

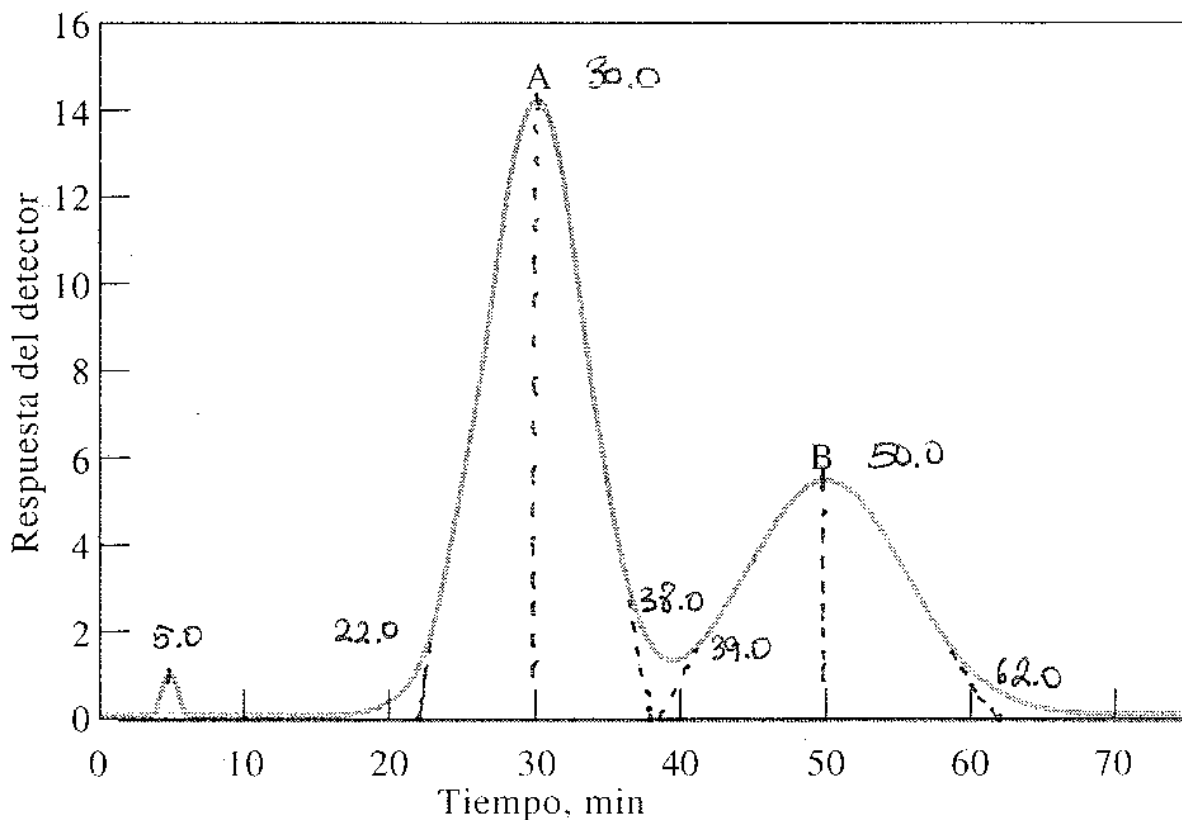
FUNDAMENTOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. 7º RELACIÓN DE PROBLEMAS.

