

QUÍMICA ANALÍTICA III. PART B: TÈCNIQUES DE SEPARACIÓ

1. INTRODUCCIÓ A LES TÈCNIQUES DE SEPARACIÓ

1. Concepte de separació analítica i classificació de tècniques de separació.
2. Tècniques de separació en preparació de mostres.
3. Introducció a l'extracció líquid-líquid.
4. Teoria de l'extracció líquid-líquid.
5. Extracció de cations metàl·lics.
6. Introducció a la SPE o extracció en fase sòlida.
7. Els suports sòlids i les fases estacionàries enllaçades emprades en SPE i en LC.

1. Concepte de separació analítica i classificació de tècniques de separació

Concepte de separació. En una separació una barreja es divideix en dues o més fraccions de composició diferent. Unes fraccions s'enriqueixen en un o diversos components, i d'altres s'empobreixen en ells. La separació es pot dur a terme amb dues finalitats: preparativa i analítica. En una separació preparativa els paràmetres d'interès són la quantitat de compost enriquit i la riquesa aconseguida. Exemple: 2 kg de compost d'un 99.9% de riquesa per injecció, càrrega o operació. En canvi, en una separació analítica l'objectiu és obtenir una, dues o més fraccions en què s'hagin preconcentrat els analits, i s'hagin reduït les concentracions d'altres components, especialment d'aquells que puguin causar interferència en la identificació o quantificació dels analits.

Algunes tècniques de separació tenen un fonament simple, com la destil·lació, i altres són més complexes, com la cromatografia, l'electroforesi, l'electrocromatografia, etc. Les tècniques simples permeten separar la mostra en dues o tres fraccions. Les tècniques complexes donen lloc a una separació contínua de la mostra al llarg d'una variable tal com el temps de retenció en cromatografia o el temps de migració a electroforesi. La mostra queda dividida en múltiples fraccions, separades entre si al llarg d'aquesta variable.

Classificació de tècniques de separació: es poden classificar atenent a diversos criteris.

A) Pel mecanisme o procés físic o fisicoquímic en què es basa la separació:

Típus de procés	Medi físic i exemples
Equilibri termodinàmic	Entre dues fases (líq-líq o líq-gas): extracció, absorció (veure Figs. 1 i 2)
	Entre una fase i una superfície: adsorció (veure Figs. 1 i 2), bescanvi iònic
	Formació d'una nova fase: precipitació, destil·lació
Fenòmens dinàmics	Difusió a través de membranes i sòlids porosos: filtració, osmosi, exclusió (en sòlids porosos, veure Fig. 2)
	Migracions en el si d'un gradient tèrmic o gravitatori: difusió tèrmica, centrifugació
Equilibri termodinàmic i fenòmens dinàmics simultàniament	Equilibri entre una fase i una superfície sòlida, o entre dues fases líquides immiscibles: cromatografia Migració en un camp elèctric: electroforesi Equilibri entre dues fases en un camp elèctric: electrocromatografia

En algunes d'aquestes tècniques, la separació es realitza en una sola fase líquida, com en l'electroforesi capil·lar, però en la majoria de les tècniques cromatogràfiques i afins intervenen dues fases, com en la cromatografia de repartiment o absorció, o bé una fase i una superfície (interfície), com en les cromatografies d'adsorció i bescanvi iònic.



Fig. 1. Adsorció i absorció

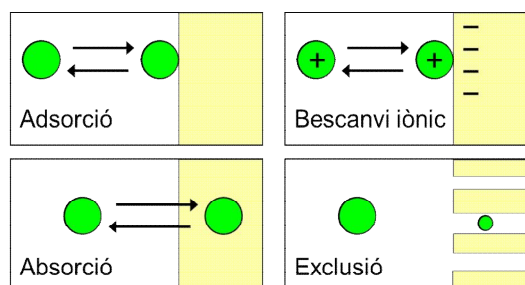


Fig. 2. Mecanismes de retenció

B) Per l'estat físic dels components del sistema separador, les tècniques cromatogràfiques i afins es poden classificar de la manera següent:

Fase estacionària / Fase mòbil	Líquid	Sòlid
Gas	Cromatografia gas-líquid o "de gasos" (GC, <i>gas chromatography</i>)	Cromatografia gas-sòlid
Líquid	Cromatografia de repartiment (LC, <i>liquid chromatography</i>)	LC d'adsorció Cromatografia de bescanvi iònic (IC, <i>ion chromatography</i>)
Fluid supercrític	Cromatografia de fluids supercrítics (SFC, <i>supercritical fluid chromatography</i>)	SFC d'adsorció

2. Tècniques de separació en preparació de mostres

Cal fer notar que, en el context d'una anàlisi, l'"etapa preparativa" no té res a veure amb la "finalitat preparativa" de la qual s'ha parlat abans. No és el mateix "preparar la mostra" per a les etapes següents de l'anàlisi, que "preparar un producte" enriquit en un component per a ús industrial o tecnològic.

En aquest curs es pretén, principalment, introduir els fonaments de la cromatografia i conèixer les principals tècniques cromatogràfiques. No obstant això, és convenient començar per parlar un poc de preparació de mostres. La primera raó és que les tècniques utilitzades en preparació de mostres i en les etapes posteriors de mesura de la concentració dels analits es basen en els mateixos principis que les separacions cromatogràfiques. En molts casos, les tècniques són les mateixes i només es distingeixen pel seu grau de complexitat. És per això que l'estudi d'algunes tècniques de preparació de mostres, i particularment de l'extracció líquid-líquid i de l'extracció en fase sòlida, constitueix una excel·lent manera d'introduir la cromatografia.

La segona raó és que sovint és necessari aplicar una tècnica de preparació de mostres per poder fer després una separació cromatogràfica. Les tècniques de preparació de mostres permeten ampliar moltíssim el camp d'aplicació de les tècniques cromatogràfiques.

La **finalitat** de les tècniques de preparació de mostres és:

- Preconcentrar els analits, la qual cosa millora els seus límits de detecció.
- Reduir la concentració d'interferències i simplificar la matriu, cosa que incrementa la selectivitat global de l'anàlisi i millora també, indirectament, els límits de detecció dels analits.
- Gràcies a una major concentració dels analits, reduir el risc de pèrdua d'analit i els riscos de contaminació de la mostra amb analit procedent de l'entorn, o amb interferències.
- Conservar mostres i analits en formes més estables.
- Canviar el medi original de la mostra, o el que procedeix d'un tractament previ (com dissolució o hidròlisi amb àcids), de manera que el nou medi siga compatible amb l'utilitzat en el cromatògraf o espectròmetre amb el que es faran les separacions o mesures posteriors. Per exemple, en cromatografia de gasos, interessa obtenir un extracte de la mostra que només tinga components volàtils. En cromatografia líquida, la mostra ha de ser compatible amb barreges hidroorgàniques (metanol-aigua, acetonitril-aigua), o bé amb mesclures hidròfobes (heptà-cloroform, etc).

Algunes tècniques prou utilitzades en la preparació de mostres prèvia a una separació cromatogràfica són les següents:

Per compostos dispersos en gasos s'utilitzen tècniques de **sorció sobre fases líquides o sòlides, seguida de desorció** per recuperar els soluts retinguts. La Fig. 3 mostra una columna de sorció o *denuder* dissenyat per atrapar i preconcentrar traces de compostos àcids en aire. La **desorció** pot ser tèrmica (un ràpid augment de la temperatura) o amb dissolvents. Els compostos alliberats es concentren en una dissolució adient, de la qual es prendran alíquotes per injectar en un cromatògraf de gasos o en un cromatògraf líquid.

Per compostos no volàtils en mostres sòlides o semisòlides s'utilitzen diverses tècniques d'extracció amb dissolvents. Les tècniques més ràpides i efectives són les que fan ús de temperatures elevades, superiors al punt d'ebullició del dissolvent, en recipients tancats a pressió. El dissolvent pot ser un líquid o inclús un fluid supercrític (habitualment CO₂ i de vegades Ar).

Per compostos no volàtils en mostres líquides són habituals les següents tècniques:

Sorció sobre barra agitadora. En la SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*) es fa servir una barra imantada proveïda d'un recobriment absorbent per preconcentrar soluts a partir de mostres líquides. L'imant es submergeix en la mostra i s'inicia l'agitació (Fig. 4). Durant la mateixa, les traces afins al recobriment van sent retingudes. La naturalesa de les traces retingudes canvia depenent de la naturalesa del sorbent. Un sorbent molt habitual per retenir traces de compostos apolars i poc polars és el poli-dimetil-siloxà (PDMS): $- [- Si (CH_3)_2 - O -]_n -$

El PDMS amb un cert percentatge de grups metils substituïts per fenils (típicament entre el 5 i el 35% de metils substituïts per fenils) dona lloc a sorbents de polaritat i polaritzabilitat creixents, capaços de retenir soluts apolars, polars i polaritzables. Aquests adsorbents són també molt utilitzats com a fases estacionàries en GC.

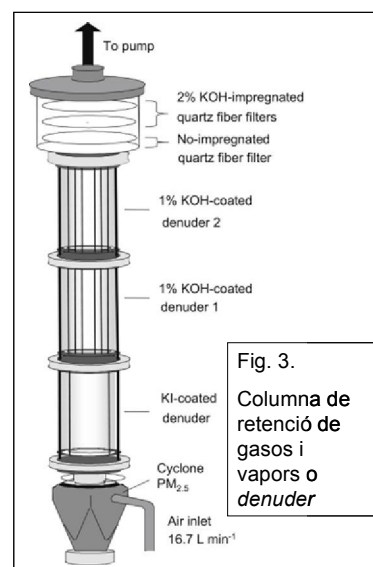


Fig. 3.
Columna de retenció de gasos i vapors o *denuder*



Fig. 4. Vial amb imant per SBSE

Sorció sobre microfibra. S'utilitza una fibra de polímer o de sílice porosa amb recobriment absorbent (sovint de PDMS amb 5% de fenils) per preconcentrar soluts a partir de mostres gasoses (confinades per un temps en l'espai de cap del vial), o a partir de mostres líquides (amb la fibra submergida en el vial).

En extracció líquid-líquid (LLE, *liquid-liquid extraction*) els analits s'extreuen mitjançant el contacte íntim entre la mostra líquida i un cert volum de dissolvent immiscible amb la mateixa.

En extracció en fase sòlida (SPE, *solid phase extraction*) els analits dissolts en la mostra líquida es retenen per un dels mecanismes indicats abans: adsorció, repartiment o absorció en el si d'una "fase enllaçada", és a dir, ancorada covalentment a la superfície d'un sòlid. Els soluts es recuperen per rentat de la fase sòlida amb un dissolvent. Si es fa servir bescanvi iònic com a mecanisme de retenció, l'elució dels analits es produeix per desplaçament amb un anió o un catió que queda retingut en lloc de l'analit.

Aquestes dues tècniques, extracció líquid-líquid i extracció en fase sòlida, tenen fonaments comuns amb les cromatografies líquides d'adsorció, repartiment i bescanvi iònic, motiu pel qual es desenvolupen més extensament en aquest tema

3. Introducció a l'extracció líquid-líquid

Concepte. L'extracció líquid-líquid o LLE és una tècnica de separació basada en la transferència d'un solut entre dues fases líquides immiscibles. L'extracció líquid-líquid es fa manualment en embuts de decantació (Fig. 5), o bé, de manera automàtica, en extractors de flux continu. Es distingeixen dues etapes:

- La de contacte entre les dues fases líquides, una de les quals és la mostra (inicialment líquida o dissolta) i l'altra és un dissolvent immiscible amb la mostra. En aquesta etapa es pretén assolir l'equilibri de repartiment de l'analit entre les dues fases.
- L'etapa de separació física de les dues fases, amb transferència d'una de les fases a un altre recipient (si l'operació és manual o per càrregues) o a una posició més avançada dins el sistema de separació (si l'operació és automàtica o en continu).



Fig. 5. Embut de decantació

L'agitació és essencial per afavorir el contacte entre les fases i accelerar la transferència de matèria. Després de l'etapa de contacte, les fases es separen gràcies a la diferència de densitat (per gravetat o amb ajuda de centrifugació), encara que també es poden separar per filtració a través d'una membrana permeable a una sola de les fases (per exemple, una membrana hidròfoba només deixa passar la fase orgànica i no l'aquosa).

Dissolvents habituals en extracció líquid-líquid i les seves característiques. Les característiques que ha de tenir un dissolvent per ser útil en extracció líquid-líquid són:

- Polaritat adequada: baixa per extreure soluts hidrofòbics, i alta per a soluts més polars.
- Escassa o nul·la miscibilitat amb aigua.
- Baixa viscositat, per facilitar el seu maneig i accelerar la transferència de massa dels soluts.
- Densitat molt diferent de la de l'aigua, per facilitar la separació de les fases.
- Volatilitat per facilitar la preconcentració dels extractes, o el canvi del dissolvent per un altre més adequat per a les etapes posteriors de l'anàlisi. També cal emprar un dissolvent volàtil si l'extracte

s'ha d'injectar en un cromatògraf de gasos.

- En cromatografia líquida, compatibilitat amb el sistema separador i amb el detector que s'hagi d'utilitzar, per exemple, transparència en l'UV (nül·la o escassa conjugació electrònica si el detector és un espectrofotòmetre).
- En cromatografia líquida, baixa força eluent (baixa capacitat per arrossegar els soluts en el sistema cromatogràfic).
- Inèrcia química (grups funcionals poc reactius).
- Baix preu (estructura molecular senzilla).

En general, s'ha d'usar dissolvents polars per extreure compostos polars (medicaments, metabòlits, pesticides, additius industrials, etc) a partir de mostres aquoses, i dissolvents apolars per extreure compostos apolars (pesticides, compostos poliaromàtics). De menor a major polaritat (vegeu les estructures moleculars a la Fig. 6), es tenen:

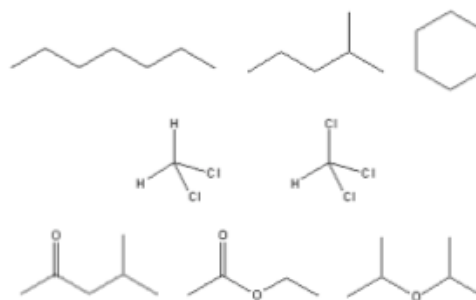


Fig. 6. Dissolvents habituals en LLE

- **Hidrocarburs** com heptà, isohexà i ciclohexà. L'anomenat **èter de petroli** és una barreja d'hidrocarburs que conté principalment heptà. Per la seva banda, el pentà és massa volàtil, i s'evita l'ús d'hexà i benzè perquè són perillosos des del punt de vista de la salut (són mutagènics).

- **Hidrocarburs halogenats** com diclorometà i cloroform. Aquests dissolvents, sense deixar de ser fortament hidròfobs, són polars a causa de la asimetria de les seves molècules. S'utilitzen per extreure compostos hidrofòbics amb grups polars en la molècula (com heterocicles amb nitrogen, grups èster o cetona, etc).

- **Dissolvents oxigenats**, com metil-isobutil-cetona (MIBK), acetat d'etil i di-isopropil èter. En extracció no s'utilitza acetona per ser miscible amb aigua. El di-etil èter, per ser excessivament miscible amb aigua, s'usa en molt pocs casos. Tampoc s'usen alcohols, ja que metanol, etanol, propanol i isopropanol són totalment miscibles amb aigua, i butanol, pentanol i els seus isòmers són excessivament miscibles amb aigua, a més de viscosos i poc volàtils.

Miscibilitat de dissolvents orgànics amb aigua. Alguns dissolvents orgànics són miscibles amb aigua en totes proporcions, altres tenen una miscibilitat limitada o molt baixa. L'extracció de soluts apolars i poc polars es facilita si el dissolvent és molt poc soluble en aigua. Si una part del dissolvent es barreja amb la fase aquosa no es recupera després com a fase separada. Per exemple, si s'extreuen 100 mL d'aigua amb 20 ml d'acetat d'etil, només es recuperen 12 ml del dissolvent orgànic, els altres 8 mL s'han dissolt en l'aigua. A més, la miscibilitat parcial redueix el rendiment de les extraccions, ja que augmenta la hidrofobicitat de la fase aquosa i per tant aquesta reté més els soluts poc polars.

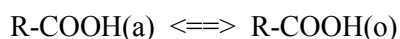
La miscibilitat de dissolvents en aigua, i la solubilitat de molts altres compostos orgànics en aigua, depèn de: (i) la capacitat del dissolvent o del solut per interaccionar amb les molècules polars de l'aigua per donació o acceptació de protons, o per interaccions entre dipols permanents o induïts; (ii) el volum del buit que s'ha d'obrir entre les molècules d'aigua per allotjar les molècules de l'altre dissolvent o del solut. D'aquí es poden derivar dues regles d'aplicació pràctica:

Una primera regla, aplicable amb excepcions, és la **regla dels cinc carbonis**: un dissolvent polar deixa de ser miscible amb aigua quan té 5 o més carbonis (grups metil o metilè) per cada grup polar, tal com -OH o -NH₂. Així, si s'augmenta el nombre d'àtoms de carboni (per exemple, passar d'acetat d'etil a butirat de butil), es redueix la solubilitat en aigua del dissolvent, però també es redueix la seva volatilitat, i augmenten la seva viscositat i el seu preu.

Aquesta regla es complementa amb **la regla del volum de la regió hidrofòbica**: com més voluminós és el grup hidrofòb, menys soluble en aigua és la molècula. Així, comparant només alcohols amb quatre àtoms de carboni, el butanol és menys miscible amb aigua que l'isobutanol, i aquest és menys miscible que el terbutanol.

4. Teoria de l'extracció líquid-líquid

Constant de repartiment. Aquesta constant, i altres paràmetres que s'exposen a continuació, són importants perquè són comuns a l'extracció líquid-líquid, la cromatografia de repartiment i altres tècniques afins. La constant de repartiment descriu l'equilibri de repartiment d'un solut entre dues fases líquides immiscibles. És la relació entre les **concentracions** de les espècies en l'equilibri, K_p (el subíndex prové del terme anglès *partition*, partició o repartiment). Per exemple, si un àcid carboxílic es reparteix entre aigua (fase aquosa, a) i acetat d'etil (fase orgànica, o):



L'equilibri ve regit per la constant:

$$K_{p,A} = [\text{A}]_o / [\text{A}]_a \quad (1)$$

on A és el solut que es reparteix (en aquest exemple, l'àcid carboxílic), i els claudàtors indiquen concentracions molars. Per l'àcid carboxílic, es podria escriure:

$$K_{p,A} = [\text{R-COOH}]_o / [\text{R-COOH}]_a$$

En el numerador s'escriu la fase orgànica i al denominador la fase aquosa. Un altre criteri freqüent és escriure en el numerador la fase més lleugera i en el denominador la més densa (sol ser l'aquosa, excepte si es treballa amb cloroform). Un valor alt de $K_{p,A}$ indica preferència del solut per la fase orgànica. Per exemple, $K_{p,A} = 10^3$ ($\log K_{p,A} = 3$) indica que el solut és 1000 vegades més soluble en la fase orgànica que en l'aquosa.

L'índex d'hidrofobicitat, $\log P$. Els alcohols no s'utilitzen en extraccions amb finalitat analítica, però la constant de repartiment entre 1-octanol i aigua constitueix un paràmetre reconegut internacionalment per mesurar la hidrofobicitat de tot tipus de soluts. Aquesta constant es mesura per al solut d'interès a una temperatura donada, freqüentment a 25 °C, i es comunica com $\log P$ o $\log K_{ow}$. La seva importància prové que l'octanol té una hidrofobicitat similar a la de les membranes cel·lulars, de manera que $\log P$ permet estimar amb bona aproximació el repartiment entre el líquid intracel·lular i les membranes cel·lulars. Es té així una mesura del potencial de bioconcentració, o retenció de soluts per part dels organismes aquàtics, i en darrer terme, de la permanència d'aquests soluts en els teixits de tots els éssers vius. Així, per exemple, compostos moderadament tòxics amb un valor elevat de $\log P$ (tal com 6 o més) són molt més perillosos que altres compostos més tòxics però amb valors baixos de $\log P$: els primers s'acumulen en el teixit adipós i en les parets cel·lulars dels organismes vius, romanen molt més temps en els mateixos passant de generació en generació, i es transfereixen entre organismes a través de la cadena alimentària.

Factor de capacitat. És la relació entre les masses d'analit presents en ambdues fases en l'equilibri:

$$k = m_{A,o} / m_{A,a} \quad (2)$$

Tenint en compte que la massa és el producte de la concentració pel volum, es té:

$$k = m_{A,o} / m_{A,a} = ([A]_o / [A]_a) (V_o / V_a) = K_{P,A} (V_o / V_a) = K_{P,A} \beta \quad (3)$$

on $(V_o / V_a) = \beta$ és la relació de volums de les fases. Com es discuteix més endavant, l'equació 3 només és vàlida en absència de reaccions laterals que alterin les concentracions de $[A]_o$ i $[A]_a$. El factor de capacitat s'utilitza per conèixer la fracció massica de compost extret o rendiment de l'extracció:

$$R = m_{A,o} / (m_{A,a} + m_{A,o}) = k / (k + 1) \quad (4)$$

La fracció de solut que queda sense extreure val:

$$1 - R = 1 / (k + 1) \quad (5)$$

Exemple: Per a 1.5 g d'un compost amb $\log K_{P,A} = 3$, i utilitzant $V_o = 10$ mL i $V_a = 250$ mL, calcular la quantitat de compost que s'extrau en la fase orgànica, així com el factor de capacitat i el rendiment de l'extracció.

Solució: Tenint en compte que $1.5 = m_{A,o} + m_{A,a}$, es té: $k = m_{A,o} / (1.5 - m_{A,o}) = 10^3 (10 / 250) = 40$. Aïllant i resolent resulta: $m_{A,o} = 1,463$ g. El rendiment de l'extracció és: $R = 1.463 / 1.5 = 97.6\%$, o també: $R = 40 / (40 + 1) = 97.6\%$.

Com s'explica en el tema dedicat a teoria de la cromatografia, factor de capacitat és exactament el mateix que la retenció relativa, k , de manera que aquest paràmetre té també gran importància en cromatografia. Per altra banda, les fraccions de solut extret i sense extreure també són importants en cromatografia, on passen a anomenar-se p i q :

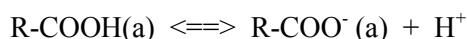
$$p = k / (k + 1) \quad (6)$$

$$q = 1 / (k + 1) \quad (7)$$

Raó de distribució. La constant de repartiment no té en compte l'efecte de les reaccions laterals, i per això, si es produeixen reaccions com ara desprotonacions o formació de complexos amb altres ions presents en el medi, la constant de repartiment per si sola no indica la quantitat total de compost que s'extreu. Per tenir en compte l'efecte de les reaccions laterals es defineix la constant o raó de distribució:

$$K_{D,A} = c_{A,o} / c_{A,a} \quad (8)$$

on $c_{A,o}$ i $c_{A,a}$ són les concentracions analítiques o totals en les fases orgànica i aquosa del compost que s'extrau; $K_{D,A}$ és una constant condicional (vàlida en determinades condicions) que s'utilitza quan hi ha reaccions laterals en alguna de les fases. En l'exemple anterior, es té una reacció lateral si l'àcid carboxílic present en la fase aquosa es desprotona:



En el cas en què només la forma protonada (sense càrrega) es puga extreure en el medi orgànic, les concentracions analítiques o totals del compost en les fases orgànica i aquosa seran:

$$c_{A,o} = [\text{R-COOH}]_o$$

$$c_{A,a} = [\text{R-COOH}]_a + [\text{R-COO}^-]_a$$

En la fase aquosa es produeix la reacció lateral de desprotonació de l'àcid, mentre que en la fase orgànica no hi ha cap reacció lateral. La constant de protonació de l'àcid en el medi aquós és:

$$K = [\text{R-COOH}]_a / ([\text{H}^+]_a [\text{R-COO}^-]_a) \quad (9)$$

En funció de K i de la concentració de protons, la fracció màsica de l'àcid que es troba en forma extraïble ve donada per:

$$\begin{aligned} \chi_a &= [\text{R-COOH}]_a / ([\text{R-COOH}]_a + [\text{R-COO}^-]_a) = \\ &= K [\text{H}^+] [\text{R-COO}^-]_a / (K [\text{H}^+] [\text{R-COO}^-]_a + [\text{R-COO}^-]_a) = K [\text{H}^+] / (K [\text{H}^+] + 1) \end{aligned}$$

on χ_a és la fracció molar de solut protonat, que és una funció del pH. La concentració de la fracció extraïble en la fase aquosa val:

$$[\text{R-COOH}]_a = \chi_a c_{A,a}$$

Substituint:

$$K_{D,A} = c_{A,o} / c_{A,a} = [\text{R-COOH}]_o / ([\text{R-COOH}]_a / \chi_a) = K_{P,A} \chi_a$$

Si s'augmenta el pH del medi aquós, la desprotonació del grup carboxilat farà disminuir χ_a , i el rendiment de l'extracció es reduirà.

En general, perquè un solut s'extregui quantitativament en un dissolvent poc polar ha de presentar un marcat caràcter hidrofòbic i no tenir càrrega elèctrica. Per això, és possible utilitzar l'extracció líquid-líquid en combinació amb equilibris de protonació per extreure selectivament uns compostos sense que se n'extreguin d'altres. Així per exemple, a $\text{pH} < 4$ s'extrauran nombrosos **àcids carboxílics** de massa molecular baixa o mitjana, mentre que a $\text{pH} > 6$ aquests compostos es trobaran en la forma iònica (carboxilat) i romandran en dissolució aquosa. Igualment, l'extracció d'**amines alifàtiques** haurà de realitzar a $\text{pH} > 9$, medi en què les amines estaran lliures, ja que la forma protonada és catiònica i no s'extreu.

Si hi ha també reaccions laterals en $[\text{R-COOH}]_o$ en el medi orgànic, de manera similar es tindria:

$$K_{D,A} = c_{A,o} / c_{A,a} = ([\text{R-COOH}]_o / \chi_o) / ([\text{R-COOH}]_a / \chi_a) = K_{P,A} / (\chi_o / \chi_a) \quad (10)$$

on χ_o és la fracció molar de la forma extraïble en el medi orgànic.

Es dedueix que **la raó de distribució és igual a la constant de repartiment dividida pel quocient de les fraccions molars de les espècies que s'extreuen**. El factor de capacitat queda modificat com segueix:

$$k = m_{A,o} / m_{A,a} = (c_{A,o} / c_{A,a}) (V_o / V_a) = K_{D,A} (V_o / V_a) = K_{P,A} (\chi_a / \chi_o) (V_o / V_a) \quad (11)$$

Exemple: Per a les dades de l'exemple anterior, si l'àcid té una constant de protonació de $\log K = 4.7$, i el medi aquós està esmorteït a $\text{pH} = 6$, calcular la raó de distribució, el factor de capacitat, la quantitat de compost que s'extreu en la fase orgànica i el rendiment de l'extracció.

Solució: La fracció molar de l'àcid protonat en el medi aquós val:

$$\begin{aligned} \chi_a &= 10^{4.7} \cdot 10^{-6} / (10^{4.7} \cdot 10^{-6} + 1) = 0.0477 \\ K_{D,A} &= K_{P,A} \chi_a = 10^3 \cdot 0.0477 = 47.7 \end{aligned}$$

$$k = m_{A,o} / (1,5 - m_{A,o}) = 47,7 (10 / 250) = 1,908$$

d'on: $m_{A,o} = 0,984$ i $R = 0,984 / 1,5 = 65,6 \%$, o també: $R = 1,908 / 2,908 = 65,6 \%$.

L'extracció múltiple. Quan la constant de distribució no és prou favorable, el rendiment es pot augmentar repetint l'extracció amb noves porcions de dissolvent. En realitat, qualsevol que siga el valor de la constant de distribució, mai es practica una extracció única, ja que cal realitzar almenys una o dues operacions de rentat amb noves porcions de dissolvent per arrossegar les restes de fase orgànica que no s'acaben de recollir la primera vegada que se separen les fases.

El rendiment de l'extracció múltiple es calcula sempre a partir de la fracció de solut que queda sense extreure. Com es demostra a continuació, fer el càlcul d'aquesta manera és molt més fàcil que fer-lo a partir de la fracció extreta. En el cas de càlcul més simple, s'utilitzen volums iguals de fase orgànica per seguir extraient solut de la fase aquosa. Després de la primera extracció, la fracció de solut que queda sense extreure val $1 - R$. Després d'una segona extracció amb una nova porció de dissolvent idèntica a l'anterior, V_o , queda sense extreure la fracció $(1 - R)$ de la fracció anterior que era $(1 - R)$, és a dir, queda la fracció $(1 - R)^2$ de la quantitat inicial:

$$(1 - R)^2 = [1 / (k + 1)]^2$$

Després de n extraccions, la fracció que haurà quedat en la fase aquosa serà:

$$(1 - R)^n = [1 / (k + 1)]^n \quad (12)$$

El rendiment de l'extracció múltiple és:

$$R_n = 1 - (1 - R)^n = 1 - [1 / (k + 1)]^n \quad (13)$$

La fracció que queda sense extraure val: $1 - R_n$.

Exemple: Per l'exemple anterior, en presència de la reacció lateral, calcular el rendiment de l'extracció si en lloc d'extreure una sola vegada amb 10 mL de dissolvent, l'extracció es repeteix: a) 4 vegades amb 2,5 mL cada vegada; b) s'utilitza un sistema automatitzat que gasta una gota de 0,05 mL cada vegada, de manera que al final ha realitzat 200 extraccions (0,05 mL x 200 gotes = 10 mL); c) en aquest últim cas, calcular el nombre de gotes necessari per assolir un rendiment quantitatiu.

Solucions:

a) Es té: $k = m_{A,o} / (1,5 - m_{A,o}) = 47,7 (2,5 / 250) = 0,477$, d'on: $m_{A,o} = 0,484$. El rendiment de la primera extracció val: $R = 0,484 / 1,5 = 32,3 \%$, o també, $R = 0,477 / 1,477 = 32,3 \%$. Com que l'extracció es repeteix quatre vegades: $R_n = 1 - (1 - 0,323)^4 = 79,0 \%$. La repetició de l'extracció amb volums menuts d'extractant ha donat lloc a un rendiment més gran que una extracció única amb tot el volum ($R = 65,6 \%$ per a 10 mL d'una sola vegada).

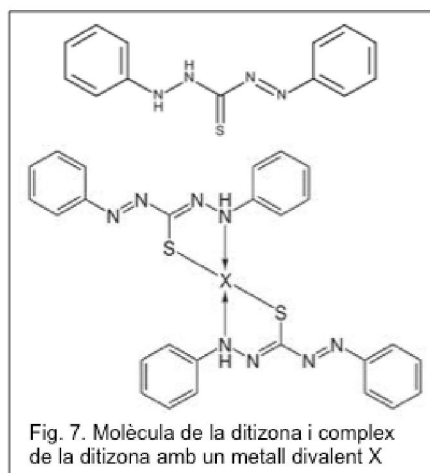
b) En aquest cas: $k = m_{A,o} / (1,5 - m_{A,o}) = 47,7 (0,05 / 250) = 0,00954$, d'on: $R = 0,00954 / 1,00954 = 0,94498 \%$. Com que l'extracció es repeteix 200 vegades: $R_n = 1 - (1 - 0,0094498)^{200} = 85 \%$.

c) Prenent n com incògnita i fent $R_n = 99,9 \%$, es dedueix que per tenir un rendiment quantitatiu es necessiten 728 gotes.

5. Extracció de cations metàl·lics

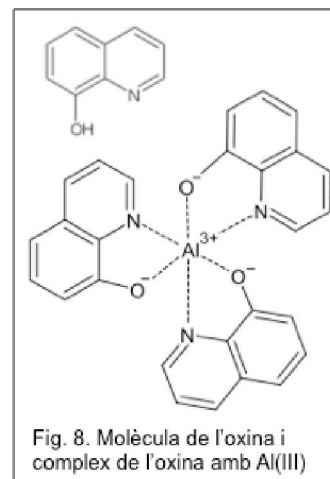
Per aïllar cations metàl·lics és freqüent fer ús d'una extracció líquid-líquid. El cations passen de la matriu aquosa original a un medi orgànic. Després es fa ús d'una tècnica espectromètrica, a voltes precedida d'una separació cromatogràfica dels cations. Com que els cations tenen càrrega, cal convertir-los en complexos sense càrrega per tal de fer-los compatibles amb el medi orgànic. Normalment es fa servir un lligant polidentat. El quelat format s'extreu quantitativament si no té càrrega (perquè la càrrega del catió central està neutralitzada per les càrregues del lligant) i si presenta un aspecte extern hidrofòbic. Entre altres, són lligants habituals en extracció de cations la ditizona (o difenil-tiocarbazona) i l'oxina (o 8-hidroxiquinolina).

Com es veu en la Fig. 7, la **ditizona** té quatre N i un S com a àtoms dadors. És un extractant de ions metàl·lics pesants, com Bi(III), Ag(I), Hg(II), Cu(II), Cd(II), etc, que són afins al sofre com a àtom dador. Amb ditizona es poden fer extraccions prou selectives, és a dir es poden extraure uns metalls i d'altres no. La selectivitat s'aconsegueix mitjançant el control del pH. Els complexos de la ditizona s'extreuen en dissolvents força apolars, tals com el tetraclorur de carboni. Per poder passar al medi orgànic, el complex perd un protó per cada lligant i queda amb càrrega neta zero. Si es treballa a pH prou àcid, la ditizona no es pot desprotonar, i només els complexos més estables (com els de mercuri, plata o coure) s'extreuen, i les seves possibles interferències (plom, zinc, cadmi) es queden en el medi aquós.



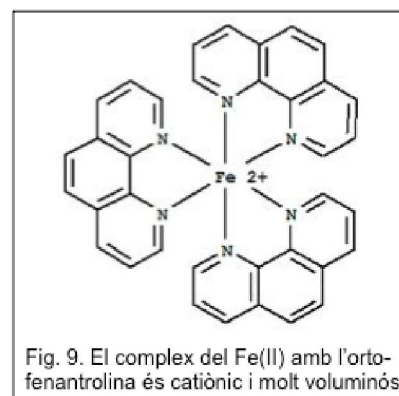
L'**oxina** té un O i un N com a àtoms dadors, i per això és un extractant de ions afins a l'oxigen, com Al(III), Zn(II), Mg(II), etc. Pel que fa a l'oxina, només la forma desprotonada del lligant forma complexos. Els complexos formats per un nombre del lligants igual a la càrrega del catió no tenen càrrega neta, cosa que permet la seva extracció en un medi orgànic.

Extraccions amb dos lligants. Ficar en el medi un segon lligant auxiliar pot augmentar el rendiment de l'extracció. Es té una extracció "sinèrgica" quant es forma un complex ternari (un ió central i dos lligants de diferent naturalesa). Per exemple, el Ca(II) no s'extreu amb oxina, però es té una extracció quantitativa si s'afegeix etilenglicol (HOCH₂CH₂OH). Es passa d'un complex hidrofílic Ca(Ox)₂(H₂O)₂ a un complex prou més hidrofòbic Ca(Ox)₂(etilenglicol).



Anàlogament, el complex de Zn(II) amb oxina no s'extreu en cloroform, però es té una extracció quantitativa si s'afegeix piridina (C₅H₅N). Es passa de Zn(Ox)₂(H₂O)₂ a Zn(Ox)₂(piridina)₂. En aquests exemples, l'etilenglicol (ligand bidentat) o la piridina (monodentat) han substituït l'aigua en l'esfera de coordinació octaèdrica.

Extracció per formació de parells iònics. La permissivitat elèctrica (o constant dielèctrica) és la capacitat del dissolvent per solvatar els ions i mantenir-los separats. L'aigua té una



permissivitat molt elevada, però altres dissolvents la tenen prou baixa. En aquests dissolvents els ions s'associen per parells, i el dissolvent no té capacitat per a suportar el pas de corrents elèctrics. En aquests dissolvents està afavorida l'extracció d'anions i cations per parelles, formant els anomenats "parells iònics", que són entitats sense càrrega. Per aconseguir l'extracció d'un ió per formació d'un parell iònic cal trobar-li un contraió adequat, que forme amb el primer una "bona parella". Exemple: el Fe(II) s'extreu si es forma primer el seu complex amb orto-fenantrolina, que és catiònic, i després s'afegeix perclorat (Fig. 9).

L'extracció de parells iònics està afavorida quan tots dos ions són grans. En aquest cas, la densitat de càrrega elèctrica dels ions és petita, i per això estan feblement solvatats i són fàcils de dessolvatar. La dessolvatació d'un ió és la pèrdua de la seva capa d'hidratació. Contraions habituals en extracció de parells iònics són:

Analits aniónics	Contraions
Clorat, ClO_3^- Perclorat, ClO_4^- Tiocianat, SCN^- Periodat, IO_4^- Tetracloromercuriat, HgCl_4^{2-}	Tetraalquilamoni, R_4N^+ Tetrafenilarsoni, $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{As}^+$
Analits catiónics	Contraions
Complex ferro(II)-orto-fenantrolina, $\text{Fe}(\text{o-fen})_3^{2+}$ Amines secundàries, R_2NH_2^+ Amines ternàries, RNH_3^+	Perclorat, ClO_4^- Tetrafenilborat, $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{B}^-$

6. Introducció a la SPE o extracció en fase sòlida

Concepte. En extracció en fase sòlida (SPE, *solid phase extraction*) s'utilitza la superfície d'un sòlid, o bé una pel·lícula líquida enllaçada químicament sobre la superfície d'un sòlid, per retenir analits a partir d'una mostra líquida. En el primer cas es té una extracció líquid-sòlid (la retenció és per adsorció), mentre que en el segon es produeix una extracció líquid-líquid (la retenció és per absorció o repartiment). Una tercera possibilitat és utilitzar un intercanviador o bescanviador iònic, cas en el qual la retenció es produeix per bescanvi iònic.

El component o components retinguts queden preconcentrats sobre el sòlid i, a la vegada, separats de la resta de components de la mostra. Canviant la composició del medi els compostos retinguts se solubilitzen de nou, i se n'obté una dissolució concentrada (elució). La SPE és un procediment simple, ràpid i econòmic (la inversió inicial és molt baixa), per la qual cosa és molt utilitzat en preparació de mostres.

Tècnica experimental. La fase sòlida, en forma de partícules menudes amb diàmetres de l'ordre dels 10 μm , s'empaqueta (o s'adquireix ja empaquetada) en cartutxos de plàstic o de vidre d'entre 1 i 10 mL de capacitat (Fig. 10). Dins del cartutx, el farcit o rebliment està retingut mitjançant discos porosos, si bé, com es comentarà més endavant, també existeixen cartutxos que contenen un monòlit o pastilla única d'un polímer o sòlid porós. En aquest últim cas, la retenció es produeix sobre la superfície interna dels porus del monòlit.



Fig. 10. Cartutxos de diverses formes i capacitats per a SPE

La separació es realitza en quatre etapes (Fig. 11):

a) **Condicionat o pre-equilibrat.** Per tractar la mostra, el seu interior ha d'estar en un medi que asseguere la retenció dels analits. Per a això, es passa una fase líquida condicionadora. Els paràmetres més importants que cal controlar són:

- El balanç hidrofobicitat/hidrofilicitat, o, en el seu cas, polaritat/apolaritat, que deu afavorir en la mesura del possible la retenció dels analits. Exemple: per a retenir soluts poc polars sobre una fase sòlida poc polar, el medi líquid deu ser hidrofílid (aigua); al contrari, per a retenir soluts polars sobre una fase sòlida polar, el medi líquid deu ser poc polar (com un oli diluït amb un hidrocarbur).
- Per a retenir àcids i bases dèbils sobre fases sòlides poc polars es deu controlar el pH. Com que es reté millor la forma no iònica (la més hidrofòbica), en general, el pH deu ser baix per a retenir àcids dèbils, i alt per a retenir bases dèbils.

- Si s'utilitza una fase sòlida que reté per bescanvi iònic, la força iònica del medi líquid deu ser baixa, per a reduir en la mesura del possible la concentració de ions competidors.

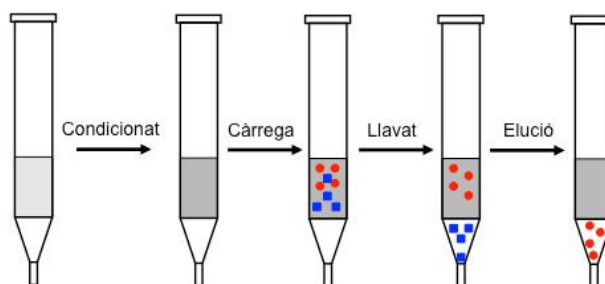


Fig. 11. Tècnica de la SPE: condicionat, carregar mostra, llavar per eliminar restes de matriu i les interferències, i eluir els analits

No únicament la fase sòlida, sinó també la mostra es deu condicionar del mateix mode mitjançant l'addició d'un tampó, o mitjançant un canvi de dissolvent si és necessari. El control del pH i de la força iònica assegura la retenció dels analits i la reproductibilitat de l'extracció.

b) **Retenció o sorció.** El terme sorció indica retenció dels analits per qualsevol dels mecanismes indicats. Per a donar temps que s'aconsegueixca l'equilibri de sorció es passa la mostra pel cartutx a una velocitat baixa (por exemple, 1 mL/ min).

c) **Llavet.** S'utilitzen porcions menudes del tampó de condicionat per eluir les restes de mostra que hagen quedat en el cartutx. Amb açò, s'eliminen les restes de components no desitjats.

d) **Elució.** L'elució dels analits s'aconsegueix canviant la composició de l'eluent: canvi de pH, augment de la força iònica, substitució del medi aquós per metanol, etc. La raó de distribució és distinta en el nou medi, sent ara favorable a la desorció dels analits.

El pas de dissolucions a través de la fase sòlida s'aconsegueix de diverses maneres:

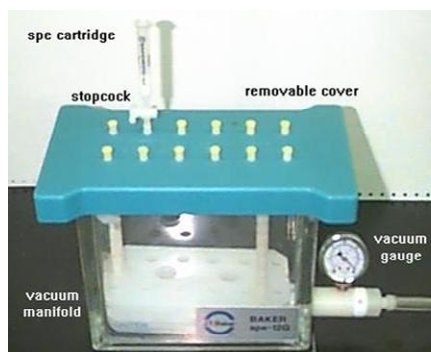


Fig. 12. Estació per fer 12 SPE simultàniament i esquema de funcionament

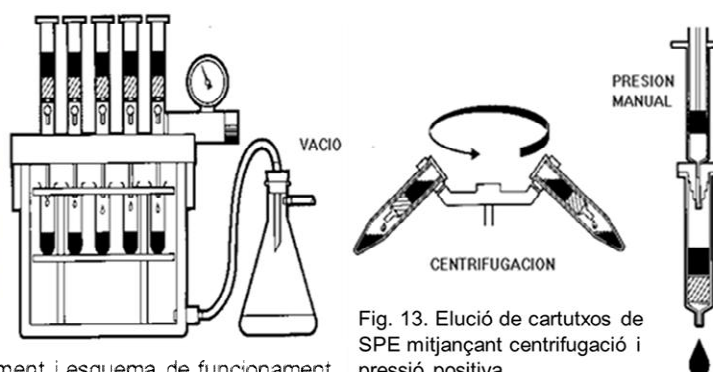


Fig. 13. Elució de cartutxos de SPE mitjançant centrifugació i pressió positiva

a) **Per succió amb buit.** Aquest és el procediment més habitual. La Fig. 12 mostra un recipient dissenyat per a realitzar 12 extraccions simultànies mitjançant succió al buit. Com s'indica en el dibuix adjunt, en la graella de baix es col·loquen els vials per recollir els extractes o eluats.

b) **Per centrifugació.** Es centrifuga el cartutx dins d'un tub que reculla l'eluat (Fig. 13, esquerra).

c) **Per pressió positiva.** Forçant el pas de l'eluent amb aire comprimit, o pressionant a mà amb una xeringa (Fig. 13, dreta).

Aplicació a la preconcentració d'analits. Per a preconcentrar es deuen utilitzar columnes que asseguruen una forta retenció dels analits. Aquests estaran a concentracions molt baixes en el problema i es deu assegurar la seua retenció quantitativa. L'ús de l'extracció en fase sòlida permet el pas de grans volums de problema (com per exemple entre 1 i 100 litres) per una columna que conté una menuda quantitat de fase sòlida (de 100 mg a 1 g). Tot el compost d'interès pot quedar concentrat en la fase sòlida, per a ser finalment eluït amb menys d'1 mL d'eluent.

La Fig. 14 mostra un muntatge experimental en el qual s'està aspirant simultàniament mostra de 4 grans flascons, fent-la passar gota a gota per 4 cartutxos de SPE. L'aspiració es manté gràcies al tancament hermètic entre els tubs i la boca dels cartutxos d'extracció. Muntatges d'aquest tipus són molt útils per extraure analits amb comoditat a partir de grans volums de mostres ambientals (habitualment aigües).



Fig. 14. Muntatge per SPE de grans volums de mostra

S'aconsegueixen factors de preconcentració de l'ordre de 100 a 1000, i en casos favorables es poden aconseguir factors molt més grans. *Exemple:* Si es parteix de 100 L i s'elueix amb 1 mL, el factor de preconcentració és $100 \text{ L} / 1 \text{ mL} = 10^5$. Un factor de preconcentració tan alt únicament es pot aconseguir si l'analit es reté molt fortament, i si a més la mostra no conté altres compostos competidors que desplacen l'analit i saturen la fase sòlida.

Retenir interferències en comptes d'analits? El mode habitual de treball consisteix a elegir la fase sòlida i la dissolució de condicionat de manera que els analits queden retinguts, mentre que la resta dels components de la matriu resulten eluïts. També és possible treballar del mode oposat, de manera que es retinguen els components no desitjables de la matriu (interferències), per tal d'obtenir una mostra lliure d'aquests. No obstant això, aquesta forma de treballar sol ser menys convenient, pel següent:

- No produeix preconcentració, sinó dilució dels analits amb les dissolucions de condicionat i llavat.
- Quan els analits es troben a baixa concentració en una matriu que conté components no desitjables en concentracions elevades (que és un cas prou habitual), la retenció de les interferències sense que s'aplegue a saturar la fase sòlida en requereix una gran quantitat, fet que resulta poc pràctic i antieconòmic.
- Moltes mostres contenen uns pocs components en què estem interessats (i els anomenem analits), a voltes només un, mentre que hi sol haver una àmplia diversitat de possibles interferències. En aquests casos, no és fàcil trobar un únic sorbent que retenga totes les interferències sense retenir també els analits.

Per tant, cal concloure que és millor cercar un sorbent per retenir els analits i no pas les interferències, però no obstant això fer-ho al revés pot ser avantatjós quan les interferències són poques, tal volta única, i no estan excessivament concentrades.

Comparació entre la SPE i la cromatografia líquida. La SPE es pot considerar com una variant de la cromatografia líquida. La primera semblança es troba en la **terminologia**. Molts termes utilitzats en SPE s'apliquen també a la cromatografia (tant en GC com en LC, però especialment en LC). Per exemple, traure un compost d'una columna és "eluir", les dissolucions que s'introdueixen en la columna es denominen "eluent", i quan n'emergeixen es denominen "eluats". A més, l'interior dels cartutxos d'extracció o fases sòlides i les columnes utilitzades en cromatografia líquida tenen la mateixa composició química i la mateixa estructura física. Per contra, la SPE es distingeix de la cromatografia líquida en els següents aspectes:

a) En SPE es persegueix un fi més simple: separar la mostra en **únicament dues fraccions** (com a màxim en tres), una de les quals conté l'analit i l'altra la resta de components de la mostra, mentre que en cromatografia líquida es pretén descompondre la mostra en múltiples fraccions.

b) La SPE s'utilitza en **preparació de la mostra**, per fer després una mesura **fora de línia** (*off-line*), però més sovint per aplicar després una altra tècnica de separació més potent, inclosa la cromatografia líquida. En canvi, la columna de separació cromatogràfica sempre està acoblada a un detector que permet la identificació i quantificació **en línia** (*on-line*) dels analits.

c) En comparació amb la cromatografia líquida, **l'eficàcia de la SPE és molt baixa**, fet que resulta ser una conseqüència de la gran mida de les partícules de l'interior dels cartutxos, mai inferior a 10 μm . En canvi, les partícules de 1.5 a 5 μm són habituals en cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC). Els reblerts de partícules de gran diàmetre tenen l'avantatge que ofereixen molt poca resistència al pas de les dissolucions, és a dir, es necessita molt poca pressió per fer-les passar pels cartutxos. Cal tenir en compte que la secció lliure (accessible a les fases mòbils) en un reblert de partícules de 10 μm no és el doble que en un reblert de 5 μm , sinó quatre voltes més gran. Per partícules de 25 μm comparades amb partícules de 5 μm , la secció lliure de les primeres és 25 voltes més gran. Com en cromatografia, en SPE també s'utilitzen fases estacionàries monolítiques, constituïdes per una peça única de sòlid porós, en lloc de reblerts de partícules.

d) La gran mida de les partícules de l'interior i la curta longitud dels cartutxos permet utilitzar un material **simple i econòmic**, sense bombes ni pressions elevades (fer el buit és suficient), estalviant en equipament i en **temps**.

