

CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

INTRODUCCIÓN

Las primeras separaciones, con resultados positivos, por medio de métodos cromatográficos fueron llevadas a cabo por Tswett en el año 1.906; este botánico ruso consiguió separar algunos pigmentos coloreados de hojas de plantas utilizando una columna de alúmina.

El desarrollo total de estas técnicas se produjo, no obstante, a partir del año 1931, en que Kuhn y Lederer comenzaron a utilizarlas de manera sistemática. La cromatografía de líquidos (CL) sufrió un relativo estancamiento a partir del año 1952 en que Martin y James impulsaron el desarrollo de la cromatografía de gases (CG), que acaparó los esfuerzos teóricos encaminados al conocimiento profundo de la cromatografía. No obstante, las limitaciones de la CG en cuanto al tipo de muestras analizables (volátiles o derivados volátiles de las mismas), originó, en la segunda década de los sesenta, una vuelta a considerar la CL cuyas limitaciones, en este sentido, se reducen a la posibilidad de disolver la muestra, lo que le confiere un rango mucho más amplio de aplicación. Este hecho, junto con la aparición de fases estacionarias con diámetros de partícula mucho menores que los utilizados hasta entonces (3 a 25 μm), que permiten obtener columnas de mayor eficacia, llevó a una utilización cada vez más extensa de este tipo de cromatografía.

La experiencia acumulada en el desarrollo de la CG permitió también aplicar nuevos puntos de vista a la CL, para la que pronto se diseñaron sistemas de inyección, circulación del eluyente y detección, de eficacia comparable a la de los utilizados en CG, dando lugar a la moderna técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

EL PROCESO CROMATOGRÁFICO

La cromatografía líquida de alta eficacia se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

Clasificación de la cromatografía líquida

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más habitual de clasificación es la realizada en base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es ésta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo, se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas:

- Cromatografía de adsorción (líquido-sólido).

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

- Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente).

La separación en este caso, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- Cromatografía de intercambio iónico.

Este tipo de cromatografía se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.

- Cromatografía de exclusión molecular.

La fase estacionaria, en este caso, es un material poroso de tamaño de poro controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño.

El mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el

tipo de interacciones que se producen y cual de ellas es la predominante; por esta razón, en la práctica se realiza otra división de los dos primeros tipos de cromatografía atendiendo a polaridad de la fase estacionaria:

- Cromatografía de fase normal:

La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc).

- Cromatografía de fase reversa (inversa):

La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo).

INSTRUMENTACIÓN

Si bien es cierto que para realizar una cromatografía líquida tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficacia, debido al pequeño diámetro de las partículas de fase estacionaria que se utilizan, requiere de la utilización de unos dispositivos que constituyen el cromatógrafo.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

- .- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).
- .- Dispositivo de inyección.
- .- Conducciones y conexiones.
- .- Detector y registrador.
- .- Columna.

Los componentes básicos de un cromatógrafo se muestran en la figura 1.

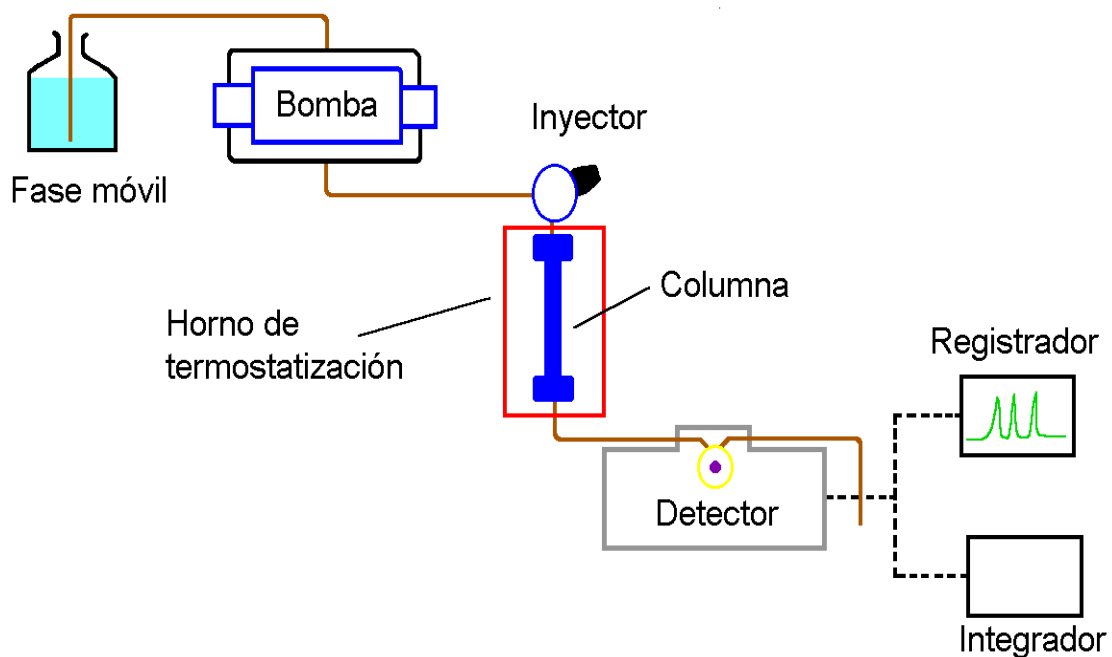


Figura 1.- Esquema de un cromatógrafo de líquidos

Además de los dispositivos anteriormente mencionados se pueden incorporar en el sistema otros que pueden simplificar el trabajo o bien mejorar algún aspecto concreto de la técnica cromatográfica, como pueden ser:

- .- Inyectores automáticos.
- .- Colectores de fracciones.
- .- Hornos termostatzados para las columnas
- .- Sistemas de tratamiento de datos.

Sistema de suministro de fase móvil

La bomba

La misión de la bomba es la de suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por la presión en cabeza de columna, ya que ésta puede variar por obstrucción de las líneas de conducción, del filtro de la cabeza de la columna, etc.

Un sistema de bombeo ideal debe cumplir las siguientes características:

- Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.
- Proporcionar un flujo libre de pulsaciones o llevar asociado un amortiguador de éstas, ya que las pulsaciones, aunque no afectan a la separación en sí, pueden contribuir al ruido de fondo del detector y por lo tanto disminuir la sensibilidad.
- Suministrar flujos adecuados para los diferentes tipos de columnas. El rango de caudales para las columnas que se utilizan habitualmente varía desde los 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ hasta los 10 ml/min (columnas microbore, analíticas y semipreparativas).
- El caudal que suministran debe ser constante a lo largo del tiempo, ya que de él depende la reproducibilidad de los tiempos de retención.

Tipos de bombas

Una primera clasificación de las bombas utilizadas en CLAE, se puede realizar atendiendo a la fuerza motriz, así se tendrán:

- Bombas neumáticas.(Figura 2):
 - Bombas de desplazamiento directo.
 - Bombas amplificadoras de aire.

- Bombas de motor eléctrico. (Figura 3):
 - Bombas de jeringa.
 - Bombas alternantes (pistón o membrana).

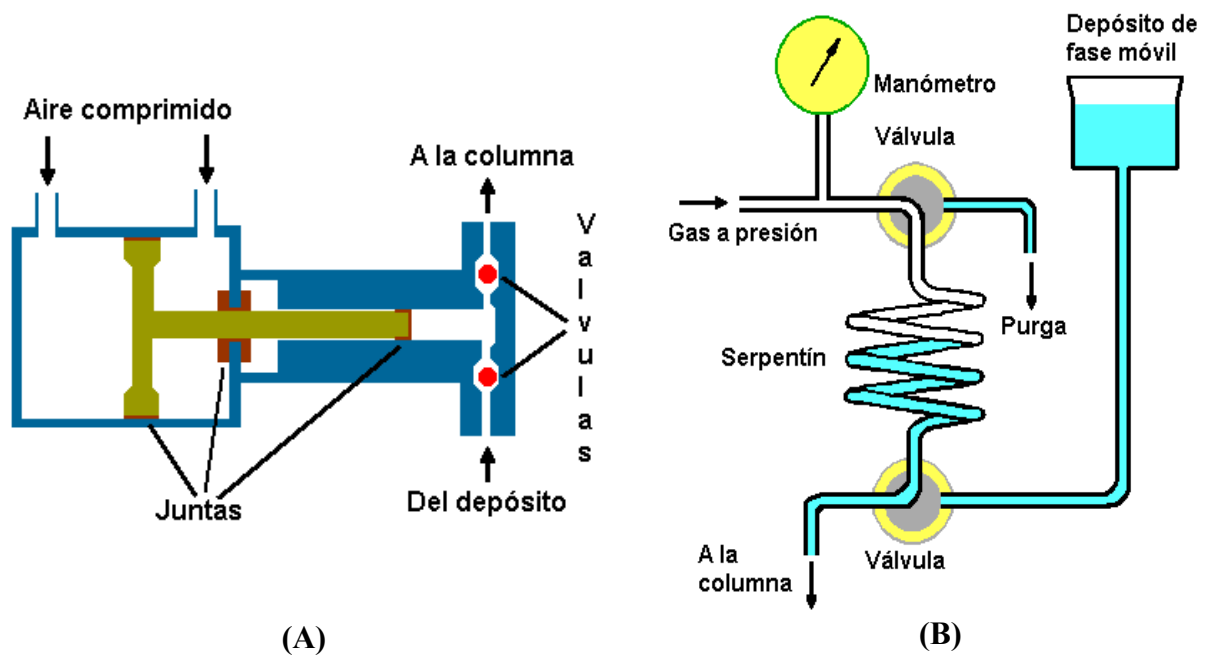


Figura 2.- Bombas neumáticas: (A) Bomba amplificadoras de aire. (B) Bomba de desplazamiento directo.

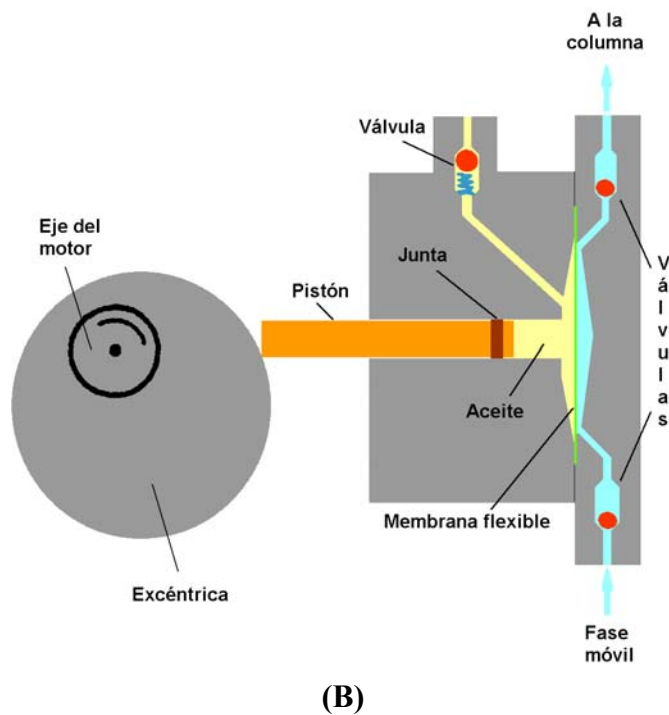
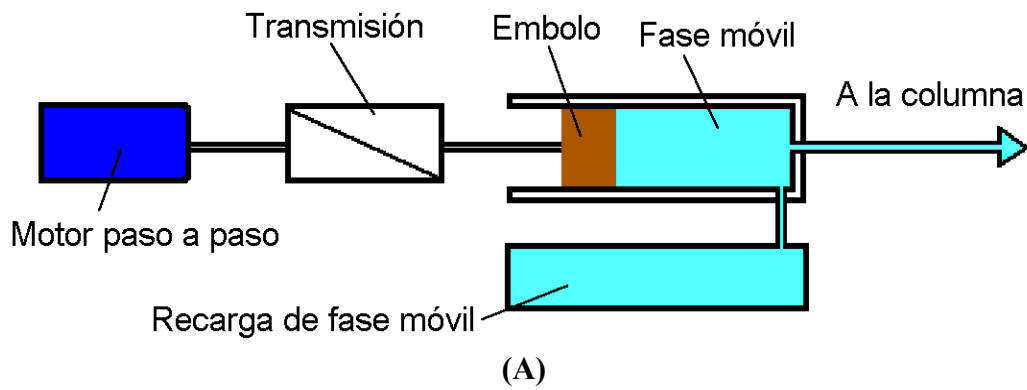


Figura 3. Bombas de motor eléctrico. (A) Bomba de jeringa. (B) Bomba alternante (membrana)

En la actualidad las bombas más utilizadas habitualmente son las de tipo alternante y, por lo tanto, se hará, en este caso, una breve descripción de su funcionamiento.

En toda bomba alternante (figura 4) se distinguen tres partes:

- El motor.
- El mecanismo de transmisión.

- La cabeza de bomba.

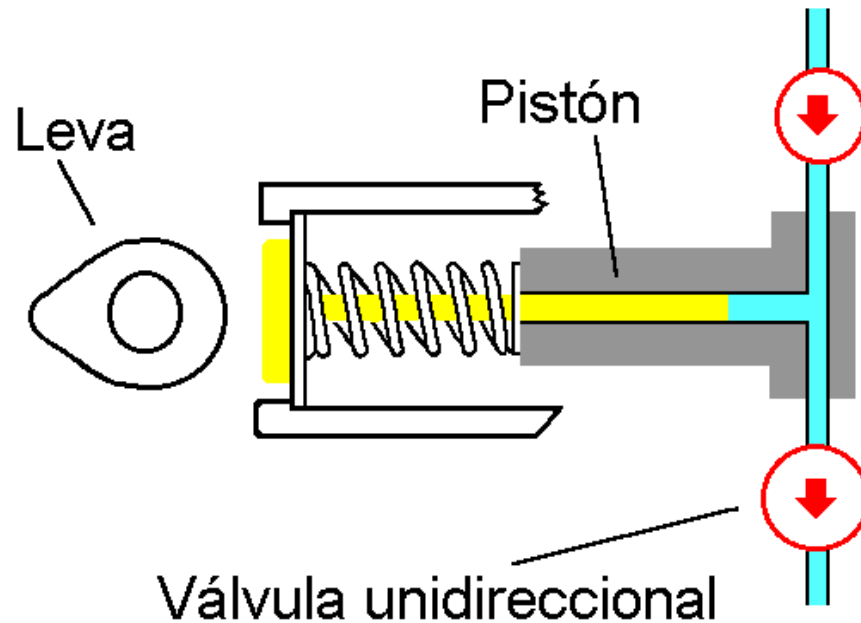


Figura 4.- Esquema de bomba alternante (tipo pistón)

El motor utilizado en este tipo de bombas es de tipo paso a paso, con lo que se consigue un perfecto control de su velocidad, y del desplazamiento que ejerce sobre el pistón.

El mecanismo de transmisión consiste en una excéntrica, que transforma el movimiento rotatorio del motor a un movimiento de va-y-ven del pistón.

La cabeza de la bomba es el compartimiento donde el pistón impulsa el líquido; la dirección de flujo del líquido se controla por medio de válvulas de dirección única (válvulas de control).

Las variantes posibles de este tipo de bombas son muchas, así se pueden encontrar bombas en las que el pistón es substituido por una membrana, bombas que tienen doble pistón con funcionamiento recíproco, bombas con dos pistones en serie, etc.

En todos los casos, las bombas alternantes suministran un flujo pulsado de fase móvil que,

según su diseño, serán de mayor o menor intensidad y que normalmente será necesario eliminar. Existen varios sistemas de amortiguación de los pulsos ("dámper") que proporcionan un caudal constante a través de la columna; en general, todos ellos se basan en situar a la salida de la bomba un recipiente cerrado y elástico con capacidad para amortiguar los pulsos de presión originados por el funcionamiento de la bomba.

Sistemas de mezcla de fase móvil

En cromatografía de líquidos, es posible trabajar en dos modalidades; isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución, y en gradiente, cuando la composición de la fase móvil cambia según una función dependiente del tiempo.

