

QUIMICA ORGÁNICA

II

Laboratorio N°2:
CROMATOGRAFÍA

CONCEPTOS

*Principios de Análisis
Instrumental – 5ta ed.
Scoog, Holler, Nieman*

La cromatografía es una técnica que permite la separación multicomponente estrechamente relacionados entre sí. Es decir varios compuestos de una mezcla compleja pueden ser separados y/o identificados.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una **fase móvil**, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase se hace pasar a través de una **fase estacionaria** con la que es inmisible (sólido o líquido), que puede estar fija dentro de una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

CLASIFICACIÓN

COMO SE DISPONE LA FASE ESTACIONARIA

- COLUMNA (contenida en un tubo hueco de dimensiones particulares)
- PLANA (adherida a una superficie plana o a los intersticios de un papel)

● **DE ACUERDO AL ESTADO FÍSICO DE LA
FASES MÓVIL Y ESTACIONARIA**

Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

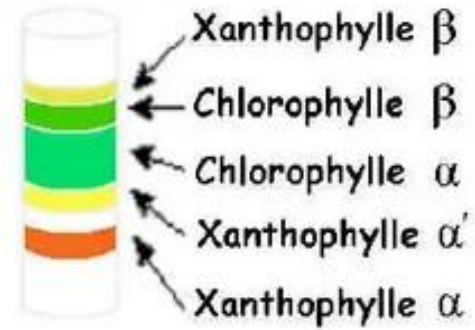
De acuerdo a polaridades relativas

- Fase normal: fase móvil más apolar respecto a la estacionaria.
- Fase reversa (inversa): fase móvil más polar respecto a la estacionaria.

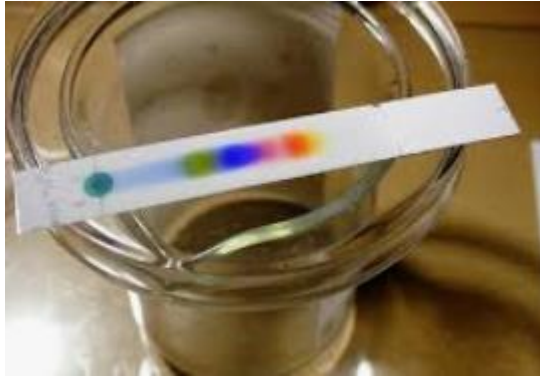
EJEMPLO

La cromatografía la inventó el botánico ruso Mikhail Tsevet en 1903. Utilizó una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido y aplicó en la parte superior de la misma un extracto vegetal, luego hizo pasar disulfuro de carbono hasta que al recorrer el líquido por gravedad la columna los pigmentos vegetales como clorofilas y xantofilas se separaron. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna por ello nombró la técnica Chroma (color)+graphein (escribir).

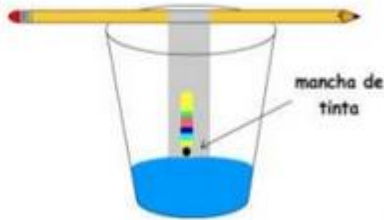
¿COMO SE DEFINIRÍA ESTA TÉCNICA?



CROMATOGRAFÍA PLANA

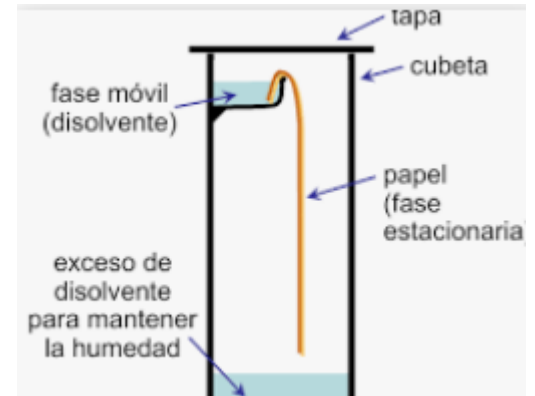


CROMATOGRAFIA PLANA



- Ascendente (fase móvil recorre la fase estacionaria por capilaridad)

