

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Existen diferentes criterios de clasificación de la cromatografía:

❖ **Por la naturaleza de sus fases:**

- Cromatografía líquido - líquido
- Cromatografía gas - líquido
- Cromatografía líquido - sólido
- Cromatografía gas - sólido

❖ **Atendiendo al proceso químico-físico que va a protagonizar el proceso de separación:** siendo este el criterio más coherente de clasificación:

- Cromatografía de Adsorción (líquido - sólido o cromatografía de fases normales).
- Cromatografía de Reparto (o líquido - líquido), se basa en las características de solubilidad relativa de los solutos entre la fase móvil y una fase estacionaria de un líquido no polar. La fase líquida se impregna a un soporte inerte de sílice o, en el caso de cromatografía de fase invertida, se une químicamente.
- Cromatografía de Intercambio iónico.
- Cromatografía de Exclusión.

❖ **Con base en la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria:**

- Cromatografía plana:
 - ✓ Cromatografía en papel
 - ✓ Cromatografía en capa fina (TLC)
- Cromatografía en columna:
 - ✓ Cromatografía de gases (GC)
 - ✓ Cromatografía líquida (LC)
 - cromatografía líquido - líquido
 - cromatografía sólido - líquido

Chromatography	Type of stationary phase	Type of mobile phase	Apparatus for stationary phase	
	CHROMATOGRAPHIC PRINCIPLE			
Chromatography	<i>Adsorption chromatography</i> Competition between a solid adsorbent and the mobile phase	Gas	Column	→ 1
		Liquid	Column	→ 2
			Planar layer	→ 3
	<i>Partition chromatography</i> Competition between a liquid stationary phase and the mobile phase	Gas	Column	→ 4
		Liquid	Column	→ 5
	<i>Ion exchange chromatography</i> Competition between an ion exchange resin stationary phase and liquid mobile phase	Liquid	Column	→ 6
	<i>Permeation chromatography</i> Competition between a polymer matrix and liquid mobile phase	Liquid	Column	→ 7

Type of chromatography

- 1 → **Gas-solid chromatography GC / GSC**
- 2 → **Liquid column chromatography LC**
High performance liquid chromatography HPLC
- 3 → **Thin layer chromatography TLC**
Paper chromatography PC
- 4 → **Gas-liquid chromatography GC / GLC**
Supercritical fluid chromatography SFC
- 5 → **Liquid-liquid chromatography**
High performance liquid chromatography LC / HPLC
- 6 → **Ion exchange chromatography IEC**
High performance ion chromatography IC / HPIC
- 7 → **Gel permeation chromatography GPC**

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento. Según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria, éstas se separarán.

Después de cada cromatografía se puede obtener información del cromatograma tanto cualitativa (para identificar los distintos compuestos de la mezcla) como cuantitativa (para poder obtener la cantidad y composición de las sustancias separadas).

Las fases estacionarias pueden ser de materiales muy distintos, existen derivados de dextranos (sefadex), derivados de agarosa, poliacrilamida, esferas de vidrio, sílice, etc.

Existen distintos tipos de cromatografía en columna:

Cromatografía de intercambio iónico: se basa en la afinidad de los iones en solución por los sitios de polaridad opuesta que se encuentran en la fase estacionaria.

Cromatografía de exclusión: Se basa en la habilidad de materiales de porosidad controlada para separar los componentes de una mezcla de acuerdo al tamaño y forma de las moléculas.

Cromatografía de afinidad: se fundamenta en la especificidad de algunas macromoléculas biológicas. Éstas se unen específicamente a la fase estacionaria y para separar dicha macromolécula, bastará con variar el pH una vez que la columna este limpia y sólo se encuentre de interés.

Cromatografía de adsorción: se basa principalmente en las diferencias en la afinidad relativa de los compuestos por el sólido utilizado como fase estacionaria. Las separaciones obtenidas se determinan casi exclusivamente por interacciones polares, siendo la fase estacionaria más polar que la fase móvil.

