

TEMA 6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS



**Universidad
Europea**

LAUREATE INTERNATIONAL UNIVERSITIES

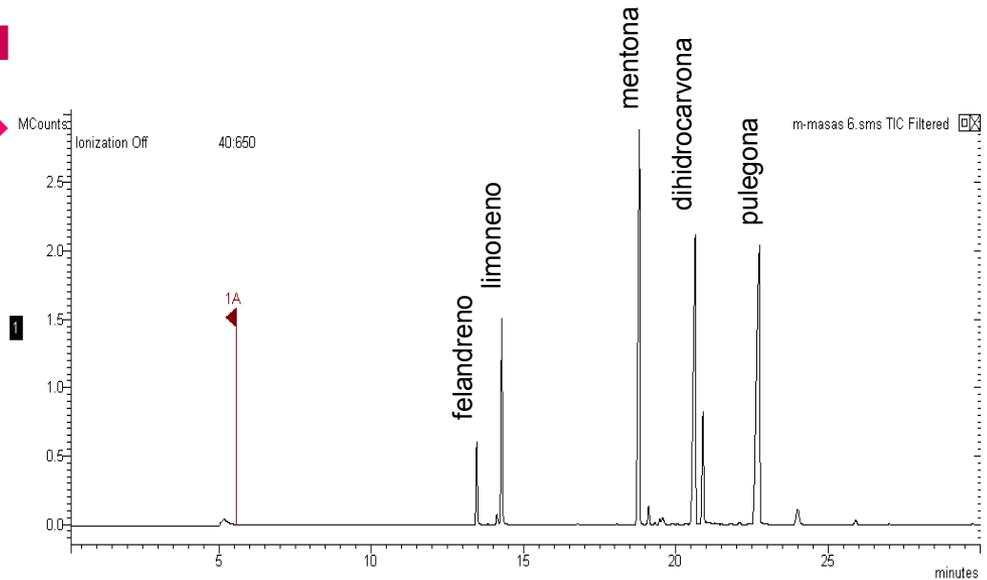
CROMATOGRAFÍA: técnica de separación que se basa en la diferente distribución de los componentes de una mezcla entre una fase móvil y una fase estacionaria



MUESTRA COMPLEJA



EXTRACTO



Cromatograma

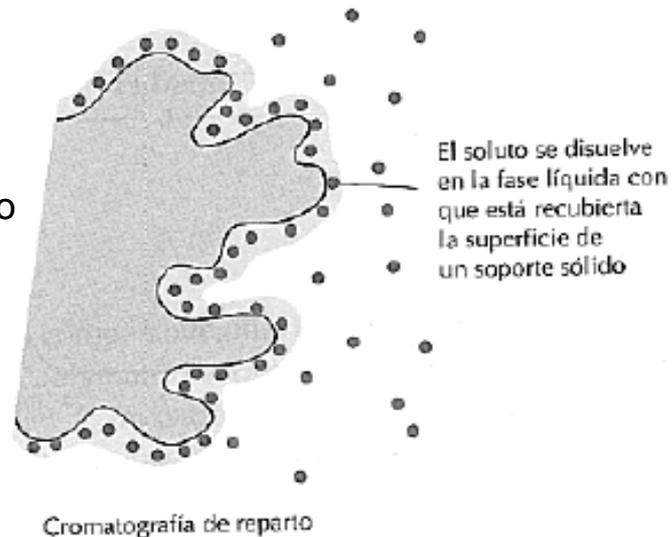
1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

- ❑ Según la naturaleza de la fase móvil:
 - a) Cromatografía de gases (GC)
 - b) Cromatografía de líquidos (LC)
 - c) Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)

- ❑ Según el mecanismo de separación:

- a) Cuando la fase estacionaria es un líquido:

- Cromatografía de reparto

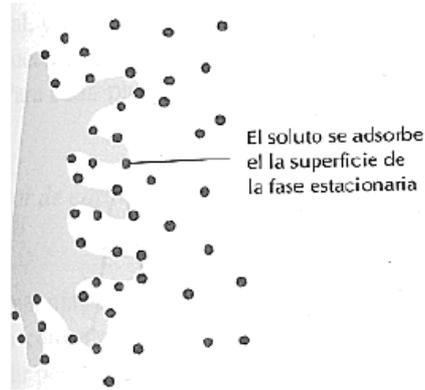


La fase estacionaria es un líquido muy viscoso

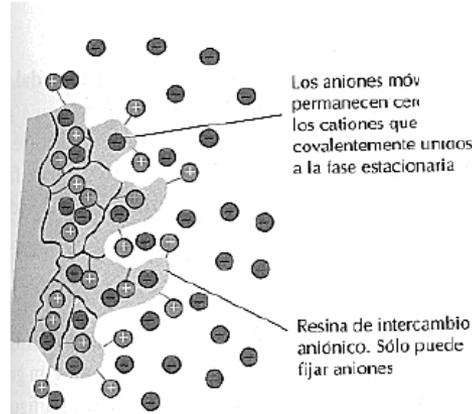
el mecanismo de separación hace referencia a la interacción que surge entre la muestra y la fase estacionaria

b) Cuando la fase estacionaria es un sólido:

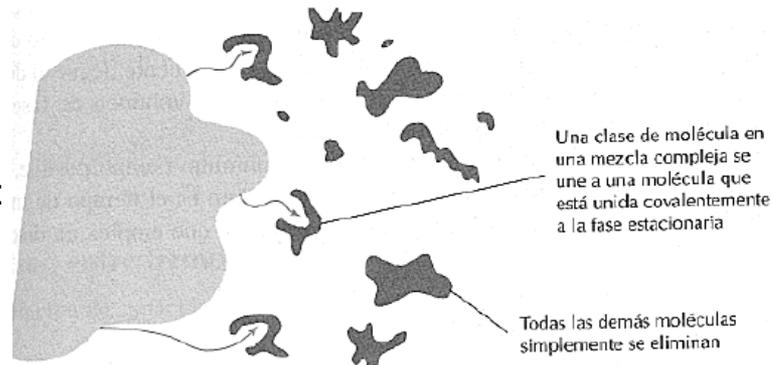
■ Cromatografía de adsorción:



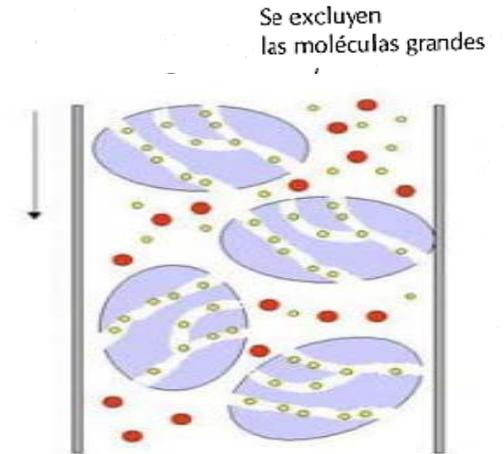
■ Cromatografía de intercambio iónico:



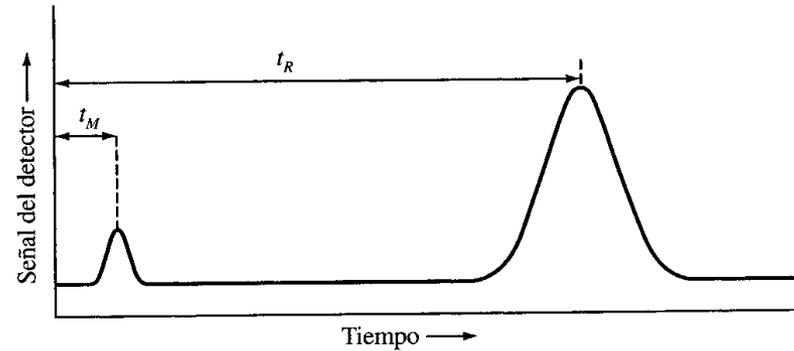
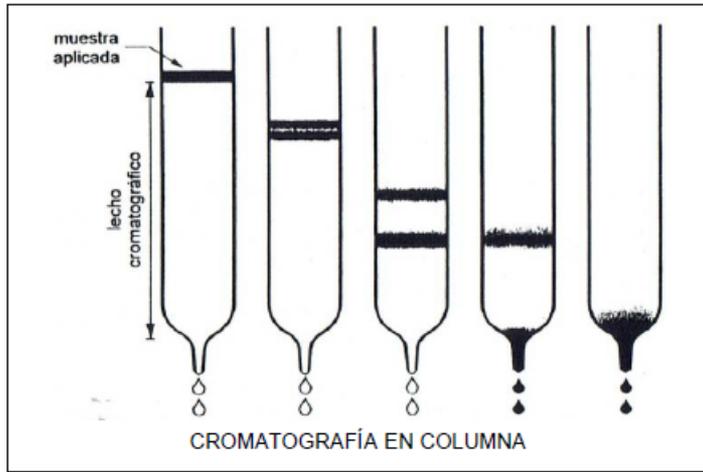
■ Cromatografía de afinidad:



■ Cromatografía de exclusión molecular:



2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CONCEPTOS FUNDAMENTALES



2.1. Tiempo de retención, tiempo básico y tiempo de retención corregido:

- Tiempo de retención (t_R): tiempo que tarda un soluto en eluirse.
- Tiempo básico o tiempo muerto (t_M): tiempo que tarda en salir un compuesto que no se retiene.
- Tiempo de retención corregido (t'_R): $t'_R = t_R - t_M$

2.2. Área de pico: medida indirecta de la concentración de una muestra. Permite el análisis cuantitativo a través de rectas de calibrado y/o adición de patrón interno.

