

GUIA DE LABORATORIO

CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA Y EN COLUMNA

Autora: Martha Lucia Ruiz Benitez

Programa académico: Química y Farmacia

Agosto 2020

Universidad Simón Bolívar



1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía es una técnica de análisis químico, descubierta por el botánico Mikhail Tswett en 1906, donde es utilizada para separar los componentes y/o analitos presentes en mezclas complejas. Permite determinar las propiedades físico-químicas de los componentes aislados dependiendo de su solubilidad, tamaño, diferencia de cargas, grado de pureza, su posterior caracterización de las diferentes biomoléculas mediante manchas o gráficos del cromatograma y consta de dos fases: la fase estacionaria (usado para retener los componentes de la mezcla) y la fase móvil (usado para arrastrar los compuestos de la mezcla).

Existen diferentes técnicas de cromatográficas y de acuerdo con su clasificación en la disposición de la fase estacionaria está la cromatografía plana: cromatografía de papel y la de capa fina y la cromatografía en columna: cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos.

2. OBJETIVOS

- ❖ Conocer las técnicas de cromatografía en capa fina, en columna y sus principales características.
- ❖ Separar los diferentes pigmentos fotosintéticos mediante la técnica de cromatografía.
- ❖ Conocer las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas mediante la cromatografía por columna.

3. MATERIALES

- ❖ Matraz erlenmayer
- ❖ Probeta
- ❖ Vaso de precipitados 100 mL
- ❖ Vaso de precipitados 250 mL
- ❖ Agua
- ❖ Tubos capilares
- ❖ Espátula
- ❖ Pinzas
- ❖ Regla
- ❖ Pipetas pasteur de plástico
- ❖ Secador de pelo
- ❖ Tanque cromatográfico
- ❖ Placas cromatográficas
- ❖ Columnas cromatográficas
- ❖ Etanol
- ❖ Sustancias reveladoras (Vainillina o Anisaldehído)



4. PROCEDIMIENTO

- Separación de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos vegetales son responsables de los colores de las plantas cuya función es captar energía luminosa durante la fotosíntesis para convertirlas en energía química. Los principales pigmentos son: la clorofila A que proporciona el color verde azulado, la clorofila B proporciona el color verde amarillento, los carotenos que proporcionan el color naranja y las xantofilas que proporcionan el color amarillo en los vegetales.

Para la obtención y separación de los pigmentos fotosintéticos se lleva a cabo la cromatografía en papel siguiendo esta metodología:

1. Colocar en un mortero hojas de espinaca, adicionar un poco de alcohol y triturar hasta que quede homogeneizada la muestra.
2. Filtrar el líquido mediante un embudo que tenga papel filtro
3. Colocar tiras de papel filtro y colocarlas dentro del vaso donde se encuentra la muestra vegetal (aquí el papel filtro es la fase estacionaria)
4. Esperar de 15 a 30 minutos para que los pigmentos asciendan por el papel para su posterior separación.
5. Observar los diferentes colores correspondientes a los pigmentos presentes en la hoja de espinaca

