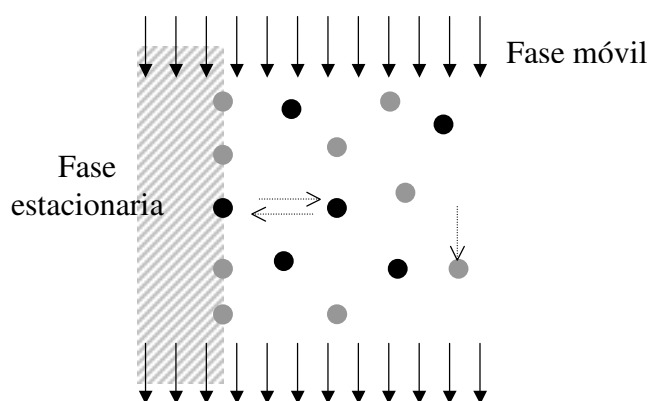


PRÁCTICA 9:

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA (CC) Y CAPA FINA (TLC)

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía es un método físico de separación basado en la diferencia de distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una móvil y otra estacionaria. Las moléculas de soluto de la mezcla son retenidas por la fase estacionaria y arrastradas por la fase móvil, de manera que si los componentes de la mezcla presentan diferentes afinidades por alguna de las fases, sus velocidades medias de avance a lo largo del sistema serán diferentes. La afinidad viene determinada por fuerzas de tipo Van der Waals, puentes de hidrógeno o transferencia de carga. Los componentes que sean fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán más lentamente a lo largo de dicha fase que aquellos que se unen débilmente. Como consecuencia de esta diferencia de movilidad los componentes de la mezcla se separan en bandas discretas, que pueden analizarse cualitativa o cuantitativamente mediante el uso de los detectores adecuados.



La cromatografía es una técnica extremadamente versátil, que permite tanto la separación de mezclas como la purificación de productos, la determinación del grado de pureza de un compuesto, el seguimiento de reacciones o la detección y caracterización de compuestos. Su principal ventaja frente a otros métodos de separación y purificación

consiste en que ésta técnica puede aplicarse a cantidades muy pequeñas de producto (del orden del μg).

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar atendiendo a varios criterios: naturaleza de las fases (sólido, líquido, gas), relación de polaridad de las fases (fase normal, fase inversa), mecanismo de separación (adsorción, exclusión, intercambio iónico, reparto, afinidad), disposición de las fases (en columna, en plano) y forma de desarrollo del proceso (frontal, de desplazamiento, de elución). En la siguiente tabla se da una relación general de los diferentes métodos cromatográficos basada en la naturaleza de la fase móvil:

Clasificación general	Fase estacionaria	Fase móvil	Mecanismo de separación
<i>Cromatografía líquida (LC)</i>	sólido	líquido	adsorción
			exclusión
	resina cambiadora	líquido	intercambio iónico
	líquido	líquido	reparto
<i>Cromatografía gaseosa (GC)</i>	líquido	gas	adsorción
	sólido	gas	adsorción
<i>Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)</i>	sólido-especies orgánicas	fluido supercrítico	reparto

En la presente práctica se estudiarán dos tipos de *cromatografía líquida*:

- Cromatografía de adsorción en columna (CC)
- Cromatografía de adsorción en placa fina (TLC)

En ambas técnicas la fase móvil está constituida por un líquido, la fase estacionaria por un sólido y el mecanismo de separación se basa en la diferencia de adsorción de los componentes de la mezcla en la superficie activa de la fase estacionaria. En la primera (CC) la fase estacionaria se sitúa en un tubo (columna), en la segunda (TLC) se deposita sobre una superficie abierta plana.

La cromatografía líquida suele emplearse para compuestos de poca volatilidad, tales como moléculas grandes y altamente polares, a los que no es aplicable la cromatografía de gases.

2. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA (CC)

En la figura 1 se muestra esquemáticamente una columna cromatográfica. La fase estacionaria consiste en un sólido adsorbente empaquetado en una columna de vidrio. La mezcla a separar (muestra) se deposita sobre la superficie superior de la fase estacionaria quedando adsorbida en ella. A continuación, se permite el paso de la fase móvil (eluyente) a lo largo de la columna a través de la fase estacionaria. Durante el proceso cromatográfico los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil a distintas velocidades efectuándose la separación. La velocidad de arrastre de cada componente depende de su grado de adsorción en la fase estacionaria y de su afinidad por la fase móvil.

