

Técnicas Cromatograficas

Cromatografias:

- Metodo de separacion fisica: Los analitos no tienen ningun cambio en su identidad quimica, sino que se hace una separacion en base a sus propiedades fisicas.
- Distribucion selectiva entre fases inmiscibles:
 - + Fase estacionaria (FE)
 - + Fase movil (FM)

De acuerdo a la naturaleza de las fases existen diversas clasificaciones de los tipos de cromatografia.

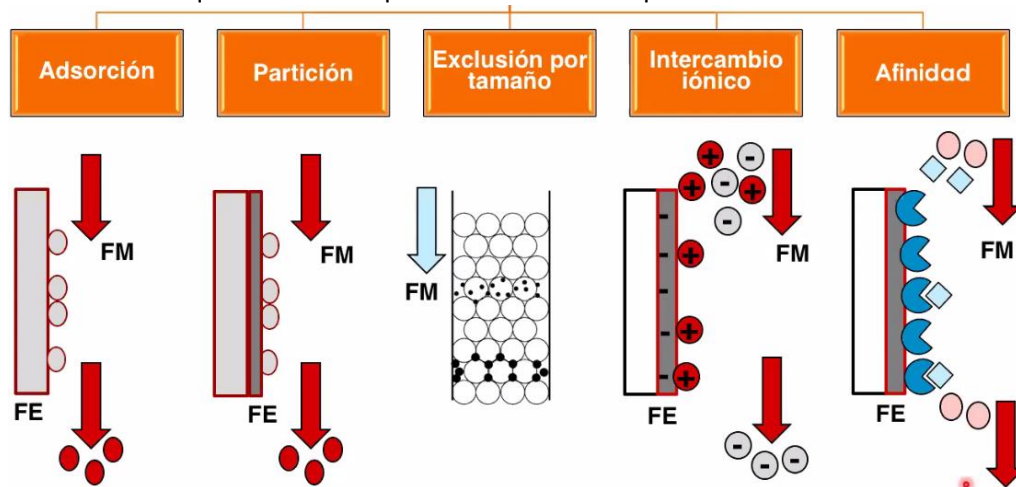
- Diferencias en coeficientes de distribucion de analitos $K = C_{FE}/C_{FM}$.

El analito no tiene la misma afinidad por la FE que por la FM, por lo que a lo largo de la corrida cromatografica se van estableciendo diversos equilibrios en simultaneo, que estan dados por la constante de distribucion del analito.

Introduccion de la muestra → FE y FM → Detector

Clasificacion de acuerdo a la FM y FE

- Si la fase movil es un liquido → cromatografia liquida
- + Adsorción: Hay una FE solida donde se va a depositar el analito, la FM al ir atravezandola, arrastra el analito. Primero sale el que mas afinidad por la FM tenga y luego el mas afin a la FE.
- + Particion: FE es otro liquido absorbido sobre un soporte solido. La FM ira arrastrando al analito de acuerdo a su afinidad.
- + Exclusión por tamaño: Soporte poroso, el tamaño del poro determinara cuando va a penetrar el analito que es arrastrado por la FM. Los más grandes, en gral, son los que salen primero y los más chicos quedan más tiempo retenidos
- + Intercambio iónico: Una FE donde se deposita una resina de intercambio iónico, es decir que tiene cargas – o +. El analito es una mezcla de compuestos, y de acuerdo a su carga quedaran absorbidos o no en la FE. Por ej. si la FE es -, las partículas + del analito quedaran absorbidas.
- + Afinidad: Lo que se deposita en la FE es algun anticuerpo, que tenga afinidad especifica por algun antígeno particular. Se usa una FM que arrastra a aquellas moléculas con poca afinidad a la FE



Representacion de lo que ocurre dentro de la columna antes de llegar al detector

En el eje "y" se indica la concentracion y en "x" el corrimiento.

Cuando comienza la corrida, a medida que va atravesando la columna, dependiendo de la afinidad por la FE y por la FM, de los compuestos, se van a ir separando.

Cada punto de separación, es semejante a un plato teórico. Se generan los equilibrios, parte sigue atravesando la columna y otra parte con más afinidad por la FE se va quedando retenida.

Eso va ocurriendo hasta que se terminan de separar completamente y llegan al detector.

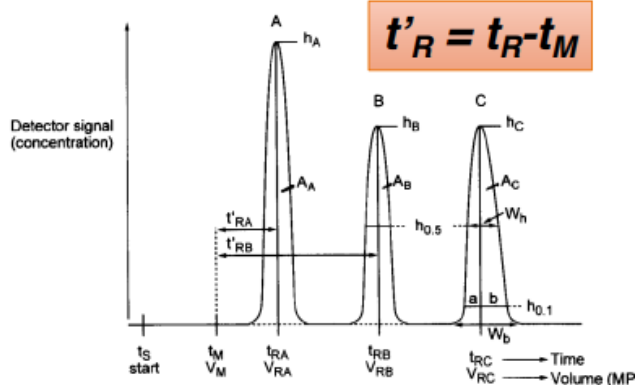
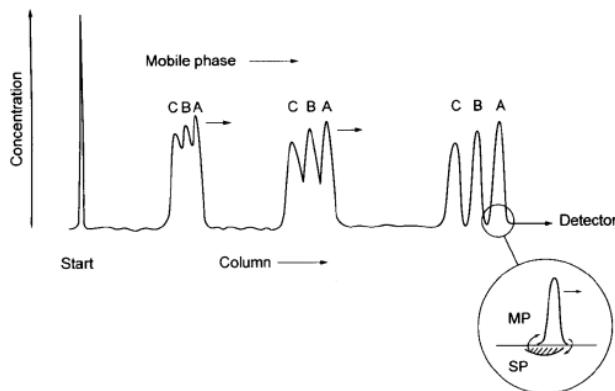
Al llegar al detector, se presenta un gráfico de tiempo en función de la señal (proporcional a la concentración).

t_R = tiempo de retención, desde que comienza la corrida, hasta que sale el último de los analitos.

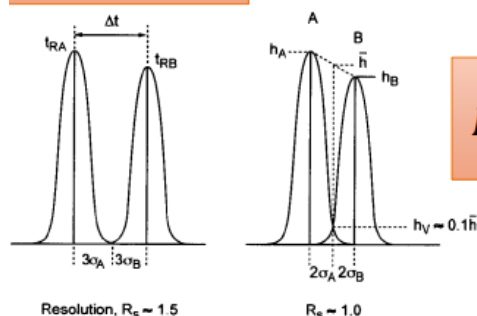
t_M = tiempo muerto. Por ej. el tiempo que tarda la FM en atravesar la columna.

t'_R = tiempo de retención ajustado respecto al tiempo muerto

$$t'_R = t_R - t_M$$



$$R_s \cong \frac{\Delta t_{B-A}}{2w_{hB}}$$



$$R_s \cong 0,1 \frac{\bar{h}}{h_v}$$

Resolución: lo que permite determinar que dos picos están separados. Es la diferencia del tiempo entre el analito B y el A (valor medio del ancho de cada señal), dividido dos veces el ancho de la base de la señal del analito B o A (se toma cualquiera porque es el mismo)

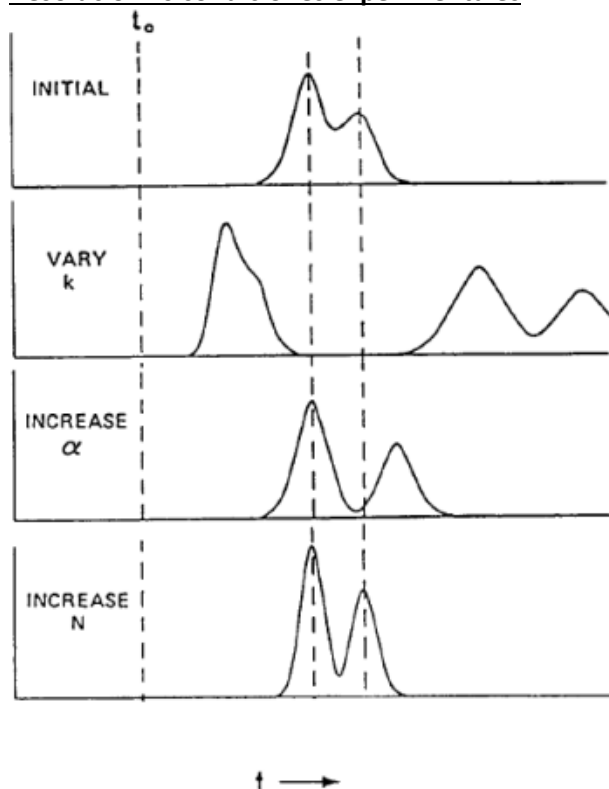
Parámetros cromatográficos

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
Longitud del relleno de la columna	L	Medida directa
Caudal	F	Medida directa
Volumen de la fase estacionaria	V_S	Datos de preparación del relleno
Concentración del analito en las fases móvil y estacionaria	c_M o c_S	Datos del análisis y de la preparación

Nombre	Ecuación	Relación con otros parámetros
Velocidad lineal de la fase móvil	$u = L/t_M$	
Volumen de la fase móvil	$V_M = t_M F$	
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	$H = L/N$	
Tiempo de retención	$(t_R)_B = \frac{16 R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$	

A medida que el factor de retención es mayor (k') más retenido en la FE queda en analito. El factor de selectividad α , es la relación de los tiempos de retención ajustado entre un analito y otro, si ambos están retenidos igual será 1, debe ser mayor a 1 para que se separen.

