

CÓDIGOTAI – 14 A

UNIDAD V. CROMATOGRAFÍA

1. Conceptos generales

La cromatografía comprende un conjunto de técnicas para separar componentes de una muestra. Es decir, son principalmente técnicas separativas. Es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (**fase estacionaria**) mientras que la otra (**fase móvil**) se mueve en una dirección definida.

El proceso cromatográfico se da como resultado de la mayor o menor capacidad para ser retenidos los diferentes componentes de una muestra por la fase estacionaria, es decir, se basa en los repetidos procesos de interacción durante el movimiento de los componentes de una mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo de la fase estacionaria. Este proceso por el cual la fase móvil se desplaza a lo largo de la fase estacionaria transportando los componentes a separar se denomina **elución**.

Cuando ambas fases se han elegido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil según las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre ambas fases.

Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retenido emerge primero, el retenido más fuertemente eluye último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra. Los componentes adyacentes (picos) se separan cuando el pico que sale después es retardado lo suficiente para impedir la superposición con el pico que eluyó antes. Una amplia gama de selección de materiales para las fases móvil y estacionaria permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase. **Refleja la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el soluto y entre sí.**

Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión del tipo London.

La **fase estacionaria** puede ser un sólido, un gel o un líquido. Si es un líquido, puede estar distribuido en un sólido, el cual puede o no contribuir al proceso de separación. El líquido puede también estar químicamente unido al sólido (fase ligada) o inmovilizado sobre él (fase inmovilizada).

En particular, en la cromatografía de gases se usa el término fase líquida, caso más común de fase estacionaria, frente a fase gaseosa para la fase móvil.

La **fase móvil** es un fluido que corre a lo largo de la fase estacionaria en una dirección definida. Puede ser un líquido (cromatografía líquida, LC), un gas (cromatografía de gases, GC) o un fluido supercrítico (cromatografía con fluido supercrítico).

Los componentes químicos a separar (analitos) de la muestra pueden no ser retenidos por la fase estacionaria (es decir, no retardados), retenidos parcialmente (es decir, eluidos a tiempos diferentes) o retenidos permanentemente.

La Figura 1 muestra un esquema de decisión cuando se desea caracterizar una muestra. Puede observarse que cuando existe la necesidad de separar analitos, la cromatografía es una técnica útil.

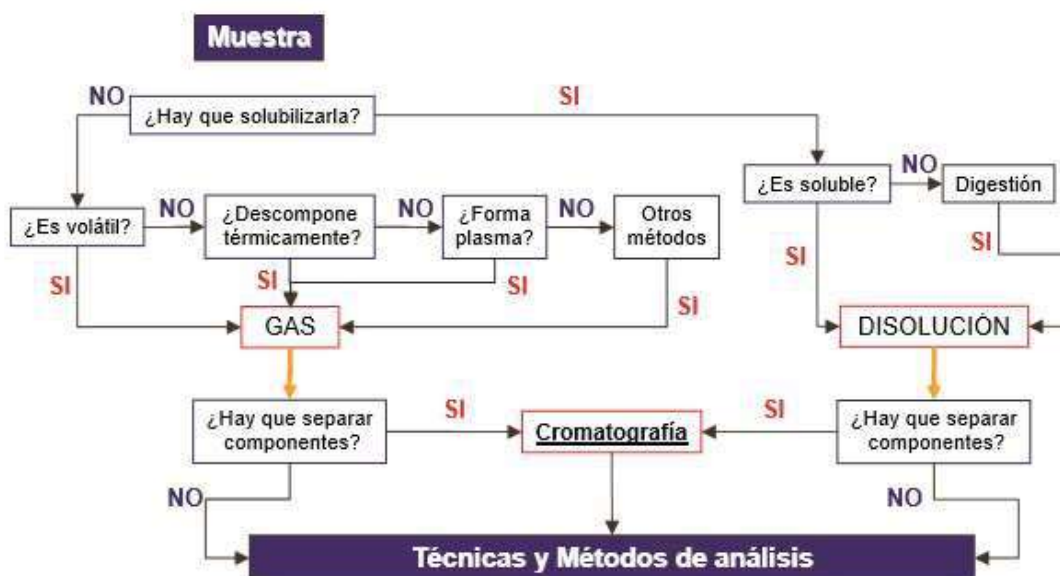


Fig. 1. Pasos a seguir en la toma de decisión para caracterizar una muestra

2. Parámetros teóricos que afectan la separación cromatográfica

La representación gráfica de la respuesta del detector (cromatograma) se presenta en forma de picos en un gráfico tipo $X = f_c(Y)$ donde en el eje X se grafica la intensidad de la señal del detector (que tiene correlato con la concentración) y en el eje Y el tiempo de transcurrida la cromatografía.