2.3. Factor de retención (k'): medida del tiempo que un compuesto permanece en la fase estacionaria en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

2.4. Factor de separación o de selectividad (α): Medida de la retención relativa de dos picos próximos. Indica el potencial del sistema cromatográfico (de las fases implicadas) para separar dos compuestos.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

1: compuesto menos retenido;
2: compuesto más retenido

α debe ser ≥ 1

2.5. Eficacia:

- Número de platos teóricos (N): indica las prestaciones de la columna en términos de eficacia, es decir, de la capacidad que tiene el sistema de proporcionar picos estrechos

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2$$

$w_{0.5}$: anchura del pico a mitad de altura

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

w_b : anchura del pico en la base

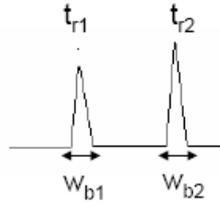
- Altura de plato (H): $H = L/N$ L: longitud de la columna

A mayor N (menor H) más eficaz es el sistema

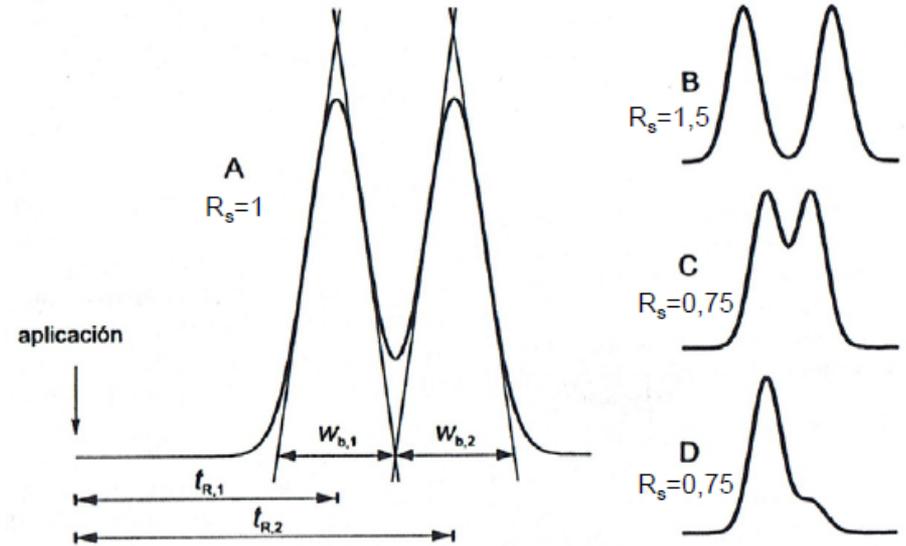
2.6. Resolución:

Separación entre dos picos consecutivos con relación a la media de sus anchuras en la base.

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



$$R_s = \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{selectividad}} \underbrace{\frac{k'}{1 + k'}}_{\text{retención}} \underbrace{\frac{\sqrt{N}}{4}}_{\text{eficacia}}$$

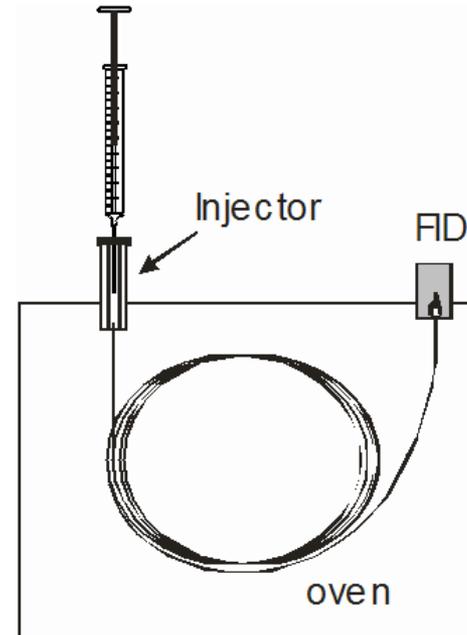


ESQUEMA BÁSICO DE UN CROMATÓGRAFO

- . **Fuente de fase móvil** con regulación de la presión o del flujo
- . **Sistema de inyección:** sistema que permite introducir la muestra en la corriente de la fase móvil.
- . **Columna:** elemento en el que se produce la separación.
- . **Recipiente termostatzado (horno)** para controlar la T de la columna.
- . **Sistema de detección:** transforma en una señal eléctrica una propiedad de la fase móvil, que se ve altamente alterada por la presencia de pequeñas concentraciones de otras sustancias (analitos)

3. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

- ❑ Fase móvil: gas inerte cuyo papel se reduce a arrastrar las moléculas de soluto a lo largo de la columna (gas portador). Los más utilizados son nitrógeno, helio e hidrógeno.
- ❑ Fase estacionaria: generalmente es un líquido viscoso que impregna un soporte sólido (cromatografía de reparto).



<https://www.youtube.com/watch?v=9nYpjtRx0Zs>

El Cromatógrafo de gases (divulgación científica IQOG-CSIC)
CanalDivulgación

3.1. INYECTORES

El método más común de introducción de la muestra en el sistema cromatográfico implica el uso de una microjeringa para inyectar volúmenes de muestra del orden de μL . La punta de la jeringa atraviesa un *septum* de goma de silicona para introducir la muestra en una cámara de vaporización situada a la cabeza de la columna.

❑ Inyector Split/Splitless (con/sin división de flujo)

. Trabaja a T fija (entorno a los 250°C)

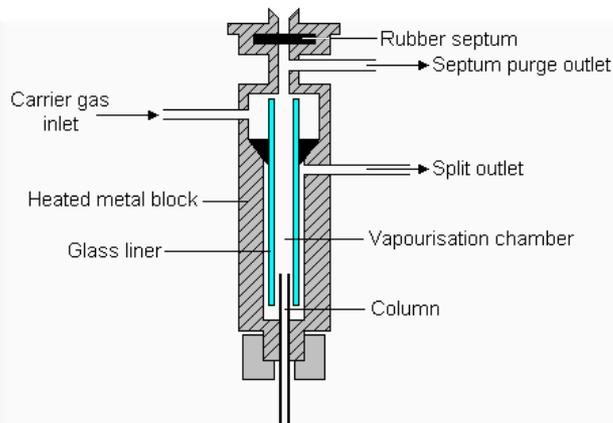
. El gas portador que arrastra la muestra, una vez evaporada, se divide en dos partes. Una sale al exterior, mientras que la otra fracción entra en la columna.

❑ Inyector PTV (vaporizador con T programada)

. La muestra se introduce en frío y se calienta súbitamente, lo que provoca la evaporación más homogénea de la muestra.

. Puede ser también con/sin división de flujo.

. Método especialmente recomendable para el análisis de compuestos termolábiles.



Inyector Split/Splitless

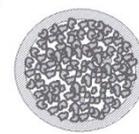
3.2. COLUMNAS / FASE ESTACIONARIA

La columna es un tubo en el que se dispone la fase estacionaria

- . Columnas abiertas: la fase estacionaria se impregna sobre la pared interna del tubo
- . Columnas de relleno: la fase estacionaria se deposita sobre partículas sólidas que llenan totalmente el tubo



abierta



De relleno

Además, según sus dimensiones las columnas pueden ser

Tabla 5.3 Dimensiones habituales en las columnas que se usan en GC

Tipo	Denominación	Diámetro (mm)	Longitud (m)	Cantidad de fase	d_p (μm)
Abiertas	Ultrarrápidas/ microcapilares	0,05-0,1	10-25	0,1-0,5 ^a	–
	Capilares	0,1-0,3	10-100	0,1-5 ^a	–
	Semicapilares/ megacapilares	0,5-0,75	10-100	0,2-5 ^a	–
	PLOT	0,5-1	10-100	0,5-10 ^b	–
	SCOT	0,5-1	10-100	0,5-30 ^b	80-500
De relleno	Capilares rellenas	0,8-1	2-7	5-15 ^c	80-200
	Clásicas	2-6	2-7	5-15 ^c	80-500

^a d_p , en μm .

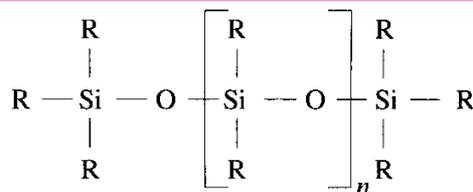
^b espesor del lecho (soporte + fase estacionaria), en μm .

^c % de fase estacionaria.

**Más habituales:
Capilares**

❑ **Fases estacionarias líquidas:**

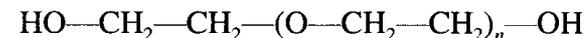
Polisiloxanos o siliconas:



La funcionalidad química de los radicales R determina la polaridad y la estabilidad térmica.

