

CROMATOGRAFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES

Sgariglia^{1,2}, Melina Araceli, José Roldolfo Soberón^{1,2}, Diego Alejandro Sampietro^{1,2}, y Marta Amelia Vattuone^{1,2}

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

²Cátedra de Fitoquímica, Instituto de Estudios Vegetales "Dr. A. R. Sampietro", Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. España 2903, 4000-Tucumán, Argentina

Email: melinasgariglia@gmail.com

Resumen

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general. Las cromatografías son procesos que abarcan varias técnicas separativas, basadas en propiedades físicas de ciertos materiales, que en interacción con sustancias o mezclas de sustancias, la/s cual/es guarda/n relación con las propiedades químicas de éstas, permite descomponer una mezcla y analizar sus constituyentes. Con el desarrollo de la tecnología, las técnicas cromatográficas se diversificaron y mejoraron sensiblemente su capacidad para resolver mezclas de distinta naturaleza. En este artículo se presentan conceptos introductorios, un breve panorama de las diversas técnicas cromatográficas disponibles y sus aplicaciones.

Palabras claves: cromatografía, resolución de mezclas, fase estacionaria, fase móvil.

Abstract

Chromatography is a method widely used in all branches of science and allows the separation, identification and determination of chemical components in complex mixtures. Chromatographies are processes that include several separation techniques, which are based on physical properties of certain materials which in interaction with substances or mixtures of substances, the / s that / is saved / n relation with the chemical properties of these, allowed break down and analyze a mixture constituents. With the development of technology, the chromatographic techniques were diversified and improved their ability to resolve mixtures of different nature. This article presents introductory concepts, and a brief overview of the various chromatographic techniques available and their applications.

Keywords: chromatography, resolution of mixtures, stationary phase, mobile phase.

INTRODUCCION

El término *cromatografía* fue introducido en 1906 por el botánico ruso Mikhailil Tswett, para hacer referencia a la separación de los pigmentos contenidos en

extractos vegetales, conforme éstos se filtraban a través de una columna rellena con un sólido poroso (Chicharro, 2005). Keulemans (1959) definió cromatografía como "Método físico de separación en el que

los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil)".

Por tanto, la cromatografía comprende procesos en los que los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria. La adecuada elección de estas fases puede permitir que tales diferencias se traduzcan en una separación efectiva de los solutos, a la vez que éstos pueden identificarse atendiendo a su particular velocidad de avance.

En cuanto a la naturaleza del proceso cromatográfico, los componentes disueltos

de una mezcla se mueven continuamente entre las dos fases, se asocian momentáneamente con la fase estacionaria, no migran, mientras todos los componentes momentáneamente presentes en la fase móvil migran a la misma velocidad que ésta. Entonces, la separación no ocurre en ninguna de las dos fases, sino que es el resultado de continuos movimientos de las moléculas entre ellas. Los componentes se separan cuando uno de ellos pasa a una velocidad diferente en la fase estacionaria respecto del resto. El tiempo empleado por cualquiera de los componentes en la fase estacionaria depende de su afinidad por ésta en las condiciones ensayadas (García-Segura et al., 1996).

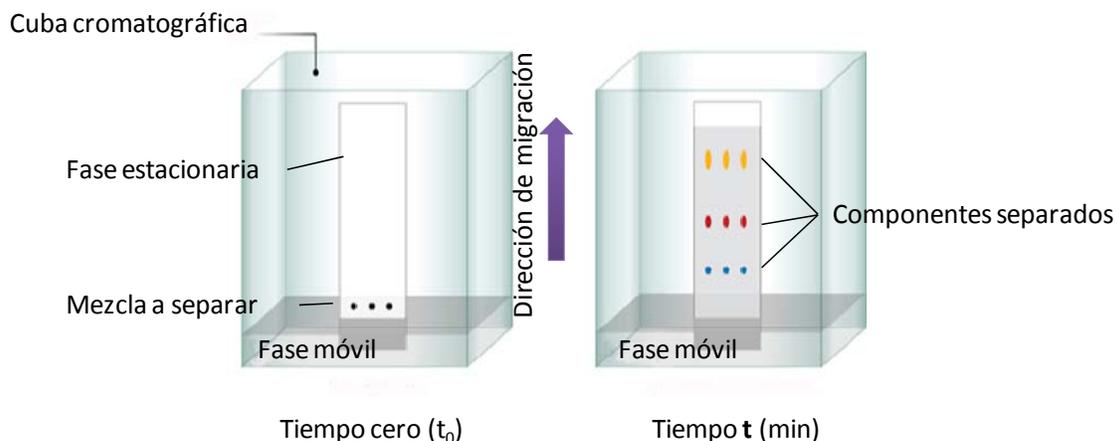


Figura 1. Representación gráfica de separación de componentes de una mezcla por cromatografía en capa fina ascendente.