7. Els suports sòlids i les fases estacionàries enllaçades emprades en SPE i en LC

El **suports sòlids** més comuns en SPE i HPLC estan constituïts per partícules microporoses de sílice (SiO_2), encara que a voltes es fan servir altres materials com alumina (Al_2O_3), zircònia (ZrO_2), carboni grafitic o polímers. Els cartutxos i columnes reblertes contenen rebliments de partícules empaquetades a l'atzar (Fig. 15). Les partícules són poroses, per augmentar la seva superfície activa. Cartutxos i columnes també poden contenir un monòlit o sòlid porós, normalment fet de sílice o d'un polímer. En aquest cas, es distingeix entre els macroporus, per on circula

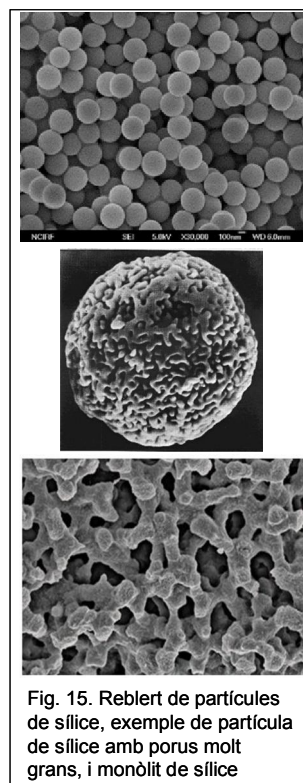


Fig. 15. Reblert de partícules de sílice, exemple de partícula de sílice amb porus molt grans, i monòlit de sílice

principalment la fase mòbil, i els microporus que serveixen per augmentar la superfície activa.

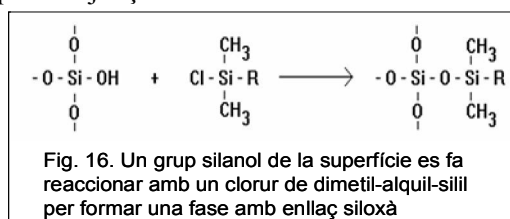
La **superfície del suport sòlid** pot constituir per si mateixa la fase activa, açò és, la que reté els compostos d'interès. En aquest cas actua per **adsorció**. Un avantatge de la retenció per adsorció és la possibilitat de separar isòmers posicionals. A causa d'efectes estèrics, diferents isòmers poden mostrar retencions molt distintes sobre una superfície. Per exemple, un anell aromàtic amb dos substituents en posició para (grups polars més separats) solen presentar una retenció molt més alta que els corresponents isòmers meta i orto (grups polars més junts).

Les fases enllaçades. És més habitual utilitzar **suports sòlids recoberts per una pel·lícula** molt prima (unes poques micres en GC i uns pocs nanòmetres en SPE i LC) d'un compost que és líquid a la temperatura de treball. Els soluts es dissolen en la **pel·lícula líquida**, és a dir, la fase els reté per **absorció**. Si fóra sòlida, les molècules dels soluts no podrien entrar entre les molècules veïnes de fase enllaçada, i no es tindria un mecanisme de retenció per repartiment, sinó per adsorció.

En principi, la pel·lícula de fase líquida podria estar simplement dipositada sobre el sòlid, banyant-lo. En canvi, s'obté una capa més fortament adherida si s'enllaça químicament sobre el suport sòlid. En una **fase enllaçada**, les molècules estan unides al sòlid suport mitjançant:

a) Enllaços **directes silici-carboni**: $\equiv\text{Si-CR}_2-$

b) Més freqüentment, mitjançant **enllaços siloxà**: $\equiv\text{Si-O-Si(CH}_3)_2\text{-CR}_2-$, amb un oxigen i un grup dimetil-silil que fan de pont (Fig. 16).



Si hi ha zones de sílice sense recobrir amb fase enllaçada, es produeix **retenció per adsorció**, la qual cosa dona lloc a extenses cues en els pics del cromatograma. Les cues impliquen soluts que no acaben mai d'eluir del tot, i per això constitueixen un greu inconvenient. Això és perquè la superfície de la sílice no és homogènia i presenta llocs més i menys actius. Les **cues d'adsorció** són degudes a molècules de solut que han ocupat els llocs més actius, i per tant es resisteixen a eluir.

Per assegurar que no ha quedat superfície sense recobrir, els fabricants de fases estacionàries realitzen l'operació de recobriment amb el clorur d'alquil-dimetil-silil diverses vegades. Existeixen també fases enllaçades que han sigut sotmeses a una o dues operacions de **recobriment final** o *endcapping* amb clorur de trimetil-silil. Com que aquest reactiu és poc voluminós, penetra a través de la capa ja enllaçada, acabant de derivatitzar els grups silanols que encara queden actius.

Els enllaços directes Si-C i siloxà (Si-O-Si) són **estables en un interval moderat de pH**; una fase enllaçada es destrueix ràpidament quan es posa en contacte amb dissolucions de $\text{pH} < 2$ o $\text{pH} > 8$. Això limita la regió de pH de les fases mòbils, les quals tampoc no poden contenir oxidants. Les denominades "fases polimèriques" (el suport sòlid és un polímer en lloc de sílice), i altres fases, com les de carboni gràfic i les de partícules de ZrO_2 , permeten estendre els límits de pH imposats per la limitada estabilitat dels enllaços siloxà i Si-C. No obstant això, en tota la història de la SPE i de la LC les fases de sílice han sigut i continuen sent les més emprades.

Avantatges de les fases enllaçades. En comparació amb sòlids banyats per un recobriment líquid, l'ús d'una fase enllaçada té grans avantatges:

a) El recobriment és molt més **estable i reproductible**, i no deixa zones extenses de sòlid sense recobrir.

b) S'aconsegueixen recobriments **d'espessor monomolecular**, cosa que accelera els equilibris de sorció i de desorció dels analits. Assolir ràpidament l'equilibri de repartiment del solut entre les fases mòbil i estacionària és molt important en cromatografia.

c) Un recobriment per banyat té moltes limitacions, ja que únicament pot utilitzar-se en contacte amb líquids en els quals no es dissolga. Per exemple, un recobriment amb un hidrocarbur pesat únicament es pot utilitzar en contacte amb aigua, i un recobriment amb un polímer hidrofílic únicament es pot utilitzar en dissolvents molt poc polars i en absència total d'aigua. Al contrari, amb un recobriment enllaçat es té molta **llibertat per elegir la composició del recobriment, i la composició de la fase líquida** en contacte amb el mateix. No existeixen limitacions imposades per la solubilitat mútua de les fases, i únicament es deu procurar no superar els límits d'estabilitat dels enllaços Si-C o siloxà ($2 < \text{pH} < 8$ i absència d'oxidants forts).

Mecanismes de retenció. Els dos mecanismes de retenció més habituals en SPE i LC analítica són el repartiment entre dues fases i el bescanvi de ions. Depenent de les polaritats de les fases, es tenen tres modes de modes de repartiment: fase reversa o inversa, fase normal i HILIC.

Fase reversa o inversa (RP-SPE, *reverse phase*), en el qual la fase enllaçada és hidrofòbica i la mòbil hidrofílica (aigua, barreges hidro-orgàniques o dissolvents polars miscibles amb aigua). La més habitual és la d'octadecil-síllice (C18) (Fig. 17). Si la retenció dels analits és excessiva, s'utilitza octil (C8), butil (C4) o etil-síllice (C2). Existeixen altres fases enllaçades hidrofòbiques, com la propil-pentafluoro-fenil-síllice (PFP, *penta-fluoro-phenyl*) (Fig. 18). El grup propil serveix de "braç" per separar l'anell aromàtic de la superfície i facilitar la seva interacció amb els soluts. En relació amb els hidrocarburs alifàtics, com C18 o C8, la fase PFP proporciona una selectivitat diferent (més retenció de soluts polaritzables).

En RP-SPE, el cartutx o la columna es condiciona amb aigua, o amb tampons aquosos diluïts, i la mostra deu ser també aquosa (compatible amb la fase mòbil). L'elució final dels analits es realitza augmentant la hidrofobicitat de la fase líquida, habitualment utilitzant metanol ($\text{H}_3\text{C-OH}$), i de vegades altres dissolvents miscibles amb aigua, com acetonitril ($\text{H}_3\text{C-CN}$), tetrahidrofurà ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}$) o iso-propanol [$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$].

Fase normal (NP-SPE, *normal phase*), en la qual la fase enllaçada és molt polar. S'utilitzen sílice sense recobrir (retenció per adsorció), i també sílice derivatitzada amb fases enllaçades polars tals com propil-ciano (-CN), propil-diol (-CHOH- CH_2OH) o propil-amino (- NH_2). El cartutx es condiciona amb heptà o mesclades d'hidrocarburs (èter de petroli). L'elució final dels analits es fa augmentant la polaritat de l'eluent, passant de l'hidrocarbur apolar a un hidrocarbur polar miscible amb heptà, tal com diclorometà o cloroform, o a un alcohol lleuger també miscible amb l'heptà, com l'iso-propanol. Cal observar que l'iso-propanol és un dissolvent universal, miscible amb tot tipus de fases líquides hidrofíliques i hidrofòbiques.

Els termes "**reversa**" i "**normal**" obeeixen a raons històriques, ja que primer es desenvolupà la cromatografia en fase "normal" (M. Tswett al 1903 emprava columnes de carbonat càlcic eluïdes amb gasolina), i amb posterioritat aparegué la cromatografia en fase inversa o "reversa". Actualment, tant

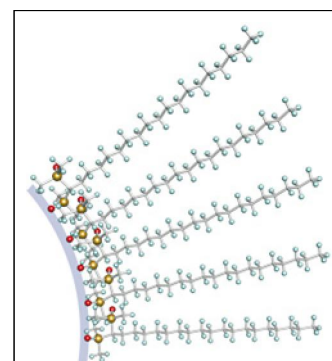


Fig. 17. La fase reversa més habitual: octadecil-síllice o C18

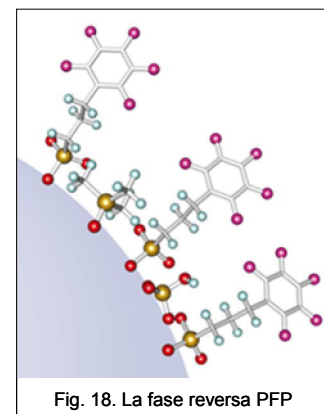


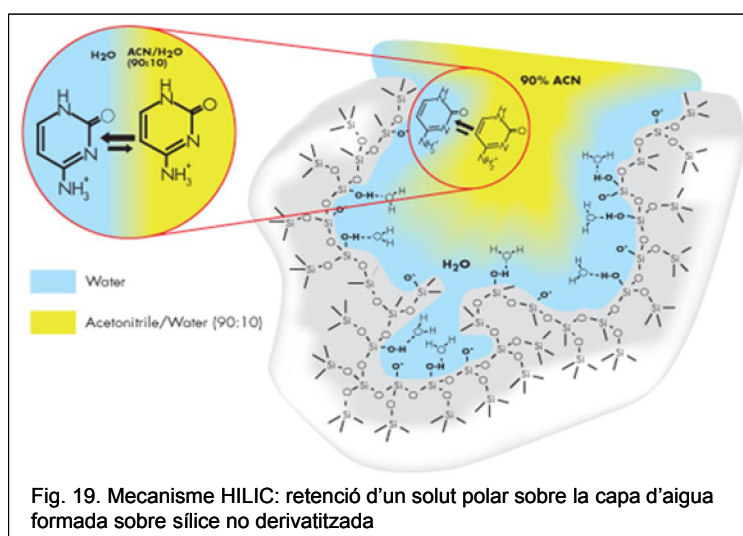
Fig. 18. La fase reversa PFP

en cromatografia com en extracció líquid-líquid, el treball en fase reversa és molt més habitual que en fase normal. Les raons són:

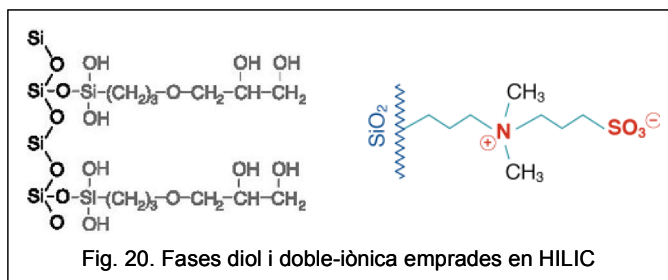
- En comparació amb les matrius lipòfiles (olis, grasses, hidrocarburs), la major abundància i interès de les matrius aquoses en el context ambiental, farmacèutic, bioquímic i industrial.
- La gran varietat d'analits poc polars (o amb una part de la molècula apolar) presents en baixes concentracions en mostres aquoses, i que experimenten retenció en les fases enllaçades apolars o poc polars (drogues, pesticides, contaminants, etc), i el seu interès des dels punts de vista ambiental, farmacèutic, bioquímic, etc.
- L'excessiva sensibilitat de l'elució en fase normal enfront de la presència de quantitats menudes d'aigua en els eluents, cosa que redueix la reproductibilitat de les separacions.

HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*).

És un mode especial de fase normal, proposat per A. Alpert en 1990. Consisteix a utilitzar una fase estacionària polar (tal com SiO_2 , o bé, SiO_2 -alquil-diòl) i una fase mòbil també polar i miscible amb aigua, habitualment acetonitril, en presència de certa quantitat d'aigua. Espontàniament es forma una capa rica en aigua sobre la superfície polar de la fase estacionària. Els soluts polars prefereixen aquesta capa aquosa (més polar que l'acetonitril), i es reparteixen entre ella i la resta de la fase mòbil (Fig. 19).



A banda de sílice no derivatitzada i de fases SiO_2 -alquil-diòl, en HILIC també es fa ús de fases que tenen un ió doble o zwitteriòniques (de l'alemany, *zwitter*, que vol dir hermafrodita) (Fig. 20). En aquestes fases, la càrrega positiva i negativa estan prou pròximes, de manera que no son catióniques ni anióniques, sinó simplement, molt polars. Per la seva elevada polaritat, aquestes fases retenen una capa d'aigua que fa la funció de fase estacionària. El repartiment HILIC fa possible la SPE i la HPLC en mode normal amb mostres hidrosolubles. Té interès per a la separació de soluts molt polars (normalment, iònics).



Retenció per bescanvi iònic. Per a retenir **cations** mitjançant **becanvi catiónic** s'utilitzen fases enllaçades anióniques carboxilades o sulfonades, les quals contenen grups tals com benzil-sulfat ($-\text{C}_6\text{H}_5-\text{SO}_3^-$) o benzil-carboxilat ($-\text{C}_6\text{H}_5-\text{COO}^-$). Les fases sulfonades es coneixen com SCX (*strong cation exchanger*), i les que contenen grups carboxilats com WCX (*weak cation exchanger*) (Fig. 21).

El condicionat es realitza amb tampons diluïts (de baixa força iònica), i l'elució dels analits amb una dissolució concentrada d'un ió competidor, com amoni o potassi, que desplaça els cations retinguts. Les fases estacionàries d'alquil-carboxilat són àcids dèbils, la qual cosa permet eluir els analits simplement baixant el pH amb un àcid diluït (la fase estacionària es protona de manera que deixa de tenir propietats bescanviadores).

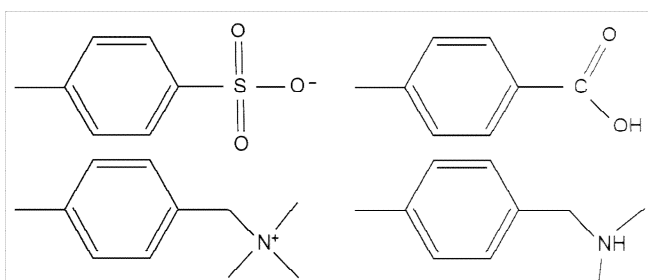


Fig. 21. D'esquerra a dreta i de dalt a baix: bescanviadors de cations fort (sulfonat) i dèbil (carboxilat), i bescanviadors d'anions fort (amoni quaternari) i dèbil (amina secundària)

Per a retenir **anions** mitjançant **bescanvi aniónic** s'utilitzen fases enllaçades catióniques que contenen grups amoni quaternari (benzil-trimetil-amoni) o grups amino (benzil-dimetilamoni o benzil-amoni) (Fig. 21). Les fases que contenen amoni quaternari es coneixen com SAX (*strong anion exchanger*), i les que contenen grups benzil-amino com WAX (*weak anion exchanger*). De la mateixa manera que en bescanvi catiónic, el condicionat es realitza amb tampons diluïts (de baixa força iònica), i l'elució dels analits amb una dissolució concentrada d'un ió competidor, habitualment clorur o perclorat. Les fases estacionàries tipus WAX són bases dèbils (el log K dels grups benzil-amino és aprox. 5), la qual cosa permet eluir els analits simplement augmentant el pH (en lloc d'haver-los de desplaçar amb una dissolució d'un ió competidor, que pot ser més difícil d'aconseguir).

FI DEL TEMA D'INTRODUCCIÓ A LES TÈCNiques DE SEPARACIÓ

2. TEORIA DE LA CROMATOGRÀFIA

1. Concepte de cromatografia, i classificació de les tècniques cromatogràfiques.
2. Paràmetres fonamentals en cromatografia.
3. Les dues teories de la cromatografia.
4. La teoria de l'equilibri, la màquina de Craig i concepte de HETP.
5. La teoria dinàmica i l'equació de velocitat.
6. Mesura experimental de l'eficàcia.
7. Resolució i factor de selectivitat.
8. Relació entre resolució i retenció. El problema general de l'elució.
9. Característiques generals dels detectors utilitzats en cromatografia.

1. Concepte i classificació de les tècniques cromatogràfiques

Concepte. La cromatografia, descrita pel botànic rus Mikhail Tswett el 1901, comprèn un ampli ventall de tècniques utilitzades per a separar i analitzar mostres complexes. Els components de les mostres es distribueixen entre dues fases (o entre una fase i una interfase), una mòbil i l'altra estacionària. La fase mòbil avança en la direcció de l'eix del sistema separador, mantenint un íntim contacte amb la fase estacionària. Quan una mostra entra en un sistema cromatogràfic, la fase mòbil tendeix a fer avançar els seus components en la direcció del flux, mentre la fase estacionària retarda l'avanç dels components amb què té més afinitat. Els components més retinguts viatgen a menor velocitat, i són eluïts més tard que els components menys retinguts. A l'eixida del sistema cromatogràfic es disposa d'un o diversos detectors per a identificar i quantificar els components a mesura que van sent eluïts. En general, les separacions cromatogràfiques són ràpides, reproduïbles i selectives. Fan possible separar en poc temps mesclades molt complexes, i distingir entre soluts amb propietats molt semblants.



Fig. 1. Mikhail Tswett

Classificació de les tècniques cromatogràfiques. La gran diversitat de les tècniques cromatogràfiques aconsella utilitzar almenys tres criteris diferents per a la seua classificació: naturalesa de les fases, disseny del sistema separador i mode operatiu. L'estudi d'aquests tres criteris és útil per a tenir una visió global de les tècniques cromatogràfiques.

A) Per la naturalesa de les fases

Atenent a la **naturalesa de la fase mòbil** es distingeix entre cromatografia gasosa o de gasos, GC (*gas chromatography*, la fase mòbil és un gas), cromatografia líquida, LC (*liquid chromatography*, la fase mòbil és un líquid) i cromatografia de fluids supercrítics, SFC (*supercritical fluid chromatography*, la fase mòbil és un fluid supercrític).

La naturalesa de la fase estacionària és especialment important perquè estableix el mecanisme de retenció, que és el responsable de la separació dels components de la mostra. Atenent a la **naturalesa de la fase estacionària** es tenen a la vegada subdivisions com ara:

- a) **Cromatografia gasosa per adsorció o gas-sòlid:** La fase estacionària és un sòlid, i la separació es deu al producte de l'equilibri dels soluts entre l'estat gasós i la seua adsorció sobre la superfície del sòlid. Sols s'utilitza en la separació de gasos permanents, com oxigen, nitrogen, argó, etc. La separació de molècules més complexes mitjançant cromatografia gasosa d'adsorció és problemàtica (els pics apareixen amb llargues "cues"), pel fet que la superfície dels sòlids és molt irregular i presenta llocs molt actius i altres poc actius.

b) **Cromatografia gasosa per dissolució o gas-líquid**: La fase estacionària és un líquid. Les fases estacionàries formen una pel·lícula molt prima (unes desenes de micres) sobre un suport sòlid. Poden estar simplement depositades sobre el suport sòlid (fase retinguda per mullat), o bé pot tractar-se d'un polímer retingut sobre la superfície mitjançant unions covalents (fase enllaçada). La separació dels soluts és producte del seu equilibri entre el seu estat gasós i la seua dissolució en el líquid. No és un equilibri de repartiment (partició), ja que la fase mòbil és un mer vehicle de transport dels analits en estat gasós, no tenint cap afinitat pels soluts. Es pareix més a una destil·lació fraccionada que a una verdadera cromatografia. És molt utilitzada en la separació de qualsevol tipus de soluts a condició que siguin volàtils a temperatures no superiors a uns 350 °C, o que es puguin convertir fàcilment en derivats volàtils.

c) **Cromatografia líquida d'adsorció o líquid-sòlid**: La fase estacionària és la superfície d'un sòlid, i la separació dels soluts és producte del seu equilibri entre la fase mòbil i la interfase líquid/sòlid. S'utilitza poc amb finalitat analítica, però és molt habitual amb fins preparatius.

d) **Cromatografia líquida d'absorció, partició o repartiment líquid-líquid**: La fase estacionària és una fase líquida enllaçada, i la separació dels soluts és producte del seu equilibri entre les dues fases líquides. Permet aconseguir eficàcies molt altes, per la qual cosa és molt utilitzada. La cromatografia líquida d'alta eficàcia es coneix amb les sigles HPLC (*high performance liquid chromatography*). La HPLC és molt habitual en la identificació i quantificació de tot tipus de soluts. És especialment útil en la separació i determinació de soluts no volàtils, que no poden separar-se per GC.

e) **Cromatografia líquida d'intercanvi o bescanvi iònic**: La fase estacionària és una fase líquida enllaçada amb capacitat per a bescanviar ions. Els soluts han de ser iònics, i la seua separació és producte dels equilibris de desplaçament d'uns ions per d'altres del mateix signe. Es practica tant amb fins preparatius com analítics. En aquest últim cas, se sol practicar a alta pressió i es coneix amb les sigles IC (*ion chromatography*). La IC és en realitat la "HPLC de bescanvi iònic".

f) **Cromatografia líquida d'exclusió**: La fase estacionària és un sòlid porós, amb porus de grandària molecular. La separació dels soluts és producte de la discriminació per grandàries, açò és, de la retenció dels soluts més xicotets a l'interior dels porus. Es practica a alta pressió i es coneix com SEC (*size exclusion chromatography*). És important en l'anàlisi de macromolècules d'origen bioquímic o sintètic (polímers).

B) Pel disseny del sistema separador

Les tècniques cromatogràfiques es classifiquen també pel **disseny del sistema separador** o forma del medi físic en què es produeix la separació. Atenent a aquest criteri es distingeix entre cromatografia en **columna** i en **llit obert**.

En GC és molt habitual el treball amb **columnes capil·lars** (Fig. 2), els diàmetres de les quals són inferiors a 1 mm, amb longituds que oscil·len entre 15 i 90 m. En estes columnes, la fase estacionària és el recobriment de la paret interna, i la fase mòbil circula pel canal central. En GC s'utilitzen també columnes reblertes, de diversos mil·límetres de diàmetre, i amb longituds de fins a 10 m. En aquestes columnes, la fase estacionària és el recobriment de les partícules. Les columnes capil·lars proporcionen separacions molt més eficaces, per la qual cosa són utilitzades amb molta més freqüència.



Fig. 2. Columna capil·lar per GC

Les **columnes per a HPLC** són molt més curtes, típicament entre 3 i 30 cm, i amb diàmetres interns d'entre 1 i 4.6 mm (Fig. 3). En HPLC s'utilitzen dos tipus de llit cromatogràfic:

(i) **Columnes reblertes** (o particulades), açò és, amb un farcit o rebliment de partícules poroses (Fig. 4). Els rebliments de bona qualitat contenen partícules aproximadament esfèriques, d'un estret rang de grandàries (quasi iguals), empacades a l'atzar. L'espai lliure interparticular, per on circula la fase mòbil, és de l'ordre del 40 % de l'espai total ocupat pel rebliment (la porositat interparticular és 0.4).



Fig. 3. Columna d'acer per HPLC

(ii) **Columnes monolítiques**, constituïdes per una peça única de sílice porosa o d'un polímer porós (Fig. 4). L'espai lliure o porositat és prou major que en els rebliments de partícules (fins a un 0.8), la qual cosa permet mantenir un gran cabal de fase mòbil amb una pressió baixa.

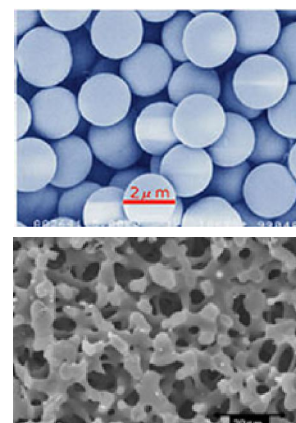


Fig. 4. Dalt, reblert de partícules de sílice; baix, monòlit de sílice

La fase estacionària pot ser la superfície de les partícules o del monòlit, però més sovint està constituïda pel seu recobriment. L'eficàcia és inversament proporcional a la grandària de les partícules en columnes reblertes, i al diàmetre dels porus en columnes monolítiques. Per aquesta raó, les majors eficàcies s'aconsegueixen amb partícules molt fines (amb diàmetres de 1.7 a 5 µm), o amb monòlits amb porus molt estrets (de l'ordre de 2 a 4 µm). A canvi, es requereix una alta pressió per a mantenir el cabal de fase mòbil, especialment en el cas de les columnes reblertes, com a conseqüència de la seva menor porositat inter-partícula.

Per la seua banda, les distintes tècniques cromatogràfiques en **llit obert** utilitzen els següents suports:

- Una **capa fibrosa**: la fase estacionària és una làmina de paper (cel·lulosa) o d'acetat de cel·lulosa.

- Una **capa de partícules**: la fase estacionària és una capa prima de partícules depositada sobre una làmina de suport (de vidre, alumini o plàstic) (Fig. 5). La naturalesa de les partícules i de la fase estacionària són les mateixes que en cromatografia en columna, si bé s'incorpora un aglomerant per a mantenir-les adherides a la placa i entre si. La tècnica es coneix com a **cromatografia sobre capa fina** (TLC, *thin layer chromatography*).

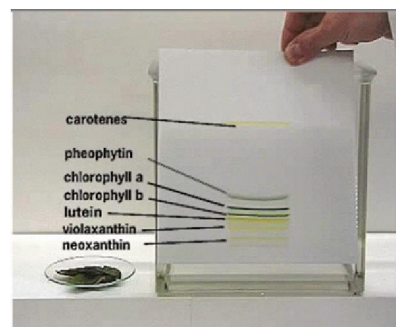


Fig. 5. Cromatografia sobre capa fina

- Una **capa de gel**: la fase estacionària és una capa prima de gel de poliàcrilamida o d'un altre polímer insoluble i microporós, depositada sobre una placa o làmina suport.

C) Pel mode operatiu

Atenent al **mode operatiu** es distingeixen tres tipus de cromatografia: l'elució zonal, l'elució frontal i l'elució per desplaçament. El mode més utilitzat en cromatografia analítica és l'elució zonal, i, de fet, la resta del present curs es dedicarà al seu estudi. No obstant això, és important conèixer els altres modes de treball, ja que tenen la seua utilitat en àmbits i aplicacions concretes.

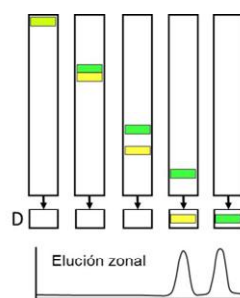


Fig. 6. Elució zonal

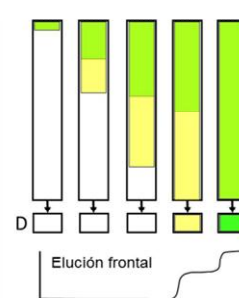


Fig. 7. Elució frontal

a) **En elució zonal o per bandes** la mostra s'introdueix tota d'una vegada, procurant que ocupe una zona o franja estreta al principi del sistema separador. A continuació s'elueix amb un flux continu de fase mòbil.

Idealment, els components de la mostra s'obtidran en forma de pics aïllats a l'eixida del sistema separador (Fig. 6).

b) **En elució frontal** la mostra s'introdueix en el sistema de forma contínua, constituint ella mateixa la fase mòbil. El sistema separador reté selectivament un (o alguns) dels seus components i deixa passar la resta. El component (o components) retingut no elueix fins que el sistema separador se satura (no és capaç de retenir més). Si es retenen diversos soluts, elueix primer el menys retingut. Els més retinguts elueixen més tard, en ordre de retenció creixent. No s'obtenen bandes, sinó fronts formats pels soluts que aconseguixen la seua saturació en el sistema (Fig. 7).

L'elució frontal s'utilitza amb dues finalitats: a) preconcentrar traces que són posteriorment eluides en un xicotet volum per mitjà d'un canvi de composició de l'eluent (és el mode habitual de treballar en extracció en fase sòlida); i b) purificar grans volums de dissolvents, inclosa la purificació d'aigua (s'utilitza una columna per a retenir les impureses no desitjades).

c) Com en elució zonal, **en elució per desplaçament** la mostra s'introdueix tota d'una vegada, ocupant una estreta zona al començament del sistema separador. Com a fase mòbil s'utilitza un dissolvent que és fortament retingut per la fase estacionària. El dissolvent desplaça tots els components de la mostra dels seus llocs d'unió amb la fase estacionària. Es té així una estreta zona de mostra que avança ràpidament en l'interior del sistema (Fig. 8).

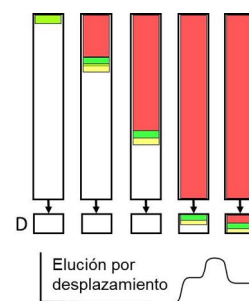


Fig. 8. Elució per desplaçament

A causa de l'elevada concentració dels components en la dita zona, la columna se satura en ells (fins que el dissolvent els desplaça). Els components més retinguts desplacen o "empenten" els menys retinguts, els quals elueixen primer, immediatament seguits dels components més retinguts, sempre en ordre de retenció creixent. Es tenen separacions poc eficaces però molt ràpides. L'elució per desplaçament és poc habitual, excepte en algunes indústries (dissolvents i combustibles).

2. Paràmetres fonamentals en cromatografia

Els paràmetres cromatogràfics (alguns dels quals ja es van introduir en el tema anterior) es poden dividir en tres grups: geomètrics, operatius i característics dels soluts.

Paràmetres geomètrics. Són els que depenen únicament del **disseny físic del sistema separador**, sent independents de les condicions de treball i de la naturalesa dels soluts. Són:

- volum total (V_T)
- volum ocupat per la fase mòbil (V_M)
- volum ocupat per el suport sòlid (V_{SS})
- volum ocupat per la fase estacionària (V_S)
- longitud de la columna (L)

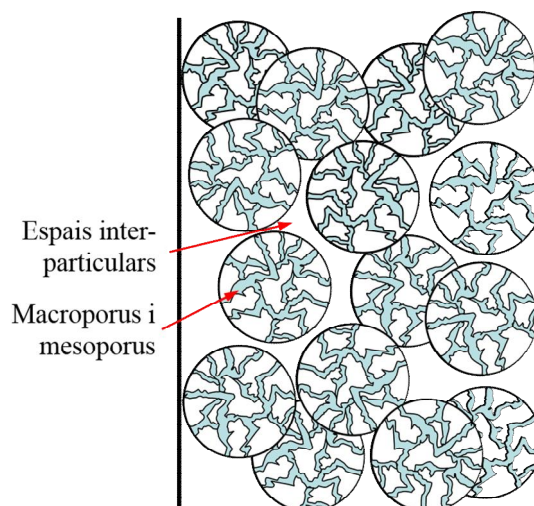


Fig. 9. Espais accessibles a la fase mòbil en columnes reblertes

El volum ocupat per la fase mòbil, V_M , inclou **tots els espais accessibles a la fase mòbil**, des del punt on s'injecta la mostra fins a l'eixida de la cel·la del detector. Així, en columnes reblertes, V_M , inclou els espais entre les partícules del rebliment i els porus de les partícules (Fig. 9), més els volums interns dels tubs que

uneixen el sistema d'injecció a la columna, i la columna amb el detector, i els volums interns de les connexions, des de l'injector de mostra fins a la cel·la del detector, ambdós inclosos.

També s'anomena **volum mort** (*dead volume*), i és el volum de fase mòbil que es necessita per a eluir (o "desplaçar" des del punt d'injecció fins al detector) un solut no retintut per la fase estacionària. En extracció líquid-líquid s'ha definit la **constant de distribució** com $K_D = C_o/C_a$ (conc. de solut en la fase orgànica dividit per conc. de solut en la fase aquosa, en l'equilibri). En cromatografia de repartiment s'utilitza el mateix concepte, si bé, **substituint la fase orgànica per l'estacionària i l'aquosa per la mòbil** (com si el solut fóra "extret" per la fase estacionària): $K_D = C_S/C_M$. Per tant, un solut no retintut té $K_D = 0$.

En columnes reblertes, el volum mort és, per tant, el volum total intern del sistema menys els volums ocupats pel suport sòlid i per la fase estacionària (pel recobriment del suport sòlid). En columnes capil·lars obertes (sense rebliment), el volum mort és igualment el volum accessible a la fase mòbil, açò és, el volum intern del sistema des del punt d'injecció fins al punt de detecció, descomptant el volum ocupat per la fase estacionària (pel recobriment de la paret capil·lar). En tots els casos, la relació entre els volums és:

$$V_T = V_{SS} + V_S + V_M$$

Paràmetres operatius. Són els que depenen de les **condicions de treball**, sent independents de la naturalesa dels soluts (Fig. 10). Són:

- **Temps mort**, t_M , o temps que utilitza un solut no retintut per a travessar el sistema (*dead time*).
- **Velocitat lineal** de la fase mòbil, \bar{u} .
- Cabal volumètric, F

Les relacions entre aquestes variables són:

- La **velocitat lineal** és la distància que avança (de mitjana en una secció transversal del sistema) la fase mòbil per unitat de temps, i també, la velocitat a què avança un solut no retintut. Per tant:

$$\bar{u} = L / t_M \quad (1)$$

- El **cabal volumètric** és el quocient entre qualsevol volum de fase mòbil, V , i el temps utilitzat per aquest volum per a travessar el sistema, t , i per tant: $F = V / t$, i també: $F = V_M / t_M$.

- La velocitat lineal, \bar{u} , és directament proporcional al cabal, F . La relació entre ambdós ve donada per: $\bar{u} = F / S$, on S és la **secció lliure** del sistema separador. En una secció transversal d'una columna cromatogràfica, la secció lliure és la fracció de l'àrea que és accessible a la fase mòbil.

Problema: Suposem una columna de HPLC de rebliment en què la columna té 10 cm de longitud i 0.46 cm de diàmetre intern, i en l'interior de la qual la fase mòbil ocupa el 40% del volum (la porositat interparticular és 0.40, que és un valor típic en columnes reblertes). Si es treballa a un cabal de 0.30 mL/min, calcular la velocitat lineal de la fase mòbil (a) i el temps d'elució d'un solut no retintut (b).

Resposta: La secció lliure és $S = 0.4 \pi r^2 = 0.0665 \text{ cm}^2$. Per tant:

a) $\bar{u} = F/S = (0.30 \text{ cm}^3 / \text{min}) / 0.0665 \text{ cm}^2 = 4.51 \text{ cm} / \text{min}$

b) $t_M = L / \bar{u} = 10 \text{ cm} / 4.51 \text{ cm} / \text{min} = 2.2 \text{ min}$

Paràmetres característics dels soluts. Són la **raó o constant de distribució** ($K_D = C_S / C_M$), el temps i el volum de retenció (t_R i V_R), la velocitat del solut (v), i el factor de capacitat o retenció relativa (k). Es defineixen com segueix (Fig. 10):

- **Constant de distribució, K_D :** Com s'ha indicat, en cromatografia, K_D es defineix com la concentració total de solut en la fase estacionària, C_S , dividit per la concentració total de solut en la fase mòbil, C_M , açò és: $K_D = C_S / C_M$

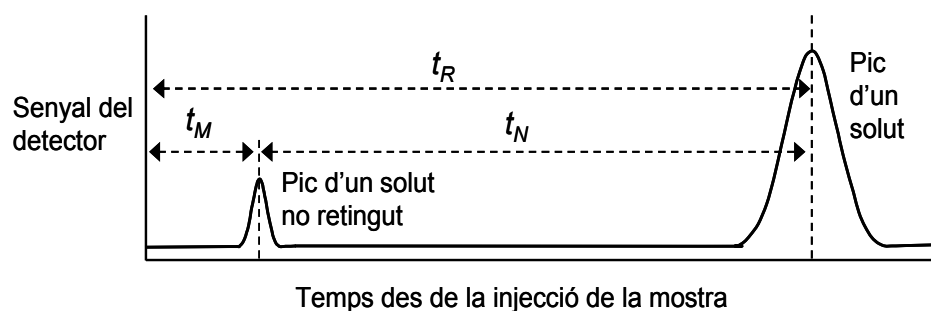


Fig. 10. Mesura del temps mort, temps de retenció i temps net sobre un cromatograma

- **Temps de retenció d'un solut, t_R :** temps transcorregut des de la injecció (introducció en el sistema) fins el moment en què es detecta la màxima concentració de solut a l'eixida del sistema separador (màxim del pic d'elució). La velocitat amb la qual es mou el solut és:

$$v = \Delta L / \Delta t = L / t_R \quad (2)$$

Aquesta velocitat és una fracció de la velocitat lineal de la fase mòbil, \bar{u} :

$$v = \bar{u} \frac{m_M}{m_M + m_S} = \bar{u} q \quad (3)$$

Aquesta expressió indica que la velocitat del solut és proporcional a la fracció massica del mateix que es troba a la fase mòbil. Si dita fracció és zero (tot el solut està en la fase estacionària), el solut no avança, i si és la unitat (tot el solut està en la fase mòbil) ho fa a la velocitat de la fase mòbil.

- **Volum de retenció d'un solut, V_R :** volum de fase mòbil gastat durant el temps de retenció del solut, o volum de fase mòbil que és necessari utilitzar per a eluir el solut. El quocient entre volum i temps de retenció de qualsevol solut és el cabal volumètric: $F = V_R / t_R$.

- **Factor de capacitat o retenció relativa, k :** El factor de capacitat es defineix en cromatografia de manera anàloga a com es va definir en extracció líquid-líquid, com a relació entre la massa de solut en la fase estacionària (en compte de la fase orgànica) dividit per la massa de solut en la fase mòbil (en compte de la fase aquosa):

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{c_S V_S}{c_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \quad (4)$$

En cromatografia, el factor de capacitat té també el significat de “**retenció relativa**”:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \quad (5)$$

Aquesta equació indica que **la retenció relativa, k** , és el **retard cromatogràfic en unitats de temps mort**, açò és, el **nombre de temps morts que es retarda un solut** retingut per la fase estacionària respecte al front o capdavant de fase mòbil, o el que és igual, respecte al pic d'un solut no retingut. A voltes, el numerador d'aquesta expressió s'anomena el **temps net**. Per a demostrar aquesta expressió es parteix de l'equació (3):

$$v = \bar{u} \frac{m_M}{m_M + m_S} = \bar{u} \frac{1}{1 + m_S/m_M} = \bar{u} \frac{1}{1 + k} \quad (6)$$

substituint v per L/t_R i \bar{u} per L/t_M i aïllant k es té l'equació (5).

La **retenció relativa és un paràmetre cromatogràfic molt important**, perquè permet relacionar el temps (i el volum) de retenció d'un solut amb el paràmetre termodinàmic K_D . Reordenant l'equació (5):

$$t_R = t_M(1 + k) = t_M \left(1 + K_D \frac{V_S}{V_M} \right) \quad (7)$$

La qual cosa indica que **el temps de retenció és igual al temps mort més un temps de retard cromatogràfic** que depèn de K_D i de la relació de volums de les fases. Per tant, **la retenció relativa, k** , és un paràmetre **característic del solut** que depèn, a més a més, de la **naturalesa de les fases** (de la seua afinitat pel solut) i de la **relació de volums de les fases** (a més fase estacionària o menys fase mòbil, més retenció). No obstant això, és **independent de la longitud de la columna i del cabdal**. Cal observar que si es duplica la columna, es dupliquen ambdós el temps de retenció i el temps mort, de manera que k roman constant (veure equació 5).

3. Les dues teories de la cromatografia

En una separació cromatogràfica intervenen simultàniament **processos d'equilibri i processos dinàmics o de difusió**. La separació dels components de la mostra és el resultat d'ambdós tipus de processos. De fet, la separació cromatogràfica pot explicar-se tant des del punt de vista de l'equilibri químic, com des del punt de vista de les lleis de la difusió. Per aquesta raó, es van desenvolupar dues teories de la separació cromatogràfica: la **teoria de l'equilibri** i la **teoria dinàmica o de velocitat**.

La teoria de l'equilibri es deu a **Archer Martin i Richard Synge** (Fig. 11) el treball dels quals, publicat en 1941, va ser premiat amb el Premi Nobel de Química. La teoria de l'equilibri posa l'èmfasi en els aspectes termodinàmics de la separació cromatogràfica, i està inspirada en la destil·lació industrial en columnes de pisos, "safates" o "plats". La teoria de velocitat, desenvolupada per **J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg i A. Klinkenberg** en 1956, emfatitza els aspectes dinàmics de la separació (Fig. 12). Les dues teories van aportar visions complementàries, i van arribar a conclusions de gran utilitat per a explicar i modelitzar el comportament cromatogràfic dels soluts.



Fig. 11. A. Martin i R. Synge



Fig. 12. J. J. van Deemter

Les dues teories van explicar els **tres fenòmens bàsics** que tenen lloc durant una separació cromatogràfica. Aquests fenòmens són:

a) En termes absoluts, l'**eixamplament de les zones ocupades** pels soluts: quan més avança un solut, o quan més temps passa dins del sistema separador, més es dilueix. Exemple: un solut ocupa inicialment 10 μL (o dit d'una altra manera, una longitud de columna d'uns pocs micròmetres), i en eixir de la columna pot ocupar, per exemple, un volum de 40 μL o més, açò és, un solut quan elueix ocupa un volum prou major que el que ocupava inicialment (Fig. 13).

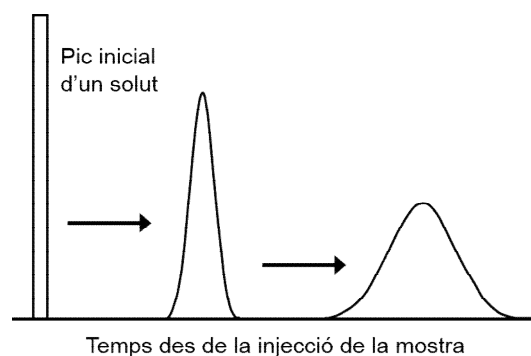


Fig. 13. Eixamplament dels pics amb el temps i la distància recorreguda

b) L'**estrenyiment relatiu de les zones ocupades** pels soluts: com més avança un solut, o com més temps passa, el solut més es dilueix, però el volum de fase mòbil utilitzat augmenta molt més ràpidament que el volum de dilució, per la qual cosa l'eixamplament aparent és en realitat un estrenyiment en termes relatius. Un solut quan elueix ocupa un volum prou major que el que ocupava inicialment, però el volum de fase mòbil que s'ha gastat és encara molt més gran que el volum ocupat pel solut. En la Fig. 14 es mostra un exemple gràfic, purament qualitatiu, de la idea d'estrenyiment relatiu.

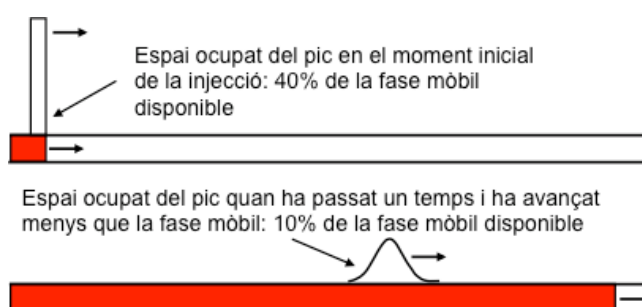


Fig. 14. Estrenyiment relatiu dels pics amb el temps i la distància recorreguda

c) La **migració diferencial de les zones ocupades** pels soluts: els soluts migren a diferents velocitats, uns més ràpids que altres. L'eixamplament de zones actua en contra de la separació, però l'estrenyiment relatiu i la migració diferencial obren a favor. La separació s'aconsegueix per l'acció conjunta d'aquests dos últims efectes.

4. La teoria de l'equilibri, la màquina de Craig i concepte de HEPT

D'acord amb la teoria de l'equilibri, la separació cromatogràfica es produeix com a resultat d'un gran nombre d'**etapes successives d'equilibri entre dues fases**, una mòbil i una altra estacionària. Cada etapa d'equilibri s'alterna amb una **etapa de transferència**, en què se separen les dues fases i es prepara l'etapa d'equilibri següent. En les etapes de transferència, la fase mòbil avança una posició dins del sistema, mentre que l'estacionària roman sempre en el mateix lloc.



Fig. 15. L. C. Craig

La màquina de Craig. A mitjan segle XX, per a comprovar experimentalment la teoria de l'equilibri, es van construir les màquines ideades per Lyman C. Craig (Fig. 15), que simulen els aspectes purament termodinàmics (d'equilibri) d'una separació cromatogràfica. En l'adreça següent:

http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletCraig/Applet_Craig2.html

es troba una demostració animada del funcionament d'aquestes màquines. Es recomana fer ús d'aquesta simulació, canviant els valors de K_D dels dos soluts.

Les màquines de Craig estaven construïdes amb tubs de vidre units entre si (Figs. 16 i 17). Un màquina típica podia tenir més de 100 tubs adossats en sèrie, cada un d'ells comunicat amb l'anterior i amb el següent a través d'un orifici d'entrada i un altre d'eixida. Els tubs estaven dissenyats per a establir contacte per agitació entre dues fases líquides immiscibles, una fase densa i una altra de lleugera.

Inicialment, cada tub es carregava amb una certa quantitat de la fase més densa (V_S), la qual no abandonava mai el tub. Quan tots els tubs estaven carregats, la màquina quedava disposada per treballar. El treball s'efectuava per cicles, i cada cicle constava de dues etapes (equilibri i transferència), separades per un període de descans, durant el qual se separaven les fases per gravetat.

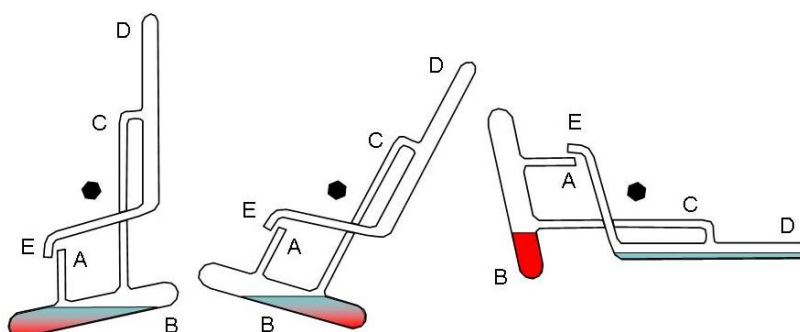


Fig. 16. Tub de Craig: A, entrada; B, bulb d'extracció; C, tub de separació de fases; D, bulb per la transferència de fase mòbil; E, eixida. Esquerra i centre: oscil·lacions durant l'etapa d'equilibri. Dreta: fase lleugera transferida al bulb de transferència (en el pròxim moviment eixirà per E cap al tub següent).

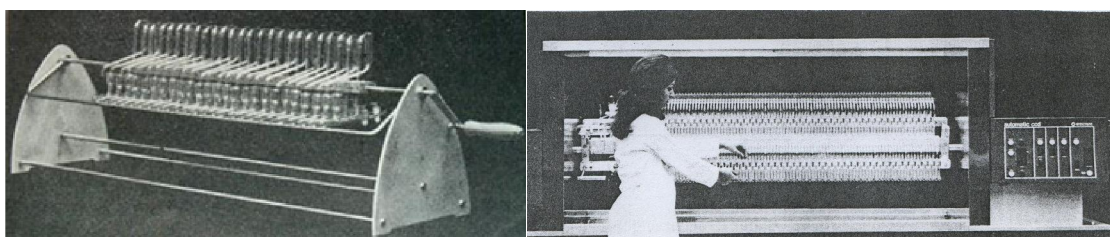


Fig. 17. Màquines de Craig (1950-60) amb 25 tubs i manual (esquerra) i amb 100 tubs i automàtica (dreta)

Abans del primer cicle, en el primer tub de la sèrie s'introdueix un cert volum de la fase més lleugera (V_M) junt amb els soluts que van a utilitzar-se a l'estudi. S'efectua la primera etapa d'equilibri (que afecta només el primer tub). Durant aquesta etapa el solut o soluts en estudi (en la figura, ambdós en el bulb B) difonen d'una fase a una altra fins que s'aconsegueix l'equilibri termodinàmic regit per la constant de distribució. A l'etapa d'equilibri segueix sempre un període de descans en què, en l'interior dels bulbs d'extracció (B) dels tubs es produeix la decantació per gravetat de les dues fases immiscibles.

En la primera etapa de transferència es transfereix la fase lleugera del primer tub al segon. En la figura, el dissolvent lleuger passa pel conducte C fins al bulb de transferència D, i d'aquest pel conducte E es transfereix a la boca A del tub següent. S'introdueix dissolvent nou (una quantitat de la fase més lleugera) en el primer tub i es procedeix a realitzar un segon cicle, i així successivament. En les etapes de transferència un gir de la sèrie de tubs produeix la transferència de la fase més lleugera de cada tub al tub següent de la sèrie (per l'eixida E de cada tub). La fase més densa sempre roman en el mateix tub en què inicialment es va introduir.

