



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Química

MÉTODOS FÍSICOS DE SEPARACIÓN Y  
PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS  
ORGÁNICAS

Mariana López Sánchez  
Jorge Triana Méndez  
Francisco Javier Pérez Galván  
María Esther Torres Padrón

# MÉTODOS FÍSICOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ORGÁNICAS

---

Mariana López Sánchez  
Jorge Triana Méndez  
Francisco Javier Pérez Galván  
María Esther Torres Padrón

---

Impresión: Febrero de 2005  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Servicio de Reprografía, Encuadernación y Autoedición de la  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC)  
Máquina Fotocopiadora  
Marca: Xerox, Modelo Docutech  
Número de Serie: 1104516609

Depósito Legal: GC 136 - 2005  
ISBN: 84 - 689 - 1114 - 3

---

## ÍNDICE

---

Filtración	1
Decantación	3
Cristalización	3
Sublimación	5
Destilación	7
Extracción	12
Cromatografía	20
Bibliografía	49

## INTRODUCCIÓN

Cuando se quiere conocer la composición de una sustancia orgánica es necesario seguir tres etapas básicas.

Obtener una muestra representativa de la muestra.

Separar o aislar cada una de las sustancias componentes de la mezcla para su posterior análisis.

Identificación de cada uno de los componentes de dicha muestra.

*La segunda de las etapas es una de las más complejas, laboriosas y difícil de realizar*

El conocimiento de los métodos de aislamiento y purificación de un compuesto es fundamental en Química Orgánica por las siguientes razones:

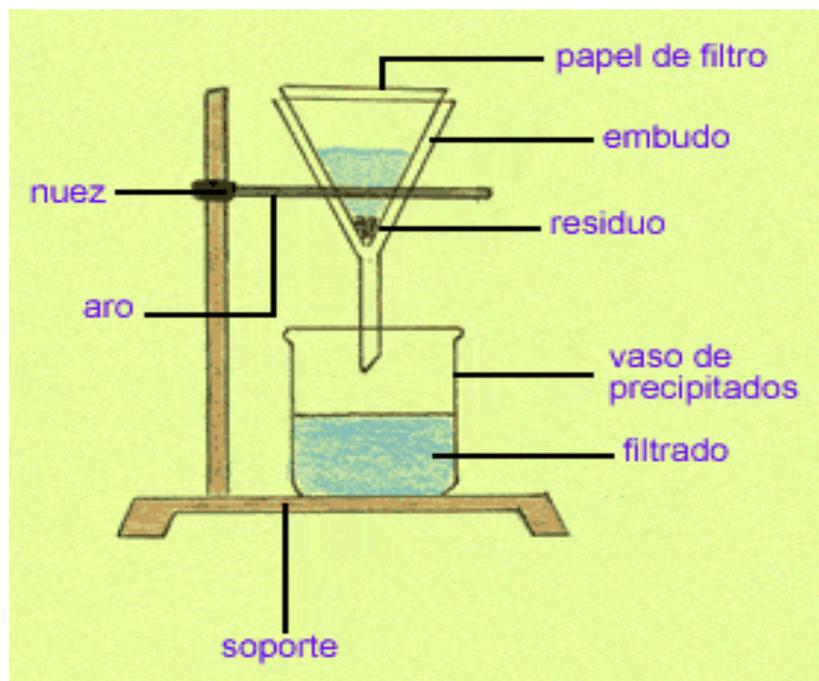
- Poder determinar su estructura
- En los procesos de síntesis.
- Seguimiento de las reacciones químicas

Estos métodos están basados en las diferencias que existen entre las propiedades físicas de los componentes de una mezcla (puntos de ebullición, densidad, presión de vapor, solubilidad, etc.)

	Filtración
	Decantación
	Cristalización
Métodos de separación	Sublimación
	Destilación
	Extracción
	Cromatografía

## FILTRACIÓN POR GRAVEDAD

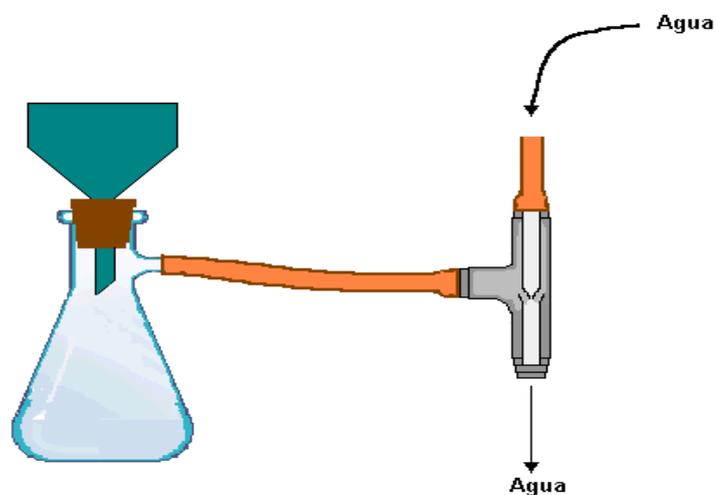
Consiste en retener partículas sólidas suspendidas de un líquido o un gas forzando la mezcla a través de una barrera porosa que puede ser mallas, fibras, material poroso o un relleno sólido.



## FILTRACIÓN POR SUCCIÓN

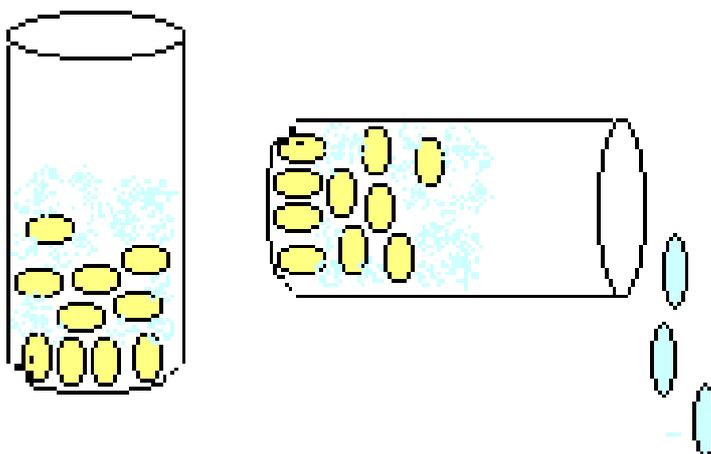
La filtración a vacío o por succión se utiliza para mezclas como barros y pastas.

El agua al pasar a través de la trompa, en el estrechamiento interior, aumenta su velocidad originando una disminución de presión. Esto origina una succión del aire a través de la conexión con el matraz, originando un pequeño vacío en éste. También se emplea para separar los cristales obtenidos a partir de una disolución.



## DECANTACIÓN

Consiste en separar componentes que contienen diferentes fases siempre que exista una diferencia significativa entre las densidades de las fases ( dos líquidos no miscibles, un sólido de un líquido. etc.)



## CRISTALIZACIÓN

Proceso de separación de un soluto a partir de su disolución, por sobresaturación de la misma, aumento de la concentración o por enfriamiento de esa disolución.

La cristalización permite separar solutos prácticamente puros.

¿Cómo se sobresatura una disolución para que comience a cristalizar el soluto?

Saturando la disolución en caliente con posterior enfriamiento de la misma

Aumentando su concentración evaporando una parte del disolvente

Adicionando a la disolución otra sustancia más soluble en el disolvente que el compuesto que se desea separar

## TIPOS DE DISOLUCIONES

Disolución no saturada: concentración de soluto es inferior a su solubilidad

Disolución saturada: concentración de soluto es igual a su solubilidad

Disolución sobresaturada: concentración de soluto es superior a su solubilidad (sistema inestable)



*Cuanto más lento sea el enfriamiento de la disolución saturada más grandes y puros serán los cristales del sólido que se separa.*

## EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN

Técnica más simple y eficaz para purificar compuestos orgánicos sólidos.

Consiste en disolver el sólido impuro en la menor cantidad de disolvente posible y en caliente. En estas condiciones se genera una disolución saturada que a medida que se va enfriando se sobresatura y origina la cristalización.

Como el proceso de cristalización es dinámico, las moléculas que están en la disolución alcanzan el equilibrio con las que forman parte de la red cristalina. El alto grado de ordenación de esa red no permite la participación de impurezas en la misma. Por eso es conveniente que el proceso de enfriamiento sea lento para que los cristales se formen poco a poco y el lento crecimiento de la red cristalina excluya las impurezas.

Si el enfriamiento de la disolución es muy rápido las impurezas pueden quedar atrapadas en la red cristalina.

## ELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE CRISTALIZACIÓN

Para su elección es muy útil la regla "semejante disuelve semejante". Los disolventes más usados en orden de polaridad creciente son: hexano, cloroformo, acetona, acetato de etilo, etanol y agua.

Es conveniente elegir un disolvente cuyo punto de ebullición no sea superior a 60°C y que a su vez sea por lo menos 10 °C menor que el punto de fusión del sólido que se desea

cristalizar, para que se pueda eliminar fácilmente por evaporación.

Muchas veces es necesario usar una mezcla de disolventes y es conveniente probar diferentes mezclas hasta encontrar aquella que nos proporcione la cristalización más efectiva. Una vez obtenidos los cristales se procede a eliminar el líquido sobrenadante llamado "aguas madres" generalmente mediante un proceso de decantación.

## RECRISTALIZACIÓN

Con el fin de conseguir una cristalización más correcta algunas veces es necesario llevar a cabo un *recristalización*

La finalidad de este proceso es conseguir un adecuado grado de pureza que nos permita determinar el punto de fusión de la sustancia.

El punto de fusión de un compuesto es una característica física que nos confirma el grado de pureza de una muestra.

No se puede hablar de punto de fusión exacto sino de un intervalo de fusión. Si la muestra está impura el intervalo de fusión es alto.

En la siguiente tabla presentamos los disolventes más empleados en la cristalización de las clases más comunes de compuestos orgánicos.

Tipos de compuestos	Disolventes sugeridos
Hidrocarburos	Hexano, ciclohexano, tolueno
Éteres	Éter, diclorometano
Haluros	Diclorometano, cloroformo
Compuestos carbonílicos	Acetato de etilo, acetona
Alcoholes y ácidos	Etanol
Sales	Agua

## SUBLIMACIÓN

Es el paso de una sustancia del estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Se puede considerar como una forma especial de destilar una sustancia sólida.

El sólido que sublima se convierte directamente por calefacción (sin fundir) en su vapor, después se condensan sus vapores a sólido mediante enfriamiento

La temperatura de sublimación es aquella a la cual la presión de vapor del sólido iguala a la presión externa.

Para que una sustancia sublime debe tener una elevada presión de vapor, es decir, las atracciones intermoleculares en estado sólido deben ser débiles

Cuanto menor sea la diferencia entre la presión externa y la presión de vapor de una sustancia más fácilmente sublimará.

La sublimación es un método excelente para la purificación de sustancias relativamente volátiles.

Ejemplos: la desaparición de la nieve, sin fundir, en un día de invierno frío pero soleado, el dióxido de carbono sólido, la naftalina y el yodo que subliman a la temperatura ambiente.

### TÉCNICA DE SUBLIMACIÓN

Se calienta en el vaso de precipitados el yodo sólido y lo tapamos con una superficie fría, en esta caso un balón al que se le añade agua - hielo para evitar que el vapor de yodo eleve peligrosamente su temperatura.

El vapor de yodo choca con el fondo del balón, y la rápida disminución de la temperatura hace que el yodo vuelva al estado sólido en forma de pequeños cristales que se pueden observar al levantar el balón.



## DESTILACIÓN

La separación y purificación de líquidos por destilación constituye una de las principales técnicas para purificar líquidos volátiles. La destilación hace uso de la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias que constituyen una mezcla.

Las dos fases en una destilación son la vaporización o transformación del líquido en vapor y la condensación o transformación del vapor en líquido. Existen varios tipos de destilaciones. La elección en cada caso se hace de acuerdo con las propiedades del líquido que se pretenda purificar y de las impurezas que lo contaminan.

El método físico consiste en suministrar calor a la mezcla logrando que el líquido de menor punto de ebullición se vaporice en primer lugar y luego se produzca la condensación de ese vapor al ponerlo en contacto con una superficie fría.

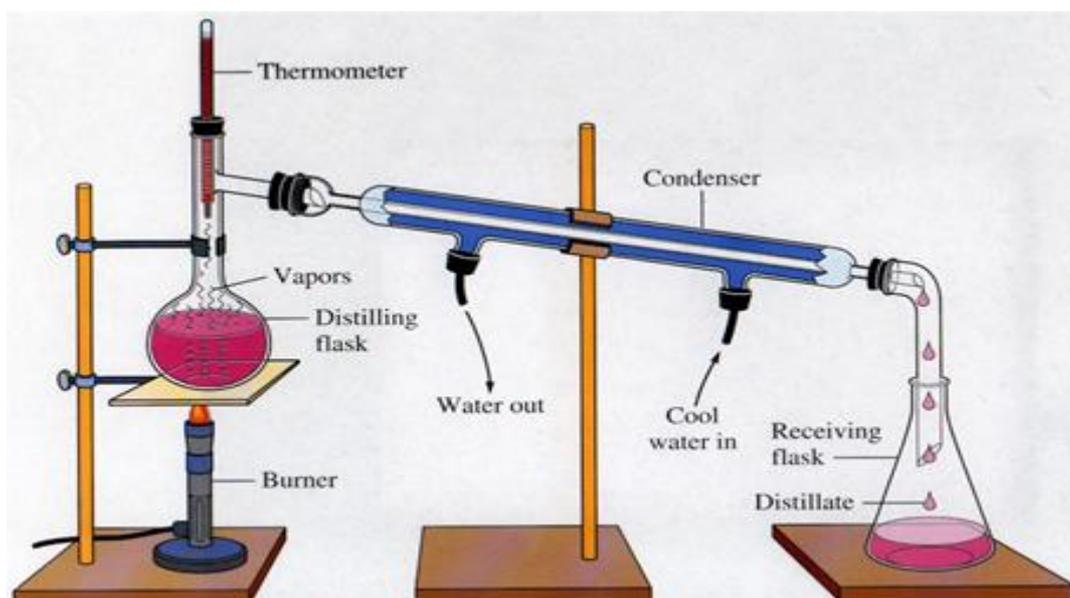
### DESTILACIÓN SIMPLE

Técnica utilizada en la purificación de líquidos cuyo punto de ebullición es inferior a  $150^{\circ}\text{C}$  a la presión atmosférica.

