

# Técnicas cromatográficas

separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas

- En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una fase móvil —que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico— la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida.
- Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria.
  - Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil.
  - En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez.
- Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa.

Se van estableciendo equilibrios entre las concentraciones del analito en cada fase



- Método de separación física.
- Distribución selectiva entre dos fases:
  - Fase estacionaria (FE)
  - Fase móvil (FM)
- Diferencias en coeficientes de distribución de analitos.

no hay cambio en identidad química

$$K = \frac{C_{FE}}{C_{FM}}$$

cte

**Clasificación** se pueden clasificar de dos maneras.

- La primera se basa en los medios físicos por medio de los cuales las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto.
  - En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual la fase móvil se fuerza a pasar por presión.
  - En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o en los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.
- Es importante señalar que los equilibrios en los que se basan los dos tipos de cromatografía son idénticos, y que la teoría desarrollada para la cromatografía en columna se adapta también con facilidad a la cromatografía en plano.
- Una clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en los tipos de fases móviles y estacionarias, y en la clase de equilibrios involucrados en la transferencia de los solutos entre las fases.
  - cromatografía de gases (CG),
  - cromatografía de líquidos (CL)
  - cromatografía de fluidos supercríticos (CFS).
- Vale la pena hacer notar que sólo la cromatografía de líquidos puede llevarse a cabo en columnas o sobre superficies planas; por otra parte, tanto la cromatografía de gases como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna, de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase móvil

fases móviles

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
1. Cromatografía de gases (CG)	a) Cromatografía gas-líquido (CGL)	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre un gas y un líquido
	b) Gas-sólido	Sólido	Adsorción
2. Cromatografía de líquidos (CL)	a) Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Distribución entre líquidos inmiscibles
	b) Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	c) Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	d) Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución-exclusión
	e) Afinidad	Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida	Distribución entre el líquido de la superficie y el líquido móvil
3. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS; fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

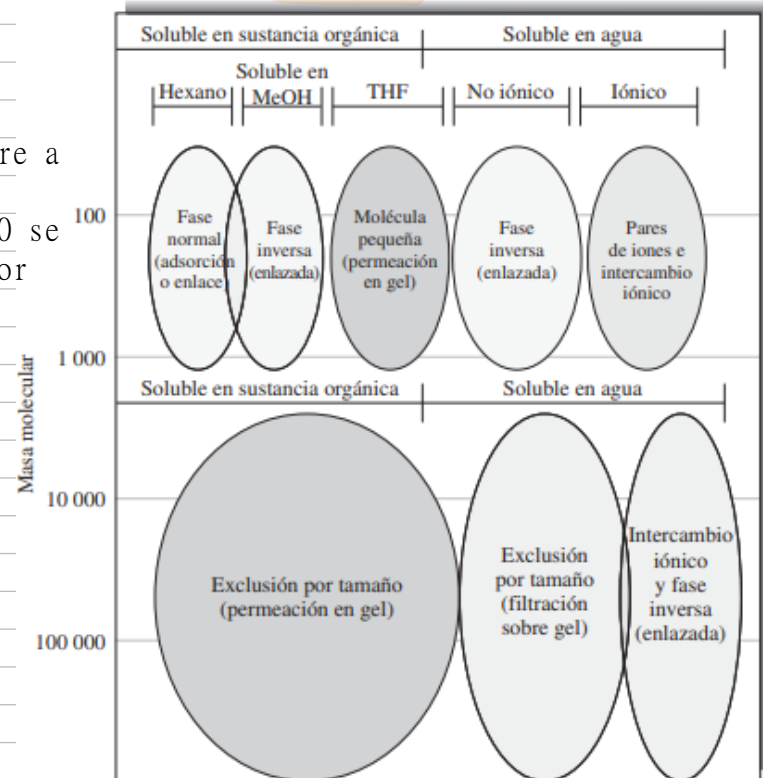
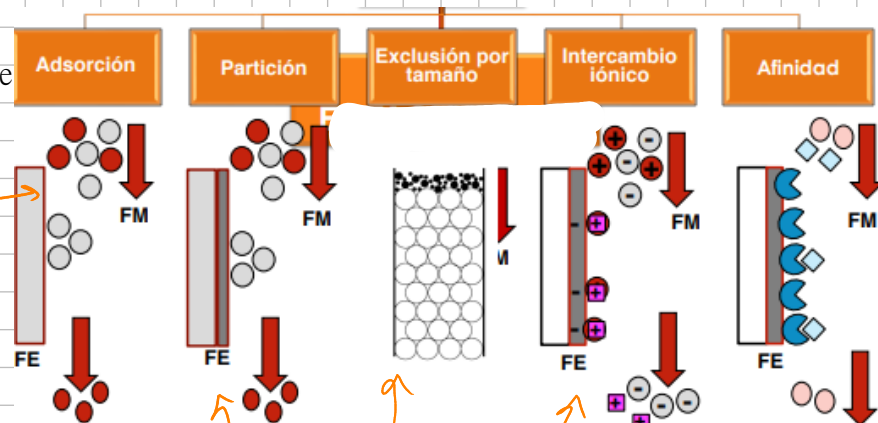
## Cromatografía líquida

se clasifican de acuerdo con el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria

- El analito se deposita en una fase estacionaria y al ir pasando por la fase móvil va ir arrastrando el analito. Tardará en salir el que tenga mayor afinidad por la fase estacionaria.
- La fase estacionaria es otro líquido embebido o absorbido sobre un soporte sólido donde se deposita el analito y la fase móvil va arrastrándolo.
- Se trata de un soporte poroso y el tamaño del poro determinará que analito saldrá primero al pasar la fase móvil. No es una cuestión de afinidad.
- Se deposita una resina de intercambio iónico con carga en la fase estacionaria y el analito es una mezcla de compuestos iónicos que serán retenidos por la misma dependiendo de su carga, ej. un analito + se retiene más a la resina -, los - saldrán primero. Puedo usar otro tipo de FM después para el analito retenido.
- Se deposita en la FE, por ej., un anticuerpo que tenga alguna afinidad específica por un antígeno en particular y cuando pasa el mismo con la fase móvil se retiene.

## ¿cómo usar?

- Tienden a ser complementarios en lo que se refiere a sus campos de aplicación. Solutos con masas moleculares superiores a 10 000 se utilizan a menudo la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos mediante cromatografía de fase inversa.
- En el caso de especies iónicas de masa molecular más pequeña, se suele utilizar la cromatografía de intercambio iónico.
- La cromatografía por afinidad se utiliza mucho para aislar y preparar biomoléculas, y la cromatografía quiral se emplea para separar enantiómeros.