En la taula s'indica la distribució obtinguda en els primers quatre tubs de la màquina al llarg de les primeres quatre transferències per a dos soluts amb $K_D = 1$ i $K_D = 1/3$. Es té a més, $V_S = V_M$. Les dades de la taula són les fraccions massiques de solut en cada fase, dins de cada tub i després de cada etapa de transferència. D'acord amb la teoria de l'extracció líquid-líquid, les fraccions massiques es calculen com: $q = 1/(k+1)$ i $p = k/(k+1)$. Per exemple, per $K_D = 1/3$ resulta: $p = 1/4$ i $q = 3/4$.

Per a $K_D = 1$. Tub, nombre:				
1	2	3	4	5
$C_M = 1/2$				
$C_S = 1/2$				
Transferència 1 ^a				
$C_M = 1/4$	1/4			
$C_S = 1/4$	1/4			
Transferència 2 ^a				
$C_M = 1/8$	1/4	1/8		
$C_S = 1/8$	1/4	1/8		
Transferència 3 ^a				
$C_M = 1/16$	3/16	3/16	1/16	
$C_S = 1/16$	3/16	3/16	1/16	
Transferència 4 ^a				
$C_M = 1/32$	1/8	3/16	1/8	1/32
$C_S = 1/32$	1/8	3/16	1/8	1/32

Per a $K_D = 1/3$. Tub, nombre:				
1	2	3	4	5
$C_M = 3/4$				
$C_S = 1/4$				
Transferència 1 ^a				
$C_M = 3/16$	9/16			
$C_S = 1/16$	3/16			
Transferència 2 ^a				
$C_M = 3/64$	18/64	27/64		
$C_S = 1/64$	6/64	9/64		
Transferència 3 ^a				
$C_M = 3/256$	27/256	81/256	81/256	
$C_S = 1/256$	9/256	27/256	27/256	
Transferència 4 ^a				
$C_M = 3/1024$	36/1024	162/1024	324/1024	243/1024
$C_S = 1/1024$	12/1024	54/1024	108/1024	81/1024

Es dedueix que el solut amb $K_D = 1/3$ avança més ràpidament que el solut amb $K_D = 1$, observant-se ja una incipient separació entre ambdós al cap de 4 etapes d'equilibri. La distribució obtinguda és la que es mostra en la Fig. 18.

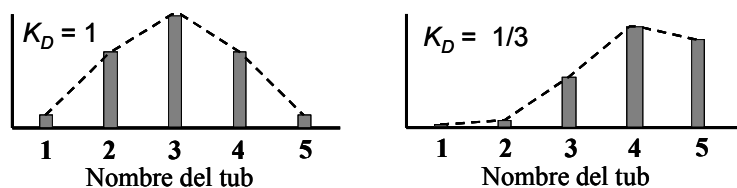


Fig. 18. Perfil de concentracions després de 4 transferències de dos soluts

Analogia entre la màquina de Craig i la cromatografia. Un tub de la màquina de Craig representa una porció "elemental" de columna cromatogràfica, així com una sèrie d'uns quants milers de tubs representen la columna completa. A més, la fase lleugera que es transfereix de tub en tub fa de fase mòbil, mentre que la fase més densa, que sempre roman en el tub on inicialment es va introduir, equival a una fase estacionària. La fase lleugera tendeix a arrossegar els soluts en el seu avanç al llarg de la sèrie de tubs, mentre que la fase densa tendeix romandre en els primers tubs.

Relació entre l'avanç d'un solut i K_D . Un solut amb $K_D = 0$ (no té cap afinitat per la fase densa) avançarà amb el front de dissolvent, mentre que un solut amb un valor molt alt de K_D tendirà a romandre per sempre en el primer tub. Solut amb valors intermedis de K_D avançaràn amb major o menor rapidesa en la sèrie de tubs, **ocupant-ne preferentment un conjunt**. Dit d'una altra manera, la velocitat de migració depèn de K_D en la forma següent:

- K_D molt elevat: la concentració del solut en la fase mòbil s'aproxima a zero, i el solut tendeix a romandre en el primer tub.
- K_D elevat: la concentració d'aquests soluts en la fase mòbil serà xicoteta, i per això avançaran lentament, ocupant preferentment zones de tubs pròximes al començament de la sèrie.
- K_D baix: la seua concentració en la fase mòbil és alta i els soluts tendeixen a avançar ràpidament en la sèrie de tubs.
- K_D zero: un solut amb afinitat nul·la per la fase estacionària avança amb el "front" de fase mòbil, i a la mateixa velocitat que la fase mòbil.

Separació de dos soluts en la màquina de Craig: eixamplament i migració diferencial de zones.

Tornant a l'exemple dels dos soluts amb distint valor de K_D , al començament de l'experiment la zona ocupada per ambdós era només el primer tub. Després d'un gran nombre de cicles ambdós ocupen molts tubs. En realitat, encara queden restes d'ambdós soluts en el primer tub, i si s'han fet mil cicles, també hauran arribat xicotetes quantitats dels dos soluts al tub número 1000. Per tant, els soluts s'han diluït i la zona ocupada per cada un d'ells s'ha eixamplat considerablement.

S'observa també que la majoria dels tubs contenen quantitats insignificants de solut. Un gràfic de la concentració d'un solut enfront del nombre del tub presenta l'aspecte d'una campana de Gauss (veure Figura), amb una màxima concentració en uns pocs tubs, i concentracions menyspreables en els altres. Per a delimitar la zona ocupada per una quantitat significativa d'un solut, s'adopta el següent criteri:

Amplària de la zona ocupada = 4σ = 96% de l'àrea davall la gaussiana = 96% de la quantitat total de solut = **Amplària de la base del pic** entre els punts de tall de la interpolació de la línia base amb les tangents traçades des dels punts d'inflexió.

Aquest criteri és utilitzat per a delimitar la zona ocupada per un solut tant en els estudis teòrics realitzats amb la màquina de Craig, com en la pràctica real de la cromatografia i l'electroforesi. Estimar el valor de σ sobre una corba gaussiana no és immediat, per la qual cosa en la pràctica, el valor 4σ o amplària d'un pic o banda cromatogràfica (quan és aproximadament simètrica) es mesura com la **distància entre els dos punts de tall de la interpolació de la línia base** (detall important, veure Fig. 19!) **amb les tangents en els punts d'inflexió** (un altre detall important, veure figura!).

Si es delimita la zona ocupada per quantitats significatives de solut (es menyspreen els tubs amb quantitats insignificants), cada solut ve a ocupar una regió distinta dins de la sèrie de tubs, més o menys avançada depenent del seu K_D . Per tant, com a resultat d'un elevat nombre de cicles s'obté: 1) una dilució o eixamplament de les zones ocupades pels soluts; 2) en relació a l'avanç total de la fase lleugera, un estrenyiment relatiu de les zones ocupades per quantitats significatives de solut; i 3) la migració diferencial dels soluts al llarg del sistema.

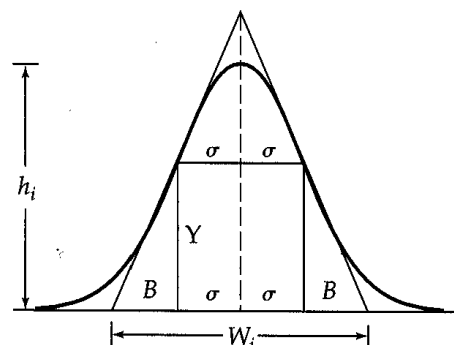


Fig. 19. Criteri universal per establir l'amplària d'un pic: la base del pic val 4σ

Estrenyiment relatiu de zones. Pot demostrar-se que l'amplària de les zones és proporcional a l'arrel quadrada del nombre de cicles, n . Per a volums iguals d'ambdues fases, es té l'equació simplificada següent:

$$\sigma = \frac{(n K_D)^{1/2}}{1 + K_D} \quad (8)$$

Aquesta equació indica que l'eixamplament de la zona ocupada per un solut, σ , no és proporcional al nombre de tubs ocupats per la fase lleugera, n , sinó a la seua arrel quadrada. Per tant, quan augmenta n , 4σ augmenta proporcionalment a \sqrt{n} . En termes absoluts les zones ocupades pels soluts s'eixamplen en créixer el nombre de cycles, però en termes relatius s'estrenyen. Aquesta conclusió és més fàcil de comprendre utilitzant un exemple numèric. Suposem un solut amb $K_D = 2$ i amb una raó de volums de les fases unitat. Aplicant l'expressió anterior resulta:

Cicles = tubs totals ocupats = n	Tubs ocupats per quantitats significatives de solut = 4σ	Percentatge = $4\sigma/n$
10	6	60%
100	19	19%
1000	60	6%
10000	189	1,9%

Per tant, com més avança la fase lleugera, açò és, com major és el nombre de tubs ocupats per la mateixa, en termes relatius, tant menor és el percentatge de tubs ocupat pel solut, açò és, tant més estreta és la zona que ocupa el solut. Tres conseqüències importants són:

- La separació es produeix a costa d'una dilució.
- La dilució augmenta amb el nombre de cycles, o el que és equivalent, amb la distància migrada.
- L'èxit en la separació es deu a l'estrenyiment relatiu de les zones ocupades pels soluts.

La teoria de l'equilibri va permetre explicar les separacions cromatogràfiques. Com s'explica a continuació, també va permetre establir una forma de mesurar l'eficàcia d'un sistema cromatogràfic treballant en unes condicions donades.

Eficàcia d'un sistema separador. En cromatografia, i també en electroforesi, en destil·lació a contracorrent, i en altres tècniques de separació, l'eficàcia és una mesura de l'eixamplament relatiu de les zones ocupades pels soluts. Un sistema separador és molt eficaç quan les zones ocupades pels soluts s'eixamplen molt poc durant el seu avanç. L'eficàcia es mesura de dues formes:

- a) Com a **eficàcia per unitat de longitud** del sistema separador, mitjançant l'altura equivalent a un plat teòric, H . El sistema és més eficaç com menor és H .
- b) Com a **eficàcia total del sistema** separador de longitud L , per mitjà del nombre total de plats teòrics amb què està funcionant, $N = L/H$. El sistema és més eficaç com major és N . Com major és el nombre "d'etapes" que té un sistema separador, més important és l'estrenyiment relatiu, açò és, com més baix és el percentatge d'etapes ocupades. És el mateix que dir que l'eficàcia es major com més estreta és la zona ocupada pel solut, açò és, com més estret és el pic cromatogràfic.

Com a mesura de l'eficàcia per unitat de longitud també s'utilitza $1/H$, que és el nombre de plats teòrics per unitat de longitud ($1/H = N/L$).

Concepte de HETP (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*). Per a comprendre els significats de H i N és necessari introduir el concepte d'altura equivalent a un pis, safata o plat teòric, HEPT o H . Segons la teoria de l'equilibri, l'eixamplament i la migració diferencial de zones que s'observen en cromatografia s'expliquen com a conseqüència de les etapes d'equilibri i de transferència. Es considera que l'avanç de la fase mòbil al llarg d'un tros de columna de longitud H realitza la mateixa funció que una etapa de contacte i transferència de fase entre dos tubs consecutius de la màquina de Craig. Un HEPT és la longitud del segment de columna (o sistema) equivalent a una etapa d'equilibri, açò és, és la longitud de columna que fa

el mateix treball separador que faria un contacte simple entre les dues fases fins a aconseguir l'equilibri termodinàmic de repartiment dels soluts. És com si la columna estiguera dividida en un elevat nombre de segments, N , cada un d'ells de longitud H (Fig. 20). Cada segment faria el mateix treball separador que un tub de Craig. La fase mòbil ha d'avançar un segment de sistema igual a H per tal d'assolir l'equilibri.

Tenir un sistema separador amb un valor elevat de N és equivalent a afirmar que l'eficàcia global del sistema és elevada, o dit d'una altra manera, que l'eixamplament dels pics dels soluts durant la separació és molt xicotet. Per exemple, compare's una columna de HPLC de 10 cm que funciona amb $N = 100$ amb una altra columna de la mateixa longitud que té $N = 10000$ (perquè és més eficaç i H és menor). Si un solut ocupa 20 etapes, l'espai ocupat per aquest solut en cada columna és el 20% i el 0,20%, respectivament. Per tant, en la primera columna el solut ocupa 20 mm i en la segona només 0,20 mm.

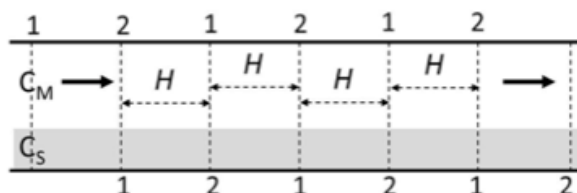


Fig. 20. Concepte de H com a segment de sistema necessari per arribar a l'equilibri: $K_D = [C_S]_1 / [C_M]_2$

Exemple 1: Una columna capil·lar de cromatografia de gasos té 30 metres de llarg i aconsegueix separacions de $N = 40.000$ plats (columna A). Una altra columna de la mateixa longitud (columna B) aconsegueix separacions de $N = 60.000$ plats. ¿Quant valen H i $1/H$ en cada cas?

Solució: Per a la columna A, $H = L/N = 30 \text{ m} / 40.000 = 0,75 \text{ mm}$ per plat. La columna A funciona amb $1/H = 1333$ plats per metre. Per a la columna B, $H = L/N = 30 \text{ m} / 60.000 = 0,50 \text{ mm}$ per plat. La columna B funciona amb $1/H = 2000$ plats per metre.

En l'exemple, la columna B és més eficaç que la A, per la qual cosa donarà lloc a pics més estrets. Si bé aquest concepte es va ampliar en la resta del tema, d'entrada es pot considerar que si un solut, en un moment donat, ocupa 400 plats, això suposa $400 \times 0,75 \text{ mm} = 30 \text{ cm}$ en la columna A, i només 20 cm en la columna B. A més, 400 plats representen l'1% de la longitud de A, però només el 0,67% de la longitud de B. Per tant, el pic és més estret en aquesta segona columna.

Exemple 2: Una columna cromatogràfica típica de HPLC té $L = 12,5 \text{ cm}$. Treballant en condicions satisfactòries es poden aconseguir separacions de $N = 20.000$ plats. ¿Quant val H en aquest cas?

Solució: $H = L/N = 12,5 \text{ cm} / 20.000 = 6,25 \text{ } \mu\text{m}$ / plat.

De la definició també es desprèn que una HEPT és el segment o longitud de columna els extrems de la qual tenen concentracions en equilibri, açò és, entre els dos extrems d'una HEPT qualsevol es compleix la condició d'equilibri (veure figura anterior):

$$[C_S]_1 / [C_M]_2 = K_D \quad (9)$$

¿Per què es diu "plat teòric"? Martin i Synge van prendre el concepte de plat dels "pisos", "plats" o "safates" de contacte líquid-líquid i líquid-gas utilitzats en les columnes d'extracció i destil·lació industrials (Fig. 21). En cada safata té lloc un contacte entre les dues fases. Després, una de les fases abandona la safata per a passar a la següent (Fig. 22). En destil·ladors i extractors industrials el dit contacte no aconsegueix mai l'equilibri. De fet, per estalviar temps, les columnes industrials treballen amb un rendiment baix (entenen "rendiment" com a grau d'avanç cap a l'equilibri), com per exemple, el 50 o el 70% en cada etapa (safata o plat), i per això, un contacte entre les fases que arribe fins a l'equilibri es diu que equival a un pis "teòric" (fins al 100%). En cromatografia i en altres tècniques de separació en llits

continus, H es defineix com la longitud de llit o segment capaç de realitzar un contacte "teòric", açò és, "fins a l'equilibri".

El concepte de HEPT és important perquè en ell es basa la definició d'eficàcia d'un sistema cromatogràfic: un sistema és més eficaç com menor és H , o com major és N . H varia amb el disseny i la naturalesa del sistema separador (per exemple, amb la grandària de partícula del rebliment i amb la naturalesa de la fase enllaçada), i també varia amb les condicions de treball (pH, composició de la fase mòbil, cabal, etc.). H es mesura en unitats de longitud de columna o sistema separador, açò és, en metres en les columnes industrials, i en mil·límetres i micròmetres per a les columnes cromatogràfiques i electroforètiques, respectivament. Els sistemes molt eficaços es reconeixen per donar lloc a pics o bandes molt estretes dels compostos eluïts.



Fig. 21. Columna industrial de destil·lació a contracorrent

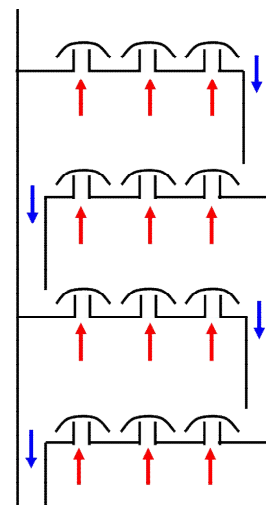


Fig. 22. En una columna de destil·lació el líquid cau d'una safata a la següent, i el vapor puja bombollejant pels brolladors

5. La teoria dinàmica i l'equació de velocitat

Limitacions de la teoria de l'equilibri. En cromatografia i electroforesi, les separacions són produïdes per processos d'equilibri regits per lleis termodinàmiques (els valors de K_D), i també simultàniament per processos dinàmics (o de velocitat), regits per les lleis de la difusió de Fick, i que també produeixen eixamplament de les bandes ocupades pels soluts. La teoria de l'equilibri i la teoria de velocitat són dues aproximacions a la realitat, en què tenen lloc processos d'ambdós tipus simultàniament.

La teoria de l'equilibri explica satisfactòriament la separació cromatogràfica. Tot i això, tan sols en té en compte els aspectes termodinàmics i oblidava els fenòmens relacionats amb la difusió. Les limitacions de la teoria resulten evidents quan s'observa el funcionament de la màquina de Craig: el procés es produeix per etapes discretes i no de forma contínua, tant en l'espai (tubs discrets) com en el temps (cicles i etapes successives). En conseqüència, la màquina de Craig no pot explicar tots els fenòmens que es produeixen en una separació cromatogràfica, que és un procés continu. A causa de la seua natura discreta, la màquina de Craig tan sols imita els aspectes termodinàmics de la cromatografia, però no els aspectes dinàmics, com la difusió molecular.

Per explicar els aspectes dinàmics de la cromatografia es desenvolupà la teoria dinàmica o de velocitat. Ambdues teories, la de l'equilibri i la de difusió o de velocitat, expliquen satisfactòriament el comportament dels soluts, açò és, l'eixamplament de les zones ocupades, el seu estrenyiment en termes relatius i la migració diferencial de dites zones. Per veure la diferència, cal considerar, per exemple, que segons la teoria de l'equilibri l'eixamplament de zones és proporcional a l'arrel quadrada del nombre de tubs ocupats, i per tant, és proporcional a \sqrt{u} l'AVANÇ del solut al llarg del sistema. En canvi, segons la teoria dinàmica, l'eixamplament de zones és proporcional a la difusió, i per tant, a l'arrel quadrada del TEMPS passat pel solut dins del sistema.

L'equació de velocitat. La teoria dinàmica o de velocitat explica l'eixamplament de les zones ocupades pels soluts com a conseqüència de tres processos, cadascun d'ells representats per un terme distint de l'equació de velocitat o **equació de Van Deemter**. L'equació de Van Deemter descriu com varia l'eficàcia

amb el cabdal, o més acuradament, amb la velocitat lineal de la fase mòbil, u . Per a GC, la forma simplificada de l'equació de velocitat és:

$$H = A + B/u + C u \quad (10)$$

La forma simplificada per a HPLC és:

$$H = A + B/u + (C_M + C_S) u \quad (11)$$

On es fa una distinció entre el coeficient C de la fase mòbil i de l'estacionària. Aquesta distinció no cal fer-la en GC, perquè la difusió del soluts a l'interior de la fase estacionària és molt més lenta i té molta més importància que al si de la fase mòbil gasosa. Les equacions completes, no simplifiades, són distintes segons el tipus de columna (es donen dos exemples a la col·lecció d'exercicis). L'equació de velocitat és important pels següents motius:

- La mesura experimental de H a valors creixents de u permet trobar els valors dels coeficients A , B i C . Aquests coeficients són característics de cada sistema cromatogràfic (una columna donada treballant en determinades condicions). Un valor massa gran d'un dels coeficients indica que s'està perdent eficàcia per defectes de construcció o estructura del sistema separador, o en el seu cas, per una selecció inadequada de la fase mòbil.
- Com que els valors dels coeficients permeten fer un diagnòstic del funcionament de la columna, és possible comparar el sistema cromatogràfic (fase estacionària i mòbil) amb altres sistemes.
- La mesura experimental de H a valors creixents de u permet trobar el valor òptim de velocitat de fase mòbil (i en conseqüència, de cabdal), en què H es mínim i per tant l'eficàcia és màxima. Com veurem, també permet prendre la decisió de treballar a un cabdal superior a l'òptim per estalviar temps d'anàlisi, sent conscient de quanta eficàcia s'ha perdut.

Les tres contribucions a H . En GC, i aproximadament també en HPLC, a partir de mesures de H a valors creixents de u , s'obté una corba com la mostrada a la Fig. 23. El valor de H en cada punt és el resultat de la suma de tres contribucions:

- Un valor constant, A , denominat tradicionalment difusió de remolí (*eddy diffusion*), encara que aquesta contribució es deu essencialment a **diferències de velocitat** en diferents punts de la fase mòbil.
- Una funció inversa, B/u , deguda a la **difusió molecular longitudinal** (al llarg de l'eix principal del sistema separador, açò és, en la direcció del flux).
- Una funció proporcional, $C u$, deguda al **retard amb què es produeixen les transferències de massa** (de solut) entre les fases mòbil i estacionària, o el que és igual, a l'excessiva lentitud dels temps de reequilibrat després d'un avanç infinitesimal de fase mòbil.

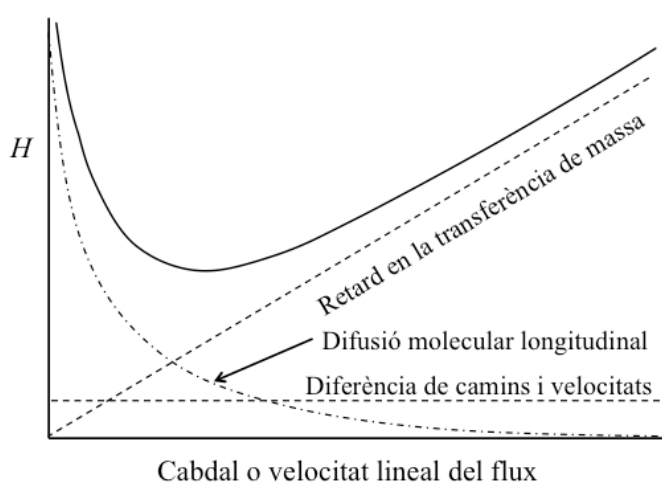


Fig. 23. Equació de van Deemter i els seus tres termes

Terme A: les diferències de velocitat. La contribució a H que és independent de la velocitat de la fase mòbil, A , s'explica essencialment per la diferència entre les velocitats de fase mòbil en canals de distinta amplària entre les partícules del rebliment, i també per les diferències de velocitat entre el centre i els costats dels canals. La fase mòbil avança més ràpid per canals més amples, i també és més ràpid el flux pel centre que pels costats dels canals (Fig. 24). D'aquesta manera, les molècules de soluts que passen per canals amples, o pel centre dels canals, avancen respecte a altres molècules que s'endarrereixen.

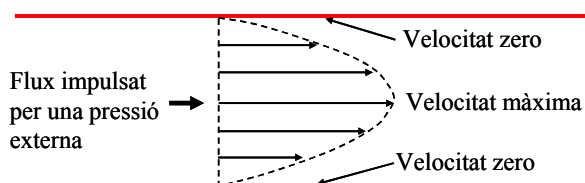


Fig. 24. Perfil parabòlic en un conducte on el flux està impulsat per una pressió externa: les partícules que circulen pels costats del conducte endarrereixen

També s'explica per la diferència de camins: hi ha molècules de solut que poden haver seguit un camí més recte fins al detector, mentre altres han seguit camins més llargs. Les primeres s'hauran avançat i les darreres endarrerit (Fig. 25).

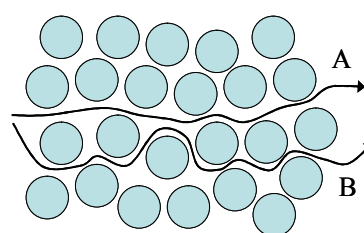


Fig. 25. Diferència de camins: la partícula B ha endarrerit

Per això, en una columna de rebliment, els factors que fan gran el coeficient A són les irregularitats de les partícules i la disparitat de mides entre partícules. El terme A disminueix en augmentar la qualitat del rebliment, és a dir, la regularitat de mides i formes de les partícules. El valor de A es molt menut en columnes capil·lars obertes (sense rebliment), on els soluts segueixen camins rectes, i les diferències de velocitats entre el centre i els costats de l'únic canal són mínimes.

Terme B/u: la difusió molecular longitudinal. Aquesta contribució a H es deu a la difusió molecular, açò és, al flux de solut de les zones de major concentració cap a les zones de menor concentració en sentit longitudinal, açò és, al llarg de l'eix del sistema separador, tant en la direcció de l'avanç de la fase mòbil com en el sentit oposat (cap enrere) (Fig. 26).

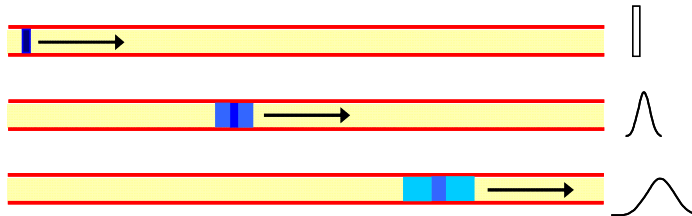


Fig. 26. Eixamplament per la difusió molecular longitudinal

En la direcció següent es pot trobar una simulació de com difon una zona ocupada per un solut a mesura que transcorre el temps:

http://www.ifh.uni-karlsruhe.de/lehre/envflu_I/Animations/diff_anim.gif

La difusió molecular dona lloc a un eixamplament de la zona ocupada pel solut en forma directament proporcional al **temps** de permanència del solut dins del sistema. Precisament per això, aquesta contribució és proporcional a la inversa de la velocitat lineal de la fase mòbil: a més velocitat, menys temps de permanència, i per tant menys eixamplament.

Terme C: el retard en la transferència de massa del solut. La contribució proporcional a \bar{u} es deu a la lentitud de les transferències de massa de solut entre una fase i altra, o lentitud del reequilibrat després de l'avanç de la fase mòbil. Aquest fenomen es pot il·lustrar mitjançant l'esquema de la Fig. 27. La lentitud o "retard" amb què s'efectuen les transferències de massa després de cada "etapa" d'avanç de la fase mòbil origina un eixamplament de la zona ocupada pel solut. Si s'augmenta la velocitat de la fase mòbil, les velocitats de transferència de massa no varien i augmenta el "retard". Com major és la velocitat de la fase mòbil, major és l'eixamplament produït pel retard.

El valor del coeficient C (o de C_M i C_S en LC) disminueix quan es milloren els factors de què depèn la velocitat de transferència de massa entre ambdues fases: quan es redueix l'espessor de la fase estacionària, quan disminueixen els espais lliures accessibles a la fase mòbil, quan es redueix la profunditat dels porus en el cas de suports porosos (partícules poroses), i quan es redueix la viscositat d'ambdues fases.

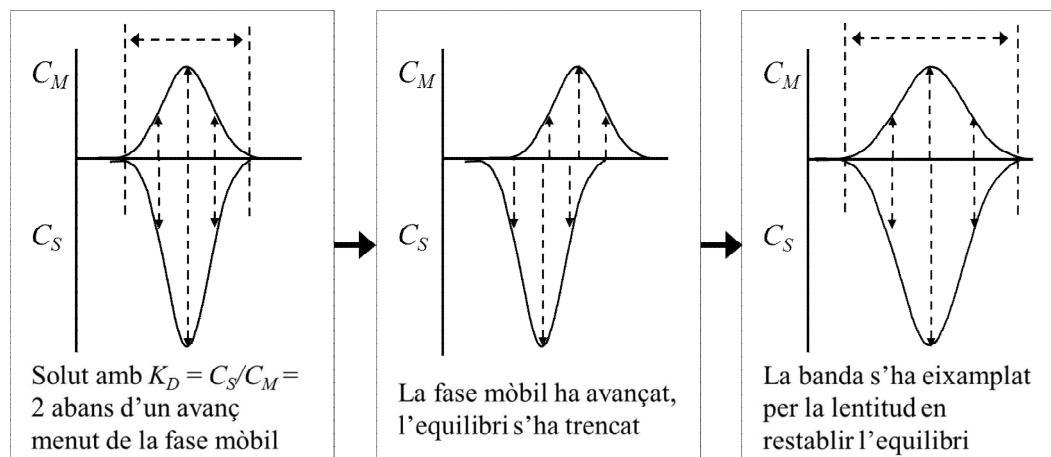


Fig. 27. Eixamplament pel retard en la transferència de massa (del solut entre les fases); el retard és proporcional al terme C

Per exemple, en el cas de les columnes capil·lars obertes utilitzades en GC (Fig. 28), l'eficàcia és millor (H és menor) per a les columnes de menor diàmetre. És així perquè els soluts han de recórrer distàncies menors entre la superfície de la fase estacionària i el si de la fase mòbil. Com que la distància és menor, les transferències de solut necessàries en tot moment per restablir l'equilibri termodinàmic són més ràpides.

Anàlogament, les columnes de rebliment utilitzades en HPLC són tant més eficaces com més menuda és la mida de la partícula (Fig. 29). Amb partícules molt menudes, els espais lliures entre partícules són també molt menuts, i en conseqüència, les distàncies a recórrer entre la superfície de la fase estacionària i el si de la fase mòbil són també molt curtes. A més a més, si les partícules del rebliment són menudes, els seus porus interns són necessàriament menys profunds, i així el temps necessari perquè els soluts n'entren i en surten és també menor.

Valor òptim de u . Derivant i igualant a zero s'obté el mínim de l'equació de van Deemter:

$$u_{\text{opt}} = (B/C)^{1/2} \quad (12)$$

A aquest valor de la velocitat lineal del flux (que equival a un cabdal òptim) es té una eficàcia òptima (un H mínim). En GC s'obtenen mínims amples i ben definits a cabdals relativament alts. Tot i això, amb freqüència es treballa a cabdals un poc superiors a l'òptim per a guanyar rapidesa (reduir el temps d'anàlisi). En LC s'obtenen mínims aguts a valors molt baixos del cabdal. Per aquesta raó, si es treballa al màxim d'eficàcia s'allarguen excessivament els temps de retenció dels soluts. Per això, per a reduir el temps d'anàlisi, se sol treballar també a cabdals bastant superiors a l'òptim. En columnes de HPLC clàssiques, de 4.6 mm de diàmetre, l'òptim pot correspondre a un cabdal de l'ordre de 0.1 mL min^{-1} o menor, però és freqüent treballar a 1 mL min^{-1} si les separacions són encara

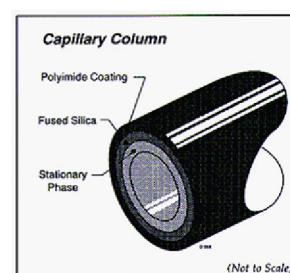


Fig. 28. En columnes capil·lars obertes les distàncies a recórrer per restablir l'equilibri són molt menudes (l'eficàcia és elevada)

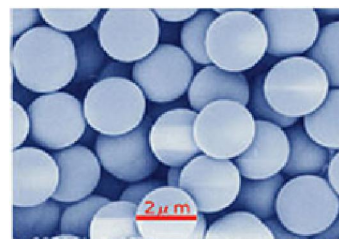


Fig. 29. Reblert de partícules: les distàncies a recórrer per restablir l'equilibri disminueixen amb la mida de les partícules

satisfactòries. En multiplicar el cabdal per 10 o 20, els temps de retenció es divideixen per 10 o 20. Se sacrifica eficàcia per guanyar rapidesa.

Migració diferencial com a conseqüència del temps de permanència en la fase mòbil. Per altra banda, la teoria de velocitat explica la migració diferencial de les zones ocupades pels soluts com segueix:

- Es considera que el solut avança només quan es troba en la fase mòbil, i que no pot avançar quan es troba en el si de la fase estacionària.
- Se suposa que la velocitat d'avanç d'un solut és proporcional al temps que aquest passa en la fase mòbil; es suposa també que el temps de permanència en la fase mòbil és proporcional a la fracció massica de solut en aquesta fase, $q = 1/(k + 1)$.
- Es dedueix que la fase mòbil arrossega els soluts a distintes velocitats, segons el seu valor de q . Això és: $v = q u$, que indica que la velocitat lineal del solut és la fracció q de la velocitat de la fase mòbil.

En conseqüència, la teoria de velocitat també prediu que els soluts migraran a distintes velocitats depenent del valor de K_D , ja que q és una funció de K_D :

$$q = \frac{m_M}{m_M + m_S} = \frac{1}{1 + m_S/m_M} = \frac{1}{1 + k} = \frac{1}{1 + K_D(V_S/V_M)} \quad (13)$$

6. Mesura experimental de l'eficàcia

La teoria dinàmica condueix a una altra definició de la HETP. La teoria demostra que H és la variància per unitat de temps, i també per unitat de longitud migrada:

$$H = \frac{\sigma_{\Delta t}^2}{\Delta t} = \frac{\sigma_{\Delta L}^2}{\Delta L} \quad (14)$$

Com menys s'eixampla un pic per unitat de temps (o de longitud migrada), tant més eficaç és el sistema separador. Reordenant, resulta:

$$\sigma_{\Delta L}^2 = H \Delta L \quad (15)$$

Aquesta expressió indica que la longitud de columna ocupada pel solut augmenta en forma directament proporcional a l'arrel quadrada de la distància migrada (o del que és equivalent, el temps transcorregut). El coeficient de proporcionalitat entre la variància del pic i la longitud migrada és H . L'equació (14) és la base per al càlcul de l'eficàcia d'un sistema separador. Tenint en compte que la velocitat del solut val $v = \Delta L / \Delta t = L / t_R$ i substituint, resulta:

$$H = \frac{\sigma_{\Delta L}^2}{\Delta L} = \frac{\sigma_{\Delta t}^2 v^2}{\Delta t v} = \frac{\sigma_{\Delta t}^2 \Delta L}{\Delta t \Delta t} = \left(\frac{\sigma_{\Delta t}}{\Delta t} \right)^2 \Delta L \quad (16)$$

Quant el pic ha eluït $\Delta t = t_R$, i $\Delta L = L$. Es té:

$$H = \left(\frac{\sigma_{\Delta t}}{t_R} \right)^2 L \quad (17)$$

Aquesta equació permet calcular H a partir de l'amplària dels pics i del seu temps de retenció, dades que són fàcilment mesurables sobre el cromatograma.

Exemple: Un pic elueix en 5 min amb una desviació estàndard de 0,04 min. Trobar H i N i el nombre de plats per metre, sabent que la columna (HPLC) té una longitud de 25 cm (Fig. 30).

Respostes: $H = (0,04/5)^2 25 = 16 \mu\text{m}$; $N = 250.000 / 16 = 15.625$ plats; $1/H = (1 / 16 \mu\text{m}) \times 10^6 \mu\text{m/m} = 62.500$ plats/m

Càlcul de l'eficàcia global d'un sistema.

Reordenant l'equació (17) es té el nombre de plats teòrics del sistema:

$$N = \frac{L}{H} = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 \quad (18)$$

Per a l'exemple es té: $N = (5/0,04)^2 = 15.625$ plats. En la pràctica no se sol mesurar la desviació estàndard dels pics, sinó l'amplària de la base que val 4σ (Fig. 30). Introduint aquest factor 4 dins i fora del parèntesi, es té l'expressió utilitzada habitualment:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{4\sigma_t} \right)^2 \quad (19)$$

Si s'imprimeix el cromatograma, l'eficàcia també es pot calcular mesurant els temps com a mil·límetres sobre el paper.

Exemple: Calcular N per al pic de la Fig. 30. *Solució:* $N = 16 (27.16/0.72)^2 = 22767$ plats.

És important observar que l'amplària de la base del pic s'ha pres sobre la interpolació de la línia base (no sobre l'eix, que pot estar desplaçat), i que el seu valor ve donat per la prolongació de les tangents als punts d'inflexió (el tall correspon al 96% de la quantitat total de solut). Així mateix, la posició del pic es pren on es troba el màxim. També es poden utilitzar les amplàries del pic en altres llocs fora de la base, a condició de substituir el factor 16 pel valor que calga d'acord amb l'equació de la corba de Gauss. Per exemple, a mitjan altura l'amplària del pic és 2.356σ i per tant, a l'equació (19) el valor 16 se substitueix per $(2.356)^2 = 5.55$. Si $w_{1/2}$ és l'amplària del pic a meitat de l'altura, es té:

$$N = 5.55 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (20)$$

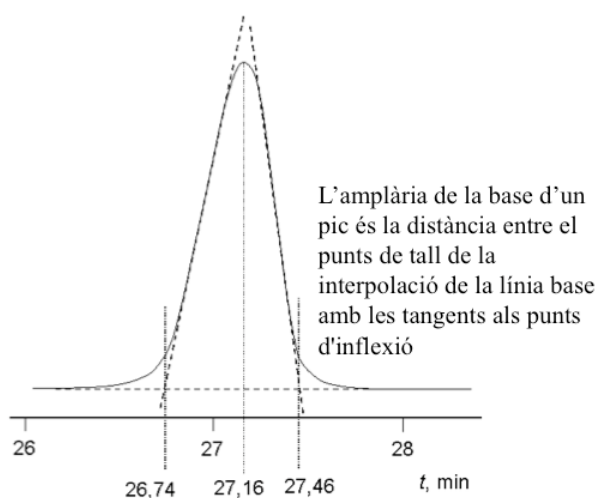
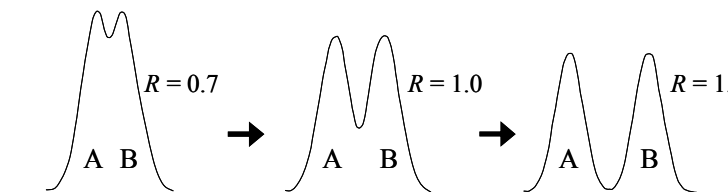


Fig. 30. Mesura de l'eficàcia d'un pic lleugerament asimètric a partir de l'amplària de la base

7. Resolució i factor de selectivitat

Resolució. És una mesura del grau de separació entre dos soluts. Es defineix com a distància entre els màxims dels pics dels dos soluts dividida per la mitjana aritmètica de les amplàries. Per al parell de soluts A i B, la resolució és:

$$R = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{\frac{4\sigma_{t,B} + 4\sigma_{t,A}}{2}} \quad (21)$$



Per a pics d'igual altura, un valor de R igual a 1 indica pics parcialment solapats, cadascun amb una contaminació del 2% del pic adjacent. Amb $R = 0,8$ la contaminació ascendeix fins el 4.5%, i amb $R = 1.5$ es redueix al 0.1%. Per a valors de R superiors a 1.5, dos pics d'igual altura tenen l'aspecte d'estar ben separats, amb una vall entre ells que aplega fins a la línia base (Fig. 31).

Factor de selectivitat. La selectivitat és la capacitat del sistema separador per a distingir entre soluts de propietats similars, cosa que depèn exclusivament de les constants de distribució. La selectivitat relativa d'un parell de soluts, A i B, és el quocient entre les seues constants de distribució:

$$\alpha = K_{D,B} / K_{D,A} \quad (22)$$

El menor valor de K_D s'escriu al denominador. Un factor de selectivitat igual a 1 indica impossibilitat de separar el parell de soluts. Un factor de selectivitat clarament major que la unitat indica que els dos soluts se separen fàcilment amb el sistema cromatogràfic utilitzat. La selectivitat es defineix sempre amb relació a un parell de soluts donats, i és distinta per a qualsevol altre parell de soluts. Així, per exemple, una columna treballant en determinades condicions pot tenir una excel·lent selectivitat per a resoldre un pesticida clorat d'alta massa molecular respecte al seu metabòlit o producte d'oxidació, i no ser capaç de distingir entre el pesticida i una impuresa amb una estructura química similar.

Per a mesurar α sobre un cromatograma, es fa ús de k , que es pot mesurar directament, cosa que no succeeix amb el paràmetre termodinàmic, K_D . Es té:

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} = \frac{k_A}{k_B} = \frac{t_A - t_M}{t_B - t_M} \quad (23)$$

En conseqüència, el factor de selectivitat de dos soluts es mesura com el quocient dels seus temps de retenció nets (descomptant el temps mort).

Exemple: Mesurar la resolució i el factor de selectivitat per als dos soluts del cromatograma adjunt (Fig. 32), sabent que el temps mort (obtingut injectant metanol) apareix als 3.82 min.

Solució:

$$R = 0.85 / [(0.72 + 0.79) / 2] = 1.13$$

$$\alpha = (28.01 - 3.82) / (27.16 - 3.82) = 1.04$$

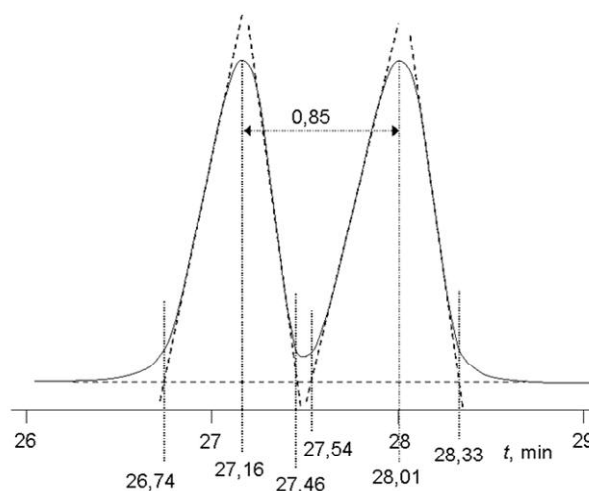


Fig. 32. Mesura de la resolució i del factor de selectivitat per una parella de pics

Millora de la selectivitat. Millorar la selectivitat entre un parell de soluts donat (com s'ha fet en la Fig. 31) implica canviar les condicions de treball, i amb freqüència serà necessari també canviar el sistema separador. Es pot actuar sobre els factors següents:

- canviar la natura de la fase mòbil: polaritat, pH, etc.
- canviar la natura de la fase estacionària: canviant de columna, de tipus de fase lligada, passant a una columna capil·lar, etc.
- canviar la temperatura de la columna
- si és necessari, es pot canviar la natura dels soluts mitjançant l'obtenció de derivats; Aquests tindran un comportament cromatogràfic molt distint en comparació amb els composts sense derivatitzar. Per exemple, s'aconseguirà una millora important de la selectivitat si un dels dos soluts que es volen separar es derivatitza i l'altre no.

Millora de la resolució. Per a millorar la resolució entre dos composts, R , es pot actuar de tres maneres:

- a) Millorant la selectivitat (augmentant α). Augmenta la separació entre els pics (veure Fig. 31). Per a modificar el factor de selectivitat és necessari modificar les constants de distribució.
- b) Millorant l'eficàcia, això és, reduint H : augmenta N i disminueix l'amplària dels pics (Fig. 33).
- c) Allargant el sistema separador. És una altra forma d'incrementar N , ja que $N = L/H$ (en la figura, també es passaria de A a B, però amb temps d'elució més llargs).

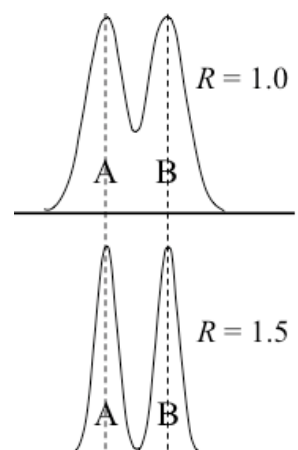


Fig. 33. Augment de la resolució per millora de l'eficàcia

8. Relació entre resolució i retenció: el problema general de l'elució

Factors de què depèn la resolució. Combinant l'equació $k = (t_R - t_M) / t_M$ i les equacions (19) i (21), es té:

$$R = \frac{N^{1/2}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right) \quad (24)$$

on l'últim parèntesi equival a la fracció massica de solut en la fase estacionària, que és una altra forma d'expressar la retenció:

$$p = k / (1 + k) = (m_S / m_M) / [1 + (m_S / m_M)] = m_S / (m_S + m_M)$$

Anàlogament, cal recordar que la fracció massica de solut en la fase mòbil és:

$$q = 1 - p = 1 / (1 + k) = m_M / (m_M + m_S)$$

L'equació (24) mostra com la resolució s'aconsegueix mitjançant la **combinació de tres factors: eficàcia** global del sistema (N elevat), **selectivitat** (allunyament de α respecte a la unitat) i **retenció relativa** (k elevat). També mostra com augmenta R a mesura que es modifiquen aquests factors:

- Si s'allarga el sistema separador augmenta N , i en conseqüència, també augmenta R . Tot i això, l'augment no és directament proporcional, per exemple, per a duplicar R és necessari quadruplicar N .
- Si $\alpha = 1$ la resolució val 0. A mesura que α s'allunya de 1, la resolució també augmenta (Fig. 34).

- Si la retenció relativa, k , és zero, la resolució també és zero. Si augmenta k , R augmenta, al principi molt ràpidament. Quan k ja és molt més gran que 1, una major retenció produeix un augment insignificant de R (Fig. 34). A més a més, valors alts de k suposen temps d'elució molt llargs.

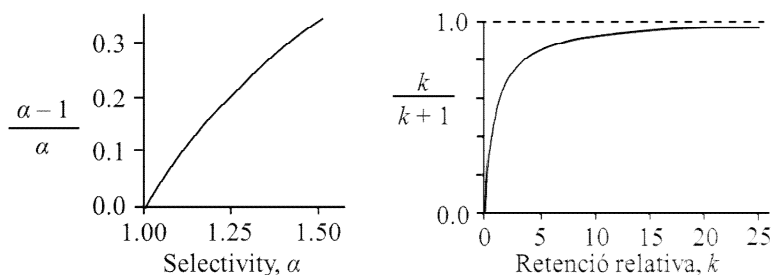


Fig. 34. La resolució augmenta ràpidament quan la selectivitat i la retenció augmenten, però augments de k superiors a 10 ja no la milloren gaire

El problema general de l'elució. La relació entre R i k condueix al denominat “problema general de l'elució”, l'enunciat del qual és el següent:

Perquè hi haja **resolució** hi ha d'haver **retenció**, de manera que no s'aconsegueix resolució per davall d'un **valor mínim de la retenció relativa, k** , però un **valor excessiu** de k condueix a **temps d'anàlisi excessivament llargs**, i a millores insignificants de R . Valors molt grans de k produeixen també una **dilució excessiva dels soluts**, i en conseqüència els seus límits de detecció augmenten excessivament. Doncs, existeix un **interval òptim de la retenció relativa**, els extrems del qual són 1 i 5, si bé valors de k entre 0.2 i 20 són acceptables.

Valors de k menors que 0.2 indiquen poca retenció, o el que és equivalent, preferència excessiva del solut per la fase mòbil. Amb valors molt baixos de k , el pic del solut apareix al cap del cromatograma, a valors propers al temps mort. Al cap del cromatograma és on apareixen precisament els pics de tots aquells composts que no experimenten retenció, o en què aquesta és molt baixa, per la qual cosa la separació és molt deficient.

Valors de k majors que 20 indiquen una retenció massa alta, produïda per una preferència excessiva del solut per la fase estacionària. A més de l'excessiu temps d'anàlisi, un altre inconvenient associat als temps de retenció excessius és la dilució dels soluts (el solut ha tingut molt de temps per a difondre's dins del sistema). Els pics amb valors molt grans de k són molt amples i de baixa altura, cosa que suposa una baixa relació senyal/soroll, o el que és igual, els límits de detecció són alts.

Per a augmentar o disminuir k es pot actuar sobre el quocient V_S/V_M (per exemple, utilitzant una altra columna amb un volum major o menor de fase estacionària o de fase mòbil), i sobre els factors de què depèn K_D : condicions de treball (temperatura, pH, etc.) i natura de les fases mòbil i estacionària.

Elució isocràtica i amb gradient. Quan es volen separar soluts amb propietats molt distintes, no és possible aconseguir que tots arriben a eluir dins de la zona òptima de valors de k . En aquest cas, es procedeix a canviar les condicions de treball (i en conseqüència, variar les K_D) durant l'elució. D'aquesta manera, s'aconsegueix que l'elució de cada solut es realitzi dins de la zona òptima de valors de k . Modificar K_D durant la separació es coneix com a **elució amb gradient**, cosa que es contraposa a **elució isocràtica** (sense canvis de condicions de treball durant l'elució).

Així, en GC l'habitual és utilitzar un gradient tèrmic, que consisteix a augmentar progressivament la temperatura de la columna. D'aquesta manera s'accelera l'elució dels soluts menys volàtils, o dels excessivament afins a la fase estacionària. En RP-HPLC és habitual augmentar la hidrofobicitat (augmentar el percentatge de dissolvent orgànic en la composició de la fase mòbil). Anàlogament, en NP-HPLC és habitual augmentar la polaritat (augmentar el percentatge d'isopropanol en mescles isopropanol-heptà).

Finalment, en HILIC el gradient es fa augmentant la proporció d'aigua en una fase mòbil composta per aigua i acetonitril.

L'elució amb gradient permet separar en un mateix cromatograma composts feblement retinguts per la fase estacionària (amb tendència a eluir amb valors molt baixos de k) i altres fortament retinguts (amb tendència a eluir amb valors molt alts de k). Per exemple, en RP-HPLC, a mesura que augmenta la hidrofobicitat de l'eluent, soluts que experimenten inicialment una retenció excessiva van sent progressivament més i més afins a la fase mòbil (els seus valors de K_D disminueixen).

