



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química
Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica

Unidad de Aprendizaje
Análisis Instrumental

tema: CROMATOGRAFIA DE
GASES Y LIQUIDOS

M. en C. A. María Magdalena García Fabila

2017



CROMATOGRAFIA DE GASES

GC



Guion Explicativo

El presente documento es un material de apoyo didáctico para la Unidad de Aprendizaje Análisis instrumental

En el tema de Cromatografía de Gases y Líquidos, comprendido en el programa de la Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica. Contiene explicaciones resumidas de los temas comprendidos en el programa académico, sobre el tema de Cromatografía de Gases y de líquidos.

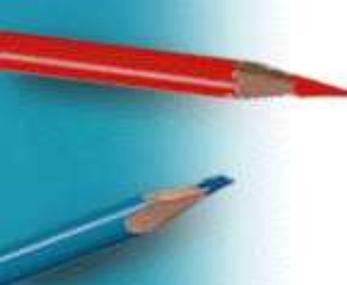
Se recomienda seguir el documento durante el curso, el material presentado debe complementarse con ejercicios matemáticos y estudios de caso, además se recomienda el uso de libros, artículos y apuntes complementarios, así como de visitas al laboratorio.



¿Qué es?

La cromatografía es una técnica en donde se lleva a cabo la separación de compuestos.

Es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil.



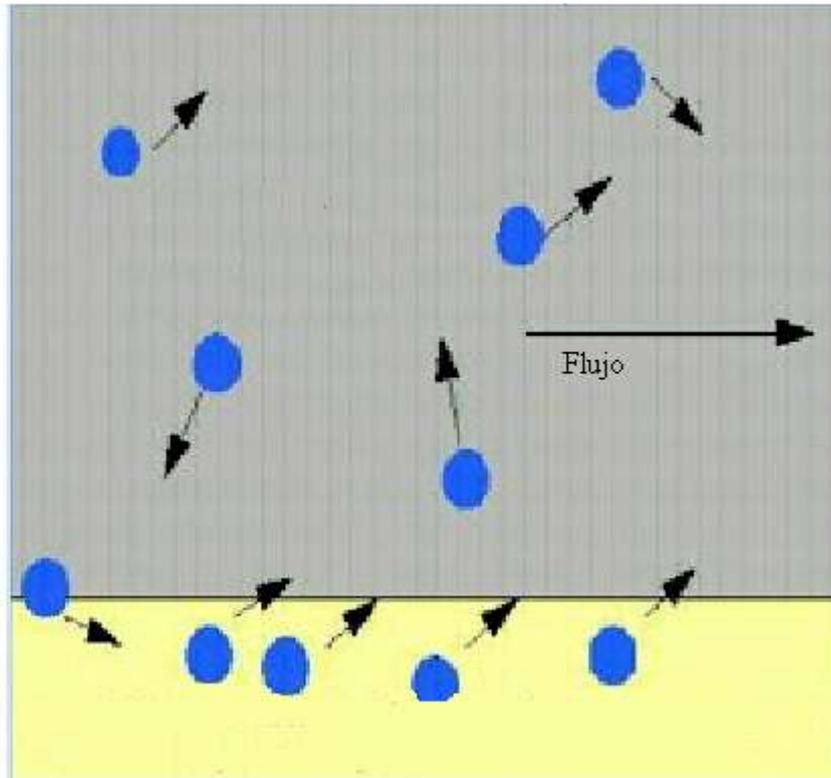
¿Para que sirve?

Su propósito es identificar, cuantificar o purificar cada uno de los componentes de una mezcla de solutos, basándose en las velocidades con las que se mueve cada soluto a través de un medio poroso arrastrado por un solvente, una mezcla de solventes o por gas.



Fase Móvil

Fase estacionaria



Cromatografía

En fase gaseosa

En fase supercrítica

En fase líquida

Columna

Placa CCF

Adsorción

Partición
(sílice)

Intercambio
iónico

Pares de
iones

Intercambio
de ligantes

Transferencia
de carga

Afinidad

Exclusión



La cromatografía de adsorción

se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. El equilibrio entre el estado adsorbido y la solución es la causa de la separación de las moléculas del soluto.

La cromatografía de reparto

una fase estacionaria forma una película delgada de la superficie de un soporte sólido. El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida o gaseosa.

La cromatografía de intercambio iónico

se basa en el equilibrio de los iones de soluto entre el solvente y los sitios fijos cargados de la fase estacionaria esta cuenta con intercambiadores aniónicos (grupos con carga positiva unidos covalentemente) los cuales retienen a los aniones del soluto y con intercambiadores catiónicos (grupos con carga negativa) retienen a los cationes del soluto.



La cromatografía de exclusión molecular

cromatografía de filtración en gel, en esta técnica las moléculas se separan por su tamaño se utiliza mucho en la bioquímica para separar moléculas grandes como proteínas, carbohidratos e incluso para separar polímeros y caracterizarlos.

La cromatografía por afinidad

se utilizan interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y otras moléculas que se unen (inmovilizan) covalentemente a la fase estacionaria.

La cromatografía de líquidos de alta resolución

se utiliza para separación de compuestos que no son lo suficientemente volátiles o no tienen bastante estabilidad térmica para la cromatografía de gases, pues emplea solventes como fase móvil.



La cromatografía de gases

Se basa en que un líquido volátil o un soluto gaseoso son arrastrados por una fase móvil gaseosa que circula sobre un líquido estacionario que recubre un soporte sólido o sobre una superficie sólida adsorbente.

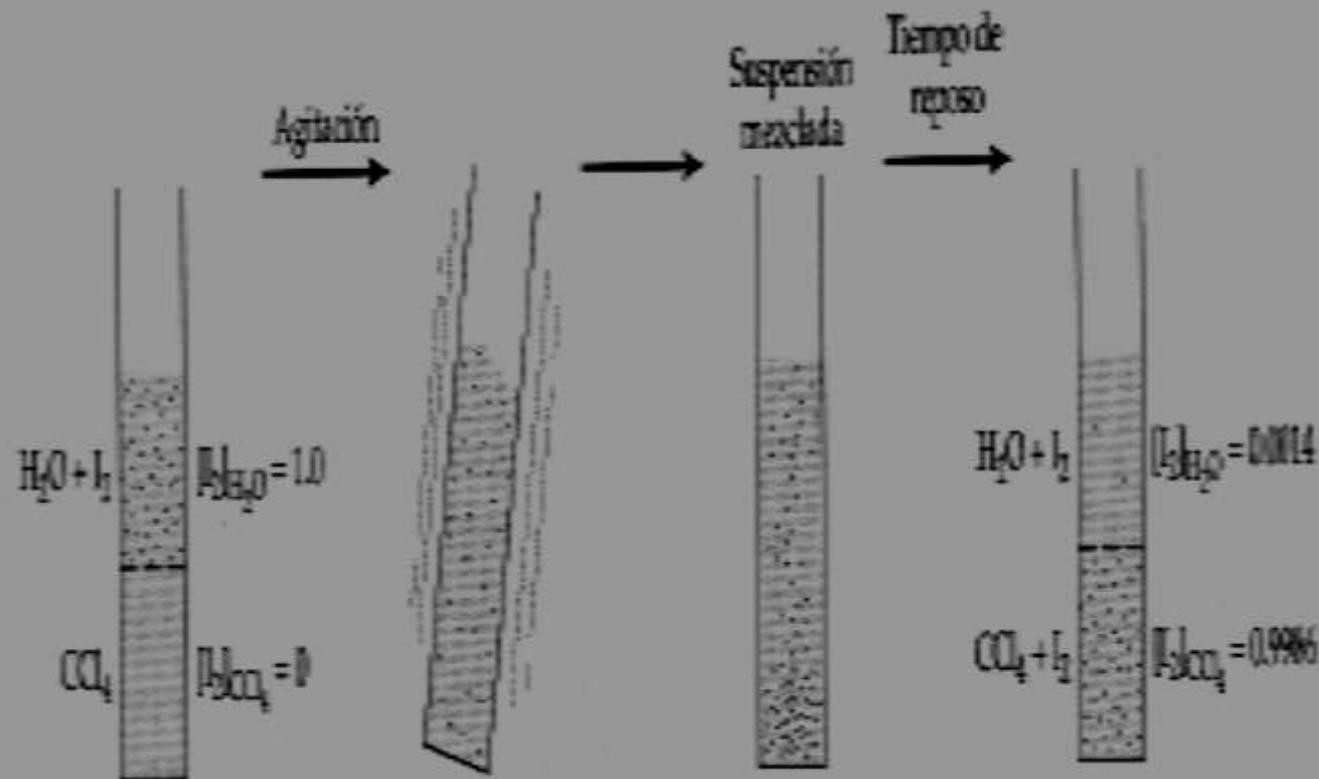
La fase estacionaria suele ser un líquido no volátil que recubre el interior de la columna o un soporte sólido de grano fino. Esta forma más común de cromatografía de gases se llama **cromatografía de reparto o de partición gas – líquido.**

En ocasiones se utilizan como fase estacionaria partículas sólidas sobre las que el soluto puede adsorberse.

En este caso la técnica se denomina **cromatografía de adsorción gas – sólido.**



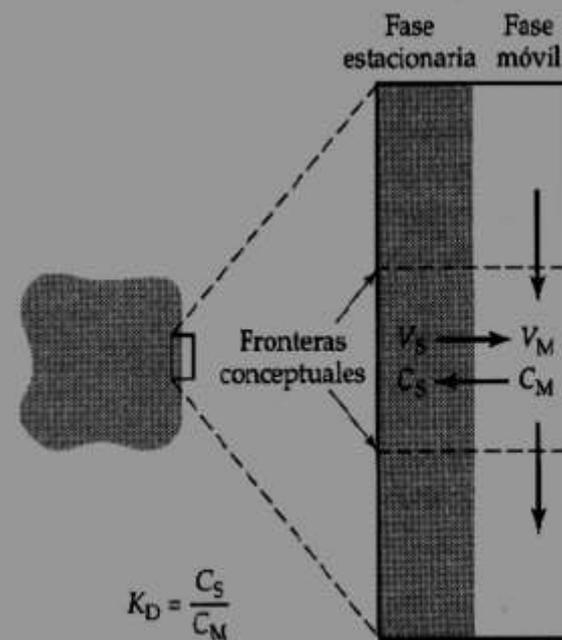
TEORIAS DE LAS SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

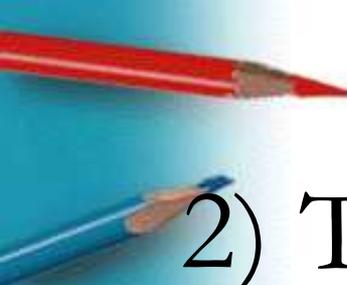


1) Extracciones.

Coeficiente de Partición entre octanol y agua (K_{ow})

Este es una medida para la capacidad de distribución de una sustancia como un plaguicida entre dos solventes inmiscibles entre si como el agua (polar) y octanol (relativamente apolar).





2) Teoría de platos

- SE HACE LA COMPARACIÓN DE UNA COLUMNA CROMATOGRÁFICA CON UNA ANTIGUA COLUMNA DE DESTILACIÓN
- SE CONCIBE A LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA COMO UNA SERIE DE CAPAS ESTRECHAS
- CONTIGUAS LLAMADAS PLATOS TEÓRICOS
- DURANTE LA ELUCIÓN, SE PRODUCE UN EQUILIBRIO EN CADA PLATO DE LA MUESTRA
- ENTRE LA FASE MÓVIL Y ESTACIONARIA (INFINITAMENTE RÁPIDO)
- EL NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS SERÁ ENTONCES PROPORCIONAL A LA EFICIENCIA

- DONDE L ES LA LONGITUD DE LA COLUMNA Y H ES LA ALTURA DE PLATO LA EFICIENCIA SERÁ ENTONCES INVERSAMENTE PROPORCIONAL AL ESPESOR(ALTURA) DEL PLATO

$$H = L/N$$



C) TEORÍA CINÉTICA DE LA CROMATOGRAFÍA

- A DIFERENCIA DE LA TEORÍA DE LOS PLATOS, CONSIDERA QUE EL EQUILIBRIO NO ES INFINITAMENTE RÁPIDO
- LA FORMA DEL CROMATOGRAMA DEPENDE DE LA DIFUSIÓN DEL SOLUTO POR LA COLUMNA, DE LA VELOCIDAD DE ELUCIÓN Y LOS CAMINOS POR LA FASE ESTACIONARIA.
- SI CONSIDERAMOS TODOS LOS MECANISMOS ANTERIORES, SE DEDUCE LA ECUACIÓN DE **VAN DEEMTER**

$$H = A + B/v + Cv$$

Donde:

A, B Y C SON CONSTANTES DEPENDIENTES DE LA FASE ESTACIONARIA Y MÓVIL

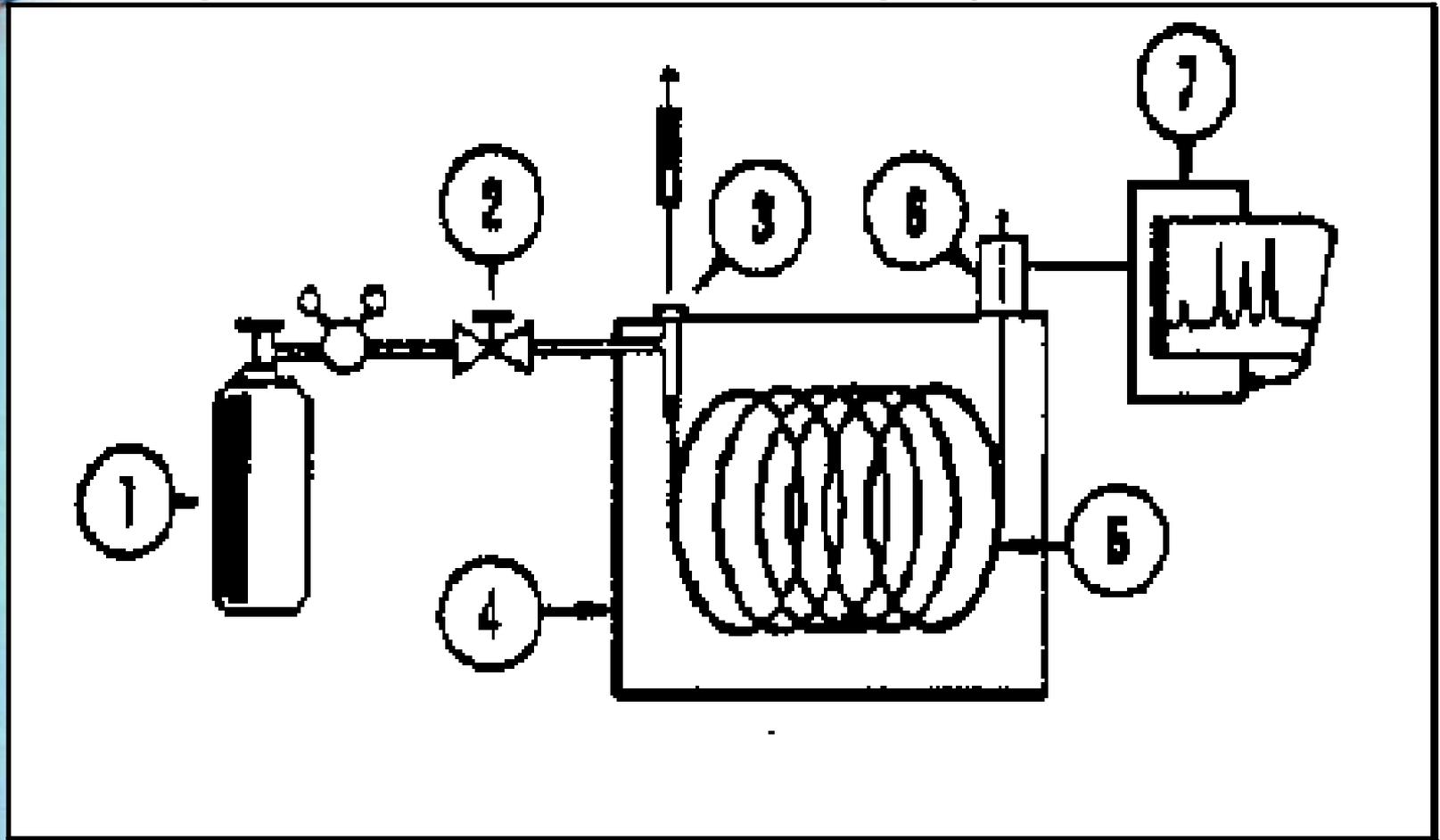
v ES LA VELOCIDAD DE LA FASE MÓVIL (GASTO)



