

TEMA 6: TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

1. Introducción
2. Clasificación de los métodos cromatográficos
3. Consideraciones generales sobre la cromatografía de elución
4. Análisis químico con métodos cromatográficos
5. Cromatografía de gases
6. Cromatografía de líquidos

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los métodos de análisis son en los casos más favorables selectivos, pero no específicos. Por ello, cuando se trata de muestras complejas la separación del analito de las posibles interferencias es una etapa esencial. Aún mejor sería la posibilidad de determinar varios analitos después de una separación previa.

Uno de los mejores métodos para conseguir esa separación, y posiblemente, el más utilizado es la cromatografía. Este conjunto de técnicas permite la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. La cromatografía en sus orígenes era exclusivamente una técnica de separación que se transformó en técnica de análisis cuando se acopló con un dispositivo para monitorizar las especies químicas que se iban separando. Así, la cromatografía se ha convertido en un método analítico de primer orden para separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en muestras líquidas o gaseosas (para muestras sólidas se requiere una etapa de disolución o extracción).

En cromatografía, los solutos se separan en base a la distinta velocidad de desplazamiento cuando son arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene a una fase estacionaria (sólida o líquida).

La muestra se disuelve en la fase móvil y se hace pasar a través de la fase estacionaria (inmiscible con la móvil) que se mantiene fija en una columna o sobre una superficie plana. Las dos fases se eligen de tal modo que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre las dos fases. Aquellos que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de fase móvil, mientras que los que se retiene débilmente avanzan con más rapidez.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse según diferentes criterios: atendiendo al modo como las fases se ponen en contacto y atendiendo a fundamento del proceso de separación. En este último caso en definitiva se trata de la naturaleza de las fases y del tipo de interacciones que tienen lugar entre los solutos y las fases utilizadas.

Clasificación atendiendo al fundamento de la separación (naturaleza de las fases y tipo de interacciones):

A. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (fase móvil líquida)

Fase estacionaria sólida: se trata de sólidos finamente divididos (con gran superficie específica)

- **Cromatografía de adsorción:** la fase estacionaria sólida retiene a los solutos por un doble efecto de adsorción física y química. Las interacciones implicadas son del tipo de fuerzas de van der Waals.

- **Cromatografía de cambio iónico:** el sólido retiene a los solutos gracias a atracciones electrostáticas. La fase estacionaria sólida lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil.

- **Cromatografía de exclusión:** la fase estacionaria es un material poroso, que retiene a las moléculas en función de su tamaño. En ocasiones se denomina también cromatografía de filtración sobre geles o de permeabilidad en geles (GPC).

Fase estacionaria líquida:

- **Cromatografía de reparto:** la fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte sólido que sólo actúa de soporte.

- **Cromatografía de afinidad o de fases enlazadas:** la fase estacionaria es generalmente un polímero de tipo líquido inmovilizado sobre un sólido inerte por enlaces covalentes.

En ambos casos la separación se debe a equilibrios de distribución de los solutos entre las fases móvil y estacionaria controlados por la diferente solubilidad de los mismos en las distintas fases.

B. CROMATOGRAFÍA DE GASES (fase móvil gaseosa)

- **cromatografía de adsorción** (o cromatografía gas-sólido) la fase estacionaria es un sólido finamente dividido, que retiene a los solutos por adsorción

- **cromatografía de partición o reparto** la fase estacionaria es un líquido retenido por impregnación o por enlace sobre un sólido inerte. Se basa en equilibrios de distribución.

C. CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (la fase móvil es un fluido supercrítico)

Un fluido supercrítico es un fluido calentado a t^a y P superiores a las críticas. Posee algunas características propias de un gas y algunas propias de un líquido. la fase estacionaria puede ser líquida o sólida.

Clasificación atendiendo al modo se lleva a cabo la separación (cómo se ponen en contacto las fases):

Cromatografía en columna: la fase estacionaria se introduce en un tubo estrecho a través del cual se hace pasar la fase móvil. Esta se desplaza por capilaridad, gravedad o presión. Pueden emplearse fases móviles líquidas, gaseosa o fluidos supercríticos.

Cromatografía plana: la fase estacionaria se coloca en un soporte plano. En cromatografía plana el flujo de fase móvil se consigue por capilaridad o por capilaridad y gravedad. Sólo pueden emplearse líquidos como fases móviles. Existen:

- cromatografía en papel: la fase estacionaria esta constituida por el agua retenida en la celulosa. también existen papeles cambiadores de iones.

- cromatografía en capa fina: la fase estacionaria es un sólido adsorbente finamente dividido o un líquido inmovilizado sobre un sólido colocado sobre una placa plana.

En este tema nos centraremos en la cromatografía en columna y consideraremos únicamente cromatografía de líquidos y de gases.

3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Consideremos la separación de dos sustancias A y B en una columna por cromatografía de elución. La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por adición sucesiva de fase móvil (eluyente). Sucesivas adiciones de fase móvil hacen descender las moléculas de analito por la columna en una serie de transferencias entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si al final de la columna se coloca un dispositivo que responda a los cambios de composición de la fase móvil, es decir, a la presencia de los distintos solutos (detector) se puede registrar un **cromatograma**, gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución (o volumen de eluyente añadido). La línea base del cromatograma corresponde a la señal del detector en ausencia de compuestos eluidos, la aparición

de un pico representa la elución de un componente de la muestra. la separación se completa cuando el cromatograma presenta tantos picos como compuestos formaban parte de la mezcla objeto de análisis.

Un constituyente se caracteriza por su **tiempo de retención** t_R , que representa el tiempo transcurrido entre el instante de la introducción de la muestra en la columna y el momento en que dicho constituyente alcanza el máximo de señal en el detector. También se emplea el llamado tiempo de retención reducido o ajustado, que es la diferencia entre el tiempo de retención de un constituyente y el tiempo muerto. El tiempo muerto (t_m) se define como el tiempo necesario para que un constituyente no retenido (o la fase móvil) llegue al detector.

Se habla también en cromatografía del factor de retención (k) de un componente, que se define como:

$$k = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

cuanto mayor sea el tiempo que un componente es retenido en la columna mayor es su factor de retención.

Muy frecuentemente se considera un término denominado coeficiente de reparto o coeficiente de distribución (K):

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

Donde C_s y C_m son las concentraciones del componente considerado en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Coeficientes de distribución grandes favorecen una buena separación entre distintos componentes pero incrementan el tiempo necesario para la elución, lo que provoca un ensanchamiento de la banda del componente. Se debe por lo tanto buscar una solución de compromiso.

Desde el descubrimiento de la cromatografía se han propuesto diferentes teorías para conseguir una explicación del modelo cromatográfico. Una de las más conocidas es la **teoría de platos**. Aunque se trata de un modelo antiguo, hoy considerado obsoleto, permite describir de forma sencilla las separaciones. Consiste en considerar la separación cromatográfica como una serie de equilibrios sucesivos de distribución entre las fases móvil y estacionaria a medida que el soluto avanza por la columna. Estos equilibrios sucesivos se basan en el concepto de plato teórico, según el cual se puede imaginar la columna dividida de longitud L dividida en N segmentos en cada uno de los cuales se establece un equilibrio. Así aunque la cromatografía es un proceso continuo este modelo es un enfoque estático, que reproduce la migración del soluto en la columna mediante el encadenamiento de una serie de etapas estáticas. El

término plato teórico proviene de la teoría de platos descrita para la destilación, y aunque no tiene ningún significado físico real se ha aceptado y conservado universalmente.

La eficacia de una columna para separar solutos depende del número de platos teóricos. A mayor número de platos teóricos mejor es la separación. Para una columna de longitud dada, la eficacia de la separación será tanto mejor cuanto menor sea la altura equivalente de plato teórico (H):

$$H = L/N$$

En las expresiones consideradas hasta el momento solo se ha tenido en cuenta la naturaleza del componente y de las fases móvil y estacionaria para alcanzar los equilibrios sucesivos. Sin embargo, la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria con cierta velocidad. Por tanto, el movimiento del soluto no puede ser completamente descrito en términos de equilibrio, pues estaríamos suponiendo que el equilibrio se alcanza infinitamente rápido. Evidentemente, la velocidad de la fase móvil debe tener una incidencia en el avance de los solutos, su dispersión y por tanto en la eficacia de la separación.

La primera ecuación cinética que describió la influencia de la fase móvil en la eficacia de la columna es la ecuación de van Deemter, quien la desarrolló para columnas empaquetadas en cromatografía de gases. Posteriormente se han propuesto ecuaciones para otros tipos de columnas (capilares) y para cromatografía líquida. Aquí nos referiremos exclusivamente a la ecuación de van Deemter. Esta ecuación relaciona la altura equivalente de plato teórico (H) con la velocidad lineal media de caudal de la fase móvil (v):

$$H = A + \frac{B}{v} + C v$$

A, B y C son constantes características de cada columna. Se comprueba que existe un caudal óptimo para cada columna, correspondiente al mínimo de la curva representativa de esta ecuación. La explicación de este comportamiento se obtiene considerando los distintos mecanismos que contribuyen al aumento de la altura equivalente de plato teórico. Podemos imaginar estos factores como aquellos que provocan el ensanchamiento de la banda de un constituyente que se mueve a través de la fase estacionaria arrastrado por la fase móvil. Todos aquellos fenómenos que contribuyen al ensanchamiento de banda disminuyen la eficacia de la separación.

Estos fenómenos responsables del ensanchamiento de zona son:

- Difusión longitudinal: el soluto tiende a difundir hacia los bordes de la zona, ensanchando la banda. Cuanto menor es el caudal de fase móvil mayor es el ensanchamiento por difusión. (Término B/v).

- Transferencia de masa entre las fases: es responsable del término C_v , ya que el soluto requiere un cierto tiempo para transferirse entre las fases móvil y estacionaria, cuando el caudal es demasiado rápido no puede alcanzarse el equilibrio.
- Difusión turbulenta. Está relacionado con el perfil de caudal de la fase móvil a través de la fase estacionaria. El tamaño de las partículas de relleno, su distribución por tamaños y su regularidad son el origen de la formación de caminos preferentes. Por tanto, el soluto puede recorrer múltiples trayectorias de distinta longitud aleatoriamente. Este término (A) es independiente de la velocidad de la fase móvil.

Así la eficacia máxima de separación se obtiene cuando la altura equivalente de plato teórico (H) es mínima. Para velocidades menores que la óptima la difusión longitudinal causa un ensanchamiento de la banda y con ello un incremento de H. Para velocidades mayores que la óptima la dificultad para alcanzar el equilibrio entre las fases hace que la banda se extienda. Para un tipo dado de fase estacionaria cuanto menor es el tamaño de partícula mejor es la eficacia de la separación, ya que el soluto debe recorrer menores distancias para alcanzar el equilibrio. El problema es que cuanto menores son las partículas de relleno mayor resistencia se opone al flujo de fase móvil por lo que hay que trabajar con alta presión.

La **resolución cromatográfica** constituye una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos. La resolución se calcula a partir del cromatograma como:

$$R_s = \frac{\Delta Z}{w_A/2 + w_B/2} = \frac{2\Delta Z}{w_A + w_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

Cuanto mayor sea R_s mejor separados estarán los picos cromatográficos de los componentes A y B. La resolución de una columna aumenta al aumentar el número de platos teóricos de la misma y por lo tanto al aumentar la longitud.

Existen dos **modalidades de trabajo en cromatografía de elución**:

Isocrática: las condiciones cromatográficas permanecen constantes durante la separación.

En gradiente: las características de la elución se van modificando durante la separación. Con ello puede conseguirse una mejor resolución de mezclas complejas.

4. ANÁLISIS QUÍMICO CON MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía es actualmente el principal método utilizado para la separación de mezclas de especies químicas estrechamente relacionadas entre si. Se puede emplear para identificación cualitativa y determinación cuantitativa de las especies separadas.

Análisis cualitativo: el parámetro que puede usarse con fines cualitativos en cromatografía es el tiempo de retención. Este es característico de cada componente en cada sistema cromatográfico. Se trata sin embargo de una información pobre si se compara con otras técnicas de identificación (ej: espectroscópicas). Únicamente con el tiempo de retención resulta difícil asegurar la presencia de un componente en una mezcla, aunque si se puede afirmar la ausencia. La identificación requiere siempre el uso de patrones en las mismas condiciones cromatográficas.

Análisis cuantitativo: se basa en la comparación del area o altura de pico del componente de interés con la de estándares de esta sustancia de concentración conocida, admitiendo que existe una relación lineal entre el area o altura de pico y la concentración en un determinado intervalo de concentraciones. En los análisis basados en altura de pico se requiere que la anchura de los picos no sufra modificación durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y los estándares para obtener resultados exactos. Por ello suele usarse mucho más el análisis basado en área de pico, parámetro independiente de los efectos de ensanchamiento.

El método más sencillo de la calibración consiste en el uso de patrones externos. Se obtienen los cromatogramas de disoluciones patrón de distinta concentración y se representa el área de pico en función de la concentración para construir la curva de calibrado. Esto debe corresponder a una recta que pasa por el origen. Por interpolación se obtiene la concentración de ese constituyente en la muestra.

Cuando se utiliza este método en cromatografía la fuente de error más frecuente es la irreproducibilidad en la inyección de un volumen muy pequeño en la cabeza de la columna. En equipos dotados de muestreadores automáticos esto no supone un problema. Pero si la inyección de muestra se hace manualmente si. En este caso pueden conseguirse mejores resultados si se emplea el método del estándar interno. En este procedimiento se añade a la muestra y a cada disolución patrón una cantidad exactamente medida de otra sustancia a la que se denomina estándar interno. Como

parámetro cuantitativo se emplea ahora la relación entre el área de pico del componente de interés y el área de pico del estándar interno. De este modo se compensan variaciones en el volumen de muestra inyectado. Entre los requisitos que debe cumplir el estándar interno es que su pico cromatográfico se encuentre bien resuelto respecto a los que constituyen la muestra y que no debe encontrarse inicialmente en la muestra.

5. CROMATOGRAFÍA DE GASES

1. Introducción
2. Componentes básicos de un cromatógrafo de gases.
3. Análisis cuantitativo empleando cromatografía de gases
4. Preparación de muestras ambientales para cromatografía de gases
5. Aplicaciones más relevantes en medio ambiente

5.1. Introducción

En cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de la columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil gaseosa. La fase móvil en cromatografía de gases es un gas inerte, es decir, no interacciona con las moléculas de analito, sólo las transporta a través de la fase estacionaria.

La fase estacionaria en cromatografía de gases puede ser un sólido (cromatografía gas-sólido), produciéndose entonces la retención de las moléculas de analito por adsorción. Este tipo de cromatografía es poco frecuente. Lo más habitual es que la fase estacionaria sea un líquido (cromatografía gas-líquido). En este caso la fase móvil es un líquido no volátil inmovilizado sobre la superficie de un sólido inerte. Se trata entonces de una cromatografía de partición. Los analitos se distribuyen entre las fases móvil (gaseosa) y estacionaria (líquida).

5.2. Componentes básicos de un cromatógrafo de gases.

Un cromatógrafo de gases consta de sistema de suministro de fase móvil, sistema de inyección de muestra, columna cromatográfica situada en horno termostático y detector.

1. Suministro de fase móvil (gas portador).

Los gases más usados son helio, argón, nitrógeno e hidrógeno. El gas suele venir determinado por el tipo de detector que se va a emplear. Con el suministro de gas portador van asociados reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo.

2. Sistema de inyección de muestra. Para que la separación sea eficaz es necesario un sistema que permita la introducción de una muestra de tamaño adecuado de forma rápida. La introducción de muestras grandes o demasiado lentamente provoca la aparición de bandas anchas lo que se traduce en una resolución pobre. El método más sencillo de introducción de la muestra es el empleo de una microjeringa. La muestra se inyecta a través de un tapón de goma (septum) en una cámara de vaporización situada en la cabeza de la columna (figura). La temperatura de esta

cámara está unos 50 grados centígrados por encima de la temperatura de volatilización del componente menos volátil de la muestra. El volumen de muestra inyectado es de unos pocos microlitros. Las columnas denominadas capilares necesitan mucha menor cantidad de muestra, por ello suele usarse un divisor de muestra, que permite pasar a la columna sólo una pequeña fracción del volumen inyectado desechando el resto. Este sistema de inyección manual tiene como principal inconveniente la poca reproducibilidad de la inyección. Esto puede mejorarse con inyectoros automáticos.

