

Cromatografía

La cromatografía es una técnica muy versátil que puede utilizarse con fines analíticos para identificar los componentes de una mezcla por comparación con patrones o con fines preparativos para purificar mezclas de productos a pequeña o a gran escala. Tiene una amplia aplicabilidad y permite separar mezclas de sustancias de muy distinta naturaleza, tanto en estado líquido como sólido. En muchos casos, esta técnica permite la separación de mezclas muy complejas de productos, pudiéndose aislar con eficacia tantos los productos mayoritarios como los minoritarios.

En la cromatografía, la separación de los productos que componen una mezcla se produce por la diferente velocidad con que éstos se desplazan a lo largo de una fase estacionaria por el efecto de arrastre de una fase móvil que está en contacto con la anterior. Las diferencias de velocidad son debidas a que cada producto de la mezcla interacciona con la fase estacionaria y con la fase móvil de manera diferente. Si los componente de una mezcla, que inicialmente se depositan en un mismo punto de la fase estacionaria, se desplazan a velocidades diferentes, al cabo de un cierto tiempo habrán recorrido distancias distintas; por lo que se encontrarán separados en puntos o zonas distintas de la fase estacionaria (Figura 1).

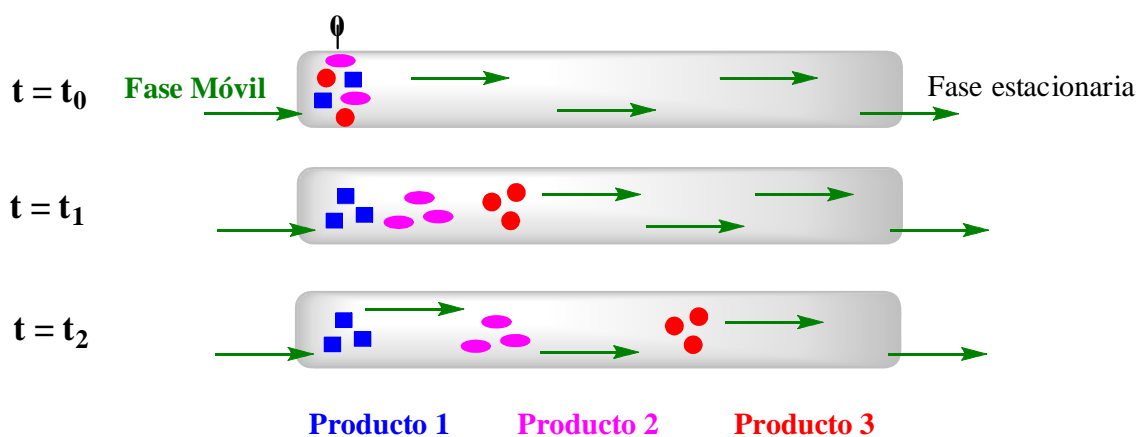


Figura 1

Al desplazamiento de los productos que componen la mezcla a lo largo de la fase estacionaria impulsados por la fase móvil se denomina elución de la mezcla.

Existen distintos tipos de cromatografías. Así, según el estado físico en la que se encuentren las fases estacionaria y móvil, podremos hablar de cromatografía sólido-líquido, cromatografía líquido-líquido (la fase estacionaria es un líquido asociado a un soporte sólido), cromatografía sólido-gas y la cromatografía líquido-gas. Según el tipo

de interacción que se establece entre los productos a separar y las fases estacionaria y móvil, hablaremos de cromatografía de intercambio iónico –se producen interacciones electrostáticas entre iones-, cromatografía de partición –basada en el reparto de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil por diferencias de solubilidad- y cromatografía de adsorción –donde se establecen interacciones electrostáticas del tipo Van der Waals o puentes de hidrógeno-.

En general la cromatografía más utilizada en un laboratorio de síntesis química es la de adsorción en las que la fase estacionaria suele ser alúmina o, más comúnmente, silicagel (sólido poroso con enlaces Si-OH y Si-O-Si) y como fase móvil se utilizan disolventes que de menor a mayor polaridad suelen ser: hexano, diclorometano, éter etílico, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, etanol o metanol y en menor medida agua. En este tipo de cromatografía se establecen equilibrios de adsorción-desorción de los componentes de la mezcla en la fase estacionaria por efecto del paso de una fase móvil que tiende a desplazarlos, siendo las interacciones que se producen entre los compuestos y las fases estacionaria y móvil de tipo fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno. Así, los productos más polares y que pueden formar puentes de hidrógeno con la fase estacionaria se retienen mucho; por lo que se desplazan muy lentamente por la misma. Por el contrario, los compuestos apolares o poco polares interaccionan con la fase estacionaria a través de fuerzas de Van der Waals muy débiles, por lo que se retienen muy poco en la fase estacionaria y se desplazan más rápidamente por la misma.

