

**CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE
CROMATOGRAFÍA**

INTRODUCCIÓN

En 1910, el botánico ruso M. Tswett describió por vez primera esta técnica, que fue aplicada a la separación de pigmentos de plantas, dándole el nombre de cromatografía en referencia a las bandas coloreadas de pigmentos que se separaban por su adsorción selectiva sobre columnas de yeso. Tras su descubrimiento, la cromatografía quedó prácticamente olvidada hasta 1930 año en que fue redescubierta por Kuhn y Lederer, quienes la aplicaron para la separación de carotenoides; a partir de este momento, el uso de esta técnica se fue extendiendo cada vez más, al tiempo que se desarrollaban diferentes versiones de la misma: cromatografía de reparto (Martin y Synge, 1941), de papel (Consden, Gordon y Martin, 1944), de capa fina (Stahl, 1958), etc. Un hito importante en el desarrollo de la cromatografía lo constituyó el desarrollo de la cromatografía gas-líquido (Martin y James, 1952), técnica que encontró rápidamente aplicaciones de gran importancia, lo que llevó a su vez al desarrollo de la teoría de la separación cromatográfica (Van Deemter, 1956; Giddings, 1965, etc.) así como al desarrollo de una instrumentación que permitía un mayor control de las condiciones de trabajo.

Hoy en día casi no hay campo de la química, biología, medicina, etc. en el que no se utilice la cromatografía en alguna de sus formas, tanto en su vertiente preparativa como en la analítica; por otra parte el desarrollo sobre el uso conjunto de la cromatografía con otras técnicas analíticas, así como el desarrollo de otros tipos de cromatografía, como es por ejemplo la de fluidos supercríticos, hace previsible una extensión aún mayor de su uso.

CONCEPTOS BÁSICOS

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (lecho estacionario), y otra móvil (fase móvil) la cual percola a través de la primera. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma.

Prácticamente no existen restricciones sobre la naturaleza de las fases a utilizar, siempre que la fase estacionaria sea sólida o líquida y la fase móvil líquida o gaseosa, por lo que es posible, en principio, realizar por medio de estas técnicas la separación de los componentes de cualquier mezcla. Por otra parte, la utilización de las técnicas cromatográficas no está exenta de dificultades, debido fundamentalmente a la gran cantidad de parámetros que pueden influir en el proceso de separación, lo cual dificulta la elección de las condiciones óptimas de separación y en muchas ocasiones implica la irreproducibilidad de los resultados. Por ello la cromatografía no es una técnica de rutina que pueda aplicarse sin más a cualquier mezcla, sin invertir en muchos casos gran cantidad de esfuerzo y tiempo.

Tipos de cromatografía

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse en función del mecanismo de separación de los componentes entre las fases, o bien por la forma de operar del sistema.

a) Mecanismos de separación

En función del mecanismo de separación, las técnicas de cromatografía pueden clasificarse

en:

- Cromatografía de adsorción. La separación depende de los equilibrios de adsorción-desorción de los componentes de la mezcla, entre la fase estacionaria sólida y la fase móvil líquida o gaseosa. La fuerza con que es adsorbido un componente depende de la polaridad de este, de la actividad del adsorbente y de la polaridad de la fase móvil. En general cuanto más polar es un compuesto más fácilmente será adsorbido. El orden general de elución de algunos compuestos orgánicos, de la actividad de algunos adsorbentes y de la fuerza de elución de algunos disolventes comunes, se recogen en la Tabla I. La cromatografía de adsorción, es una técnica que está particularmente bien adaptada para la separación de compuestos de polaridad baja y media. La separación de compuestos muy polares mediante cromatografía de adsorción requiere, debido a la gran retención que ofrecen, la utilización de adsorbentes muy poco activos, o bien, tratamientos químicos previos para la preparación de la muestra (preparación de trimetilsilil derivados, etc.) a fin de reducir su polaridad.

- Cromatografía de reparto. Está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el reparto existente entre la fase móvil (líquido o gas) y la fase estacionaria (líquida) soportada o ligada sobre un sólido adecuado. La mayor o menor migración de un compuesto en este tipo de cromatografía, será función del coeficiente de reparto de éste entre la fase estacionaria y la fase móvil:

$$K_d = \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

La cromatografía de reparto es utilizable para la separación de mezclas de compuestos de polaridad media y alta. Ejemplos de este tipo de cromatografía, son las cromatografías sobre papel, sílice hidratada y la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa.

- Cromatografía por tamaño molecular, también llamada de permeación de gel o de tamiz molecular. Consiste en la separación de las moléculas basándose en su tamaño en lugar de

en su solubilidad o polaridad. Las fases estacionarias empleadas para este tipo de cromatografía son inorgánicas (zeolitas), o geles orgánicos compatibles con disolventes acuosos (agarosa, poliacrilamida) u orgánicos (copolímeros estireno/divinilbenceno). Estas fases estacionarias poseen cavidades en las cuales las moléculas de los compuestos a separar pueden penetrar y ser retenidas, siendo las moléculas mayores las eluidas de la columna en primer lugar; el rango de trabajo de estas fases estacionarias, se define como el intervalo de pesos moleculares que pueden ser separados; otro parámetro que caracteriza a este tipo de fases, es su límite de exclusión, que se define como el peso molecular a partir del cual los compuestos pasarán a través del lecho estacionario sin experimentar retención.

- Cromatografía de cambio iónico. Las separaciones por intercambio iónico, se llevan a cabo con materiales insolubles y de textura porosa, los cuales presentan grupos reactivos asociados a iones lábiles capaces de intercambiarse con los del medio que les rodea, por lo que inevitablemente este tipo de cromatografía ha de realizarse en medio líquido. La cromatografía de intercambio iónico, es utilizable para la separación de sustancias iónicas, tanto inorgánicas como orgánicas. Las separaciones por cambio iónico, están basadas en los diferentes equilibrios de reparto de los iones de la mezcla entre el material cambiador y la disolución:

$$K_d = \frac{[R_n M]}{[M^{n+}]}$$

En general, se utilizan tres tipos de materiales para cromatografía de cambio iónico: resinas, geles y celulosas. La diferencia fundamental entre ellos reside en su microestructura ya que, generalmente, las resinas presentan un tamaño de poro mucho menor, siendo apropiadas para la separación de sustancias de pequeño volumen molar. Otras diferencias existentes entre los diversos materiales de cambio iónico son debidas a la naturaleza de los grupos cambiadores (fuerza del grupo cambiador) y al número de estos por unidad de peso de material (capacidad de cambio).

Debe tenerse en cuenta que los mecanismos de separación descritos, son aproximaciones a

las situaciones reales y que, aunque en una técnica concreta predomine alguno de ellos, la separación suele estar basada en la conjunción de diversos mecanismos.