Resolución vs condiciones experimentales



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

Selectividad Eficiencia Retención

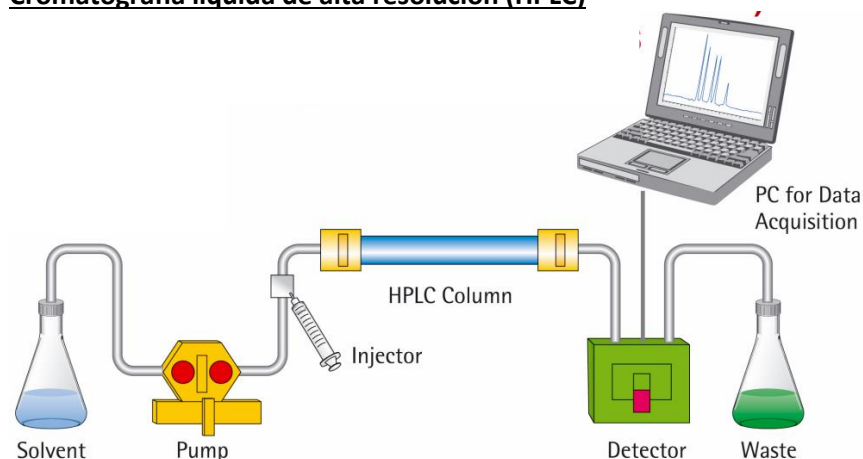
N (platos teóricos) responde a:

- Flujo
- Longitud de columna
- Tamaño de partícula

k (si es chico el analito sale rápido) y α responden a:

- Fase móvil
- Fase estacionaria
- Temperatura

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)



- Tamaño de partícula: μm
- Alta presiones: 10 MPa (2000 Psi). Una bomba que sirva para que el solvente pueda ser ingresado dentro de la columna, y tenga la fuerza suficiente para atravesarla.
- Costo equipos: desde moderado a elevado
- Muy versátil: se puede cambiar tanto la FE como la FM.

Tipos de cromatografía líquida

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.

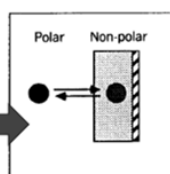
Partición de pares iónicos neutros entre fases

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.

HPLC { **FASE NORMAL: FE polar; FM no polar**
FASE REVERSA: FE no polar; FM polar



Fase móvil: solventes

Una forma de estimar la polaridad de la fase móvil es utilizando los índices de polaridad y la proporción (ϕ) de cada solvente.

Disolvente	Índice de refracción ^a	Viscosidad, cP ^b	Punto de ebullición, °C	Índice de polaridad, P'	Fuerza eluyente ^c , ϵ^0
Fluoroalcanos ^d	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	< -2	-0,25
Ciclohexano	1,423	0,90	81	0,04	-0,2
<i>n</i> -Hexano	1,372	0,30	69	0,1	0,01
1-Clorobutano	1,400	0,42	78	1,0	0,26
Tetracloruro de carbono	1,457	0,90	77	1,6	0,18
<i>iso</i> -Propileter	1,365	0,38	68	2,4	0,28
Tolueno	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Dietileter	1,350	0,24	35	2,8	0,38
Tetrahidrofurano	1,405	0,46	66	4,0	0,57
Cloroformo	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanol	1,359	1,08	78	4,3	0,88
Acetato de etilo	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Dioxano	1,420	1,2	101	4,8	0,56
Metanol	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitrilo	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Nitrometano	1,380	0,61	101	6,0	0,64
Etilenglicol	1,431	16,5	182	6,9	1,11
Agua	1,333	0,89	100	10,2	Grande

^a A 25 °C.

^b El centipoise es una unidad típica de viscosidad; en unidades del SI, 1 cP = 1 mN · s · m⁻².

^c En Al₂O₃. Multiplicando por 0,8 se obtiene el ϵ^0 para la SiO₂.

^d Las propiedades dependen de la masa molecular. Se da un intervalo de datos.

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

REVERSA → agua (A) + SO: solvente orgánico (B) (ej. agua: acetonitrilo). Si incrementa %B (< polaridad) disminuye k.

$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{(P'_{12} - P'_{11})/2}$$

NORMAL → SO no polar (A) + SO polar (B) (ej. hexano: propanol). Incrementa % B (> polaridad) disminuye k

$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{(P'_{11} - P'_{12})/2}$$

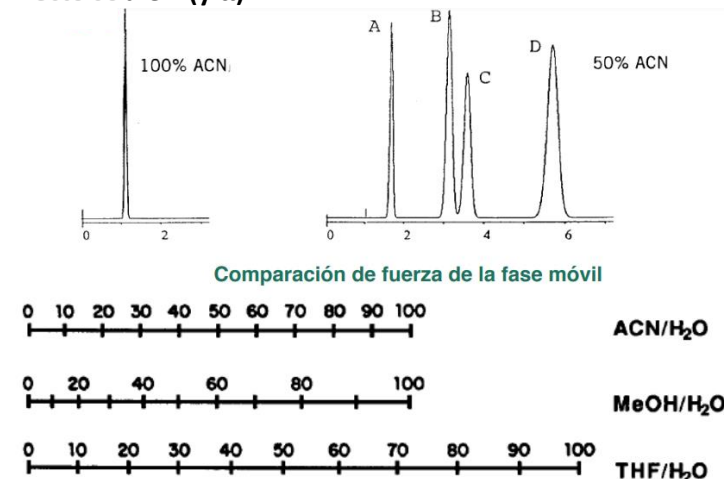
Cambios en selectividad, α (FASE REVERSA)

- Modificar % B;
- Cambiar solvente B;
- Variar pH;
- Variar buffer;
- Aditivos;
- Agentes quelantes.

Isocratico: utilizo la misma concentración de solvente durante toda la corrida cromatografica

Gradiente: Variar la proporción de solventes a medida que se quieren disminuir los tiempos de retención y acelerar la corrida cromatografía.

Efecto sobre k (y α):



Al 100% de ACN la fuerza de la fase móvil es demasiada, compete muy bien con la FE, entonces todos los analitos salen juntos.

Al 50% aumenta la polaridad para que salgan más lento, por lo que se separan y se observan varios picos.

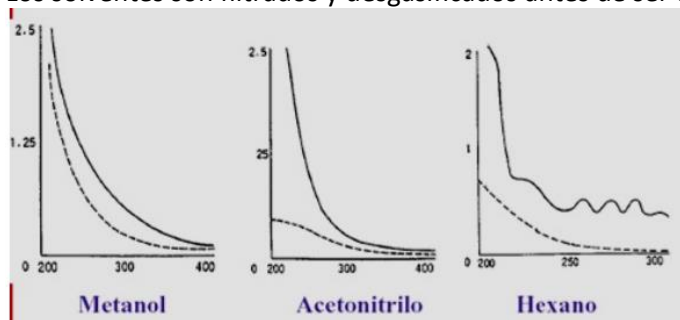
50% de ACN es equivalente a un 60% de MeOH o cerca del 40% del THF

Diferencia entre grado analítico y HPLC

Los solventes deben tener una calidad HPLC, es decir que sean puros, que no tengan partículas ni burbujas en solución porque eso afecta a la cromatografía.