Útil para eliminar impurezas no volátiles

También sirve para separar dos líquidos con puntos de ebullición que difieran en al menos  $25^{\circ}\text{C}$ .

El vapor formado por la ebullición del componente, simplemente se condensa y se recoge en el matraz.



## DESTILACIÓN A VACÍO O PRESIÓN REDUCIDA

Técnica usada en la separación de líquidos con un punto de ebullición superior a 150 °C.

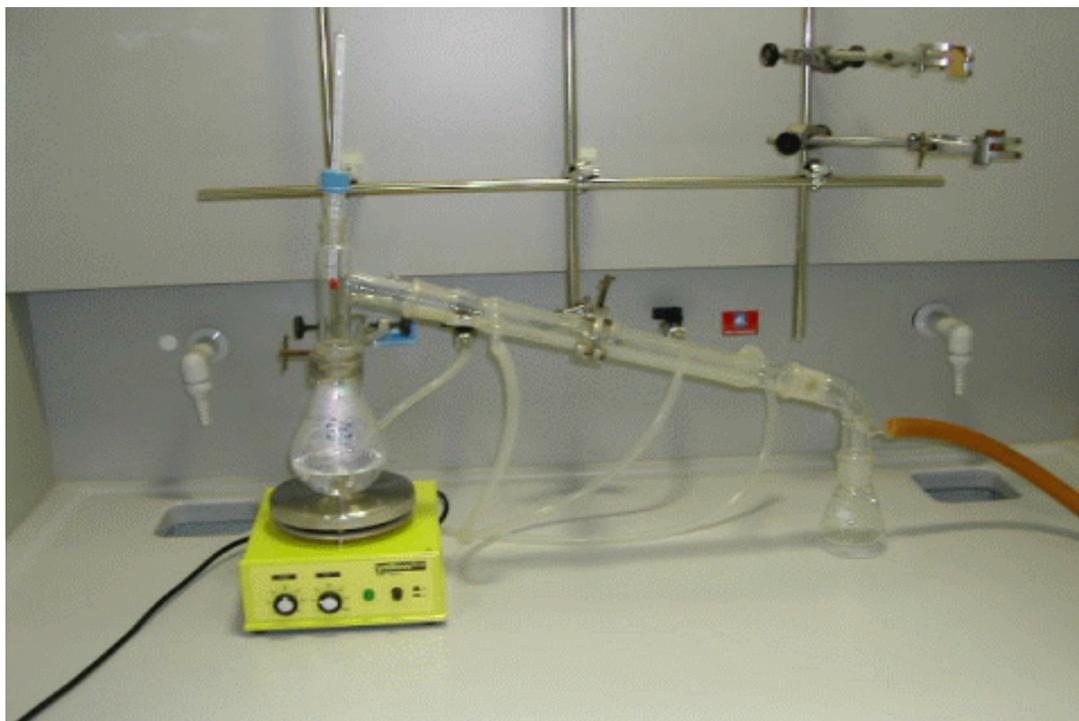
Como un líquido hierve cuando su presión de vapor iguala la presión atmosférica, se puede reducir su punto de ebullición disminuyendo la presión a la cual se destila

Para mantener una ebullición homogénea se puede usar plato poroso o adaptar al conjunto un capilar para mantener la ebullición homogénea.

Este montaje nos permite destilar líquidos a bajas temperaturas evitando de esta forma la descomposición térmica de las sustancias.

Similar al anterior excepto que el sistema se conecta a una bomba de vacío o una trompa de agua.

### Equipo de destilación a vacío



## DESTILACIÓN FRACCIONADA

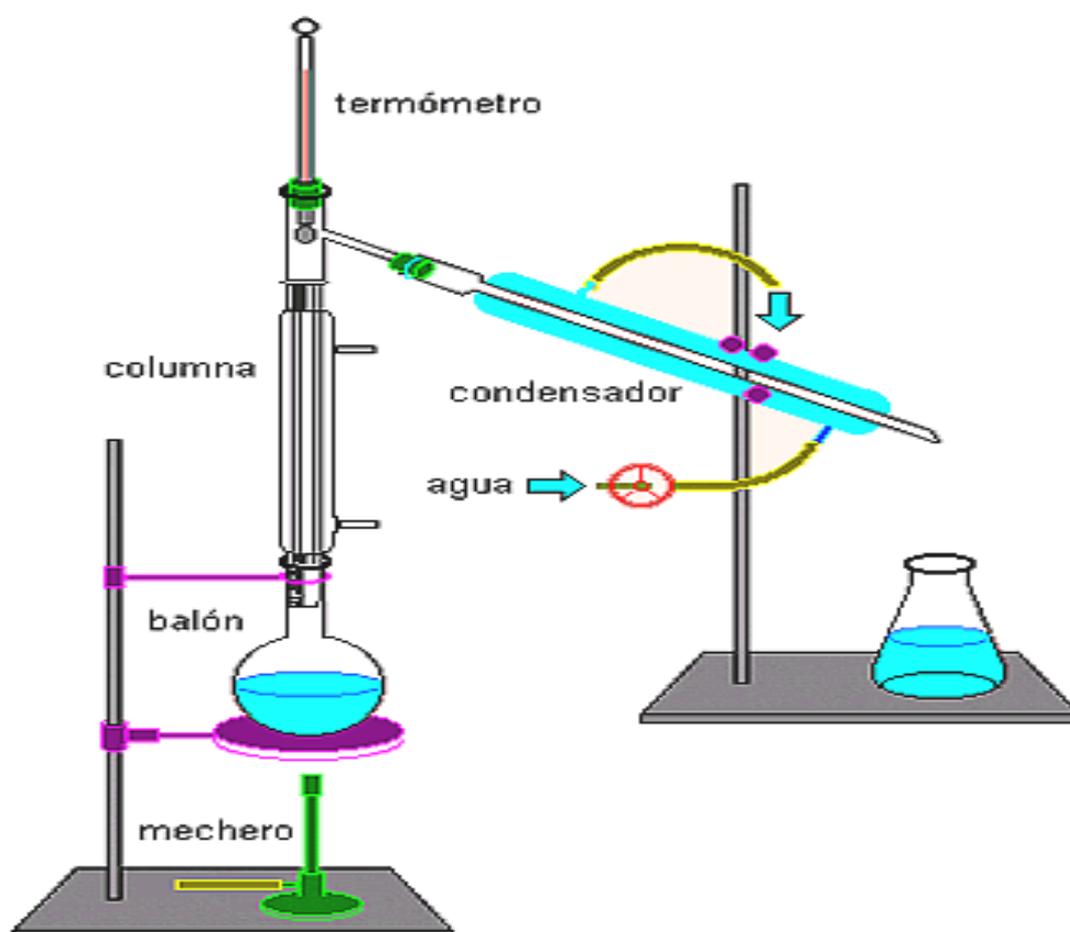
Técnica que se utiliza en la separación de sustancias cuyos puntos de ebullición difieren entre sí menos de 25°C.

La diferencia con la destilación simple es que incorpora una columna de fraccionamiento (o de rectificación) entre la disolución y el refrigerante.

La columna de fraccionamiento consta de un tubo largo de vidrio que lleva en su interior un relleno inerte (hélices de vidrio) o unos platos de condensación.

La columna aporta una gran superficie para el intercambio entre el vapor que sube y el condensado que desciende, lo que hace posible una serie de vaporizaciones y condensaciones a lo largo de la columna.

#### Equipo de destilación fraccionada



#### EL PROCESO DE DESTILACIÓN FRACCIONADA

En cualquier punto de esa columna de fraccionamiento, el condensado frío recibe calor del vapor que asciende y se vuelve a vaporizar parcialmente formando un vapor que se enriquece en el componente más volátil.

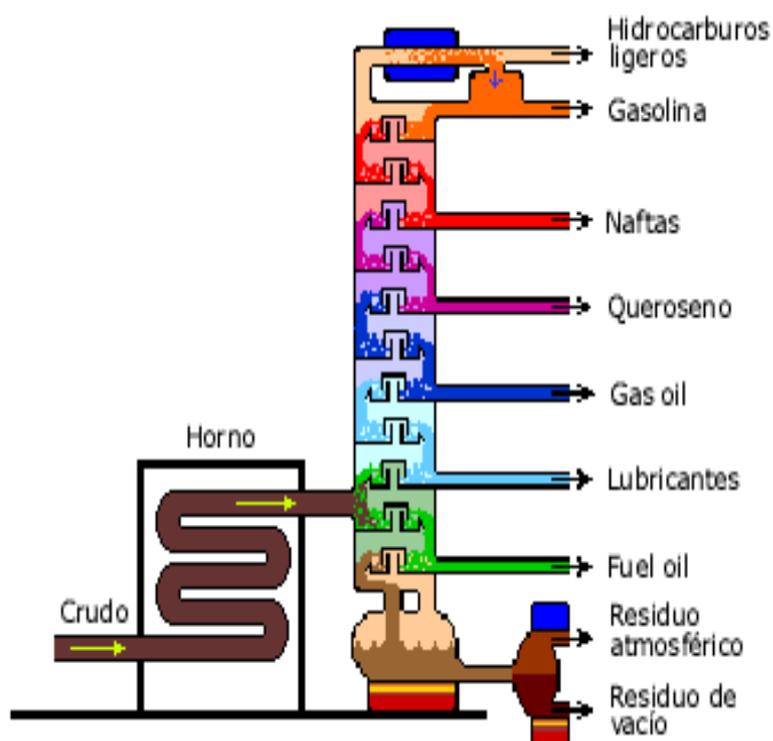
De la misma manera, al ceder calor al condensado el vapor se enfría formando un condensado más rico en el componente menos volátil.

Con la columna adecuada y un control suficiente de la temperatura se pueden separar con esta técnica líquidos que difieren unos pocos grados en su punto de ebullición.

*UNA DESTILACIÓN FRACCIONADA ES EQUIVALENTE A UNA SECUENCIA DE DESTILACIONES SIMPLES Y POR TANTO UN PROCESO MÁS EFICIENTE.*

Esta técnica es particularmente importante en la industria del petróleo, donde el crudo se destila para obtener diferentes fracciones de intervalos de ebullición creciente. A partir de estas fracciones se pueden obtener sustancias puras mediante procesos ulteriores.

Torre de destilación fraccionada del petróleo crudo



## DESTILACIÓN EN CORRIENTE DE VAPOR

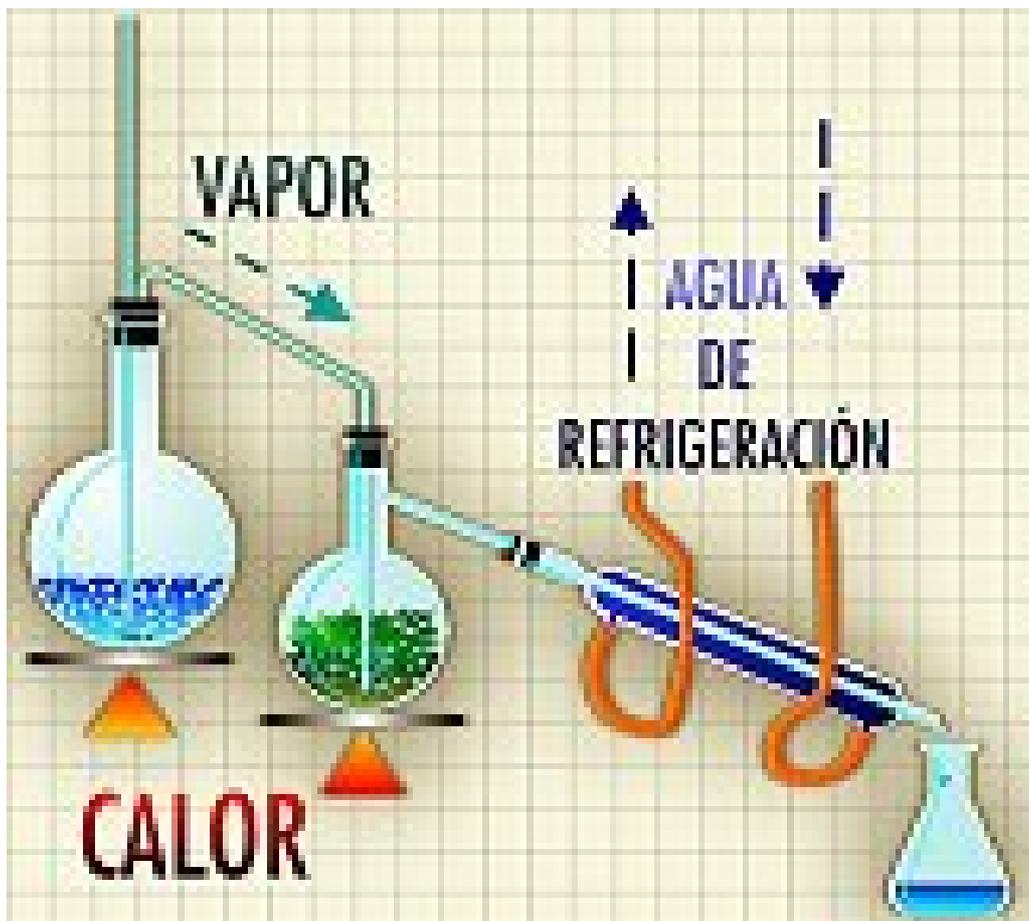
Técnica que se usa en la separación de sustancias poco solubles en agua

Al hacer pasar una corriente de vapor a través de la mezcla, ambos componentes se destilan juntos.

Como el agua y el compuesto son inmiscibles, cada uno de ellos ejerce su presión de vapor *independientemente* del otro (al contrario que en la destilación simple)

Cuando la suma de la presión de vapor del compuesto y del agua se iguala a la presión atmosférica, por debajo de  $100^{\circ}\text{C}$ , se produce la destilación conjunta de ambos componentes.

Equipo de destilación con arrastre de vapor



La condensación de los vapores produce una mezcla acuosa a partir de la cual se extrae el compuesto deseado por filtración o extracción.

Se emplea para separar una sustancia de una mezcla que posee un punto de ebullición muy elevado y que se descompone al destilar.

También se utiliza para separar disolventes de alto punto de ebullición de sustancias sólidas que no son arrastradas.

Principal método de obtención de los "aceites esenciales", fragancias naturales muy apreciadas que se encuentran en las plantas, como el mentol, eucaliptol, eugenol, la vainillina, etc.

