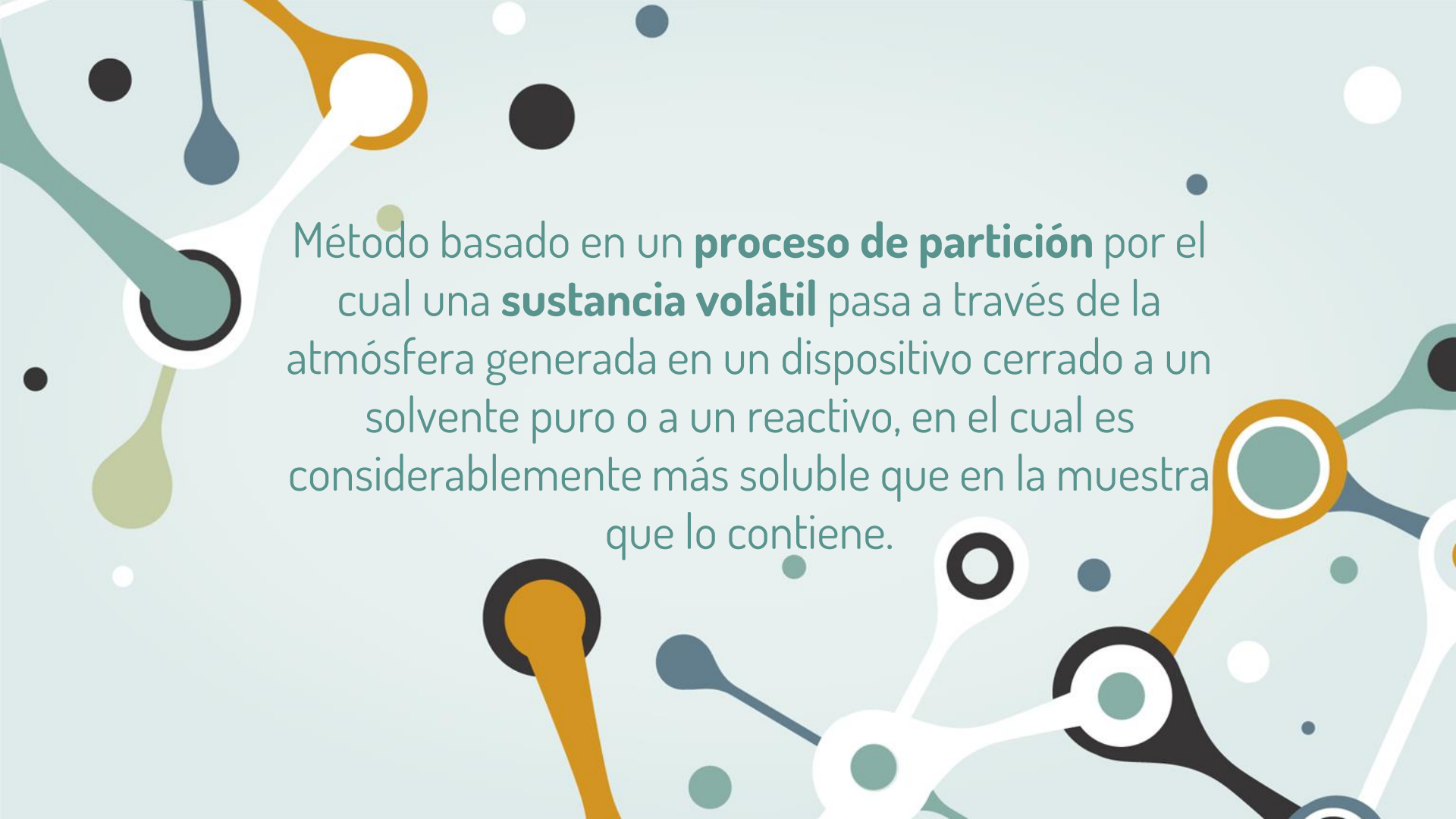


**MÉTODOS FÍSICOS
GENERALES DE SEPARACIÓN.
Y PURIFICACIÓN
PARTE II**



MICRODIFUSIÓN EN CÁMARA DE CONWAY



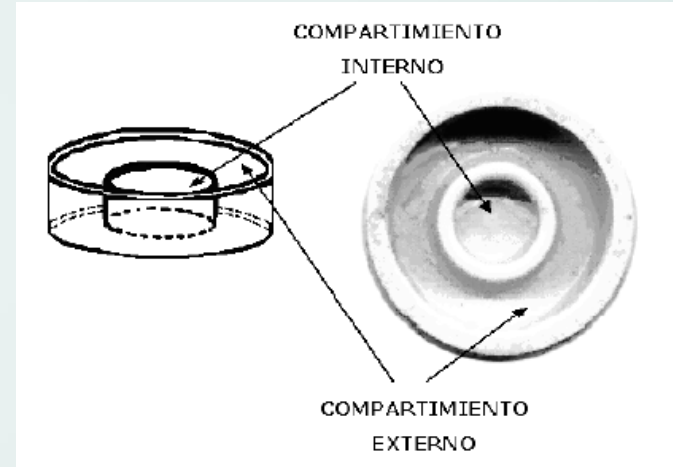
Método basado en un **proceso de partición** por el cual una **sustancia volátil** pasa a través de la atmósfera generada en un dispositivo cerrado a un solvente puro o a un reactivo, en el cual es considerablemente más soluble que en la muestra que lo contiene.

El dispositivo utilizado es la **cámara de Conway**.

La misma consta de **dos compartimentos**; uno interno, más pequeño y otro externo, más grande.

En el **compartimento interno** se coloca el reactivo o el solvente puro sobre el cual se disolverá el tóxico volátil que se investiga.

En el **compartimento externo** se coloca la muestra sospechosa de contener el tóxico objeto de nuestro estudio.

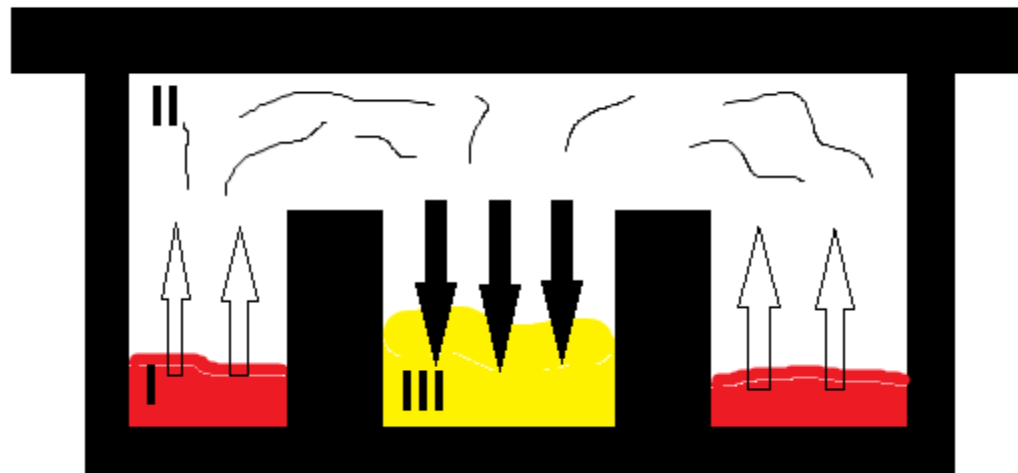


La cámara de Conway puede ser de vidrio, de porcelana o de plástico. La tapa y el borde de la cámara se unta con vaselina o vaselina siliconada para asegurar un cierre hermético y se cierra.



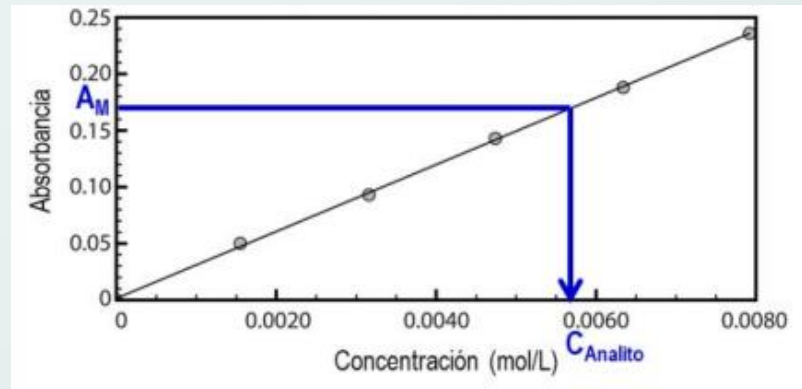
La cámara tapada se deja un tiempo a temperatura adecuada (1-5 horas a temperatura ambiente o menor tiempo a 37 °C) para que se complete la difusión del analito a investigar desde el compartimiento externo al interno.

$A_{\text{Liq I}}$ \longrightarrow $A_{\text{Vap II}}$ \longrightarrow $A_{\text{Liq III}}$





La **concentración del compuesto** se calcula, en la mayoría de los casos por espectrofotometría, mediante comparación de la absorbancia con las curvas de calibración previamente preparadas con estándares de concentración conocida.





