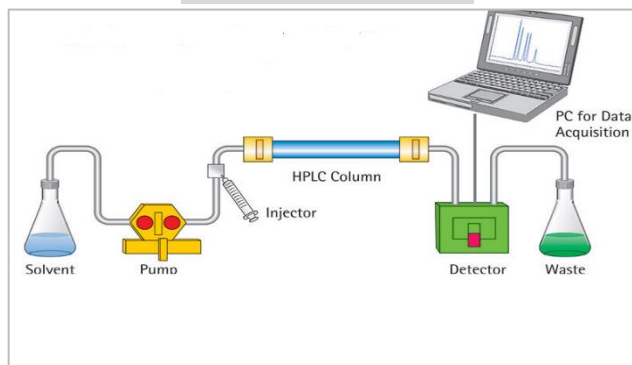
- En papel
  - En capa fina
- La FM se mueve por acción capilar o por gravedad

## Cromatografía en columna:

- Cromatografía de gases (CG)
  - Cromatografía líquida (CL)
    - L-L
    - S-L
- La FM se mueve por gravedad o bajo P



## HPLC



## Cromatografía de alta eficiencia o rendimiento

- Se basa en los mismos principios que la cromatografía a baja presión.
- Tiene mejor resolución.
- Menores tiempos
- Mejor reproducibilidad
- El material empacado en las columnas está formado por pequeñas partículas de tamaño muy uniforme y gran rigidez
- Permite trabajar con flujos altos para lo que requiere aplicar presión.

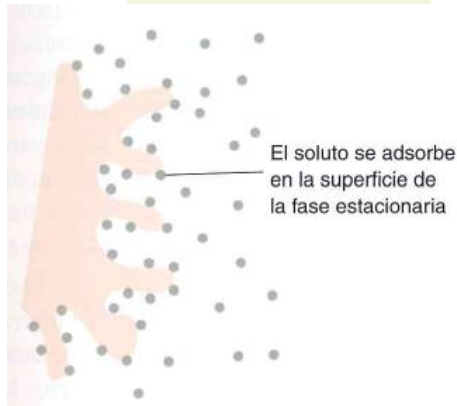
# Clasificación de las técnicas cromatográficas:

Según el equilibrio entre las fases (mecanismo de separación):

Tipo	Fase estacionaria	Fase móvil	Disposición fase estacionaria	Composición fase móvil	Temperatura fase móvil
Partición o reparto	Líquido	Líquido-gas	Columna	Isocrática	Isoterma
Adsorción	Sólido	Líquido - gas	Plana (papel o capa fina)	Gradiente	Gradiente
Intercambio iónico	Resina (sólido) con grupos cargados	Líquido			
Exclusión molecular	Gel poroso	Líquido			
Afinidad	Sólido	Líquido			

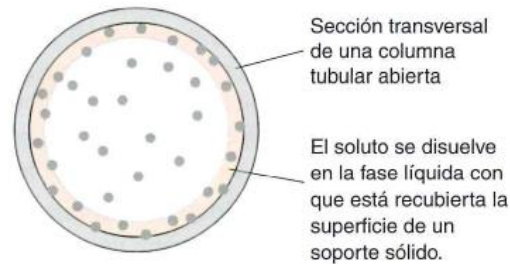
# Mecanismos de separación cromatográfica

## Adsorción



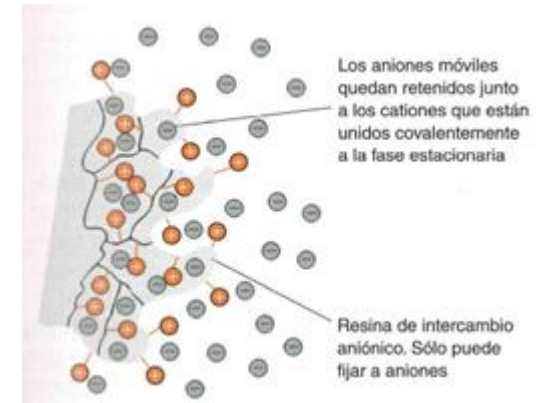
- Es un fenómeno superficial
- FE: sólido
- FM: Líquido o gas

## Reparto



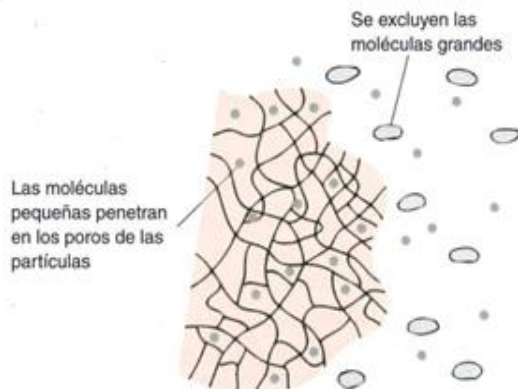
- El soluto se equilibra entre el líquido de la FE y la FM por diferencia de solubilidad
- FE: Líquido
- FM: Líquido o GAS

## Intercambio iónico



- Existen aniones o cationes unidos covalentemente a la fase estacionaria sólida (resina).
- Los iones en disolución de carga opuesta son atraídos a la fase estacionaria por fuerzas electrostáticas.
- Fase estacionaria: sólido
- Fase móvil: líquido.

