

CROMATOGRAFÍA

Prof. Francisco Rojo Callejas

GENERALIDADES:

Tiempo de retención (t_r , fig 1)

El tiempo que un soluto permanece en la columna. Se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo del pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes. Auxiliar en la identificación de los solutos.

Tiempo muerto (t_o , fig 1)

El tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Tiempo que cualquier soluto permanece en fase móvil. Representa el espacio vacío de la columna.

Tiempo de retención ajustado (t'_r , fig 1)

Mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria.

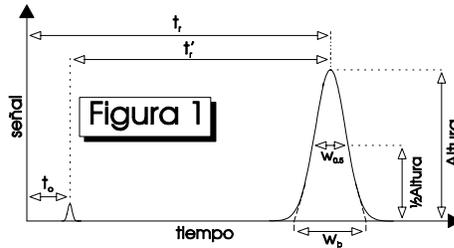
$$t'_r = t_r - t_o$$

Ancho a la base (w_b , fig 1)

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

Ancho a la mitad de la altura ($w_{1/2}$, fig 1)

Una medida mas reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).



Número de platos teóricos (N)

Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. se calcula con cualquiera de las ecuaciones:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 5.545 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{t_r}{\text{Area}/\text{Altura}} \right)^2$$

donde t_r y w_b o $w_{1/2}$ se deben expresar en las mismas unidades, por ser N adimensional.

Altura equivalente a un plato teórico (H, AEPT, HETP)

Segmento de columna que representa un plato teórico. Es la medida inversa de la eficiencia del sistema, entre menor sea H el sistema es mas eficiente (se tienen mas platos teóricos en la misma

longitud de columna). se calcula como: $H = L/N$

usualmente H y L se expresan en mm.

Factor de capacidad (k')

Se define como la razón de la cantidad de soluto en fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil al equilibrio. Es igual a la relación del tiempo que el soluto permanece en fase estacionaria respecto al tiempo en fase móvil:

$$k' = \frac{t'_r}{t_o}$$

Selectividad (α, fig 2)

Mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Un valor mayor de α significa una columna mas selectiva y mejor separación entre solutos. Se calcula como el tiempo de retención corregido del soluto mas retenido entre el del menos retenido.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{r,2}}{t'_{r,1}} \geq 1$$

Resolución (Rs, fig 2)

Es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos. **Se calcula con:**

$$R_s = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{(w_{b,2} + w_{b,1})}$$

donde los tiempos de retención y los anchos se expresan en las mismas unidades. La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0 (ver fig 3), una resolución de 1.5 representa separación a la línea base.

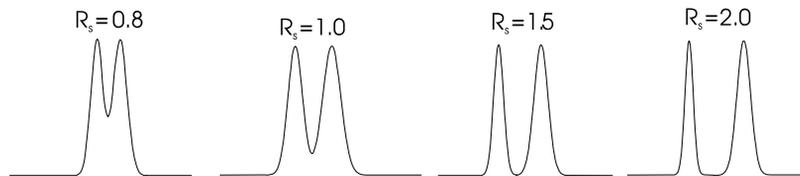
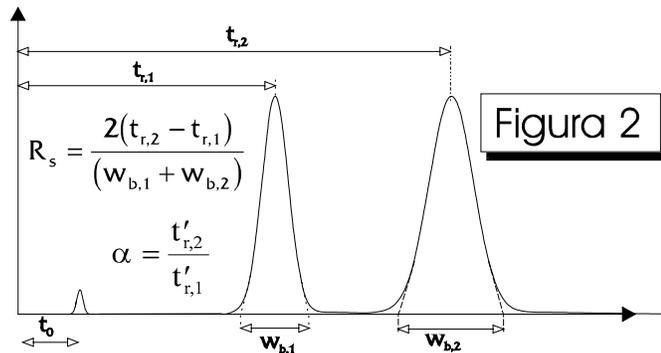