- Descendente (fase móvil recorre la fase estacionaria por gravedad)



CROMATOGRAFÍA PLANA

- **SOLIDO EN SOPORTE INERTE =
PLACA FINA**
- **EN PAPEL (la celulosa es la
fase estacionaria)**

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA (TLC)



NOMBRE	PROVEEDOR
Gel de sílice G	Merck
Gel de sílice N	Merck
Gel de sílice H	Merck
Gel de sílice 7G	Baker
Gel de sílice D y DS	Gelman
Gel de sílice	Woelm
Gel de sílice SG41	Reeve Angel
Gel de sílice TLC	Mallinckrodt
Gel de sílice Bio-silo	Bio-Rad
Gel de sílice AD	Applied Science
Oxido de aluminio G	Merck
Oxido de aluminio H	Merck
Oxido de aluminio P	Merck
Oxido de aluminio D	Gelman
Oxido de aluminio AG	Bio-Rad
Celulosa 300 y 300G	Merck
Celulosa CC41	Whatman
Celulosa P	Bio-Rad
Poliamida G, perlón, caprolactama,	Merck
Kieselgur G	Merck

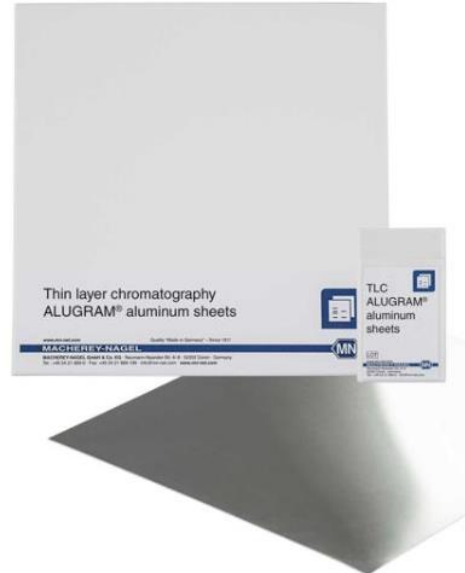
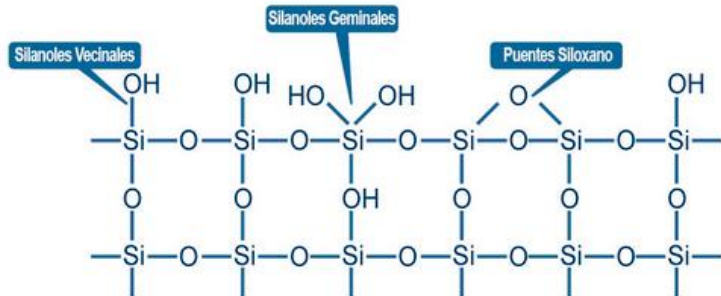


<https://www.youtube.com/watch?v=ED8LHLQJvWU>

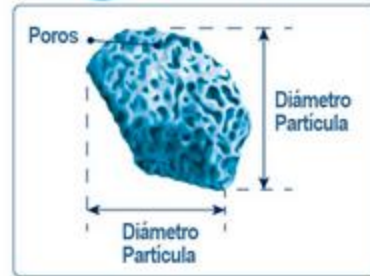
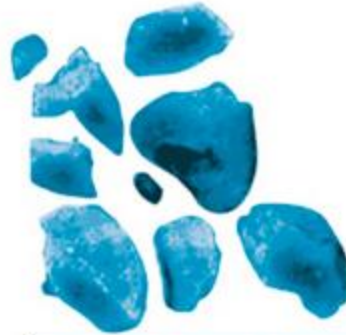
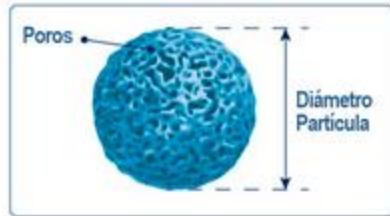


TLC soporte de Aluminio, capa de silicagel, ALUGRAM Xtra SIL G UV254, 20x20 cm

El **gel de sílice**, también conocido como **Silicagel**, es **$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ absorbente**. De aspecto cristalino, poroso, inerte, no tóxico e inodoro, insoluble en agua ni en cualquier otro solvente, químicamente estable, sólo reacciona con el ácido fluorhídrico y el álcali.