## Exclusión molecular, permeabilidad o por tamaño



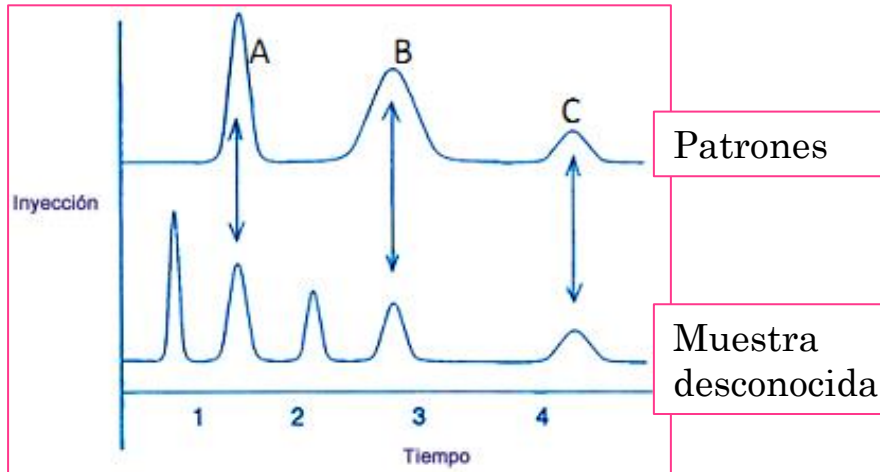
- Filtración molecular a través de la red de un gel.
- Almidón, agar-agar, látex natural.
- Separa moléculas por su tamaño.
- No hay una interacción atractiva entre las fase estacionaria y el soluto.
- Las moléculas grandes pasan más rápidamente que las pequeñas

# Análisis cualitativo

- Tiempo de retención de un determinado analito
- Posición en la fase estacionaria



Se puede determinar presencia o ausencia de componentes.

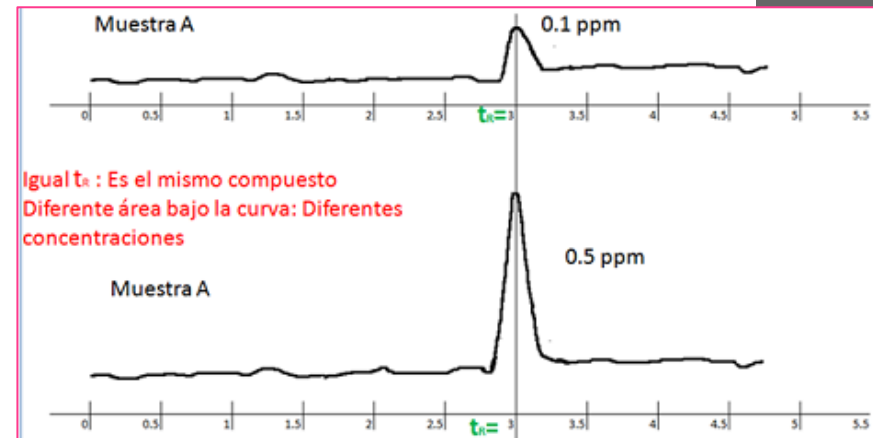


# Análisis cuantitativo

- Comparación de altura o de área de picos.



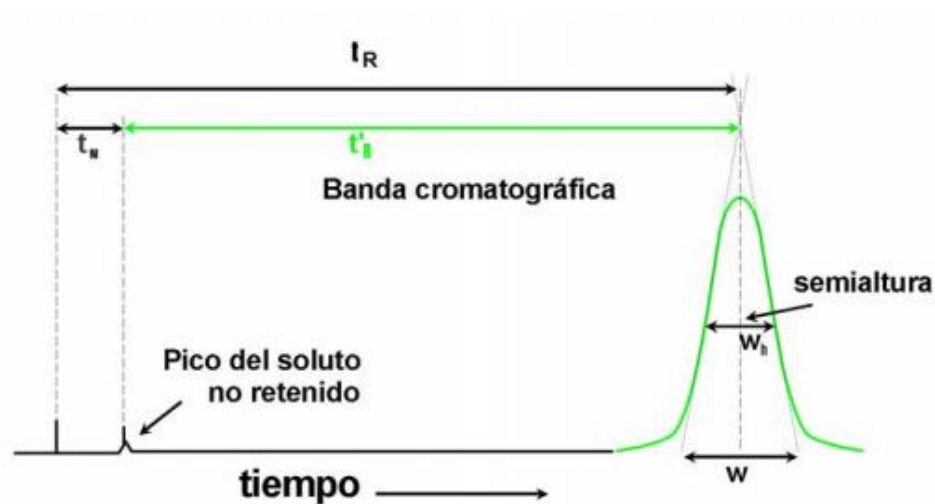
Se puede determinar la concentración de componentes.





# Parámetros cromatográficos:

## Cromatograma



**$t_M$** : tiempo muerto. Representa el tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector y proporciona una medida de la velocidad promedio de migración de la fase móvil

**$T_s$** : tiempo de retención corregido del analito que pasa por la fase estacionaria.

**$t_R$** : tiempo de retención total. Es el tiempo requerido para que el analito llegue al detector después de la inyección de la muestra.

$$t_R = t_S + t_M$$

**$V_R$** : Volumen de retención. Es el V que eluye de la columna desde la inyección de la muestra hasta que se produce el máximo pico correspondiente a una sustancia que ha interactuado con la fase estacionaria.

**$W_b$** : ancho de pico en la fase. Se obtiene trazando las tangentes en los puntos de inflexión a ambos lados del contorno de banda del analito.

# Parámetros cromatográficos:

## Constante de reparto o coeficiente de distribución (K)



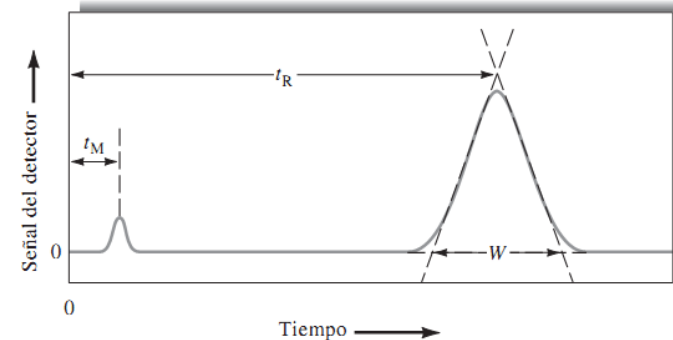
$$K = \frac{[\text{Solute}]_{FE}}{[\text{Solute}]_{FM}} = \frac{n_{FE}/V_{FE}}{n_{FM}/V_{FM}}$$



- Está relacionado con el grado de interacción del soluto con la FE y FM
- $n_{FE}$  y  $n_{FM}$  representan la cantidad de soluto en cada fase en equilibrio.