1.- Las sustancias A y B tienen tiempos de retención de 16.40 y 17.63 min, respectivamente, en una columna de 30 cm. Una especie no retenida pasa a través de la columna en 1.30 min. Las anchuras máximas (en la base) de A y B son 1.11 y 1.21 min, respectivamente. Calcule:

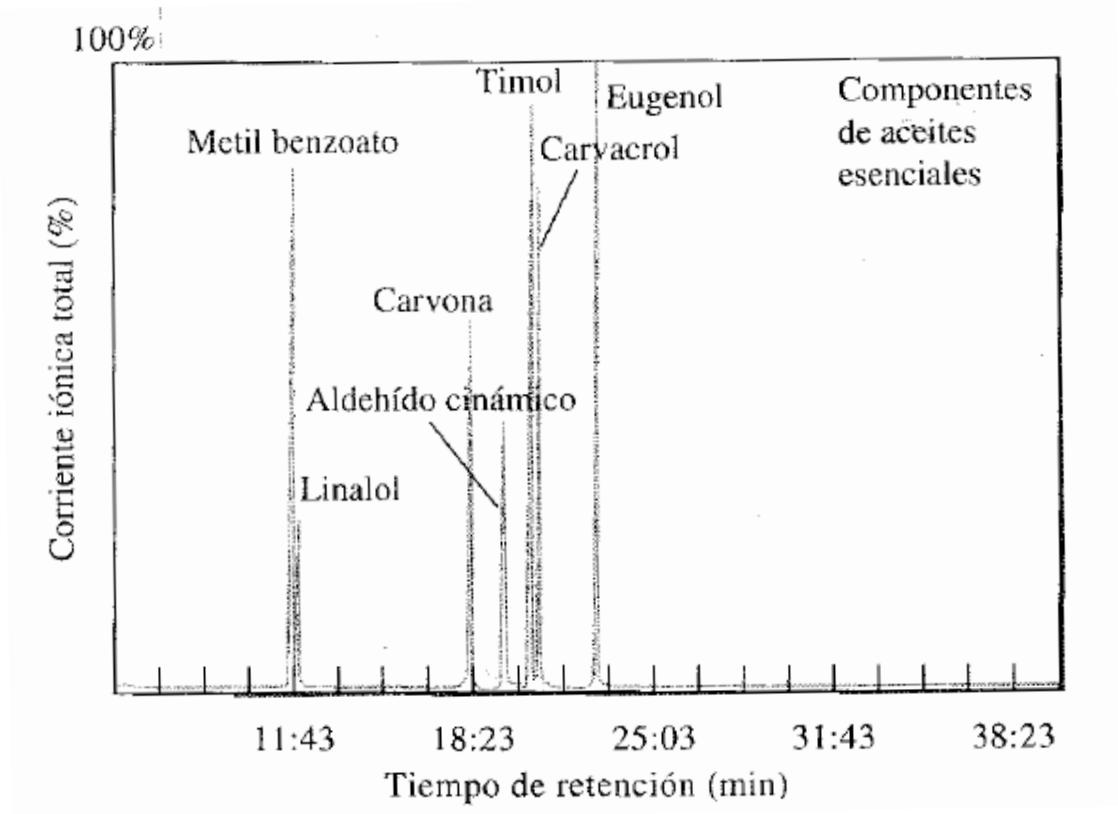
- la resolución entre los compuestos A y B
- el número medio de platos de la columna
- la altura de plato
- la longitud de la columna necesaria para lograr una resolución de 1.5
- el tiempo necesario para eluir la sustancia B en la columna que da un valor de R_s de 1.5

2.- La figura muestra el cromatograma de una mezcla de dos componentes en una columna cromatográfica de líquidos empaquetada, de 25 cm. La velocidad de flujo fue de 0.40 mL min^{-1} .