3. Columna cromatográfica situada en horno termostaticado. En ella se va a producir la separación de los analitos. Existen dos tipos de columnas, las columnas empaquetadas (o de relleno) y las capilares (o tubulares abiertas). Las **empaquetadas** son columnas rellenas con un soporte sólido de grano muy fino que bien actúa como fase estacionaria o está recubierto de una fina capa de fase estacionaria líquida no volátil. El soporte ideal son pequeñas partículas esféricas de tamaño uniforme y gran superficie específica. El material debe ser inerte y resistente a elevadas temperaturas. El soporte más usado es la tierra de diatomeas, consistente en los esqueletos de sílice de algas microscópicas. Estas columnas poseen diámetros de 3-6 mm y longitud de 1-5 metros.

Las columnas **tubulares abiertas o capilares** son más estrechas (0.2-0.5 mm) y suelen ser mucho más largas (10-100 m). La pared interior de la columna se recubre con una película de la fase estacionaria, (sólida o líquida) con un espesor de unas pocas micras. De este modo al no existir la oposición del relleno al paso del gas pueden hacerse más largas. Estas columnas poseen una menor AEPT que las columnas empaquetadas, pues el término A de la ecuación de van Deemter, asociado a la multitud de trayectorias posibles desaparece. La cantidad de muestra necesaria para estas columnas es menor que para las empaquetadas. Todo ello se traduce en que las columnas capilares poseen mucha mejor resolución, mayor sensibilidad y necesitan menor tiempo de análisis. Por ello prácticamente han reemplazado por completo a las empaquetadas.

Las **FASES ESTACIONARIAS** en cromatografía de gases juegan un papel decisivo, puesto que la fase móvil es inerte. Estas son en su mayoría líquidas como ya se ha comentado y deben cumplir una serie de requisitos:

- baja volatilidad: su temperatura de ebullición debe estar al menos 100 grados por encima de la temperatura máxima de trabajo
- deben ser estables a temperaturas elevadas
- deben ser químicamente inertes (no reaccionar)

Existe una gran variedad de fases estacionarias líquidas. La selección de una u otra suele hacerse empíricamente. Debe buscarse que la fase estacionaria disuelva los componentes de la mezcla separar de forma diferente, que no queden muy retenido ni tampoco demasiado poco. En general suele seguirse el principio de que lo semejante disuelve a lo semejante. Así, se utilizan fases estacionarias polares para separar compuestos polares, dichas fases suelen tener grupos tipo $-\text{CN}$, $-\text{CO}$, $-\text{NH}$. Las fases estacionarias apolares se emplean para separar compuestos apolares.

Además del empleo de líquidos no volátiles como fases estacionarias, es cada vez más frecuente el uso de **fases enlazadas**. Se trata de moléculas unidas covalentemente al soporte sólido para minimizar la pérdida de fase líquida de la columna.

La columna cromatográfica se encuentra en el interior de un horno termostatzado, ya que la temperatura es una variable crucial en las separaciones por cromatografía de gases. La temperatura afecta al equilibrio de distribución de los analitos entre la fase móvil y estacionaria. Cuando se aumenta la temperatura de la columna se acelera la elución. La temperatura óptima reflejará un equilibrio entre la consecución de la resolución necesaria y la velocidad de la separación. Puede trabajarse a temperatura constante (isotérmicamente) o con programación de temperaturas (en gradiente o rampa de temperatura). Esta última modalidad permite separar grupos de compuestos con volatilidad muy variada en periodos de tiempo más breves.

4. Detectores. El detector es el sistema encargado de poner de manifiesto la presencia de solutos que salen de la columna cromatográfica. Se han usado muchos detectores. Las características de un detector ideal en cromatografía de gases son:

- adecuada sensibilidad
- buena estabilidad y reproducibilidad
- respuesta lineal en un intervalo amplio de concentración
- amplio intervalo de temperatura de trabajo
- tiempo de respuesta corto

En ocasiones interesa que el detector responda de forma semejante a todos (o muchos) los compuestos, estos detectores se denominan universales. En otros caso interesan detectores selectivos, que responde a determinadas familias de compuestos.

Comentaremos algunos de los detectores más habituales:

a) Detector de ionización de llama (FID). La respuesta el detector se debe a la combustión de los compuestos orgánicos en una llama de aire-hidrógeno. Los

compuestos orgánicos al quemarse producen iones y electrones, que pueden conducir la corriente eléctrica. Se mide la intensidad de corriente entre dos electrodos situados a los lados de la llama. Es uno de los detectores más utilizados, debido a su respuesta casi universal a los compuestos orgánicos. Solo los gases no combustibles, como CO_2 , SO_2 , óxidos de nitrógeno N_2O , NO , NO_2 , NH_3 no producen respuesta en este detector. Este detector posee elevada sensibilidad (10^{-13} g/s), amplio intervalo lineal de respuesta (10^7) y bajo ruido de fondo. Se trata de un detector destructivo.

b) Detector de conductividad térmica. Este detector responde a cualquier soluto cuya conductividad térmica sea diferente de la del gas portador. Este término se refiere a la capacidad de una sustancia de transportar calor de una región caliente a una fría. El funcionamiento se basa en la disminución de la conductividad del gas portador cuando un soluto sale de la columna. Se suele usar generalmente por su elevada conductividad térmica. Se emplea un filamento calentado eléctricamente cuya resistencia depende del calor disipado. Se necesita una referencia, un gas que no pasa por la columna. Este detector sensible que el anterior y suele emplearse para aquellas especies que no producen respuesta en el FID, puesto que responde a cualquier compuesto cuya conductividad térmica sea diferente a la del gas portador. Es un detector no destructivo, por lo que puede emplearse en serie con otros y así mejorar la cantidad de información obtenida.

Además de estos detectores universales, se pueden usar otros más selectivos. Comentaremos dos especialmente relevantes en aplicaciones medioambientales.

c) Detector de nitrógeno y fósforo (NPD). Es un detector basado en una modificación del FID. La presencia de iones alcalinos en una llama disminuyen las ionizaciones de los grupos C-H y aumentan la de grupos que contienen átomos de N y P, generando una respuesta muy selectiva para moléculas que contienen estos átomos.

d) Detector de captura electrónica: se basa en el hecho de que las especies muy electronegativas pueden captar electrones formando iones cargados negativamente. La producción de electrones se consigue mediante un emisor beta. El flujo de electrones (señal de fondo) disminuye cuando salen de la columna especies capaces de capturar electrones. Es un detector muy sensible a moléculas que contengan átomos halógenos.

Además pueden emplearse otros tipos de detección como la fotometría de llama, se mide la emisión atómica. Útil para especies con S y P. Un caso aparte son los

acoplamiento de cromatógrafos con detectores más potentes, que proporcionan mucha mayor cantidad de información cualitativa. EJ. Con espectroscopia infrarroja.

5.3. Análisis cuantitativo empleando cromatografía de gases

El análisis cuantitativo empleando cromatografía de gases se basa en la comparación del área o altura de los picos del analito en la muestra con el área o altura de los picos de estándares de concentración conocida de esta sustancia. Para la calibración el método más sencillo es preparar disoluciones patrón de diferente concentración, obtener los cromatogramas y representar altura o área de pico. Esto debería dar una recta que pasa por el origen. Sin embargo si se emplea este método en cromatografía de gases con inyección manual de la muestra, la falta de reproducibilidad de la inyección de pequeños volúmenes produce malos resultados. Pueden conseguirse mejores resultados empleando el método del estándar interno. Este consiste en añadir a la muestra y a los patrones una cantidad constante de otro compuesto al que llamamos estándar interno. Después se emplea como parámetro para construir la recta de calibrado la relación de áreas entre la especie de interés y el estándar interno. De este modo se compensa la variabilidad en el volumen de muestra introducido. El estándar interno debe elegirse de tal modo que su pico esté bien separado de los otros constituyentes de la muestra.

5.4. Preparación de muestras ambientales para cromatografía de gases

La mayoría de los métodos para la determinación de compuestos orgánicos en muestras ambientales (ej: aguas) implican una etapa de extracción de estos compuestos previa al análisis cromatográfico. Ello no se debe solo a la necesidad de preconcentrar. A pesar de que en muchos casos la sensibilidad es suficiente para permitir el análisis directo, la mayoría de las fases estacionarias son incompatibles con la inyección de agua y compuesto no volátiles. Además la extracción selectiva puede simplificar el cromatograma, especialmente en muestras biológicas complejas.

Los procedimientos más usados son:

- Extracción con disolventes: si la muestra es de agua se hace una extracción líquido-líquido con un disolvente inmiscible con agua y compatible con la fase estacionaria. Luego debe secarse este disolvente. Las muestras sólidas se tratan con disolventes apropiados para extraer selectivamente los analitos.
- Extracción en fase sólida: la muestra, generalmente de agua, se hace pasar a través de una columna que contiene un material adsorbente. Los analitos quedan retenidos selectivamente y luego son eluidos con un pequeño volumen de disolvente orgánico.

- Cromatografía de espacio de cabeza: se utiliza para determinar los constituyentes volátiles de muestras sólidas o líquidas analizando la fase de vapor que se encuentra en equilibrio termodinámico con la muestra en un recipiente cerrado. Un calentamiento suave favorece el establecimiento de este equilibrio.
- Técnica de Purga y Atrapamiento: consiste en extraer los componentes volátiles de una muestra líquida, generalmente acuosa usando un gas inerte de purga. Generalmente después los compuestos son retenidos en un adsorbente que luego se somete a calentamiento para liberarlos e introducirlos en el cromatografo.

5.5. Aplicaciones más relevantes en medio ambiente

La cromatografía de gases es el método más aconsejado para separar y analizar compuestos orgánicos volátiles (punto ebullición < 250°C). Compuestos de punto de ebullición mas alto suelen descomponer a la temperatura necesaria para eluirlos de la columna en un tiempo razonable. En ocasiones se pueden emplear reacciones químicas para formar derivados volátiles.

Las aplicaciones más relevantes en medio ambiente son:

Análisis de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, funguicidas..) en aguas suelos, etc. Suelen emplearse distintos detectores según la naturaleza de los compuestos. Es frecuente el análisis de pesticidas organoclorados empleando el detector de captura electrónica. Para los compuestos con átomos de P y N se emplea el detector selectivo NPD. Si contienen S puede usarse el fotométrico de llama.

Análisis de disolventes organoclorados en aguas empleando el detector de captura electrónica.

Análisis de compuestos orgánicos en general, para los que se emplea el detector FID.

Además la cromatografía de gases es muy útil para el análisis de gases inorgánicos en muestras de aire. En este caso casi sin preparación de la muestra. Para estos gases suele usarse cromatografía gas-sólido (es uno de los escasos ejemplos). Los sólidos empleados suelen separar los gases en función del tamaño molecular. Como detector suele usarse el de conductividad térmica.

6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

1. Introducción
2. Instrumentación
3. Cromatografía de partición
4. Cromatografía de adsorción
5. Cromatografía iónica
6. Cromatografía de exclusión por tamaños

6.1 Introducción

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la más utilizada. Esta técnica deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna, en la que la cromatografía se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Para que el flujo de fase móvil fuese razonablemente rápido las partículas de fase estacionaria debían ser de gran diámetro (150-200 μm), lo que se traducía en una separación poco eficaz y, a pesar de todo, lenta. Para aumentar la eficacia de la separación y así incrementar la resolución era necesario emplear fases estacionarias con tamaño de partícula mucho menor (entre 2 y 5 μm), ya que la difusión de los solutos entre las fases móvil y estacionaria se hace más rápida. Pero ello implica la necesidad de impulsar la fase móvil con un sistema de alta presión, nace así la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6.2. Instrumentación general

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables, normalmente constituyendo módulos con funciones bien definidas. La circulación de fase móvil entre los distintos módulos se hace a través de conductos tubulares. Deben emplearse siempre diámetros de tubo muy pequeños a fin de reducir el efecto del ensanchamiento de banda extracolumnar.

Los elementos indispensables en cualquier cromatógrafo de HPLC son: sistema de suministro de fase móvil (con depósito de disolventes y bomba de alta presión), sistema de inyección y detector continuo. Existen además otros elementos adicionales que pueden mejorar algunos aspectos de la separación o la detección.

a) Sistema de suministro de fase móvil

Todos los equipos de HPLC incluyen un sistema de bombeo de fase móvil de alta presión para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna, cuyo relleno muy compacto, es responsable de una importante sobrepresión. Los requisitos del sistema

de bombeo en HPLC son muy rigurosos ya que en algunos detectores las fluctuaciones en el flujo de fase móvil dan lugar a fluctuaciones de la señal, produciendo un ruido de fondo que impide la observación de señales débiles. En HPLC es deseable que el control y la reproducibilidad del caudal de fase móvil sean mejores que el 0.5%. Existen diferentes tipos de bombas de alta presión con distintas características, ventajas e inconvenientes. Las más frecuentes son bombas de pistón.

En HPLC, para una fase estacionaria concreta, la naturaleza de la fase móvil es el factor clave en la separación. Puede trabajarse en dos modalidades:

Isocrática: la composición de la fase móvil permanece constante durante la separación

En gradiente: la composición se va modificando durante la separación. Para trabajar en esta modalidad el cromatógrafo debe disponer de un sistema de programación de gradiente, que permita la mezcla reproducible de disolventes en distintas proporciones durante la separación cromatográfica.

Un requisito técnico importante es que los disolventes empleados deben carecer de gases disueltos, ya que estos pueden provocar serios problemas por formación de burbujas. Es frecuente por ello la desgasificación de los disolventes.

b) Sistema de inyección de muestra

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto período de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación de fase móvil establecido en la columna y el detector. Además, los volúmenes empleados son pequeños, unos pocos microlitros, lo que se traduce en muchos casos en que el factor limitante de la reproducibilidad del método es la reproducibilidad con que puede introducirse la muestra en la columna. El sistema más utilizado son válvulas rotatorias de alta presión de varias vías manuales o automatizadas. Estas válvulas poseen dos posiciones. En la **posición de llenado** la bomba y la columna están comunicadas y la muestra se introduce a presión atmosférica con ayuda de una jeringa en un pequeño depósito de forma tubular (bucle). El bucle puede escogerse de diferente volumen (5-500 μL). En la **posición de inyección** gracias a la rotación de la válvula la muestra es arrastrada por el flujo de la fase móvil e introducida en la columna.

c) Columna cromatográfica

Las columnas de HPLC son tubos rectos de acero que miden entre 3 y 30 cm de longitud. Su diámetro entre 2 y 5 mm. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados en los extremos de la columna.

En HPLC se emplean dos tipos de relleno para las columnas:

- Relleno pelicular: se utilizan bolitas de vidrio o polímero no porosas esféricas de diámetro entre 30-40 μm . Sobre su superficie se deposita una capa delgada de partículas muy pequeñas (2-5 μm) gel de sílice, alúmina o un cambiador iónico que actúan como fase estacionaria. Si la fase estacionaria es líquida se coloca una fina película de líquido sobre las esferas no porosas.

- Partículas porosas: se trata de micropartículas porosas con tamaños entre 3-10 μm de sílice, alúmina o cambiadores iónicos, que actúan como fases estacionarias. También pueden recubrirse con películas orgánicas líquidas retenidas por adsorción.

Son más fáciles de empaquetar pero menos eficaces que las segundas

Además pueden emplearse fases enlazadas, que son generalmente partículas de gel de sílice modificadas químicamente. Estas resultan mucho más estables que los líquidos retenidos físicamente.

Muchas veces para alargar la vida de la columna analítica se añaden precolumnas con objeto de retener impurezas de la muestra que podrían perjudicar la columna cromatográfica. El relleno de la precolumna es similar al de la columna analítica pero con mayor tamaño de partícula.

En HPLC no suele ser necesario un control estricto de la temperatura de la columna, aunque si resulta aconsejable controlarla en un intervalo de unos pocos décimas de grado para obtener resultados más reproducibles.

d) Detector

Un detector ideal en HPLC debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que dura el cromatograma. Además, en caso de que se utilice gradiente debe ser insensible a los cambios de composición de la fase móvil. Es también importante que la celda de flujo del detector tenga un volumen mínimo para no provocar ensanchamiento de las bandas. La mayoría de los detectores empleados responden a alguna propiedad característica de los compuestos a analizar aunque existen también detectores que responden a la variación de una propiedad de la fase móvil debido a la presencia de solutos.

Algunos de los detectores más usados son:

Detectores espectrofotométricos. Miden la absorbancia a una o varias longitudes de onda en el ultravioleta o en el visible. La fase móvil no debe ser muy absorbente. Es muy frecuente emplear detección en UV a 254 nm donde absorben gran cantidad de compuestos orgánicos. En instrumentos más versátiles pueden seleccionarse otras longitudes de onda e incluso registrar espectros completos. Este detector puede emplearse con gradiente si se utilizan disolventes no absorbentes.