R= metilo, vinilo, fenilo, cianoalquilo (de menor a mayor polaridad)

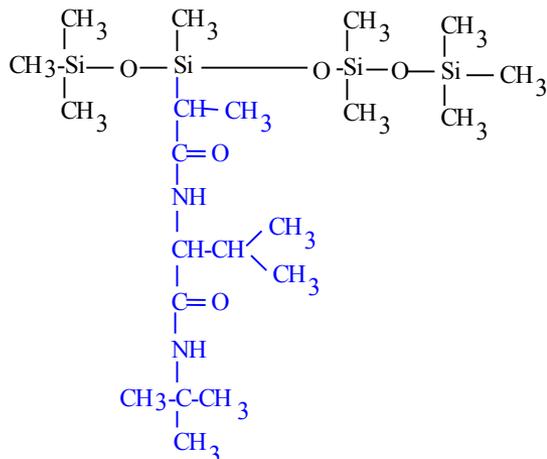
Polietilenglicoles:



Polímeros de peso molecular variable. Apropriadas para el análisis de compuestos polares

Fase estacionaria	Nombre comercial común	Temperatura máxima, °C	Aplicaciones comunes
Polidimetilsiloxano	OV-1, SE-30	350	Fase estacionaria no polar de uso general; hidrocarburos, aromáticos polinucleares, fármacos, esteroides, PCB
Poli(fenilmetildimetil) siloxano (10 por 100 fenil)	OV-3, SE-52	350	Ésteres metílicos de ácidos grasos; alcaloides; fármacos; compuestos halogenados
Poli(fenilmetil)siloxano (50 por 100 fenil)	OV-17	250	Fármacos, esteroides, pesticidas, glicoles
Poli(trifluoropropildimetil) siloxano	OV-210	200	Aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos
Polietilenglicol	Carbowax 20M	250	Ácidos libres, alcoholes, éteres, aceites esenciales; glicoles
Poli(dicianoalildimetil) siloxano	OV-275	240	Ácidos grasos poliinsaturados, ácidos de la colofonia, ácidos libres, alcoholes

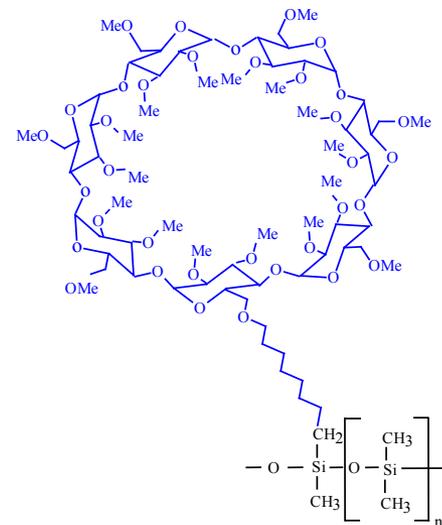
❑ **Fases quirales:** Permiten la separación de los enantiómeros de un compuesto quiral



Chirasil-Val



Derivados de aminoácidos



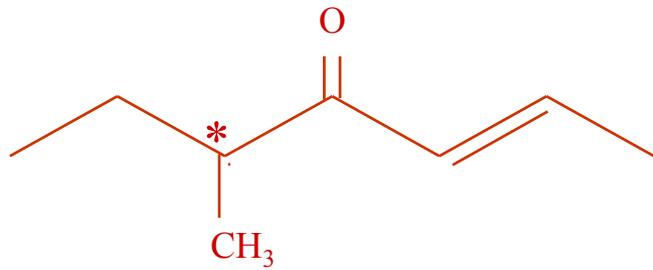
Chirasil-β-Dex



Derivados de ciclodextrinas

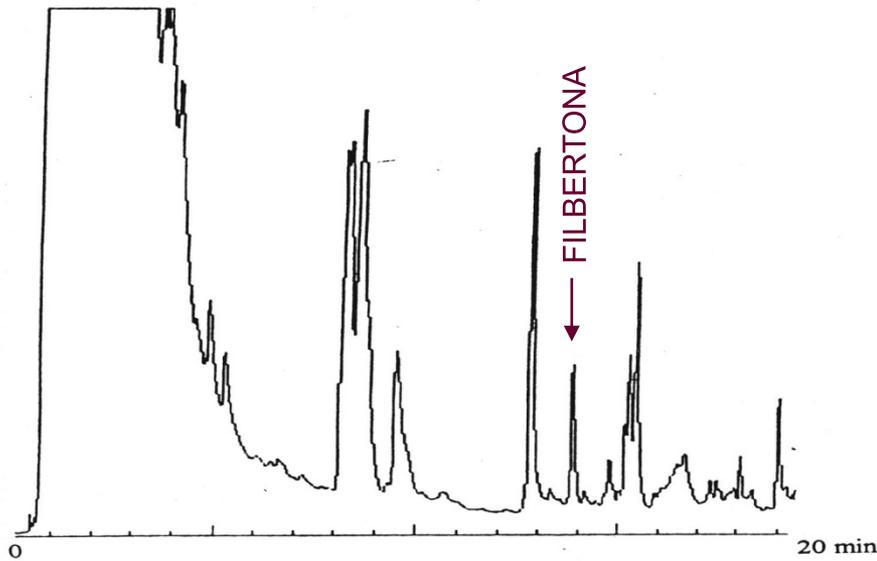
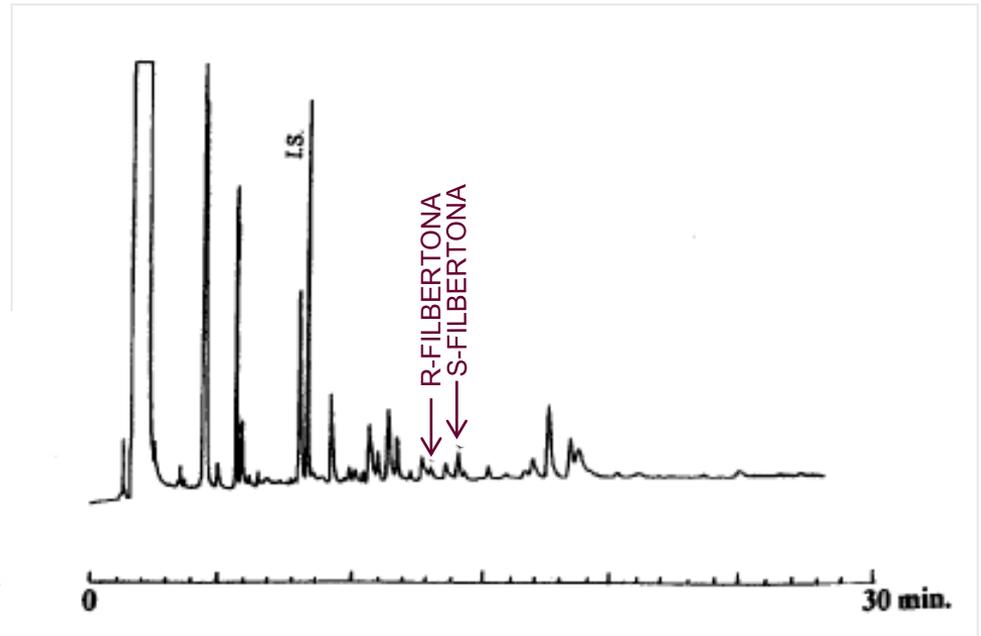
Ciclodextrina: anillos de varias unidades de α-D-glucopiranosas, unidas entre sí por enlace 1,4-glicosídico.

Las ciclodextrinas pueden estar disueltas en un polisiloxano o ancladas químicamente, lo que incrementa la estabilidad térmica.



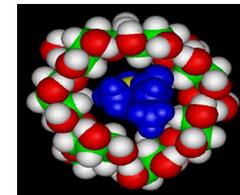
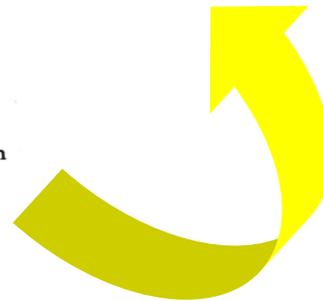
E-5-metil-2-hepten-4-ona
Filbertona

