

Son un conxunto de técnicas fundamentais para a separación de mesturas químicas.

Fundamento:

Os compoñentes dunha estrutura sepáranse segundo a súa diferente velocidade de desprazamento a través dunha fase estacionaria cando son transportados por unha fase móbil.

Tipos de fase estacionaria (FE): sólido, líquido, fase ligada.

Tipos de fase móbil (FM): líquido, gas, fluído supercrítico

En función das combinacións posibles de fases, as principais técnicas cromatográficas móstranse na figura 1.

Cromatografía de elución en columna

A mostra (mestura de compoñentes que se queren separar) introdúcese no interior dunha columna e de seguido faise pasar o eluente que vai arrastrar os compostos.

Os compoñentes da mestura que se reteñen máis na FE viaxan máis lentos que os que se reteñen menos. Como consecuencia, sepáranse en bandas ou zonas de soluto e vanse detectar a medida que saen mediante o sistema detector colocado ao final da columna. Os perfís de concentración que dan lugar a sinal no detector teñen forma de picos gaussianos.

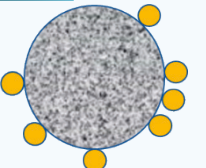
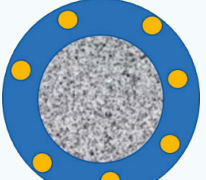
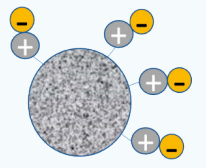
O esquema dunha separación cromatográfica pódese ver na figura 2.

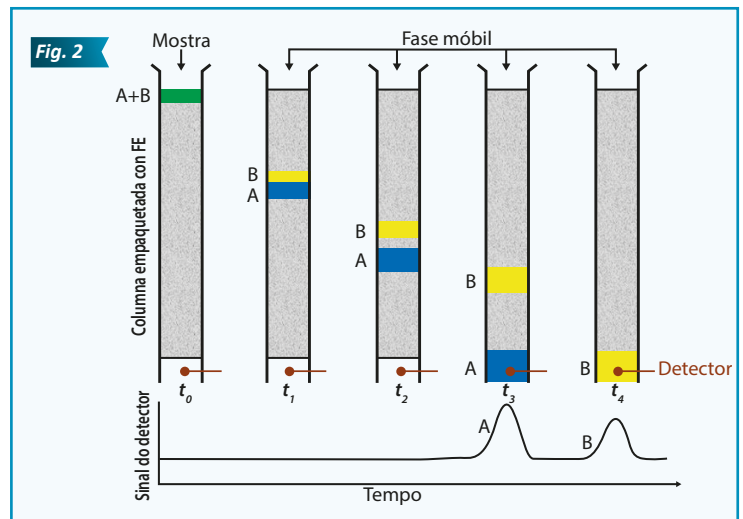
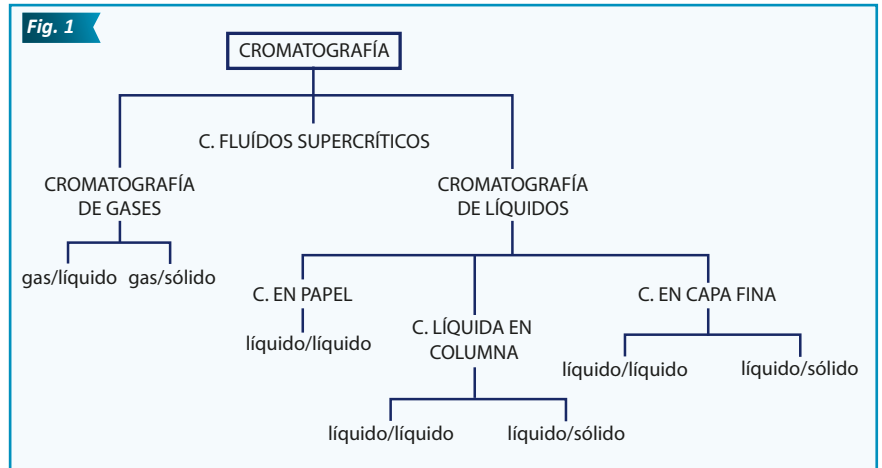
Os solutos vanse distribuír entre a FE e a FM segundo os seus coeficientes de reparto:

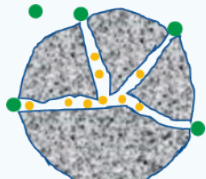
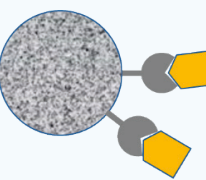
$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

Mecanismos de separación cromatográfica

Segundo a maneira na que os solutos interaccionan coa FE pódese falar de mecanismos de separación. Os principais resúmense na figura 3. Normalmente nunha separación cromatográfica intervén máis dun mecanismo aínda que predomine un deles.

<p>Fig. 3</p> 	<p>Adsorción</p> <p>A FE é un sólido polar en equilibrio cunha FM líquida pouco polar ou un gas. A retención dos solutos con afinidade polo sólido prodúcese na súa superficie.</p>
	<p>Reparto</p> <p>Os compostos da mostra repártense entre unha FE, que pode ser un líquido ou un composto orgánico enlazado quimicamente a un soporte inerte, e unha FM líquida inmisible ou un gas.</p>
	<p>Cambio iónico</p> <p>A FE é un xel con grupos químicos cargados ligados. Os compostos con carga contraria que viaxan na FM interaccionan con eles electrostáticamente e son retidos.</p>

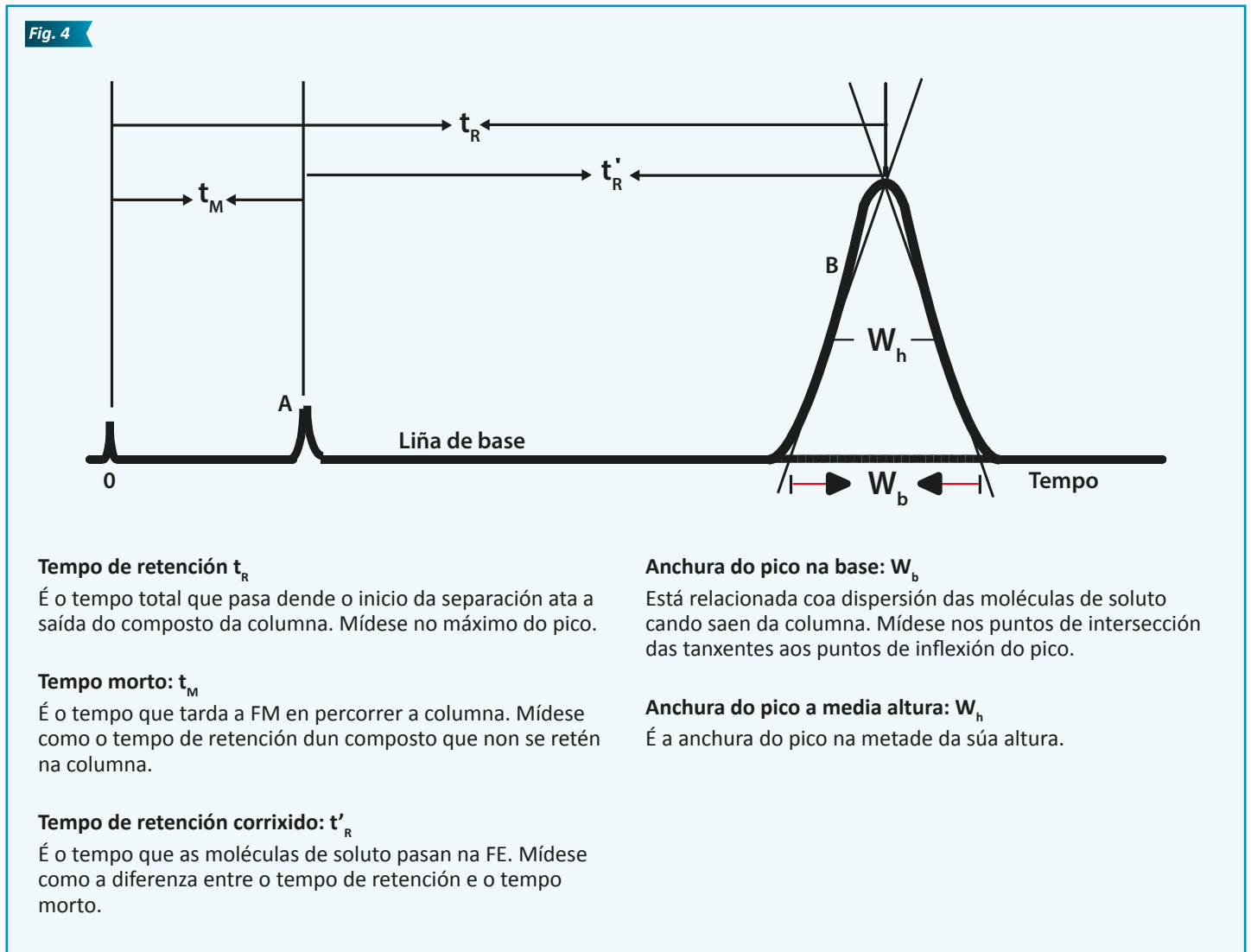


	<p>Exclusión por tamaños</p> <p>A FE é un xel con porosidade controlada. Os solutos cun tamaño adecuado penetran no interior dos poros e son retidos. Os solutos cun tamaño superior ao dos poros son excluídos. A separación prodúcese por barutado en función do tamaño.</p>
	<p>Afinidade</p> <p>A FE é un ligando de afinidade enlazado a un soporte inerte. O mecanismo de retención é tipo chave-pechadura, moi selectivo para os solutos capaces de interaccionar co ligando.</p>