INSTRUMENTACIÓN

CG

Diagrama de un cromatografo de Gases

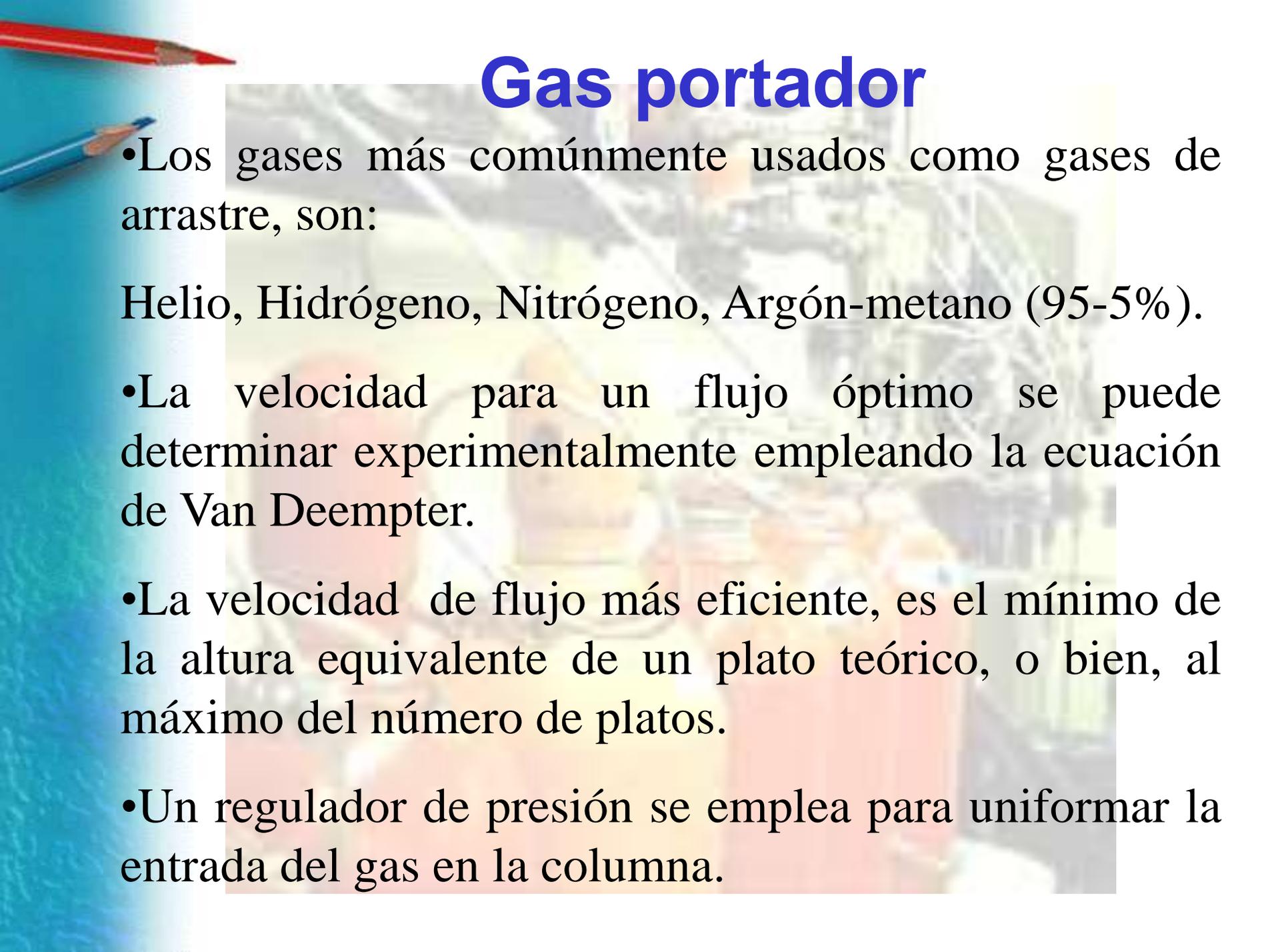


1.-Gas Portador, 2 y 3.- Inyector, 4.- Horno ,
5.-Columna, 6.-Detector, 7.-Registrador



Gas portador

- *Inerte con respecto a la muestra y a la fase estacionaria*
 - *Capaz de minimizar la difusión gaseosa.*
 - *De fácil disponibilidad y con un alto grado de pureza*
 - *Adecuado al tipo de detector que se emplea.*
- 



Gas portador

- Los gases más comúnmente usados como gases de arrastre, son:

Helio, Hidrógeno, Nitrógeno, Argón-metano (95-5%).

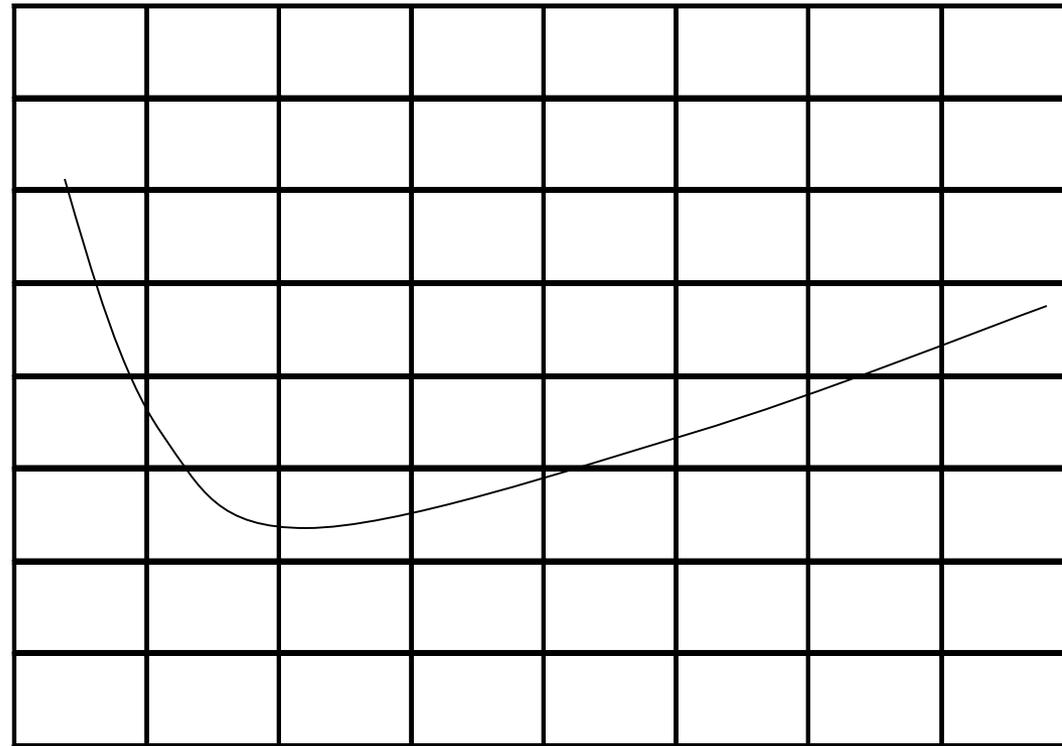
- La velocidad para un flujo óptimo se puede determinar experimentalmente empleando la ecuación de Van Deempter.

- La velocidad de flujo más eficiente, es el mínimo de la altura equivalente de un plato teórico, o bien, al máximo del número de platos.

- Un regulador de presión se emplea para uniformar la entrada del gas en la columna.

Plano de Van Deemter para la selección de la velocidad de flujo óptimo del gas de arrastre.

AEPT



Velocidad de flujo



SISTEMAS DE MUESTREO

Es el lugar donde se introduce la muestra al cromatógrafo de gases y en el cual la muestra debe evaporarse de inmediato y combinarse con el gas de arrastre.



Muestras líquidas.

Se emplea una jeringa, se perfora con ella un septum.

Muestras gaseosas.

Se emplean válvulas muestreadoras especiales con el empleo de circuitos muestreadores de volúmenes específicos, o bien con jeringas especiales.

Muestras sólidas.

Se recurre a solventes o se emplean jeringas especiales en forma de espátulas.



COLUMNAS

La columna es el corazón de un sistema cromatográfico.

Para seleccionar una columna se requieren consideraciones especiales:

- a) material de la columna*
- b) tipo de columna*
- c) dimensiones de la columna*
- d) selección de la fase estacionaria y del soporte sólido.*

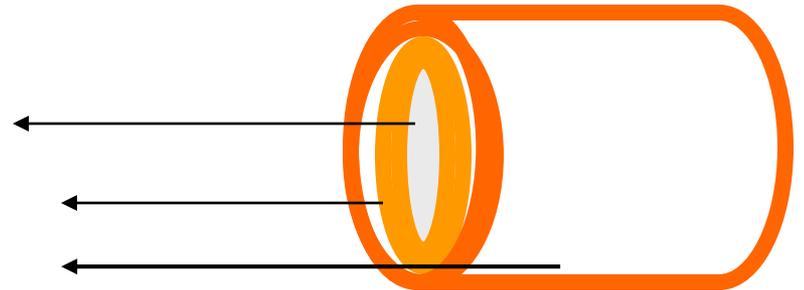


Columna capilar diámetro interno 1/16 in

Fase estacionaria

Silica Fundida

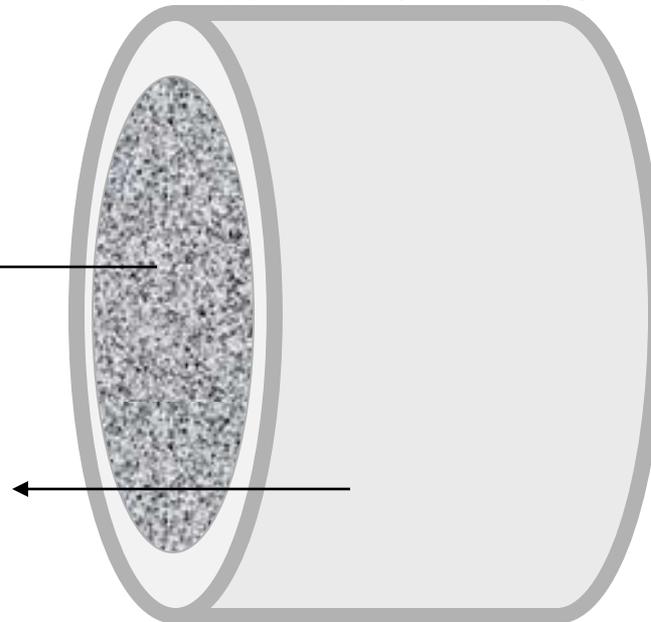
Capa de poliamida



Columna empacada diámetro interno 1/4 o 1/8 in

Empaque y fase estacionaria

Acero inoxidable, vidrio, cobre, teflón.



Parámetros para columnas capilares.

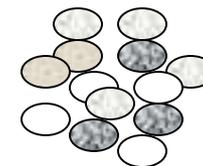
Diametro interno (mm)	0.25	0.32	0.52	0.75
N máx p/m	4400	3500	2200	1500
AEPT, min mm.	0.225	0.290	0.450	0.680
Capacidad	100 ng	500ng	2μg	15μg
*Flujo lineal cm/seg	25-35	20-35	20-30	15-25
*Flujo volumen (ml/min)	0.7-1.0	1.0-1.7	2.4-3.5	4.0-6.6

*El flujo se da para gas portador Helio, para Nitrógeno multiplicar los valores por 0.5

Parámetros para columnas capilares y empacadas.

Columnas	Capilares	Empacadas			
Diámetro exterior in mm	Silica-vidrio	1/16	1/8	¼	3/8
	0.4-0.5, 0.8-1.2	1.59	3/17	6.35	9.52
Diámetro interno mm	0.25-0.50	1.2	2.0	2.0 y 4.0	8.0
Platos totales max.	300,000	60,000	48,000	30,000	15,000
Rango de malla	-----	100/120	80/100	60/80	20/40
Vel. lineal cm/seg	25	10	10	7	7
Vel. de flujo ml/min	1-3	10	20	70	120
Tamaño de muestra líquido μl	0.010	1.0	2.0	20	1000
Tamaño de muestra gas ml	0.0001-0.01	0.01-0.1	0.1-1.0	1-10	>10

Análisis Químicos para soportes



	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	CaO	MgO
Chromosorb W	91.2	4.1	1.15	0.25	0.40	0.65
Chromosorb P	89.22	5.1	1.50	0.30	0.90	1.00

Propiedades Físicas de los soportes

Chromosorb Tipo:	A	G	W	P	750	T
Densidad de empaque (g/ml)	0.48	0.58	0.24	0.47	0.30	0.49
Superficie área (m ² /g)	2.7	0.5	1.0	4.0	0.8	7.8
pH	7.1	8.5	8.5	6.5	n.r	-
Color	Blanco	Blanco O.	Blanco	Rosa	n.r	Blanco
% fase líquida máx.	25	5	25	30	7	n.r

SopORTE:

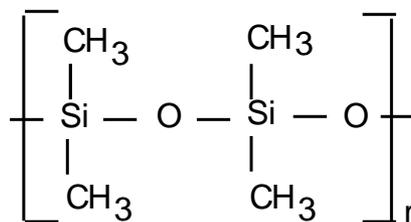
*superficie específica grande, *estructura porosa con diámetro uniforme 10 μ por poro, *inerte, *tamaño uniforme, *con resistencia mecánica.

Fase estacionaria

I.- Baja Polaridad	II.- Polaridad intermedia
Hidrocarburos saturados	Éteres
Hidrocarburos olefínicos	Cetonas
Hidrocarburos aromáticos	Aldehídos
Halogenuros de alquilo	Ésteres
Mercaptanos	Aminas terciarias
Sulfuros	Compuestos nitro (sin átomos de hidrógeno en α)
CS ₂	Nitrilos (sin átomos de H en α)
III.- Polares	IV.- Muy polares
Alcoholes	Polihidroxialcoholes
Ácidos carboxílicos	Aminoalcoholes
Fenoles	Hidroxiácidos
Aminas primarias	Ácidos polipróticos
Oximas	Polifenoles
Compuestos nitro (sin átomos de hidrógeno en α)	
Nitrilos (sin átomos de H en α)	

FASES LÍQUIDAS COMUNES USADAS EN CROMATOGRAFIA DE GASES

SE – 30



350° C máx.

(Siliconas o silicones)

APIEZON

(Hidrocarburos mezclados)

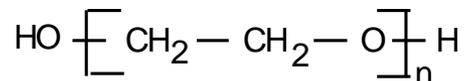
275 – 300° C máx.

OV – 17

(Metilfenilsilicona)

300° C máx.

CARBOWAX 20M



250° C máx.

TETRAHIDROXIETILENDIAMINA

EDTA

150° C



Solventes

- Un buen *solvente absoluto* para los componentes de la muestra, si la solubilidad es baja, los componentes eluyen rápidamente y la separación es pobre.
- Ser un buen *solvente diferencial* para los componentes de la muestra.
- *No volátil*, la presión de vapor 0.01 a 0.1 mm Hg a la temperatura de operación razonable para la vida de la columna.
- *Térmicamente estable*, la inestabilidad puede ser promovida por el soporte con la influencia de la temperatura.
- *Químicamente inerte* con respecto a la muestra.



DETECTORES

El detector cromatográfico es el recurso mediante el cual se identifica y mide la cantidad de componentes separados de una muestra.

Características para un detector.

- *Selectividad*
- *Sensibilidad o detectabilidad*
- *Respuesta*
- *Ruido y límite de detección.*
- *Rango lineal*



Los más importantes tipos de detectores cromatográficos

<i>Conductividad térmica</i>	<i>TCD</i>
<i>Ionización de Flama</i>	<i>FID</i>
<i>Captura de electrones</i>	<i>ECD</i>
<i>Fotométrico de flama</i>	<i>FPD</i>
<i>Termoiónico específico</i>	<i>TSD</i>
<i>Espectrómetro de masas</i>	<i>MS</i>



Detector de Conductividad térmica (TCD)

Consiste de una serie de filamentos montados coaxialmente en uno o 2 cilindros metálicos cuya temperatura variará al introducir una sustancia diferente al gas de arrastre, si es que la sustancia tiene una conductividad térmica diferente.

Parámetros más importantes en la operación de un detector de conductividad térmica TCD.

