

Extracciones y sistemas cromatográficos

- Fernando de J. Amézquita L.
 - Diana Mendoza O.



Universidad de Guanajuato

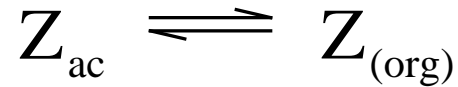
La extracción es utilizada para el aislamiento o enriquecimiento de ciertos compuestos o grupos de compuestos en mezclas químicas. Por ejemplo, trazas de compuestos orgánicos presentes en el suministro de aguas públicas pueden ser concentradas y aisladas por medio de extracción de grandes volúmenes de agua con, relativamente, pequeños volúmenes de disolventes no polares (por ejemplo *n*-hexano). Las impurezas de metales en traza en productos importantes industriales pueden ser separados de mayores constituyentes abrumadores por extracción selectiva con reactivos específicos. Las mezclas complejas de compuestos orgánicos pueden ser simplemente clasificadas en ácidos, bases, y especies neutras por medio de dos pasos de extracción.

Sistema



Equilibrio de fases

Termodinámica



$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln(a_z)_{org} - RT \ln(a_z)_{ac}$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{(a_z)_{org}}{(a_z)_{ac}}$$

como en el equilibrio: $\Delta G = 0$, obtenemos la relaciones que se muestran a continuación:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{(a_z)_{org}}{(a_z)_{ac}}$$

$$\ln \frac{(a_z)_{org}}{(a_z)_{ac}} = -\frac{\Delta G^\circ}{RT}$$

$$\frac{(a_z)_{org}}{(a_z)_{ac}} = e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}}$$

Así la razón de las actividades del soluto en las dos fases viene a ser una constante determinada por ΔG y T . En una forma completamente análoga al tratamiento de constante de equilibrio, llamaremos a esta razón de actividad el coeficiente de partición termodinámica K_p :

$$K_p = \frac{(a_z)_{org}}{(a_z)_{ac}}$$

El coeficiente de partición

Como en el sistema previamente discutido, los coeficientes de actividad requeridos raramente son conocidos, se utiliza una aproximación basada solamente en las concentraciones. Esta razón es aproximadamente:

$$K_p = \frac{[Z]_1}{[Z]_2}$$

donde K_p es llamado el coeficiente de partición. Debido a que las soluciones diluidas de especies moleculares se acercan más al comportamiento ideal que las que contienen solutos iónicos la aproximación dada aquí es mejor que la hecha para las constantes de equilibrio.

La razón de distribución

En la extracción de un ácido orgánico, HA, del agua por un disolvente orgánico, hay una cuestión esencialmente importante. ¿Qué tan eficiente es la extracción?, o en otras palabras ¿cuanto ácido quedó en el agua? El coeficiente de partición únicamente relaciona la razón $[HA]_{\text{org}} / [HA]_{\text{ac}}$, la cual no nos dice la historia completa en este caso, debido a que en la fase acuosa el ácido puede disociarse.



$$D_c = \frac{(\text{conc. total de todas las formas de Z})_1}{(\text{conc. total de todas las formas de Z})_2} = \frac{c_1}{c_2}$$

Los dos equilibrios están gobernados por las expresiones:

$$K_p = \frac{[\text{HA}]_1}{[\text{HA}]_2} \quad \text{y} \quad K_a = \frac{[\text{A}^-]_2 [\text{H}^+]_2}{[\text{HA}]_2}$$

Si asumimos que las especies cargadas son esencialmente insolubles en la fase orgánica, la razón de distribución está dada por:

$$D_c = \frac{[\text{HA}]_1}{[\text{HA}]_2 + [\text{A}^-]_2}$$

La combinación de las ecuaciones de los equilibrios, nos dará :

$$D_c = \frac{[\text{HA}]_1}{\frac{[\text{HA}]_1}{K_p} + \frac{K_a [\text{HA}]_1}{K_p [\text{H}^+]_2}}$$