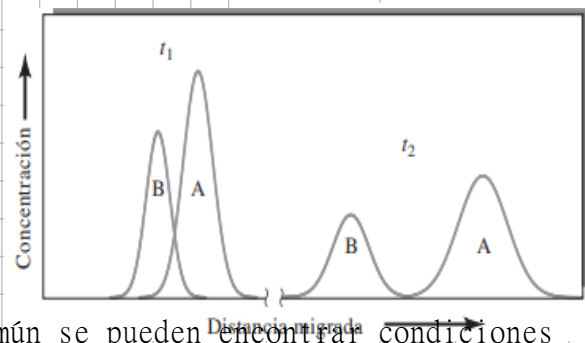


## Cromatografía en columna → para explicar ciertos parámetros.

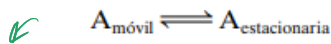
- Dos sustancias A y B se separan en una columna empacada mediante elución.
- La columna está constituida por un tubo angosto relleno con un sólido inerte finamente dividido que mantiene a la fase estacionaria en su superficie. La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas del material de empaque.
- \* Para empezar, una solución de la muestra que contiene una mezcla de A y de B en la fase móvil se introduce en la parte superior de la columna como un tapón angosto en el tiempo  $t_0$ . Entonces los dos componentes se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria. La elución implica la purificación de una especie por lavado en una columna mediante la adición continua de fase móvil nueva.
- \* Con la primera introducción de fase móvil nueva, el eluyente (la parte de la muestra contenida en la fase móvil) avanza hacia abajo por la columna, donde tiene lugar un reparto o distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria (tiempo  $t_1$ ).
- A medida que la fase móvil limpia fluye por la columna, transporta moléculas de soluto hacia abajo de la columna en una serie continua de transferencias entre las dos fases. Pero como el movimiento de los solutos sólo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de soluto migra hacia abajo en la columna depende de la fracción de tiempo que permanece o reside en dicha fase.
- Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria y grande cuando el soluto reside principalmente en la fase móvil. Las diferencias de velocidad que resultan hacen que los componentes de la mezcla se separen en bandas, o zonas, que se localizan a lo largo de la columna.
- \* El aislamiento de las especies separadas se logra haciendo pasar una cantidad suficiente de fase móvil por la columna hasta que las bandas individuales llegan al extremo, es decir, son eluidas o lavadas de la columna, en donde se detectan o se recogen.

## Cromatograma

- La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.
- Como la especie B es retenida con más fuerza por la fase estacionaria que A, se retrasa durante la migración. Observe que en el descenso por la columna aumenta la distancia entre las dos bandas. Sin embargo, al mismo tiempo tiene lugar un ensanchamiento de ambas zonas, lo que disminuye la eficacia de la columna como sistema de separación. Aunque el ensanchamiento de banda es inevitable, por lo común se pueden encontrar condiciones en las que ocurra con más lentitud. Por consiguiente, con frecuencia es posible tener una clara distinción de las especies siempre y cuando la columna sea lo suficientemente larga. Se pueden lograr mejores separaciones controlando las variables que 1) incrementan la velocidad de separación de la banda y 2) disminuyen la velocidad de ensanchamiento de la banda.



## Etres de distribución



La constante de equilibrio  $K_c$  para la distribución de la especie A entre las dos fases se denomina **constante de distribución** y se define como

$$K_c = \frac{(a_A)_S}{(a_A)_M} \quad (26.1)$$

$(a_A)_S$  es la actividad del soluto A en la fase estacionaria y  $(a_A)_M$  es su actividad en la fase móvil

• Cuando las concentraciones son bajas o cuando intervienen especies no aniónicas, los coeficientes de actividad se acercan a la unidad. En estas condiciones, se sustituyen las actividades  $c_S$ , por la concentración analítica molar del soluto en la fase estacionaria y por  $c_M$ , su concentración analítica molar en la fase móvil

$$K_c = \frac{c_S}{c_M} = \frac{n_S/V_S}{n_M/V_M}$$

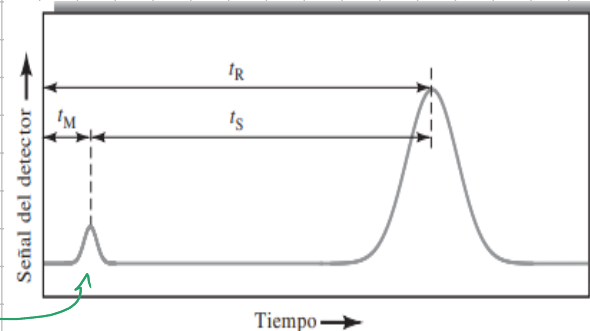
$n_S$  y  $n_M$  son las cantidades de moles de analito en las dos fases y  $V_S$  y  $V_M$  son los volúmenes de las dos fases

•  $K_c$  es la cantidad fundamental que afecta la distribución de los componentes entre las fases y, por tanto, las separaciones.

Para una elección adecuada de la fase móvil, de la fase estacionaria o de ambas, la constante de distribución se puede manipular dentro de límites. Si se ajusta el volumen de una fase, es posible modificar la relación molar en las dos fases

## Tiempo de retención

• El pico pequeño de la izquierda es para la especie que no es retenida por la columna. La muestra o la fase móvil contiene una especie que no se queda en la columna. Cuando ocurre así, este tipo de especie puede añadirse para facilitar la identificación de los picos.



• El tiempo  $t_M$  necesario para que la especie no retenida alcance el detector en algunas ocasiones se denomina tiempo muerto y proporciona una medida de la velocidad promedio de migración de la fase móvil, por lo que es un parámetro importante para identificar los picos del analito. Todos los componentes pasan un tiempo  $t_M$  en la fase móvil.

• El pico más grande de la derecha es el de una especie del analito. El tiempo requerido para que esta zona llegue al detector después de la inyección de la muestra se denomina tiempo de retención y se le simboliza con  $t_R$ .

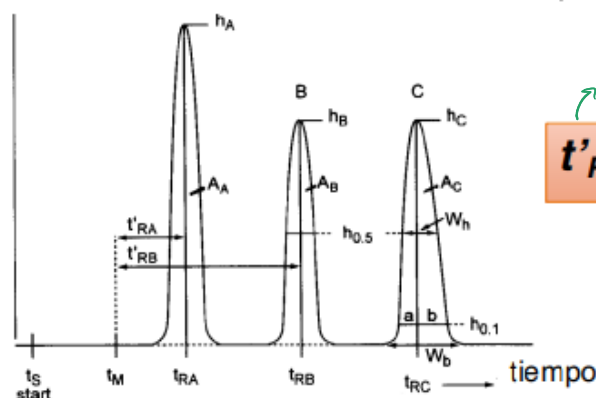
• El analito es retenido porque pasa un tiempo  $t_S$  en la fase estacionaria. Entonces, el tiempo de retención es

$$t_R = t_S + t_M$$

## Resolución

• Señala qué tan separadas están dos bandas en relación con sus anchos. La resolución proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos.