El grado analítico es más impuro.

Los solventes son filtrados y desgasificados antes de ser utilizados en la cromatografía.



MeOH grado analítico aprox. USD 24/L

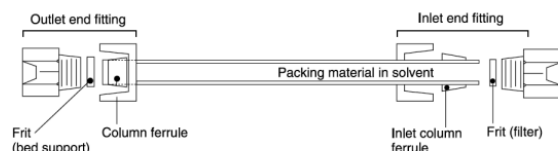
MeOH HPLC aprox. USD 178/L



Tipos de columnas

La elección del tipo de columna debe ser acorde a la cromatografía que se quiere realizar

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 μ l/min	microbore
0,5-1,5 mm	10-100 μ l/min	micro
150-500 μ m	1-10 μ l/min	capilar
10-150 μ m	10-1000 nl/min	nano



Longitud: 3 a 25 cm

Tamaño de partícula: 3 a 10 μ m

Tamaños de poros: 50 a 150 Å

Efficiency Changes with Particle Size		
Packing diameter (μ m)	Plates/meter	Flow rate (mL/min)
10	30,000	1.0
5	50,000	1.5
3	100,000	2.5

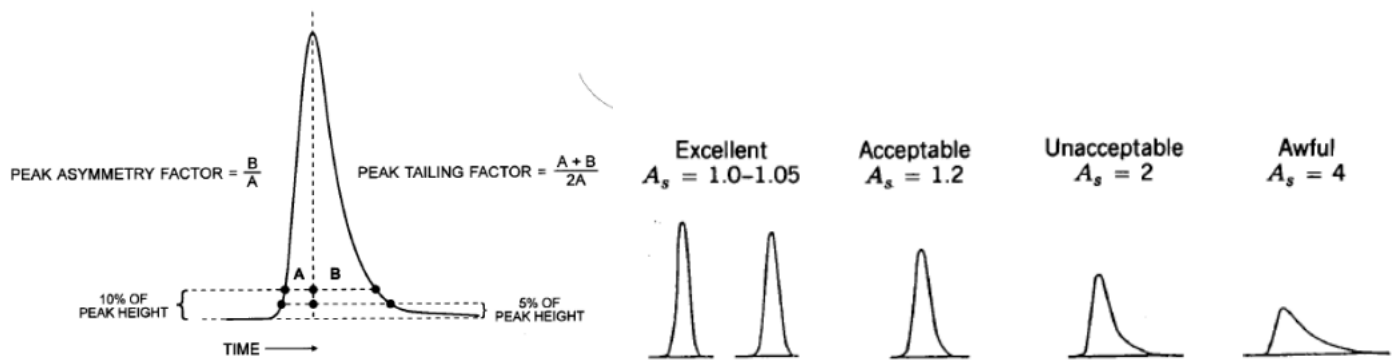
Al aumentar el número de platos por metro, aumenta la resolución, porque la eficiencia en la separación es mayor

Columna: Asimetría de picos

Un pico ideal debería ser completamente simétrico.

El factor de simetría se calcula como el ancho de la parte B sobre el de la parte A. puede ser al 10%, al 5%, o a la base.

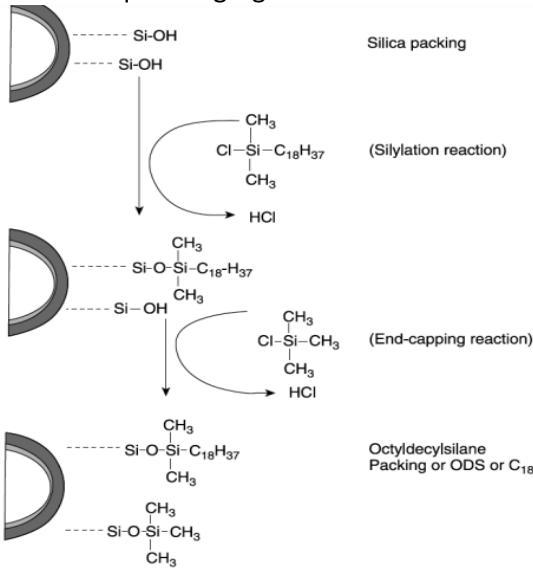
Si el resultado está entre 1-1,05 el funcionamiento de la columna es excelente. Hasta 1,2 es aceptable. Valores mayores que 2 la corrida cromatografica no sirva para separar los picos.



Fase estacionaria

Si la fase es normal, la FE es polar y generalmente posee grupos silanos.

A medida que se agregan cadenas carbonadas extensas, se disminuye la polaridad y pasa a una fase reversa.



FASE REVERSA (RP-HPLC)

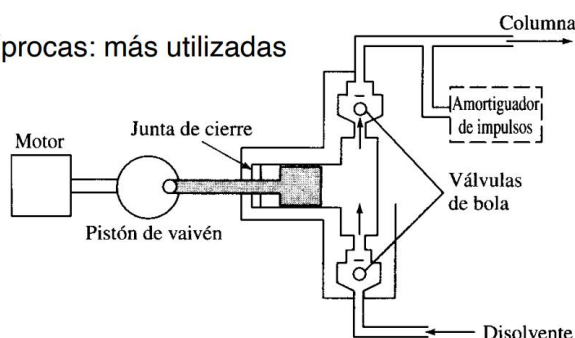
	Polarity Increase ----->							
	FASE REVERSA				FASE NORMAL			
Columns:	C18	fenil 0	C8	C4	CN	DioL	NH ₂	Si
	FASE NORMAL				FASE REVERSA			
Solvents:	Hexane	Benzene	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	THF	ACN	MeOH	H ₂ O

¿Cuándo es preferible utilizar fase normal?

- 1- Muestra no retenida en fase reversa (muy hidrofílica)
- 2- Muestra demasiado retenida en fase reversa (muy hidrofóbica)
- 3- En fase reversa, la separación es inadecuada ($\alpha \approx 1$)
- 4- Isómeros de posición, estereoisómeros o diastereómeros
- 5- cromatografía preparativa
- 6- La muestra se disuelve en solvente no polar

La bomba

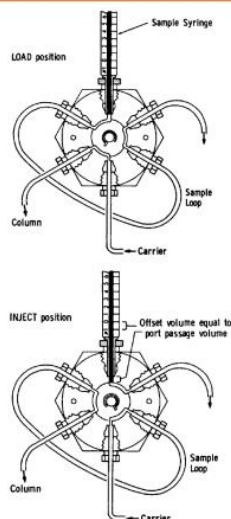
Bombas recíprocas: más utilizadas



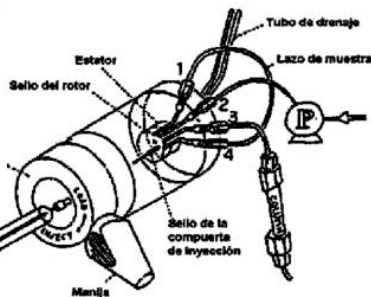
- Generar presiones por encima de 6000 psi
- Flujo libre de pulsaciones
- Caudal de 0,1 mL a 10 mL por minuto, para que sea constante se usa el amortiguador de impulsos.
- Reproducibilidad y estabilidad
- Componentes resistentes a la corrosión

Introducción de la muestra

Tamaño del lazo: 0,5 μL a 2 mL dependiendo del tipo de HPLC



inyector: posee una perilla que puede estar en modo de carga o en modo de inyección. Por otro lado posee un lazo que es donde está el volumen que se inyecta. Una jeringa que tiene punta roma para no dañar al inyector.



Cuando el lazo está en posición de carga está conectado a los residuos, cuando está en inyección, el lazo estará conectado a la columna para que pase la FM.