El tamaño estandar de poro es 60Å dando una superficie de 520m²/g
EL SOPORTE TAMBIÉN PUEDE SER POLIESTER



- Pueden cambiarse el grupo oxhidrilo del extremo por una cadena hidrocarbonada. Para cromatografía plana la cantidad de carbonos final suele ser de 2, 8 y 18



RP-Modified Silica Plates

RP-2, RP-8 and RP-18 are based on silica gel 60 modified with aliphatic hydrocarbons. The chain length in combination with the degree of modification defines the ability to tolerate the water of the solvent system and strongly affects retention. Migration time increases in the order RP-2, RP-8, RP-18 using the same solvent composition. The HPTLC RP-2 sorbent exhibits higher polarity and high affinity of aqueous solutions, tolerating up to 80% water, while the longer carbon chains RP-8 and R-18 can be run with up to 60% water in the solvent system.

DETECCIÓN

En el procedimiento cromatográfico hay que considerar que las especies pueden ser invisibles al ojo humano, por tanto se debe complementar la técnica de separación con una técnica de detección. A este procedimiento se le llama Revelado.

Estos métodos son:

a) No destructivos:

i. UV, generalmente a 254 nm y 366 nm. En estas longitudes se detectan sistemas de dobles enlaces conjugados, cetonas α , β no saturadas, anillos aromáticos, pero no compuestos con dobles enlaces aislados.

- ⊙ En la denominación de la placa cromatográfica se especifica que el sólido tiene silicato de zinc activado con manganeso para dar fluorescencia verde para UV de onda corta (254 nm). Los compuestos orgánicos se ven como manchas opacas.



- Productos fluorescentes a 254 nm: fósforo inorgánico, silicato de zinc, rodamina 6 G, diclorofluoresceína 34 y fluoresceína sódica.
- Productos fluorescentes a 366 nm: fluoresceína al ultravioleta.
- I₂, forma complejos con una gran variedad de compuestos, puede ser aplicado por pulverización en soluciones al 1 % en Meto o en una cámara con vapores.
- H₂O, sobre placas de sílica gel con varios compuestos se logra ver manchas opacas que contrastan en un fondo semitransparente.

⊗ Destructivos

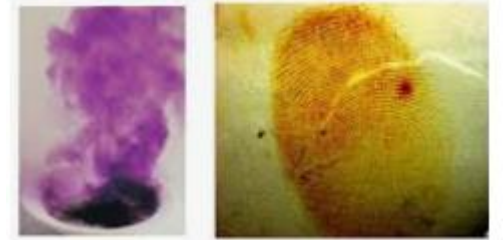
- H₂SO₄ al 25 % en etanol
- H₂SO₄ + oxidantes (K₂Cr₂O₇, KMnO₄, HNO₃, CeSO₄, al calentarse dan manchas oscuras por carbonización)
- HClO₄ al 2% en etanol
- H₃PO₄ al 50 % en etanol
- Haluros metálicos: SbCl₃, SbCl₅, ZnCl₂, FeCl₃, al calentarse producen derivados fluorescentes.

LOS CROMATÓGRAFOS SE ACOPLAN A DETECTORES DE ACUERDO A LAS PROPIEDADES DE LOS ANALITOS

Detector LC	Disponible comercialmente
Absorbancia	Sí ^c
Fluorescencia	Sí ^c
Electroquímica	Sí ^c
Índice de refracción	Sí
Conductividad	Sí
Espectrometría de masas	Sí ^d
FT-IR	Sí
Dispersión de la luz ^e	Sí
Actividad óptica	No
Selectivo de elementos	No
Fotoionización	No

- ① <https://www.youtube.com/watch?v=4IyGp6tqFqA>
- ① <https://www.youtube.com/watch?v=g71IWP205pg>
- ① <https://www.youtube.com/watch?v=20E91GORIro> NOTAR LA SIEMBRA