## EXTRACCIÓN

Técnica general más utilizada para el aislamiento y purificación de un compuesto orgánico de una mezcla de reacción o de sus fuentes naturales

Se aplica a todo tipo de mezclas ya sean sólidas, líquidas o gaseosas

Está fundamentada en la diferencia de solubilidades de los compuestos.

## LEY DE DISTRIBUCIÓN O REPARTO

La distribución de un soluto entre dos disolventes inmiscibles está gobernada por la ley de Distribución o de Reparto.

Para un soluto A distribuido libremente entre dos fases se cumple:

$$K = [A_o] / [A_w]$$

[A<sub>o</sub>] = Concentración del soluto en la fase orgánica

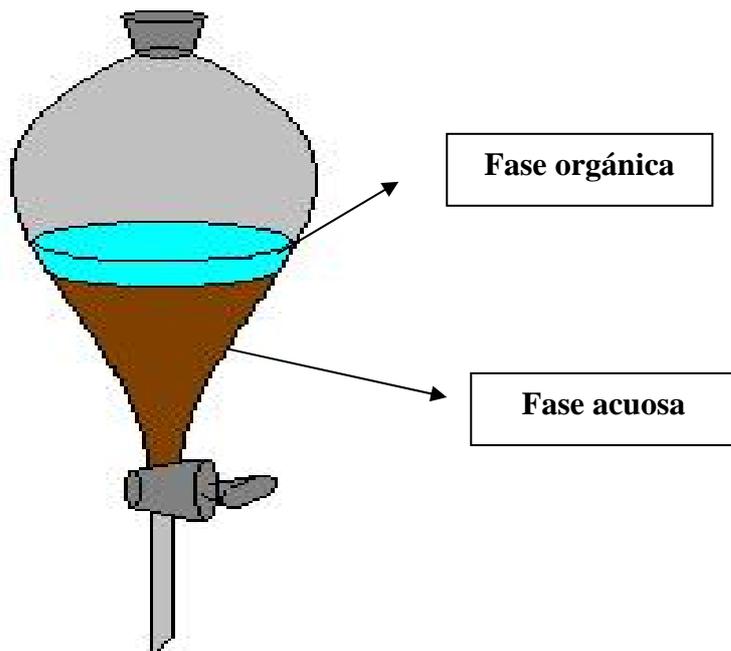
[A<sub>w</sub>] = Concentración del soluto en la fase acuosa

K = Coeficiente de reparto

El soluto A se distribuye entre las dos fases en función de su solubilidad en ambas originando un equilibrio de partición dinámico. Este equilibrio viene definido por su constante de equilibrio, constante de distribución o coeficiente de reparto K.

Cuando se ha alcanzado el equilibrio se establece una diferencia entre las relaciones de concentración en ambas fases.

Esa relación de concentraciones entre la fase orgánica y la fase acuosa es independiente de la cantidad total de A



Mediante extracciones sucesivas con pequeñas porciones del disolvente extractante, se separa mayor cantidad de soluto que con una sola extracción en la que se utilice todo el volumen de extractante.

### EJEMPLO

Se extraen 1000 ml de una disolución acuosa que contiene 60 gramos de  $I_2$  con 1000 ml de tetracloruro de carbono. Se desea saber: A) La cantidad de  $I_2$  que queda en la disolución acuosa. B) La cantidad de  $I_2$  que queda en la disolución acuosa si la extracción se realiza con dos porciones sucesivas de 500 ml de  $CCl_4$ . DATO: el Yodo es 80 veces más soluble en  $CCl_4$  que en agua.

#### A) Una única extracción

$X$  = gramos de Yodo remanentes después de la extracción

Concentración de  $I_2$  en  $CCl_4$  =  $60 - x / 1000$

Concentración de  $I_2$  en  $H_2O$  =  $x / 1000$

$80 = \text{Concentración de } I_2 \text{ en } CCl_4 / \text{Concentración de } I_2 \text{ en } H_2O$

$$80 = [ 60 - x / 1000 ] / [ x / 1000 ] = 60 - x / x$$

$$x = 0,47 \text{ gramos de yodo remanentes}$$

#### B) Dos extracciones sucesivas

B - 1) Primera extracción

Y = gramos de Yodo remanentes después de finalizada la primera extracción

Concentración de  $I_2$  en  $H_2O$  =  $Y / 1000$

Concentración de  $I_2$  en  $CCl_4$  =  $60 - Y / 500$

$$80 = [ 60 - Y / 500 ] / [ Y / 1000 ]$$

Y = 1,46 gramos de Yodo remanentes

B - 2) Segunda extracción

Z = gramos de Yodo remanentes después de finalizada la segunda extracción

Concentración de  $I_2$  en  $H_2O$  =  $Z / 1000$

Concentración de  $I_2$  en  $CCl_4$  =  $1,46 - Z / 500$

$$80 = [ 1,46 - Z / 500 ] / [ Z / 1000 ]$$

Z = 0,0356 gramos de yodo remanentes

## EXTRACCIÓN LÍQUIDO - LÍQUIDO

Consiste en tratar la mezcla de compuestos con un disolvente de tal forma que uno de los componentes se disuelva en dicho disolvente y el resto de las sustancias no lo haga.

Los compuestos orgánicos en disoluciones acuosas se extraen generalmente agitando vigorosamente dicha solución con un disolvente orgánico no miscible.

El proceso se realiza en un *embudo de decantación*



## EL PROCESO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO - LÍQUIDO

- 1ª) Se agita vigorosamente ambas capas
- 2º) Se deja sedimentar ambas capas.
- 3º) Se separan

La eliminación del disolvente se realiza en un rotavapor

### ELIMINACIÓN DE UN DISOLVENTE A PRESIÓN REDUCIDA (ROTAVAPOR)

Consiste en eliminar un disolvente orgánico de una mezcla de reacción

El motor eléctrico produce el giro de un tubo que tiene un ajuste esmerilado al cual se acopla el matraz de fondo redondo que contiene la disolución.

El matraz debe estar parcialmente sumergido en un baño de agua y girando.

En el caso de disolventes orgánicos usuales la temperatura del baño debe oscilar entre 35 - 40 °C

Acoplado al sistema hay un refrigerante por el que circula generalmente agua, que origina la condensación de los vapores del disolvente que se recogen en un colector

El conjunto es un sistema cerrado conectado a una bomba de vacío, una trompa de agua o un circuito de vacío

Esto también se puede realizar mediante destilación simple, sin embargo, es el procedimiento más empleado por ser más rápido y cómodo.



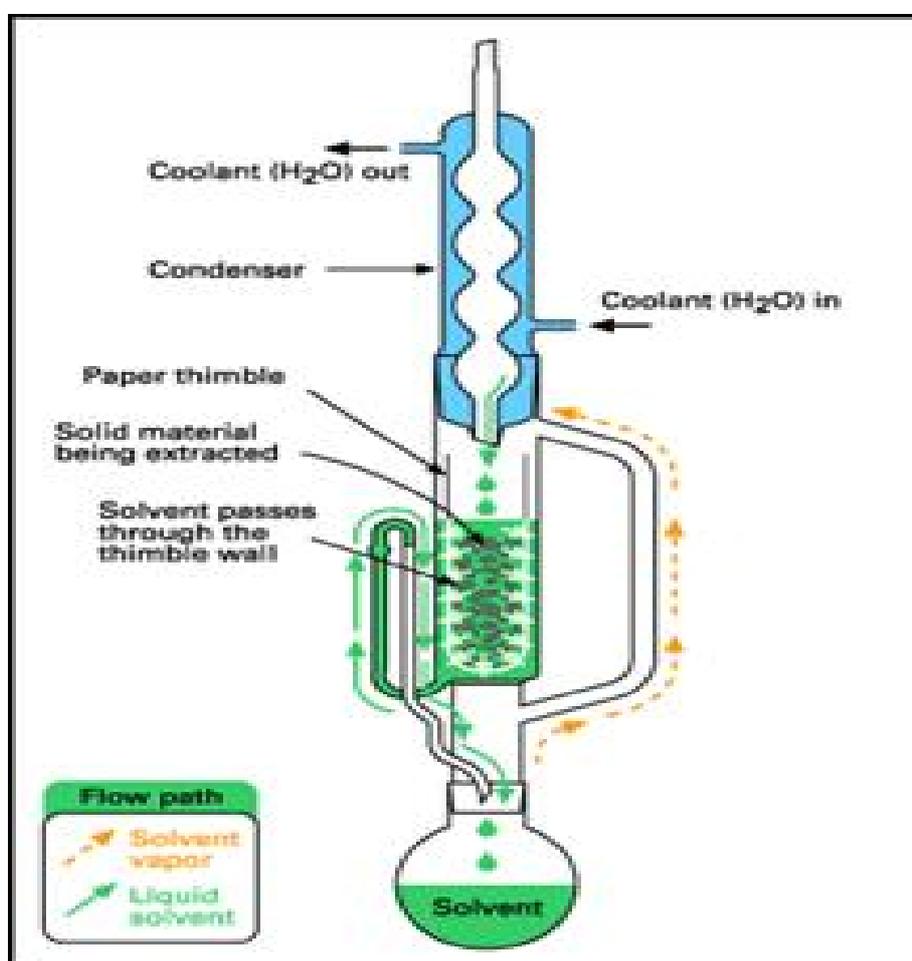
## EXTRACCIÓN SÓLIDO - LÍQUIDO

Para la extracción en continuo donde la sustancia a extraer se encuentra en estado sólido y el extractor es un líquido se emplea el SOXHLET.

Técnica más utilizada y consiste en extraer la mezcla con un disolvente que disuelve todos los componentes.

La extracción continua es una combinación de extracción - destilación que permite la recuperación del disolvente.

Equipo soxhlet para la extracción en continuo



## PROCEDIMIENTO

1°) La mezcla sólida finamente dividida se introduce en un cartucho de extracción y se coloca en el Soxhlet

2°) El disolvente elegido se coloca en el matraz y se lleva a ebullición.

3°) Los vapores del disolvente extractor se condensan por encima de la muestra

4°) El condensado caliente lixivia la muestra mientras se va llenando el cartucho.

5°) Cuando la cámara se ha llenado, la disolución se sifona y vuelve al matraz de destilación.

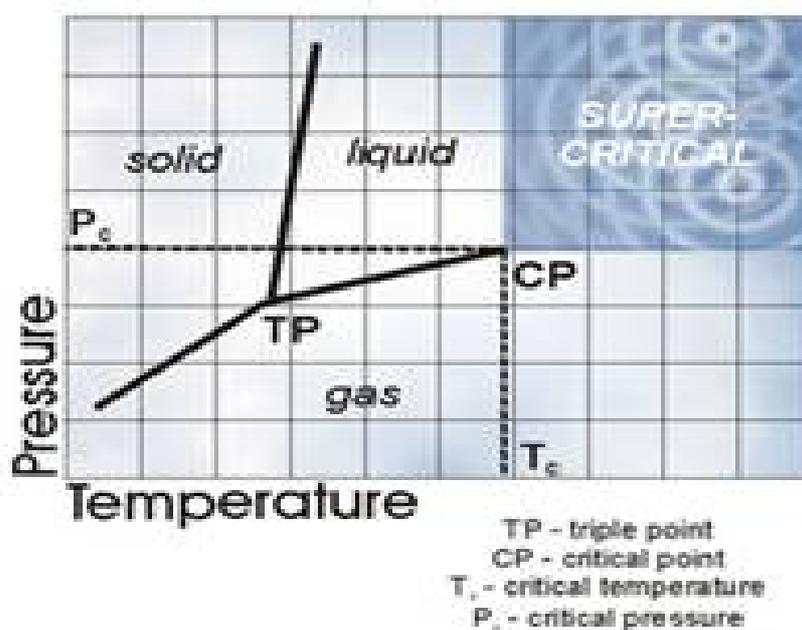
El proceso se repite sucesivamente con lo que se consigue que aumente la concentración del extracto en el disolvente extractor.

### EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFS)

Técnica muy utilizada para la extracción de aceites esenciales (aromas y fragancias), medicinas naturales, pesticidas naturales, tabaco libre de nicotina, café y té descafeinado, productos libres de colesterol y en el tratamiento de residuos orgánicos industriales.

Un fluido es supercrítico cuando está sometido a condiciones superiores a su presión y temperatura crítica, en este caso se encuentra en estado supercrítico.

En este estado la línea de separación de fases líquido - gas se interrumpe. Esto implica la existencia de una sola fase en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y un gas. Mantiene su gran difusividad (propia de los gases) mientras consigue una alta densidad (propia de los líquidos)



## CARACTERÍSTICAS DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Dada la relación directa entre la densidad de un fluido con su poder de solvatación, vemos como los fluidos supercríticos tienen una gran capacidad de solvatación que, unido a la enorme difusividad que presentan, les permite penetrar a través de matrices porosas aportando al fluido supercrítico una gran versatilidad.

Su gran poder disolvente junto a una gran capacidad de penetración en los sólidos permite el agotamiento rápido y prácticamente total de los sólidos extraíbles. (pe, en la extracción de productos naturales se originan extractos de alta pureza).

Pueden separarse totalmente en forma sencilla de los extractos modificando la presión y la temperatura, hasta el extremo, si es necesario de que el fluido pase al estado gaseoso.

### FLUIDOS MÁS USADOS EN EFS

Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Etano ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ). Eteno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ )  
Propano ( $\text{C}_3\text{H}_8$ ) Xenón (Xe) Óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ )

De todos ellos el más usado es, tanto a nivel de laboratorio como en procesos industriales el dióxido de carbono. Se trata de un gas inocuo (no tóxico, no corrosivo, no inflamable) abundante, barato y cuyas condiciones críticas son relativamente bajas ( $31^\circ\text{C}$ , 73 atm) y por tanto fáciles de operar.