Que puede ser simplificada para quedar como:

$$D_c = \frac{K_p [\text{H}^+]_2}{[\text{H}^+]_2 + K_a}$$

$$D_c = \frac{K_p [H^+]_2}{[H^+]_2 + K_a}$$

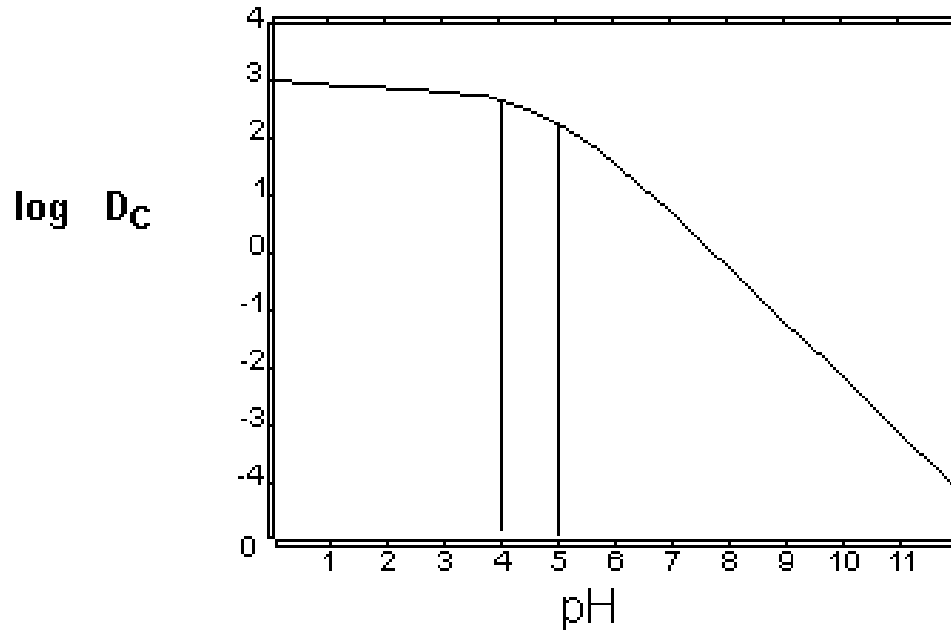
Cuando graficamos sobre coordenadas logarítmicas la razón de distribución, tendremos dos regiones de línea recta:

primero: $[H^+]_2 \gg K_a, \quad D_c \approx K_p \quad \log D_c = \log K_p = (\text{constante})$

segundo: $K_a \gg [H^+]_2$ entonces: $D_c = \frac{K_p [H^+]_2}{K_a}$

y $\log D_c = \log K_p + \log [H^+]_2 - \log K_a$
 $\log D_c = (\text{const})' - pH$

Si utilizamos los valores para K_a y K_p que son los típicos para la distribución de un ácido graso entre éter y agua, $K_a= 10^{-5}$ y $K_p= 10^3$, puede ser construido el gráfico siguiente, que muestra claramente la bien conocida dependencia de la extracción sobre el pH.

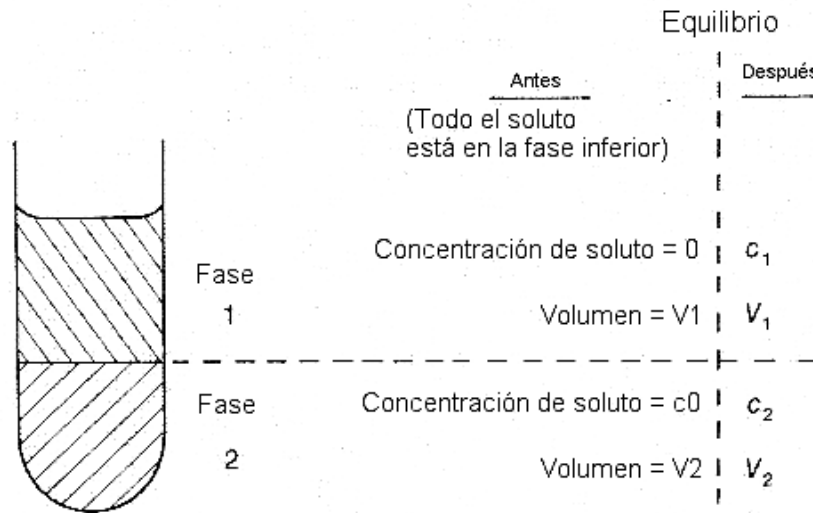


Razón de distribución (D_c) como una función del pH para el fraccionamiento de un ácido carboxílico entre éter y un buffer cuando $K_a= 10^{-5}$ y $K_p= 10^3$

Teoría de los métodos de contactos de fase

Etapa simple

La unidad de contacto.