Algunos parámetros importantes de la cromatografía son los siguientes:

Tiempo de retención, t_r : tiempo que un soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del pico (punto máximo de altura). Es característico del soluto para condiciones de operación cromatográfica constantes. Auxiliar en la identificación de los solutos.

Tiempo muerto, t_0 : tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Representa el espacio "vacío" de la columna.

Tiempo de retención ajustado, t'_r : mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria. $t'_r = t_r - t_0$

Ancho a la base: Es la porción de la línea base intersectada por las tangentes al pico. Para un pico gaussiano es igual a 4σ . Tradicionalmente usado en el **cálculo de la eficiencia del sistema**.

Ancho a la mitad de la altura: Una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).

Número de platos teóricos (N): Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. **El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos.**

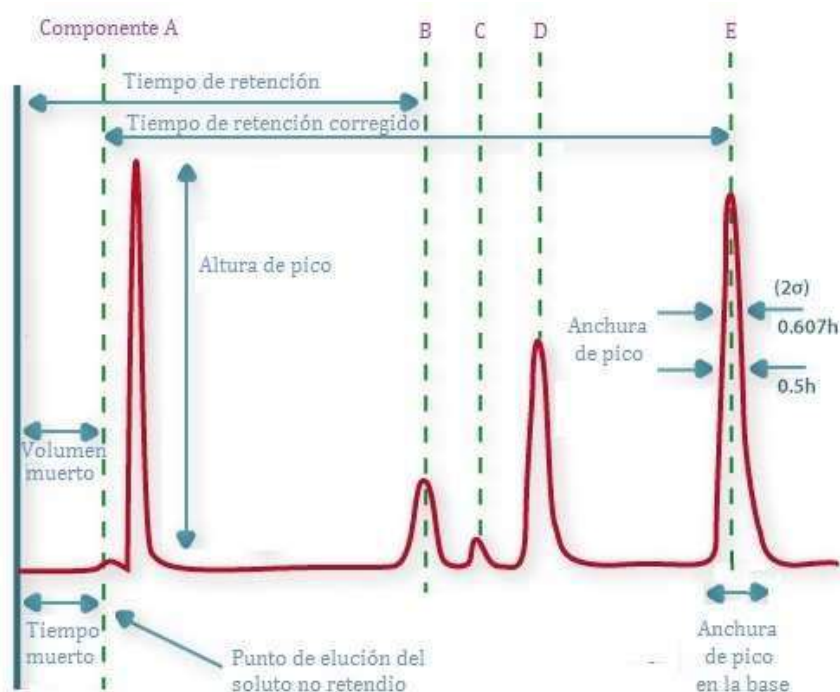


Fig. 2. Cromatograma con los parámetros más típicos en cromatografía

Comportamiento de retención

El comportamiento de retención refleja la distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. El volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector (en el máximo del pico del soluto) se define como **el volumen de retención, V_r** .

El **flujo de corrida (F_c)** de la fase móvil indica el volumen de fase móvil por unidad de tiempo. Ejemplo 1 mL/min.

El V_r se puede obtener directamente del cromatograma multiplicando el tiempo de retención correspondiente (t_r) por el flujo (F_c), $V_r = t_r \times F_c$

El F_c , en términos de los parámetros de la columna, depende la sección transversal de la columna vacía, la porosidad total del relleno (empaquete) de la columna y la velocidad lineal promedio de la fase móvil.

La **resolución** alcanzada en un sistema es proporcional al producto de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema, que son los tres más importantes parámetros de control en una columna cromatográfica

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0 (Fig. 3), **una resolución de 1.5** representa separación a la línea base.