Análisis de aceite de avellana



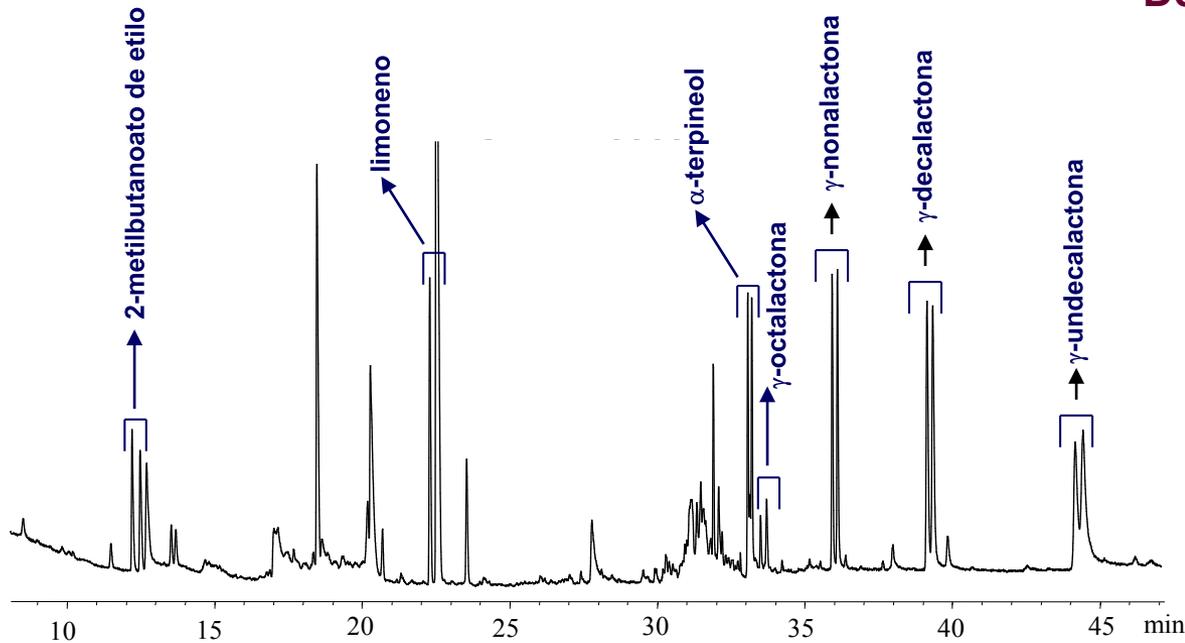
Análisis con columna aquiral

Análisis con columna quiral

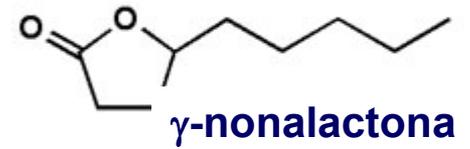
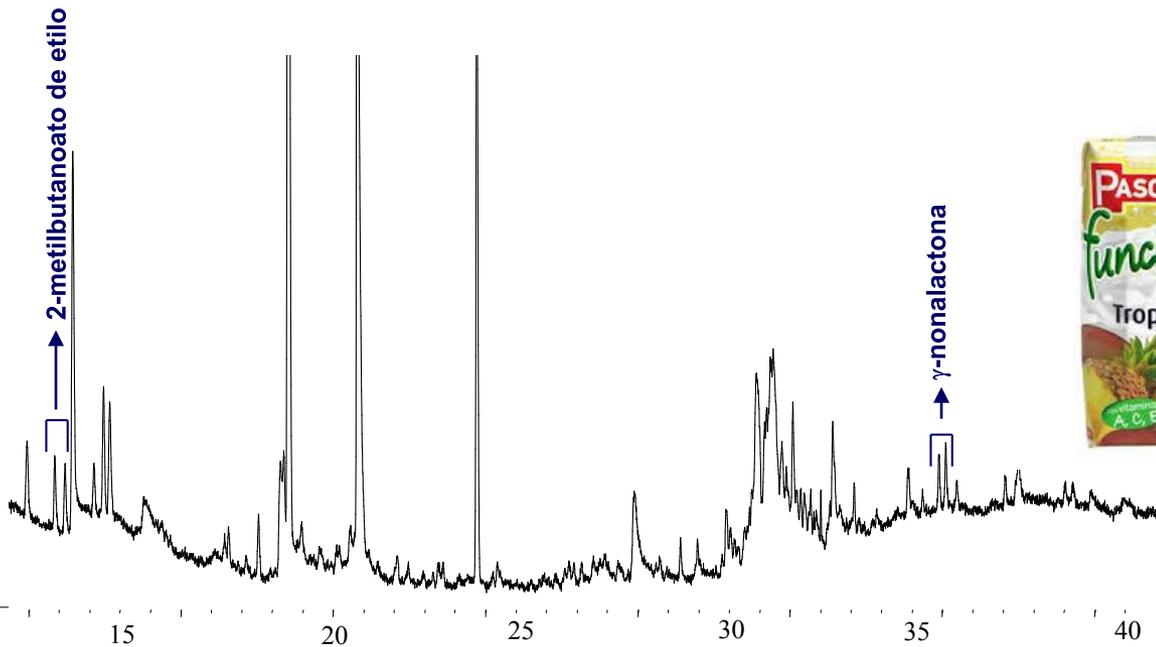


Chirasil-β-Dex

Detección de aromas artificiales



→ disolución patrón



→ bebida de frutas

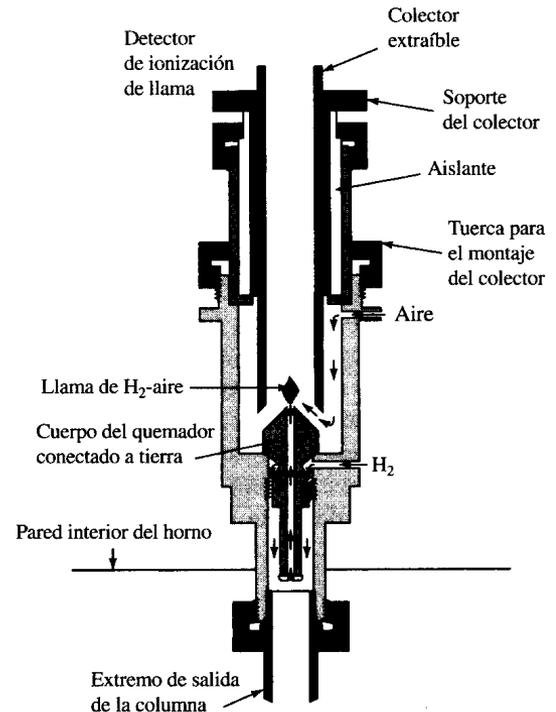


3.3. DETECTORES

❑ **FID (detector de ionización de llama):**

. Consiste en un quemador en el que el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y aire. Los compuestos orgánicos, al pirolizarse en la llama, producen iones y electrones que conducen la electricidad a través de la llama. Sobre la llama hay un electrodo colector. Entre dicho electrodo y el quemador se establece una diferencia de potencial y se mide el incremento de la corriente al paso e ionización por la llama de los analitos.

. Detector prácticamente universal (gran aplicabilidad), de elevada sensibilidad



❑ Detectores termiónicos (TID)

Derivados del FID. Selectivos para compuestos que contienen N o P

❑ Detectores de captura de electrones (ECD)

Específico para derivados halogenados. Se emplea sobretodo en análisis medioambiental

❑ Espectrómetro de masas (MS), espectrómetro de masas de relaciones isotópicas IRMS



Equipo GC-MS

3.4. APLICACIONES:

Análisis de compuestos volátiles

→ Caracterización

→ Detección de pesticidas

→ Detección de contaminantes

→ Análisis de metabolitos

- Estudios clínicos
- Aplicaciones agrícolas
- Microbiología

→ Identificación de marcadores

- Adulteración
- Procesos tecnológicos
- Biomarcadores

Masiá y col.
Anal Chim Acta. (2016) 936 40–61
↓
Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-massspectrometry: A review.

Elss y col.
Food additives and contaminants (2004) 21 811-814
↓
Contaminación de alimentos infantiles envasados en tarros de cristal con ácido 2-etilhexanoico, procedente de las juntas de plástico de las tapas metálicas

Jiye y col.
Anal. Chem. (2005) 77 8086–8094
↓
Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome

Madla y col.
Journal of Microbial & Biochemical Technology. (2012.)
↓
Optimization of Extraction Method for GC-MS based Metabolomics for Filamentous Fungi

Ruiz-Matute y col.
J. Agric. Food Chem. (2007) 55 7264-7269
↓
Anhídridos de difructosa como indicadores de la adulteración de mieles con siropes

Mohammad y col.
PLoS One. (2015) 10
↓
GC-MS Based Plasma Metabolomics for Identification of Candidate Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Cohort

4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

- ❑ Fase móvil: líquido, generalmente agua con metanol o acetonitrilo (isocrático, o con gradiente)
- ❑ Modos de separación:
 - Fase normal: fase estacionaria es más polar que la fase móvil.
 - Fase inversa: fase estacionaria generalmente apolar y fase móvil más polar que la fase estacionaria

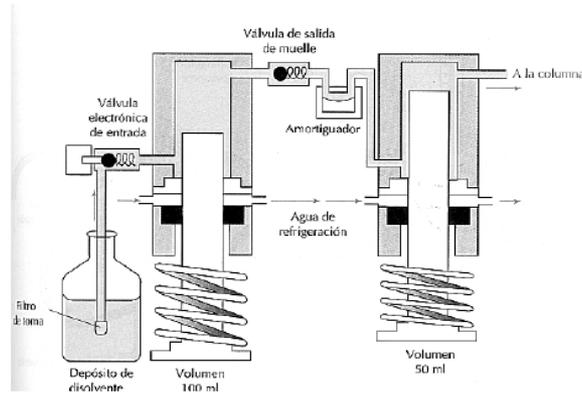


La HPLC (High Performance Liquid Chromatography) se utiliza para separar los componentes de compuestos químicos y biológicos no volátiles.

4.1. BOMBA

Impulsa la fase móvil y suministra una presión adecuada de trabajo, que debe ser constante durante todo el proceso cromatográfico.

