

CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA Y COLUMNA

Autores: Antonio Matthew Méndez, José
Guillermo Penieres Carrillo y Fernando Ortega
Jiménez Proyecto DGAPA-PAPIME UNAM
PE206117

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

Departamento de Ciencias Químicas
Sección de Química Orgánica





D. R. © UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Excepto donde se indique lo contrario esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución No comercial, No derivada, 4.0 Internacional (CC BY NC ND 4.0 INTERNACIONAL).

ENTIDAD EDITORA

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México.

FORMA SUGERIDA DE CITAR: Méndez, Antonio Matthew, Penieres Carrillo, José Guillermo y Ortega Jiménez, Fernando (septiembre 2023). *Cromatografía en Capa fina y Columna (monografía)*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

Contenido

Objetivo	1
Introducción.....	1
Cromatografía	1
Tipos de cromatografía	1
Cromatografía en capa fina	2
Aplicación de las muestras	2
Elección del eluyente	2
Desarrollo de la cromatografía.....	3
Revelado de los componentes	3
Ventajas de la cromatografía en capa fina	4
Cromatografía en columna.....	4
Elección del adsorbente	5
Apéndice	6
Fase estacionaria.....	6
Fase móvil	6
Eluir.....	6
Eluyente	6
Muestra	6
Componentes de la muestra	6
Referencias	6

Objetivo

Proporcionar a los estudiantes de las licenciaturas en Ciencias Químico-Biológicas y áreas afines una guía fácil que les permita acceder de una manera directa y clara a los conceptos de cromatografía, particularmente cromatografía en capa fina y cromatografía en columna a través de un material digital de apoyo.

Introducción

Los métodos cromatográficos son procesos de separación que involucran la transferencia reversible de un compuesto que está adsorbido en una fase estacionaria (adsorbente) a una fase móvil (disolvente).

La separación surge de las interacciones mutuas de componentes de una muestra: disolvente y adsorbente. El adsorbente está presente en exceso, con una gran superficie y con sitios polares capaces de unir reversiblemente pequeñas concentraciones de sustancias por un proceso esencialmente electrostático. El disolvente compite con los componentes de la muestra por los sitios de unión. Estos componentes son desplazados reversible y continuamente en la dirección del flujo del disolvente. El proceso puede describirse como un equilibrio competitivo en donde hay una partición de los componentes entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Entre más polar sea un compuesto, más fuerte se adsorbe en la fase estacionaria, por lo que su migración a lo largo de ella es menor, siendo eluido (arrastrado) más lentamente por la fase móvil que los componentes menos polares. De este modo, la separación selectiva de los componentes de una muestra por cromatografía se debe a las diferencias de migración de los componentes individuales a lo largo de la fase estacionaria.

En el campo laboral la cromatografía es de los métodos cuantitativos más valorados, importantes y exactos que existen, ya que con una serie de muestreo y de pruebas se puede garantizar que un producto cumple con los estándares de calidad establecidos por la empresa, además de que se pueden detectar impurezas no deseadas, mejorar el proceso y, por ende, tener un producto más competitivo.

Hoy en día casi no hay campo de la química, biología, medicina, etc., en el que no se utilice la cromatografía en alguna de sus formas.

Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes. En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas): una móvil (FM) y otra estacionaria (FE), que se mueven una con respecto a la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase móvil y sus componentes se distribuyen entre la fase estacionaria y la móvil; invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación. Si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil el producto se mueve rápidamente, mientras que, si se encuentra mayormente en la etapa estacionaria, el producto queda retenido y su salida es más lenta.

Tipos de cromatografía

Existen diferentes criterios de clasificación de la cromatografía:

Por la naturaleza de sus fases:

- a) Cromatografía líquido – líquido.
- b) Cromatografía gas – líquido.
- c) Cromatografía líquido – sólido.
- d) Cromatografía gas – sólido.

Atendiendo al proceso químico-físico que va a protagonizar el proceso de separación (siendo este el criterio más coherente de clasificación):

- a) Cromatografía de Adsorción (líquido - sólido o cromatografía de fases normales).
- b) Cromatografía de Reparto (o líquido - líquido), se basa en las características de solubilidad relativa de los solutos entre la fase móvil y una fase estacionaria de un líquido no polar. La fase líquida se impregna a un soporte inerte de sílice o, en el caso de cromatografía de fase invertida, se une químicamente.

c) Cromatografía de Intercambio iónico.

d) Cromatografía de Exclusión.

Con base en la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria:

a) Cromatografía plana:

-Cromatografía en papel.

-Cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés).

b) Cromatografía en columna:

-Cromatografía de gases (GC).

