

Universidad Nacional del Callao

Facultad de Ingeniería Química

Escuela profesional de Ingeniería Química

Tema:

Cromatografía

Curso:

Laboratorio de **Química Orgánica I**

Profesor:

Ing. Milla Flores

Integrantes:

Carrasco Santaria Percy

030736-F

Iparraguirre Rosas Miguel

0227696-F

Perez Obregón Dalmiro

022100-I

Quispe Choque Maritza

034238-k

Chancafe curo rudy

030720-B

Bellavista - Callao

2005

CROMATOGRAFÍA

I.-Objetivos:

- Aprender teóricamente el método de la cromatografía.
- Poder realizar y ejecutar los diversos métodos o tipos de cromatografía.
- Poder realizar la interpretación de resultados en los ensayos de cromatografía.

II.-Fundamento teórico:

1.- CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica que se emplea para separar entre si los componentes de una sustancia.

Esta técnica fue creada por el botánico ruso Michael Tswett en 1906, el cual llamó a su método cromatografía, palabra griega que significa escritura a color, porque lo utilizo para separar compuestos coloreados. Tswett llevó a cabo una extracción de una mezcla de pigmentos de hojas verdes utilizando éter de petróleo, un disolvente no polar, y descubrió que era capaz de separar los pigmentos al hacer pasar el extracto a través de una columna, un tubo de vidrio relleno con carbonato de calcio (tiza). Tswett utilizó como detector del experimento la simple observación, ya que los compuestos que separó tenían color y era posible detectar bandas o zonas de distintas materias por su color en la columna, demostrando que la clorofila es solo uno de los muchos pigmentos que se encuentran en las hojas de las plantas.

A pesar de que el método cromatográfico prometía simplificar la separación de sustancias de mezclas complejas, no fue sino hasta finales de la década de los 30 y principio de los 40 cuando se empezó a desarrollar la técnica teniendo este método diversas aplicaciones. En la actualidad la cromatografía se emplea principalmente para separar compuestos incoloros pero el nombre permanece para describir cualquier técnica que se base en los mismos principios.

La columna sencilla de Tswett, un tubo vertical de cristal, abierto por su parte superior, rellena de un sólido común donde el eluyente se mueve conducido por su propio peso, ha evolucionado hasta los modernos equipos que hoy conocemos.

tipo	fase estacionaria	fase movil
<i>líquido-sólido</i>	sólido inerte como gel de sílice o alúmina	disolventes
<i>intercambio iónico</i>	resina cambiadora	soluciones acuosas
<i>líquido-líquido</i>	líquido adsorbido en un soporte sólido	líquido
<i>gas-líquido</i>	película de líquido adsorbida sobre un soporte sólido	gas

BASE CIENTÍFICA:

En la cromatografía se separan los componentes de las mezclas a medida que son transportadas por un fase fluida móvil a través de una fase estacionaria sólida o líquida, la separación de las moléculas se logra porque la movilidad de cada soluto depende de un equilibrio en la distribución entre la fase móvil y la estacionaria, y esta separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox.

Como resultado hay una gran variedad de técnicas para llevar a cabo la separación de una sustancia, que se clasifican en cuatro grandes grupos según el mecanismo de separación:

- C. de reparto: separa los solutos basándose en la solubilidad.
- C. de adsorción: se basa en la afinidad de adsorción.
- C. de exclusión: separa solutos según el peso molecular.
- C. de intercambio iónico: separa solutos según la carga iónica.

También se pueden clasificar según el estado de la fase móvil en:

- C. de gases: la fase móvil es un gas y pueden ser dos sistemas:
 - C. gas-líquido
 - C. gas-sólido
- C. líquida: la fase móvil es un líquido y puede ser:
 - C. líquido-líquido
 - C. líquido-sólido
 - C. de exclusión
 - C. de intercambio iónico