Figura 3. Ejemplos de resolución entre dos picos cromatográficos

Ecuación maestra de la resolución

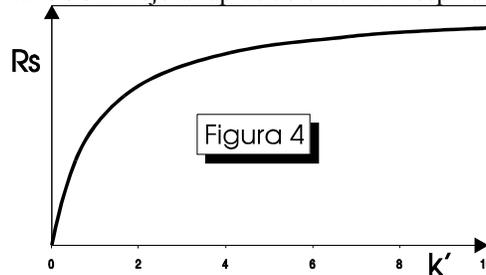
Analiza las variables primarias de control de la resolución, la ecuación tiene la forma:

$$R_s = \frac{\sqrt{L/H}}{4} \left(\frac{k'}{1+k'} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right)$$

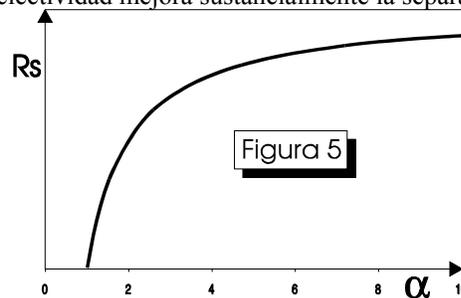
2

Las tres conclusiones que se obtienen son:

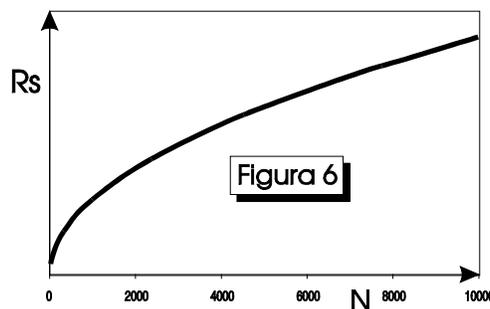
1. A mayor retención (k'), mejor resolución (fig 4), pero la curva es asintótica. Para tener buenas separaciones se necesita un factor de capacidad $k' > 2$. En mezclas sencillas un k' mayor de seis solo aumenta el tiempo de análisis sin mejorar apreciablemente la separación.



2. A mayor selectividad mayor resolución (fig 5). Nuevamente la gráfica es asintótica, por lo que no se necesitan selectividades muy grandes. Generalmente se trabaja en la zona cercana a $\alpha=1$, por lo que cualquier aumento en la selectividad mejora sustancialmente la separación.



3. Entre mayor sea el número de platos teóricos, mejores separaciones (fig 6). La forma de la gráfica (\sqrt{N}) indica que se deben de buscar cambios sustanciales (de varios órdenes de magnitud) para que esta mejora sea importante. El aumentar ligeramente este valor no representa cambios apreciables (p. ej. duplicar N mejora solo 30% la R_s). Se debe de buscar mejorar N con sistemas mas eficientes (H pequeño) y solo en casos especiales con columnas mas largas (análisis mas lentos).



FUNDAMENTOS

Eficiencia

Flujo de fase móvil (F_0)

Se mide a las condiciones de salida de la columna (P y T ambientales). Comúnmente se emplean caudalímetros de burbuja, por lo que el cálculo del valor medio de la columna involucra la corrección por la temperatura de operación de la columna, la caída de presión en la misma y la presión de vapor del agua. Se expresa en ml/min.

Velocidad lineal promedio de la fase móvil (v)

Se calcula con: $v=L/t_0$. Un estimador exacto involucra la evaluación matemática de t_0 con series homólogas. Generalmente se calcula aproximando el tiempo muerto (t_0) con un compuesto poco retenido (por ejemplo el metano). Se expresa en cm/seg.

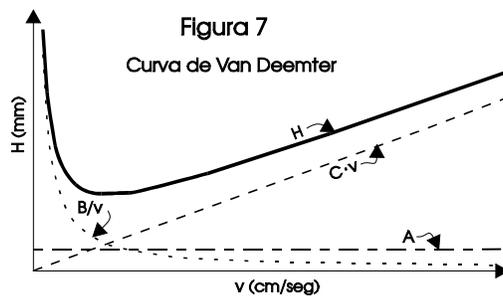
Ecuación de Van Deemter

Analiza las variables que afectan la eficiencia de los sistemas cromatográficos. La forma simplificada de la ecuación es:

$$H = A + B/v + C \cdot v$$

En la ecuación anterior los términos empíricos representados son:

- **A** es el efecto multicanales. En sistemas empacados analiza el efecto del tamaño y forma de las partículas y de la densidad de empacado.
- **B** representa la difusión axial, la que depende de la movilidad de las moléculas en las fases.
- **C** representa la resistencia a la transferencia de masa. Este término permite concluir que para obtener sistemas eficientes se necesitan fases poco viscosas (helio o hidrógeno en lugar de nitrógeno, fases estacionaras fluidas en lugar de gomas), espesores de película delgados (décimas de μm) y columnas de poco diámetro (capilares en lugar de "megabore").
- **v** la velocidad afecta la altura del plato teórico de modo que existe un flujo óptimo (fig 7) en que se obtiene el máximo de eficiencia. En la práctica se trabaja a flujos mayores del óptimo para reducir el tiempo de análisis.

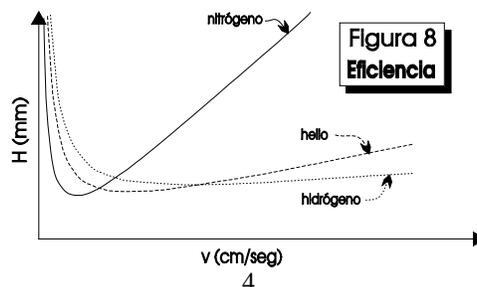


Ecuación de Golay

En columnas capilares no existe el efecto multicanales ($A=0$), por lo que la ecuación de Van Deemter se reduce a:

$$H = B/v + C \cdot v$$

La fórmula anterior es la forma simplificada de la ecuación de Golay. A diferencia de Van Deemter esta es una ecuación exacta deducida teóricamente y comprobada experimentalmente. El que no haya efecto multicanales indica que las columnas capilares son inherentemente más eficientes. Además, la restricción al flujo es mucho menor por lo que las columnas pueden ser mucho más largas (10 a 60m comercialmente) y con mucho mayor poder de separación. En la figura 8 se muestran las gráficas típicas de los tres gases más empleados como fase móvil en Cromatografía de gases.



ELUCIÓN PROGRAMADA

En cromatografía se denomina el análisis de mezclas complejas como problema general de elución.

En condiciones de trabajo isotérmicas (cromatografía de gases, CG) o isocráticas (cromatografía de líquidos, CL) la ecuación general de la resolución permite optimizar la separación de una pareja de compuestos. En particular se puede optimizar la separación de los solutos menos retenidos (fig. 9, temperatura T_1), pero en estas condiciones los solutos con mayor retención tardarían mucho en eluir, las señales serían muy anchas y por lo tanto pequeñas, inclusive podrían no eluir o no ser detectados.

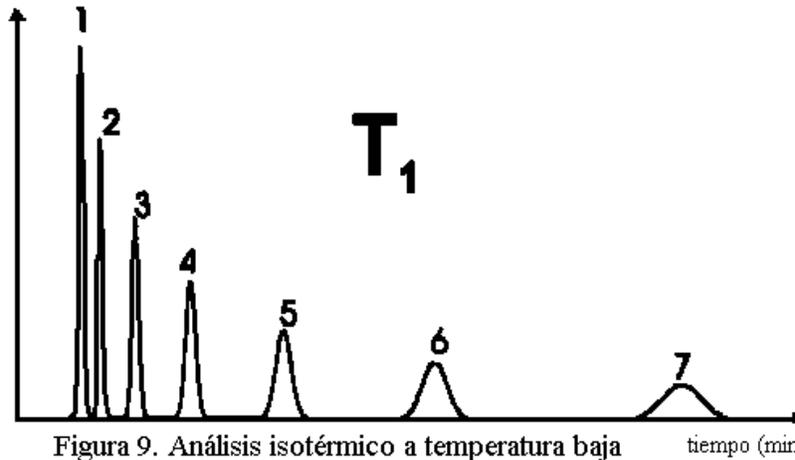


Figura 9. Análisis isotérmico a temperatura baja

Se puede fijar las condiciones de trabajo de modo que se observe la separación de los últimos solutos en eluir (fig. 10). Para ello en CG se necesita una temperatura mayor que la anterior ($T_3 > T_1$). En CL se usaría un disolvente con mayor poder de elución. Los resultados obtenidos son tales que se observa la separación de los últimos solutos, pero los primeros se retienen tan poco ($k' \sim 0$) que no se separan.