Señal



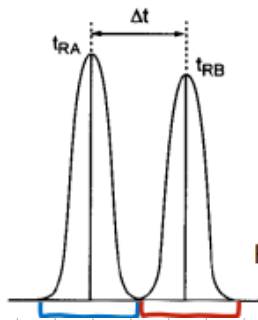
$$t'_R = t_R - t_M$$

• Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorar si se alarga la columna, lo que aumenta el número de platos. Sin embargo, la adición de platos teóricos aumenta el tiempo que se requiere para separar los componentes.

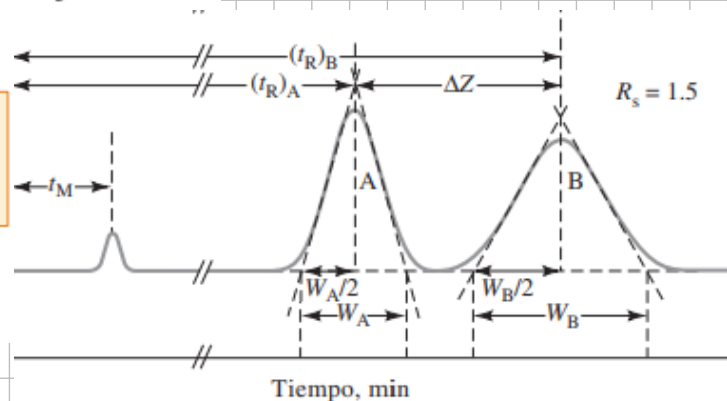


# Parámetros cromatográficos

Nombre	Símbolo del parámetro experimental	Determinación
Tiempo de migración, especies no retenidas	$t_M$	Cromatograma
Tiempos de retención, especies A y B	$(t_R)_A, (t_R)_B$	Cromatograma
Tiempo de retención ajustado, especie A	$(t'_R)_A$	$(t'_R)_A = (t_R)_A - t_M$
Anchuras de pico, especies A y B	$W_A, W_B$	Cromatograma



$$R_S = \frac{2\Delta t_{B-A}}{W_B + W_A}$$



## Otros conceptos y parámetros

La velocidad lineal promedio de la migración del soluto a lo largo de la columna  $\bar{v}$  (por lo regular, en cm/s) es

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (26.4)$$

donde  $L$  es la longitud de la columna rellena. De manera semejante, la velocidad lineal promedio  $u$  de las moléculas en la fase móvil es

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (26.5)$$

## Factor de retención

se usa con frecuencia para comparar las velocidades de migración de los solutos en las columnas. no depende de la forma de la columna. Esto quiere decir que para una combinación dada de soluto, fase móvil y fase estacionaria cualquier columna de cualquier forma que funciona a cualquier tasa de flujo de fase móvil dará el mismo factor de retención. En el caso del soluto A, el factor de retención  $k_A$  se define como

$$k_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

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

factor de selectividad  $\alpha$  de una columna para los dos solutos A y B se define como donde  $K_B$  es la constante de distribución para la especie más fuertemente retenida B, y  $K_A$  es la constante para la especie A menos retenida, o que es eluida o lavada con más rapidez. De acuerdo con esta definición,  $\alpha$  siempre es mayor que la unidad.

## Platos teóricos

cromatográfica: 1) la altura de plato  $H$  y 2) el número de platos o cantidad teórica de platos,  $N$ . Los dos están relacionados por la ecuación

$$N = \frac{L}{H} \quad (26.16)$$

donde  $L$  es la longitud (por lo regular en centímetros) del relleno de la columna.

La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos  $N$  y cuanto menor es la altura  $H$  del plato

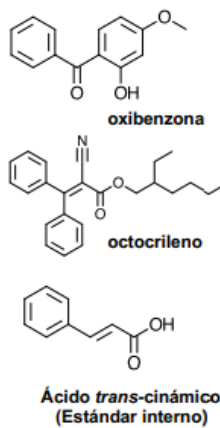
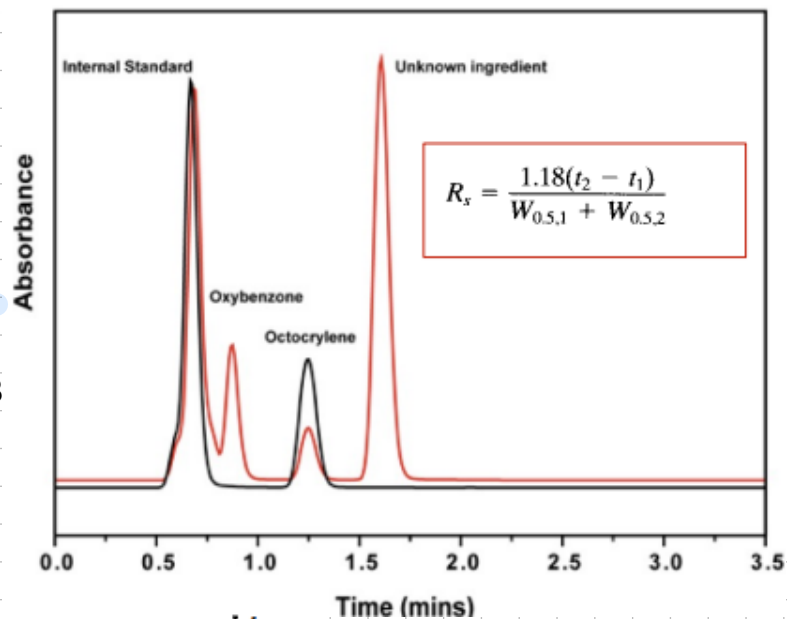
El origen de los términos "altura de plato" y "cantidad de platos teóricos" proviene de Martin y Synge que trataron a una columna cromatográfica como si fuera similar a una columna de destilación que estuviera constituida por numerosas capas angostas, o platos, distintos pero contiguos, a las que denominaron platos teóricos.

Se suponía que en cada plato se establecía el equilibrio de la especie entre las fases móvil y estacionaria. El descenso del soluto por la columna se trataba entonces como una transferencia por etapas de fase móvil equilibrada de un plato al siguiente.