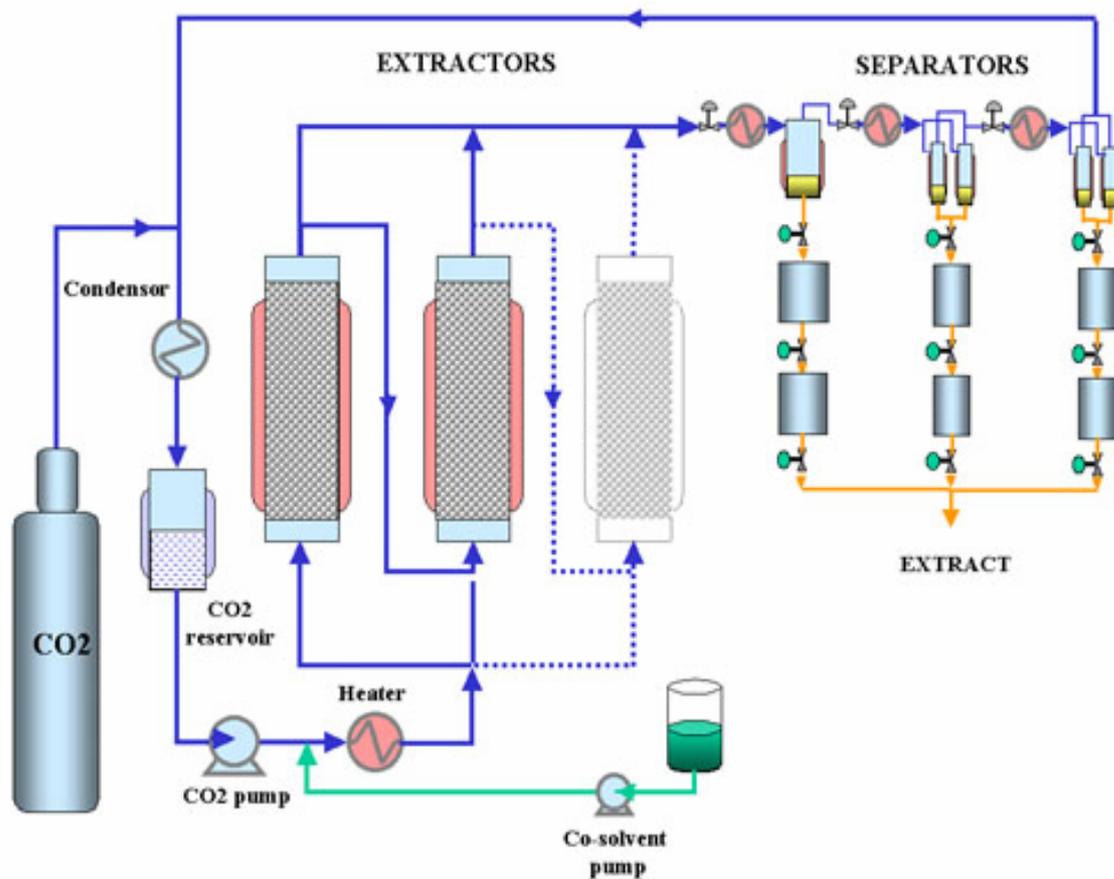
### EL PROCESO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

1°) La mezcla, generalmente un sólido molido, es cargada en el extractor.

2°) El  $\text{CO}_2$  es alimentado hacia el extractor a través de una bomba de alta presión (100 - 400 bar). El  $\text{CO}_2$  comprimido es calentado hasta la temperatura de extracción ( $30 - 60^\circ\text{C}$ ).

3°) Ingreso en el extractor donde se disuelven los compuestos a extraer.

4°) La mezcla  $\text{CO}_2$  - extracto es enviada a un separador (50 - 160 bar) previo paso a través de una válvula de reducción. A temperatura y presión reducida, el extracto precipita espontáneamente en el separador, mientras que el  $\text{CO}_2$ , libre de cualquier extracto, es reciclado al proceso, con unos pasos previos de enfriamiento y compresión



5°) El CO<sub>2</sub> se puede usar sólo o combinado con otros fluidos como metanol, amoníaco, etc. que permite variar su polaridad logrando con ello mejorar la selectividad de la separación. A estos aditivos se les llama "modificadores polares"

6°) La separación se realiza frecuentemente en etapas, manteniendo condiciones distintas en dos o tres separadores, para fraccionar el extracto en función de las solubilidades de los componentes y las especificaciones deseadas de los productos.

#### VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

El CO<sub>2</sub> no deja residuo en los compuestos procesados. No hay presencia de disolventes orgánicos en el extracto. El uso de temperaturas moderadas evita la degradación térmica del extracto.

Alto coste de los equipos y su mantenimiento. No se obtienen todos los compuestos presentes en la muestra. Para cualquier composición de la muestra inicial no existen datos experimentales para conocer como se distribuye el soluto en el fluido supercrítico. Este es su mayor inconveniente.

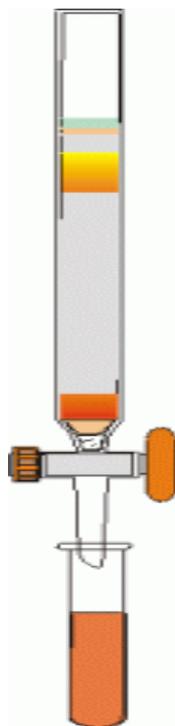
## CROMATOGRAFÍA

Cromatografía significa "Escribir en Colores" [del griego cromos (color) y grafe (escribir)]. Debe su nombre al biólogo ruso Mikhail Tswett primera persona que utilizó esta técnica (1906) al separar una mezcla de pigmentos naturales.

Utilizó una columna larga de vidrio, rellena de sulfato de calcio finamente dividido y con una llave en su extremo inferior.

Comprobó que al colocar una mezcla de pigmentos verdes de una planta en una columna que se eluye con éter de petróleo, aparecen unas bandas horizontales con diferentes colores que se corresponden con cada uno de los pigmentos de la mezcla y que indica que ha habido una separación a lo largo de la columna

Aproximación a la técnica de Tswett



La separación no tiene nada que ver con el color de los compuestos sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos hacia el yeso. De esta forma los compuestos que se adsorben más débilmente avanzan por la columna de cromatografía con más rapidez que los compuestos que se adsorben más fuertemente.

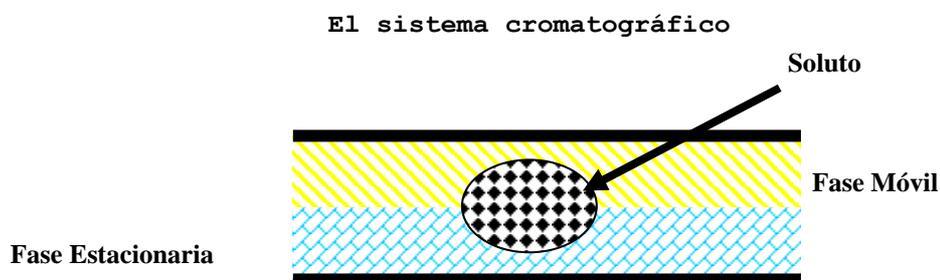
Aunque el color tiene poco que ver con la cromatografía moderna, su nombre ha persistido y se sigue utilizando para describir todas las técnicas de separación en las que intervienen una fase móvil y una fase estacionaria.

## DEFINICIÓN DE CROMATOGRAFÍA

Se entiende por cromatografía al conjunto de técnicas analíticas que se fundamentan en la separación que se produce cuando una mezcla de compuestos es arrastrada por una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria.

La técnica cromatográfica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre una fase estacionaria y una móvil.

*Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles, una de ellas llamada fase activa o fase móvil, que transporta las sustancias que se separan, y que progresa en relación a otra fase llamada fase estacionaria*



## CLASIFICACIÓN DE LOS PROCESOS CROMATOGRÁFICOS

La fase móvil puede ser un líquido o un gas. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido.

Teniendo en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria se establece la siguiente clasificación.

**CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN:** la fase estacionaria es un sólido sobre el que se adsorben los componentes de la muestra.

- Cromatografía Líquido - Sólido CLS (fase móvil líquido)
- Cromatografía Gas - Sólido CGS (fase móvil gas)
- Cromatografía en Capa Fina CCF (fase estacionaria sólida en forma plana y la móvil líquida)

**CROMATOGRAFÍA DE REPARTO:** la fase estacionaria es un líquido sostenido por un sólido inerte.

- Cromatografía Líquido - Líquido CLL (fase móvil un líquido)

- Cromatografía Gas - Líquido CGL (fase móvil un gas)
- Cromatografía en papel (fase estacionaria es una capa de agua adsorbida sobre una hoja de papel)

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO: la fase estacionaria es una resina de intercambio iónico y la separación se produce por la unión de los iones a la fase estacionaria.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR: la fase estacionaria es una estructura parecida a un tamiz y la separación se produce en función del tamaño de las moléculas.

Teniendo en cuenta la forma de la fase estacionaria se clasifica en:

- Cromatografía en columna
- Cromatografía plana (cromatografía en capa fina y en papel).

## CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

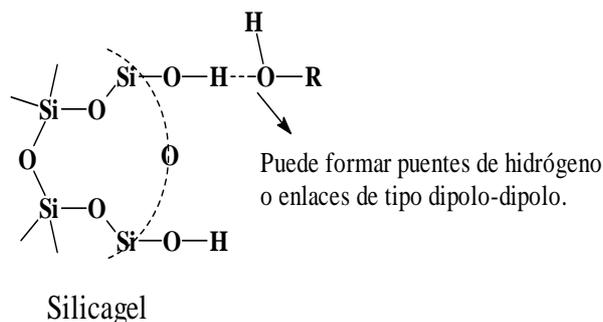
Existen ciertas sustancias sólidas, químicamente inertes, que tienen la propiedad de adsorber o fijar débilmente en su superficie a una gran cantidad de compuestos. La fortaleza con la que se adsorben las sustancias sobre un adsorbente dado varía de un compuesto a otro.

Entre los adsorbentes más usuales: sílica Gel (óxido de silicio), alúmina (óxido de aluminio), celulosa, fluorosil (silicato de magnesio) y sulfato de calcio.

La separación se realiza por la diferente tendencia de adsorción de los compuestos orgánicos por la fase estacionaria.

La fase móvil desplaza y disuelve a los componentes de la mezcla según sea su afinidad por la fase estacionaria es decir, los componentes más polares estarán adsorbidos con más fuerza y serán más difíciles de separar de la fase estacionaria que los componentes poco polares.

Los menos polares no presentan una interacción importante con la fase estacionaria (gel de sílice) y no serán retenidos.



En un proceso de adsorción los componentes de la mezcla son adsorbidos por la fase estacionaria con diferente intensidad de tal forma que el proceso adsorción - desorción hace que unos componentes avancen más rápidamente que otros.

La adsorción es un proceso de superficie mientras que la absorción es la penetración de una sustancia en el seno de otra (al escribir el papel adsorbe tinta mientras que la esponja absorbe agua).

En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables independientes: *el adsorbente, el disolvente y las sustancias a cromatografiar.*

*Por tanto, sí una molécula tiene una gran afinidad pasará muy lentamente mientras que otro componente con menos afinidad lo hará más rápidamente.*

Adsorbentes por orden de menor a mayor poder adsortivo	Disolventes por orden de menor a mayor poder eluyente
Azúcar, almidón Inulina Talco Carbonato de sodio Carbonato de potasio Carbonato de calcio Óxido de magnesio Gel de sílice activada Alúmina activada ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )	Hexano, éter de petróleo Heptano Ciclohexano Tetracloruro de carbono Benceno Tolueno Cloroformo Éter dietílico Acetato de etilo Piridina Acetona Propanol Etanol Metanol Agua Mezcla de ácidos o bases con agua, alcoholes o piridina.

La regla general es elegir la polaridad del disolvente análoga a la de la muestra a emplear y en la mayoría de los casos adsorbentes poderosos (activos) para sustancias no polares y adsorbentes con menos actividad para sustancias más polares.

En la tabla anterior se indica una relación de adsorbentes y disolventes ordenados de menor a mayor polaridad, (actividad y poder eluyente respectivamente).

## CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN O REPARTO

Técnica donde la separación selectiva de los componentes se produce por el diferente grado de solubilidad que estos puedan tener con las dos fases participantes. Es decir, como si se estuviese produciendo un elevado número de extracciones.

Por ello, las fases tiene que ser inmiscibles entre si y el soluto sufre un equilibrio de partición entre ambas que queda definido por una constante  $K$ , llamada "coeficiente de reparto", cuyo valor depende para una fase estacionaria determinada y para una fase móvil dada, de la naturaleza del soluto a aislar, lo que origina las diferencias en la retención y la consiguiente separación.

El soluto se reparte entre el líquido de la fase estacionaria y la fase móvil, por diferencia de solubilidad, hasta alcanzar el equilibrio.

*La técnica cromatográfica* consiste en disponer de una columna de tal forma que su contenido sea capaz de establecer fuerzas de retención hacia una sustancia, a la vez que un disolvente que pasa continuamente por esa columna sea capaz de establecer fuerzas de disolución hacia ese soluto.

Lógicamente, para que la fase estacionaria se mantenga dentro de la columna debe estar formando una delgada película sobre un soporte inerte.

En este tipo de cromatografía se debe controlar la temperatura y los volúmenes de ambas fases (estacionaria y móvil) ya que estos parámetros alteran la solubilidad y por tanto el coeficiente de reparto.

## CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA

Cromatografía líquido - sólido que utiliza columnas huecas verticales de vidrio cerradas en su parte inferior con una llave que permite la regulación del flujo de la fase móvil.

Como fase estacionaria se emplean básicamente dos adsorbentes, gel de sílice y alúmina.

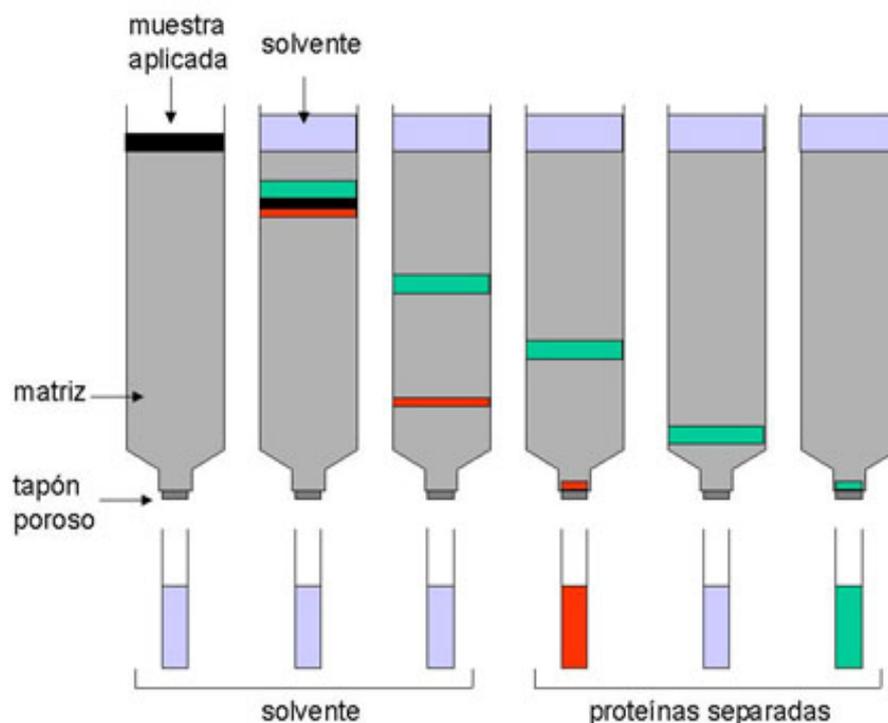
La técnica consiste en rellenar la columna con el adsorbente elegido que debe sedimentar sin que se produzcan canales o grietas.