## Factor de retención o de capacidad (k)

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$



- Es un parámetro experimental.
- Expresa la retención de un compuesto por la fase estacionaria independientemente del caudal de la fase móvil.
- Medida de retención del soluto.
- Sirve para comparar las velocidades de migración de los solutos en la columna.
- Indica que tan lejos del  $t_M$  eluye el analito
- $k'$  debe estar entre 1 y 15 con el fin de no alargar excesivamente los tiempos de separación

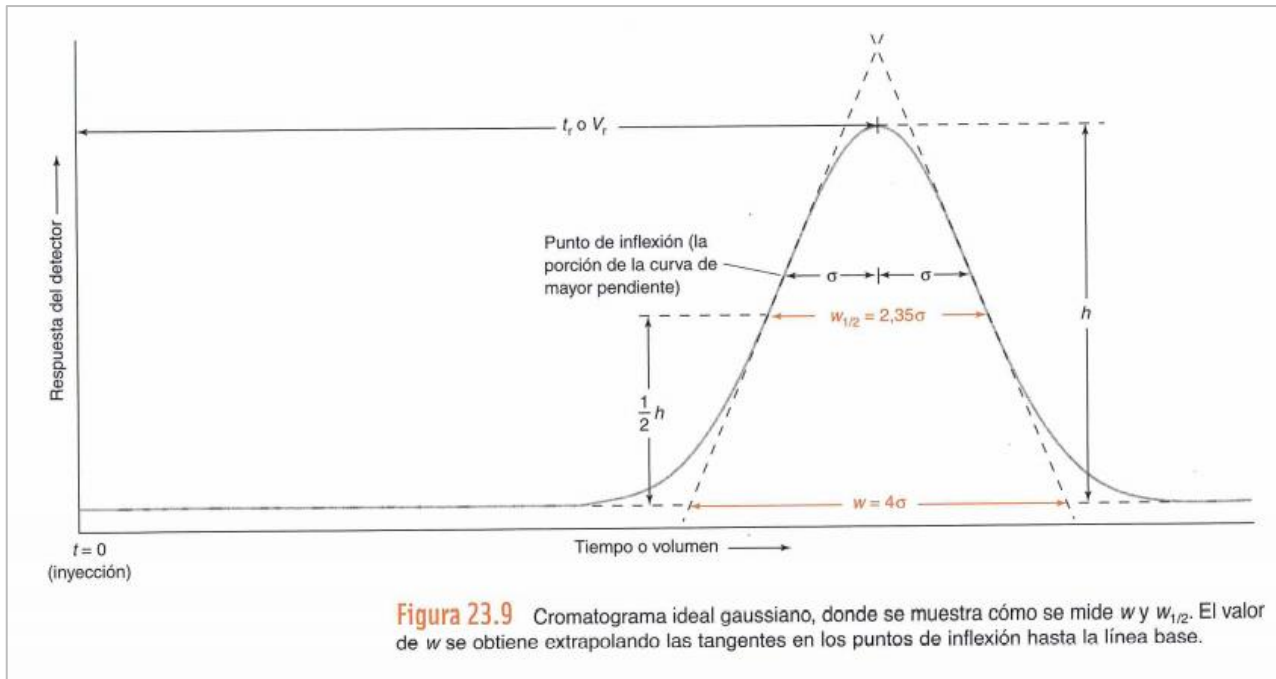
*Cuando  $k'$  es  $\leq 1.0$  la separación es pobre*

*Cuando  $k'$  es  $\geq 30.0$  la separación es lenta*

*Cuando  $k'$  es  $= 2-10.0$  la separación es óptima*

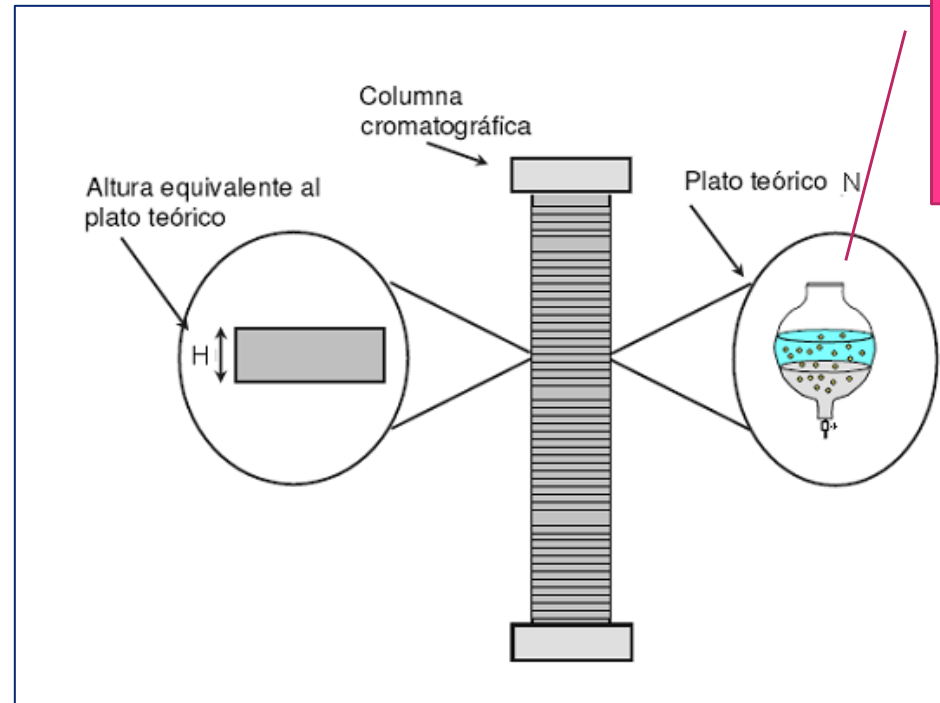
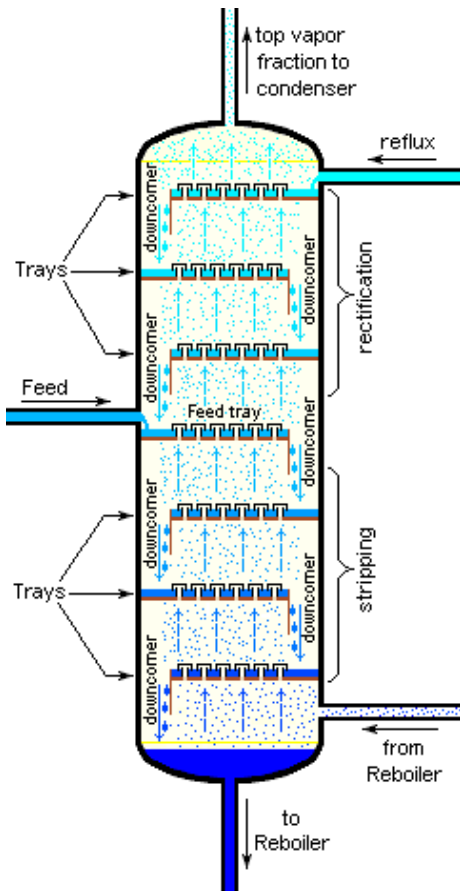
# Parámetros cromatográficos:

- Altura de pico
- Ancho
- Área



# Parámetros cromatográficos:

## PLATO TEORICO



Equilibrio  
entre el  
soluto y la  
FM y la FE

N: total de platos teóricos  
H: altura de los platos

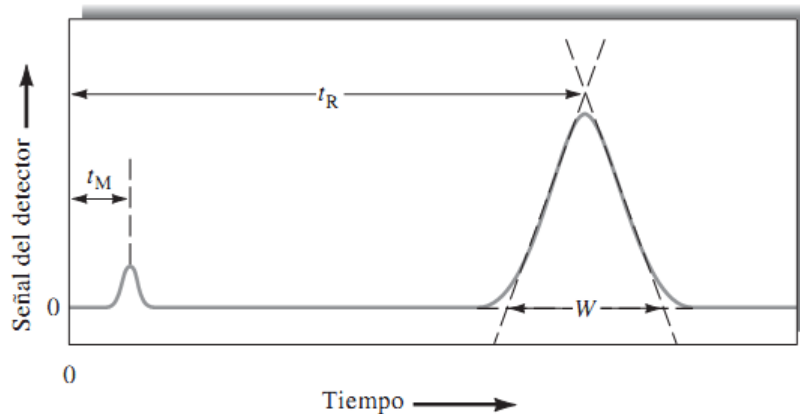
Para un determinado analito, se relaciona con el número de equilibrios que se pueden establecer dentro de la columna (N)

Al tener mas platos teóricos en la columna es posible más equilibrios y **mejor calidad de separación.**

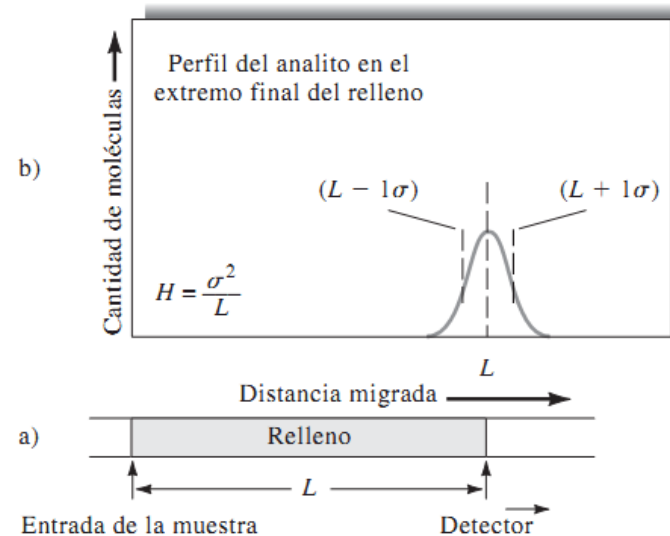
# Parámetros cromatográficos:

## Número teórico de platos (N)

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,55 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



## Altura de plato (H)



- Las bandas cromatograficas son generalmente curvas gaussianas que se caracterizan por la desviación estándar  $\sigma$  (ancho de la mitad en el punto de inflexión) o la varianza  $\sigma^2$ .
- La eficiencia de la columna se refleja en el ancho del pico.
- Se usa la varianza  $\sigma^2$  por unidad de longitud como medida de la eficiencia de la columna

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

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

Eficiencia de la columna



↑↑↑ N

↓↓↓ H

## Poder de separación

A mayor numero de platos teóricos (N), se logra mayor separación:

- El poder de separación es mayor
- Se pueden separar mezclas mas complejas
- Se pueden separar analitos mas parecidos

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,55 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

**W (ancho de pico) del pico está relacionado:**

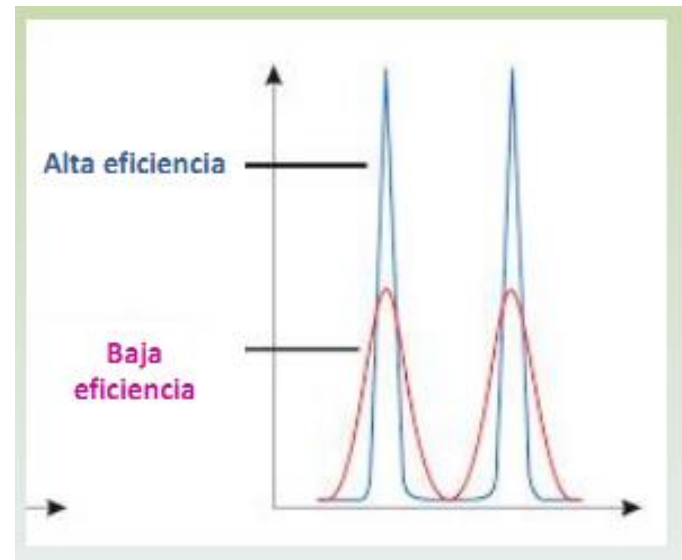
- Directamente con el tiempo de residencia en la columna
- Inversamente con la velocidad con la que fluye la FM.