CLASIFICACIÓN

El estado físico de la fase móvil determina la primera gran división de los métodos cromatográficos. En esencia, algún tipo de fluido puede ser usado como fase móvil. Históricamente, los líquidos fueron los primeros en ser usados dando lugar a un amplio rango de métodos clasificados como cromatografía líquida (CL). Los gases también pueden ser usados como fase móvil, los métodos basados en este principio se clasifican como cromatografía gaseosa (CG). En este tipo de cromatografía no sólo la fase móvil debe ser un gas sino que también debe serlo la mezcla a separar, por ello la CG requiere un paso previo de volatilización, que no siempre es factible, máxime si se

considera la termolabilidad de ciertas sustancias, como por ejemplo la mayoría de las proteínas de muestras biológicas.

Esta es una división más metodológica que conceptual, cuya razón de ser se encuentra en los diferentes modos de operación e instrumentación necesarios para el manejo de gases o de líquidos.

El estado de la fase estacionaria puede ser sólido o líquido. Cuando la fase estacionaria es sólida no se plantea ningún problema conceptual, pues se entiende que una fase móvil puede moverse a través de una fase sólida más o menos porosa. Sin embargo, cuando la fase estacionaria es líquida, la fase móvil aun siendo inmisible con ella, podría arrastrarla. Esto se resuelve

inmovilizando el líquido que constituye la fase estacionaria por medio de algún sólido que recibe el nombre de *soporte*, el cual

ejerce como matriz de retención frente al empuje mecánico de la fase móvil (tabla 1).

Nombre de la Técnica	Fase estacionaria	Fase móvil	Desplazamiento fase móvil	Mecanismo de separación
C. sólido-líquido	Sólido absorbente	Líquido	Gravedad	Adsorción
C. líquido-sólido	Líquido Absorbido en soporte sólido	Líquido	Gravedad	Reparto, Adsorción
C. sobre geles	Gel poroso	Líquido	Gravedad	Tamaño
C. intercambio iónico	Resinas de intercambio iónico	Líquido	Gravedad	Afinidad química
C. de gases	Sólido Absorbente Líquido Absorbido en soporte sólido	Gas	Presión	Adsorción
C. líquida de alta resolución	Sólidos Diversos y líquidos Absorbidos en soporte sólido	Líquido	Presión	Adsorción, reparto, afinidad química, tamaño
C. adsorción en papel	Sólido (papel)	Líquido polar	Capilaridad (gravedad)	Adsorción
C. de reparto en papel	Líquido Polar absorbido en papel sólido	Líquido no polar	Capilaridad (gravedad)	Reparto (adsorción, af. Química)
C. cambio iónica en papel	Sólido	Líquido	Capilaridad (gravedad)	

Tabla 1. Clasificación de cromatografías. (C. = Cromatografía).

Otra clasificación de métodos cromatográficos se basa en la **forma física de la fase estacionaria** usada. En la mayoría de las separaciones cromatográficas la fase estacionaria está confinada dentro de un tubo a través del cual se alimenta la fase móvil. Este tubo se llama columna cromatográfica, y tales métodos se clasifican como *cromatografías en columna* (Figura 2). Alternativamente, la fase estacionaria puede distribuirse como una capa fina y homogénea sobre un soporte plano de material inerte, los métodos que utilizan esta forma se denominan cromatografías en capa fina (CCF). La CCF es el representante de un grupo más amplio en el cual la fase estacionaria tiene forma plana, llamado

cromatografías planares. Otro representante de este grupo es la cromatografía en papel, donde el soporte material es el papel, el cual constituye la fase estacionaria (Figura 3).

Los métodos cromatográficos también pueden clasificarse según el **tipo de interacción entre el soluto y la fase estacionaria**. Entre varias posibilidades la adsorción es la más común. Este término se aplica a una clase en la cual un material (en este caso el soluto) es atraído por otro (la fase estacionaria). Si el soluto está confinado a la superficie de la fase estacionaria, el fenómeno se llama adsorción, y el método cromatografía de adsorción. Son muchos los sólidos (adsorbentes) que se han utilizado como fase estacionaria en cromatografía de

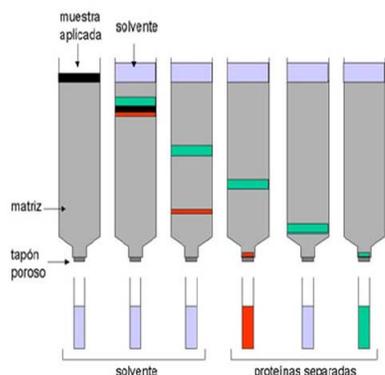


Figura 2. Esquema que muestra la separación de una mezcla de dos componentes por cromatografía de elución en columna.