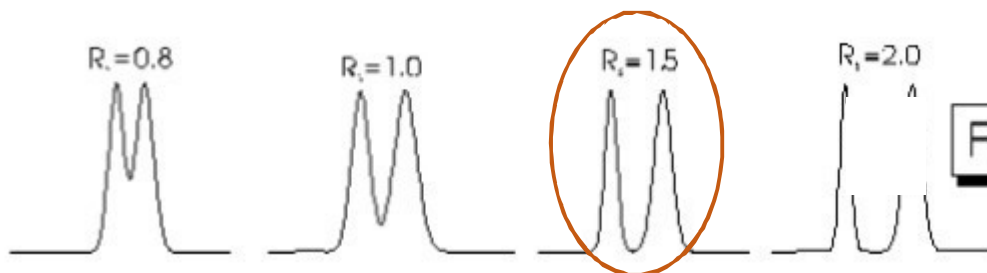


Fig. 3. Esquema que muestra la separación de picos según la resolución

Los picos señalados en el óvalo naranja se denominan **par crítico**. La resolución de picos adyacentes puede mejorarse ya sea aumentando la separación de los picos o disminuyendo los anchos de los picos individuales. Esto involucra la selectividad de la columna cuando se alejan más los picos y la eficiencia cuando se intenta disminuir el ancho del pico.

El **factor de capacidad o retención** (k) es uno de los parámetros más importantes de cromatografía en columna. Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Para un conjunto dado de parámetros de operación, k es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación el tiempo transcurrido en fase móvil y lo que **permite el tema de separación entre los picos**. En resumen, **la selectividad se define como la habilidad del sistema para separar los picos. La eficiencia de la columna está relacionada con el ensanchamiento de la banda que se encuentra en la columna y por ende el ensanchamiento de los picos.**

3. Tipos de cromatografía

Los tipos de cromatografía pueden clasificarse por distintos criterios. Aquí se desarrollarán dos de ellos.

➤ Clasificación de acuerdo a la forma del lecho cromatográfico

- **En columna:** Técnica de separación en la que el lecho estacionario está contenido dentro de un tubo ("la columna"). Las partículas de fase estacionaria sólida, o de soporte recubierto con una fase estacionaria líquida, pueden llenar por completo el tubo (columna empaquetada) o estar concentradas sobre o a lo largo de su pared interna, dejando una ruta abierta, no restringida, para el paso de la fase móvil por el centro del tubo (columna tubular abierta).
- **Plana:** Técnica de separación en la que la fase estacionaria está en forma de plano o sobre un plano. Éste puede ser un papel, que sirva como tal o que esté impregnado con una sustancia que actúe de fase estacionaria (cromatografía en papel), o una capa de partículas sólidas extendida sobre un soporte, tal como una placa de vidrio (cromatografía en capa fina, TLC).

➤ Clasificación por estado físico de la fase móvil

- ✓ Cromatografía de gases
- ✓ Cromatografía líquida
- ✓ Cromatografía de fluido supercrítico

➤ Clasificación de acuerdo al tipo de equilibrio involucrado

El tipo de **equilibrio involucrado** es gobernado por el tipo de fase estacionaria utilizada. Así, la cromatografía puede ser de adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión y afinidad.

3.a. Cromatografía de adsorción

La **fase estacionaria** es un **sólido** en el que los componentes de la muestra son adsorbidos. La fase móvil puede ser un líquido o un gas; los componentes se distribuyen entre dos fases a través de la combinación de los **procesos de adsorción y desorción**.

La cromatografía de **capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography)** es un ejemplo de cromatografía por adsorción.

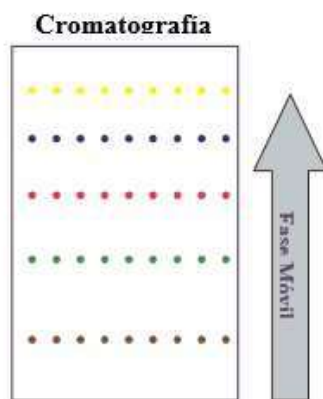


Fig. 4. Esquema de sistema para hacer cromatografía en capa fina

3.b. Cromatografía de partición

La **fase estacionaria** de la cromatografía de partición es un **líquido soportado en un sólido inerte**. Otra vez, la fase móvil puede ser un líquido (cromatografía de partición líquido-líquido) o un gas (cromatografía de partición gas-líquido, GLC). **La cromatografía en papel** es un tipo de cromatografía de partición en la cual la fase estacionaria es una capa de agua adsorbida en una hoja de papel. Pero las más populares por su aplicación son la cromatografía de gases (**GC**, Gas Chromatography) y la cromatografía líquida de alto rendimiento (**HPLC / UHPLC**, High/Ultra High Performance Liquid Chromatography). Dada su importancia se describirán luego con más detalle.