-Cromatografía líquida (LC).

-Cromatografía líquido – líquido.

-Cromatografía sólido – líquido.

Las más utilizadas en química orgánica es la cromatografía sólido-líquido es sus dos variantes: cromatografía en capa fina y cromatografía en columna que a continuación de detallan.

Cromatografía en capa fina

Se realiza sobre papel u otro material sólido. Suele llamarse también “en capa delgada” porque la fase estacionaria recubre un soporte plano y rígido.

Para la cromatografía en capa fina (TLC) la fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor fijadas sobre un soporte sólido generalmente de aluminio, plástico o vidrio. Después de aplicar el analito cerca de la parte inferior de la placa seca, el disolvente empieza a producir la separación.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

Polaridad de los compuestos orgánicos en orden creciente:

hidrocarburos < olefinas < fluor < cloro < nitro < aldehído

aldehído < éster < alcohol < cetonas < aminas < ácidos < amidas

Aplicación de las muestras

Los productos para examinar se disolverán, cuando sea posible, en una sustancia orgánica no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación. A menudo se necesitan disolventes polares; la mezcla cloroformo: metanol (1:1) es efectiva. Frecuentemente se emplean disoluciones al 1%, de manera que al aplicar 2 µl resulta en la carga 20 µg de producto sólido. Muchos reactivos de revelado llegan a detectar 0.1 µg de material, de manera que con esta carga puede llegarse a observar un 5% de impurezas. Existen una gran variedad de micropipetas y microjeringuillas para realizar el proceso de siembra de la muestra a analizar, también pueden usarse tubos capilares. El proceso de siembra se realiza tocando con la punta del capilar (micropipeta, jeringuilla, etc.) sobre la placa preparada, dejando una distancia al borde inferior de 0.5 centímetros aproximadamente. A esto se le conoce como punto de aplicación.

Una vez colocada la muestra se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar.

Elección del eluyente

La elección del eluyente dependerá del componente que se va a separar y del material en el que la separación se lleva a cabo.

Principales eluyentes en orden creciente de polaridad:

Éter de petróleo

Hexano

Tolueno

Benceno

Éter dietílico.

Tetracloruro de carbono

Cloroformo

Diclorometano

Acetato de etilo

Acetona

Etanol.

Metanol

Agua.

Ácido acético.

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares (Figura 1).

En primer lugar, se aplican eluyentes poco polares, se puede seguir utilizando la misma placa para emplear

otros eluyentes más polares, hasta dar con el más apropiado.

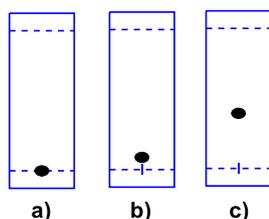


Figura 1. a) Muestra sin aplicar ningún eluyente. b) Aplicando un eluyente poco polar. c) Aplicando un eluyente más polar. Fuente: elaboración propia.

Otra técnica para realizar la elección del eluyente consiste en sembrar varias muestras distanciadas suficientemente, y aplicar con un tubo capilar distintos eluyentes sobre el centro de cada muestra. Esto permite desarrollar cada eluyente radialmente por capilaridad, de forma que se aprecie el eluyente con el cual la separación se realiza de una manera más eficaz.

Desarrollo de la cromatografía

El desarrollo de los cromatogramas en capa fina se realiza normalmente por el método ascendente, esto es, al permitir que un eluyente suba por una placa casi en vertical, por la acción de la capilaridad (Figura 2). La cromatografía se realiza en una cubeta o cámara cromatográfica. Para conseguir la máxima saturación posible de la atmósfera de la cámara, las paredes se tapizan con papel impregnado del eluyente. A veces pueden obtenerse separaciones mejores sin poner papeles en las paredes, cosa que no debe olvidarse.

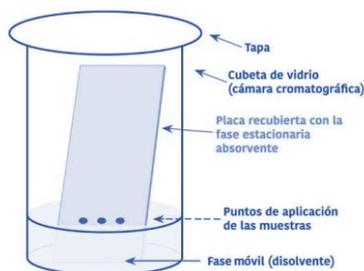


Figura 2. a) Cromatografía ascendente en capa fina. Fuente: elaboración propia con base en (Gilbert, & Martin, 2010).

Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen. La mancha en una placa se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil. El grado de retención en cromatografía plana de superficie se expresa como el factor de retardación o índice de retención R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distancia de desplazamiento del soluto}}{\text{Distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

La constante R_f es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa

como una fracción decimal, mide la retención de un componente.

