

PRINCIPIOS DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

4 u 8 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es conseguir la comprensión de la teoría y la metodología de la cromatografía en capa fina.

2. COMPONENTES para 4 u 8 grupos de estudiantes

Esta práctica proporciona suficientes reactivos para un total de 8 separaciones, que pueden dividirse en 4 grupos de prácticas (2 separaciones para cada uno de los 4 grupos) u 8 grupos de prácticas (1 separación para cada uno de los 8 grupos).

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
• Colorantes:	Nevera
A. Azul brillante	Nevera
B. Azul-Rojo	Nevera
C. Amarillo	Nevera
D. Azul claro	Nevera
E. Mezcla de A-D	Nevera
• Solventes:	Nevera
F. Acetato de potasio acuoso (concentrado 10x)	Nevera
G. Citrato de sodio acuoso: isopropanol	Nevera
• 1 capa fina de 10 x 20 cm, placa base de celulosa	Nevera
• 20 pipetas capilares de vidrio (5 µlitros)	

Nota: Ninguno de los componentes esta práctica se han preparado a partir de fuentes humanas.

Nota: Todo el kit de esta práctica se puede almacenar en nevera.

Nota: Todos los componentes de esta práctica se destinan a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni ser administrados o consumidos por los seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Vasos de precipitación de 250 ml (6 a 7 cm de diámetro)
- Regla métricas
- Lápices
- Pipetas 5 o 10 ml
- Pera de succión para pipeta

3. INTRODUCCIÓN

La **Cromatografía en capa fina (Thin layer chromatography, TLC)** es un método muy valioso utilizado en química y bioquímica para la separación y análisis de una amplia variedad mezclas de moleculares. Las **TLC's** se pueden utilizar para separar mezclas de iones inorgánicos, moléculas orgánicas y compuestos biorgánicos tales como pigmentos, lípidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares. La placa de la **TLC** consiste típicamente en una gruesa capa de 0,1 mm de material adsorbente unido a una capa o soporte de plástico. El adsorbente se compone de muchas placas microscópicas. Estas superficies proporcionan un área grande para la separación cromatográfica. Después se aplica un pequeño volumen de solución de muestra a la superficie adsorbente y se deja secar, la placa se coloca en un vaso de precipitados que contiene el disolvente apropiado. Sólo el borde de la placa más cercano a las muestras está en contacto con el disolvente. El disolvente se introduce en el material adsorbente seco y se desplaza hacia arriba a través de la placa arrastrando las muestras. La tasa de migración de los componentes de la muestra sobre el adsorbente depende de su estructura química.

La comprensión de la **TLC** requiere una introducción y la exposición de los principios generales por los que trabajan. La cromatografía de adsorción fue descubierta por el botánico Tswett en 1903. Observó que las soluciones de éter de pigmentos vegetales, tales como las clorofilas, podrían ser separados en diferentes zonas de color haciéndolas pasar a través de una columna que contiene carbonato de calcio. El desarrollo significativo de la cromatografía de adsorción se produjo a principios de los 1930 cuando fue utilizado en la química preparativa de pigmentos. Durante este período, la separación preparativa de compuestos orgánicos incoloros se llevó a cabo con la aparición de los métodos de detección química apropiados. Los geles de sílice y las tiras de papel se utilizan en la década de 1940 para la separación de sustancias solubles en agua, tales como aminoácidos y azúcares. Otros materiales de cromatografía de adsorción común incluyen carbonato de magnesio, silicato de magnesio, alúmina y carbón activado. La mayoría de los materiales de adsorción pueden tener cargas superficiales. Las sustancias que se adsorben a estos materiales son moléculas polares o polarizables. Un ejemplo de una molécula polar es agua.