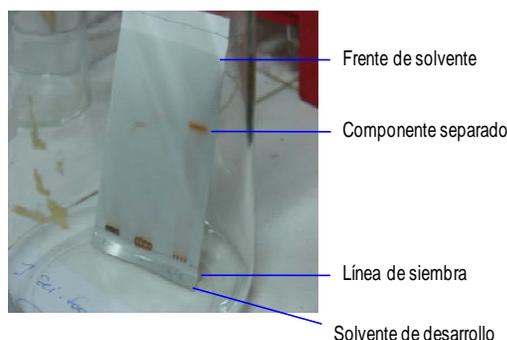


Figura 3. Cromatografía en capa fina (CCF) ascendente

adsorción. Los más importantes son alúmina, silicato de aluminio, silicagel, óxido, silicato y carbonato de magnesio, óxido, carbonato y fosfato de calcio, como inorgánicos; y carbón, almidón y azúcares como orgánicos. Normalmente deben ser sometidos a un proceso térmico de activación superficial antes de su utilización. Como eluyentes (solventes que se emplean para preparar la fase móvil) se utilizan agua, alcoholes, cetonas, ésteres, cloroformo, tetracloruro de carbono, etc. Su capacidad de elución depende de su polaridad, del adsorbente y de los componentes a eluir.

Cuando el soluto entra en la mayor parte de la fase estacionaria ocurre adsorción; sin embargo, los métodos cromatográficos basados en este principio son generalmente llamados *cromatografía de partición o reparto*. En cromatografía de reparto la fase estacionaria es un líquido, poco miscible con la fase móvil. Los solutos

se distribuyen entre las dos fases dependiendo de su solubilidad en cada una de ellas, es decir, según su coeficiente de reparto. Aunque el mecanismo fundamental de la separación es la extracción o reparto, es prácticamente imposible evitar adsorciones por parte del sólido soporte, por lo que muchas de las separaciones son empíricas. Los sólidos soportes más utilizados son el silicagel, el polvo de celulosa y la tierra de diatomeas; menos aplicación tienen el almidón y el relleno de bolas de vidrio.

Polímeros y otras moléculas de alto peso molecular pueden ser separados **según su tamaño** usando materiales porosos que cubran rangos de tamaño específicos, tales métodos se denominan *cromatografía de exclusión por tamaño*. Emplea geles hinchables por agua o por cualquier otro líquido previamente escogido. El fenómeno puede considerarse como una filtración a través de un tamiz molecular.

Por otro lado, interacciones específicas entre la fase estacionaria y un tipo particular de soluto forman las bases de la *cromatografía de afinidad*. Este último método difiere de todos los demás en que se suele utilizar para aislar un único soluto de una mezcla compleja, y no para separar los componentes de una mezcla entre sí.

DETECCION

Los componentes separados por cromatografía deben poder ser visualizados de alguna manera, hecho que no constituye un problema para sustancias coloreadas como los pigmentos, pero cuando los componentes a separar no pueden ser observados a simple vista es necesario recurrir a diversas herramientas de detección, las cuales se denominan *reveladores* (Pasto y Johnson, 2008).

Los reveladores pueden ser físicos o químicos. Los *reveladores físicos* comprenden por ejemplo lámparas que emiten luz UV, la cual permite visualizar componentes que por sus características químicas son capaces de emitir fluorescencia (ej: compuestos fenólicos), la exposición al calor también puede generar ciertos cambios en los componentes separados (ej. acelerar la oxidación de éstos) que permitan visualizarlos. Los *reveladores químicos* son sustancias químicas con reactividad, la cual

generalmente es específica para grupos funcionales determinados en una molécula, y

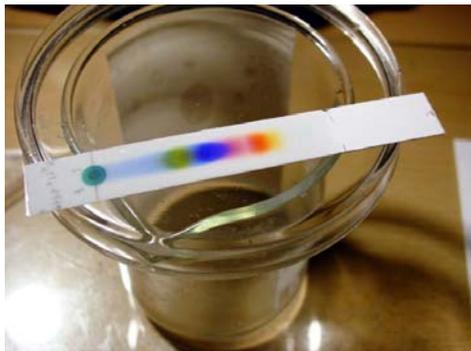


Figura 4. Cromatografía en capa fina (CCF), detección de componentes revelados con un reactivo químico.

a través de éstos es posible seleccionar qué tipo de moléculas (componentes) queremos visualizar. En este sentido vale la pena mencionar que cuando se conocen exactamente los componentes que se pretenden separar mediante cromatografía, se aprovechan las propiedades de éstos para seleccionar aquellos reveladores que permitan detectarlos con mayor especificidad e inequívocamente. Ejemplos: para detectar aminoácidos o péptidos pequeños se emplea ninhidrina, Lieberman-Bouchard para detectar sustancias esteroides (tipo colesterol), anticuerpos unidos a cromóforos para visualizar determinados antígenos presentes en muestras biológicas, etc.