## Eficiencia

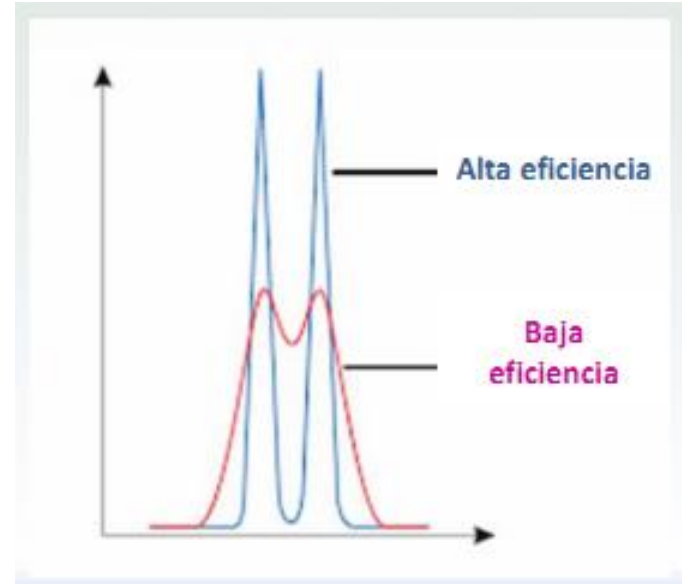
$$H = \frac{L}{N}$$

H mide la eficiencia de la columna cromatográfica

- Entre mas pequeño sea H, es sistema es mas eficiente (mayor numero de platos teóricos por metro)
- Para una misma longitud se logra mayor poder de separación con una menor H



Los picos deben ser agudos, es decir W pequeños



Una baja eficiencia terminara complicando la resolución, es decir, los picos no se separan

# Parámetros cromatográficos:

## Factor de selectividad

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

Retención relativa

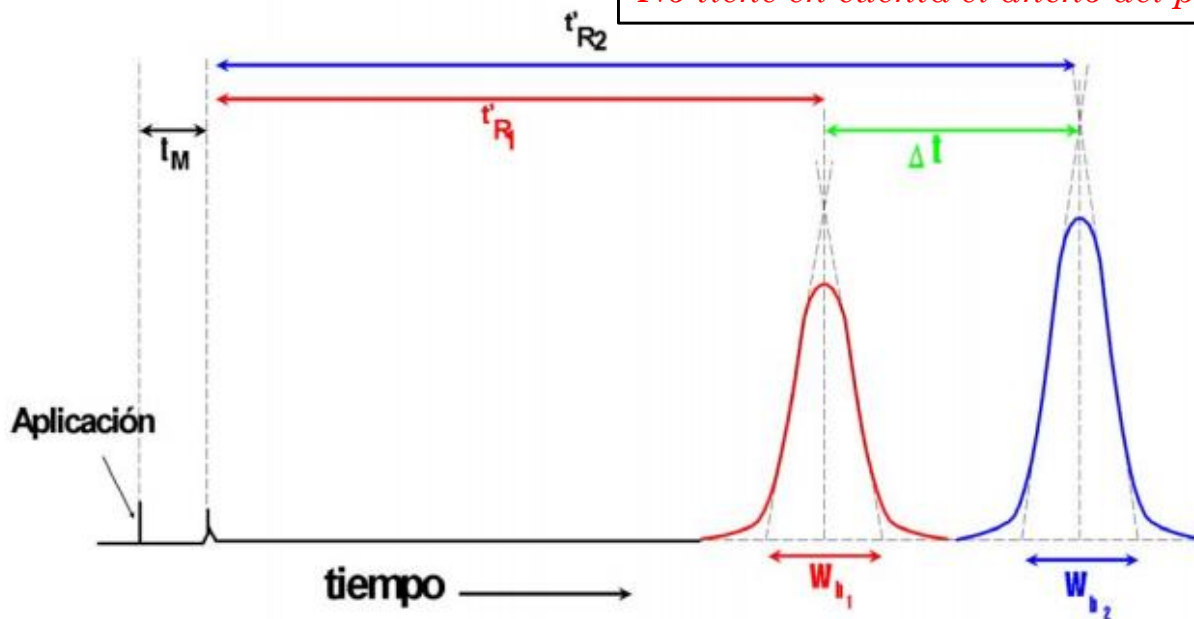
Es indicativo de separación, que tan separados están los picos.  
Valores altos indican una mejor separación.

Valores bajos indican que están saliendo juntos los analitos

$\alpha > 1$

*Indica el potencial de separación de dos solutos, pero no mide la separación real*