Detectores

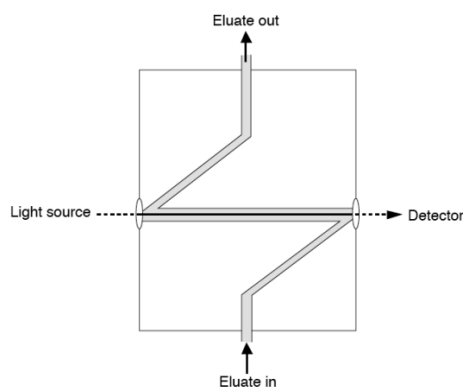
- Alta sensibilidad
- Respuesta lineal amplia
- Tiempo de respuesta corto independiente de velocidad de flujo
- Poco sensible a cambios de temperatura y presión
- Respuesta similar para distintos analitos o selectivo
- Buena estabilidad y reproducibilidad
- Volumen interno pequeño
- Alta confiabilidad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

Algunos detectores son sensibles a concentración y otros sensibles a masa

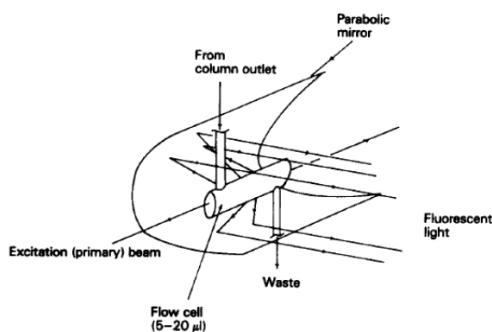
	Detection limit for sample	Linear range	Flow sensitive	Temperature sensitive	Useful with gradient	Favourable samples
Ultraviolet (absorbance)	$5 \times 10^{-10} \text{ g cm}^{-3}$	$10^4 - 10^5$	No	Low	Yes	Conjugated aromatics and heterocyclic compounds
Photo-diode (absorbance)	$> 2 \times 10^{-10}$	$10^4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

Esquema celdas de flujo

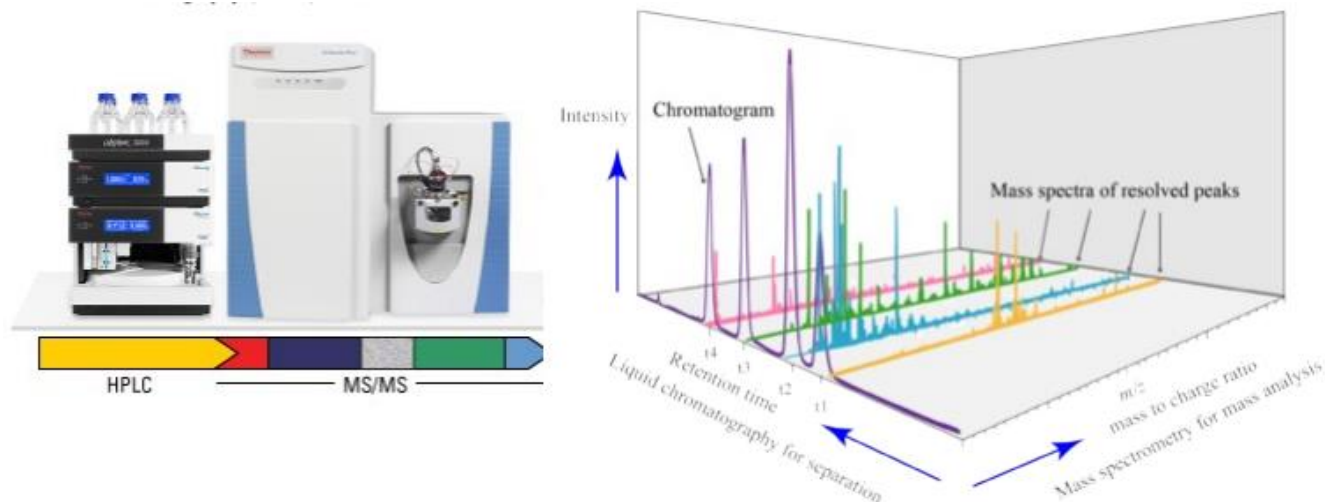
ABSORBANCIA



FLUORESCENCIA



Espectrometría acoplada a HPLC

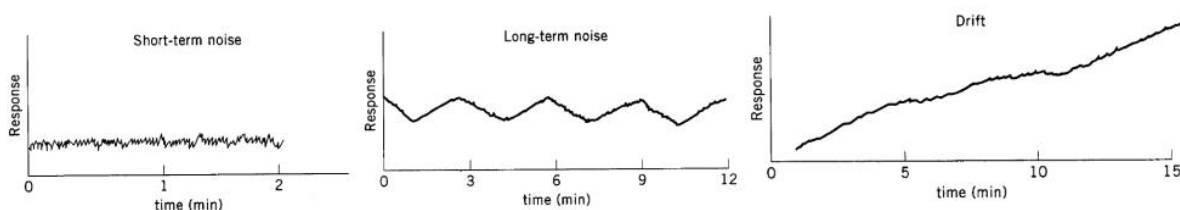


Ionización química a presión atmosférica (APCI)

- Complementaria a ESI: compuestos no polares o poco polares.
- Ionización suave
- Permite velocidades de flujo hasta 2 mL min^{-1}
- Más tolerante a buffers que ESI
- Más tolerante a condiciones experimentales que ESI
- Presenta la presencia de aductos como $(M+NH_4)^+$ o $(M+CH_3COO)^-$
- Hasta 2000 Da

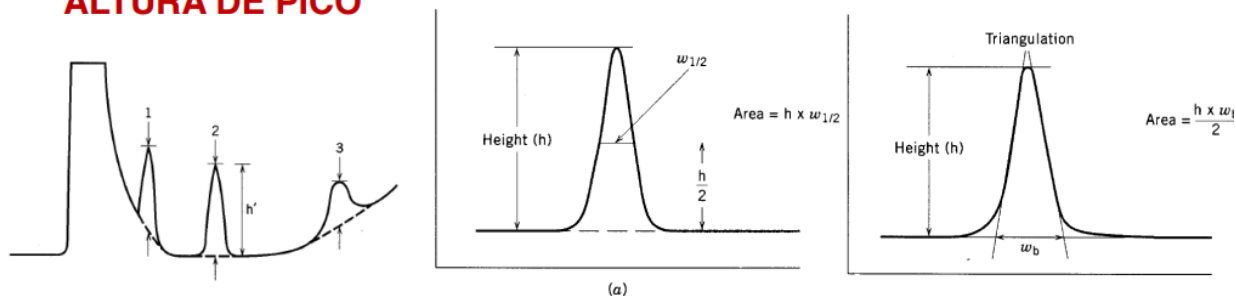
Cuantificación

RUIDO

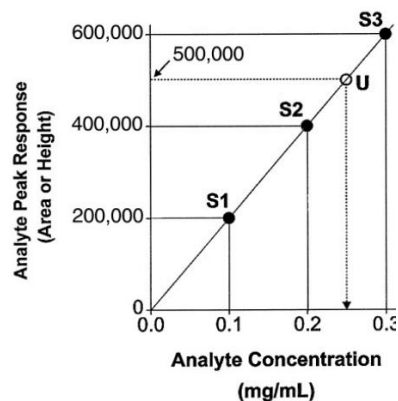


AREA DE PICO

ALTURA DE PICO



1- Método de estándar externo



Requiere:

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

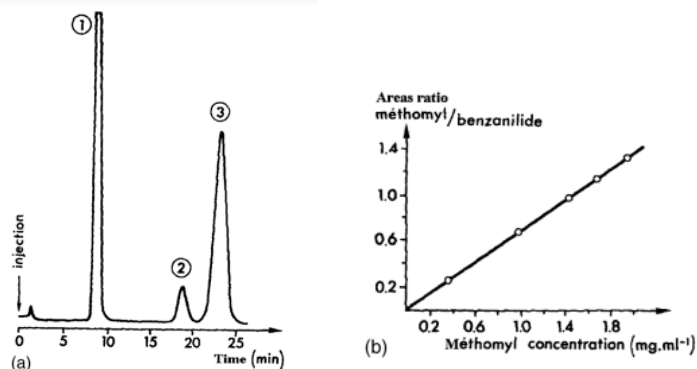
Area (y) = ax

2- Método de estándar interno

- 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.