3.c. Cromatografía de intercambio iónico

La separación en la cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas, a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El mecanismo de separación se basa en un **equilibrio de intercambio** iónico.

Muchos de los experimentos de intercambio iónico se llevan a cabo en cinco etapas:

1. Equilibrio en el cual el intercambiador iónico (fase estacionaria) se encuentra en las condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica, lo que permitirá la unión de las moléculas de soluto. En este estado inicial, los grupos que se intercambiarán están asociados con sus respectivos contra-iones (usualmente aniones o cationes simples, como cloruro o sodio).
2. Aplicación de la muestra y su adsorción, en la cual las moléculas del soluto llevan a cabo el apropiado desplazamiento de carga de los contra-iones y se unen reversiblemente al gel. Las sustancias que no se unen son eluidas de la fase estacionaria del intercambiador usando el buffer inicial.
3. Desorción de la muestra cambiando las condiciones de elusión, al desfavorecer la formación del enlace iónico de las moléculas de la muestra y la cama del intercambiador. Esto normalmente se logra aumentando la fuerza iónica del buffer de elusión o cambiando su pH.
4. Remoción de sustancias no eluidas bajo las condiciones experimentales previas.
5. Regreso a equilibrio de las condiciones iniciales para la siguiente purificación.

La separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas, densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la **fuerza iónica** y el **pH**. Las diferencias en propiedades de carga de compuestos biológicos son a menudo considerables. La cromatografía de intercambio iónico es capaz de separar especies con propiedades poco diferentes.

La matriz. Un intercambiador iónico consiste en una matriz sólida insoluble a la cual se unen de forma covalente grupos cargados. Puede estar hecha de compuestos inorgánicos, resinas sintéticas o polisacáridos. Los intercambiadores cargados positivamente tienen contra-iones cargados negativamente (aniones) disponibles para ser intercambiados por lo que son llamados intercambiadores aniónicos.

Intercambiadores cargados negativamente tienen contra-iones cargados positivamente (cationes) y se les conoce como intercambiadores catiónicos.

Grupos cargados. La presencia de grupos cargados es una propiedad fundamental de un intercambiador iónico. Estos grupos determinan el tipo y fuerza del intercambiador iónico. Por su lado, la cantidad total y su disponibilidad determina la capacidad.

Hay una variedad de grupos que pueden escogerse para usarse en intercambiadores iónicos; algunos ejemplos son:

Intercambiadores aniónicos: Grupo funcional Dietilaminoetil (DEAE), Aminoetil cuaternario (AEC), Amonio cuaternario (C).

Intercambiadores catiónicos: Grupo funcional Carboximetil (CM), Sulfopropil (SP), Metil sulfonato (S).

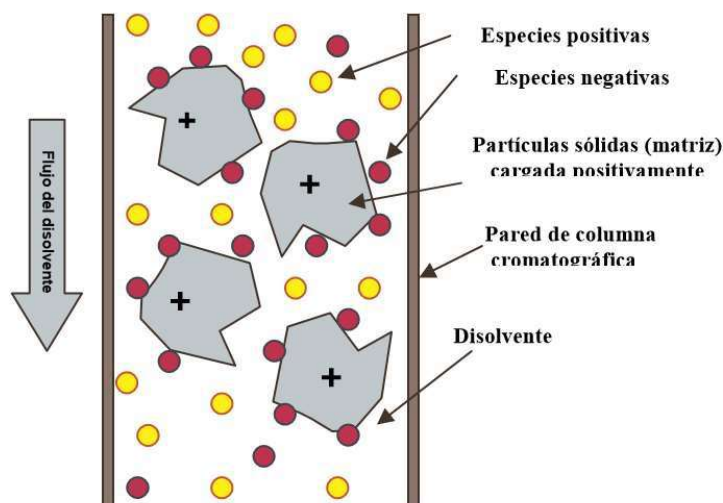


Fig. 5. Esquema del proceso de separación por cromatografía de intercambio iónico

3.d. Cromatografía de exclusión por tamaño

En la cromatografía de exclusión puede separarse moléculas solvatadas de acuerdo a su tamaño y habilidad para penetrar en una estructura tamiz (la fase estacionaria). La separación en cromatografía de partición y en cromatografía de intercambio iónico se logra de diferentes interacciones de solutos con la fase móvil y la fase estacionaria. En contraste, la separación en **cromatografía de exclusión por tamaño se lleva a cabo por diferencias en tamaño molecular y la habilidad de diferentes moléculas para penetrar los poros de la fase estacionaria a diferentes tamaños o magnitudes.**