9. Característiques generals dels detectors utilitzats en cromatografia

Requisits bàsics d'un detector per cromatografia. En GC, HPLC, electroforesi i altres tècniques, no existeix un detector universal que pugui recomanar-se per a tot tipus d'aplicacions. En l'actualitat es continuen utilitzant diversos tipus de detectors, cada un dels quals té el seu camp d'aplicació preferent. Amb independència de la tècnica o els principis fisicoquímics en què es basa, un detector ideal ha de tenir en alt grau les següents característiques:

- Poca deriva del senyal (línia base plana) i baix soroll (oscil·lacions xicotetes de la línia base)
- Alta sensibilitat (variacions grans del senyal amb canvis petits de la conc. del solut)
- Resposta ràpida
- Ampli rang dinàmic lineal (tres o més ordres de magnitud o dècades)
- Baix volum mort (la contribució del detector al volum mort ha de ser molt menuda)
- Baixa sensibilitat davant els canvis de les condicions d'operació, com la temperatura de la columna o la composició de la fase mòbil. Si el detector és sensible a aquests canvis, la deriva de la línia base fa impossible l'elució amb gradient (l'escala de treball no es pot ajustar).
- Fàcil maneig, robustesa i fiabilitat
- Preferentment, ser no destructiu, per permetre la connexió en sèrie amb un altre detector, o la seua aplicació en cromatografia a escala preparativa.

El soroll de fons. En la majoria de les tècniques analítiques el senyal es representa enfront d'una variable d'escombrat (com a temps, longitud d'ona, relació massa/càrrega, etc), i els components es detecten com a desviacions significatives de la línia base en forma de pics o bandes que destaquen sobre la línia base. En cromatografia la variable d'escombrat és el temps d'elució. La figura mostra un pic destacant sobre el soroll de fons (*background noise*) o soroll de la línia base. El soroll de fons té diversos components: soroll d'alta freqüència (oscil·lacions molt ràpides degudes al moviment a

l'atzar dels electrons en els circuits electrònics, sempre presents), soroll de baixa freqüència o fluctuacions (degudes a inestabilitat en el detector, canvis en la temperatura, oscil·lacions del subministrament elèctric,

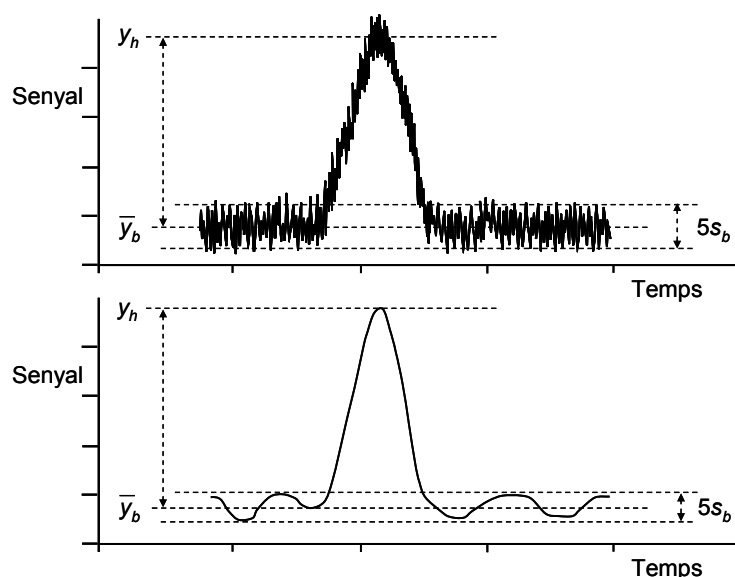


Fig. 35. Soroll de fons abans i després de filtrar les altes freqüències, i mesura de l'amplària de la banda de fons per calcular el LOD

etc), i deriva (*drift*, línia base inclinada). Per distingir pics fins a concentracions molt baixes, és important que la línia base estiga lliure de deriva i fluctuacions, i que el soroll aleatori d'alta freqüència siga de molt baixa amplitud. En la Fig. 35 es mostra un pic de poca intensitat, que destaca poc sobre la banda del soroll de fons. En la part de dalt de la figura, el senyal no està filtrat, de manera que es veu el soroll d'alta freqüència. Si es passa un filtre electrònic o digital, el soroll d'alta freqüència desapareix, però les fluctuacions de baixa freqüència no. Aquestes no es poden filtrar perquè desapareixeria també el pic. En eliminar les altes freqüències, la banda del fons es fa més estreta, però sempre queda un soroll de baixa freqüència que no es pot eliminar.

Mesura del soroll de fons amb el criteri 5s. Tant si es filtra el soroll d'alta freqüència com si no, una forma molt pràctica de mesurar el soroll de fons és aplicar el **criteri 5s**. Se suposa que les oscil·lacions són aleatòries, de manera que segueixen la distribució de Gauss. El 99% de l'àrea per baix la corba de Gauss està compresa entre $-2.5s_b$ i $+2.5s_b$, on s_b és la desviació estàndard del fons o desviació estàndard del blanc. Per tant, si es té la precaució de deixar fora de la mesura un 1% de l'àrea de les oscil·lacions del fons (les "puntes" d'algunes oscil·lacions), es té un valor de l'amplària de la banda de fons aproximadament igual a $5s_b$. Aquesta mesura de s_b (amplària de la banda del fons dividida per 5) és prou precisa, i com s'explica a continuació, serveix per a mesurar límits de detecció. Per tenir un valor fiable, la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomana mesurar l'amplària de banda del soroll al llarg d'unes 10 vegades l'amplària de la base del pic, i a cada costat (tal com s'ha fet a la Fig. 35 es insuficient). *Exemple.* Si en la Fig. 35 la banda del fons té una amplària de 12 mV, resulta: $s_b = 12/5 = \pm 2.4$ mV.

Límit de detecció (LOD, limit of detection). És una estimació de la capacitat d'un mètode per detectar concentracions o quantitats molt menudes d'analit. Un pic es considera detectat si destaca n desviacions estàndard sobre la mitjana de les desviacions del fons (ns_b). El valor de n varia segons la norma que s'aplique. Un valor freqüent és $n = 3$. Segons aquest criteri (IUPAC, 1978), el LOD és la concentració d'analit que genera un senyal que destaca $3s_b$ sobre la mitjana de la línia base. Com es veu a la Fig. 36, a concentracions per sota del LOD la dispersió dels punts fa impossible prendre mesures del senyal. Això és perquè per sota del LOD el soroll és més gran que el senyal. Si b és el pendent de la corba de calibrat, el LOD es calcula com $3s_b$ dividit per b , per a convertir el senyal en el LOD en concentració:

$$\text{LOD (concentració)} = 3s_b / b \quad (25)$$

Exemple (continuació). Si el pic de l'analit té 90 mV (des de la mitjana del blanc fins al màxim), i correspon a un estàndard de 0.1 mg/L, es té: $s_b = \pm 2.4$ mV, $b = 90 \text{ mV} / (0.1 \text{ mg/mL}) = 900 \text{ mV}/(\text{mg/mL})$, i per tant, $\text{LOD} = 3 \times 2.4 / 900 = 0.008 \text{ mg/mL} = 8 \text{ }\mu\text{g/mL}$.

Cal notar que el LOD estimat amb aquest procediment és el que correspon a mesures de l'altura del pic, quan el més habitual és mesurar l'àrea. Com s'indica en la secció 10 d'aquest tema, el calibrat en àrees és molt més habitual que en altures. No obstant això, es pot demostrar que els LODs obtinguts fent mesures en àrees i en altures són exactament els mateixos. Sense arribar més lluny, aquesta conclusió es deriva del fet que la incertesa de l'altura d'un pic és molt més gran que la incertesa de la seva amplària. Per tant, si un pic té una imprecisió del 4% de l'altura, doncs també té una imprecisió del 4% de l'àrea. És per això que el procediment 5s és molt habitual, perquè dona el mateix, i perquè les mesures de la banda del fons en altures són molt més fàcils de fer que mesurar la imprecisió de l'àrea.

Sensibilitat. És una mesura de la capacitat del detector per distingir xicotetes diferències de concentració de l'analit. Matemàticament, és el pendent de la corba de calibratge, b .

Selectivitat. Un detector és selectiu quan és sensible a un solut donat, o a un grup reduït o particular de soluts, i la seua sensibilitat és baixa o nul·la davant altres soluts. Selectivitat s'oposa a universalitat. Un detector és universal quan presenta una sensibilitat similar enfront de tot tipus de soluts.

Rang dinàmic lineal, LDR (*linear dynamic range*): és l'interval de concentracions per al qual la relació senyal - concentració és lineal. S'inicia al LOD i acaba quan la resposta del detector s'aparta de la linealitat en més d'un 3% (Fig. 36). Es mesura en ordres de magnitud o dècades, i es calcula com:

$$\text{LDR} = \log [(\text{resposta lineal màxima per una desviació de 3\%}) / \text{LOD}] \quad (26)$$

Exemple. Calcular el LDR per a l'exemple de la Fig. 35 si la linealitat es desvia un 3% quan el senyal aplega a $y = 2.88 \text{ V}$.

Solució: Com que el senyal en el LOD val $3 \times 2.4 = 7.2 \text{ mV}$, resulta: $\text{LDR} = \log (2880/7.2) = 2.6$ dècades.

La quantificació dels analits es facilita molt si el detector té un rang dinàmic lineal de diversos ordres de magnitud (o dècades): s'eviten les dilucions i preconcentracions, i els errors associats a la manipulació addicional de les mostres durant les operacions de dilució o preconcentració.

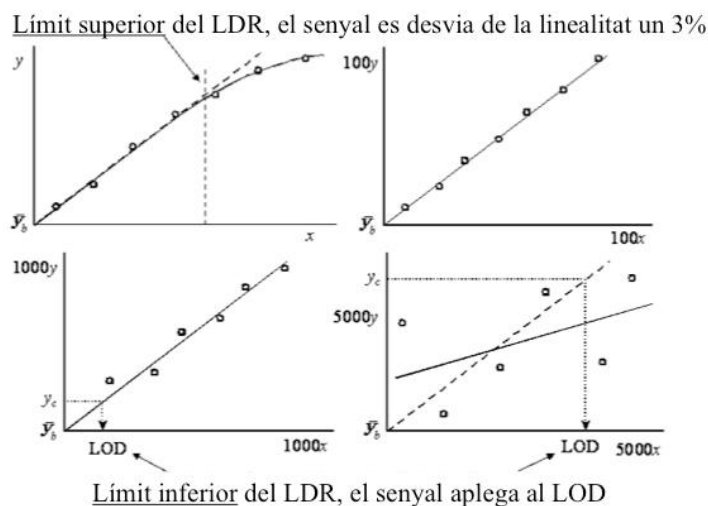


Fig. 36. Corbes de calibrat: efecte de la dilució des del límit superior del LDR fins al LOD (la dispersió augmenta en diluir)

Anàlisi quantitativa en cromatografia. Per determinar un solut i l'àrea del pic corresponent es relaciona amb la concentració en la mostra:

$$A_i = b_i C_i \quad (26)$$

on b_i és el pendent de la corba de calibratge en àrees. Com en qualsevol altra tècnica basada en el calibratge, per trobar b_i es cromatografia el patró en concentracions creixents i es mesuren les àrees. En general, el programari (*software*) de l'instrument contindrà eines per establir la línia base i integrar l'àrea dels pics (unitats de voltatge x temps). En cas que alguna etapa del mètode analític siga poc segura respecte a la conservació de la massa de solut, o respecte a la conservació de la sensibilitat amb el temps, es pot aplicar la tècnica del patró intern, exactament igual que en qualsevol altra tècnica. El patró intern s'afegeix a la mostra prèviament a l'etapa o les etapes crítiques, i en concentració coneguda i constant. Se selecciona un patró que no estiga present en les mostres, però amb propietats físiques i químiques similars a les dels analits. Sobre el cromatograma, el patró intern dona un pic d'àrea A_p . L'àrea d'aquest pic es fa servir per dividir les àrees dels pics dels analits. El calibrat correspon ara a l'equació:

$$(A_i / A_p) = b'_i C_i \quad (27)$$

FI DEL TEMA DE TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA

3. CROMATOGRAFIA DE GASOS

1. Introducció i esquema del cromatògraf de gasos
2. Camp d'aplicació i reaccions de derivatització habituals en GC
3. Injecció de la mostra amb derivació i sense derivació i directa en columna
4. Les fases estacionàries habituals
5. Tipus de columnes. Les columnes capil·lars. Criteris de selecció
6. Eluació a temperatura programada
7. El detector de ionització de flama (FID)
8. Detectores basats en modificacions del FID: NPD i PSD
9. El detector de captura electrònica (ECD)
10. Anàlisi qualitativa en GC. Els índexs de Kováts

1. Introducció i esquema del cromatògraf de gasos

En cromatografia gasosa o de gasos (GC, *gas chromatography*) la fase mòbil és un gas, i la fase estacionària és la superfície activa d'un sòlid o, més freqüentment, un líquid que recobreix un suport sòlid, ja siga per banyat o per unió química (fase enllaçada). El suport sòlid pot ser un rebliment de partícules de sílice (columnes reblertes) o, amb molta més freqüència, la paret interna d'un tub capil·lar de sílice (columnes capil·lars). Atenent a la naturalesa de la fase estacionària es distingeix:

- a) **Cromatografia gas-sòlid o d'adsorció**, la qual únicament s'utilitza per la separació de compostos que són gasos a temperatura ambient, com CO, CO₂, N₂, NH₃, etc.
- b) **Cromatografia gas-líquid o de partició o repartiment**, utilitzada per la separació de tot tipus de compostos, amb l'única limitació que deuen ser suficientment volàtils a temperatures inferiors a uns 350 °C o, al seu torn, deuen poder formar derivats que siguen volàtils a eixa temperatura. Algunes fases estacionàries no es descomponen fins uns 450 °C, fet que permet practicar una GC d'alta temperatura, útil per separar soluts molt poc volàtils, encara que deuen ser tèrmicament molt estables.

—A causa del camp d'aplicació incomparablement més ampli de la cromatografia de repartiment gas-líquid, quan es diu simplement "cromatografia de gasos" s'entén que es tracta d'aquesta última.

Funció del gas portador. El gas utilitzat com a fase mòbil és un simple portador dels analits; no existeix cap tipus d'interacció química entre gas i analits, pel fet que la naturalesa del gas no influeix sobre la selectivitat. No obstant això, la difusibilitat dels soluts és major si el gas és menys viscos. L'augment de difusibilitat incrementa la velocitat de les transferències de massa en el si del gas, cosa que millora l'eficàcia quan es treballa a cabals alts (per damunt de l'òptim de Van Deemter, per reduir així el temps d'anàlisi).

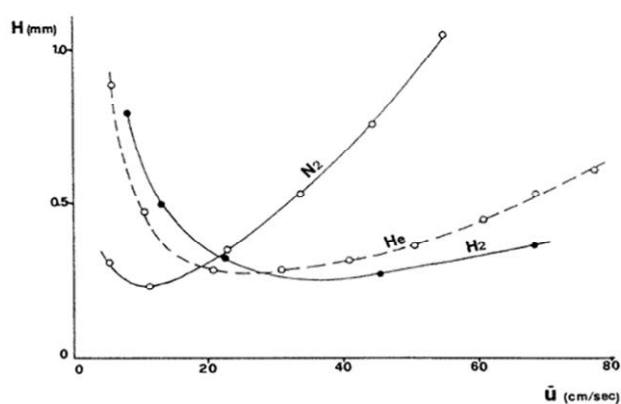


Fig. 1. Corbes de van Deemter obtingudes amb un solut qualsevol sobre una mateixa columna però fent ús de gasos portadors diferents

Per això, el millor gas portador és el H₂, seguit del He i després del N₂. S'evita l'ús de O₂ o d'aire per reduir els riscos d'oxidació dels analits o de les fases estacionàries. Com s'observa en les gràfiques de van Deemter (Fig. 1), el gas menys viscos (H₂) presenta el mínim de la corba a un valor més alt del cabal. Per tant, amb H₂ es pot augmentar molt el cabal i reduir el temps d'anàlisi sense perdre eficàcia. Altres factors a tenir en compte són la perillositat (el H₂ és inflamable), les exigències del detector que es vaja a utilitzar (en GC-MS és habitual utilitzar He), el preu (el He és millor que el N₂, però prou més car) i la sostenibilitat (el He s'extrau dels combustibles fòssils, i per tant és un recurs no renovable). No obstant això, com que la major eficàcia i l'estalvi de temps tenen molta importància, els gasos portadors més utilitzats en GC són H₂ i He.

Esquema de l'instrument. Les parts essencials del cromatògraf de gasos (Fig. 2) són:

- Subministrament de gas: He, N₂, aire i H₂, depenent del detector utilitzat. El subministrament pot ser en botelles (bales), o mitjançant generadors de gasos, ja que el N₂ es pot concentrar a partir de l'aire, i el H₂ es pot generar per electròlisi de l'aigua. A l'eixida de la bala de gas cal disposar un reductor de pressió o manoreductor proveït de dos manòmetres (del grec, mesurador de gasos), un per controlar la pressió que queda en la bala, i l'altre per la que proveïm a l'entrada del cromatògraf.
- Injector de mostra, amb regulació independent de temperatura.
- La columna, la qual serà de reblerta o capil·lar.
- Forn de columnes amb control independent de temperatura.
- Detector, o detectors si s'utilitza un primer detector no destructiu seguit d'un altre muntat en sèrie.
- Rotàmetre (mesurador de cabdal) intercalat en el tub d'entrada de gas, i cabdalímetre electrònic o manual (de bombolla de sabó) situat a l'eixida de la columna.
- Sistema informàtic d'adquisició, tractament i presentació de dades.

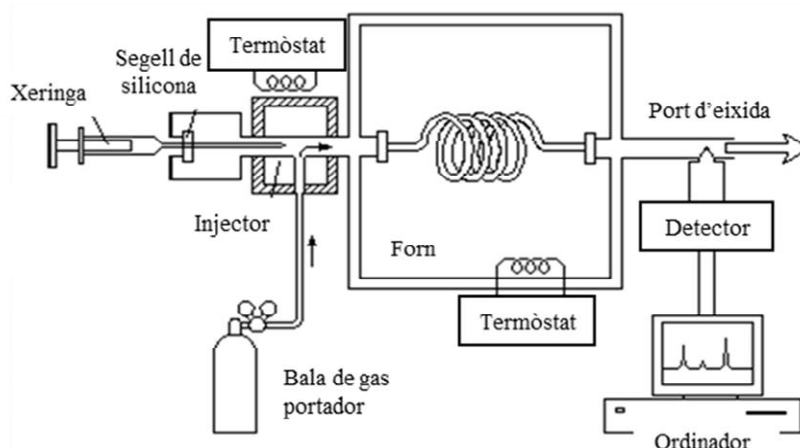


Fig. 2. Components d'un cromatògraf de gasos

2. Camp d'aplicació i reaccions de derivatització

Temperatures màxima i mínima d'operació. La temperatura màxima d'operació (350-450 °C) està limitada pel risc de descomposició tèrmica de la fase estacionària, i en fases no enllaçades també per la pèrdua de viscositat de la fase, fet que augmenta el risc del "sagnat", això es, que la fase estacionària isca de la columna. No obstant això, el camp d'aplicació de la cromatografia de gasos es pot estendre a molts compostos no volàtils mitjançant reaccions prèvies de derivatització dels soluts (veure subapartat següent).

La temperatura mínima de treball és el punt de fusió de la fase estacionària. Una fase estacionària sòlida no pot retenir soluts, ja que aquests no es dissolen en el seu si. La temperatura mínima de treball també ve limitada per l'augment excessiu de viscositat que experimenten certes fases polimèriques a temperatures baixes. Amb una viscositat excessiva la transferència de massa és molt lenta i per tant l'eficàcia és baixa (com indica el 3r terme de l'equació de Van Deemter).

Reaccions de derivatització habituals en GC. L'objectiu principal de la derivatització de mostres per a GC és augmentar la volatilitat dels analits, per fer possible l'elució a temperatures raonables, sense descomposició tèrmica o sense reorganitzacions intramoleculares. S'aconsegueix mitjançant la transformació dels grups polars (carboxilat, hidroxil, amides, amina, fosfat, etc) en altres menys polars. La volatilitat augmenta perquè es redueixen les interaccions intermoleculares (sobretot els ponts d'hidrogen).

A més d'incrementar la volatilitat, altres raons que poden aconsellar la derivatització dels analits són: reduir la seua inestabilitat tèrmica, augmentar la seua resposta en el detector (per exemple, incorporar grups CF_3 quan s'utilitza un detector de captura electrònica), millorar la separació reduint les cues d'adsorció, o facilitar el reconeixement de la molècula si s'utilitza un espectròmetre de masses com a detector (el banc de dades conté els espectres de masses dels derivats, no dels analits sense derivatitzar si aquests no són volàtils). Reaccions de derivatització molt habituals en GC són, entre altres, la **sililació**, l'**esterificació** d'àcids carboxílics amb metanol i de grups $-\text{OH}$ amb anhídrids, i la **metilació** amb diazometà.

Sililació. Quasi tots els grups funcionals polars responsables de la falta de volatilitat dels analits es poden sililar. Els derivats són menys polars, més volàtils i més estables tèrmicament. La reacció més freqüent és la substitució del protó pel grup trimetilsilil: $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. S'utilitzen diversos reactius sililants; per a GC-MS es recomana l'ús del tert-butil-dimetil-clorosilà (Fig. 3). Les reaccions són molt ràpides i quantitatives, inclús a temperatura ambient, si bé se sol calfar durant uns minuts a 60°C per assegurar la quantitativitat.

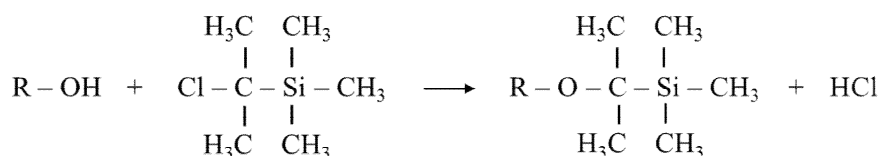
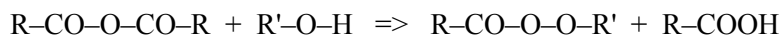


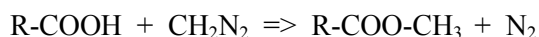
Fig. 3. Reacció de sililació d'un grup OH amb tert-butil-dimetil-clorosilà

Esterificació. Els grups carboxilats s'esterifiquen amb metanol en presència d'un àcid com catalitzador: $\text{R-COOH} + \text{CH}_3\text{OH} \Rightarrow \text{R-COOCH}_3 + \text{H}_2\text{O}$

Per la seua part, els grups $-\text{OH}$ (alcohol) s'esterifiquen amb anhídrid acètic o trifluoroacètic (perquè els derivats perfluorats són més volàtils):



Metilació amb diazometà. El diazometà és un reactiu molt eficaç i d'ús molt freqüent. Metila els àcids orgànics i altres grups reactius de la següent manera:



3. La injecció sense derivació i amb derivació, i la injecció directa en columna

Tècniques d'injecció de líquids. En l'injector, la mostra es deu vaporitzar ràpidament, per ser després arrossegada pel gas portador cap a la columna. La mostra, ja siga en la seua totalitat o en part, es deu transferir a la columna d'una manera ràpida i representativa. La rapidesa és necessària perquè la mostra ocupe una estreta franja al començament de la columna, de manera que es pugui mantenir una eficàcia alta. En aquest sentit, la vaporització de la mostra és una etapa crítica.

La vaporització és també una operació crítica respecte a preservar la representativitat. Els components més volàtils de la mostra es vaporitzen abans que els més pesats, menys volàtils, de manera que es produeix una cua d'aquests últims. Si els components pesats tarden molt de temps en entrar en la columna s'obtenen pics deformats i de baixa eficàcia. Si s'atura la injecció abans que s'acabe de vaporitzar tota la mostra, per preservar així l'eficàcia, es té una injecció no representativa, amb una proporció menor de components pesats que la que veritablement presente la mostra. Aquest fenomen es coneix com a **discriminació per masses**, i produeix cromatogrames amb la sensibilitat exaltada per a components lleugers, i deprimida per als pesats. Per aconseguir una injecció ràpida i representativa s'utilitzen tres tècniques: injecció amb derivació o divisió de la mostra, injecció sense derivació i injecció directa en columna.

L'injector *split/splitless* o amb divisió / sense divisió (o amb/sense derivació) és un bloc metàl·lic amb regulació de temperatura independent de la temperatura del forn (Fig. 4). Les mostres s'injecten en estat líquid, manualment, o mitjançant un injector automàtic, punxant a través d'un segell (*septum*) o disc de cautxú de silicona amb una **xeringa Hamilton** (Fig. 5). Aquestes xeringues estan dissenyades per injectar amb precisió volums molt menuts de mostres líquides, entre 1 i 50 μL . En el cromatògraf de la Fig. 5 (dreta), la xeringa Hamilton es troba dins del cos vertical de la "torre" d'injecció que injecta les mostres. La "torre" pot operar en conjunció amb un carrusel de mostra, o formar part del braç del robot cartesià muntat sobre el forn.

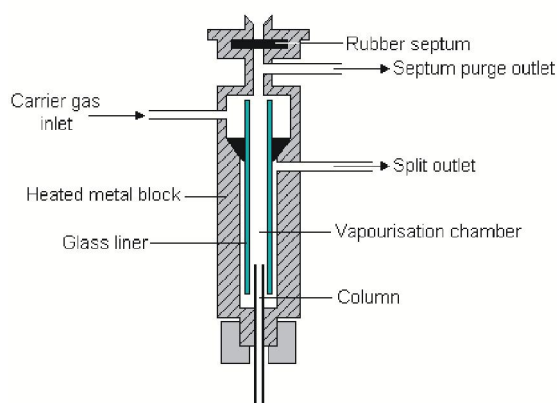


Fig. 4. Injector amb divisió o *split*



Fig. 5. Cànules o *liners* amb diferents dissenys (esquerra), xeringues Hamilton (centre) i torre d'injecció amb carrusel (dreta)

a) **Injecció amb derivació (o divisió)** de la mostra (*split injection*): La mostra es volatilitza en una cambra o **cànula** (*liner*, literalment "la barqueta"), on es mesclen els vapors (Fig. 5, esquerra). Quan es va a injectar una mostra, el cabal de gas portador es deté durant uns segons perquè es mesclen els vapors produïts. A continuació s'augmenta bruscament el cabal amb l'eixida de la derivació (*split*) oberta (Fig. 6, esquerra). Únicament una fracció dels vapors entra en la columna. La resta de la mostra (pot ser tant com el 99%) es rebutja a través de la derivació (*split*). D'aquesta manera s'eliminen les cues que es produïrien si seguien entrant en la columna restes de la mostra volatilitzada. L'eliminació de cues és essencial per preservar l'eficàcia. Quan l'injector està net, es redueix el cabal de gas al seu nivell normal de treball i es tanca la derivació.

b) **Injecció sense derivació** (*splitless injection*): Com en el cas anterior, es deté el cabal de gas portador i s'injecta la mostra en l'interior de la cànula, però mantenint sempre tancada la derivació

(Fig. 6, centre). D'aquesta manera, quasi tot el vapor produït entra en la columna. Es deixa perdre un poc de mostra per la purga del segell de silicona amb el fi d'eliminar les últimes restes de la mostra.

c) **Injecció directa en columna.** No s'utilitza cànula, però sí una agulla més llarga, de manera que el seu extrem s'introdueixca un poc en l'interior de la columna (Fig. 6, dreta). La mostra es volatilitza directament dins de la columna. Com que tot el vapor produït entra en la columna no es causa discriminació per masses. No obstant això, es corre el risc de fer malbé la columna, especialment si la mostra conté components no volàtils que hi quedaran dipositats permanentment. Per això, la injecció directa en columna es reserva per a soluts d'alt punt d'ebullició, que s'evaporen molt lentament en la cànula, i per a soluts tèrmicament inestables, que poden sofrir degradació en contacte amb els materials de la cànula (quars o vidre). A més, la injecció directa no es pot utilitzar amb columnes capil·lars. Una columna capil·lar requereix dividir sempre la mostra perquè no es produïska sobrecàrrega (i la consegüent pèrdua d'eficàcia).

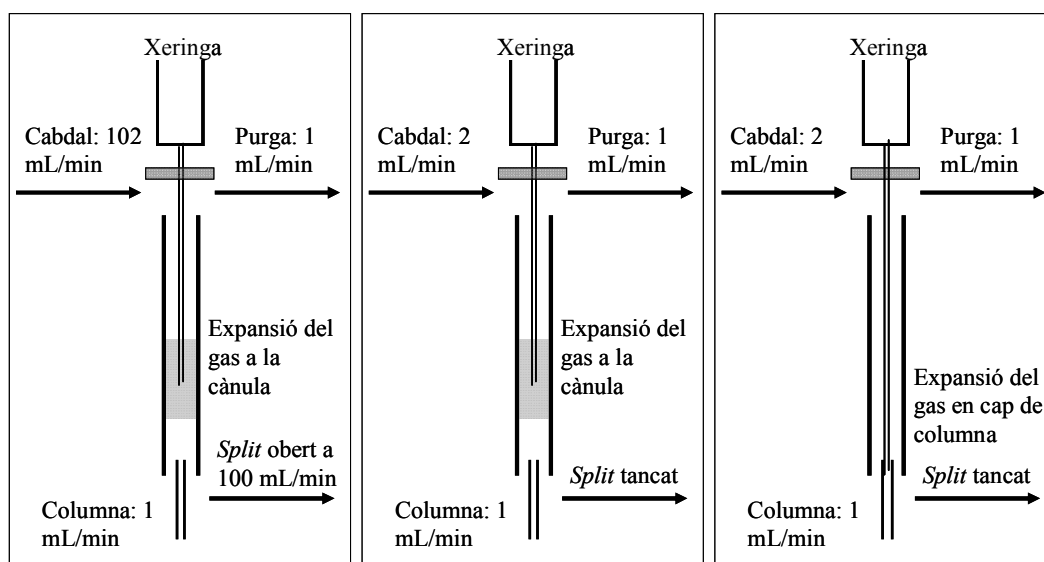


Fig. 6. Esquerra: injecció amb divisió, la major part del gas generat s'expulsa per la vàlvula de divisió. Centre: injecció sense divisió, quasi tot el gas generat entra en la columna. Dreta: injecció directa en columna, el gas es genera en cap de columna.

Funció de la cànula. És impossible aconseguir la volatilització instantània de tota la mostra. Per això, la injecció ideal deu constar d'una etapa de volatilització tan ràpida com siga possible de tots els components, seguida d'un mesclat al més complet possible dels soluts que es volatilitzen ràpidament amb els que ho fan lentament. La **cànula** és una cambra de vidre o de sílice que proporciona un espai perquè la mostra es vaporitzi per complet, i el vapor produït es mescla abans d'entrar en la columna. Algunes cànules tenen una zona reblerta amb fibra de vidre o de quars per facilitar la ràpida evaporació de la mostra, si bé el risc és que la seua superfície pugui catalitzar alguna reacció de descomposició dels analits. La cànula també serveix perquè no s'embrute l'interior de l'injector, i perquè els components de la mostra no entren en contacte amb les seues parets metàl·liques, les quals podrien actuar de catalitzadors.

Una altra funció de la cànula és protegir la columna. Les restes no volàtils de les mostres es van acumulant en la cànula, per la qual cosa és necessària netejar-la o reemplaçar-la periòdicament. Existeixen tipus de cànules especials, com les que s'utilitzen per a desorció de mostres retingudes sobre barra agitadora (veure tema 1). En aquest cas, en comptes de punxar amb una agulla a través d'un segell, la barra agitadora (l'imant recobert d'absorbent) és introduït en la cànula.

4. Fases estacionàries més utilitzades en GC

Les fases estacionàries utilitzades en GC són polímers de massa molecular elevada, i sempre que és possible s'enllacen químicament a la paret interna del capil·lar. Les fases enllaçades són millors que les no enllaçades per diversos motius:

- No es perden per "sagnat" ni es volatilitzen a alta temperatura.
- Les columnes es poden llavar amb dissolvents.
- S'aconsegueixen espessors menors i més uniformes de fase (la seua espessor, d , és constant).

L'excepció la constitueixen algunes fases molt polars, que no poden enllaçar-se sobre sílice (com els poli-etilè-glicols o PEGs). Els tipus principals de fases estacionàries per a GC són:

a) **Fases apolars.** Retenen als soluts mitjançant forces hidrofòbiques o de Van der Waals (atracció entre dipols permanents i induïts dèbils). S'utilitzen per separar soluts apolars (hidrocarburs alifàtics i hidrocarburs halogenats), i també soluts que, tot i ser polars, tenen una part apolar important en les seues molècules (per exemple, pesticides i altres contaminants ambientals). Les fases apolars més habituals estan constituïdes per poli-dimetil-siloxà (PDMS) (Fig. 7).

b) **Fases polaritzables.** Retenen soluts polaritzables (com els que contenen un doble o un triple enllaç, o un anell aromàtic) mitjançant la formació de dipols induïts. Les fases polaritzables més habituals estan constituïdes també per PDMS, però amb una certa proporció de grups fenil (per exemple, les fases amb un 5 % de difenils són les més utilitzades).

c) **Fases polars.** Contenen dipols permanents, i retenir soluts polars i polaritzables, com alcohols, cetones, èters, esters, amines, etc. Les fases polars més habituals contenen PDMS amb una proporció considerable de grups propil-ciano-fenil (del 10 al 35 %).

d) **Fases molt polars.** Retenen els soluts mitjançant atracció entre dipols permanents i/o per formació de ponts d'hidrogen (ja siga per donació o per acceptació del protó). Per experimentar retenció sobre aquestes fases, els soluts deuen contenir almenys un grup funcional molt polar. En aquest grup s'inclouen les fases de DMPS amb proporcions elevades de propil-ciano, i les fases de poli-etilè-glicol o PEG: $\text{H}-[\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}]_n\text{-OH}$.

Ordre d'elució dels soluts: regla dels punts d'ebullició i regla de l'afinitat. Si la fase estacionària és apolar, la retenció únicament es pot produir mitjançant forces de Van der Waals, és a dir, mitjançant interacció entre dipols permanents i induïts dèbils. Aquestes interaccions es denominen "inespecífiques", per distingir-les de les interaccions més fortes o "específiques" que tenen lloc entre grups funcionals polars. En absència d'interaccions específiques, els soluts ixen de la columna en ordre creixent del seus punts d'ebullició.

Si la fase estacionària és polar o polaritzable, es produiran també interaccions específiques amb els soluts que tinguen grups funcionals polars o polaritzables. En aquest cas, l'ordre d'elució vindrà donat per les dues regles següents:

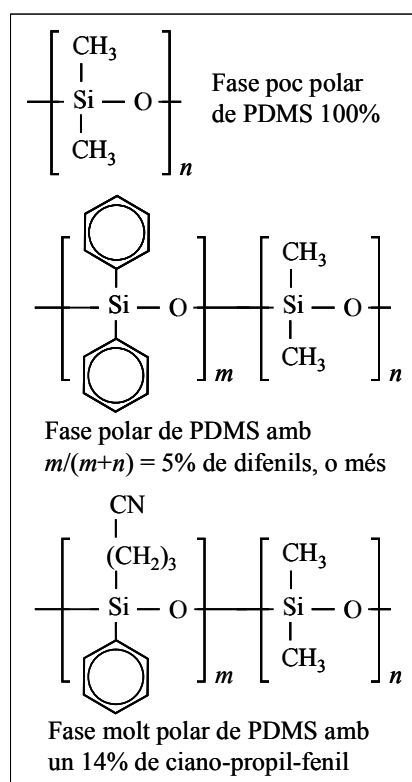


Fig. 7. Composició de les fases estacionàries més habituals en GC

a) **Regla dels punts d'ebullició.** Els membres d'una mateixa sèrie homòloga de compostos tenen propietats químiques similars, per la qual cosa la fase estacionària no pot distingir-los en base a interaccions específiques. La distinció entre els membres d'una mateixa sèrie homòloga s'aconsegueix en base a la seua volatilitat: els soluts d'una mateixa sèrie homòloga apareixen en ordre creixent dels seus punts d'ebullició. Exemple: n-butanol < n-pentanol < n-hexanol < etc.

b) **Regla de l'afinitat per la fase estacionària.** Soluts de sèries homòlogues distintes es separen en base a diferències d'afinitat per la fase estacionària: el solut que interacciona més fortament amb la fase estacionària resulta més retingut. Exemple: en una columna polar, el dibutil-èter apareixerà abans que la dibutil-cetona, que és més polar i es reté més.

5. Tipus de columnes. Columnes capil·lars. Criteris de selecció de columnes capil·lars

Columnes reblertes i capil·lars. En GC s'utilitzen dos tipus de columnes: les reblertes o particulades, i les capil·lars. Les columnes reblertes es construeixen amb tubs d'1 m a 10 m de longitud i uns pocs mil·límetres de diàmetre intern (Fig. 8, esquerra). La majoria contenen un farcit de partícules de sílice porosa (amb freqüència, terra de diatomees o diatomita, Fig. 8, centre), recoberta per fase estacionària enllaçada o dipositada per bany. S'utilitzen quan no es requereix una eficàcia alta, o quan cal manejar quantitats grans de mostra per poder assolir límits de detecció més baixos (per exemple, per a anàlisis de traces). Són columnes que es poden utilitzar amb tot tipus de detectors, a diferència de les columnes capil·lars, que requereixen detectors amb límits de detecció molt baixos.



Fig. 8. Columna d'acer reblerta de diatomita (centre) i columnes capil·lars de sílice

Les columnes capil·lars. En GC, les columnes capil·lars són molt més eficaces que les reblertes, per la qual cosa s'utilitzen molt més. Estan constituïdes per tubs capil·lars de sílice amb un diàmetre intern d'entre 50 i 530 μm . La seua longitud varia entre els 15 i els 90 metres, i es fan servir enrol·lades en un bastidor (Fig. 8, dreta). Els capil·lars es poden doblegar sense trencar-se gràcies al recobriment extern de poliimida, fortament adherit a la seua superfície (Fig. 9). Existeixen columnes capil·lars de tres tipus: recobriment de paret o WCOT (*wall coated open tubular*), de suport sòlid porós o SCOT (*support coated open tubular*) i de capa porosa o PLOT (*porous layer open tubular*).

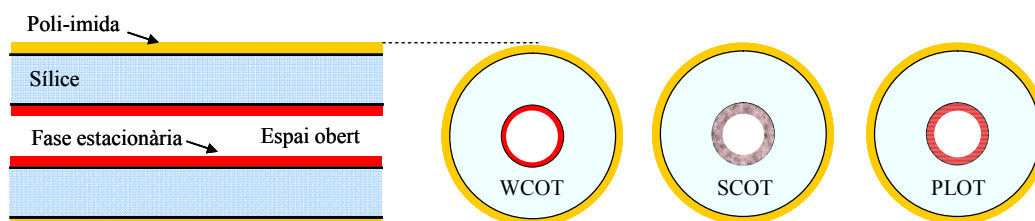


Fig. 9. Columnes capil·lars de sílice tipus WCOT, SCOT i PLOT

En les columnes WCOT, la fase estacionària està dipositada o enllaçada directament sobre la paret interna del capil·lar, formant una pel·lícula molt prima, d'entre 0,1 i 10 μm . Són molt eficaces, però la seua **capacitat de càrrega** és molt menuda. Les columnes SCOT contenen una capa de partícules (terra de diatomees) sobre les parets, i un canal central obert (sense rebliment) en el centre del tub capil·lar. La capa de partícules augmenta la superfície on està dipositada la fase estacionària. Les columnes PLOT són similars a les SCOT, però la capa porosa ancorada a les parets és polimèrica. Les columnes SCOT i PLOT tenen major quantitat de fase estacionària, i per tant, la seua capacitat de càrrega és major.

La **capacitat de càrrega** d'una columna és directament proporcional al volum de fase estacionària per unitat de longitud. Com més fase estacionària per metre de columna, més capacitat té la columna per dissoldre quantitats grans de solut sense aplegar a la saturació, i sense que s'aplegue a alterar les propietats de la fase estacionària com a dissolvent. Si se sobrepassa la capacitat de càrrega d'una columna apareixen deformacions dels pics (en forma de llengüetes o avançades). Columnes amb gran capacitat de càrrega permeten injectar majors quantitats de mostra. Això permet assolir límits de detecció menors. No obstant això, una quantitat gran de fase estacionària fa més lentes les transferències de massa, cosa que en redueix l'eficàcia.

Criteris de selecció de columnes capil·lars. Per seleccionar una columna capil·lar es consideren cinc factors. Aquests cinc factors són importants perquè permeten reproduir els resultats en un altre laboratori o un altre instrument. Són valors que obligatòriament s'han d'indicar en el procediment de treball normalitzat del mètode (PNT o SOP, *standard operating procedure*). Són els següents:

a) **Naturalesa de la fase estacionària.** S'elegeix d'acord amb la naturalesa dels soluts que es volen retenir: apolars, polars o polaritzables.

b) **Tipus de columna (WCOT, SCOT o PLOT):** Per a alta eficàcia s'elegeix una columna WCOT, i per carregar més mostra i reduir així els límits de detecció, s'elegeix una SCOT o una PLOT.

c) **Diàmetre intern, D .** Per seleccionar el diàmetre es tenen en compte els següents criteris:

- Les columnes més amples tenen més capacitat de càrrega. En augmentar D hi ha més fase estacionària per unitat de longitud, cosa que augmenta la capacitat de càrrega. Si s'injecta més mostra, s'assoliran límits de detecció més baixos.
- En augmentar el diàmetre es redueix la retenció. En augmentar D augmenta també el volum total de fase estacionària, V_S . No obstant això, el volum de fase mòbil, V_M , augmenta més ràpidament que V_S (l'espai lliure augmenta més que la superfície de la paret), fet pel qual es redueix el quocient V_S/V_M . La conseqüència és una **menor** retenció, ja que $k = K_D V_S/V_M$.
- En augmentar el diàmetre es redueix l'eficàcia. Augmenta la distància que han de recórrer els soluts per restablir l'equilibri termodinàmic entre la superfície de la fase estacionària i el si del gas portador, de manera que augmenta el retard de les transferències de massa (el restabliment de l'equilibri requereix més temps), fet que en redueix l'eficàcia.

Una **regla pràctica** és elegir valors grans de D , excepte quan es requereix alta eficàcia (quan els soluts són difícils de separar), o quan cal augmentar la retenció de soluts poc retinguts.

d) **Espessor de la pel·lícula de fase estacionària, d .** Las fases estacionàries poden ser molt primes (0,1 μm) o molt gruixudes (1 μm o més). Per seleccionar d es tenen en compte els següents criteris:

- En augmentar d augmenta la capacitat de càrrega i es poden utilitzar també detectors amb límits de detecció més alts.

- Amb un valor alt de d la superfície de la sílice queda millor recoberta evitant-se la formació de cues per adsorció (elució no lineal).
- Per altra part, una pel·lícula gruixuda de fase estacionària augmenta el retard de les transferències de massa, fet que en redueix l'eficàcia.
- Un valor alt de d implica més fase estacionària sense que a penes es modifiqui el volum de fase mòbil, i, ja que $k = K_D V_S / V_M$, la retenció augmenta.

Una **regla pràctica** és elegir valors menuts de d per tenir eficàcies altes, llevat que apareguen problemes de cues, o que els soluts estiguen poc retinguts.

En la **taula** adjunta s'observa com el nombre de plats per unitat de longitud augmenta quan disminueix el diàmetre del tub, o també quan es redueix el gruix de la fase estacionària, a la vegada que disminueix la capacitat de càrrega.

Tipus de columna	L (m)	D (mm)	Plats/ m	N (plats)	Capac. càrrega (ng)
De farcit	1-6	2	màx. 700	700-42000	10^6
SCOT i PLOT	15-60	0.5	màx. 2500	màx. 150000	600
WCOT	15-90	0.20	5000	150000-300000	30
		0.32	3333	100000-200000	500
		0.75	1167	35000-70000	10000

e) **Longitud de la columna, L .** Cal tenir en compte el següent:

- La longitud de columna té un impacte moderat sobre la resolució. La resolució és proporcional a l'arrel quadrada de L , per tant, per duplicar la resolució es deu quadruplicar L (passar per exemple de 15 a 60 m).
- No obstant això, en augmentar L el temps d'anàlisi augmentarà en la mateixa proporció.
- També augmenta el cost econòmic de la columna i de les anàlisis (perquè costen més temps).

Tenint en compte aquests criteris, la **regla pràctica** és utilitzar columnes de 15 m per a separacions fàcils o ràpides, de 30 m per a ús general, ja que són les que donen el millor balanç entre resolució i temps d'anàlisi, i de 60 m per a separacions difícils, o per a compostos volàtils o poc retinguts. Les columnes més llargues únicament són útils en casos molt particulars.

6. Elució a temperatura programada

Variació de la retenció relativa amb la temperatura. En GC s'observa que el logaritme de la retenció relativa és proporcional a l'invers de la temperatura absoluta (equació de Van t'Hoff):

$$\log k = \Delta H / (2.3 R T) + A \quad (1)$$

on ΔH és l'entalpia molar de dissolució del solut en la fase estacionària i R és la constant universal dels gasos. La constant A es fa servir per ajustar millor les dades experimentals a una recta, però sol ser molt menuda. Aquesta equació és útil per a predir el comportament dels soluts a diferents temperatures. Per a això, n'hi ha prou amb cromatografiar els soluts d'interès a dues temperatures diferents (dues elucions isotèrmiques). Si es representa la recta $\log k$ davant $1/T$ per a cada solut, el pendent és $\Delta H / (2.3 R)$ i l'ordenada en origen és A . Un creuament de dues rectes indica la temperatura a la qual dos soluts

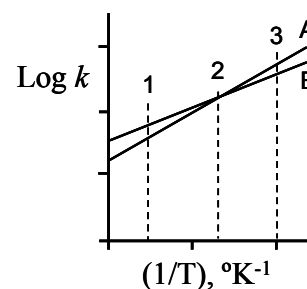


Fig. 10. Isotermes d'elució de dos soluts A i B

co-elueixen. L'encreuament indica també la temperatura per sobre i per sota de la qual s'inverteix l'ordre d'elució dels dos soluts. Per exemple, a una temperatura alta (com la de l'esquerra, marcada com a 1), el solut A elueix abans que el B, però a una temperatura baixa (com la de la dreta, marcada amb 3), el solut B elueix abans que el A. Quan la temperatura és 2, els soluts A i B co-elueixen.

GC a temperatura programada. No és possible cromatografiar a una mateixa temperatura soluts amb punts d'ebullició molt diferents: si es tria una temperatura baixa se separaran els soluts de punt d'ebullició baix, però els de punt d'ebullició més alt mai sortiran de la columna. Anàlogament, a una temperatura alta els soluts de punt d'ebullició alt se separaran adequadament, però els de punt d'ebullició baix apareixeran a temps de retenció propers al temps mort i no se separaran. Es té el mateix problema quan es cromatografien compostos de qualsevol tipus que tinguin polaritats molt diferents. El problema se soluciona mitjançant un gradient de temperatura, és a dir, treballant a temperatura programada.

El programa de temperatura de la columna s'executa immediatament després de cada injecció de mostra. Se sol començar a una temperatura constant relativament baixa, al cap d'uns minuts s'inicia l'augment de temperatura seguint una rampa lineal, que pot ser única o tenir trams de diferent pendent, seguida d'uns minuts a una temperatura elevada per facilitar l'elució dels components més pesants de la mostra. Finalment, es torna a la temperatura inicial abans d'injectar una altra mostra. A la Fig. 11, esquerra, es mostra un cromatograma de cinc hidrocarburs lineals. Com que la retenció augmenta d'acord amb $\log k$ i, a més a més, els pics dels soluts més retinguts són cada volta més amples, doncs, no és possible cromatografiar-ne més que uns pocs. En canvi, en la figura de la dreta, el gradient de temperatura ha produït un espaiat semblant entre tots els soluts, i ha fet més estrets els pics, independentment del seu temps de retenció. Per això, ha estat possible eluir des de l'hydrocarbure C8 fins al C35 en el mateix cromatograma i en un temps d'anàlisi raonable.

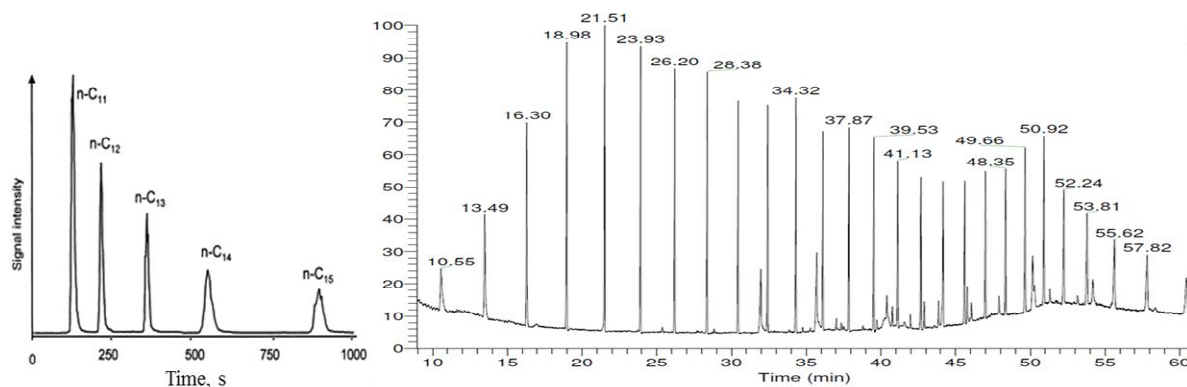


Fig. 11. Cromatogrames d'hydrocarburs lineals obtinguts en condicions isotèrmiques (esquerra, des de C11 a C15) i amb temperatura programada (dreta, des de C8 fins a C35). A la dreta, els nombres sobre els pics són els temps de retenció, i els pics menuts entremig són impureses.