Detectores de fluorescencia: miden la emisión fluorescente por parte de los analitos. Es un detector muy sensible, pero aplicable solo a compuestos fluorescentes. Su campo de aplicación puede ampliarse mediante reacciones de formación de compuestos fluorescentes que se realizan en el propio sistema cromatográfico mediante un reactor situado antes o después de la columna de separación.

Detectores electroquímicos: se basan en métodos electroanalíticos como la amperometría, coulombimetría, voltamperometría. Detectan compuestos electroactivos, es decir, susceptibles de sufrir reacciones de oxidación o reducción. También puede emplearse medidas de conductividad eléctrica.

Detectores refractométricos: se basan los cambios del índice de refracción de la fase móvil por la presencia de un soluto. En general su funcionamiento se basa en lo que sucede cuando un haz luminoso pasa a través de una celda que está dividida en dos compartimientos, uno de los cuales contiene el disolvente empleado como fase móvil y el otro el efluente de la columna. Cuando no se está eluyendo ningún soluto el índice de refracción de los líquidos contenidos en los dos compartimientos es igual y el haz no sufre ningún desplazamiento. Sin embargo, cuando algún componente es eluido la diferencia entre los índices de refracción hace que el haz de luz se desplace, provocando un cambio en la señal proporcional a la concentración de soluto. Se trata de un detector universal. Es menos sensible que los detectores espectrofotométricos y además se ve muy afectado por los cambios de temperatura y no puede utilizarse en gradiente.

Otros detectores más complejos pueden proporcionar información más específica que permita la identificación inequívoca de compuestos, proporcionando mucha más información cualitativa que el tiempo de retención.

6.3. Cromatografía de partición

Se trata probablemente del tipo más usado de cromatografía líquida de alta resolución. En ella se considera tanto el uso de fases líquidas retenidas sobre un soporte sólido como el de fases enlazadas unidas químicamente al soporte sólido.

La separación de los solutos se basa en la diferente solubilidad entre las fases móvil y estacionaria. En general la fase estacionaria debe tener polaridad semejante a la de los analitos y la fase móvil se escoge de diferente polaridad (aunque no tan diferente que el tiempo de retención sea excesivamente largo).

Suele hablarse de dos tipos de cromatografía de partición:

Cromatografía en fase normal: emplea fases estacionarias polares y la móvil es poco polar.

Cromatografía en fase inversa: la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar. En ella los compuestos polares son eluidos más rápido que los apolares, al contrario que en cromatografía en fase normal. Actualmente es la más utilizada.

La fase estacionaria más usada es gel de sílice (polar) modificado para variar su características, reteniendo líquidos o fases enlazadas de diferente polaridad.

Una vez fijada la fase estacionaria las características de la fase móvil son el factor clave de la separación cromatográfica. Las fases móviles se caracterizan por los su capacidad de desplazamiento y selectividad. En fase normal los disolventes polares eluyen más rápidamente (tienen mayor capacidad de desplazamiento) mientras que en fase inversa es al revés. La selectividad se basa en las interacciones específicas entre el soluto y la fase móvil. Puede emplearse elución isocrática o en gradiente.

La aplicación típica de la cromatografía de reparto es la separación y determinación de compuestos orgánicos. En medio ambiente son especialmente destacables las determinaciones de residuos de plaguicidas (herbicidas, fungicidas e insecticidas), fenoles, e hidrocarburos (PCBs, PAHs, etc).

Un tipo particular de cromatografía de reparto en fase inversa es la cromatografía de pares iónicos. Se emplea para la separación y determinación de especies iónicas voluminosas. La fase móvil está formada por una disolución acuosa que contiene cierta proporción de un disolvente orgánico miscible (ej: acetonitrilo o metanol) y un compuesto iónico que aporta un contraión de carga opuesta a los analitos. Este ión se combina con los analitos formando un par iónico, que es una especie neutra que puede interactuar y ser retenida por la fase estacionaria apolar. Suele emplearse

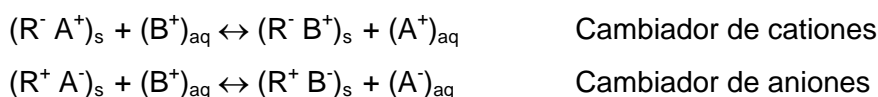
para la determinación de iones grandes, como los surfactantes. También ha ofrecido buenos resultados para iones como nitrato (NO_3^-) y clorato (ClO_3^-).

6.4. Cromatografía de adsorción

En la cromatografía de adsorción el relleno sólido de la columna actúa como fase estacionaria. Las fases estacionarias típicas son sílice y alúmina ambas polares. Como la fase estacionaria es polar suelen emplearse fases móviles apolares o moderadamente polares. Para seleccionar la fase móvil suele considerarse no sólo la polaridad sino también la fuerza eluyente, que es un parámetro relacionado con la energía de adsorción del disolvente por unidad de superficie (parámetro que también depende del adsorbente). Las fases típicas son hexano, isooctano y diclorometano. La selección es empírica y es frecuente el empleo de mezclas. Esta cromatografía es menos usada que la de reparto.

6.5. Cromatografía iónica

En cromatografía iónica se emplean cambiadores de iones como fases estacionarias. Los cambiadores de iones son redes tridimensionales de macromoléculas con ciertas cargas electrostáticas fijas por unidad estructural. Pueden tomar iones de una disolución electrolítica y ceder otros de la misma carga en cantidad equivalente. Por lo tanto, los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo que se encuentran retenidos sobre la superficie de un sólido insoluble de elevada masa molecular (cambiador de iones):



Se trata de un equilibrio heterogéneo. La constante que rige este equilibrio se llama coeficiente de selectividad y se suele representar como E_A^B . Cuanto mayor es el valor de E_A^B tanto mayor será la afinidad de B por el cambiador iónico comparada con la de A. Para facilitar la comparación entre distintos iones suele usarse $E_H^{\text{catión}}$ y $E_{\text{OH}}^{\text{anión}}$. En general los iones de mayor carga y menor radio hidratado son más fuertemente retenidos.

Los rellenos de cambio iónico empleados como fases estacionarias suelen ser polímeros activados introduciendo en su estructura grupos funcionales cargados, generalmente ácidos o básicos. Son frecuentes por ejemplo los cambiadores con grupos $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NR}_4^+$.

La fase móvil en cromatografía de cambio iónico suele ser una disolución acuosa (con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua) que contiene especies iónicas en forma, generalmente, de disolución reguladora del pH (variable clave en la elución). Los iones de la fase móvil compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria. Por ello, la fuerza eluyente y la selectividad de la fase móvil dependen del tipo y concentración de iones añadidos.

La cromatografía iónica tardó en desarrollarse debido a la falta de un buen sistema de detección. La elección evidente es un **detector conductimétrico**. El problema surge debido a la elevada concentración iónica de necesaria para eluir a la mayoría de los iones en un tiempo razonable. Ello hace que la conductividad de la propia fase móvil sea muy elevada haciendo muy difícil la detección de pequeñas concentraciones de analito. Este problema se resolvió mediante un sistema supresor de conductividad colocado a la salida de la columna cromatográfica. Los primeros sistemas supresores utilizados fueron columnas de intercambio iónico que convierten los iones del disolvente en especies moleculares poco ionizadas y por lo tanto poco conductoras. Así, por ejemplo, cuando se separan cationes es frecuente emplear una disolución de HCl como eluyente. La columna supresora es aniónica y contiene iones OH^- . Al paso de la fase móvil por la columna supresora los Cl^- son intercambiados por iones OH^- . De este modo se ha sustituido el HCl muy conductor por H_2O poco conductora. En la separación de iones es frecuente usar HCO_3Na y CO_3Na_2 en la fase móvil. La columna supresora es en este caso catiónica. De este modo el Na^+ es sustituido por H^+ formándose un electrolito débil como H_2CO_3 .

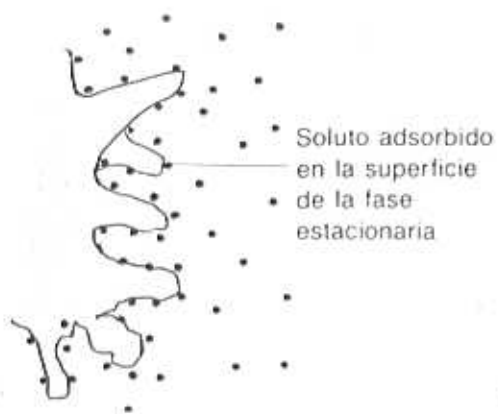
El inconveniente de este sistema es la necesidad de regenerar periódicamente la columna supresora. Más recientemente se han desarrollado otros sistemas supresores (supresores de membrana) que operan en modo continuo. El eluyente y la disolución regeneradora fluyen en direcciones opuestas a ambos lados de unas membranas semipermeables cambiadoras de iones. También, se han descrito sistemas en lo que no se emplea sistema supresor, sino una columna cromatográfica con un cambiador iónico de baja capacidad lo que permite emplear como fase móvil disoluciones con pequeña concentración de iones.

Además del detector conductimétrico pueden emplearse otros detectores, como la detección absorciométrica en UV-visible. Para ello es necesario que los analitos absorban radiación ultravioleta o visible. Si esto no ocurre puede emplearse una fase móvil que contenga alguna especie absorbente detectándose los solutos indirectamente por la disminución de la absorción de la fase móvil.

La cromatografía iónica tiene importantes aplicaciones en análisis de aguas. La determinación de cationes funciona bien para alcalinos y alcalinoterréos. Para otros cationes la diferencia en los coeficientes de selectividad no es suficiente para permitir la separación directa y son necesarios otros métodos como la formación de especies que si presentan más diferencia. En cambio, para la determinación de aniones en aguas resulta uno de los mejores métodos posibles. Con cromatografía iónica pueden determinarse los iones más habituales de forma mucho más rápida que empleando métodos individuales de análisis para cada uno.

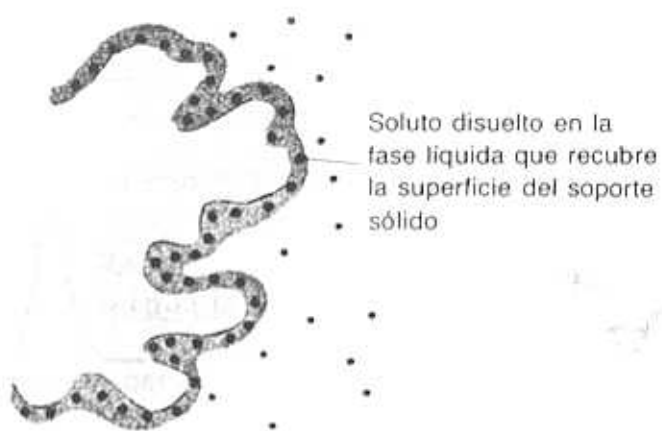
6.6. Cromatografía de exclusión por tamaños

Se denomina también cromatografía en geles permeables, de filtración en geles o de exclusión molecular. Los rellenos están constituidos por pequeñas partículas poliméricas que contienen una red de poros en la que pueden difundir las moléculas de soluto y disolvente. La base de la separación es la capacidad del soluto para penetrar en los poros de la fase estacionaria. Las moléculas con un tamaño significativamente menor que el de los poros atraviesan la columna entera sin ser retenidos. Los solutos demasiado grandes como para penetrar en los poros tampoco resultan retenidos. En cambio las moléculas de tamaño intermedio se separan en función de su tamaño. Este tipo de cromatografía se aplica para la separación de especies de elevado peso molecular (polímeros y biomoléculas como las proteínas).



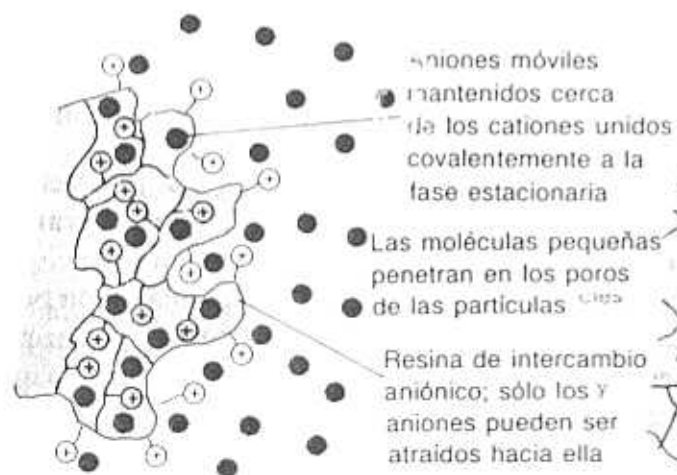
Soluto adsorbido en la superficie de la fase estacionaria

Cromatografía de adsorción



Soluto disuelto en la fase líquida que recubre la superficie del soporte sólido

Cromatografía de reparto

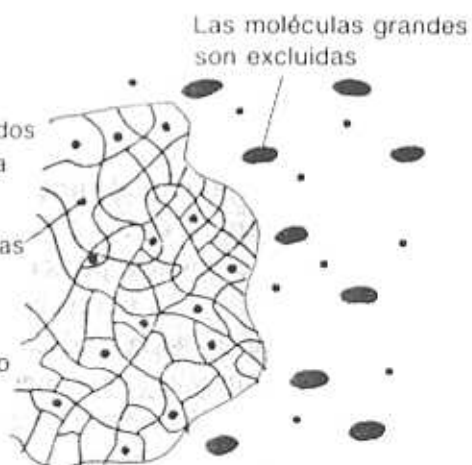


Aniones móviles mantenidos cerca de los cationes unidos covalentemente a la fase estacionaria

Las moléculas pequeñas penetran en los poros de las partículas

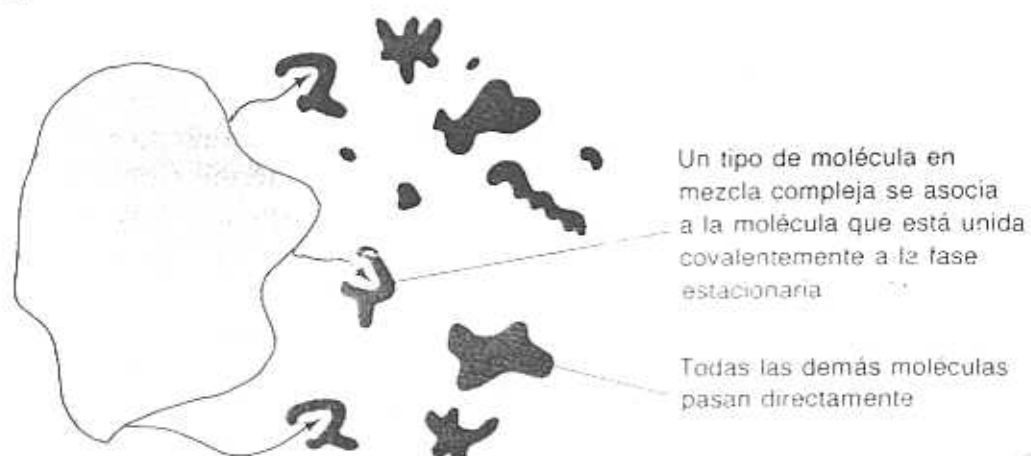
Resina de intercambio aniónico; sólo los y aniones pueden ser atraídos hacia ella

Cromatografía de intercambio iónico



Las moléculas grandes son excluidas

Cromatografía de exclusión molecular



Un tipo de molécula en mezcla compleja se asocia a la molécula que está unida covalentemente a la fase estacionaria

Todas las demás moléculas pasan directamente

Cromatografía de afinidad

TABLA 24-1
 Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

| Clasificación general | Método específico | Fase estacionaria | Tipo de equilibrio |
|--|-----------------------------|--|---|
| Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquida) | Líquido-líquido, o reparto | Líquido adsorbido sobre un sólido | Distribución entre líquidos inmiscibles |
| | Líquido-fase enlazada | Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida | Distribución entre un líquido y una superficie enlazada |
| | Líquido-sólido, o adsorción | Sólido | Adsorción |
| | Intercambio iónico | Resina de intercambio iónico | Intercambio iónico |
| | Exclusión por tamaño | Líquido en los intersticios de un sólido polimérico | Distribución/exclusión |
| Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas) | Gas-líquido | Líquido adsorbido sobre un sólido | Distribución entre un gas y un líquido |
| | Gas-fase enlazada | Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida | Distribución entre un líquido y una superficie enlazada |
| | Gas-sólido | Sólido | Adsorción |
| Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico) | | Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida | Distribución entre un fluido supercrítico y una superficie enlazada |