**TABLA I.- Adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía.
Orden de elución, actividad de adsorbentes y fuerza de elución de los disolventes**

Secuencia	Orden de elución de compuestos	Actividad de adsorbentes	Fuerza de elución de disolventes
<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">+</p>	Hidrocarburos saturados	Celulosa	Eter de petróleo
	Hidrocarburos aromáticos		Ciclohexano
	Derivados halogenados		Benceno
	Eteres		Tetracloruro de carbono
		Sulfato cálcico (yeso)	Diclorometano
	Cetonas	Sílice	Cloroformo
	Aldehídos	Florisil	Eter dietílico
	Esteres	Oxido de magnesio	Acetato de etilo
	Alcoholes	Alúmina	
	Aminas		
	Acidos	Carbón activo	Acetona
			n-propanol
			Etanol
		Metanol	
		Agua	
		Acido acético	

b) Formas de separación.

Otra posible clasificación de las técnicas cromatográficas, está basada en la forma de operar del sistema cromatográfico. Básicamente existen cuatro formas de operación:

- Análisis por desarrollo. Es el método utilizado en los experimentos iniciales de cromatografía. El cromatograma se desarrolla hasta que el frente de disolvente alcanza el final del lecho estacionario, de forma que los constituyentes de la mezcla una vez separados permanecen sobre el lecho al finalizar la separación. La técnica de análisis por desarrollo presenta la ventaja de que es analizable la totalidad de la muestra, incluyendo los compuestos de muy baja o muy alta retención. Se utiliza fundamentalmente en cromatografía de papel y capa fina.
- Análisis por elución. Es la técnica utilizada en casi todas las separaciones cromatográficas analíticas y en muchas preparativas. En ella, el paso de la fase móvil se continúa indefinidamente hasta que los componentes separados de la mezcla emergen al final del lecho cromatográfico. Esta técnica presenta la desventaja de que los compuestos con retenciones muy altas pueden no ser observados.
- Análisis frontal. Este método está basado en la diferencia de afinidad del adsorbente por cada una de las sustancias a separar. Se utiliza una pequeña columna, que es saturada sucesivamente por cada una de las sustancias a separar, emergiendo de ella el primer componente puro hasta que la columna se satura del segundo componente, momento en el que empezará a emerger éste mezclado con el primero. El análisis frontal tiene su principal aplicación como técnica preparativa para la purificación de sustancias.
- Análisis por desplazamiento. En este caso, la sustancia desplazante va incorporada dentro de la fase móvil. Este método se utiliza tanto para separaciones analíticas como preparativas, siendo muy utilizada en cromatografía de cambio iónico.

PARÁMETROS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA

El tratamiento teórico del proceso cromatográfico, fue desarrollado fundamentalmente en base a las técnicas instrumentales de cromatografía que utilizan el método de análisis por elución y, en consecuencia, como parámetros para definir la banda cromatográfica, se utilizan el tiempo o el volumen de eluyente a que aparece dicha banda al final de lecho estacionario (tiempo o volumen de retención); no obstante, es necesario precisar que los parámetros que definen una separación cromatográfica, son extrapolables a las separaciones que utilizan técnicas de desarrollo.

Retención y factor de capacidad

Cuando se introduce un compuesto en la corriente de fase móvil de un sistema cromatográfico, de no existir interacción de éste con la fase estacionaria, la banda que forma se desplazaría a la misma velocidad que la fase móvil y emergería del lecho estacionario cuando el volumen total de fase móvil utilizado fuese igual al volumen vacío o intersticial de la columna (volumen muerto); sin embargo, como las moléculas de la muestra interactúan de hecho con la fase estacionaria, aquellas necesitan para su elución el paso de un volumen mayor de fase móvil, que se denomina volumen de retención de la muestra. Dado que en un sistema cromatográfico que opere a caudal constante, el volumen eluido y el tiempo son proporcionales, los conceptos de volumen muerto y volumen de retención, son directamente intercambiables por los de tiempo muerto (t_M) y tiempo de retención (t_R).

En la figura 1, se muestran los parámetros de retención para el caso de una única banda cromatográfica. Se observa que el tiempo de retención de la banda, puede dividirse en dos partes: el tiempo muerto (t_M) y el tiempo transcurrido a partir de este momento hasta la aparición del máximo de la banda. A partir de la definición de tiempo muerto, se induce que el segundo, es el tiempo real que la fase estacionaria ha retrasado el avance del compuesto, y se conoce con el nombre de tiempo de retención corregido (t'_R).

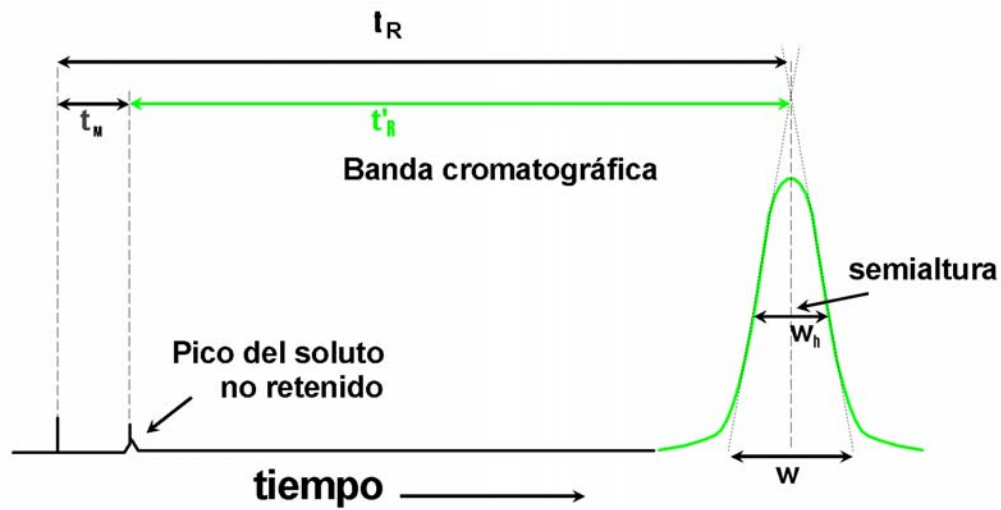


Figura 1.- Cromatograma de un componente y sus parámetros característicos

En base a los parámetros de retención descritos, se define el factor de capacidad (k') como:

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Este factor adimensional expresa la retención de un compuesto por la fase estacionaria, independientemente del caudal de la fase móvil. En la práctica, los compuestos de interés deben presentar, en el sistema cromatográfico elegido, valores de k' comprendidos entre 1 y 15, con el fin de no alargar excesivamente los tiempos de separación.