En la parte superior de la columna se coloca la mezcla a separar, llamada *cabeza de la columna* que se obtiene mezclando el adsorbente con la muestra con el eluyente (fase móvil) que va a ser utilizado en el proceso de separación

Se deja que el eluyente empiece a descender por la columna ya sea por gravedad o a presión (cromatografía flash).

Se produce la adsorción de los componentes con diferentes intensidades logrando que unos avancen más que otros.

En la parte inferior de la columna se recogen las diferentes fracciones cromatográficas que se analizan y agrupan en función de sus características.



El rendimiento del proceso depende básicamente de la preparación de la columna y del proceso de elución.

El relleno de la columna puede ser en seco o en húmedo. El seco tiene el inconveniente de que pueden aparecer burbujas de aire en la columna que son difíciles de eliminar. También hay que tener presente que los adsorbentes al empaparse de los eluyentes aumenta su volumen y pueden romper la columna. El relleno húmedo evita los problemas anteriores y consiste en llenar la columna en forma continua con una mezcla de adsorbente con el eluyente a utilizar de menor polaridad.

La cantidad de adsorbente a emplear es de 20 - 25 gramos de adsorbente por cada gramo de mezcla a separar. Este es el tipo de cromatografía más utilizado en Química Orgánica.

El orden aproximado de elución de los compuestos es el que se indica a continuación.

	Alcanos
	Alquenos
	Éteres
Aumento de la polaridad	Hidrocarburos halogenados
movimiento más lento	Hidrocarburos aromáticos
	Aldehídos y cetonas
	Ésteres
	Alcoholes
	Aminas
	Ácidos carboxílicos

Polaridad de los disolventes más usuales:

	Alcanos (hexano, éter de petróleo)
	Tolueno
	Hidrocarburos halogenados
Aumento de la polaridad,	Éter dietílico
se eluye más fácilmente	Acetato de etilo
	Acetona
	Alcoholes
	Ácido acético.

## CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La técnica de Cromatografía en Capa Fina CCF ( TLC, sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography) es una adaptación especial de la cromatografía de adsorción muy utilizada en Química Orgánica ya que entre otras cosas nos permite:

- Determinar el grado de pureza de una muestra
- Comparar muestras.
  
- Hacer el seguimiento de una reacción química
- Controlar el contenido de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna
- Determinar las condiciones más adecuadas para una cromatografía en columna.

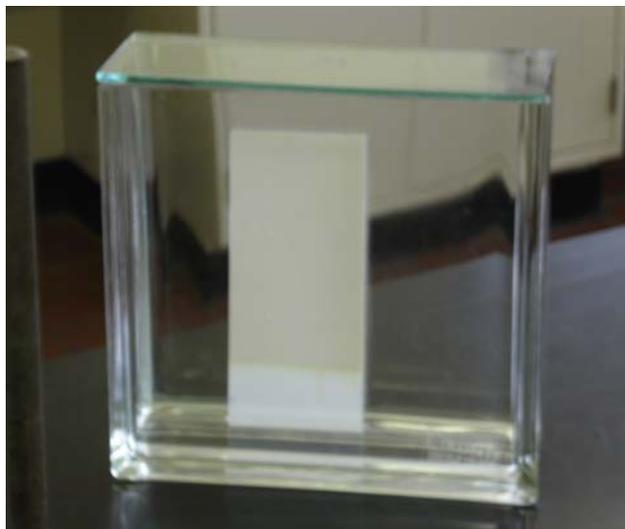
La fase estacionaria consiste en una fina capa delgada de gel de sílice o alúmina adherida a un soporte de vidrio, aluminio o materiales plásticos con un grosor que puede oscilar entre 1 hasta 0,1 - 0,2 mm. Algunas placas vienen con indicadores fluorescentes.

Para realizar la cromatografía se aplica la muestra disuelta en la parte inferior de la placa, y a 1 cm del borde de la misma, con la ayuda de un capilar.

Las muestras se deben colocar entre 1 - 1,5 cm del extremo de la placa de tal forma que al ponerla en contacto con el disolvente que se encuentra en la cubeta no cubra la muestra.



El cromatograma se introduce verticalmente en un recipiente cerrado llamado *cubeta de cromatografía* o *tanque de desarrollo* que contiene en su fondo una pequeña cantidad del eluyente que se vaya a usar (fase móvil) dejando que el disolvente ascienda por capilaridad.



Las sustancias que forman parte de la muestra se adhieren a la fase estacionaria o son arrastradas con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria.

Cuando el eluyente ha ascendido hasta casi el borde superior de la placa, se saca, se seca y se observan las señales.

Muchas veces las sustancias desarrolladas por este método, al no ser coloreadas, no son visibles. Para hacerlas visibles se utiliza luz ultravioleta entre 240 - 270 nm.

Para hacer visibles aquellas señales que no se detectan a la luz UV ni son coloreadas, se procede al revelado de la placa usando un revelador destacando entre los más usuales el Yodo y el Oleum [mezcla de ácido sulfúrico (4%) ácido acético (80%) y agua (16%)]

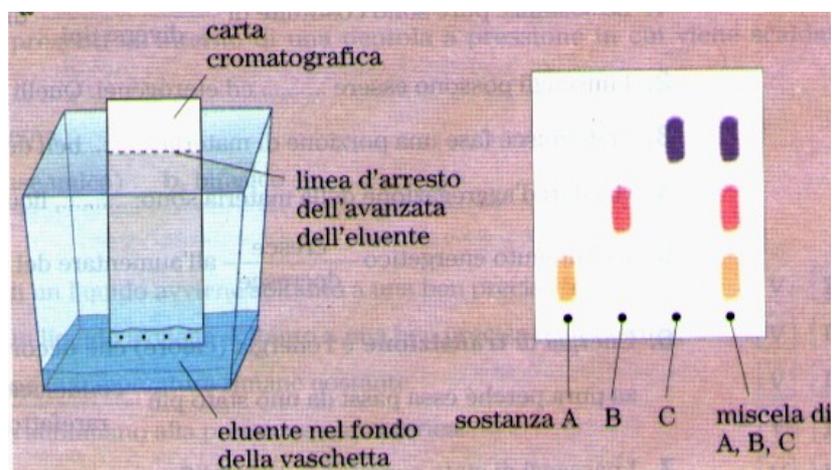
El revelado consiste en pulverizar el cromatograma con la especie reveladora y posterior calentamiento en una estufa alrededor de 100 °C, lográndose de esta manera la carbonización de los compuestos orgánicos.

El cromatograma una vez revelado nos presenta mediante manchas el grado de pureza de la muestra o el número de compuestos presentes en ella.

## Cámara para el revelado de la placa



## Cromatograma

CONCEPTO DE FACTOR DE RETENCIÓN - R<sub>f</sub>

Para determinar las posiciones relativas de las señales se utiliza el concepto de R<sub>f</sub> o Factor de Retención.

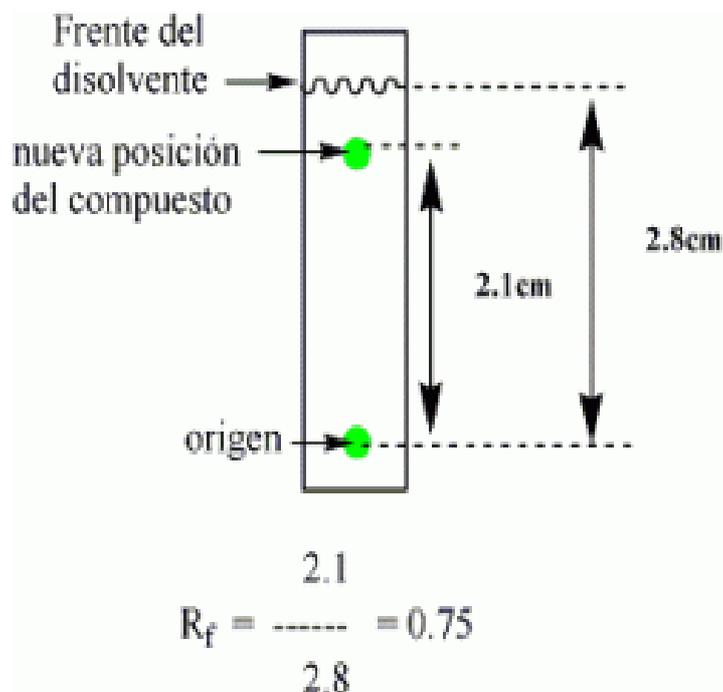
El R<sub>f</sub> es la relación que existe entre el recorrido de una mancha, medido desde el origen hasta el centro de la misma, y el recorrido por el disolvente (fase móvil) medido desde el origen hasta el frente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la señal de un compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

El R<sub>f</sub> se expresa en valores que oscilan desde 0,01 hasta 0,99 y, también en porcentaje.

Cuanto menos haya recorrido la sustancia en la fase estacionaria, menor será el  $R_f$  de la misma.

Los valores de  $R_f$  se pueden utilizar con fines comparativos para identificar sustancias al comparar con muestras auténticas de las mismas.



## CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA BIDIMENSIONAL

Cuando las mezclas a analizar son complicadas la cromatografía unidireccional sólo nos conduce a una separación parcial.

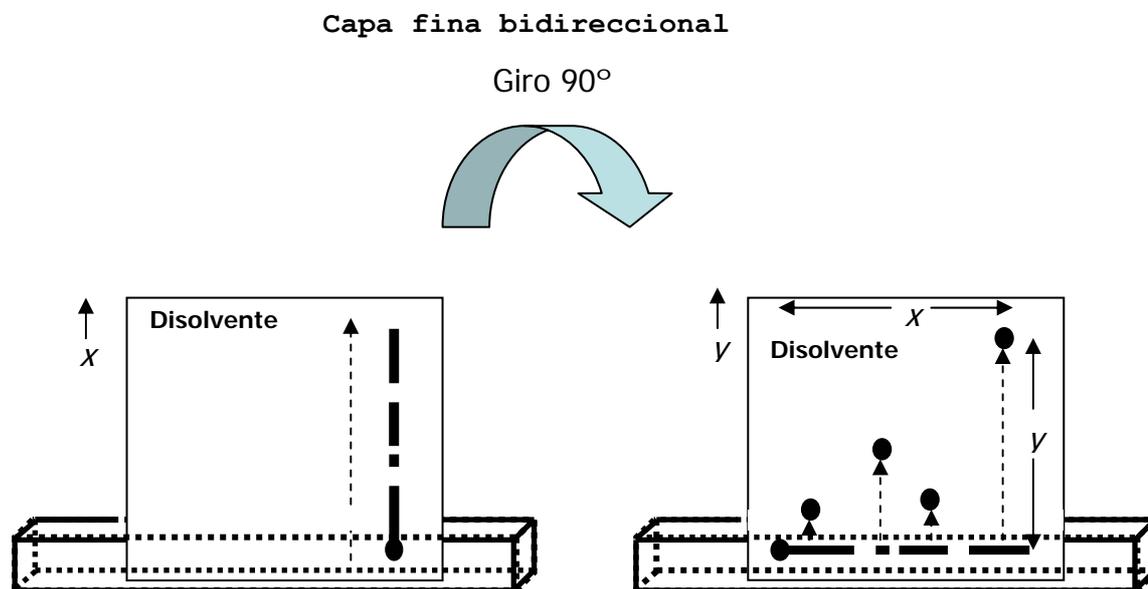
Para conseguir una mejor separación de las manchas se utiliza la TLC bidimensional.

La técnica consiste en realizar una CCF normal pero colocando la muestra en una esquina del cromatograma y eluyendo dicha placa con un disolvente A. Cuando el eluyente ha llegado al extremo superior de la placa se saca y se seca.

A continuación se gira la placa  $90^\circ$  y se vuelve a cromatografiar utilizando otro eluyente B. El empleo de un disolvente con características diferentes al primero permite aumentar el recorrido de las sustancias facilitando la separación parcial de las señales.

Después del segundo desarrollo se saca la placa de la cubeta se seca y se revela con algún agente selectivo.

También es posible identificar un compuesto determinado sobre un cromatograma bidimensional por comparación de su posición ( $R_f$ ) con la de algún compuesto estándar colocado sobre el mismo cromatograma.



## TLC PREPARATIVA

La cromatografía en capa fina también se puede usar con fines cuantitativos para separar pequeñas cantidades de un compuesto.

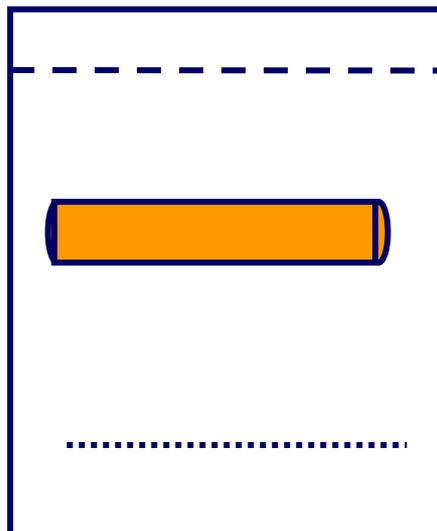
Las separaciones preparativas se realizan en placas estándar de 20 x 20 cm (algunas veces en placas de 20 x 40 cm) más gruesas y el volumen de la muestra también debe ser mayor (alrededor de 10 ml).

La muestra se aplica en forma de banda lineal mediante una pipeta Pasteur o con un capilar.

Para la TLC preparativa podemos utilizar todos los sistemas de disolventes que hemos descrito para la TLC analítica obteniendo los mismos resultados.

Una vez realizada la cromatografía, las bandas de interés se ponen de manifiesto utilizando una técnica no destructiva con el reactivo adecuado (luz UV o Yodo).

Capa gruesa sin revelar



La zona de la placa que contiene dicha banda es raspada y recuperada en un matraz y extraída con el disolvente adecuado.