Para trabajar en la modalidad de gradiente, es necesario que el equipo cromatográfico tenga un dispositivo capaz de realizar mezclas de disolventes con un control preciso y reproducible.

Los dos principales métodos de mezclado de los componentes de la fase móvil se conocen como mezclado a alta presión y mezclado a baja presión (figuras 5 y 6).

Mezclado a alta presión

Este sistema de mezclado utiliza una bomba para cada uno de los disolventes que se van a mezclar, estando la salida de cada bomba conectada a una conexión en "T" o a una pequeña cámara de mezcla. La denominación de mezcla en alta presión es debida a que la mezcla se realiza una vez que los disolventes han pasado la bomba y, por lo tanto, han adquirido la presión de trabajo (figura 5).

El mayor inconveniente de este sistema de mezcla, es el alto coste de las bombas si se requieren mezclas con un porcentaje inferior a un 5 % de uno de los componentes, ya que en este caso deben utilizarse bombas de alta precisión y, además, se necesita una bomba para cada uno de los disolventes a mezclar. Como ventajas, se pueden señalar una buena reproducibilidad de las mezclas, una rápida respuesta en los cambios de concentración y, además, la posibilidad de utilizar cada una de las bombas por separado para trabajar con sistemas isocráticos independientes.

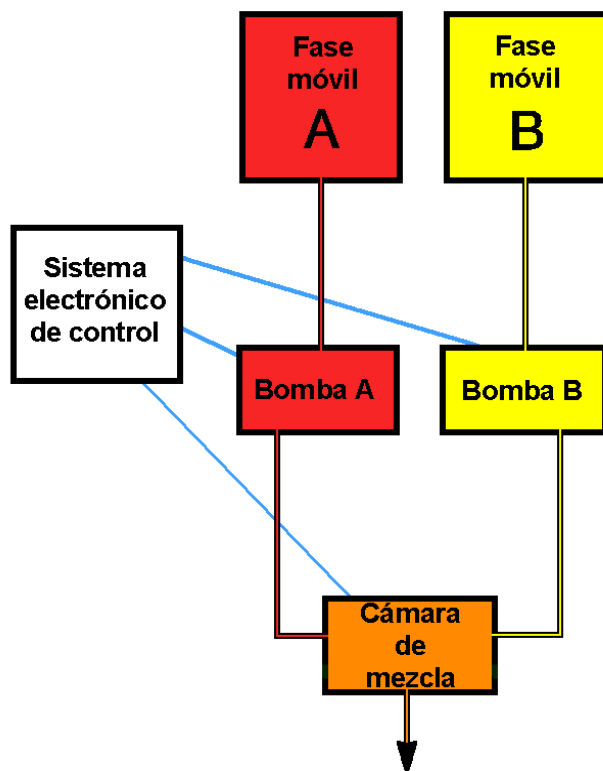


Figura 5.- Sistema de mezcla en alta presión

Mezclado a baja presión

En los equipos de mezcla en baja presión, el mezclado de los diferentes componentes se lleva a cabo antes de éstos entren en la bomba (en la zona de baja presión del sistema), controlándose el caudal del sistema cromatográfico por medio de una sola bomba. El mezclado de los componentes se realiza por medio de válvulas porcentuales controladas por relés, que están calibradas para dar la mezcla adecuada. El dispositivo de control simplemente abre cada válvula durante un período de tiempo adecuado, que será función del porcentaje de cada componente que se precise en la mezcla (figura 6).

La principal ventaja de este tipo de mezclado, es que el coste del equipo se reduce considerablemente. El mezclado en baja permite la mezcla de dos o más componentes de la fase móvil con una buena reproducibilidad, aunque con unos tiempos de retardo algo mayores respecto a la mezcla en alta presión. Como principal desventaja, se tiene la baja reproducibilidad que se obtiene en mezclas donde uno de los componentes se encuentra en una proporción de menos del 5%.

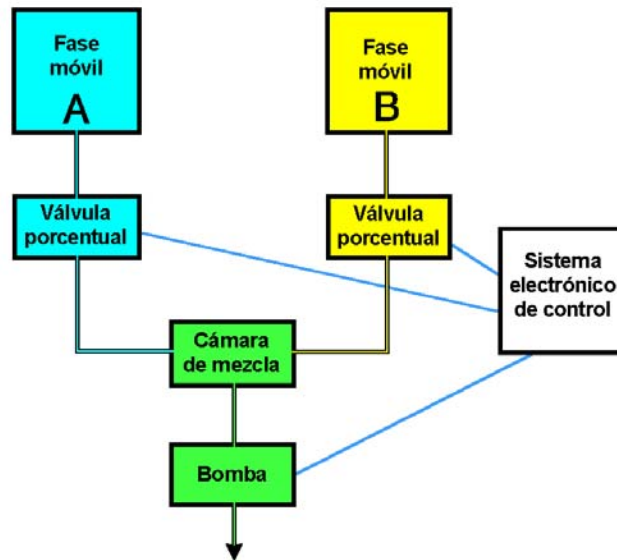


Figura 6.- Sistema de mezcla en baja presión

Sistemas de inyección

El método de introducción de la muestra en CLAE, es de importancia capital, pues un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica que deterioren la eficacia del sistema cromatográfico.

Un inyector ideal debe tener las siguientes características:

- Introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible.
- Ser de fácil manejo.
- Dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.

Fundamentalmente existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula.

Inyectores de jeringa

En este tipo de inyectores, la introducción de la muestra en la columna se realiza por medio de una jeringa cuya aguja entra en el sistema cromatográfico a través de una membrana ("septum"), lo que permite depositar la muestra en la cabeza de la columna (figura 7).

Las ventajas de este tipo de inyector, radican en su facilidad de construcción y en que permiten sacar todo el partido a la eficacia ofrecida por la columna; por el contrario, son inyectores que presentan una gran falta de reproducibilidad, tienen una presión de trabajo limitada y son de gran dificultad de manejo.

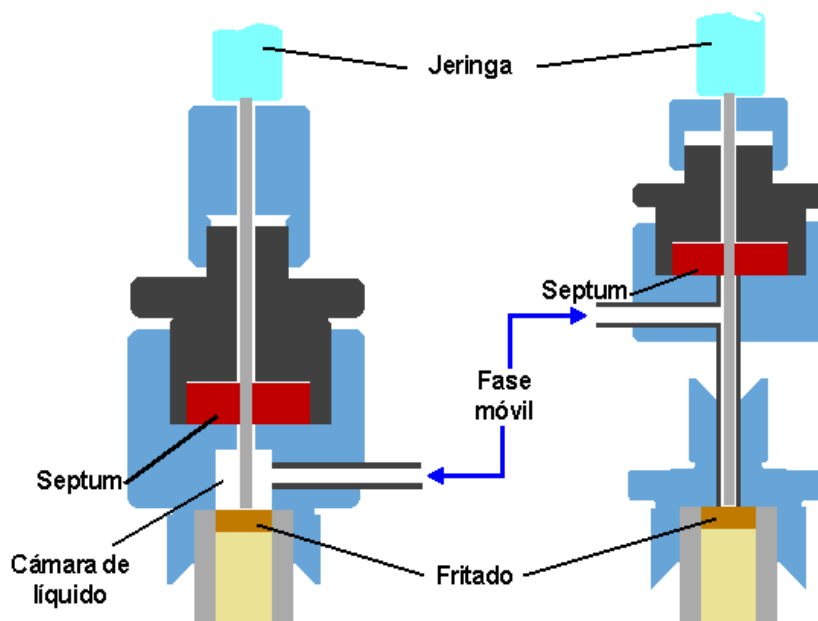


Figura 7.- Inyectores de jeringa con y sin cámara de líquido

Inyectores de válvula

Este sistema de inyección consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de una espira ("loop"). Esta espira es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contener la muestra antes de efectuarse la inyección.

La introducción de la muestra en la columna se lleva a cabo en dos etapas; la primera se realiza a presión atmosférica, y consiste en cargar la muestra en la espira con ayuda de una jeringa; en la segunda, mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la

espira hacia la columna (figura 8).

La inyección mediante válvulas es con mucho la más utilizada, ya que reúne prácticamente todas las características exigibles a un inyector.

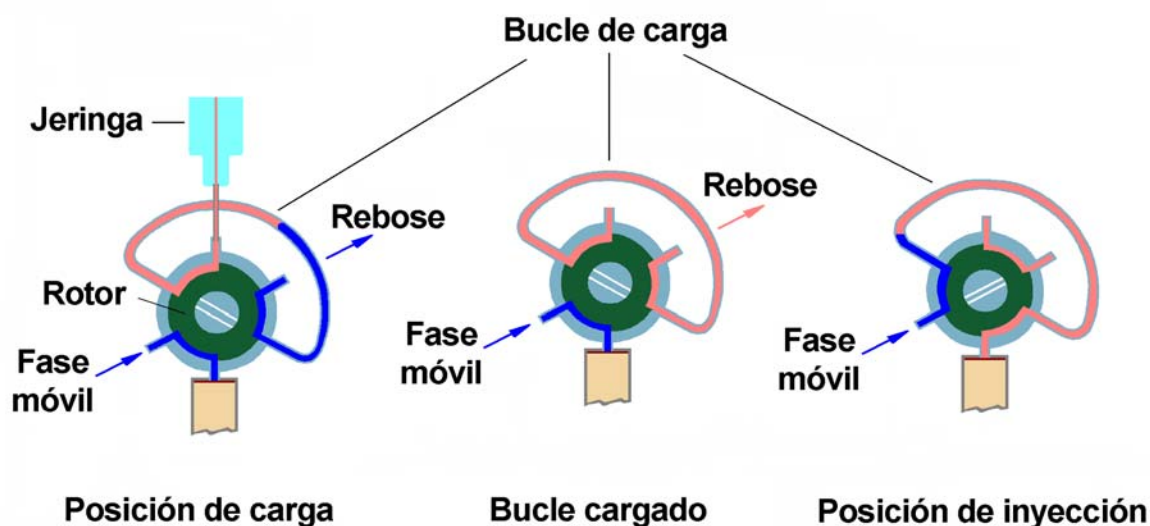


Figura 8.- Inyección mediante válvula de 6 vías

Conducciones y conexiones

Como ya es conocido, la presencia de volúmenes muertos es uno de los grandes problemas de los equipos de cromatografía de líquidos, ya que éstos dan origen a pérdidas en la eficacia del sistema y, por lo tanto, en la capacidad de separación. En particular, todas las conducciones y conexiones entre inyector y columna, y entre columna y detector son de la máxima importancia.

El tubo de conducción puede considerarse como un volumen muerto del sistema y, por lo tanto, es de vital importancia la utilización para esta finalidad de tubos capilares en los que el diámetro interno sea pequeño y evitar al máximo posible la utilización de grandes longitudes de tubo de conexión; de este modo, se consigue reducir en la medida de lo posible el volumen muerto del sistema. Es posible calcular la pérdida de eficacia producida por el volumen muerto de la conducción; a título de ejemplo, en la tabla I se muestran diferentes combinaciones de diámetros internos y longitudes de tubo que pueden utilizarse para no dar lugar a una pérdida

superior al 10 % de la eficacia del sistema.

Tabla I.- Longitudes y diámetros de tubo para una pérdida de eficacia de 10 %

Diámetro interno (mm)	Longitud del tubo (cm)
0.125	128
0.25	8
0.5	0.5

También es importante conocer la naturaleza del tubo utilizado, ya que éste debe ser inerte frente a la fase móvil y a las sustancias a separar; en general se utiliza tubo de acero inoxidable, pero en casos especiales, se utilizan tubos de titanio (no sufren ataque por ión Cl⁻), y en otros casos, de materiales sintéticos (principalmente PTFE).

Las conexiones tienen la misma importancia que el tubo, ya que en ellas es también necesario el lograr eliminar la presencia de volúmenes muertos.

Existen dos tipos de conexiones: las uniones, que se emplean para conectar tubos del mismo diámetro (figura 9), y las reducciones, que se emplean para modificar el diámetro de la conducción encontrándose, por lo general, las reducciones únicamente en los extremos de la columna. En ambos casos, es imprescindible la eliminación de los volúmenes muertos (figura 10).

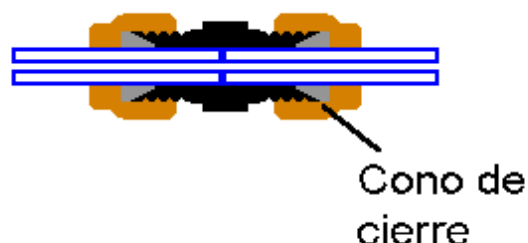


Figura 9.- Conexión de unión

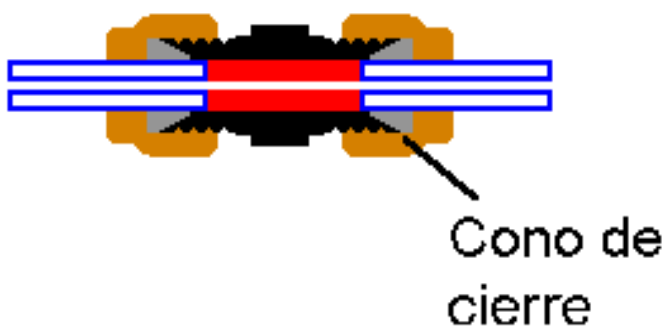


Figura 10.- Volumen muerto originado por una unión

Detectores

Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste. La detección en cromatografía se realiza, habitualmente, en continuo, aunque es posible la utilización de colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente.

Las características de un detector para cromatografía, son principalmente:

1.- Características que no afectan a la eficacia de la separación.

Respuesta.- Es la señal ofrecida por el detector ante una determinada variación de la propiedad física del eluyente que es medida. Esta propiedad debe ser proporcional a la variación de masa del soluto que sale de la columna o a su concentración. La respuesta de un detector suele ser lineal (en un rango más o menos ancho según el tipo de detector), lo que implica que la señal generada por el detector varía linealmente con la concentración o la masa de soluto que, por unidad de tiempo, sale de la columna.

Ruido.- Es cualquier perturbación de la señal generada por el detector y que no es originada por la salida de un soluto de la columna.

El ruido de fondo del detector (figura 11), se compone a su vez de otros dos tipos de ruido: ruido de corto alcance (perturbaciones de una frecuencia mayor que la inversa del ancho del pico de soluto) y ruido de largo alcance (perturbaciones con una frecuencia del mismo orden que la inversa del ancho del pico del soluto).

Deriva.- Es la variación de la señal de base a lo largo del tiempo, que origina una variación lenta y progresiva de la línea de base (figura 11).

Sensibilidad.- La sensibilidad se define como la mínima concentración o cantidad de soluto que debe pasar por el detector para que la señal a que éste da lugar sea dos veces mayor que la del ruido de fondo. Este parámetro indica la cantidad mínima de soluto que es posible detectar, y es dependiente del

ruido del detector.

Rango dinámico.- Es el rango de concentraciones de soluto entre las cuales el detector produce una respuesta dependiente de la concentración de soluto a la salida de la columna. El valor mínimo, se corresponde con la sensibilidad del detector, y el máximo, con la concentración de soluto a partir de la cual la respuesta del detector es constante (saturación). El rango dinámico lineal, es la zona del anterior en el que la respuesta del detector es lineal frente a la concentración de soluto.