*No tiene en cuenta el ancho del pico.*



$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

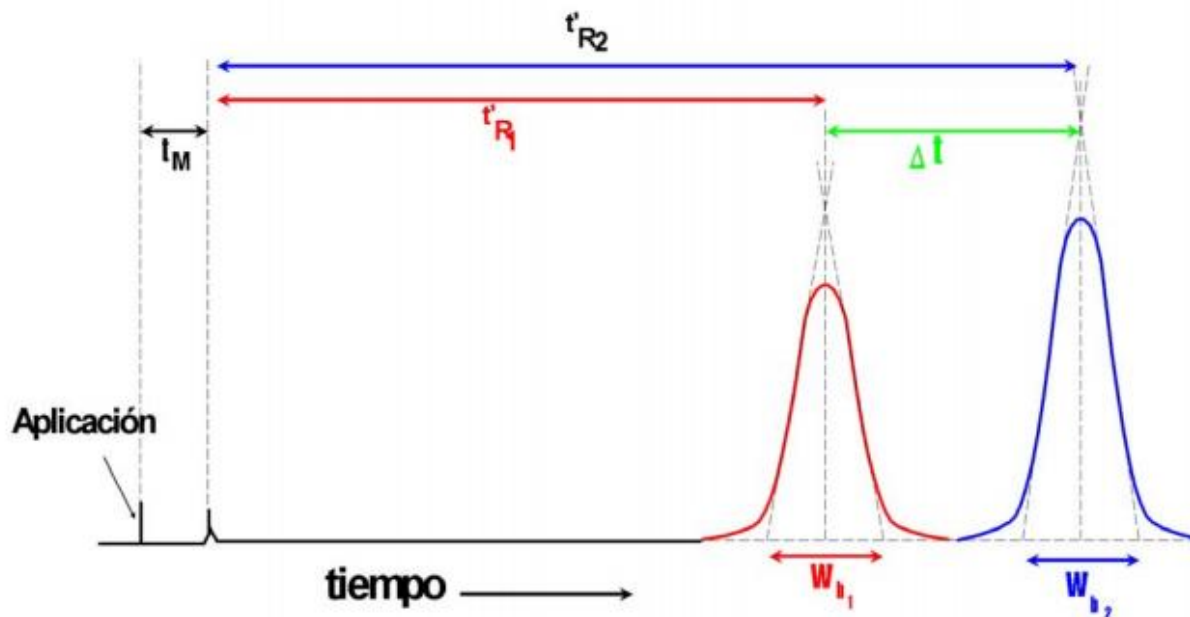
$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

Figura 3.- Cromatograma de dos bandas y parámetros para calcular eficacia y resolución

# Parámetros cromatográficos:

## Resolución de la columna

Indica qué tan separadas están dos bandas en relación con sus anchos y proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos.



$$R_s = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{\frac{1}{2}(W_A + W_B)}$$

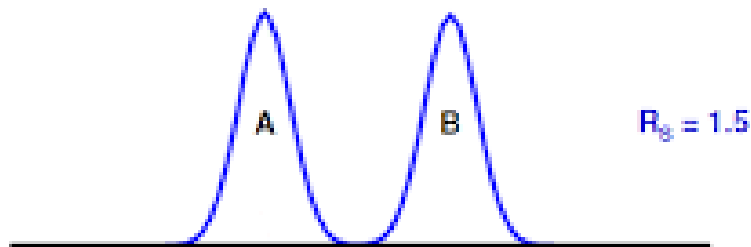
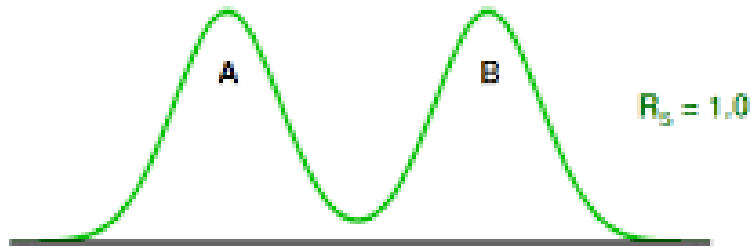
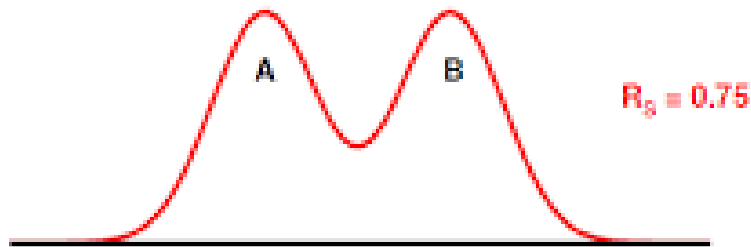
$$R_s = \frac{2\Delta t}{W_{b1} + W_{b2}}$$

Figura 3.- Cromatograma de dos bandas y parámetros para calcular eficacia y resolución