La teoría del plato explica de manera satisfactoria la forma gaussiana de los picos cromatográficos y su velocidad de desplazamiento por la columna. Pero la teoría se abandonó en favor de la teoría de la velocidad, debido a que la primera fallaba al intentar justificar el ensanchamiento de los picos de una manera mecanicista. No obstante, los términos originales para la eficiencia se han incorporado a la teoría de velocidad. E

Nombre	Ecuación	Relación con otros parámetros
Factor de retención	$k' = (t_R - t_M)/t_M$	$k' = \frac{KV_S}{V_M}$
Coefficiente de distribución	$K = \frac{k'V_M}{V_S}$	$K = \frac{c_S}{c_M}$
Factor de selectividad	$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$	$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Resolución	$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$
Número de platos	$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$	$N = 16 R_s^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$
Altura de plato	$H = L/N$	

¿Cómo calculo  $k$ ,  $\alpha$ ,  $R$  y  $N$  desde este cromatograma?



$$R_s = \frac{1}{4} (\alpha - 1) N^{1/2} \frac{k'}{1 + k'}$$

selectividad    eficiencia    retención

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_B}{1 + k_B} \right)$$

- Si tengo dos analitos A y B puede ser que sea mas selectivo para uno que para otro entonces este alfa se hace mayor a 1. Si es menor o 1, se hace todo 0
- Mientras mas platos teoricos tengo, mejor eficiencia y resolucion tengo. Tiene que ver con la longitud de la columna
- Si el factor de retencion es muy pqueño, el analito sale muy rapido y la separacion no puede lograrse bien

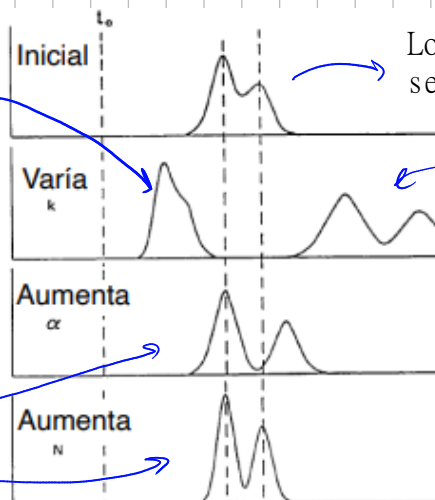
Si disminuyo la retencion todo sale a tiempo mas corto y se solapan los picos

**$k'$  y  $\alpha$  responden a**

- Fase móvil
- Fase estacionaria
- temperatura

Si aumento alfa, aumenta la resolucion

Si aumento el numero de platos, tambien se aumenta la resolucion



Los analitos no estan bien separados

Si aumenta, se separan mejor los picos

**$N$  responde a**

- flujo
- longitud de columna
- tamaño de partícula

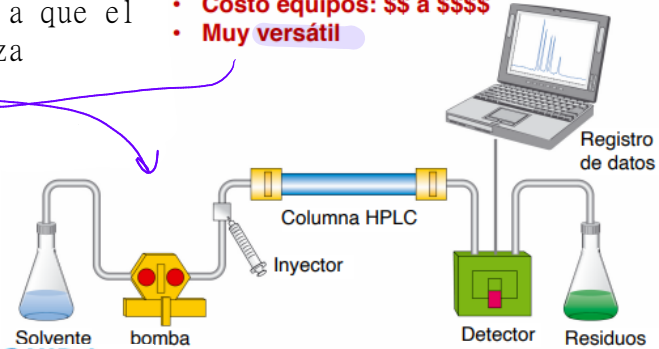
# Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

- Fue apenas a finales de los años sesenta cuando se perfeccionó la técnica adecuada para producir y utilizar empaques de tamaño de partícula tan pequeños como del orden de 3 a 10  $\mu\text{m}$ . Esta técnica requería instrumentos complejos para poder trabajar a altas presiones, lo que contrasta con las sencillas columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica cuyo flujo se debía a la gravedad. En la actualidad, toda la cromatografía de líquidos se efectúa con flujo presurizado

- Las altas presiones son dadas por una bomba que ayuda a que el solvente sea ingresado por la columna y tenga la fuerza suficiente para atravesar la misma

- Puedo cambiar fase estacionaria, que es lo mas costoso o puedo cambiar el solvente con muchas posibilidades

- Tamaño de partícula:  $\mu\text{m}$
- Alta presiones: 10 MPa (2000 Psi)
- Costo equipos: \$\$ a \$\$\$\$
- Muy versátil



## TIPOS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA

### Tipo de sorción

Adsorción fase sólida  
(NORMAL)

Fase modificada  
(NORMAL o REVERSA)

Intercambio iónico

Par iónico

Exclusión por tamaño

Quiral

Afinidad

### Mecanismo de retención

Adsorción sobre la superficie en base a polaridad.

Partición o reparto entre fases o interacción de adsorción.

Interacción de cargas entre iones y contra-iónóforos en la FE.

Partición de pares iónicos neutros entre fases

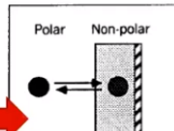
Efecto de filtración por volumen hidrodinámico

Interacciones diastereoméricas entre enantiómeros (soluto) y sitios quirales en la fase estacionaria.

Interacción bio-específica de solutos con un ligando inmovilizado.

**FASE NORMAL: FE polar; FM no polar**

**FASE REVERSA: FE no polar; FM polar**

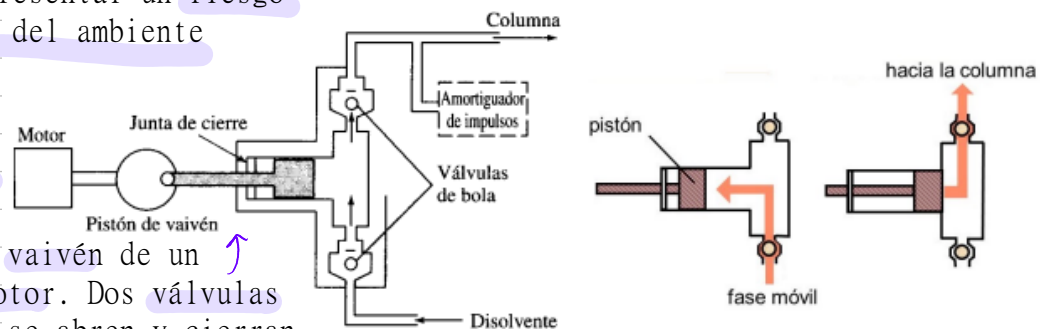


\* la bomba

- Generar presiones por encima de 6000 psi
- Flujo libre de pulsaciones
- Caudal de 0,1 mL a 10 mL por minuto
- Reproducibilidad y estabilidad
- Componentes resistentes a la corrosión

- Las presiones elevadas que generan no constituyen un riesgo de explosión, porque los líquidos no son muy compresibles. Por tanto, la rotura de un componente del sistema sólo supone una pérdida de solvente. Lo que sí es evidente es que ésta puede representar un riesgo de incendio o de contaminación del ambiente

### Bombas recíprocas: más utilizadas



## Bombas recíprocantes

- Consiste en una pequeña cámara en la que el solvente es impulsado por el movimiento de vaivén de un pistón accionado mediante un motor. Dos válvulas de globo unidireccionales, que se abren y cierran de manera alternada, controlan el flujo del solvente hacia dentro y hacia afuera de un cilindro. El solvente está en contacto directo con el pistón.