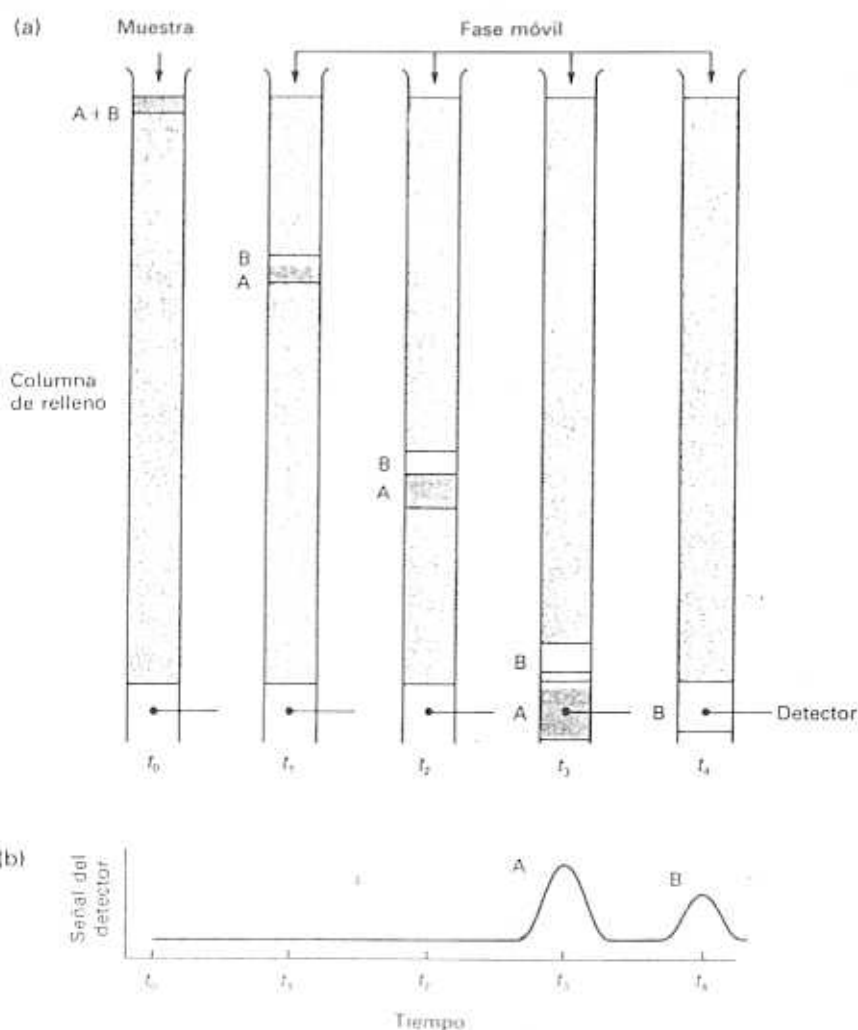
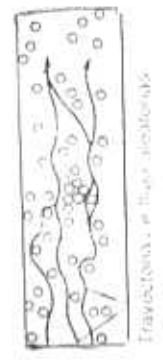
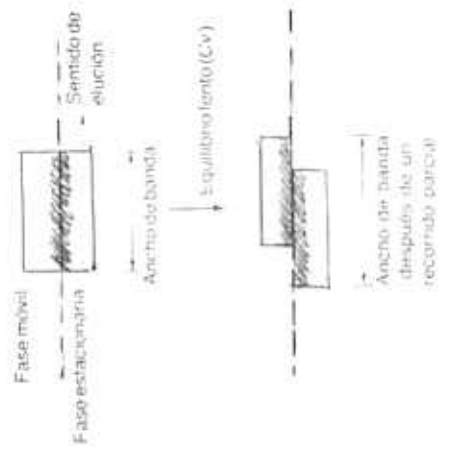
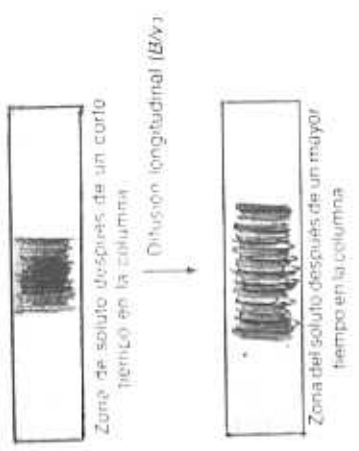
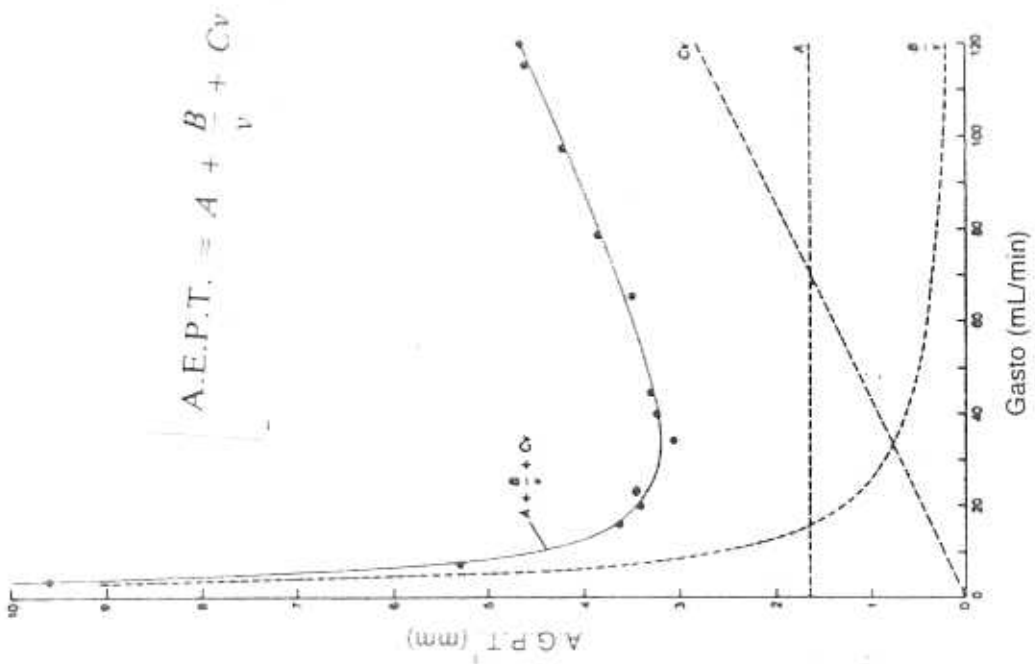


FIGURA 24-1. (a) Diagrama que muestra la separación de una mezcla de componentes A y B por cromatografía de elución en columna. (b) Salida de la señal del detector en las diversas fases de la elución mostradas en (a).



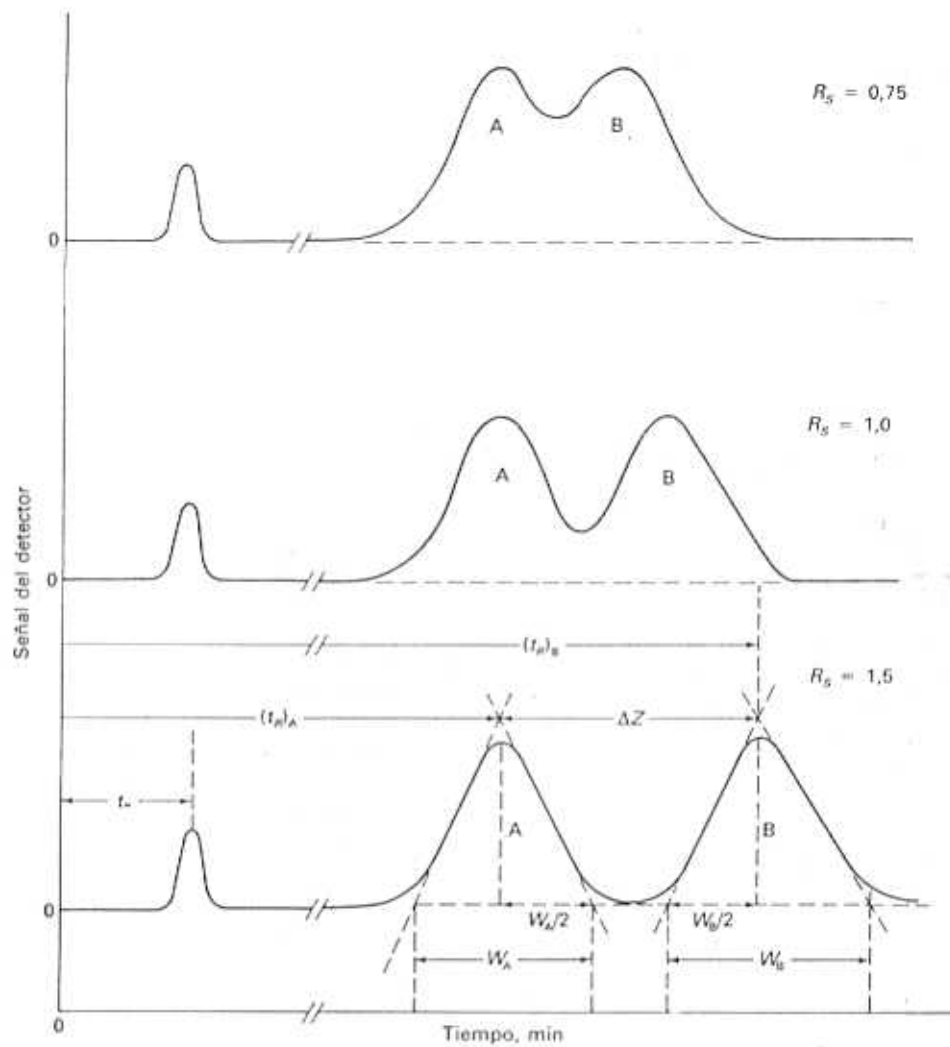


FIGURA 24-11. Separaciones correspondientes a tres resoluciones distintas. Aquí, $R_s = 2 \Delta Z / (W_A + W_B)$.

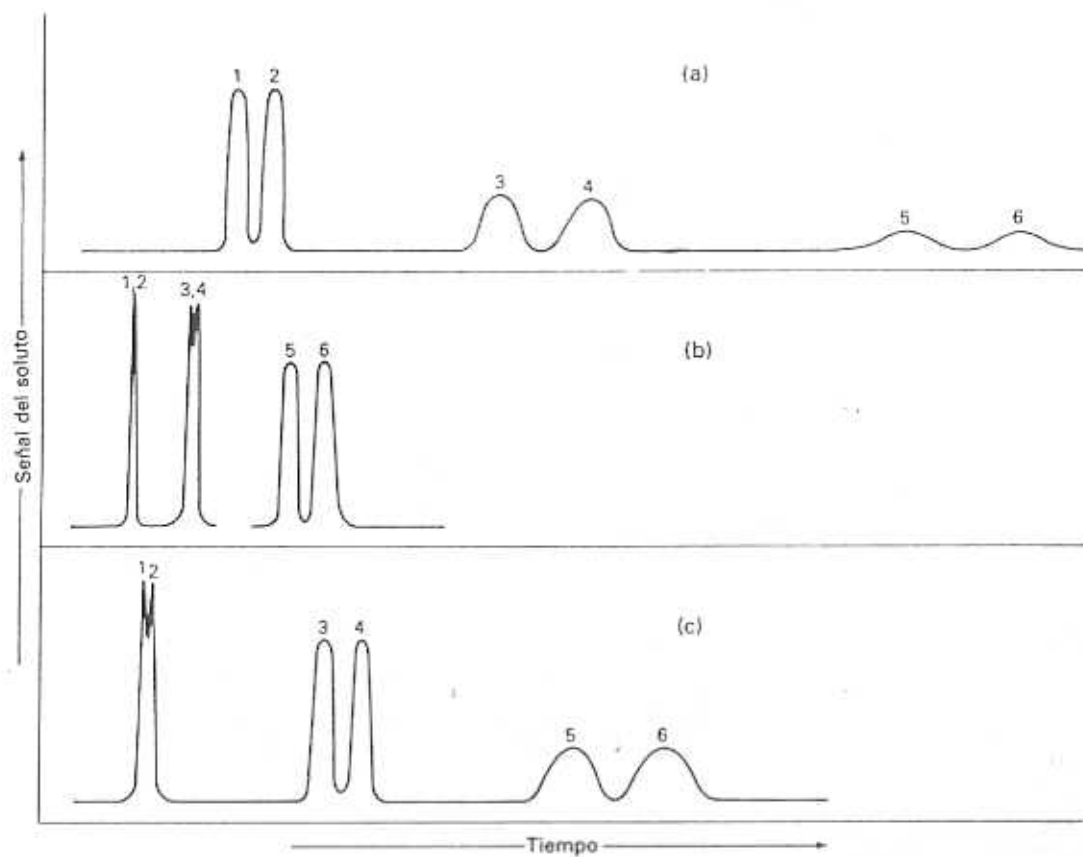


FIGURA 24-14. Ilustración del problema general de la elución en cromatografía.

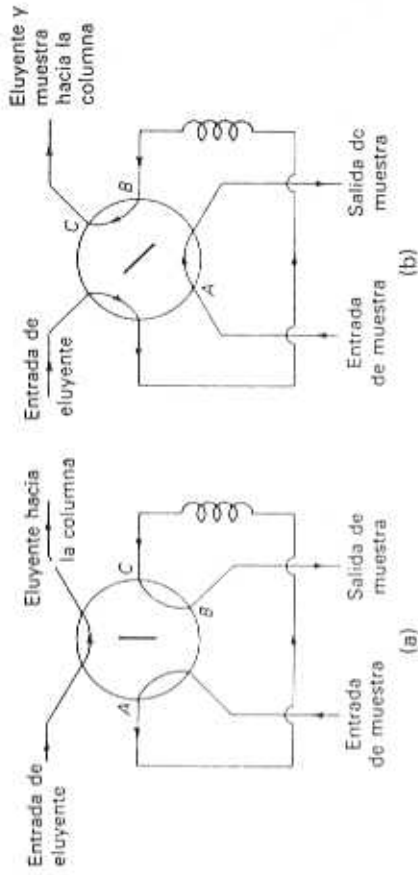


FIGURA 24-15. Una válvula rotatoria de muestra: posición de la válvula (a) para el llenado del bucle de muestra ACB y (b) para la introducción de la muestra en la columna.

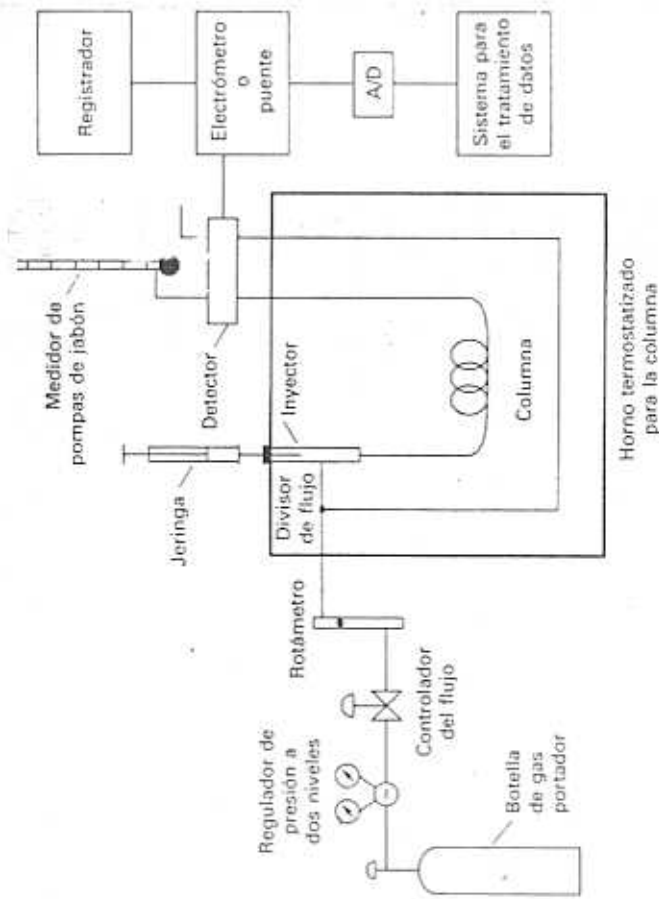


FIGURA 25-1. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.