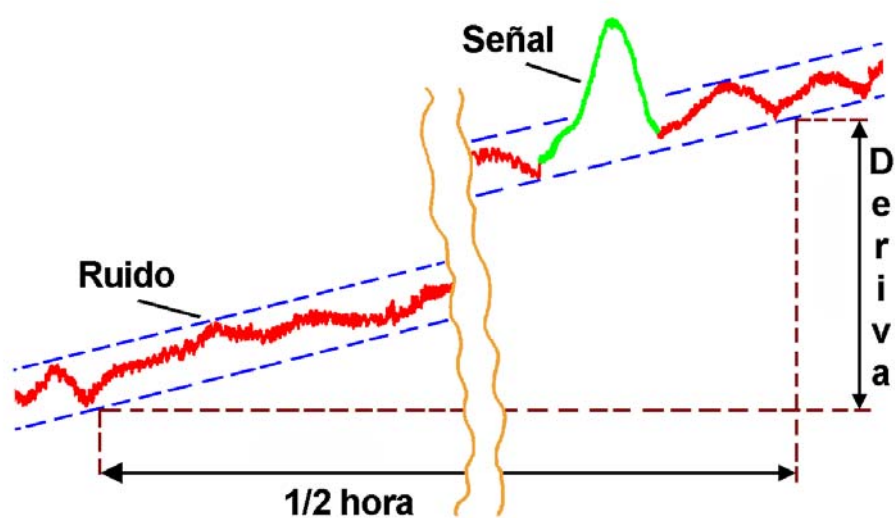


Figura 11.- Ruido y deriva de la señal de un detector

2.- Características que afectan a la eficacia de la separación.

Volumen de la cubeta.- El volumen de la cubeta puede provocar una pérdida considerable de la eficacia del sistema, ya que volúmenes grandes de célula originan un efecto de dilución exponencial del soluto que sale de la columna, deformándose el pico y pudiéndose mezclar dos solutos que salen separados de la columna.

El volumen máximo de la cubeta es función del porcentaje de pérdida de eficacia admisible para el sistema

y, en general, se utilizan volúmenes inferiores a 8 μL para evitar pérdidas de eficacia (figura 12.)

Constante de tiempo.-

La constante de tiempo del detector indica el tiempo que necesita la electrónica del detector para asumir la señal instantánea originada por el soluto. Constantes de tiempo elevadas, dan origen a que picos que salen rápidamente de la columna se vean ensanchados, y por lo tanto, dan origen a una pérdida de la eficacia del sistema. Para análisis convencionales, son apropiadas constantes de tiempo inferiores a 100 ms.

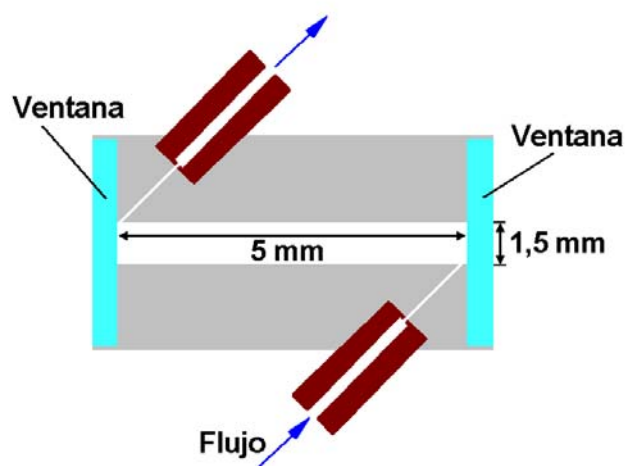


Figura 12.- Célula típica de flujo en Z

Se puede hacer una división de los detectores en dos grandes grupos: los que aportan información estructural sobre las sustancias eluidas (son aquellos detectores que permiten la obtención de espectros de las sustancias que salen de la columna, tales como IRTF, UV-VIS de matriz de diodos, EM) y aquellos que no la aportan. Los pertenecientes al primer grupo no son detectores de cromatografía de líquidos de uso frecuente, aunque en la actualidad alguno de ellos se está imponiendo a los detectores que no aportan información estructural.

Los detectores que no aportan información estructural, han sido hasta el momento los de uso más extendido; entre ellos deben mencionarse:

- Detector índice de refracción.

- Detector de ultravioleta y/o visible.
- Detector de fluorescencia.
- Detector de conductividad eléctrica.
- Detector electroquímico.

Detector de índice de refracción

Fundamentos

El detector de índice de refracción, es el detector de uso corriente de respuesta más universal.

El índice de refracción es una característica física definida de todos los compuestos. La detección se basa en equilibrar el detector, a caudal constante, con fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil. Resulta obvio que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y de la fase móvil, mayor será el desequilibrio, por tanto, la máxima sensibilidad se obtendrá cuando exista una diferencia máxima entre los respectivos índices de refracción. Sin embargo, aparecen ocasionalmente algunos problemas al efectuar la elección de un sistema de fase móvil, que sea compatible con el tipo de separación y con los componentes del instrumento, para que su índice de refracción sea diferente del de la muestra. Por otra parte, en mezclas complejas, los índices de refracción de los componentes de la mezcla pueden cubrir un amplio intervalo de valores y algunos de ellos pueden ser muy cercanos al de la fase móvil, con lo que resultarán invisibles para el detector.

Otro inconveniente de la detección por índice de refracción, es la necesidad de reequilibrar el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil. Este factor resulta muy limitativo, puesto que convierte al detector de índice de refracción en inutilizable en las separaciones con elución por gradiente, en las que la composición de la fase móvil cambia durante el análisis; por supuesto, es posible intentar la preparación de mezclas de disolventes de alta y baja polaridad, mezclados cuidadosamente para mantener igual el índice de refracción a lo largo de todo el análisis, pero resulta sumamente difícil de realizar a menos que se trabaje solamente a baja sensibilidad.

Tipos de refractómetros

En la actualidad se suelen utilizar dos tipos básicos de detectores de índice de refracción. Ambos requieren el uso de una cubeta de doble paso, en la que el lado que contiene la muestra se compara constantemente con el lado de referencia que contiene fase móvil.

a) Detector de desviación

En la figura 13, se presenta un esquema de la parte óptica del detector de desviación, que obedece a la ley de Snell. Este detector utiliza el principio de la desviación; en él se mide la desviación de un haz luminoso al variar la composición del lado de la muestra en relación con la del lado de referencia a medida que eluye la muestra a través del detector. Cuando no hay muestra presente, la luz que pasa a través de ambas partes de la cubeta se enfoca en la fotocélula; a medida que eluye la muestra, varía el ángulo de refracción, por lo que el haz luminoso se desvía. Esto se traduce en un cambio en la intensidad de luz que llega a la fotocélula, siendo registrada la intensidad del cambio, que puede relacionarse con la concentración de la muestra.

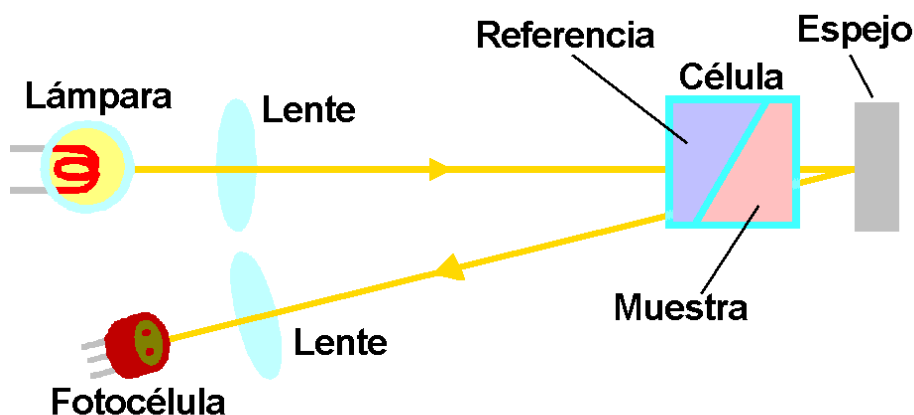


Figura 13.- Refractómetro de desviación de haz óptico

Las ventajas de este tipo de detector son su baja sensibilidad frente a las partículas sólidas y a las burbujas de aire que puedan penetrar en la cubeta y la posibilidad de cubrir el intervalo completo de índices de refracción (desde 1,000 hasta 1,75), con una única cubeta fácilmente equilibrable. Sus desventajas, son su alto coste y, como consecuencia del crítico emplazamiento de la cubeta en el centro de la óptica, su difícil manejo, lo que impide limpiar, quitar o reemplazar fácilmente la cubeta cuando se forma en ella una película o se atasca.

b) Detector de reflexión (Fresnel).

El segundo tipo de detector de índice de refracción utiliza el principio de Fresnel. En la figura 14, se muestra el esquema óptico de este tipo de detector. En él, el haz luminoso se enfoca tanto a las interfaces prisma-líquido de la cubeta como a una lámina pulimentada que forma la superficie trasera de las cubetas de la muestra y de la referencia, reflejándose desde ellas a la fotocélula de detección. Al entrar la muestra en una de las cubetas la luz se refracta con un ángulo diferente, con lo cual a la salida hacia la fotocélula habrá variado su intensidad (no su dirección). El consiguiente desequilibrio del detector generará un cambio en la energía eléctrica de su señal de salida. También en este caso, la diferencia entre la señal de la cubeta de la muestra y la de la referencia se transmite a un registrador o a un sistema de tratamiento de datos en forma de variación del voltaje de salida.

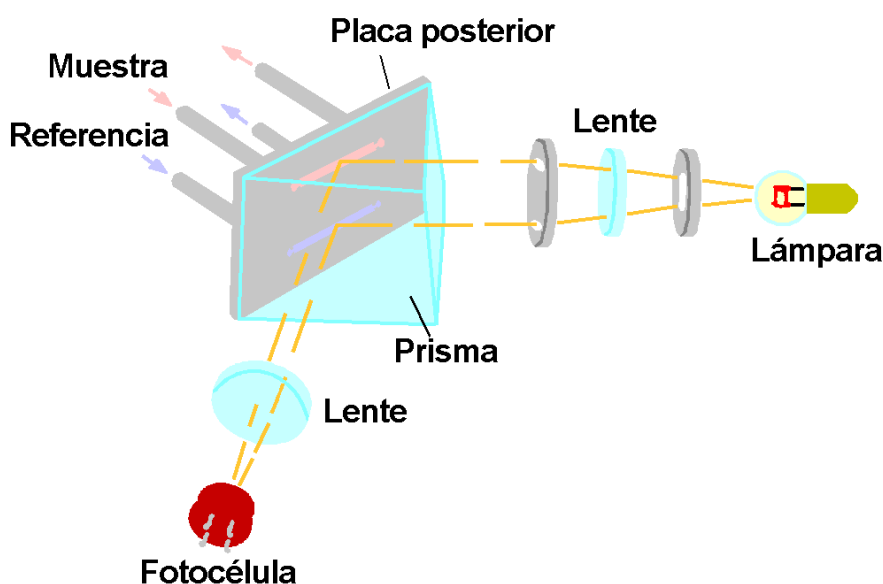


Figura 14.- Refractómetro de reflexión Fresnel

La principal ventaja de este tipo de detector es su gran sensibilidad potencial, puesto que su óptica permite una mayor concentración de la señal en un determinado intervalo de índice de refracción de lo que es posible en los detectores de intervalo amplio. Presenta también otras ventajas, como son la posibilidad de operar a caudales sumamente bajos con cubetas de muy pequeño volumen, un fácil acceso a la cubeta y, además, su bajo coste. Sus desventajas son la necesidad de cambiar los prismas para adaptarse al índice de refracción de los disolventes (que pueden tenerlo muy elevado o bien muy bajo) así como la necesidad de ajustar manualmente el camino óptico al cambiar de disolvente.

Factores que influyen en la sensibilidad.

El índice de refracción de un compuesto es función de su densidad molecular. Una variación en la densidad se traduce en un cambio en el índice de refracción, por lo que un refractómetro es sensible a los cambios en la concentración de la muestra o del eluyente, a los cambios de presión y a los de temperatura, ya que todos ellos dan lugar a cambios en la densidad. Un detector de índice de refracción apropiado para su uso en CLAE debe ser sensible a un cambio del índice de refracción del orden de 10^{-7} unidades (correspondiente a un cambio en la concentración de 1 ppm). La presencia de aire disuelto, los cambios en la composición del disolvente, un mezclado incorrecto o el arrastre de fase estacionaria de la columna, provocan deriva de la línea de base. Un líquido orgánico de los normalmente utilizados como fase móvil, sufre una variación de 1×10^{-6} unidades de índice de refracción al variar la presión en 1 atm (15 psi), y de 6×10^{-8} unidades de índice de refracción al variar la temperatura en 1°C ; por tanto, es evidente que estas condiciones deben controlarse con precisión, en especial la temperatura. Para trabajar a gran sensibilidad, un detector de índice de refracción debe estar termostatzado en $\pm 0,01^\circ\text{C}$, mediante un baño de agua conectado a la cabeza del detector, o bien, alternativamente, debe poseer una camisa de gran volumen que estabilice la temperatura. Los detectores comerciales normalmente llevan un tubo de pequeño calibre en su entrada que permite estabilizar la temperatura del material que eluye antes de que penetre en la cubeta.

Detectores de ultravioleta/visible

Fundamentos

Cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, éstos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía, a una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional. Esta energía, provoca el paso de un electrón desde el estado fundamental hasta un nivel de energía superior. La absorción de energía, se traduce en una disminución de la intensidad del haz luminoso que se ha hecho pasar a través de la muestra, pudiéndose medir esta disminución de intensidad haciendo incidir el haz sobre una fotocélula.

En los detectores de absorción ultravioleta, la línea de base representa la máxima transmisión de luz, y cualquier desviación de ella indicará pérdida o absorción de radiación.

La utilización de la absorción de luz ultravioleta o visible para el control de una corriente

líquida y analizar los distintos componentes que lleva en disolución, es una extensión natural de la espectrofotometría. Al contrario de lo que ocurre con el índice de refracción, la absorción UV o visible es un parámetro específico para cada compuesto, ya que éste debe presentar una absorción adecuada en alguna región del espectro o, en su caso, debe combinarse con un reactivo adecuado para formar un derivado que presente absorción.

La posibilidad de realizar el control de una corriente líquida por medio de su absorción a una determinada longitud de onda es muy sencilla de evaluar, ya que las características de la absorción UV de una determinada muestra se pueden conocer por medio de trabajos previos en este tipo de detectores, o bien pueden obtenerse fácilmente registrando su espectro de absorción en un espectrofotómetro. Cuando la muestra no absorbe la radiación por sí misma, el hallar un reactivo adecuado que dé lugar a un derivado coloreado para poder medir la absorción en visible, requiere mucho más trabajo químico, aunque el procedimiento final de evaluación sea el mismo.

En la tabla II se dan las absorptividades molares de diversos grupos funcionales a determinadas longitudes de onda. El conocimiento de estos valores es importante, ya que indican las longitudes de onda que es necesario utilizar para obtener una respuesta máxima del detector.

Tabla II.- Coeficiente de extinción molar (ϵ) de varios compuestos

TIPO DE COMPUESTO	CROMÓFORO	LONGITUD DE ONDA (nm)	ϵ
Amina	-NH ₂	195	2800
Insaturación alifática	-C=C-	190	8000
	-(C=C) ₂ -	210-230	21000
Insaturación alicíclica	-(C=C) ₂ -	230-260	6000
Benceno		202	6900
Bifenilo		246	20000
Quinoleína		270	3600
		314	2750
Antraceno		252	199000
		375	7900

La mayoría de los compuestos orgánicos pueden analizarse por cromatografía líquida

utilizando detectores de UV-visible. Se considera que, por lo menos, el 65 % de las muestras analizadas por CLAE presentan alguna absorción en la zona de 254 nm (longitud de onda con la que trabajan la mayoría de los detectores de longitud de onda fija de uso general), y más del 90% absorben en algún punto del espectro que cubren los algo más sofisticados detectores de longitud de onda variable. Este hecho, junto con la relativa sencillez de su manejo, hace que el detector de UV sea el más útil y el más ampliamente utilizado de los detectores de CLAE.

Tipos de detectores UV/VIS

a) Detectores de longitud de onda fija.

La fuente luminosa más corrientemente utilizada en los detectores de UV, emite la mayor parte de la energía a una longitud de onda fija de 253,7 nm. Es posible seleccionar, por medio de filtros adecuados, una de las longitudes de onda, retirando las de emisión más débil. La mayoría de los detectores que trabajan con longitud de onda fija, utilizan la línea de 254 nm, que presenta una gran estabilidad y de emisión y permite obtener una alta sensibilidad, pudiéndose medir incluso cantidades por debajo del nanogramo en sustancias que presenten una gran absorción.