- Las bombas recíprocantes tienen la desventaja de producir un flujo pulsado que se tiene que amortiguar porque los pulsos se manifiestan como ruido en la línea base del cromatograma



- Entre las ventajas de las bombas reciprocantes se pueden citar
  - su pequeño volumen interno (35 a 400  $\mu\text{L}$ ),
  - sus altas presiones de salida (hasta 10 000 psi),
  - su fácil adaptación a la elución con gradiente,
  - su gran capacidad de solvente y
  - sus flujos constantes, que son prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad del solvente.

## \*Introducción de la muestra

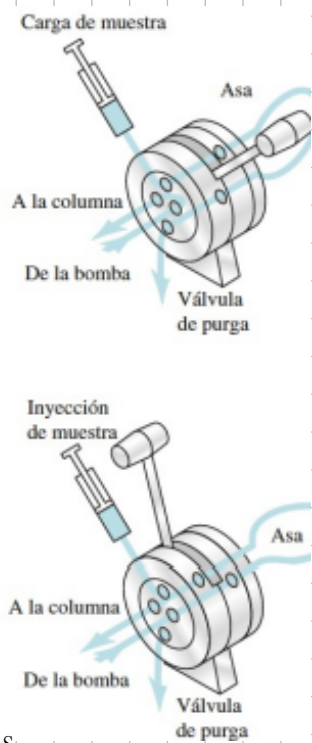
Tamaño del lazo: 0,5  $\mu\text{L}$  a 2 mL dependiendo del tipo de HPLC

- A menudo, el factor limitante en la precisión de las mediciones en cromatografía de líquidos es la reproductibilidad con que se pueden introducir las muestras en el relleno de la columna. El problema se acentúa por el ensanchamiento de banda que acompaña al tapón o sobrecarga de inyección. Por consiguiente, los volúmenes de muestra que se emplean tienen que ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro hasta quizá unos 500  $\mu\text{L}$ . Además, lo apropiado es introducir la muestra sin despresurizar el sistema.

- El medio que más se usa se basa en los rizados de muestreo. Hay rizados intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 1 hasta 100  $\mu\text{L}$  o más.

## \*la columna

- Las columnas se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Algunas se fabrican con tubos de vidrio de paredes resistentes o con polímeros como el polieteretercetona. Además, también hay columnas de acero inoxidable cuyo interior está revestido con vidrio o polieteretercetona



## analítica

- La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos miden de 5 a 25 cm de largo. Invariablemente se usan columnas rectas. A veces se pueden alargar acoplando dos o más de ellas.
- Los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3 o 5  $\mu\text{m}$ .
- Con esta técnica HPLC convencional, se pueden aislar los compuestos e identificarlos pero no se pueden aislar en grandes cantidades para utilizarlos



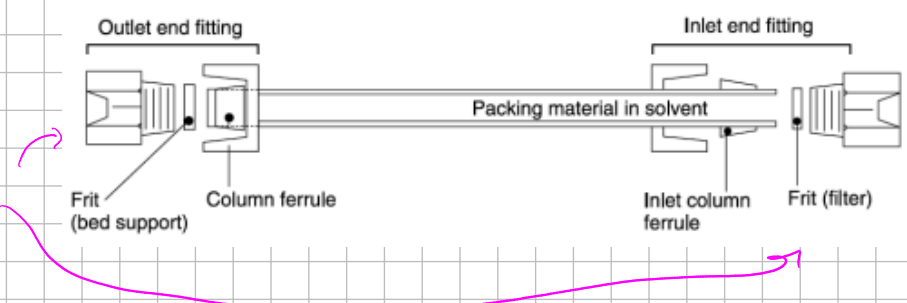
diámetro columna	flujos	nombre técnica
4-7,5 mm	2-10 ml/min	semipreparativa
7,5-21 mm	10-50 ml/min	preparativa
>21 mm	50-1000 ml/min	industrial
3,2-4,6 mm	0,5-2,0 ml/min	convencional (analítica)
1,5-3,2 mm	100-500 $\mu\text{L}/\text{min}$	microbore
0,5-1,5 mm	10-100 $\mu\text{L}/\text{min}$	micro
150-500 $\mu\text{m}$	1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$	capilar
10-150 $\mu\text{m}$	10-1000 nL/min	nano

→ se podrían usar las 3 de arriba

## microcolumas

- Diámetros interiores oscilaban entre 1 y 4.6 mm y sus longitudes iban de 3 a 7.5 cm. Estas columnas, que se rellenan con partículas de tamaño de 3 a 5  $\mu\text{m}$  alcanzan hasta 100 000 platos/metro y presentan la ventaja de la rapidez y del mínimo consumo de solvente. Esto es importante porque los solventes de alta pureza que se requieren en cromatografía de líquidos son muy caros y se desechan después del uso

Ferulas por las que la voy a unir a los conductos que traen la fase móvil y los que la dejan eluir hasta el detector





# Fase estacionaria (crom. líq. de partición)

Longitud: 3 a 25 cm

Tamaño de partícula: 3 a 10 µm

Tamaños de poros: 50 a 150 Å

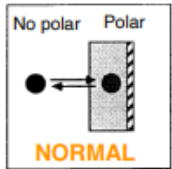
## Efecto de tamaño de partícula sobre la eficiencia

Tamaño de partícula (µm)	N/metro	Flujo (mL/min)
10	30,000	1.0
5	50,000	1.5
3	100,000	2.5

## Cromatografía líquida de partición

### Fase Estacionaria

Líquido adsorbido o unido químicamente a un sólido

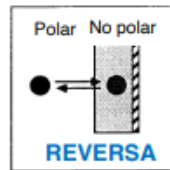


**FASE NORMAL: FE polar; FM no polar**

**FASE REVERSA: FE no polar; FM polar**

### Mecanismo de separación

Partición entre líquidos inmiscibles o interacciones de adsorción  
soluto:FE polar.



Con base en las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto.

En un principio, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad, y como fase móvil se empleaba un solvente relativamente no polar, Ahora a este tipo de cromatografía se le conoce como cromatografía en fase normal.