En la Figura 3 se observa un ejemplo sobre el R_f , que mide la movilidad relativa de cada componente con respecto al máximo posible, la distancia recorrida por el frente de fase móvil.

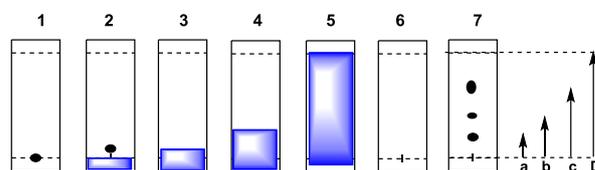


Figura 3.

1: Aplicación de la muestra.

2: Se sumerge el extremo inferior en la fase móvil.

3 a 5: La fase móvil asciende por capilaridad y se va produciendo la separación de los componentes.

6: Se marca el frente de avance del disolvente y se deja secar la placa.

7: Revelado de los componentes ya separados y medida de su avance.

Fuente: elaboración propia con base en (Gilbert, & Martin, 2010).

Componente 1: $R_f = a / D$

Componente 2: $R_f = b / D$

Componente 3: $R_f = c / D$

Para averiguar si dos compuestos son iguales, se colocan ambos sobre la misma placa y se desarrollan con varios eluyentes. Una vez desarrollados se calculan los R_f y si son distintos puede deducirse con toda seguridad que no se trataba del mismo compuesto; si los R_f son iguales los compuestos pueden ser iguales o no serlo.

Si se sospecha que dos compuestos son muy parecidos se eluyen sobre la misma placa con el mismo eluyente u otros de menor polaridad, hasta apreciar una separación mínima. En este caso no se pueden usar reveladores químicos, ya que alterarían los compuestos, sino un indicador ultravioleta.

Revelado de los componentes

Si los compuestos separados no son coloridos es necesario revelar la posición de dichos compuestos, para ello existen dos tipos de métodos:

Métodos químicos.

Métodos físicos.

Métodos químicos

Consisten en realizar una reacción química entre un reactivo revelador y los componentes de la placa. Generalmente se utiliza el yodo como reactivo revelador, el cual forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrón), pero las manchas desaparecen con el tiempo; aquí es conveniente señalar las manchas aparecidas.

Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras.

El tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado.

Además de estos reveladores generales, existen otros específicos:

2,4-dinitrofenilhidrazina (para aldehídos y cetonas).

Verde de bromocresol (para ácidos carboxílicos).

para-dimetilaminobenzaldehído (para aminas).

Ninhidrina (para aminoácidos).

Métodos físicos

El más común consiste en añadir al adsorbente un indicador fluorescente, de tal forma que al colocar la placa bajo una lámpara ultravioleta y, dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes. En otros casos aparece toda la placa fluorescente excepto donde hay componentes.

Algunos compuestos poseen cierta fluorescencia (aunque no es normal) con lo que pueden ser detectados directamente en una lámpara de ultravioleta.

La detección y localización de las manchas en la placa de TLC se hacen observando los cambios en la fluorescencia o adsorción en el U.V. de un indicador que se incorporó a la fase estacionaria. Cuando no hay solutos presentes toda la placa flúorese bajo luz UV, pero si llega a residir el soluto aparecen como manchas oscuras. También podemos observar el color de los compuestos después de reaccionar con reactivos específicos para grupos o metales rociados sobre la placa, como la fluorescamina para aminas.

Ventajas de la cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa, etc.) ya que el utillaje que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.

La ventaja principal de la TLC es que se analizan simultáneamente la muestra y el patrón, mientras que en la cromatografía en columna las muestras se analizan individualmente. Además, las muestras que son difíciles de separar se pueden resolver utilizando

dos disolventes diferentes por desarrollo de la placa en direcciones perpendiculares.

Otra ventaja es que, si los componentes no se pierden en los vapores que rodean la placa, todos estarán en algún lugar de esta, mientras que en la cromatografía en columna algunos componentes no eluyen y se pierden. Y a esto se suma que la placa de TLC se usa una sola vez, por lo que se pueden utilizar condiciones severas de separación.

Cromatografía en columna

Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento. Según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria, estas se separarán.

Después de cada cromatografía se puede obtener información del cromatograma, tanto cualitativa (para identificar los distintos compuestos de la mezcla) como cuantitativa (para poder obtener la cantidad y composición de las sustancias separadas). Las fases estacionarias pueden ser de materiales muy distintos, existen derivados de dextranos (sephadex), derivados de agarosa, poliacrilamida, esferas de vidrio, sílice, etc.