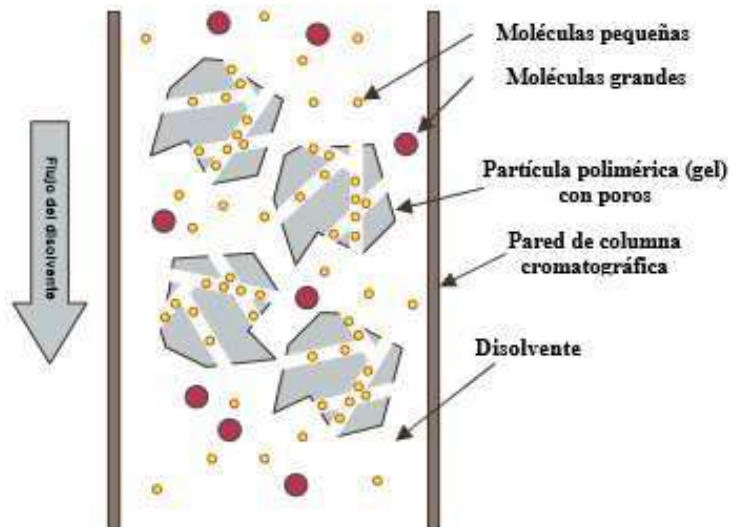


Fig. 6. Esquema del proceso de separación por cromatografía de exclusión por tamaños

3.e. Cromatografía de afinidad

Este tipo de cromatografía utiliza **interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria**. Por ejemplo, la molécula inmovilizada podría ser un anticuerpo específico para una proteína particular. Cuando una mezcla cruda que contiene miles de proteínas se pasa a través de una columna, sólo una proteína reacciona con el anticuerpo que está unido a la columna. Después de lavar todos los otros solutos de la columna, la proteína deseada es desplazada del anticuerpo cambiando el pH, la fuerza iónica o la polaridad. Las interacciones entre las moléculas del ligando (anticuerpo por ejemplo) y blanco (proteína a separar) pueden ser el resultado de interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y/o puentes de hidrógeno. La purificación por afinidad requiere un ligando bioespecífico que puede ser unido covalentemente a una matriz cromatográfica. El ligando acoplado debe retener su afinidad específica de enlace hacia las moléculas blanco, y después de lavar el material no unido, la unión entre la molécula blanco y el ligando debe ser reversible y permitir que las moléculas blanco sean removidas pero que conserven su actividad. Cualquier componente puede ser usado como un ligando para purificar a su compañero respectivo. Algunas interacciones típicas se muestran en la Fig. 7.

- ✓ Enzima ⇔ sustrato análogo, inhibidor, cofactor.
- ✓ Anticuerpo ⇔ antígeno, virus, célula.
- ✓ Lecitina ⇔ polisacárido, glicoproteína, receptor de superficie celular, célula.
- ✓ Ác. nucleico ⇔ secuencia base complementaria, histonas, polimerasa de ácidos nucleicos, proteína de unión al DNA.
- ✓ Hormona, vitamina ⇔ receptor, proteína acarreadora.
- ✓ Glutación ⇔ glutación-S-transferasa o proteínas de fusión GST
- ✓ Iones metálicos ⇔ proteínas de fusión poli (his), proteínas nativas con histidina, residuos de cisteína y/o triptofano en sus superficies.

Fig. 7. Interacciones biológicas típicas usadas frecuentemente en cromatografía de afinidad

4. Cromatografía líquida (LC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es uno de los tipos de cromatografía de partición de aplicación rutinaria en los procedimientos analíticos de separación (párrafo 3.a). No está limitada, como la GC, por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. La HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria. La recuperación de la muestra es fácil en este tipo de cromatografía. Las fracciones separadas se recolectan en forma sencilla, colocando un recipiente abierto al final de la columna. La recuperación es usualmente cuantitativa (exceptuando la adsorción irreversible en la columna) y los componentes separados son fácilmente aislados del disolvente de la fase móvil.

En el **modo Normal** de operaciones, una **fase estacionaria polar** (por ej. silicagel) se usa con una fase móvil no polar (por ej. hexano). Esto **favorece la retención de compuestos polares** y la elusión de compuestos no polares y se le conoce como cromatografía **fase normal**.