Dispersión de bandas

Cuando se introduce, en forma de banda muy estrecha, una mezcla de los componentes a

separar en una columna cromatográfica (cabeza de columna), al eluir la mezcla desde un extremo a otro de la columna, se observa que las bandas de soluto se van ensanchando al mismo tiempo que se separan; este proceso es debido fundamentalmente a la difusión termodinámica de las moléculas de la banda, que tienden a distribuirse uniformemente en todo el volumen disponible. El proceso de difusión es dependiente del tiempo, de forma que la dispersión de la banda aumentará en función del tiempo de elución. Dado que los procesos de difusión de las moléculas tienen su fundamento en movimientos de las mismas al azar, la concentración final de las moléculas dentro de una banda cromatográfica adoptará, en un caso ideal, un perfil de distribución normal, y el registro de las concentraciones de la banda en función del volumen eluido o del tiempo, dará lugar a una forma gaussiana de anchura definida por la desviación standard de la dispersión. Los parámetros característicos de un pico gaussiano se ilustran en la figura 2.

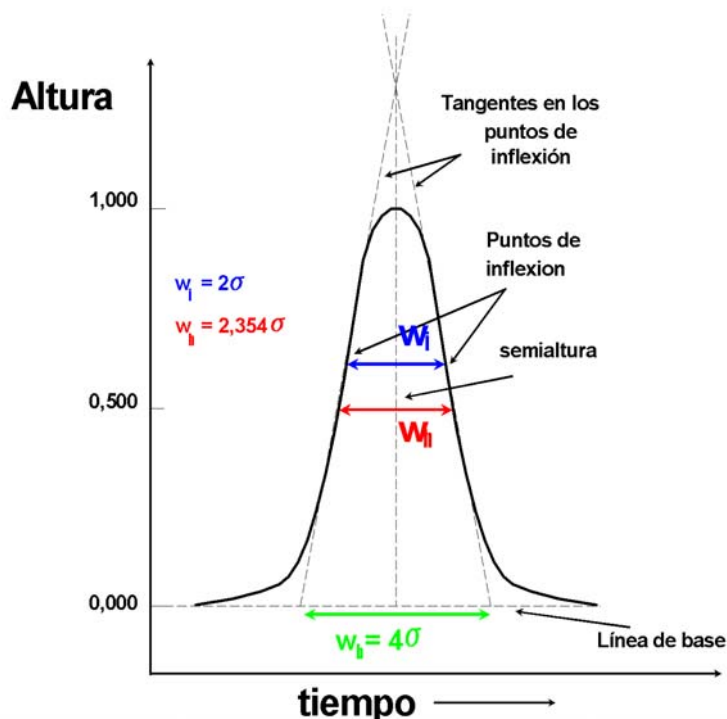


Figura 2.- Parámetros característicos de un pico gaussiano

Eficacia

Para realizar una separación cromatográfica óptima, debe evitarse en lo posible, el ensanchamiento de las bandas debido a la dispersión; en efecto, cuanto mas anchas sean las bandas, menor número de ellas podrán ser resueltas en un espacio de tiempo dado; en otras palabras, cuanto mas agudos sean los picos que emergen de una columna mejor estará actuando dicha columna. Las anchuras de las bandas cromatográficas dependen de las características de la columna (tamaño de

las partículas del lecho estacionario, homogeneidad de este, etc.), así como de otros factores como por ejemplo, la velocidad de la fase móvil. Para expresar la calidad de un pico, se utiliza un parámetro relativo que tenga en cuenta tanto la retención como la anchura de la banda; este parámetro es el cociente entre el tiempo de retención y la desviación standard de la banda cromatográfica:

$$\frac{t_R}{\sigma}$$

En la práctica, se define la eficacia de una columna como el cuadrado del cociente anterior y se expresa como número de platos teóricos:

$$N = \left[\frac{t_R}{\sigma} \right]^2$$

Así el número de platos teóricos de una columna puede calcularse utilizando la anchura de uno de sus picos, normalmente el último que pueda medirse directamente sobre el cromatograma (figura 3), utilizando las expresiones:

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{w_b} \right]^2 \qquad N = 5,545 \left[\frac{t_R}{w_h} \right]^2$$

El número de platos de una columna cromatográfica, depende lógicamente de su longitud, por lo que para comparar la eficacia de columnas con diferente longitud, se introduce otro término, denominado altura equivalente de un plato teórico, que relaciona la eficacia de una columna con su longitud y que se define como el cociente entre la longitud de la columna y su número de platos teóricos:

$$H = \frac{L}{n}$$

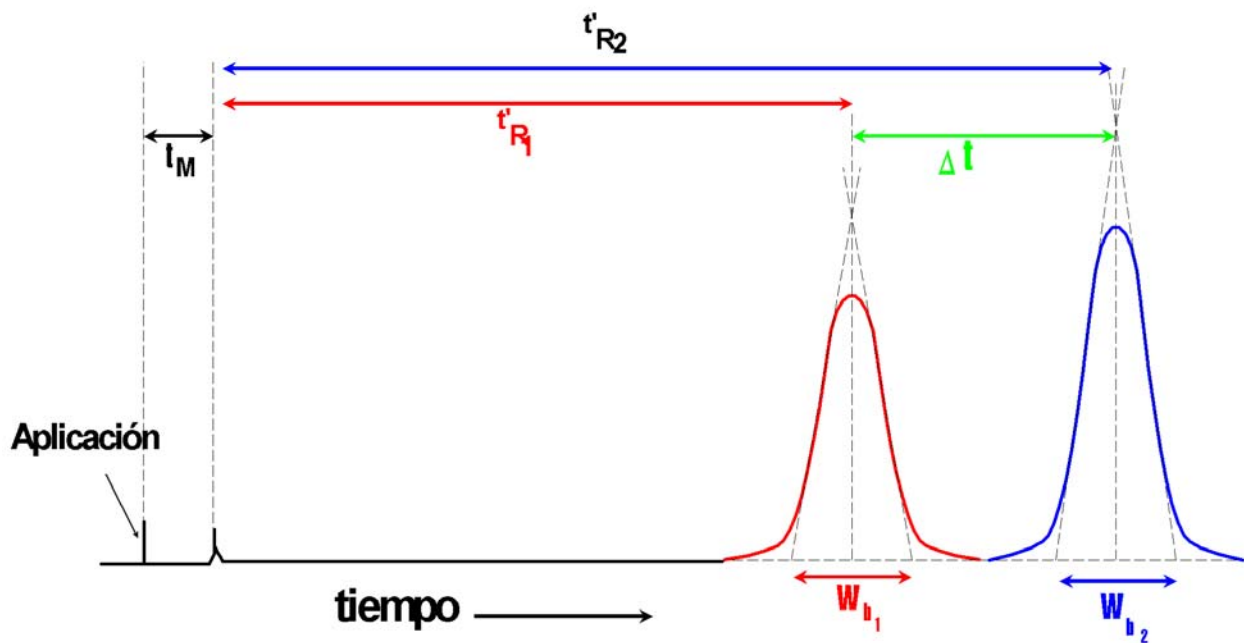


Figura 3.- Cromatograma de dos bandas y parámetros para calcular eficacia y resolución

Es de destacar que al considerar la eficacia, solamente se han tenido en cuenta los efectos propios de la columna, aunque existen otros parámetros del sistema (anchura de banda inicial, velocidad de la fase móvil, etc.) que contribuyen al ensanchamiento de las bandas cromatográficas. De esta manera, no siempre la baja eficacia de un sistema cromatográfico es atribuible a la columna, sino que también contribuyen otros factores que será preciso optimizar.