VENTAJAS DEL MÉTODO

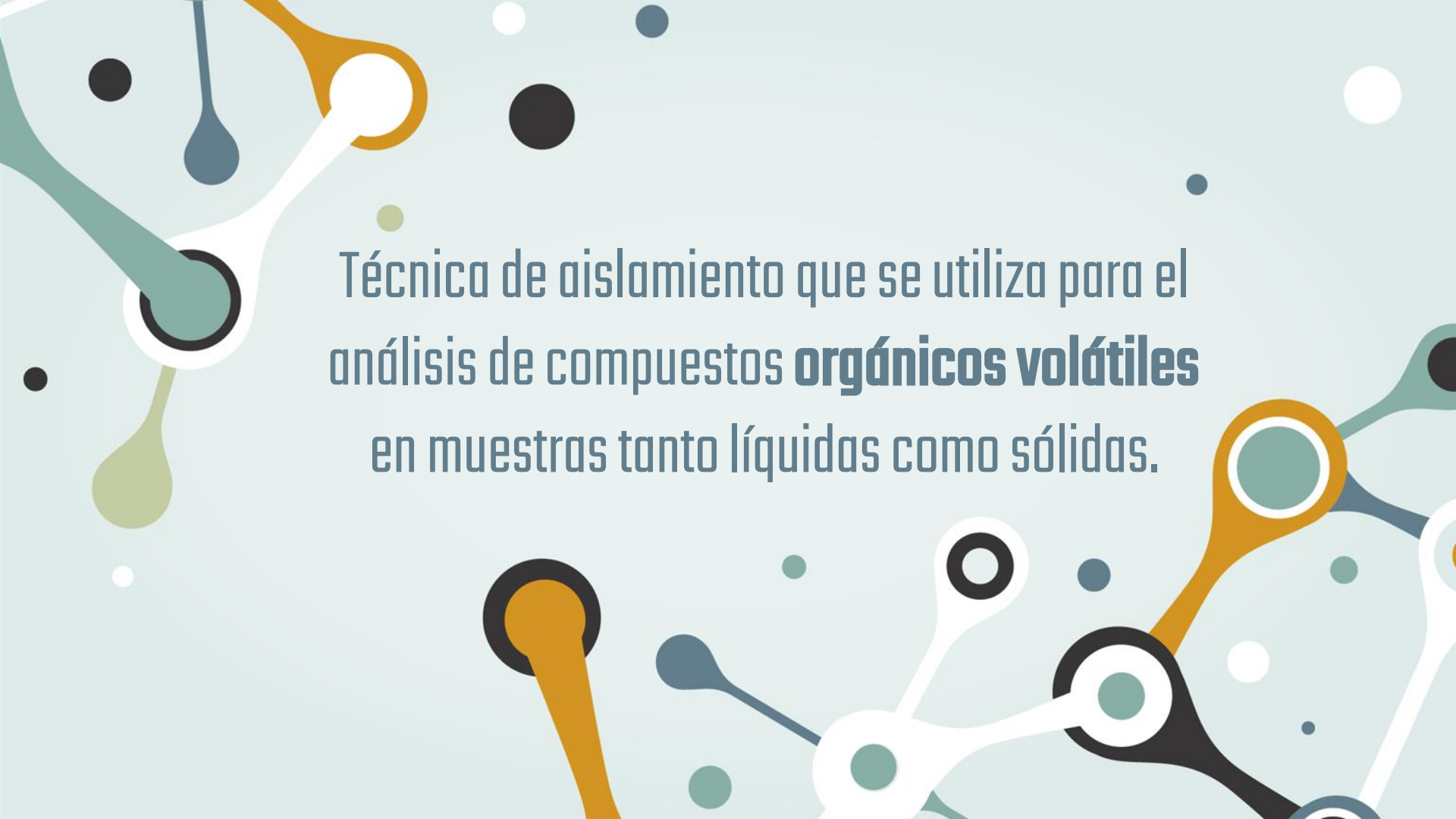


- Se necesita **escasa** cantidad de **muestra**.
- **No** necesita **procesos previos** de purificación, directamente se trabaja con la muestra problema.
- Es un método muy **sencillo**.
- Es un método **económico**.
- Es un método **rápido**.

HEAD SPACE

An abstract graphic design featuring organic, flowing shapes in shades of orange, olive green, and black. A central orange shape contains a white circle with the number '02' inside. Surrounding these shapes are several small, solid-colored circles in blue, teal, and black. The background is a light, pale blue.

02

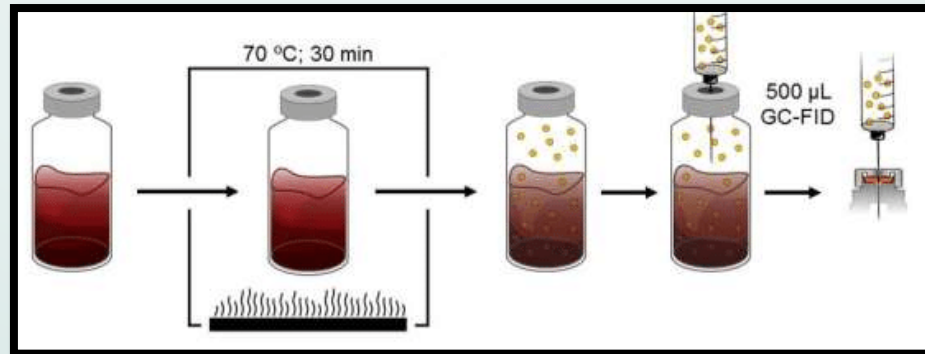


Técnica de aislamiento que se utiliza para el análisis de compuestos **orgánicos volátiles** en muestras tanto líquidas como sólidas.

La muestra se mantiene en un vial **herméticamente cerrado** mediante tapón y una membrana de silicona.

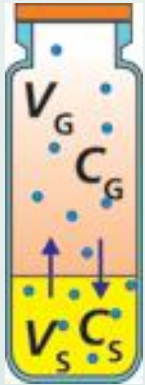
El vial con la muestra se mantienen en condiciones de **temperatura controlada** para permitir que los compuestos volátiles pasen de la fase sólida/líquida a la fase gas del vial.

La zona de gas del vial es lo que se denomina Espacio de Cabeza. Una vez que una parte de la fracción volátil pasa a la fase gas, se transfiere una parte de la misma a la columna cromatográfica.





EL EQUILIBRIO EN HEADSPACE

Es necesario permitir una combinación de tiempo de incubación y temperatura para que la concentración de los analitos volátiles se mantenga **estable y alcance un equilibrio** antes de la extracción y transferencia.



En la figura se muestra un sistema típico con sus características físico-químicas más importantes como el Volumen de la Fase Líquida V_S y de la fase gaseosa V_G , la Concentración de los analitos tanto en Fase Líquida C_S como en Fase GAS C_G , y la migración de las moléculas de soluto entre las dos fases.



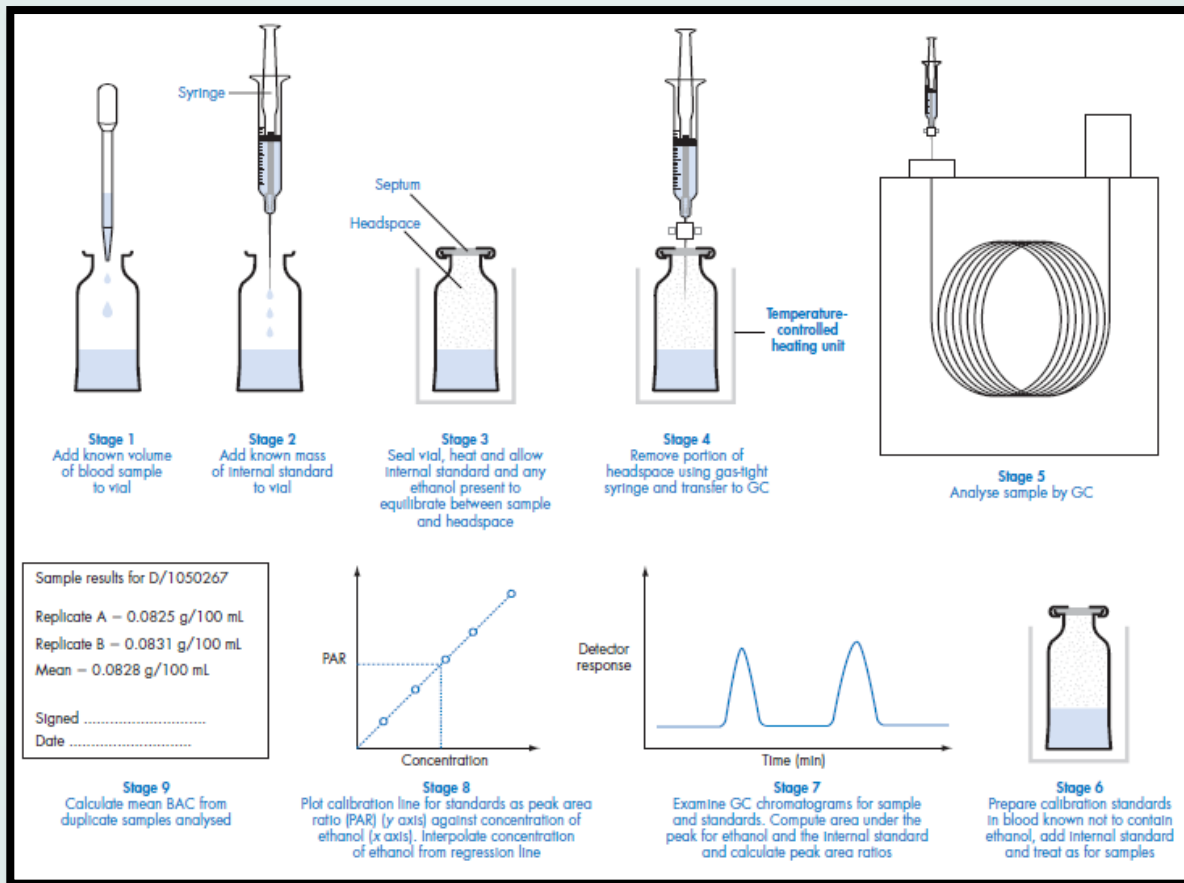
La concentración en la fase gas de cada analito es la cantidad medida en el análisis por GC, no sus concentraciones en la fase líquida. Para determinar las concentraciones originales del analito C_0 , hay que considerar el **coeficiente de reparto K** en condiciones de equilibrio. K es la relación de las concentraciones de un compuesto en la fase líquida y en la gaseosa:

$$K = C_S / C_G$$

El coeficiente de distribución depende de la temperatura y de la naturaleza química de la fase líquida en relación con los solutos.