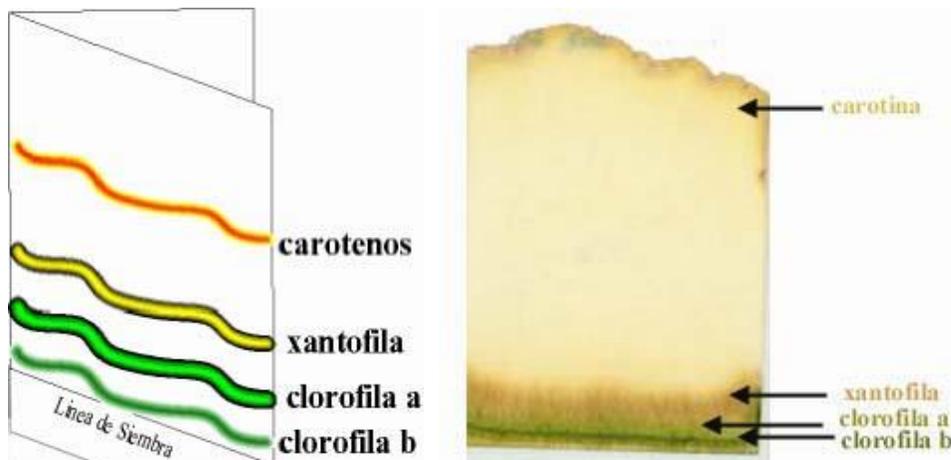


Figura 1. Cromatografía en papel para separar mezclas homogéneas.
Fuente: Carlos González. Pigmentos fotosintéticos. 2002.



- **Cromatografía de capa fina (delgada)**

La cromatografía en capa fina también llamada TLC (en inglés thin layer chromatography) consiste en una técnica analítica que sirve para separar mezclas con moléculas orgánicas, comparar muestras de acuerdo con su estructura química, su liposolubilidad, su hidrosolubilidad y determinar el grado de pureza de un compuesto. Presenta como fase estacionaria gel de sílice (SiO_2), alúmina (Al_2O_3), silicato de magnesio, celulosa, de material adsorbente unido a una capa o soporte de plástico con un grosor aproximado de 0,1 mm que interaccionan con las muestras (soluto) por enlaces de hidrógeno y por interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo. Por otro lado, presenta la fase móvil es proporcionada por un eluyente (disolvente) cuya función es arrastrar los compuestos de la mezcla y los disolventes mayormente empleados son: el hexano, tetraclorometano, cloroformo, diclorometano acetato de etilo y acetona.

En relación con la metodología correspondiente a esta técnica, se pueden separar aminoácidos de una mezcla producto de la hidrólisis de proteínas o también mediante extractos de frutas para determinar su composición de aminoácidos. Adicionalmente, se usan compuestos de referencia (patrones) de naturaleza química conocida para poder comparar la muestra de interés. La respectiva metodología correspondiente es:

1. Usar como base una mezcla de sustancias, en donde se quiere verificar si presentan compuestos polares y no polares.
2. Se corta con un bisturí las placas cromatográficas correspondientes al número de muestras a analizar.
3. Se marca con lápiz y a una distancia de 1cm del borde inferior de la placa y se marcan de forma separada (a 1cm de distancia) los puntos correspondientes a las muestras a analizar y del patrón a comparar.
4. Con un capilar colocar las respectivas muestras en pequeñas cantidades en los puntos correspondientes
5. Se introduce la placa en el tanque cromatográfico de forma que el líquido no moje la línea y posteriormente cerrar la tapa para que no se evapore la fase móvil y se deja alrededor de 30 minutos (el tiempo depende de la velocidad del corrido y de la naturaleza de la muestra).
6. Se retira la placa y se marca el punto alcanzado por la fase móvil y se secan con aire caliente (se puede usar un secador) hasta que no haya olor de reactivo.
7. Analizar los resultados de la placa mediante la visualización de manchas correspondientes a cada compuesto. Si no son visibles, se pueden visualizar mediante técnicas de revelado como el uso de agentes reveladores como la ninhidrina (aminoácidos), 2,4 - dinitrofenilhidracina (para aldehídos y cetonas), verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos), entre otros y la visualización de los compuestos por luz ultravioleta (254 nm).
8. La posición y distancia de la mancha de interés se analiza mediante la siguiente fórmula:



En donde se realiza el cálculo correspondiente para determinar el valor de R_f (factor de retención) (ver figura 2).

$$R_f = \frac{\text{(a) distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{(b) distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$$