- a) corriente del filamento
- b) temperatura del bloque del detector (difiere de la T del filamento)
- c) muestra
- d) gas de arrastre



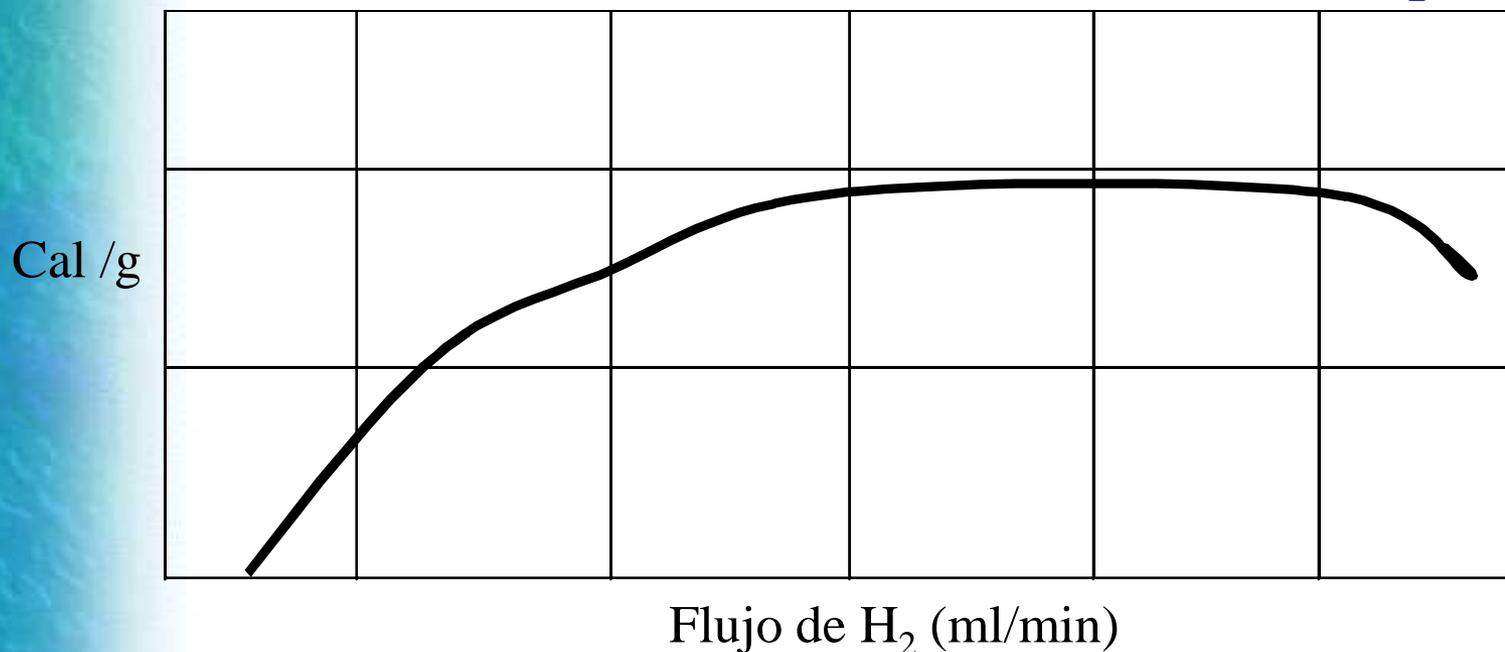
Detector de ionización de flama (FID)

- Su respuesta es para casi todos los compuestos orgánicos, tiene una sensibilidad relativamente alta y un amplio rango de respuesta lineal. Permite análisis rutinarios de compuestos en el rango de nanogramos (10^{-9} g).
- La ionización en el FID consiste en la combustión de la muestra orgánica a una temperatura alta, producto de una flama de H^2 -aire cuya temperatura es del orden de 2000° C.
- La reacción química ocurre en la flama del FID, cuando un compuesto orgánico se quema en la flama se generan iones positivos y negativos, los iones positivos se colectan sobre un electrodo, produciendo una corriente eléctrica, la cual se amplifica en un electrómetro, el cual produce una señal capaz de ser graficada.

Compuestos que dan un mínimo o no dan respuesta al FID

He	O ₂	SO ₂	CO	SiHCl ₃
Ar	N ₂	NO	CO ₂	SiCl ₄
Kr	CS ₂	N ₂ O	H ₂ O	SiF ₄
Ne	COS	NO ₂	HCHO	
Xe	H ₂ S	NH ₃	HCOOH	

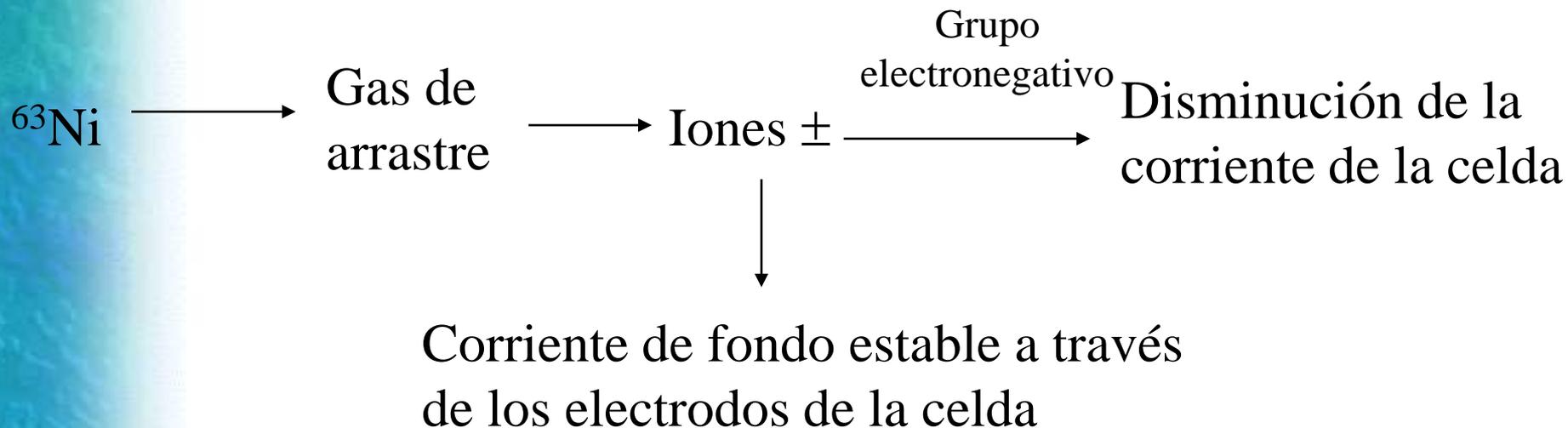
Sensibilidad del FID contra el flujo de H₂



Captura de electrones

ECD

- Responde a compuestos que contienen grupos funcionales electronegativos:
- Su aplicación más común es para halógenos. También responde al antraceno, cetoesteroides, nitrobenzenos y fenoles; fumaratos, oxalatos, cetonas conjugadas.





Fotométrico de flama FPD

- Este detector contiene un detector de flama, que realiza su misma función y después pasa a través de un filtro que lleva la muestra a su estado elemental.
- La ventaja de este detector es que pueden hacerse análisis rápidos de compuestos de azufre y fósforo atómico.
- Se emplea básicamente en la industria petroquímica.



Termoiónico específico

TSD

- Trabaja mediante una señal de quimiluminiscencia, es específico para compuestos que contienen nitrógeno y fósforo.
- Es ~500 veces más sensible a especies orgánicas que contienen P que el FID.
- Es ~50 veces más sensible a especies orgánicas que contiene N que el FID.
- Suprime la respuesta a carbón por 3 ó 4 ordenes de magnitud.
- Una esfera de cerámica (Sulfato de Rubidio) calentada 600-1000° C suministra E para la oxidación, cuya superficie actúa como catalizador para formar iones selectivos de N y P, mientras que provee condiciones pobres para la formación de iones de C.



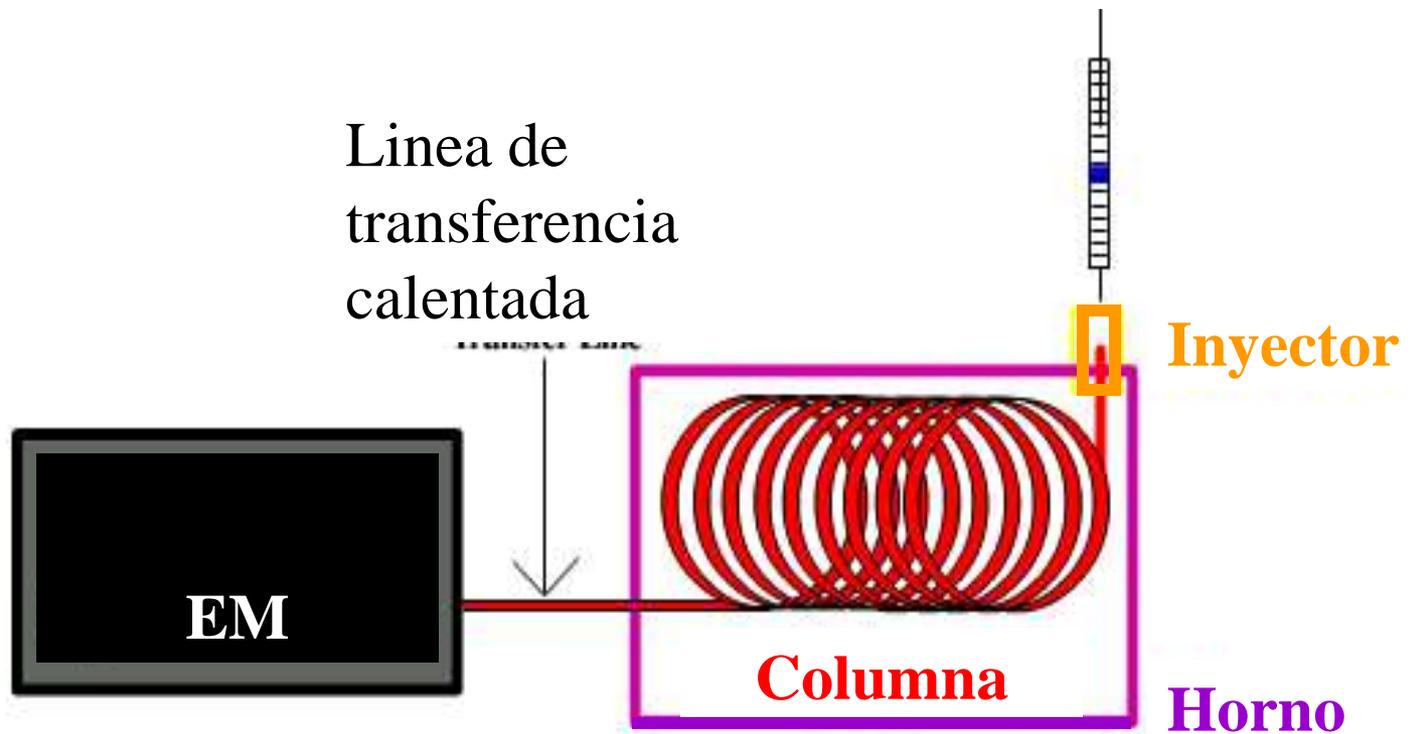
Espectrómetro de masas *MS*

La principal ventaja de los equipos CG/EM radica en el poder identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja, en un corto tiempo y con cantidades muy pequeñas de muestra.

Requisitos de las muestras:

- los componentes de la muestra posean una presión de vapor alta a la temperatura de operación de los equipos (de -10 a 450 °C).
- todos los componentes de la mezcla sean volátiles, que eluyan de la columna en un tiempo razonable
- que no se degraden térmicamente.

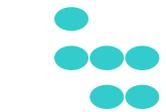
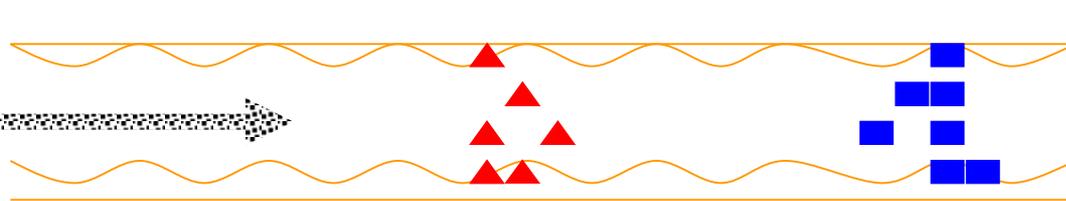
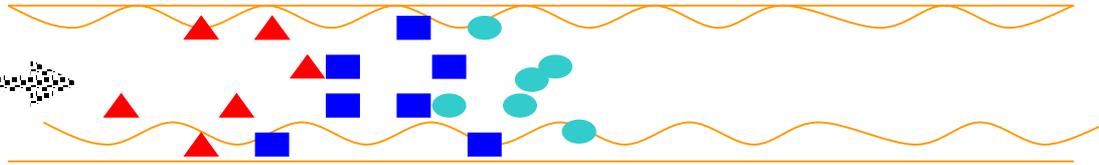
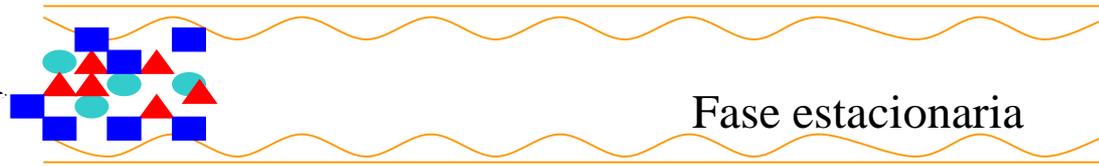
El espectrometro de masas actua como el detector del cromatografia de gases, cada compuesto separado eluye de la columna cromatografica y entra al espectrometro de masas