Amb freqüència, per aprofitar l'efecte de trampa freda, s'utilitza una temperatura inicial més baixa que els punts d'ebullició de molts soluts. Els soluts queden retinguts al capdavant de columna, dissolts en la fase estacionària. Els soluts passen a la fase gas a mesura que s'assoleixen els seus respectius punts d'ebullició. Com que la temperatura continua elevant-se, els soluts s'acceleren i elueixen amb força rapidesa. És interessant observar que la cromatografia de gasos a temperatura programada s'assembla a una destil·lació fraccionada. En un mateix cromatograma obtingut en un curt espai de temps, de l'ordre dels 15 min, es poden aconseguir pics ben resolts d'un gran nombre de compostos amb masses moleculars i punts d'ebullició molt diferents.

7. El detector de ionització de flama (FID)—

Principi de funcionament. El FID (*flame ionization detector*) és un dels detectors de GC més utilitzats (Figs. 12 i 13). Com a gas portador se sol utilitzar nitrogen, menys perillós que el H_2 i més barat que el He. A l'eixida de la columna el gas es mescla amb menuts cabdals de H_2 i aire amb el fi de mantenir la flama d'una menuda mistera. La flama crema dins d'un anell el qual està connectat a potencial de terra. En canvi, la punta del cremador està connectada a un elevat potencial respecte a terra. A pesar d'aquesta diferència de potencial, en absència de portadores de càrrega el corrent elèctric entre cremador i anell és zero. El corrent únicament pot passar si apareixen ions o electrons en el gas (al si de la flama). El H_2 quan crema no produeix ions, per tal cosa la flama de H_2 té la propietat de no ser conductora de l'electricitat. En canvi, quan es crema qualsevol compost orgànic, la presència de ions i electrons en la flama origina un corrent elèctric entre cremador i anell.

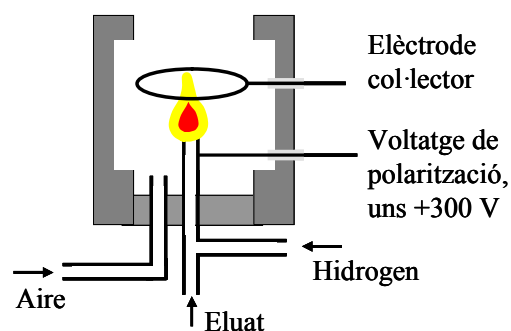


Fig. 12. Detector de ionització de flama o FID

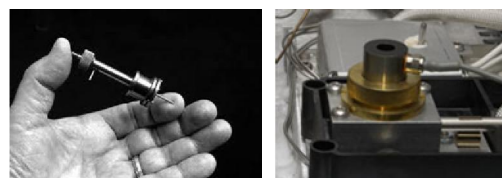


Fig. 13. FID desmuntat i muntat sobre el forn

Selectivitat de la resposta. La sensibilitat del FID és proporcional al nombre d'àtoms de carboni oxidables (carboni unit a hidrogen, que es pot oxidar a CO_2 i aigua). La resposta disminueix en augmentar la substitució amb halògens, amines i oxhidrils, ja que els carbonis units a aquests grups funcionals ja estan parcialment oxidats. La contribució dels carbonis encara més oxidats, com els de carbonils i carboxils, és nul·la.

Avantatges i limitacions. Per a compostos que tenen carbonis oxidables, s'assoleixen límits de detecció molt baixos. Per aquesta raó, un FID és molt adequat per treballar amb columnes capil·lars de qualsevol diàmetre. A més, té un interval dinàmic lineal molt ampli (abasteix fins set ordres de magnitud), és estable, senzill i robust. No obstant això, és un detector destructiu, fet pel qual no pot ser acoblat a un espectròmetre de masses.

8. Detectors basats en modificacions del FID

Existeixen diversos detectors el disseny dels quals és similar al d'un FID. Les modificacions introduïdes fan al detector més sensible, o inclús específic, per a la mesura de determinades espècies químiques. Entre els detectors derivats del FID destaquen el detector d'emissió termoiònica o nitrogen-fòsfor i el fotomètric de flama o de fòsfor-sofre.

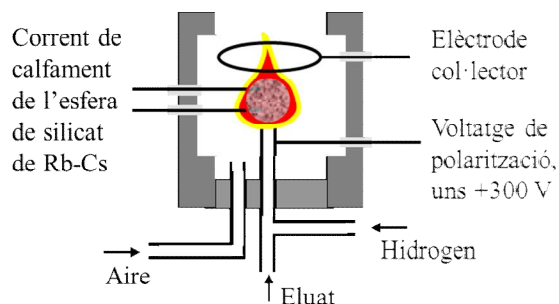


Fig. 14. Detector de nitrogen-fòsfor o NPD

En el NPD (*nitrogen-phosphor detector*) o **detector de nitrogen-fòsfor**, la principal modificació consisteix en la inserció en el si de la flama d'una "perla" o esfera de silicat de rubidi o de cesi (Fig. 14). Mitjançant una resistència elèctrica, l'esfera es manté a uns 600-800 °C. L'esfera calenta catalitza la descomposició dels compostos de nitrogen i fòsfor, produint una gran quantitat de ions, i per tant, també un augment del corrent elèctric

recollida per l'anell col·lector. Respecte al FID, la sensibilitat augmenta unes 500 vegades quan elueix un compost de P, i unes 50 vegades per a N. Es tracta per tant d'un detector selectiu, amb LODs molt baixos per a compostos nitrogenats i organofosforats.

El **FPD** (*flame photometric detector*) o **detector fotomètric de flama** és selectiu per a compostos que contenen fòsfor i sofre, com per exemple, els que se solen trobar en nombroses plaguicides i contaminants de l'aire. No es mesura el corrent, sinó la radiació emesa per la flama. Mitjançant un sistema òptic proveït de filtres s'aïlla la radiació característica emesa pels compostos de fòsfor (526 nm), o bé pels de sofre (394 nm), separant-la de les radiacions emeses per altres compostos que puguen estar presents en la flama (Fig. 15). Finalment, la intensitat de la radiació a la longitud d'ona elegida es mesura amb un tub fotomultiplicador (PMT, *photomultiplier tube*), o amb un fotodiode. El FPD és 100.000 vegades més sensible a compostos de fòsfor i sofre que el FID.

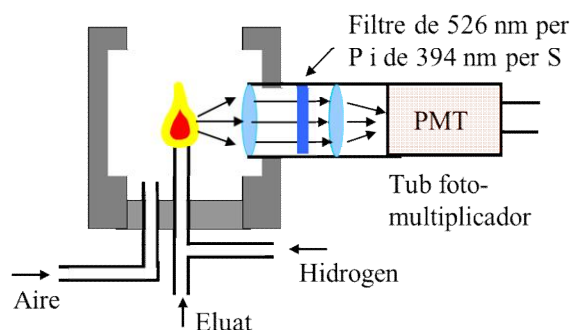


Fig. 15. Detector fotomètric de flama o FPD

9. El detector de captura electrònica

Principi de funcionament. En el detector de captura electrònica o ECD (*electron capture detector*) el gas que procedeix de la columna passa primer per una zona on entra en contacte amb electrons d'alta energia o "ràpids" (Fig. 16). Els electrons ràpids es poden generar amb un isòtop radioactiu (un emissor beta), tal com una esponja de ^{63}Ni (veure figura), o bé, mitjançant un camp elèctric molt intens (descàrrega en corona). Els electrons ràpids ionitzen el gas portador: $e_{\text{ràpid}} + \text{N}_2 \Rightarrow 2e_{\text{lent}} + \text{N}_2^+$

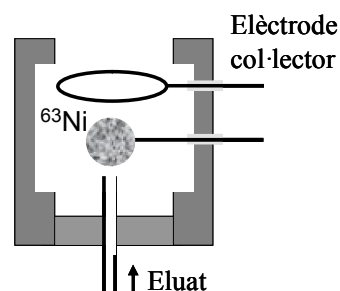


Fig. 16. Detector de captura o ECD

El gas ionitzat passa per un elèctrode en forma d'anell que recull un corrent que és degut fonamentalment als electrons. Quan elueix un compost electròfil, aquest capta els electrons i el corrent disminueix: $e_{\text{lent}} + \text{solut} \Rightarrow \text{solut}^-$

Selectivitat i aplicacions del ECD. La sensibilitat depèn de la capacitat que tinguen els soluts per capturar electrons. Front a compostos fortament electròfils, tals com els derivats halogenats, s'obtenen límits de detecció molt baixos. Per això, el detector de captura s'utilitza principalment en la detecció i determinació de pesticides i d'altres compostos que contenen brom, clor o fluor en les seues molècules. Front a compostos halogenats, el ECD és fins 1000 vegades més sensible que el FID, assolint límits de detecció de l'ordre d'uns pocs femtograms per segon ($1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$). La sensibilitat també és alta front a altres compostos electròfils com carbonils conjugats, nitrils i nitrocompostos. En canvi, aquest detector és insensible a hidrocarburs (al contrari que el FID), alcohols i cetones, que no són electròfils. En la Fig. 17 s'observen dos detectors muntats sobre el forn (cadascun d'ells connectat a l'eixida de distintes columnes); el de dalt és un ECD i el de baix un FID.

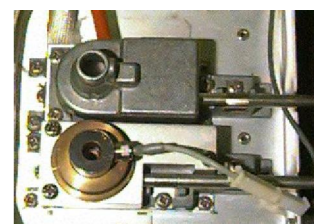


Fig. 17. ECD (dalt) i FID (baix) muntats sobre el forn

Inventat en 1957 per James E. Lovelock (la fotografia de la Fig. 18 és de *The Guardian*, maig de 2008), el ECD va revolucionar en els anys 60 del segle XX els coneixements que es tenien sobre la difusió i el destí final dels contaminants halogenats en el medi ambient atmosfèric i aquàtic.

J.E. Lovelock ha sigut i segueix sent un científic ambiental independent, original i polèmic, per la seua teoria sobre l'autoregulació del planeta, les seues encertades prediccions sobre el canvi climàtic (formulades ja en 1965) i la seua defensa de l'energia nuclear.

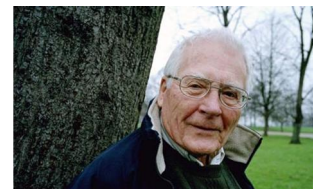


Fig. 18. J. Lovelock en 2008

10. Anàlisi qualitativa en GC. Els índexs de Kováts

Detectors sense i amb escombrat d'una variable. Els detectors que s'han vist fins ara mesuren una única propietat dels soluts, tals com la seva capacitat per donar ions i electrons en cremar-se, emetre radiacions característiques o absorbir electrons. En GC es fan servir també detectors més complexos, amb capacitat per escombrar una variable, i per tant, amb capacitat per donar uns quants centenars de valors d'aquesta variable durant l'elució del solut. Són dos: el detector d'espectrometria infraroja i el detector d'espectrometria de masses. Aquest darrer s'utilitza prou sovint, i molt més que el primer. No obstant això, aquests detectors queden fora de l'abast d'aquest tema. El detector d'espectrometria de masses es vorà en la part C de la matèria, en el tema d'hibridació instrumental.

Tanmateix, els detectors d'escombrada són eines molt poderoses per a l'anàlisi qualitativa. Els escombrats es realitzen diverses vegades mentre el solut elueix, proporcionant amb cada espectre (d'infraroig o de masses, o ambdós) gran quantitat d'informació estructural. Amb detectors d'escombrat la identificació de soluts depèn fonamentalment de la informació espectral. Per contra, per a detectors que no fan escombrats, la identificació dels soluts s'ha de basar en altres mitjans, fonamentalment en la comparació amb el temps de retenció de patrons. A continuació es comenten les tècniques d'identificació més habituals quan s'utilitza un detector no espectral.

Afegir patrons a la mostra. El mètode més simple per identificar un pic cromatogràfic consisteix a comparar el seu temps de retenció amb el d'un patró. La forma més fiable de comparar el temps de retenció consisteix a cromatografiar patrons afegits a la mostra. Si el temps de retenció del patró és idèntic al d'un component del problema, l'àrea del pic del component augmentarà; en cas contrari s'observaran dos pics amb temps de retenció diferents. Aquesta identificació és poc segura quan es realitza amb una sola columna, però és molt segura quan es fa amb dues columnes de diferent selectivitat, ja que és molt poc probable que dos compostos diferents donen lloc al mateix temps de retenció sobre columnes diferents. És evident que afegir patrons a la mostra només és pràctic quan es coneix la mostra i es

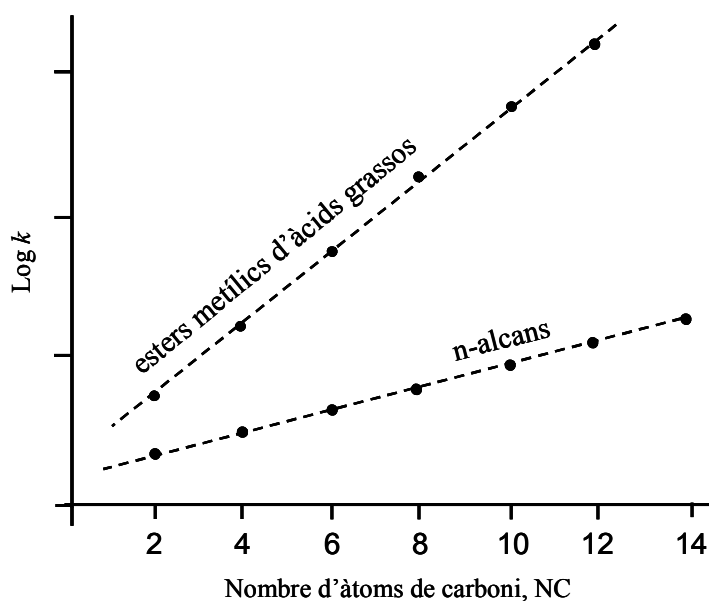


Fig. 19. Identificació de membres d'una sèrie homòloga per la relació lineal entre $\log k$ i el nombre d'àtoms de carboni

té una idea del que s'està cercant.

Utilitzar diagrames de log k davant del número d'àtoms de carboni, NC . Per identificar membres d'una sèrie homòloga (n-alcans, n-alcohols, esters metílics d'àcids n-carboxílics, etc) es fa ús de la relació lineal entre log k i el NC . En condicions isotermes aquesta relació és lineal:

$$\log k = A + B (NC) \quad (2)$$

L'increment regular de la retenció és degut que les interaccions inespecífiques entre els analits i la fase estacionària augmenten de forma regular amb cada grup $-CH_2-$ que s'afegeix a la molècula. Per fer ús d'aquesta relació es cromatografiem diversos patrons de les sèries homòlogues d'interès (almenys dos o tres de cada sèrie), i es construeix un diagrama de log k enfront del NC (Fig. 19). Sobre el diagrama, els membres d'una mateixa sèrie homòloga apareixen sobre una mateixa línia recta, espaiats a intervals regulars. La Fig. 19 mostra un diagrama de log k enfront del NC per esters metílics d'àcids grassos i per n-alcans.

S'observa una relació lineal respecte al NC , de manera que només cal cromatografiar uns pocs estàndards per a predir el temps de retenció de tots els altres membres de cada sèrie homòloga. Per elució amb gradient lineal de temperatura es té aproximadament:

$$k = A + B (NC) + C (NC)^2 \quad (3)$$

—Diagrames amb dades de dues columnes. Com s'ha indicat, la identificació és molt més segura si s'obtenen dades amb dues columnes de diferent selectivitat. En la Fig. 20 s'han representat els temps de retenció dels soluts de diverses sèries homòlogues obtinguts amb una columna apolar enfront dels temps de retenció obtinguts amb una columna polar. S'observa com els alcohols tenen temps de retenció majors amb la columna polar, mentre que succeeix el contrari per als alcans. Aquest diagrama és útil per identificar a quina sèrie pertany un solut.

En la Fig. 21 s'han representat les mateixes dades en escala logarítmica. Ara ja no és tan fàcil distingir els membres d'una sèrie dels d'una altra, sobretot quan les línies apareixen molt juntes, però es prediu millor el NC dels soluts, perquè sobre escales logarítmiques els espaiats entre els membres successius de les sèries són iguals.

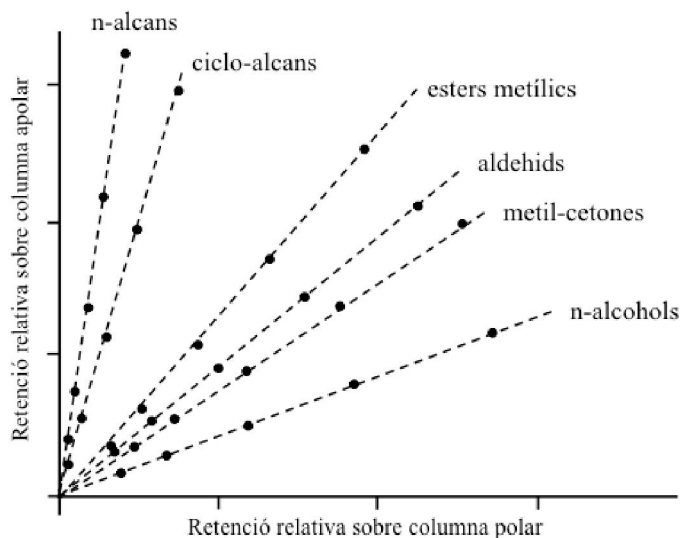


Fig. 20. Identificació de derivats d'hidrocarburs per la seva retenció sobre dues columnes: identificació de la sèrie homòloga

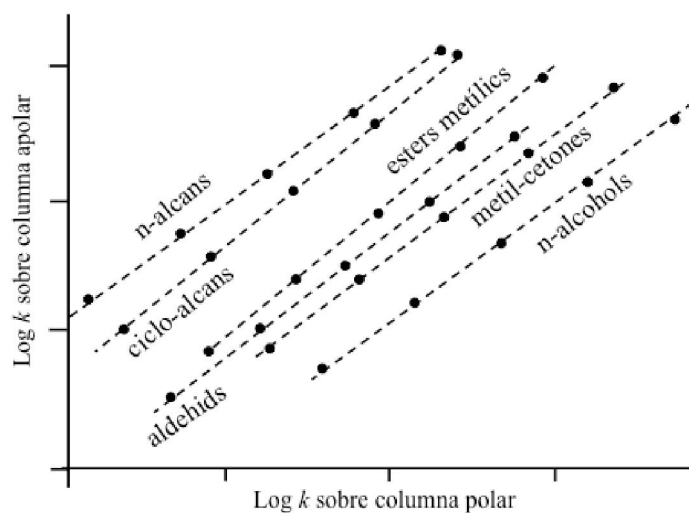


Fig. 21. Identificació de derivats d'hidrocarburs per la seva retenció sobre dues columnes: identificació del membre de la sèrie

El índex de Kováts. El químic helveticohongarès E. Kováts va proposar en 1958 fer ús de l'equació (2) per comparar els temps de retenció de tots tipus d'analits. La idea de Kováts va ser definir un índex que fóra el mateix per un determinat analit, independentment que estigués obtingut amb una columna diferent (diferent diàmetre, longitud, etc), i en diferents condicions experimentals (una temperatura diferent). De fet, els índexs de Kováts depenen lleugerament de la naturalesa de la fase estacionària, però aquest inconvenient es va solucionar adoptant la fase de PDMS amb un 5% de difenils per obtenir els índexs.

—Els índexs són especialment útils en la identificació de productes naturals, però també per assegurar la identitat de compostos sintètics. L'ús de detectors d'escombrada, i especialment els detectors d'espectrometria de masses, permeten aconseguir una identificació força segura dels analits. No obstant això, si només es fa ús de les dades espectrals es perd la informació associada al temps de retenció. El millor és utilitzar conjuntament la informació espectral i la cromatogràfica (els temps de retenció) per assegurar la identificació dels analits. El temps de retenció pot ser clau per confirmar la naturalesa del compost, eliminant ambigüitats sobre els possibles candidats (compostos amb espectres de masses similars, però amb diferent temps de retenció).

L'analista estarà, per tant, interessat a comparar la retenció relativa d'un analit sense identificar amb la descrita en la bibliografia per a un o més compostos candidats, que seran els que tenen un espectre de masses similar al de l'analit. El problema és com comparar dades de retenció obtingudes amb columnes diferents, i amb diferent programació de la temperatura de la columna. La solució és calcular l'índex de Kováts de l'analit i comparar-lo amb els índexs de Kováts dels compostos candidats, que molt probablement es troben ja descrits en estudis anteriors. A la taula de la Fig. 22 es mostren els índexs de Kováts per als components d'un oli essencial d'una planta aromàtica (alfabeguera de clau). A la taula, *KI* són dades bibliogràfiques (Adams, 1995), mentre que *RI* són els índexs trobats en l'estudi de l'oli essencial d'aquesta planta (Aquino, 2005). Un compost desconegut queda identificat si coincideix amb el valor bibliogràfic dins d'un marge de seguretat. Lògicament, una identificació segura es basa en la coincidència d'altres propietats (com es ara l'espectre de masses) i tan sols l'índex de Kováts.

Compounds ^a	KI ^b	RI ^c
Myrcene	991	996
α -Terpinene	1018	1017
<i>p</i> -Cymene	1026	1054
(E)- β -Ocimene	1050	1052
γ -Terpinene	1062	1061
<i>p</i> -Cymenene	1089	1087
Terpin-4-ol	1177	1175
Thymol	1290	1288
Carvacrol	1298	1295
Eugenol	1356	1357
α -Copaene	1376	1375
β -Caryophyllene	1418	1417
α -Humulene	1454	1454
(E)- β -Farnesene	1458	1457
Germacrene D	1480	1482
<i>cis</i> - β -Guaïeno	1490	1491
α -Selinene	1494	1493
(Z)- α -Bisabolene	1504	1502
β -Sesquiphellandrene	1524	1521
Spathulenol	1576	1575
Caryophyllene oxide	1581	1580

Fig. 22. Comparació d'índexs de Kováts de l'oli essencial d'*Ocimum grat.* i valors bibliogràfics (J. Aquino Lemos i col., Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100, 1, 2005).

Inicialment, els índexs de Kováts varen ser proposats exclusivament per experiments fets en condicions isotermes. Tanmateix, aviat es varen adaptar també per treballar amb temperatura programada (Van Den Dool i Kraft, 1963). Com veurem, els índexs de Kováts es basen en una interpolació feta amb valors de $\log k$. En l'aproximació de Van Den Dool per cromatogrames obtinguts a temperatura programada es fa la mateixa interpolació, però fent ús directament dels valors de k , sense treure el logaritme.

La forma d'obtenir els índexs en condicions isotermes i a temperatura programada s'il·lustra en la Fig. 23. En primer lloc, sobre la columna i en les condicions en què estem treballant, es cromatografia una barreja de n-alcans. S'obtenen cromatogrames com els que s'han mostrat a la Fig. 11. Per definició, els índexs dels n-alcans valen el seu *NC* multiplicat per 100. Per exemple, l'índex del dodecà (C12) és $I_{12} = 1200$. El cromatograma dels n-alcans permet convertir el temps de retenció en

una escala de l'índex. Per exemple, en el cromatograma de la Fig. 11, part dreta, els valors $t_{11} = 18.98$ (C11) i $t_{12} = 21.51$ min (C12) equivalen als índexs $I = 1100$ i 1200 , respectivament. Suposem que estem interessats a calcular l'índex d'un analit que elueix entre aquests dos n-alcans, en $t_x = 20.88$. A continuació, cal convertir els valors de t en valors de k . Si el temps mort es $t_M = 2.66$ min, resulta:

$$k_{11} = (18.98 - 2.66) / 2.66 = 6.14$$

$$k_{12} = (21.51 - 2.66) / 2.66 = 7.09$$

$$k_x = (20.88 - 2.66) / 2.66 = 6.85$$

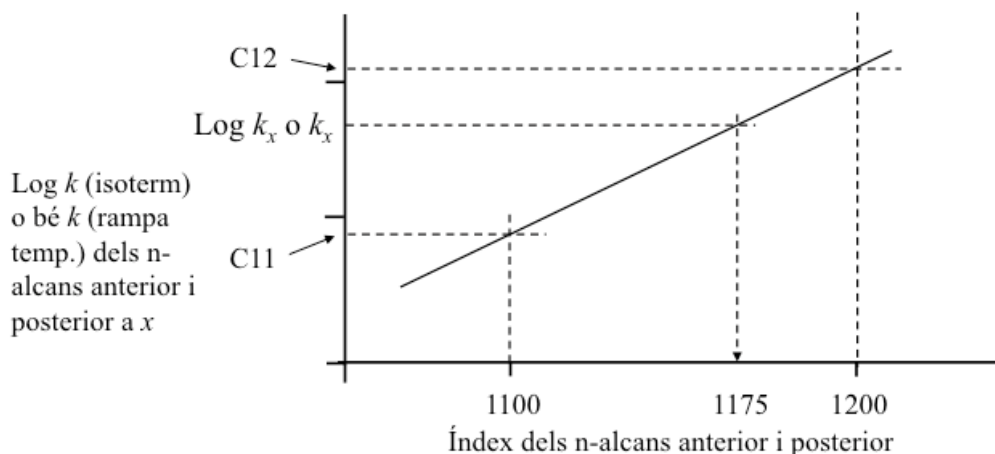


Fig. 23. Obtenció de l'índex de Kováts d'un analit que ha eluït entre els n-alcans C11 i C12

Com que treballem a temperatura programada, no farem ús dels logaritmes, sinó que farem el càlcul directament amb els valors de k . Fent una interpolació lineal, resulta:

$$(7.09 - 6.14) / (6.85 - 6.14) = 100 / x$$

Com que $x = 75$, l'índex que estem cercant val $I_x = 1175$. També es pot treballar directament amb valors de t , sense convertir-los en valors de k . El resultat de la interpolació és exactament el mateix.

4. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA RESOLUCIÓ

1. Modes d'HPLC. El cromatògraf d'HPLC.
2. La injecció manual i automàtica.
3. Bombes per a elució isocràtica i en gradient.
4. Les columnes: tipus i criteris de selecció.
5. La força eluent i el seu control.
6. La selectivitat global de les fases mòbils. El triangle de selectivitat de Snyder.
7. Optimització de la composició de la fase mòbil en mode isocràtic.
8. Optimització de la composició de la fase mòbil en mode gradient.
9. Influència de la temperatura de la columna.
10. Detectores en cromatografia líquida: classificació.
11. La detecció espectrofotomètrica.
12. Problemes.

1. Modes d'HPLC. El cromatògraf d'HPLC

Modes d'HPLC. En cromatografia de líquids d'alta resolució o HPLC (*high performance liquid chromatography*), la fase mòbil és un líquid. Per la seua banda, la fase estacionària pot ser:

a) La superfície d'un sòlid en cromatografia d'**adsorció**, si bé la retenció per adsorció s'utilitza sobretot en columnes de resolució baixa i mitjana, sent rar utilitzar-la en HPLC.

b) Una fase enllaçada en cromatografia de **repartiment**. Depenent de la polaritat de la fase estacionària es distingeixen tres modalitats:

- **Fase inversa**, invertida o reversa (**RP-HPLC**, *reverse-phase*), quan la fase estacionària és hidrofòbica i la fase mòbil polar (aquosa o hidroorgànica).
- **Fase normal** (**NP-HPLC**, *normal-phase*) quan la fase estacionària és polar i la fase mòbil és hidrofòbica (un hidrocarbur, i dissolvents miscibles amb ell).
- **Interacció hidrofòbica** (**HILIC**, *hydrophobic interaction liquid chromatography*), quan la fase estacionària té una superfície polar, com en fase normal, recoberta d'una capa d'aigua adsorbida. La fase mòbil és una mescla hidroorgànica (quasi sempre aigua i acetonitril, veure tema II.1).

c) Un bescanviador iònic en cromatografia de **bescanvi iònic**. Pot ser un bescanviador catiònic o aniònic. Aquesta modalitat d'HPLC es coneix com a cromatografia iònica (**IC**, *ion chromatography*).

d) Els porus d'un sòlid microporós o d'un gel, en **cromatografia d'exclusió molecular** (**SEC**, *size exclusion chromatography*). S'utilitza per a caracteritzar macromolècules (polímers).

Aquest tema està dedicat a l'HPLC de repartiment, i en el tema següent es tracta la cromatografia iònica. En comparació amb la GC, en HPLC la naturalesa dels soluts no està limitada per la seua volatilitat. A més, en GC la fase mòbil és un portador no actiu, mentre que en HPLC els components de la fase mòbil intervenen activament en les separacions. En HPLC, els soluts estableixen interaccions dels mateixos tipus amb les dues fases, mòbil i estacionària: atraccions dipol-dipol, donació i acceptació de protons, etc. D'aquesta manera, els factors que poden modificar-se per a aconseguir una separació són molt més nombrosos en HPLC que en GC, on només la fase estacionària és activa. Per això, l'HPLC comprèn un conjunt nombrós de tècniques d'alta eficàcia, aplicables a la separació d'una molt àmplia varietat de compostos de polaritat molt diversa, i d'un rang molt ampli de masses moleculars.

El cromatògraf d'HPLC. Els equips per a HPLC consten dels elements següents (Fig. 1):

1) Els flascons de **reserva de dissolvents** (entre 1 i 4) i un **desgasificador en línia**, per a eliminar els gasos de l'aire dissolts en les fases mòbils. No representat a la Fig. 1, el desgasificador se situaria entre les ampolles de dissolvent i el mòdul de bombes. És molt convenient que les fases mòbils estiguen **desgasificades**, ja que la solubilitat dels gasos de l'aire varia amb les proporcions dels diferents dissolvents, i amb la pressió i la temperatura. En dissolucions no desgasificades, una reducció de la solubilitat dels gasos deguda a la pèrdua de pressió al llarg de la columna provoca l'aparició de bombolles, que donen lloc a falsos pics i a un augment del soroll de fons en els detectors. La desgasificació de les fases mòbils es sol realitzar amb **desgasificadors en línia**: la fase mòbil passa per un tub de plàstic permeable als gasos, però no als líquids, situat en l'interior d'una cambra a pressió reduïda. Els gasos dissolts es perden a través de la paret del tub.

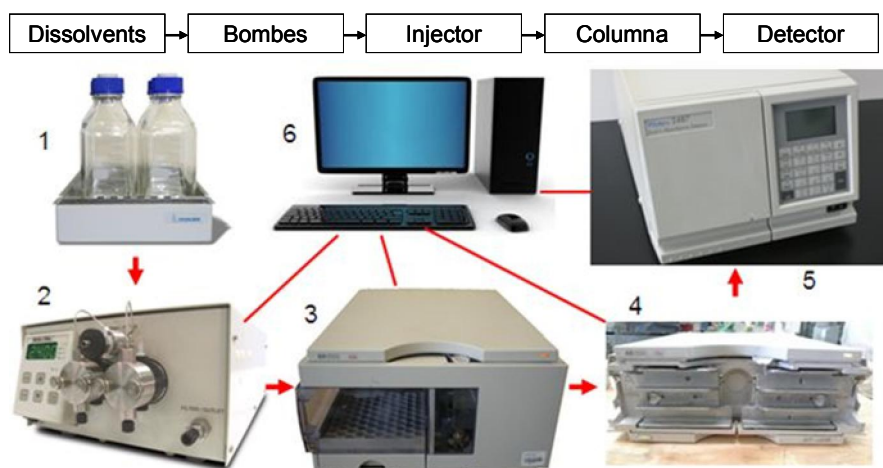


Fig. 1. Esquema de cromatògraf d'HPLC, construït amb mòduls de diferents models comercials: 1, safata amb les ampolles de dissolvents; 2, mòdul de bombes; 3, injector automàtic; 4, compartiment de columnes amb termòstat; 5, detector; 6, ordinador

2) **El mòdul de bombes** capaç de mantenir un cabal menut i constant, i d'aconseguir almenys 40 MPa (com que un mega Pascal són 10 atmosferes, unes 400 atm). Per mantenir un cabal adequat de fase mòbil a través de rebliments de partícules molt xicotetes (típicament de 2,6 a 5 μm en columnes d'uns 10 o 15 cm) es necessiten pressions en el rang de 10 a 20 MPa. La pressió de treball necessària per a mantenir el flux (açò és, per a igualar la contrapressió) augmenta ràpidament quan es redueix el diàmetre de les partícules del rebliment. Per la seua banda, les columnes monolítiques actuals tenen una xarxa contínua de porus amb diàmetres de l'ordre de 2 a 3 μm . La contrapressió necessària per a fer passar el cabal és menor en monòlits que en columnes reblertes a causa de la major proporció d'espai que ocupen els porus dels monòlits. La proporció d'espai buit o porositat és de l'ordre del 80% en columnes monolítiques, i d'un 40% en columnes reblertes.

3) **El mòdul d'injecció** manual o automàtic. En aquest últim cas, el sistema d'injecció tindrà també un suport pels vials de les mostres i un xicotet braç robotitzat per a realitzar les injeccions. Una part essencial del sistema d'injecció és una vàlvula de 6 vies (o 6 ports) i 2 posicions.

4) La **columna**, precedida d'una **precolumna** (*guard column*), més curta. A escala analítica, s'utilitzen columnes amb diàmetres interns que van des de menys de 0.1 mm (HPLC capil·lar) fins a 4.6 mm. Les columnes són curtes, amb longituds típiques de 10 o 15 cm que arriben com a màxim als 35 o 40 cm. Es construeixen en acer inoxidable (Fig. 2) o en PEEK (*poly-ethylen-ether-ketone*) (Fig. 3), un

plàstic resistent als dissolvents i capaç de suportar elevades pressions sense deformar-se.

La separació té lloc en la columna. La funció de la precolumna és protegir la columna de la presència de compostos agressius que pogueren deteriorar la fase enllaçada, i evitar l'entrada de partícules en el rebliment. La precolumna ha de contenir el mateix rebliment que la columna, si bé la seua longitud és molt menor que la columna (com per exemple, 1 cm per a columnes de 10 o 15 cm), pel que contribueix poc a la contrapressió. La precolumna se substitueix després d'un temps prudencial d'ús. Freqüentment, les columnes es posen dins un **compartiment termostatitzat**. La temperatura de la columna es controla habitualment al voltant de 20 o 25 °C. Temperatures entre 10 i 60 °C són prou freqüents.

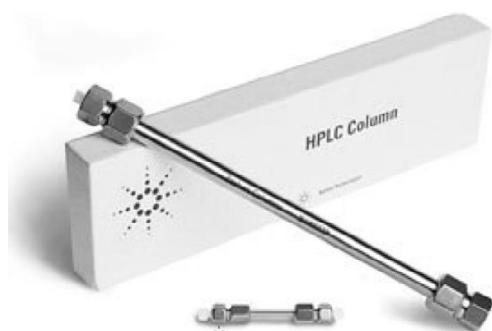


Fig. 2. Columnes d'HPLC d'acer



Fig. 3. Columnes capil·lar de sílice (dalt) i plàstic PEEK (tres de baix) per HPLC

Tots els espais accessibles a la fase mòbil estan units per mitjà de **tubs de 1/16** (1/16 de polzada anglesa de diàmetre extern) i **peces d'unió**. Tubs i unions es construeixen en acer inoxidable o en plàstic PEEK. Per a reduir al mínim la seua contribució al volum mort, es trien tubs amb diàmetres interns molt xicotets, de 5 i 7 mil·lèsimes de polzada. Per la mateixa raó, les unions es dissenyen de manera que l'espai lliure siga el mínim possible (idealment, zero). Per això, aquestes peces d'unió es denominen **ZDV** (*zero dead volum*) (Fig. 3). Perquè la unió siga hermètica, la nou (la peça amb el mascle del caragol) pressiona la fèrula (un anell cònic) contra el seient de la unió ZDV, de manera que al seu torn la fèrula quede ajustada sobre el tub.

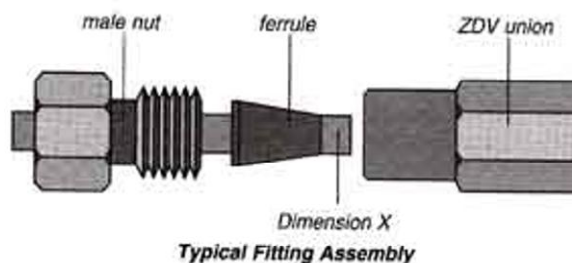


Fig. 4. Unió ZDV: mascle, fèrula cònica i femella

5) El **detector** (espectrofotomètric, fluorimètric, evaporatiu, electroanalític, MS, etc.) o dos detectors en sèrie (el primer no destructiu). En cromatografia preparativa, el detector, que ha de ser no destructiu, està seguit d'un col·lector de fraccions.

6) El **sistema d'adquisició i tractament de dades**. Els equips d'HPLC solen tenir un **disseny modular**, amb mòduls que es comuniquen entre ells per mitjà d'una connexió digital. En la Fig. 5 es mostra un equip d'HPLC amb els mòduls apilats per a estalviar espai sobre la taula del laboratori. A la dreta, de dalt a baix, s'observen: la safata amb dissolucions de reserva, el



Fig. 5. Cromatògraf d'HPLC modular

desgasificador i el mòdul de bombes. A l'esquerra, i de dalt a baix: l'injector automàtic, el compartiment termostatitzat de columnes (amb la tapa retirada) i dos detectors.

2. La injecció manual i l'automàtica

La vàlvula de 6 vies i 2 posicions. Tant en cromatografia líquida com en altres tècniques analítiques, per a inserir una mostra líquida en el corrent que circula per un tub s'utilitza una **vàlvula de 6 vies (o de 6 ports) i 2 posicions**. En HPLC, la vàlvula s'intercala entre el mòdul de bombes i la columna, i està construïda en acer (o en materials ceràmics) perquè pugui suportar la pressió sense fugites. En la Fig. 6 es mostra una vàlvula per a injecció manual, amb una xeringa. La vàlvula està constituïda per un cos extern que és fix, i un altre central que és giratori i té dues posicions.

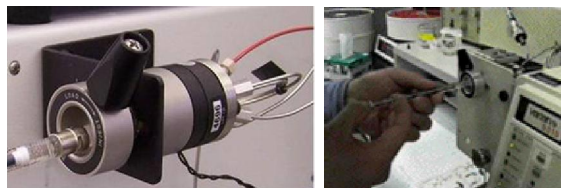


Fig. 6. Vàlvula d'HPLC manual

En el cos giratori central estan els canals que comuniquen els ports per parelles (Fig. 7). Començant a comptar des de dalt i girant a esquerres, els ports intercomunicats són: 1-2, 3-4 i 5-6 en una de les dues posicions possibles, i 2-3, 4-5 i 6-1 en l'altra posició. Per a **injecció manual**, dos ports de la vàlvula estan connectats per mitjà d'un tub d'acer de volum intern perfectament conegut denominat "bucle". En la **posició de càrrega** (part esquerra de la figura) s'utilitza una xeringa per a llavar i carregar el bucle amb la mostra. Aquesta operació es fa amb el desguàs obert, per la qual cosa l'avanç de l'èmbol de la xeringa no troba resistència. Girant la vàlvula 60° en sentit antihorari es passa a la **posició d'injecció** (part dreta de la figura, i foto de la dreta). En aquesta posició el contingut del bucle queda **INSERIT** en el flux a pressió que prové de la bomba amb destinació a la columna.

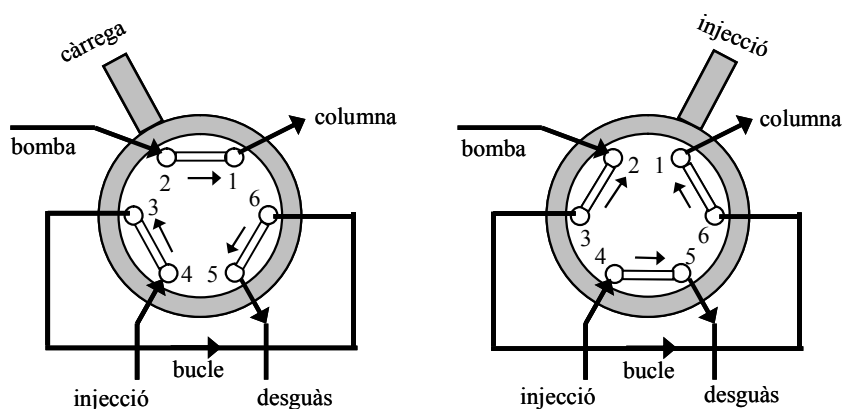


Fig. 7. Funcionament de la vàlvula d'injecció manual

Quan es treballa amb columnes convencionals (4,6 mm de diàmetre intern), és habitual utilitzar bucles amb volums d'entre 1 i 50 μL . El volum d'injecció es redueix amb el diàmetre de la columna: $< 1 \mu\text{L}$ en micro-HPLC (columnes de 0,8 a 2 mm de diàmetre intern), i $< 0,1 \mu\text{L}$ en HPLC capil·lar (columnes de 75 - 375 μm de diàmetre intern).

L'injector automàtic. La majoria dels cromatògrafs estan dotats d'un mòdul d'injecció automàtica. La injecció automàtica estalvia molta feina, perquè les successives injeccions es programen i es van executant sense l'atenció de l'analista, sovint durant la nit. El seu funcionament es mostra en l'esquema de la Fig. 8. A l'esquerra, la vàlvula de 6 vies s'ha representat en posició de càrrega o *bypass* (traços grossos = ports comunicats). La bomba mesuradora ha llavat, i després ha omplert

l'agulla i el bucle d'espera amb el volum exacte de mostra que s'ha programat. S'utilitza un bucle prou llarg per evitar que la mostra arribe a l'interior del pistó de la bomba mesuradora. Un braç robotitzat col·loca ara l'agulla sobre el seu seient. L'agulla pressiona sobre el seient per a tancar hermèticament la unió entre ambdós. A continuació, el gir de la vàlvula de 6 vies inserix el contingut del bucle en el circuit d'alta pressió, açò és, entre la fase mòbil que ve del mòdul de bombes i la que ix en direcció a la columna. Cal observar que en la **posició d'injecció** o *mainpass* (esquema de la dreta) els ports comunicats per parelles són uns altres.

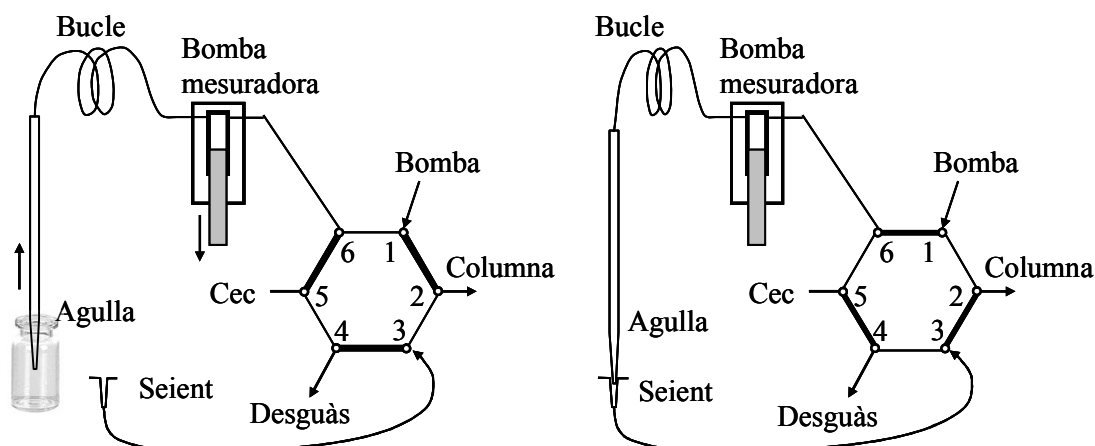


Fig. 8. Esquema d'injector automàtic; els traços més gruixuts indiquen que la vàlvula es troba en posició de càrrega (*bypass*, esquerra) o injecció (*mainpass*, dreta)

3. Bombes per a elució isocràtica i en gradient

Elements d'una bomba d'HPLC simple. La Fig. 9 mostra un pistó o èmbol del tipus dels utilitzats en les bombes d'HPLC. El pistó es construeix en safir sintètic (un cristall tallat d' Al_2O_3), material que té la duresa i resistència a la corrosió necessàries. El pistó avança espentat per una lleva o disc excèntric, i retrocedeix espentat per una molla. L'avanç i retrocés del pistó dins del cilindre està coordinat amb l'operació de les vàlvules antiretorn que impedeixen el retrocés del líquid (les "vàlvules de bola" a l'entrada i eixida del cilindre, on es troba la culata del cilindre).

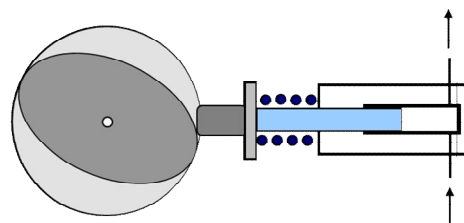


Fig. 9. Esquema d'una bomba simple per HPLC: la lleva o excèntrica empeny el pistó de safir, i la molla el fa tornar enrere. En l'entrada i eixida, les vàlvules antiretorn impedeixen el retorn del líquid.

En HPLC, els injectors automàtics utilitzen **bombes d'un sol pistó** per a aspirar la mostra, però no per fer avançar la fase mòbil. La raó és que les bombes d'un sol pistó no proporcionen un flux constant de fase mòbil. Amb un sol pistó el flux és polsat, la qual cosa deteriora els rebliments de les columnes, i contribueix a augmentar el soroll de fons en certs detectors. Per mantenir un cabal constant i no polsant de fase mòbil s'utilitzen **bombes de doble pistó**.

Bombes de doble pistó o "isocràtiques". Els dos pistons connectats en sèrie bombegen el líquid alternativament (recíprocament): quan el primer emplena, el segon buida i a l'inrevés (Fig. 10). En el disseny de l'esquerra, el volum que carrega el primer cilindre (típicament 100 mL) és el doble que el

del segon (50 mL), de manera que, quan retrocedeix el segon pistó, el primer proporciona prou cabal per a omplir el segon cilindre al mateix temps que fa avançar la fase mòbil. D'aquesta manera, s'aconsegueix un cabdal constant, amb xicotetes oscil·lacions residuals originades per l'obertura i el tancament de les vàlvules. Les oscil·lacions residuals (menys de l'1 % de la pressió de treball) es redueixen per mitjà d'un **amortidor d'impulsos**. El disseny de la dreta també està basat en dos cilindres que treballen de manera recíproca, però en aquest cas són iguals. Ambdós alimenten l'amortidor d'impulsos. Les bombes convencionals per a columnes de 4.6 mm de diàmetre (Fig. 11) donen un cabal regulable entre 0.01 i 10 mL/ min a pressions de fins a 40 MPa.

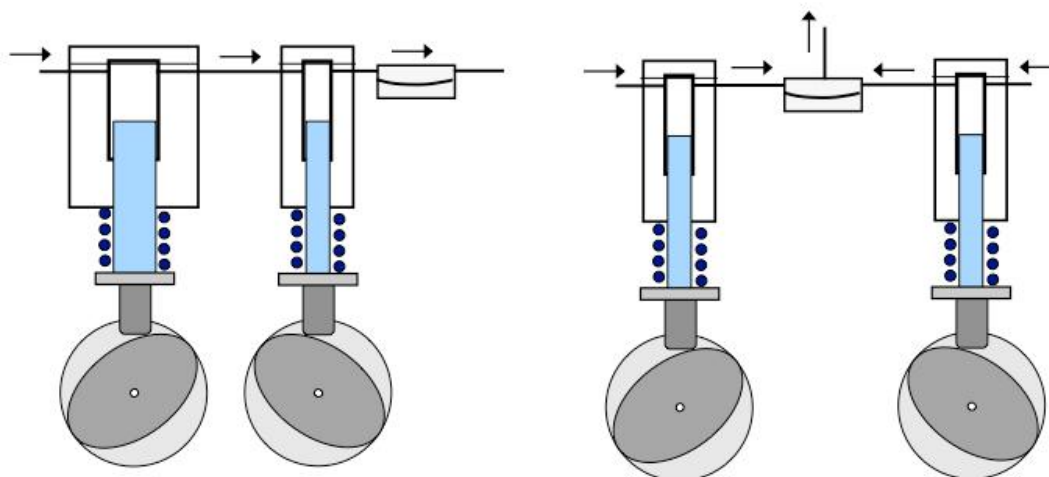


Fig. 10. Esquemes de mòduls de doble pistó per a HPLC. En ambdós dissenys els pistons es mouen recíprocament: quan un buida, l'altre està omplint. En el disseny de l'esquerra, el volum lliurat pel primer pistó és el doble que el del segon, per tal de continuar bombejant i omplir el segon pistó quan aquest retrocedeix. L'eixida és sempre a través de l'amortidor d'impulsos.

Bombes de gradient. Els mòduls de bombes capaços d'eluir amb gradient són un poc més complexos que les "bombes isocràtiques". És així perquè el mòdul de bombes s'ha de poder programar per a generar una mescla de composició variable. Les bombes de gradient es construeixen combinant dues bombes de doble pistó, o bé una bomba de doble pistó amb una vàlvula quaternària. Aquestes dues possibilitats donen lloc a bombes de gradient de dos tipus:

a) En les bombes de **mescla a alta pressió o binàries** els dissolvents es mesclen després d'haver sigut pressuritzats. Les bombes binàries estan constituïdes per dos mòduls del tipus de doble pistó (tenen quatre pistons agrupats en dues parelles). En la Fig. 12, esquerra, la bomba A (mòdul A) conté un conjunt de dos pistons, i la bomba B (mòdul B), un altre conjunt igual. Cada mòdul comprimeix un dissolvent, realitzant-se la mescla a alta pressió a l'eixida dels mòduls.