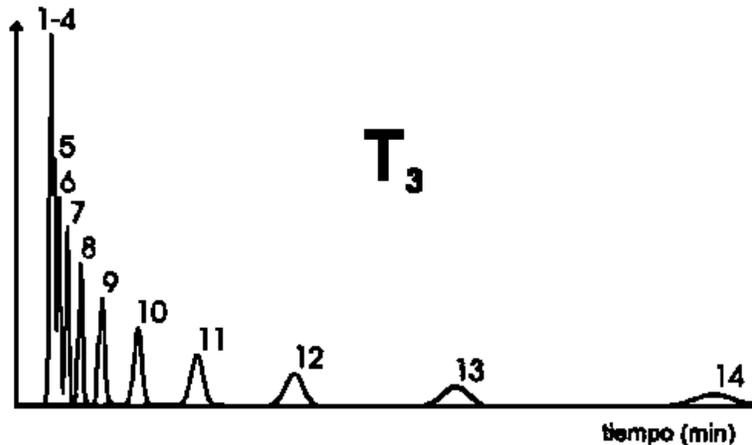


Figura 10. Análisis isotérmico a temperatura alta

El utilizar condiciones de trabajo intermedias (fig. 11, $T_1 < T_2 < T_3$) proporciona resultados intermedios. Ni se logra separar por completo los primeros solutos ni se logra eluir la totalidad de los compuestos de la mezcla.

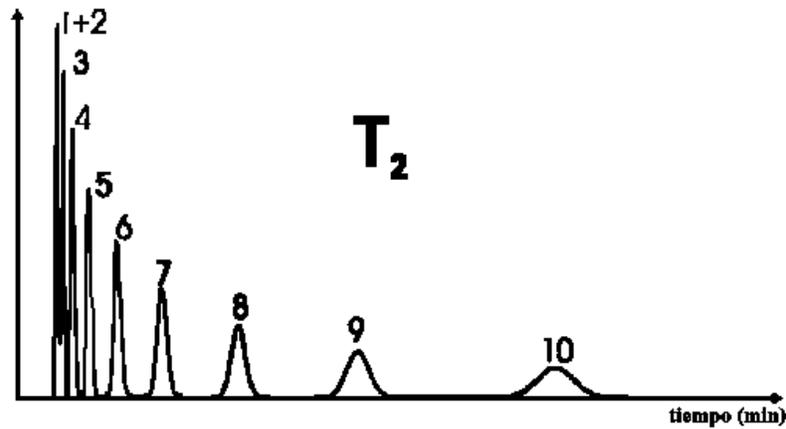


Figura 11. Análisis isotérmico a temperatura intermedia

La solución al problema anterior es la elución programada. En cromatografía de gases se programa linealmente la temperatura y el líquidos se programa exponencialmente la proporción de disolventes (mezclas). Los resultados de un análisis programado se observan en la fig. 12.