Columna

Flujo de gas
Fase móvil



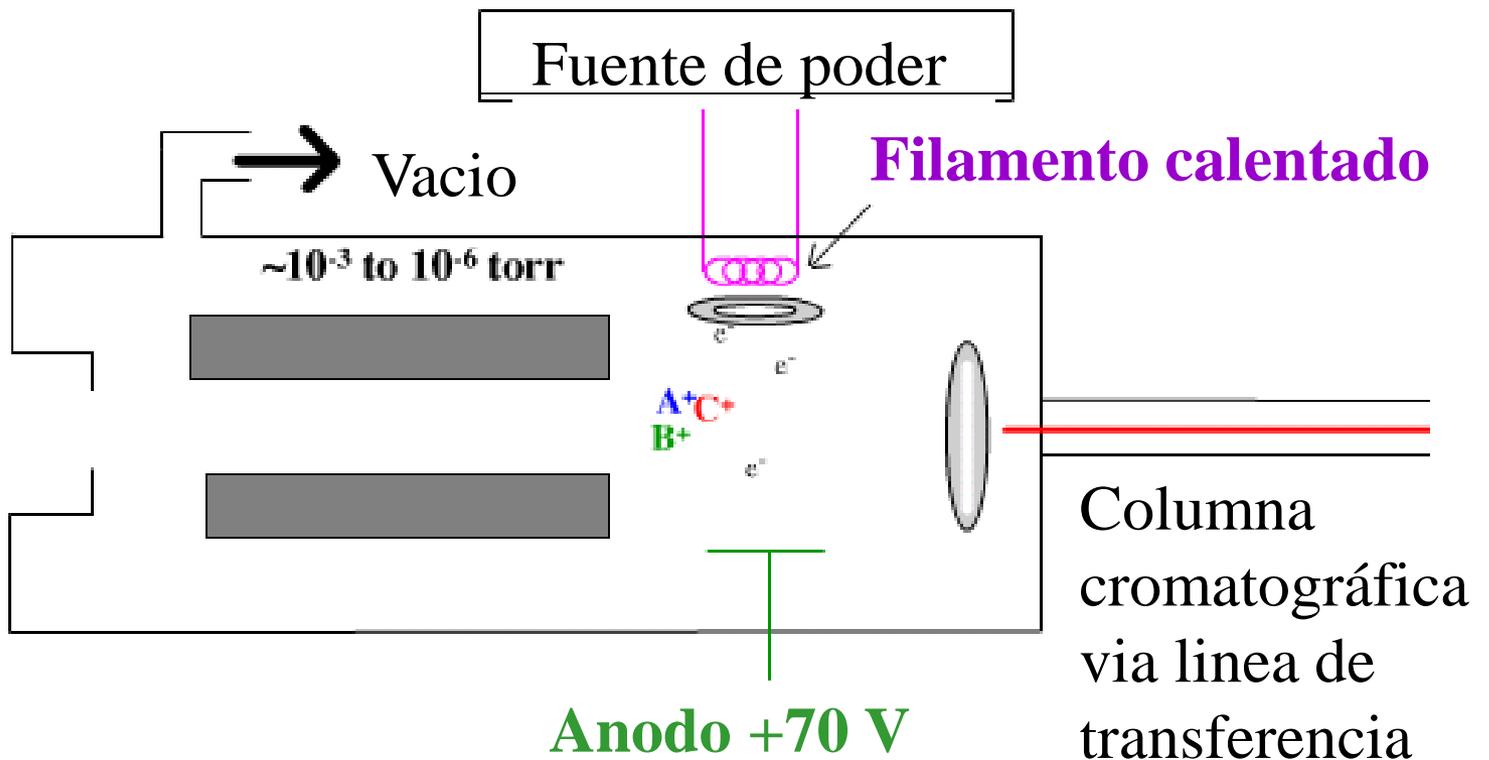
Detector

Analitos separados

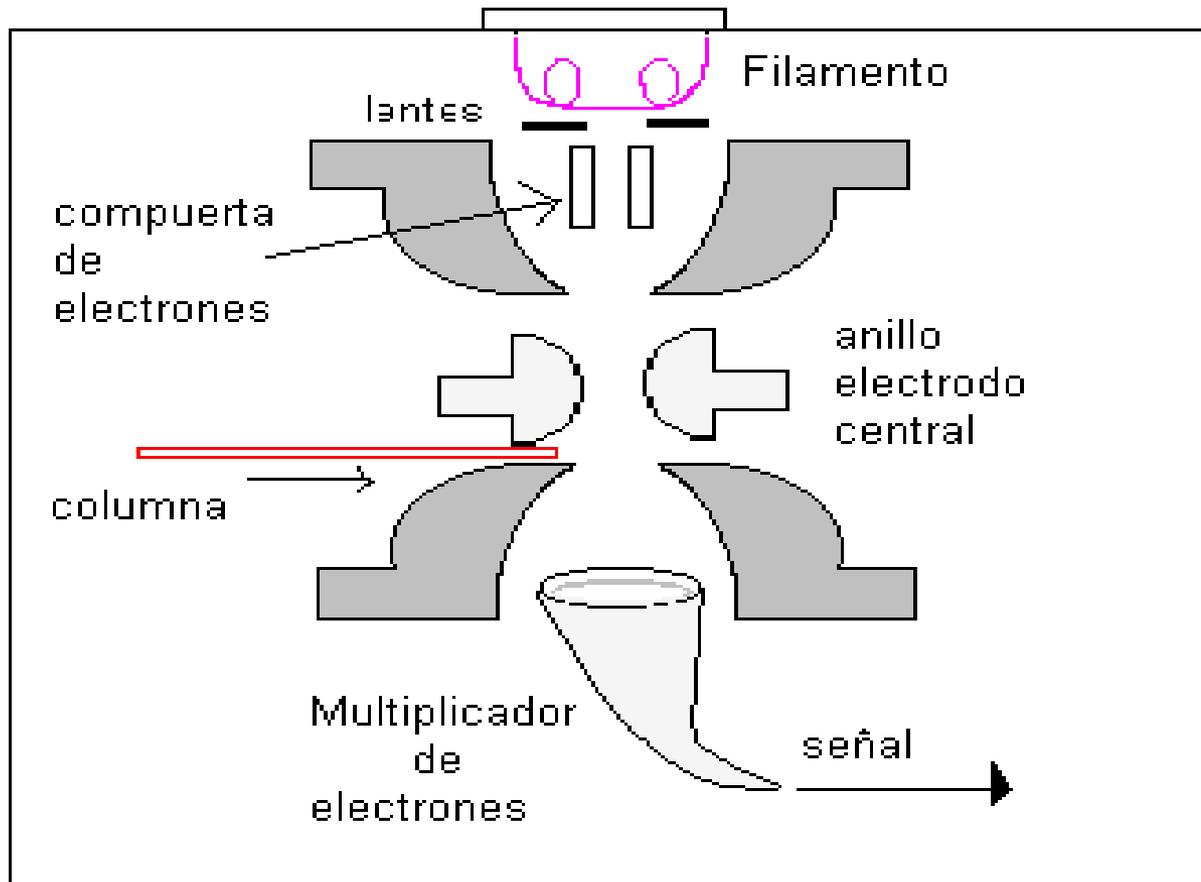
Separación cromatográfica

Camara de Ionización

Al
analizador
de Masas



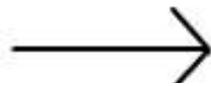
Camara de Ionización



Detector de Masas

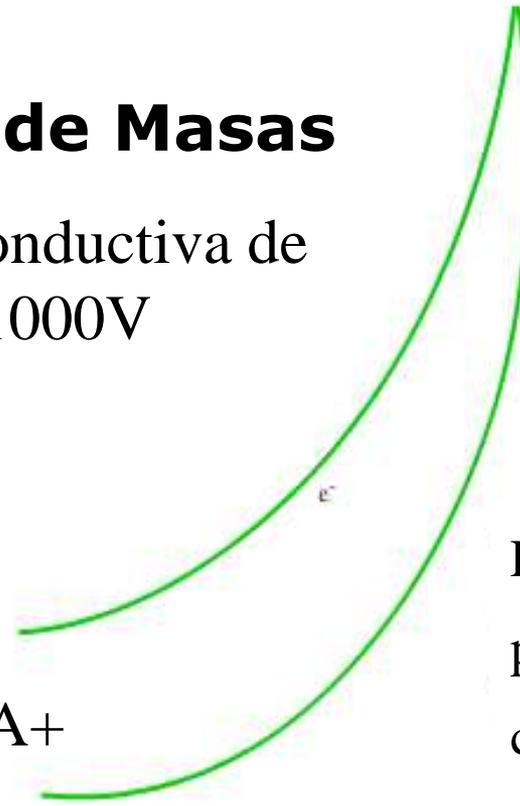
Superficie conductiva de un dinodo $-1000V$

Iones procedentes del analizador



A^+

Los iones neutros son absorbidos por el vacío

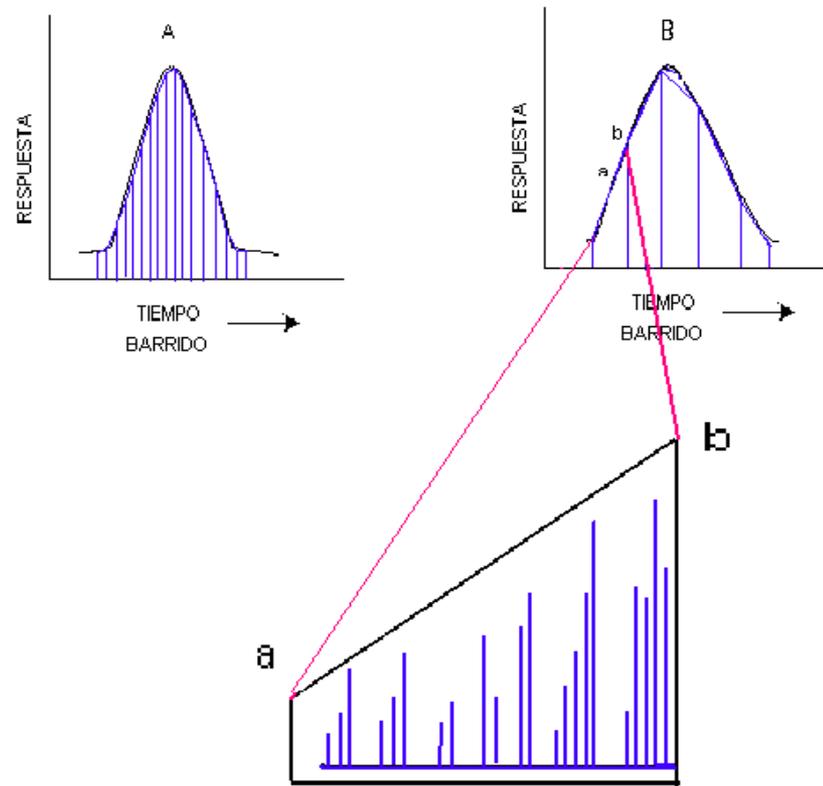


Amplicador



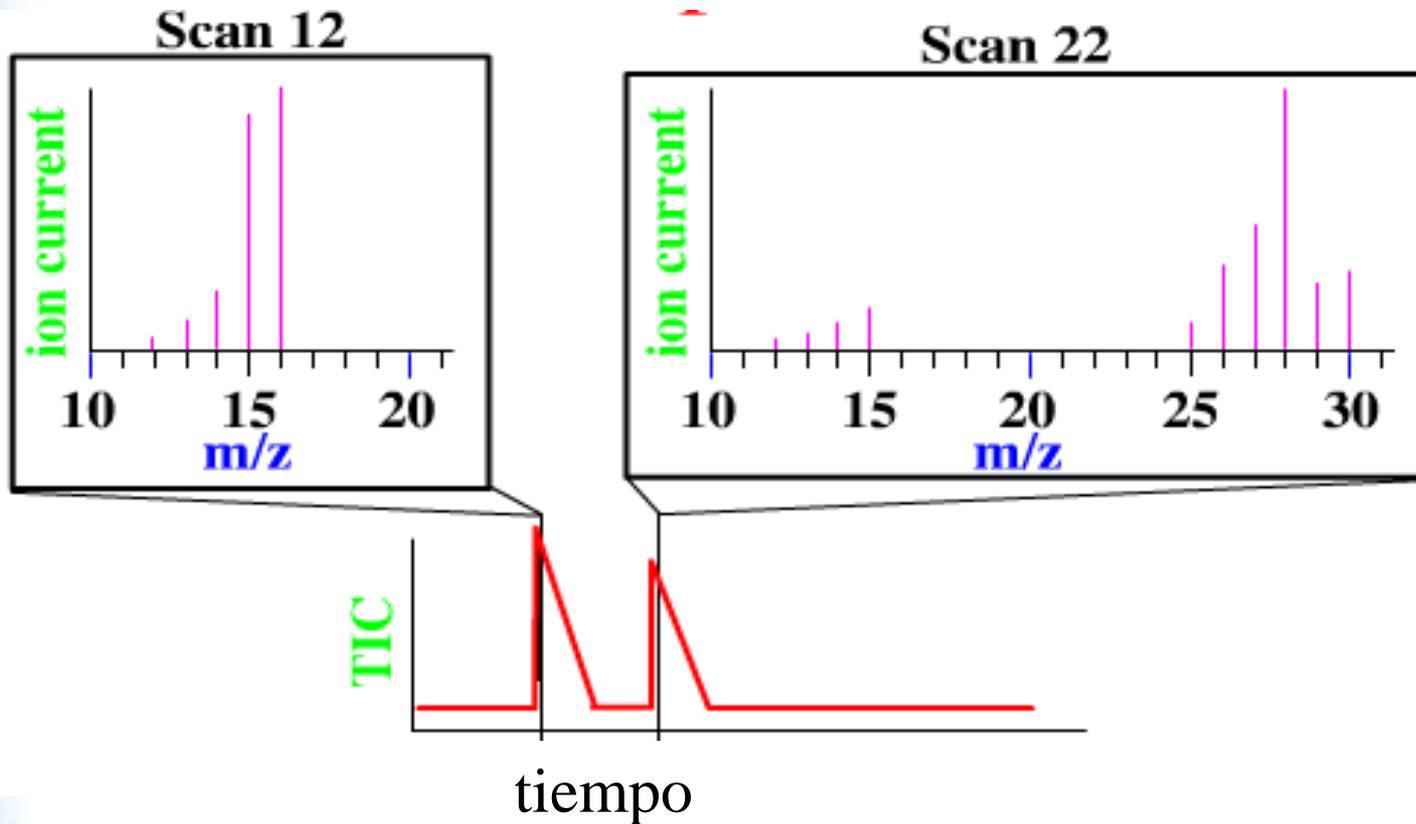
El ion presente es registrado por los controles de la computadora el cual lo identifica según su m/z en el instante en el que es analizado

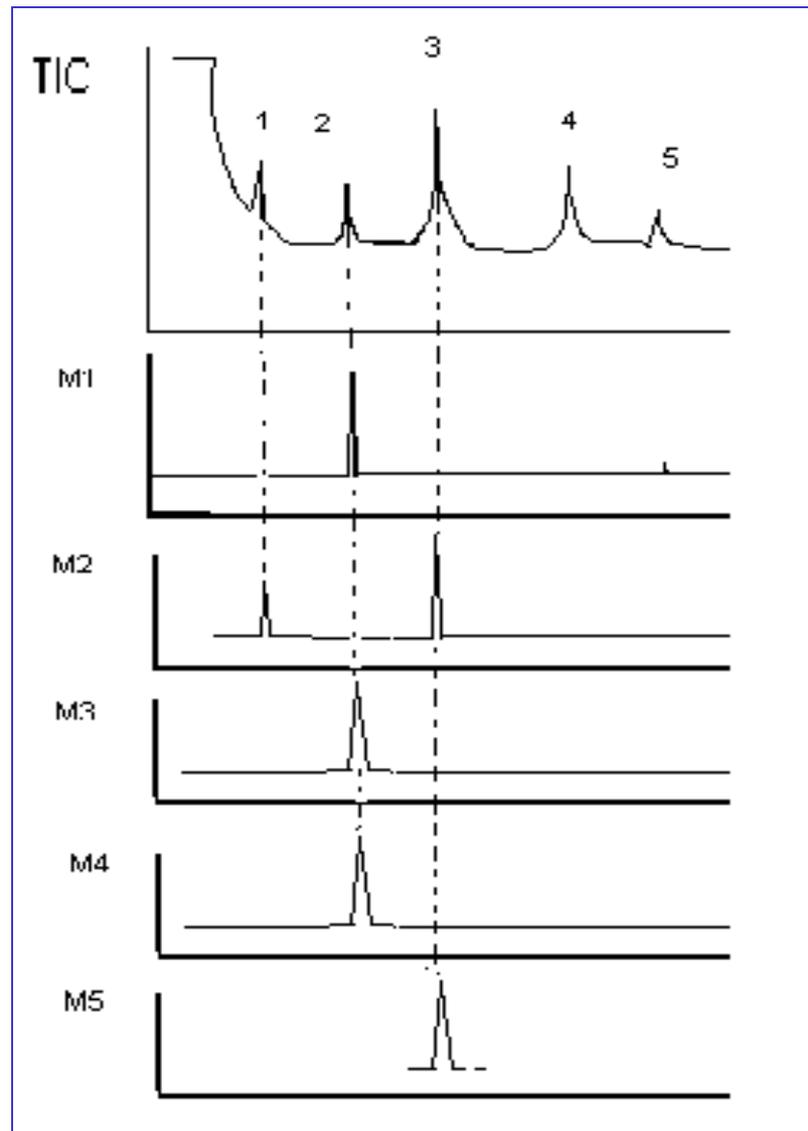
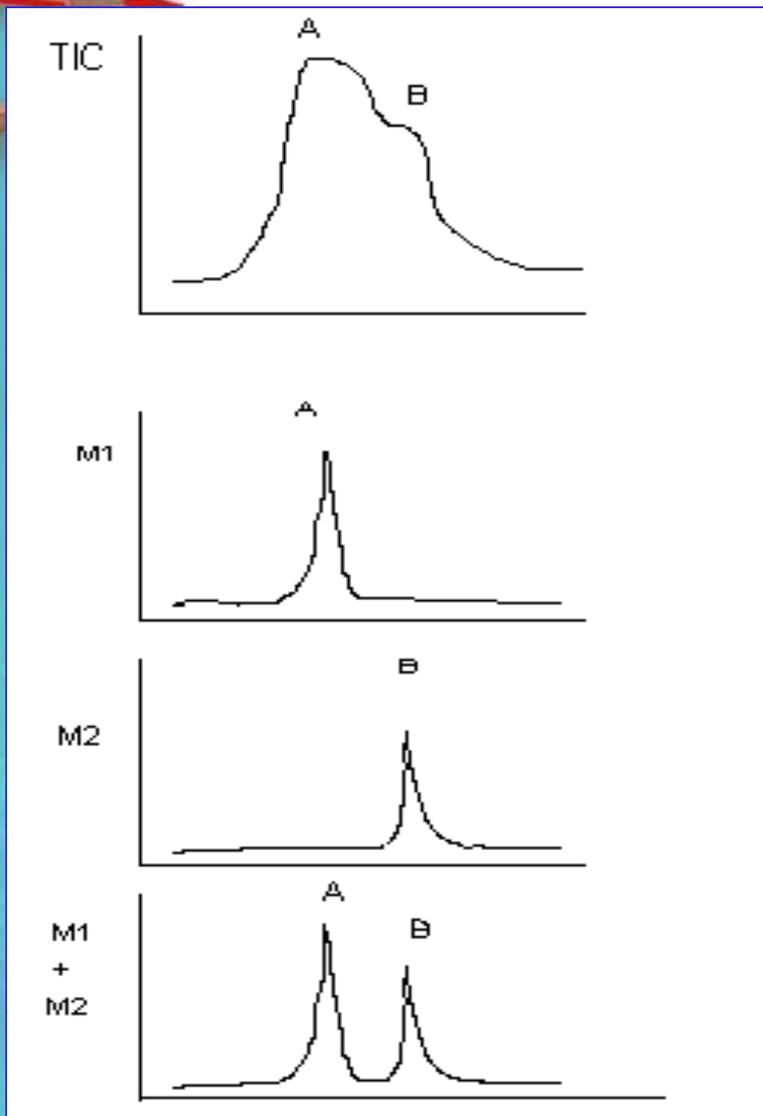
Formación de la señal cromatográfica