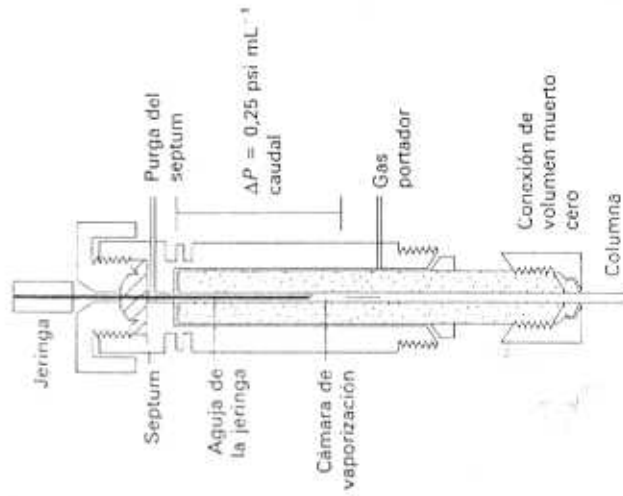
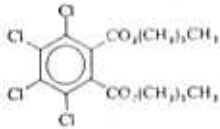
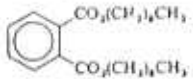
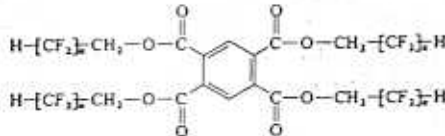


FIGURA 25-3. Vista transversal de un inyector de vaporización instantánea.

Tabla 23-1
Algunas fases líquidas comunes utilizadas en cromatografía de gases

| Fase líquida | Estructura | Clase de solutos retenidos más fuertemente | Temperatura máxima (°C) |
|-------------------------------|--|--|--|
| Escualeno | $\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 \\ & & & & & & \\ \text{HC}-(\text{CH}_2)_7 & -\text{CH}-(\text{CH}_2)_7 & -\text{CH}-(\text{CH}_2)_7 & -\text{CH}-(\text{CH}_2)_7 & -\text{CH}-(\text{CH}_2)_7 & -\text{CH}-(\text{CH}_2)_7 & -\text{CH} \\ & & & & & & \\ \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 & & \text{CH}_3 \end{array}$ | I | 100 |
| SE-30 | $\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{—Si—O—Si—O—} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$ <p>(Los polímeros con la estructura $\text{—SiR}_2\text{—O—SiR}_2\text{—O—}$ se denominan siliconas o silicónes.)</p> | I | 350 |
| Apiezon | (Hidrocarburos mezclados) | I | 275-300 (dependiendo del tipo de Apiezon) |
| Tetraclorofalato de dibutilo |  | II | 150 |
| Dinonilftalato |  | II | 175 |
| QF-1 | $(\text{CH}_3)_3\text{Si} \left[\begin{array}{c} \text{CF}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} \right] \text{O} \left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—Si—} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n \text{O} \text{—Si(CH}_3)_3$ | II | 250 |
| OV-17 | Metilfenilsilicona | II | 300 |
| DEGS | $\text{—}[\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—C(=O)—CH}_2\text{—CH}_2\text{—C(=O)—O—}]_n\text{—}$ | II | 190 |
| Tetracianoetil-pentaeritritol | $\begin{array}{c} \text{O—C}_2\text{H}_4\text{—C}\equiv\text{N} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}\equiv\text{C—C}_2\text{H}_4\text{—O—CH}_2\text{—C—CH}_2\text{—O—C}_2\text{H}_4\text{—C}\equiv\text{N} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{O—C}_2\text{H}_4\text{—C}\equiv\text{N} \end{array}$ | III | 180 |
| Zonyl E-7 |  | III | 200 |
| XE-60 | $(\text{CH}_3)_3\text{Si—O—} \left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}\equiv\text{N} \end{array} \right] \text{—O—Si(CH}_3)_3$ | III | 275 |
| Carbowax 20M | $\text{HO—}[\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—O}]_n\text{—H}$ | IV | 250 |
| Versamid 900 | $\text{HO—}[\text{C(=O)—R—C(=O)—NH—R'—NH}]_n\text{—H}$ | IV | 275 |
| Tetrahidroxi-etilendiamina | $\begin{array}{c} \text{HO—CH}_2\text{—H}_2\text{C} \quad \quad \quad \text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{N—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{HO—CH}_2\text{—H}_2\text{C} \quad \quad \quad \text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH} \end{array}$ | IV | 150 |

Fuente: Adaptado de H. M. McNair y E. J. Bonelli, *Basic Gas Chromatography* (Palo Alto, Calif.: Varian Instrument Division, 1968).

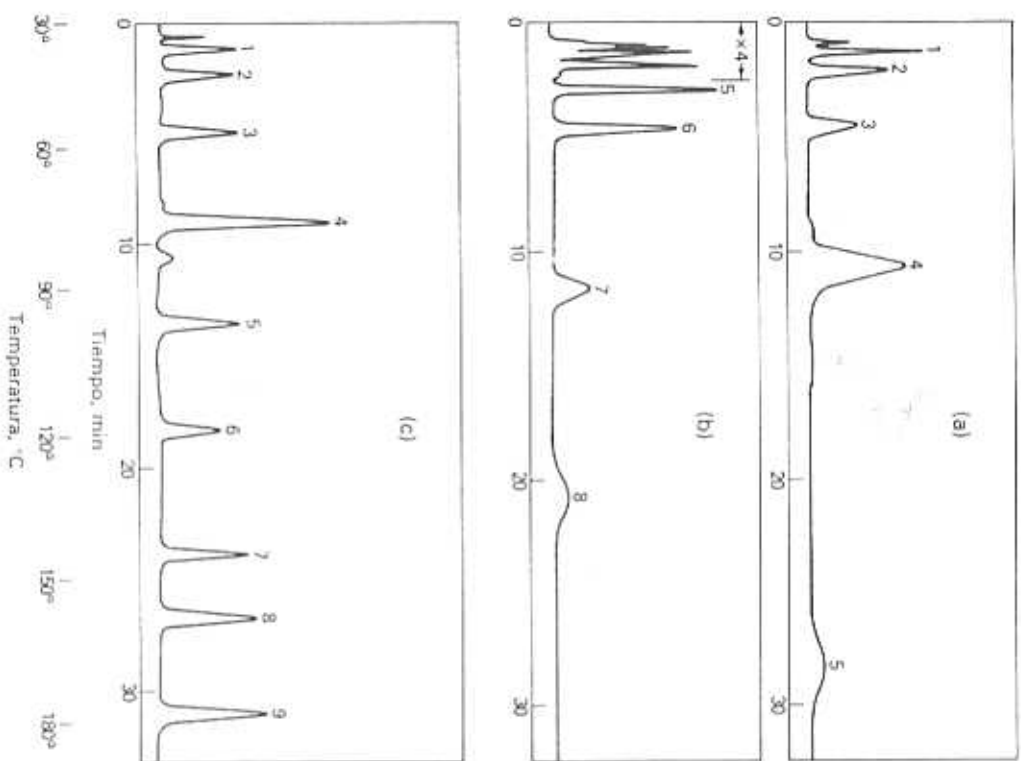


FIGURA 25-4. Efecto de la temperatura sobre los cromatogramas de gases: (a) isotérmica a 45 °C; (b) isotérmica a 145 °C; (c) programación de 30 °C a 180 °C. (De W. E. Harris y H. W. Habgood, *Programmed Temperature Gas Chromatography*, pág. 10, New York: Wiley, 1966. Reproducido con permiso de John Wiley & Sons, Inc.)

Tabla 23-2
Clases de solutos para la Tabla 23-1

| I: Baja polaridad | II: Polaridad intermedia |
|---|---|
| Hidrocarburos saturados | Eteres |
| Hidrocarburos olefinicos | Cetonas |
| Hidrocarburos aromaticos | Aldehidos |
| Haluros de alquilo | Esteres |
| Mercaptanos | Aminas terciarias |
| Sulfuros | Compuestos nitro (sin atomos de H en α) |
| CS ₂ | Nitrilos (sin atomos de H en α) |
| III: Polares | IV: Muy polares |
| Alcoholes | Polihidroxicicloalcoholes |
| Ácidos carboxilicos | Aminocicloalcoholes |
| Fenoles | Hidroxiácidos |
| Aminas primarias y secundarias | Ácidos poliproticos |
| Oximas | Polifenoles |
| Compuestos nitro (con atomos de H en α) | |
| Nitrilos (con atomos de H en α) | |

Fuente: Adaptado de H. M. McNair y E. J. Bonelli, *Basic Gas Chromatography* (Palo Alto, Calif.: Varian Instruments Division, 1968).

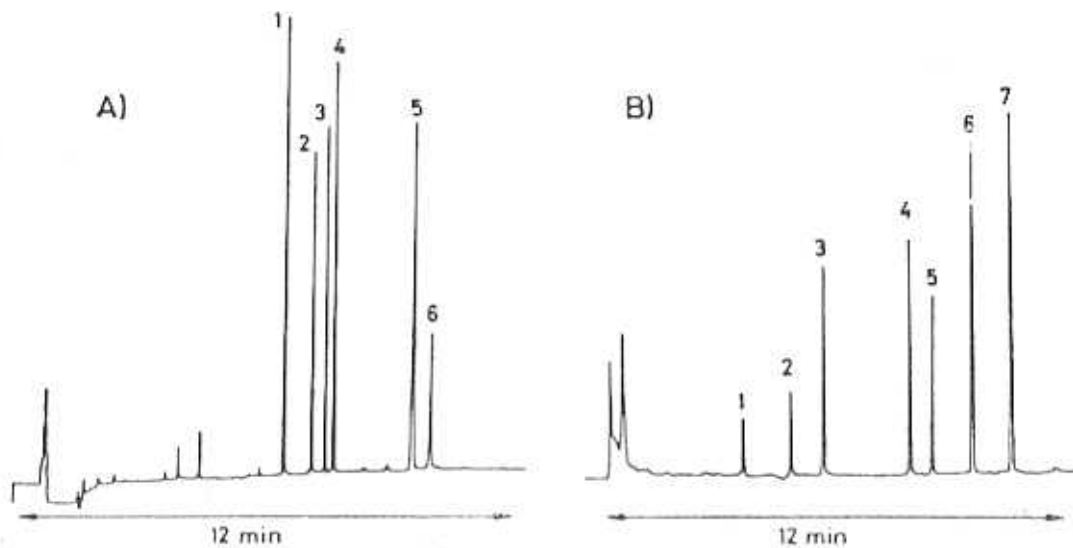


Figura XX.7

Cromatogramas de mezclas de pesticidas (A) y fungicidas (B) con columnas HP-101 de metilsilicona con 0,2 μm de espesor de película. A) Columna de 12 m x 0,2 mm; gas portador: He; velocidad de flujo: 30 cm/s; inyección sin división; programación de temperatura: 1 min a 60 °C, aumento hasta 200 °C con una velocidad de 30 °C/min, y hasta 240 °C con velocidad de 10 °C/min; detector de fósforo y nitrógeno; picos: (1) Diazinon, (2) metil-Paration, (3) Malation, (4) Paration, (5) Etion, y (6) Carbofenotion. (B) Columna de 25 m x 0,2 mm; gas portador: hidrógeno; velocidad de flujo: 60 cm/s; programación de temperatura: 1 min a 100 °C y aumento hasta 250 °C con una velocidad de 10 °C/min; detector de captura electrónica; picos: (1) metabolito diclorado del Terrazol, (2) Terrazol, (3) Pentaclorobenceno, (4) Hexaclorobenceno, (5) Pentacloronitrobenceno, (6) Pentacloroanilina, y (7) Pentaclorotioanisol.

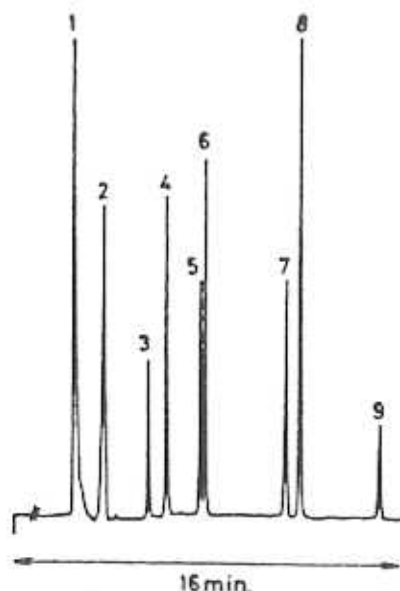


Figura XX.6

Cromatograma de una muestra de agua con hidrocarburos halogenados. Columna HP-5 (50 m x 0,32 mm) con fenilmetilsilicona como fase inmobilizada con 1 μm de espesor de película. Gas portador: He, Velocidad de flujo: 17 cm/s, Volumen de muestra: 1 μL . Programación de temperatura: 8 min a 95 °C, aumento a una velocidad de 10 °C/min hasta llegar a 200 °C, que se mantiene durante 3 min. Detector de captura electrónica. Picos: (1) agua, (2) diclorometano, (3) cloroformo, (4) 1,1,1-tricloroetano, (5) tricloroetano, (6) bromodiclorometano, (7) dibromoclorometano, (8) tetracloroetano, y (9) bromoformo.

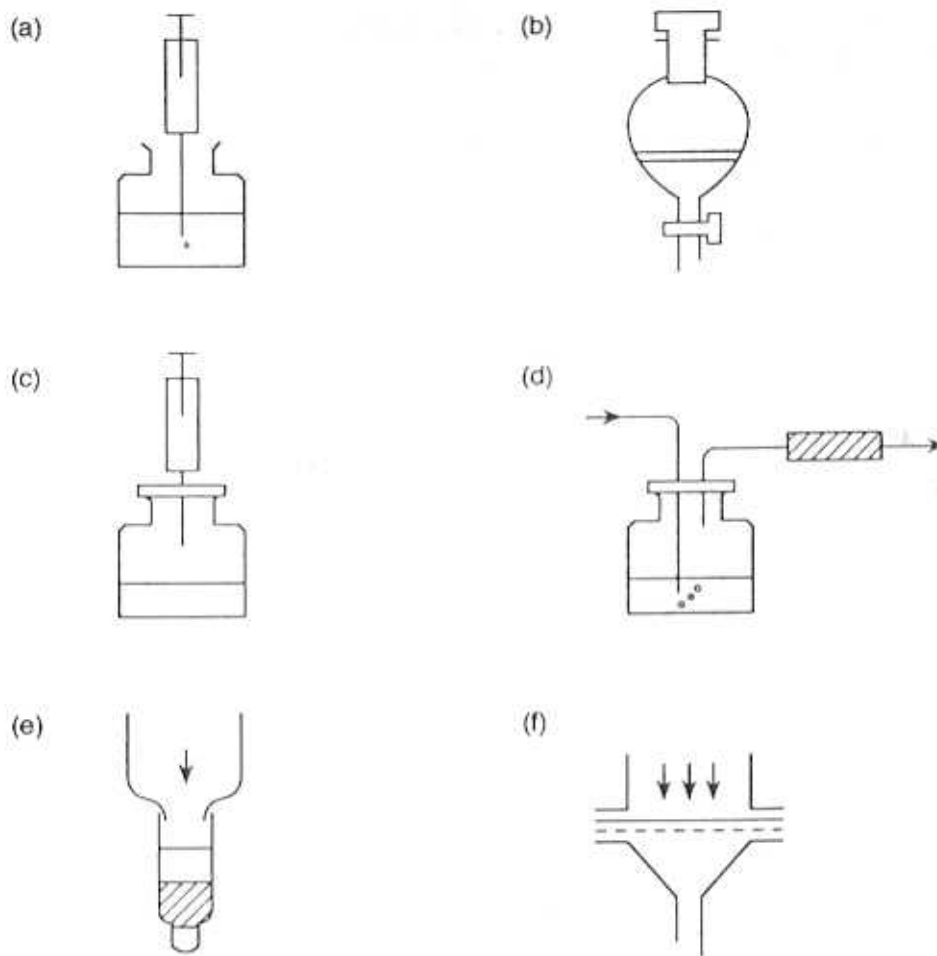
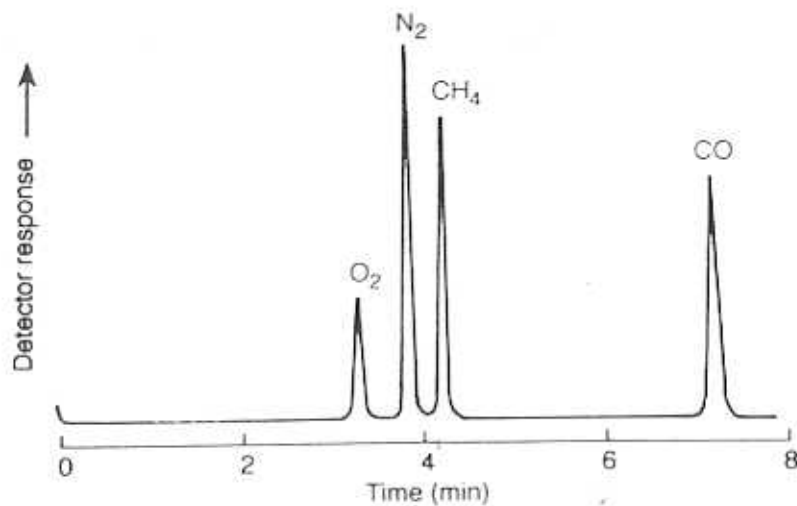