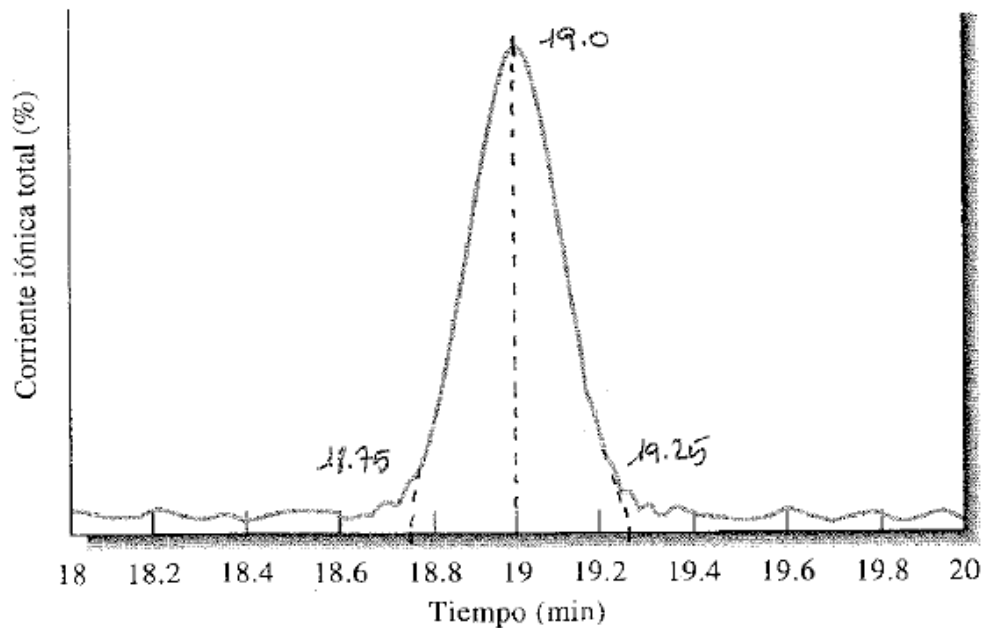
- Determina los factores de retención para los dos componentes
- Calcula la resolución de los dos picos
- Halla la altura media de plato
- ¿Qué longitud de la columna se necesitaría para alcanzar una resolución de 1.75?
- Supongamos que la longitud de la columna se ha fijado a 25 cm y que el material de empaquetamiento está fijo. ¿Qué medidas podría usted tomar a fin de incrementar la resolución para lograr la separación en línea base?
- ¿Hay alguna medida que usted pudiera usar para lograr una mejor separación en menos tiempo con la misma columna que en el apartado anterior?



3.- El aldehído cinámico es el compuesto del que depende el sabor de la canela. También es un antimicrobiano potente, que forma parte de ciertos aceites esenciales. La respuesta de la cromatografía de gases (CG) con una muestra artificial que contiene seis componentes de aceites esenciales y metilbenzoato como patrón interno se muestra en la siguiente figura:



La siguiente figura es una ampliación de la región cerca del pico del aldehído cinámico.



Cromatograma ampliado

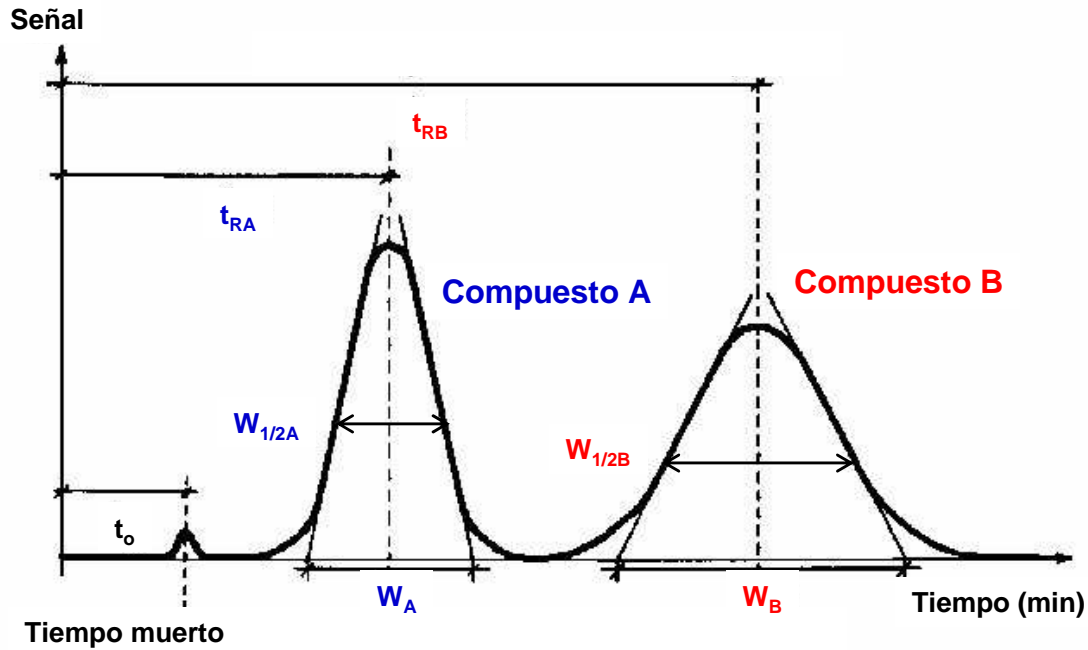
Calcula:

- el número de platos teóricos para el compuesto de estudio.
- La columna de sílice fundida tiene 0.25 mm x 30 cm de diámetro y longitud de columna respectivamente, y con un tamaño de partícula de 0.25 μm . Determina la altura de plato teórico.
- Se obtienen datos cuantitativos empleando metilbenzoato como patrón interno para los compuestos aldehído cinámico y timol tal y como se muestra en la siguiente tabla. Sabiendo que los valores de área relativas para cada compuesto se calculan dividiendo el área del pico del componente/área del patrón interno, calcula: el área relativa para los dos compuestos anteriormente mencionados, determine las ecuaciones de la curva de calibrado para cada componente y a partir de los datos del apartado anterior determina qué componente tiene mayor sensibilidad.

Área de pico absoluta

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Metil benzoato	Aldehído cinámico	Timol
0.50	18225	12325	20238
0.75	18523	20140	36890
1.30	17895	35462	69975
2.50	18329	68090	130215

PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS



1. Tiempo de retención (t_R)

2. Factor de capacidad (K') $K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ o bien $K' = \frac{V_R - V_0}{V_0}$

3. Selectividad (α) **Factor de selectividad, también llamado retención relativa:**

$$\alpha_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1}$$

4. Eficacia de la columna

- Número de plato teórico (N): $N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2$ $N = 5.54 \left(\frac{t_R}{\omega_{1/2}} \right)^2$

ω : anchura de la base del triángulo construido por el pico.

$\omega_{1/2}$: anchura de la media altura del pico.

- Altura de plato teórico (H): $H = L/N$

6. Resolución (R_s)

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)/2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)}$$

1.- Las sustancias A y B tienen tiempos de retención de 16.40 y 17.63 min, respectivamente, en una columna de 30 cm. Una especie no retenida pasa a través de la columna en 1.30 min. Las anchuras máximas (en la base) de A y B son 1.11 y 1.21 min, respectivamente. Calcule:

- la resolución entre los compuestos A y B
- el número medio de platos de la columna
- la altura de plato
- la longitud de la columna necesaria para lograr una resolución de 1.5
- el tiempo necesario para eluir la sustancia B en la columna que da un valor de R_s de 1.5

a)

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)/2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)} = \frac{2 * (17.63 - 16.40)}{1.11 + 1.21} = 1.06$$

Es una resolución menor que 1.5, lo que indica que no hay separación de los compuestos a línea base. Este valor nos indica que la resolución es aproximadamente del 90%.