Separación y resolución

Hasta el momento, únicamente se ha considerado el caso de que en el cromatograma exista una sola banda; sin embargo, el objeto de la cromatografía es separar mezclas de varios componentes y es de suma importancia considerar la separación entre ellos. Debe recordarse siempre que, independientemente del número de componentes que pueda tener una mezcla, el problema de separación de todos ellos, queda siempre reducido al de las dos bandas adyacentes más difíciles de

separar. La separación entre dos bandas cromatográficas (figura 3), puede estudiarse en función de dos parámetros, la retención relativa, definida como el cociente entre los tiempos de retención corregidos de las dos bandas:

$$\alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{k_B}{k_A}$$

Y la resolución, que se define como el cociente de la distancia entre los centros de las dos bandas y el valor medio de la anchura de las mismas:

$$R_s = \frac{\Delta t}{\frac{w_{b_1} + w_{b_2}}{2}} = \frac{2\Delta t}{w_{b_1} + w_{b_2}}$$

En consecuencia, una separación total de dos bandas requerirá valores de α y de R_s lo más elevados posible. Es de tener en cuenta que mientras que un valor elevado de R_s puede conseguirse aumentando la eficacia de la columna (mayor longitud de columna, menores dispersiones de banda, etc.), el valor de α es constante para cada sistema cromatográfico y solamente podrá variarse alterando la fase estacionaria o la móvil, en otras palabras, cambiando de sistema cromatográfico. La solución de un problema real de separación entre dos bandas deberá darse en función de los valores de α y R_s que presente; así, para valores altos de α y bajos de R_s , la separación podrá conseguirse mediante un aumento de eficacia, mientras que para valores bajos de α no es práctico intentar la separación en base a un aumento de eficacia y debe procederse a un cambio del sistema.

LA CURVA DE AEPT

Como ya se ha visto, la eficacia de una columna cromatográfica es de gran importancia a la hora de conseguir una buena separación; en consecuencia, es de gran interés el conocer los parámetros de los que depende la eficacia.

La curva de AEPT, es la representación de la altura equivalente a un plato teórico, frente a la velocidad lineal de la fase móvil. Como ya se ha visto, la altura de un plato teórico viene dada por la expresión:

$$H = \frac{L}{N}$$

O bien, por la expresión equivalente:

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Es decir, el cociente entre la varianza de la banda cromatográfica y la longitud de la columna. El valor de la varianza total del pico cromatográfico, vendrá dado por la suma de las varianzas individuales de todos los fenómenos que contribuyan al ensanchamiento de la banda:

$$\sigma^2 = \sum_i^2$$

Los factores que contribuyen al ensanchamiento de una banda cromatográfica que se mueve a lo largo de una columna son los siguientes:

- 1.- Difusión molecular.

2.- Irregularidades en el relleno (difusión de Eddy).

3.- Resistencia a la transferencia de materia en la fase móvil.

4.- Resistencia a la transferencia de materia en la fase estacionaria.

La difusión molecular es debida a la dispersión termodinámica de las moléculas de la banda cromatográfica a lo largo de la columna, teniendo lugar esta dispersión tanto si la banda se mueve como si está en reposo. La varianza originada por difusión molecular viene dada por la expresión:

$$\sigma^2 = \frac{2\gamma D_m L}{u}$$

Siendo D_m el coeficiente de difusión molecular, L la longitud de la columna, u la velocidad lineal del eluyente y γ es el denominado coeficiente de tortuosidad, que tiene en cuenta la perturbación de la difusión molecular debida a irregularidades de la fase estacionaria.

El ensanchamiento de la banda cromatográfica debido a la irregularidad de la fase estacionaria, viene dado por la expresión:

$$\sigma^2 = aLu^{1/3}$$

Donde a es un coeficiente que será función del tamaño medio de la partícula y del coeficiente de dispersión en la fase móvil.

El ensanchamiento de la banda debido a la resistencia a la transferencia de materia, en la fase móvil y en la fase estacionaria, vendrá dado por las expresiones:

$$\sigma_m^2 = \frac{C_m L d^2 u}{D_m}$$

$$\sigma_e^2 = \frac{C_e L d^2 u}{D_m}$$

Donde d es el diámetro medio de la partícula del lecho estacionario y C_m y C_e , dos coeficientes que dependen respectivamente de la fase móvil y de la fase estacionaria.

A partir de las ecuaciones anteriores, se puede deducir que la varianza total de la banda cromatográfica vendrá dada por la expresión:

$$\sigma^2 = \frac{2\gamma D_m L}{u} + a L u^{1/3} + (C_m + C_e) \frac{d^2 L u}{D_m}$$

Y en consecuencia, la altura equivalente de plato teórico, vendrá dada por la expresión:

$$H = \frac{2\gamma D_m}{u} + a u^{1/3} + (C_m + C_e) \frac{d^2 u}{D_m}$$

Esta ecuación, es la expresión matemática de la curva de AEPT o ecuación de Van Deemter, que frecuentemente se encuentra abreviada bajo la forma:

$$H = A u^{1/3} + \frac{B}{u} + C u$$

La ecuación de Van Deemter resulta de difícil manejo desde el punto de vista práctico, ya que

muchos de los coeficientes que forman parte de ella son difíciles de conocer. No obstante, pueden extraerse de ella algunas informaciones interesantes; así, por ejemplo, puede verse que la altura de plato es función del diámetro de las partículas de la fase estacionaria, mejorándose la eficacia del sistema cromatográfico a medida que disminuye el tamaño de partícula. Por otra parte, puede verse que la eficacia de una columna cromatográfica, será también función de la velocidad lineal de la fase móvil, como se puede ver claramente en la representación gráfica de la ecuación:

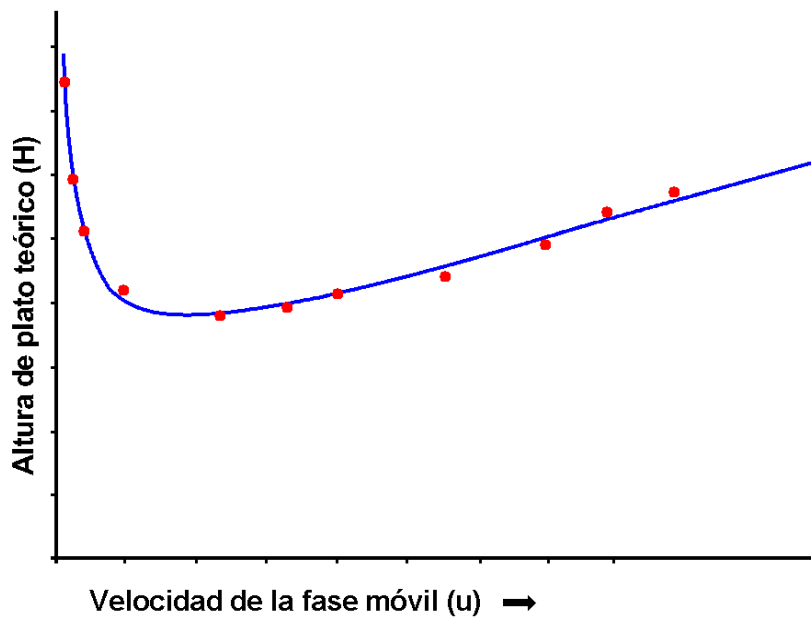


Figura 4.- Representación gráfica de la curva de AEPT

DISTORSIONES DE BANDA

Asimetría de pico

Como primera aproximación, se ha venido considerando que el sistema cromatográfico se comporta como un operador gaussiano, ensanchando la banda cromatográfica hacia una distribución normal según va pasando a través de la columna cromatográfica.