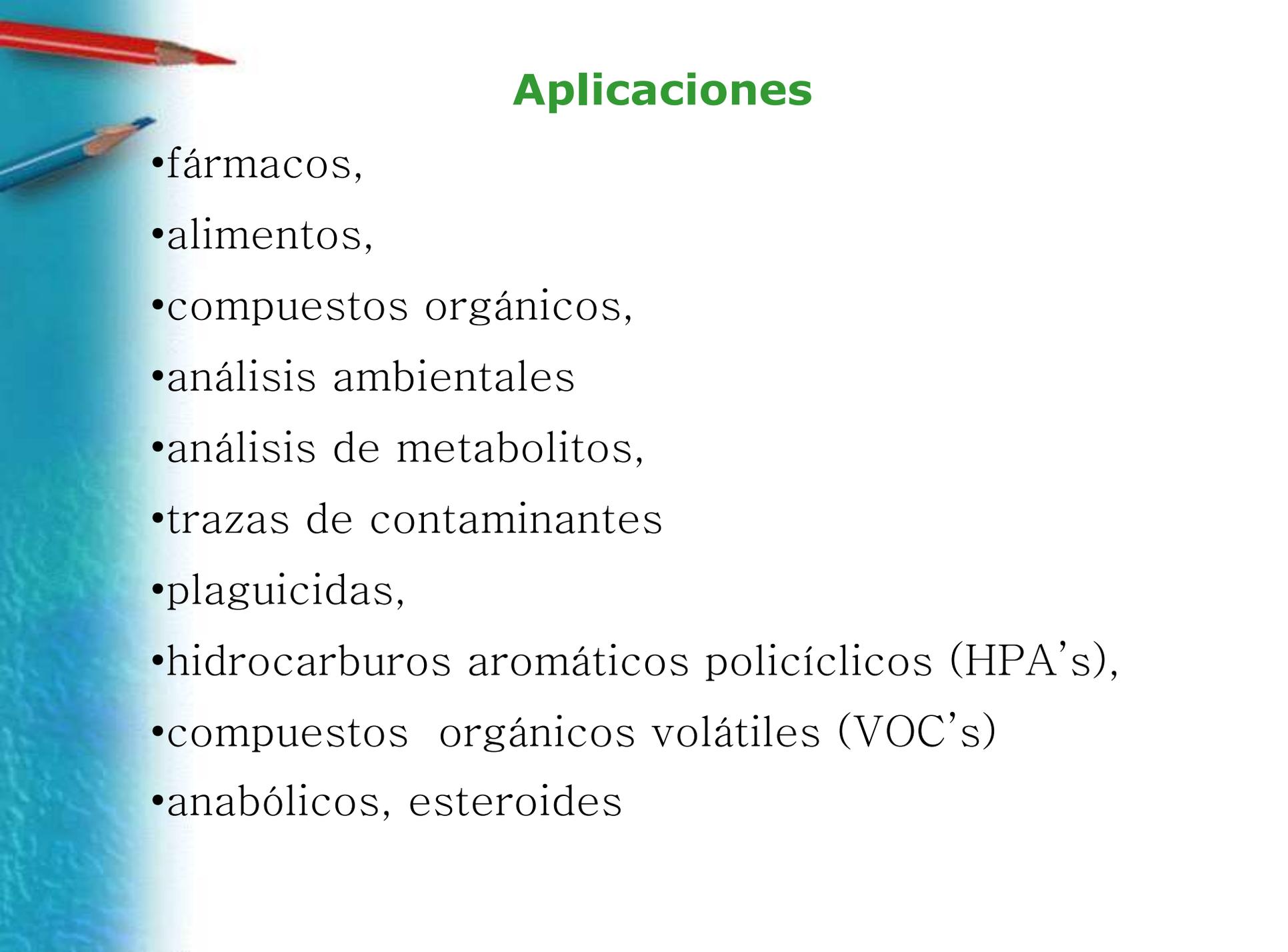
Espectro deformado por el aumento de la cantidad de muestra durante el barrido.

Cromatogramas totales y Espectros de Masas





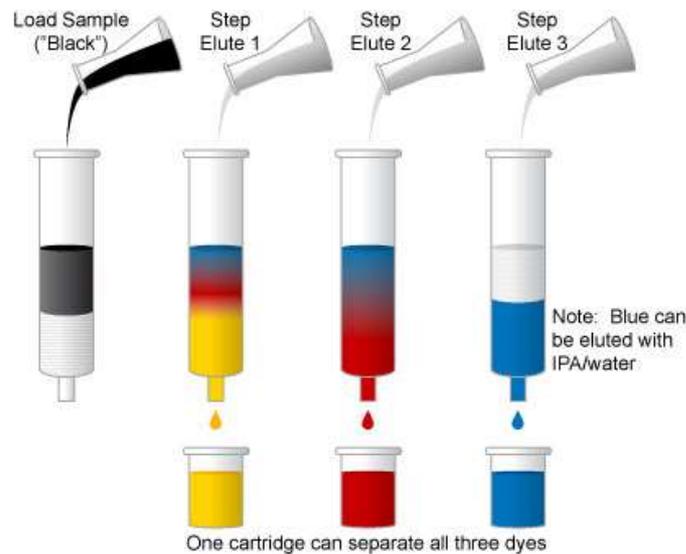
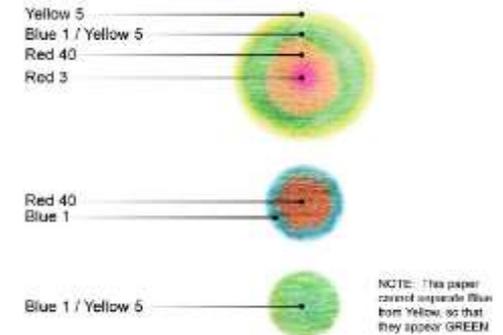
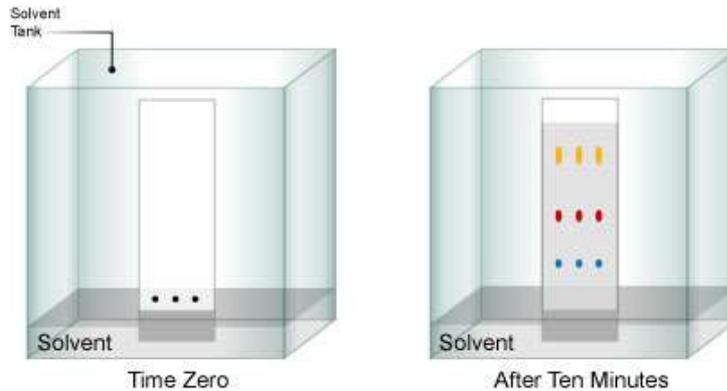
CROMATOGRAMAS DE MASAS



Aplicaciones

- fármacos,
- alimentos,
- compuestos orgánicos,
- análisis ambientales
- análisis de metabolitos,
- trazas de contaminantes
- plaguicidas,
- hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA's),
- compuestos orgánicos volátiles (VOC's)
- anabólicos, esteroides

Tipos de Cromatografía líquida



1



Cromatografía

En fase gaseosa

En fase supercrítica

EN FASE LÍQUIDA

COLUMNA

Placa CCF

Adsorción

Partición
(sílice)

Intercambio
iónico

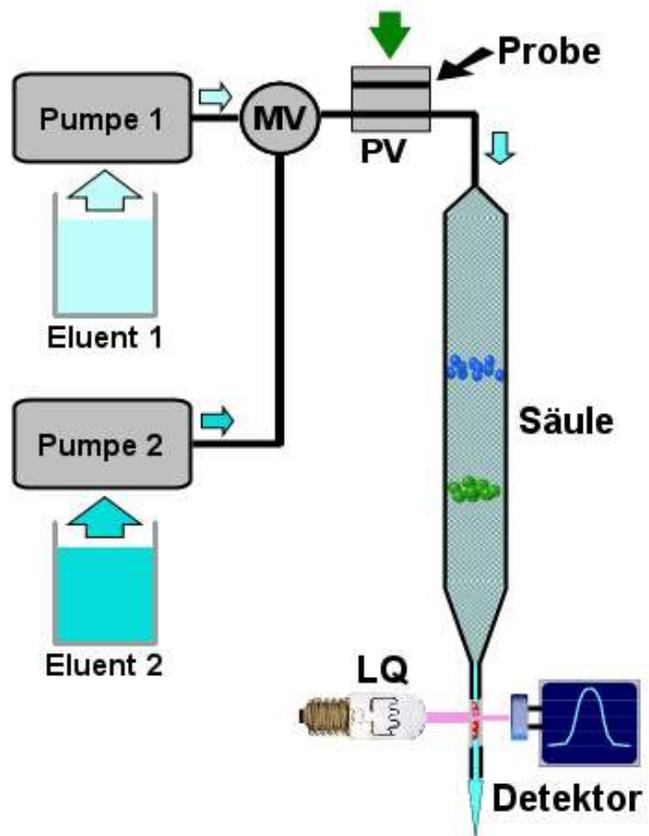
Pares de
iones

Intercambio
de ligantes

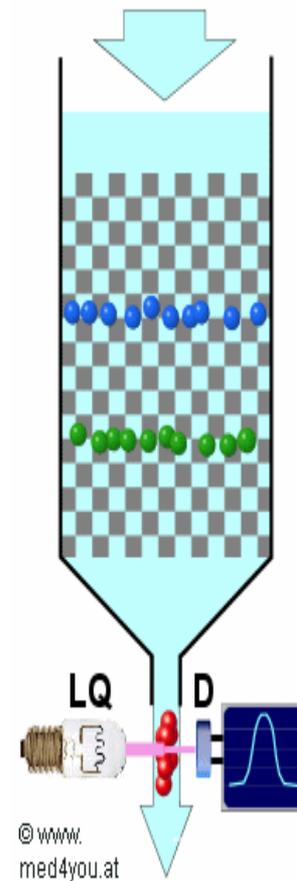
Transferencia
de carga

Afinidad

Exclusión



© www.med4you.at





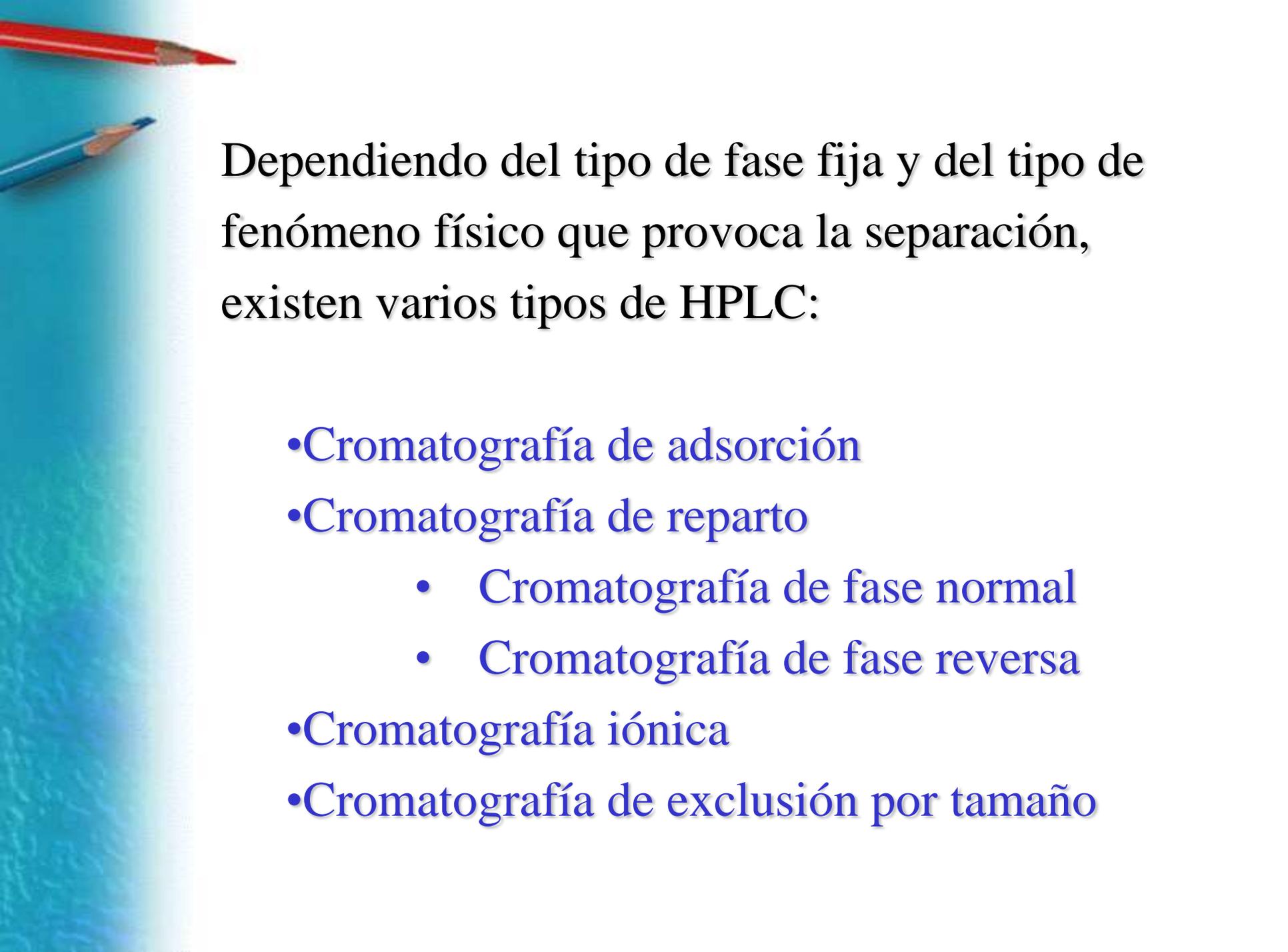
Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC)

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de la fase fija fue disminuyendo (μm), esto generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.

El nombre HPLC originalmente se refiere al hecho de que una gran presión es requerida para generar un flujo necesario para la cromatografía de líquidos en columnas empacadas.