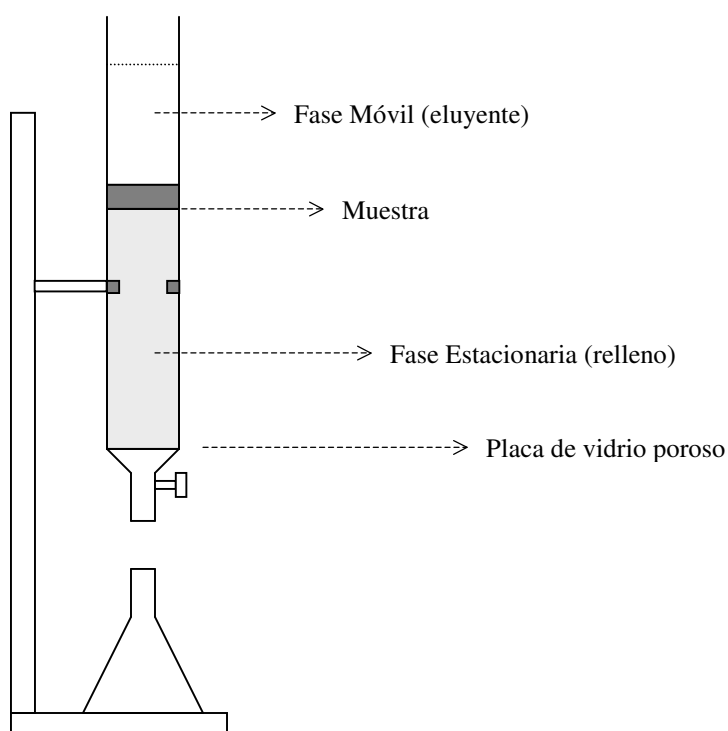


Fig. 1

Para que la separación de los componentes de la mezcla sea efectiva, su velocidad de migración a lo largo de la columna debe ser suficientemente diferente y la longitud de la columna adecuada.

Algunos adsorbentes comúnmente utilizados son: gel de sílice, alúmina, sacarosa y almidón.

La fase móvil consiste en un disolvente o mezcla de disolventes, seleccionado en base a su polaridad con el fin de optimizar la separación de los componentes de la muestra en la columna. De forma orientativa se puede establecer el siguiente orden de polaridades para los disolventes usados con mayor asiduidad:

Éter de petróleo < ciclohexano < tetracloruro de carbono < benceno < cloroformo < cloruro de metileno < éter etílico < acetato de etilo < acetona < piridina < etanol < metanol < agua < ácido acético

La fase móvil se desplaza a lo largo de la fase estacionaria debido a la fuerza de la gravedad.

El proceso de cromatografía en columna consta de tres pasos:

- a) **Preparación de la columna:** Empaquetamiento de la fase estacionaria en la columna. Se prepara una suspensión del adsorbente (fase estacionaria) en el eluyente (fase móvil) y se vierte en el interior de la columna.
- b) **Siembra de la muestra:** La muestra se deposita (“siembra”) en la superficie superior del adsorbente contenido en la columna con la ayuda de una pipeta. Si la muestra es líquida se puede sembrar directamente, si es sólida se siembra una solución concentrada de la misma en un disolvente adecuado (de baja polaridad).
- c) **Desarrollo/Elución de la columna:** Una vez sembrada la muestra se permite el paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria y se van recogiendo fracciones consecutivas del eluyente, que serán examinadas posteriormente para determinar su composición.

Estos pasos se verán en más detalle en la parte experimental.

3. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN PLACA FINA (TLC)

En la cromatografía en capa fina la fase estacionaria se deposita, formando una capa delgada, sobre un material de soporte tal como placas de vidrio o aluminio. La fase móvil asciende a lo largo de la fase estacionaria por capilaridad, produciéndose la separación de los componentes de la muestra en base a su diferente distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria, de forma análoga a la descrita en el apartado 2 para la cromatografía en columna.

En lo que se refiere a la composición de la fase móvil y la fase estacionaria, las consideraciones que se han hecho para la cromatografía en columna son también aplicables a la cromatografía en placa fina. Así mismo, el campo de aplicación de ambas técnicas es muy similar, de hecho, una de las principales aplicaciones de la TLC es seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo una CC. Algunas de las ventajas que presenta esta técnica son su bajo coste, su rapidez y su sensibilidad.