En la práctica, los picos cromatográficos raramente son gaussianos, y la realización de cálculos sobre el cromatograma en base a esta suposición, puede llevar a errores significativos si se trabaja con picos muy distorsionados. El modelo de la curva de Gauss sólo es apropiado cuando se trabaja con picos cuya asimetría es ligera. En la figura 5, se muestran las características de simetría de picos gaussianos (a), picos con cola (b) y picos con distorsión frontal (c).

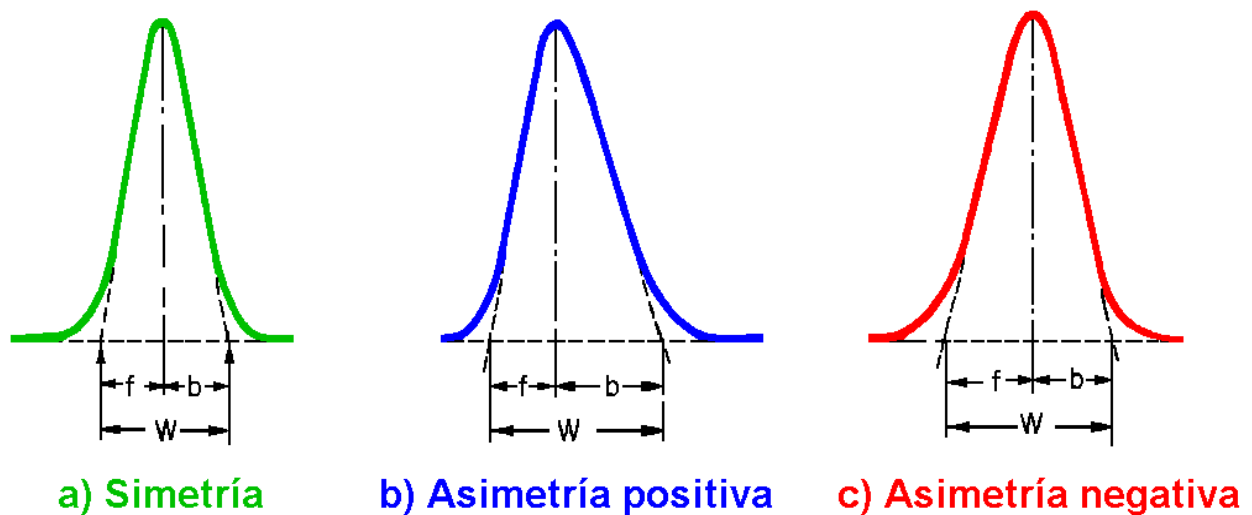


Figura 5.- Parámetros correspondientes a diferentes formas de pico

El factor de asimetría de un pico cromatográfico, puede calcularse por medio de la ecuación:

$$As = \frac{b+f}{b+f-\Delta W}$$

Donde:

$$\Delta W = |b-f|$$

Para los picos gaussianos, el factor de asimetría es igual a 1; si los picos presentan cola, se asigna a As valor positivo, y cuando los picos presentan distorsión frontal, se le asigna valor negativo.

Aunque prácticamente todos los picos cromatográficos son ligeramente asimétricos, los factores de asimetría exagerados deben ser evitados, tanto por la posibilidad de que se originen errores en la cuantificación, como por la pérdida de resolución que se origina (un pico con $As = 1,1$ ocasiona una pérdida de eficacia de un 10 %).

La asimetría de los picos puede ser debida a un buen número de factores, tanto instrumentales como cromatográficos, entre ellos resolución incompleta de dos bandas, presencia de puntos de gran actividad en las fases estacionarias, reacciones químicas del compuesto en la columna, volúmenes muertos en el sistema cromatográfico, técnicas de inyección incorrectas, etc.

Distorsión instrumental de banda

Hasta el momento, se han considerado algunos de los factores que originan el que las bandas cromatográficas experimenten una variación de forma a lo largo del proceso cromatográfico (generalmente ensanchamientos). Si bien en la mayoría de los casos no existe posibilidad de

intervenir sobre estos factores, en otros, si existen posibilidades de optimización, no ya con el fin de aumentar la eficacia de una columna, lo que es imposible, sino con la finalidad de no perder la eficacia que puede proporcionar.

Inyección

La muestra inyectada, puede originar una deformación de la banda cromatográfica por dos motivos: la inyección de una masa excesiva de muestra, puede llevar a una sobrecarga de la columna, con la consiguiente pérdida de capacidad de separación; este motivo de distorsión no tiene otra solución que inyectar masas menores de muestra. Un segundo motivo de deformación de las bandas que, por otra parte, suele ser el caso más frecuente es el de que aunque la masa inyectada no sea suficiente para sobrecargar la columna, la inyección de un volumen excesivo, provoque una pérdida de la eficacia del sistema.

Cuando se inyecta un determinado volumen de muestra, ésta ocupará en la cabeza de la columna una cierta longitud. En el caso de una columna ideal, que no ensanchase los picos, la banda cromatográfica a la salida de la columna tendría la misma anchura que la banda inyectada; este ancho de banda inicial ocasionado por la inyección, nunca se reducirá a su paso por la columna, sino que por el contrario se hará mayor. Es evidente, en consecuencia, la necesidad de inyectar volúmenes adecuados, así como de utilizar métodos capaces de proporcionar inyecciones de alta calidad.

La calidad instrumental de un sistema de inyección, se expresa en función de un parámetro K , en la expresión:

$$\sigma_i = \frac{V_0}{K}$$

Donde V_0 es el volumen inyectado y σ_i la desviación típica de la banda ocasionada por la inyección. De la ecuación anterior, se deduce que la inyección será tanto mejor cuanto mayor sea el

parámetro instrumental K y cuanto menor sea el volumen inyectado. La anchura total del pico cromatográfico a la salida de la columna, vendrá dada por la expresión:

$$\sigma_t^2 = \frac{V_0^2}{K^2} + \sigma_c^2$$

Siendo σ_t^2 la varianza total del pico a la salida de la columna y σ_c^2 la varianza del pico debida a la columna. A partir de esta ecuación, es posible obtener el valor de K de un inyector, representando σ_t^2 en función de V_0^2 . Se puede demostrar teóricamente que para un inyector ideal, $K = 3,5$, aunque en la práctica, para sistemas de inyección aceptables $K = 2$.