Fig. 11. Mòdul de bombes de doble pistó: les eixides dels dos cilindres van a parar a l'amortidor d'impulsos

Per a canviar la composició de la mescla, la velocitat de bombament es fa augmentar en un dels mòduls (per exemple, el A) i disminuir en l'altre (el B), de manera que la suma de cabdals es mantinga constant. Les **bombes binàries** només permeten mesclar dos dissolvents al mateix temps en compte de quatre (com succeeix en les bombes quaternàries); no obstant això, la mescla es realitza amb més

precisió, la seua composició no fluctua (que és el que passa en la mescla a baixa pressió) i el cabal és més constant i precís, sobretot a cabals baixos.

b) En les bombes de **mescla a baixa pressió o quaternàries** (Fig. 12, dreta) els dissolvents es mesclen en les proporcions adequades ABANS d'entrar en una bomba de doble pistó (igual que la utilitzada en elució isocràtica). La mescla la realitza una vàlvula programable, controlada per ordinador. La vàlvula té quatre entrades independents (flascons de reserva A, B, C i D) i una eixida única. La composició de la mescla d'eixida depèn de la distribució dels temps d'aspiració assignats a cada canal. Així, per a crear un gradient, la vàlvula augmenta els temps d'aspiració assignats a uns canals, al mateix temps que redueix els temps dels altres canals perquè el cabal d'eixida es mantinga constant. Utilitzant temps d'aspiració molt curts, l'eixida de la vàlvula consisteix en xicotets segments juxtaposats de distinta composició.

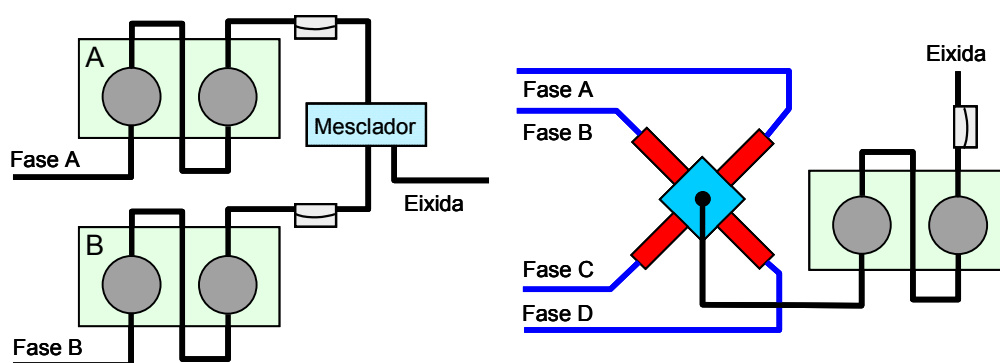


Fig. 12. Mòduls de bombes binari o de mescla a alta pressió (esquerra) i quaternari o de mescla a baixa pressió (dreta)

Els segments es barregen durant el seu recorregut per la bomba, de manera que la fase mòbil ja és prou homogènia en arribar a la columna. No obstant això, la vàlvula programable produeix cert soroll (oscil·lacions periòdiques de poca amplitud) en els detectors quan es barregen dissolvents purs (com aigua amb acetonitril pur). Aquest soroll és perquè les barreges encara no són perfectament homogènies en arribar a la cel·la del detector. Si s'alimenten els canals d'entrada amb dissolvents prebarrejats en un cert grau (com per exemple, aigua contenint un 5% de acetonitril, i acetonitril contenint un 5% d'aigua), el soroll a causa de la barreja incompleta dels dissolvents es redueix a un nivell insignificant.

4. Les columnes: tipus i criteris de selecció

Columnes reblertes, empacades o particulades. En HPLC s'utilitzen dos tipus de columnes, les reblertes o particulades i les monolítiques. Amb finalitat analítica s'utilitzen columnes de diversos diàmetres i longituds (Fig. 13, esquerra). També es construeixen columnes de gran diàmetre, per a ser utilitzades a escala preparativa (Fig. 13, dreta). Les columnes es construeixen en acer i en plàstic PEEK, excepte les capil·lars, que són de sílice flexible amb recobriment extern de poli-imina (com les capil·lars de GC, encara que molt més curtes).

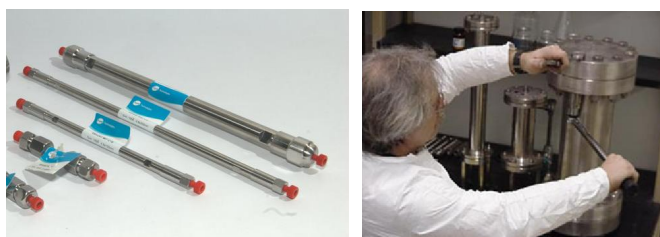


Fig. 13. Columnes d'HPLC a escala analítica (esquerra) i preparativa (dreta)

Mida de partícula i eficàcia. Els rebliments estan constituïts per partícules de sílice que suporten una fase estacionària enllaçada. Les columnes reblertes clàssiques contenen partícules de sílice entre 5 i 2.6 μm de diàmetre. Com s'il·lustra en la Fig. 14, i a causa de la reducció dels termes A i C de l'equació de Van Deemter, s'aconsegueixen augments molt importants d'eficàcia reduint el diàmetre de les partícules. A principis de l'actual segle XXI, s'han introduït en el mercat columnes amb partícules de diàmetres inferiors a 2 μm denominades “sub 2” (per exemple, 1.6 μm).

Per a una columna reblerta, i a un valor donat de la velocitat lineal mitjana, \bar{u} , l'eficàcia és inversament proporcional al diàmetre de partícula, d_p :

$$N \sim KL / d_p \quad (1)$$

on K és un coeficient que depèn de la qualitat del rebliment, i L és la longitud de la columna. La millora de l'eficàcia en reduir la mida de partícula es deu, d'una banda, al fet que el flux és més uniforme, la qual cosa redueix el coeficient A de l'equació de Van Deemter. D'altra banda, la difusió del solut en la fase mòbil (en els intersticis entre les partícules, i en l'interior dels porus de les partícules) es fa a través de distàncies més curtes, la qual cosa també redueix el terme C.

Un altre avanç en tecnologia de columnes, introduït a principis de l'actual segle, han sigut els rebliments de partícules del tipus “nucli sòlid” (*fused-core*) o “corfa-nucli” (*shell-core*). Aquests rebliments reben diversos noms segons el fabricant. Els rebliments corfa-nucli permeten aconseguir eficàcies dues o tres vegades majors que les aconseguïdes amb rebliments convencionals: en l'equació (1), el coeficient K és unes 2-3 vegades més gran. Aquests rebliments estan constituïts per partícules amb una regió central no porosa, de manera que els porus són poc profunds (Fig. 15). Per això, la fase mòbil té accés tan sols a la capa externa de les partícules. Això redueix molt el terme C de l'equació de Van Deemter (Fig. 14), perquè els soluts entren i surten amb rapidesa. La partícula de la Fig. 15 té un diàmetre de 2.6 μm , però només la capa exterior, de 0.5 μm de gruix, és porosa.

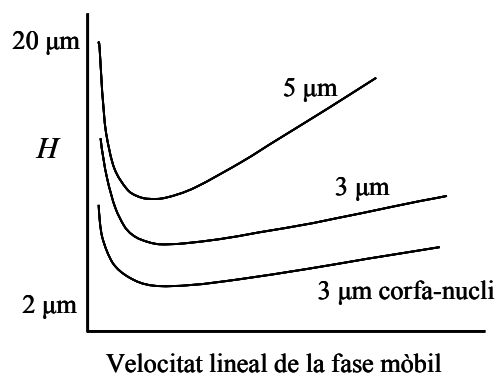


Fig. 14. Gràfics de van Deemter per columnes amb reblerts de partícules de diversos tipus

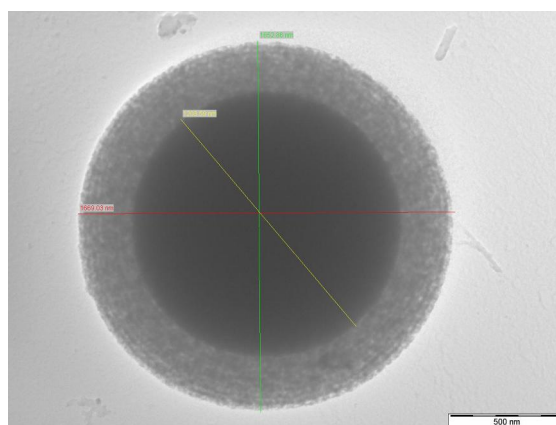


Fig. 15. Microfotografia d'una partícula corfa-nucli: només la capa externa és porosa

Mida de partícula, cabal i contrapressió. El preu que es paga per utilitzar partícules molt fines és la resistència al flux. Exemple: un cabal típic d'1 mL min^{-1} en una columna de 4.6 mm de diàmetre i 10 cm de longitud, amb partícules de 5 μm , i fase mòbil aquosa podria donar una contrapressió d'uns 10 MPa. La contrapressió és molt major si es redueix el diàmetre de les partícules, i també augmenta si la columna està deteriorada o envellida, o si s'utilitza una fase mòbil més viscosa (com per exemple, mescles metanol-aigua prop del punt de màxima viscositat, 40% de metanol), o temperatures baixes.

Eficàcia i qualitat del rebliment. Els rebliments de qualitat estan constituïts per partícules esfèriques (microfotografia adjunta), d'un estret interval de mides, i empaquetades de la manera més densa i regular possible. La regularitat de l'empaquetatge és important per a reduir el volum mort, i per a aconseguir una màxima eficàcia i un llit estable amb el temps.

Eficàcia i qualitat del rebliment. Els reblerts de qualitat estan constituïts per partícules esfèriques (microfotografia de la Fig. 16, esquerra), d'un estret interval de mides, empaquetades de la manera més densa i regular possible. La regularitat del rebliment és important per reduir el volum mort, i per aconseguir una màxima eficàcia i un llit estable amb el temps. Els rebliments de poca qualitat experimenten un envelliment més ràpid. Un rebliment “envelleix” quan les partícules es mouen, deixant zones amb buits excessivament grans i altres amb un empaquetatge més dens, la qual cosa es tradueix en pèrdua d'eficàcia i en un augment de la pressió necessària per a mantenir el cabal.—

Les columnes monolítiques. En el context de la cromatografia líquida, un monòlit és una fase estacionària contínua (no conté partícules), constituïda per una peça única d'un material rígid proveït d'una microestructura porosa molt homogènia (Fig. 16, dreta). El material pot ser sílice (com en la microfotografia) o un polímer orgànic. La microestructura porosa s'aconsegueix per mitjà de

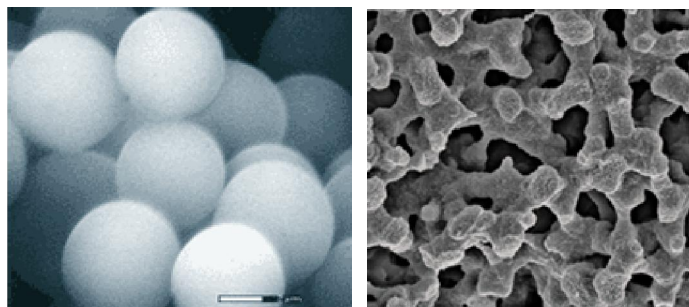


Fig. 16. Reblert de partícules (esquerra) i monòlit (dreta)

tècniques especials de precipitació de la sílice, o si és el cas, de polimerització. A continuació es pot 'funcionalitzar' la superfície dels porus, açò és, enllaçar una fase estacionària del mateix tipus de les utilitzades en columnes reblertes. S'aconsegueixen així fases estacionàries amb diferents propietats: hidrofòbiques, polars, polaritzables o de bescanvi iònic. En particular, els monòlits de sílice són altament reproduïbles, la seua eficàcia és molt alta, i donen lloc a excel·lents separacions.

5. La força eluent i el seu control

Concepte. Força eluent o eluotrópica és la capacitat de la fase mòbil per arrossegar els soluts retinuts en la fase estacionària. Tant en fase inversa (RP-HPLC, *reverse phase*) com en fase normal (NP-HPLC, *normal phase*), s'utilitzen les mateixes fases estacionàries i mòbils que en extracció en fase sòlida o SPE. No obstant això, en SPE s'utilitzen fases mòbils de composició constant, i habitualment, de força eluent extrema, com aigua o metanol purs, mentre que en HPLC és molt important ajustar d'una manera molt més precisa la força eluent (no s'obté el mateix cromatograma amb un 30% que amb un 31% de metanol). Més encara, amb freqüència en HPLC s'elueix amb gradient, és a dir, augmentant progressivament la força eluent de la fase mòbil. Exemple: Iniciar el cromatograma amb un 30% de metanol i augmentar linealment fins un 80% en 45 min.

El concepte de força eluent s'utilitza, per exemple, en la primera etapa del desenvolupament d'un mètode cromatogràfic, per establir la composició que deu tenir la fase mòbil perquè un determinat grup de soluts amb propietats similars aparega dins de la zona òptima de valors de k . També s'utilitza per expressar si un determinat canvi, tal com augmentar o disminuir la concentració d'un dissolvent, o canviar un dissolvent per un altre, implicarà un augment o una reducció de la retenció dels soluts d'interès. Els dissolvents de major força eluent són els que produeixen un major canvi en la retenció.

Com elueixen els soluts en els sistemes cromatogràfics habituals. Les fases estacionàries i mòbils habituals en RP-HPLC, NP-HPLC i HILIC es varen introduir en el Tema 1. A continuació, es comenta com es produeix l'elució en cada cas.

En RP-HPLC, com a fase mòbil es fa ús d'aigua mesclada amb un dissolvent orgànic miscible, el “modificador”. Modificadors habituals en són acetonitril (ACN), metanol (MeOH) i tetrahidrofurà (THF). Si els soluts poden experimentar reaccions àcid-base, també s'afegeix un amortidor de pH.

Finalment, per reduir l'acció dels silanols residuals, s'afegeix un àcid dèbil (com l'acètic, que baixa el pH per protonar els silanols) o una amina hidrosoluble, com la trietanolamina (que es protona i forma parells iònics amb els silanols desprotonats). En RP-HPLC, els soluts apolars prefereixen la fase estacionària hidrofòbica, i per tant, l'elució es produeix **en ordre de polaritat decreixent**, és a dir, elueixen primer els soluts més hidrofílics seguits dels més hidrofòbics. La força eluent de la fase mòbil augmenta amb la seua hidrofobicitat. La força eluent és tant major com més es pareix la fase mòbil a la fase estacionària hidrofòbica. Per a concentracions iguals de modificador, la força eluent augmenta en el sentit MeOH ~ ACN < THF. Per a alguns soluts la força eluent és major amb MeOH, però per a d'altres, és major amb ACN.

En **NP-HPLC**, com a fase mòbil apolar s'utilitza un hidrocarbur, habitualment heptà o ciclohexà. Per incrementar la força eluent, l'heptà es mescla amb concentracions creixents de dissolvents polars miscibles. Els "modificadors" habituals en NP-HPLC són diclorometà, cloroform, acetat d'etil i isopropanol. En NP-HPLC, els soluts polars prefereixen la fase estacionària polar, per això l'elució es produeix **en ordre de polaritat creixent**, és a dir, elueixen primer els soluts menys polars seguits dels més polars. La força eluent de la fase mòbil augmenta amb la seua polaritat. La força eluent és tant major com més es pareix la fase mòbil a l'estacionària polar. Per a concentracions iguals de modificador, la força eluent augmenta en el sentit cloroform ~ acetat d'etil < diclorometà < isopropanol.

En **HILIC** la fase estacionària en HILIC és la capa d'aigua d'hidratació del sòlid suport o de la fase enllaçada. La fase mòbil és ACN en presència d'aigua, i la força eluent s'augmenta fent augmentar la proporció d'aigua (el "modificador" és l'aigua). Per això, els soluts elueixen **en ordre de polaritat creixent**, igual que en fase normal. De fet, el HILIC és un tipus especial de fase normal.

Relació entre retenció relativa i concentració del modificador. Per a una fase estacionària donada, i per a un conjunt de soluts determinat, si la fase mòbil té una força eluent excessiva, la retenció serà molt baixa, i per tant no hi haurà separació. En el cas contrari, si la força eluent és molt baixa, els soluts resulten excessivament retinguts. Per tant, per tal que els soluts eluïsquen en la zona òptima de la retenció relativa, k , és important disposar d'algun criteri que permeti decidir quina força eluent deu tenir la fase mòbil.

La força eluent augmenta amb la proporció del modificador, φ . En RP-HPLC, i per a valors no molt elevats de φ (< 30%), el $\log k$ és una funció aproximadament lineal de φ :

$$\log k = A - B\varphi \quad (2)$$

Si es segueix augmentant la concentració del modificador ($\varphi > 30\%$), $\ln k$ segueix disminuint, però la relació ja no és lineal. Per tant, per a concentracions baixes i moderades de modificador, aquesta equació permet predir valors de retenció relativa a partir de tan sols dos experiments (per establir A i B). Igualment, el valor de B és una mesura relativa de la força eluent. Així per exemple, si un grup de soluts elueix abans amb un 10% de THF que amb un 10% d'ACN, es diu que el THF té una força eluent major. En tal cas, el valor de B en l'equació (2) serà major per a THF que per a ACN. Per tant, el pendent B serveix per fer prediccions a altres valors de φ i per comparar la força eluent de distintes modificadors. L'equació (2) també es compleix per a NP-HPLC i HILIC, però els intervals de linealitat són més curts.

Contribucions a la força eluent global. La preferència d'un solut per una determinada fase mòbil o estacionària ve determinada per diverses forces o mecanismes d'interacció solut-dissolvent. En un dissolvent poden existir forces de diversos tipus:

- 1) Interacció entre dipols permanents, entre un dipol permanent i un induït, i entre dipols induïts.

- 2) Interaccions electrostàtiques (repulsió i atracció entre ions).
- 3) Interaccions àcid-base per donació de protons (acidesa de la fase estacionària).
- 4) Interaccions àcid-base per acceptació de protons (basicitat de la fase estacionària).

Donat que soluts diferents exhibeixen distintes propietats moleculars, es dedueix que la força eluent d'un dissolvent, o d'una mescla de dissolvents, no es pot mesurar amb un únic paràmetre tal que siga vàlid per a tot tipus de soluts. Així, per exemple, si es cromatografiem diversos herbicides els quals tenen estructures moleculars paregudes, els valors de k seran probablement similars, però distints per a tots ells. Es podria afegir "afortunadament" distints, ja que d'altra manera la separació cromatogràfica d'uns i altres herbicides entre si no seria possible.

La força eluent és distinta per a soluts diferents. No obstant això, si les estructures moleculars dels herbicides són similars, els valors de k no seran molt diferents. El mateix es podria afirmar de qualsevol grup de soluts amb propietats similars. Per aquesta raó, resulta útil establir el concepte de "força eluent", basat en un "paràmetre de polaritat" únic que estime la polaritat global de dissolvents, soluts i fases estacionàries. El pendent B de l'equació (1) és una mesura empírica de la força eluent d'un dissolvent. El paràmetre de solubilitat de Hildebrand proporciona una altra mesura de la força eluent d'un dissolvent o d'una mescla de dissolvents.

Mesura de la força eluent amb el paràmetre de solubilitat de Hildebrand. S'han descrit diversos paràmetres que intenten resumir en un valor numèric únic el conjunt de forces amb les quals una molècula interacciona amb d'altres. Una mesura d'aquest tipus és el paràmetre de solubilitat de Hildebrand. Mesura les forces que mantenen unides entre si les molècules d'un dissolvent. Es defineix com l'arrel quadrada de l'energia cohesiva per unitat de volum:

$$\delta^2 = -E / v \quad (3)$$

on E és l'energia cohesiva i v és el volum molar o volum que ocupa un mol del dissolvent. En la següent taula es donen alguns valors del paràmetre δ .

Dissolvent—	δ —	Dissolvent—	δ —
Aigua—	25,5—	1,4-Dioxà—	10,7—
MeOH—	15,9—	THF—	9,9—
ACN—	13,1—	Acetat d'etil—	9,5—
Isopropanol—	11,6—	Cloroform—	9,4—
Diclorometà—	10,7—	Alcans —	7—

El paràmetre de Hildebrand ofereix una mesura global de les forces que actuen en el si d'un dissolvent per mantenir les seues molècules unides, fet que permet disposar d'una escala quantitativa de polaritat. L'aigua es troba en el més alt de l'escala, com correspon a un líquid molt fortament associat, i altres dissolvents polars ocupen posicions intermèdies. Els alcans apareixen en la part inferior de la taula, ja que les seues molècules estan unides per forces dèbils.

Aquest paràmetre és útil per estimar la força eluent de les fases mòbils, i també per estimar la força amb la qual les fases estacionàries van a retenir els soluts. És així perquè les forces que uneixen les molècules del dissolvent les unes amb les altres (fonamentalment interaccions entre dipols, i acceptació i donació de protons) són les mateixes forces que uneixen els soluts amb les fases mòbil i estacionària.

Observant la taula de valors de δ , es dedueix que en fase inversa (RP-HPLC), i per a mescles amb la mateixa proporció de modificador, la força eluent augmentarà en el sentit:

MeOH/aigua < ACN/aigua < isopropanol/aigua << THF/aigua.

Per altra part, en fase normal (NP-HPLC), també per a mescles amb la mateixa proporció de modificador, la força eluent ha d'augmentar en el sentit:

Cloroform/heptà < acetat d'etil/heptà < diclorometà/heptà < isopropanol/heptà.

La regla de Schoenmakers. Perquè els soluts eluïsqen dins de la zona òptima de valors de k i a la vegada apareguen resolts entre ells es deuen complir dues condicions:

a) Que les polaritats dels soluts estiguen pròximes a la mitjana entre les polaritats de les fases, fet que es pot expressar de la manera següent:

$$\delta_i \sim (\delta_M + \delta_S) / 2 \quad (4)$$

on δ_i és la polaritat del solut estimada amb el paràmetre de Hilderband, i δ_M i δ_S són les polaritats de la fase mòbil i la fase estacionària, respectivament. Com indica l'equació (4), perquè es produïska retenció dins de la zona òptima de valors de k el solut no deu tenir una preferència excessiva per una de les dues fases. Per tant, la seua polaritat deu ser intermèdia entre les polaritats de les fases. La polaritat de tots els soluts no pot ser exactament igual a la mitjana de les polaritats de las fases. L'equació (4) es deu complir únicament d'una manera aproximada, de forma que els soluts no tinguin tots exactament la mateixa polaritat, ja que no es podrien separar.

b) Que les polaritats de les fases, δ_M i δ_S siguen molt distintes entre si. En efecte, si $\delta_M \sim \delta_S$ seran molt pocs els soluts que puguen complir l'equació (4), ja que quasi tots tindran valors de δ_i majors o menors que δ_M i δ_S , però no intermedis. Pel contrari, si δ_M i δ_S són molt distintes, molts soluts tindran polaritats intermèdies, i l'equació (4) es podrà complir aproximadament per a molts d'ells.

Aquestes dues condicions es resumeixen en la **regla de Schoenmakers** (Fig. 17), la qual diu que, per obtenir un valor de k dins de la zona òptima, les polaritats de les fases i del solut deuen ser tals que:

$$(\delta_M + \delta_S - 2\delta_i) (\delta_M - \delta_S) \sim 0 \quad (5)$$

amb la condició (com s'ha comentat) que el segon parèntesi siga al més gran possible, de manera que siguen molts els soluts que puguen complir aproximadament l'equació (4) (que el primer parèntesi siga pròxim a zero).



Fig. 17. Peter J. Schoenmakers

La regla de Schoenmakers té la seua expressió gràfica en el diagrama de la Fig. 18. D'acord amb el que indica la part A de la figura, si s'utilitza fase inversa sobre C18, soluts polars (fins a 15,5) elueixen bé amb aigua o amb mescles riques en aigua. Soluts poc polars (fins a 10) elueixen bé amb mescles riques en ACN o en MeOH. Per a soluts més hidrofòbics (menys polars que 10) es deuen utilitzar mescles riques en THF. Quan es fa un gradient aigua-ACN, augmentant la concentració d'aquest últim "s'agraña" la zona de polaritats de soluts entre 15,5 i 10.

Igualment, la part B de la figura indica les polaritats que deuen tenir els soluts que elueixen en la zona òptima de k quan s'utilitza una fase estacionària de sílice sense recobrir i es fa un gradient en fase

normal. Utilitzant heptà i augmentant la concentració de cloroform o d'isopropanol s'agranada una menuda zona de polaritats dels soluts (des de 11,5 fins a 13,5). Aquesta zona és menor que l'agranada en fase inversa, i no abasteix cap zona nova respecte als soluts que se separen bé en fase inversa. Es pot pensar que la cromatografia en fase normal no aporta res de nou respecte a la fase inversa. No obstant això, permet cromatografiar mostres i soluts incompatibles amb medis aquosos o hidroorgànics.

Per últim, en HILIC, els soluts es retenen en una fase estacionària constituïda essencialment per aigua i el gradient es fa amb una fase mòbil rica en ACN, augmentant la proporció d'aigua. En aquest cas, com s'indica en la part C de la figura, en la zona òptima elueixen soluts altament polars (des de 18 fins a 21 si s'augmenta la proporció d'aigua des del 5% fins al 50%).

Força eluent de mescles de dissolvents. Per aconseguir fases mòbils amb la polaritat adequada es treballa amb mescles de dissolvents. La mescla permet un sintonitzat fi de la polaritat i, en cas necessari, permet realitzar un gradient de polaritat. En fase inversa, i per a percentatges baixos o moderats de modificador, la polaritat de la mescla es calcula aproximadament com:

$$\delta_M = \sum \varphi_j \delta_j \quad (6)$$

on els coeficients φ_j són les fraccions volumètriques.

Exemple: Una mescla amb $\delta_M \approx 17$ per treballar en fase inversa es pot aconseguir amb metanol i aigua. Aplicant l'equació (6) per calcular els volums a mesclar, i tenint en compte que la suma de fraccions volumètriques és la unitat resulta: $\delta_M = 15.9 \varphi + 25.5 (1 - \varphi) = 17$. Resolent es té: $\varphi = 88.5\%$ de metanol i 11.5% d'aigua. El càlcul és orientatiu, ja que el percentatge de modificador resultant està fora de la zona lineal de l'equació (2) (fins un 30%).

Mescles isoelutòriques. Una mescla amb un valor donat de δ_M es pot aconseguir de moltes maneres, és a dir, per a un valor donat de δ_M són possibles moltes mescles isoelutòriques. Aplicant l'equació (5) a mescles binàries de MeOH, ACN i THF amb aigua, resulta:

$$\delta_{MeOH} \varphi_{MeOH} + \delta_{aigua} (1 - \varphi_{MeOH}) = \delta_{ACN} \varphi_{ACN} + \delta_{aigua} (1 - \varphi_{ACN}) = \delta_{THF} \varphi_{THF} + \delta_{aigua} (1 - \varphi_{THF})$$

$$\text{reorganitzant: } \varphi_{MeOH} (\delta_{MeOH} - \delta_{aigua}) = \varphi_{ACN} (\delta_{ACN} - \delta_{aigua}) = \varphi_{THF} (\delta_{THF} - \delta_{aigua})$$

Utilitzant els valors de la taula de Hildebrand, es té:

$$\varphi_{MeOH} = 1.29 \varphi_{ACN} = 1.63 \varphi_{THF} \quad (6)$$

$$0.78 \varphi_{MeOH} = \varphi_{ACN} = 1.26 \varphi_{THF} \quad (7)$$

$$0.62 \varphi_{MeOH} = 0.79 \varphi_{ACN} = \varphi_{THF} \quad (8)$$

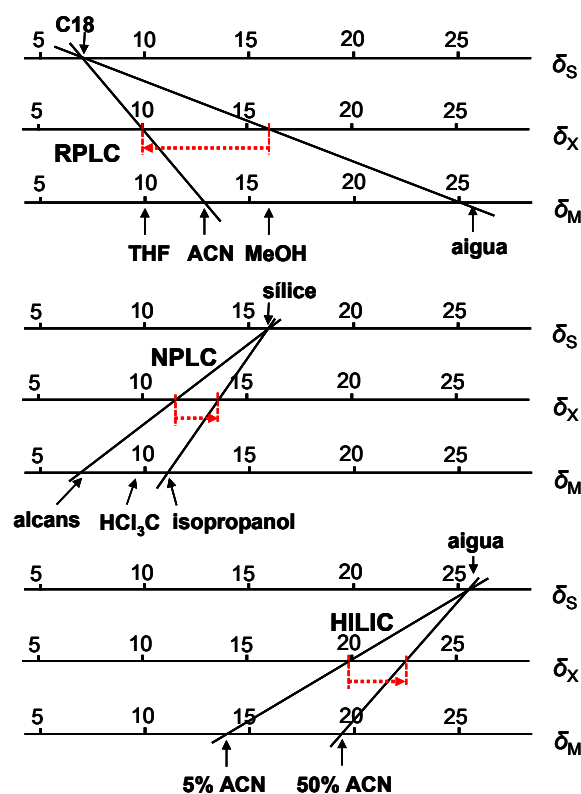


Fig. 18. Expressió gràfica de la regla de Schoenmakers

Aquestes expressions resulten útils per a canviar un dissolvent per un altre, modificant la selectivitat sense que canvie dràsticament la força eluent.

Exemple 1: Una fase mòbil amb un 60% de metanol tindrà aproximadament la mateixa força eluent que fases mòbils contenint $0.78 \times 60 = 47\%$ d'acetonitril o $0.62 \times 60 = 37\%$ de THF (el THF és més hidrofòbic, i amb menys proporció en la mescla s'aconsegueix la mateixa força eluent).

Exemple 2: Si es vol canviar una fase mòbil 90:10 aigua-metanol per una altra amb la mateixa força eluent, les dues alternatives més habituals es tenen substituint el 10% de metanol per un 7.8% d'acetonitril, o per un 6.1% de THF (comprovar els càlculs!).

Es comprèn la utilitat d'expressions d'aquest tipus si es considera que es deu optimitzar primer la força eluent, fins que tots els soluts eluïsquen en la regió òptima de retenció relativa ($1 < k < 5$), o en la regió acceptable ($0.2 < k < 20$). Després d'optimitzar la força eluent es canvia la naturalesa de la fase mòbil per modificar la selectivitat, però sense que varïe la força eluent global, és a dir, utilitzant mescles isoelutòpiques. D'aquesta manera, es busca millorar la resolució entre tots els soluts sense que el canvi de dissolvent supose una modificació important de la força eluent global.

No obstant, a causa de les limitacions del paràmetre de Hildebrand, les prediccions realitzades amb les equacions (6) a (8) es compleixen únicament d'una manera molt aproximada, depenent en gran mesura de la naturalesa dels soluts. Encara així, les equacions (6) a (8) resulten de gran utilitat per desenvolupar i modificar mètodes cromatogràfics.

El **nomograma** adjunt (Fig. 19) resumeix el comportament de molts soluts en mescles ACN/aigua, MeOH/aigua i THF/aigua. Una línia vertical indica fases isoelutòpiques. Respecte a l'escala del ACN/aigua, les escales de les altres mescles de dissolvents no són lineals. L'ACN té més força eluent que el MeOH (encara que per a certs soluts pot ser al revés) i el THF prou més força que l'ACN. El nomograma prediu, per exemple, que les mescles 60:40 ACN/aigua, 70:30 MeOH/aigua i 46:54 THF/aigua són isoelutòpiques (veure línia vertical de punts).

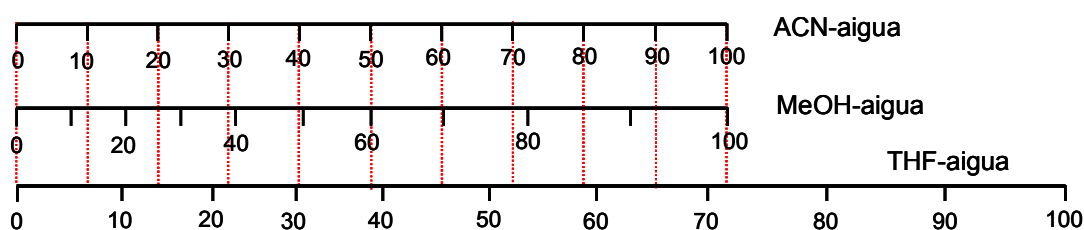


Fig. 19. Nomograma per a estimar fases isoelutòpiques en RP-HPLC

6. La selectivitat global de les fases mòbils. El triangle de selectivitat de Snyder

Una vegada s'ha ajustat la força eluent per a un grup de soluts, és necessari optimitzar la selectivitat, és a dir, modificar la naturalesa de la fase mòbil fins aconseguir la resolució de tots els parells de soluts. Per a això és necessari saber com es va a modificar la retenció de cada solut individual si es modifica la composició de la fase mòbil. Com s'ha indicat abans, en un dissolvent poden existir forces de diversos tipus. Per a predir la força eluent que va a experimentar un solut donat és necessari calcular aquestes forces per a la unió de la molècula del solut amb la fase estacionària i amb la fase mòbil. Existeixen programes informàtics que realitzen aquests càlculs.

Tanmateix, com que són moltes les forces d'interacció en joc, predir la selectivitat per a soluts

individuals és molt més difícil que predir una força eluent global. Sovint es fa ús de procediments gràfics que estimen simplement el **caràcter global d'un dissolvent** o d'una barreja de dissolvents, independentment de les forces d'interacció pròpies dels soluts. Per exemple, el procediment gràfic proposat per Snyder en 1974 (la foto de la Fig. 20 és de 2012) serveix per tenir una idea del caràcter dels dissolvents. Coneixent el caràcter dels dissolvents es pot saber si un determinat solut tindrà una afinitat especial per un dissolvent donat, i per tant si eluirà abans o més tard si en la fase mòbil se substitueix un dissolvent per altre.

En el **triangle de selectivitat dels dissolvents** o de Snyder (Fig. 21), en el costat dret es representa x_e , un paràmetre que estima el **caràcter bàsic** del dissolvent. Com més alt està un dissolvent en el diagrama, més bàsic és i, per tant, amb més facilitat eluirà soluts àcids (perquè interaccionen amb més força amb ell). A l'esquerra es representa x_d , que estima el **caràcter àcid** del dissolvent. Com més baix es troba el dissolvent, més accentuat és el seu caràcter àcid, i amb més facilitat eluirà soluts bàsics. Finalment, sobre el costat inferior es representa x_n , que és una mesura conjunta de la **polaritat i polaritzabilitat** del dissolvent. El terme "dipolaritat" al·ludeix a aquestes dues propietats considerades conjuntament. Com més **polar o polaritzable** siga un dissolvent, es trobarà tant més a la dreta, i eluirà més fàcilment soluts polars o polaritzables. La forma de llegir les escales s'indica mitjançant les fletxes que ixen del punt que representa el cloroform.



Fig. 20. Lloyd Snyder

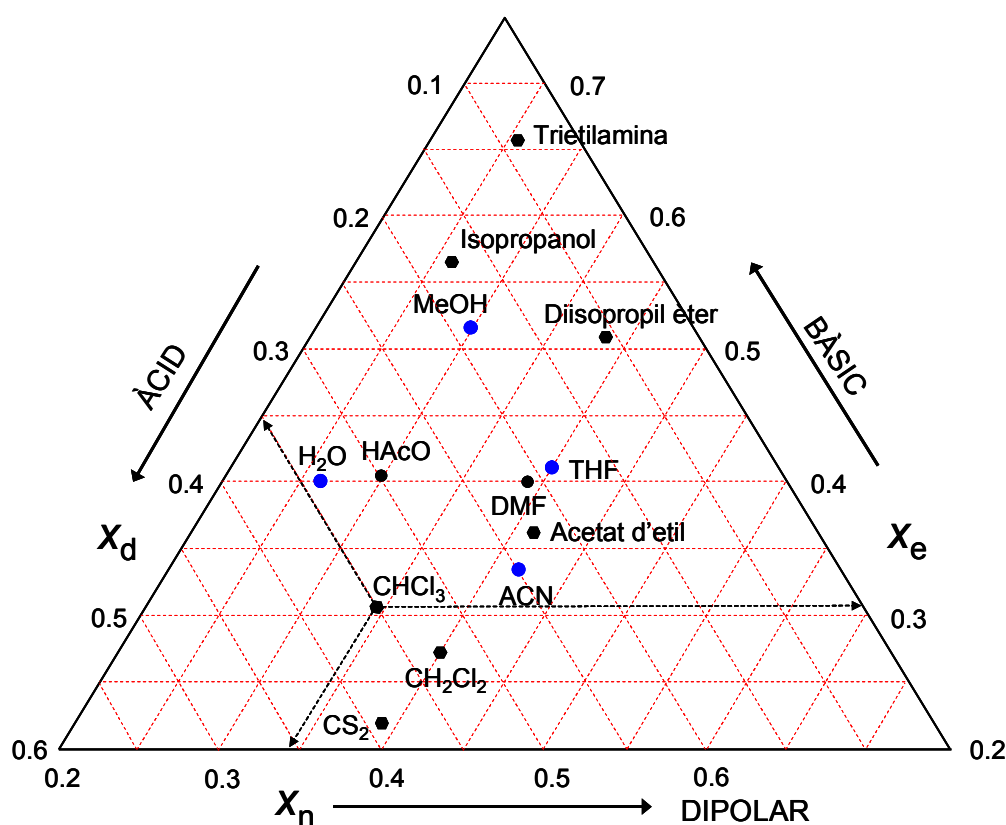


Fig. 21. Triangle de selectivitat dels dissolvents de Snyder

D'acord amb el diagrama, el cloroform és menys bàsic que àcid i és un dipol moderat (índexs 0.31/ 0.35/ 0.34). La trietilamina és molt bàsica (0.66), i l'acetat d'etil és molt dipolar (0.42). Respecte als dissolvents habituals en fase inversa, l'aigua és més bàsica que àcida i és un dipol molt dèbil (índexs 0.40/ 0.34/ 0.26). L'ACN també és més bàsic que àcid, però és molt més dipolar (índexs 0.33/ 0.25/ 0.42).

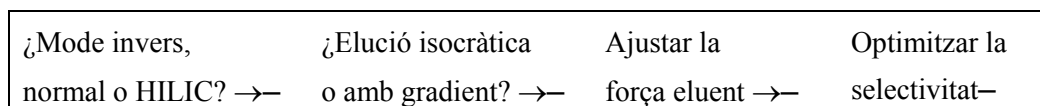
0.42). El MeOH és prou més bàsic que l'aigua i que l'ACN, molt menys àcid que ambdós, i la seua dipolaritat és intermèdia entre la de l'aigua i la de l'ACN (índexs 0.52/ 0.18/ 0.30). Finalment, el THF és moderadament bàsic (accepta protons), poc àcid i fortament dipolar (índexs 0.41/ 0.18/ 0.40).

El triangle de selectivitat permet predir si la força eluent de la fase mòbil augmentarà o disminuirà per a determinats soluts quan es substituïska un dissolvent per un altre de distint caràcter. Per exemple, substituir una mescla MeOH/aigua per altra isoelutroòpica ACN/aigua suposa reduir la capacitat d'acceptar protons, de manera que la força eluent es redueix per als soluts àcids. En canvi, augmenta el caràcter dipolar de la fase mòbil, de manera que els compostos dipolars i polaritzables eluiran abans.

Per altra part, si una separació no és possible amb un dissolvent, quasi segur que tampoc serà possible amb un altre dissolvent que ocupe un lloc pròxim en el triangle de selectivitat. Atenent a les diferències entre les propietats dels soluts, s'elegirà un dissolvent tan distint com siga possible. Cal observar que els quatre dissolvents habituals en RP-HPLC (aigua, acetonitril, metanol i THF) són molt diferents entre si. El mateix succeeix amb els dissolvents habituals en NP-HPLC (heptà, cloroform, acetat d'etil, isopropanol).

7. Optimització de la composició de la fase mòbil en mode isocràtic

Per optimitzar una fase mòbil és recomanable seguir un procediment sistemàtic, tal com el que es descriu a continuació. El primer és elegir el mode invers, normal o HILIC, i després es decideix si es deu treballar amb elució isocràtica o amb gradient. A continuació, s'ajusta la força eluent, i per últim es modifica la selectivitat fins que tots els compostos d'interès estiguen resolts. Esquemàticament:



¿Mode invers, mode normal o HILIC? Per elegir el mode invers, el normal o el HILIC, es presta atenció a dos criteris:

a) **Assegurar la retenció** dels soluts sobre la fase estacionària. Si els soluts tenen regions hidrofòbiques extenses en zones estructurals "externes", es retindran bé sobre les fases típiques del mode invers: C8, C18. En canvi, un solut rodejat de grups iònics o polars (grups com -COOH, -OH o -NH₂) no experimentarà retenció. Aquests soluts, amb grups polars, es retenen bé sobre les fases polaritzables, com PFP, o polars com sílice o propilcà.

b) **Assegurar la compatibilitat de la mostra amb fase mòbil.** Per a la injecció directa de mostres solubles en aigua o en mescles hidroorgàniques (sèrum, orina, aigües, extractes aquosos o en aigua-metanol) s'elegeix fase inversa o HILIC, en canvi, per a mostres hidrofòbiques (olis, grasses o hidrocarburs, extractes en heptà, diclorometà o isopropanol) s'elegeix fase normal. No obstant això, en qualsevol dels dos casos, si els soluts no es retenen bé sobre la fase estacionària, es pot canviar la naturalesa hidrofílica o hidrofòbica de la matriu de la mostra. Per exemple, un oli vegetal es pot extraure amb un tampó aquós o amb metanol, i una mostra ambiental (aquosa) es pot concentrar sobre fase sòlida (per exemple, sobre C18) i obtenir un eluat en una mescla heptano-isopropanol.

¿Elució isocràtica o amb gradient? S'elegeix el mode isocràtic si es sap d'entrada que els compostos que es van a separar tenen polaritats molt semblants. Exemples: quan el que es vol separar són medicaments, drogues o pesticides amb estructures moleculars similars. En canvi, si se sap o se

sospita que els soluts tenen polaritats molt dispars, la separació únicament serà possible en mode gradient. Per a un problema desconegut, per al qual no se sap si les polaritats dels soluts seran paregudes o molt distintes entre si, és millor començar l'optimització del mètode treballant en gradient. Tal i com s'explica més avall, en aquests casos s'utilitza primer un gradient molt ampli (per exemple, del 5% al 100% d'acetonitril), de manera que s'assegure l'elució de tots els soluts.

Optimització de la força eluent en fase inversa amb elució isocràtica. En fase inversa, s'elegeix una fase estacionària de C18 (molt hidrofòbica), s'injecta la mostra i s'elueix amb una fase mòbil amb una força eluent molt alta, per exemple, 95:5 ACN/aigua. Utilitzar d'entrada una fase mòbil de força eluent elevada assegura l'observació de tots o molts components de la mostra, encara que siga sense retenció (prop de $k = 0$).

A continuació, per augmentar la retenció dels soluts no retinguts, es prova de reduir la concentració d'ACN. Es realitzen, per exemple, injeccions a 80, 60, 40 i 20% d'ACN. A mesura que es reduïska la força eluent, anirà creixent la retenció per a tots els soluts. Aplegarà un moment en què tots els soluts eluïsquen amb $k > 0,2$ (preferiblement, amb $k > 1$). En aquell moment, si el solut més retingut (el major valor de k) té $k < 20$ (preferiblement, $k < 5$), és a dir, si tots els soluts d'interès estan dins de la zona òptima de k , la força eluent està ajustada (falta eliminar possibles solapaments ajustant la selectivitat). En cas contrari (si hi ha a la vegada soluts amb $k < 0,2$ i $k > 20$), el problema no es pot resoldre per elució isocràtica, és a dir, serà necessari treballar amb gradient.

Optimització de la força eluent en fase normal i mode HILIC amb elució isocràtica. En fase normal, i de manera similar a com s'ha indicat per a fase inversa, s'elegeix una columna polar (per exemple, sílice), s'injecta la mostra i s'elueix amb una fase mòbil amb força eluent elevada, per exemple 20:80 heptà/ isopropanol. En HILIC, s'elegeix una columna polar tal com alquil-glicol, i s'elueix amb una mescla aigua-acetonitril la qual tinga una proporció alta d'aigua (per exemple, un 80%). En ambdós casos, probablement s'obtinguen tots els pics prop del temps mort. A continuació es va reduint la força eluent, de manera que augmente la retenció dels components de la mostra. Se sap així si és possible situar tots els analits dins de la zona òptima de valors de k .

El problema de les mostres amb força eluent alta. A mesura que es redueix la força eluent de la fase mòbil, s'observa a vegades una pèrdua creixent d'eficàcia. Els pics s'eixamplen i formen una cua. En casos extrems, els pics s'arriben a desdoblar (Fig. 22). El problema es produeix quan la força eluent de la fase mòbil és menor que la força eluent de la mostra. Per aquests casos, immediatament després de la injecció, els soluts elueixen en un ambient de força eluent major que la que correspon a la fase mòbil. Això arrossega la part del solut que roman en la fase mòbil, que s'avança, mentre que l'altra part del solut que s'ha dissolt en la fase estacionària queda endarrerida. El pic s'eixampla i s'aplega a desdoblar. Per evitar aquest problema, **les mostres es preparen en medis de baixa força eluent**, o bé, es dilueixen amb el dissolvent "dèbil" abans d'injectar. Així per exemple, per a fase inversa, un extracte en metanol es deu diluir al doble o al triple del seu volum amb aigua abans d'injectar en una fase mòbil que tinga una força eluent baixa.

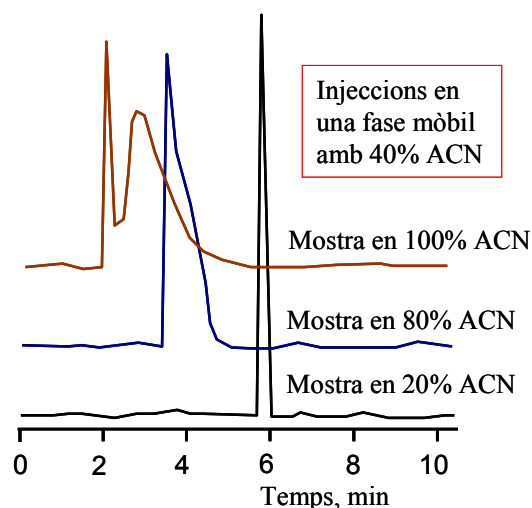


Fig. 22. Deformació del pic quan la mostra té una força eluent excessiva

Optimització empírica de la selectivitat amb el triangle de desenvolupament de mètodes. Si tots els soluts apareixen separats el problema està resolt. Si diversos soluts apareixen solapats, és necessari

optimitzar la selectivitat. L'optimització de la selectivitat es pot fer sobre una base racional, considerant les propietats dels soluts i de les fases estacionària i mòbil. Existeixen programes comercials que fan prediccions del comportament dels soluts en canviar les fases. També es pot fer ús de procediments qualitius com ara el triangle de Snyder. El principal problema d'aquests mètodes es que requereixen un coneixement de la naturalesa i propietats químiques dels soluts. Per això amb freqüència l'optimització de la selectivitat es fa mitjançant **procediments empírics**, de prova i error, en lloc de procediments basats en les propietats del soluts. Els procediments empírics no requereixen coneixements previs i són molt senzills.

En fase inversa, els procediments de prova i error s'apliquen substituint la mescla ACN/aigua per **mescles isoeluotrópiques** MeOH/aigua i THF/aigua. Altres mitjans per modificar la selectivitat són canviar la **temperatura** de la columna, o **variar el pH** de la fase mòbil. De millor a pitjor, el primer dissolvent que es deu provar és ACN, ja que permet treballar a pressions més baixes (és menys viscos), i per a detecció UV-vis té una longitud d'ona de tall molt baixa (190 nm). Si la separació no és satisfactòria amb ACN, la segona opció és MeOH. La viscositat és major, i per tant la pressió serà elevada, i la longitud d'ona de tall en el UV-vis és més alta (205 nm). La tercera opció, el THF, és pitjor que les altres dues, perquè en la seua presència l'equilibri de la fase mòbil amb la fase estacionària s'assoleix més lentament. A més, la longitud d'ona de tall del THF en el UV-vis també és més alta (212 nm).

Per tant, per provar mescles isoeluotrópiques se segueix l'ordre indicat pel **triangle de desenvolupament de mètodes** (Fig. 23). Si amb una de les tres mescles isoeluotrópiques la separació és satisfactòria, el problema està resolt. Si continuen apareixent pics solapats, es proven mescles isoeluotrópiques de tres dissolvents, o inclús de quatre, seguint l'ordre A - G del triangle. En aquest diagrama, els vèrtexs representen les mescles binàries ACN/aigua (A), MeOH/aigua (B) i THF/aigua (C), els punts sobre els costats representen mescles ternàries ACN/MeOH/aigua (D), etc, i el punt central G és una mescla quaternària. Per optimitzar la selectivitat de la fase es van modificant les mescles, seguint primer l'ordre de les lletres A - G, i després es modifica lleugerament la mescla que ha donat el millor resultat, fins que tots els pics d'interès apareguen resolts.