La molécula que se muestra en la **Figura 1** no tiene carga neta. El átomo de oxígeno tiene una carga ligeramente más negativa que los átomos de hidrógeno, que por lo tanto tienen carga levemente más positiva. Esto es porque el núcleo de oxígeno atrae los electrones cargados negativamente en los enlaces químicos más fuertemente que los núcleos de hidrógeno. Por lo tanto, a pesar de que la molécula de agua es en general eléctricamente neutral, sus átomos individuales poseen carga negativa o positiva parcial. Las moléculas que exhiben estas propiedades se llaman **polares**. Las moléculas que contienen cargas opuestas, o cargas opuestas parciales, poseen un dipolo. El material adsorbente tiene muchos grupos químicos polares y totalmente cargadas (iónico) en su superficie. Las moléculas polares de la muestra pueden

interactuar con estos grupos por dipolo-dipolo e interacciones dipolo-ion. Estas interacciones implican básicamente la atracción entre las regiones con cargas opuestas. Estas interacciones se muestran en la **Figura 2**.

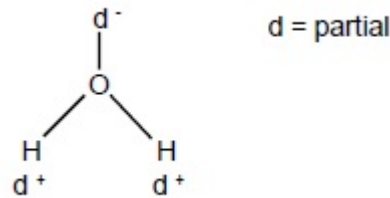


Figura 1

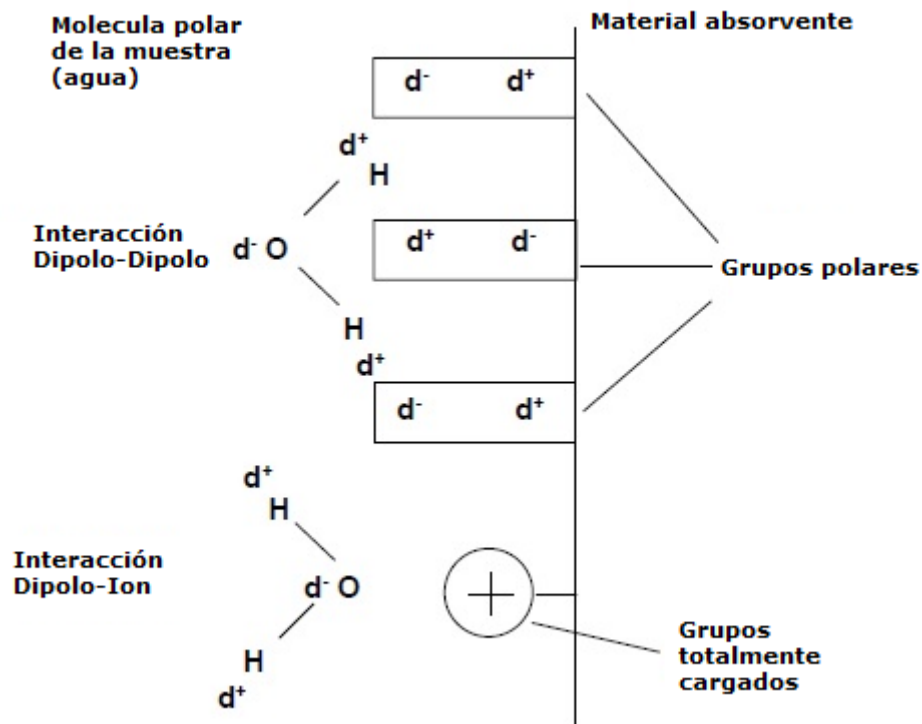


Figura 2

Hay muchos tipos de moléculas que pueden tener una carga positiva o negativa neta. Las moléculas de la muestra cargada interactúan con la superficie de adsorción por las mismas fuerzas químicas descritas. Las placas de **TLC** se pueden preparar también que presenten una gran cantidad de grupos químicos con cargas positivas o negativas netas en la superficie. Las moléculas de la muestra cargada se pueden separar de manera eficiente en estas placas con disolventes que tienen las concentraciones de pH y sal apropiada. Este tipo de **TLC** se llama **intercambio iónico** e implica la interacción de compuestos con cargas netas opuestas. La **TLC** de intercambio iónico normalmente implica interacciones más fuertes que la **TLC** de adsorción.