El espectrofotómetro de 254 nm, ha sido el detector de bajo coste más ampliamente utilizado en CLAE, ya que la mayoría de los compuestos que absorben en UV presentan cierta absorción esta longitud de onda.

Muchos detectores de longitud de onda fija también ofrecen la posibilidad de utilizar otros filtros, lo que permite una utilización limitada del detector a otras longitudes de onda para la detección de aquellos compuestos que no presentan absorción a 254 nm, pero que si absorben en algún otro punto del espectro ultravioleta; sin embargo, la estabilidad de la línea de base y la intensidad de la señal que se obtiene al trabajar con estas líneas más débiles, no suelen ser nunca comparables a las que se obtienen con la línea de 254 nm.

b) Detectores de longitud de onda variable.

Los detectores de longitud de onda variable son particularmente útiles en tres casos:

- En el caso de que pueda obtenerse una mejor sensibilidad a una longitud de onda distinta de 254 nm o de otras longitudes de onda para las que existen filtros.

- En el caso de que los distintos componentes de la muestra presenten gran absorción a diferentes longitudes de onda y, por tanto, el trabajo a una única longitud de onda reduzca la sensibilidad e incluso pueda resultar imposible la detección de algunos de los componentes de la muestra.
- En el caso de que se desee una operación con paro del flujo combinada con un registro del espectro completo de los picos.

En la figura 15, se presenta el esquema óptico de un detector de UV de longitud de onda variable. Los modernos detectores de UV son capaces de trabajar a cualquier longitud de onda comprendida entre 190 y 900 nm.

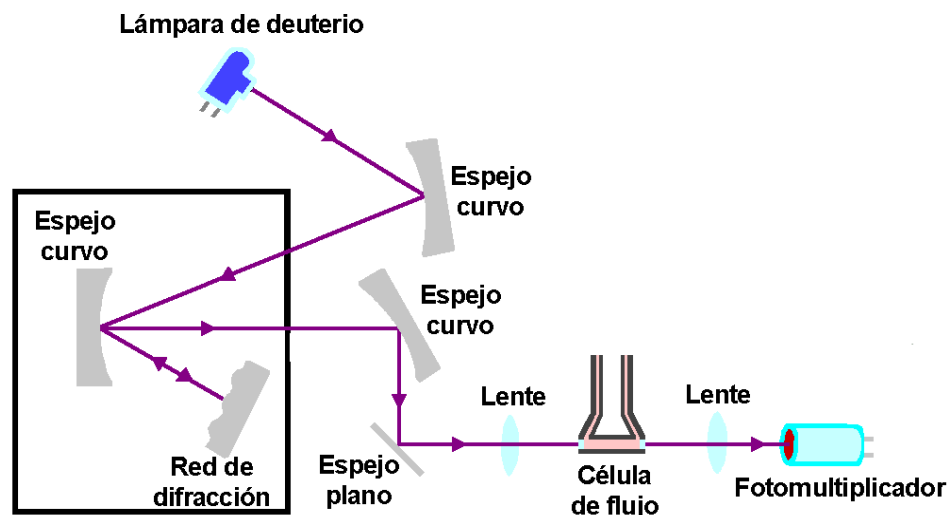


Figura 15.- Detector UV/VIS de longitud de onda variable

En algunos detectores, el cambio de longitud de onda se efectúa manualmente, mientras que en otros puede programarse la longitud de onda de trabajo en función del tiempo por medio de la memoria del instrumento; esto permite trabajar a diferentes longitudes de onda sin atención por parte del personal. Los aparatos más sofisticados, también permiten un registro automático de todo el espectro, parando automáticamente el flujo cuando la cubeta contiene una determinada fracción del efluente de la columna.

Otro tipo de detector ultravioleta, cuya importancia en CLAE se hace cada vez mayor, ya que permite en tiempo real conocer el espectro de UV/Vis en cualquier instante del

cromatograma, es el llamado detector de matriz de diodos. La base del funcionamiento de los espectrofotómetros de matriz de diodos (figura 16) es simple; el haz de radiación que ha atravesado una cubeta de flujo continuo, a través de la que circula la fase móvil procedente de la columna cromatográfica, es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos.

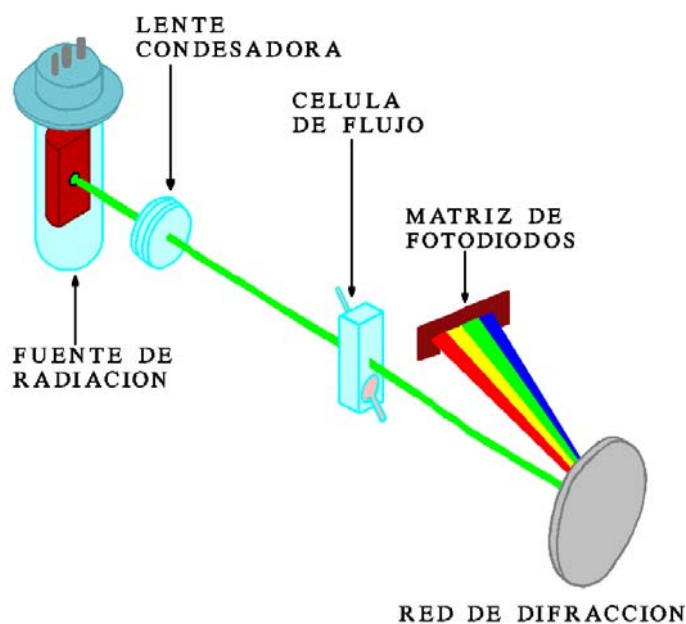


Figura 16.- Detector UV de matriz de fotodiodos

Por supuesto, debe tenerse en cuenta que este tipo de espectrofotómetro no presenta nunca un diseño de doble haz, por lo que en los espectros obtenidos aparecerán siempre las bandas de absorción propias de la fase móvil, aunque este problema puede minimizarse mediante una substracción de las señales espectrales de la línea de base; debe destacarse también que la técnica de detección mediante espectrofotómetros de matriz de diodos, presenta la desventaja de ser ligeramente menos sensible que la detección por ultravioleta convencional.

Detectores de fluorescencia.

Fundamentos

El fenómeno de fluorescencia tiene lugar cuando compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos, se excitan con la energía de ciertas longitudes de onda y emiten

radiación de mayor longitud de onda que la absorbida.

En fluorescencia, la radiación emitida se mide normalmente, con objeto de evitar interferencias, en dirección perpendicular a la de incidencia del haz de excitación. Naturalmente la posibilidad real de detectar por fluorescencia grupos químicos específicos, es función de las longitudes de onda seleccionadas, tanto la de excitación como la de emisión.

Los detectores de fluorescencia representan el tercer tipo de detectores más comúnmente utilizados en la moderna CL. Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por medio de una derivatización simple, es el tipo de detección más sensible que se puede aplicar de rutina a la CL; normalmente la sensibilidad del detector de fluorescencia es 1.000 veces mayor que la del detector UV, para compuestos con absorción UV intensa, y la sensibilidad del detector UV es, por su parte, 1.000 veces mayor que la del detector de índice de refracción. En la tabla III se recogen algunos compuestos que presentan fluorescencia natural.

Tabla III. Compuestos con fluorescencia natural

COMPUESTO	LONGITUD DE ONDA	LONGITUD DE ONDA
	(nm)	(nm)
	EXCITACIÓN	EMISIÓN
Benceno	270	310
Tolueno	270	320
Clorobenceno	275	345
Fenol	285	365
Anilina	210	405
Acido benzoico	310	390
Benzonitrilo	280	360

En la detección por fluorescencia, además de aumentar la sensibilidad, también aumenta la especificidad. Los detectores de fluorescencia son los más específicos de todos los detectores ópticos, lo que se usa ventajosamente para la determinación de especies con una fluorescencia específica en muestras complejas; de hecho, una de las mayores ventajas potenciales de la detección por fluorescencia, en especial si se usa instrumentación que permita efectuar tanto

barridos de excitación como de emisión, reside en la posibilidad de proporcionar datos para la identificación de los picos a través de sus espectros de excitación y de emisión, utilizando técnicas de registro con paro de flujo. Los espectros de excitación y de emisión de una sustancia, proporcionan una gran cantidad de información; con instrumentación sofisticada, que permita obtener los espectros corregidos, se puede llegar a realizar una interpretación estructural de los espectros de fluorescencia, lo que permite llegar a la identificación de los compuestos que eluyen de la columna.

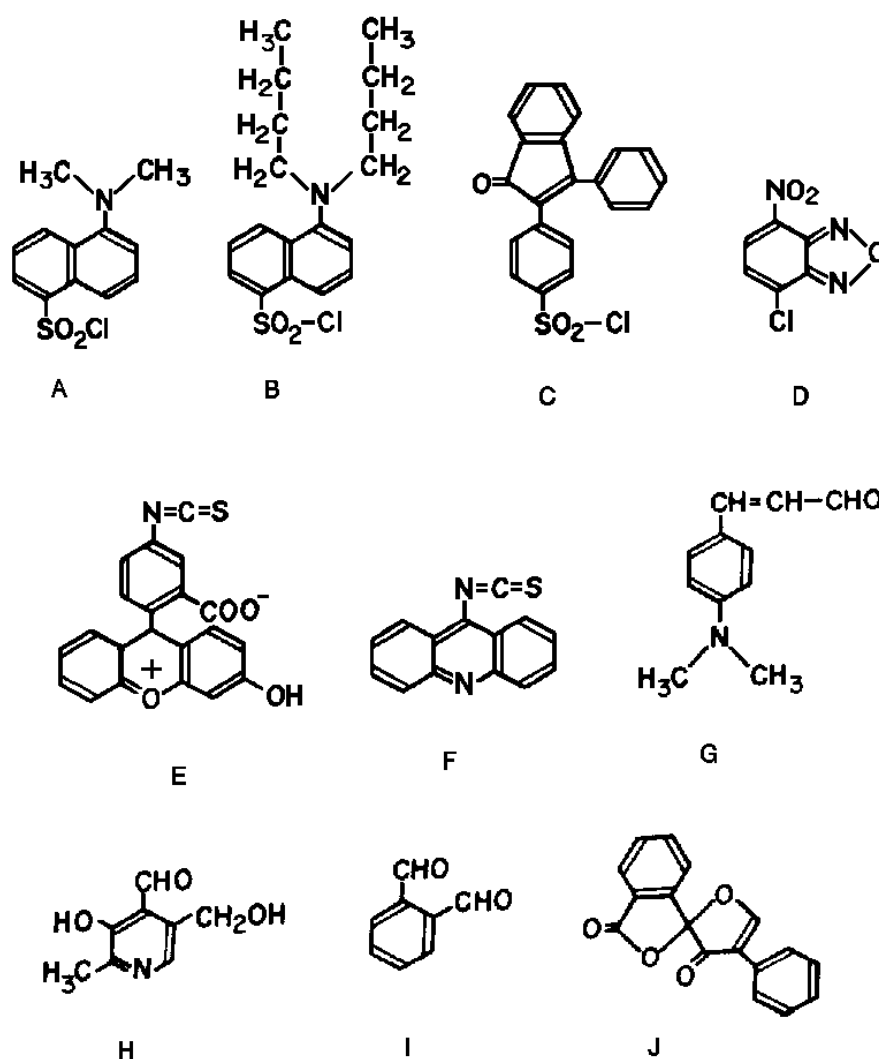


Figura 17.- Reactivos utilizados para la detección por fluorescencia:
 (A) Cloruro de dansilo. (B) Cloruro de 5-di-n-butilaminonaftaleno-1-sulfonylo. (C) p-clorosulfofenil-3-fenilindona. (D) 4-cloro-7-nitrobenzo -1,2,5-oxadiazol. (E) isitiocianato de fluoresceína. (F) isocianato de acridina. (G) p-dimetilaminocianoaldehido. (H) Piridoxal. (I) o-ftaldialdehido. (J) Fluorescamica.

Además de utilizarse para el análisis de compuestos fluorescentes, en muchas ocasiones, el detector de fluorescencia es utilizado para analizar compuestos que no la presentan, tras una derivatización conveniente de éstos. Así, solutos que no tienen fluorescencia natural se pueden unir a determinadas moléculas muy reactivas que presenten fluorescencia y convertirse a su vez en fluorescentes.

Las técnicas de derivatización fluorescente, ha sido utilizadas con éxito para realizar muchos tipos de análisis. Como reactivos para la derivatización, se pueden utilizar cloruro de dansilo, fluorescamina, etc, dependiendo de la naturaleza de los compuestos a analizar (figura 17).

El detector

En la figura 18, se presenta el esquema óptico de un detector típico de fluorescencia para cromatografía líquida. Los diversos detectores asequibles comercialmente, difieren fundamentalmente en la forma de controlar las longitudes de onda de excitación y emisión. Los instrumentos más baratos utilizan filtros, los de precio medio ejercen el control mediante monocromador de una de las longitudes de onda, generalmente la de excitación, y los instrumentos más completos, del tipo de los usados en investigación, ofrecen el control mediante monocromador de ambas longitudes de onda, tanto la de excitación como la de emisión.

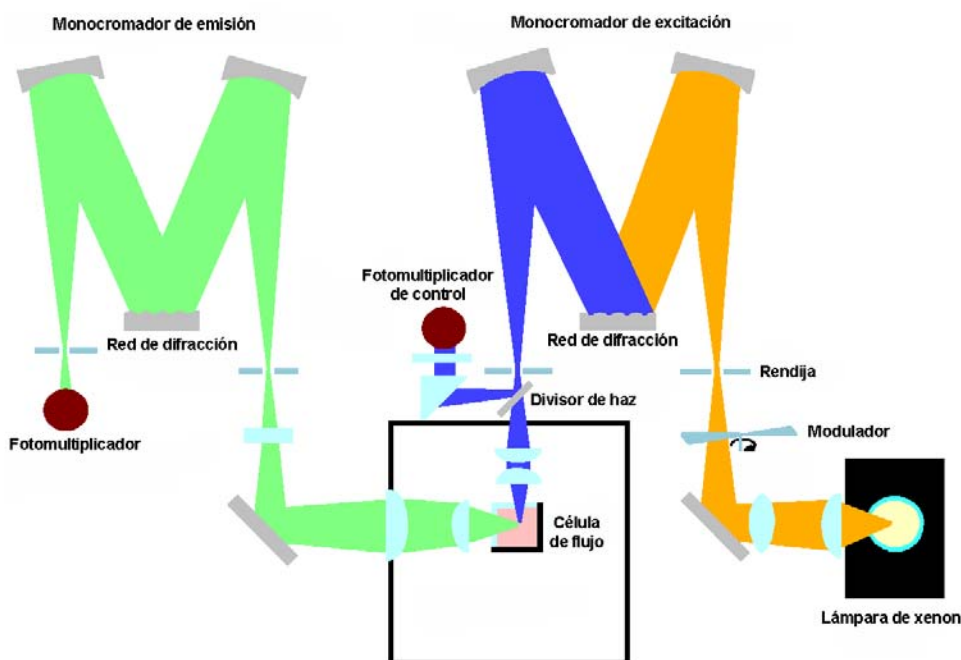


Figura 18.- Esquema de un detector de fluorescencia

Detectores electroquímicos.

Fundamentos

Este tipo de detectores, están basados en la oxidación del analito eluído mediante un electrodo adecuado, registrándose la intensidad de la corriente, mantenida mediante la electrolisis de los analitos, a lo largo del cromatograma. La detección en este caso está basada en el conocido polarógrafo de gota de mercurio; este instrumento consta de un par de electrodos a los que se aplica un potencial de oxidación (potencial de semionda) suficiente para crear una corriente de difusión. Puesto que la cantidad de corriente es una medida directa de la concentración de analito en un momento dado, el proceso es cuantitativo.

Para poder aplicar esta técnica a la detección en cromatografía líquida, se han desarrollado nuevos materiales para los electrodos y se han diseñado cubetas de electrolisis de escaso volumen y con geometrías muy eficaces. Como electrodos de medida, se utilizan los de pasta de carbón, carbón pulimentado y amalgama de oro y mercurio, normalmente con un contraelectrodo de plata-cloruro de plata. El esquema de la célula de un detector electroquímico se muestra en la figura 19.