Si se utiliza una **fase estacionaria no polar** (por ej. C18) con una fase móvil polar (por ej. metanol), entonces **los solutos no polares serán retenidos** y los solutos polares eluidos. Esto se conoce como cromatografía por **fase reversa**. El mecanismo de separación en cromatografía de fase **reversa depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria**.

Algunos conceptos importantes:

Cromatografía en Fase Normal

Procedimiento de elución en el que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. Este término se usa en cromatografía líquida para resaltar el contraste con la cromatografía con fase invertida o reversa.

Análisis isocrático

Procedimiento en el que la composición de la fase móvil permanece constante a lo largo del proceso de elución.

Elución con Gradiente

Procedimiento en el que la composición de la fase móvil cambia, de forma continua o en etapas, a lo largo del proceso de elución.

Elución en etapas o escalonada

Proceso de elución en el que se cambia la composición de la fase móvil en etapas o escalones durante un sólo desarrollo de la cromatografía.

Cromatografía Bidimensional

Procedimiento en el que parte o todos los componentes de la muestra se someten, una vez separados, a etapas adicionales de separación. Esto se puede hacer, por ejemplo, conduciendo a una fracción en particular que eluye de la columna hacia otra columna (o sistema) que tenga diferentes características de separación. Cuando se combina con etapas de separación adicionales, se puede hablar de cromatografía multidimensional. En la cromatografía plana, cromatografía bidimensional se refiere al proceso cromatográfico que hace que los componentes migren primero en una dirección y luego en otra perpendicular a ella; las dos eluciones se llevan a cabo con eluyentes diferentes.

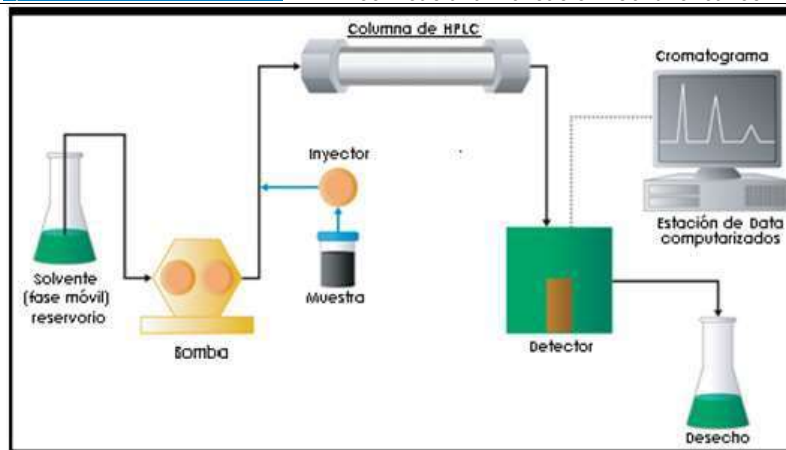


Fig. 8. Esquema básico del circuito HPLC

Diferencia entre cromatografía líquida de baja, alta y ultra alta presión (rendimiento, performance)

La diferenciación se basa en tres criterios fundamentalmente: tamaño de poro del relleno de la columna y presión de trabajo. Suelen variar en longitud.

LPLC o Low Pressure Liquid Chromatography: incluye habitualmente análisis cromatográficos que utilizan columnas cuyo soporte es de vidrio o plástico. El **relleno** posee un **poro grande** y la **presión de trabajo** durante las corridas cromatográficas **es baja**, usualmente hasta unos **400psi**. Como la presión que empuja la corriente de la fase móvil es baja, las partículas del relleno de la columna deben ser grandes (mm) para que el flujo pueda pasar a través de ellas, ya que las bombas utilizadas para generar la presión son pequeñas.

HPLC o High Performance Liquid Chromatography: suele utilizarse indistintamente "alta presión" o alta "performance" (rendimiento); ambos términos son correctos. En este caso, lo emplearemos como alta presión. Comparado con LPLC que usa partículas del orden de los milímetros, en este caso las **partículas del relleno** de la columna son del orden de los micrones, 2 a 20 μm siendo el más común el de **5 μm** , empacados en columnas de acero inoxidable capaz de soportar alta presión. En este caso, las bombas que bombean los solventes a través de la columna logran **presiones** hasta 6000 psi aunque raramente las columnas soporten más de 4000 psi y usualmente se trabaja alrededor de **2000psi**. El diámetro interno de las columnas de tipo analíticas es 4-5 mm y 6-10 mm las de tipo preparativas.