La **TLC** generalmente es muy sensible a pequeñas diferencias en la estructura química. La estructura afecta a la fuerza y el tipo de interacciones entre la muestra y adsorbente. Además, las diferentes moléculas de la muestra tienen diferentes solubilidades en un disolvente dado. Las diferencias en la solubilidad también dependen de la estructura química. La composición del disolvente se puede variar fácilmente para proporcionar un conjunto virtualmente ilimitado de condiciones para la cromatografía. Por ejemplo, citrato de sodio acuoso: isopropanol (disolvente G) es menos polar que el acetato de potasio acuoso (solvente F), ya que contiene isopropanol y menos agua. El isopropanol es mucho menos polar que el agua. Los colorantes de este experimento migran de manera diferente en el mismo tipo de placa de **TLC** en función de si se utiliza un solvente G o F.

Las diferencias de solubilidad exhibidas por moléculas de la muestra entre las dos fases líquidas es la base de la cromatografía de separación. El ejemplo más obvio de un sistema líquido de dos fases es el petróleo y el agua. En una **TLC** el disolvente se llama **fase móvil**. El líquido que está asociado a la superficie de la placa de **TLC** se llama **fase estacionaria**. La fase estacionaria se compone de capas moleculares de fluido en la superficie de la placa de **TLC**.

Las moléculas de la muestra tendrán una distribución preferente entre las fases estacionaria y móvil en función de su estructura. Las muestras que tienen poca o ninguna solubilidad en la fase móvil y una alta solubilidad en la fase estacionaria migrarán lentamente. Por el contrario, las muestras que tienen poca solubilidad en la fase estacionaria, pero que son muy solubles en la fase móvil tendrán las tasas de migración más rápido.

Un ejemplo del proceso de separación es la cromatografía en papel o en placas de **TLC** de celulosa. La fase estacionaria son las moléculas de agua que hidratan las fibras de celulosa (celulosa es un polímero de glucosa). Este agua de hidratación no se comporta como el líquido "libre" y se comporta como una solución acuosa muy concentrada de un azúcar o polisacárido, es decir, similar a un gel. En la práctica, ambos procesos de separación y adsorción funcionan simultáneamente, en diferentes grados, en el mismo experimento de **TLC**. Por ejemplo, ciertas moléculas de la muestra pueden interactuar directamente con las fibras de celulosa en un proceso de adsorción.

En esta práctica, una mezcla de colorantes se separa en una placa de **TLC** con base de celulosa utilizando dos sistemas de disolventes distintos. El disolvente se debe dejar que corra hasta alrededor de la mitad de la placa. Las moléculas de colorante contienen diferentes tipos y cantidades de grupos químicos cargados y polares. También difieren con respecto a sus pesos moleculares, la geometría y las posiciones y el número de dobles enlaces carbono-carbono.

Una vez se ha completado el experimento y la placa se seca parcialmente, se puede observar una línea ondulada débil en el límite del borde de ataque del disolvente en la placa (el adsorbente). Esta línea se llama el **frente del disolvente**. La distancia recorrida por la muestra a partir de su origen dividido por la distancia del frente del disolvente desde el origen de la muestra se define como la **Rf**. Una sustancia que no migra desde el origen de la muestra tiene un $R_f=0$, mientras que uno que no se adsorbe tiene $R_f=1$. La R_f es un valor característico de una sustancia particular

sometida a cromatografía con un adsorbente y un sistema de disolventes dados. El R_f no puede ser mayor que uno (1.0).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

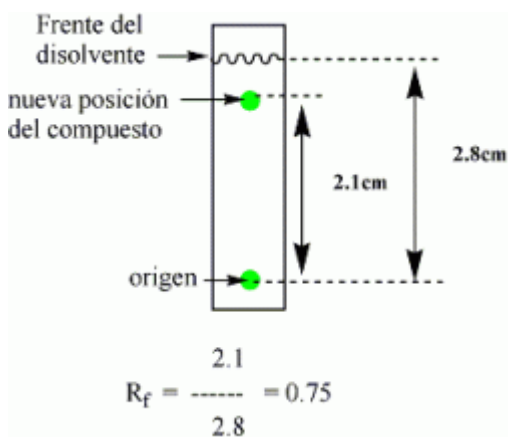


Figura 3

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es obtener una comprensión básica de la teoría y la metodología de la cromatografía en capa fina para lograr la separación de una mezcla de colorantes.