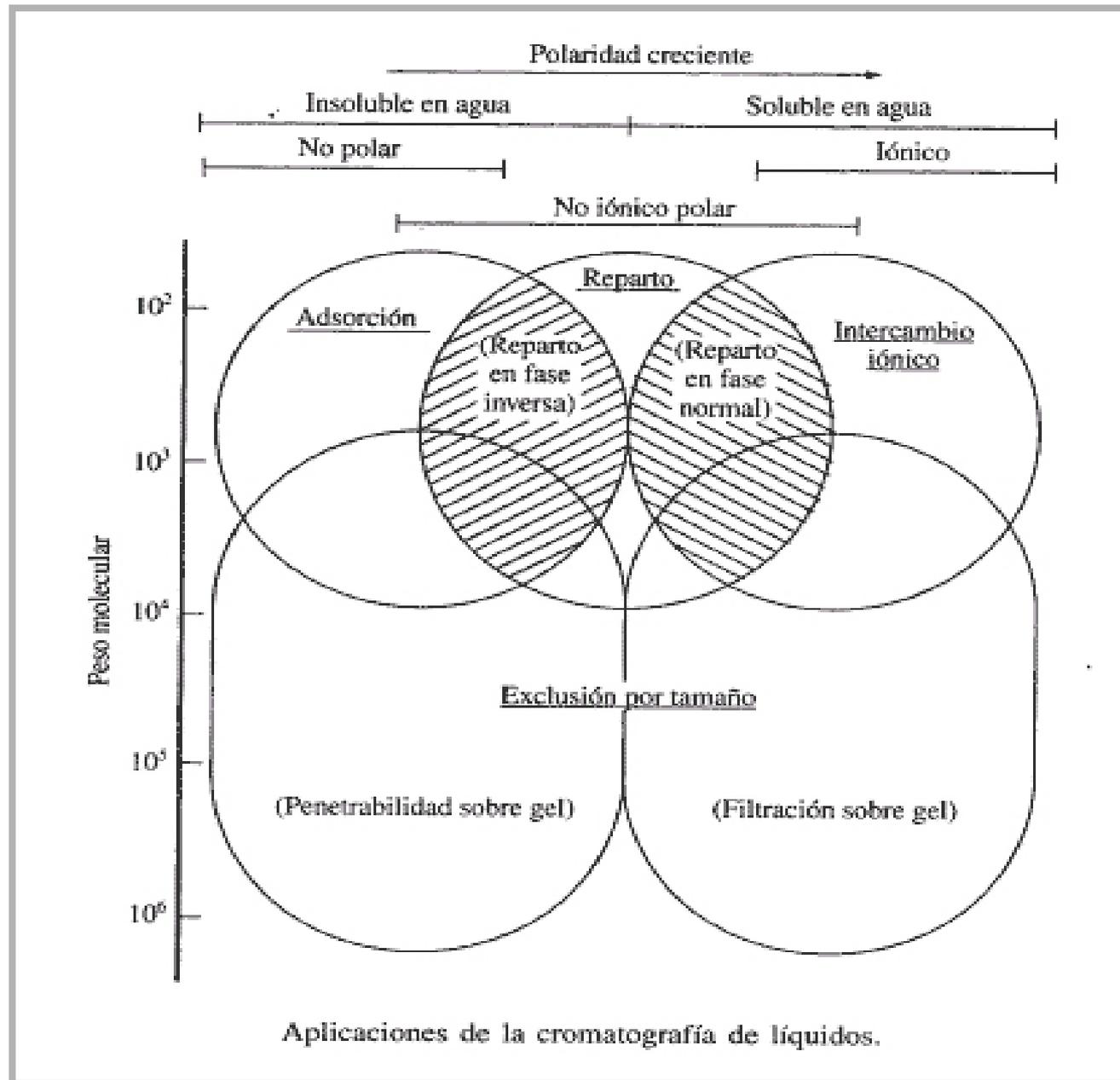
En los principios de la cromatografía las presiones generadas eran de alrededor de 500psi (35 bar), por eso HPLC.

En los años 70's se desarrollaron sistemas que podían manejar arriba de 6,000psi (400 bar) y se incluyó un detector y varios tipos de columnas.



Dependiendo del tipo de fase fija y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, existen varios tipos de HPLC:

- Cromatografía de adsorción
- Cromatografía de reparto
 - Cromatografía de fase normal
 - Cromatografía de fase reversa
- Cromatografía iónica
- Cromatografía de exclusión por tamaño





Cromatografía de adsorción

Se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa.

El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas.

El equilibrio entre el estado adsorbido y la solución es la causa de la separación de las moléculas del soluto.

- También llamada cromatografía líquido – sólido.
- Técnica más adecuada para compuestos no polares y con distintos grupos funcionales.
- Tiene la capacidad de diferenciar isómeros en mezclas.



La cromatografía de reparto

Una fase estacionaria forma una película delgada de la superficie de un soporte sólido.

El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida o gaseosa.

Se subdivide en cromatografía en
fase normal
fase reversa



Cromatografía en fase normal

Se caracteriza por separar compuestos en base a su polaridad.

Utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar.

La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y por lo tanto también aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción depende de los grupos funcionales del compuesto de interés y de factores estéricos (diferenciar isómeros estructurales).

El uso de disolventes polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención, mientras que los disolventes no polares tienden a aumentarlo.



Cromatografía de fase reversa

Consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil de polaridad moderada.

El tiempo de retención es mayor para moléculas no polares, mientras que las moléculas polares eluyen más rápidamente.

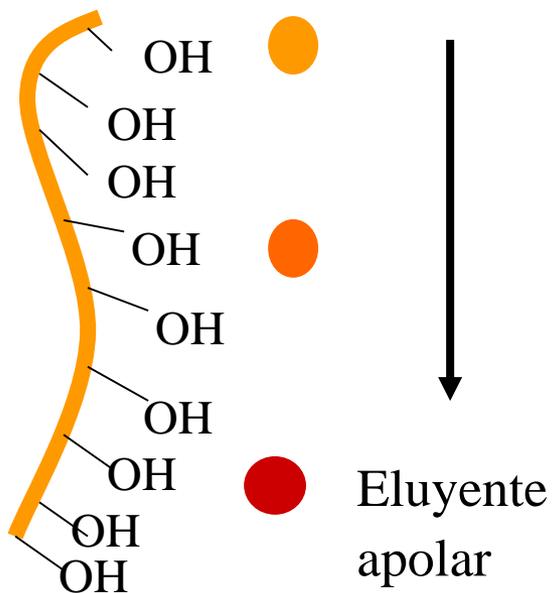
Un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor debido al aumento de la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria.

El pH puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto; la mayoría de métodos utilizan una solución tampón (fosfato de sodio) para controlar el valor del pH, neutralizar la carga del compuesto y mejorar la separación cromatográfica.

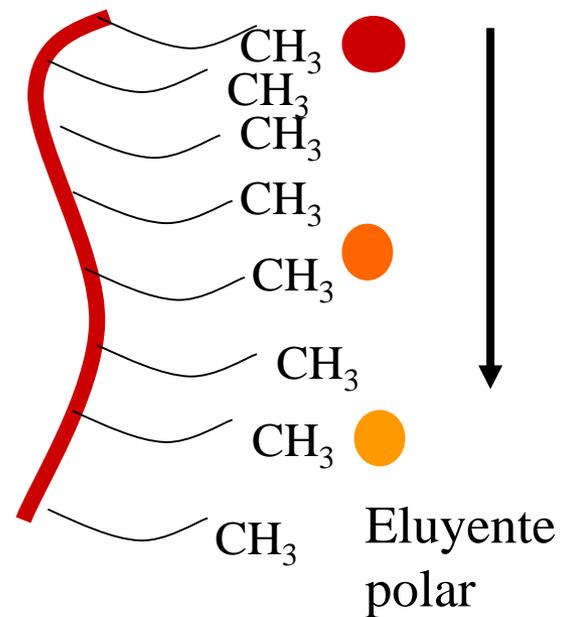
fase normal

fase inversa

Sup. polar de la fase estacionaria



Sup. apolar de la fase estacionaria



● Polar

● Polaridad media

● Apolar



La cromatografía de intercambio iónico

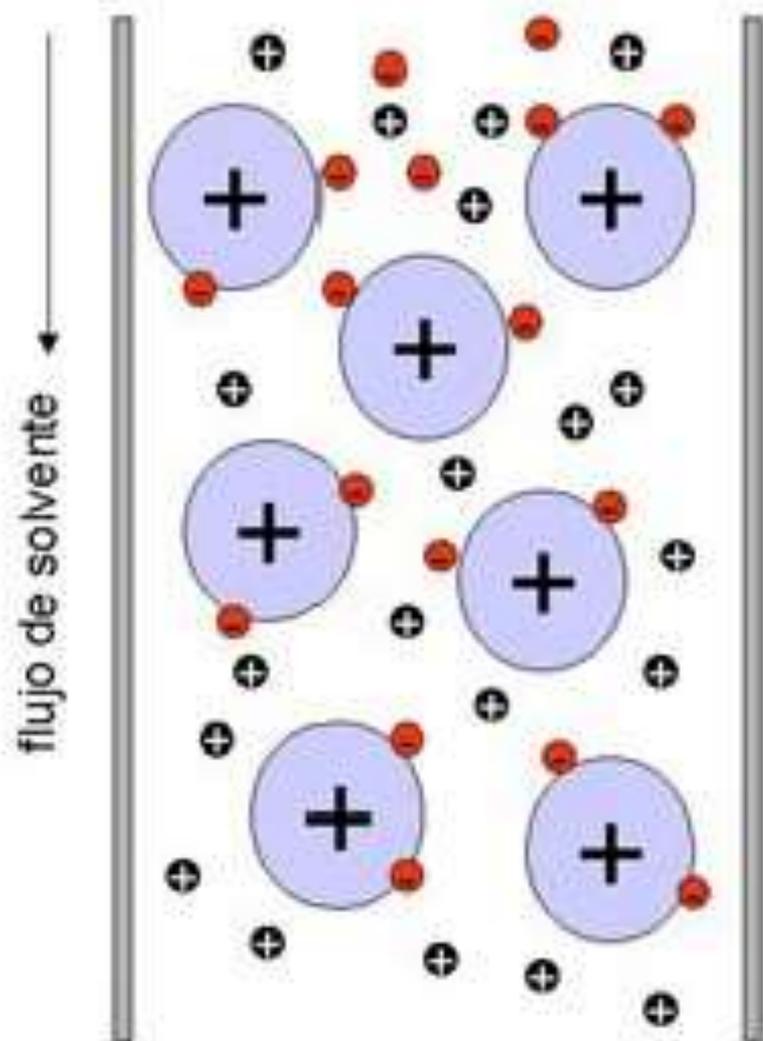
Se basa en el equilibrio de los iones de soluto entre el solvente y los sitios fijos cargados de la fase estacionaria

Esta cuenta con intercambiadores aniónicos (grupos con carga positiva unidos covalentemente) los cuales retienen a los aniones del soluto y
con intercambiadores catiónicos (grupos con carga negativa) retienen a los cationes del soluto.



- La retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria.
- Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna.
- En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones de elevada carga y radio pequeño.
- Un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico, mientras que una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico.

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



Las partículas cargadas negativamente se unen a la matriz sólida cargada positivamente, y son retenidas.

Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la matriz sólida cargada positivamente y son eluidas.

La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del solvente hasta igualarlo a su punto isoeléctrico o hasta invertir su carga neta.



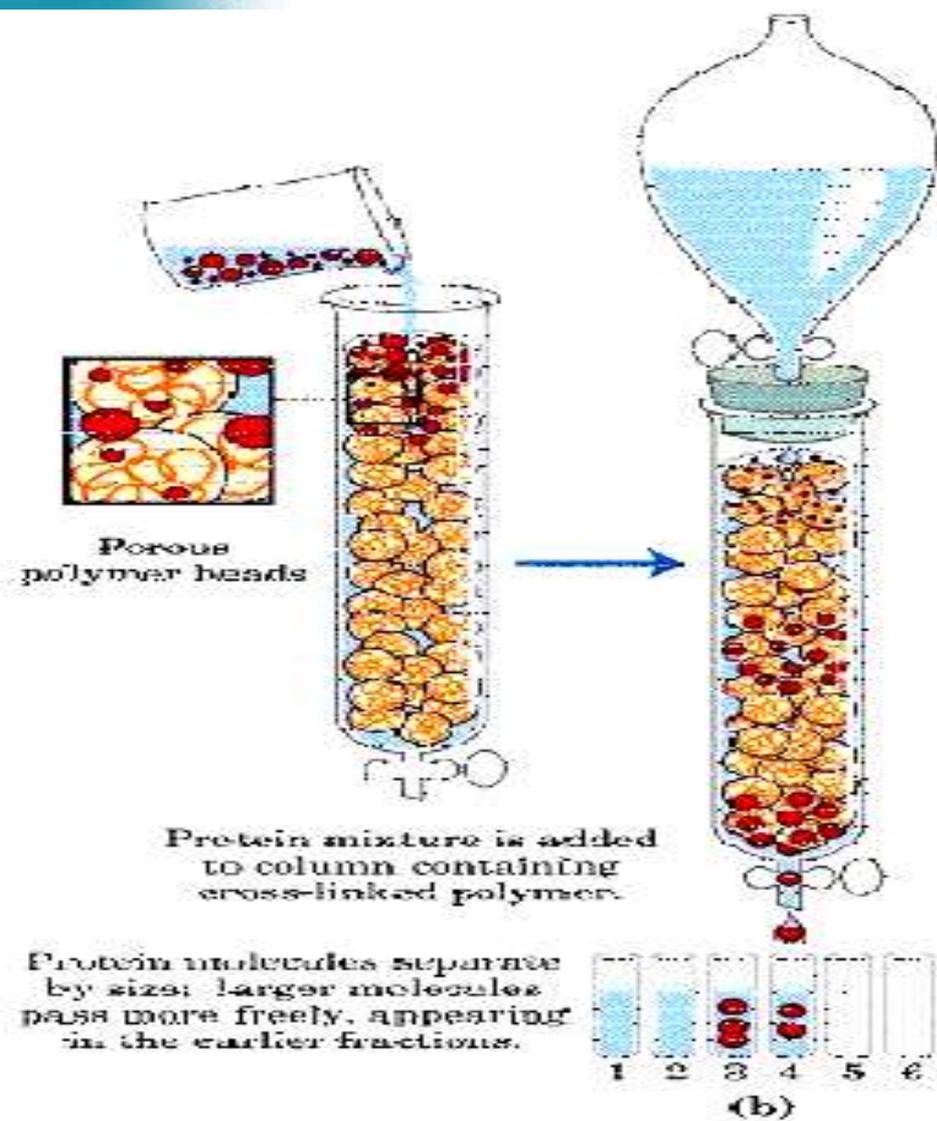
Cromatografía de exclusión molecular

Cromatografía de filtración en gel, en esta técnica las moléculas se separan por su tamaño se utiliza mucho en la bioquímica para separar moléculas grandes como proteínas, carbohidratos e incluso para separar polímeros y caracterizarlos.

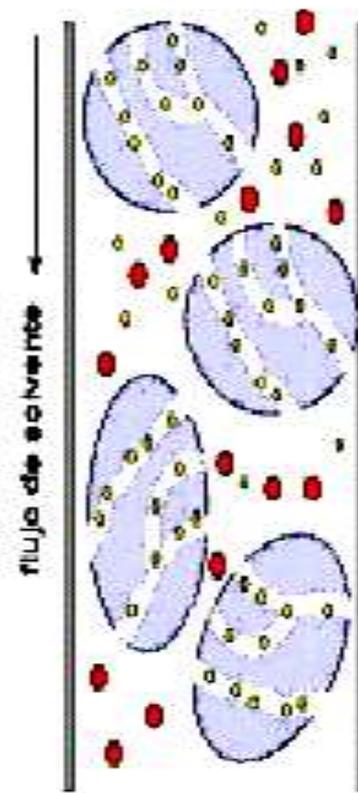
- Cromatografía de baja resolución; se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación.
- Muy útil para la determinación de la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas purificadas.
- La fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa, cuyo tamaño es tal que algunas moléculas grandes no podrán ingresar a esos poros, en tanto que las pequeñas podrán pasar libremente.



- La matriz de la columna esta formada por un polímero entrecruzado con poros de tamaños determinados.
- Las moléculas de mayor tamaño migran más deprisa a lo largo de la columna que las de pequeño tamaño, debido a que son demasiado grandes para introducirse en los poros de las bolas de polímero y por tanto siguen una ruta más corta y directa a lo largo de la longitud de la columna.
- Las moléculas de menor tamaño, entran en los poros y su marcha a lo largo de la columna es más lenta



PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL



Las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos que presentan las bolas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor.

Las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los pequeños conductos de las bolas de gel se mueven entre ellas, donde la velocidad de flujo de solvente es superior.

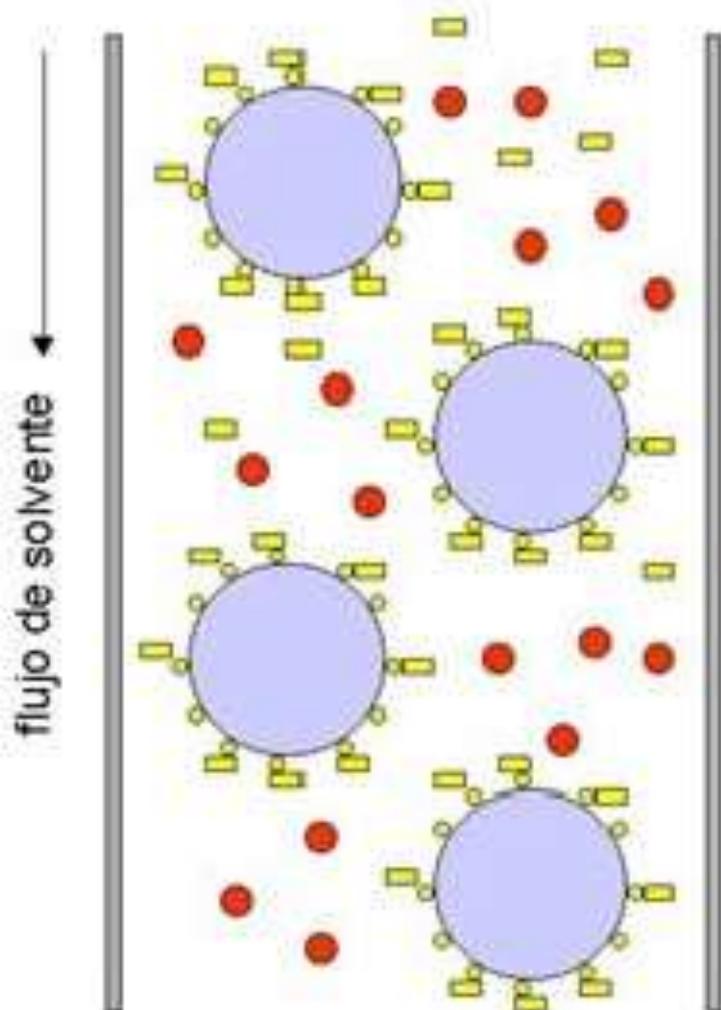
Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular son eluidas antes que las de menor peso molecular.



