

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

OBJETIVOS

- Conocer la técnica de cromatografía en capa fina, (ccf), sus características y los factores que en ella intervienen.
- Calcular valores de R_f de varias sustancias y correlacionarlo a la selección adecuada del eluyente y deducir la relación que existe entre la polaridad de las sustancias que se analizan y la de los eluyentes utilizados.
- Aplicar la técnica de cromatografía en capa fina como criterio de pureza e identificación de sustancias.

ANTECEDENTES

- Concepto de cromatografía. Tipos de cromatografía. Cromatografía de adsorción y cromatografía de partición. Ejemplos.
- Fenómeno de adsorción. La propiedad de retención. Concepto de R_f
- La cromatografía en capa fina. Sus características y aplicaciones.
- Eluyentes, soportes y reveladores más comunes para cromatografía en capa fina.
- Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.

INFORMACIÓN

Concepto de cromatografía

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor).

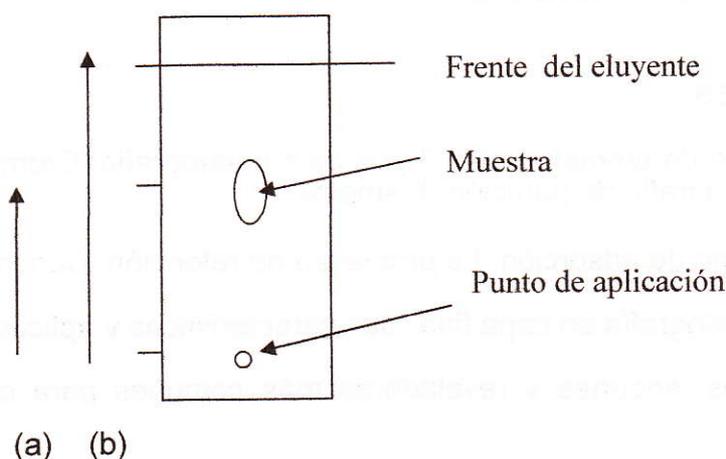
Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido.

Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.

Concepto de Rf

Rf es el registro, es una relación de distancias, y se define como:

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



El valor de Rf depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de $\pm 20\%$, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa.

Cromatografía en capa fina

En este caso se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo "manchas" de los componentes.

En la cromatografía en capa fina (ccf), el grado de elución de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado.

El adsorbente se coloca en forma de una capa delgada adherida sobre un soporte rígido, que pueden ser placas de vidrio, aluminio o poliéster. Los tamaños de la placa para ccf convencional son: 20 x 20 ; 10 x 20 y 5 x 2 cm.

Hay adsorbentes que contienen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos, se requerirán otras técnicas de revelado.

Eluyentes más comunes para cromatografía en capa fina

- éter de petróleo
- *n*-hexano
- ciclohexano
- tolueno
- dietil-éter
- *t*-butil-éter
- cloroformo
- cloruro de metileno
- acetato de etilo
- acetona
- *iso*-propanol
- etanol
- metanol
- ácido acético

Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante:

- a) Luz UV: si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F_{254} ó F_{366}), el número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado.
- b) La introducción de la placa en vapores de yodo.
- c) El rocío con una solución de agua/ H_2SO_4 1:1 (dentro de un compartimiento especialmente protegido y bajo una campana de extracción de gases). Después calentar intensamente, por ejemplo, con un mechero. hasta carbonizar los compuestos.

Adsorbentes más comunes para cromatografía en capa fina.

- a) Gel de sílice (se utiliza en el 80% de las separaciones)
- b) Óxido de Aluminio ó Alúmina (ácida, neutra ó básica)
- c) Celulosa (Nativa o micro-cristalina)
- d) Poliamidas

Para la selección del adsorbente deber tomar las siguientes consideraciones:

- a) Polaridad
- b) Tamaño de partícula
- c) Diámetro
- d) Área Superficial
- e) Homogeneidad
- f) Pureza

Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.

- Temperatura: a menor temperatura las sustancias se adsorben más en la fase estacionaria.
- La cromatografía debe llevarse a cabo en un área sin corrientes de aire.
- Limpieza de las placas. Muchas placas están contaminadas con grasa o agentes plastificantes o adhesivos. Para el trabajo a pequeña escala, éstas deben limpiarse corriendo primero una mezcla de cloroformo y metanol y después dejar secar completamente antes de aplicar la muestra.
- Pureza de los disolventes.