4.1 Precauciones

Las buenas prácticas de laboratorio nos obligan a utilizar los guantes y las gafas de seguridad durante la realización de esta práctica.

4.2 Preparaciones previas

Preparación de placas de capa fina

1. Manejar la placa por sus bordes. Divida la placa en ocho trozos de 5 x 5 cm, dibujar las líneas con un lápiz romo utilizando una regla sobre la superficie adsorbente de la placa de celulosa.

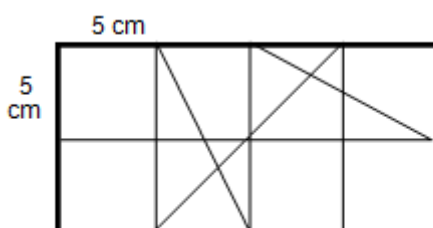


Figura 4

2. Cortar cuidadosamente la placa en 8 piezas con un par de tijeras afiladas. No utilizar un cutter. Cada grupo de prácticas necesitará dos piezas.
 3. Medir 1 cm desde un borde en cada pieza y trace una línea recta con un lápiz. No presionar con fuerza, porque puede separar la celulosa de su placa de apoyo. Esta será la **línea de origen** de la muestra.

Preparación de los disolventes

(Debe ser preparado justo antes de realizar la práctica)

1. El acetato de potasio acuoso (**disolvente F**) es un concentrado 10x. Añadir 1 ml de solución concentrada por cada 9 ml de agua destilada.
2. El citrato de sodio acuoso:isopropanol (**disolvente G**) se utiliza directamente, sin diluir.
3. Para cada grupo de prácticas, marcar de dos vasos precipitación de 250 ml, uno como "F" y otro como "G".
4. Añadir aproximadamente 4 ml de acetato de potasio acuoso diluido (**disolvente F**) a cada vaso de precipitados de marcado como "F" (o simplemente líquido suficiente para cubrir la parte inferior).
5. Añadir aproximadamente 4 ml de citrato de sodio acuosa:isopropanol (**disolvente G**) a cada vaso de precipitación marcado como "G".

Preparación de los colorantes

(Debe ser preparado justo antes de realizar la práctica)

1. Añadir 150 µl de agua destilada a cada tubo de colorante (colorantes A-E). Permitir que las muestras se hidraten durante 5 minutos. Agitar las muestras con un agitador vórtex o golpear con el dedo el microtubo para mezclar los colorantes hasta que el color de cada uno se haya distribuido de manera uniforme.
2. Los colorantes se pueden alícuotar, 15 µl de cada colorante por tubo para los 4 u 8 grupos de prácticas.

Enjuague de pipetas

1. Llenar la pipeta por capilaridad con agua destilada.
2. Liberar el agua tocando una toalla de papel con la pipeta.
3. Repetir el procedimiento.
4. Dejar secar al aire.

5. PRÁCTICA

Instrucciones Generales para la aplicación del colorante a la placa de capa fina

1. Utilizar una pipeta capilar nueva o enjuagada (asegurarse que no quedan restos de líquido en su interior) para cada colorante. Cada marca en la pipeta corresponde a 1 microlitro. El volumen total calibrado es de 5 microlitros.
2. Golpear suavemente cada tubo de colorante para que todo el líquido vaya al fondo del microtubo.
3. Introducir la pipeta capilar en el microtubo del colorante. Colocar el extremo de la pipeta capilar lo más próximo posible a la marca de graduación presente por debajo de la superficie del colorante en el microtubo. Dejar que el líquido llegue a la segunda o tercera marca de la graduación de la pipeta y luego retirarla.

iUn consejo útil!