En el equilibrio, la razón de la concentración total de soluto en las dos fases está dada por: $D_c = \frac{c_1}{c_2}$

donde la razón de distribución, D_c , será considerada constante a través de la presentación. Sin embargo, las cantidades actuales de soluto presentes en cada fase dependen de los volúmenes de fase. Para c expresada en moles/litro y V en litros, Podemos escribir las siguientes relaciones:

Moles de soluto en fase 2 inicialmente = $c_0 V_2$

Moles de soluto en fase 1 después del equilibrio = $c_1 V_1$

Moles de soluto en fase 2 después del equilibrio = $c_2 V_2$

Es muy útil definir símbolos para las cantidades fraccionarias de soluto en cada fase después del equilibrio:

$$p \equiv \text{fracción de soluto en la fase 1 después del equilibrio} = \frac{c_1 V_1}{c_0 V_2}$$

$$q \equiv \text{fracción del soluto en la fase 2 después del equilibrio} = \frac{c_2 V_2}{c_0 V_2}$$

Usando las definiciones anteriores y considerando $\frac{V_1}{V_2} = V_r$

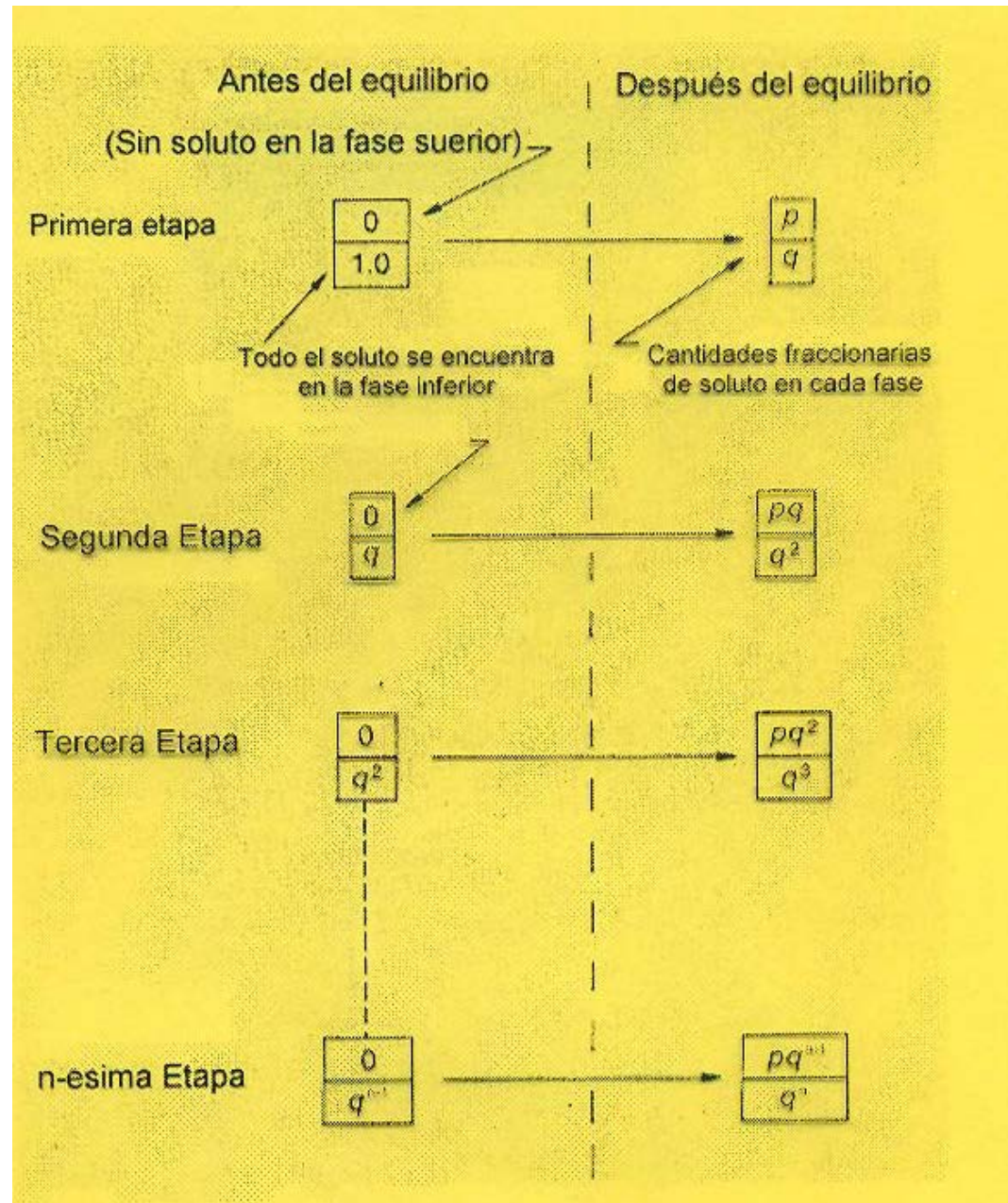
(razón de volúmenes), se podrá demostrar que:

$$p = \frac{D_c V_r}{D_c V_r + 1} \quad \text{y} \quad q = \frac{1}{D_c V_r + 1}$$

Para calcular el porcentaje de soluto extraído en la fase 1, todo lo que necesitamos es expresar p en por ciento:

$$\text{porcentaje de soluto extraído} \quad E = 100p$$

Etapa múltiple



Cantidades de soluto:

$$\text{Fase superior : } pq^{n-1} \cdot (\text{Cantidad inicial de soluto}) = pq^{n-1}c_0V_2$$

$$\text{Fase inferior : } q^n \cdot (\text{Cantidad inicial de soluto}) = q^n c_0 V_2$$

Concentraciones de Soluto

$$\text{Fase superior : } \frac{pq^{n-1}c_0V_2}{V_1} = \frac{pq^{n-1}c_0}{V_1}$$

$$\text{Fase inferior : } \frac{q^n c_0 V_2}{V_2} = q^n c_0$$

La cantidad total de soluto extraído es, claro, la suma de todas las cantidades de soluto contenidas, en todas las fases superiores sucesivas; o más simplemente, la cantidad de soluto que existía originalmente en la fase inferior menos el remanente en la fase inferior después de la última extracción

$$(p + pq + pq^2 + \dots + pq^{n-1})c_0V_2 = (1 - q^n)c_0V_2$$

Eficiencia máxima posible:

La eficiencia máxima posible de la extracción con un volumen total determinado de disolvente - extractor puede ser encontrada mediante una ruta muy interesante, de la definición de q .

$$q = \frac{1}{D_c V_r + 1} = \frac{V_2}{D_c V_1 + V_2}$$

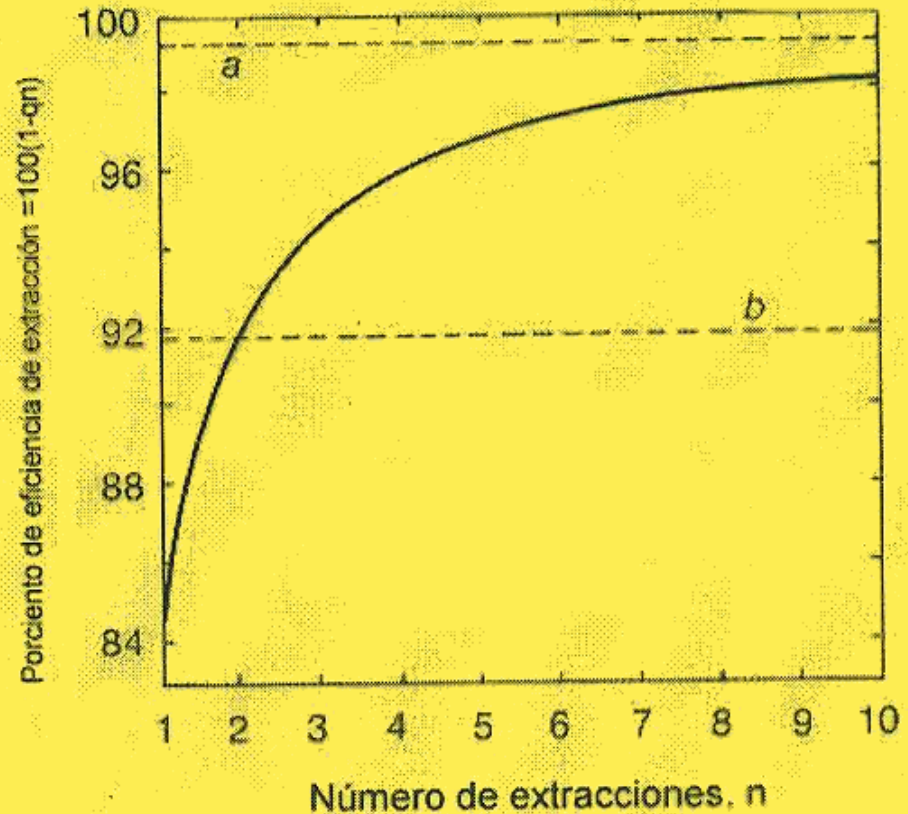
Podemos escribir una expresión para la cantidad fraccionaria de soluto que permanece sin extraerse después de cualquier número, n , de extracciones con un volumen total de fase extractora $\sum V_1$. (Esto es, n extracciones cada una con un volumen de disolvente $\sum V_1/n$)