Una de las principales variables que hay que optimizar cuando se pretende separar una mezcla de sustancias por cromatografía de adsorción es la polaridad del disolvente a utilizar como fase móvil, denominado habitualmente eluyente. Como eluyentes se pueden utilizar disolventes puros o mezclas de los mismos y para seleccionar el más adecuado para separar una determinada mezcla hay que tener en cuenta que los disolventes polares desplazan a los productos depositados sobre la fase estacionaria a mayor velocidad que los disolventes apolares o poco polares.

Dependiendo del tipo de soporte utilizado para depositar la fase estacionaria de silicagel, las cromatografías de adsorción se pueden realizar sobre capa fina o en columna.

1. Cromatografía en Capa Fina (CCF):

En este tipo de cromatografía la sílica gel se encuentra depositada en forma de una fina capa de espesor uniforme sobre un soporte sólido de plástico, vidrio o aluminio.

Para efectuar una cromatografía en capa fina, la mezcla se disuelve en un disolvente volátil y por medio de un capilar se deposita en un punto cercano a uno de los extremos de la placa. A continuación se introduce la placa en una cubeta cromatográfica en cuyo interior hemos colocado una pequeña cantidad de eluyente. El disolvente asciende por capilaridad por la placa y a su paso arrastra hacia arriba a los componentes de la mezcla a distintas velocidades. Cuando el frente del eluyente está próximo a alcanzar la parte superior de la placa, se saca la placa de la cubeta, se señala hasta donde ha llegado el frente y se deja secar. Las manchas correspondientes a los distintos productos puros que componen la mezcla se encontrarán distribuidos a distintas alturas lo largo de la vertical respecto a la posición inicial donde se había depositado la mezcla y para visualizarlas, en la mayoría de los casos, hay que recurrir a la utilización de reveladores.

El R_f de un compuesto es una magnitud que se calcula dividiendo la distancia que ha recorrido la mancha correspondiente a este compuesto, respecto al punto inicial donde se había depositado por la distancia recorrida por el frente del eluyente. El valor de esta magnitud es característico para cada compuesto siempre y cuando se reproduzcan las mismas condiciones experimentales en las que se ha realizado la cromatografía. Dado que reproducir exactamente las condiciones experimentales en las que se ha realizado una CCF es prácticamente imposible, se admiten pequeñas oscilaciones de este valor de un ensayo a otro; por lo que, si se intenta comparar una mezcla con una serie de patrones puros con fines analíticos la mejor opción es eluir todas las muestras en la misma placa, depositando las muestras en puntos separados a lo largo de una línea horizontal cerca del borde inferior de la placa, denominada línea base (Figura 2).

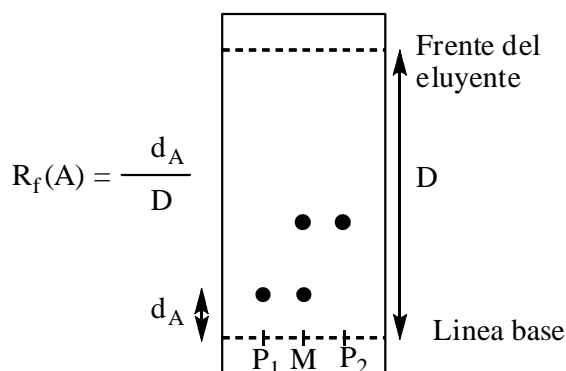


Figura 2

Cuanto más polar es un compuesto, menor es su R_f , y viceversa. Además, para un mismo compuesto, el cambio de eluyente de uno menos polar a otro más polar da lugar a un incremento en el valor de R_f . Por lo tanto, como eluyente óptimo se suele seleccionar un disolvente o mezcla de disolventes que dé lugar a un valor medio de R_f en torno a 0,4 para los componentes de la muestra.