Normalmente K disminuye al aumentar la temperatura, es decir un aumento de las concentraciones en la fase gas, y aumenta con composiciones de la fase líquida en la que los analitos son más solubles.

GC/FID para determinar la concentración de etanol en sangre

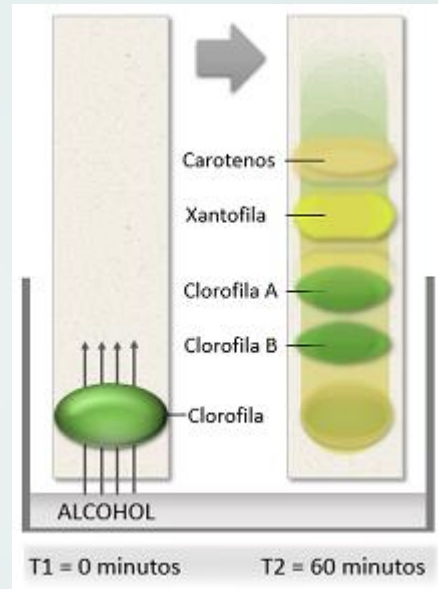


CROMATOGRAFÍA

03

The graphic features several organic, rounded shapes in teal, orange, and white. A central teal circle with a black border contains the number '03'. Other shapes include a white teardrop shape with a teal circle inside, a large orange teardrop shape with a teal circle inside, and a smaller orange teardrop shape with a white circle inside. There are also several small teal and black dots scattered around the larger shapes.

La cromatografía es un **método físico** de separación para la caracterización de mezclas complejas, cuyo objetivo es **separar** los distintos componentes de una mezcla, permitiendo **identificar y determinar** las cantidades de dichos componentes

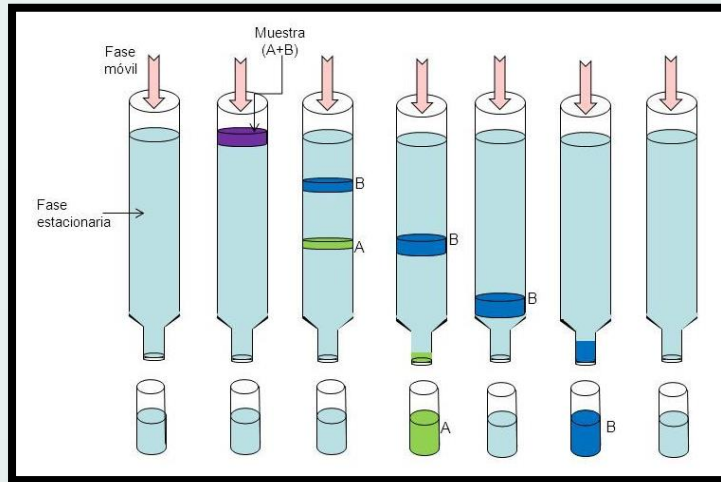


M. TSWETT (1903): Separación de mezclas de pigmentos vegetales en columnas rellenas con adsorbentes sólidos (carbonato de calcio) y solventes (éter de petróleo).



El término **cromatografía** se aplica a varios sistemas y técnicas, que tienen en común el uso de una **fase estacionaria** y el de una **fase móvil**.

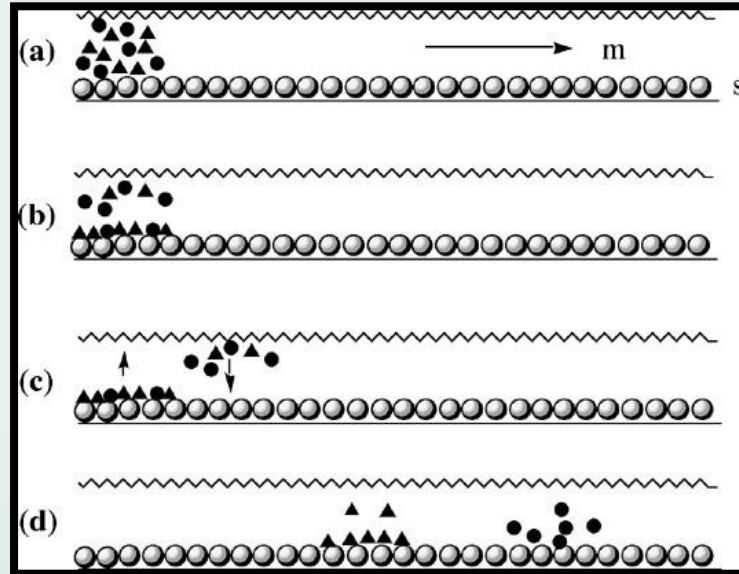
Los componentes de la mezcla son llevados a través de la fase estacionaria por la fase móvil. La separación se basa en las **diferencias de las velocidades de migración entre los componentes de la muestra**.






La **fase estacionaria** es aquella que está fija en su lugar, ya sea dentro de una columna o sobre una superficie plana.

La **fase móvil** es aquella que se mueve sobre la fase estacionaria o a través de ésta acarreando con ella la mezcla de analitos. La fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico.





Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se **distribuyen en grados distintos** entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- Aquellos componentes que son fuertemente *retenidos* por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil.
- En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez.

Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se **separan en bandas o zonas distintas** que se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa.



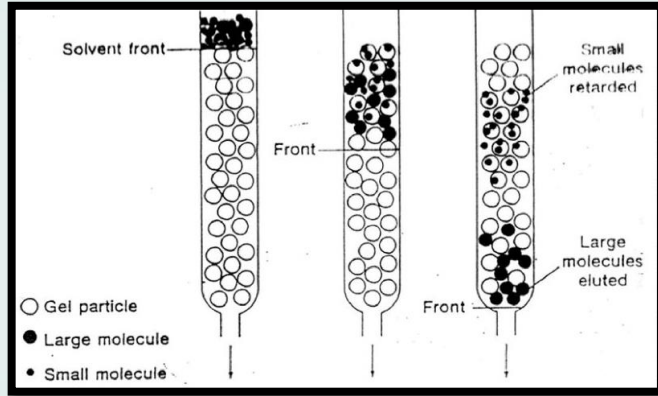
CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EN FUNCIÓN DEL ESTADO FÍSICO DE LA FASE MÓVIL

Tipo	Fase estacionaria	Fase móvil	Mecanismo de separación
Cromatografía gaseosa (CG)	Sólida	Gas	Adsorción
	Líquida		Reparto
Cromatografía líquida (CL)	Sólida	Líquida	Adsorción
	Líquida		Exclusión por tamaño
	Resina intercambiadora		Reparto
			Intercambio iónico

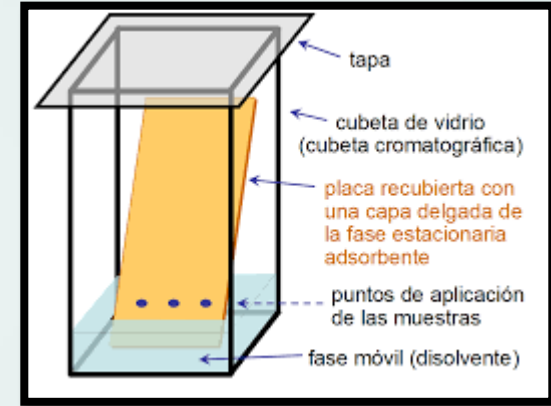


SEGÚN EL SOPORTE DE LA FASE ESTACIONARIA

LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA SE CLASIFICA:



Cromatografía en columna: la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo delgado, y la fase móvil es forzada a través del tubo mediante presión o gravedad.



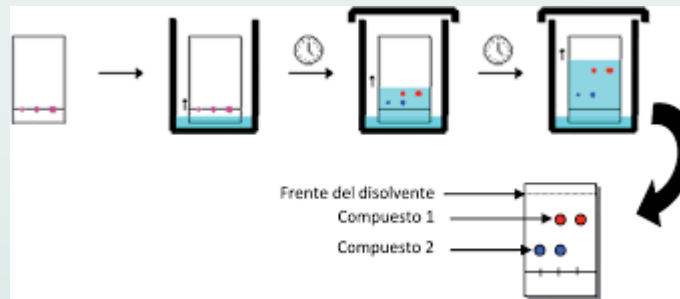
Cromatografía plana: la fase estacionaria está sostenida sobre una placa plana o en los poros de un papel, y la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad o por la influencia de la gravedad.