b)

$$N_A = 16 * \left(\frac{t_{RA}}{\omega_A} \right)^2 = 16 * \left(\frac{16.40}{1.11} \right)^2 = 3493$$

$$N_B = 16 * \left(\frac{t_{RB}}{\omega_B} \right)^2 = 16 * \left(\frac{17.63}{1.21} \right)^2 = 3397$$

$$\bar{N}_{AB} = \frac{N_A + N_B}{2} = \frac{3493 + 3397}{2} = 3445$$

c)

$$H = \frac{L}{N} = \frac{30.0 \text{ cm}}{3445} = 8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

d) La resolución se relaciona proporcionalmente con la raíz cuadrada del número de platos:

$$\frac{R_{s1}}{R_{s2}} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}}$$

Siendo 1 la columna de 30 cm y 2 la columna a calcular

$$\frac{1.06}{1.5} = \frac{\sqrt{3445}}{\sqrt{N_2}} \quad \therefore N_2 = 6900 \quad \therefore L = H * N = 8.7 \times 10^{-3} * 6900 = 60 \text{ cm}$$

Nos vamos a otra columna el doble de larga, lo que dobla los tiempos de retención y por tanto de análisis.

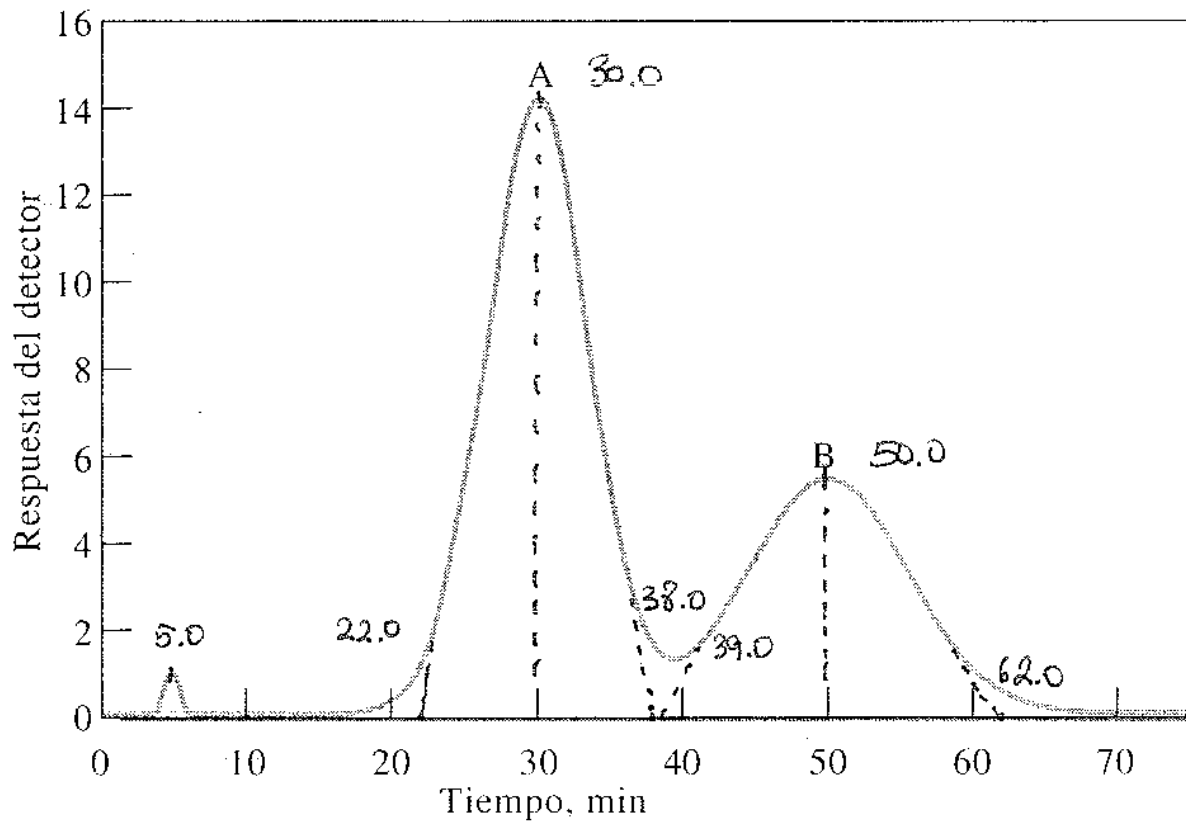
e) en este caso:

$$\frac{t_{R1}}{t_{R2}} = \frac{Rs_1^2}{Rs_2^2} \quad \therefore \frac{17.63}{t_{R2}} = \frac{1.06^2}{1.5^2} \quad \therefore t_{R2} = 35 \text{ min.}$$

En el siguiente problema se plantearán otras estrategias para aumentar la resolución sin que se incremente el tiempo de análisis.