El volumen exacto retirado con la pipeta capilar no es crítico siempre que el nivel del colorante coincida con una de las marcas de graduación de la pipeta. Si se retiran más de 5 microlitros, toque con la punta de la pipeta una toalla de papel justo el tiempo suficiente para que el nivel del colorante descienda a una marca de graduación.

4. Para aplicar el tinte a la placa de capa fina:

- Mantener la pipeta verticalmente y tocar el extremo de la línea de origen de la muestra en la placa de capa fina adsorbente hasta que el nivel de tinte se ha reducido a la siguiente marca de graduación.
- Levantar rápidamente la pipeta a la placa de adsorbente.

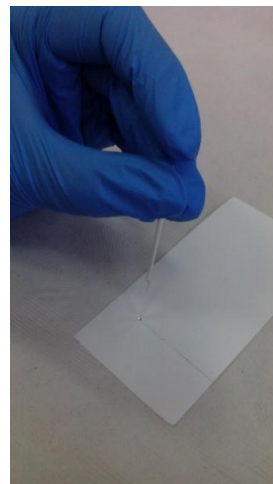


Figura 5

Aplicación de colorantes a la placa F y G

1. Obtener dos placas de capa delgada. En la parte superior (borde opuesto de la línea origen de la muestra), marcar una como **Placa F** y la otra como **Placa G**.

Para cada placa:

2. Iniciar la aplicación de los colorantes con el colorante **Azul brillante** (A) en el lado izquierdo de la placa. Aplicar 1 microlitro en cada placa, sobre la **línea de origen** dibujada con lápiz.

3. Usando una pipeta nueva o enjuagada, aplicar 1 microlitro del colorante **Azul-Rojo** (B) a la derecha del colorante A en ambas placas. Deja un pequeño espacio entre las muestras.

4. Aplicar 1 microlitro del colorante **Amarillo** (C) a la derecha del colorante B en ambas placas.

5. Aplicar 1 microlitro del colorante **Azul claro** (D) a la derecha del tinte C en ambas placas.

6. Aplicar 1 microlitro del colorante **Mezcla de A-D** (E) a la derecha del tinte D en ambas placas.

7. Dejar secar las manchas de la muestra durante 5 minutos.

Cromatografía

8. Colocar el borde inferior de la **Placa F** en un vaso de precipitados que contenga **acetato de potasio acuoso (disolvente F)**.

Es importante que el nivel del disolvente sea menor que el origen de la muestra. Colocar la placa hacia arriba usando la pared del vaso como soporte.

9. De la misma forma, colocar la **Placa G** en un vaso de precipitados que contenga **citrato de sodio acuoso:isopropanol (disolvente G)**.

10. Dejar que las placas en contacto con los disolvente durante aproximadamente 12 minutos.

El frente del disolvente no debe llegar al extremo superior de las placas en este momento.

11. Antes que el frente del disolvente alcance el borde superior, retirar las placas de los vasos con disolventes y dejarlas sobre una toalla de papel para que se sequen, manteniendo siempre la parte adsorbente hacia arriba.