En la Fig. 2 se muestra de forma esquemática un proceso cromatográfico en placa fina. La altura máxima que alcanza el disolvente en la placa recibe el nombre de *frente de disolvente*, y se utiliza como referencia para calcular las distancias relativas recorridas por los componentes de la mezcla en el cromatograma.

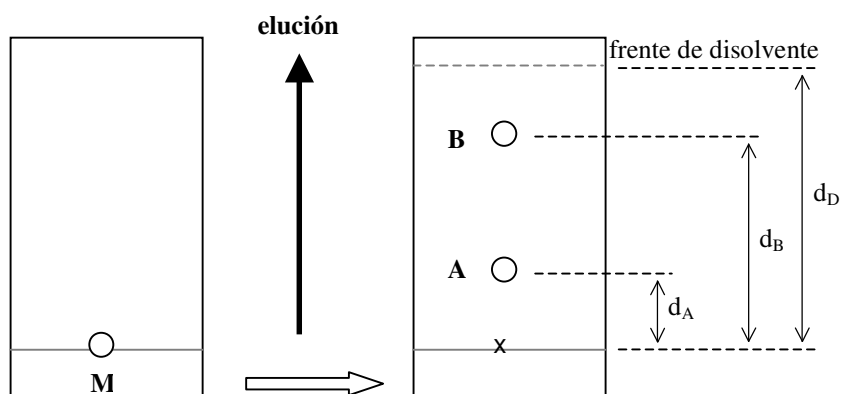


Fig. 2

Se denomina *factor de retardo* (R_f) a la relación existente entre la distancia recorrida por un compuesto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}} \Rightarrow R_{fA} = \frac{d_A}{d_D} \quad \text{y} \quad R_{fB} = \frac{d_B}{d_D}$$

Este factor depende tanto de las condiciones experimentales (temperatura, grado de saturación de la cámara de desarrollo, cantidad de muestra, etc.) como de la composición de la fase móvil y de la fase estacionaria, pero es una constante física (al igual que el punto de fusión) de cada especie química. Por este motivo, para un sistema

cromatográfico dado (condiciones experimentales/fase estacionaria/fase móvil), el valor de R_f de un compuesto determinado es constante, permitiendo la identificación de especies.

3.1. Preparación de la placa

Las placas para cromatografía TLC se preparan depositando una fina capa de una suspensión del adsorbente sobre un soporte adecuado y secando el disolvente en estufa. No obstante, existe una amplia gama de placas para cromatografía TLC disponibles comercialmente con diferentes tipos de adsorbentes y soportes.

3.2. Aplicación de la muestra

La aplicación de la muestra se realiza, generalmente, depositando una disolución de la misma (del 0,01 al 0,1 %) a aproximadamente 1 cm del borde inferior de la placa con la ayuda de una pipeta Pasteur o un capilar de vidrio. En el caso de disoluciones diluidas se realizan varias aplicaciones superpuestas permitiendo que el disolvente se seque entre aplicación y aplicación. La disolución de la muestra se transfiere a la placa por simple contacto entre ésta y la punta de la pipeta (o capilar) que la contiene. Esta operación se debe realizar de forma cuidadosa con el fin de no deteriorar la superficie del adsorbente. Cuando se depositan varias muestras en la cromatoplaça, éstas deben estar espaciadas un mínimo de 1 cm entre sí. Para facilitar la aplicación se puede dibujar en la placa una línea a lápiz a 1 cm de su borde inferior (línea de aplicación de muestras).

3.3. Desarrollo de la placa

Se introduce la placa en una cámara cerrada saturada con los vapores del disolvente (fase móvil) con el que se llevará a cabo el desarrollo. Para favorecer la saturación, se puede introducir en la cámara un papel de filtro cuya parte inferior quede sumergida en la fase móvil. El papel de filtro debe dejar una franja de la pared de la cámara al descubierto, para poder seguir el proceso cromatográfico sin necesidad de destapar la cámara (véase Fig.3). El disolvente no debe estar en contacto directo con la muestra depositada en la cromatoplaça, debiendo quedar su nivel por debajo de la línea de aplicación de muestras.