Existen distintos tipos de cromatografía en columna:

Cromatografía de intercambio iónico: Se basa en la afinidad de los iones en solución por los sitios de polaridad opuesta que se encuentran en la fase estacionaria.

Cromatografía de exclusión: Se basa en la habilidad de materiales de porosidad controlada para separar los componentes de una mezcla de acuerdo con el tamaño y forma de las moléculas.

Cromatografía de afinidad: Se fundamenta en la especificidad de algunas macromoléculas biológicas, las cuales se unen específicamente a la fase estacionaria, y para separar dicha macromolécula bastará con variar el pH una vez que la columna este limpia y solo se encuentre de interés.

Cromatografía de adsorción: Se basa principalmente en las diferencias y en la afinidad relativa de los compuestos por el sólido utilizado como fase estacionaria. Las separaciones obtenidas se determinan casi exclusivamente por interacciones polares, siendo la fase estacionaria más polar que la fase móvil.

Cromatografía de partición: La fase estacionaria es un líquido soportado en un sólido inerte. Otra vez, la fase móvil puede ser un líquido (cromatografía de partición líquido-líquido) o un gas (cromatografía de partición

gas-líquido, GLC). La cromatografía en papel es un tipo de cromatografía de partición en la cual la fase estacionaria es una capa de agua adsorbida en una hoja de papel. La cromatografía de gases (GC) y de alta resolución (HPLC) son técnicas de partición ampliamente empleadas.

Cromatografía de fase reversa: El mecanismo de separación depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. La naturaleza actual de las interacciones de unión hidrofóbica asume que la interacción de unión es el resultado de un efecto entrópico favorable. Las condiciones iniciales de unión de la fase móvil usadas en la cromatografía de fase reversa son acuosas, lo cual indica un grado alto de estructuras de agua organizadas alrededor de las moléculas de soluto y el ligando inmovilizado. A medida que el soluto se une al ligando hidrofóbico inmovilizado disminuye el área hidrofóbica expuesta hacia el disolvente. Así, el grado de organización de la estructura de agua disminuye con un favorable aumento de entropía en el sistema de fusión.

En química orgánica se utiliza la cromatografía sólido-líquido de adsorción.

La cromatografía en columna es quizá el método más utilizado para la separación, a la vez que para la purificación de diferentes compuestos orgánicos que se encuentren en estado sólido o líquido.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria utilizada, es decir, el adsorbente, se coloca en el interior de una columna de vidrio, la cual finaliza con una llave para controlar el paso de sustancias al exterior de la columna. La fase estacionaria se impregna con el eluyente o fase móvil. Enseguida depositamos la mezcla orgánica que nos interesa separar por la parte superior de la fase estacionaria, y así la fase móvil podrá ir atravesando el sistema.

Los compuestos que se encuentran disueltos en la fase móvil poco a poco saldrán de la columna cromatográfica y se recogen en fracciones. Las fracciones menos polares, que son por lo general las que se retienen poco o nada en el adsorbente, serán las primeras en salir de la columna. En cambio, las sustancias más polares quedan retenidas por más tiempo en el adsorbente, y a menudo es necesario el uso de diferentes disolventes para incrementar su polaridad y que sean arrastradas por estos (Figura 4).

El tiempo que se necesita para hacer fluir un compuesto por la columna se conoce como tiempo de retención. Esta etapa varía, siendo característica de cada compuesto en condiciones cromatográficas determinadas que dependen del adsorbente usado, el disolvente, la presión y el diámetro que tenga la columna utilizada.

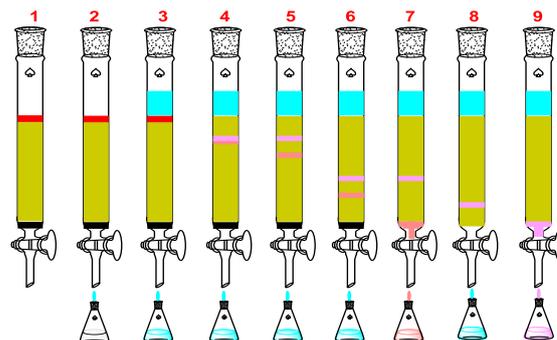


Figura 4. Funcionamiento de una columna de adsorción mostrando la carga de la muestra y diversos momentos a lo largo de la elución. 1 muestra depositada sobre el lecho cromatográfico. 2 la muestra penetra en el lecho. 3 se añade fase móvil. 4 comienza la separación de los componentes de la muestra. 6-7 eluye el primer componente. 8-9 eluye el segundo componente. Fuente: elaboración propia con base en (Gilbert, & Martin, 2010).