Las únicas sustancias que no pueden ser examinadas por cromatografía son las insolubles y aquellas que se descomponen con el solvente o con la fase estacionaria. Dentro de las técnicas cromatográficas no se incluyen los métodos que utilizan campos eléctricos para separar moléculas cargadas, métodos que se denominan electro separaciones, electro migraciones o electroforesis. El proceso cromatográfico, aparentemente simple, es en realidad una compleja unión de fenómenos tales como hidrodinámica, cinética, termodinámica, química de superficie y difusión. Hasta la fecha se han propuesto muchas teorías, que incluyen complejos matemáticos para poder explicar el comportamiento de los solutos en las columnas cromatográficas, por citar alguna de estas teorías las más estudiadas son:

- Teoría de los Platos Teóricos (Martin & Synge).
- □□ Teoría Cinética (Van Deemter, Zuiderweg, Klinkenberg & Sjenitzer).
- □□ Teoría Desarrollada para Columnas Capilares (Golay).

Cromatograma

Además de observar el resultado final del proceso, se pueden realizar las medidas continuamente para obtener una información global del proceso pasando la muestra a través de un detector instrumental, normalmente los transductores del detector se sitúan al final de la columna.

El detector registra los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasa por él, estos cambios son reproducidos y registrados en forma de gráfica, ésta gráfica que recoge la respuesta del detector en función del tiempo se denomina cromatograma.

En las graficas se observa la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo, generalmente la respuesta del detector es linealmente proporcional a la concentración de analitos en la fase móvil, la forma de cada pico muestra la distribución de concentración del componente asociado a dicho pico.

En el cromatograma el eje horizontal corresponde al volumen, o al tiempo equivalente. En la cromatografía moderna es frecuente mantener constante la velocidad de flujo (volumen/tiempo), así mediante esta relación se puede reflejar el tiempo en el eje horizontal: $\text{velocidad de flujo} \times \text{tiempo} = \text{volumen}$

2. CROMATOGRAFÍA PLANA Y CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía líquida puede llevarse a cabo por cuatro técnicas analíticas:

- □C. En papel
- □C. En capa fina
- □C. en columna
- □C. Líquida de alta resolución. HPLC.

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

Es una forma combinada de cromatografías de partición y adsorción en la que la fase estacionaria es el agua absorbida presente en el papel, y el soporte es el papel mismo. La fase móvil es una solución que consiste de un solvente o de una mezcla de varios líquidos, incluyendo el agua. Se deja secar sobre el papel unas gotas del extracto de la muestra y se forma una mancha.

Para impedir la evaporación, el papel se cuelga dentro de una cámara de tal forma que la mancha pueda ser irrigada con la fase móvil ya sea hacia abajo por efecto de la gravedad, hacia arriba u horizontalmente por efecto de la capilaridad. Cuando la fase móvil ha saturado el papel hasta una distancia predeterminada en la que se logre la separación cromatográfica, se saca el papel de la cámara y se desarrolla el cromatograma rociando agente reveladores.

En el caso de sustancias coloreadas tales como los colorantes de alimentos, la separación resulta evidente aun sin la ayuda de tales agentes. Las sustancias no polares también pueden separarse recubriendo el papel con un compuesto no polar y usando solventes polares como fase móvil. Es una técnica barata pero relativamente lenta, con limitaciones en el uso de agentes reveladores, algunos de los cuales pueden atacar y destruir el papel. Las manchas tienden a ser difusas.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias y para identificar/caracterizar o para determinar semicuantitativamente componentes individuales.

La separación se basa en que las sustancias investigadas se reparten de modo diferencial entre una fase estacionaria y otra móvil: en la TLC el eluyente (fase móvil) se desplaza por una fina capa del sorbente (fase estacionaria), transportando así los componentes individuales de la mezcla de sustancias más o menos lejos dependiendo de su solubilidad y/o de su comportamiento frente a la adsorción. Al contrario, que en la cromatografía en columna, el proceso separativo transcurre en un sistema abierto, la placa separativa plana. El recorrido particular de cada sustancia se emplea así para su identificación.

Las separaciones se realizan generalmente por el procedimiento ascendiente, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa.