Fig. 4.2b. Summary of extraction methods. (a) Direct injection; (b) solvent extraction; (c) headspace analysis; (d) purge and trap; (e) solid phase extraction; (f) extraction filters



Separation of a gas mixture on a 5A molecular sieve column

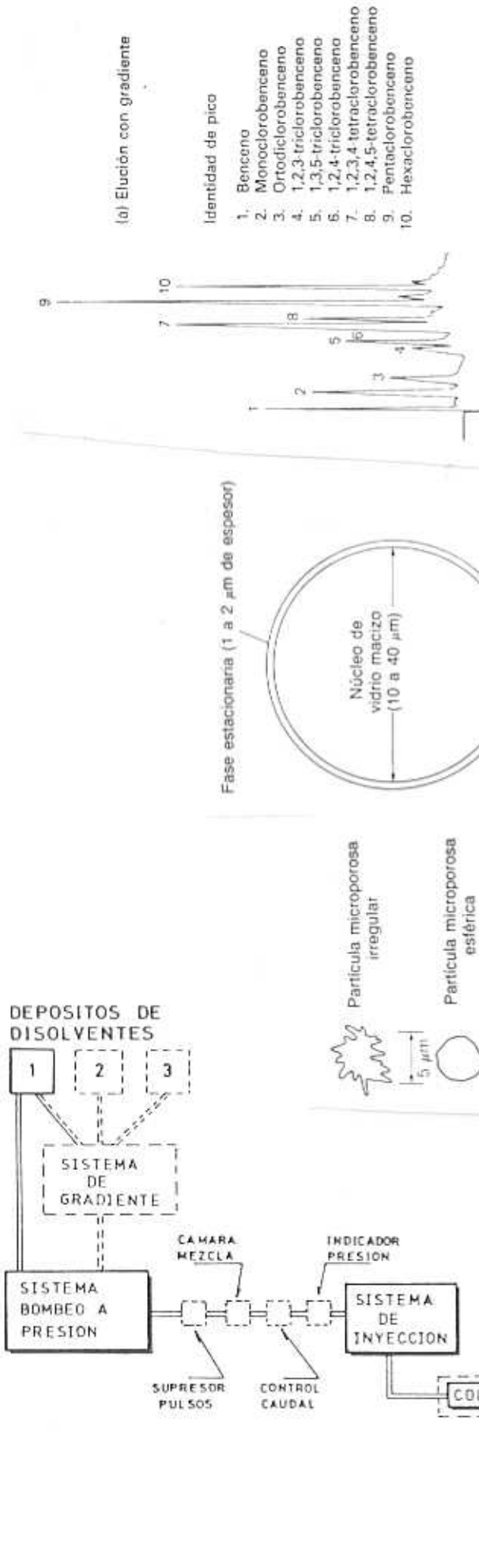


Figura XIV.1
Diagrama esquemático de un cromatógrafo de líquido donde se muestran los elementos básicos (—) y los complementarios (---).

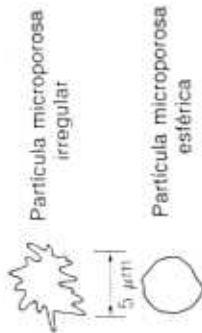
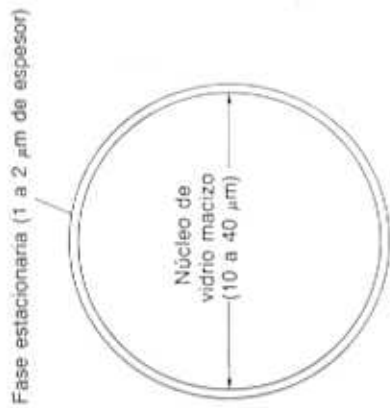


Figura 23-16
Tipos comunes de partículas de soporte para CLAR.

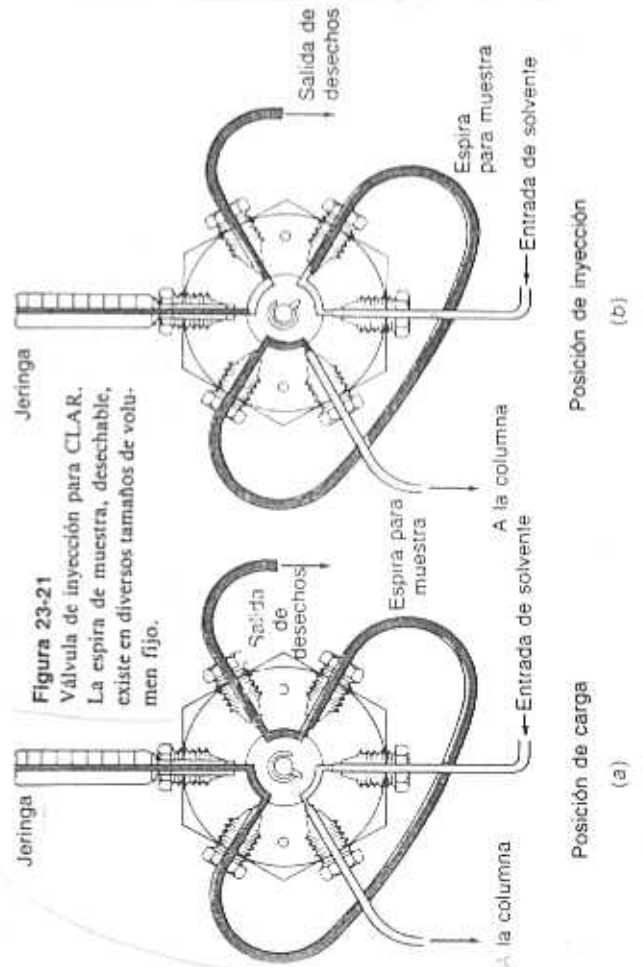
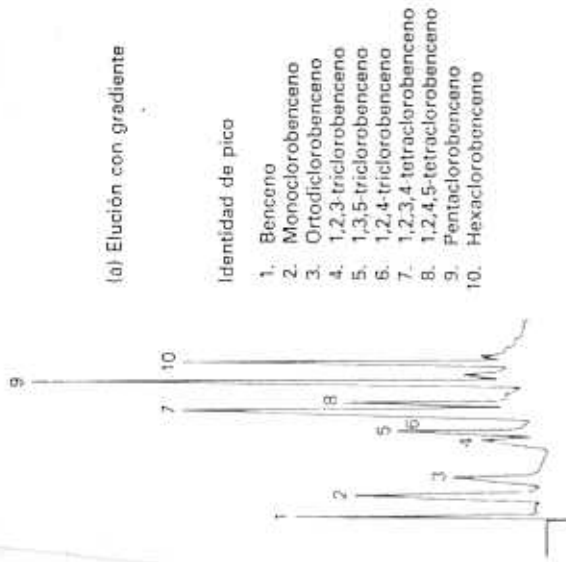


Figura 23-21
Válvula de inyección para CLAR. La espira de muestra, desechable, existe en diversos tamaños de volumen fijo.



- Identidad de pico
1. Benceno
 2. Monoclorobenceno
 3. Ortodiclorobenceno
 4. 1,2,3-triclorobenceno
 5. 1,3,5-triclorobenceno
 6. 1,2,4-triclorobenceno
 7. 1,2,3,4-tetraclorobenceno
 8. 1,2,4,5-tetraclorobenceno
 9. Pentaclorobenceno
 10. Hexaclorobenceno

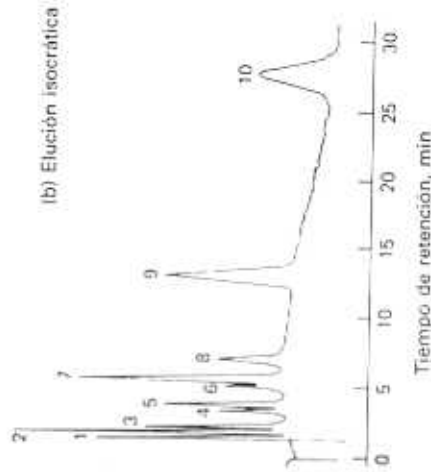


FIGURA 26-5. Mejora de la eficiencia de la separación mediante la elución con gradiente. Columna: 1 m x 2,1 mm d.i., de acero inoxidable con diámetro interior de precisión; relleno: 1% Permaphase[®] ODS. Muestra: 5 μL de bencenos clorados en isopropanol. Detector: fotómetro de UV (254 nm). Condiciones: temperatura, 60 °C, presión, 1200 psi. (Tomado de J. J. Kirkland, *Modern Practice of Liquid Chromatography*, pág. 88, New York: Interscience, 1971.)

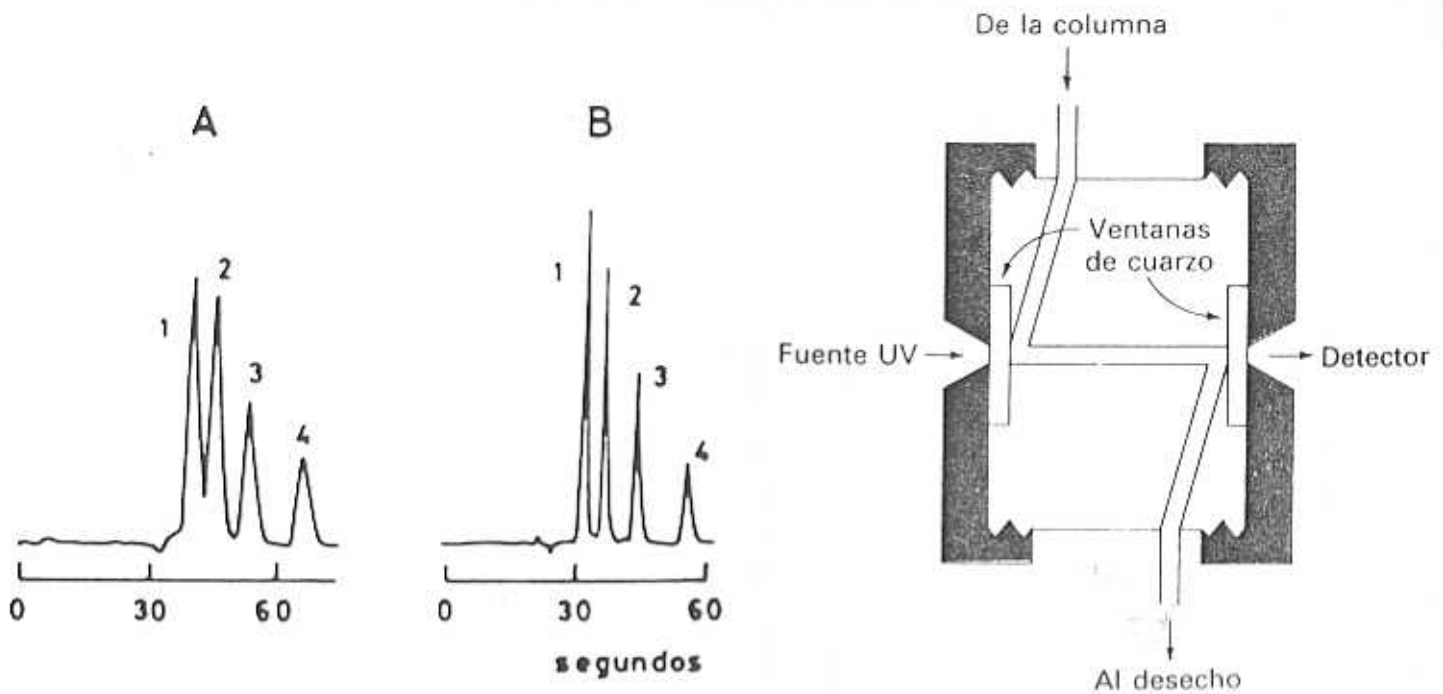


Figura XIV.10
Influencia del volumen de la célula de flujo (A: 8 μ l, B: 2.4 μ l) en la resolución cromatográfica en CLAR. Separación de cuatro ésteres del ácido p-hidroxibenzoico (alquilparabenos) por cromatografía en fase ligada C_{18} y fase móvil acetonitrilo-agua (2:1).

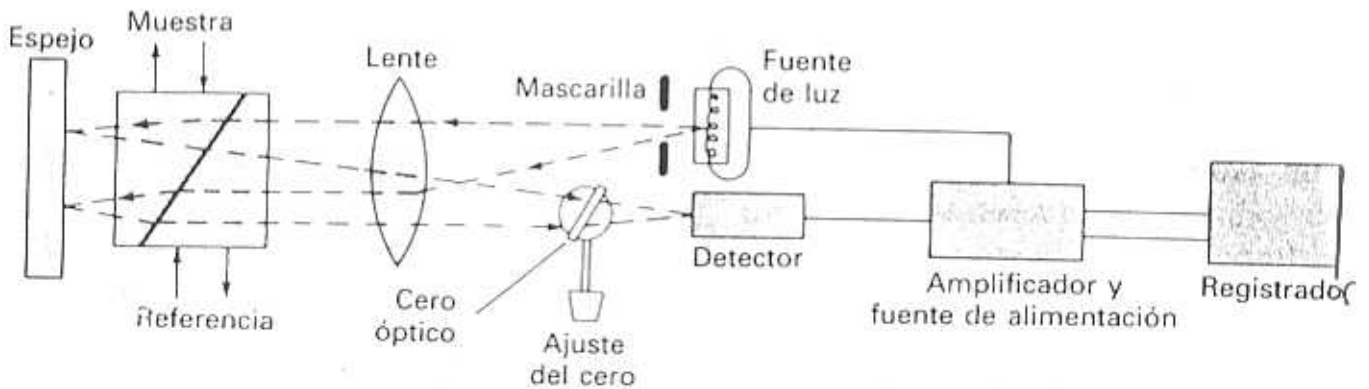


FIGURA 26-11. Esquema de un detector diferencial de índice de refracción.

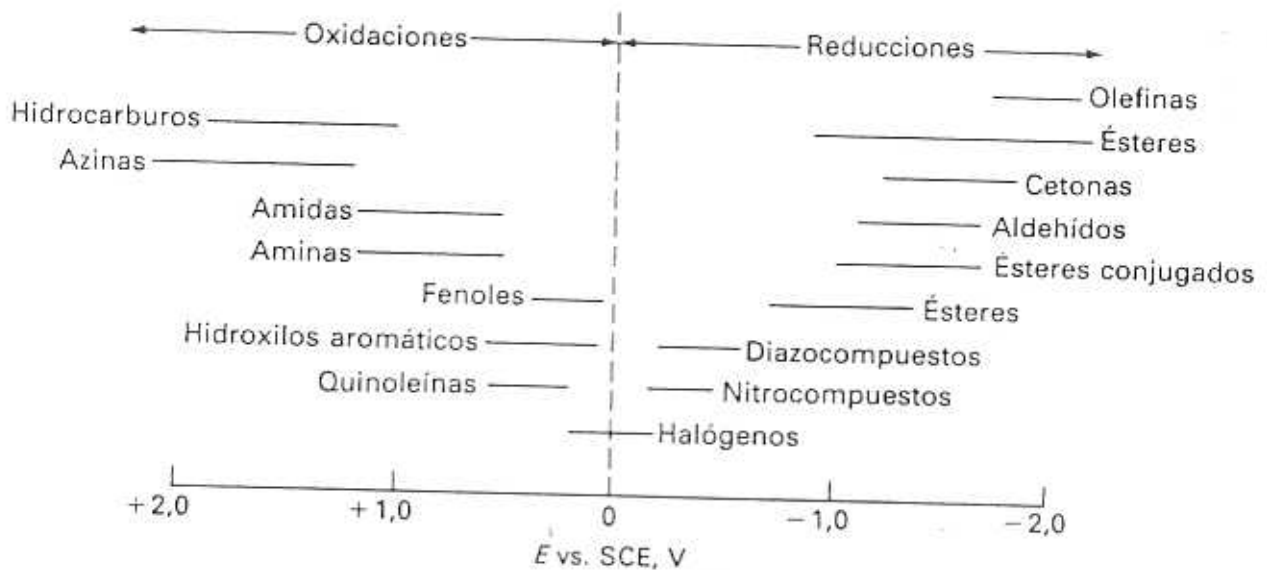


FIGURA 26-12. Grupos funcionales orgánicos detectables potencialmente por medidas electroanalíticas. Las líneas horizontales indican el intervalo de potenciales de oxidación o reducción donde son electroactivos los compuestos que contienen los grupos funcionales señalados.