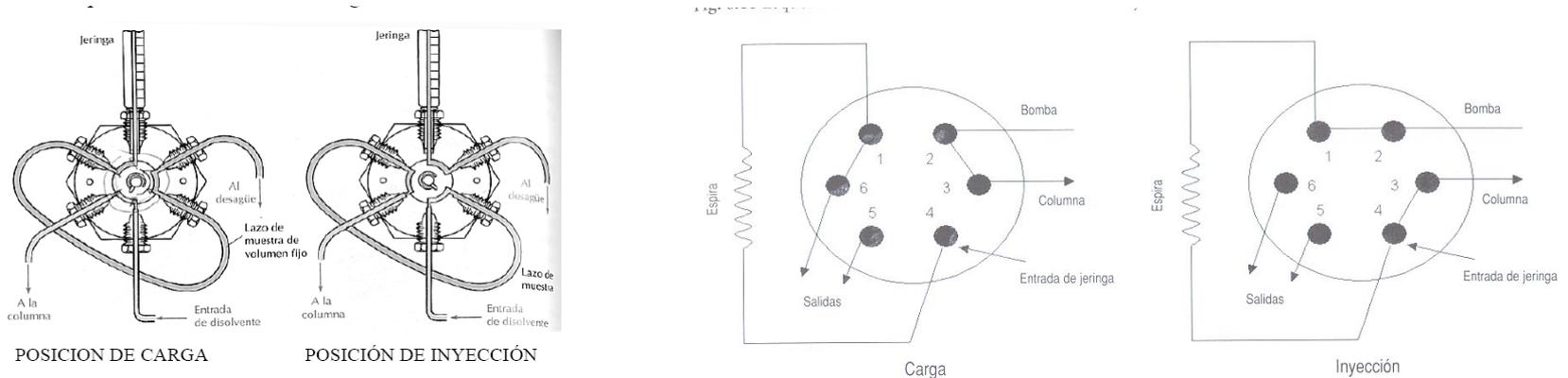
Las más utilizadas son las de doble pistón.



Bomba de doble pistón

4.2. INYECTOR- VÁLVULA RHEODYNE

Válvula de 6 vías. Permite insertar un volumen fijo de muestra en el recorrido de la fase móvil, sin que varíe la presión del sistema cromatográfico.

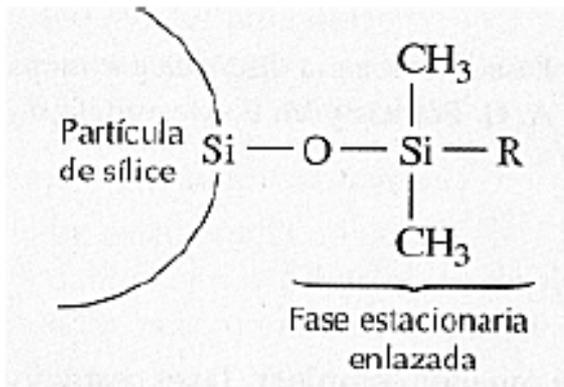


4.3. COLUMNA:

Según sus dimensiones (y aplicaciones) hay columnas preparativas, semipreparativas, analíticas y microcolumnas. Obviamente, en los procesos analíticos las más habituales son las analíticas con dimensiones de 10 a 40 cm de longitud y diámetro interno de 1 a 5 mm, generalmente de relleno.

. Fases estacionarias: dependen del proceso cromatográfico que se vaya a realizar (fase normal o inversa, reparto, exclusión, intercambio iónico, bioafinidad, etc..)

Actualmente, el mayor número de aplicaciones de la técnica tiene lugar con cromatografía de reparto, con columnas de relleno de fase inversa.



Siloxano

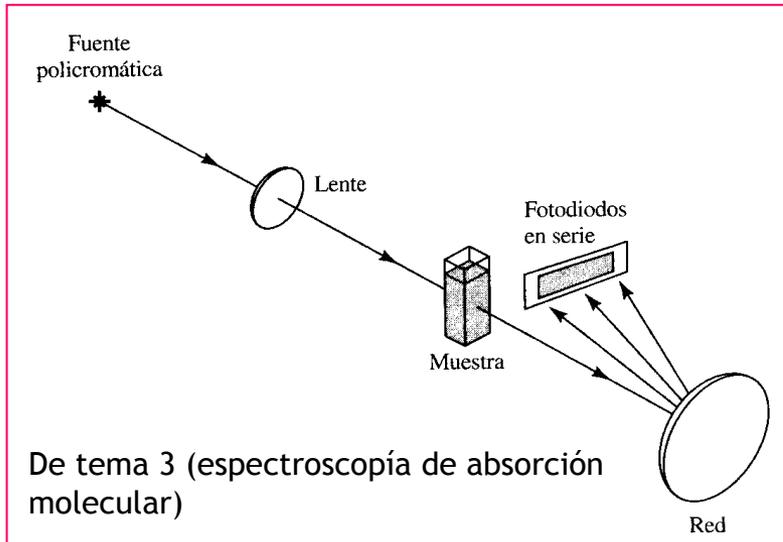
Grupo R:

- . cadena C8 (n-octilo)
- . cadena C18 (n-octadecilo; cadena lineal de 18 carbonos)

4.4. DETECTOR:

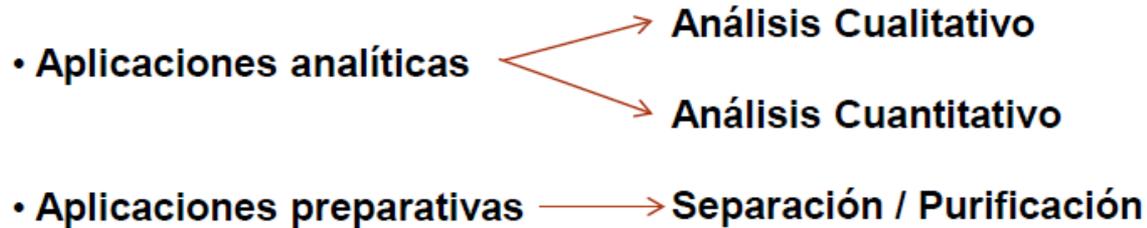
- ❑ Detector de absorbancia UV-Vis: pueden ser de longitud de onda fija, variable o de matriz de fotodiodos (diodo array). Proporcionan una gran sensibilidad (10^{-7} - 10^{-8} g/mL).
- ❑ Detector de fluorescencia
- ❑ Detector de índice de refracción
- ❑ HPLC-FTIR
- ❑ HPLC-MS

4.5. APLICACIONES:



Campo	Mezclas típicas
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensioactivos, propulsores, colorantes
Contaminantes	Pesticidas, herbicidas, fenoles, PCB
Química forense	Drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos.

5. APLICACIONES GENERALES DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS



Fuente de error más importante en el análisis cuantitativo:

Incertidumbre en el volumen de muestra introducido



- ❑ **Método del patrón interno:** en cada disolución patrón y en cada muestra se introduce una cantidad exactamente medida de una sustancia que llamamos estándar o patrón interno. Lo que se emplea como parámetro analítico es la relación entre las áreas del analito y del patrón interno. Condiciones: el pico del patrón interno debe estar bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra. El pico del patrón debe aparecer cerca del pico del analito.
- ❑ **Método de la normalización de áreas:** se suman las áreas correspondientes a los picos de todos los componentes de la muestra. El área del analito se corrige en función de su relación con el área total de los picos.

6. LÍNEAS DE EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

➡ Desarrollo de nuevas fases estacionarias

└─→ Nuevas aplicaciones, menor consumo de tiempo

➡ Miniaturización de los sistemas

└─→ Abaratamiento, menor consumo de tiempo y de materiales requeridos

➡ Acoplamientos de sistemas

└─→ El análisis se realiza con el 2º sistema cromatográfico. El 1º sirve como etapa previa de preparación de muestra

NUEVAS FASES ESTACIONARIAS - CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

➔ Desarrollo de columnas monolíticas

Buena eficacia
Mejor permeabilidad
Mayor velocidad de flujo

Reducción del tiempo de análisis

Barbero y col.
Food Chem. (2008) 107 1276-1282

Determinación de capsaicinoides en guindilla. RP-HPLC-F
Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4.6 mm)
Flujo fase móvil: 6 mL/min