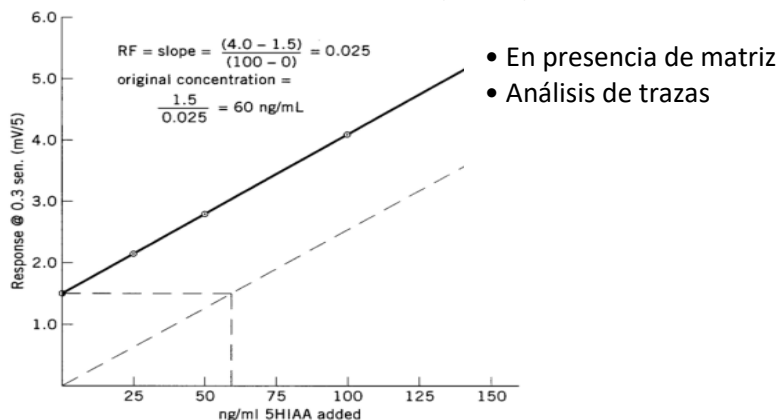


$$\frac{Area\ x}{Area\ ei} = a\ x$$

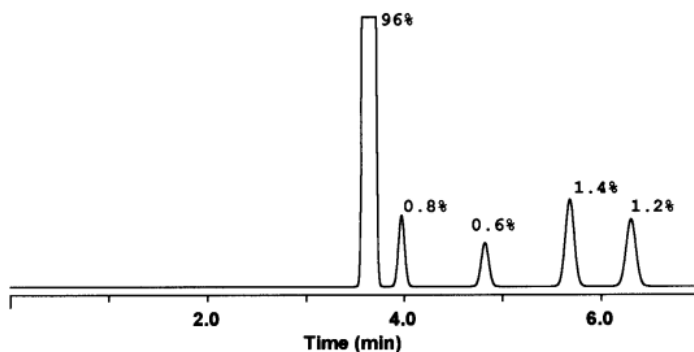
Factores de respuesta: $D_{RFx} = Area\ x / [x]$;
 $D_{RFei} = Area\ ei / [ei]$
 Luego $D'_{RF} = Area\ x * [ei] / Area\ ei * [x]$

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

3- Método de las adiciones estándar (MOSA)



4- Método de normalización de áreas



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

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

Técnicas en TANDEM

Un método analítico tiene diferentes etapas: separación, identificación, cuantificación. En las técnicas en TANDEM se busca que esas tres etapas se realice en un mismo experimento, sin necesidad de aislar una muestra y pasar de un equipo a otro.

Para ellos la separación y la identificación/cuantificación, van a estar dadas por diferentes componentes de este equipamiento.

Para el caso de separación puede haber un instrumento que hace la cromatografía o electroforesis capilar.

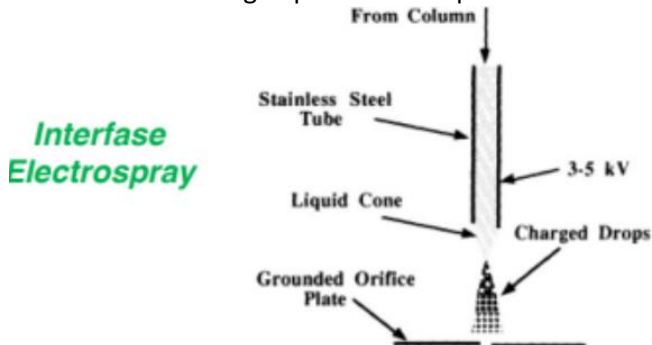
La parte de cuantificación e identificación, los detectores pueden ser por técnicas espectroscópicas o de masas.

HPLC- MS

Más complejo que cromatografía gaseosa-MS

- Por baja volatilidad de analitos
- EI y CI no son adecuadas
- Necesita de solvatación previa a MS.

Alto contenido de agua puede ser un problema



Velocidad de flujo: afecta tamaño y la distribución de las gotas en el proceso de ESI => cantidad de cargas.
5 a 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ es mayor la eficiencia en ESI.

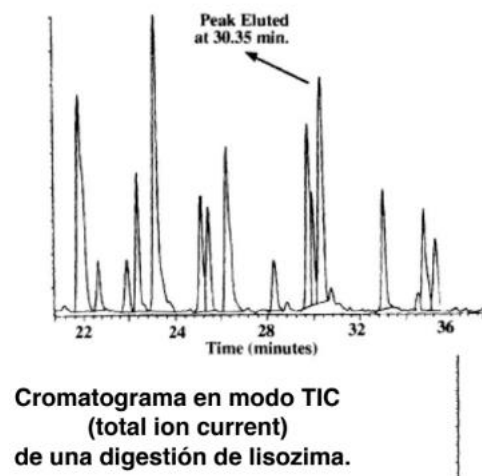
* Utilizar columnas de diámetro reducido (microbore)

Mantener el mismo tiempo de retención que en una analítica (d.i= 4,6 mm; flujo 1 mL/min)

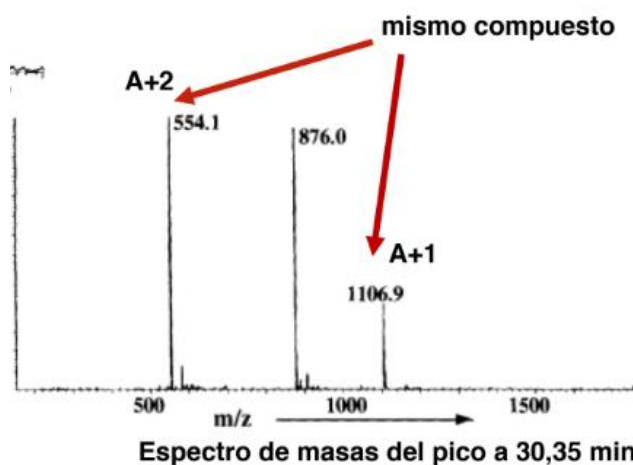
$$\text{flujo} = \left(\frac{r}{4,6} \right)^2 \times 1,0$$

* Dividir el flujo.

En general, a bajos flujos ESI es sensible a concentración y a flujos altos es sensible a masa



Cromatograma en modo TIC
(total ion current)
de una digestión de lisozima.

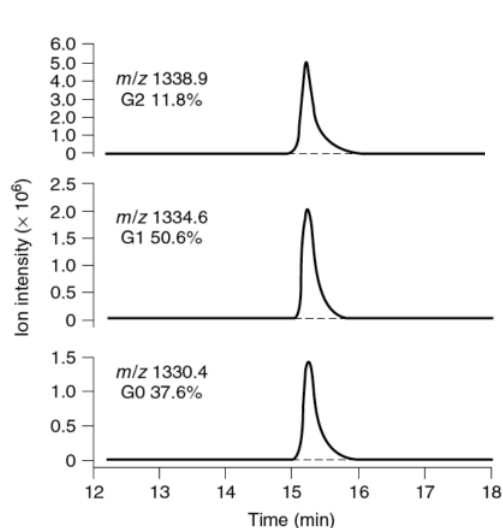
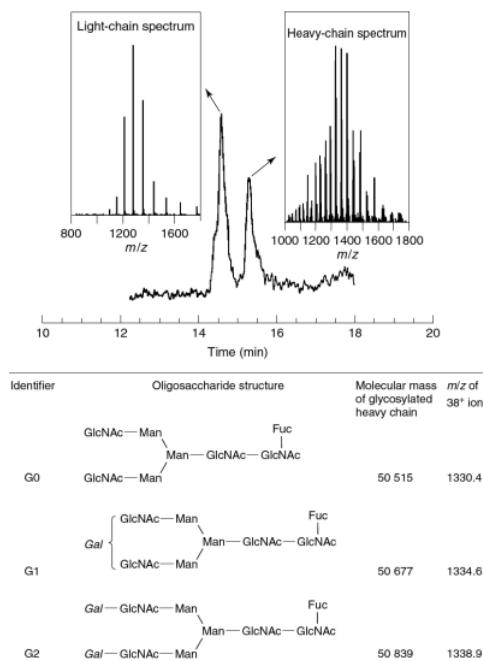


MS- MS

En una etapa se aísla un ion de interés y en otra etapa se utiliza para obtener relaciones entre este ion con otros (padre e hijos).

- Ion hijo
- Ion padre
- Pérdida de masa constante
- Selección de monitorear descomposición

Permite realizar determinaciones en metabolómica, estructuras de biomoléculas.