EN ESTE CASO

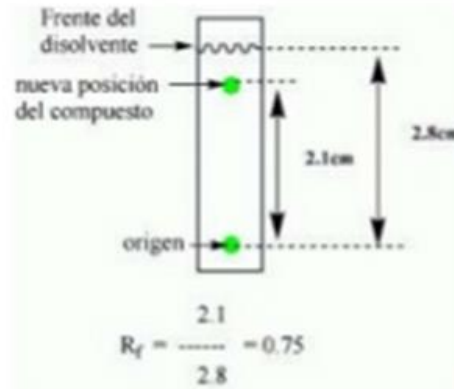


CÁMARA DE IODO

COMPORTAMIENTO DE ANALITOS

Existe una repetida transferencia de soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. La velocidad de migración del soluto depende de su K_d . Es común describir la trayectoria de un soluto particular en función de su factor de retardo R_f

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



DESARROLLO EN CLASE

PRACTICA DE LABORATORIO

SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE UN ACEITE

- Placas de sílica gel G (1,5 g + 4 ml de agua destilada).
- Solvente de corrida: éter de petróleo/éter sulfúrico/ácido acético (45:10:1,5).
- Solvente de muestra: n-hexano.
- Muestra: aceite vegetal sin purificar al 5%.
- Reactivos de detección: vapores de yodo, luz ultravioleta.

SOBRE LA PLACA (CROMATOPLACA)

PRIMER PASO

Marcar la línea de siembra =precauciones

SEGUNDO PASO

Marcar el frente del solvente (puede realizarse al final de la corrida =precauciones

SIEMBRA (aplicación) DE LA MUESTRA

- La muestra se aplica en la placa según el objetivo: Analítico ó Preparativo en:
 - Banda (preparativo) el objetivo es purificar un compuesto de una mezcla compleja
 - Punto ó Mancha (analítico) el objetivo es separar todos los compuestos presentes en una mezcla compleja.

Se deposita la muestra de aceite en hexano con un capilar generando una mancha no mayor a 5mm de diámetro. Concentrar la muestra realizando por lo menos 4 aplicaciones más dejando evaporar el solvente entre aplicaciones.

PREPARACION DE CÁMARAS

- Mientras se realiza la siembra debe llenarse la CUBA CROMÁTÓGRÁFICA con el solvente de corrida para saturarla de vapores = precauciones
- Colocar iodo en la CÁMARA DE IODO para que volatilice y el vapor de iodo sature la cámara