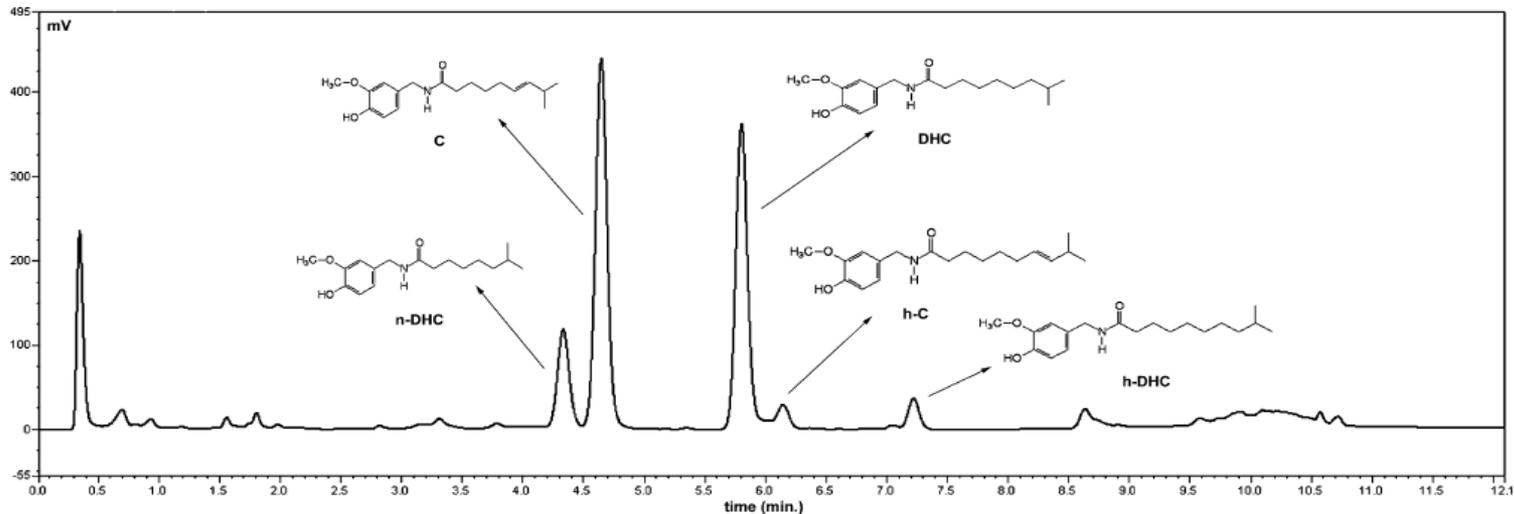


Fig. 1. Chromatogram of pepper extract and chemical structures of capsaicins (nordihydrocapsaicin (n-DHC), capsaicin (C), dihydrocapsaicin (DHC), homocapsaicin (h-C) and homodihydrocapsaicin (h-DHC)). Fluorescence detection: excitation 280 nm, emission 310 nm.

La capsaicina es un compuesto activo de los pimientos picantes. Se usa como aditivo alimentario para generar sabor picante. También se emplea en medicina por sus propiedades analgésicas

MINIATURIZACIÓN - CROMATOGRAFÍA DE GASES

Sistemas FAST



Columnas más cortas
Mayor velocidad de gas portador

Mondello y col.
J. Sep. Sci. (2004) 27 699



Aceite esencial de lima

ULTRA FAST

SE-52

5 m x 50 μm I.D. d.f.= 0.05 μm

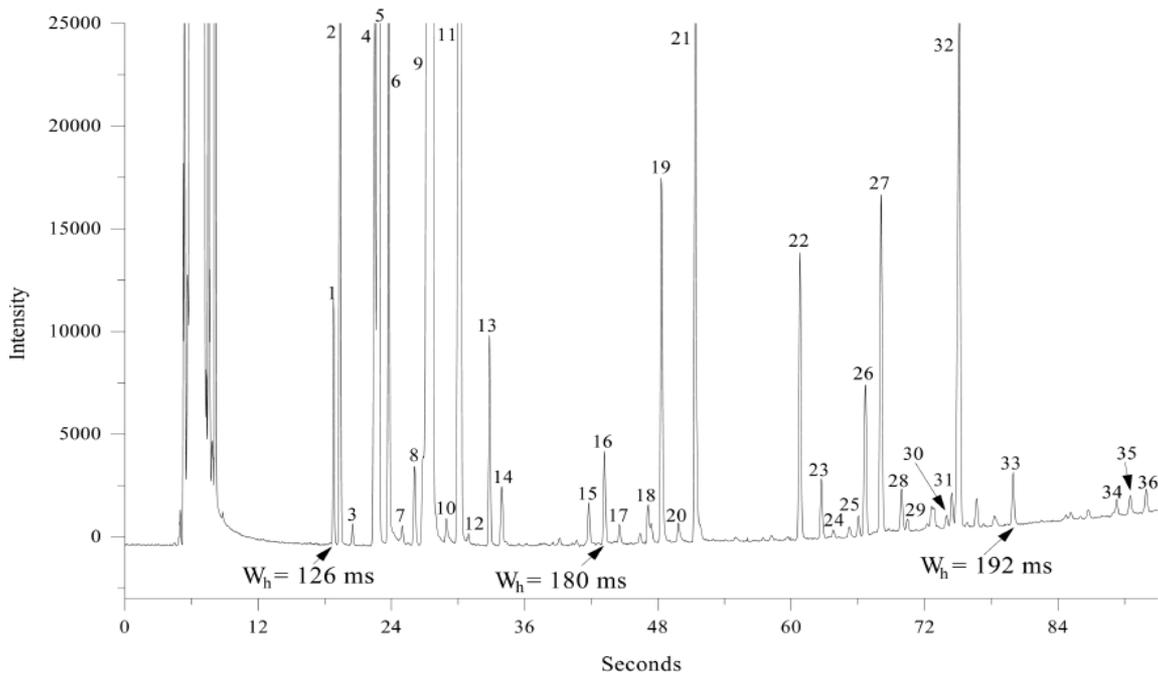
880 kPa (H_2)

CONVENCIONAL

TRx5-MS

30 m x 250 μm I.D. d.f.= 0.25 μm

102 kPa (He)



Nº	Identity
1	α -Thujene
2	α -Pinene
3	Camphene
4	Sabinene
5	β -Pinene
6	Myrcene
7	Octanal+ α -Phellandrene
8	α -Terpinene
9	<i>p</i> -Cymene + Limonene
10	<i>E</i> - β -Ocimene
11	γ -Terpinene
12	<i>cis</i> -Sabinene hydrate
13	Terpinolene
14	Linalool
15	Terpinen-4-ol
16	α -Terpineol
17	Decanal
18	Nerol
19	Neral
20	Geraniol+Piperitone
21	Geranial
22	Neryl acetate
23	Geranyl acetate
24	α -Elemene
25	<i>cis</i> - β -Bergamotene
26	α -Caryophyllene
27	<i>trans</i> - α -Bergamotene
28	α -Humulene+ <i>E</i> - β -Farnesene
29	Santelene
30	α -Selinene
31	<i>Z</i> - α -Bisabolene
32	(<i>E</i> - <i>E</i>)- α -Farnesene+ β -Bisabolene
33	Germacrene B
34	2,3-Dimethyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)-2-norbornanol
35	Campherenol
36	α -Bisabolol

ACOPLAMIENTOS

. Sistemas multidimensionales



. Sistemas comprehensive

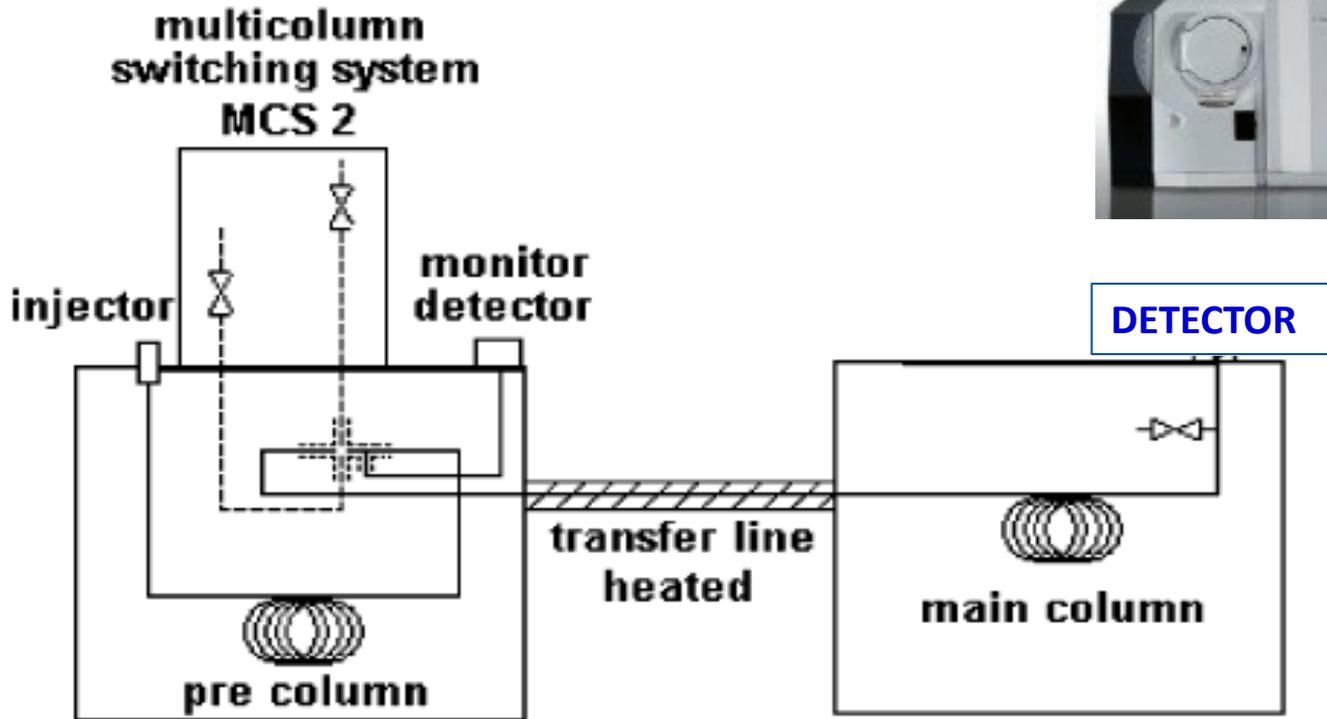


. Acoplamiento on-line LC-GC



❑ Sistemas multidimensionales

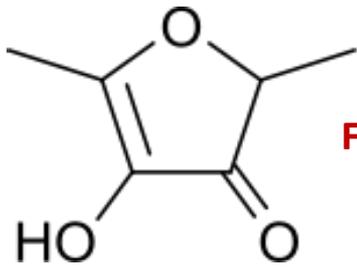
GC-GC



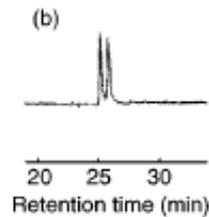
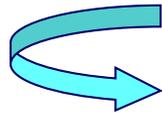
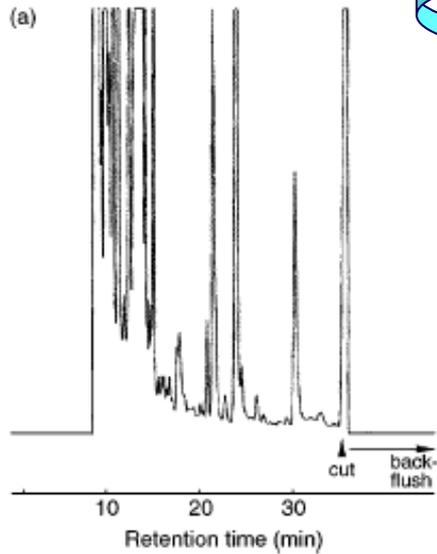
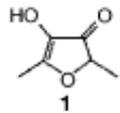
Fraction in the first column containing the target compounds is transferred (“heart-cut”) to the second column