Tabla XV.5
Fases empleadas en cromatografía de partición líquido-líquido

| Fase estacionaria | Fase móvil |
|--|--|
| β,β' -oxidipropilnitrilo Carbowax | Pentano, hexano, iso-octano Los mismos disolventes, pero con un porcentaje no superior al 10% de cloroformo, THF, diclorometano |
| Trietilenglicol, Poli(etilenglicol) Dimetilsulfóxido Etilendiamina Polímero hidrocarbonado | Eter dibutílico Iso-octano Hexano Agua/metanol |

Tabla XV.6
Empleo de fases ligadas polares como fase estacionaria activa

| Mecanismo cromatográfico | Grupo funcional activo | -R | Nombre comercial |
|--------------------------|------------------------|------------------------------------|---|
| Partición | Ciano | $-(CH_2)_3-CN$ | Nucleosil-CN Micropak-CN μ Bondpak-CN Partisil-10-PAC |
| Adsorción | Amino | $-(CH_2)_n-NH_2$ | Nucleosil-NH ₂ μ Bondpak-NH ₂ LiChrosorb-NH ₂ Amino-Sil-X-1 |
| Cambio iónico | Dimetilamino | $-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3$ | Nucleosil-NMe ₂ |
| Exclusión | Diol | $-(CH_2)_3-O-CH-CH_2OH$ OH | |

Tabla XV.7
Algunas fases ligadas no polares estacionarias empleadas en cromatografía en fase invertida

| Tipo de cadena | -R | Nombre comercial | Tamaño de partícula (μm) |
|----------------|---------------------------|--|----------------------------------|
| Larga | $-C_{18}H_{37}$ | Nucleosil C ₁₈ MicroPak CH μ Bondpak C ₁₈ LiChrosorb RP-18 ODS-Sil-X-1 | 5, 10 10 10 5, 10 13 |
| Intermedia | $-C_8H_{17}$ $-C_6H_5$ | Nucleosil C ₈ LiChrosorb RP-8 μ Bondpak-Phenyl | 5, 10 5, 8 10 |
| Corta | $>Si(CH_2)_2$ | LiChrosorb RP-2 | 5, 10 |

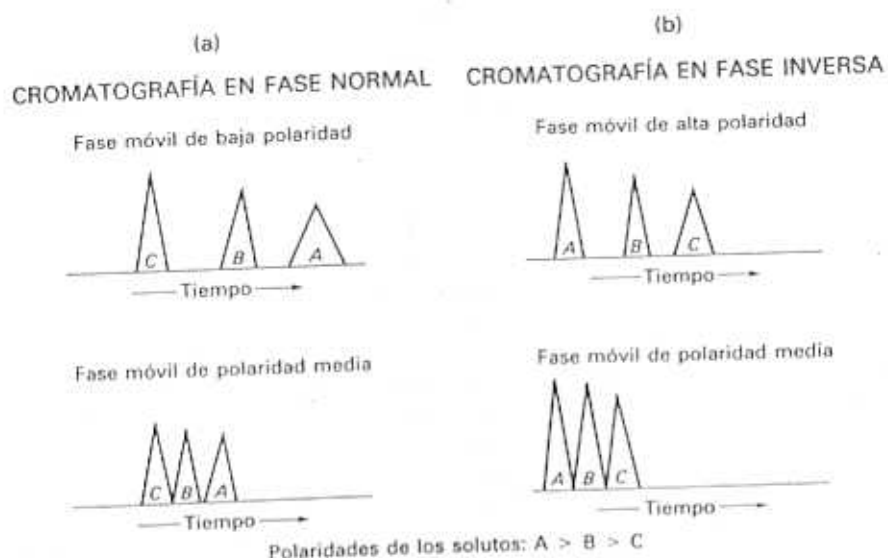


FIGURA 26-14. Relación entre la polaridad y los tiempos de elución en cromatografía en fase normal y en fase inversa.

Tabla XV.4
Materiales comerciales de empacamiento de columnas CLAF para las modalidades de adsorción y partición

| Tipo | Estructura | Nombre comercial | Tamaño de partícula (μm) | Área específica (m^2/g) | Forma |
|---------|-------------|------------------|---------------------------------------|---|-----------|
| Silíce | Microporosa | Hypersil | 5-7 | 200 | esférica |
| | | LiChrospher 100 | 10 | 25 | " |
| | | LiChrosorb 60 | 5, 10, 30 | 500 | irregular |
| | | Porasil A | 37-75 | 350-500 | esférica |
| | | " B | 75-125 | 125-250 | " |
| | | " C | " | 50-100 | " |
| | | " D | " | 25-45 | " |
| | | μ Partisil | 5, 10, 20 | 400 | irregular |
| | | μ Porasil | 8-12 | 400 | " |
| | | Nucleosil 50 | 5, 7, 10 | 500 | esférica |
| | | " 100 | " | 300 | " |
| | | Spherosil XOA | " | " | " |
| | | " 600 | 5, 10, 20 | 600 | " |
| | | " 800 | 5, 10 | 830 | " |
| | | " 400 | 10 | 350-500 | " |
| | | " 200 | 10 | 125-250 | " |
| Alúmina | Pelicular | Sil-X-1 | 13 \pm 5 | 400 | irregular |
| | | Zorbax Sil | 5-7 | 300 | esférica |
| | | Corasil | 37-50 | 7-14 | " |
| | | Peliosil HC | 37-44 | 8 | " |
| | | " HS | " | 4 | " |
| | | Perisorb A | 30-40 | 14 | " |
| | | Zipax | 25-37 | 1 | " |
| | | BioRad HC | 75 | 200 | irregular |
| | | LiChrosorb | 5, 10, 30 | 70 | " |
| | | MicroPak Al-5 | 5 | 70 | " |
| Alúmina | Microporosa | Spherisorb A5W | 5 | 90 | esférica |
| | | " | " | " | |
| | | " | " | " | |
| Alúmina | Pelicular | Pellumina HC | 37-44 | 8 | " |
| | | " HS | " | 4 | " |

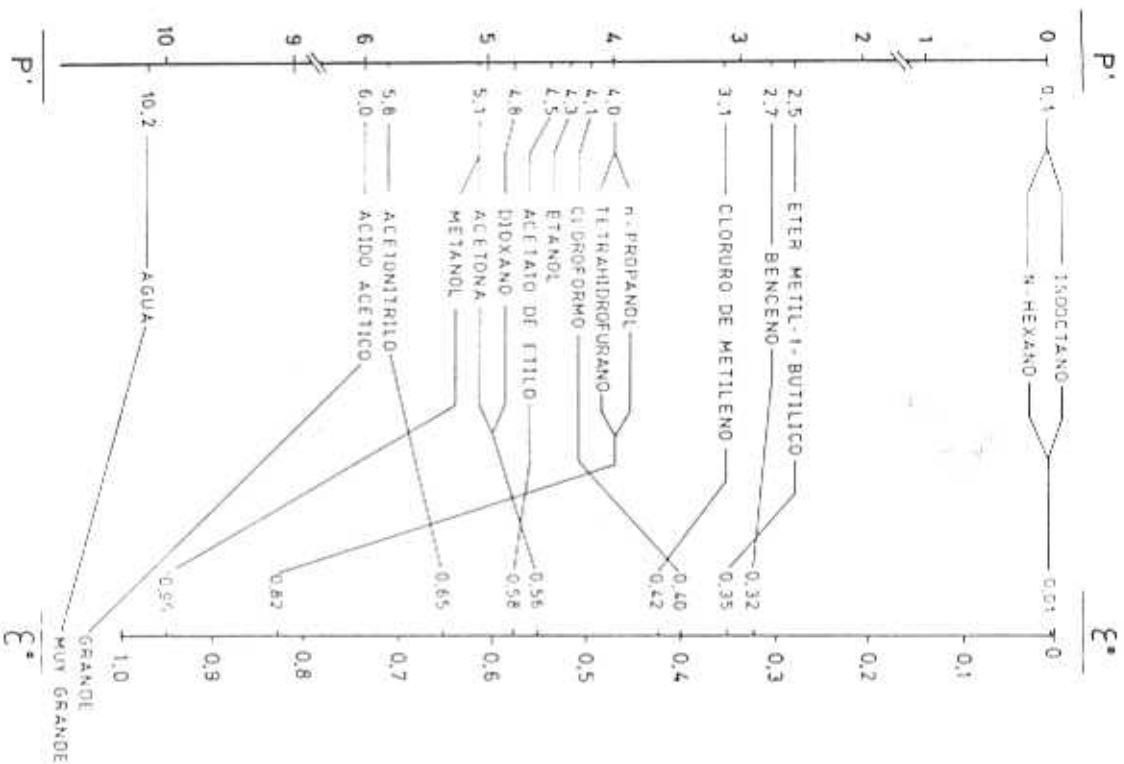


Figura XV.6. Disolventes más usados como fase móvil en cromatografía líquida de adsorción y partición ordenados según los valores del índice de polaridad (P') y el parámetro de desplazamiento (C^*). El orden respecto a su poder de elución (derecha) es la denominada serie eluotrópica.

- Identificación de pico
1. Metil paratión
 2. Clodrin
 3. Paratión
 4. Difenato
 5. Diazinón
 6. EPN
 7. Ronnel
 8. Tritión

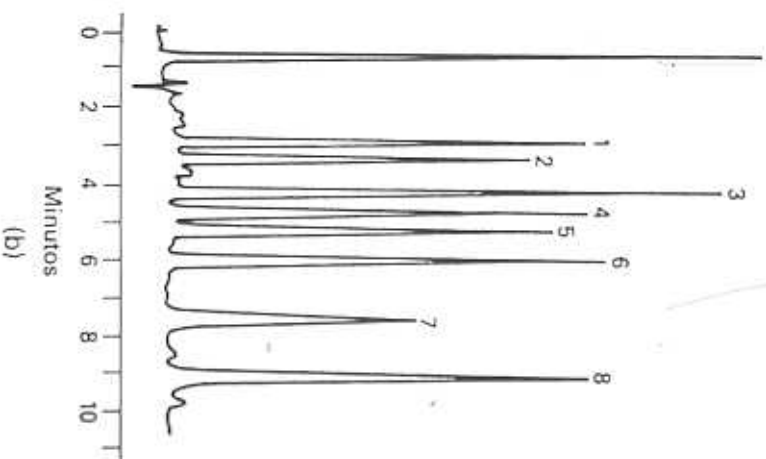


FIGURA 26-17. Aplicaciones características de la cromatografía de fase enlazada.

organofosforados. Columna: $4,5 \times 250$ mm empaquetada con partículas de $5 \mu\text{m}$ con fase enlazada de C_8 . Gradiente: de CH_3OH 67%/H₂O 33% a CH_3OH 80%/H₂O 20%. Caudal: 2 mL/min. (Cortesía de IBM Instruments Inc., Danbury, CT.)

Insecticidas
la detección UV es a 254 nm.

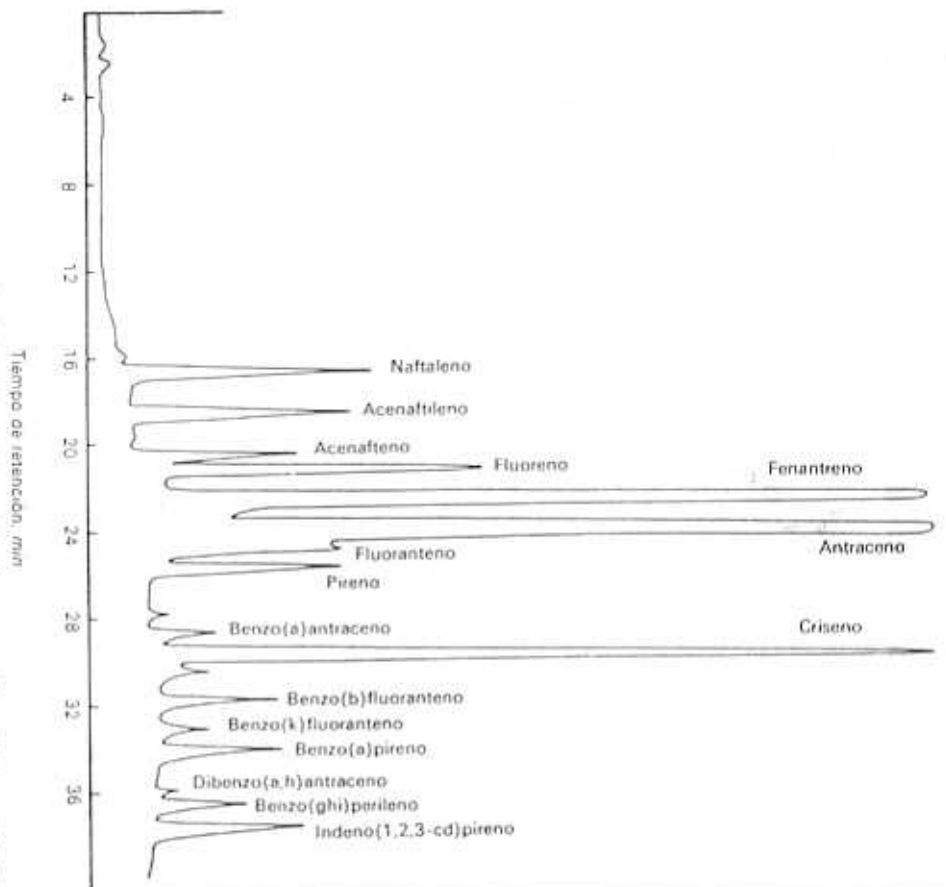


Figura 6-44-1. Cromatograma líquido de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Columna: HC-ODS SIL-X; fase móvil: 40 por 100 a 100 por 100 de acetonitrilo en agua; detector: ultravioleta λ : 254 nm.

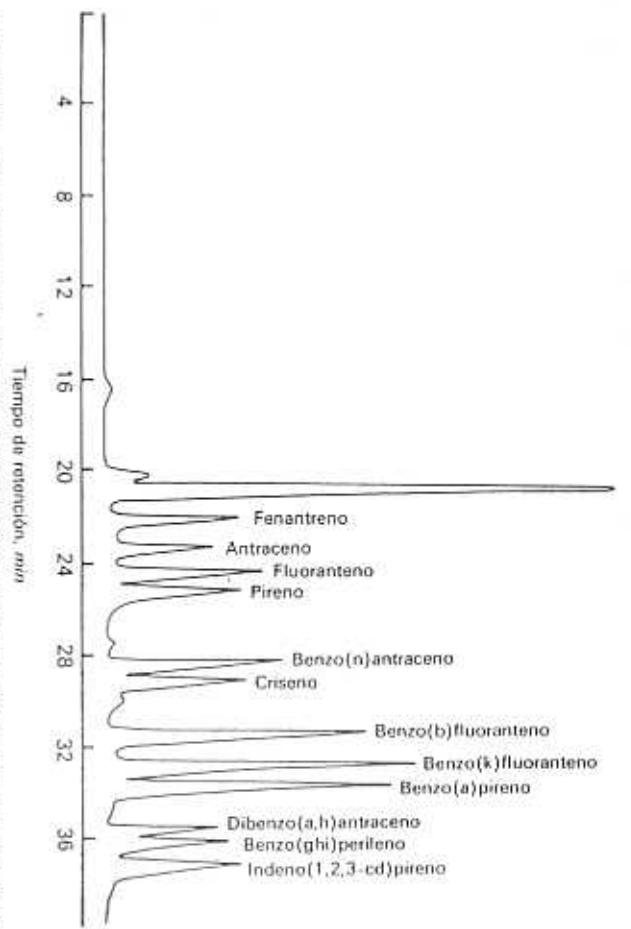


Figura 6-44-2. Cromatograma líquido de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Columna: HC-ODS SIL-X; fase móvil: 40 por 100 a 100 por 100 de acetonitrilo en agua; detector: fluorescencia.