2.- La figura muestra el cromatograma de una mezcla de dos componentes en una columna cromatográfica de líquidos empaquetada, de 25 cm. La velocidad de flujo fue de 0.40 mL min^{-1} .

- Determina los factores de retención para los dos componentes
- Calcula la resolución de los dos picos
- Halla la altura media de plato
- ¿Qué longitud de la columna se necesitaría para alcanzar una resolución de 1.75?
- Supongamos que la longitud de la columna se ha fijado a 25 cm y que el material de empaquetamiento está fijo. ¿Qué medidas podría usted tomar a fin de incrementar la resolución para lograr la separación en línea base?
- ¿Hay alguna medida que usted pudiera usar para lograr una mejor separación en menos tiempo con la misma columna que en el apartado anterior?



a)

$$K'_A = \frac{t_{RA} - t_0}{t_0} = \frac{30 - 5}{5} = 5 \quad K'_B = \frac{t_{RB} - t_0}{t_0} = \frac{50 - 5}{5} = 9$$

b)

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_2 + \omega_1)} = \frac{2 * (50 - 30)}{23 + 16} = 1.025$$

De la gráfica, prolongando hasta el eje, sacamos las anchuras de pico:

$$\omega_1 = (38 - 22) = 16 \text{ min} \quad \omega_2 = (62 - 39) = 23 \text{ min}$$

No hay resolución a línea base

c)

$$N_A = 16 * \left(\frac{t_{RA}}{\omega_A} \right)^2 = 16 * \left(\frac{30}{16} \right)^2 = 56.25$$

$$N_B = 16 * \left(\frac{t_{RB}}{\omega_B} \right)^2 = 16 * \left(\frac{50}{23} \right)^2 = 75.62$$

$$\bar{N}_{AB} = \frac{N_A + N_B}{2} = \frac{56.25 + 75.62}{2} = 65.93$$

$$H = \frac{L}{N} = \frac{25cm}{65.93} = 0.379cm$$

d)

$$\frac{Rs_1}{Rs_2} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}}$$

Siendo 1 la columna de 25 cm y 2 la columna a calcular

$$\frac{1.025}{1.75} = \frac{\sqrt{65.93}}{\sqrt{N_2}} \quad \therefore N_2 = 192.215 \quad \therefore L = H * N = 0.379 * 192.215 = 72.85cm$$

Nos vamos a una columna casi tres veces la longitud original.

e) Si la Fase Estacionaria es constante (no varía L, ni tamaño de partícula, diámetro o espesor de la capa líquida, es decir N) podemos actuar sobre la fase móvil:

- Cambiar de eluyente, utilizar otros disolventes con mayor capacidad de elución.
- Adición de sustancias a la fase acuosa, como tampones (cambio de pH y naturaleza del tampón), pares iónico, ligandos formadores de complejos, etc.
- Variación de la temperatura.

