

TRABAJO PRÁCTICO N°1: CROMATOGRAFIA

Introducción:

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de una muestra entre dos fases. Una fase es un lecho estacionario de extensa superficie: **fase estacionaria**, y puede ser un sólido o un líquido (una delgada película líquida que recubre a sólido). La otra fase consiste en un gas o un líquido que pasa a través de la fase estacionaria; es la **fase móvil**. Se puede comprender la cromatografía **como la remoción selectiva de los componentes de una mezcla por acción de la fase móvil que fluye a través de la fase estacionaria**.

La fase estacionaria puede estar en la forma de una columna empaquetada a través de la cual se deja fluir la fase móvil (cromatografía en columna), o bien como una delgada capa adherida a un soporte adecuado (cromatografía en capa delgada) sobre la cual la fase móvil asciende por acción capilar o desciende por gravedad.

Las distintas técnicas cromatográficas se clasifican según **la fase móvil** empleada: *cromatografía de gases o cromatografía líquida*.

También pueden ser diferenciadas basándose en **el principio de separación** en:

Cromatografía de partición: La fase estacionaria es una película delgada de líquido adsorbida sobre la superficie de un soporte inerte. La fase móvil puede ser un líquido o un gas (cromatografía de partición líquido-líquido y gas-líquido, respectivamente). En cualquiera de los casos la separación depende extensamente de la partición entre las dos fases, aunque puede haber efectos secundarios de adsorción de los componentes de la muestra al soporte inerte. La cromatografía en papel es un ejemplo importante de cromatografía de partición en la cual el papel de filtro sirve como soporte de la fase estacionaria líquida (agua retenida).

Cromatografía de adsorción: La fase móvil es usualmente un líquido y la fase estacionaria un adsorbente sólido finamente dividido (cromatografía líquido-sólido). Aquí la separación depende de la adsorción selectiva de los componentes de la mezcla en la superficie sólida, constituye un ejemplo especial en el que las fuerzas electrostáticas aumentan las fuerzas de adsorción relativamente débiles. La cromatografía de capa fina [Thin- layer chromatography (T.L.C)] es un ejemplo importante

Cromatografía de exclusión o de permeación en gel. Aparte de los procesos de partición y adsorción, las separaciones cromatográficas pueden basarse en las diferencias en el tamaño molecular. En estos casos un gel sirve como fase estacionaria y la separación se logra a través de la difusión diferencial dentro de los poros de la matriz, de moléculas que no son lo suficientemente grandes como para ser totalmente excluidas. Las moléculas mayores escurren primero.

Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria está formada por resinas que tienen grupos reactivos que están asociados a iones lábiles capaces de ser intercambiados con los iones de la fase móvil (generalmente acuosa). Como su nombre lo indica se emplea para la separación de sustancias iónicas, tanto orgánicas como inorgánicas, enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes

La cromatografía gas-sólido (C.G.S.), o gas-líquido (C.G.L.) es un método para separar componentes de mezclas de compuestos volátiles. **La distribución de los componentes de la mezcla se logra mediante un proceso cromatográfico de adsorción (C.G.S) o de partición (C.G.L).** En la mayoría de sus aplicaciones las separaciones se hacen para identificar y determinar el número de componentes de una mezcla.

Según la técnica empleada habrá consideraciones especiales para los distintos pasos en el proceso cromatográfico, pero se puede decir que dicho proceso consta de cinco etapas principales:

1. Armado de la placa, columna o acondicionamiento del papel: disposición espacial que adopta la fase estacionaria.
2. Siembra: contacto inicial de la mezcla a separar con la fase estacionaria.
3. Desarrollo: es el pasaje de la fase móvil a través de la fase estacionaria.

4. Revelado: localización de las zonas donde se encuentran los compuestos ya separados mediante el uso de un agente revelador.
5. Elusión: se utiliza cuando se quieren remover los solutos separados en la fase estacionaria.

Cromatografía de adsorción

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (T. L.C) (thin-layer chromatography)

En esta técnica suelen emplearse placas de vidrio recubiertas por una capa de fase estacionaria sólida, la cual se adhiere a las placas de vidrio por medio de un agente ligante, tal como el sulfato de calcio, el cual es incorporado a la misma. Los adsorbentes más utilizados, en orden decreciente de poder adsorbente, son: carbón activado, silicato de magnesio, óxido de aluminio (alúmina), sílica gel, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, talco y almidón.