# Parámetros cromatográficos:

## Resolución de la columna

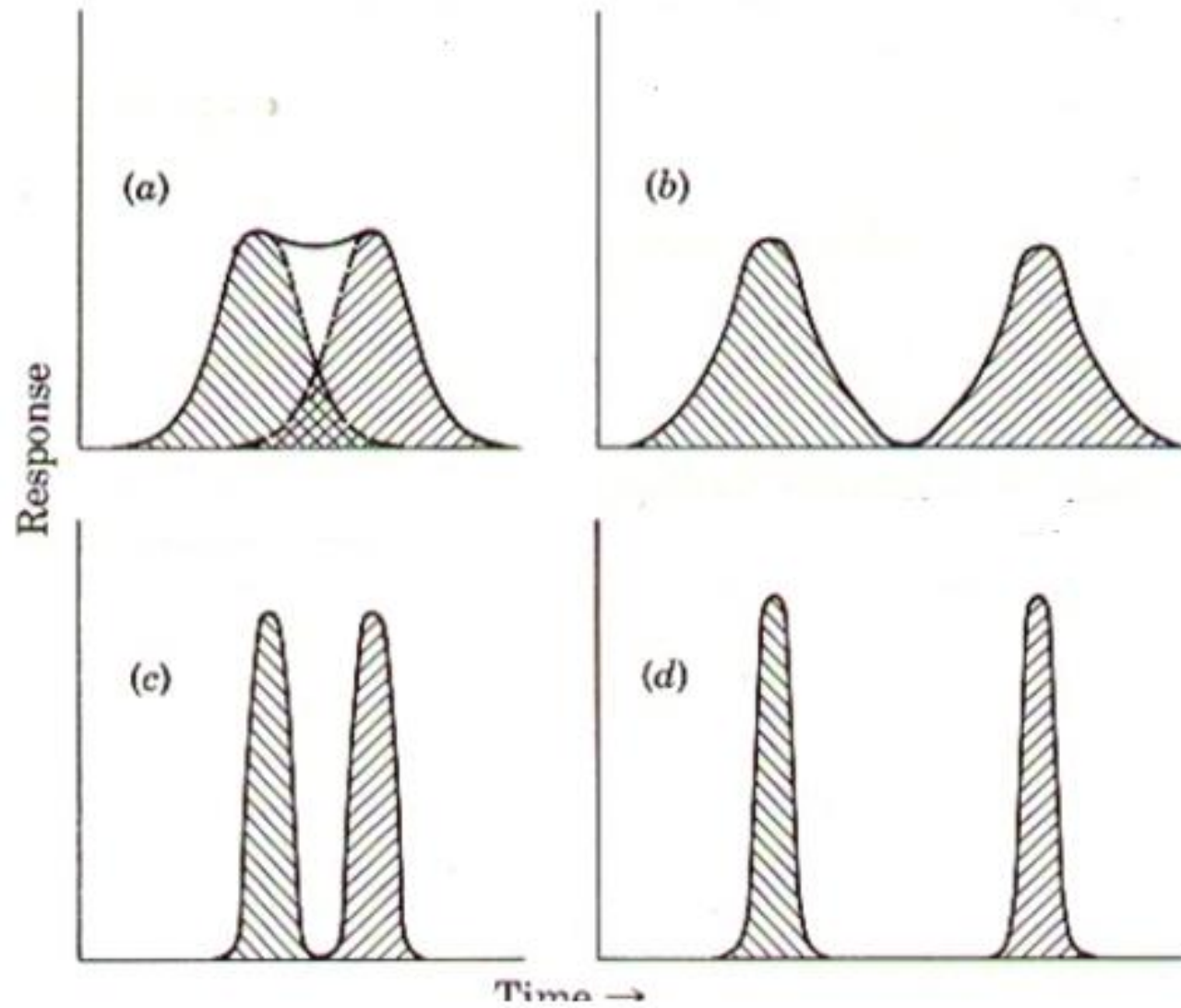


$R_s = 1,0$  la zona de A contiene alrededor del 4% de B. No se logra separación completa

$R_s = 1,5$  permite una separación completa de A y B

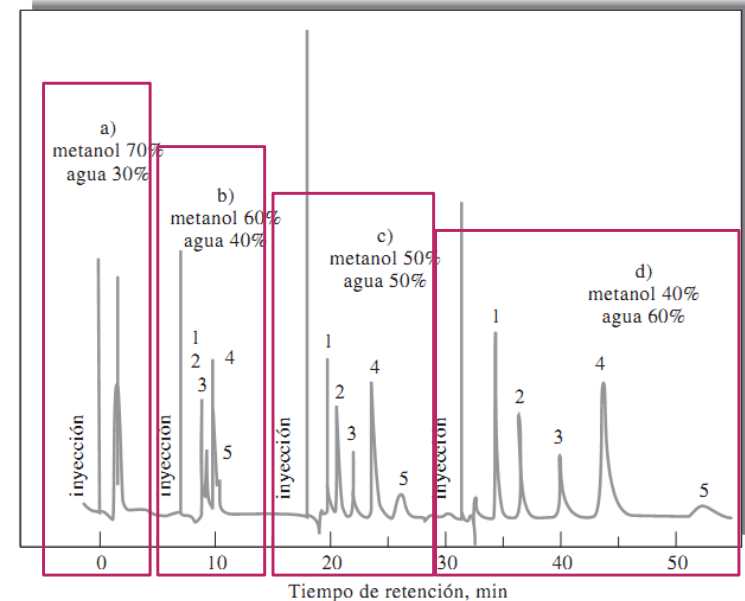
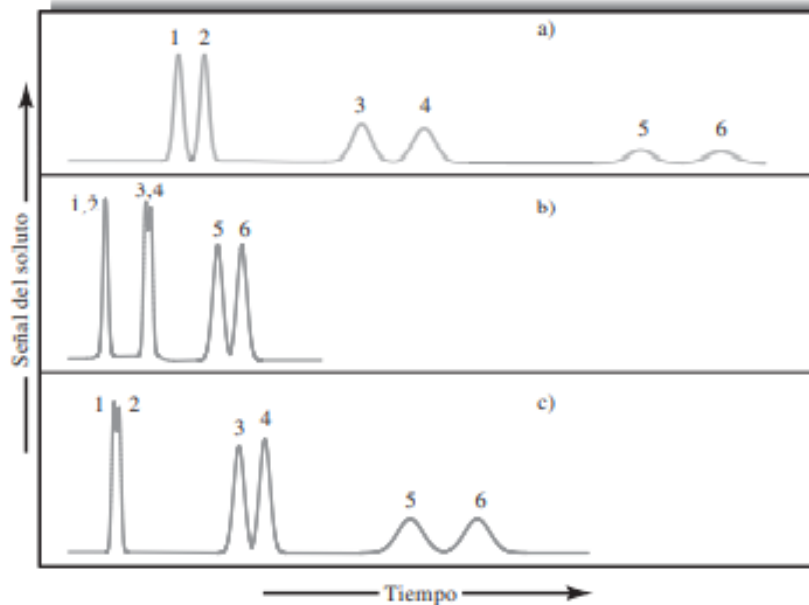
Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorar aumentando  $L$  de la columna, lo que implica un aumento del número de platos. La adición de platos teóricos aumenta el tiempo que se requiere para separar los componentes.