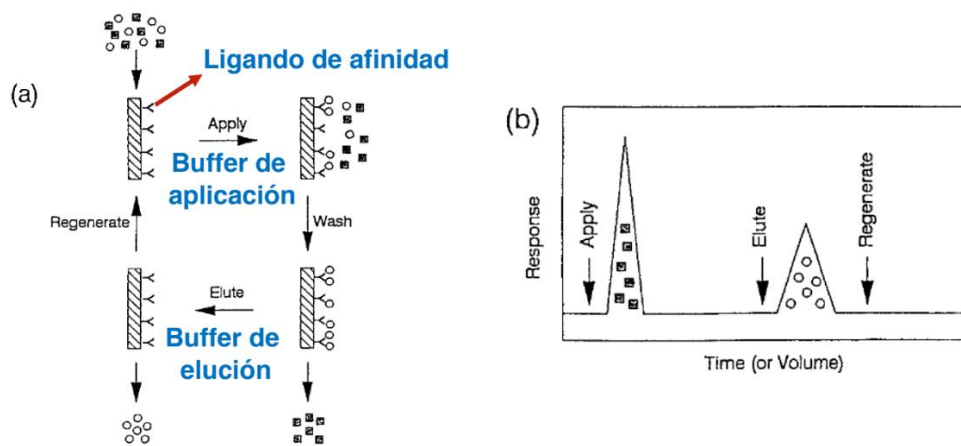
RITUXIMAB: anticuerpo monoclonal recombinante. Actividad depende del número de residuos galactosa terminales sobre el residuo asparagina 301.

Cromatografía de afinidad

- Utiliza un agente 'biológico' como fase estacionaria.
- Purificación y análisis de componentes de una mezcla.
- Interacciones no covalentes, reversibles (no se produce ningún enlace entre la FE y el analito, sino que se da por interacciones no covalentes y además se puede revertirla interacción haciendo que el analito fluya).

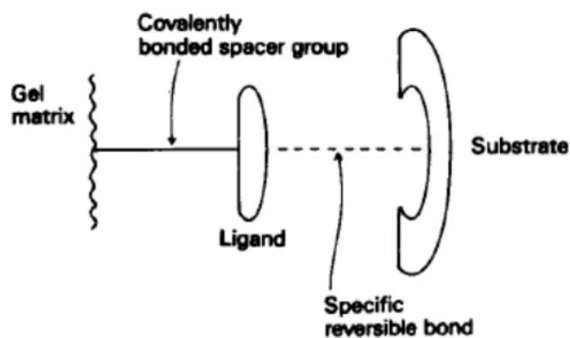
Una FE que tiene un ligando de afinidad muy específico, se aplica un buffer, el cual contiene una mezcla de lo que se quiere separar. Lo que tiene afinidad por la FE va a quedar retenido y lo demás va a ser eluido por el lavado.

Si se quiere recuperar lo que está retenido en la FE, se aplica el buffer de elución para poder recuperar el analito de interés.



La fase estacionaria:

- El ligando
 - El soporte:
 - +Baja eficiencia (en columna): Ej. Geles basados en carbohidratos.
 - +Alta eficiencia (HPAC): ej. silica, poliestireno hidroxilado vidrio.
- Hay una matriz unida covalentemente al ligando y luego el ligando, por un enlace reversible, se va a unir al sustrato que es el analito de interés.



Para inmovilizar el ligando:

A- Activación

B- Acoplamiento

Se debe evitar: unión múltiple; orientación incorrecta; impedimento estérico.

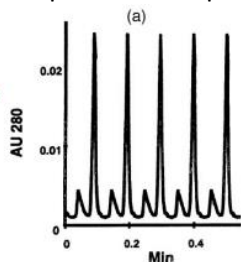
Buffer de aplicación

- Solventes con pH, polaridad y fuerza iónica similar al ambiente natural.

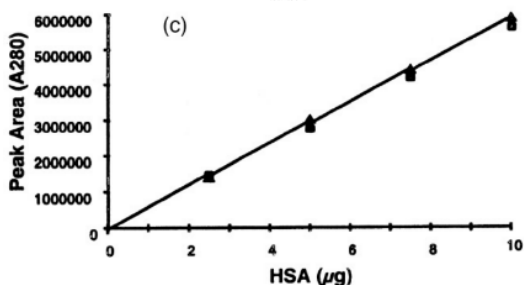
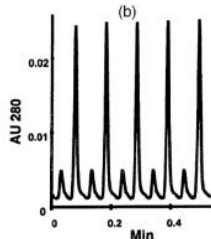
Buffer de elución

- Elución no específica: disminuir K
- Elución bioespecífica: competencia con el soluto (normal) competencia con el ligando (reversa)

Primeros 5 análisis



Últimos 5 análisis de un total de 5000

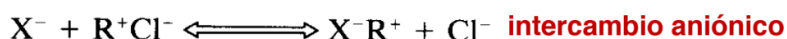
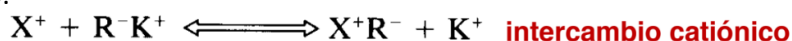


FASE ESTACIONARIA: Anticuerpo policlonal anti-HSA inmovilizado sobre epoxi.
SOLVENTE DE APLICACIÓN: PBS (buffer fosfato)
SOLVENTE DE ELUCIÓN: 12 mM HCl con 150 mM NaCl.
MUESTRA: 10 g HSA a 1mg/mL.

Cromatografía de intercambio iónico

- Fase modificada con sitios catiónicos (tendrá afinidad por aniones) o aniónicos (tendrá afinidad por cationes).
- Separación de compuestos iónicos.
- Interacciones electrostáticas (por diferentes cargas).
- Fase acuosa.

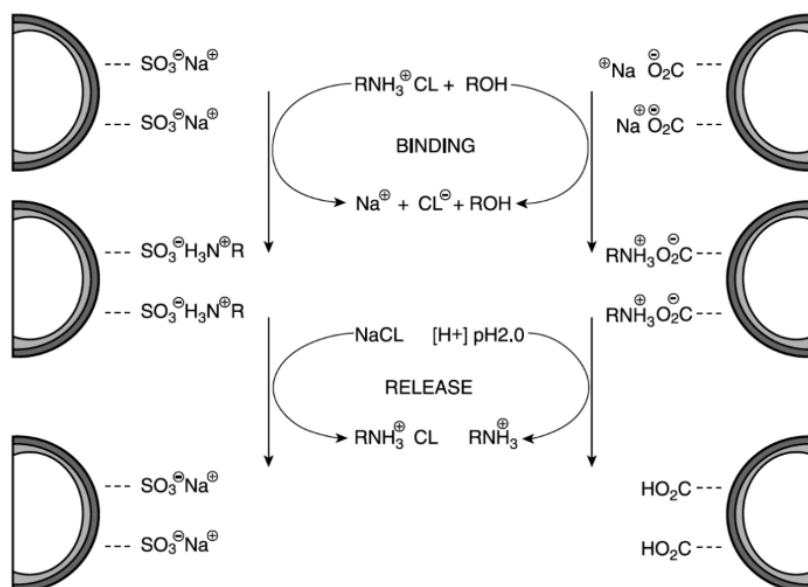
Si la resina tiene sitios anionicos (afinidad por cationes), al agregar una mezcla con cationes va a haber un intercambio catiónico.



$$k = \frac{K}{[\text{contraion}]^z}$$

La retención de un soluto iónico de carga z a la resina de intercambio está relacionada a la [contraion] en la fase móvil.