Parámetros cromatográficos

O cromatograma é a representación do sinal do detector fronte ao tempo da separación. Nel móstranse os compostos da mostra

que foron separados. A partir do cromatograma é posible medir una serie de parámetros moi importantes (figura 4).



Velocidade de migración dun soluto: Factor de retención k

As moléculas de soluto só se moven cando están na FM, e fano á mesma velocidade desta. Só cando os solutos interaccionan coa FE son retidos un certo tempo segundo a súa afinidade relativa pola FE, provocando o retardo na súa viaxe. A distinta afinidade dos compoñentes da mostra é responsable das diferenzas nas súas velocidades de migración.

O factor de retención mide o tempo que pasan as moléculas de soluto na FE con respecto ao tempo que pasan na FM, o que se traduce nun cociente da cantidade de soluto na FE e na FM.

$$k = \frac{n_s}{n_M} = \frac{C_s V_s}{C_M V_M} = k \frac{V_s}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

$k=2-10 \Rightarrow$ separación óptima

$k < 1 \Rightarrow$ pouca separación entre os picos

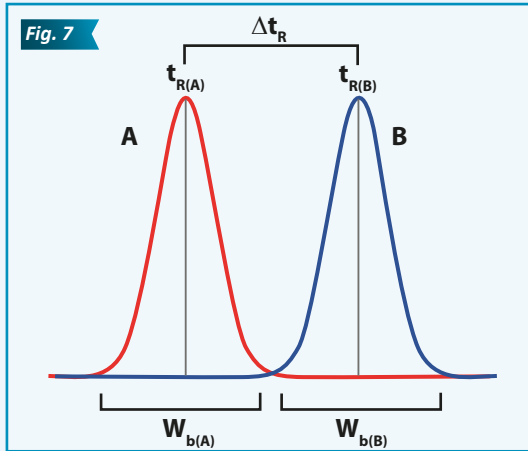
$k > 30 \Rightarrow$ separación lenta

Velocidade relativa de migración de dous solutos

A separación entre dous solutos A e B, dos que B presenta maior afinidade pola FE que A ($t_{R(B)} > t_{R(A)}$) pode cuantificarse mediante o factor de separación α