Cuanto mas ancho es el pico, más va a comprometer a la resolución



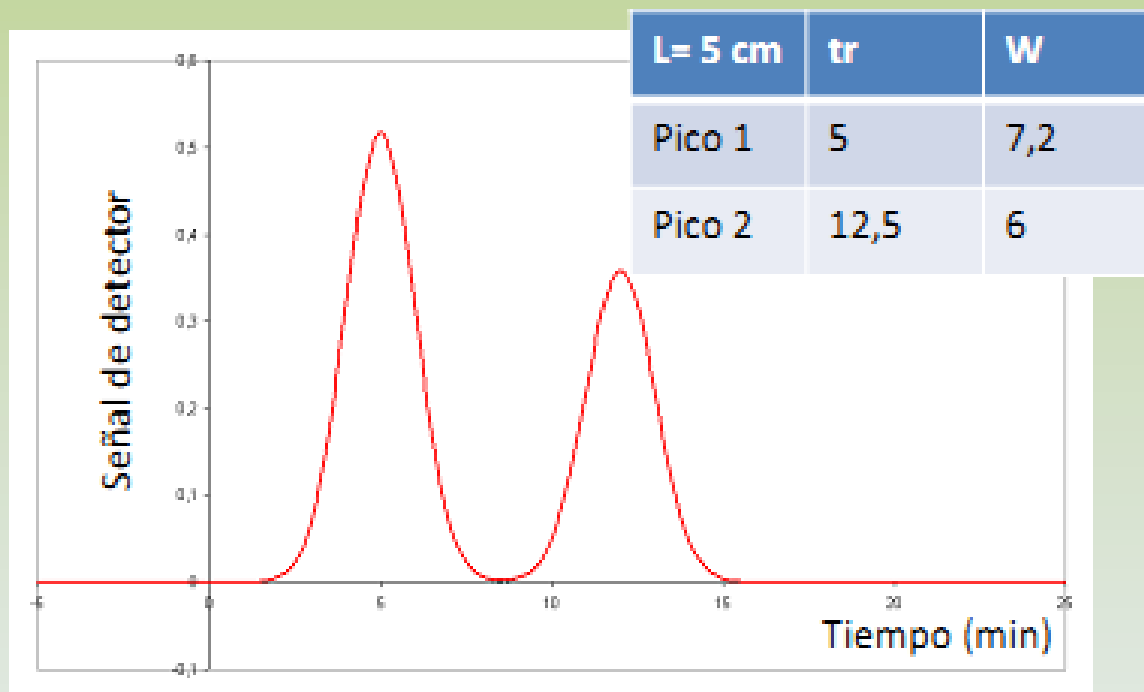
# ¿Como podemos mejorar el rendimiento de una separación?

- $\alpha$
  - $k$
- Variando:
- Temperatura
  - Composición de la fase móvil
- $N$  → Aumentar el N de platos teóricos de la columna (mayor tiempo)
  - $H$  → Disminuir del tamaño de partícula de relleno, reducción de la viscosidad del solvente



Efecto del cambio en la composición del solvente (valor  $k$ ).  
c) Representa la mejor proporción ya que presenta una resolución adecuada en un tiempo mínimo

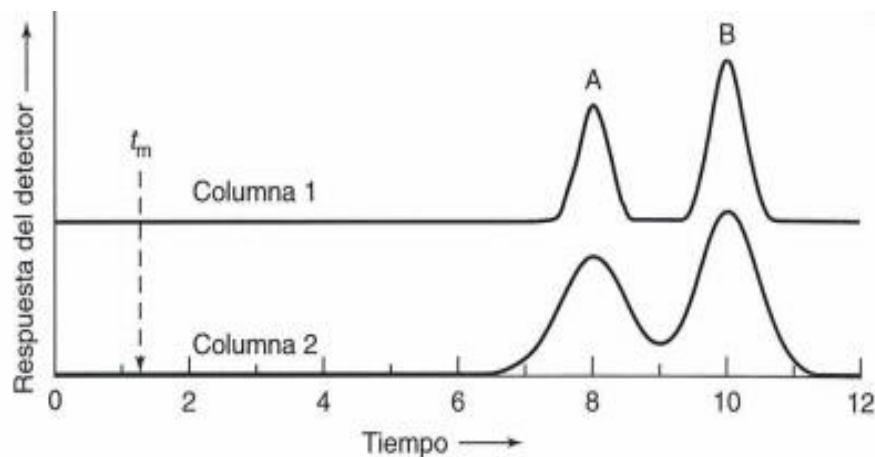
## Problema 1:



1. Calcular la eficiencia de la columna para cada analito ( $N$  y  $H$ ).
2. Calcular la resolución de los picos

## Problema 2:

Los cromatogramas de los compuestos A y B que se muestran en la figura se obtuvieron empleando dos columnas de la misma longitud y con el mismo caudal



- a) ¿Qué columna tiene mas platos teóricos?
- b) ¿Qué columna tiene mayor altura de plato?
- c) ¿Qué columna tiene mayor resolución?
- d) ¿Qué compuesto tiene mayor factor de capacidad?
- e) ¿Que compuesto tiene mayor coeficiente de reparto?
- f) ¿Que columna es más eficiente para los analitos A y B?

### Problema 3:

Se inyectó al cromatógrafo  $5 \times 10^{-3}$  mg de una mezcla de acetona, metiletilcetona e isobutilcetona, el pico de la acetona dio un área de  $5 \text{ cm}^2$ . En igualdad de condiciones se inyectó  $10^{-3}$  mg de acetona y el pico dio un área de  $2 \text{ cm}^2$ . ¿Cuál es el % de acetona en la mezcla?

## Problema 4:

Los siguientes datos corresponden a una columna para cromatografía de líquidos: longitud de relleno: 24,7 cm; masa de flujo: 0,313 mL/min; VM: 1,37 mL; VS: 0,164 ML

El cromatograma de una mezcla de las especies A, B, C y D proporcionó los siguientes datos:

	Tiempo de retención, min	Ancho de la base (W), min
No retenida	3,1	-
A	5,4	0,41
B	13,3	1,07
C	14,1	1,16
D	21,6	1,72

Calcular:

- a) El número de platos para cada analito.
- b) La altura de plato de la columna
- c) El factor de retención.
- d) La resolución para B y C ; C y D.

# *Bibliografía consultada:*

- ✓ Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. Principios de análisis instrumental. Sexta edición. 2008
- ✓ Harris Daniel C. Analisis Quimico Cuantitativo. Tercera edición. 2013
- ✓ Day R.A., Underwood A. L. Quimica analítica cuantitativa. Quinta edición.