Cromatografía de Afinidad

- La Cromatografía de Afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando.
- En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna.
- Después de que las proteínas que no se unen al ligando son lavadas o eluidas a través de la columna, la proteína de interés que ha quedado retenida en la columna se eluye o libera mediante el empleo de una solución que contiene bien ligando libre u otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína.

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

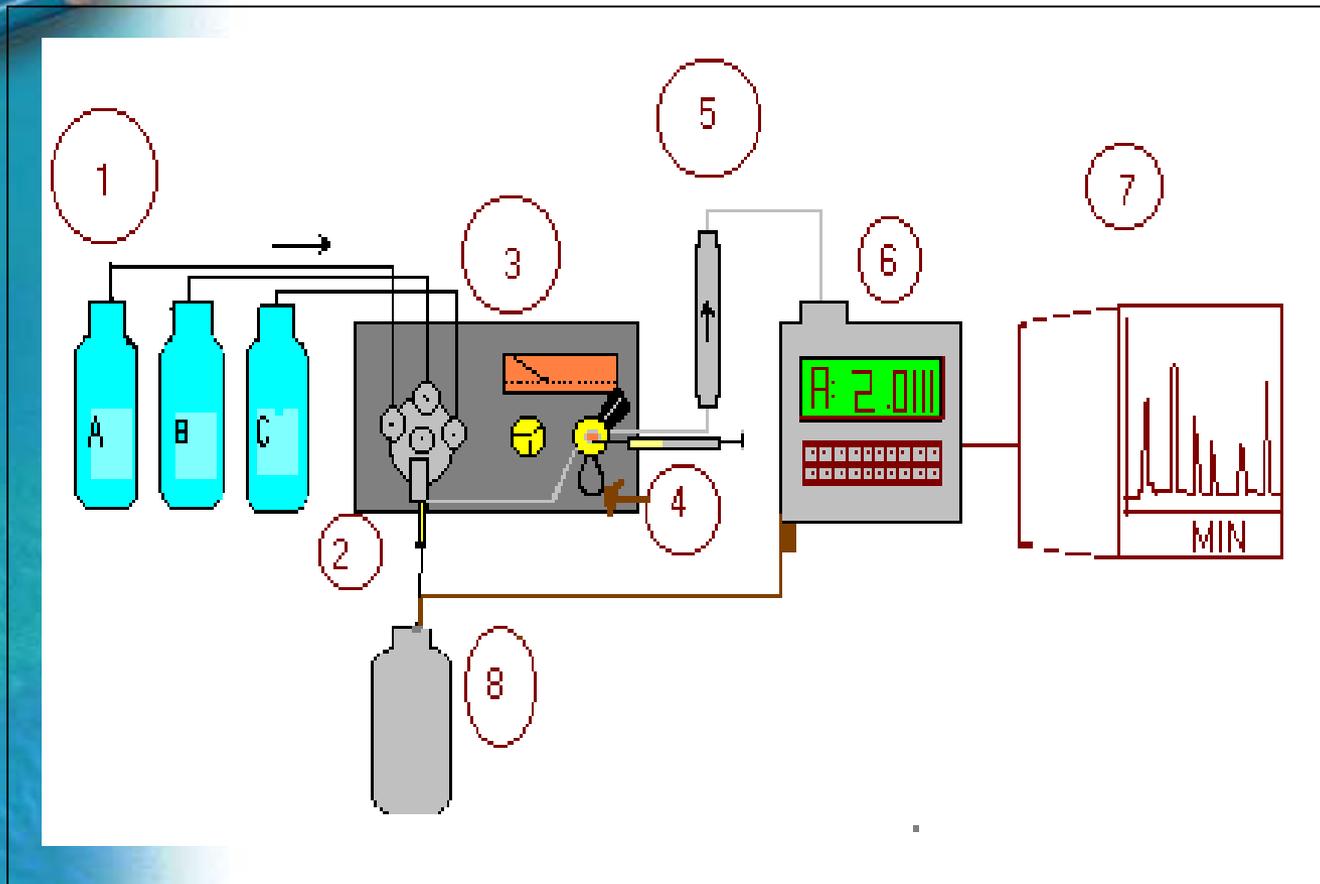


Las bolas de gel están recubiertas de un ligando por el que tiene afinidad alguna de las proteínas a aislar. Al pasar la mezcla compleja a través de la columna ésta proteína es retenida en la superficie de las bolas, eluyéndose las demás.

Para eluir la proteína retenida por afinidad se suele aumentar la fuerza iónica de la solución de solvente o incluir en éste el ligando soluble a alta concentración de forma que compita con el que está unido a las bolas de gel por la unión a la proteína.



Instrumentación



1. *Reservorio de disolventes (fase móvil)*
2. *Bomba*
3. *Inyector y Filtros*
4. *Luv (carga del inyector)*
5. *Columna (fase estacionaria)*
6. *Detector*
7. *Registrador*

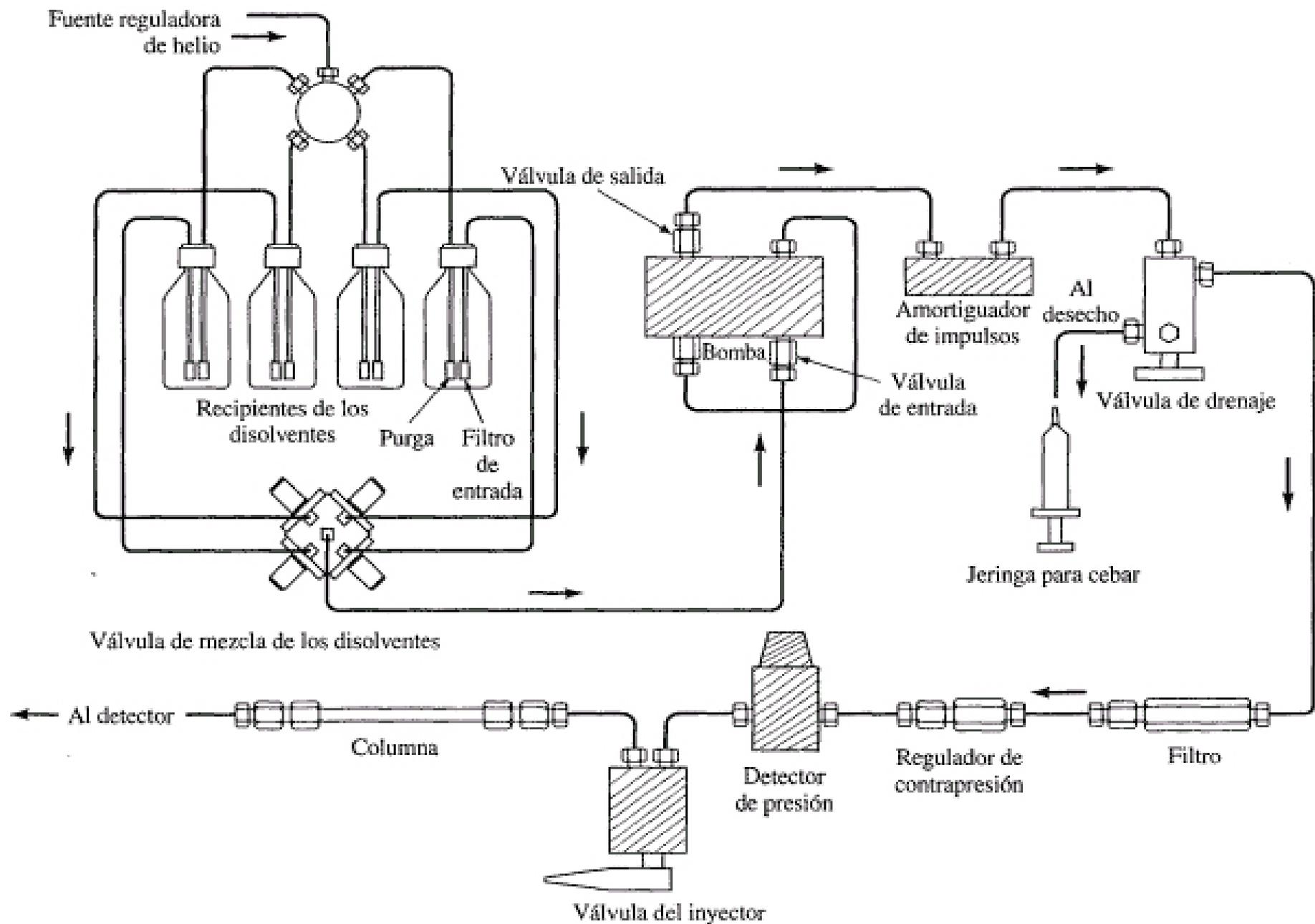


Figura 28-4. Esquema de un aparato de HPLC.



Que pasa dentro de un cromatógrafo

1. Carga de la muestra
2. ingreso de la muestra
3. separación cromatografica
4. Detección
5. Generación del cromatograma



Recipientes para la fase móvil

- Un aparato moderno de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o acero inoxidable, cada uno contiene de 200 a 1,000 mL de un disolvente.
- Se equipan también con un sistema para eliminar gases disueltos (O_2 , N_2) que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección.
- Contienen un dispositivo para filtrar el polvo y partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que dañen la bomba o los sistemas de inyección u obturen la columna.
- Una separación que utiliza un solo disolvente se denomina “elución isocrática”;
- cuando se utilizan dos o tres disolventes con polaridad significativamente distinta se denomina “elución con gradiente” donde la eficacia de la separación aumenta notablemente.



SISTEMAS DE MUESTREO



El lugar donde se introduce la muestra al cromatógrafo de líquidos se llama inyector y puede ser manual o automático.

Muestras líquidas.

Muestras sólidas.

La muestra debe ser soluble en la fase móvil y se introduce en un orden de ppm ya que la sensibilidad es muy alta aunque esta depende del detector.



Sistemas de bombeo

- Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que se encarga de introducir la fase móvil a través de la columna.
- Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:
 - Generar presiones superiores a 6000 psi.
 - Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 mL/min con una precisión del 0,5 %.
 - Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.



Sistemas de bombeo

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

- Bombas recíprocas: son las más utilizadas, formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. Las ventajas son que se consiguen presiones elevadas, fácil adaptación a la elución con gradiente y se suministra un caudal constante.
- Bombas neumáticas: hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, pero están limitadas a presiones relativamente bajas y no son utilizables en la elución con gradiente.
- Bombas de desplazamiento o tipo jeringa: consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 mL.

Bomba peristáltica



Bomba de vacio



Válvula
solenoid





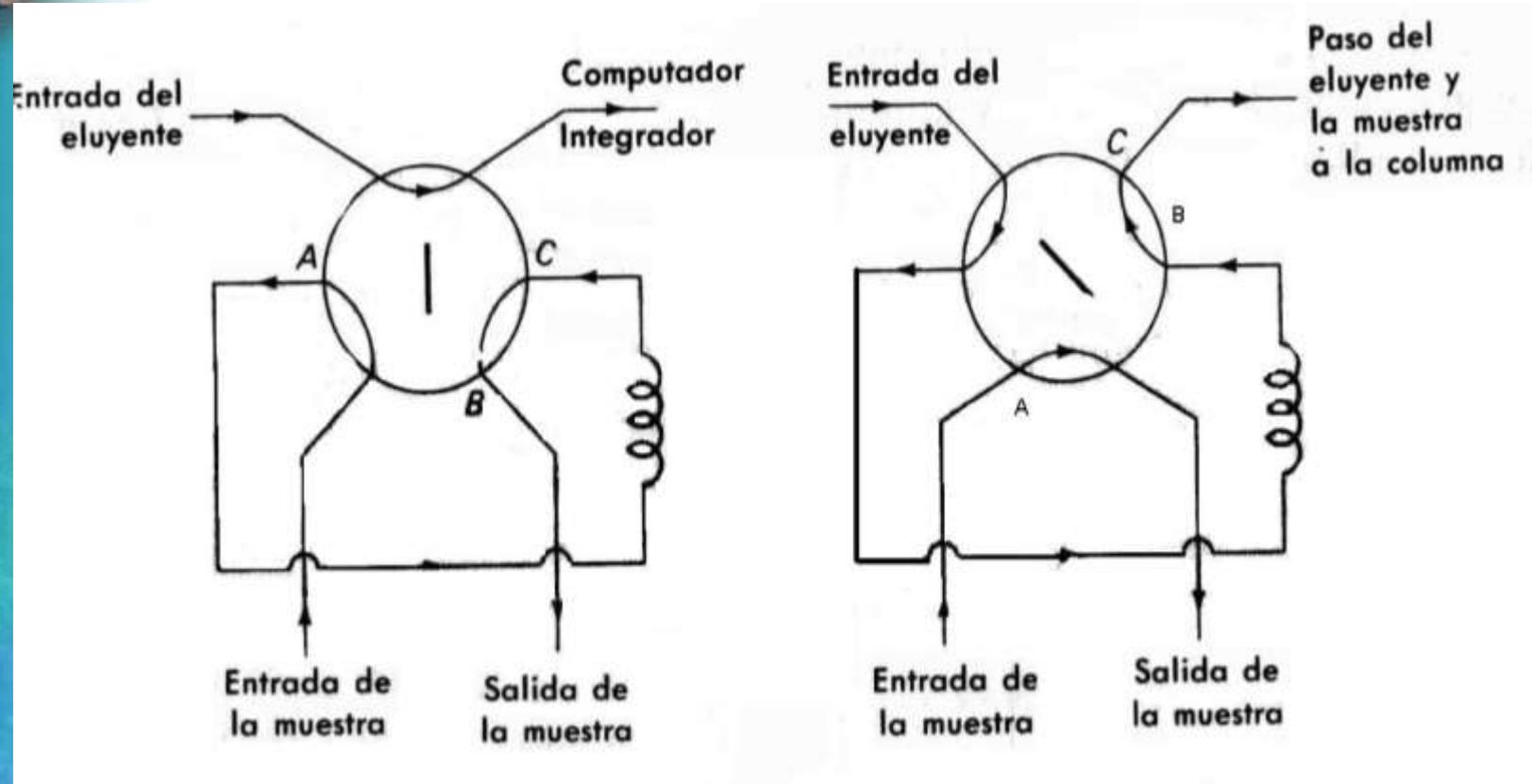
Sistema de inyección de muestra

- Los volúmenes de muestra que se inyectan, deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna.

Hay varios tipos:

- El método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* (limitado a 1500 psi) con un diafragma “septum” a la entrada de la columna.
- Las *válvulas de inyección* con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado.

Inyección



Válvula rotatoria para muestras

Izquierda: Posición de llenado Derecha: posición de inducción de la muestra a la columna



COLUMNAS PARA HPLC



La Columna

Es el espacio físico donde se produce la separación físicamente debe reunir ciertas características básicas:

- 1) resistente: debe resistir altas presiones
- 2) Químicamente estable.



Columnas

- Es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación, por lo que el material suele ser de acero inoxidable
- Su longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm.
- La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria.
- El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm .



Columnas

- El diámetro interno de una columna de HPLC determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad.
- Con un diámetro interno mayor a 10 mm, se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su posterior utilización.
- Con un diámetro interno menor 4-5 mm se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, aumentan la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes.
- Existen columnas de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masas.



Columnas ACQUITY UPLC

Las columnas para LC más avanzadas tecnológicamente de la historia. Diseñadas, comprobadas y garantizadas para utilizarse en aplicaciones de hasta 15000 psi (1000 bar), ofrecen un rendimiento, una resistencia y una eficacia insuperables. Combine separaciones más rápidas con una mayor resolución aprovechando todo el potencial que proporcionan las partículas pequeñas.