Cromatografía de partición: la fase estacionaria es un líquido soportado en un sólido inerte. Otra vez, la fase móvil puede ser un líquido (cromatografía de partición líquido-líquido) o un gas (cromatografía de partición gas-líquido, GLC). La cromatografía en papel es un tipo de cromatografía de partición en la cual la fase estacionaria es una capa de agua adsorbida en una hoja de papel. La cromatografía de gases (GC) y de alta resolución (HPLC) son técnicas de partición ampliamente empleadas.

Cromatografía de fase reversa: el mecanismo de separación depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. La naturaleza actual de las interacciones de unión hidrofóbica asume que la interacción de unión es el resultado de un efecto entrópico favorable. Las condiciones iniciales de unión de la fase móvil usadas en la cromatografía de fase reversa son acuosas lo cual indica un grado alto de estructuras de agua organizadas alrededor de las moléculas de soluto y el ligando inmovilizado. A medida que el soluto se une al ligando hidrofóbico inmovilizado disminuye el área hidrofóbica expuesta hacia el disolvente. Así, el grado de organización de la estructura de agua disminuye con un favorable aumento de entropía en el sistema

CROMATOGRAFÍA PLANA

La mayoría de los principios que se aplican para la cromatografía en columna se aplican también a la cromatografía en superficie plana.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Para la cromatografía en capa fina (TLC), la fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor, fijadas sobre un soporte sólido generalmente de aluminio, plástico o vidrio. Después de aplicar el analito cerca de la parte inferior de la placa seca, el disolvente empieza a producir la separación.

La ventaja principal de la TLC es que se analizan simultáneamente la muestra y el patrón, mientras que en la cromatografía en columna las muestras se analizan individualmente. Además, las muestras que son difíciles de separar, se pueden resolver utilizando dos disolventes diferentes por desarrollo de la placa en direcciones perpendiculares.

Otra ventaja es que, si los componentes no se pierden en los vapores que rodean la placa, todos estarán en algún lugar de la misma, mientras que en la cromatografía en columna algunos componentes no eluyen y se pierden. Y a esto se suma que la placa de TLC se usa una sola vez, por lo que se pueden utilizar condiciones severas de separación.

La mancha en una placa de TLC se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil. El grado de retención en cromatografía plana de superficie se expresa como el factor de retardación, o índice de retención R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distancia de desplazamiento del soluto}}{\text{Distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

El “frente” del disolvente es el límite alcanzado por la fase móvil, en éste se mide la distancia en que se ha desplazado éste. El valor de R_f depende de las mismas condiciones experimentales que el valor de K de la cromatografía en columna: la composición de la fase móvil, el tipo de fase estacionaria, la temperatura y el tipo de compuestos separados.

También se puede definir el coeficiente de distribución, K , en términos de la concentración del soluto en la fase móvil, C_m , y en la fase estacionaria, C_s :

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

La detección y localización de las manchas en la placa de TLC se hace observando los cambios en la fluorescencia, o absorción en el U.V., de un indicador que se incorporó a la fase estacionaria. Toda la placa fluoresce bajo luz UV cuando no hay solutos presentes. Los lugares en los que reside el soluto aparecen como manchas oscuras. También podemos observar el color de los compuestos después de reaccionar con reactivos específicos para grupos o metales, rociados sobre la placa, como la fluorescamina para aminas.

Existen instrumentos para determinar directamente la fluorescencia y/o color de las manchas en la placa. Los instrumentos deben ser capaces de cuantificar la medida sobre el área total de la mancha.

Cromatografía en papel

En este caso, el soporte y fase estacionaria es papel. El papel que normalmente se utiliza es de celulosa. La celulosa es muy polar en el agua y se vuelve electronegativa. El papel tiene propiedades de intercambio iónico débiles, así como de adsorción.

La mayoría de las propiedades varían de papel a papel, lo que provoca variaciones en el R_f . Actualmente existen papeles modificados con resinas cambiadores de iones, alúmina, etc. El aparato que se usa consta de un soporte para el papel, un recipiente para el disolvente y una cámara hermética para desarrollar el cromatograma. La cámara hermética es necesaria para evitar la evaporación de los disolventes volátiles debido a la gran superficie del papel expuesta. Antes de sumergir el papel en el disolvente de elución se aplica la muestra en forma de punto diminuto con cualquier objeto que pueda transferir un pequeño volumen.