Finalmente el disolvente es evaporado para la recuperación del soluto.

Esta técnica tiene la ventaja de que su tiempo de desarrollo es inferior al de una cromatografía en columna.

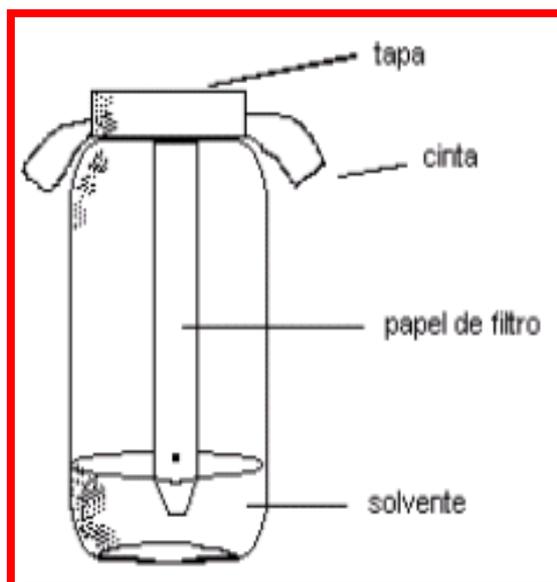
## CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

Es similar a la CCF, excepto en que como fase estacionaria se utiliza una capa de agua adsorbida sobre una hoja de papel (líquido retenido sobre un soporte sólido inerte). El papel contiene retenido alrededor de un 20% de agua.

El soporte general que se utiliza es papel Whatman número 1 y número 3 para separaciones analíticas y Whatman 3MM para trabajos preparativos

No es estrictamente una cromatografía de adsorción sino una combinación de adsorción y reparto. El reparto se produce entre el agua que hidrata la celulosa de la fase estacionaria y la fase orgánica móvil.

## Cubeta para cromatografía en papel



La técnica consiste en colocar el papel (fase estacionaria) en una cubeta de vidrio colgándolo de un soporte.

La fase móvil, colocada en el fondo de la cubeta (1 - 1,5 cm), entra en contacto con el papel sobre el cual, a 1 cm de distancia hemos colocado las muestras que deben ser arrastradas y separadas.

Este tipo de cromatografía, llamada *ascendente*, se debe realizar en unas condiciones estándar de saturación previa de la fase estacionaria ya que el disolvente se puede evaporar del papel antes de que se produzca la separación y no se consiga el efecto deseado.

La técnica de cromatografía en papel se utiliza preferentemente cuando se trata de separar compuestos polifuncionales o muy polares como aminoácidos o azúcares.

La técnica descendente es similar a la anterior y sólo se diferencia en que el papel es introducido por su parte superior en una canaleta donde hay una pileta para el disolvente.

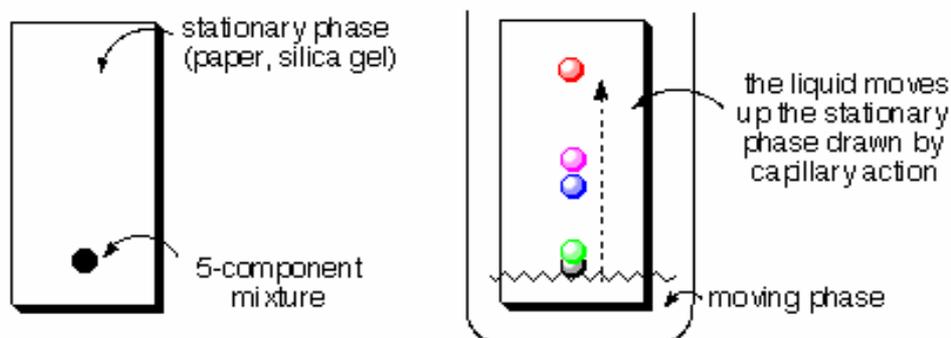
Las muestras colocadas en la parte superior del papel, a 1 - 1,5 cm de la canaleta, serán arrastradas hacia abajo por el eluyente (fase móvil).

Los resultados de ambas técnicas son similares.

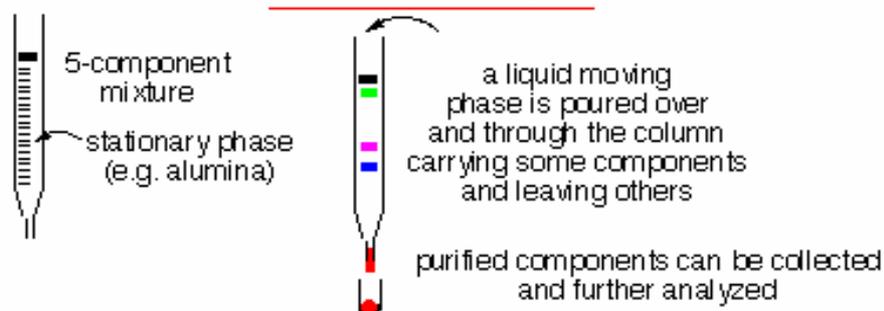
En forma análoga a la TLC se pueden realizar cromatografías en papel tanto preparativa como bidimensional.

## Comparación de las técnicas de cromatografía en columna y plana

### Example of paper or thin layer chromatography



### Example of column chromatography



## CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - HPLC

Técnica muy utilizada para el análisis de compuestos orgánicos pesados como pesticidas, aromáticos polinucleares, fármacos, vitaminas, alimentos etc. Cromatografía de adsorción conocida como HPLC (siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) o Cromatografía Líquida de Alta Presión o Resolución.

Es una variante de la cromatografía en columna donde la fase estacionaria está formada por partículas muy pequeñas, en forma esférica, que hace que el empaquetamiento de la columna sea muy compacto.

La disminución del tamaño de los poros que forman la fase estacionaria hace que la cromatografía sea muy lenta pérdida de carga, por lo que hay que instalar a la entrada de la columna un sistema de bombeo que tiene dos finalidades:

- I) Superar la resistencia del relleno
- II) Aportar un flujo de fase móvil que puede ser controlado a lo largo de toda la cromatografía

En estas condiciones se consigue acortar el tiempo de análisis

de las columnas de gravedad.

En la cromatografía líquida los componentes de una mezcla son llevados a través de una fase estacionaria fijada dentro de una columna de cromatografía mediante el flujo de una fase móvil líquida.

Las separaciones están basadas en las diferentes velocidades de migración que existen entre los componentes de la mezcla que dependen de su naturaleza y su interacción con las fases.

Una cromatografía por HPLC puede tener un poder de separación miles de veces superior al de una columna simple.

Las partículas de relleno suelen ser microesferas de sílice, alúmina o resina cuyo diámetro oscila entre 3 - 25  $\mu\text{m}$  (micras).

Las columnas de HPLC son de acero inoxidable, con un diámetro interno de 2 - 5 mm y una longitud variable de 10 - 30 cm dependiendo del diámetro de las micropartículas de relleno.

El flujo a presión se aplica entre 1500 - 800 psi.

En la cromatografía HPLC, como en cualquier tipo de cromatografía, se distinguen una fase estacionaria y una fase móvil. Como ambas compiten con las moléculas del soluto serán de polaridades diferentes.

Si la fase móvil la integran compuestos orgánicos poco polares, la fase estacionaria será relativamente polar. La técnica derivada de esta situación se llama de *fase normal* por ser la modalidad más usual de la HPLC.

Si la fase móvil la forman líquidos acuosos o polares y la fase estacionaria es poco polar o apolar, la técnica se llama de *fase inversa* (cada vez más usada).

- HPLC en "fase normal"

- Fase móvil poco polar (hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc.)

- Fase estacionaria polar (generalmente sílice)

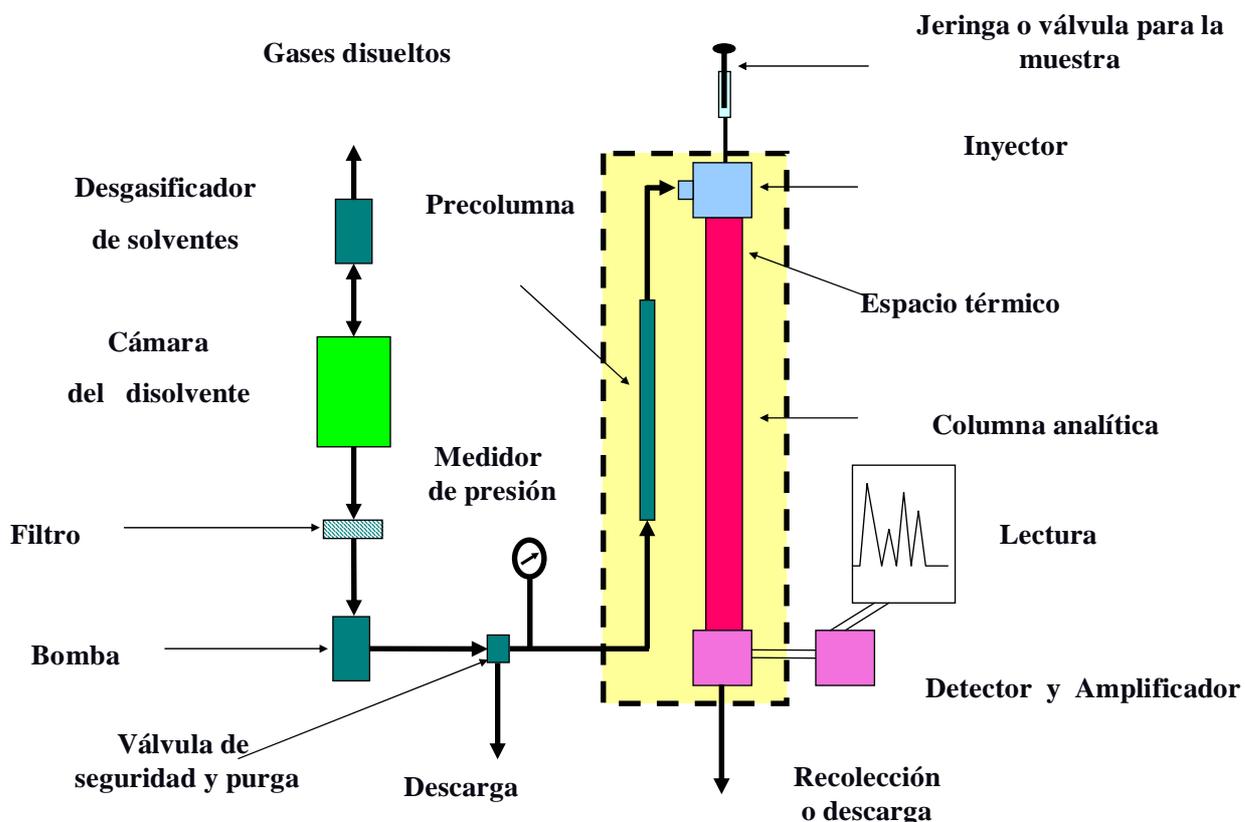
- HPLC en "fase inversa"

- Fase móvil polar (agua, disoluciones amortiguadoras de pH, metanol, acetonitrilo, etc.)

Fase estacionaria no polar: (habitualmente sílice injertada con compuestos orgánicos que contienen desde 8 hasta 18 átomos de carbono).

Esta técnica requiere un equipo muy sofisticado que describimos a continuación.

## ESQUEMA DE UN CROMATÓGRAFO HPLC



### CÁMARA DEL DISOLVENTE

Los componentes de la fase móvil para HPLC necesitan un estricto control de pureza física y química por ellos tienen que ser filtrados y muchas veces desgasificados. Es conveniente que en esta cámara (reservorio) existan desgasificadores (aplicación de ultrasonidos) para eliminar los gases del disolvente pues producen burbujas en la columna que interfieren en los resultados. Se puede trabajar con un solo disolvente (elución isocrática) o se puede cambiar continuamente la composición del disolvente (elución por gradiente).

### BOMBA DE ALTA PRESIÓN

Es la encargada de introducir la fase móvil (eluyente) en la columna de cromatografía. Estas bombas deben aportar un flujo constante del disolvente entre 0,001 hasta 10 ml/minuto. Las elevadas presiones que generan las bombas (varios centenares de atmósferas) no constituyen un peligro de explosión ya que los líquidos no son muy compresibles. No obstante, muchos

cromatógrafos presentan válvulas de seguridad y purga por si se produce este proceso.

#### PRECOLUMNA

El empleo de una columna previa (precolumna) a la columna analítica mejora la eficiencia de la separación cromatográfica. Su misión es eliminar contaminantes y partículas de polvo.

#### CÁMARA DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA - INYECTOR.

Dispositivo por medio del cual se introduce la muestra en el sistema cromatográfico. La inyección se realiza con una jeringa que se introduce en el inyector y descarga la muestra para su análisis. La muestra no debe contener sólidos para que no se atasque, si es necesario hay que proceder a su filtración. La muestra debe ser disuelta en el mismo eluyente que se va a utilizar. El volumen a inyectar de muestra debe ser el menor posible para que los resultados sean más nítidos.

#### COLUMNA ANALÍTICA

Es el corazón del sistema cromatográfico, en ella se produce la retención de los diferentes compuestos que permite su separación.

#### ESPACIO TÉRMICO - CALENTADOR.

Su misión es controlar la temperatura del proceso que puede oscilar desde la ambiental hasta 150°C. Manteniendo la temperatura constante se obtienen mejores resoluciones cromatográficas.

#### DETECTOR.

Dispositivo que colocado a la salida de la columna nos indica "quien va en la fase móvil". Su misión es detectar los momentos de emersión de los componentes y proporcionar información cualitativa y cuantitativa de los mismos. La acción del detector se traduce en una señal, (normalmente de tipo eléctrico) que posteriormente se amplifica y registra en un gráfico llamado cromatograma. El cromatograma consta de una serie de picos que se emplean para identificar cualitativamente (posición en el eje) y cuantitativamente (área de los picos) a los componentes de la muestra, al compararlos con cromatogramas estándar. Se dividen en dos tipos:

Detector selectivo.