Columnas XBridge

Con una mejora de un orden de magnitud en la estabilidad a pH altos y un nivel más alto de rendimiento cromatográfico, las columnas híbridas con puentes de etileno (BEH) definen el nuevo estándar de referencia para el desarrollo de métodos de LC con una estabilidad excelente en un amplio intervalo de pH (1-12).



Columnas Atlantis

Las columnas de referencia para la separación de compuestos polares por fase reversa y en modo HILIC.



Columnas SunFire

Estas columnas, que ofrecen la tecnología de endcapping y las fases enlazadas C18 y C8 de fase reversa más avanzadas, proporcionan la mejor forma de los picos para los compuestos básicos, una excelente estabilidad a pH bajos, una alta eficacia y una mayor capacidad de carga.



Columnas Symmetry

Las columnas Symmetry siguen siendo el estándar de reproducibilidad para el análisis de fármacos por HPLC y proporcionan confianza en el cumplimiento a largo plazo de los métodos de HPLC.



Columnas XTerra

Estas columnas, basadas en la primera generación de tecnología de partículas híbridas, proporcionan picos estrechos y simétricos para compuestos básicos en un intervalo de pH de la fase móvil de 2-12.



Columnas YMC

Una amplia selección de columnas para HPLC con una gama de selectividades que le ayuda a desarrollar con éxito separaciones consistentes. Compatibles con más de 400 aplicaciones.

Otras columnas analíticas

Disponemos también de los siguientes productos en nuestro catálogo de columnas: [Spherisorb](#), [μBondapak/Bondapak](#), [Nova-Pak](#), [Resolve](#), [PAH](#), [μPorasil/Porasil](#), [RSPak](#), [accesorios para columnas](#), [productos y columnas para aplicaciones específicas](#) y columnas para [bioseparaciones](#).

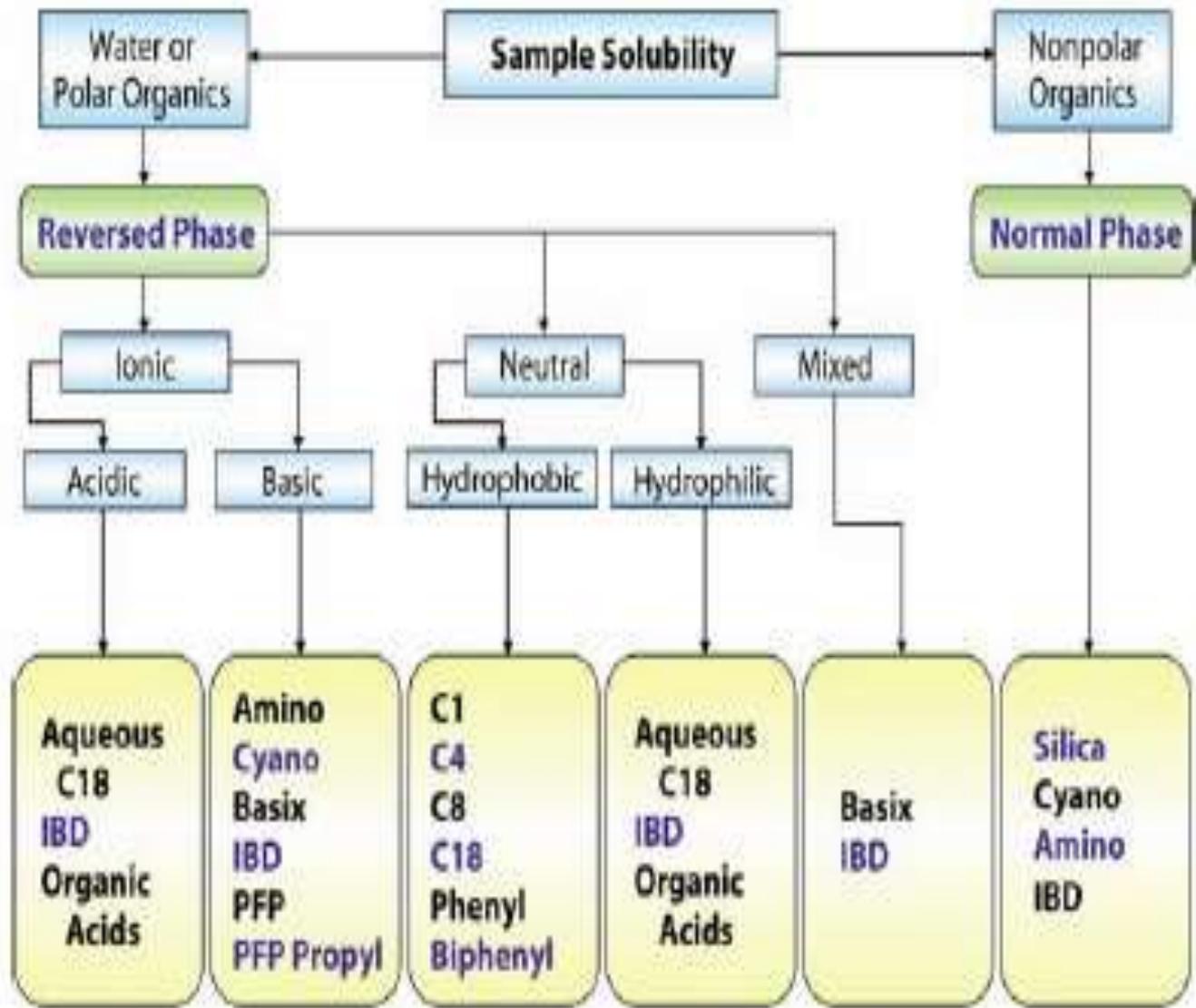
Las innovadoras tecnologías de columnas de Waters son la primera elección para la optimización del desarrollo de métodos.

Precolumnas

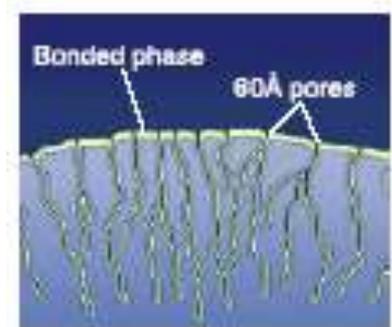
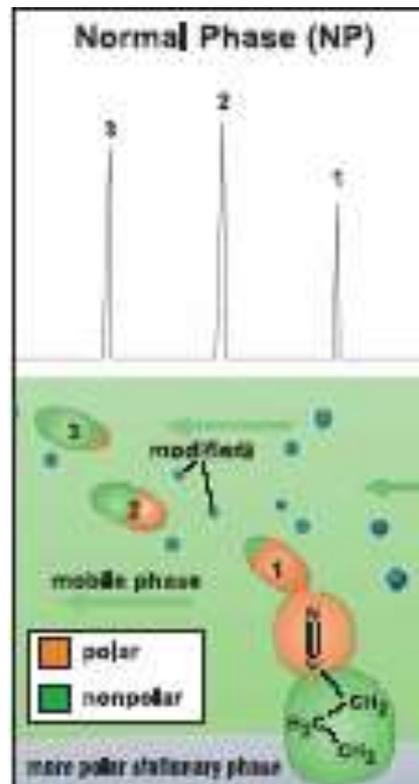
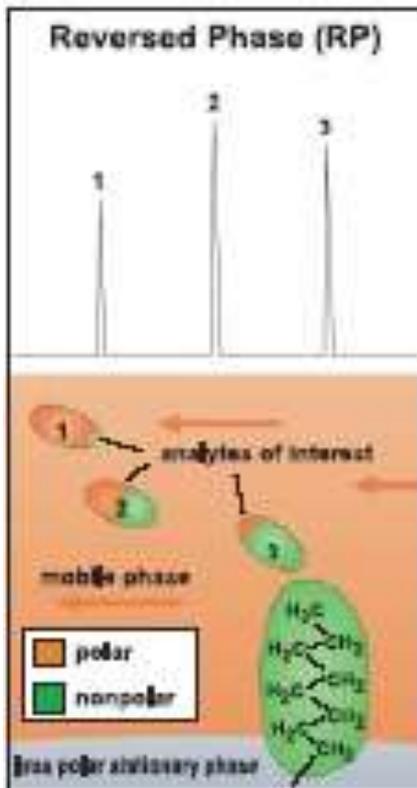
- Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por lo que se protege la entrada de la columna con otra más corta, la “precolumna”, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible.



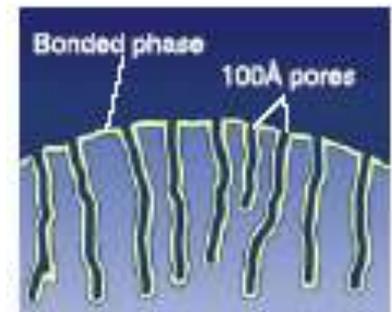
Selección de la Fase estacionaria



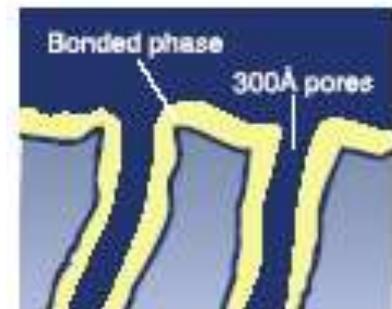
Fases estacionarias



Allure® 60Å pore size provides maximum retention.

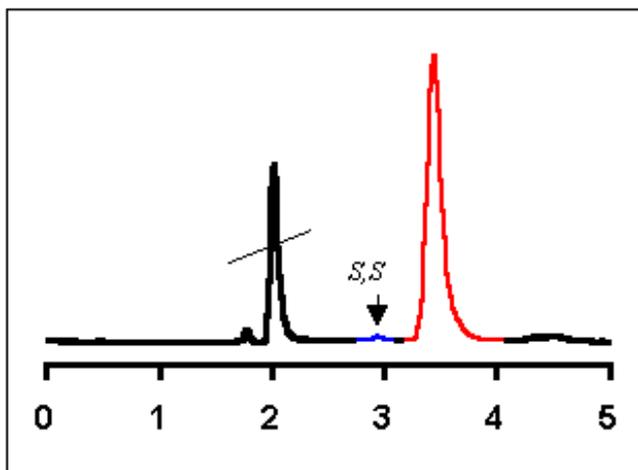
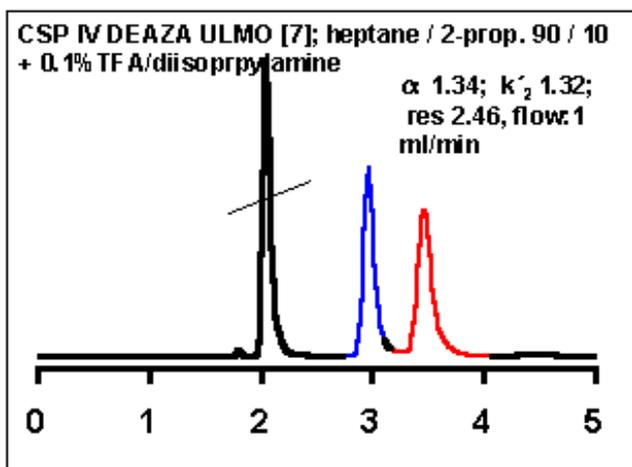


Ultra 100Å pore size provides moderate retention.

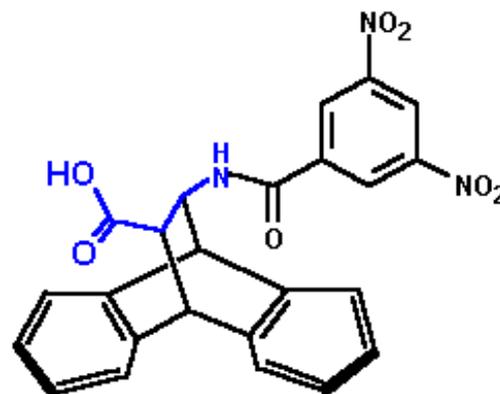


Viva 300Å pore size provides the best retention of large molecules.

Uso de fases específicas



HPLC-analysis of AMEAC as 3,5-dinitrobenoylamide **5**. Above analyzed as racemate, and below as the purified (*R,R*)-enantiomer (99ee) after semipreparative chromatography on the deaza-ULMO CSP [7].





i	High/Low pH UPLC Method Development Kit, 3.0 x 50 mm, 4/pk Referencia: 176001881	2,320.00 EUR
i	High/Low pH UPLC Method Development Kit, 3.0 x 100 mm, 4/pk Referencia: 176001882	2,440.00 EUR
i	IC-Pak Cation M/D Column, 3.9 x 150 mm Referencia: WAT036570	1,360.00 EUR
i	HSS C18 50mm,1.8µm to 100mm, 3.5µm Method Transfer Kit, 2/pk Referencia: 186004968	1,300.00 EUR
i	HSS T3 50mm,1.8µm to 100mm, 3.5µm Method Transfer Kit, 2/pk Referencia: 186004969	1,300.00 EUR
i	HSS T3 50mm,1.8µm to 150mm, 5µm Method Transfer Kit, 2/pk Referencia: 186004962	1,320.00 EUR
i	HSS C18 SB 50mm,1.8µm to 150mm, 5µm Method Transfer Kit, 2/pk Referencia: 186004963	1,320.00 EUR
i	IC-Pak Anion HR Column, 4.6 x 75 mm Referencia: WAT026765	1,660.00 EUR
i	Ion Exclusion Column, 7 µm, 7.8 x 150 mm Referencia: WAT010295	1,060.00 EUR
i	HSS C18 50mm,1.8µm to 150mm, 5µm Method Transfer Kit, 2/pk Referencia: 186004961	1,320.00 EUR
i	IC-Pak Ion Exclusion Guard Column Inserts, 10/pk Referencia: WAT020770	337.00 EUR
i	IC-Pak Anion Concentrator Inserts, 5/pk Referencia: WAT007358	337.00 EUR

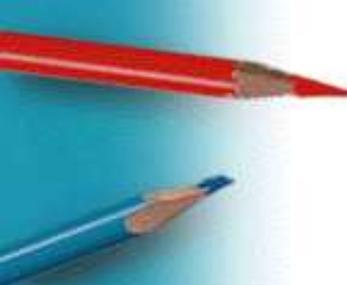


DETECTORES

El detector cromatográfico es el recurso mediante el cual se identifica y mide la cantidad de componentes separados de una muestra.

Características para un detector.

- *Selectividad*
- *Sensibilidad o detectabilidad*
- *Respuesta*
- *Ruido y límite de detección.*
- *Rango lineal*



Detectores

- El detector se coloca al final de las columnas, indicando los momentos de aparición de los componentes, y proporciona el análisis cuantitativo y cualitativo de los mismos.
- El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad, insensible a cambios de presión y temperatura.

Se pueden clasificar de la forma siguiente:

- Detectores de absorbanza ultravioleta
- Detectores de fluorescencia,
- Detectores electroquímicos,
- Detectores de índice de refracción,
- Detectores de conductividad



<i>Detector</i>		<i>Tipo</i>	<i>Selectividad</i>	<i>Sensibilidad</i>
Indice de refracción UV/VIS	de	Universal	Ninguna	10 μ g/mL
Fluorescencia		Selectivo	Dobles enlaces y aromáticos	1ng
Infrarrojo		Selectivo	Poliaromáticos	10pg/mL
Electroquímico		Selectivo	Moléculas con $\mu \neq 0$	5 a 10ng/mL
Masas (acoplado)		Selectivo	Especies oxidables	
			Iónes característicos	ppb



Fase móvil

Reservorio del Disolvente

Sistema de bombeo

Aparato para gradiente o microprocesador

Desplazador automático de muestra

muestra

Inyector

Dispositivo de inyección automática

Termorregulación

Columna

Fase estacionaria

Termorregulación

Detector

Integrador Tratamiento de datos

Recolector de fracciones

Registrador





DISOLVENTES PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

(FASE MÓVIL)

- Alta pureza. (Ser grado HPLC)
- Estabilidad (se debe asegurar que el sistema cromatográfico sea lo más estable posible para hacerlo más repetible y reproducible)
- Polaridad (es uno de los factores que influyen en la separación cromatográfica)
- In-inflamabilidad. (por la seguridad en el trabajo)
- Efectos de mezcla (que la solubilidad de todos los analitos sea optima en el disolvente y que la mezcla sea estable, no toxica)
- Compatibilidad con la columna empleada



Referencias

- Cromatografía

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm>

- http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/Trabajo050405.doc

- <http://www.q1.fcen.uba.ar/materias/ai/hplc1.pdf>

- Skoog A., Holler J., Nieman A., 2001. Principios de Análisis Instrumental, Mc Graw Hill, México.