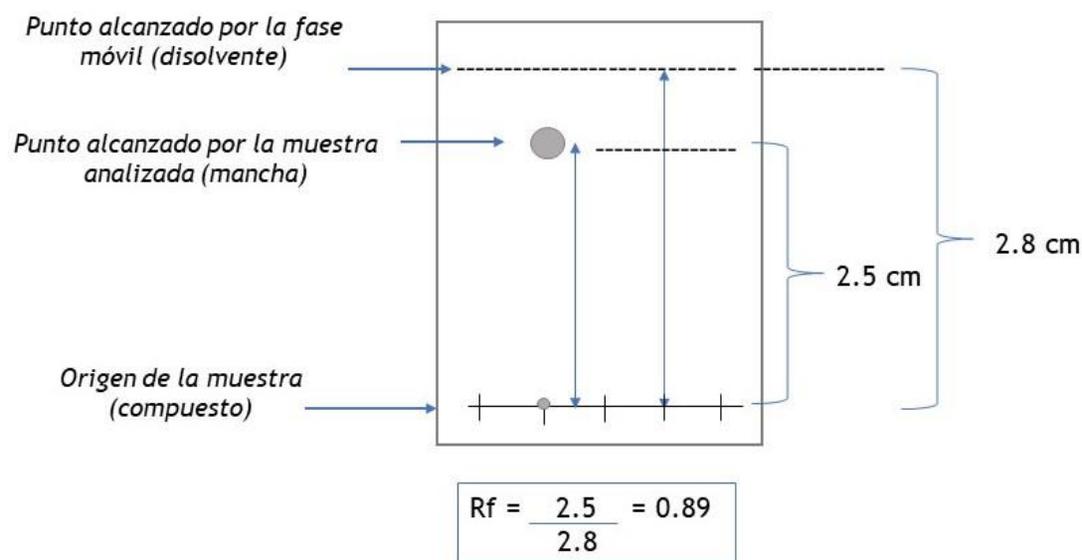


Figura 2. Determinación del valor de R_f .

Fuente: Propia

Y dependiendo de la fase estacionaria usada y la naturaleza del eluyente usado se puede determinar que los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.

- **Cromatografía por columna (preparativa)**

Esta técnica permite aislar compuestos de una mezcla, se realiza mediante el uso de un tubo cilíndrico vertical (columna de vidrio), el cuál en su interior lleva un soporte sólido adsorbente actuando de fase estacionaria y por donde pasa la fase móvil. Para crear la fase estacionaria son utilizados el gel de sílice (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3), y las sustancias que atraviesan esta fase pasan por presión, por gravedad o por capilaridad.

De forma general la cromatografía por columna es usada para separar proteínas y su separación depende de la matriz con que esté hecha la fase estacionaria permitiendo o no la interacción con la matriz y su retención y posterior aislamiento. Estas matrices juegan un papel importante en la finalidad de producto obtenido y existen variantes como lo son la

cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, entre otras.

La metodología a tener en cuenta es:

1. Preparar la columna de vidrio rellenándola con el gel de sílice y arena y compactar la matriz mediante el paso del eluyente (mezcla de acetato de etilo y hexano) y por medio de presión de aire.
2. Adicionar la muestra (diluida con un solvente) que se quiere separar en el frasco correspondiente al reservorio del eluyente (el disolvente debe estar en contacto con la matriz).
3. Depositar el eluyente en cantidades suficientes para aislar el número correspondientes de fracciones que se requieran (ejemplo: si se quieren aislar 20 fracciones de la cromatografía con un volumen de 20 mL en cada tubo, debe usarse 400 mL del diluyente antes de iniciar el proceso de aislamiento)
4. Recoger las fracciones en tubos de forma continua (uno tras otro) mediante aproximadamente 15 minutos (depende la naturaleza del soluto) y después apagar la bomba del equipo y cerrar la llave de la columna.
5. Observar el cambio de color de las fracciones recolectadas y analizar las fracciones (eluatados) obtenidas mediante la cromatografía en capa fina.
6. Eliminar el disolvente por rotavapor y analizar los componentes obtenidos de la mezcla mediante técnicas empleadas en química analítica.