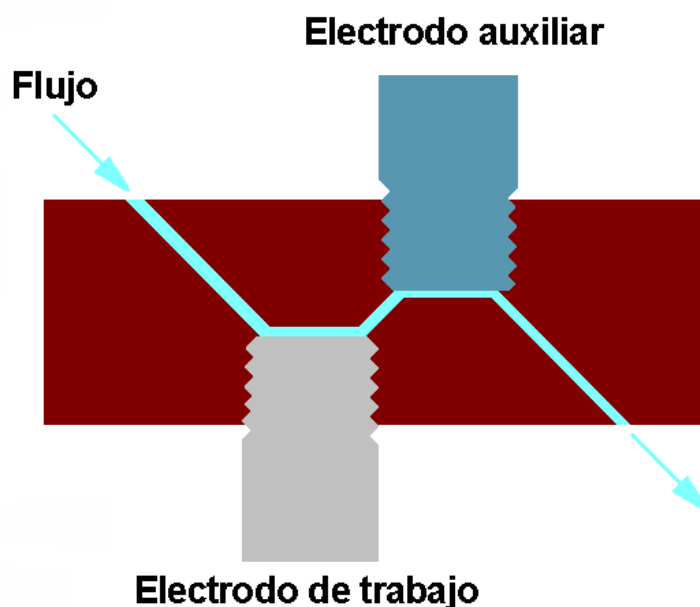


Figura 19.- Célula de flujo de un detector amperométrico

El campo de aplicación de la detección electroquímica no es tan extenso como el de la detección por índice de refracción, UV/VIS o fluorescencia, pero entre los compuestos a los que puede aplicarse se encuentran algunos de los compuestos de la mayor importancia. Para estos compuestos, su gran especificidad y su elevada sensibilidad (de 50 a 100 veces mayor que en los otros tipos de detectores) convierte a esta técnica de detección en un medio muy útil para el análisis de mezclas complejas, tales como los fluidos biológicos y los extractos de muestras naturales. La sensibilidad de estos detectores para compuestos tales como el fenol, las nitrosaminas y muchos ácidos orgánicos es del orden del picomol (nanogramo).

A pesar de sus ventajas, los detectores electroquímicos presentan también una serie de limitaciones; básicamente, estas son:

- La fase móvil debe ser conductora de la corriente eléctrica, lo cual normalmente se consigue por adición de una sal adecuada. Esto limita o impide la realización de muchas separaciones en fase normal, en las que se utiliza hexano u otras fases móviles apolares. Las cromatografías de intercambio iónico y de fase reversa, son dos buenos campos de aplicación para estos detectores. Sin embargo, no debe olvidarse que la adición de sales a la fase móvil puede provocar cambios en la cromatografía.
- La fase móvil debe ser purgada de oxígeno, contaminantes metálicos y haluros, para reducir la corriente de fondo y, por tanto, el ruido y la deriva de la línea de base.
- Los componentes de las muestras deben ser oxidables, a un valor de potencial que no dé lugar también a electrolisis en la fase móvil o en los restantes componentes de la muestra.

Detector de conductividad electrolítica

En los detectores de conductividad electrolítica se mide de manera continua la conductividad de la fase móvil que eluye de la columna, indicándose la presencia de un analito por medio de un cambio en la conductividad.

Para la utilización de esta técnica como sistema de detección cromatográfico, la célula de inmersión utilizada normalmente para medir conductividad, se substituye por una célula de

flujo de pequeño volumen, registrándose continuamente las variaciones en la conductividad de la fase móvil. La respuesta de los detectores conductimétricos es lineal frente a la concentración en un intervalo muy amplio, de manera que es posible cuantificar la señal de salida por medio de una correcta calibración preliminar. Los mejores resultados con este detector se obtienen en los análisis isocráticos, ya que los gradientes dan lugar a una deriva proporcional en la línea base. Un esquema de una célula de conductividad se encuentra en la figura 20.

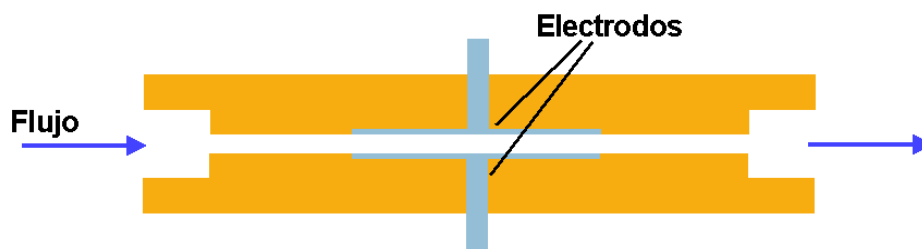


Figura 20.- Célula de flujo de un detector de conductividad

Uno de los inconvenientes de los detectores de conductividad electrolítica, es su inestabilidad debido a variaciones térmicas de la cubeta, por lo que son necesarios buenos sistemas de termostatación. Estos detectores se han utilizado con éxito en cromatografía de intercambio iónico.

LA COLUMNA

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad se nunca se obtendrán buenos resultados aunque se disponga del mejor instrumental.

Las partes de que se compone una columna de cromatografía líquida se muestran en la figura 21. Las columnas más utilizadas en cromatografía de líquidos son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo separación que se pretende llevar a cabo. El diámetro interno varía entre 2 y 60 mm dependiendo su utilización, a escala analítica o semipreparativa, y su longitud varía entre 5 y 30 cm.

También se encuentran hoy en día en el mercado columnas de pequeño diámetro (microbore), con diámetros comprendidos entre 2 y 0,5 mm y longitudes entre 25 y 100 cm. Este tipo de columnas permite reducir el consumo de disolventes y, por lo tanto, facilitan la posibilidad de acoplar la cromatografía líquida a otras técnicas analíticas (fundamentalmente espectrometría de masas). Por otro lado, se empieza a introducir la denominada cromatografía de líquidos capilar, en la que se utilizan como columnas tubos (de sílice fundida generalmente) de un diámetro interno muy pequeño (entre 200 y 500 μm) y de gran longitud (varios metros); en este tipo de columnas, la característica más importante es que la fase estacionaria se encuentra ligada químicamente a las paredes del tubo, por lo que se hace innecesaria la utilización de partículas de fase estacionaria como en los dos casos anteriores.

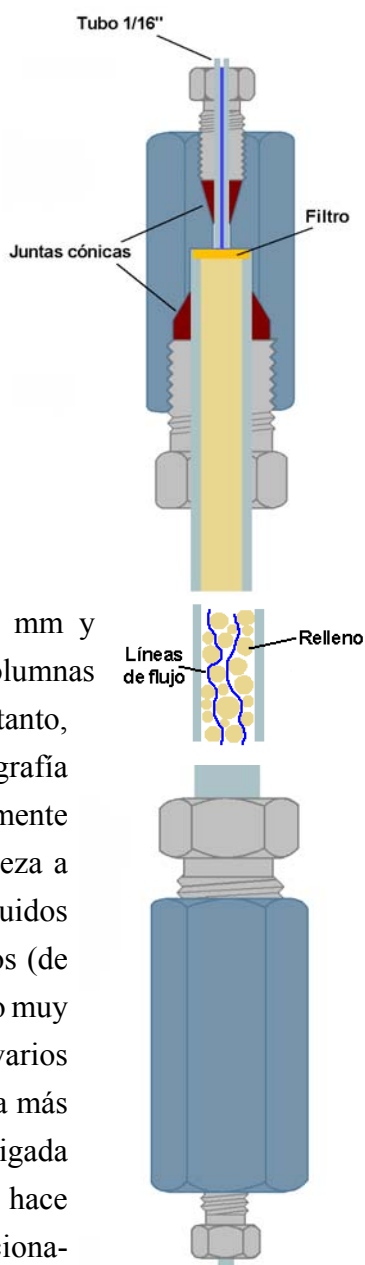


Figura 21.- Componentes de una columna de CLAE

Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son:

- Diámetro interno
- Longitud
- Conexiones (reducciones)
- Relleno
- Tamaño de partícula del relleno

Diámetro de la columna

La elección del diámetro interno de la columna se realiza en función de la cantidad de muestra a separar. Para las separaciones a escala analítica (algunos microgramos de muestra por inyección) se suelen usar columnas de pequeños diámetros (1 a 6 mm) mientras que en los trabajos a escala preparativa se superan los 10 mm de diámetro interno. Esta selección de diámetros se debe a la pérdida de eficacia, por sobrecarga de la columna, cuando se inyecta una masa excesiva de solutos a separar. Se ha comprobado empíricamente que en fase normal, la sobrecarga comienza a partir de 50 μg de muestra por gramo de relleno, mientras que en fase reversa es necesario sobrepasar los 100 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de relleno; parece lógico, por tanto, pensar que mayores diámetros de columna, manteniendo iguales los restantes parámetros, permitan separar mayores cantidades de muestra sin variación de la eficacia del sistema.

El inconveniente de las columnas de gran diámetro consiste en el elevado consumo de disolventes, puesto que se necesitan flujos elevados para conseguir la misma velocidad lineal de eluyente que en las de pequeño diámetro.

Las columnas analíticas de más amplio uso suelen tener 4,6 mm de diámetro interno.

Longitud de la columna

Como se puede comprobar en las ecuaciones que rigen los procesos cromatográficos, la eficacia de la columna depende, entre otros factores, de la longitud de la columna y, a igualdad de otros parámetros, mayores longitudes de la columna permitirán obtener mayores eficacias.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que, a mayor longitud de la columna, la presión en cabeza se eleva considerablemente, por lo que hay que alcanzar un compromiso, a la hora de

seleccionar la columna, entre eficacia y caída de presión.

Las columnas de cromatografía líquida en ningún caso pueden tener longitudes extremadamente grandes; se ha comprobado que para tamaños de partícula de 10 a 5 μm , resulta difícil conseguir empaquetar buenas columnas de longitud superior a 30 cm; para tamaños de partícula de 3 μm , la longitud de la columna no podrá ser superior a 20 cm sin riesgo de que la presión en cabeza de columna sea excesivamente elevada.

Conexiones

En los extremos de la columna se montan los sistemas de conexión para poderlas unir al detector y a los sistemas de inyección y bombeo de eluyentes. La conexión, en este caso, es realmente una unión reductora de compresión radial, que permite una perfecta unión del tubo de la columna con el capilar que la conecta a los restantes dispositivos del cromatógrafo. Estas uniones no deben presentar volumen muerto, deben permitir el paso de secciones anchas de tubo a capilares, y deben ser fácilmente montables y desmontables.

Por otra parte, y como cierre del tubo que contiene el relleno se colocan los llamados fritados, que son mallas con un tamaño de poro inferior al diámetro de la partícula de relleno; de esta forma, se deja pasar al eluyente evitando que el relleno se salga de la columna.

Relleno

Todas las separaciones cromatográficas tienen lugar sobre la fase estacionaria. Las fases estacionarias en cromatografía de líquidos, están constituidas generalmente por partículas de materiales rígidos o semirígidos, y en la gran mayoría de los rellenos se suele utilizar sílice con este fin, aunque también es posible encontrar rellenos basados en polímeros sintéticos.

En la mayoría de los rellenos de columnas de cromatografía líquida, la sílice utilizada realiza una de las tres funciones siguientes:

- Superficie adsorbente. En este caso los propios grupos activos de la superficie de la sílice (grupos silanol) son los responsables de la separación.
- Soporte de la fase estacionaria. Esta, o bien impregna la superficie de la sílice, o

bien se encuentra ligada químicamente a ella (sílice modificada químicamente).

- Actuación como substrato microporoso. En este caso, la sílice permite la selección de moléculas en función de su tamaño.

Los grandes avances técnicos en la preparación de sílices de estructura conocida, con modificaciones químicas en la superficie, con poros y formas controladas y con una buena granulometría, han permitido que este material, en multitud de formas de presentación, sea el relleno más utilizado en las columnas de cromatografía de líquidos. La sílice ha terminado por desplazar como relleno a los polímeros sintéticos que, debido principalmente a su gran inercia química y a la facilidad de modificar químicamente su superficie, estaban tomando un cierto auge en cromatografía líquida. En este sentido, la sílice se está introduciendo en campos de la cromatografía líquida en los que la base del relleno era por excelencia polimérica, como es los casos de la cromatografía de exclusión molecular y la cromatografía de intercambio iónico.

Las propiedades de la sílice que propician su utilización como soporte se pueden resumir en:

- Gran resistencia mecánica. Lo que permite a las columnas empaquetadas con sílice resistir mayores presiones de trabajo. En general, los polímeros sintéticos no permiten trabajar a presiones por encima de los 18 Bar (1.800 psi).
- Amplia gama de formas, tamaños y diámetros de poro, lo que permite conseguir una gran variedad de estructuras. En la actualidad, es posible preparar una sílice prácticamente a conveniencia; así, es posible encontrar sílices esféricas, irregulares o poligonales, lo que puede tener gran importancia en el empaquetado de la columna (presiones resultantes y permeabilidad del relleno al paso del eluyente) y en la posterior eficacia de ésta (Tabla IV).
- Gran variedad de sílices en cuanto a superficie específica. Este hecho, permite encontrar sílices de gran reactividad o de relativa inercia y, por lo tanto, es posible tener una amplia gama de capacidades de separación y de posibilidades de ligar químicamente moléculas a su superficie (Tabla IV).

Tabla IV.- Propiedades de algunos rellenos basados en sílice

Nombre comercial	Superficie específica.	φ poro	pH	Tipo de partícula
Hypersil	170 m ² /g	11,5 nm	9,0	esférica
LiChrosorb	100 -320 m ² /g	11,1 nm	7.0	irregular
Porasil	350 m ² /g	10.0 nm	7.2	irregular
Spherisorb	190 m ² /g	8,1 nm	9.5	esférica
Zorbax BPSil	300 m ² /g	5,6 nm	3.9	esférica
Pecosphere	300 m ² /g	8 nm	-	esférica

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula juega un papel importantísimo en la calidad y eficacia de la columna. Como se puede ver en la ecuación de Van Deemter, la altura equivalente de plato teórico es función del diámetro de la partícula de relleno:

$$H = \frac{2 \gamma D_m}{u} + a u^{1/3} + (C_m + C_e) \frac{d_p^2 u}{D_m}$$

Donde d_p es el diámetro de las partículas y u la velocidad lineal de la fase móvil.

De la ecuación anterior se desprende la importancia del diámetro de partícula, ya que a diámetros menores se obtendrá una menor altura equivalente de plato teórico y, por lo tanto, una mayor eficacia del sistema.

Las partículas utilizadas inicialmente para rellenos en cromatografía líquida, eran bastante grandes (de más de 40 μm) y totalmente porosas. Este tipo de partículas presentan una gran superficie específica y, por lo tanto, las columnas preparadas con ellas presentan una gran capacidad de carga (admiten gran cantidad de muestra) pero, como contrapartida, dan lugar a un gran ensanchamiento de la banda cromatográfica ya que influyen significativamente sobre los términos de transferencia de masa de la ecuación de Van Deemter (figura 22).

Como solución parcial a este problema, se comenzaron a utilizar los recubrimientos de

estas partículas por capas de fase estacionaria (adsorbente o intercambiadora de iones). Este tipo de rellenos (rellenos peliculares) dan lugar a picos más estrechos (figura 22), aunque no son la solución óptima.