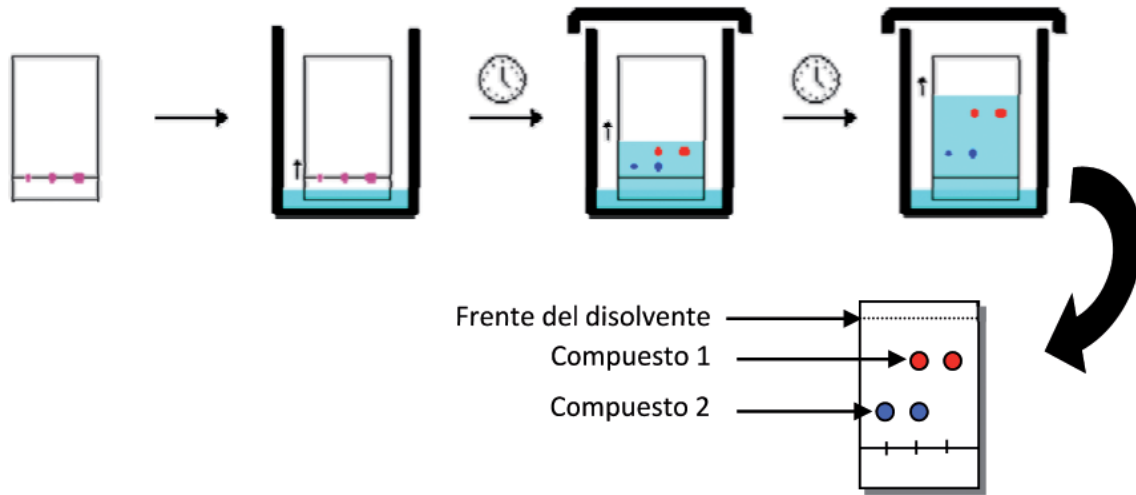


Figura 6

12. Calcular la **Rf** de los colorantes A - D en ambas placas:

- Medir, en milímetros, las distancias desde el origen de la muestra (tomando el centro aproximado como punto de origen). Esto puede ser más difícil con el **colorante D**.
- La **Rf** es la distancia recorrida por la muestra a partir de su origen, dividido por la distancia del frente del disolvente desde el origen. El **Rf** no puede ser mayor que 1.

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

Los resultados esperados en esta práctica se presentan en la **figura 7**.

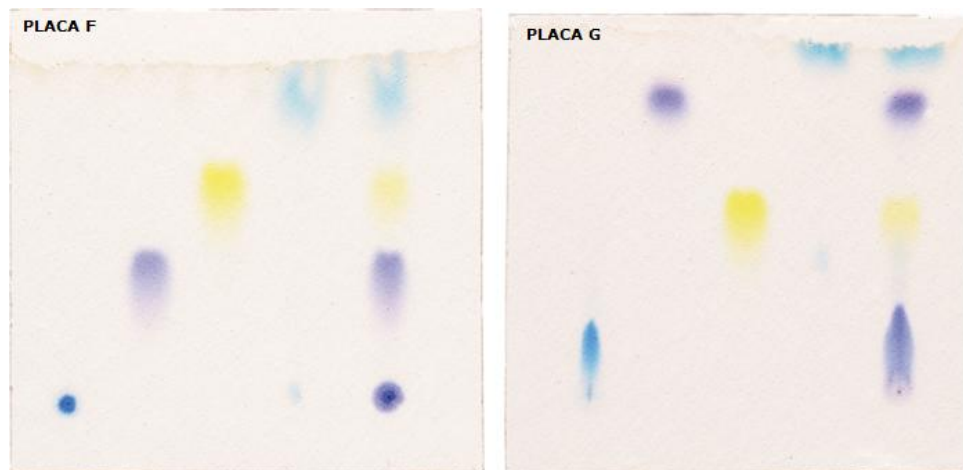


Figura 7

6.2 Preguntas

1. ¿Los valores **Rf** de los cada colorante son iguales con los **disolvente F** y **disolvente G**?
2. Considerando cada una de las cromatografías de separación por separado. ¿Qué colorante son más solubles en el **disolvente F**? ¿Qué colorantes son más solubles en el **disolvente G**?
3. Considerando cada una de las cromatografías de separación por separado. ¿Qué colorante está adsorbido más fuertemente al **disolvente F**? ¿Qué colorante se absorbe con menos fuerza al **disolvente F**?
4. Supongamos que un "**disolvente H**" que tiene una concentración mayor de isopropanol que el **disolvente G** se utiliza en la práctica. Predecir si un colorante se desplazará a una distancia menor o mayor que con el **disolvente F** o el **disolvente G**. ¿Por qué?
5. La **TLC** puede ser uno de los métodos usados para ayudar a identificar un compuesto desconocido. Explicar cómo esto puede llevarse a cabo, utilizar el ejemplo de los colorantes.