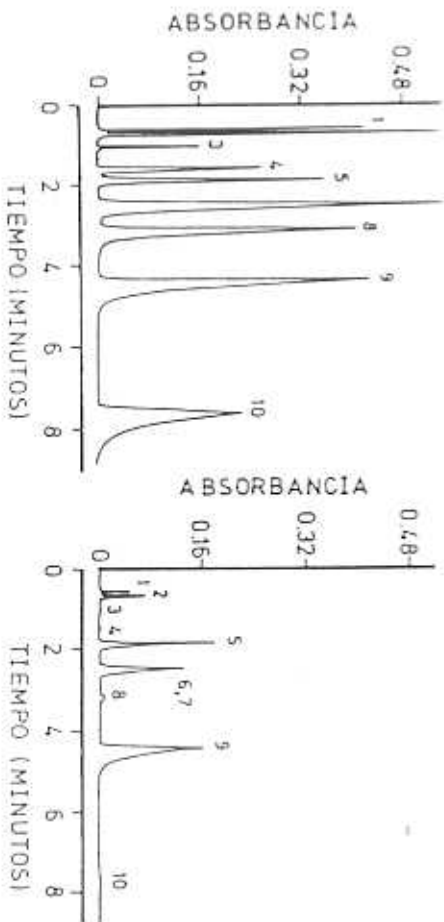


Figura XV.10 Separación de insecticidas clorados y compuestos afines por cromatografía de adsorción. Columna empaquetada Lichrosorb SI 60 (5 μ m) de 25 cm x 3 mm; eluyente: hexano seco; velocidad de flujo: 4 mL/min; temperatura de la columna: 27 $^{\circ}$ C; detector UV: (a) 205 nm; (b) 254 nm. Solutos: (1) hexaclorobenceno, (2) decacloro-difenilo, (3) aldrin, (4) heptaclor, (5) p,p'-DDE, (6) o,p'-DDE, (7) o,p'-DDT, (8) p,p'-DDT, (9) bifenilo, (10) p,p'-DDD.

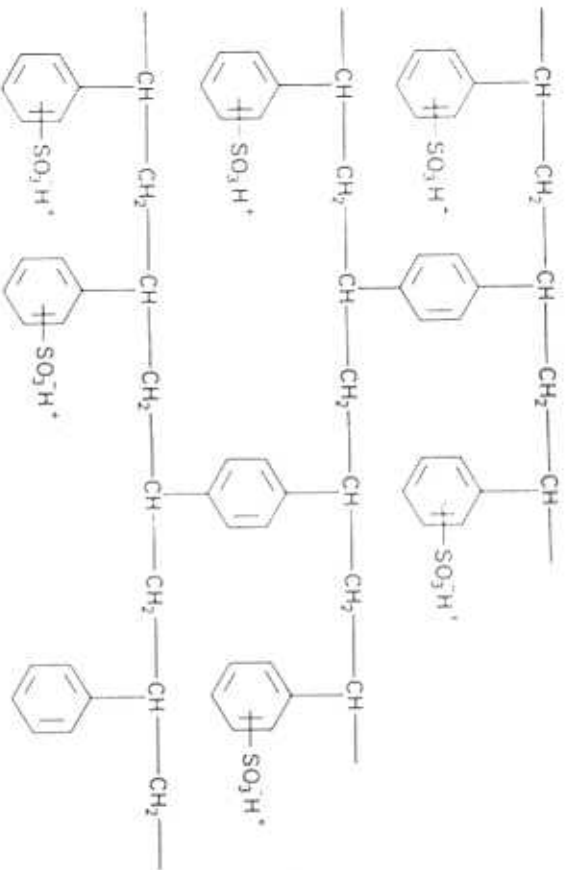


FIGURA 26-21. Estructura de una resina de intercambio iónico de poliestireno entrecruzado. Se utilizan resinas parecidas en las que el grupo $-\text{SO}_3\text{H}^+$ se sustituye por grupos $-\text{COO}^- \text{H}^+$, $-\text{NH}_3^+ \text{OH}^-$ y $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{OH}^-$.

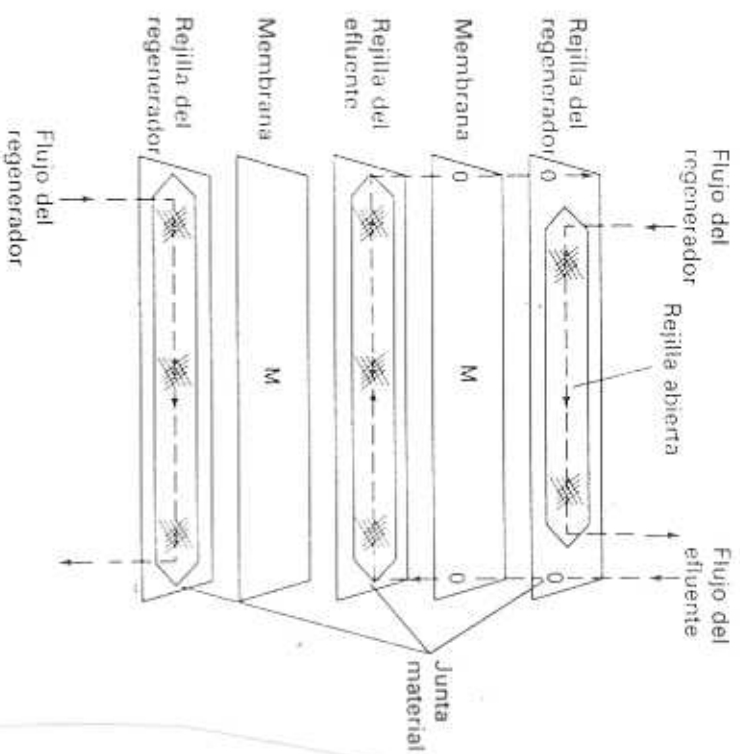
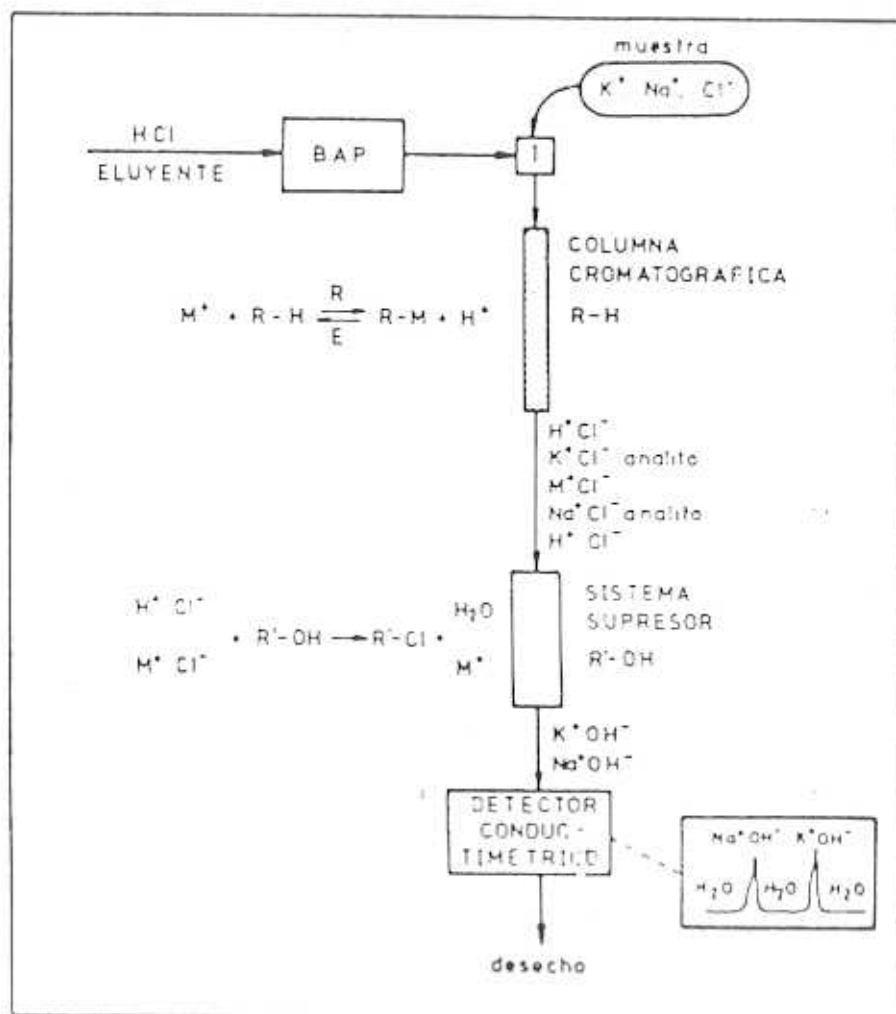
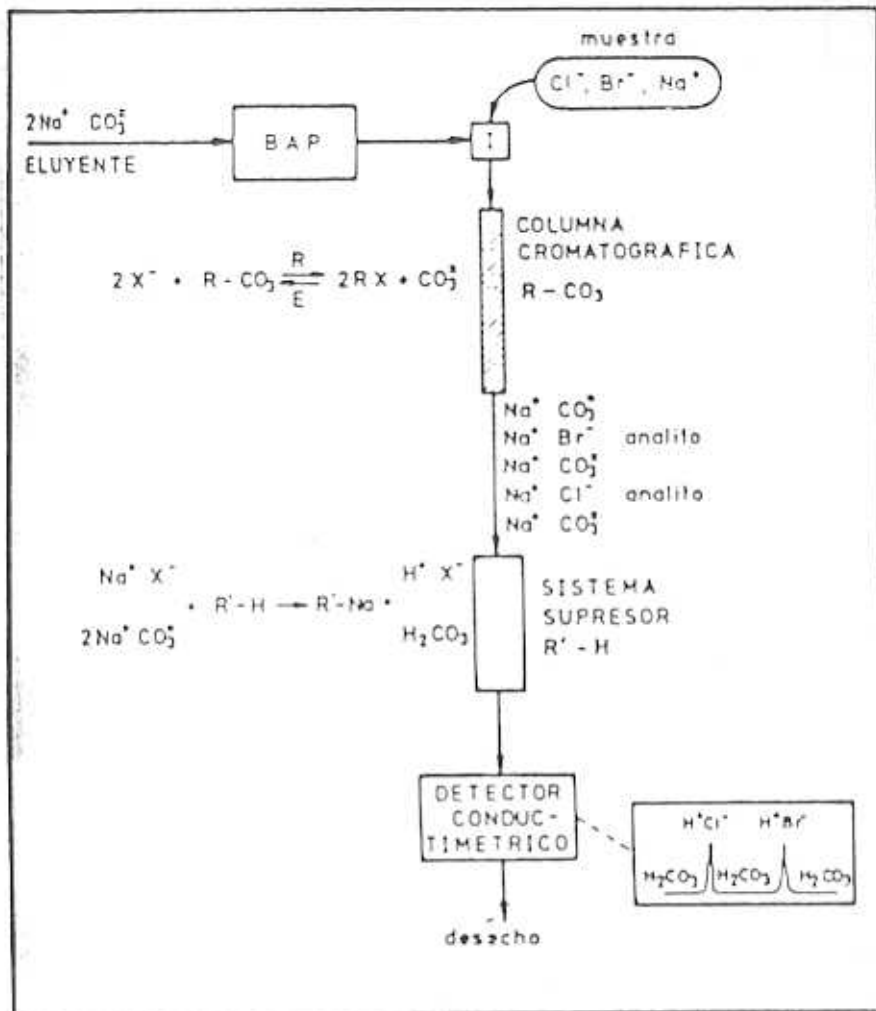


FIGURA 26-22. Micromembrana supresora. El eluyente fluye a través de un canal estrecho que contiene una rejilla de plástico que reduce el volumen muerto y aumenta la velocidad de transferencia de masas. El eluyente se separa de la disolución supresora por una resina de intercambio de $50 \mu\text{m}$. El flujo regenerador va en la dirección opuesta al flujo del eluyente. (Cortesía de Dionex Corporation.)



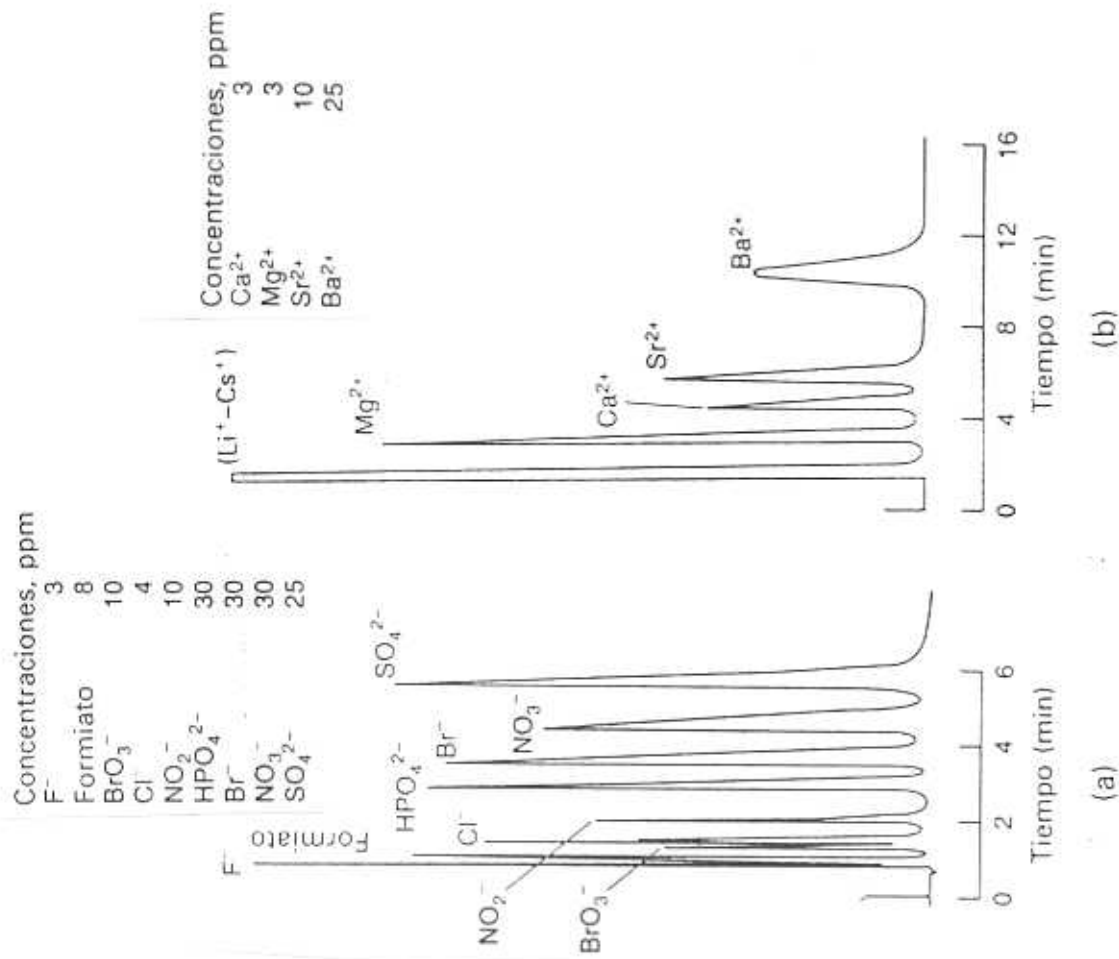


FIGURA 26-23. Aplicaciones típicas de la cromatografía iónica. (a) Separación de aniones en una columna de intercambio de aniones NaHCO₃ 0,0028 M/Na₂CO₃ 0,0023 M. Tamaño de muestra: 50 μL. (b) Separación de iones alcalinos en una columna de intercambio catiónico. Eluyente: Diclorhidrato de fenilendiamina 0,025 M/HCl 0,0025 M. Tamaño de muestra: 100 μL. (Cortesía de Dionex, Inc., Sunnyvale, CA.)

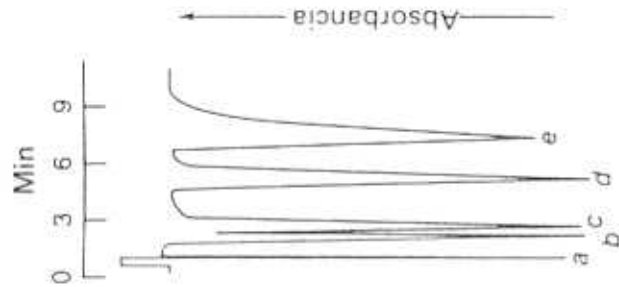


FIGURA 26-24. Detección fotométrica indirecta de varios aniones. Eluyente: ftalato de sodio 10⁻³ M, ácido bórico 10⁻³ M, a pH 10. Caudal: 5 mL/min. Volumen de muestra: 0,02 mL. Detector UV. Iones en la muestra: (a) 18 μg de carbonato; (b) 1,4 μg de cloruro; (c) 3,8 μg de fosfato; (d) 5 μg de azida; (e) 10 μg de nitrato. (Tomado con autorización de H. Small, *Anal. Chem.*, 1985, 55, 240A. Derechos de reproducción desde 1983 de American Chemical Society.)