MDGC-C/P-IRMS

Sewenig y col.
J. Agric. Food Chem. (2005) 53 838-844



FURANEOL



Addition of Synthetic Racemate

**Mosandl et al.
J. High Resolut. Chromatogr. (1990) 13 660-662**



Analysis of pineapple ketone in a "strawberry tea"

Precolumn: Carbowax 20M (60 m, 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness);
Main Column: permethylated β -cyclodextrine column (47 m x 0.23 mm i.d.)

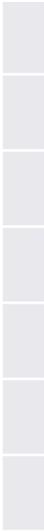
❑ Sistemas comprehensive



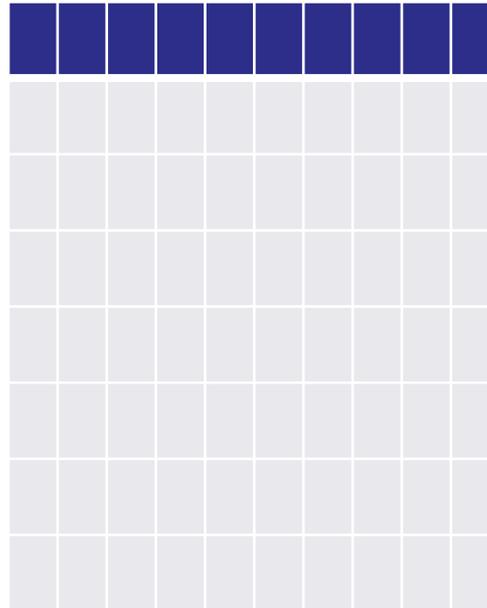
1 D GC



MDGC



GC xGC



. The entire sample is subjected to reanalysis on the 2^o column

. No fractions go unexplored

typical GC x GC setup

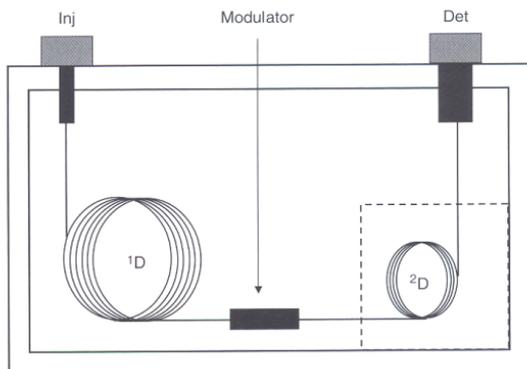
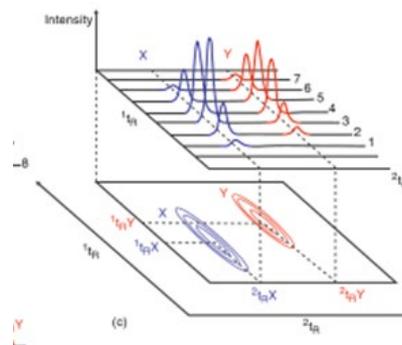


Figure 4 Schematic of the basic setup for GC×GC. Note that the whole sample elutes through both columns and that only one detector is used. Dotted line: optional secondary oven, placed inside the main oven, for independent temperature control of the second column.



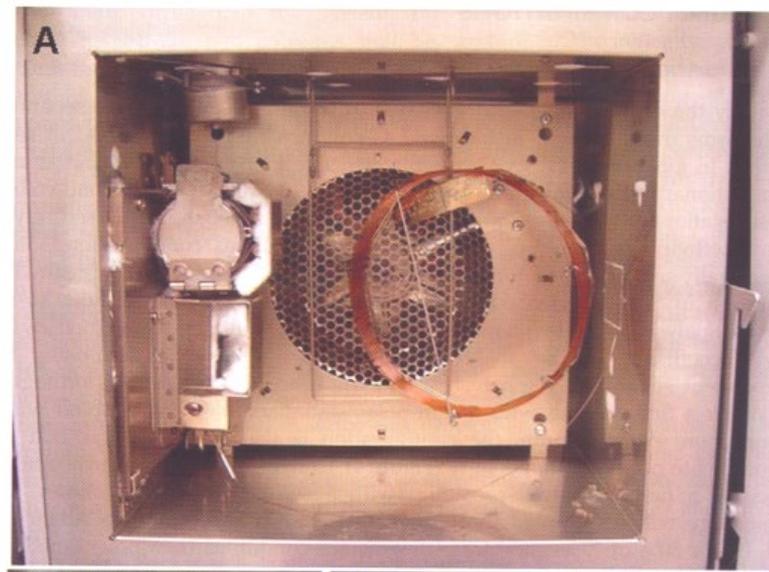
2D separation of each fraction has to be completed before the next fraction is subjected to reanalysis