Respecto al volumen de muestra inyectado, su valor máximo para que se origine una pérdida de eficacia de ΔN platos en una columna, viene dado por la ecuación:

$$V_0 = K \sqrt{\frac{\Delta N}{N} \frac{\pi d^2}{4} \epsilon L^{1/2} H^{1/2} (1 + k')}$$

Como se puede ver, el volumen máximo que se puede inyectar dependerá, además de la calidad del inyector, de las características de la columna (diámetro de la columna, porosidad, longitud y altura de plato) y de la retención del pico que se trate de analizar (k'). Es fácil deducir, que si se quieren evitar pérdidas elevadas de eficacia, los volúmenes inyectados deben ser pequeños, en particular si se trabaja con columnas muy eficaces (bajo valor de H), de pequeño diámetro, y muy en particular, cuando los compuestos a analizar presentan pequeñas retenciones. Como estimación práctica, para limitar a un cierto valor la pérdida de eficacia de una columna, en la que el pico de interés presente un volumen V_p , los volúmenes máximos a inyectar (V_i), son los recogidos en la Tabla II.

Tabla II.- Pérdidas de eficacia del sistema en función del volumen inyectado

V_i	Pérdida de resolución (%)
0,25 V_p	5
0,33 V_p	8
0,40 V_p	10
0,57 V_p	20

Conexiones

Los tubos capilares y los diferentes sistemas de unión utilizados para conectar los diferentes componentes del cromatógrafo, deben ser considerados a todos los efectos como volúmenes muertos capaces de originar pérdidas de eficacia del sistema.

El radio interno y la longitud del tubo de conexión que pueden provocar una pérdida de ΔN platos, vienen dados por la ecuación:

$$r^4 l = 6 \frac{\Delta N}{N} \epsilon d_c^2 N \frac{H^2 D_m^2}{u^2 d_p} (1 + k')^2$$

Como puede verse, el factor fundamental en la pérdida de eficacia, es en este caso el radio del tubo de conexión, ya que la pérdida de eficacia aumenta en función de su cuarta potencia; este hecho, obliga a que todos los tubos de conexión en sistemas de alta eficacia sean extremadamente finos (del orden de 0,1 mm de diámetro).

Respecto a las conexiones entre tubos, debe estarse extremadamente seguro de que a la hora

de realizar la conexión no se introducen volúmenes muertos de ningún tipo (figura 6), no sólo debido al ensanchamiento de banda que provocaría, sino al hecho, de mayor importancia todavía, de que un volumen muerto en este tipo de conexiones deja frecuentemente zonas que no son barridas por el flujo de fase móvil, lo que conduce no sólo a ensanchamientos de banda, sino también a distorsiones de la forma de la banda que en ocasiones pueden llegar a ser de gran importancia.

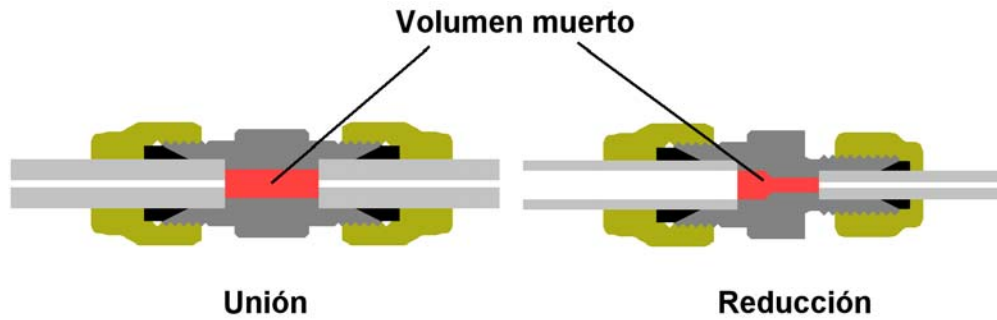


Figura 6.- Volúmenes muertos provocados por conexiones mal realizadas

INTERPRETACIÓN DEL CROMATOGRAMA

Como ya se ha mencionado, la cromatografía es básicamente un método de separación, tal vez el más potente de que se puede disponer en un laboratorio, aunque debe tenerse siempre en cuenta que la cromatografía, a efectos analíticos, es una técnica ciega. Los métodos cromatográficos, por si mismos, pueden informar, en el mejor de los casos, del número de compuestos químicos que están presentes en una mezcla (figura 7), pero nunca de proporcionar información sobre su naturaleza.

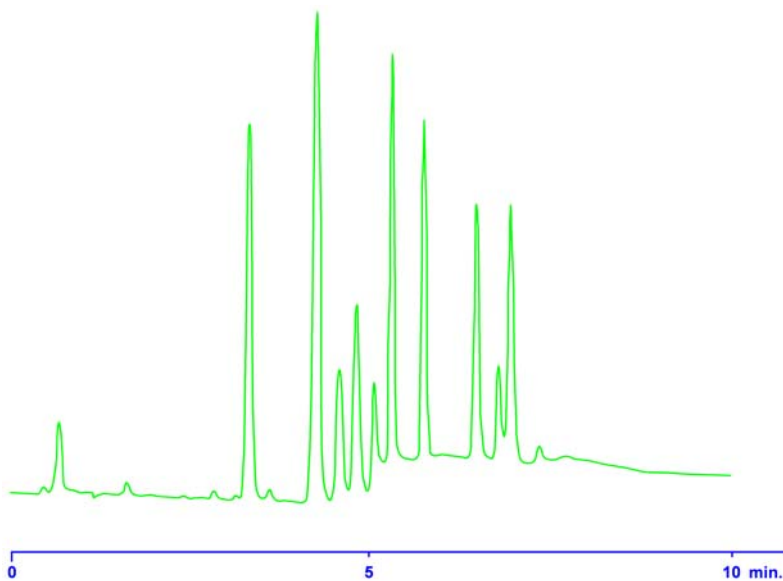


Figura 7.- Cromatograma típico de una mezcla

Análisis cualitativo

A pesar de la limitación mencionada, ya desde los primeros trabajos publicados sobre técnicas cromatográficas instrumentales, se indicaba que los parámetros de retención (tiempo o volumen) de un compuesto, eran constantes para un sistema cromatográfico dado, por lo que podían ser utilizados de forma cualitativa para identificar compuestos.