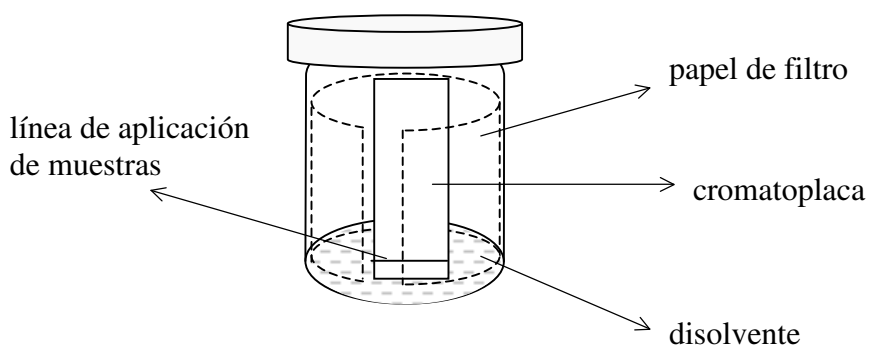


Fig. 3

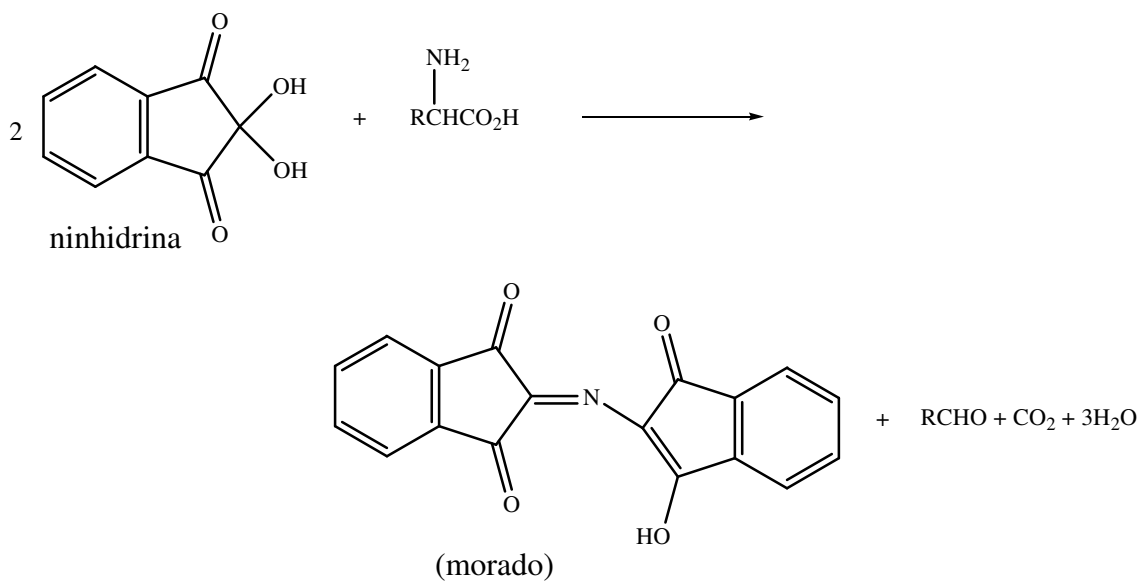
La placa se extrae de la cámara cuando el frente de disolvente está a aproximadamente 1 cm de su borde superior.

3.4. Revelado de la placa

Existen diversos procedimientos para detectar los componentes de la muestra en la placa tras el proceso de separación. Uno de los más utilizados consiste en incorporar a la fase estacionaria un material fluorescente y examinar la placa, una vez finalizado el desarrollo, bajo luz ultravioleta (los lugares de la placa donde se encuentran los componentes no muestran fluorescencia). Otro método consiste en nebulizar la placa con una solución de yodo o de ácido sulfúrico (reaccionan con compuestos orgánicos para dar productos oscuros). En la presente práctica se utilizará un reactivo específico para nebulizar las placas, la ninhidrina, que reacciona con α -aminoácidos dando un producto de color violeta.