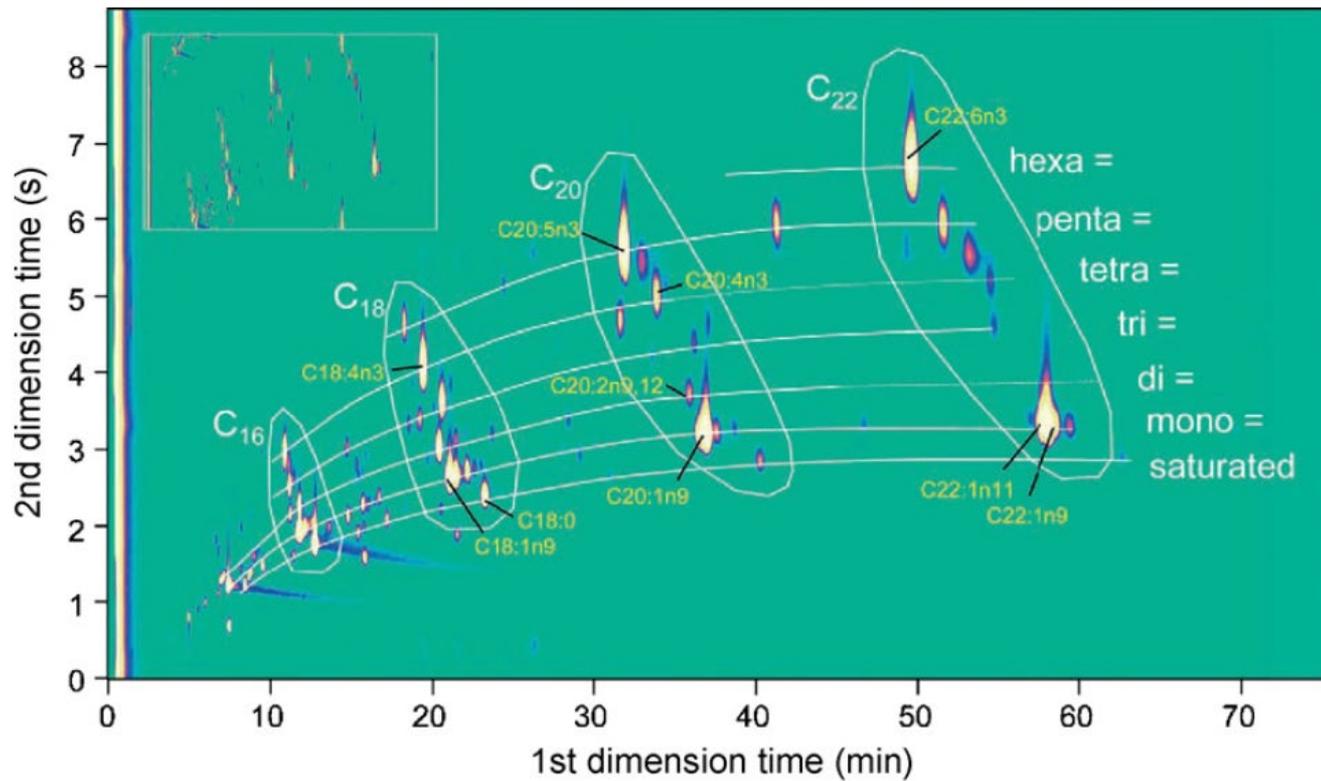
SECOND COLUMN HAS TO BE EXTREMELY SHORT

. First dimension: (15-60) m x (0.25-0.53) mm ID x (0.25-1) μm d_f

. Second dimension: (0.5-2) m x 0.1 mm ID x (0.1-0.25) μm d_f



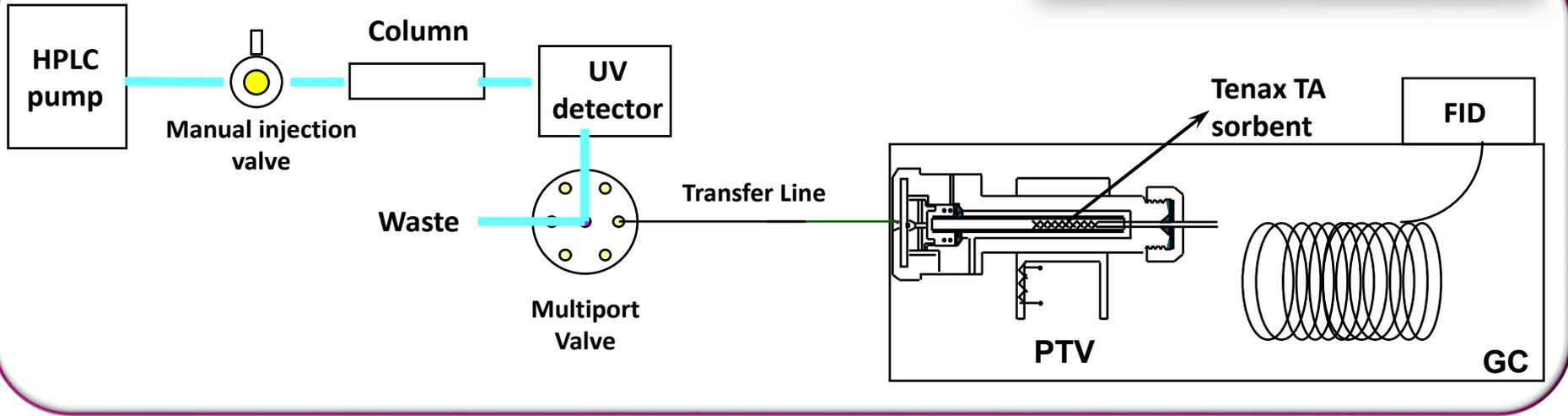
SEPARATION OF C16:0 THROUGH TO C22:0 FAS IN HERRING OIL



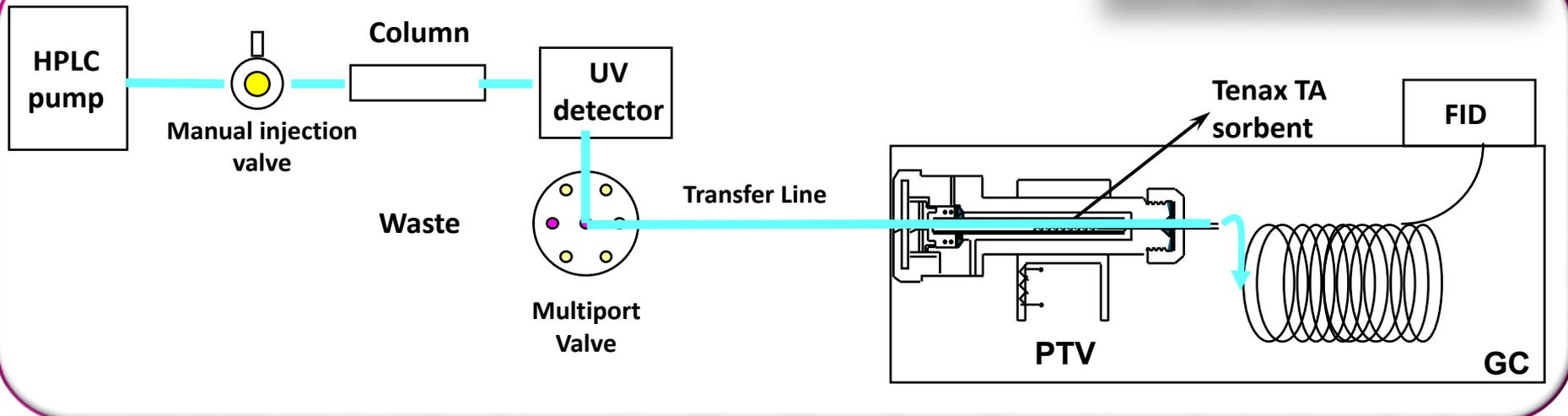
❑ Acoplamiento on-line LC-GC

LC-GC

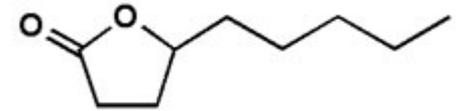
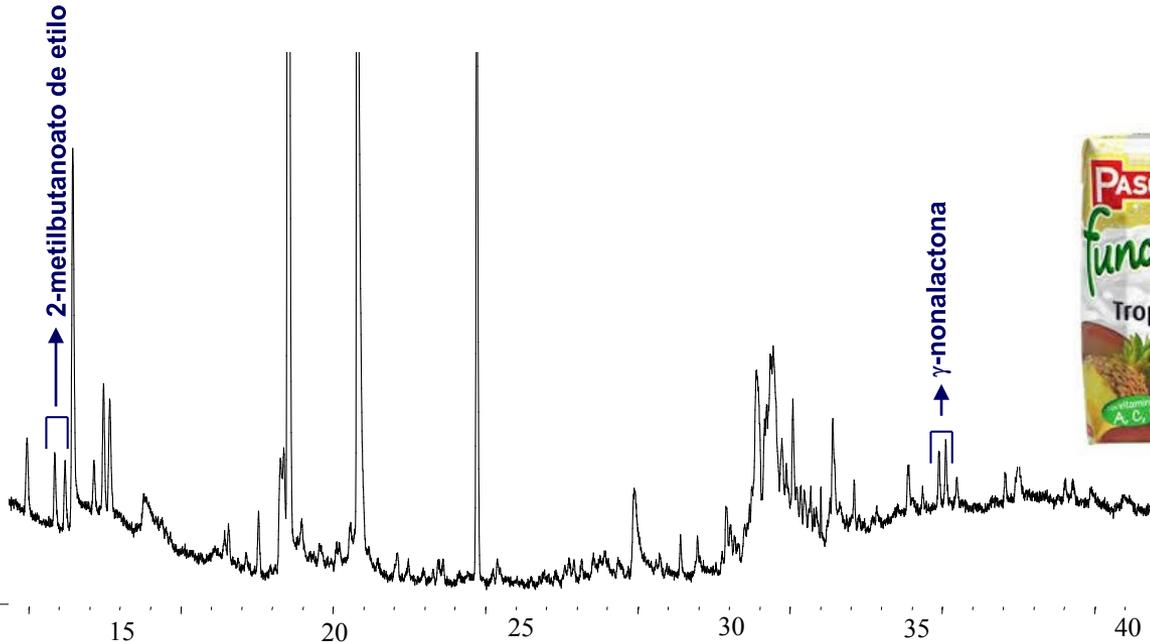
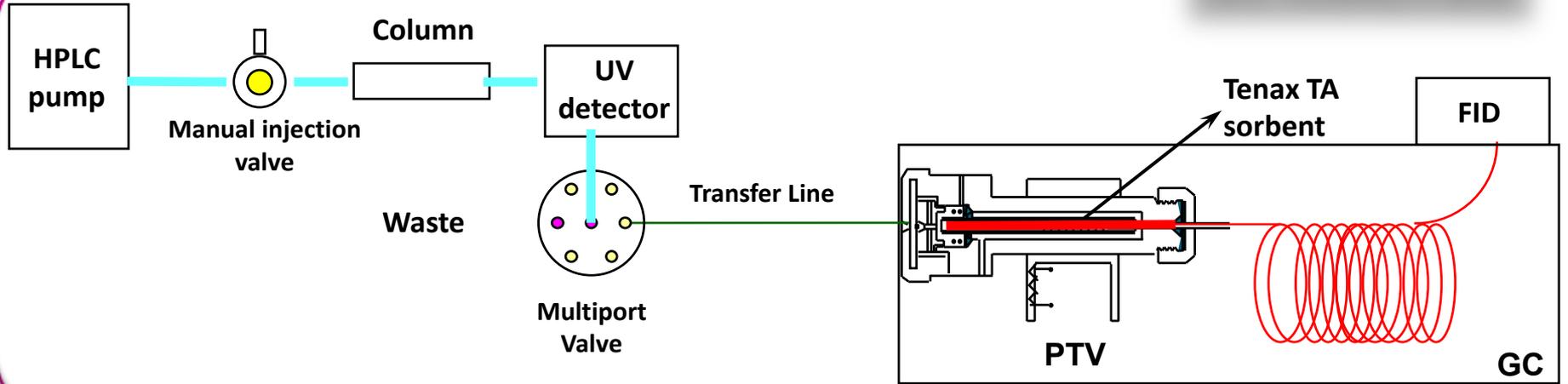
LC PRESEPARATION



LC-GC TRANSFER



GC ANALYSIS



γ -nonalactona

→ bebida de frutas