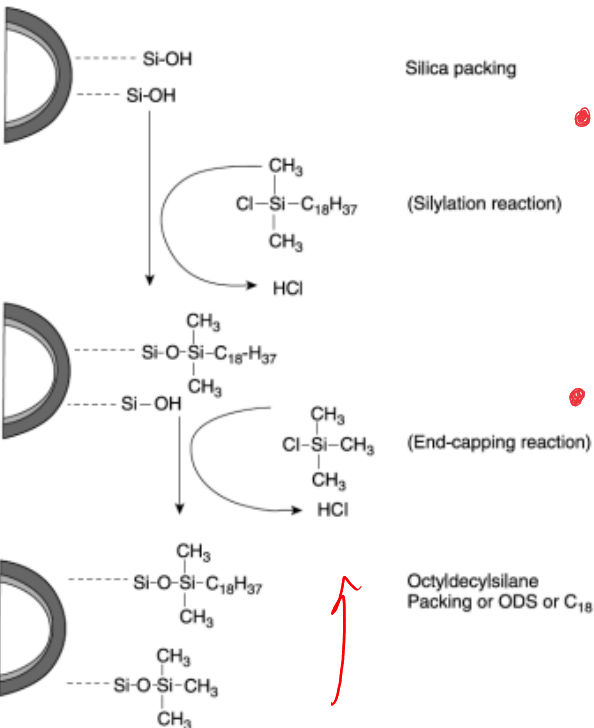
En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar, y la fase móvil es un solvente relativamente polar,

## FASE NORMAL (NP-HPLC)

En la cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero; al aumentar la polaridad de la fase móvil ocasiona una disminución del tiempo de elución.

En cambio, con la cromatografía de fase inversa, los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil incrementa el tiempo de elución.

## FASE REVERSA (RP-HPLC)



Un empaquetado de FE para fase normal sería polar con grupos silanos como se ve arriba. Vemos que se van haciendo reacciones de sililación y se incrementan las cadenas carbonadas extensas, disminuyendo la polaridad. Se pasa de un empaquetado que sería para F Normal a una F Reversa

Fase Estacionaria:

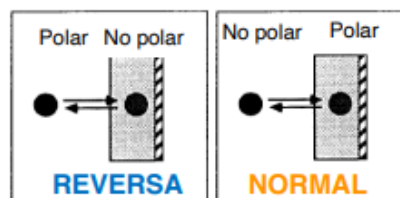
Solventes:

Compuestos hidrofóbicos son más retenidos en la FE

Incremento de la Polaridad →

FASE REVERSA				FASE NORMAL			
C18	fenil	C8	C4	CN	DioL	NH <sub>2</sub>	Si
Hexano				THF	ACN	MeOH	H <sub>2</sub> O

incrementa polaridad

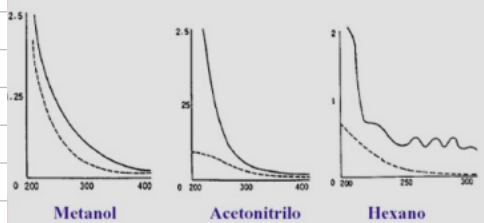


Compuestos hidrofílicos son más retenidos en la FE

Fase móvil → calidad solvente.

→ influencia en  $k$

### Diferencias entre grado analítico y HPLC



MeOH grado analítico aprox. USD 24/L

MeOH HPLC aprox. USD 178/L

- Libre de partículas
- Libre de burbujas

FILTRAR y DESGASIFICAR



- En cromatografía de líquidos, el factor de retención  $k$  es el que se puede manipular experimentalmente con más facilidad debido a que depende en gran medida de la composición de la fase móvil. Para un funcionamiento óptimo,  $k$  debería estar en el intervalo ideal comprendido entre 2 y 10

- A menudo a los solventes que interaccionan fuertemente con los solutos se les denomina "fuertes". Los solventes fuertes son con frecuencia, pero no siempre, polares. La fuerza del solvente depende de la naturaleza del analito y de la fase estacionaria. El índice de polaridad sirve para describir de manera cuantitativa la polaridad de los solventes. Cualquier índice de polaridad que se desee entre esos límites se puede conseguir por mezcla de dos solventes apropiados. Entonces, el índice de polaridad  $P'_{AB}$  de una mezcla de solventes A y B es

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

$P_A$  y  $P_B$  son los índices de polaridad de los dos solventes y  $\phi_A$  y  $\phi_B$  son las fracciones en volumen de cada uno de los solventes A y B.

- El factor de retención puede modificarse a su vez cambiando el índice de polaridad del solvente. En este caso, el ajuste de  $P$  se consigue con facilidad utilizando fases móviles que consisten de una mezcla de dos solventes. Por lo común, un cambio de dos unidades en  $P$  origina (más o menos) una variación de 10 veces en  $k$

$k_1$  y  $k_2$  son los valores inicial y final de  $k$  para un soluto y  $P_1$  y  $P_2$  son los valores correspondientes de polaridad

### Modo HPLC

#### REVERSA

#### NORMAL

### Composición fase móvil

agua (A) + SO (B) (ej. agua: acetonitrilo).

Incrementa %B (< polaridad) disminuye  $k$ .

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

SO no polar (A) + SO polar (B) (ej. hexano: propanol).

Incrementa % B (> polaridad) disminuye  $k$ .

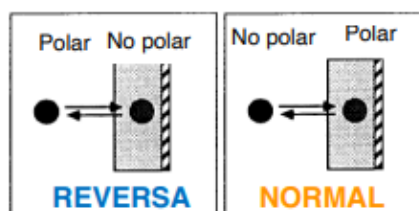
$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_1 - P'_2)/2}$$

- Si tengo una FE que es no polar y si tengo una fase móvil que disminuye su polaridad, compite por el analito y lo arrastra mas facilmente, menor tiempo de retencion y menor factor de retencion

Mobile Phase	Polarity Index (P')
cyclohexane	0.04
n-hexane	0.1
carbon tetrachloride	1.6
i-propyl ether	2.4
toluene	2.4
diethyl ether	2.8
tetrahydrofuran	4.0
ethanol	4.3
ethyl acetate	4.4
dioxane	4.8
methanol	5.1
acetonitrile	5.8
water	10.2

### SO: solvente orgánico

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

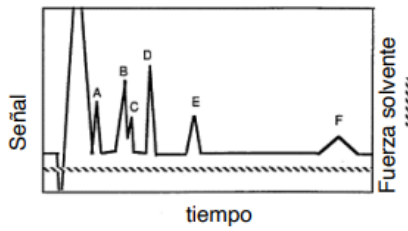


→ Influencia en  $\alpha$

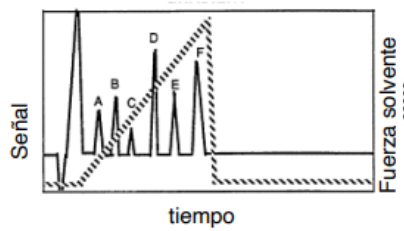
- Se tiene que procurar aumentar el factor de selectividad  $\alpha$  para las dos especies cuando hay solapamiento de picos. Esta variación se puede llevar a cabo de manera conveniente al cambiar la naturaleza química de la fase móvil mientras  $k$  mantiene más o menos el mismo valor.

Puedo trabajar de dos maneras

### ISOCRÁTICO



### GRADIENTE



### Cambios en selectividad, $\alpha$ (FASE REVERSA)

- modificar % B;
- cambiar solvente B;
- variar pH;
- variar buffer;
- aditivos;
- agentes quelantes.