$$\log k = \log K + z \log (1/ [\text{contraion}])$$

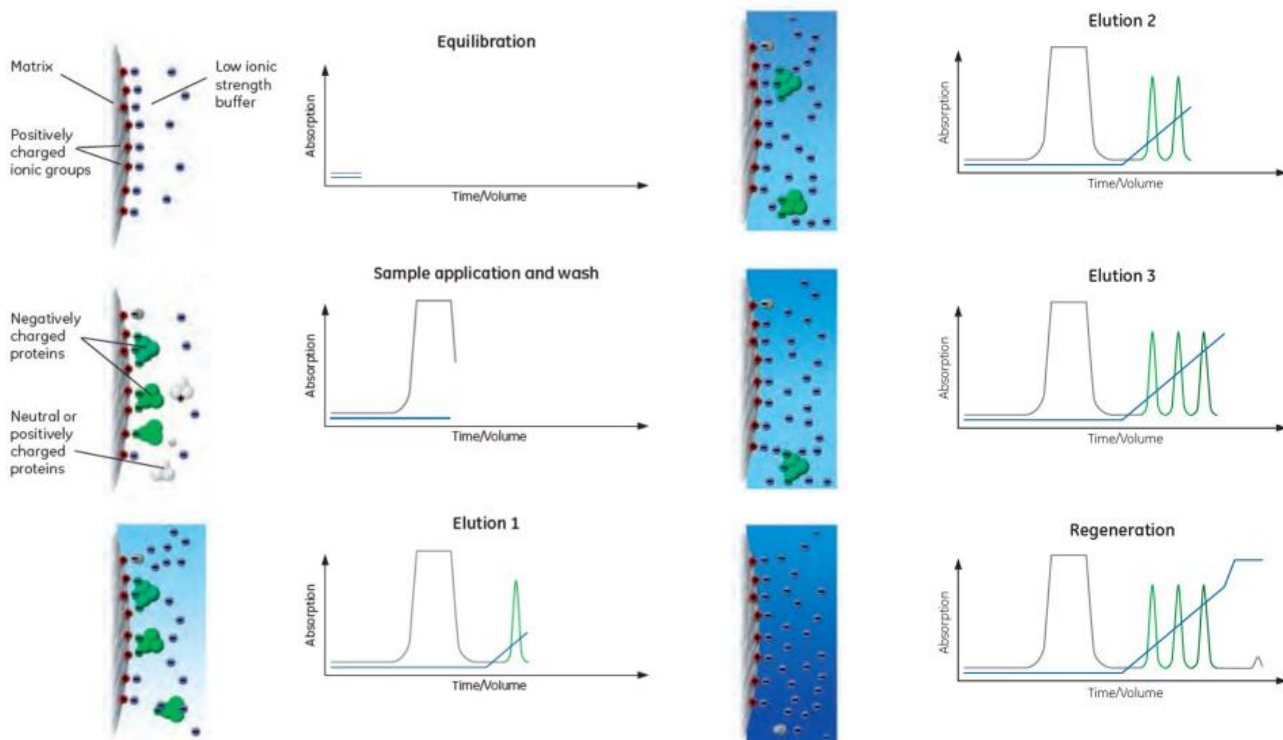


Ej. la resina tiene aniones sulfatos, acompañados de Na. Se le agrega una mezcla, por ej. alcohol con una sal de amonio. El amonio va a tener mayor afinidad y va a desplazar al sodio de la fase estacionaria y quedara retenido, dejando eluir el resto (alcohol, contra iones).

Si se quiere recuperara la sal de amonio, se aplica algo con mayor fuerza ionica para que vuelva a ocurrir el intercambio de cationes, se desplaza el amonio y se obtiene

Esta la matriz, a la cual se le agrega un buffer de baja fuerza ionica, por lo que queda en la línea de base. Al aplicar la muestra de interés van a ir quedando retenidos los iones, lo que sale es lo de lavado. Cuando se aplica la elución, comenzara a salir el analito de interés.

Si es más de un analito con diferentes afinidades, se van a ir desplazando.



Resinas modificadas covalentemente: fases estacionarias

	Functional group	Type	pK	pH Range (approximate)
Anion exchange				
DEAE (diethylaminoethyl)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Weak	5-9	2-9
PEI (polyethyleneimine)	$(-\text{NHCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	Weak	5-9	2-9
Q (quaternary ammonium)	$-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Strong	>13	2-12
Cation exchange				
CM (carboxymethyl)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Weak	4-6	6-10
SP (sulfopropyl)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Strong	<1	4-13
S (sulfonate)	$-\text{R}-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Strong	<1	3-11
(R may be methyl with hydroxyl or amide groups)				

Ejemplos de matriz soporte en fases estacionarias:

Partículas no porosas

- Mayor resolución
- Evita difusión

Partículas porosas

- Alta capacidad de interacción

Fase Móvil

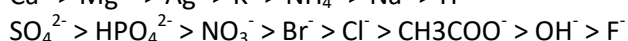
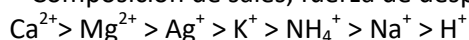
Buffer salt	pH Range
Ammonia	8.2-10.2
Ammonium acetate	8.6-9.8
Ammonium phosphate	2.2-6.5
Citric acid	2.0-6.0
Disodium hydrogen citrate	2.6-6.5
Potassium dihydrogen phosphate	2.0-8.0 / 9.0-13
Potassium hydrogen phthalate	2.2-6.5
Sodium acetate	4.2-5.4
Sodium borate	8.0-9.8
Sodium dihydrogen phosphate	2.0-6.0 / 8.0-12
Sodium formate	3.0-4.4
Sodium perchlorate	8.0-9.8
Sodium nitrate	8.0-10.0
Triethanolamine	6.7-8.7

Factores que influyen en la resolución de la cromatografía:

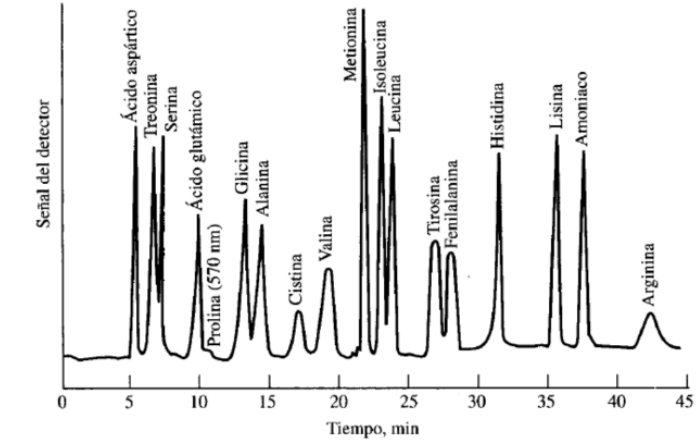
- fuerza iónica
- pH
- temperatura
- composición de sales
- flujo
- modificador orgánico

- A mayor fuerza iónica; mayor fuerza del solvente

- Composición de sales, fuerza de desplazamiento



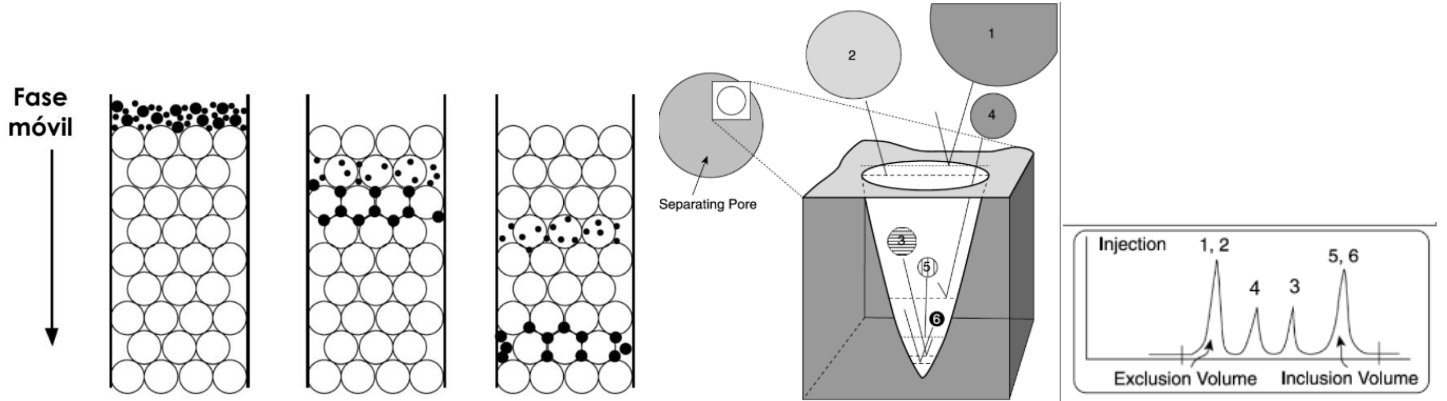
- Aumento del pH, mayor ionización de ácidos, mayor retención como aniones; Disminución de pH, mayor retención de base como cationes.
- Flujo puede afectar resolución.
- A mayor temperatura, mayor intercambio
- Modificador orgánico tiene efecto para compuestos más hidrofóbicos.



Separación de aminoácidos con una columna de intercambio iónico. Relleno: intercambiador catiónico con un tamaño de partícula de 8 µm. Presión: 2.700 psi.