Cuando la CCF se realiza con fines analíticos se utilizan placas con un espesor uniforme de la capa de sílica gel de entre 0,1 y 0,2 mm. La CCF con fines analíticos se suele aplicar para:

- Determinar los componentes de una mezcla
- Identificar un compuesto
- Comprobar la pureza de un compuesto
- Monitorizar una reacción
- Seleccionar el eluyente más adecuado para hacer una cromatografía en columna
- Analizar las fracciones recogidas por cromatografía en columna

Cuando la CCF se realiza con fines preparativos se utilizan placas de silicagel de mayor tamaño, con un espesor uniforme de la capa de entre 1 y 2 mm; lo que permite separar mezclas de entre 100 y 200 mg por término medio.

2. Cromatografía en Columna:

En este tipo de cromatografía la silicagel se introduce en el interior de una pieza de vidrio denominada columna de cromatografía. Una columna de cromatografía como la que aparece en la figura 3 consta de un tubo de vidrio que termina en una llave. El tubo de vidrio puede ser de diversos grosores (habitualmente entre 1 y 10 cm) en función de la cantidad de silicagel que queramos introducir. Entre el final del tubo y la llave suelen estar equipadas con una placa filtrante o en su defecto se coloca un algodón que permita retener el gel de sílice que se introduce por la parte superior de la columna. Además, en la parte de arriba del tubo de vidrio se suele soldar un esmerilado hembra, imprescindible si queremos acelerar la elución utilizando aire a presión.

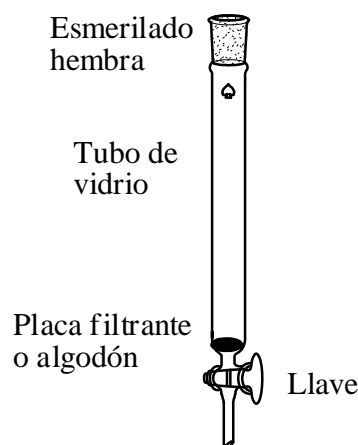


Figura 3

Obviamente la cantidad de gel de sílice que se puede introducir en una columna es mucho mayor que la que se puede depositar sobre una capa fina. Dado que la cantidad de fase estacionaria utilizada está directamente relacionada con la cantidad de muestra que podemos separar, la cromatografía en columna se utiliza exclusivamente con fines preparativos y, en la actualidad, se han convertido en el método más general de separación y purificación de compuestos orgánicos.

El procedimiento experimental para realizar una separación por cromatografía en columna se puede dividir en tres fases.

Primera fase: consiste en la preparación del lecho de silicagel (Figura 4, A). Para ello, se prepara una suspensión de silicagel y eluyente lo suficientemente fluida para que pueda ser depositada con facilidad en el interior de la columna por la parte superior de la misma. A continuación se pasa eluyente hasta que el lecho de gel de sílice quede perfectamente compactado.

Segunda fase: introducción completa de la muestra en el interior del lecho de gel de sílice (Figura 4, B). Para ello, el procedimiento estándar consiste en disolver la muestra en la mínima cantidad posible de eluyente y añadir la disolución resultante con sumo cuidado por la parte superior de la columna con el objeto de no distorsionar la planaridad del lecho de silicagel.

Tercera fase: se procede a efectuar la elución de la columna (Figura 4, C). Para ello se llena con eluyente la parte del tubo situado por encima del lecho de silicagel, se abre la llave inferior y el eluyente se va recogiendo en varios erlenmeyers. Durante la elución, los componentes de la mezcla se van desplazando a velocidades distintas por el interior del lecho de silicagel y se intenta recogerlos en fracciones separadas a medida que van

saliendo por la parte inferior de la columna. Los compuestos menos polares se retienen menos y son los primeros en eluir; mientras que los más polares quedan más retenidos en la fase estacionaria, su avance a lo largo del lecho de silicagel es más lento y eluyen más tarde. En algunos casos, es necesario incrementar la polaridad del eluyente para lograr la elución total de los compuestos más polares, lo que se denomina elución en gradiente.