Reacción de la ninhidrina

Cuando una solución acuosa de un α -aminoácido se trata con hidrato de tricetohidrindeno (ninhidrina), se produce color violeta:



4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Separación de una mezcla de dos colorantes por cromatografía en columna (CC)

Materiales:

- Columna de cromatografía
- Matraces Erlenmeyer (4 x 50 ml; 2 x 100)
- Vaso de precipitados (100 ml)
- Varilla de vidrio
- Soporte metálico
- Pinza
- Nuez
- Pipetas Pasteur / pipeta graduada de 1 ml
- Aspirador de pipeta

Reactivos/disolventes:

- Alúmina activada
- Etanol al 96%
- Agua destilada
- Mezcla problema: 1,5 ml de una solución de 60 mg de naranja de metilo y 200 mg de azul de metileno en 110 ml de etanol al 96%

Procedimiento:

- **Preparación de la columna:** Preparar una suspensión con 15 g de alúmina activada y etanol al 96% (aprox. 20 ml). Comprobar que la llave de la columna está cerrada añadir la suspensión de alúmina activada en etanol al 96%. Golpear suavemente, con un tubo de goma o con el dedo, las paredes externas de la columna para favorecer la eliminación de las burbujas de aire que se puedan haber formado. Abrir la llave de la columna y dejar fluir lentamente el etanol hasta que la altura de éste quede 2 mm por encima de la alúmina. Durante esta elución inicial la alúmina sedimenta y, al finalizar la elución, debe presentar un aspecto uniforme y una superficie lisa y perpendicular al eje longitudinal de la columna. El etanol que se obtiene de la columna durante esta parte del proceso se puede reutilizar. **NOTA:** a lo largo del proceso cromatográfico la columna nunca debe “secarse”, es decir, la fase estacionaria debe encontrarse en todo momento cubierta por la fase móvil, ya que de lo contrario la fase estacionaria se contraería y agrietaría.
- **Siembra de la muestra:** Una vez compactada la columna se procederá a “sembrar”, depositar, 1 ml de la muestra sobre la superficie de la alúmina con la ayuda de una pipeta. Finalizada la adición de la muestra se abre la llave de la columna y se eluye hasta que la muestra sea adsorbida y el nivel del líquido quede aproximadamente 1 mm por encima de la superficie del adsorbente. Si la pared interna de la columna se ha manchado con la muestra al depositarla, se lava dejando gotear por ella un poco del eluyente (con la ayuda de la pipeta) y se eluye de nuevo hasta que el nivel del líquido vuelva a quedar 1 mm por encima de la superficie del adsorbente. Finalmente se añade 1 ml de etanol y se eluye de

nuevo hasta que el nivel del líquido vuelva a quedar 1 mm por encima de la superficie del adsorbente.

- **Desarrollo/Elución de la columna:** Adicionar, con la ayuda de una pipeta Pasteur y lentamente, 10 ml de etanol en la parte superior libre de la columna y abrir la llave para permitir el flujo del etanol a través de la alúmina. A medida que evoluciona el cromatograma se observa que el azul de metileno eluye a lo largo de la columna, formando una banda de color azul bien diferenciada que se desplaza hacia la parte inferior de la misma, mientras que el naranja de metilo queda retenido en la parte superior. Si es necesario se añadirá más etanol a la columna durante el proceso de elución. Cuando el azul de metileno esté próximo a la salida de la columna se procederá a recoger fracciones en matraces Erlenmeyer numerados de forma consecutiva, hasta que todo el producto se haya recogido y el etanol no presente coloración azul.
- Dejar fluir el etanol a través de la columna hasta que la altura de éste quede 2 cm por encima de la alúmina y llenar la parte superior libre de la columna de agua destilada (“cambio de eluyente”), con la ayuda de una pipeta Pasteur y lentamente. Abrir la llave de la columna y dejar fluir el agua a través de la alúmina. A medida que evoluciona el cromatograma se observa que el naranja de metilo eluye a lo largo de la columna, formando una banda de color naranja bien diferenciada que se desplaza hacia la parte inferior de la misma. Cuando el naranja de metilo esté próximo a la salida de la columna se procederá a la recolección de fracciones siguiendo un procedimiento análogo al anterior para el azul de metileno, hasta que el agua no presente coloración.