Un soluto que se siembra, se ve atraído por el adsorbente tanto más fuertemente cuanto mayor es su polaridad; así compuestos muy polares como alcoholes, ácidos carboxílicos o aminas son adsorbidas con mayor fuerza que compuestos como hidrocarburos y sus derivados halogenados, y en consecuencia los primeros ascenderán por la capa de adsorbente con mayor lentitud.

La actividad de adsorbente influye también en el grado de migración del soluto; los adsorbentes más activos establecen ligaduras más fuertes con los solutos, de manera que la migración será más lenta. El grado de actividad de la alúmina y de la sílica depende en gran medida de su contenido de agua; a menor contenido de agua mayor será la actividad del adsorbente.

La polaridad del disolvente es otro factor que influye en la ascensión de soluto; para un soluto y un adsorbente determinados, un aumento en la polaridad del solvente ocasionará una mayor interacción soluto-solvente y, por lo tanto, el soluto ascenderá más que en el caso de solvente menos polar.

Una desventaja de los sistemas de sílica gel sobre vidrio es que utilizan como ligante sulfato de calcio, unido esencialmente por puentes de hidrógeno a vidrio; las débiles fuerzas que retienen la capa de adsorbentes sobre el vidrio son fáciles de romper mediante agua o alcoholes, y en general estos solventes no pueden emplearse. En consecuencia, moléculas muy polares como aminoácidos o azúcares, que requieren solventes muy polares para ser movilizadas, son difíciles de analizar en este tipo de placas. Los solventes utilizados para el desarrollo y elusión de cromatogramas, en orden creciente de polaridad, ver **Tabla 1**.

Tabla 1.

	E^a	P^b
Eter de petróleo (30-60°)	1,88	3,290
Hexano	1,88	3,295
Benceno	2,29	1,564
Eter etílico	4,47	1,222
Cloroformo	5,20	13,542
Acetato de etilo	6,11	1,441
Dicloroetano	10,40	1,449
2-butanol	15,50	4,210
Acetona	21,50	1,295
Etanol	26,00	1,003
Metanol	31,20	1,547
Agua	80,37	1,000
Piridina	12,37	0,947
Ácidos orgánicos.		
Ácidos y álcalis inorgánicos.		

^aconstante dieléctrica. ^bviscosidad en centipoises a 25 °C.

Cromatografía de Partición

Cromatografía en papel

La cromatografía en papel es una forma de cromatografía de partición en la cual la **fase estacionaria** es el agua absorbida, siempre presente en el papel de filtro (c.a. 22%) y cuyo soporte son las moléculas de celulosa de papel.

Aunque puede utilizarse papel de filtro común, existen variedades comerciales seleccionadas especialmente para cromatografía (Whatman). La **fase móvil** es una mezcla de uno o más solventes orgánicos polares miscibles en agua como fenol, ácido acético, alcoholes o piridina para

incrementar la proporción de agua en la fase móvil. El hecho que se pueda producir un fenómeno de partición entre el agua del papel y el agua contenida en el solvente de corrida, se basa en que se forma un complejo agua-celulosa y que tiene un poder de disolución distinto al del agua pura. Dado que en la cromatografía de partición, ambas fases (estacionaria y móvil), son líquidas, se la denomina también cromatografía liquido-liquido.

Por lo tanto la separación se basa en la distribución selectiva de los solutos en las dos fases (estacionaria y móvil) según sus constantes de partición.

Las soluciones a cromatografiar son aplicadas sobre el papel por medio de un tubo capilar, tal como se hace en cromatografía en capa delgada, y se seca entonces el papel. Luego se lo coloca en un recipiente adecuado para que la fase móvil ascienda por capilaridad, sin pérdidas por evaporación. Cuando el solvente ha recorrido la distancia requerida, se retira el papel del recipiente y se lo deja secar (se marca primero el lugar hasta donde llegó el solvente).

Si las manchas no son coloreadas su localización es determinada mediante el uso de un revelador. Como en la cromatografía en capa fina se calcula el R_f .

Relación de frentes (R_f)

Siempre que las condiciones experimentales sean reproducibles, el movimiento de una sustancia relativa al frente de solvente para un dado sistema cromatográfico es constante y característico de la misma. Se especifica la constante R_f y se define como *el cociente entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el solvente*:

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

La verdadera reproducibilidad de los valores R_f es raramente lograda en la práctica, debido al cambio en un número de variables tales como: el tamaño de partícula de diferentes muestras de adsorbente, a composición de solvente y el grado de saturación de la atmósfera del frasco o cuba con el vapor del solvente, la activación anterior de las placas, el espesor de la capa de adsorbente, etc.