DESARROLLO EXPERIMENTAL**MATERIAL**

Pipeta de 5 ml *	1	Espátula	1
Probeta de 25 ml *	1	Frasco p/cromatografía c/tapa	3
Tubos capilares	3	Portaobjetos	6
Agitador de vidrio	1	Vidrio de reloj	1
* graduados			

MATERIAL ADICIONAL

Lámpara de luz UV, onda larga y onda corta	1
Cámara oscura para lámpara de luz UV	1

SUSTANCIAS Y REACTIVOS

Silicagel 60 HF ₂₅₄ para ccf	Acetona
Benzoína	Acetato de etilo
Cafeína	<i>n</i> -Hexano
Nipagín	Metanol
Nipasol	Yodo

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE CROMATOPLACAS Y CAPILARES

Se pueden utilizar cromatofolios ya preparados (comerciales), o bien, preparar las cromatoplasmas en el laboratorio.

Para preparar las cromatoplasmas, se introducen dos portaobjetos juntos, limpios y secos, en una suspensión de gel de sílice al 35% en acetato de etilo, se dejan secar al aire y se separan con cuidado. Se preparan 6 cromatoplasmas y se ordenan sobre una hoja de papel.

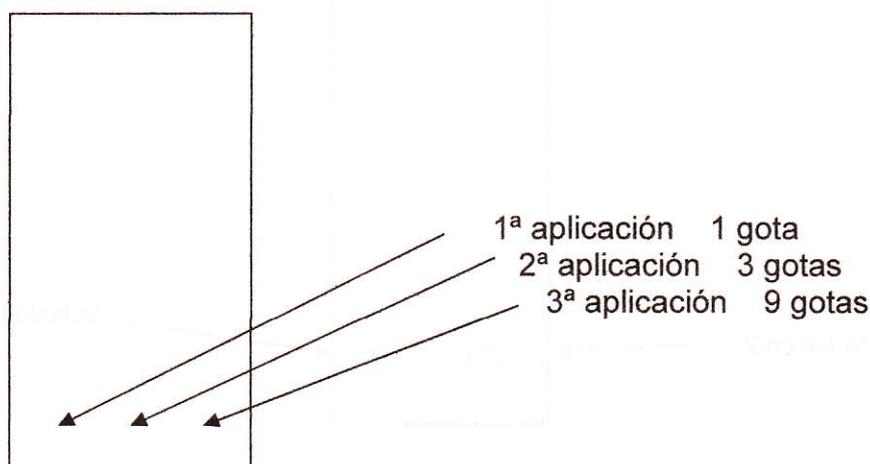
Para aplicar las soluciones a las cromatoplasmas utilice capilares, que previamente deber ser estirados en la flama del mechero (flama pequeña), con el fin de que tengan el diámetro adecuado (ver Figura 1)

Para mayor claridad de los resultados, incluya en su informe los dibujos de las cromatoplasmas a tamaño natural de todos los experimentos de esta sesión.

EXPERIMENTO 1.- APLICACIÓN DE LA MUESTRA Y EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN.

Con la micro pipeta, tome una pequeña cantidad de la solución-problema y aplique una gota sobre la capa de Silicagel, a 1 cm. aprox. del borde inferior de la placa (ver Figura 2) y trace una marca, con un lápiz fino, en el borde derecho, para no perder el punto de aplicación.

Para saber cuál es el efecto de la concentración (o el tamaño) de las gotas, se harán 3 aplicaciones de la solución No. 1 en orden creciente de concentración, en una sola placa, como se indica en el siguiente ejemplo:



Para desarrollar el cromatograma, introduzca la placa en una cámara de elución, (que puede prepararse con un frasco de tamaño apropiado), a la que previamente se le coloca por dentro un cuadro de papel filtro para aumentar la saturación de los vapores del eluyente, coloque unos 4 mL de acetato de etilo y tápela (Figura 3). Una vez que la placa esté dentro de la cámara, no debe moverla. Cuando el frente del eluyente esté casi en el borde superior de la capa de Silicagel, abra el frasco, retire la placa y marque el frente del eluyente con un lápiz fino. Coloque la placa en su hoja de papel, donde anotará sus datos, y déjela secar al aire.