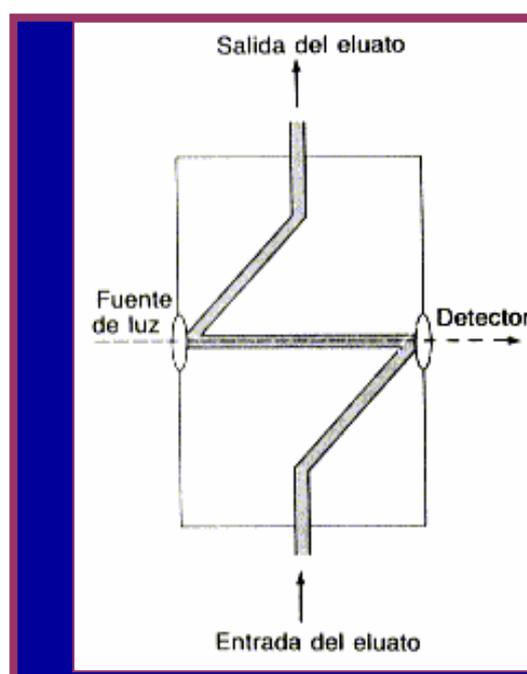
Aquel que responde a una propiedad del soluto en disolución.

Ejemplo, el detector UV/Visible nos mide la absorción de un producto a una determinada longitud de onda, el fluorímetro que nos mide la fluorescencia, etc.

El más utilizado es el detector espectrofotométrico UV/Vis por ser el más sensible y estable a los cambios de flujo y temperatura (trabaja en el rango 190 - 650 nm). Es el más utilizado porque muchos solutos absorben este tipo de radiación y son bastantes sensibles a ella.

El sistema más simple emplea la emisión a 254 nm de una lámpara de mercurio y detección a una sola longitud de onda.

Esquema de un detector espectrofotométrico UV/Visible



Detector universal.

Aquel que responde cuando una propiedad de la fase móvil es modificada por la presencia de un soluto en ella.

Ejemplo, el detector de índice de refracción (RI) nos mide el cambio en el índice de refracción entre el líquido contenido en el matraz y la referencia.

Los más utilizados son el detector de índice de refracción y el de conductividad.

#### COLECTOR DE FRACCIONES

En este módulo se van recogiendo las fracciones a medida que van llegando al detector. Esta recogida nos separa los

componentes de idénticas propiedades entre sí, salvo que aparezcan picos solapados. A continuación se toman las muestras, se comprueba su pureza mediante una cromatografía en capa fina y se efectúan los ensayos de identificación con las técnicas disponibles, IR, RMN, Fluorescencia, Masas, etc. La mayoría de los cromatógrafos de HPLC llevan incorporados un colector de fracciones.

#### ORDENADOR CROMATOGRÁFICO

Microprocesador diseñado solo para esta técnica, es el nexo entre todos los componentes del equipo. Su misión es controlar todas las variables del proceso e indicar en cada instante las condiciones del sistema.

#### CROMATOGRAFÍA DE GASES

Técnica cromatográfica que se utiliza para separar compuestos orgánicos volátiles como hidrocarburos, fenoles, disolventes, ácidos grasos, etc. Hay dos tipos de cromatografía de gases:

Cromatografía Gas - Sólido (CGS) donde la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un gas inerte. (Técnica muy limitada solo aplicable a compuestos gaseosos de bajo peso molecular). (Cromatografía de adsorción)

Cromatografía Gas - Líquido (CGL) donde la fase estacionaria es un líquido retenido sobre la superficie de un soporte sólido y la fase móvil es un gas. En este caso la separación de los compuestos depende de la constante de solubilidad de la muestra entre la fase líquida y la fase gaseosa. Esta es la técnica conocida vulgarmente como cromatografía de gases CG (Cromatografía de reparto).

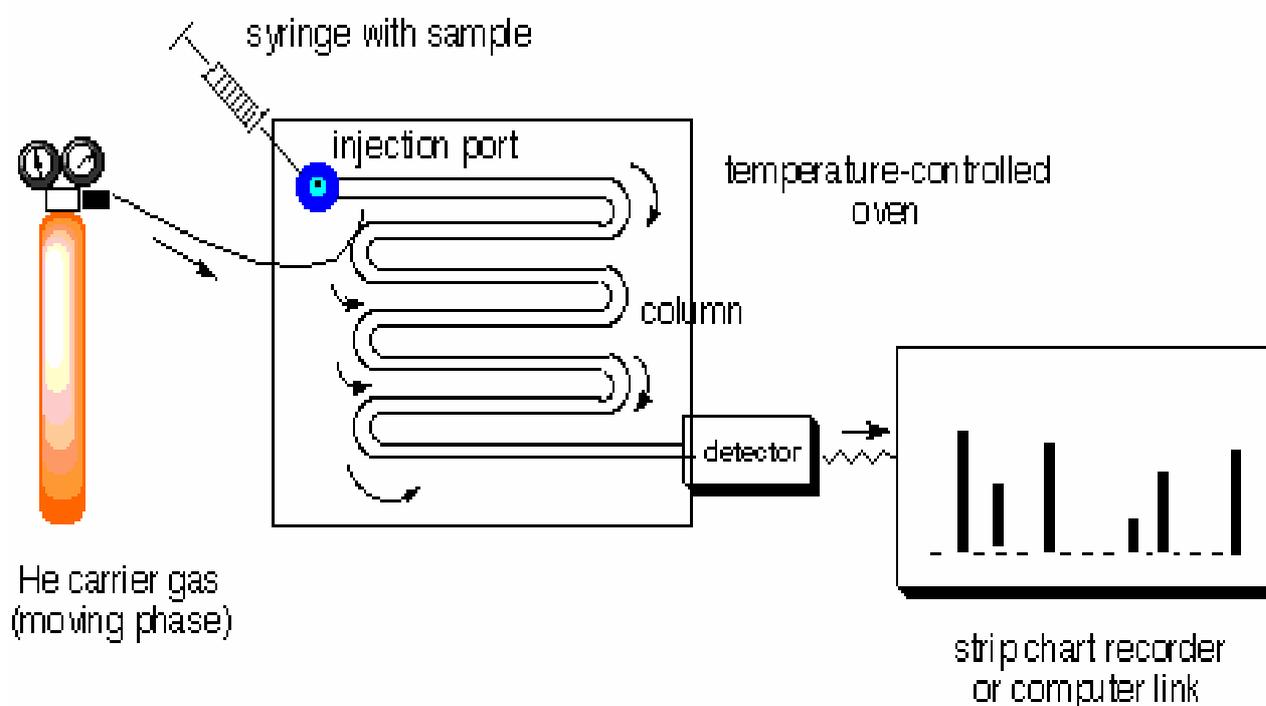
#### MÉTODO GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

Una pequeña muestra del material a separar se inyecta en una corriente de gas inerte (fase móvil) que lo transporta hasta la columna de cromatografía que contiene el medio adecuado para ir retardando el flujo de los componentes individuales de la muestra.

Los componentes de la muestra se van separando en la columna cromatográfica debido a las diferencias de su perfil de partición o retención entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria sólida o líquida. La diferencia en la adsorción o en el reparto sobre el material de la columna es el factor que hace posible la separación.

Los compuestos ya separados emergen a intervalos de tiempo discretos (característico de cada componente) y pasan a través de un tipo de detector.

## Schematic of a Gas Chromatograph



### ELEMENTOS DEL CROMATÓGRAFO DE GASES

**GAS PORTADOR:** Los más usuales son el helio, argón, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno, inyectados a presión que oscila entre 2 - 6,3 atm. Su elección depende del tipo de detector instalado en el cromatógrafo. El gas portador, químicamente inerte, se mezcla con la muestra vaporizada impulsándola por el interior de la columna.

**INYECTOR:** Dispositivo encargado de introducir la muestra en la columna. Se mantiene a temperaturas elevadas entre 200 - 350 °C. La temperatura de trabajo se debe elegir de tal forma que se consiga la volatilización de todos los componentes presentes en la mezcla, pero no debe ser superior a la temperatura de ebullición del componente menos volátil ya que puede producir su descomposición.

**COLUMNAS:** La columna de cromatografía está situada dentro de un horno ya que esta técnica se realiza a elevadas temperaturas. Las columnas pueden ser de vidrios, plásticos y

metálicas (cobre - níquel y acero inoxidable). Generalmente se usan columnas metálicas (más caras pero más eficaces) cuya longitud oscila entre 1 - 4,5 m y entre 2 - 20 mm de diámetro.

En las columnas de adsorción los adsorbentes más usuales son la alúmina, gel de sílice y carbón activo.

En columnas de reparto el material de relleno consiste en un soporte sólido finamente dividido como celita, arcilla o esferitas de vidrio que portan el líquido volátil. Los líquidos más empleados son las siliconas, grasas y glicoles polietilénicos.

#### DETECTOR:

Los componentes de la muestra ya separados, abandonan la columna de cromatografía y se dirigen hacia el detector que mide alguna propiedad física del compuesto que origina una señal eléctrica sobre el registrador.

Entre los detectores más usuales está el de ionización de llama, conductividad térmica, el termoiónico (para detectar compuestos orgánicos con nitrógeno y fósforo y el detector fotométrico de llama útil para el análisis de contaminantes del agua y del aire como pesticidas e hidrocarburos.

#### REGISTRADOR:

El proceso de separación por cromatografía de gases queda reflejado en un cromatograma donde se observan una serie de picos. Cada pico representa una sustancia de las eluidas en la columna. Estos picos vienen caracterizados por tres parámetros:

\* Tiempo de retención: tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la elución de un producto de la misma.

\* Volumen de retención: volumen total del gas portador que se ha necesitado pasar a través de la columna para separar completamente la sustancia responsable de ese pico.

Volumen retención = (tiempo retención) x (velocidad del flujo)

\* Área de los picos: directamente relacionada con la concentración de la sustancia detectada. La altura de los picos en el cromatograma se expresa en unidades de potencial eléctrico. El área de los picos se calcula multiplicando el alto del pico por el ancho del mismo medido a la mitad de su altura.

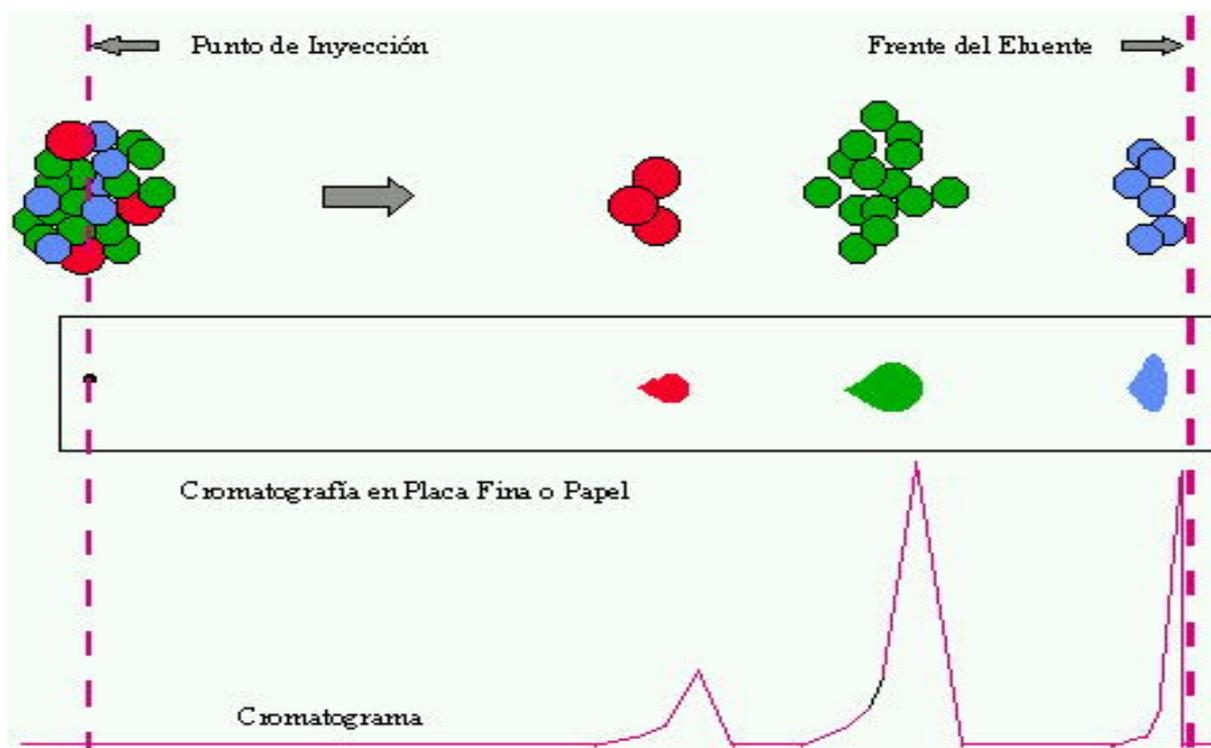
Actualmente los cromatógrafos de gases llevan incorporados unos aparatos llamados integradores que realizan esa función automáticamente.

La identificación de los productos separados se realiza comparando su tiempo de retención o volumen de retención con el de sustancias conocidas.

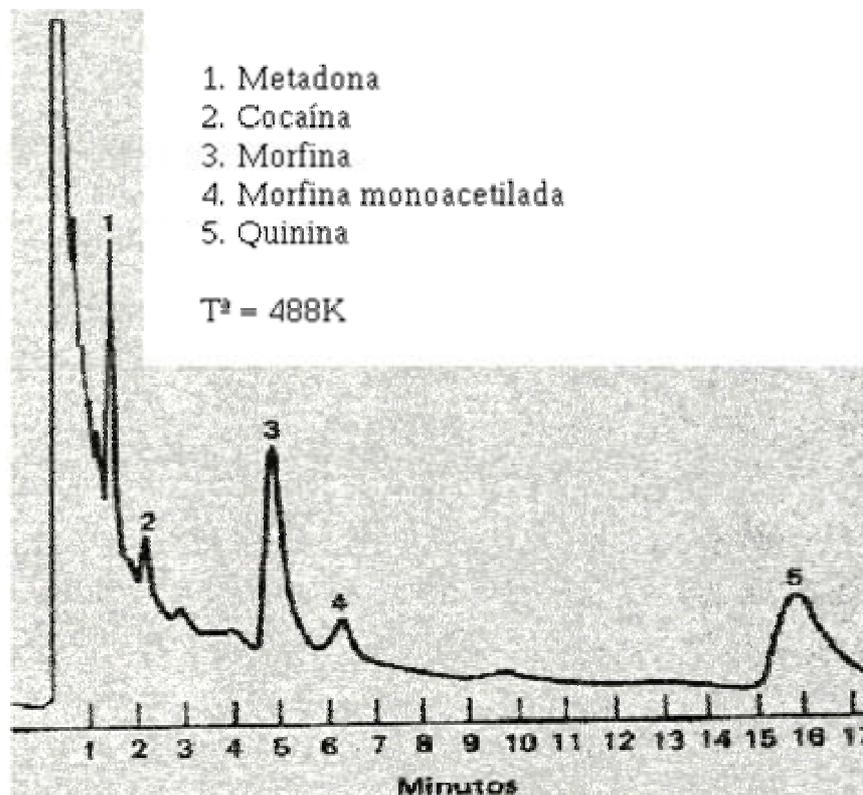
En el análisis de mezclas con sustancias desconocidas la técnica de la cromatografía de gases no es suficiente. En este caso es necesario recoger la muestra a la salida del detector para realizar su identificación con las técnicas habituales de IR, RMN, UV y Masas. Esta técnica tiene dos grandes ventajas:

- \* Útil para separar cantidades muy pequeñas de material (del orden de 10<sup>-4</sup> g).
- \* Requiere poco tiempo para su realización al contrario que otras técnicas analíticas.