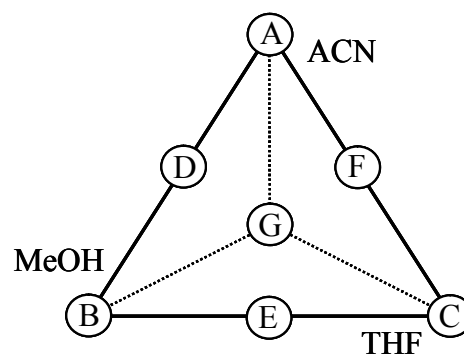


Fig. 23. Triangle per al desenvolupament empíric de mètodes

Exemple: Per resoldre un problema s'ha ajustat la força eluent. Amb una fase 70:30 ACN/aigua (punt A) s'ha aconseguit tenir tots els pics amb $0,5 < k < 10$, no obstant això, la resolució entre alguns parells de pics no és satisfactòria. El que es deu fer a continuació és el següent:

- D'acord amb el nomograma de fases isoeluotrópiques, s'utilitzarà una mescla 78:22 MeOH/aigua (punt B del triangle de desenvolupament de mètodes).
- Si segueixen existint soluts no resolts, s'utilitzarà una mescla 52:48 THF/aigua (punt C). De nou, el percentatge d'ambdós dissolvents s'ha calculat per a una mescla isoeluotrópica respecte a les anteriors (veure el nomograma representat més amunt).
- Si el problema continua sense resoldre, s'utilitza la mescla isoeluotrópica D: 35 % ACN, 39 % MeOH i 26 % aigua.
- La fase a provar a continuació és la isoeluotrópica E: 39 % MeOH, 26 % THF i 35 % aigua, i així successivament.

8. Optimització de la composició de la fase mòbil en mode gradient

El gradient s'estableix sempre de manera que augmente la força eluent amb el temps. S'accelera així l'elució dels soluts que tenen una preferència excessiva per la fase estacionària. S'utilitzen almenys dues mescles de dissolvents: una mescla A, de menor força eluent, i una altra mescla B, de major força eluent. En el moment en el qual es realitza la injecció s'inicia el gradient. Durant el temps del gradient, t_G , es va augmentant el cabal de B a la vegada que es redueix el de A, mantenint constant la suma d'ambdós cabals, fins que únicament es bombeja B.

Desenvolupament d'un mètode mitjançant elució amb gradient. Si les mostres contenen soluts amb polaritats molt distintes, és millor començar el desenvolupament del mètode utilitzant elució amb gradient, en compte d'isocràtica. Per assegurar que es veuen tots els pics, en el primer cromatograma s'utilitza un gradient de poc pendent (temps del gradient gran, en la Fig. 24, $t_G = 40$ min) i molt ampli. Per exemple, en fase inversa el gradient pot començar amb un 5% d'ACN i finalitzar amb un 100%. Es finalitza amb una fase de força eluent elevada per assegurar l'elució de tots els components de la mostra.

A continuació es mesura el temps des que elueix el primer pic fins que elueix l'últim, Δt . En l'exemple de la figura, el primer pic elueix als 17 min i l'últim als 32, de manera que $\Delta t = 32 - 17 = 15$ min. El quocient $\Delta t / t_G$ proporciona un criteri per decidir si el problema es pot resoldre en mode isocràtic o si és necessari el gradient. Es tenen dos casos:

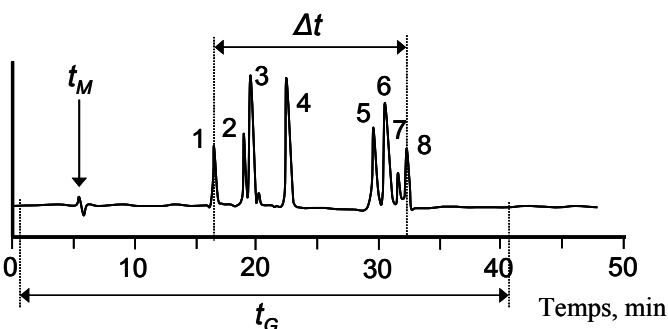


Fig. 24. Cromatograma obtingut amb un gradient ample: els pics dels soluts ocupen una part del temps del gradient

a) Els soluts d'interès ocupen menys del 25% del temps del gradient, és a dir, $\Delta t / t_G < 0,25$. Els soluts elueixen en un interval de temps estret en comparació amb el temps de gradient, per la qual cosa serà possible eluir-los a tots en mode isocràtic dins d'un temps raonable. La composició de la fase isocràtica a utilitzar és la corresponent al punt mitjà de l'interval Δt .

b) Els soluts d'interès ocupen més del 25% del temps del gradient, és a dir, $\Delta t / t_G > 0,25$. En aquest cas, els soluts elueixen en moments molt distintes del gradient, i no serà possible eluir-los a tots en mode isocràtic dins d'un temps raonable. En la figura, $\Delta t / t_G = 15 / 40 = 0,38$, de manera que s'elegirà l'elució amb gradient. El nou gradient ja no serà tan ampli com el primer. El gradient es pot ara "enfocar" entre la composició de la fase mòbil en el moment en el qual elueix el primer pic (inici de Δt ; la composició en aquest punt serà la nova fase A) i la composició de la fase en el moment en el qual elueix l'últim (final de Δt , composició de la nova fase B).

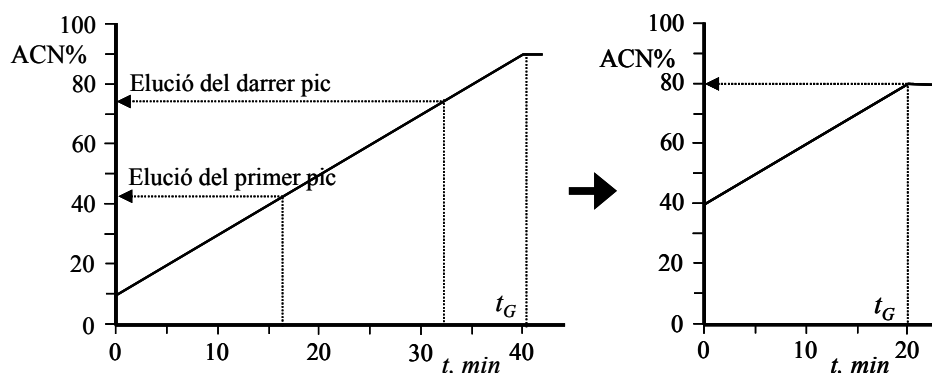


Fig. 25. Selecció d'un nou gradient

Exemple 1: Si en el cromatograma de la Fig. 24 el gradient s'ha iniciat amb 10% ACN (mescla A), i ha finalitzat amb 90% ACN (mescla B), ¿quina composició òptima deuen tenir les noves mescles A i B per fer el següent gradient?

Solució: Com s'il·lustra en la Fig. 25, el gradient ve donat per una recta la qual passa pels punts ($t = 0$, ACN% = 10) i ($t = t_G = 40$, ACN% = 90). El pendent del gradient és de $(90 - 10) / 40 = 2\%$ d'augment d'ACN per minut. Com és fàcil calcular, per a $t = 17$ (primer pic d'interès) i 32 min (últim pic d'interès) es té ACN% = 42 i 75, respectivament. En la pràctica, s'iniciarà el gradient un poc abans de 42, per exemple en ACN% = 40, i es finalitzarà un poc després de 75%, per exemple en 80%, per donar així un cert marge que assegure l'elució completa dels analits. Si es manté el mateix pendent (2% d'ACN / min), el temps d'anàlisi es redueix.

Exemple 2. En el supòsit que únicament interesse separar el grup de soluts 5 - 8 de la Fig. 24, demostrar que dita separació és possible amb elució isocràtica, i calcular la composició que deuria tenir la fase mòbil.

Solució: Es té: $\Delta t = 32 - 29 = 3$ min, per la qual cosa $\Delta t / t_G = 3 / 40 \ll 0,25$, de manera que aquest grup de soluts es pot separar mitjançant elució isocràtica. El punt mitjà de Δt es té a $(29 + 32) / 2 = 30,5$ min, per la qual cosa la fase mòbil deuria tenir aproximadament un 64% d'ACN (veure Fig. 25).

Una vegada s'ha establert la força eluent de les mescles A i B (inicial i final), es presta atenció a dues qüestions més:

a) **Optimitzar la selectivitat.** Si alguns parells de pics no apareixen amb suficient resolució és necessari modificar la composició de les mescles A i B sense canviar la seua força eluent. Per a això es substitueix l'ACN per MeOH, THF o les seues mescles, tal i com s'ha comentat per a elució isocràtica. És recomanable provar les distintes mescles seguint el triangle de desenvolupament de mètodes (punts A, B, C, etc, per a les dues mescles del gradient).

b) **Segmentar el gradient.** Quan tots els soluts estan ben resolts, s'intenta **reduir el temps del gradient**, sense perdre resolució. Una forma d'aconseguir-ho és utilitzar un **gradient segmentat**, és a dir, un gradient el pendent del qual canvia d'acord amb la dificultat que presenta cada segment del cromatograma. La Fig. 26 mostra l'aspecte que podria tenir el cromatograma de la Fig. 24 si el mateix problema es fa eluir amb un gradient de tres segments. Per estalviar temps sense perdre resolució, el gradient s'ha dissenyat de manera que el pendent és menor en les zones amb pics solapats, i major en les zones on no hi ha pics.

Existeixen programes informàtics que prediuen el cromatograma resultant quan es canvia el pendent del gradient (veure les pàgines web de **DryLab** i **ChromSword**, entre altres). Aquest tipus de programes facilita en gran mesura el treball necessari per optimitzar un gradient, ja siga amb un sol segment o dividit en segments de distint pendent. Un **programa de desenvolupament de mètodes** redueix en gran mesura el treball experimental i estalvia molt de temps.

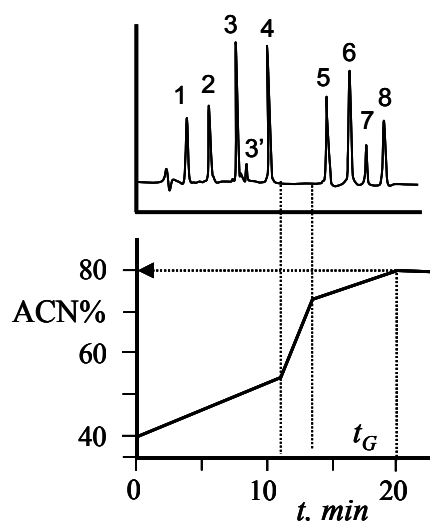


Fig. 26. Gradient segmentat

9. Influència de la temperatura de la columna

La regulació de la temperatura de la columna no és tan important en HPLC com en GC, no obstant això, és molt útil per a millorar les separacions. De fet, la temperatura de la columna és un dels paràmetres que s'optimitzen quan s'utilitza un programa informàtic com DryLab o ChromSword. L'habitual és treballar en mode isotèrmic. Se sol evitar l'ús d'un gradient de temperatura per eludir els temps d'espera fins que es recupere la temperatura inicial (i l'equilibri entre la fase mòbil i l'estacionària) entre un cromatograma i el següent.

Per controlar la temperatura de la columna, aquesta es col·loca dins d'un forn calfat per aire, similar als que es fan servir per a GC, o dins un bloc metàl·lic termostatitzat (Fig. 27). Es sol treballar en el rang 5 – 80 °C. A les pressions elevades que es troben dins de les columnes, els dissolvents que s'utilitzen en la composició de les fases mòbils, com aigua, metanol i acetonitril, es mantenen en estat líquid. No obstant això, si s'utilitzen temperatures altes en la columna, es deuen prendre dues precaucions:



Fig. 27. Compartiment termostatitzat per columnes

- Precalfar la fase mòbil (mitjançant un serpentí o tub metàl·lic), per evitar distorsions del flux que causarien pèrdua d'eficàcia.
- Utilitzar un tub restrictiu de pressió a l'eixida de la columna (un capil·lar d'acer, o un tub PEEK diàmetre menut intern) per evitar que la fase mòbil entre en ebullició abans de refredar-se.

Controlar la temperatura de la columna millora la reproduïbilitat dels cromatogrames. Per altra part, utilitzar temperatures altes (més de 40 °C) té els següents **avantatges**:

- Disminueix la viscositat de la fase mòbil, de manera que el cabal es manté amb menys pressió.
- Millora la solubilitat de certs soluts en la fase mòbil.
- Modifica la selectivitat de la columna (canvia l'ordre d'elució de certs soluts).
- Augmenta l'eficàcia a cabals alts, perquè incrementa la velocitat de difusió dels soluts, i amb això augmenta la velocitat de transferència de massa entre les fases.

El principal **inconvenient** és que es redueix la vida de la columna, especialment si es treballa a pHs on l'enllaç siloxà és poc estable (menys de pH 2 i més de 7).

10. Detectores espectrofotomètrics

Fonament dels detectors espectrofotomètrics. En espectrofotometria es mesura l'absorció de radiació en la regió UV-Vis de l'espectre electromagnètic (de 200 a 800 nm). En aquesta regió absorbeixen alguns ions i molècules inorgàniques, i una gran part dels ions i molècules orgàniques. L'absorció es produeix mitjançant l'excitació d'electrons de baixa energia: electrons π i desaparellats. El senyal és proporcional a la concentració molar del solut absorbent, d'acord amb la llei de Lambert-Beer:

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon b c \quad (9)$$

on A és l'absorbància, I_0/I és el quocient entre la intensitat de la radiació incident i la transmesa, ε l'absortivitat molar del solut, b el pas òptic o espessor de la cel·la d'observació, i c la concentració molar del solut. En la figura el pas òptic és la distància entre les cares interiors de les dues finestres de quars de la cel·la d'absorció. L'absortivitat molar d'un solut, ε , depèn de la naturalesa del cromòfor o

cromòfors (grups absorbents) i de la longitud d'ona. Quan els soluts no són absorbents, o quan la seua absorptivitat és baixa, s'utilitzen tècniques de preconcentració (com extracció en fase sòlida i altres), o bé s'augmenta l'absorptivitat dels soluts mitjançant derivatització. Les reaccions de derivatització introdueixen un cromòfor o un auxòcrom (un grup donador d'electrons que augmenta la conjugació d'algun cromòfor ja present).

El soroll de fons d'un detector espectrofotomètric de qualitat és de l'ordre de $s = 0.1$ mAU (*mili-absorbance units*, mil·liunitats d'absorbància). Per tant, en un espectrofotòmetre ordinari, dotat d'una cel·la d'1 cm de camí òptic, i per a soluts fortament absorbents (per exemple, amb absorptivitats molars d'uns $30000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$), es tenen LODs de l'ordre dels 10^{-8} M :

$$\text{LOD} = 3s/b = 3 \times 0.0001 / (1 \text{ cm} \times 30000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}) = 10^{-8} \text{ mol/L}$$

En un detector per a HPLC, la cel·la de mesura té un camí òptic 0.5 - 1 mm, per la qual cosa els LODs són unes 10 o 20 vegades majors ($10^{-6} - 10^{-7} \text{ M}$ si el solut té una absorptivitat molar alta). Per altra part, els detectors espectrofotomètrics assoleixen el límit superior de l'interval dinàmic lineal per a absorbàncies pròximes a 2, quan la intensitat de la radiació que aplega al detector (la radiació transmesa) comença a ser excessivament baixa. Per tant, per a un solut amb alta absorptivitat molar, l'interval dinàmic lineal val: $\log [(\text{límit superior}) / \text{LOD}] = \log [2 / (3 \times 0.001)] = 2.8$. Per tant, en el millor dels casos, un detector espectrofotomètric s'estén sobre uns 3 ordres de magnitud.

Detector espectrofotomètric de làmpada de Hg.

Els detectors UV-vis més senzills estan proveïts d'una làmpada de Hg (Fig. 28). Aquesta font de radiació és monocromàtica, emet una línia intensa a 254 nm, coincident amb la regió espectral en la qual absorbeixen els compostos orgànics amb grups aromàtics, amb dobles enllaços conjugats amb carbonils o amb altres grups donadors d'electrons, entre altres. Amb un filtre s'elimina la radiació incident d'altres longituds d'ona, i la radiació transmesa es mesura amb un fotodiode.

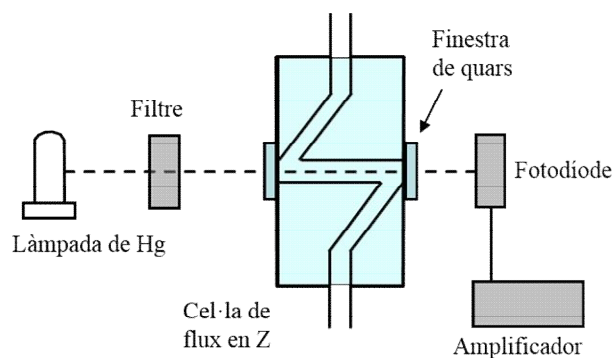


Fig. 28. Detector espectrofotomètric de làmpada de mercuri (no està dibuixat a escala)

Detector espectrofotomètric de longitud d'ona variable.

Molts detectors espectrofotomètrics estan proveïts d'una làmpada de deuteri, la qual emet radiació contínua en l'UV, i també d'una altra làmpada de filament de wolfram, la qual emet radiació contínua en el visible (Fig. 29). D'aquesta manera, amb dues làmpades, es cobreix tot el rang UV-vis, des de 190 fins 800 nm. La longitud d'ona de la radiació incident se selecciona amb un monocromador, constituït per

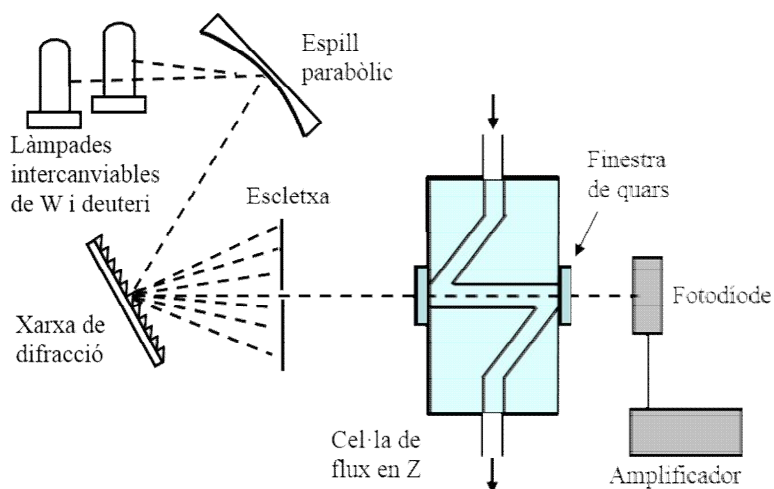


Fig. 29. Detector espectrofotomètric de longitud d'ona variable (no està dibuixat a escala)

una xarxa de difracció i una màscara amb una esclatxa. Finalment, la radiació monocromàtica incideix sobre la **cel·la de flux**, per on flueix l'eluat procedent de la columna.

Detector espectrofotomètric de fila de díodes. Els detectors de fila o matriu de díodes (DAD, *diode array detector*) són capaços de detectar a la vegada tot l'espectre UV-vis. Per aquesta raó, la radiació incident no es dispersa abans de la mostra. Al contrari, tota la radiació emesa per les làmpades de deuteri i de wolframi incideix simultàniament sobre la mostra (Fig. 30). El monocromador es troba situat després de la mostra (i no abans), i manca d'esclatxa. El monocromador dispersa la radiació transmesa, de manera que cada longitud d'ona incideix sobre un fotodíode distint. Sobre la fila de díodes es registra a la vegada tot l'espectre d'absorció de la mostra.

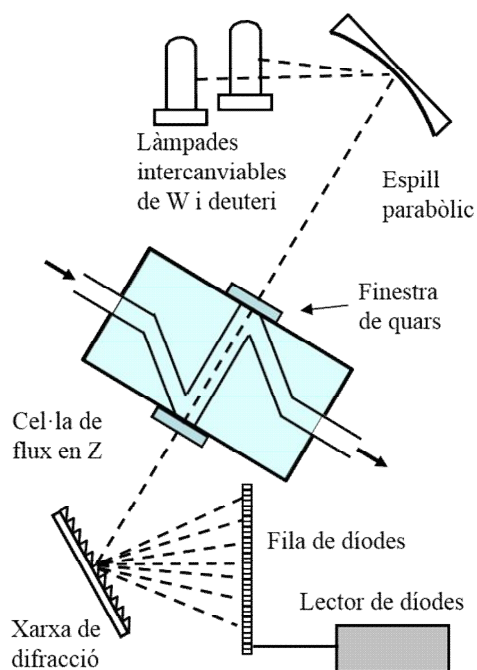


Fig. 30. Detector espectrofotomètric de fila de díodes (no està dibuixat a escala)

No obstant això, la mesura no és instantània. Ja que es necessita cert temps perquè els fotodíodes puguin mesurar adequadament la intensitat de la radiació (quantitat de fotons detectats per segon), la lectura dels mateixos es pren unes 3 vegades per segon. Amb aquests detectors es poden registrar diversos espectres durant l'elució d'un pic, fet que és útil a efectes d'identificació de l'analít (observació de màxims característics). A més, un canvi en l'espectre durant l'elució indica que el pic és degut a dos compostos poc resolts (per exemple, pot revelar la presència d'una impuresa no resolta). Observe's que la informació donada per un DAD és tridimensional: temps d'elució - longitud d'ona - absorbància.

La facilitat de maneig, el baix cost, la possibilitat d'eluir amb gradients, la gran varietat de compostos orgànics que absorbeixen en l'UV, i la sensibilitat adequada per a moltes aplicacions, fan que els detectors espectrofotomètrics siguin els més àmpliament utilitzats en HPLC. A més, els soluts no absorbents es poden detectar mitjançant derivatització cromogènica, la qual pot ser precolumna o postcolumna (entre l'eixida de la columna i el detector, si la reacció és ràpida).

11. Altres detectors per HPLC

A banda dels detectors espectrofotomètrics, en HPLC es fa ús de detecció fluorimètrica, d'índex de refracció, evaporativa, amperomètrica i d'espectròmetres de masses acoblats (veure el tema d'hibridació instrumental). La **detecció fluorimètrica** és important quan és necessari arribar a límits de detecció molt baixos, com sol ser el cas quan es treballa amb mostres ambientals

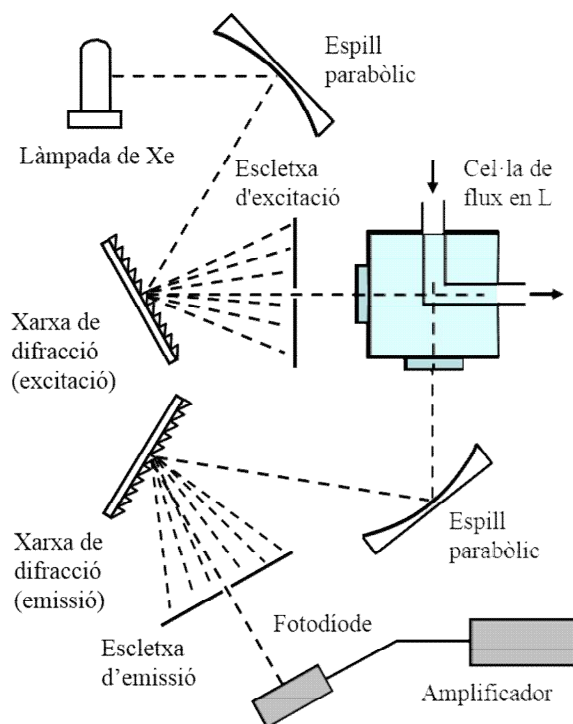


Fig. 31. Detector fluorimètric (no està a escala)

o bioquímiques. A la Fig. 31 es mostra un esquema de detector fluorimètric. La radiació, procedent d'una làmpada de xenó, és dispersada per una primera xarxa de difracció. Per això, sobre l'eluat incideix radiació monocromàtica. L'espectre d'emissió procedent de l'analit és dispersat en el segon monocromador. La intensitat de l'emissió es mesura finalment a una determinada longitud d'ona.

Quan els analits no absorbeixen en l'UV-Vis, i per raons econòmiques no és possible disposar d'un espectròmetre de masses, es pot fer ús del **detector d'índex de refracció** i dels detectors evaporatius. El detector d'índex de refracció és l'únic realment universal (detecta tota mena de substàncies), sent a més un detector molt econòmic, però té l'inconvenient que els límits de detecció són alts i l'interval lineal molt estret (menys de dos ordres de magnitud).

Els **detectors evaporatius** consten d'una primera etapa en la qual l'eluat es transforma en un aerosol mitjançant un corrent de nitrogen gas a pressió, i d'una segona etapa en la qual es detecten els soluts. Una vegada evaporat el dissolvent, els soluts queden en forma d'una fina boira de partícules en suspensió. No són universals perquè només detecten substàncies poc volàtils (no poden detectar substàncies que tinguin una volatilitat similar o més elevada que els dissolvents de la fase mòbil). Es comercialitzen dos tipus de detectors evaporatius: el de **dispersió de llum (ELSD, evaporative light scattering detector)**, en el qual es mesura la llum dispersada pel núvol de partícules (Fig. 32), i el d'**aerosol carregat o de descàrrega en corona (CAD, charged aerosol detector)**, en el qual es mesura el corrent elèctric que és capaç de transportar el núvol de partícules.

Finalment, els **detectors amperomètrics** serveixen per detectar compostos electroactius, que s'oxiden o es redueixen sobre un elèctrode de platí, or o pasta de carboni. La seva aplicabilitat està limitada a un grup d'analits relativament menut en comparació amb el camp d'aplicació dels detectors anteriors.

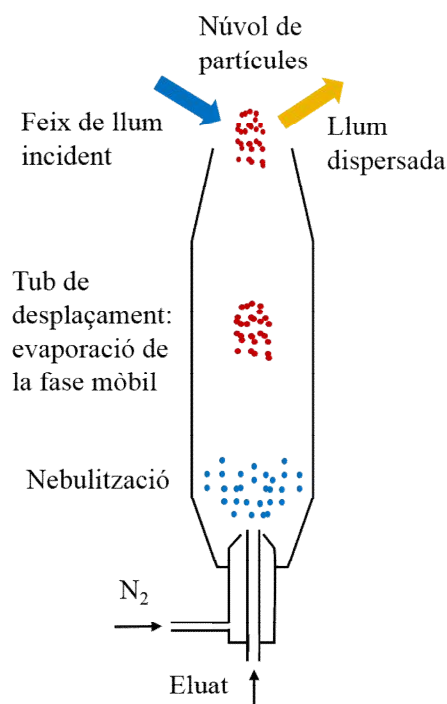


Fig. 32. Detector evaporatiu de dispersió de llum (ELSD)

5. CROMATOGRAFIA IÒNICA

1. Introducció. Fases estacionàries habituals.
2. L'equilibri de bescanvi iònic: coeficients de selectivitat.
3. Detecció conductimètrica.
4. Supressió aniònica.
5. Detecció fotomètrica indirecta.

—

1. Cromatografia iònica. Fases estacionàries habituals

Concepte. En **cromatografia de bescanvi iònic** la retenció té lloc per atracció electrostàtica entre els ions de la dissolució i els llocs carregats de la superfície d'un sòlid. Els **bescanviadors aniònics** tenen grups catiònics sobre la seua superfície, de manera que retenen anions. Els **bescanviadors catiònics** tenen grups aniònics, de manera que retenen cations. La cromatografia de bescanvi iònic d'**alta eficàcia** o HPLC de bescanvi iònic es coneix com **cromatografia iònica** (IC, *ion chromatography*).

Camp d'aplicació. Les tècniques habituals per determinar traces d'anions inorgànics i orgànics són la IC, l'electroforesi capil·lar (CE) i l'espectrometria de masses (MS). Respecte als cations, aquestes tres tècniques s'utilitzen també per a determinar traces de cations orgànics. Per altra banda, la MS s'utilitza també en la determinació de traces de cations inorgànics, en canvi la IC i la CE no sol utilitzar-se per a aquesta finalitat. És així perquè en aquest camp l'espectrometria d'absorció atòmica, i altres tècniques atòmiques, així com també la MS, són més ràpides i selectives, i donen lloc a LODs més baixos.

Les fases estacionàries. El material del qual està construïda la columna deu tenir la duresa suficient com per a suportar pressions elevades sense deformar-se. Atenent a aquest requisit deuen utilitzar-se exclusivament reblliments de partícules de sílice, o bé monòlits silícics, en els dos casos amb una fase enllaçada carregada positiva o negativament. No obstant això, el problema és que l'enllaç siloxà que reté la fase enllaçada no és estable per damunt de pH 7,5. Per aquesta raó, i atès que és freqüent en IC utilitzar com a fase mòbil dissolucions aquoses de bicarbonat o carbonat sòdics (pH 8,3 - 10,5), les fases estacionàries polimèriques (partícules o monòlits), que també es diuen "resines", són prou habituals.

Un exemple es l'estirè-divinilbenzè (St-DVB, *styrene-divinylbenzene*). Es prepara per polimerització de l'estirè (St) en presència de DVB, que actua com a entrecreuador de les cadenes de polímer (Fig. 1). Després de la síntesi, es derivatitzen els anells aromàtics com grups sulfonat ($-\text{SO}_3^-$), amoni quaternari ($-\text{NR}_3^+$) o altres. La substitució es produeix en la posició *para*. El bescanvi iònic es produeix en els porus de la "resina", que estan "entapissats" dels grups carregats.

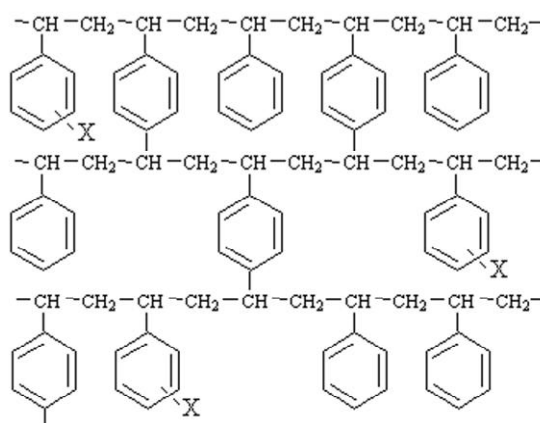


Fig. 1. Poliestirè entrecreuat i derivatitzat

Bescanviadors de ions forts i dèbils. En les fases estacionàries tipus "fort", el grup enllaçat és un àcid fort, que està sempre ionitzat. Els bescanviadors forts mantenen la capacitat bescanviadora a

qualsevol pH. Les fases “fortes” més habituals són la SAX (*strong anion-exchanger*), que té grups d’amoni quaternari, i la SCX (*strong cation-exchanger*), que té grups de sulfonat.

Altres fases, amb grups amino o carboxilat, són bescanviadores “dèbils”, açò és, perden la capacitat bescanviadora per dalt o per baix d’un cert pH. Exemples de bescanviadors aniònics dèbils (WAX, *weak anion-exchanger*) són: -propil-amino (-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂), o també, etilo-amino-dietil [-CH₂-CH₂-N(CH₂CH₃)₂]. Exemple d’un bescanviador catiònic dèbil (WCX, *weak cation-exchanger*): propil-carboxilat. L’avantatge dels bescanviadors dèbils és la possibilitat d’eluir ions fortament retinguts mitjançant un simple canvi de pH.

2. L’equilibri de bescanvi iònic: coeficients de selectivitat

L’equilibri de bescanvi iònic difereix del mecanisme de repartiment. En repartiment o absorció, la presència d’un solut B no té ninguna influència sobre la retenció d’un altre solut A. La retenció de cada solut obeeix a la seua constant de distribució, sent independent de la presència d’altres soluts. Al contrari, en bescanvi iònic, el mecanisme d’elució es basa precisament en el desplaçament d’uns ions per altres. És així perquè el nombre de llocs actius sobre la superfície del bescanviador iònic és limitat, i perquè tots els llocs actius deuen estar ocupats per ions de càrrega oposada o “contraions” (no es pot trencar la neutralitat elèctrica). Els ions units al bescanviador no trenquen el seu enllaç iònic amb el mateix, excepte si es veuen substituïts (desplaçats) per altres ions més abundants, o més afins als llocs actius o llocs d’enllaç.

Selectivitat de l’equilibri de bescanvi iònic. Es considera la competència entre Na⁺ i Li⁺ pels llocs actius d’una fase estacionària (St) bescanviadora de cations:



on s’ha considerat que l’activitat dels sòlids és la unitat. Depenent de les concentracions relatives dels dos ions en el medi, i de la preferència del bescanviador per un o un altre, la reacció es desplaçarà cap a la dreta o cap a l’esquerra. Així, si la concentració del ió sodi en el medi és alta, la reacció es desplaça a la dreta. En canvi, la reacció també es desplaça a la dreta si el bescanviador no conté res de sodi, encara que la concentració del ió sodi en el medi siga baixa. La manca de ions d’una determinada classe en el bescanviador és el que fa que ions en concentracions baixes queden retinguts.

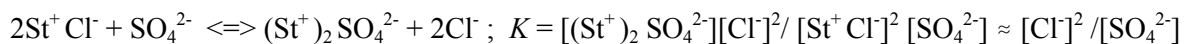
Suposem que la fase estacionària està carregada amb concentracions iguals de ions sodi i liti, i que està en contacte amb una dissolució que conté també concentracions iguals de ions sodi i liti. Depenent del valor de K , la fase estacionària tendeix a enriquir la dissolució amb ió sodi o amb ió liti, fins que es compleix la condició d’equilibri. Si $K = 3$, la fase prefereix el sodi, de manera que el ió sodi és retingut i el liti alliberat. Al cap d’uns minuts la concentració de ió liti en el medi serà el triple que la de ió sodi. Passa el contrari si $K < 1$ (la fase prefereix el liti). Si $K = 0,5$, al cap d’un temps la concentració de ió liti en el medi serà la meitat que la de ió sodi.

La constant d’equilibri K s’anomena **coeficient de selectivitat del Na⁺**, perquè descriu la selectivitat relativa de la fase estacionària per al Na⁺ pel que fa al Li⁺, que es pren com a ió de referència per bescanvi catiònic (si bé alguns fabricants de fases estacionàries prenen també el protó com a referència). El coeficient de selectivitat s’escriu amb el ió de referència en el numerador, de manera que una constant alta indica preferència de la fase per l’altre ió (la seua concentració en el medi tendeix a ser menor que la concentració del ió de referència).

En la taula adjunta es mostren els coeficients de selectivitat proporcionats per un fabricant de bescanviadors iònics. Els coeficients de selectivitat del fabricant permeten predir si una fase estacionària determinada és o no és adequada per separar una determinada parella de ions, segons que els seus coeficients de selectivitat siguin molt diferents o quasi iguals. També permeten predir si és fàcil o difícil desplaçar un ió amb un altre. Així per exemple, el ió potassi desplaça fàcilment el ió sodi, però és més difícil desplaçar el ió potassi utilitzant ió sodi. Igualment el ió plata desplaça fàcilment tots els altres cations, però és difícil desplaçar el ió plata utilitzant qualsevol catió. S'aconsegueix a base de concentracions majors del ió desplaçat, o també mitjançant grans volums d'elució. És interessant observar que els coeficients de selectivitat no són molt grans (no són valors logarítmics), cosa que permet desplaçar sempre un ió retingut amb concentracions o volums no excessivament grans de qualsevol altre ió.

Ió \ Resina-	Catiònica-X4-	Catiònica-X8-	Catiònica-X10-	Ió \ Resina-	Aniònica-
Li ⁺ -	1,00-	1,00-	1,00-	F ⁻ -	0,09-
H ⁺ -	1,30-	1,26-	1,45-	OH ⁻ -	0,09-
Na ⁺ -	1,49-	1,88-	2,23-	Cl ⁻ -	1,0-
K ⁺ -	2,09-	2,63-	4,15-	Br ⁻ -	2,8-
Ag ⁺ -	4,00-	7,36-	19,4-	ClO ₄ ⁻ -	10,0-

Anàlogament, la competència entre ió clorur i ió sulfat sobre una fase estacionària de bescanvi aniónic pot expressar-se com:

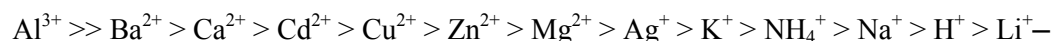


Com abans, el sulfat desplaça el ió clorur de la superfície del bescanviador i viceversa. En aquest cas, el ió clorur s'ha pres com a referència per establir el coeficient de selectivitat de la fase estacionària respecte a la resta d'anions (no obstant això alguns fabricants de fases estacionàries prefereixen prendre com a referència el ió oxhidril). La constant d'equilibri d'aquesta reacció és el **coeficient de selectivitat del sulfat** respecte al clorur. En la taula anterior es tenen alguns valors donats per un fabricant de resines de bescanvi iònic. És evident que el bromur desplaça fàcilment el clorur, i que el contrari és més difícil. Igualment, el ió perclorat desplaça fàcilment tots els altres ions.

Les sèries eluotrópiques de cations i anions. Els coeficients de selectivitat de les resines de bescanvi depenen en gran mesura de la **grandària dels ions hidratats i de la seua deformabilitat o polaritzabilitat, i en menor mesura, també de la rigidesa i la grandària dels porus**. Així, es retenen amb més força els ions més xicotets (considerant els radis dels ions hidratats), i els més polaritzables, com el Ag⁺. El ió liti no hidratat té un radi molt xicotet. Per això és molt rígid i, a més a més, la densitat de càrrega elèctrica sobre la seua superfície és molt gran. En conseqüència, el ió liti hidratat està constituït pel ió no hidratat més una capa gruixuda d'aigua fortament retinguda. Per tant, el radi del ió liti hidratat és prou gran. Un ió hidratat gran té poca densitat de càrrega sobre la seua gran superfície, cosa que implica retenció dèbil del ió sobre punts actius de càrrega oposada. Seguint el mateix raonament, el ió sodi hidratat es reté més que el ió liti hidratat perquè en ser menor té més densitat de càrrega. Igualment, el ió potassi hidratat es reté més que el ió sodi hidratat perquè en ser més menut té més densitat de càrrega.

L'altre factor que governa els coeficients de selectivitat és la **grandària dels porus**. La retenció augmenta en augmentar la grandària del porus (en la taula, des de X10 pels porus més menuts fins a X4 pels més grans) perquè es facilita l'entrada dels ions a l'interior dels mateixos. A la taula, l'efecte

de la grandària dels porus sobre la retenció no es veu, perquè els coeficients de selectivitat només comparen dades de retenció per a un bescanviador determinat. El que sí que es veu a la taula és que els bescanviadors de porus més menuts són més selectius: discriminen millor entre uns ions i altres. Les fases estacionàries també retenen amb més força els ions di-carregats, i més encara els poli-carregats, a causa de la seua major densitat de càrrega i perquè formen dos o més enllaços iònics amb els llocs actius de la fase estacionària (un enllaç per càrrega). En general, per a tot tipus de resines de bescanvi catiónic i en ordre decreixent del coeficient de selectivitat, es té la següent **sèrie eluotròpica dels cations**:



Per **anions** es tenen regles anàlogues. En la taula anterior, el F^- i el OH^- són ions molt menys retinguts que el Cl^- (ió de referència) perquè els corresponents ions hidratats, que són els que compten a efectes de bescanvi, són grans i poc deformables. El Br^- es reté amb més força perquè el ió hidratat és menor i més deformable o polaritzable. El perclorat, ClO_4^- , és un ió molt poc hidratat, i per això es reté molt fortament, sent molt utilitzat per desplaçar i eluir altres ions. Es podria pensar també que en ser tan gran la seua densitat de càrrega és molt baixa; però pot concentrar quasi tota la càrrega en l'oxigen unit al punt de l'enllaç catiónic, cosa que dóna lloc a enllaços electrostàtics forts. En general, per a moltes resines de bescanvi aniónic, i en ordre decreixent del coeficient de selectivitat, es té la següent **sèrie eluotròpica dels anions**:



Selecció de l'eluent. Una aplicació important dels coeficients de selectivitat és la selecció d'eluent en cromatografia de bescanvi iònic i en altres aplicacions. L'elució es produeix per competència entre el ió retingut i els ions de la mateixa càrrega presents en la fase mòbil. La força eluent creix amb el coeficient de selectivitat i amb la concentració del ió desplaçant. Així, a concentracions iguals, una dissolució de K^+ té més força eluotròpica que una de Na^+ . Anàlogament, per a anions, una dissolució de perclorat sòdic (no s'utilitza perclorat potàssic, perquè forma un parell iònic que no és soluble en aigua) té una força eluent molt més gran que les dissolucions d'altres anions de la mateixa concentració.

Els equilibris de bescanvi iònic es poden desplaçar inclús en el sentit contrari al que indiquen els coeficients de selectivitat, per la qual cosa és necessari utilitzar una concentració suficient del ió desplaçant, o més volum de reactiu, o ambdues coses. Així per exemple en rentar una columna que conté K^+ amb un excés de Li^+ , el Li^+ desplaça el K^+ , tot i que en aquest cas la diferència dels coeficients de selectivitat no és favorable. La fase estacionària es converteix a la forma lítica (queda retingut el Li^+). Igualment, i amb més facilitat, en rentar una columna en la forma Li^+ amb una sal de K^+ , la fase estacionària es converteix a la forma potàssica (queda retingut el K^+).

En cromatografia iònica, per eluir amb un **gradient de força eluotròpica creixent**, s'augmenta progressivament la concentració del ió desplaçant. Per exemple, per a eluir anions es pot mesclar una fase mòbil A que conté sols aigua, amb una fase mòbil B que conté 100 mM de perclorat sòdic (el desplaçant és el ió perclorat). Anàlogament, per a eluir cations es pot mesclar una fase A constituïda per aigua, amb una fase B constituïda per una dissolució aquosa 100 mM de nitrat potàssic (el desplaçant és el ió potassi). En ambdós casos, el gradient es genera augmentant la proporció de B en la mescla A+B. Les fases A i B poden contenir també un amortidor de pH a una concentració baixa i constant, perquè els ions del tampó no afecten la força eluent.

La càrrega d'una columna SCX amb Ag(I) proporciona un altre exemple il·lustratiu. El ió argent augmenta la retenció cromatogràfica de compostos orgànics que tenen grups aromàtics o dobles

enllaços (olefines). És així perquè el Ag^+ és molt polaritzable, i en polaritzar-se genera dipols induïts en els soluts que tenen electrons π . Per tant, una columna SCX carregada amb Ag^+ s'utilitza per separar compostos insaturats. Com que les fases SCX tenen major afinitat per a Ag^+ que per a altres cations, és fàcil carregar una columna amb $\text{Ag}(\text{I})$ i mantenir-la carregada permanentment. Si és necessari, s'afegeix una concentració "de record" a la fase mòbil (tal com 0,1 mM de Ag^+). El procés oposat, eliminar tots els ions Ag^+ de la columna, és difícil; no obstant això, pot fer-se rentant la columna amb un volum suficient d'àcid diluït (la fase estacionària queda en forma àcida).

3. La detecció conductimètrica

El detector de conductivitat. Amb poques excepcions, els cations i anions no absorbeixen en l'UV-Vis, per la qual cosa el detector conductimètric és el més habitual en IC. Consisteix en dos puntes de Pt submergides en la dissolució. Entre ambdues s'aplica una diferència de potencial xicoteta, alterna i de baixa freqüència. Com que el corrent canvia de sentit en cada cicle, els ions presents en la dissolució no tenen temps d'assolir els elèctrodes i per tant no es produeix electròlisi.

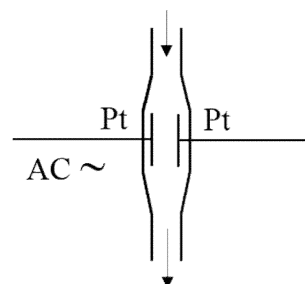


Fig. 2. Detector conductimètric

No obstant això, en cada semicicle la càrrega elèctrica de cada elèctrode canvia de negativa (excés d'electrons) a positiva (excés de buits). Aquesta càrrega produeix una acumulació de càrrega elèctrica (ions) de signe oposat en la dissolució pròxima als dos elèctrodes. Aquesta acumulació de càrrega en cada semicicle és el que permet el pas del corrent altern entre els elèctrodes, sense necessitat que hi hagi un transvasament d'electrons des de l'elèctrode a la dissolució (amb reducció d'alguna espècie química), i sense necessitat que passen electrons de la dissolució a l'elèctrode per neutralitzar els buits (amb oxidació de l'espècie química que cedeix els electrons). Ni tan sols es produeix transport de càrregues (de ions) en el si de la dissolució, excepte en la regió més propera a la superfície dels elèctrodes.

Per tant, tot i que no hi ha un corrent electrolític o "faradaic" (no es produeix electròlisi), l'acumulació i dissipació de càrrega al costat dels elèctrodes implica el pas d'un corrent altern d'origen "capacitiu". Es podria dir que el "ball" o "vaivé" dels ions transporta el corrent altern sense que hi haja oxidació o reducció (pas d'electrons) a la superfície dels elèctrodes. O també, que la polarització de la dissolució en les regions properes als elèctrodes permet el pas del camp elèctric entre ambdós. Si el corrent no fóra altern, el transport del mateix es detindria.

Quan el voltatge aplicat i la freqüència són constants, el corrent capacitiu és proporcional a la concentració i mobilitat dels ions presents en la dissolució. El detector de conductivitat és sensible a tot tipus de ions i dóna una resposta nul·la a espècies sense càrrega elèctrica neta (molècules i ions dobles). Com que hi ha ions més carregats i més mòbils que d'altres, els factors de resposta varien amb la seua naturalesa, tal com s'explica a continuació.

Selectivitat i sensibilitat de la resposta. La conductivitat d'un ió és proporcional a la seua mobilitat electroforètica, la qual és proporcional a la seua densitat de càrrega, i aquesta és proporcional a la seua càrrega i inversament proporcional al radi del ió hidratat. Per tant, la sensibilitat de la detecció conductimètrica és més gran com més carregat i més xicotet siga el ió hidratat. Com es dedueix de la taula de conductivitats iòniques, a igualtat de concentracions, una sal de K^+ dóna una resposta més gran que la mateixa sal de Na^+ , i aquesta major que la mateixa sal de Li^+ . La menor resposta del Li^+ està d'acord amb la major mida del seu radi com a ió hidratat. D'altra banda, els ions di-carregats mostren una resposta més gran que els mono-carregats. La resposta més gran de l'oxalat (massa

iónica, 88) respecte al Zn^{2+} (massa iònica, 65) s'explica perquè aquest últim, precisament per ser més xicotet, està més hidratat que l'oxalat i per tant és menys mòbil (el seu radi iònic és major).

Catió	Conductivitat iònica, $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$	Anió	Conductivitat iònica, $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$
H^+	350	OH^-	199
Li^+	39	Cl^-	76
Na^+	50	CH_3COO^-	41
K^+	73	$(\text{COO})_2^{2-}$	148
Zn^{2+}	106	—	—

Selectivitat i sensibilitat de protons i oxhidrils. És interessant observar que el protó i l'hidroxil, que tenen una sola càrrega i estan fortament hidratats, donen una resposta anormalment alta. Aquesta sensibilitat tan alta es deu al particular mecanisme de translació d'aquests ions. En lloc de traslladar-se amb tota la seua aigua d'hydratació, un protó passa d'una molècula d'aigua a una altra, d'acord amb la reacció: $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}_3\text{O}^+$

Igualment, per a un ió hidroxil, es té: $\text{HO}^- + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}^-$

A la primera reacció són tres els protons que poden saltar del H_3O^+ al H_2O , i en la segona són dos els que poden saltar del H_2O al HO^- . Aquest mecanisme explica les elevades conductivitats d'aquests ions, i l'avantatge estadístic (3 enfront de 2) explica la major conductivitat del H_3O^+ respecte al OH^- . Com s'exposa a continuació, mitjançant la tècnica coneguda com a "supressió iònica", es fa ús de l'elevada conductivitat de protons i hidroxils per augmentar la sensibilitat i, per tant, aconseguir LODs baixos en detecció conductimètrica

Avantatges i inconvenients del detector de conductivitat. La resposta del detector conductimètric és lineal al llarg de diversos ordres de magnitud. No obstant això, fins i tot quan es detecten protons (que són els ions amb la màxima sensibilitat), els LODs són de l'ordre de 10^{-6} M, que no sempre és prou baix per a les exigències de les anàlisis de traces. Per això, molts mètodes d'IC contemplen una etapa inicial de preconcentració de la mostra. Un altre problema del detector de conductivitat és que no funciona correctament amb gradients, ja que, en augmentar la concentració del ió desplaçant, també augmenta la conductivitat de la fase mòbil, de manera que es produeix deriva en el detector. No obstant això, la tècnica coneguda com a "supressió iònica" millora en gran mesura les prestacions de la detecció conductimètrica.

4. La supressió iònica

Com s'ha indicat, les fases mòbils utilitzades en IC són dissolucions aquoses de diversos electrolits, com perclorat sòdic o carbonat sòdic per eluir anions, i clorur potàssic o àcid clorhídric per eluir cations. Quan s'elueix, per exemple, amb perclorat sòdic, la fase mòbil conté necessàriament el ió desplaçant, el perclorat, i el seu contraió, en aquest cas el ió sodi. Per aquesta raó, la conductivitat de la fase mòbil és sempre molt alta. El soroll de fons del detector, constituït per fluctuacions de baixa freqüència i oscil·lacions d'alta freqüència, és també alt. Aquest soroll de fons elevat és la causa que no es puguin assolir els LODs requerits en anàlisi de traces, la qual cosa limita molt el camp d'aplicació de la IC amb detecció directa de la conductivitat de l'eluat. La solució és aplicar la tècnica coneguda com a "supressió iònica", que elimina la conductivitat de l'eluat, al mateix temps que exalta la conductivitat deguda als analits.