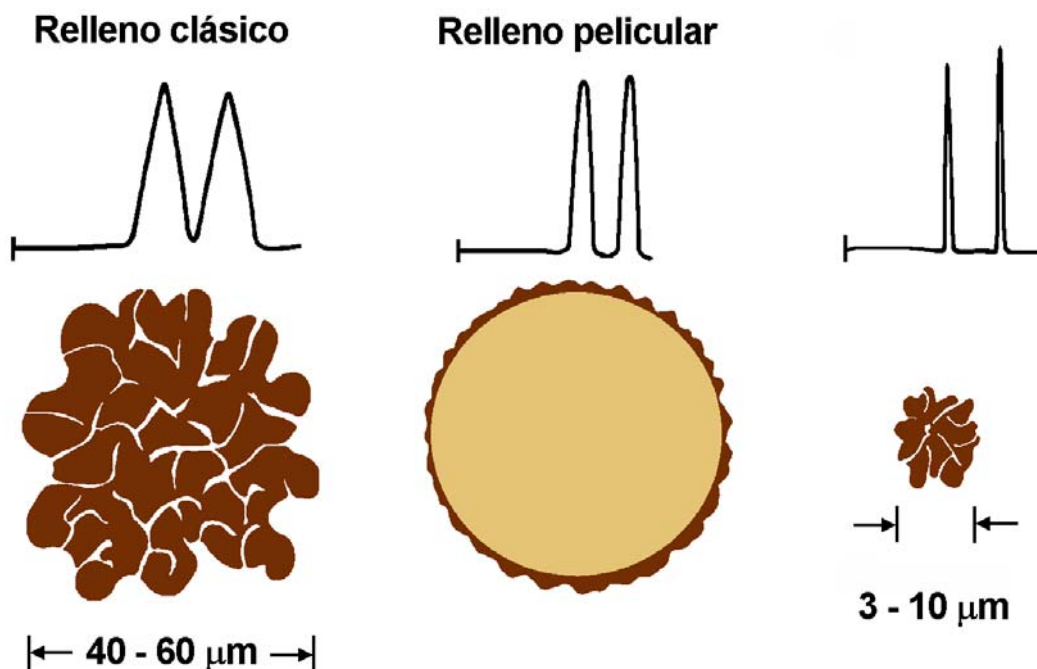


Figura 22.- Influencia del tamaño de partícula sobre la resolución

Los mayores avances se han realizado al reducir los tamaños de las partículas del relleno a unos niveles en los que se consiguen grandes incrementos en la eficacia de la columna sin que por ello se tengan unas presiones tan excesivamente elevadas en cabeza de columna que hagan inviable el análisis (figura 22).

En la actualidad, los tamaños de partícula habituales se encuentran comprendidos entre 10 y $3 \mu\text{m}$ de diámetro, aunque en la gran mayoría de los casos, los análisis se están realizando con rellenos de 10 ó $5 \mu\text{m}$.

En la figura 23, se pone de manifiesto cómo el tamaño de las partículas utilizadas para el relleno aplana la curva de AEPT; se puede observar que un tamaño de partícula de $3 \mu\text{m}$ permite menores alturas equivalentes de plato teórico, incluso a velocidades elevadas de fase móvil (ecuación de Knox), permitiendo este tipo de partículas lograr separaciones muy buenas junto con tiempos de análisis reducidos.

Un último detalle, aunque de gran importancia, es que cuanto menor sea el tamaño de partícula, la presión en cabeza de columna se incrementa de forma proporcionalmente inversa al cuadrado del tamaño de la partícula. Por este motivo, es fácil comprender el porqué no se encuentran en el mercado rellenos con un tamaño de partícula de menos de 3 μm .

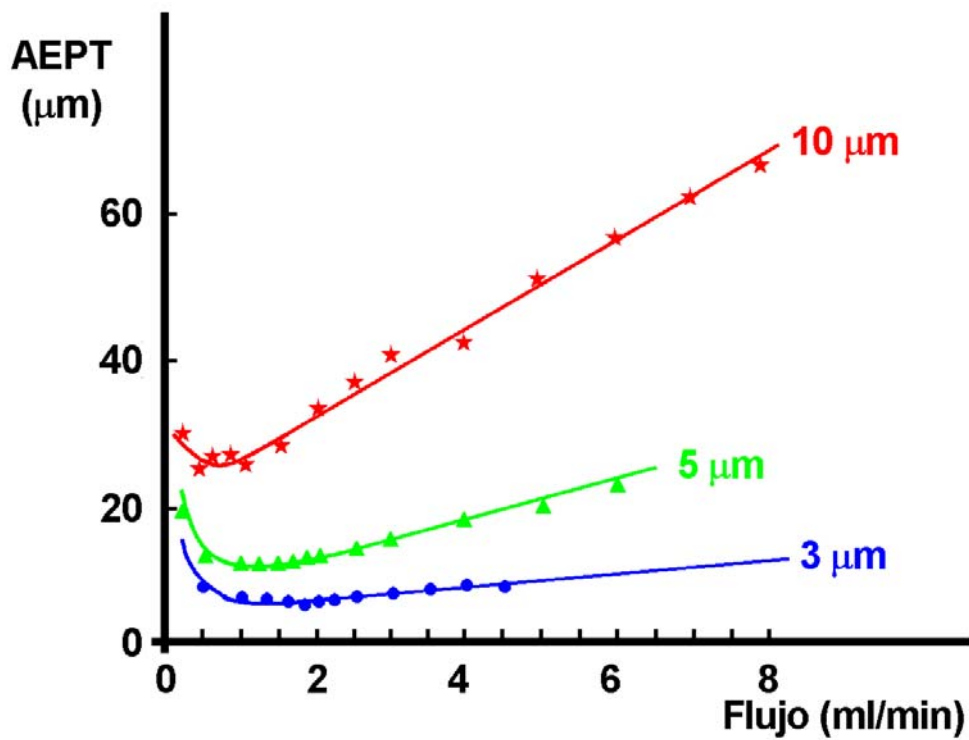


Figura 23.- Influencia del diámetro de partícula sobre la AEPT

ELECCIÓN DE LA COLUMNA Y DE LA FASE MÓVIL

La elección del sistema cromatográfico debe realizarse en función de la naturaleza de las sustancias a separar.

El conocimiento de la naturaleza de la sustancia va a permitir, *a priori*, orientar al cromatografista sobre qué mecanismo de separación puede ser el más apropiado o, dicho de otro modo, cuál es la propiedad para la que existen diferencias más notables entre las sustancias a separar (tamaño, carga, polaridad, etc.), lo que dará una idea de la fase estacionaria que puede ser apropiada (Figura 24).

Es necesario, por lo tanto, conocer los mecanismos de separación más generales utilizados en cromatografía de líquidos. Básicamente éstos se pueden dividir en:

- Adsorción. Cromatografía líquido-sólido (CLS).

- Adsorción/reparto. Cromatografía con fases ligadas (CFL).
Cromatografía de fase normal (CFL).
Cromatografía de fase reversa (CFR).

- Intercambio iónico. Cromatografía de intercambio iónico (CII).
Cromatografía de cambio catiónico.
Cromatografía de cambio aniónico.

- Tamaño molecular. Cromatografía de exclusión molecular (CEM).
Cromatografía de filtración en gel (CFG).

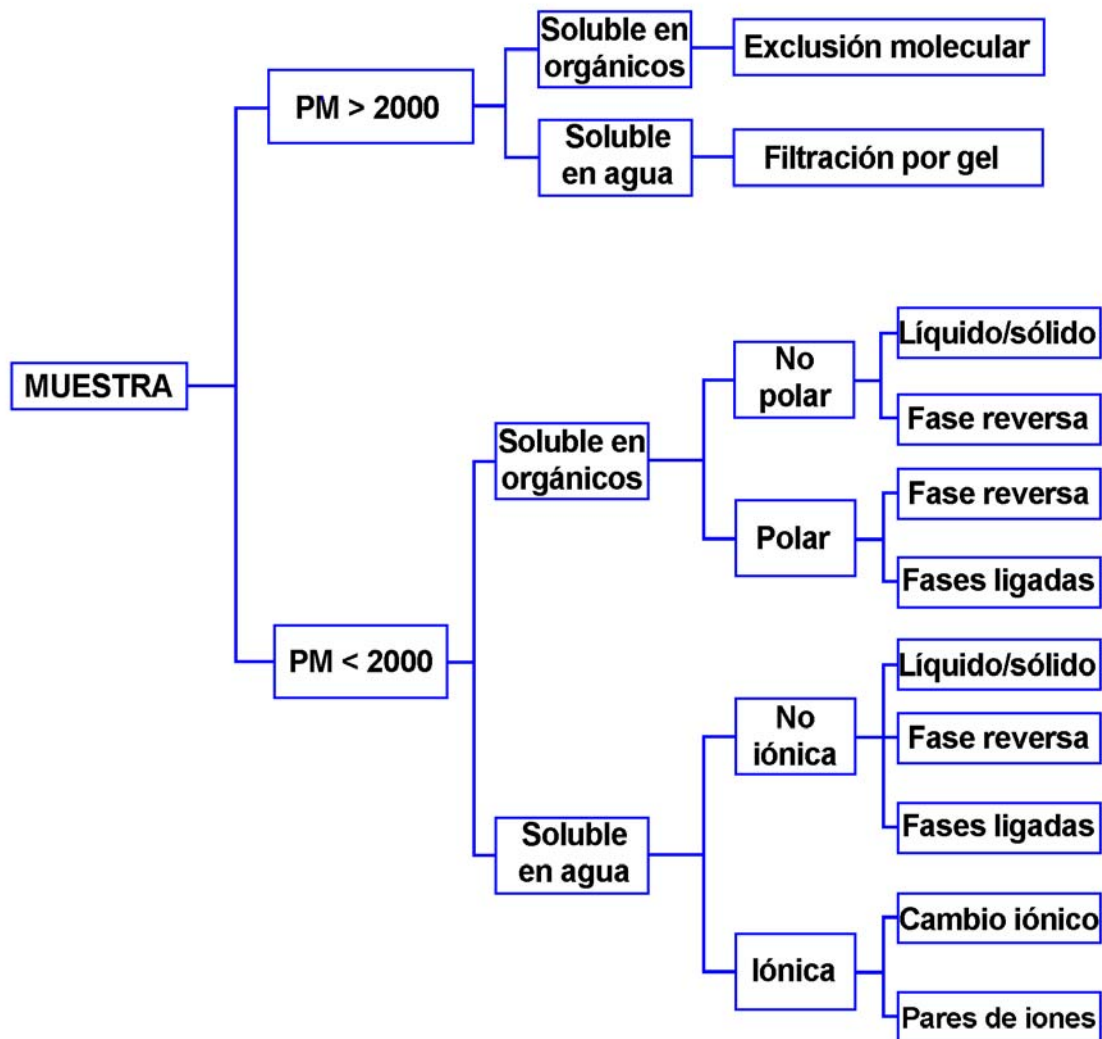


Figura 24.- Selección del sistema cromatográfico en función del tipo de muestra

Cromatografía de adsorción

Fundamentalmente, se tiene este mecanismo de separación cuando la fase estacionaria es un sólido, con una superficie que contiene grupos funcionales cuyas características les permiten interaccionar con los compuestos a separar y con la fase móvil. La cromatografía sólido-líquido se fundamenta en este mecanismo y los sólidos utilizados habitualmente como fase estacionaria son alúmina o sílice. Este tipo de cromatografía es el más antiguo de todos (es el usado por Tswett en 1903).

La teoría más aceptada por los cromatografistas para explicar las interacciones que se

producen en cromatografía de adsorción, es la denominada mecanismo de desplazamiento, que permite comprender el comportamiento de los diferentes sistemas de cromatografía de adsorción.

Esta teoría, propone la existencia de una competencia, entre soluto y fase móvil, por los puntos activos de la superficie de la fase estacionaria. Así, cuando el eluyente puro pasa a través de la columna, se llega a un equilibrio en el que moléculas de la fase móvil quedan adsorbidas sobre la superficie del sólido formando una monocapa que es llamada fase adsorbida. Cuando el soluto es introducido en la columna, éste compite por los puntos activos de la superficie de la fase estacionaria ocupados por la monocapa de fase móvil, llegándose a nuevos equilibrios de adsorción-desorción entre fase móvil, fase estacionaria y soluto (figura 25); en estos equilibrios influyen:

- Cantidad de puntos activos sobre la superficie de la fase estacionaria.
- La fuerza electrostática (ϵ°) de la fase móvil (fuerza de adsorción del eluyente sobre la fase móvil).
- Relación de fases. Fase móvil adsorbida/ fase móvil sin adsorber.
- El soluto.

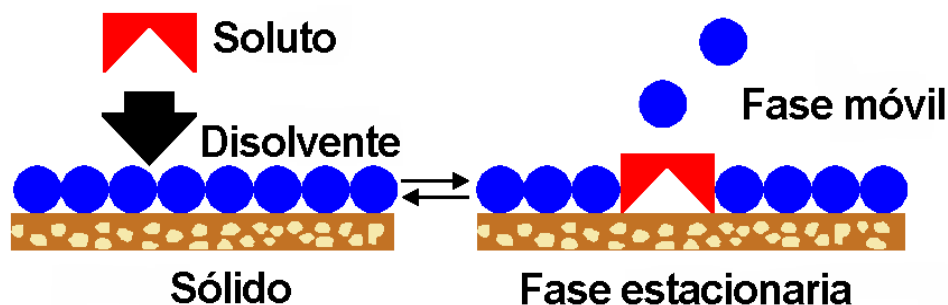


Figura 25.- Mecanismo de desplazamiento en cromatografía sólido/líquido

Por lo tanto, se puede intuir el comportamiento del soluto en la columna teniendo en cuenta los factores anteriormente indicados, y se puede estudiar la forma en que los distintos componentes del sistema cromatográfico influyen en la separación.

La fase estacionaria

Las fases estacionarias más utilizadas en cromatografía de adsorción son la sílice y la

alúmina, cuya principal característica común reside en la elevada actividad superficial. Los parámetros que permiten orientar sobre la actividad de estas fases estacionarias son:

- . La superficie específica
- . El tamaño de poro de la partícula

Ambos datos dan una orientación de cuantos puntos activos existen en la superficie del relleno y sobre si estos puntos activos están al alcance de las moléculas de soluto (una superficie específica alta con un tamaño de poro pequeño da lugar a que gran parte de los puntos activos se encuentren en zonas del poro inaccesibles para el soluto).

También es importante tener en cuenta el estado en que se encuentran los puntos activos de la superficie del adsorbente, ya que pueden estar desactivados por la presencia de moléculas que se adsorban fuertemente sobre ellos. Así, por ejemplo, la presencia de moléculas de agua en la fase móvil conduce a una desactivación de la superficie de la fase estacionaria (el agua es un compuesto de alta polaridad que se adsorberá fuertemente sobre la superficie, evitando la adsorción de los solutos, por lo que éstos no se retendrán). En algunos casos, la desactivación parcial y controlada del adsorbente puede ser de utilidad para algún tipo concreto de análisis.

La fase móvil

La fase móvil juega un papel principal en la cromatografía líquida, ya que es la variable del sistema que permite mayor variación y que, por otra parte, permite efectuar los pequeños retoques necesarios para lograr una perfecta separación.

En cromatografía de adsorción, se utilizan como fase móvil disolventes orgánicos de polaridad baja o media (la polaridad está en relación directa con la fuerza eluotrópica ϵ^0), pudiéndose utilizar un rango muy variado de fuerza eluotrópica, bien por cambios de disolvente, bien por mezclas de dos o más disolventes de diferentes polaridades.

La selección de la fase móvil en cromatografía líquida de adsorción se efectúa convenientemente con la ayuda de la llamada escala de Hildebrand, que clasifica a los diferentes disolventes utilizados como fase móvil de acuerdo con la fuerza eluotrópica (ϵ^0), que indica su fuerza como eluyente con relación al pentano, al que se le asigna convencionalmente el valor cero.

Los eluyentes generalmente utilizados son: n-hexano, iso-octano, acetonitrilo, metanol, cloruro de butilo, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano y 2-propanol. Los tres primeros disolventes, pueden obtenerse muy puros y con una gran transparencia frente a la radiación ultravioleta de bajas longitud de onda, lo que los hace muy aptos para su utilización con el detector de U.V., ampliamente utilizado en cromatografía líquida.

Es muy frecuente la utilización como eluyente de mezclas de dos o más disolventes de diferente polaridad. En general, al disolvente de mayor polaridad se le denomina modificador, y suele ir en pequeñas proporciones. De este modo se puede conseguir una amplia gama de polaridades (fuerzas eluotrópicas) y, por lo tanto, aumentar la selectividad del sistema cromatográfico. Una regla general para elegir el disolvente a utilizar como fase móvil, es que la variación de 0.05 unidades de ϵ^0 hace variar el factor de capacidad (k') en 2 - 4 unidades. En la figura 26, se recogen las equivalencias en fuerza eluotrópica de mezclas de disolventes de uso frecuente.