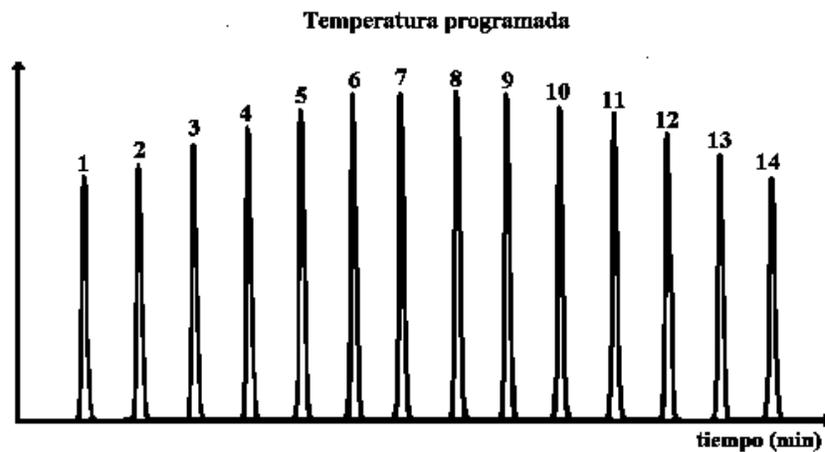


Figura 12. Análisis de temperatura programada

Se observan dos comportamientos importantes. Primero se logra eluir perfectamente separados a la totalidad de los solutos. En particular para las series homólogas el espaciamiento entre picos es casi constante, a diferencia de los análisis isotérmicos en que el espaciamiento crece exponencialmente. Segundo, el ancho de los picos es prácticamente constante, por lo que los últimos picos son mucho más altos que en un análisis isotérmico, se detectan con mayor facilidad.

En cromatografía de gases de temperatura programada el caso mas sencilla y común es la monorampa lineal (fig. 13).

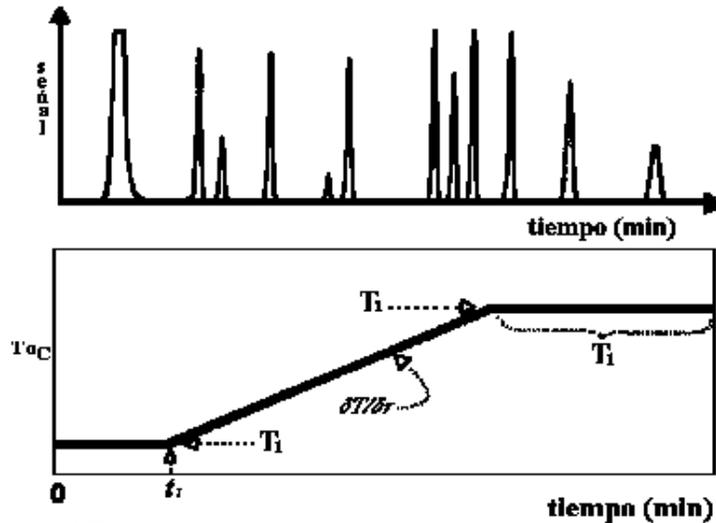


Figura 13. programación lineal de temperatura

Los tres parámetros básicos de la misma son:

1. Temperatura Inicial (T_i). Debe ser la mínima necesaria para lograr separar los primeros solutos sin que se retengan en exceso. Generalmente el mínimo alcanzable se encuentra limitado instrumentalmente ($T_i > (T_{amb} + 20^\circ\text{C})$) excepto en equipos criogénicos. Muchas fases poseen una temperatura mínima de operación por debajo de la cual solidifican y dan malas separaciones. Cuando por cualquier de estas causas no se pueda lograr una temperatura suficientemente baja, se deberá permanecer el tiempo necesario (T_i) para lograr separar los primeros solutos T_1 . Cuando ni así se logre separarlos, la única solución es emplear una columna con mayor retención (e.g. más fase estacionaria).
2. Temperatura final (T_f). La máxima necesaria para eluir los últimos solutos. Una vez que estos salieron, no tiene caso seguir calentando. Nunca se debe sobrepasar la temperatura máxima de operación de la columna. Si se llega a esta y aún faltan solutos por eluir se deberá permanecer a temperatura constante (T_f) el tiempo necesario (T_f) para terminar de eluir los solutos. Si este tiempo es excesivo, se necesitará una columna con menor retención (e.g. menos fase).
3. Velocidad de calentamiento ($\delta T / \delta t$). Depende de la complejidad de la mezcla. En mezclas no muy complejas puede ser alto (hasta $20^\circ\text{C}/\text{min}$) para acortar el tiempo de análisis. En mezclas muy complejas puede ser necesario un calentamiento muy lento ($2^\circ\text{C}/\text{min}$) para lograr la separación. Usualmente se emplean gradientes de 5° a $10^\circ\text{C}/\text{min}$.