El papel debe estar en equilibrio con los vapores del disolvente antes de empezar el desarrollo. La cromatografía en papel se ha aplicado con buen éxito a problemas de química orgánica e inorgánica y de bioquímica.

CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La separación en la cromatografía de intercambio iónico depende la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas, a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El mecanismo de separación se basa en un equilibrio de intercambio iónico. Muchos de los experimento de intercambio iónico se llevan a cabo en cinco etapas.

La primera etapa es un equilibrio en el cual el intercambiador iónico se encuentra en las condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica, lo que permitirá la unión de las moléculas de soluto. En este estado inicial, los grupos que se intercambiarán están asociados con sus respectivos contra-iones (usualmente aniones o cationes simples, como cloruro o sodio).

En una segunda etapa se encuentra la aplicación de la muestra y su adsorción, en la cual las moléculas del soluto llevan a cabo el apropiado desplazamiento de carga de los contra-iones y se unen reversiblemente al gel. Las sustancias que no se unen son eluidas de la cama del intercambiador usando el buffer inicial.

En la tercera etapa, se lleva a cabo la desorción de la muestra cambiando las condiciones de elusión, al desfavorecer la formación del enlace iónico de las moléculas de la muestra y la cama del intercambiador. Esto normalmente se logra aumentando la fuerza iónica del buffer de elusión o cambiando su pH.

En las cuarta y quinta etapas corresponden a la remoción de sustancia no eluidas bajo las condiciones experimentales previas y regresar al equilibrio de las condiciones iniciales para la siguiente purificación.

La separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas, densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la fuerza iónica y el pH. Las diferencias en propiedades de carga de compuestos biológicos son a menudo considerables, y tomando en cuenta que la cromatografía de intercambio iónico es capaz de separar especies con propiedades poco diferentes.

Se pueden llevar a cabo separaciones por intercambio iónico en una columna, mediante un procedimiento en lote o por adsorción en cama extendida.

La matriz. Un intercambiador iónico consiste de una matriz sólida insoluble a la cual se unen de forma covalente grupos cargados. Los grupos cargados se asocian a contra-iones móviles. Estos contra-iones pueden intercambiarse reversiblemente a otros iones de la misma carga sin alterar la matriz.

La matriz puede tener carga positiva o negativa y los contra-iones también. Los intercambiadores cargados positivamente tienen contra-iones cargados negativamente (aniones) disponibles para ser intercambiados por lo que son llamados intercambiadores aniónicos. Intercambiadores cargados negativamente tienen contra-iones cargados positivamente (cationes) y se les conoce como intercambiadores catiónicos.

La matriz puede estar hecha de compuestos inorgánicos, resinas sintéticas o polisacáridos. Las características de la matriz determinan sus propiedades cromatográficas tales como su eficiencia, capacidad y recuperación, así como su estabilidad química, fuerza mecánica y fluidez. La naturaleza de la matriz afectará su comportamiento hacia sustancias biológicas y el mantenimiento de la actividad biológica

Grupos cargados. La presencia de grupos cargados es una propiedad fundamental de un intercambiador iónico, y el tipo de grupo determina el tipo y fuerza del intercambiador iónico; su número total y disponibilidad determina la capacidad. Hay una variedad de grupos que pueden escogerse para usarse en intercambiadores iónicos; algunos de estos se muestran a continuación.

Intercambiadores aniónicos	Grupo funcional
Dietilaminoetil (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$
Aminoetil cuaternario (AEC)	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Amonio cuaternario (C)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+H(CH_3)_3$
Intercambiadores catiónicos	Grupo funcional
Carboximetil (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
Sulfopropil (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
Metil sulfonato (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$

Se usan los grupos sulfónico y amino cuaternario para formar intercambiadores iónicos fuertes, los otros grupos formar intercambiadores iónicos débiles. Los términos fuertes y débiles se refieren a la extensión de variación de ionización con pH y no a la fuerza del enlace. Los intercambiadores iónicos fuertes están completamente ionizados en un amplio rango de pH mientras que con los intercambiadores iónicos débiles, el grado de disociación y la capacidad de intercambio varía más marcadamente con el pH.

CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Fundamentos y principios básicos

El proceso cromatográfico puede ser considerado como: un conjunto de fuerzas que compiten de manera selectiva por un compuesto (analito o soluto) para, por una parte, fijarlo al relleno de la columna o fase estacionaria, o llevarlo disuelto en los líquidos que fluyen a través de la columna o fase móvil. Los distintos tipos de fuerzas entre fase estacionaria y solutos definen los distintos tipos de cromatografía.

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Proceso cromatográfico	Fuerzas implicadas	Nombre alternativo	Denominación	
			Español	Genérica
Adsorción - reparto	De adsorción	Líquido-sólido	CLS	HPLSC
Partición	De partición	Líquido-líquido	CLL	HP LLC
Iónicas	De intercambio iónico.	—	CIE	HPIEC
	De par iónico		CPI	HPIPC
	De supresión iónica			
Penetrabilidad en poros	De exclusión	Cromatografía de geles (filtración o permeación)	CEM	HPSEC

En la cromatografía de **reparto** se utilizan fases estacionarias polares (sílice, alúmina, hidroxiapatito) y fases móviles apolares (ciclohexano, isooctano, tetracloruro de carbono, etc.), aplicándose a la separación de solutos apolares. El origen de la retención es, por tanto, la interacción de los grupos polares de los analitos con los grupos polares de la superficie del relleno.

En la de **partición** la fase estacionaria es líquida, es necesario ligarla o embeberla sobre partículas inertes (generalmente de sílice) para que permanezca fija en la columna. Hoy en día los grupos funcionales se fijan mediante enlace químico a las partículas de relleno, lo que permite a la fase estacionaria resistir las altas presiones aplicadas en HPLC.

Hay dos posibilidades en la cromatografía de partición: cromatografía en fase normal (cuando la fase estacionaria es polar, por ejemplo si contiene grupos ciano, diol, amino o dimetilamino) y cromatografía en fase inversa (cuando la fase estacionaria es apolar, por ejemplo con grupos C8 ó C18). La cromatografía de partición en fase inversa es la más utilizada de todas las técnicas HPLC, pues las fases móviles polares permiten separar una amplia variedad de compuestos de interés bioquímico, farmacológico o químico. En fase inversa la retención esta basada en una atracción primaria entre la fase estacionaria y la región no polar del analito. El orden de elución es de hidrofílico a hidrofóbico, de polar a no polar. Para aumentar la retención de un compuesto, es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil. La fase estacionaria más común es C18. Las fases móviles más comunes son; acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, etc. con agua como componente de la fase móvil.

En cromatografía de **intercambio iónico** la fase móvil compite con la estacionaria por los solutos mediante fuerzas iónicas. La limitación es que el soluto sea iónico (un anión o un catión). Se trata de una técnica muy útil para separar iones inorgánicos, proteínas, etc. Mediante **supresión iónica** se separan compuestos iónicos, suprimiendo (o reduciendo) su estado iónico en solución a través del control del pH, de manera que quedan más retenidos en rellenos de fase reversa. Se trata, por tanto, de adaptar la cromatografía de partición en fase reversa a la separación de mezclas que contienen uno o varios compuestos ionizables. Funciona bien para ácidos débiles y bases débiles. Otro tipo es la cromatografía de **pares iónicos** que se forma al pasar una fase móvil polar que contiene un contraión de carga contraria a la de los solutos, se suele añadir a la fase móvil un catión o un anión hidrofóbico, que interacciona con el analito formando el par iónico.

La cromatografía de **exclusión molecular** separa los solutos en función de su tamaño molecular. El principal inconveniente es que se trata de un método de baja resolución. No obstante, es muy útil para la separación de proteínas y otras moléculas de alto peso molecular. Es importante que no haya interacción entre la fase estacionaria y la muestra.

Las reglas básicas en HPLC son cuatro:

1. Fase móvil y estacionaria han de ser de polaridad opuesta.
2. Todos los solutos han de ser solubles en la fase móvil (es decir, polaridad similar).
3. Todo soluto que entra en la columna ha de salir de ella (propagación).
4. Y, a ser posible, con los distintos solutos separados (migración diferencial).