UHPLC o Ultra High Pressure Liquid Chromatography: también definida como **partículas de relleno sub-2 μ m** donde la bomba es capaz de conseguir **presiones** de más de **8000psi**. Incluye subcategorías como nano-HPLC, narrow-bore HPLC, and mini-bore HPLC. Las columnas son más cortas y su diámetro interno es de 1.0, 2.1 o 3.5 mm, es decir, más delgadas que las de HPLC. La **ventaja** respecto de HPLC son **tiempos de corrida más cortos** (3 a 10 veces más corto), **menor tiempo para equilibrar la columna, y menor gasto de solvente (fase móvil)** lo que implica una ventaja en términos económicos y medioambientales. No son muy útiles para análisis complejos en donde se requiere de columnas más largas (mayor cantidad de equilibrios para una separación eficiente).

5. Cromatografía gaseosa (GC)

La cromatografía de gases es otro de los tipos de cromatografía de partición de aplicación rutinaria en los procedimientos analíticos de separación. Es la técnica a elegir para la separación de **compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles**. La disponibilidad de detectores versátiles y específicos, y la posibilidad de acoplar el cromatógrafo de gases a un espectro de masas o a un espectrofotómetro de infrarrojo, amplían aún más la utilidad de la cromatografía de gases.

Un cromatógrafo de gases consiste en varios módulos básicos ensamblados para:

- 1) proporcionar un flujo constante del gas transportador (fase móvil)
- 2) permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye
- 3) contener la longitud apropiada de fase estacionaria
- 4) mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura)
- 5) detectar los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y
- 6) proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente.

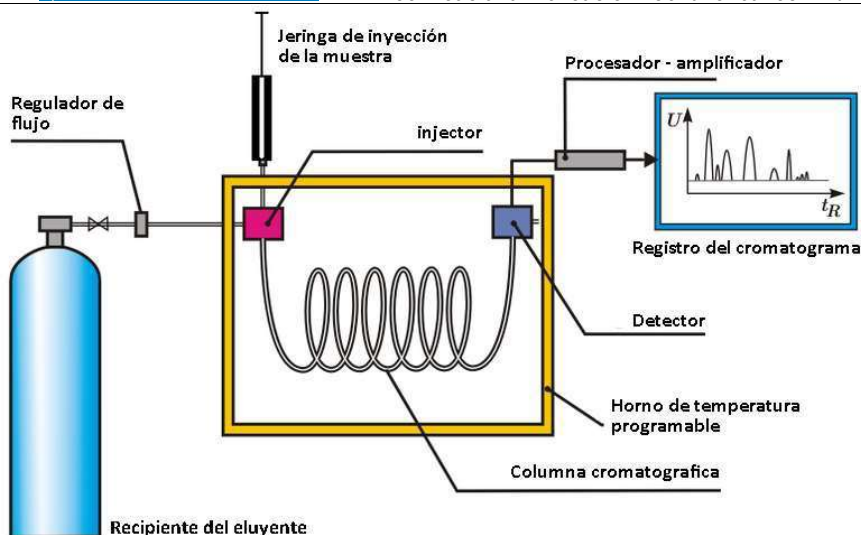


Fig. 9. Esquema básico de los módulos que describen un GC

Sólo el 20% aproximadamente de los compuestos conocidos permiten ser analizados por cromatografía de gases, ya sea porque son insuficientemente volátiles y no pasan a través de la columna, o porque son térmicamente inestables y se descomponen en las condiciones de separación. Por ello, si se compara con HPLC es menos universal. Otra diferencia es que en el caso de GC, la fase móvil gas solo cumple la función de "arrastre" a través de la fase estacionaria y no es interactiva como en el caso de la fase móvil líquida del HPLC y HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación.

Bibliografía

Willard, HH., Instrumental Methods of Analysis, Wadsworth, Inc., U.S.A., 1988.
Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech: Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography, Sweden, 2002.

http://gc.discussing.info/gs/b_theory/index.html

http://gc.discussing.info/gs/b_theory/index.html

HPLC: hints and tips for chromatographers.

<https://hplctips.blogspot.com.ar/2015/08/terminology-which-is-it- uplc-uhplc-or.html>