En consecuencia, no es aconsejable utilizar el valor de R_f como criterio de identificación luego de un aislamiento; si se dispone de testigos de referencia deben sembrarse en la misma placa que la mezcla para establecer la identificación de los componentes.

Aquellos solventes que provocan que todos los componentes permanezcan cerca del origen de siembra o se muevan cerca del frente de solvente no son satisfactorios; en general, se busca un sistema que produzca un R_f de aproximadamente 0,5 con una buena separación de los componentes.

PARTE EXPERIMENTAL

CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA

Preparación de las placas

Antes de ser recubiertas con el adsorbente, los portaobjetos deben ser cuidadosamente lavados con detergente, agua destilada y, en casos de severa grasitud, mezcla sulfocrómica. Se prepara una especie de papilla agregando agua a la sílica en relación: 2:1 p/p.

Los portaobjetos se sostienen de a dos, uno junto a la otro, y se sumergen en la suspensión de sílica, se retiran, se dejan escurrir y se mueven ligeramente para lograr una película lo más uniforme posible. Luego se dejan secar en posición horizontal.

Las placas se **activan** mediante calentamiento a 110 °C, colocándolas en la estufa.

Extracción de pigmentos de hojas verdes: cortar en tiras finas aproximadamente 10 g de hojas verdes de acelga u otro vegetal Colocar en un mortero con cantidad suficiente de arena lavada, agregar 25 ml de acetona y moler finamente las hojas. Filtrar con algodón o lana de vidrio recogiendo el filtrado en un tubo de ensayos.

Transferir el sólido nuevamente al mortero y practicar dos extracciones con 15 ml de éter etílico cada vez y filtrar. Concentrar el extracto etéreo bajo campana, hasta 1/3 de su volumen original.

Armado de las placas y portaobjetos

La preparación de las placas 20 x 20 es realizada por los auxiliares. Las placas para su uso se activan en estufa a 110°C durante 20-30 minutos

Los alumnos prepararán los portaobjetos que deberán lavarse perfectamente con detergente y secados en estufa. Luego se sumergen dos portaobjetos juntos en un vaso de precipitados conteniendo una suspensión de sílica gel 60G en metanol o cloroformo, se retiran, se separan las dos placas y se colocan a activar en estufa 10 minutos a 110 °C. Dejar enfriar antes de sembrar.

Sembrado de las placas

Sembrar en la placa de 20 x 20 y en los portaobjetos el extracto etéreo. Para sembrar se utilizan capilares que se preparan cerrando a la llama del mechero su parte media y luego se cortan para su uso en el lugar de cierre. Se aplica la muestra en porciones pequeñas, secando después de cada aplicación. El punto de aplicación debe estar situado a no menos de 2 cm del borde inferior en la placa grande y 1cm para los portaobjetos con una separación de 1 cm entre siembras.

Cada siembra de 3 mm de diámetro tiene un volumen aproximado de 0,5 microlitros, como se debe sembrar alrededor de 1 microlitro, es necesario depositar tres gotas de la mezcla en el mismo lugar, esperando que la primera gota se seque antes de colocar la segunda.

Armado de la cuba, elección del solvente y desarrollo del cromatograma

Los portaobjetos se desarrollan convenientemente en un frasco de vidrio cilíndrico; las placas grandes como las de 20 x 20 cm, necesitan una cuba rectangular de dimensiones apropiadas.

Se recubre el interior del frasco con papel de filtro, dejando un espacio libre para ver en su interior. El solvente de desarrollo se selecciona probando diferentes solventes y mezclas colocados en distintas cubas y efectuando corridas en portaobjetos. Se utilizarán los siguientes solventes o la mezcla de ellos: etanol, acetona, tolueno, éter de petróleo, hexano, acetato de etilo. De estas pruebas resulta que el solvente de desarrollo es la mezcla: hexano- acetona (70:30) v/v

El solvente elegido debe ser razonablemente volátil (P.E. 40-60 °C); ya que es deseable una rápida evaporación del solvente a medida que se efectúa la siembra, lo que conduce a la formación de manchas de pequeño diámetro, y resulta así una mejor separación en el desarrollo del cromatograma. Luego se coloca el solvente de desarrollo (en cantidad aproximada de unos 2 cm de altura) y se deja que el líquido ascienda por capilaridad en el papel, se cierra el frasco y se deja 10 minutos para que la atmósfera en el interior del frasco se sature con el vapor del solvente. Luego se coloca el portaobjetos dentro del frasco cuidando que el nivel del solvente no llegue hasta la siembra. Se tapa nuevamente el frasco y se deja ascender al solvente hasta una línea previamente marcada a 1,5 cm del borde superior de la placa. Se retira la placa, y se deja secar convenientemente de acuerdo a la volatilidad y toxicidad del solvente utilizado.