La **elución** de los componentes de una muestra comprende el lavado de una parte de la muestra disuelta en la fase móvil a través de una columna de fase estacionaria por agregado de disolvente fresco. La porción de muestra se introduce por la parte superior de la columna (tiempo t_0), los componentes se distribuyen por sí mismos entre las dos fases según la naturaleza química de éstos con respecto a las fases móvil y estacionaria. Adiciones posteriores del disolvente llevan a las moléculas de soluto hacia abajo en la columna, hasta que salen de ella en un tiempo determinado (t_x).

La **velocidad** a la cual un soluto migra depende de la fracción de tiempo que ha necesitado para salir de la columna, tiempo que es detectado por un detector. Esta velocidad será pequeña para solutos fuertemente retenidos por la fase estacionaria, y será grande para solutos que tengan mayor afinidad por la fase móvil.

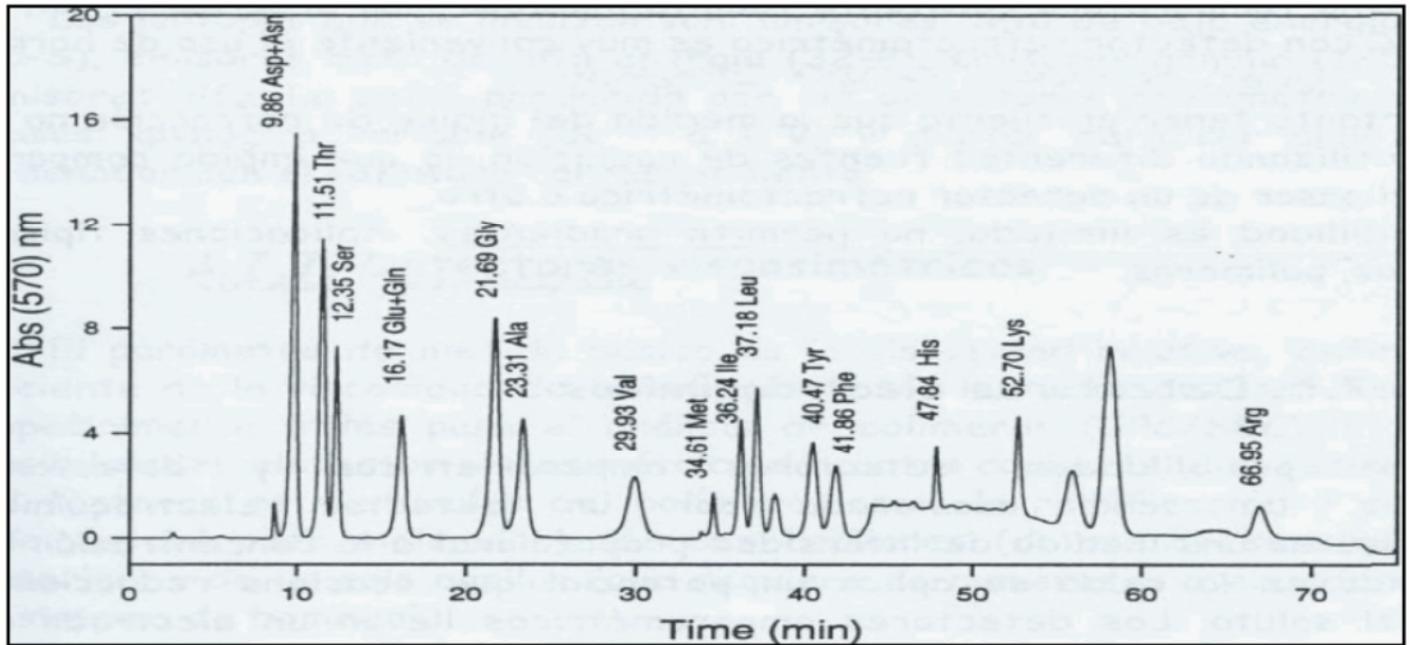
El detector se coloca en el extremo final de la columna, y la señal se transforma en una gráfica en función del tiempo denominada **cromatograma**. El cromatograma discurre horizontalmente paralelo a la escala de tiempos (**línea de base**), zona que informa de las condiciones generales del sistema en ausencia de solutos. Luego se observa un brusco incremento sobre la línea base, seguido de un descenso más o menos simétrico que enlaza con la continuación de la misma (**pico cromatográfico**).