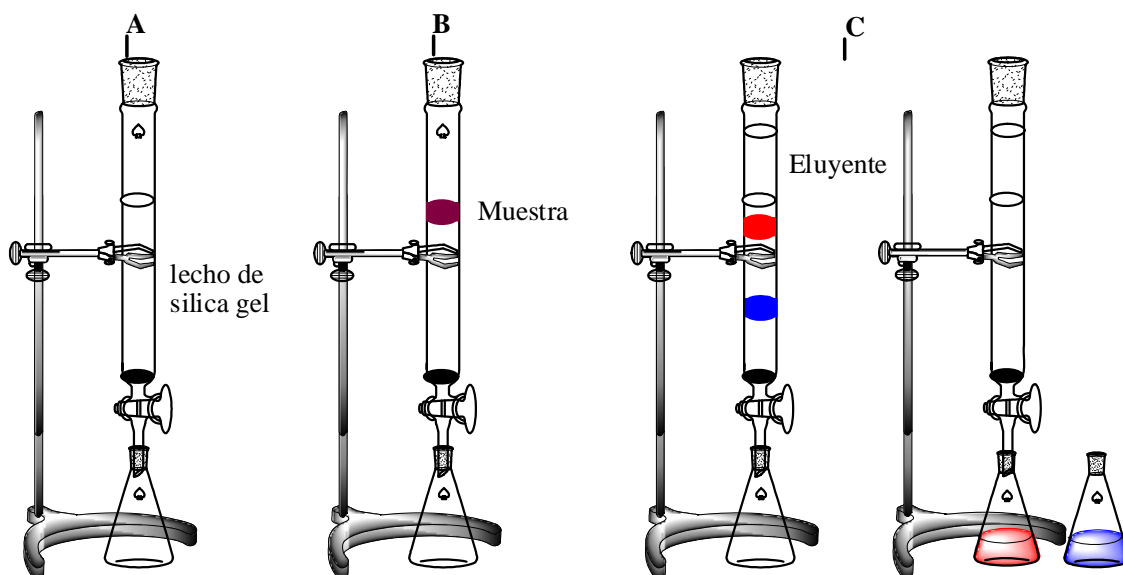


Figura 4

La elución de la columna puede realizarse a presión atmosférica (por gravedad) o a presiones más elevadas, lo que se denomina cromatografía tipo “flash”, en cuyo caso se conecta la columna cromatográfica a una fuente de aire comprimido a través del esmerilado superior. La cromatografía de tipo “flash” utiliza gel de sílice de tamaño de partícula inferior, lo que da lugar a separaciones más eficaces.

Por norma general, una columna de cromatografía se rellena con gel de sílice hasta alcanzar una altura de unos 20 cm por término medio. La altura del lecho de gel de sílice se suele incrementar si los valores de R_f de los compuestos a separar son muy próximos (R_f relativos inferiores a 0,2). El diámetro de la columna a elegir está relacionado con la cantidad de muestra a separar. A mayor cantidad de muestra mayor cantidad de gel de sílice hay que introducir en la columna para no perder eficacia en la separación; lo que obliga a utilizar columnas de mayor diámetro. Por norma general, se suele introducir en la columna unos 30 gramos de silicagel por cada gramo de muestra a separar.

Antes de realizar una cromatografía en columna es necesario seleccionar el eluyente o combinación de eluyentes (si se trata de una elución en gradiente) más apropiados, lo cual se realiza por cromatografía en capa fina. El eluyente seleccionado debe dar lugar a una buena separación de los componentes de la mezcla en la placa, con R_f relativos superiores a 0,1 si es posible, y situar los compuestos que se quieren purificar en valores de R_f comprendidos entre 0,7 y 0,3 dependiendo de si la separación es fácil o difícil. Si el producto que queremos purificar presenta valores de R_f altos en el eluyente seleccionado (por encima de 0,5) la elución del mismo será muy rápida; pero la capacidad de separación de la columna se verá seriamente comprometida, de forma que la columna solo será eficaz si la separación es fácil. Por el contrario, si el producto que queremos purificar presenta un valor de R_f alrededor a 0,3 en el eluyente seleccionado, la capacidad de separación de la columna será muy alta; pero la velocidad de elución del producto será muy baja. Estas condiciones suelen ser las seleccionadas cuando las impurezas presentan valores de R_f muy próximos al del producto o productos que queremos purificar.

Incorporado en el material docente de este curso hay cuatro videos en los que se describen con detalle los procedimientos experimentales para llevar a cabo cromatografías en capa fina o en columna de silicagel tanto de una mezcla de colorantes como de una mezcla de productos incoloros. Los dos videos que muestran la separación de mezclas coloreadas se han seleccionado para que el estudiante pueda seguir visualmente el proceso de separación de los componentes de la mezcla, por lo que se recomienda visionarlos en primer lugar. Los dos videos en los que se muestra la separación por CCF o por CC de muestras de productos incoloros muestran una situación más real, muy cercana a las que suelen enfrentarse los químicos en su labor cotidiana al frente de un laboratorio de síntesis química.