Localización de las manchas. Reveladores

La posición de componentes coloreados puede ser visualizada cuando la concentración de la siembra es lo suficientemente alta. Se observará la separación de las manchas de diferente coloración que puede corresponder al pigmento clorofila y otros como: carotenos, xantofilas, neoxantinas, etc., para determinar su identidad se debe recurrir a la espectroscopia UV-V.

También se puede observar la placa bajo la luz ultravioleta, lo cual revelará los compuestos fluorescentes.

Un revelador muy útil para muchos compuestos orgánicos, pero inespecífico, es el vapor de Iodo, donde aparecen como manchas color marrón.

Otra forma de revelado general, aplicable sólo en el caso de adsorbentes inorgánicos, y para la detección de material orgánico, consiste en pulverizar la placa con un spray de ácido sulfúrico concentrado o una solución de ácido sulfúrico concentrado en metanol (4:100), y luego calentar en una estufa por encima de 200°C hasta que los materiales orgánicos sean revelados como manchas negras carbonizadas.

También hay métodos químicos de detección de sustancias incoloras, los cuales utilizan un spray de un agente cromógeno adecuado. Muchos de éstos son selectivos para un grupo funcional en

particular y pueden ser extremadamente sensibles, como por ejemplo la ninhidrina para la detección de los aminoácidos.

Identificación de los componentes separados por TLC

Se marcan los frentes de cada una de las bandas (en la sílica gel) correspondientes a las clorofilas y carotenos y se extrae cuidadosamente con una espátula. Se colocan en tubos de centrifuga, se agrega acetona en el caso de las clorofilas y hexano para los carotenos. Luego se centrifugan, se decanta y se guarda el sobrenadante (que contiene los pigmentos en solución).

Realizar un espectro entre las longitudes de onda $\lambda = 400-700$ nm y determinar los picos de máxima absorción para las clorofilas a y b y los carotenos.

En el caso de los pigmentos vegetales, al ser coloreados, nos indican que absorben en la zona visible del espectro. Además lo hacen en la zona de longitudes de onda que corresponde al color complementario del que emiten, de forma tal que un compuesto amarillo, absorberá en la zona de los azules, por ser colores complementarios uno del otro.

Sacar conclusiones de la elección del mejor solvente de desarrollo a partir de las corridas en los portaobjetos y de la separación de los pigmentos de los distintos extractos corridos en la placa grande

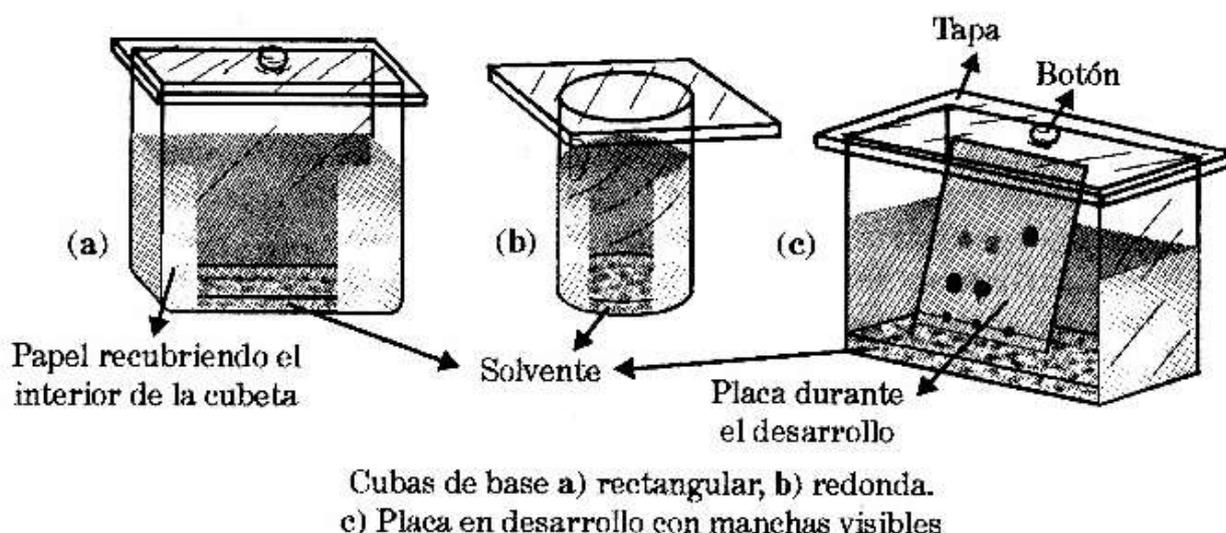


Figura 1. Desarrollo de cromatografía en placa delgada

Cromatografía circular sobre papel. Separación de una mezcla de colorantes

Preparación del papel:

Utilizar un disco de papel Whatman N° 1, de 11 cm ó 6 cm de diámetro según sea el tamaño de la cuba (placa de petri). Con un compás trazar una línea de siembra de 0,5 cm de radio desde el centro del papel y una línea de frente de solvente de desarrollo a 1 cm del borde del mismo. Hacer un pequeño orificio en el centro y pasar un hilo grueso de algodón.

Siembra:

Las gotas de las soluciones de los colorantes rodamina B, fluoresceína y azul de metileno en solución alcohólica, son aplicadas sobre el papel por medio de una pipeta capilar, tal como se hace en cromatografía en capa delgada, y se seca entonces el papel luego de cada aplicación. Se siembra también una mezcla de los colorantes

Desarrollo del cromatograma:

Se llena hasta unos 0,5 cm una tapa de placa de petri de 10 cm de diámetro o 6 cm de diámetro, según el papel usado, con el solvente de desarrollo: **etanol; metanol; agua (2:1:4)** y la otra tapa hará de cubierta a fin de cerrar la cuba.

Se coloca el papel ya sembrado y se sumerge la mecha en el solvente. Se deja correr hasta que el frente de solvente alcance la línea marcada. Comparar los R_f de los colorantes y explicar sus posibles diferencias sobre la base de sus estructuras.

El R_f se define tal cual como en la cromatografía en capa fina.

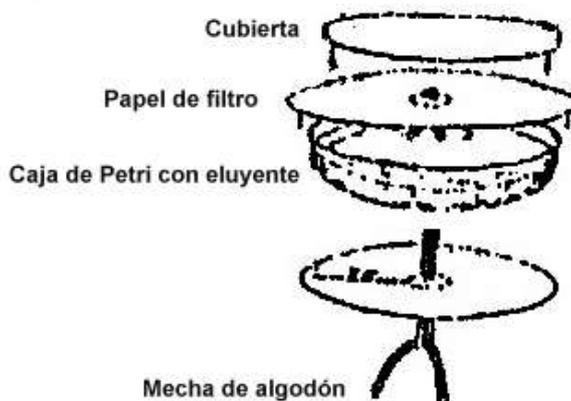


Figura 2. Cromatografía de papel circular

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

- 1.- Defina cromatografía.
- 2.- ¿Cuáles son las propiedades que permiten la separación en los distintos tipos de cromatografía: adsorción, partición?. Elabore un cuadro comparativo con las diferencias importantes que encuentra entre ambas cromatografías.
- 3.- ¿Qué es el soporte, el ligante y adsorbente en una placa delgada?
- 4.- ¿Qué es la activación de una placa? ¿Para qué se hace?
- 5.- ¿Qué es la Relación de frentes? ¿De qué factores depende? ¿Puede usarse como criterio de identificación? Justifique.
- 6.- ¿Cuál es la importancia de la saturación de la cuba con el solvente a utilizar, previo a la realización del cromatograma?.
- 7.- ¿Qué es el revelado? ¿qué es un revelador universal? ¿Qué es un revelador específico? Dé ejemplos.
- 8.- ¿Cuáles son las fases móvil y estacionaria en la cromatografía de partición?
- 9.- ¿Por qué utiliza cromatografía de partición en la separación de colorantes?
- 10.- Una muestra con un componente Z se ensayó con TLC empleando como fase móvil una mezcla con 80% de hexano y 20% de acetato de etilo y se registró un R_f de 0,05. Prediga cuál de las siguientes opciones considera la más acertada para lograr un R_f mayor y justifique:
 - a) Emplear hexano puro como fase móvil
 - b) Emplear una mezcla con 90% de hexano y 10% de acetato de etilo como fase móvil.
 - c) Emplear una mezcla 1:1 de hexano y acetato de etilo como fase móvil.
 - d) Emplear agua como fase móvil.
- 11.- Se analizan los siguientes compuestos por TLC, empleando una placa recubierta con sílica como fase estacionaria y diclorometano como solvente de desarrollo. Ordene los compuestos en función de los valores de R_f crecientes esperados (de menor a mayor). Explique su razonamiento.