Idealmente el pico tiene apenas anchura: es estrecho, casi una línea vertical. Pero muchas veces presenta una anchura apreciable, tomando el aspecto habitual de una gaussiana. También se presenta una primera banda peculiar ascendente-descendente (**frente del disolvente o frente de inyección**), no siempre observable, y que suele hacerse coincidir con el tiempo muerto del sistema o tiempo necesario para que un fluido sin retención atraviese físicamente la columna, tubos, etc. del sistema.

Las moléculas de un mismo soluto, pese a hallarse sometido a las mismas fuerzas, no eluyen todas al mismo tiempo, sino obedeciendo a un modelo gaussiano.

Los picos sobre el eje de los tiempos se emplean para identificar tanto cualitativa (posición en el eje) como cuantitativamente (área bajo los picos) los componentes de la muestra.

La **cromatografía cuantitativa** se basa en una comparación de la altura o del área del pico de un analito con el de uno o más estándares. Ambos parámetros varían linealmente con la concentración. La **cromatografía cualitativa** se basa en la comparación de la posición de los picos (tiempos determinados de retención) con cromatogramas estándares.



La **efectividad** de la columna cromatográfica para la separación de solutos depende de las velocidades relativas a las cuales las especies son eluidas. La eficiencia máxima para la cromatografía líquida ocurre a muy bajas velocidades de flujo. Se puede incrementar la eficiencia de la columna si se disminuye el tamaño de la partícula del empaque de la columna, se reduce la viscosidad de la fase móvil o se incrementa la temperatura. En una primera etapa, la cromatografía de líquidos se llevaba a cabo en columnas de vidrio con diámetros de 1-5 cm y longitudes de 50-500 cm, cuyas partículas de la fase estacionaria no superaban las 150-200 μm de diámetro a fin de asegurar unos caudales razonables. Incluso así, los tiempos de separación eran largos, podían llevar varias horas.

La **cromatografía líquida de alta eficacia** o **HPLC** (High Performance Liquid Chromatography) es el método más sofisticado y moderno de la cromatografía líquida, que utiliza partículas de fase estacionaria para el interior de la columna con diámetros muy pequeños para aumentar la eficiencia, en torno a 3-10 μm . Así, se ha conseguido reducir el tamaño de la columna a 10-30 cm de largo y 4-10 mm de diámetro en la HPLC, y el tiempo necesario para la separación.

Aplicaciones

La HPLC permite muy buenas separaciones e identificaciones de sustancias o grupos de sustancias en un tiempo corto, tanto cualitativa como cuantitativamente. Como condición, es imprescindible que la muestra sea soluble en un disolvente, al ser la fase móvil un líquido.

Es especialmente adecuada para compuestos poco volátiles, termolábiles e iónicos. Algunas aplicaciones incluyen sustancias tan diversas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenos, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una gran variedad de sustancias inorgánicas.

Ejemplos de utilización de HPLC:

- Detección y cuantificación de cafeína y teobromina que son alcaloides muy importantes en el café, té y el cacao, especialmente por su acción estimulante. El contenido de estos compuestos se utiliza para evaluar su calidad. (Detección UV)
- Determinación de azúcares. La analítica de carbohidratos no resulta fácil pues presenta acumulación de grupos funcionales iguales, los grupos hidroxilo, y además posee gran número de esteroisómeros. Tras una dilución los azúcares se separan cromatográficamente por medio de HPLC en una fase amínica. (Detección IR)
- Determinación cuantitativa de polisacáridos como el almidón, las dextrinas, los dextranos, el glucógeno, la inulina, la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas, así como sustancias mucilaginosas de algas marinas y las gomas vegetales.
- Detección de ciclomato en jugos de fruta.
- Separación de ésteres de ácidos grasos por fase inversa y con argentización de columnas (Silicato de Al con Ag).
- Separación de Triglicéridos por la longitud de la cadena y el grado de insaturación por fase inversa y detector de dispersión luminosa, para el estudio de aceites y grasas adulteradas.
- Determinación del contenido de Vit A y sus precursores (α y β caroteno) en margarina y aceites de hígado por fase inversa.
- Determinación del contenido en Vit D en leche en polvo y cereales por fase normal.