Aparatos y materiales

- Cubeta cromatográfica (con tapa hermética); la mayoría de las veces se trata de la cubeta Normal. (Profundidad del espacio para el gas: 3mm)
- Placas de cromatografía: preparadas por uno mismo o ya fabricadas.
- Pipetas de microlitro
- Recipiente de vidrio con pulverizador
- Probeta o matraz Erlenmeyer con tapón (para preparar y mezclar la fase móvil)

- Secador
- Plantilla para TLC o regla
- En caso necesario: lámpara UV para comprobar la fluorescencia o la disminución de la misma.

Placas cromatográficas y sorbentes

Las placas constan de un soporte liso, inerte (placas de vidrio, láminas de aluminio o de fibra) sobre las que se dispone el sorbente formando un espesor lo más homogéneo posible (por lo general 0,25 mm); dependiendo de la separación a realizar, se tratará de silicagel, óxido de aluminio, poliamida, celulosa, etc o mezclas.

En tanto que en el HPLC se utilizan principalmente materiales de fase inversa, en la cromatografía en capa fina predominan los materiales para fase normal, como por ejemplo el silicagel.

Hay placas de TLC que tienen la denominada zona de concentración (=zona de carga). Se trata de una zona de unos 2 cm de anchura de barro de diatomeas o de un gel de sílice de tamaño de poro muy grande, de manera que durante el desarrollo de la placa de TLC en esa zona prácticamente no hay separación cromatográfica. La ventaja específica es que los componentes cargados se concentran en una estrecha banda en la línea de partida (línea divisoria entre la zona de concentración y sorción). Así resulta posible cargar grandes volúmenes y obtener una buena separación.

Carga de las disoluciones

Las disoluciones de la muestra y de los patrones se cargan con pipetas de microlitro (o similares) sobre la placa de TLC, de manera que el punto medio de la mancha esté a 1.5 cm aproximadamente del borde inferior y de los bordes de los laterales y que haya una separación entre 1-2 cm de una mancha a otra

Los volúmenes recomendables dependen de la concentración de las disoluciones. Por lo general, se cargan 1-10 microgramos de sustancia por mancha. Si la concentración de la sustancia a analizar fuera de un orden de magnitud desconocido, la muestra debería cargarse varias veces en volúmenes crecientes y claramente diferentes.

Los volúmenes mayores se cargan en varias veces, secando entre una y otra (con aire frío o caliente, aire a presión o con nitrógeno), para evitar que las manchas se extiendan.

Para realizar determinaciones cuantitativas con placas convencionales, se cargan volúmenes aproximados de 0.5-1.0 microlitros por mancha. Los volúmenes mayores de 5.0 microlitros deben evitarse salvo en casos excepcionales, donde se cargaran en varias veces.

Desarrollo:

El eluyente, cuya composición depende de cada problema concreto, se pone en la cubeta cromatográfica por lo menos 30 minutos antes del principio de la separación hasta una altura de 0.5 cm. La cubeta se cerrará con su tapa para que se sature con los vapores del disolvente y se coloca en un lugar adecuado. Para que la saturación sea mejor, se recubre la cubeta con papel secante (se indicará en el protocolo en el caso que sea necesario).

Para desarrollar la placa, su extremo inferior se introduce en el diluyente y se vuelve a cerrar la cubeta inmediatamente. Para evitar eluciones, las manchas cargadas deberán estar completamente por encima del nivel de eluyente.

El eluyente se ve impelido hacia arriba por capilaridad a través del recubrimiento. El recorrido será, dependiendo de la separación, de 5 a 15 cm máximo, y el tiempo necesario dependerá del sorbente, del espesor del mismo y de la composición del eluyente. El recorrido óptimo es por lo general de 10 cm.

Cálculos:

Tras el desarrollo del cromatograma, se saca la placa de la cubeta y (después de marcar el frente) se seca cuidadosamente al aire o con un secador. La posición de las manchas se determina:

-por su color propio

-por su fluorescencia

-por la disminución o amortiguación de la fluorescencia

-por reacción química: la placa una vez seca se rocía parcial o totalmente con un determinado reactivo, de manera que aparecerán coloraciones características o una fluorescencia particular.