Evidentemente, los parámetros de retención de un compuesto dependen de un gran número de variables, por lo que la identidad entre analitos y patrones solamente puede ser establecida para un sistema dado y en un momento dado, lo que hace muy trabajosa la identificación de una sustancia por este método. Aunque existen en la bibliografía colecciones de datos de retención para diversos compuestos, estos datos tienen un valor puramente orientativo, ya que resulta muy difícil reproducir los datos de retención (de unos laboratorios a otros e incluso dentro del mismo

laboratorio) debido a la irreproducibilidad de los sistemas cromatográficos. De forma análoga, las ecuaciones empíricas desarrolladas para correlacionar datos de retención con la estructura química de diversos compuestos es utilizable únicamente para la identificación de compuestos pertenecientes a series homólogas muy bien definidas.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, el mejor método para realizar un análisis cualitativo, es, todavía, la comparación directa de los parámetros de retención de los picos de la muestra con los de sustancias patrón, trabajando en ambos casos con el mismo sistema cromatográfico. A la hora de realizar las comparaciones, es conveniente utilizar determinados parámetros, que si bien no eliminan todas las posibilidades de variabilidad de los resultados, si permiten al menos corregir la variabilidad inducida por determinadas condiciones; como parámetros de retención utilizados frecuentemente para análisis cualitativo, los más utilizados son:

- 1.- Tiempos o volúmenes de retención corregidos.
- 2.- Factores de capacidad.
- 3.- Tiempos de retención relativos.

De entre estos parámetros, los dos primeros permiten corregir las diferencias de retención debidas a los volúmenes muertos de cada sistema.

Los tiempos de retención relativos se definen mediante la ecuación:

$$t_r = \frac{t}{t_p}$$

Donde t es el tiempo de retención del compuesto que se trata de identificar y t_p el tiempo de retención de un compuesto que se toma como patrón. La utilización de los tiempos de retención relativos, permite eliminar todos los factores de variabilidad, salvo los que pueden afectar a los

valores de k' (naturaleza de la fase estacionaria, naturaleza de la fase móvil y temperatura), por lo que este parámetro es el más adecuado para la identificación cualitativa de compuestos en base a los datos bibliográficos.

Una última consideración sobre la utilización de las técnicas cromatográficas para el análisis cualitativo, es que estas técnicas permiten realizar una identificación negativa, es decir, permiten asegurar con absoluta certeza que un compuesto determinado no se encuentra presente en una mezcla pero, por el contrario, no permiten nunca asegurar la presencia de un compuesto, ya que no se puede excluir la posibilidad de que dos compuestos diferentes presenten los mismos parámetros de retención sobre un sistema dado. Este problema puede soslayarse en parte realizando la identificación sobre diversas columnas, con diferentes fases estacionarias. Por supuesto, es obvio que los resultados cualitativos son más fiables cuanto mayor número de columnas se utilicen, pero el método es largo y tedioso; como norma general se puede decir que la identificación de un compuesto sobre tres columnas, aunque no proporciona una certeza absoluta, ofrece una fiabilidad suficiente a todos los efectos.

Análisis cuantitativo

Si bien, como se ha mencionado en el apartado anterior, las técnicas de análisis cromatográfico ofrecen escasas posibilidades para la realización de análisis cualitativos, sus posibilidades como técnica cuantitativa son enormes. La cromatografía permite separar mezclas muy complejas de productos, aun cuando éstos sean de naturalezas muy semejantes, lo que permite un análisis directo de muestras que de otra manera serían muy difíciles de cuantificar. Por otra parte, los detectores que se utilizan en cromatografía ofrecen una respuesta muy fácil de relacionar con la cantidad de analito contenida en la disolución inyectada, y con una sensibilidad que, en ocasiones, es casi imposible de alcanzar por medio de cualquier otra técnica.

La medida del área o de la altura del pico cromatográfico, es el factor más importante a la hora de realizar un análisis cuantitativo. La utilización de la altura de pico para la cuantificación es

de gran comodidad, pero únicamente proporciona una exactitud aceptable en cromatogramas que presenten picos agudos, estrechos, claramente definidos y muy simétricos; este procedimiento de cuantificación es interesante para análisis de rutina, en los que se puede sacrificar la exactitud en favor de la sencillez y la rapidez de las cuantificaciones. La utilización para el análisis cuantitativo de las áreas de los picos, es el procedimiento de uso más general cuando se requiere exactitud en las cuantificaciones.

Existen multitud de métodos que permiten medir las áreas bajo los picos cromatográficos, aunque la medida por medio de integración electrónica es con mucho la más utilizada; de entre los restantes métodos, sólo se mencionará el de la "altura por la mitad de la anchura", un método muy sencillo y que ofrece muy buenos resultados. Este método consiste en medir la anchura del pico cromatográfico a la mitad de su altura ($W_{1/2}$), el producto de este valor por su altura:

$$A = W_{1/2} h$$

Ofrece un valor A, que es proporcional al área del pico. Este método proporciona muy buenos resultados para picos de forma aproximadamente gaussiana, pero los resultados son menos satisfactorios para picos no simétricos o para picos pequeños y anchos.

Al margen de cualquier otro método de medida de áreas, el sistema más utilizado actualmente es el integrador electrónico; un dispositivo de esta naturaleza digitaliza la señal analógica proporcionada por el detector, detecta el comienzo y el final de cada pico cromatográfico, integra digitalmente el área bajo la curva y corrige automáticamente la línea de base. El único problema que presentan los integradores digitales se plantea a la hora de integrar picos parcialmente resueltos (figura 7), ya que muchos integradores tienen limitadas sus posibilidades de medida en estos casos a muy pocos métodos, llegando a realizar en algunos casos extremos integraciones totalmente disparatadas. Este problema, no obstante, se resuelve bastante bien mediante la utilización de integradores basados en ordenadores personales, que permiten al usuario tanto la visualización de la forma en que se han integrado los picos, como la posibilidad de modificar la forma de integración en caso de ser necesario.

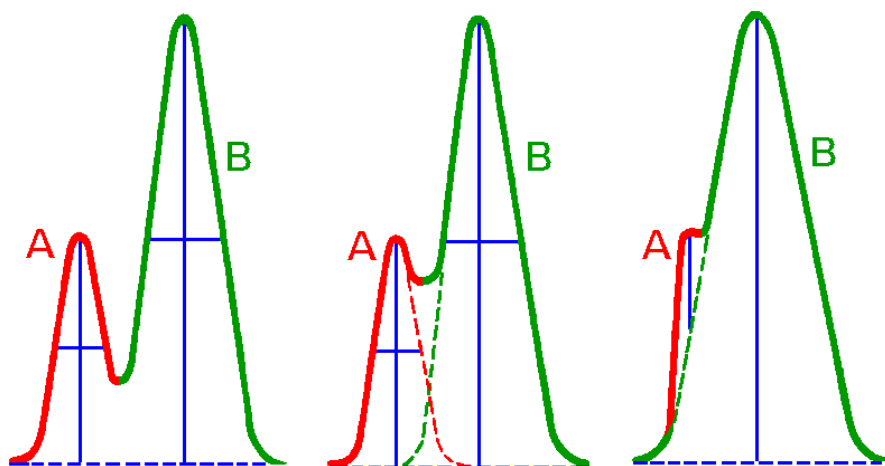


Figura 8.- Posibles métodos de integración de picos no resueltos

Métodos de calibrado

Una vez conocida el área o la altura del pico que se pretende cuantificar, es posible conocer su masa o su concentración en la muestra inyectada si se conoce la curva de calibración que relaciona la respuesta del detector con la cantidad de compuesto inyectada.