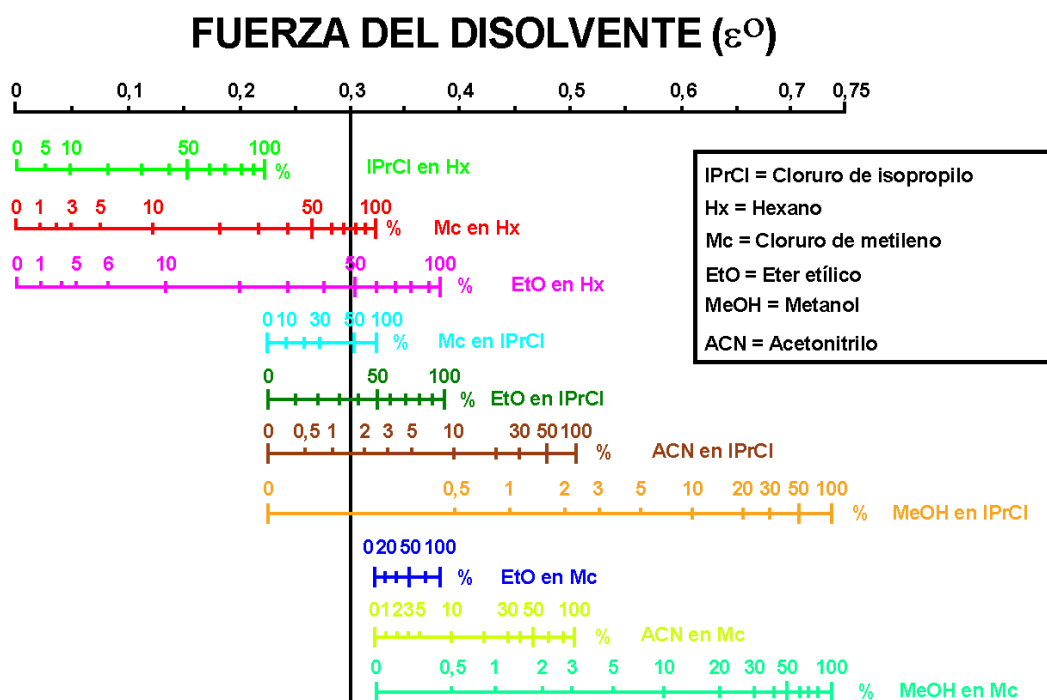


Figura 26. Fuerza eluotrópica (ϵ^0) de varias mezclas de dos disolventes

Cromatografía con fases ligadas

Desde que en 1970 Kirkland y De Stefano consiguieron unir una molécula orgánica sobre la superficie del relleno cromatográfico, para dar lugar a lo que se conoce con el nombre de fases ligadas químicamente, la cromatografía de líquidos ha experimentado un gran desarrollo. Actualmente se estima que, de las separaciones que se llevan a cabo por cromatografía líquida, entre el 80 y el 90 % se efectúan por medio de una columna con fase unida químicamente.

Estas fases ligadas químicamente han dado origen a dos modos de separación:

- . Cromatografía en fase inversa .
- . Cromatografía en fase normal.

El mecanismo de separación, mas admitido, para el caso de la cromatografía de fase normal, vuelve a ser la adsorción del soluto sobre la fase estacionaria. La adsorción tiene lugar por interacción del soluto con el grupo funcional de la molécula orgánica ligada al soporte, siendo el comportamiento del soluto en estas fases, del todo semejante al que muestra en la cromatografía sólido-líquido, es decir, el aumento de polaridad de la fase móvil implica un descenso en la retención del soluto.

Las consideraciones expuestas para las fases de cromatografía sólido-líquido, son válidas en este caso, con la excepción de que los grupos activos de la fase estacionaria (grupos silanol en la sílice), en este caso se encuentran como parte de una molécula orgánica ligada al relleno, y son de naturaleza más variada (Tabla V).

Tabla V.- Grupos funcionales de las fases químicamente ligadas

TIPO	GRUPO FUNCIONAL	ESTRUCTURA DEL GRUPO FUNCIONAL
FASE NORMAL	AMINO	-NH ₂
	CIANO	-CN
	DIOL	Si-O-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ OH
FASE REVERSA	DIMETILSILILO	Si(CH ₃) ₂
	OCTILSILILO	Si-CH ₂ -(CH ₂) ₆ -CH ₃
	OCTADECILSILILO	Si-CH ₂ -(CH ₂) ₁₆ -CH ₃
	FENILSILILO	Si-C ₆ H ₄ -OH

El mecanismo por el que se produce la retención en la cromatografía de fase inversa se puede explicar de dos formas:

- Reparto entre dos fases líquidas.
- Adsorción del soluto a la fase estacionaria.

En el primero de ellos, se considera que la molécula orgánica ligada al relleno se comporta como un líquido o cuasi-líquido, y el soluto experimentará un reparto entre la fase móvil y la estacionaria atendiendo exclusivamente a la polaridad de las fases en juego.

Este mecanismo es sólo admisible para aquellos casos en los que la molécula ligada al relleno sea lo suficientemente grande y se elimine cualquier punto de la superficie que pueda ser activo para un fenómeno de adsorción, bien porque el contenido de agua en la fase móvil sea elevado y desactive el soporte (normalmente sílice), o bien porque el soporte sea de tipo polimérico e inerte.

El mecanismo de adsorción puede explicar la retención del soluto en otras ocasiones, basándose en la fijación del soluto sobre las moléculas orgánicas ancladas en la superficie del soporte. Este mecanismo sería similar al explicado para el caso de la cromatografía líquido-sólido, pero ambos se diferencian en el tipo de interacción que da origen a la adsorción, que para la cromatografía de fase inversa serán interacciones no específicas (tipo solvófobo), y para la cromatografía sólido-líquido y de fase normal son interacciones específicas.

Se puede resumir este mecanismo diciendo que el soluto es expulsado de la fase móvil contra la fase estacionaria, y es en esta situación cuando se forma el complejo soluto-fase estacionaria, de cuya estabilidad depende la retención del soluto en la columna. Por otro lado, también han de considerarse los fenómenos de adsorción del soluto sobre las moléculas de la fase estacionaria ligadas químicamente; estas interacciones, de tipo débil, entre la fase estacionaria y el soluto serían las causantes de la retención del soluto, y la fase móvil jugaría el papel de regulador de las interacciones al enviar al soluto contra las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, repeliéndolo de la fase móvil debido a su hidrofobicidad.

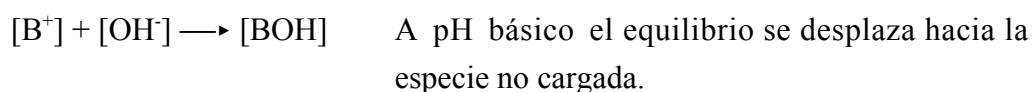
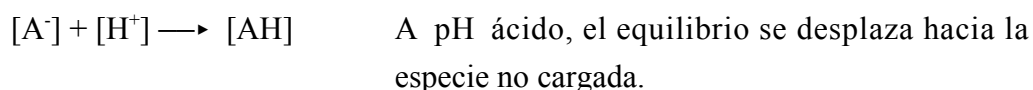
No se puede olvidar tampoco, la posible presencia de interacciones específicas entre soluto y relleno, que pueden influir en la retención, y que son debidas a que, en general, el soporte utilizado para ligar las moléculas de fase estacionaria es sílice y la fase ligada no cubre la totalidad de puntos activos de ésta. Estas interacciones pueden ser controladas por los modificadores orgánicos incluidos en la fase móvil o bien utilizando soportes de elevada inercia

química (rellenos poliméricos) para la fase estacionaria.

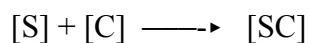
Ambos mecanismos, de manera conjunta, pueden explicar el porqué de la separación en este tipo de cromatografía, de tal manera que la polaridad del soluto frente a la de las fases estacionaria y móvil condiciona que los compuestos con polaridad semejante a la de la fase estacionaria presenten mayor retención, necesitando de fases móviles de mayor fuerza de elución (polaridad más semejante a la del soluto) para reducir el tiempo de retención y lograr que el compuesto salga de la columna.

En la cromatografía en fase inversa es habitual que la fase móvil tenga un elevado contenido en agua, lo que da lugar a que compuestos cargados se disuelvan perfectamente en ella y no sean repelidos hacia la fase estacionaria (como dice la teoría del mecanismo de adsorción) con lo que no se producirá interacción ni, consecuentemente, retención. En estos casos, es necesario anular la carga del soluto mediante la presencia de un modificador incluido en la fase móvil. La anulación de la carga se puede efectuar de tres maneras, lo que da origen a otros tantos tipos de cromatografía de fase inversa:

- Por acción del pH de la fase móvil. Aquellos solutos que presentan carga (ácidos, bases) dependiendo del pH de la disolución, pueden ser retenidos en su forma no cargada, siempre que se desplace el equilibrio ácido/base en el sentido de la forma no cargada mediante el pH de la fase móvil. Esta técnica recibe el nombre de cromatografía de supresión iónica:



- Por adición de agentes acomplejantes a la fase móvil. Cuando el soluto presenta carga, pero puede formar un complejo estable no cargado con alguna sustancia añadida a la fase móvil, se consigue una molécula que se puede retener en la fase estacionaria. Esta técnica recibe el nombre de cromatografía de ligando o de complejo.



- Por la adición a la fase móvil de un contraion capaz de formar un par iónico con el soluto. La carga que presenta el soluto es compensada por un contraion, manteniéndose un equilibrio químico entre las diferentes especies que dependerá de las concentraciones del soluto y del contraion en la fase móvil (figura 27). El mecanismo de retención es el mismo que para el resto de las cromatografías de fase inversa, solo que en este caso, también hay que tener en cuenta la concentración del contraion añadido en la fase móvil, ya que esta concentración es la responsable de mantener el equilibrio desplazado en el sentido del complejo sin carga (figura 27). Las condiciones que debe cumplir el contraion incluido en la fase móvil, deben ser las siguientes:
 - El contraion debe poseer un valor extremo de pK, con el objeto de presentar siempre carga.
 - No son necesarias concentraciones de contraion muy elevadas (generalmente con 0,003 a 0,005 M es suficiente), pero si suficientes para desplazar el equilibrio.
 - Debe ser univalente y aprótico.
 - Debe ser soluble en la fase orgánica.
 - No debe formar agregados o producir equilibrios secundarios.
 - No debe interferir con el sistema de detección.
 - Debe ser compatible químicamente con la fase estacionaria, con la fase móvil y con el soporte de la fase estacionaria (sílice).

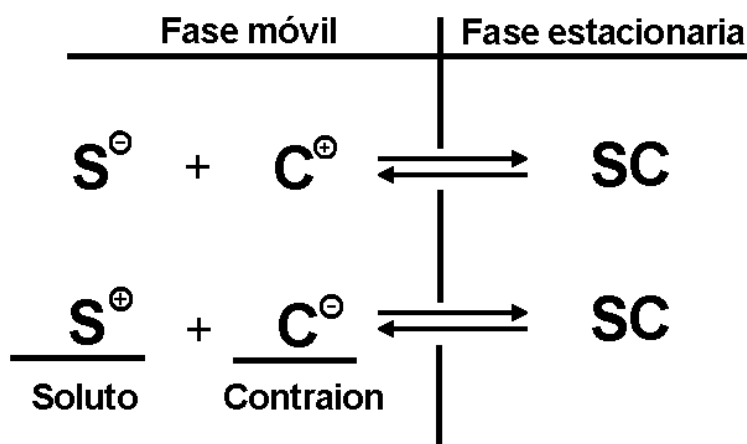


Figura 27.- Mecanismo de la cromatografía de pares de iones

Esta técnica se denomina cromatografía de pares de iones y su utilización está muy extendida.

La fase estacionaria

Como en el caso de la cromatografía líquido-sólido, la naturaleza de la fase estacionaria influye en la selectividad del sistema cromatográfico. En la cromatografía de fases ligadas, la polaridad de la fase estacionaria puede ser seleccionada entre una mayor variedad, atendiendo al grupo funcional que se liga químicamente al soporte (Tabla V), cadenas cortas (C-8), cadenas largas (C-18) u otros grupos funcionales.

Si bien es cierto que con las fases ligadas se dispone de más versatilidad en la elección de fases estacionarias, las más habitualmente utilizadas son:

- Cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos para fase inversa.
- Cadenas con extremos amino para fase normal.

Al igual que en cromatografía sólido-líquido, la cantidad de grupos activos y la distribución de éstos sobre la superficie del soporte condicionan la calidad de la fase estacionaria. Para las fases ligadas, existen varios parámetros indicativos de la cantidad de grupos activos: la concentración superficial, el grado de conversión de silanoles y el porcentaje de carbono total relativo a la superficie específica. En todos los casos no son valores que permitan comparar fases estacionarias aparentemente iguales, pero son un indicativo de la actividad de la fase estacionaria.

No hay que olvidar que el soporte de la fase estacionaria juega un importante papel, no sólo por sus características de superficie y porosidad, que influyen en la cantidad de fase ligada, sino también porque, como ya se ha mencionado, puede presentar puntos activos de adsorción específica que pueden modificar los resultados de retención esperados para el sistema cromatográfico; este hecho es lógico, pues la mayor parte de los soportes para cromatografía de líquidos están basados en la sílice que, si bien tiene la ventaja de presentar una gran resistencia mecánica, no es un soporte inerte

La fase móvil

La fase móvil para cromatografía de fase normal recibe las mismas consideraciones que

en el caso de cromatografía sólido-líquido, utilizándose por regla general disolventes de polaridad baja (n-hexano por lo general); también en este caso se suelen utilizar modificadores para ampliar los rangos de polaridad (alcoholes, cloruro de metileno, etc).

Es necesario hacer una puntualización en este caso; debido a que algunas de las fases estacionarias utilizadas en este tipo de cromatografía pueden ser químicamente activas, debe cuidarse la compatibilidad química de la fase estacionaria con las fases móviles utilizadas y con las muestras a separar. Así, por ejemplo, cuando se utilizan columnas con fase amino ligada, es necesario extremar las precauciones para evitar la posible presencia de cetonas y/o aldehídos, que pueden reaccionar con los grupos amino dando bases de Schiff, siendo muy importante en este caso la pureza de los disolventes a utilizar, que deben estar libres de compuestos que presenten grupos carbonilo.

En cromatografía de fase inversa la fase móvil vuelve a jugar un papel importante, por ser la variable que más influye en la selectividad. En cromatografía de fase reversa, la fase móvil contiene, en la mayoría de los casos, grandes proporciones de agua, que es sin duda el eluyente principal, junto con un modificador orgánico que completa la composición del eluyente. Como ya se ha mencionado, la presencia de agua permite la variación del pH de la fase móvil o la adición de otras sustancias que permiten modificar al soluto para realizar una separación concreta.

El agua es el disolvente menos fuerte para la elución de solutos en cromatografía de fase reversa, dando origen a tiempos de retención muy elevados; por este motivo, se tiene la necesidad de utilizar modificadores orgánicos (los más usados son metanol y acetonitrilo) que deben de cumplir las siguientes condiciones:

- a) Ser compatible con el detector utilizado.
- b) Ser miscible con el agua en un amplio margen de proporciones.
- c) No reaccionar ni con la fase estacionaria ni con la muestra a separar.
- d) Ser poco tóxico.
- e) Sus vapores no deben producir mezclas inflamables con el aire.
- f) No deben impedir la detección de los solutos. El caso más frecuente de interferencia se presenta cuando se utiliza un detector de UV, en el que muchos disolventes presentan una absorción excesiva a longitudes de onda bajas (longitud de onda de corte).

Otro aspecto importante a considerar en las fases móviles, es la viscosidad de las mezclas agua/modificador orgánico que, en caso de ser demasiado alta, puede dar lugar a problemas de presión elevada en cabeza de columna así como a ensanchamiento de los picos.