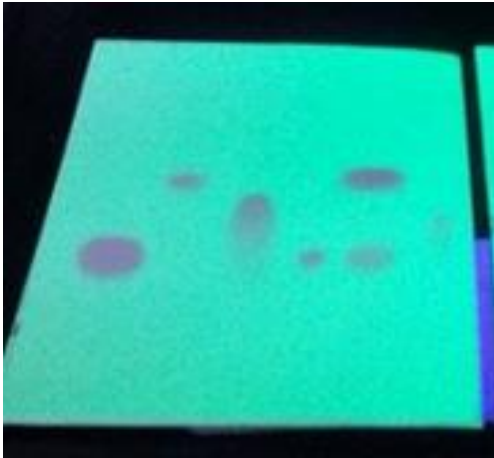
CORRIDA HASTA FRENTE DE SOLVENTE

DEJAR EVAPORAR EL SOLVENTE Y REVELAR

MUESTRAS: aceites de soja, chia, quinoa (todos sin refinar) y oliva

REVELADO

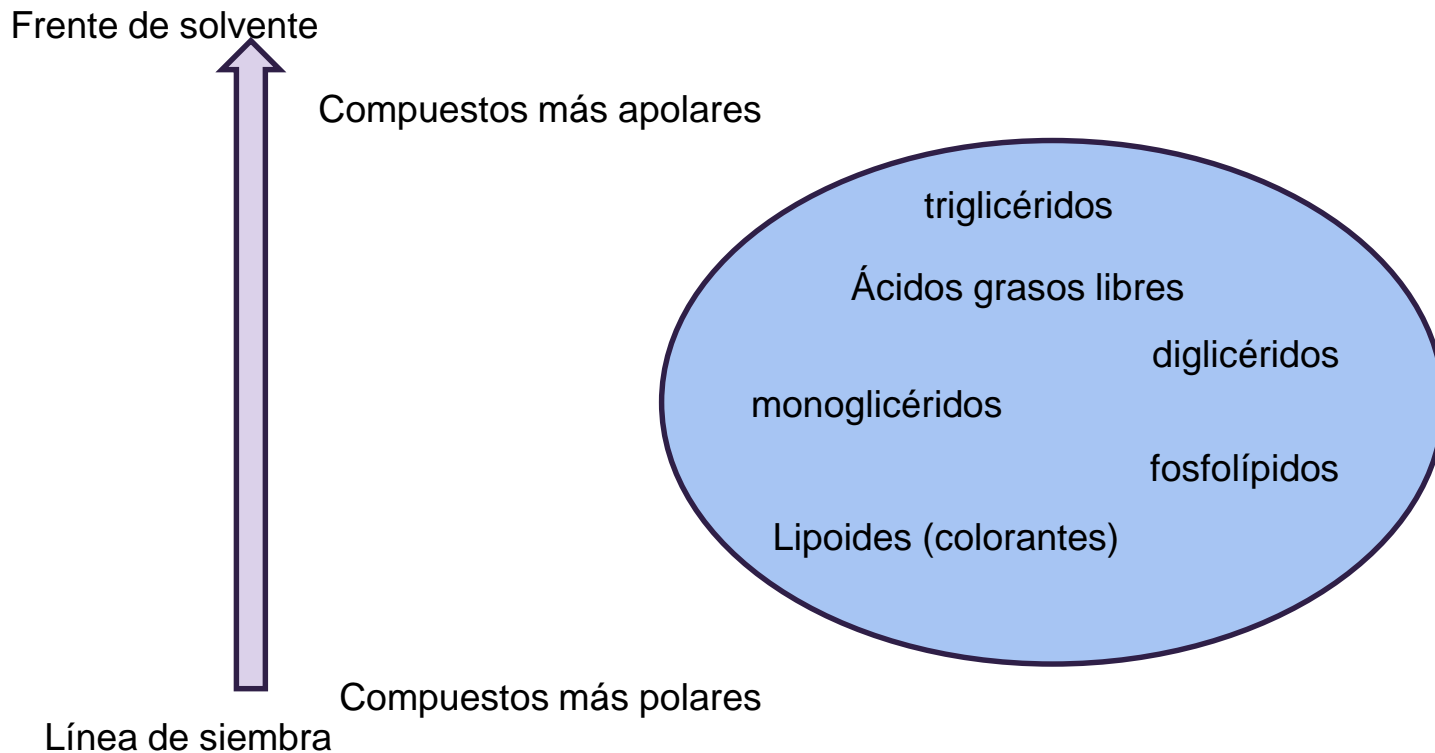
UV



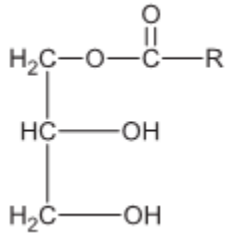
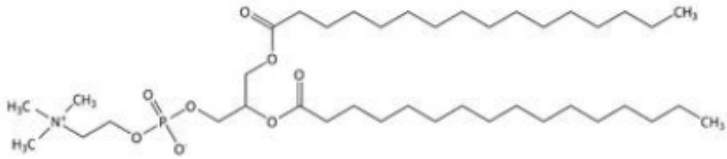
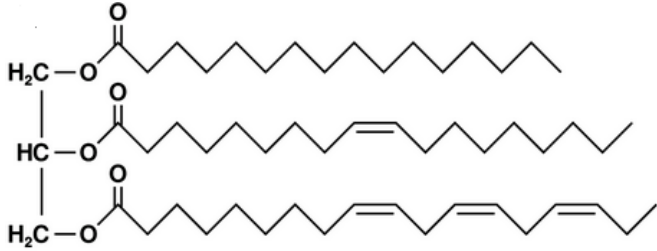
iodo