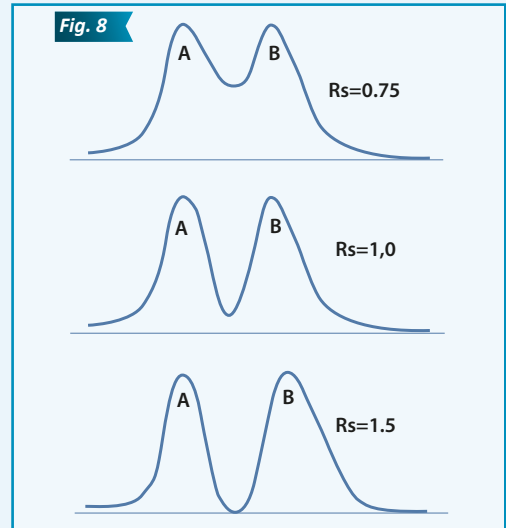
RESOLUCIÓN DA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

É unha medida da separación real entre dous picos adxacentes (figura 7). Ten en conta non só a posición relativa dos picos (separación entre os tempos de retención) senón tamén a súa anchura.



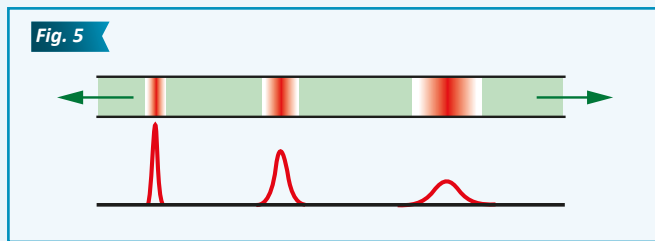
$$R_s = \frac{\Delta t}{(W_{b1} + W_{b2})/2} = \frac{2 \cdot \Delta t}{W_{b1} + W_{b2}} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

Unha boa resolución debe ser >1.0 (figura 8).



EFICACIA DUNHA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

É unha medida do ensanchamento dos picos durante o proceso de separación na columna (figura 5).



Os picos vanse ancheando canto maior é a interacción dos solutos coa FE (maior tempo de residencia no interior da columna). Para obter boas separacións interesa que os picos sexan estreitos e agudos.

Para a cuantificación do ancheamento dos picos, considérase que unha columna de lonxitude L está dividida en N pratos "teóricos". Cada prato ten unha anchura H chamada **altura equivalente a un prato teórico**. A maior N e menor H, a columna é máis eficaz.

$$L = HN$$

$$N = 16 \frac{(t_R)^2}{(W_b)^2}$$

Procesos cinéticos que contribúen ao ancheamento da banda cromatográfica na columna:

A ecuación de van Deemter resume as contribucións de varios procesos:

- Difusión aparente ou de camiños múltiples (A):
- Difusión lonxitudinal (B):

- Transferencia de masa nas fases (C), na FM (C_M) e na FE (C_s)
- Velocidade da FM: $u=L/t_M$