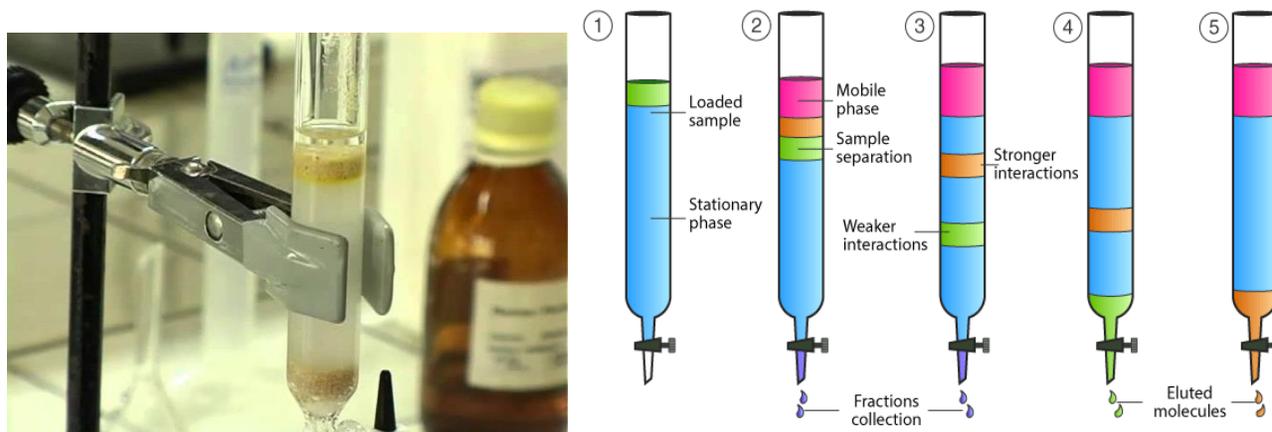


Figura 3. Montaje de cromatografía por columna

Fuentes: Cosmos. Maquinaria y equipo, Metrología, análisis y control. 2017 y <https://byjus.com/chemistry/column-chromatography/>



5. BIBLIOGRAFÍA

- Cosmos. Maquinaria y equipo, Metrología, análisis y control. 2017.
- González Carlos. Pigmentos fotosintéticos. 2002.
- <http://www.qfa.uam.es/qb/practicas/P6-guion.pdf>
- <https://byjus.com/chemistry/column-chromatography/>
- Polo Díez L.M.. “Fundamentos de Cromatografía” Dextra Editorial, 2015
- Poole CF. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. J Chromatogr A. 2003;1000(1-2):963-984. doi:10.1016/s0021-9673(03)00435-7
- Sajewicz M, Kowalska T, Sherma J. Sample Preparation for Thin Layer Chromatography. Adv Chromatogr. 2017;53:301-329.
- Sherma J. Modern thin-layer chromatography. J AOAC Int. 2008;91(5):1142-1144.
- Técnicas Cromatográficas. Facultad de Química Analítica Instrumental II. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.
- Uzcátegui Arrieta Cristina. Técnicas de separación. Introducción a las separaciones cromatográficas. 2018.

PREGUNTAS

1. ¿Qué factores influyen en una separación por cromatografía de capa fina y por columna?
2. ¿Indique que eluyentes son más comunes usados en la cromatografía en capa fina y cromatografía de columna?
3. ¿Qué función tienen los reveladores en la cromatografía en capa fina, cuáles son los más comunes y químicamente cómo interactúan con las muestras?
4. Explique las diferentes técnicas cromatográficas
5. La tabla muestra los resultados obtenidos en una cromatografía. Explique el significado de R_f y la significancia de los valores. Ordene los analitos de menor a mayor en cuanto a su afinidad por la fase móvil (tener en cuenta que la fase en polar). Justifique.

Analito	R_f
Arginina	0,23
Lisina	0,76
Glutamina	0,37