La identificación de cada una de las manchas se realiza de acuerdo con su color y del denominado valor R.F (factor de retención, llamado también factor Rf o hRf ($=R.F \times 100$), es decir, el cociente entre el recorrido de la sustancia (ls) y el del eluyente (IL).

Para conseguir la identificación, los colores propios o consecuencia del revelado y los **rf** se comparan con los de sustancias de referencia, obtenidos en las mismas condiciones de desarrollo y tinción (si es posible en el mismo cromatograma). Como control se realiza adicionalmente los denominados cromatogramas mixtos (la disolución problema y la de la sustancia de referencia se cargan en una misma mancha).

CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL EN CAPA FINA

Para mejorar una separación incompleta, se combinan dos pasos de cromatografía monodimensional de la manera siguiente:

1º paso: cargar la muestra en una esquina de la placa y desarrollarla en sentido ascendente como se describía más arriba.

2º paso: girar 90º la placa desarrollada y seca, de manera que la mezcla ya separada parcialmente se encuentre en el borde inferior, a continuación se desarrolla en

sentido ascendente con un segundo eluyente. La investigación y la determinación se realizan como ya han sido descritas anteriormente.

Aplicaciones:

En la mayoría de los casos la TLC se realiza cuando se quieren hacer evaluaciones cualitativas rápidas (screening). Las determinaciones cuantitativas son posibles por acoplamiento del equipamiento necesario (unidades de carga, scanner); en estos casos, es mejor recurrir a las placas de HPTLC, porque son más efectivas.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Fue la forma original de cromatografía líquida realizada por primera vez en 1906 por Tswett. La fase estacionaria normalmente se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro. Se utilizan muchas clases de materiales de empaque que van desde la alúmina, gel de sílice, tierra de diatomeas, hasta resinas sintéticas y derivados polisacáridos.

Se usan todos los tipos de cromatografía líquida. Lo habitual es que la fase móvil se deje percolar a través de la columna por gravedad. No se usa mucho en el análisis de alimentos ya que es una técnica para la separación cromatográfica de mezclas de sustancias. Sin embargo, hoy en día existe un sistema cromatográfico completo y automático diseñado para el análisis bioquímico que se conoce como .cromatografía líquida rápida para proteínas. Estos instrumentos emplean un rango de fases en columnas de plástico de 5 o 10 cm que operan bajo presión moderada. Se revolucionó el uso de la cromatografía en columna para la purificación de soluciones de prueba o para extraer las sustancias deseadas de las soluciones, debido a la introducción de cartuchos cortos de plástico y desechables de minicolumnas, preempacados con una variedad de fases de separación con partículas de tamaño relativamente grandes, por ejemplo, cartuchos de Bond-Elut y Sep-Pak. Las soluciones de prueba, de lavado o extracción pasan rápidamente a través de los cartuchos con un poco de vacío generado a través de una bomba de agua. La mayoría de los métodos de purificación tales como la extracción líquido-líquido, la TLC y la cromatografía en columna de vidrio que se usan antes de la espectrofotometría, la GLC, la HPLC etc., pueden ahora realizarse en forma más eficiente usando estos cartuchos.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC):

Es parecida a la cromatografía en columna, sólo que se aplica el flujo a presión (entre 1500 a 2200 psi), el tamaño de la partícula es entre 3 y 10 micras, la longitud de la columna es entre 5 y 25 cm y requiere de equipo sofisticado.

- **Fase Normal:** La fase móvil es no polar (hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc.) y la fase estacionaria es polar (generalmente Sílica).
- **Fase Inversa:** La fase móvil es polar (agua, soluciones amortiguadoras de pH, acetonitrilo, metanol, etc.) y la fase estacionaria es no polar (generalmente Sílicagel) injertada con cadenas de grupos orgánicos de 8 y 18 átomos de carbono (C₈ y C₁₈).
- **Intercambio Iónico:** La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico y tiene la propiedad de separar especies ionizadas (cationes o aniones). La fase móvil es generalmente una solución amortiguadora de pH.
- **Exclusión:** La fase estacionaria está constituida de partículas altamente porosas que permiten la separación de los componentes en función del tamaño de las moléculas. A la fase estacionaria se le llama también Malla Molecular. El cromatograma obtenido representa la distribución de los pesos moleculares.

3. CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG):

La fase móvil es un gas (llamado Portador o Acarreador) y la fase estacionaria puede ser un sólido (Cromatografía Gas-sólido) o una película de líquido de alto punto de ebullición (generalmente Polietilén-Glicol o silicón) recubriendo un sólido inerte (Cromatografía Gas-Líquido).

Los compuestos que se pueden separar por cromatografía de gases deben ser volátiles y térmicamente estables.

III.-Materiales y Reactivos:

Materiales

Cámara de vidrio
 Fase estacionaria de 5X20cm
 1 lámina de vidrio de 5X10c
 1 pulverizador
 Frasco de vidrio con tapa
 Capilares
 Regla y lápiz

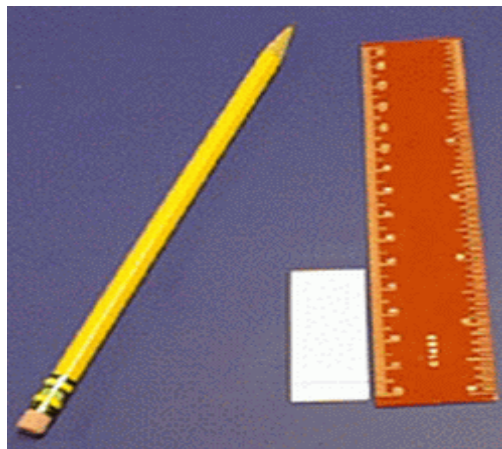
IV.-Procedimiento Experimental:

1.-Proceso de identificación mediante la cromatografía de capa fina:

Identificación del ácido esteárico

- preparar la fase móvil , una solución de 30 ml de acetato de etilo y 30ml de cloroformo 1:1
- preparar la fase estacionaria marcando la línea de origen para obtener el frente de solvente y frente de soluto (los trazos se hacen con lápiz)

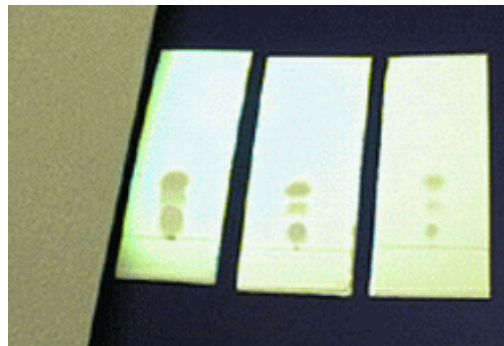
- Con la ayuda de una micro pipeta colocar la muestra en un extremo (aceite disuelto en cloroformo) y el estándar (ácido esteárico disuelto en cloroformo) en la línea de origen el sembrado se hace gota a gota secando cada vez
 - Colocar la lamina en la cámara o cuba de saturación que ya contiene la fase móvil y taparlo herméticamente
 - Dejar que el solvente ascienda gradualmente hasta que supere la mitad de la distancia media de la lamina
 - Al retirar la lamina marcar la última zona húmeda y dejar secar la lamina para realizar el proceso de revelado
 - Se utiliza como revelador el azul de bromo timol en NH_4OH con la ayuda de un pulverizador.
- 1) Preparar o cortar, en su caso, una placa de tamaño adecuado.



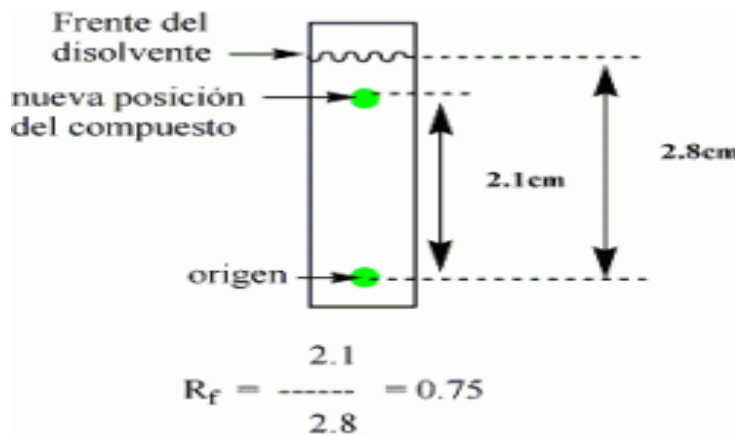
2) Disolver una pequeña cantidad de la muestra y, mediante un capilar de vidrio, pinchar en la parte inferior de la placa a cierta distancia del borde.