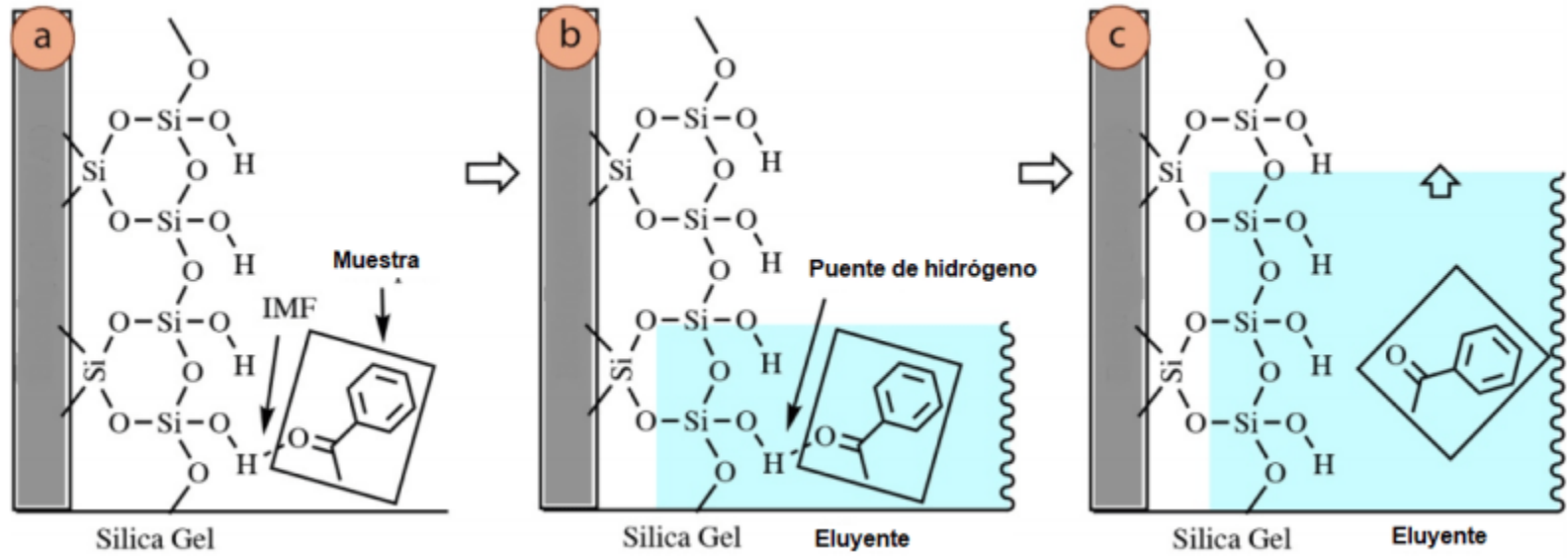
CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC/CCD)

Económica, rápida, sensible, flexible en la selección de las fases estacionaria y móvil y aplicable a una amplia variedad de sustancias.

Se realiza en una hoja de vidrio, plástico o papel de aluminio, que se recubre con una fina capa de material adsorbente, generalmente gel de sílice, óxido de aluminio (alúmina) o celulosa (fase estacionaria).

Los diferentes compuestos de la mezcla de la muestra viajan a velocidades diferentes debido a las diferencias en su atracción por la fase estacionaria y a las diferencias en la solubilidad del disolvente.

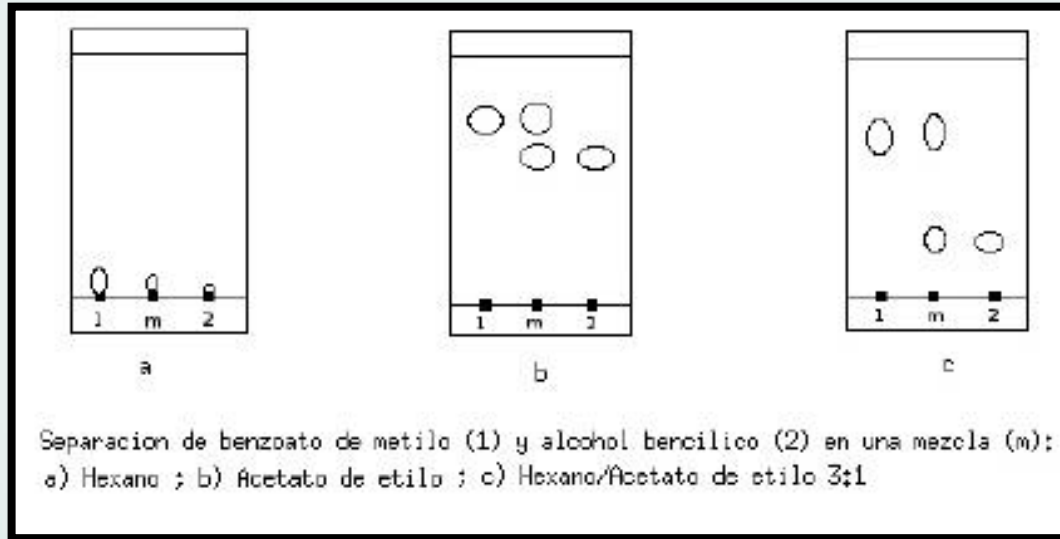




Diagramas estructurales de compuestos unidos a una placa de TLC recubierta de sílice (vista lateral)
 a) Acetofenona sembrada en la línea de base de la placa de TLC, b) Eluyente subiendo por la placa de TLC, c)
 Acetofenona en la fase móvil después de romper sus IMF con la superficie de sílice.

SELECCIÓN DE SOLVENTES

FM



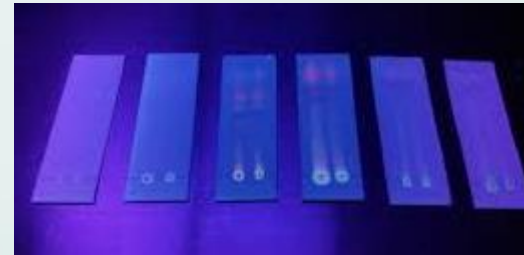
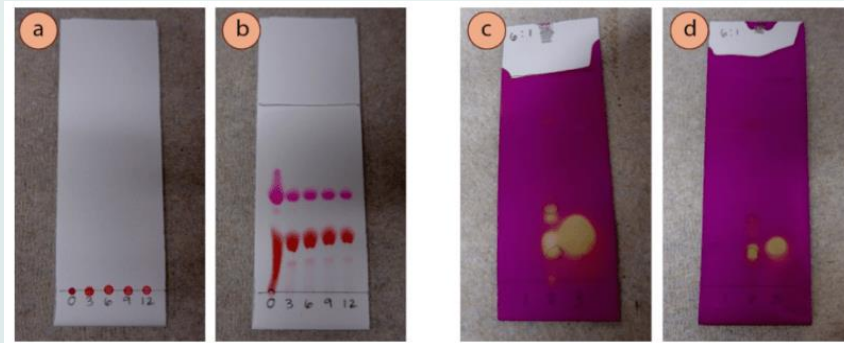
Cambiando el disolvente, o utilizando una mezcla, se puede ajustar la separación de los componentes.

REVELADO

Una vez concluida la técnica, interesa localizar la posición de las sustancias separadas. Si las sustancias no son coloreadas se recurre a diferentes métodos para poder hacerlo:

Métodos Físicos: Luz UV

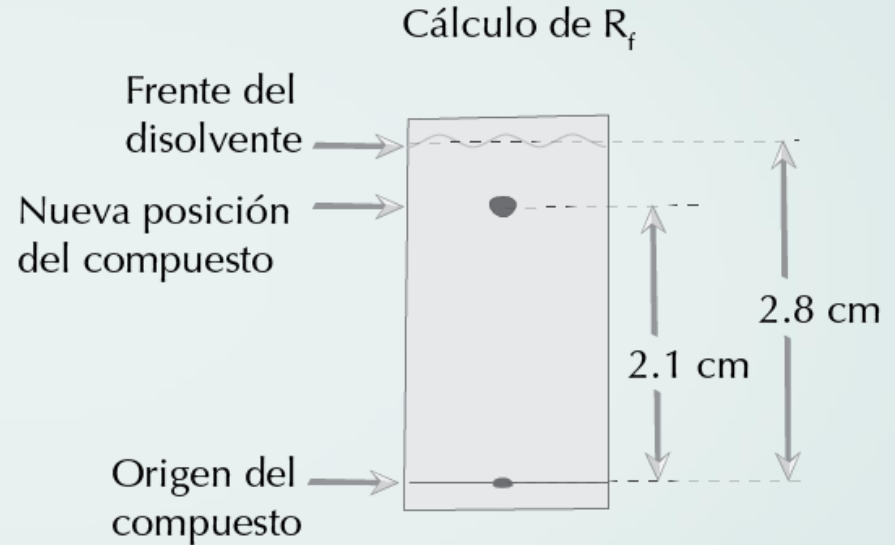
Métodos Químicos: las sustancias a revelar reaccionan con algún reactivo químico formando un compuesto coloreado. Se debe evitar el uso de reveladores que destruyan el soporte como ácido sulfúrico o calor.



EVALUACIÓN

Se efectúa el cálculo del **R_f (Factor de retención o de retardo)** para cada componente de la mezcla por separado, que es **característico de cada compuesto** en condiciones constantes: soporte, temperatura, solventes, altura de desarrollo.

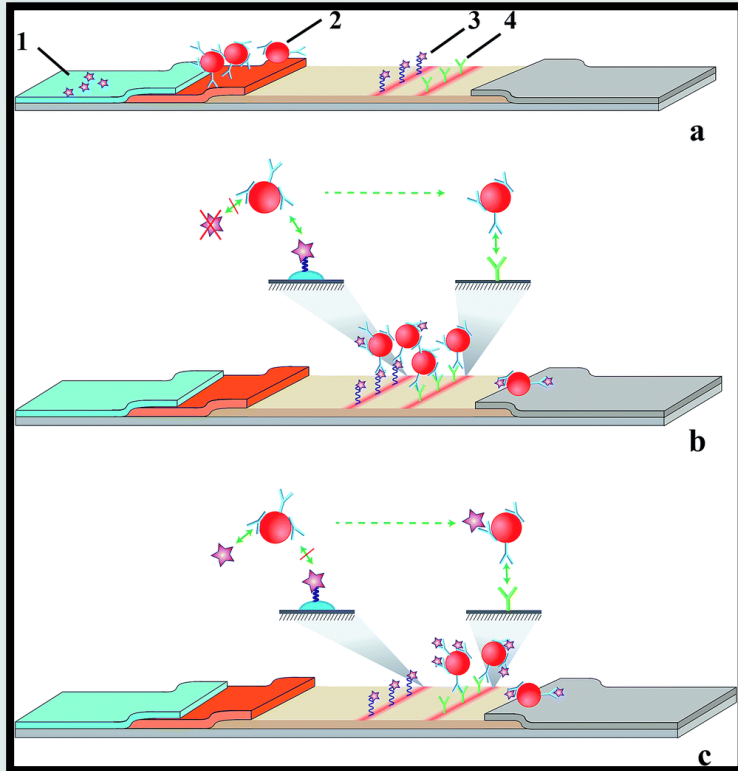
$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$



$$R_f = \frac{2.1}{2.8} = 0.75$$



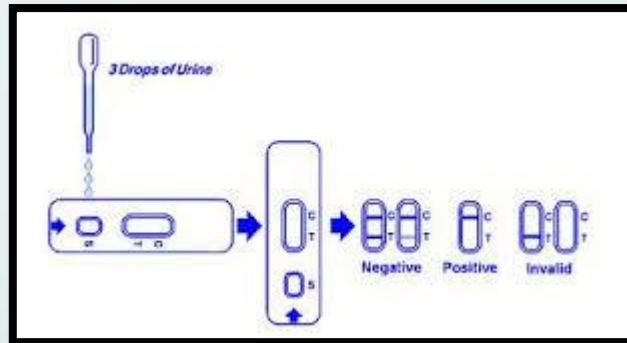
INMUNOCROMATOGRAFÍA



Tests diseñados para confirmar la presencia o ausencia de determinado analito en una muestra. Se presenta en un formato de tira: la muestra problema fluye a lo largo de un sustrato sólido por medio de una acción capilar.