Dependiendo de la técnica cromatográfica considerada los detectores pueden constituir todo un sistema instrumental, como por ejemplo los detectores másicos (espectrómetro de masas) que se utilizan con mucha frecuencia en cromatografía gaseosa (CG-MS), y los detectores UV muy empleados en cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

APLICACIONES

Las distintas técnicas cromatográficas tienen aplicación en muestras que contengan compuestos orgánicos (Nollet, 2006).

Algunos ejemplos de aplicación son:

- Determinación del porcentaje de formación de una molécula de síntesis, en una planta de síntesis orgánica.
- Determinación de porcentaje de solvente en un producto agroquímico terminado.

- Determinación de concentración de producto activo en un producto agroquímico terminado.
- Control de calidad de pureza de solventes, como alcohol etílico anhidro, tolueno, xileno, benceno, que entran como materias primas a una planta.
- Determinación del contenido de principio activo de un medicamento.
- Control de calidad de la pureza de materias primas entrantes a bodega de una fábrica de productos medicinales, tales como: alcohol etílico al 95%, propilenglicol, glicerina, alcohol isopropílico, o-toluidina, paracetamol, butanol, octanol, benzaldehído, acetato de etilo, éter di etílico, alcanfor, y muchos otros.
- En fábricas de adhesivos, pegamentos, pinturas, para controlar que el producto terminado lleve las cantidades indicadas de solventes, humectantes, colorantes, gomas, resinas, poliuretanos, secantes, rellenanets, esponjantes, suspensores, emulsificantes.
- En investigaciones policiales o forenses resulta una herramienta muy útil para el análisis de muestras.
- En fábricas de alimentos, para control de calidad de producto terminado y materias primas, tales como proteínas, aromatizantes, determinación de colorantes.
- En la industria petrolera, es un método indispensable, para analizar las composiciones de casi todos los productos que van saliendo, del cracking, los tipos de gasolinas, los compuestos orgánicos destinados a síntesis.
- En el control de la producción vinícola, tiene infinidad de usos, desde usarse como una "nariz electrónica", para caracterización de vinos, de acuerdo a parámetros previamente establecidos por expertos, concentración de componentes, análisis de aminas, como etanolamina, metilamina, agmatina, triptamina. Determinación de ocratoxina-A.
- Su utilización es indispensable en análisis industriales, forenses bromatológicos, toxicológicos, clínicos y de contaminación ambiental.

- Las muestras biológicas (ej.: sangre, exudados de diferentes orígenes, muestras de suelo, etc.) deben recibir un tratamiento adecuado previo a su análisis, y luego son perfectamente abordables por algunas o varias de las técnicas cromatográficas disponibles.

TERMINOLOGIA EN CROMATOGRAFIA

Absorción: es la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar mezcla o a reaccionar químicamente con la misma.

Adsorbente: fase estacionaria en la cromatografía de adsorción y de reparto.

Adsorción: es la retención de una especie química en los sitios activos de la superficie de un sólido, quedando limitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial, esta retención superficial puede ser física o química.

Disolvente o revelador: cualquier fase móvil.

Elución: proceso de extraer un soluto de la fase estacionaria.

Eluyente: la fase móvil una vez que se extrae de la columna.

Fase estacionaria: material que permanece dentro de la columna cromatográfica durante la cromatografía y que retiene algún componente de la muestra, posee una gran área superficial y puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte.

Fase móvil: es un fluido que puede ser líquido, gas o fluido supercrítico que se

usa como portador de la mezcla y que se hace pasar a través de la columna cromatográfica y la fase estacionaria.

Origen: lugar físico donde se coloca la muestra al principio.

Revelado: proceso de separar un soluto de la muestra por medio de cromatografía.

Soporte: el material sólido inerte que en la cromatografía de reparto sirve para sostener la fase estacionaria líquida en su sitio.

Sorbente: cualquier fase estacionaria.

REFERENCIAS

Chicharro, M. 2005. *Cromatografía, principios y aplicaciones. Análisis Químico.* http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mo nchi/alim/traba3.pdf.

García-Segura, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M. Vivanco, F. Eds. 1996. *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica.* Editorial Síntesis, S.A. Madrid (España).

Keulemans, A.I.M. 1959. "Gas Chromatography", *Second Edition*, Reinhold Publisher Corp. New York (USA).

Nollet, L.M.L. 2006. *Chromatographic Analysis of the Environment. Third Edition*, Jack Cazes Chief Ed. CRC Press, Taylor & Francis, Florida (USA).

Pasto, D.J. y Johnson, C.R. 2008. *Determinación de estructuras orgánica.* Editorial Reverté, Barcelona (España).