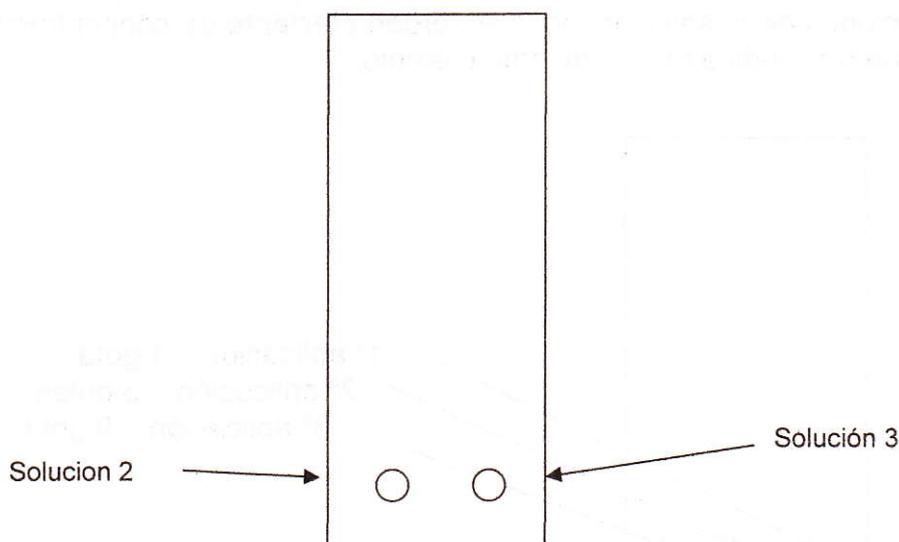
Para visualizar las manchas, revele primero con la lámpara de luz UV (Figura 4), marcando el contorno de cada una con un lápiz fino y luego introduciendo la placa en una cámara con cristales de yodo.

Conteste las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la relación existente entre la intensidad y tamaño de las manchas con la concentración de la sustancia aplicada en cada caso?
- ¿Cuál es el R_f de la mancha intermedia?

Experimento No. 2.- Polaridad de las sustancias y polaridad de los eluyentes.

Para comparar la polaridad de dos sustancias diferentes, se le proporcionarán las soluciones No. 2 y No. 3. Prepare 3 cromatoplasacas y aplique estas dos soluciones en cada una de ellas, de tal manera que queden como en el siguiente ejemplo:



Para comparar la polaridad de los eluyentes, eluya la primera cromatoplaca con hexano, la segunda con AcOEt y la tercera con MeOH.

En cada caso, deje evaporar el eluyente y revele con luz UV, observe y anote sus resultados (calcule el Rf de cada mancha). Luego, revele con yodo y anote sus observaciones.

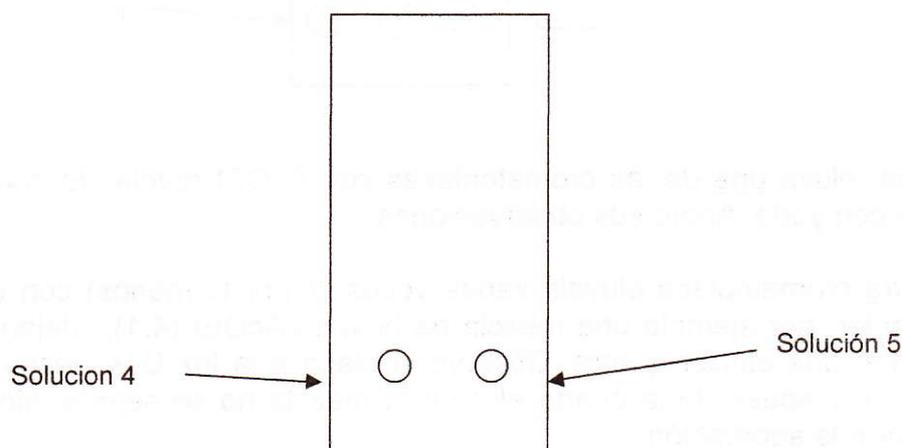
Con base en los resultados obtenidos, conteste las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es el eluyente adecuado? ¿Por qué?
- ¿Cuál de las dos sustancias problema es la más polar? ¿Por qué?
- ¿Cuál es la sustancia problema menos polar? ¿Por qué?