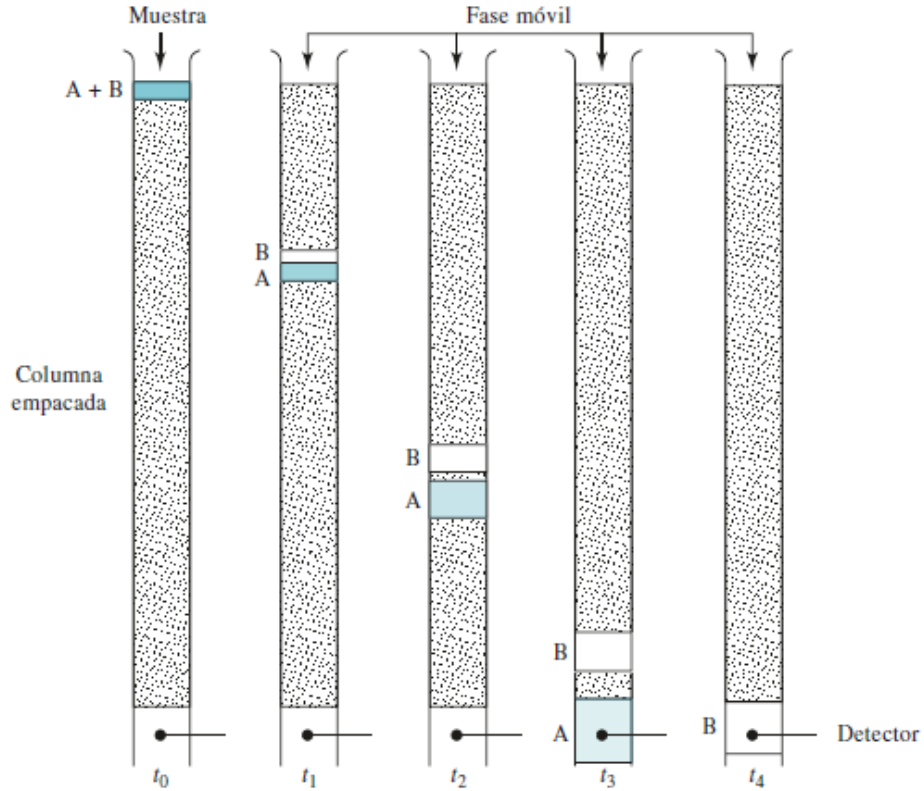
Estos ensayos son de detección visual y de fácil lectura.

Los mas populares son los test de embarazo y los de detección de estupefacientes.

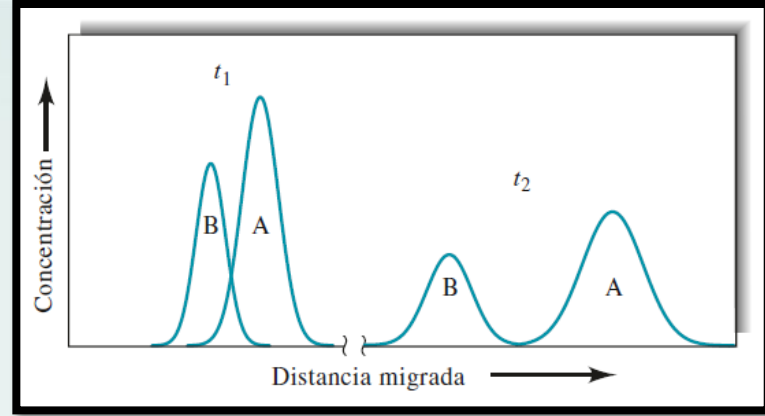
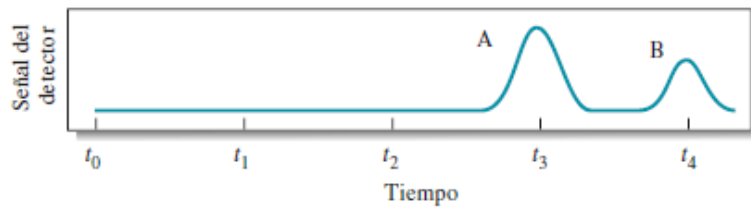




PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

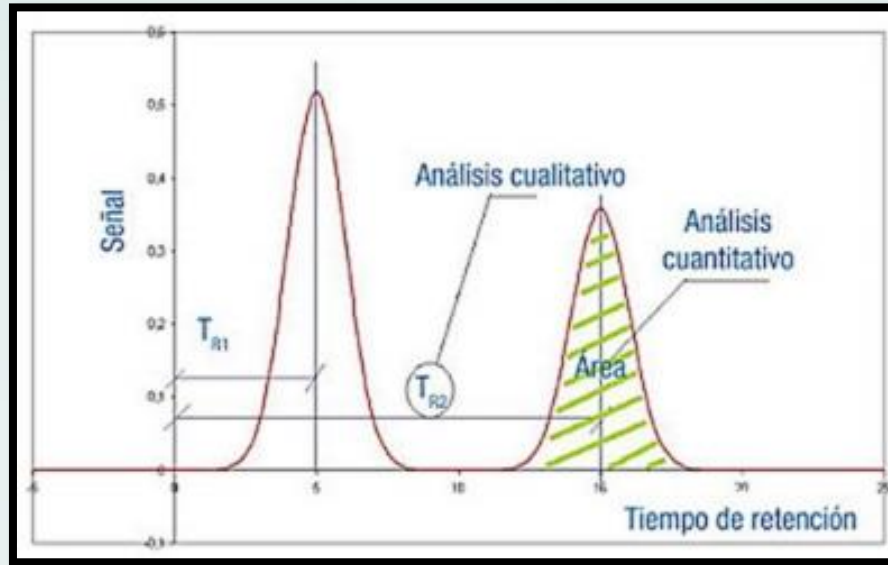


a)



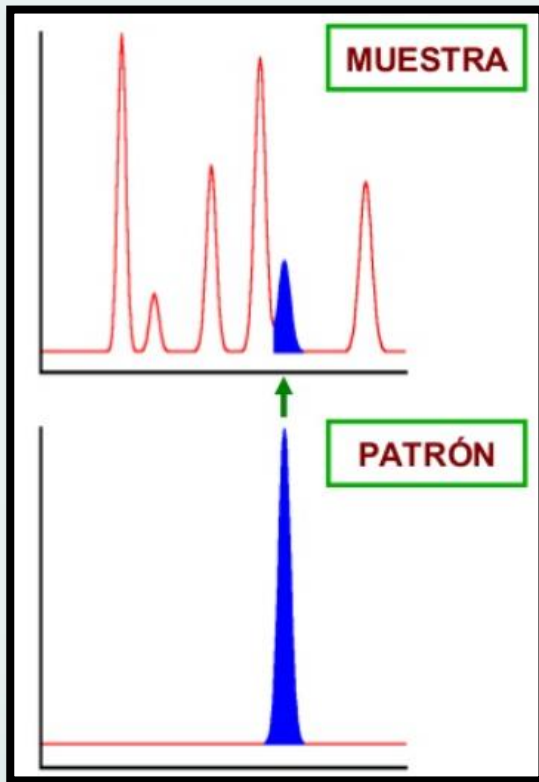
Si un detector que responde a la concentración de soluto se coloca al final de la columna durante una elución y su señal se grafica en función del tiempo, se obtienen una serie de picos.

Esta gráfica, denominada **CROMATOGRAMA**, es útil para los análisis cualitativos y cuantitativos.



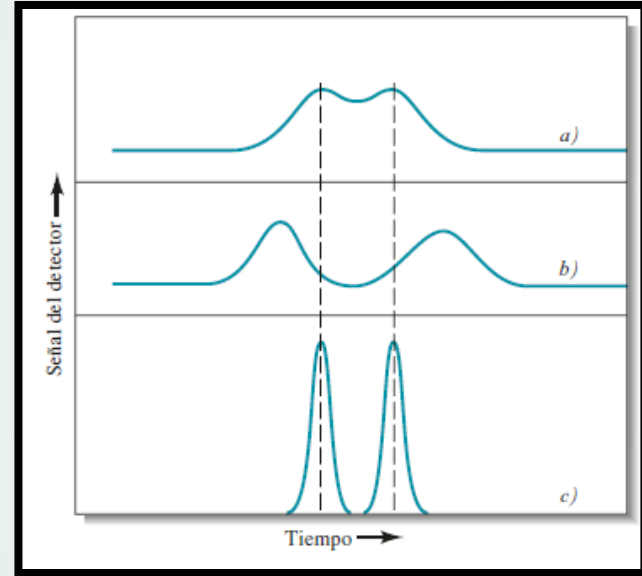
- Las posiciones del máximo de los picos, que representa al tiempo de retención, pueden ser utilizados para **identificar** los componentes de la muestra.
- Las áreas debajo de los picos proporcionan una **medida cuantitativa** de la cantidad de cada especie química en la muestra.