$$H = A + B/u + (C_s + C_M)u$$

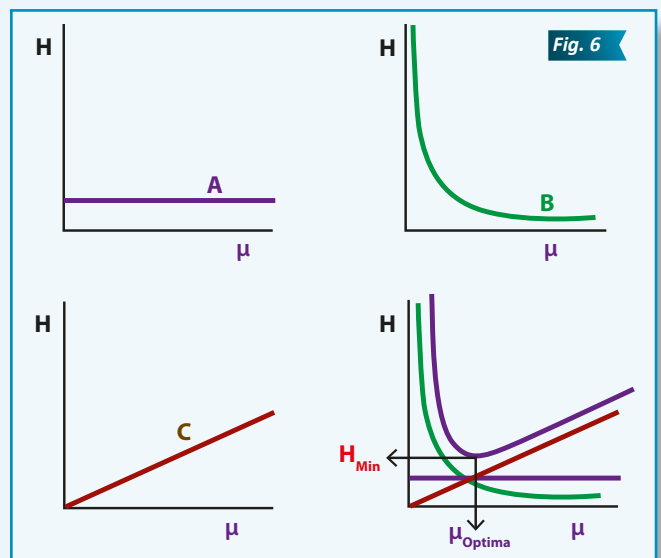
$$A \propto d_p^2$$

$$B \propto D_M$$

$$C_M \propto d_c^2, d_p^2/D_M$$

$$C_s \propto d_f^2/D_s$$

Pódense comparar diferentes columnas e condicións cromatográficas a través da representación das curvas de van Deemter (figura 6).



OPTIMIZACIÓN DO FUNCIONAMENTO DA COLUMNA

O obxectivo dunha separación cromatográfica é obter a máxima resolución entre picos no menor tempo posible de análise.

Segundo a ecuación fundamental da resolución, esta depende da eficacia da columna e das propiedades dos solutos e das fases.

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

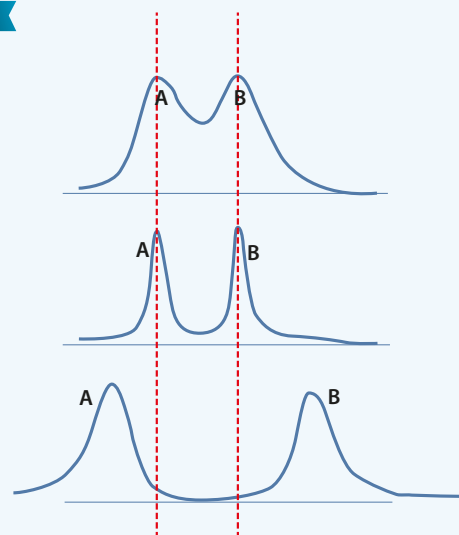
Pódense facer cambios para estreitar os picos (aumentar a eficacia) ou para cambiar as súas posicións relativas (mellorar a selectividade da columna) (figura 9).

Para aumentar a eficacia hai que diminuír H (picos máis estreitos) $\Rightarrow \downarrow d_p, \downarrow d_c, \downarrow d_f$

Para aumentar a selectividade α (cambiar a velocidade relativa de migración dos solutos) \Rightarrow modificar a FM e/ou a FE.

As elucións en gradiente de polaridade (en HPLC) ou de temperatura (en GC) permiten optimizar a separación nas que os solutos teñen propiedades moi diversas.

Fig. 9



Resumo de parámetros importantes en cromatografía

Parámetro	Símbolo	Determinado a partir de
Tempo morto ou tempo de migración (especies non retidas)	t_M	Cromatograma
Tempo de retención	t_R	Cromatograma
Tempo de retención corrixido	t'_R	$t'_R = t_R - t_M$
Anchura na base do pico	W_b	Cromatograma
Lonxitude da columna	L	Medida directa
Fluxo de FM	F	Medida directa $F = u \pi r^2$
Velocidade lineal de fluxo	u	$u = L / t_M$
Concentración de soluto na FE e na FM	C_s, C_M	A análise e a preparación de mostra
Volume de FM	V_M	$V_M = t_M F$
Factor de retención	k	$k = (t_R - t_M) / t_M$
Coeficiente de reparto	K	$K = C_s / C_M$
Factor de separación	α	$\alpha = k_B / k_A = K_B / K_A$
Resolución	R_s	$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b1} + W_{b2}}$
Número de pratos teóricos	N	$N = 16 \frac{(t_R)^2}{(W_b)^2}$
Altura equivalente a un prato teórico	H	$H = L / N$