Experimento No. 3.- Pureza de las sustancias.

Se desea saber cuál sustancia es pura y cuál es impura. Para esto se le proporcionarán las soluciones No. 4 y No. 5. Prepare una cromatoplaca y aplique en ella ambas soluciones, como en el experimento anterior.

Eluya con AcOEt y deje secar. Revele con luz UV y luego con yodo. Anote sus resultados y observaciones.



Conteste las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es la sustancia pura? ¿Por qué?
- ¿Cuál es la sustancia impura? ¿Cuántas impurezas se observan?
- ¿Cuál es el Rf de la sustancia principal?
- ¿Cuál es el Rf de la impureza?

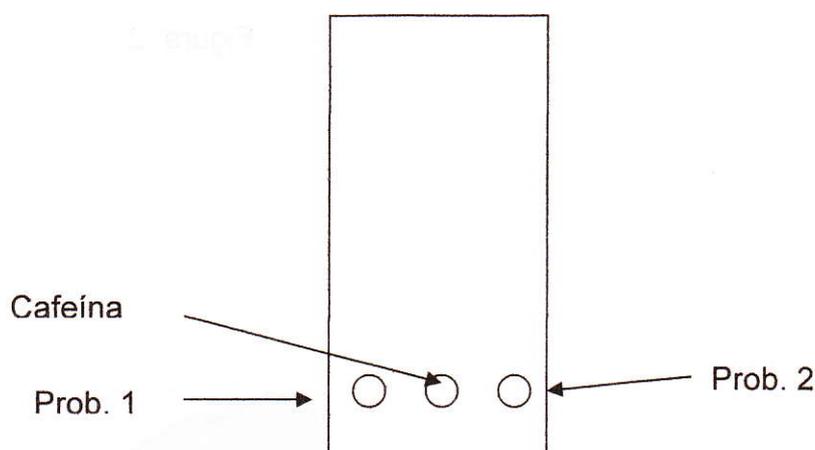
Experimento No. 4-B

Se desea identificar dos pastillas de analgésicos diferentes (Prob. 1 y Prob. 2), utilizando la técnica de ccf, comparando las dos con una muestra patrón.

En este caso, se utilizarán *Cafiaspirina* (Ac. acetil-salicílico y cafeína) y *Sacidol* (Ac. acetil-salicílico, paracetamol y cafeína), pero puede usarse otro juego de analgésicos diferente.

Se le darán las soluciones marcadas como Prob. 1 y Prob. 2, (sin que Ud sepa cuál es cuál). Se usará cafeína como muestra patrón.

Prepare dos cromatoplasmas iguales y aplique las soluciones en cada una siguiendo el siguiente esquema:



Eluya una de las cromatoplasmas en metanol, y la otra en AcOEt. Deje secar, revele las dos cromatoplasmas con luz UV y anote los resultados obtenidos en cada una.

Conteste las siguientes preguntas:

a) ¿Cuál eluyente permite una mejor separación de los componentes?

- Tomando en cuenta solamente la cromatoplasma eluída en el eluyente que resultó ser el adecuado, conteste también las siguientes preguntas:

b) ¿A qué analgésico corresponde el Prob. 1? ¿Por qué?

c) ¿A qué analgésico corresponde el Prob. 2? ¿Por qué?

d) ¿Cuál es el R_f del ácido acetil-salicílico?

e) ¿Cuál es el R_f del paracetamol?

f) ¿Cuál es el R_f de la cafeína?