Elección del adsorbente

Cuando vamos a realizar una cromatografía en columna lo primero que debemos hacer es elegir el disolvente adecuado, para así optimizar la separación de los componentes de la mezcla. Dicha operación se produce a través de cromatografía analítica en capa fina. La variante más influyente en la eficacia de la separación de la cromatografía a media presión usando gel de sílice es el diámetro de la columna, así como la cantidad de gel utilizado.

Para elegir el disolvente, primero se lleva a cabo una cromatografía en capa fina de la muestra a analizar. El disolvente debe producir una buena separación de los componentes de la mezcla en la placa, colocando el componente menos polar a un R_f cercano a 0.3. En el caso de columnas pequeñas, lo ideal es usar un eluyente menos polar que el conseguido en el resultado de la cromatografía en placa.

A veces se utilizan mezclas de disolventes y se hace una elución en gradiente. La cromatografía se inicia con una mezcla de disolventes de polaridad adecuada para poder separar el componente que posea mayor R_f y así, una vez recogido, se aumentará poco a poco la polaridad para ir separando los componentes más polares. Si cuando se empieza la cromatografía se usa un disolvente excesivamente polar, los componentes de la mezcla eluirán conjuntamente, lo que llevaría a que la separación no tenga lugar. Una de las mezclas de disolventes más utilizadas es hexano/acetato de etilo.

En 1978 se introdujo una versión modificada denominada cromatografía en columna rápida. La diferencia con la cromatografía en columna tradicional es que en la técnica rápida el disolvente se hace atravesar la fase estacionaria aplicando una presión positiva. Esto hace que las separaciones mejoren en resolución y se pueda disminuir el tiempo de elución, por lo cual constituye un método de elección.

Si los compuestos separados en una cromatografía en columna son coloridos, el progreso de la separación se puede monitorizar visualmente; no obstante, los compuestos que deben ser aislados a veces son incoloros. En este caso, se recogen secuencialmente pequeñas fracciones en tubos rotulados y la composición de cada fracción se analiza por cromatografía en capa fina. Una vez identificadas las diferentes fracciones que contienen el mismo producto, se reúnen, se elimina el disolvente y se analiza la identidad de los componentes por métodos espectroscópicos.

Apéndice

Fase estacionaria

Es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico. Puede ser un sólido, un gel o un líquido. Si es un líquido, puede estar distribuido en un sólido, el cual puede o no contribuir al proceso de separación.

Fase móvil

Fluido que se filtra a través o a lo largo del lecho estacionario, en una dirección definida. Puede ser un líquido (cromatografía líquida, LC), un gas (cromatografía de gases, GC) o un fluido supercrítico (cromatografía con fluido supercrítico).

Eluir

Proceso en el que la fase móvil se desplaza a lo largo de la fase estacionaria transportando los componentes a separar.

Eluyente

La fase móvil que abandona la columna.

Muestra

Mezcla consistente en cierto número de componentes, cuya separación se pretende en el lecho cromatográfico al ser arrastrados o eluidos por la fase móvil.

Componentes de la muestra

Son los constituyentes químicamente puros de la muestra. Pueden no ser retenidos por la fase estacionaria (no retardados), retenidos parcialmente (eluidos a tiempos diferentes) o retenidos permanentemente. Se aceptan también los términos eluito y analito para un componente de la muestra.

Referencias

Armarego, W. L. F. and Chai C. (2009). *Purification of Laboratory Chemicals*, USA: British.

Fessenden, R. J. and Fessenden J. S. (2001). *Organic Laboratory Techniques*. USA: Brooks and Cole.

Gilbert, J. C. and Martin S. F. (2010). *Experimental Organic Chemistry A Miniscale and Microscale*. USA: Brooks and Cole.

Mohring, J.R., Alberg, D.G., Hofmeister, G.E., Schatz, P.F. & Hammond, C. N. (2014). *Laboratory Techniques in Organic Chemistry Supporting Inquiry-Driven Experiments*. 4th ed. W. H. Freeman and Company.

Pavia, D. L., Lampam G. M., Kriz G. S. and Engel R. (2011). *A Small Scale Approach to Organic Laboratory Techniques*. USA: Brooks and Cole.

Pedersen, S. F. and Myers A. M. (2011). *Understanding the Principles of Organic Chemistry: A Laboratory Course*. USA: Brooks and Cole.

Scott, R.P.W. (1992). *Liquid chromatography column theory*. Chichester: John Wiley & Sons.

Willard, H.H., Merritt, Jr. L.L., Dean, J.A. y Settle Jr. F.A. (1991). *Métodos Instrumentales de análisis*. México: Iberoamericana.