Se varia la proporción entre solventes a medida que quiero acelerar la corrida

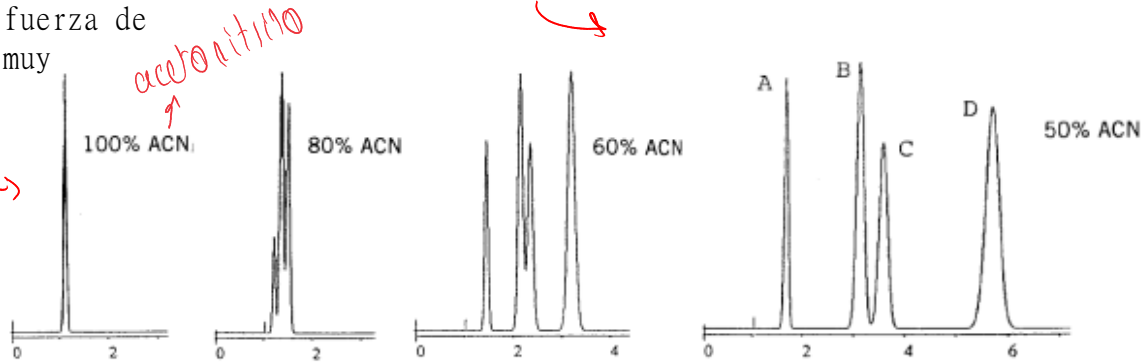
La composición de la FM es constante durante todo el experimento.

La composición de la FM se modifica durante el experimento.

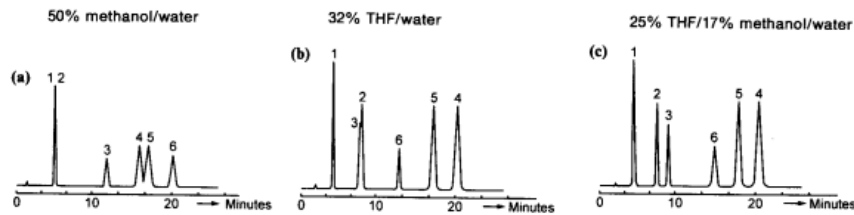
### Efecto sobre $k'$ (y $\alpha$ )

• Cuando tengo el acetonitrilo sin diluir, en fase reversa es demasiada la fuerza de la fase móvil y compite muy bien con la FE entonces todos salen juntos

• si aumento la polaridad, compiten menos y van saliendo separados los analitos



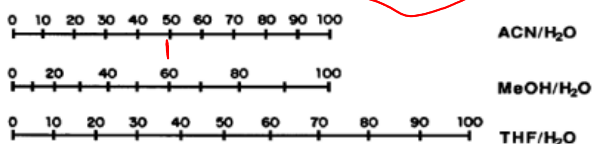
### Efecto sobre $\alpha$



• Como comparo la fuerza de la FM en fase reversa

Si uso una mezcla de acn y agua 50%, es equivalente a usar una mezcla con metanol al 60%

### Comparación de fuerza de la fase móvil



### \* Detectores

• los detectores de cromatografía de líquidos han sido instrumentos analíticos tradicionales adaptados con celdas de flujo para medir concentraciones bajas de solutos en flujos de líquidos

- Alta sensibilidad
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Respuesta lineal amplia
- Volumen interno pequeño
- Tiempo de respuesta corto independiente de velocidad de flujo
- Poco sensible a cambios de temperatura y presión
- Alta confiabilidad y fácil de utilizar
- Respuesta similar para distintos analitos o selectivo
- No destructivo

características

Pueden ser:  
SENSIBLES A  
CONCENTRACION  
SENSIBLES A MASA

*más comunes*

	Detection limit for sample	Linear range	Flow sensitive	Temperature sensitive	Useful with gradient	Favourable samples
Ultraviolet (absorbance)	$5 \times 10^{-10}$ g cm <sup>-3</sup>	$10^4-10^5$	No	Low	Yes	Conjugated aromatics and heterocyclic compounds
Photo-diode (absorbance)	$>2 \times 10^{-10}$	$10^4-10^5$	No	Low	Yes	Vitamins and steroids
Fluorescence	$\sim 10^{-12}$	$10^3-10^4$	No	Low	Yes	Carbonyl and aliphatic
Infrared (absorbance)	$10^{-6}$	$\sim 10^3$	No	Low	Yes	Universal
FTIR (absorbance)		$\sim 10^3$	No	$\pm 10^{-4}^\circ\text{C}$	No	Ionic substances
Refractive index (RIU)	$5 \times 10^{-7}$	$10^3-10^4$	No	$\pm 1^\circ\text{C}$	No	Catecholamines
Conductometric ( $\mu\text{mho}$ )	$10^{-8}$	$10^3-10^4$	Yes	$\pm 1^\circ\text{C}$	No	electroactive
Electrochemical ( $\mu\text{amps}$ )	$10^{-12}$	$10^4-10^5$	Yes		No	Labelled compounds
Radioactivity	50 cpm $^{14}\text{C}$ cm <sup>-3</sup>	$\sim 10^3$	No	Negligible	Yes	Universal
Mass spectrometry	$10^{-10}$	$10^4-10^5$	No	No	Yes	Oxidisable hydrocarbons
Transport FID (A)	$5 \times 10^{-7}$		No	No	Yes	

## Cuantificación

- Las características cromatográficas cuantitativas de la columna se basan en la comparación de la altura o el área del pico del analito con la de uno o más patrones

### altura

- Se obtiene al unir las líneas base a cada lado del pico con una línea recta y midiendo la distancia vertical desde esta línea hasta el pico

Es importante considerar que las alturas de pico están relacionadas de manera inversa con sus anchuras.

Las variables que deben controlarse con rigor son la temperatura de la columna, la tasa de flujo del eluyente y la velocidad de inyección de la muestra. Además, se ha de tener mucho cuidado para evitar sobrecargar la columna

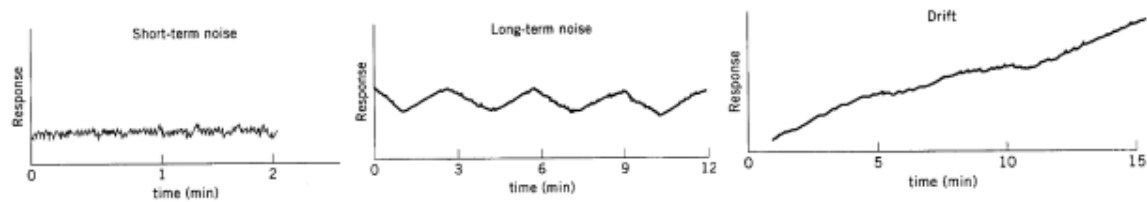
### área

- Las áreas de los picos son independientes de los efectos de ensanchamiento. Por tanto, las áreas son un parámetro analítico más adecuado que la altura del pico.
- Los instrumentos cromatográficos más modernos están equipados con computadoras o con integradores electrónicos digitales, los cuales permiten un cálculo preciso del área del pico. Si no se dispone de tales equipos, se tiene que efectuar un cálculo manual. Un método sencillo, que resulta adecuado si los picos son simétricos y de ancho razonable, consiste en multiplicar la altura del pico por su anchura a la mitad de su altura.