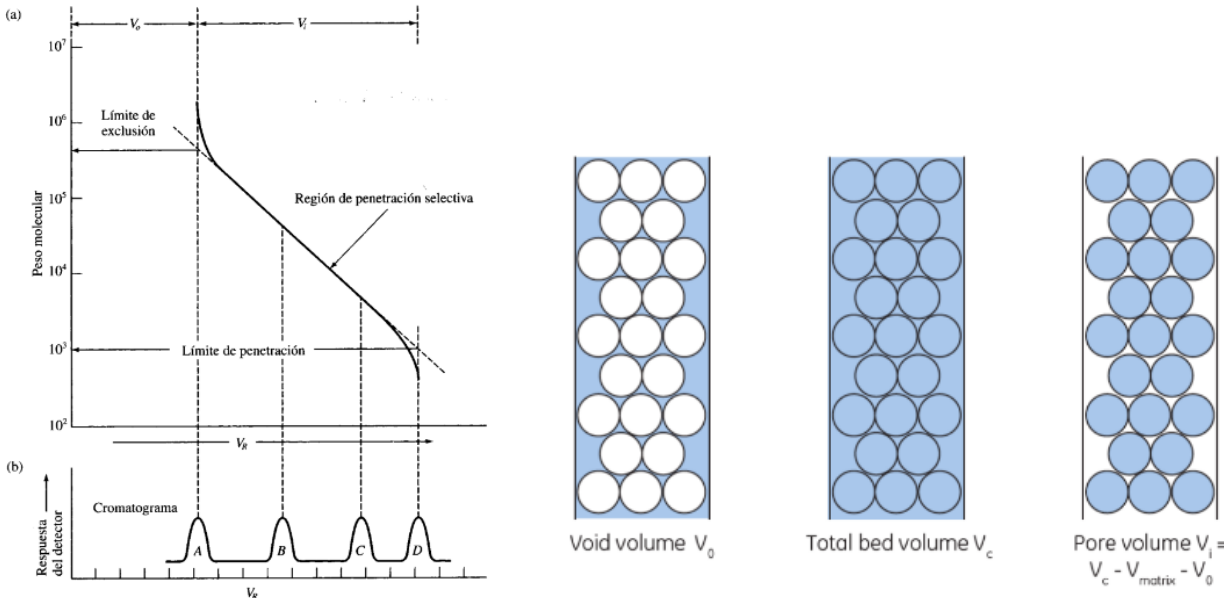
Cromatografía de exclusión por tamaño

- Separación de compuestos por diferencias en tamaño o volumen hidrodinámico.
 - Biomoléculas, distribución de PM en polímeros.
 - La fase estacionaria está compuesta por partículas con poros, los cuales se pueden cambiar de acuerdo a lo que se quiere separar.
- Los mas grandes son los primeros que salen, porque no entran en el poro. Los de tamaño intermedio pueden entrar, pero no a gran profundidad. Los pequeños entran libremente dentro del poro y salen al final.
- Fase estacionaria: geles de polímeros entrecruzados semirígidos o partículas de sílica.

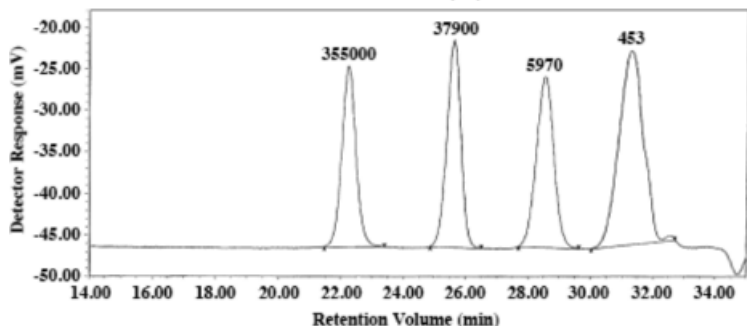
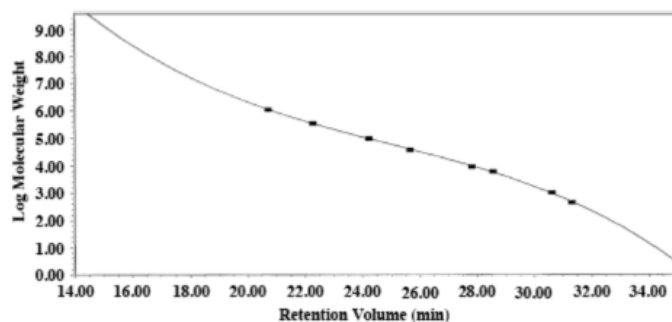
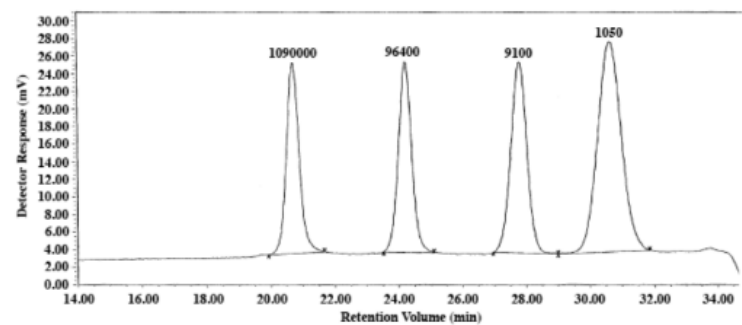


Límite de exclusión y Límite de penetración.

$V_e = V_0$ (necesario para atravesar la columna) + KV_i (especifico, relacionad con la afinidad del analito)



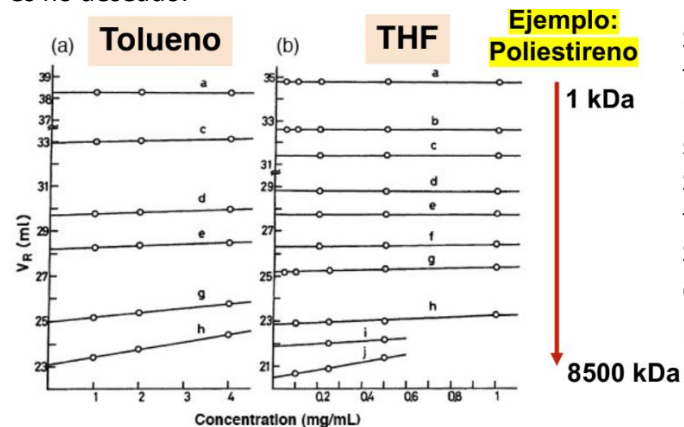
- Fase móvil: acuosa a velocidades de flujo bajas. FE hidrofílica (Cromatografía por filtración de gel) 1959
 - Fase móvil: solventes orgánicos. FE hidrofóbica (Cromatografía por permeación de gel) 1964
 - Detector sensible a masas. Generalmente refractómetro.
- Otros detectores: Absorbancia, dispersión de luz, viscosímetros, MALDI- TOF, RMN



Efecto de la concentración y Efecto de sobrecarga

Ej. Si una columna de SEC (25 cm x 8 mm d.i) se utiliza, la concentración no debe superar 0,2% Tolueno y THF como FM.

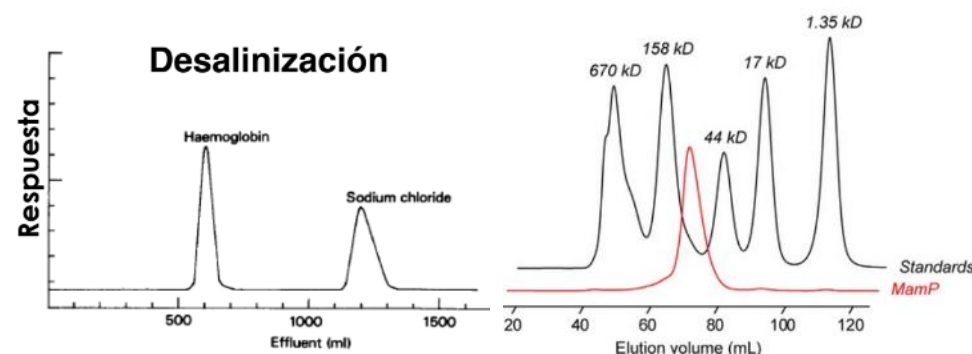
La concentración no debería importar, ya que esta cromatografía se basa en el tamaño, pero si se produce algún efecto, es no deseado.



Si se trabaja con polímeros pequeños, la concentración no tiene ningún efecto, pero en el polímero de mayor PM si hay efectos de la concentración, dependiendo del solvente el efecto será mayor o menor.

Se pueden cambiar los resultados variando la velocidad de flujo y la temperatura.

Si se tiene una proteína globular y otra extendida en su estructura 3ª o 4ª. La globular va a parecer mas pequeña, por lo que quedara retenida mayor tiempo.



Caracterización proteína