Otra de las características de la cromatografía de fase inversa, es la rapidez con la que se alcanzan los equilibrios en el sistema cromatográfico, lo que permite obtener resultados muy reproducibles cuando se trabaja con gradientes de polaridad de la fase móvil. La utilización de gradientes de polaridad, permite realizar separaciones muy complejas, siempre y cuando el instrumental permita la realización de los gradientes con una gran precisión y reproducibilidad.

Cromatografía de intercambio iónico

Todos aquellos compuestos que presentan un grupo funcional cargado eléctricamente, en disolución acuosa, pueden ser separados atendiendo al signo y la carga neta que presentan. Esta propiedad es aprovechada para realizar separaciones mediante la técnica de cromatografía que se conoce con el nombre de intercambio iónico.

Básicamente, en este tipo de cromatografía, se utiliza una fase estacionaria que presenta como grupos activos, permanentemente unidos a la superficie de la partícula mediante enlace químico, cargas de signo contrario a las de los solutos a separar. Estas cargas son compensadas por contraiones presentes en la fase móvil.

Los solutos serán retenidos por las cargas de la fase estacionaria en función de su propia carga eléctrica y de la competencia por los puntos activos de la fase estacionaria por parte de los otros contraiones presentes en la fase móvil. Básicamente, son dos los equilibrios que intervienen en el mecanismo de retención en cromatografía iónica (figura 28).

Cuando en el anterior sistema en equilibrio se introduce un soluto con carga afín a la de los puntos activos de la fase estacionaria, el soluto tenderá a retenerse en la fase, creándose un nuevo equilibrio entre soluto, contraion y fase estacionaria. La conservación de la neutralidad de cargas exige que el número de contraiones desplazados y el de iones desplazantes (solute) sea estequiométricamente equivalente, por lo tanto, un soluto fuertemente cargado que compite con las cargas débiles de la fase móvil quedará fuertemente adherido a la fase estacionaria, sin que los iones débiles del eluyente puedan desplazarlo. Por el contrario, una fase móvil que contenga unos contraiones de gran fuerza, no permitirán a un soluto débil interactuar con la fase estacionaria, por lo que éste eluirá rápidamente.

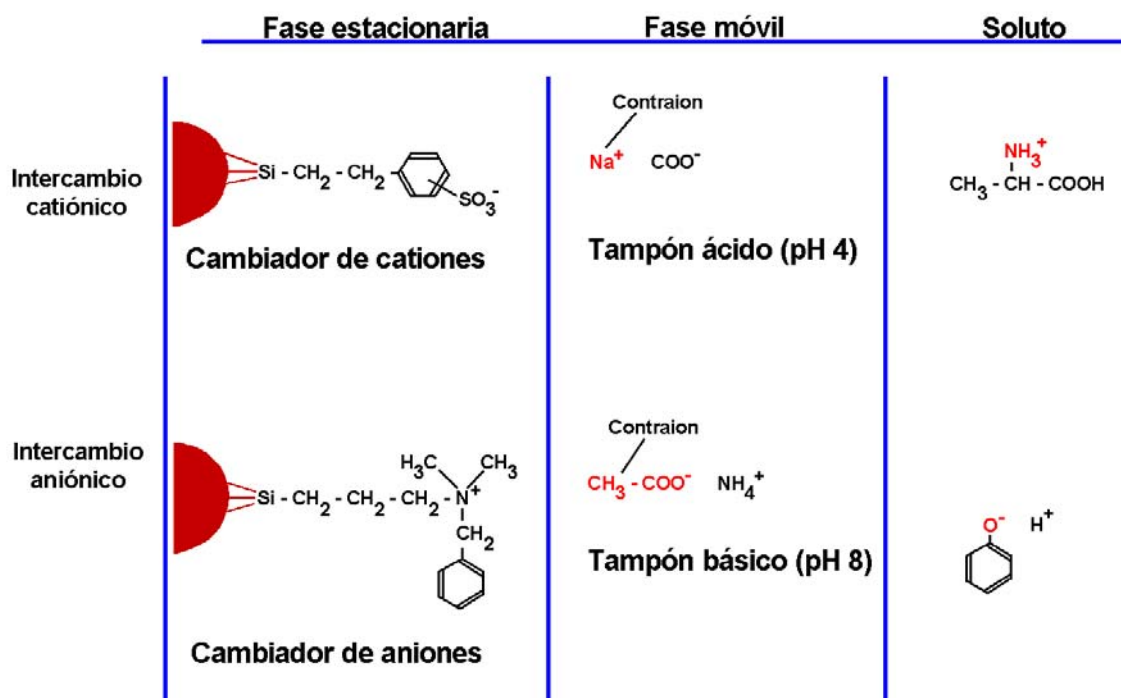


Figura 28.- Especies en equilibrio en cromatografía de intercambio iónico (fase estacionaria, fase móvil y soluto)

Los equilibrios pueden ser desplazados también en función de la concentración de contraion de la fase móvil (fuerza iónica del eluyente) y de la carga que presente el soluto según el pH del eluyente.

La fase estacionaria

Las fases estacionarias para intercambio iónico pueden clasificarse, según la carga del grupo funcional, en intercambiadoras de aniones o de cationes. Los rellenos más habitualmente usados en cromatografía iónica están constituidos por copolímeros de estireno/divinilbenceno sobre los que se ligan los grupos funcionales cambiadores. También se encuentran con cierta frecuencia otros copolímeros como base de las fases de cambio iónico (polimetacrilato y poliácrilato con divinilbenceno), pero en la actualidad están tomando mucho auge los cambiadores de iones basados en soportes rígidos, como es el caso de las sílices de estructura controlada sobre las que se ligan los grupos funcionales necesarios para el intercambio de iones; el mayor inconveniente que presenta la sílice como soporte, es su inestabilidad a valores de pH extremos (en especial los básicos), lo que obliga a trabajar en un rango estrecho de pH, por

contra, la sílice ofrece una gran resistencia mecánica, una alta uniformidad en los tamaños de partículas y la posibilidad de utilizar partículas mas pequeñas, lo que la hace más apta para el trabajo en cromatografía de alta eficacia.

Los intercambiadores de cationes contienen grupos de ácido sulfónico (cambiadores de cationes fuertes) o bien de ácido carboxílico (cambiadores de cationes débiles), en tanto que los cambiadores de aniones contienen grupos amonio cuaternario (cambiadores fuertes) o grupos amino (cambiadores débiles).

Tabla VI.- Propiedades de soportes para cambiadores iónicos

CARACTERÍSTICA	RESINA BASE POLIMERICA	SÍLICE DE INTERCAMBIO IÓNICO
d_p (µm)	7 - 12	5 - 12
Forma	esférica	esférica-irregular
Capacidad de carga (meq g⁻¹)	3 - 5	0,5 - 2
eficacia	buena	excelente
Pérdida de carga	muy grande	grande
Resistencia mecánica	pequeña	excelente
Acceso de moléculas grandes a los grupos funcionales	difícil	fácil
Rango de Ph	0 - 14	2 - 9
Velocidad de recuperación	lenta	moderada

La fase móvil

De nuevo la fase móvil juega el papel principal en la retención del soluto ya que, en este caso, permite controlar los equilibrios entre soluto, contraion y fase estacionaria. La fase móvil debe contener los contraiones apropiados para la resina utilizada, existiendo tres variables que afectan a la retención de un soluto iónico sobre la fase estacionaria:

- La fuerza iónica.
- El pH.
- El modificador orgánico.

La fuerza iónica está relacionada con la concentración y la carga de los iones disueltos en el eluyente. Esta concentración de iones va a influir en el delicado equilibrio entre los puntos activos del intercambiador y el soluto, permitiendo que éste sea atraído y desplazado, alternativamente, por las cargas de la fase estacionaria, durante su recorrido a lo largo de la columna.

Si la concentración de los iones en la fase móvil es demasiado elevada, los iones de la muestra no encontrarán ningún punto activo disponible y no serán retenidos; por el contrario, si la concentración es demasiado baja, los iones de la muestra no se eluirán de la columna.

La separación de algunas muestras complejas, puede requerir de la utilización de un gradiente de fuerza iónica para lograr una correcta elución de los componentes de la muestra; en estos casos, es recomendable la utilización de una fase estacionaria basada en la sílice, ya que presentará una mayor recuperación frente a los cambios de fuerza iónica que las fases basadas en resinas poliméricas.

El pH también juega un importante papel en la separación, ya que, en muchos casos, este parámetro es el que controlará el grado de ionización del soluto, modificando su equilibrio de hidrólisis en el eluyente:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (\text{forma ionizada}/\text{forma no ionizada})$$

En estos casos, como norma general, el pH del tampón de elución debe ser de una a dos unidades inferior al pK_b de las bases y una o dos unidades superior al pK_a de los ácidos.

La utilización de modificadores orgánicos, es necesaria cuando las moléculas ionizadas presentan además de la carga una estructura apolar suficientemente grande como para posibilitar que se produzcan fenómenos de adsorción. En estos casos, es necesaria la inclusión en el eluyente de una pequeña proporción de disolvente orgánico miscible con el agua para deshacer las interacciones no iónicas que se pudiesen producir.

Cromatografía de exclusión molecular

Este tipo de cromatografía líquida, se basa en la diferencia de tamaños de las moléculas a separar, comportándose esta técnica como un auténtico tamiz (por lo que recibe también el

nombre de cromatografía de tamiz molecular).

Esta técnica se desarrolló inicialmente para la separación de compuestos biológicos, con eluyentes acuosos, sobre geles de dextrano (cromatografía de filtración en gel), que presentan la característica de poseer una reticulación homogénea que permite a las moléculas, al igual que en una criba, pasar de manera selectiva por unos canales de diámetro controlado.

La evolución experimentada en el campo de los rellenos para cromatografía líquida y en la fabricación de polímeros, ha permitido una expansión del campo de aplicación de este tipo de cromatografía. En la actualidad, la incorporación de los copolímeros de estireno y divinilbenceno a la fabricación de rellenos cromatográficos y, aún de mayor significación, la introducción de rellenos a base de sílice cristalizada con retículos perfectamente controlados, la eliminación de puntos activos para posibles adsorciones y la consecución de una gran resistencia mecánica y química frente a disolventes orgánicos, ha permitido incorporar este tipo de cromatografía a las denominadas de alta resolución, pudiéndose separar todo tipo de solutos sin que estos tengan que ser necesariamente disueltos en agua, condición indispensable hasta hace pocos años.

En síntesis, la fase estacionaria actúa como un pequeño tamiz, que deja penetrar a las moléculas más pequeñas en los poros del relleno, mientras que las más grandes son arrastradas rápidamente por la fase móvil (figura 29). De este modo, las moléculas más grandes serán las primeras en eluir de la columna mientras que las pequeñas saldrán más tarde, dependiendo de su tamaño y del tamaño del poro.

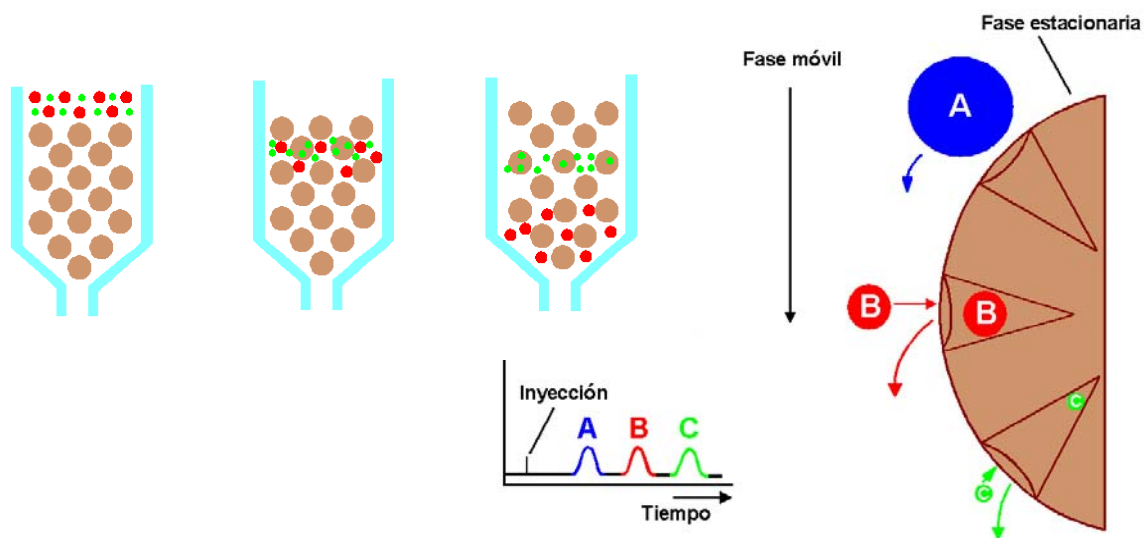


Figura 29.- Mecanismo de separación en cromatografía de exclusión molecular

La fase estacionaria

La fase estacionaria en la cromatografía de exclusión es de la mayor importancia, pues es en ella donde radica totalmente la capacidad de separación ya que en este tipo de cromatografía la fase móvil, que es un simple vehículo para los solutos, no tiene en absoluto ninguna influencia sobre la separación.

Las características que debe cumplir la fase estacionaria de cromatografía de exclusión son:

- Tener estructuras poliméricas rígidas.
- Tener un tamaño de poro controlado. En general, cuando se comparan columnas para cromatografía de exclusión molecular, no se especifica el tamaño de poro sino el intervalo de pesos moleculares que permite separar.
- El tamaño del poro no debe variar en las condiciones cromatográficas.
- Debe ser inerte frente a los solutos y a la fase móvil.

La gama de rellenos existentes es muy variada, atendiendo a sus características químicas, pero siempre se puede encontrar una constante en todos ellos: los tamaños de poro caracterizan los rangos de peso molecular de las moléculas a separar, hasta el punto de que estas fases se caracterizan en función de los pesos moleculares de las sustancias que se pueden separar al existir, en general, una relación directa del tamaño con el peso molecular.

En la Tabla VII se recoge el intervalo de trabajo de algunos rellenos utilizados en cromatografía de exclusión.

Tabla VII.- Características de separación de rellenos para cromatografía de exclusión

RELLENO	PORO (A)	P. M. (DALTON) Moléculas lineales	P. M. (DALTON) Moléculas globulares
TSK-10	-	< 1.000	-
TSK-20	50	< 5.000	< 2.000
TSK-30	200	1.000 a 20.000	1.000 a 100.000
TSK-40	500	2.000 a 300.000	10.000 a 1,5 10 ⁶
TSK-50	1.000	4.000 a 800.000	>1.500.000

La fase móvil

La fase móvil realiza en este caso un mero papel de transportador, ya que no actúa directamente sobre el mecanismo de la separación.

La fase móvil utilizada para este tipo de cromatografía, debe reunir las siguientes características:

- Debe solubilizar perfectamente a la muestra.
- No debe disolver la fase estacionaria.
- No debe interactuar ni con la muestra ni con la fase estacionaria.

Por supuesto, muchos disolventes cumplen estas características y pueden utilizarse como fase móvil, pero siempre hay que tener en cuenta las especificaciones del fabricante de la fase estacionaria, ya que los geles de polímeros biológicos y los de polímeros orgánicos pueden modificar su tamaño de poro por acción del disolvente, variando en consecuencia la calibración de la columna.

En ocasiones, se pueden presentar junto con el mecanismo de exclusión otros fenómenos de separación diferentes. Para asegurarse de que no se dan otros mecanismos (fundamentalmente adsorciones), se eluye un compuesto de pequeño tamaño (generalmente benceno, a no ser que el límite inferior de exclusión sea menor), en las mismas condiciones cromatográficas con las que se va a trabajar; como esta molécula pequeña pasa a través de todos los poros de la columna, será también la que más tarde en salir de la columna; en el cromatograma de la muestra real, ningún compuesto puede salir más tarde que el pico de ésta molécula, y de suceder, este hecho indicaría la superposición de más de un mecanismo de separación.