4.2. Separación de una mezcla de aminoácidos por cromatografía en capa fina (TLC)

Materiales:

- Cromatoplasmas de gel de sílice de 0,2 mm
- Cámara de desarrollo
- Nebulizador para líquido de revelado
- Capilares de vidrio

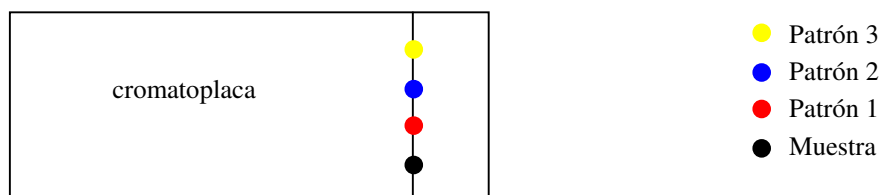
Reactivos/disolventes:

- Disoluciones patrón de aminoácidos: 1mg/ml en etanol al 96 %, 0,5 M en HCl. **Patrón 1:** fenilalanina. **Patrón 2:** β -alanina. **Patrón 3:** ácido aspártico.
- Disolución de revelado: Ninhidrina al 0,3 % (p/v) en n-butanol/ácido acético al 3 % (v/v)
- Fase móvil: N-propanol: NH_3 30 % (7:3, v/v)
- Disolución problema (puede contener uno o varios aminoácidos)

Procedimiento:

- Preparar capilares de vidrio siguiendo las instrucciones del profesor.
- Cargar la cámara de desarrollo con la fase móvil (nivel del líquido dentro de la cámara de aproximadamente 0,5 cm). Cerrar la cámara para que la atmósfera interior se sature de disolvente.

- Trazar en la cromatoplaaca muy suavemente, sin dañar la superficie del adsorbente, y con la ayuda de una regla y un lápiz, la línea de aplicación de muestras a aproximadamente 1 cm del borde inferior. (NOTA: no usar nunca tinta para marcar la cromatoplaaca).
- Depositar, con la ayuda de un capilar de vidrio, una microgota de los patrones y la muestra a analizar sobre la línea de aplicación de muestras de la cromatoplaaca, espaciadas un mínimo de 1 cm entre sí y respecto a los bordes laterales de la cromatoplaaca.



- Dejar que se seque el disolvente e introducir la cromatoplaaca en la cámara de desarrollo.
- Dejar que el disolvente ascienda por la cromatoplaaca hasta un nivel de aproximadamente 1 cm por debajo del borde superior. Extraer la cromatoplaaca de la cámara y marcar el frente del disolvente con la ayuda de un lápiz.
- Dejar que se seque el disolvente (se puede acelerar el proceso de secado mediante el uso de un secador de mano) y revelar la cromatoplaaca por nebulización con la solución de ninhidrina.
- **Calcular el valor de R_f tanto de los patrones como de la muestra problema.**
- **Establecer la composición de la muestra problema en base a los patrones, mediante la comparación de sus respectivos factores de retardo.**

4.3. Separación de una mezcla de dos colorantes por cromatografía en capa fina

Materiales:

- Cromatoplaacas de gel de sílice de 0,2 mm
- Cámara de desarrollo
- Capilares de vidrio

Reactivos/disolventes:

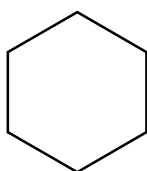
- Etanol al 96%
- Agua destilada
- Mezcla problema: 0,5 ml de una solución de 60 mg de naranja de metilo y 200 mg de azul de metileno en 110 ml de etanol al 96%

Procedimiento:

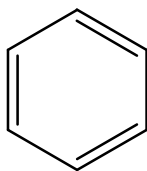
Llevar a cabo una TLC con la muestra problema del apartado 4.1, utilizando etanol al 96% como eluyente. **Justificar las diferencias observadas en la elución de la muestra problema por CC y TLC.**

5. EJERCICIOS

1. ¿Cuál es la principal diferencia entre CC y TLC?
2. ¿Qué tipo de fuerza causa el movimiento de la fase móvil en la cromatografía líquida de adsorción en columna?
3. ¿Qué tipo de fuerza causa el movimiento de la fase móvil en la cromatografía líquida de adsorción en capa fina?
4. ¿Por qué no se puede utilizar tinta para marcar la *línea de aplicación de muestras* en una cromatoplaca?
5. Ordenar según polaridad ascendente:



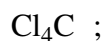
;



;



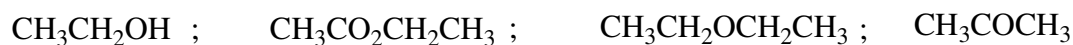
;



;



;



6. Escribir las fórmulas químicas y nombres químicos de: fenilalanina, β -alanina y ácido aspártico.