ANÁLISIS CUALITATIVO

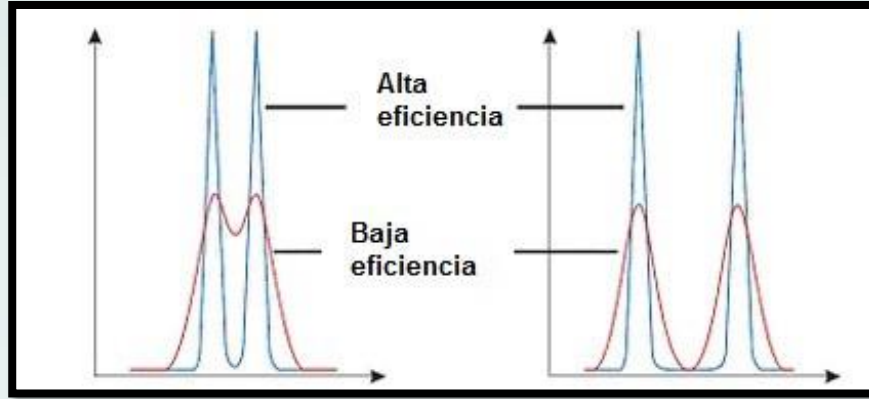


EFICIENCIA DE LA COLUMNA

Definimos a la eficiencia de una columna cromatográfica para separar un componente de otro, como el **grado de ensanchamiento de bandas** que experimenta un compuesto a través de la columna.



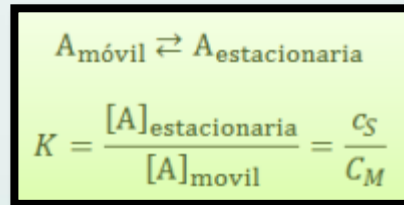
- a) cromatograma original con los picos traslapados;
b) mejora producida por un aumento en la separación de las bandas, y c) mejoramiento por una disminución de la anchura.



La **eficiencia** de una columna cromatografica para separar dos solutos **depende** en parte de las **velocidades relativas con las que eluyen** las dos especies.

Esas velocidades están **determinadas** por la magnitud de las **constantes de equilibrio** para las reacciones mediante las cuales los solutos se distribuyen entre las fases estacionaria y movil.

- 1)- Constantes de distribución
- 2)- Tiempo de retención (tR)

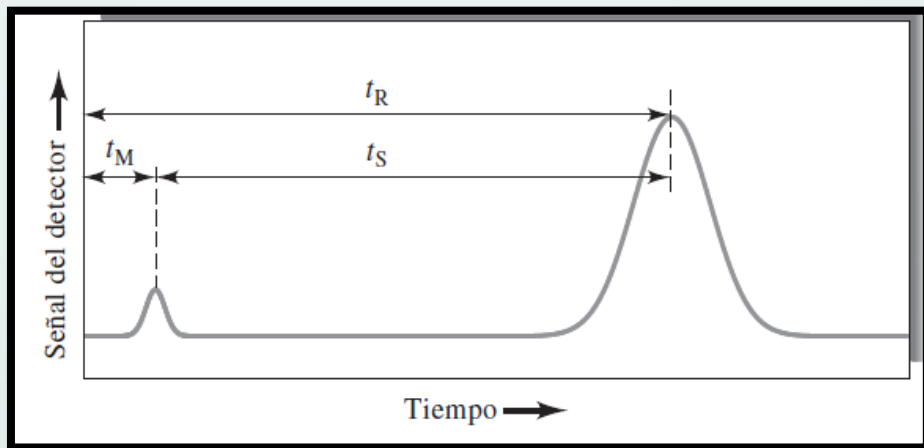


TIEMPO DE RETENCIÓN (t_R)

Es el **tiempo que tarda un soluto para emerger de la columna**, medido en el máximo del pico.

Se puede usar como un parámetro para identificación: Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos.

La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un **criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad**, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad.

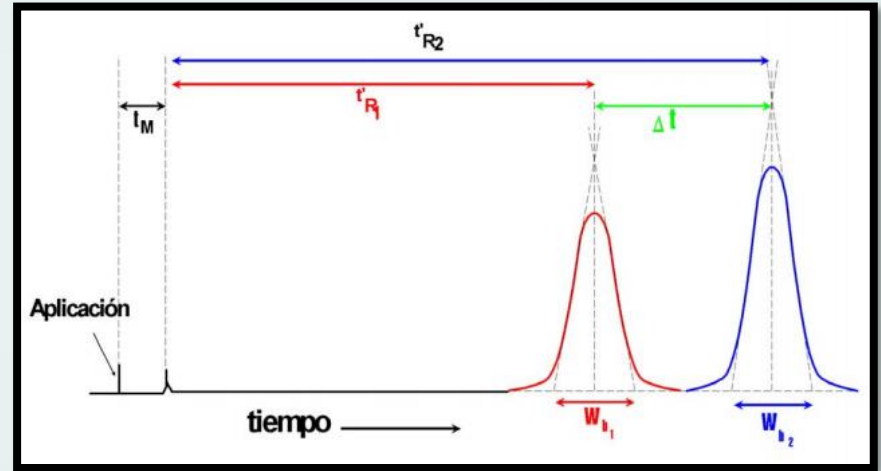


RETENCIÓN RELATIVA

La separación entre dos bandas cromatográficas puede estudiarse en función de dos parámetros: La retención relativa y la resolución.

La **retención relativa** (α) se define como el cociente entre los tiempos de retención corregidos de las dos bandas:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

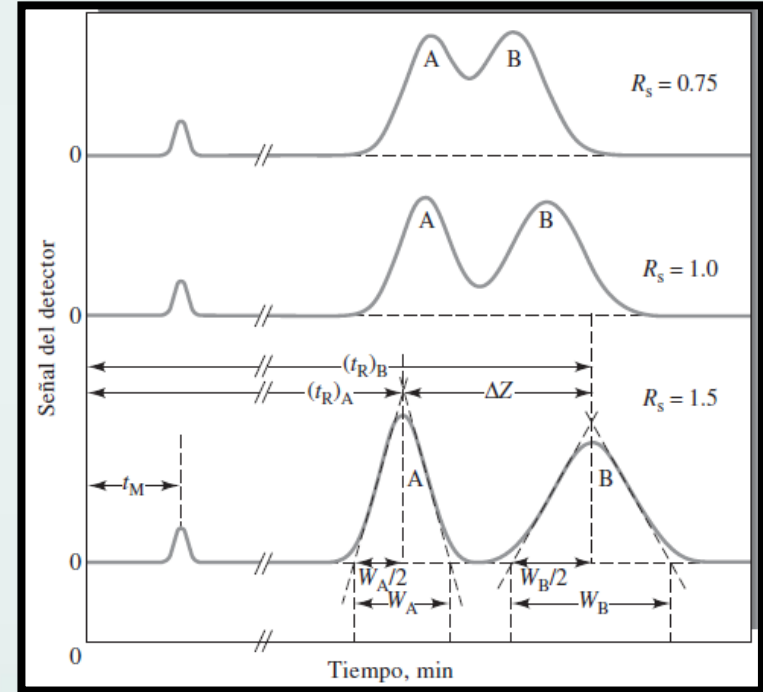


RESOLUCIÓN

El **grado de separación** o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos de las bandas (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas.

Es una **medida cuantitativa** de la **capacidad** de la técnica cromatográfica para **separar** dos analitos.

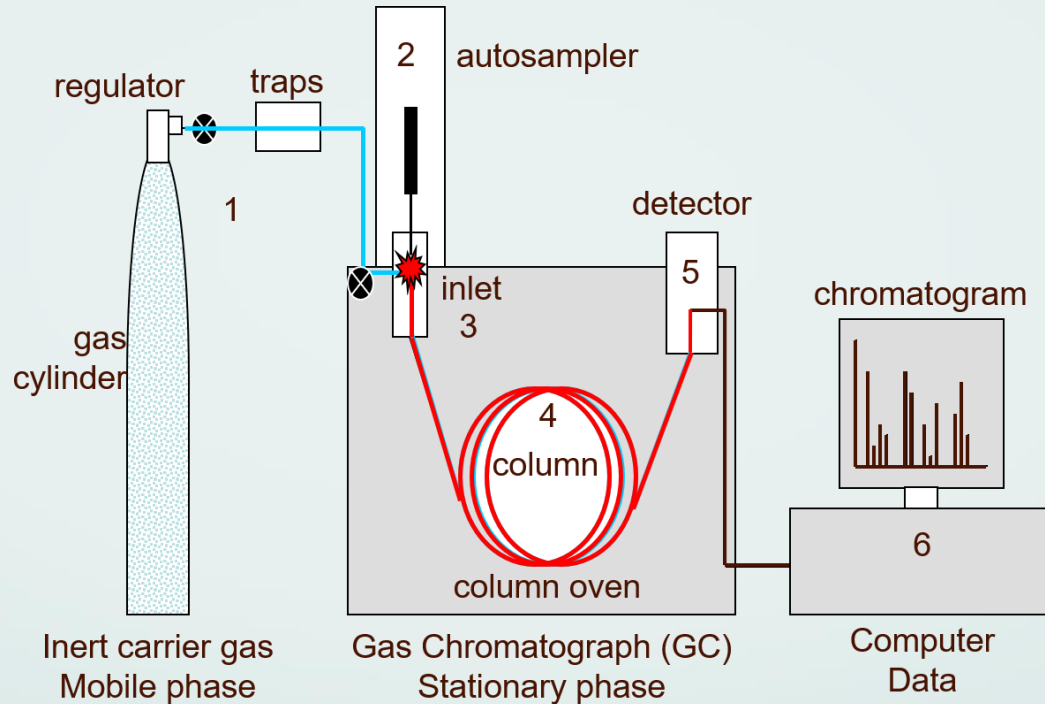
Una total separación requiere valores de R y de α lo más elevados posibles.





CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Los componentes de una **muestra vaporizada** se separan al ser distribuidos entre una **fase móvil gaseosa** y una **fase estacionaria líquida o sólida** retenida en una columna.



CROMATÓGRAFO GASEOSO



VENTAJAS

- Rapidez (minutos)
- Eficiente: Alta resolución
- Alta sensibilidad: Niveles de trazas (ppm/ppb)
- No destructivo
- Acoplamiento en línea (Espectrómetro de masas)
- Análisis cuantitativo con alta exactitud
- Requiere volumen de muestra pequeño (microlitros)
- Confiable y relativamente simple
- Bajo costo

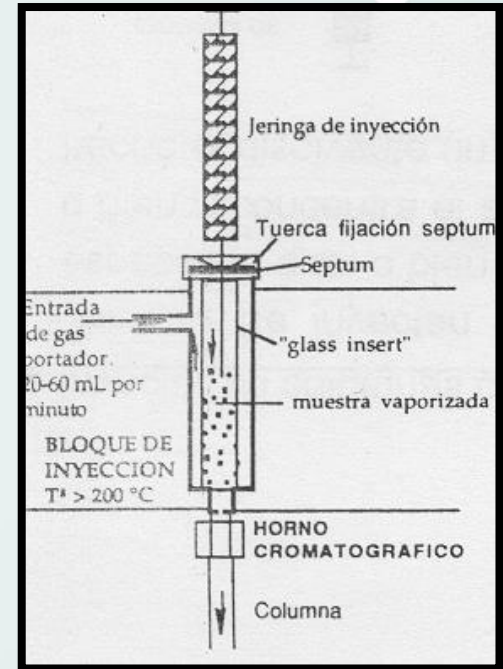
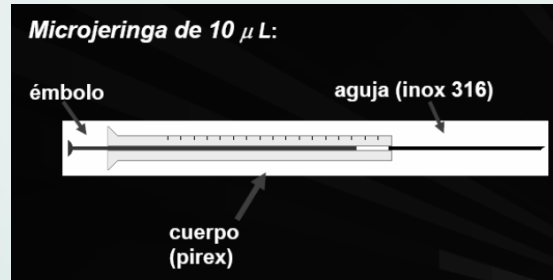
LIMITACIONES

- Limitada a muestras volátiles
- No se puede utilizar en muestras térmicamente lábiles
- Difícilmente puedan resolverse compuestos iónicos, no volátiles y con pesos moleculares mayores a 600.
- Puede ser necesario eliminar interferencias (separación/purificación)
- Inyección debe ser exacta (sistema automatizado)
- Requiere espectroscopía para determinar identidad

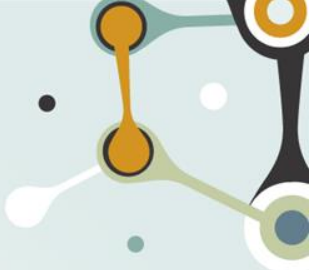

INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Es un apartado crítico. La muestra es inyectada y vaporizada en la parte superior de la columna cromatográfica.

Se debe inyectar una cantidad adecuada, e introducirse de tal forma ("tapón de vapor") que sea rápida (INSTANTÁNEA), para evitar el ensanchamiento de las bandas.



PARÁMETROS DE INYECCIÓN



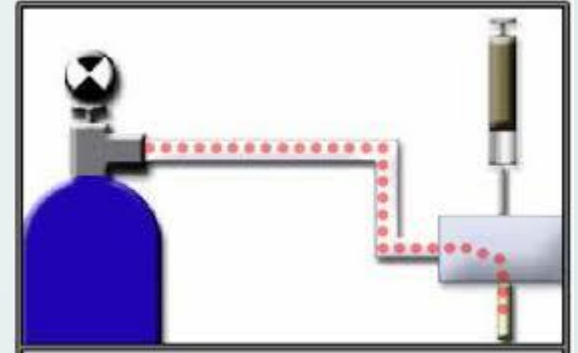
TEMPERATURA DEL INYECTOR	<ul style="list-style-type: none">• Debe ser suficientemente elevada para que la muestra se vaporice inmediatamente, pero sin descomponerse.
REGLA GENERAL	<ul style="list-style-type: none">• $T_{inyec} = 50^{\circ}\text{C}$ por encima del pto de ebullición del componente menos volátil
VOLUMEN INYECTADO	<ul style="list-style-type: none">• Depende del tipo de columna y del estado físico de la muestra

GAS PORTADOR

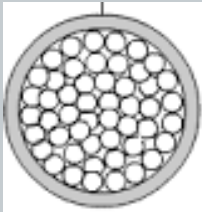
Para que una sustancia pueda ser movilizada por un flujo gaseoso debe poder disolverse en dicho gas.

En CG la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito, su única función es **transportar al analito** a través de la columna, por este motivo recibe el nombre de “Gas portador” o “Carrier” (Helio, Nitrógeno, Hidrógeno, etc).

La elección del gas dependerá de la naturaleza de la fase estacionaria y de las características del detector utilizado.



TIPOS DE COLUMNAS



RELLENAS

- Diámetro: 2-4mm
- Longitud: 2-3m
- Muestras poco complejas (hasta 10 componentes)
- Material sólido, dividido y homogéneo, recubierto de un FE líquida.




CAPILARES

- Diámetro: <1mm
- Longitud: 5-50m
- Muestras complejas
- La FE se deposita sobre las paredes interiores del capilar





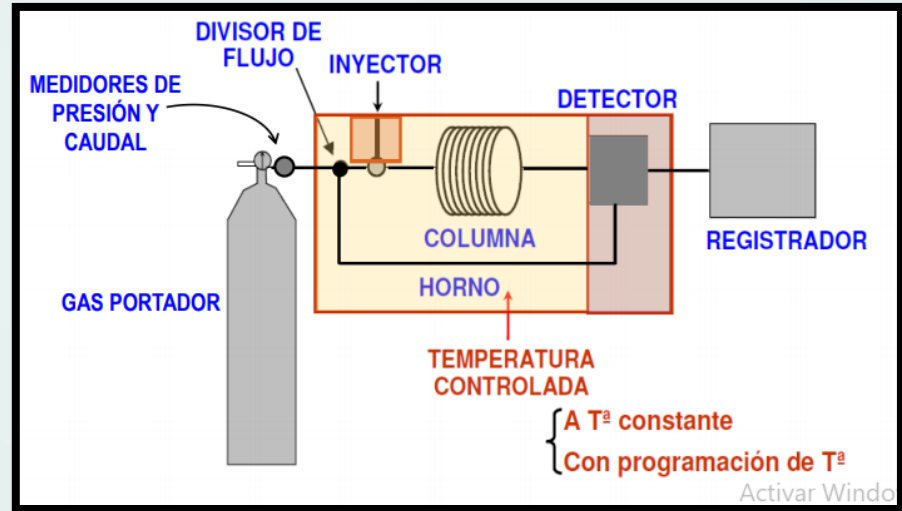
CARACTERÍSTICAS FASE ESTACIONARIA

1. Estabilidad térmica: Rango de temperatura útil amplio, idealmente sería un rango entre -50°C y 400°C .
 2. Baja volatilidad: Presión de vapor lo más baja posible, es decir, el punto de ebullición debe ser al menos 100°C mayor que la temperatura máxima de trabajo del horno.
 3. Debe ser químicamente inerte.
 4. Debe ser lo más selectiva posible para el tipo de soluto con los que va a interactuar.
- 

TEMPERATURA DE LA COLUMNA

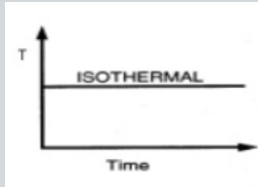
La temperatura de la columna es una variable importante para que el análisis se efectúe en un plazo razonable, por ello se introduce dentro de un horno.

La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido.

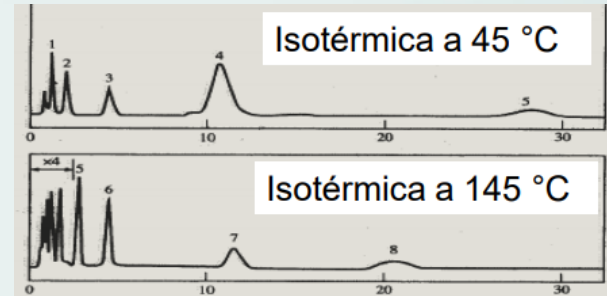


TEMPERATURA PROGRAMADA

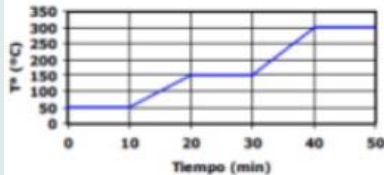
TEMPERATURA ISOTÉRMICA



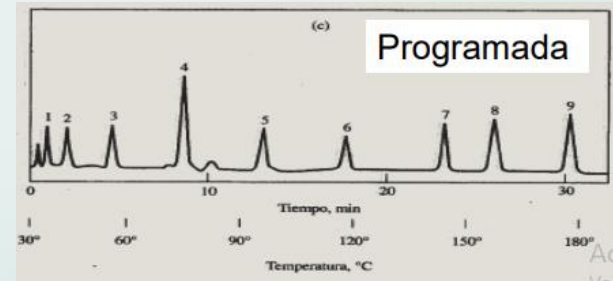
- Temp. Promedio de ebullición
- Mezclas simples
- T es igual para inyector, columna y detector
- Problemas en el tiempo de análisis



TEMPERATURA PROGRAMADA



- Cambio a partir de una T lineal y se va ajustando constantemente
- Una o varias rampas según la mezcla a separar
- Ajustar tiempos y temperaturas (0,5-15°C/m)





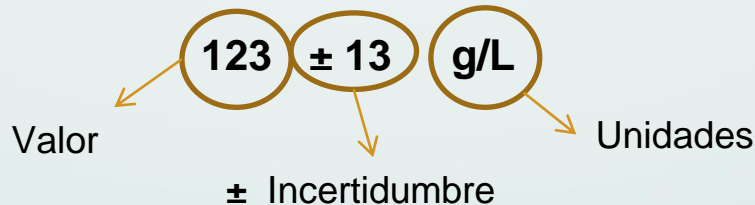
ANÁLISIS CUANTITATIVO

FUENTES DE ERROR

Cuando se realiza un procedimiento de laboratorio se presentan **variaciones en las mediciones**, incluso si la medida es realizada repetidamente por el mismo analista bajo las mismas condiciones.