Metodos para la cuantificacion

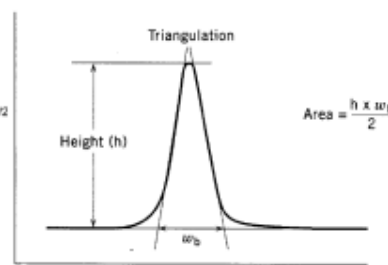
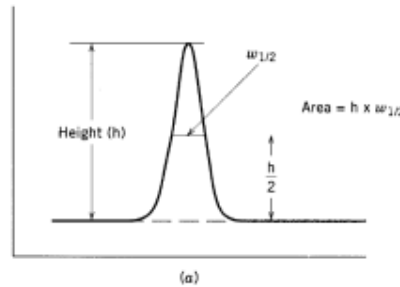
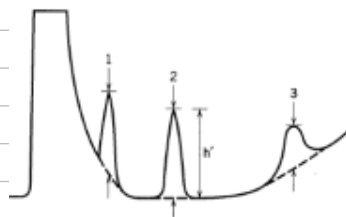
- 1- Método de estándar externo
- 2- Método de estándar interno
- 3- Método de las adiciones estándar (MOSA)
- 4- Método de normalización de áreas

### RUIDO



### AREA DE PICO

#### ALTURA DE PICO



#### EXACTITUD depende de:

- cantidad de muestra
- resolución
- simetría del pico
- calibración
- tratamiento de datos

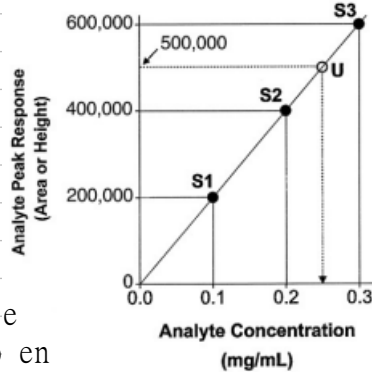
#### PRECISIÓN depende de:

- preparación de muestra
- reproducibilidad instrumental
- S/N aceptable
- simetría del pico
- método de cuantificación



## 1. estándar externo

- El método más sencillo para el análisis cromatográfico cuantitativo requiere la preparación de una serie de soluciones patrón externo de composición parecida a la de la muestra. A continuación se obtienen los cromatogramas de los patrones y se grafican las alturas o áreas del pico en función de la concentración



### Requiere:

- Reproducibilidad entre inyecciones.
- Condiciones constantes (flujo, temperatura).

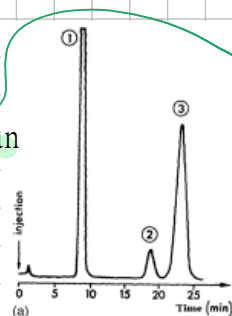
$$\text{Area (y)} = a x$$

La grafica de los datos debería originar una línea recta que pase por el origen del sistema coordinado; las determinaciones se basan en esta curva de calibración.

- Al utilizar este método, la fuente de error más importante en los análisis es por lo regular la incertidumbre en el volumen de la muestra; a veces, la velocidad de inyección de la muestra es también un factor por considerar

## 2. estándar interno

- La mayor precisión en cromatografía cuantitativa se consigue con el uso de patrones internos debido a que se evitan las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra.



- Compensa errores de inyección.

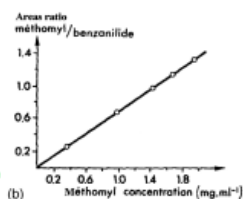
### Requiere:

- Alta pureza de estándar interno.
- Químicamente inerte hacia FE, FM y analito.
- Tiempo de retención diferente pero cercano al analito.
- Factor de respuesta similar al analito.

$$\frac{\text{Area } x}{\text{Area } ei} = a x$$

Factores de respuesta:  $D_{RFx} = \text{Area } x / [x]$ ;  
 $D_{RFei} = \text{Area } ei / [ei]$   
 Luego  $D'_{RF} = \text{Area } x * [ei] / \text{Area } ei * [x]$

$$\frac{\text{Area } x}{\text{Area } ei} = (D'_{RF} / [ei]) x$$

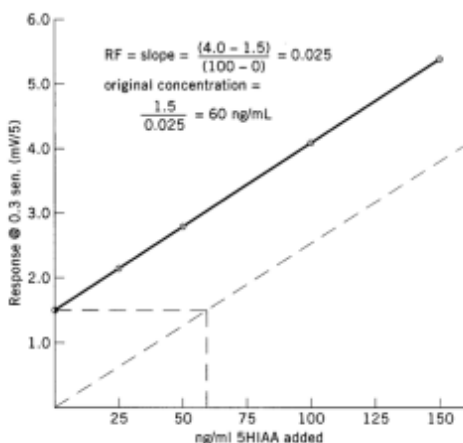


- En este procedimiento se introduce en cada patrón y en la muestra una cantidad cuidadosamente medida de una sustancia patrón interno, y la relación del analito con las áreas (o alturas) del pico del patrón interno sirve como variable analítica.

- Para que este método sea satisfactorio, es necesario que el pico del patrón interno esté bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra ( $R_s > 1.25$ ); por otra parte, el pico del patrón interno debería aparecer cerca del pico del analito. Con un patrón interno adecuado, se pueden conseguir precisiones relativas mejores que uno por ciento

## 3. adiciones estándar

- En presencia de matriz
- Análisis de trazas

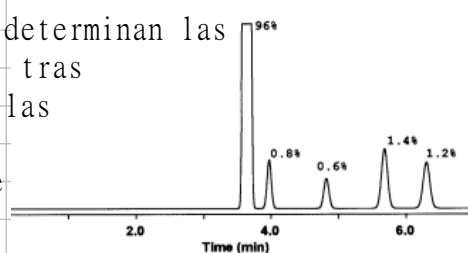


## 4. normalización de áreas

- Evita las incertidumbres asociadas con la inyección de la muestra.

- Es necesario que se produzca la elución completa de todos los componentes de la muestra.

- En el método de normalización se determinan las áreas de todos los picos eluidos; tras corregir dichas áreas respecto a las diferencias en la respuesta del detector a los distintos tipos de compuestos, se calcula la concentración del analito a partir de la relación de su área con el área total de todos los picos.



- Estimar proporción en una mezcla  
 Suppose: \* Factores de respuesta iguales  
 \* Todos los compuestos eluyen de la columna.