Las concentraciones de un analito que pueden ser medidas en cada caso dependen del rango dinámico del detector, una característica de cada combinación detector/analito, que se define como el rango de concentraciones de soluto entre las cuales el detector produce una respuesta dependiente de la concentración de soluto que llega a él; el valor mínimo de este rango se corresponde con la sensibilidad del detector, y el máximo con la concentración de soluto a partir de la cual la respuesta del detector es constante (saturación). Dado que casi todos los detectores presentan curvas de respuesta de tipo sigmoide, debe tenerse en cuenta que lo más conveniente es trabajar, siempre que sea posible, dentro del rango dinámico lineal del detector, que se define como la zona del rango dinámico en la que la respuesta del detector es lineal frente a la concentración de soluto (figura 9); las cuantificaciones realizadas fuera del rango dinámico lineal (figura 10) deberían ser evitadas en

lo posible, realizándose únicamente en caso de trabajar con concentraciones muy próximas al límite de sensibilidad del detector.

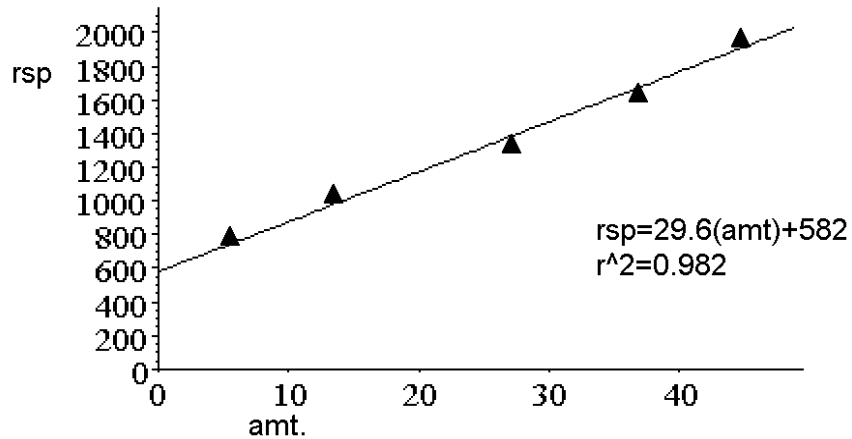


Figura 9.- Calibración con respuesta lineal

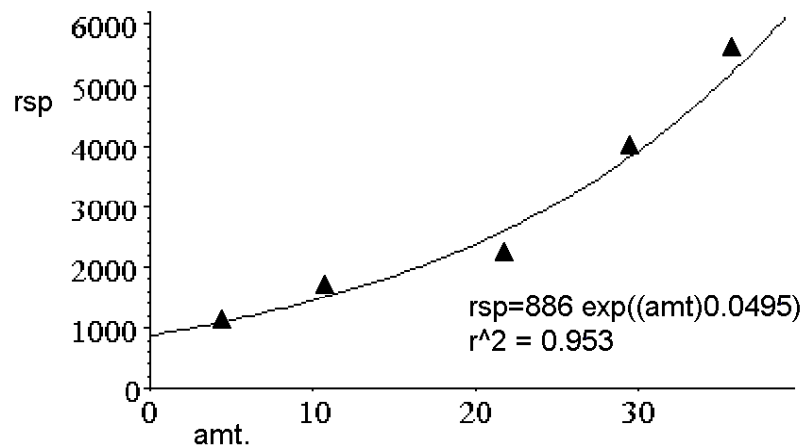


Figura 10.- Calibración con respuesta exponencial

De los diferentes métodos que existen para realizar el calibrado, los más utilizados con mucho son el método del estándar externo y el método del estándar interno.

El método del estándar externo, consiste en inyectar en el equipo volúmenes constantes de

disoluciones de concentraciones conocidas y crecientes del compuesto que se pretende cuantificar; tras este proceso, se representa la cantidad de compuesto frente al tamaño del pico (área o altura), debiéndose obtener una línea recta. A partir de esta recta de calibrado, es posible realizar la cuantificación en una muestra desconocida, por interpolación gráfica o matemática del pico obtenido en la recta de calibrado. El principal problema que plantea la calibración por medio de este método es la reproducibilidad de la inyección, o bien el control estricto de las cantidades inyectadas, aunque tomando las debidas precauciones, la exactitud alcanzada puede ser notablemente alta. Por otra parte, la calibración debe repetirse periódicamente para verificar la fiabilidad de la cuantificación, lo que en algunos casos puede hacer que este método sea un poco tedioso.

La calibración por el método del estándar interno, se utiliza con frecuencia en el análisis cuantitativo para compensar posibles errores derivados de la manipulación de la muestra. Este método consiste en esencia en añadir una cantidad conocida de un compuesto patrón a la muestra a analizar antes de realizar con ella cualquier manipulación; en el cromatograma, aparecerán los picos correspondientes al analito y al patrón añadido, y de la relación entre el tamaño de ambos, podrá calcularse, previo calibrado, la cantidad de analito existente en la muestra. Para efectuar el calibrado en este método, se preparan disoluciones de concentración creciente del compuesto a analizar a las que se añade una cantidad idéntica en todos los casos del compuesto patrón; tras obtener los correspondientes cromatogramas, se representa la concentración del compuesto a cuantificar en función de la relación de los picos problema/patrón, con lo que se obtendrá una recta en la que es posible interpolar la relación entre los dos picos que se obtenga al realizar el cromatograma de una muestra desconocida. Los requisitos que debe cumplir un producto para ser utilizado como patrón interno, serán:

- a) El producto patrón debe dar un pico totalmente resuelto de los de la mezcla a analizar.
- b) El pico del compuesto patrón debe estar situado en el cromatograma en las proximidades de los picos de interés.
- c) A lo largo de todo el proceso de análisis, debe tener un comportamiento similar al de los

compuestos a cuantificar.

d) En ningún caso debe estar presente en la muestra a analizar.

e) Debe ser químicamente estable, tanto frente a los componentes de la muestra como frente a los compuestos que se puedan utilizar durante el proceso de análisis.

Debe destacarse que, para los dos métodos de calibración mencionados, muchos sistemas de integración permiten realizar el cálculo únicamente en base a un factor de respuesta obtenido a partir de una sola concentración de patrón; este método de cálculo asume implícitamente que la respuesta del detector es lineal frente a la concentración con pendiente 1, lo que muy raramente se cumple en la práctica. En estos casos la calibración debe realizarse únicamente con patrones cuya concentración de analito sea muy similar a la de las muestras ya que, en caso contrario, las cuantificaciones realizadas mediante este tipo de cálculo pueden alejarse notablemente de la realidad, tanto más cuanto mayor sea la diferencia de concentraciones entre patrón y muestra.