Estas variaciones se presentan debido a la incertidumbre de los instrumentos usados y a la variabilidad intrínseca de las acciones humanas.

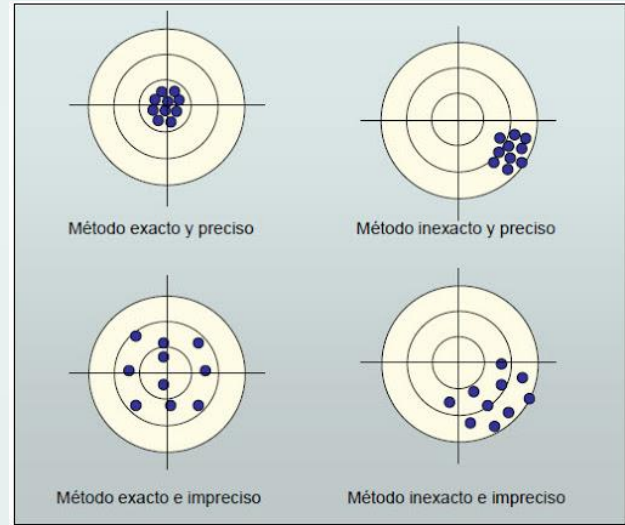
Todo estudio cuantitativo presenta sus resultados acompañados de un estimado de los errores inherentes a ellos.



EXACTITUD Y PRECISIÓN

La **exactitud** describe la proximidad del valor medido respecto al valor “verdadero” o “aceptado”. Si se dispone de un estándar conocido (ej: material de referencia certificado), la medida será exacta si el valor obtenido es próximo al valor certificado.

La **precisión** es una medida de la reproducibilidad de un resultado. Si se mide una cantidad varias veces exactamente de la misma manera y los valores obtenidos se aproximan mucho entre sí, la medida es precisa. Si los valores varían mucho entre sí, la medida no es precisa.

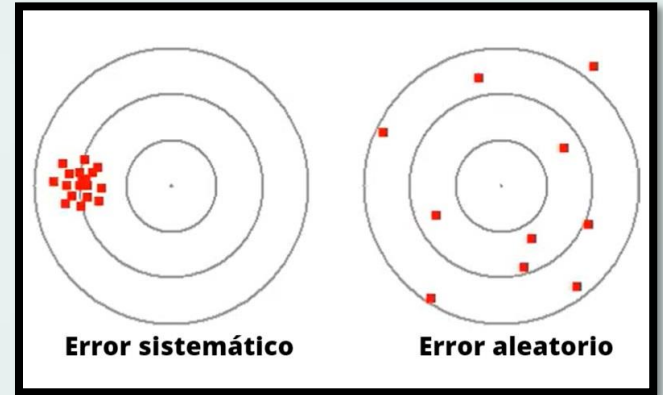


LOS ANÁLISIS QUÍMICOS SE VEN AFECTADOS POR DOS

TIPOS DE ERRORES:

Error Sistemático: es aquel que se produce de igual modo en todas las mediciones que se realizan de una magnitud. Puede estar originado en un defecto del instrumento, en una particularidad del operador o del proceso de medición, etc. Las causas de este tipo de error se pueden identificar claramente y su efecto puede corregirse. Afectan la exactitud, introduciendo un sesgo en la medida.

Error Aleatorio: sus fuentes no pueden ser determinadas ni controladas. Se caracterizan por introducir desviaciones sin ninguna dirección preferencial para las observaciones de una serie con respecto al valor esperado para la muestra. Pueden ser negativos y positivos con aleatoriedad. Afecta la precisión

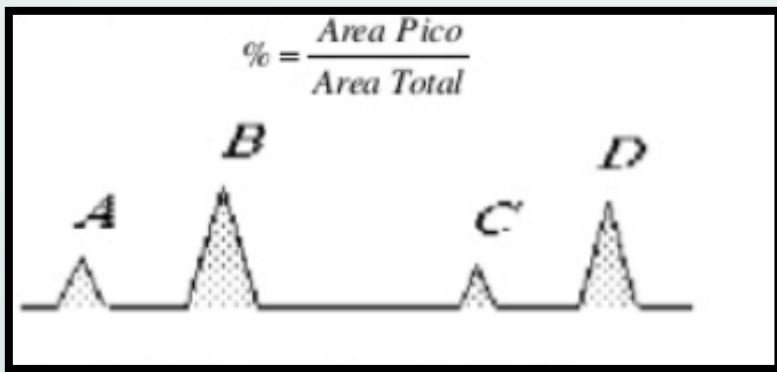




MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESULTADOS

1)- Normalización del área/ Porcentaje por área

La normalización de área es un medio para establecer el **porcentaje de cada componente** en la muestra. Se calcula dividiendo el área de cada componente entre el área total y multiplicando por 100%, es decir:



$$\%A = \frac{\text{Area de A}}{\text{Area total}} * 100$$

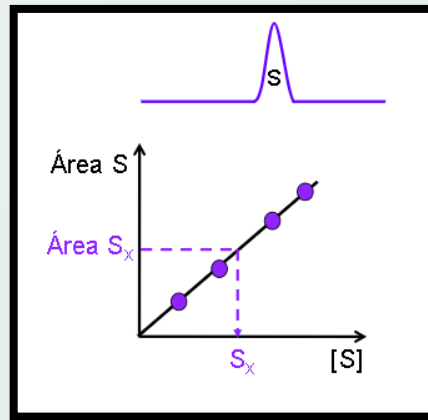


CALIBRACIÓN

La calibración determina la **relación entre la respuesta analítica y la concentración** del analito. Esta relación se determina comúnmente mediante el uso de **estándares químicos**.

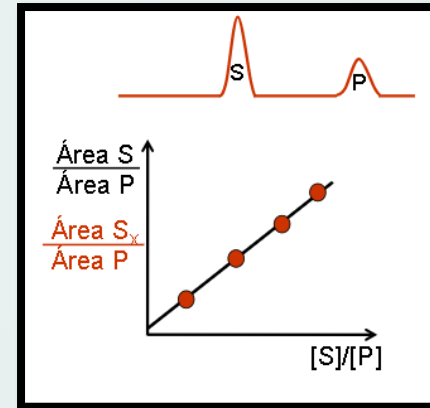
2)- Calibración absoluta:

Se preparan una serie de soluciones de concentraciones crecientes, se inyectan al CG y se obtienen los cromatogramas. Se integra el área debajo de las curvas de cada uno, para luego realizar una gráfica (Área vs. Conc) y obtener matemáticamente la ecuación de una recta ($y = mx + b$), la cual se utiliza para predecir la concentración desconocida de un analito.



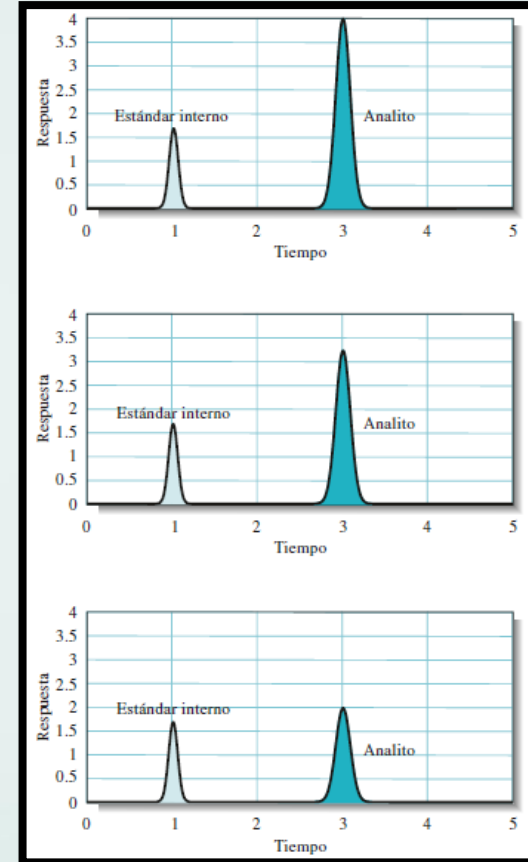
3)- Calibración con patrón interno

Una cantidad conocida de una especie de química diferente al analito es añadida a todas las muestras, estándares y determinaciones del blanco. La señal de respuesta es una *proporción* de la señal del analito con respecto a la señal de la especie química de referencia. Se prepara una curva de calibración donde el eje y es la proporción de las respuestas y el eje x es la concentración del analito en el estándar, como es lo usual.



El patrón interno debe tener ciertas características: poseer una estructura química similar a la del analito a determinar; presentar tiempos de retención relativamente cercanos al mismo.

El método **compensa ciertos tipos de errores** si estos influyen en la misma magnitud proporcional al analito y a la especie química de referencia.





FIN