El **supressor iònic** és una columna auxiliar que s'intercala entre la sortida de la columna analítica i el detector conductimètric (Fig 3). Quan la columna analítica és un bescanviador d'anions (SAX o

WAX), s'utilitza com a columna supressora un bescanviador catiònic fort (SCX) carregat amb protons. En canvi, quan la columna analítica és un bescanviador de cations (SCX o WCX), la columna supressora és un bescanviador aniònic fort (SAX) carregat amb oxhidrils

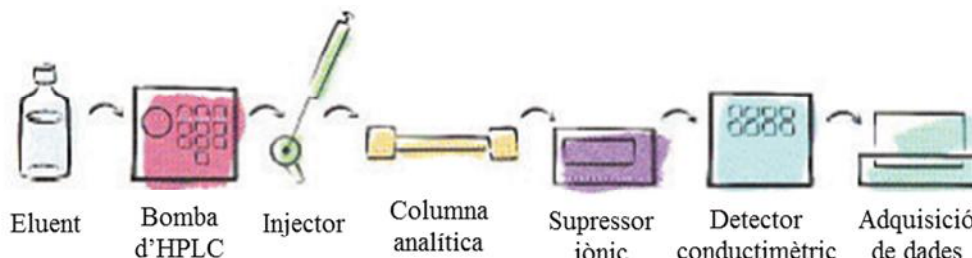


Fig.3. Esquema de cromatògraf iònic

Separació d'anions amb supressió iònica. En cromatografia de **supressió aniònica** se separen anions, de manera que la columna analítica és un bescanviador d'anions (SAX o WAX) que s'utilitza sempre en la forma carbonat (carregada amb aquest ió; veure figura). A la sortida de la columna analítica s'afegeix en sèrie una altra columna "supressora d'anions", la funció de la qual s'explica més avall. A més, les dues columnes en sèrie s'elueixen sempre amb una dissolució de carbonat sòdic, Na_2CO_3 . Per descomptat, la tècnica no és adequada per detectar carbonat i bicarbonat.

Per il·lustrar el funcionament de la separació i de la supressió aniònica, suposem per exemple que una mostra conté KNO_3 i CaSO_4 (Fig. 4). A la columna analítica, carregada amb carbonat, els ions nitrat i sulfat són bescanviats per carbonat i resulten retinguts. Els cations (K^+ y Ca^{2+}) no són retinguts, i travessen el sistema en el temps mort. Després d'un temps, elueixen els anions acompanyats de Na^+ com a contraió, és a dir, elueixen com NaNO_3 i Na_2SO_4 . Com que el sulfat té dues càrregues, la seua retenció és més gran, i elueix després que el nitrat. No obstant això, la detecció d'aquests dos anions per la seva conductivitat elèctrica no és fàcil, perquè l'eluent té una gran concentració de Na_2CO_3 . L'elevada conductivitat emmascara el xicotet augment de conductivitat degut a la presència dels analits.

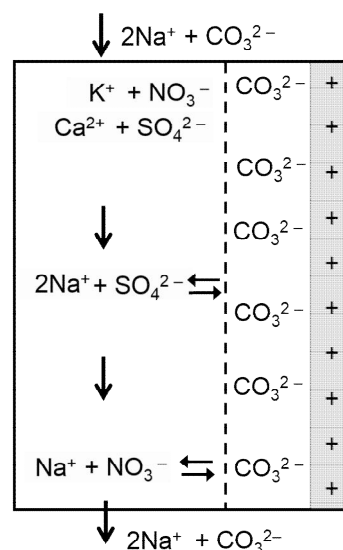


Fig. 4. Separació d'anions en la columna analítica

Per solucionar aquest problema, l'eluat es fa passar per la **columna supressora d'anions**, que s'intercala entre la columna analítica i la cel·la del detector conductimètric. La columna supressora conté un bescanviador catiònic fort (SCX) carregat amb protons. En aquesta columna tots **els cations són bescanviats per protons**.

Quan passa pel supressor el NaNO_3 procedent de la columna de separació, el Na^+ és substituït per H^+ , donant lloc a una dissolució de HNO_3 , que té una conductivitat prou més alta que la del NaNO_3 (Fig. 5). Igualment, quan elueix el sulfat sòdic, la columna supressora el converteix en àcid sulfúric, que té una conductivitat molt elevada. Per contra, quan només passa el Na_2CO_3 de l'eluent, el ió sodi també és bescanviat per protons, cosa que produeix CO_2 i H_2O , i per tant, en absència d'anions diferents de carbonat o bicarbonat, la fase mòbil té una conductivitat elèctrica molt baixa.

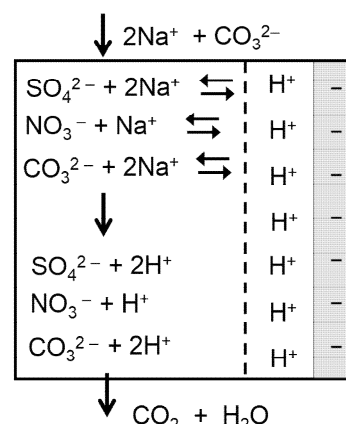


Fig. 5. Funció de la columna supressora

Ja que la fase mòbil és una dissolució de carbonat, la columna analítica es manté sempre, i per si sola, carregada amb ió carbonat. En canvi, la columna supressora perd contínuament la seua càrrega de protons per la qual cosa és aconsellable regenerar-la després de cada cromatograma. Per regenerar la columna supressora s'hi fa passar àcid sulfúric diluït. Per a això, el millor és disposar d'un sistema automàtic amb tres columnes supressores iguals. Per a cada cromatograma s'usa una columna supressora recentment regenerada. Mentre s'obté el cromatograma, una de les altres dues columnes supressores s'està rentant amb aigua per eliminar el carbonat, i la tercera columna s'està regenerant (carregant amb protons), és a dir, hi està passant una dissolució diluïda d'àcid sulfúric.

En **cromatografia de supressió catiònica** (per separació de cations) s'utilitza un sistema similar, si bé, a l'inrevés que en supressió aniónica, és a dir, la columna supressora és un bescanviador d'anions i la fase mòbil és una dissolució de HCl.

A la fotografia adjunta s'observa l'interior d'un cromatògraf iònic (Fig. 6). A l'esquerra el mòdul de bombes, al centre la vàlvula d'injecció de 6 vies, a l'esquerra (de color blanc) la vàlvula que controla l'operació de les tres columnes supressores (vàlvula selectora), les columnes supressores (xicotetes i en posició vertical), i més a la dreta la columna analítica (més gran i també en posició vertical). A la fotografia de sota, es mostra en detall la vàlvula selectora.



Fig. 6. Cromatògraf iònic i detall del compartiment amb les tres columnes supressores

Avantatges de la supressió iònica. Els avantatges derivats de la supressió iònica són tres:

i) Millor sensibilitat: en una separació d'anions, el que aplega al detector conductimètric són sempre àcids forts. El senyal és el resultat de la contribució de l'anió i del protó a la conductivitat, de manera que la sensibilitat de qualsevol ió queda igualada a la del protó, i la de qualsevol anió queda igualada a la de l'oxhidril. Els LODs es redueixen en la mateixa mesura, quedant igualats als del protó i l'oxhidril, respectivament.

ii) Reducció gairebé a zero de la conductivitat de fons de l'eluat, de manera que es redueix molt el soroll de fons (a causa de la reducció de les fluctuacions i del soroll d'alta freqüència). D'aquesta manera, es milloren també en gran mesura els LODs. Ambdues millores dels LODs fan possible la utilització de la IC amb detecció conductimètrica en anàlisi de traces.

iii) Compatibilitat de la detecció conductimètrica amb gradients d'elució: com a conseqüència del fet que la composició de l'eluent després de la supressió siga constant i independent de la concentració del tampó.

5. La detecció espectrofotomètrica indirecta

En detecció espectrofotomètrica indirecta s'utilitza un detector espectrofotomètric per detectar ions, tot i que aquests no absorbeixin a la regió UV-vis. Per aconseguir "visualitzar" els ions, s'afegeix a l'eluent un compost absorbent que actua com a **reactiu revelador** o

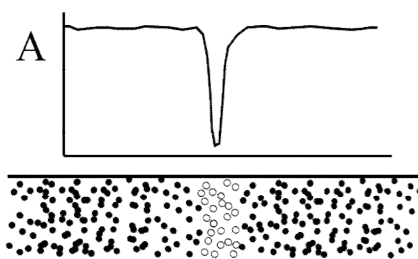


Fig. 7. Detecció fotomètrica indirecta

visualitzador. Per anions es pot utilitzar com a revelador benzoat o cromat, i per cations un catió acolorit, com Cu^{2+} . Es treballa a la longitud d'ona d'absorció del visualitzador, de manera que la fase mòbil absorbeixca la radiació incident. S'obté un eluat amb una absorbància alta i constant.

Suposem que s'injecta una mostra els components de la qual no absorbeixen a la longitud d'ona del visualitzador. El "tros de flux" ocupat per la mostra no absorbeix a la longitud d'ona del visualitzador (Fig. 7). Durant el procés de separació cromatogràfica la mostra es fracciona en els seus components segons que aquests resultin més o menys retinguts. En la mesura que el visualitzador encara no s'ha barrejat amb les fraccions que procedeixen de la mostra, eixes fraccions, o "trossos de flux" ocupats pels components de la mostra, no absorbeixen. És així perquè en la secció de flux on hi ha el Na^+ o el Ca^{2+} no hi ha el visualitzador catiónic (o bé, hi ha un defecte del mateix), ja que el balanç elèctric de la dissolució ha de mantenir-se a zero. Anàlogament, on hi ha sulfat o clorur procedents de la mostra no hi ha el corresponent visualitzador aniònic (per exemple, cromat).—

D'aquesta manera, l'absorbància *disminueix* quan elueixen els analits. El cromatograma té l'aspecte d'una sèrie de pics cap avall o "negatius", si bé se sol invertir l'eix d'absorbàncies per obtenir la típica representació amb pics positius. Aquesta tècnica permet utilitzar un detector UV-vis ordinari per detectar universalment tot tipus de ions no absorbents, amb l'avantatge que la sensibilitat és gairebé la mateixa per a tots ells. Així, el sulfat, que té dues càrregues, dóna una sensibilitat aproximadament el doble que el clorur, que en té una. És així perquè un ió sulfat desplaça un ió cromat, però calen dos ions clorurs per desplaçar un ió cromat.

El cromatograma de la Fig. 8 correspon a una sèrie d'anions inorgànics amb detecció espectrofotomètrica indirecta. La mostra també conté dos cations que es detecten directament (com complexos amb EDTA). La Fig. 9 mostra un típic cromatograma d'anions amb detecció conductimètrica.

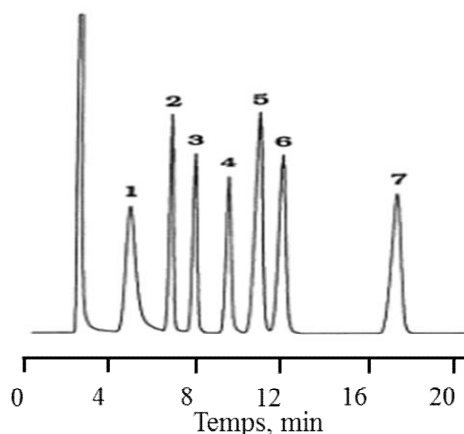


Fig. 8. Cromatograma amb detecció fotomètrica indirecta per als anions i directa per als cations. El revelador dels anions és àcid trimel·lític. Els cations es detecten perquè han format els seus complexos amb EDTA, que absorbeixen. De l'1 al 7: bicarbonat, clorur, nitrit, nitrat, calci, magnesi i sulfat (K. Ohta i K. Tanaka, Anal. Chim. Acta 1998).

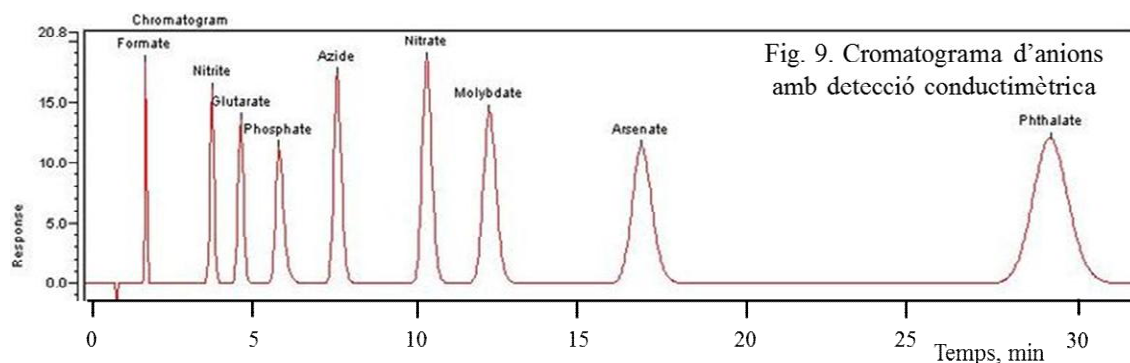


Fig. 9. Cromatograma d'anions amb detecció conductimètrica

COL·LECCIÓ DE PROBLEMES DE TÈCNIQUES DE SEPARACIÓ

1. INTRODUCCIÓ A LES TÈCNIQUES DE SEPARACIÓ

P1.1. Una dissolució aquosa conté 10 g del compost A en 500 mL. La constant de distribució de A entre cloroform i aigua és $\log K_D = 4.6$. ¿Quin volum mínim de cloroform s'ha d'utilitzar perquè l'extracció siga quantitativa? (una operació és quantitativa quan es recupera el 99.9% del producte).

Solució: $K_D = 10^{4.6} = [(10 - 0.010) \text{ g} / 0.010 \text{ g}] (500 \text{ mL} / v_o)$; $v_o = 12.5 \text{ mL}$

P1.2. Mitjançant extracció líquid-líquid es vol reduir la concentració del compost A d'una dissolució aquosa fins que només quedi el 0.1% de la seva concentració inicial (és a dir, perquè l'extracció siga quantitativa). Respondre les qüestions següents:

a) Si inicialment hi ha 1 g / L, ¿quina concentració final ha de quedar?

b) Calcular el factor de capacitat necessari per assolir una extracció quantitativa en una sola etapa.

c) Si $\log K_D = 4.3$, ¿quin volum de fase orgànica serà necessari per extreure 1 L de dissolució aquosa?

Solució: a) $0.001 \times 1 \text{ g} / \text{L} = 1 \text{ mg} / \text{L}$

b) $R = k / (k + 1) = 0.999$; $k = 999$

c) $k = 10^{4.3} V_o / 1000 = 999$; $V_o = 50 \text{ mL}$

P1.3. Es pren una mostra de 100 mL d'una dissolució aquosa de l'insecticida teflubenzuron (TFB), i s'extrau amb cloroform. Sabent que $\log K_D = 2.8$, calcular:

a) El factor de capacitat per extraccions amb 10 mL de cloroform.

b) El rendiment d'una extracció.

c) El volum de dissolvent necessari perquè l'extracció sigui quantitativa en una sola etapa.

d) El rendiment resultant de realitzar dues extraccions successives amb 10 mL cada vegada.

Solució: a) $k = 10^{2.8} (10 / 100) = 63.1$

b) $R = k / (k + 1) = 98.4\%$

c) $R = k / (k + 1) = 0.999$; $k = 999 = 10^{2.8} (V_o / 100)$; $V_o = 158 \text{ mL}$

d) $(1 - R_2)^2 = [1 / (k + 1)]^2 = (1 / 64.1)^2 = 2.43 \times 10^{-4}$; $R_2 = 1 - 2.43 \times 10^{-4} = 99.98\%$

P1.4. Es disposa de 100 mL d'una dissolució aquosa de Cu^{2+} de 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. S'afegeix un lligand L i s'extreu el complex amb 20 mL d'èter diisopropílic. Per absorció atòmica s'estableix la concentració residual de Cu^{2+} en la fase aquosa, que resulta ser de 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Calcular el rendiment de l'extracció i la constant de distribució.

Solució: a) $m_o = 5 \mu\text{g} / \text{mL} \times 100 \text{ mL} - 0.1 \mu\text{g} / \text{mL} \times 100 \text{ mL} = 490 \mu\text{g}$

$R = 490 / 500 = 98.0\%$

b) $R = 0.98 = K_D (20 / 100) / [K_D (20 / 100) + 1]$; $\log K_D = 2.4$

P1.5. Un gram del compost A està dissolt en 50 mL d'aigua, quin volum de cloroform es necessita per fer una extracció quantitativa si $\log K_D = 3.7$?

Solució: a) $R = 0.999 = (10^{3.7} V_o / 50) / [(10^{3.7} V_o / 50) + 1]$; $V_o = 9.97 \text{ mL}$

P1.6. L'extracció de 100 mL de dissolució aquosa del compost A amb diisopropilèter es realitza amb un valor de $K_D = 80$. Calcular el rendiment per als dos casos següents i comentar els resultats:

a) Quan s'extreu un sol cop amb 10 mL.

b) Quan s'extreu en dues vegades, consumint 5 mL de dissolvent cada vegada.

Solució: a) $R = (80 \times 10 / 100) / [(80 \times 10 / 100) + 1] = 88.9\%$

b) $(1 - R)^2 = (1 / [(80 \times 5 / 100) + 1])^2 = 0.04$; $1 - (1 - R)^2 = 96 \%$.

P1.7. Es vol reduir el contingut en cafeïna d'una sèrie d'infusions de te, des de la seva concentració inicial fins a menys del 1% de la mateixa. Es parteix d'ampolletes que contenen 150 mL, i extreu amb porcions de 10 mL d'un dissolvent tal que $\log K_D = 2.4$. Calcular:

a) El nombre d'extraccions necessàries.

b) Si es realitzen les extraccions predites en l'apartat anterior, ¿quin serà el rendiment?

Solució: a) $R_n = 0.99$; $(1-R)^n = 0.01 = (1 / [(10^{2.4} \times 10 / 150) + 1])^n$

$n \log 5.64 \times 10^{-2} = -2$; $n = 1.6$, per tant, són necessàries 2 extraccions

b) $R = (10^{2.4} \times 10 / 150) / [(10^{2.4} \times 10 / 150) + 1] = 0.94365$

$R_2 = 1 - (1-R)^2 = 1 - (5.64 \times 10^{-2})^2 = 99.7\%$

P1.8. Es té 1 L d'una dissolució que conté sacarina. Respondre:

a) Quantes extraccions líquid-líquid es necessiten per assegurar la seva extracció quantitativa si s'utilitzen porcions successives de 20 mL d'un dissolvent tal que $\log K = 4.0$?

b) Si es realitzen les extraccions predites en l'apartat anterior, ¿quin serà el rendiment?

Solució: a) $(1 - R)^n = 1 - 0.999 = 0.001 = (1 / [(10^4 \times 20 / 1000) + 1])^n$

$n \log (1 / 201) = \log 0.001$; $n = 1.3$, per tant, són necessàries 2 extraccions

b) $(1 / 201)^2 = (1-R)^2$; $R_2 = 1 - (1-R)^2 = 99.998\%$

P1.9. Utilitzant 20 mL d'acetat d'etil s'extreuen 500 mL d'una dissolució aquosa que conté 2 mg / ml de bromur de tetraalquilamoni. La constant de distribució és $\log K_D = 2.1$. En evaporar l'extracte, ¿quin pes de sal s'espera recollir?

Solució: a) $R = (10^{2.1} \times 20 / 500) / [(10^{2.1} \times 20 / 500) + 1] = 0.8343$; $500 \times 2 \text{ mg} \times 0.8343 = 83.43 \text{ mg}$

P1.10. Un solut A es troba dissolt en 50 mL d'aigua i se'n pretén extreure el 99.8% amb cloroform ($K_D = 21.2$). Calcular el nombre d'extraccions necessàries i el volum total de dissolvent consumit en cada un dels següents casos:

a) Extracció múltiple manual, amb porcions de 10 mL de cloroform cada vegada.

b) Extracció múltiple automàtica, utilitzant una gota de 0.01 mL de cloroform cada vegada.

Solució: a) $(1 / [(21.2 \times 10 / 50) + 1])^n = 0.19084^n$

$n = \log 0.002 / \log 0.19084 = 3.75$, per tant, són necessàries 4 extraccions i 40 mL

b) $0.002 = (1 / [(21.2 \times 0.01 / 50) + 1])^n = 0.995778^n$

$n = \log 0.002 / \log 0.995778 = 1469$; $V_{\text{total}} = 1469 \times 0.01 = 15 \text{ mL}$

2. TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA

P2.1. Una columna de HPLC té $L = 10.3 \text{ cm}$ i un diàmetre intern de 4.61 mm . La fase estacionària ocupa el 61 % del volum intern. Calcular:

a) La velocitat lineal del flux quan es treballa a un cabal de 1.13 mL/min .

b) El temps i el volum de fase mòbil que necessita un solut no retingut per travessar el sistema.

c) El temps i el volum de retenció per a un solut que té un factor de capacitat de 10.0.

Respostes: $\bar{u} = 17.36 \text{ cm/min}$; $t_M = 0.593 \text{ min}$; $V_M = 0.670 \text{ mL}$; $t_R = 6.53 \text{ min}$; $V_R = 7.38 \text{ mL}$.

P2.2. Una columna tubular oberta per a GC de 30.1 m de longitud i 0.530 mm de diàmetre intern està recoberta per una pel·lícula de fase estacionària de $3.1 \mu\text{m}$ de gruix. En les condicions de treball un solut no retingut la recorre en 2.16 min , i un altre solut mostra un temps de retenció de 17.32 min . Calcular: a) \bar{u} i F ; b) el factor de capacitat del solut i la fracció de temps que roman en la fase estacionària; c) la constant de distribució del solut.

Respostes: a) 13.9 m/min i 3.08 mL/min ; b) $k = 7.02$ i $p = 87.5\%$; c) $\log K_D = 2.48$.

P2.3. S'ha desenvolupat un mètode de HPLC capaç de purificar fins a 4 mg d'un compost A sense que el cromatograma mostre sobrecàrrega apreciable. La columna té 25 cm de longitud i un diàmetre intern de 0.85 cm. Es vol escalar el mètode per a fins preparatius. Referent a això calcular:

- Les dimensions que ha de tenir una columna per a purificar fins a 100 mg de A en cada injecció.
- Si el cabal de la columna menuda és 0.22 mL/min, el cabal que s'haurà d'utilitzar en la gran.
- Si la fase mòbil ocupa el 35 % del volum intern de les dues columnes, \bar{u} en cada cas.

Respostes: a) 4.25 cm; b) 5.5 mL/min; c) 1.11 cm/min.

P2.4. Una columna de HPLC de $L = 25$ cm té un volum mort de 1.37 mL, i la fase estacionària ocupa 0.164 mL. A la vista de les dades obtingudes pels quatre soluts de prova de la taula, i sabent que un solut no retingut apareix als 3.1 min, calcular:

Solut	t_R , min	4σ , min
A	5.4	0.41
B	13.3	1.07
C	14.1	1.16
D	21.6	1.72

- N , H , k , K_D , R_{BC} i α_{BC} .

b) La longitud de columna necessària per assolir $R_{BC} = 1$ sense modificar les condicions de treball.

Respostes: Per a A: $N = 2800$; $H = 90 \mu\text{m}$; $k = 0.74$; $K_D = 6.2$. Altres respostes: $R_{BC} = 0.72$; $\alpha_{BC} = 1.08$; $L = 48.7$ cm.

P2.5. Una columna de HPLC de $L = 22$ cm té un volum mort de 1.26 mL, i la fase estacionària ocupa 0.148 mL. S'està treballant a un cabal de 0.30 mL/min. Un solut no retingut elueix als 4.2 min. A la vista de les dades de la taula, calcular N i H (valors mitjans), k (per A, B i C), K_D (per A, B i C), R_{BC} i α_{BC} .

Solut	t_R , min	4σ , min
A	6.4	0.45
B	14.4	1.07
C	15.4	1.16
D	20.7	1.45

Respostes: $N = 3060$; $H = 74 \mu\text{m}$; $k = 0.52$ (A); $k = 2.43$ (B); $k = 2.67$ (C); $K_D = 4.43$ (A); $K_D = 20.7$ (B); $K_D = 22.7$ (C); $R_{BC} = 0.90$; $\alpha_{BC} = 1.1$.

P2.6. Els pesticides Aldrin (A) i Dieldrin (D) se separen mitjançant GC. La columna és de 15 m, i en les condicions de treball funciona amb $N = 20000$ plats teòrics. El cabal mitjà o corregit és de 15 mL/min. Injectant aire s'observa que el temps mort és 30 s. Els temps de retenció dels soluts A i D són 11.4 i 11.6 min, respectivament. Calcular:

- L'amplària que es pot esperar per als dos pics.
- H (valor mitjà), el nombre mitjà de plats per metre de columna i la resolució entre A i D.

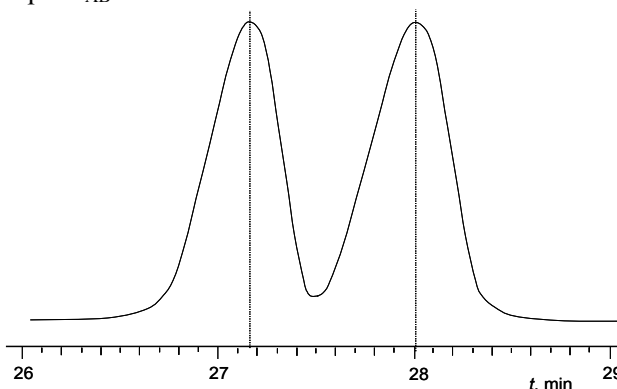
Respostes: a) 0.322 i 0.328 min; b) $H = 0.75$ mm/plat; $1/H = 1333$ plats/m; $R = 0.62$.

P2.7. Per a una columna de GC que treballa en $N = 40000$ plats teòrics, representar gràficament com varia la resolució entre dos pics, R , en els supòsits que segueixen, i comentar els resultats:

- Mantenint constant $\alpha_{AB} = 1.2$ per a aquests dos soluts, es duen a terme injeccions successives, reduint la temperatura de la columna cada vegada, de manera que va augmentant k .
- Repetir el gràfic anterior per a dos soluts tals que $\alpha_{AB} = 1.02$.
- Per als dos casos anteriors, i sent $k = 3$, quan es modifica progressivament la fase estacionària de manera que α_{AB} augmenta.

P2.8. Utilitzar el gràfic adjunt (fragment de cromatograma) per a obtenir les següents dades:

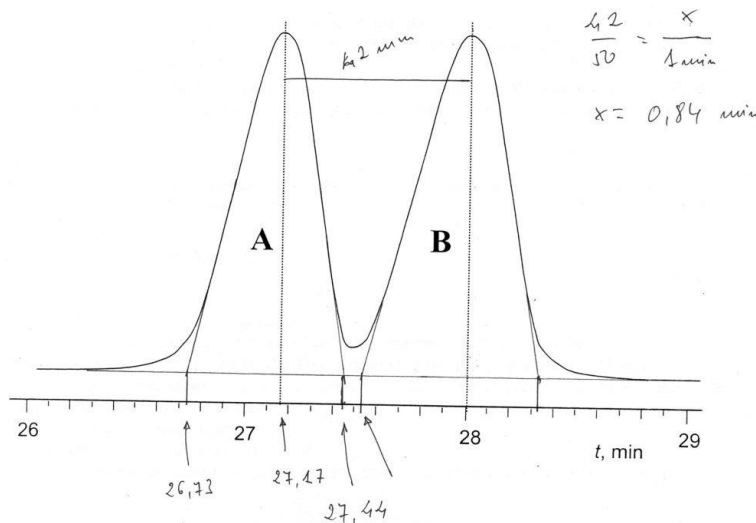
- Establir la posició i l'amplària del pic A en minuts (amb dues xifres decimals), i a partir d'aquests valors, estimar l'eficàcia.
- Suposant que l'amplària dels pics A i B és la mateixa, estimar la resolució.



Respostes:

a) Posició de A = 27.17 min, límits de la base 26.73 i 27.44 min; la diferència són 0.71 min (l'amplària); $N = 16$ $(27.17/0.71)^2 = 23430$ plats teòrics.

b) La diferència són 0.83 – 0.84 min, per tant: $R = 0.83/0.71 = 1.17$.



P2.9. Per a columnes reblertes i per GC, una forma expandida de l'equació de Van Deemter és:

$$H = 2\lambda d + \frac{2\gamma D_M}{\bar{u}} + \frac{d_p}{96D_M} \times \frac{k^2}{(1+k)^2} \bar{u} + \frac{2d_f^2}{3D_S} \times \frac{k}{(1+k)^2} \bar{u}$$

on λ és el factor d'empaquetament i val aproximadament 0.5; d és el diàmetre intern de la columna; γ és el factor de tortuositat i val aproximadament 0.7; D_M i D_S són les difusibilitats del solut en les fases mòbil i estacionària; d_p és el diàmetre de partícula i d_f és el gruix de la pel·lícula de fase estacionària. Per butà com a solut i utilitzant He a 25 °C i a 1 bar com a gas portador, es té: $D_M = 0.342 \text{ cm}^2/\text{s}$. En canvi, si s'utilitza N_2 en les mateixes condicions: $D_M = 0.0960 \text{ cm}^2/\text{s}$. Respondre raonadament a les qüestions següents:

- Comentar les variables i els termes de l'equació, relacionant-les amb els de l'equació de velocitat simplificada, i raonant per què estan en el numerador o denominador.
- Comentar qualitativament com es veuen afectats H , u_{opt} i H_{min} en substituir He per N_2 .

P2.10. Una forma expandida de l'equació de Van Deemter per a columnes capil·lars de GC és:

$$H = \frac{2D_M}{\bar{u}} + \frac{r^2}{24D_M} \times \frac{1+6k+11k^2}{(1+k)^2} \bar{u} + \frac{d_f^2}{6D_S} \times \frac{k}{(1+k)^2} \bar{u}$$

on r es el radi intern del capil·lar i d_f és el gruix de la pel·lícula de fase estacionària dipositada sobre la seva paret interna. Repetir el problema anterior pel cas d'una columna capil·lar. Comparar també aquesta equació amb l'anterior.

P2.11. En un cromatògraf es realitzen 12 injeccions repetides d'una mateixa mostra. L'àrea mitjana de la sèrie de 12 pics de l'insecticida paratió es 13408, i la seua desviació estàndard ± 255 . A continuació s'injecta una dissolució patró de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de paratió i s'obté un pic amb una àrea de 75992. Calcular la concentració en la mostra i el LOD del mètode.

Respostes: 2.65 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$; LOD = 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

P2.12. En la determinació del problema anterior, es té la sospita que la sensibilitat del detector varia amb el temps, per la qual cosa es decideix utilitzar metil-paratió com a patró intern. El metil-paratió s'afegeix a les dissolucions de tots dos, la mostra i el patró de paratió, en una concentració de 5.00 $\mu\text{g}/$

mL^{-1} . En injectar de nou la mostra, les àrees dels pics del paratió i del metil-paratió són 14163 i 18052, respectivament. Quan s'injecta el patró de paratió de $15 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ s'obtenen àrees de 75043 i 18556, per al paratió i el metil-paratió, respectivament. Calculeu la concentració de paratió a la mostra quan no s'aplica i quan s'aplica la correcció del patró intern.

Respostes: $2.83 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ i $2.91 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

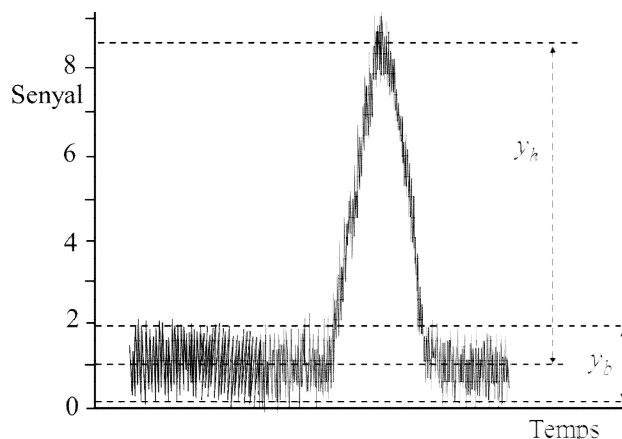
P2.13. Per al pic de la figura adjunta:

a) Aplicar el procediment "5s" per a establir el valor de la desviació estàndard del soroll de fons, s , en mil·liunitats d'absorbància (mAU).

b) Establir la relació senyal-soroll en la posició del màxim del pic.

c) Utilitzant les dades anteriors i un punt de calibrat fet a banda (la injecció d'un patró amb 10 mg/L dona un senyal de 0.5 mV d'altura), calcular el LOD (jamb 2 xifres significatives i acompanyat de les seves unitats!). Aplicar el criteri 3s (IUPAC, 1978).

Respostes: a) $5s = 2 \text{ mAU}$, on $s = 2/5 = \pm 0.4 \text{ mAU}$; b) des de la mitjana de les oscil·lacions de la línia base i del pic, $h = 8.5 - 1 = 7.5 \text{ mAU}$; per tant, $S/N = 7.5/0.4 = 18.8$; c) el pendent de la corba de calibrat és $b = 500 \text{ mAU} / 10 \text{ mg/L}$, on $\text{LOD} = 3s/b = 3 \times 0.4 / (500/10) = 0.024 \text{ mg/L}$, o bé, 24 micrograms/L .



3. CROMATOGRAFIA DE GASOS

P3.1. Un compost elueix amb un temps de retenció net de 15 min a $373 \text{ }^\circ\text{K}$, i de 20.0 min a $363 \text{ }^\circ\text{K}$. Predir el temps de retenció net a $353 \text{ }^\circ\text{K}$.

Resposta: 27.1 min .

P3.2. Una columna capil·lar de GC de $L = 45.7 \text{ m}$ i 2 mm de diàmetre intern opera a un cabal de $46.6 \text{ cm}^3/\text{min}$. En cromatografiar esters metílics d'àcids grassos s'observa una eficàcia mitjana de $N = 47480$. Calcular:

a) La velocitat lineal mitjana.

b) Per a un solut A amb $k = 4.71$, el temps d'anàlisi.

c) La resolució i el factor de selectivitat per a dos soluts B i C que elueixen amb $k = 0.12$ i 0.18 .

d) La longitud de columna que seria suficient perquè dits soluts eluïsquen amb $R = 1.5$.

e) Amb una columna de dita longitud ¿quin seria el temps d'anàlisi de A?

Respostes: $u = 24.7 \text{ cm/s}$; $t_R = 4.40 \text{ min}$; 0.40 ; $R = 2.4$; $\alpha_{AB} = 1.5$; $L = 18.3 \text{ m}$; $t_R = 1.76 \text{ min}$.

P3.3. Amb una columna capil·lar de 15 m , i en condicions isotermes, s'han obtingut els resultats de la taula. Calcular:

a) N , H i el nombre de plats per metre de columna.

b) Predir l'amplària del pic del benzè.

c) La resolució del parell ciclohexà/ciclopentè, i el factor de selectivitat de la columna respecte a aquest parell.

d) El nombre de plats necessaris perquè aquest parell de soluts es resolga amb $R = 1.0$.

e) Comentar què es pot fer per millorar R .

Respostes: $N = 20060 \text{ plats}$; $H = 750 \mu\text{m}/\text{plat}$; $N/L = 1333 \text{ plats/m}$; $R_{AB} = 0.40$; $\alpha_{AB} = 1.015$; $N =$

Solut	t_R , min	4σ , min
Aire	2.50	-
A. Ciclohexà	10.70	0.30
B. Ciclopentè	10.82	-
C. Ciclohexè	11.60	0.33
D. Benzè	14.00	-

130590 plats. Per millorar R es pot augmentar l'eficàcia global (allargant la columna), millorar l'eficàcia per unitat de longitud (canviar la columna per una altra de menor diàmetre, o amb una fase estacionària de menor espessor), o millorar el factor de selectivitat (canviant la columna per una altra amb una fase estacionària més selectiva).

P3.4 (Problema opcional, per si s'ha explicat el factor de asimetria). Un solut que apareix als 15.0 min mostra una cua amb forta asimetria. Els coeficients de Foley-Dorsey són 0.25 i 0.05 min. Calcular:

- N i el factor de asimetria del pic.
- N per a un pic que eluísca amb la mateixa amplària total, 0.30 min, però que fóra simètric.

Respostes: $N = 16680$; $\delta = 5$; $N = 40000$.

P3.5. En el desenvolupament d'un mètode de GC es planteja substituir la columna capil·lar de 0.1 mm de diàmetre intern per un altra de 0.5 mm. Discutir qualitativament i de forma raonada, fent referència als termes de l'equació de Van Deemter i a altres circumstàncies:

- Si es guanyarà o es perdrà eficàcia.
- Si la retenció serà major o menor, i com es vorà afectat el temps d'anàlisi.
- Si es podrà carregar més mostra, i si es necessitarà un detector amb LODs menors o no.

Respostes:

- Eficàcia: En ser la columna més ampla, la transf. de massa és més lenta, i l'eficàcia és menor.
- Retenció: El quocient volum de fase estac. / volum de fase mòbil és menor, per la qual cosa la retenció disminueix. Amb menor retenció, els temps són menors.
- Detecció: El volum de fase estacionària és major, per la qual cosa la capacitat de càrrega augmenta i el LOD del mètode és menor. Per tant, un detector que no arribe a LODs molt baixos pot servir.

P3.6. Repetir el problema anterior pel cas en què es plantege la substitució de la columna capil·lar amb fase estacionària de 0.2 μm per una altra de 0.6 μm de gruix. Discutir qualitativament i de forma raonada els mateixos tres punts que en el problema anterior.

Respostes:

- Eficàcia: Amb una fase estac. més gruixuda, la transf. de massa és més lenta i l'eficàcia és menor.
- Retenció: Per la mateixa raó, la retenció augmenta. Amb major retenció, els temps són majors.
- Detecció: El volum de fase estacionària és major, per la qual cosa la capacitat de càrrega augmenta i el LOD del mètode es menor. Per tant, un detector que no arribe a LODs molt baixos pot servir.

P3.7. Es té una columna capil·lar de GC amb les següents característiques: $L = 30$ m, DI (diàmetre intern) = 200 micròmetres, d_f (gruix de fase estacionària) = 10 micròmetres. La columna s'està utilitzant per a separar dos pesticides amb estructures molt semblants, A i B, però encara no s'ha aconseguit suficient resolució. Respondre raonadament:

- Si es decideix canviar la columna, ¿quin valor ha de tenir L perquè la resolució augmente? ¿Major o menor que l'indicat? Comentar també si la resolució augmentarà molt o poc, i si a canvi d'una millor resolució no es tindran altres inconvenients.
- Repetir l'apartat "a" per al cas en què es decidisca utilitzar una columna de diferent valor de DI .
- Repetir l'apartat "a" per al cas en què es decidisca utilitzar una columna de diferent valor de d_f .
- Ja que es decideix triar una altra columna, ¿quines altres característiques de la mateixa es poden canviar perquè la resolució entre A i B augmente?

Respostes:

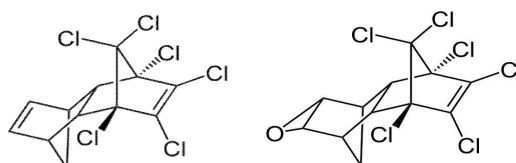
- Si augmenta L , l'eficàcia, N , augmentarà en la mateixa proporció, però perquè R es duplique es necessita quadruplicar N (passar de $L = 30$ a $L = 120$ metres). A canvi, el temps d'anàlisi serà quatre vegades major.
- Si augmenta el DI , hi haurà més retard en la transferència de massa, de manera que N disminuirà i R també. L'adequat seria reduir DI . A canvi la columna tindrà menys fase estacionària per unitat de

longitud, de manera que la seua capacitat de càrrega serà menor. El LOD del mètode serà també més alt. Caldrà fer ús d'un detector que aplegue a LODs prou baixos.

c) Es deuria disminuir d_f per a augmentar la velocitat de transferència de massa. L'eficàcia i la resolució augmentaran, però també es perdrà capacitat de càrrega. Amb fases estacionàries molt primes poden aparèixer cues d'adsorció.

d) Una fase estacionària més selectiva, que preferisca més un dels dos analits que l'altre. És a dir, una fase estacionària amb un valor més gran de α .

P3.8. Atenent als possibles mecanismes de retenció, discutir quins pesticides entre els següents seran més retinguts sobre una fase polar de PDMS amb un 35% de difenils: aldrin (esquerra), dieldrin (dreta, amb un grup epoxi en lloc d'un doble enllaç), o els seus corresponents metabolits en què el doble enllaç de la dreta s'ha transformat en un enllaç simple, i simultàniament un dels clors adjacents ha sigut substituït per una funció cetona (C=O).



Resposta: El dieldrin és més retingut perquè el grup epoxi és més polar que un doble enllaç. Els metabolits són més retinguts que els pesticides perquè una cetona és més polar que la suma del doble enllaç i l'àtom de clor.

P3.9. Es cromatografien esters metílics d'àcids grassos sobre dues columnes, sent B més polar que A. En ambdós casos es fa ús d'una rampa de temperatura. Els temps de retenció estan indicats a la taula. Es fa ús d'una abreviatura habitual, per exemple, C12:1 significa una cadena de 12 àtoms de carboni amb una insaturació (un doble enllaç). Fent ús d'un procediment gràfic:

- Identificar els dos pics desconeguts, P1 i P2.
- Predir el temps de retenció de C16:2 sobre A i B.

Solut	t_R , min (A)	t_R , min (B)
C12:0	16.2	13.1
C16:0	22.4	14.9
C12:1	16.0	13.7
C14:1	19.1	14.6
C14:2	18.9	15.2
P1?	15.8	14.3
P2?	22.2	15.5

Respostes: P1 = C12:2 i P2 = C16:1. Els temps de retenció de C16:2 han de ser 22.0 min sobre A i 16.1 min sobre B.

P3.10. Sobre una columna de PDMS amb 5% de difenils, el pic del timol apareix als 16.8 min. Per altra banda, quan es cromatografia una barreja d'hidrocarburs fent ús de la mateixa columna i la mateixa rampa de temperatura, el pic del C12 es troba a 15.0 min, i el del C13 a 17.0 min. Calcular l'índex de Kováts del timol.

Resposta: 1290.

P3.11. Es prepara una dissolució patró amb masses iguals de quatre hidrocarburs. S'injecta 1 μL d'aquesta dissolució (0.80 μg). Les àrees dels pics del patró i d'una mostra s'indiquen a la taula. Calcular el percentatge en pes dels quatre hidrocarburs de dues formes: a) utilitzant el calibrat amb patrons; b) aplicant el mètode de normalització d'àrees (comentar per què els resultats no són iguals).

Patrons	Àrea	Mostra
C9	106.9	32.6
C11	102.6	46.8
C14	80.0	73.8
C16	50.0	84.9

Respostes: a) 9.02 %, 13.49 %, 27.28 % i 50.21 %. b) 13.69 %, 19.66 %, 30.99 % i 35.66 %. El mètode de normalització no dona resultats exactes perquè les àrees dels pics no s'han dividit pels seus corresponents factors de resposta.

P3.12. Les àrees relatives dels pics obtinguts mitjançant cromatografia de gasos d'una mescla d'acetat de metil (AM), propionat de metil (PM) i n-butirat de metil (BM) van ser 18.4, 30.6 i 49.3, respectivament (unitats arbitràries). Aplicant el mètode de normalització d'àrees, calcular el percentatge de cada component. Dades: respecte a butirat de butil com a patró, els factors de resposta

del detector (sensibilitats) són: 0.65 (AM), 0.83 (PM) i 0.92 (BM), respectivament.

Resposta: R: AM = 23.84 %, PM = 31.04 i BM = 45.12%.

4. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS D'ALTA RESOLUCIÓ

P4.1. Una columna per a HPLC de 15 cm x 0.46 cm, i amb un farcit de partícules de 5 µm, s'està utilitzant amb una fase mòbil que té un 80% de ACN i que es bombeja a 1 mL/ min. S'obtenen 100 cromatogrames per setmana, cadascun dels quals suposa 24 min de funcionament.

a) Calcular la despesa de ACN per setmana.

b) Calcular dita despesa si se substitueix la columna per una altra d'equivalent d'1 mm de diàmetre intern.

c) Repetir el mateix càlcul per a una columna ultrarràpida (amb partícules de 1.7 µm) de 0.46 cm de diàmetre i de 5 cm de longitud, i que s'utilitzi també per obtenir 100 cromatogrames setmanals.

Respostes: a) 1920 mL; b) 90.5 mL; c) 640 mL.

P4.2. Se separen compostos aromàtics per HPLC amb una columna C18. L'eluent té MeOH i aigua. Raonar com es veurien afectats els temps de retenció si es passa d'un 70% de MeOH a:

a) 90% de MeOH; b) 60% ACN; c) 45% THF. Dades: triangle de selectivitat de Snyder.

Respostes: a) S'acurtaran per augment de la força eluent; b) ja que els compostos aromàtics són polaritzables, augmentaran per reduir-se la dipolaritat de la fase mòbil; c) s'acurtaran, ja que el THF és més dipolar.

P4.3. En utilitzar el triangle de desenvolupament de mètodes s'observa una resolució satisfactòria dels pics primer i segon amb una fase que té 50:50 MeOH/aigua (punt B). Utilitzant un nomograma es calcula la mescla isoeluotrópica THF/aigua (punt C). Aquesta fase resol bé els pics primer i segon, però no resol els pics tercer i quart. Per millorar la selectivitat, es prepara una fase de propietats intermèdies (punt E). Calcular la composició de les fases C i E. Dades: nomograma de mescles isoeluotrópiques.

Respostes: C = 30:70 THF/aigua; E = 25:15:60 MeOH/ THF/aigua.

P4.4. En el desenvolupament d'un mètode, en fer un gradient des de A = 5% fins a B = 95% de ACN en 30 min, el primer pic apareix als 11 min, i l'últim als 20 min. Calcular la composició que deuen tenir les fases A i B per reduir al mínim el temps d'anàlisi.

Resposta: A = 38% (millor començar en 35%), i B = 65% (millor finalitzar en 70%).

P4.5. Amb ajuda del triangle de Snyder, i sabent que s'estan utilitzant mescles isoeluotrópiques heptà-modificador (en NP-HPLC), comentar l'efecte que tindrà sobre el pic d'un solut àcid i polar la substitució de: a) cloroform per isopropanol; b) isopropanol per acetat d'etil.

Resposta: a) la fase mòbil serà menys àcida (més alcalina), fet que tendeix a avançar el solut àcid, i més dipolar, fet que tendeix també a avançar-lo, de manera que la retenció d'aquest solut serà menor; b) la fase mòbil serà més àcida, fet que tendeix a retardar el solut àcid, i menys dipolar, cosa que també tendeix a retardar el solut, de manera que el temps de retenció serà major.

P4.6. Mitjançant HPLC es determina la concentració d'alguns pesticides en vegetals. Es pesen 5.0000 g de mostra, es dissolen i s'afora a 10 mL. Es pipetegen 2 mL d'aquesta dissolució, s'afegeix 1 mL d'una dissolució de 500 ppm de patró intern i s'afora a 10 mL. Per a construir la corba de calibratge, en aforats de 10 mL s'introdueixen volums creixents, entre 0.25 i 1.50 mL, d'una dissolució patró de 1000 mg/ L de pesticida i 1 mL d'una dissolució de 500 mg/ L del mateix patró intern i s'afora. D'acord amb els resultats de la taula, expressar la concentració de pesticides en el vegetal en mg/ kg i en percentatge. Acompanyar la resposta amb la gràfica de calibratge sense i amb aplicació del mètode del patró intern. Nota: El t_R per al pesticida és de l'ordre de 3.2 min i el del patró intern de

l'ordre de 5.4 min.

Volum de patró, mL	Àrea pesticida	Àrea P.I.	Mostra	Àrea pesticida	Àrea P.I.
0.25	9.501	19.002	M1	30.002	20.001
0.50	21.003	21.002	M2	28.501	19.004
0.75	28.502	19.001	M3	31.503	21.003
1.00	38.002	19.002	-	-	-
1.25	50.004	20.003	-	-	-
1.50	63.005	21.004	-	-	-

Resposta: Concentració del pesticida: $(749.97 \pm 0.07) \text{ mg}_{\text{pesticida}} \text{ kg}^{-1}_{\text{vegetal}}$, i també $(0.074997 \pm 0.000007)\%$.

P4.7. Mitjançant HPLC amb detecció UV a $\lambda = 259 \text{ nm}$ és possible la determinació de cefalexina en mostres d'orina. Fent ús de les dades de les taules, calcular:

a) Les equacions de les rectes de calibratge així com els valors de s_a i de s_b (desviacions estàndard de l'ordenada en origen i del pendent) quan s'utilitza l'àrea de la cefalexina com senyal analític sense i amb aplicació de correcció pel mètode del patró intern.

$C_{\text{cefalexina}} \text{ (mg/L)}$	5	10	15	20	25
Àrea _{cefalexina} $t_R = 4.7 \text{ min}$	23.85	46.84	69.86	92.83	115.89
Àrea _{patró intern} $t_R = 5.5 \text{ min}$	65.46	64.85	65.07	64.66	65.21

b) La concentració de la cefalexina utilitzant els dos calibratges anteriors, sabent que s'injecten tres rèpliques d'una mateixa mostra d'orina i s'obtenen les següents àrees:

Nº	$t_R = 4.7 \text{ min}$	$t_R = 5.5 \text{ min}$
1ª rèplica	65.25	64.86
2ª rèplica	65.83	65.97
3ª rèplica	65.16	65.48

c) Sabent que la mostra d'orina conté 14 mg/L de cefalexina, l'error relatiu i el percentatge de recuperació.

Respostes: a) Equacions: $i = (0.82 \pm 0.03) + (4.603 \pm 0.002) C$, $r = 0.9999998$; $i = (0.013 \pm 0.006) + (0.0708 \pm 0.0003) C$, $r = 0.99996$, respectivament.

b) $c = 14.03 \pm 0.08$; $c = 13.94 \pm 0.08$.

c) $\varepsilon_r = 0.2$; $\varepsilon_r = -0.4$; recuperació = 100.2% i 99.6%.

FI DE LA COL·LECCIÓ DE PROBLEMES DE TÈCNiques DE SEPARACIÓ