Preparación de las micropipetas

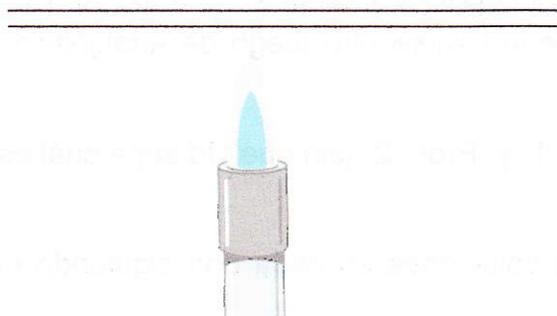


Figura 1

Aplicación de la muestra en la cromatoplaaca

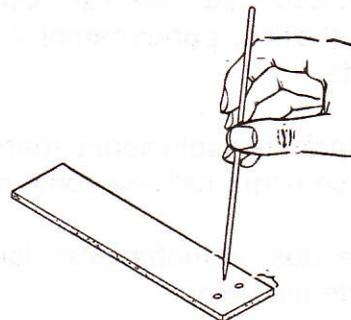
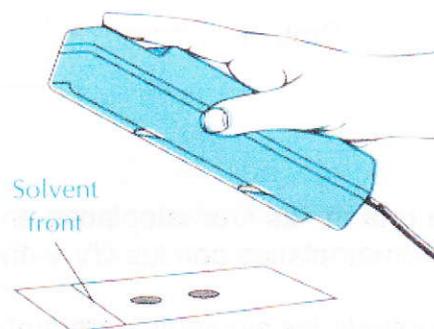


Figura 2



Frente del eluyente
Frasco de elución

Figura 3



Revelado con luz UV

Figura 4

MANEJO DE RESIDUOS

Los residuos generados en este experimento son:

RESIDUOS	CANTIDAD
D1. Hexano	
D2. Acetona	
D3. Metanol	
D4. Acetato de etilo	
D5. AcOEt-Hexano	
D6 Capilares	
D7. Gel de sílice para ccf	

D1 a D5: Guardar los disolventes para recuperarlos por destilación

D6: Empacar cuidadosamente para incineración.

D7: Se puede recuperar para su reuso, previo lavado y secado

CUESTIONARIO

- a) En el experimento 2, ¿cuál de las dos sustancias, la más polar o la menos polar, recorre mayor distancia en la placa a partir del punto de aplicación? ¿Por qué?
- b) ¿Qué significa que una sustancia tenga:
- $R_f < 0.5$?
 - $R_f = 0.5$?
 - $R_f > 0.5$?
- c) En el experimento 4, ¿cuál de las dos formas de elución permitió mayor separación de la mezcla?, ¿a qué se debe esto?
- d) ¿Por qué se dice que la ccf es un criterio parcial y no total de identificación?
- e) ¿Cuál será el resultado de los siguientes errores en cromatografía en capa fina?
- Aplicación de solución muy concentrada.
 - Utilizar eluyente de alta polaridad.
 - Emplear gran cantidad de eluyente en la cámara de cromatografía.
- f) Una serie de colorantes es separada por cromatografía en capa fina. Calcular los valores de R_f de cada colorante de acuerdo a la siguiente tabla.

Colorantes:	Distancia Recorrida (mm)
Eluyente	66.0
Rojo de metilo	56.0
Rodamina B	38.0
Rojo Congo	0.5

- g) ¿Qué tratamiento es necesario darle a la gel de sílice para reutilizarla?

BIBLIOGRAFÍA

- a) Abbott D. Y Andrews R. S., Introducción a la Cromatografía, 3ª ed., Alhambra, Madrid, 1970.
- b) Ault A., Techniques and Experiments for Organic Chemistry. University Science Books, USA, 1998.
- c) Ávila Z. G. *et al.* Química Orgánica, Experimentos con un enfoque ecológico, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, UNAM, México, 2001.
- d) Bates R.B., Schaefer J.P. Técnicas de Investigación en Química Orgánica, Prentice-Hall Internacional, Madrid, 1977.
- e) Brewster R.Q., Vanderwerf, C.A.y McEwen, W. E. Curso de Química Orgánica Experimental, Alhambra, Madrid, 1974.
- f) Clement B., Organic Chemistry Laboratory Manual, Texas A&M University, USA, 2002.
- g) Fessenden R .J. and Fessenden J. S. Organic Laboratory Techniques, Brooks/Cole, USA., 1993.
- h) Hammond C., Experimental Organic Techniques, Freeman, USA, 1999.
- i) Pasto D.J., Johnson C.R. and Miller M.J. Experiments and Techniques in Organic Chemistry. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1992.
- j) Pavia D. L., Lampman G. M. and Kriz G.S. Introduction to Organic Laboratory Techniques, a Contemporary Approach, 3rd. ed.. Saunders College, Fort Worth, 1988.
- k) Roberts R. M., Modern Experimental Organic Chemistry, 3rd. ed., Holt. Rinehart Winston, Nueva York, 1979.