Ilustración de las técnicas cromatográficas en capa fina y gases.



Aplicación de la cromatografía de gases en la determinación de drogas. Los picos del cromatograma se identifican positivamente por comparación con los de estándares conocidos de drogas.



Cromatografía de gases de una muestra de orina

## CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Método muy utilizado en la separación de iones inorgánicos como nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), separación y purificación de moléculas biológicas (pe, proteínas) y en los procesos de desionización del agua.

La técnica es muy similar a la utilizada en la cromatografía en columna y la separación se produce en función de la carga que posee el soluto.

Fase estacionaria: resinas de intercambio iónico que tienen la propiedad de separar especies ionizadas (aniones o cationes)

Fase móvil: generalmente disoluciones amortiguadoras de pH.

La afinidad de los compuestos por los grupos cargados de la fase estacionaria está influida por el pH que determina su estado de ionización.

El intercambiador iónico consiste en una *matriz insoluble* a la que se han unido covalentemente grupos cargados. Estos grupos cargados pueden ser reversiblemente intercambiados por otros iones de la misma carga sin alterar la matriz. Hay dos tipos de intercambiadores iónicos

Intercambiador catiónico.

Posee grupos cargados negativamente que atraen cationes (cargas +).

También se les conocen como intercambiadores iónicos ácidos porque sus cargas negativas proceden de la ionización de sus grupos ácidos.

Las resinas catiónicas presentan como grupos funcionales más frecuentes el sulfonato  $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$  y el carboxilato  $-\text{COO}^- \text{H}^+$ .

Intercambiador aniónico.

Posee grupos cargados positivamente que atraen aniones (cargas negativas).

También se les conocen como intercambiadores iónicos básicos ya que las cargas positivas que poseen resultan de la asociación de protones con grupos básicos.

Las resinas aniónicas suelen contener grupos amonio cuaternario  $-\text{RN}^+\text{R}_3$  ( $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ ) y ( $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$ )

Se utilizan normalmente como *fase móvil disoluciones acuosas tamponadas* ya que las propiedades del agua contribuyen a la disociación de los grupos iónicos y al hinchamiento de la matriz efectos que aumentan el intercambio iónico.

Hay que tener presente dos reglas básicas

1<sup>a</sup>) *La temperatura del proceso* que afecta a la constante de equilibrio (pK) de la disolución tampón por lo que puede variar su capacidad de tamponamiento.

2<sup>a</sup>) *Que los iones del tampón no interfieran en el proceso de intercambio iónico* ya que si estos iones llevan carga opuesta a la de los grupos funcionales del intercambiador iónico intervendrán en el proceso de intercambio iónico y causarán perturbaciones en el pH.

CONCLUSIÓN: "Utilizar tampones catiónicos con intercambiadores aniónicos y tampones aniónicos con intercambiadores catiónicos"

Tampones más usuales en cromatografía de intercambio iónico

Intercambiador iónico	Tampón	pKa	Rango de tamponamiento
Catiónico	Acetato	4,75	4,2 - 5,2
	Citrato	4,75	4,2 - 5,2
	Fosfato	7,20	6,7 - 7,6
	Hepes	7,55	7,6 - 8,2
Aniónico	L-Histidina	6,15	5,5 - 6,0
	Imidazol	7,00	6,6 - 7,1
	Trietanolamina	7,77	7,3 - 7,7
	Tris	8,16	7,5 - 8,0
	Dietanolamina	8,80	8,4 - 8,8

EL PROCESO CROMATOGRÁFICO DE INTERCAMBIO IÓNICO

1°) Instalación de la columna: la resina de intercambio iónico se empaqueta en la columna. Los rellenos de las resinas son polímeros cruzados de estireno y etilbenceno a los que se les ha añadido los grupos funcionales ácido ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) o básico ( $-\text{NH}_3\text{OH}$ ). Todo este conjunto recibe el nombre de *matriz de la columna* o *lecho de la columna*.

2°) Aplicación de la muestra produciéndose la adsorción reversible de la misma.

3°) Separación de las sustancias las moléculas que poseen una carga opuesta a la del intercambiador se adsorben, mientras que las moléculas neutras o las que poseen la misma carga que la del intercambiador se eluyen a lo largo de la columna.

"Las sustancias se separan entre sí porque poseen diferentes afinidades por el intercambiador iónico, debido a sus diferencias de cargas."

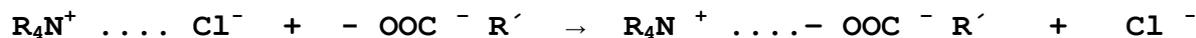
La separación del compuesto de la matriz cargada se puede realizar cambiando el pH de la disolución

El intercambio de iones es un proceso instantáneo y en equilibrio esquematizado en las siguientes reacciones:

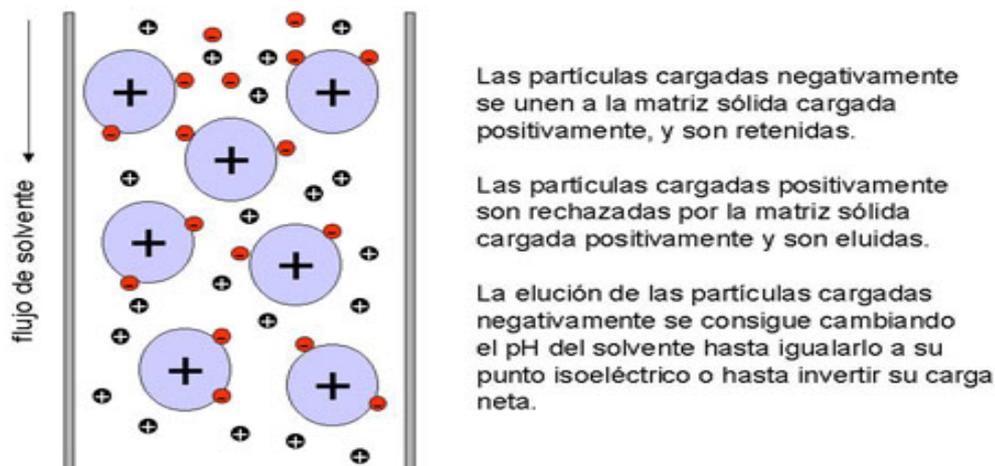
Intercambiador catiónico.



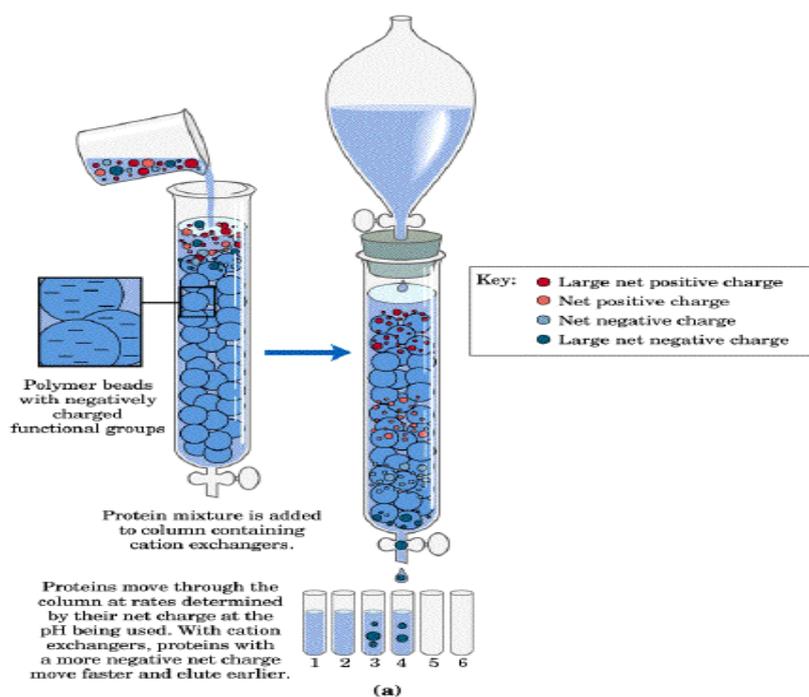
Intercambiador aniónico



### PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



### Separación de proteínas por cromatografía de intercambio iónico



## CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

También conocida como Cromatografía de Filtración sobre Gel, Cromatografía de Permeación sobre Gel y Cromatografía por Tamaño Molecular o por Tamices Moleculares.

Es un tipo especial de cromatografía que se utiliza en la separación de sustancias que poseen volúmenes o tamaños diferentes.

La fase estacionaria, llamada *malla molecular*, está formada por partículas altamente porosas que permiten la separación de los componentes de la mezcla en función del tamaño de las moléculas.

No existen interacciones entre la fase estacionaria y el soluto. Se separan por el tamaño de la partícula.

Las especies más utilizadas como fase estacionaria se dividen en dos tipos:

*Tipo Inorgánico:* como las zeolitas sintéticas, por ejemplo los tamices moleculares de Linde.

*Tipo Orgánico:* como geles y biogeles (polímeros orgánicos) por ejemplo, el Sephadex (polímero cruzado derivado del dextrano)

Todas estas especies poseen cavidades o poros a través de los cuales las moléculas pueden pasar o ser retenidas.

### MECANISMO DE FILTRACIÓN SOBRE GEL

La muestra a cromatografiar se añade por la parte superior de la columna y se procede a su elución con el disolvente adecuado.

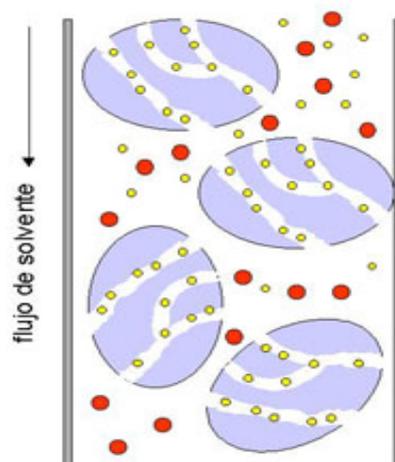
Las sustancias cuyo tamaño molecular es superior al de los poros del gel no pueden atravesarlo por lo que pasan con el líquido a través del lecho emergiendo las primeras en la columna.

El tamaño de estas moléculas determina el llamado "*límite de exclusión*" de tal forma que aquellas moléculas que superan dicho límite serán las primeras en ser eluidas.

Las moléculas más pequeñas penetran en los poros quedando retenidas en su interior y serán las últimas en ser eluidas.

Las moléculas que emergen de la columna siguen un orden decreciente respecto a sus pesos moleculares.

### PRINCIPIO DE LA CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

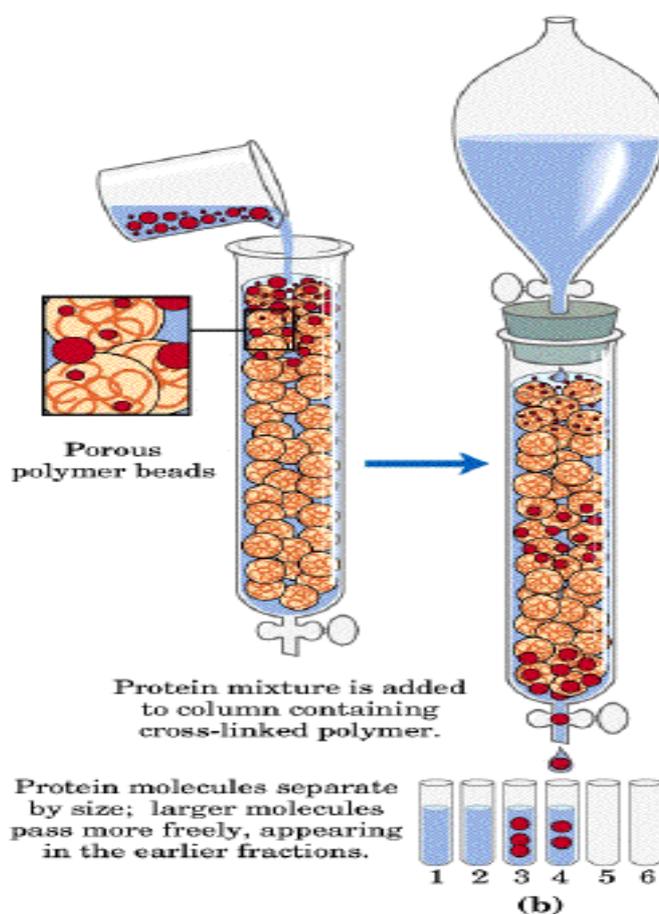


Las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos que presentan las bolas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor.

Las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los pequeños conductos de las bolas de gel se mueven entre ellas, donde la velocidad de flujo de solvente es superior.

Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular son eluidas antes que las de menor peso molecular.

### Separación de proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular.



**BIBLIOGRAFÍA*****"Análisis Instrumental"*****Skoog - Leary****Ed. McGraw - Hill (1993)*****"Cromatografía Líquida de Alta Resolución"*****Adrián García de Marina - Benito del Castillo****Ed. Limusa (1988)*****"Determinación de Estructuras Orgánicas"*****Daniel J. Pasto - Carl R. Jonson****Ed. Reverté (1984)*****"Guía de Prácticas de Química Orgánica"*****Mariana López Sánchez - Jorge Triana Méndez - María Esther Torres Padrón****Ed. Servicio de Reprografía y Encuadernación - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (2001)*****"Introducción a la Cromatografía"*****David Abbott - R.S Andrews****Ed. Alambra (1983)*****" Manual de Cromatografía"*****Juan Francisco Loro Ferrer****Colección Textos Universitarios. Gobierno de Canarias.  
Consejería de Educación - Cultura y Deportes (2001)**