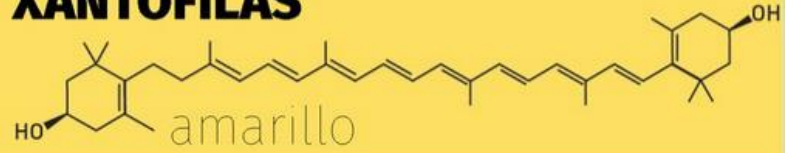
SEPARACIÓN DE COMPONENTES



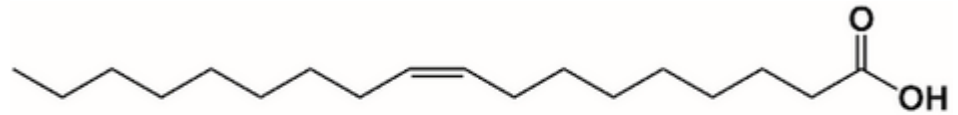
RECORDAR



XANTÓFILAS



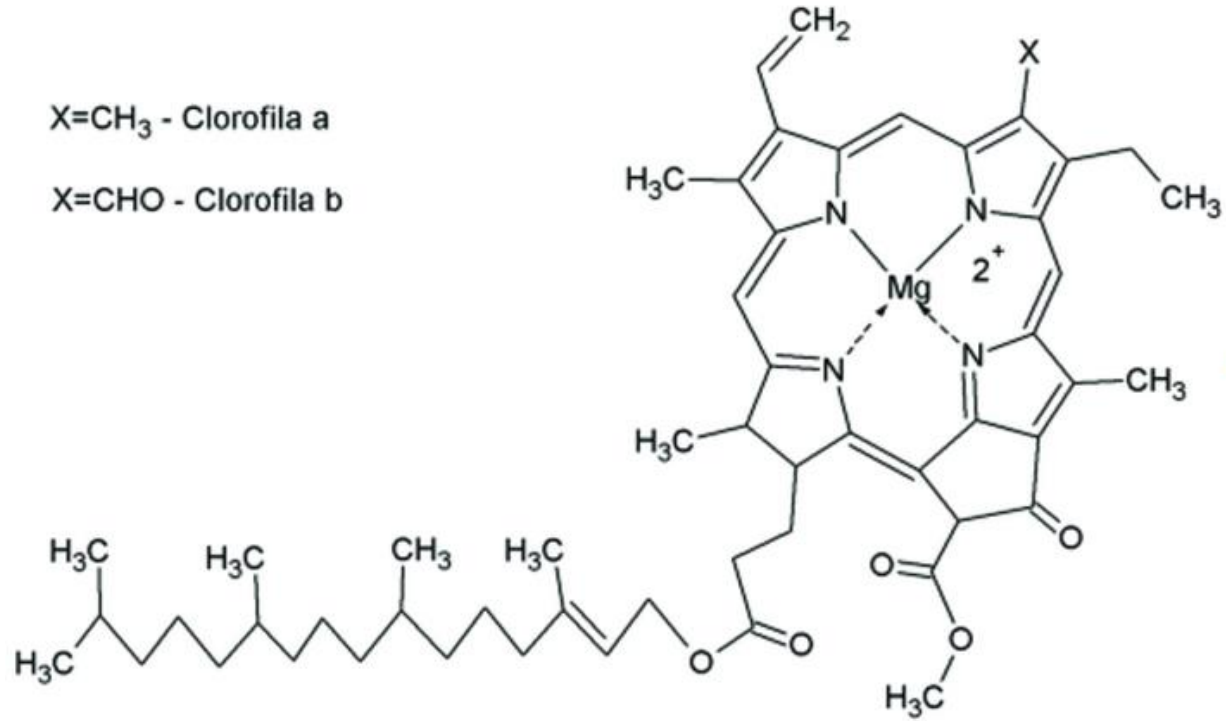
CAROTENOS



ácido oleico

X=CH₃ - Clorofila a

X=CHO - Clorofila b



HASTA LA PRÓXIMA CLASE!!