- 3) Introducir la placa en un recipiente con el disolvente adecuado. Dicho recipiente debe presentar una atmósfera saturada en el vapor del disolvente por lo que se pone trozo de papel de filtro en la parte posterior y disponer de un sistema de cierre.
- 4) Cerrar el recipiente y dejar que el líquido ascienda por capilaridad.
- 5) Revelar la placa para poner de manifiesto donde se encuentran los puntos .



- 6) Determinar las posiciones relativas de los puntos mediante el cálculo del R_f



Cogemos un papel filtro y lo cortamos según el modelo:

Cuestionario

Defina ud los siguientes terminos :

1. **Adsorbente:** fase estacionaria en la C. de adsorción y de reparto.
2. *Eluyente:* La fase móvil una vez que se extrae de la columna.
3. *Silicagel HF254 :es el absorbente que ayuda a arrastrar la fase movil de la fase estacionaria.*
4. **HPLC:** La cromatografía líquida de alta resolución se caracteriza por el empleo de una fase estacionaria constituida por partículas de tamaño muy pequeño, del orden de los μm . Esto hace que la eficacia del sistema sea muy elevada proporcionando columnas con un número muy grande de platos teóricos.

Para vencer la enorme resistencia que ofrece la fase estacionaria al paso de la fase móvil es necesario emplear un sistema de bombeo a alta presión.

Otra característica importante de la HPLC es la detección continua de los analitos conforme son eluidos.

5. Defina ud que es un revelador . de ud ejemplos de reveladores para diferenciar el reconocimiento de diferentes compuestos organicos es una sustancia que se usa para poder identificar un soluto de un muestracomo por ejemplo , el tricloruro ferrico ,bromotimol

MUESTRA:

Grupos fenolitos

Aminoácidos

Azucares

REVELADOR:

Tricloruro Ferrico

MINHIDRINA

sulfato cuprico con hidróxido de sodio

Conclusiones:

Para Cromatografía de capa fina:

- Se observa que la muestra problema contiene ya que en el experimento se observó mediante el emisor de rayos u.v que las manchas b-naftol y de m.p son similares y de la muestra coincidían con la misma altura, también se realizó el cálculo del R.F y el resultado es muy cercano.
- Al final se agregó el reactivo de FeCl_3 y se observó que la distancia era la misma y la intensidad de color también.
- El método de cromatografía de capa fina es muy eficaz para identificar el contenido de muchos compuestos.

VI.-Recomendaciones:

- Tener los aparatos, material, área de trabajo siempre limpio, evitando recargar su sitio con material innecesario.
- Nunca se debe devolver al frasco los reactivos sobrantes, es preferible mejor desecharlos para no contaminar el frasco de reactivos.
- No use los reactivos mas de lo necesario, pues cualquier exceso de reactivo puede causar resultados desfavorables para los experimentos realizados en la práctica.
- No descartar el material hasta que no estés seguro de lo que ya no lo necesites, echando los desperdicios sólidos en el cajón que hay en el fondo del laboratorio y los líquidos en los lavaderos.
- Lea la etiqueta siempre antes de usar los frascos del laboratorio.

Cuando se calienta una sustancia tener mucho cuidado de no dirigir la boca del tubo hacia el vecino

BIBLIOGRAFÍA:

- Zlatkis Albert
Breitmaier
introducción a la química orgánica
1978
México
Editorial: Mc graw-Hill
- Klages Federico
tratado de química orgánica
1968
editorial reverté
- Lefferr jonhfn
introducción a la química orgánica
1975
España
editorial jims
- Pavlov teherant
química orgánica
1970
rucia
editorial mir