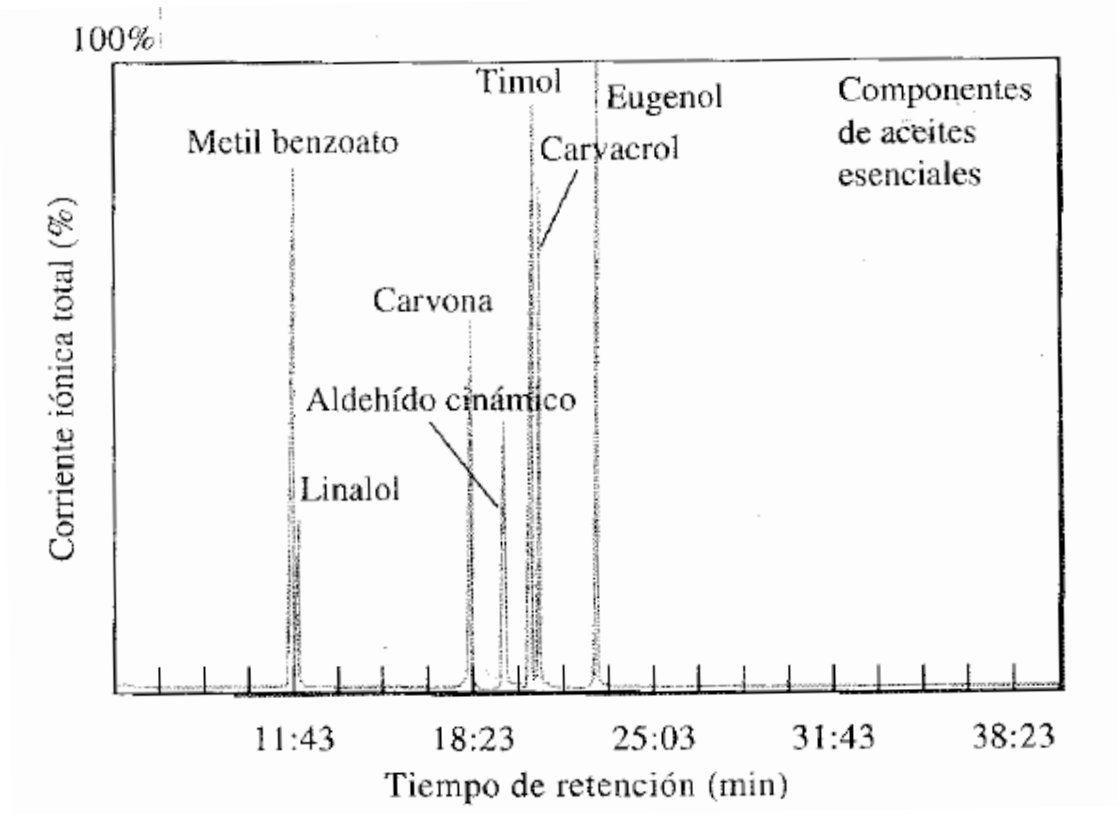
f)

- aumentando el caudal de la fase móvil
- elución en GRADIENTE
- variando la temperatura

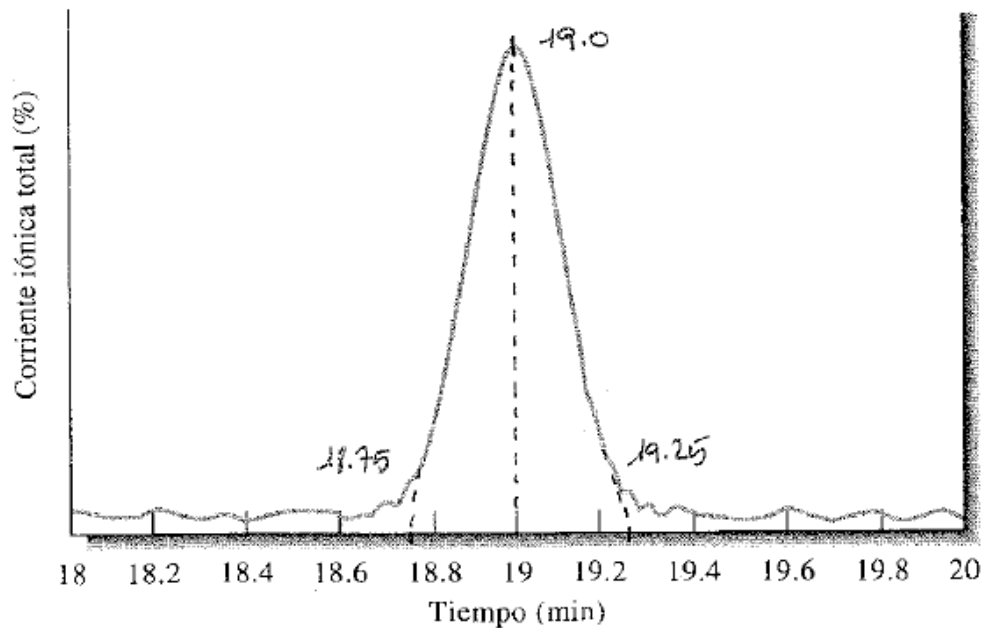
Actuando sobre la fase estacionaria, la resolución se puede variar actuando sobre:

- Longitud de la columna (aumenta los tiempos de retención y de análisis por tanto)
- Tamaño de partícula
- Diámetro de la columna
- Espesor de la capa líquida.

3.- El aldehído cinámico es el compuesto del que depende el sabor de la canela. También es un antimicrobiano potente, que forma parte de ciertos aceites esenciales. La respuesta de la cromatografía de gases (CG) con una muestra artificial que contiene seis componentes de aceites esenciales y metilbenzoato como patrón interno se muestra en la siguiente figura:



La siguiente figura es una ampliación de la región cerca del pico del aldehído cinámico.



Cromatograma ampliado

Calcula:

- el número de platos teóricos para el compuesto de estudio.
- La columna de sílice fundida tiene 0.25 mm x 30 cm de diámetro y longitud de columna respectivamente, y con un tamaño de partícula de 0.25 μm. Determina la altura de plato teórico.
- Se obtienen datos cuantitativos empleando metilbenzoato como patrón interno para los compuestos aldehído cinámico y timol tal y como se muestra en la siguiente tabla. Sabiendo que los valores de área relativas para cada compuesto se calculan dividiendo el área del pico del componente/área del patrón interno, calcula: el área relativa para los dos compuestos anteriormente mencionados, determine las ecuaciones de la curva de calibrado para cada componente y a partir de los datos del apartado anterior determina qué componente tiene mayor sensibilidad.

Área de pico absoluta

Concentración (μg mL ⁻¹)	Metil benzoato	Aldehído cinámico	Timol
0.50	18225	12325	20238
0.75	18523	20140	36890
1.30	17895	35462	69975
2.50	18329	68090	130215

a)

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = 16 * \left(\frac{19}{0.5} \right)^2 = 23104$$

De la gráfica, prolongando hasta el eje, sacamos las anchuras de pico: $\omega = (19.25 - 18.75) = 0.5$ min

b)

$$H = \frac{L}{N} = \frac{30m}{23104} = 0.13cm$$

c) Se trata del método del patrón interno, para obtener la señal analítica, se divide el área de pico del analito por la del patrón interno. Entonces se hace el ajuste por mínimos cuadrados

Áreas de pico corregidas

Concentración (μg mL ⁻¹)	Aldehído cinámico	Timol
0.50	0.676	1.110
0.75	1.087	1.991
1.30	1.982	3.910
2.50	3.715	7.104

Aldehído cinámico: $y = 1.514 * \text{Área corregida} - 4.67 \times 10^{-2}$

Timol: $y = 2.975 * \text{Área Corregida} - 2.27 \times 10^{-1}$

Mayor sensibilidad presenta el Timol, ya que la pendiente de la recta de regresión entre la señal analítica y la concentración es mayor, luego, para obtener el mismo intervalo de señal analítica, se necesita un intervalo de concentraciones menores. Indicio es que podemos determinar concentraciones más pequeñas, pero el límite de detección como hemos visto no solo depende de la pendiente de la recta de calibrado.