$$q^n = \left(\frac{V_2}{D_c \frac{\sum V_1}{n} + V_2} \right)^n$$

Tomando el límite de esta expresión cuando $n \rightarrow \infty$ obtenemos:

$$q^\infty = e^{-D_c \sum V_1 / V_2}$$

Por ciento de eficiencia de extracción como una función de n , el número de subdivisiones y extracciones separadas, usando un volumen fijo total de extracciones de fase $\sum V_1$. La línea continua representa el caso donde $\sum V_1 = 5V_2$, y $D_c = 1$. La línea discontinua, **a**, muestra el máximo de eficiencia posible para este caso. La línea discontinua **b**, muestra la asíntota máxima para $D_c \sum V_1 / V_2 = 2.5$. Para una mayor eficiencia al 99.9% se requiere que $D_c \sum V_1 / V_2 > 6.9$.



Separación de dos solutos. Hasta ahora, hemos estudiado el grado máximo de extracción de un soluto. En una situación práctica, es más común aplicar el procedimiento a la separación de un soluto de otro, obteniendo por consecuencia una separación de los dos componentes. Claramente, las razones de distribución de los dos solutos tendrán mucho que ver con ello y podemos suponer que el grado de separación de A y B estará determinada por la razón D_{cA}/D_{cB} (aquí, y en las siguientes discusiones los subíndice A y B se refieren a los compuestos A y B). Los cálculos siguientes contrastan los sistemas, ambos con la razón $D_{cA}/D_{cB} = 10^3$, y muestra que la situación es más complicada.

$$D_{cA} = 32, D_{cB} = 0,032$$

$$D_{cA} = 10^3, D_{cB} = 1$$

Para una extracción simple con $V_r = 1$

$$p_A = 0,97, p_B = 0,03$$

$$p_A = 0,999, p_B = 0,50$$

Para concentraciones iniciales iguales de A y B en la fase 2

Se obtiene A en un 97% de pureza
97% de B removido

Se obtiene A en un 66% de pureza
Solo 50% de B es removido

Sucede que el primer ejemplo trata el caso más favorable. Para $V_r = 1$, la mejor separación de A en la solución que contiene a A y B la obtendremos cuando:

$$\sqrt{D_{cA} D_{cB}} = 1$$

Debido a que los valores de D_c relacionan únicamente a las concentraciones y no a las cantidades, es mejor ampliar nuestras consideraciones y reordenar la ecuación anterior en términos de p y q , y en términos de las concentraciones y volúmenes:

$$1 = \left[\left(\frac{p_A}{q_A} \right) \left(\frac{p_B}{q_B} \right) \right]^{1/2} = \left[\left(\frac{c_{1A} V_{1A}}{c_{2A} V_{2A}} \right) \left(\frac{c_{1B} V_{1B}}{c_{2B} V_{2B}} \right) \right]^{1/2} = \sqrt{D_{cA} D_{cB} V_r^2}$$

Reordenando la ecuación se demuestra que es posible optimizar las condiciones para la separación ajustando V_r de tal manera que:

$$V_r = (D_{cA} D_{cB})^{-1/2}$$

En el segundo caso, la aplicación de la ecuación (1.32) da un V_r óptimo de 0,03. Por tanto, si se aplica la extracción de un litro de la fase inferior con 32 mL de fase superior, se obtendrá el resultado óptimo del primer caso.

Distribución de contracorriente

Antes del primer equilibrio, $n=0$, todo el soluto está en $r=0$

	0							
	1.0	0	0	0	0	0	0	...
$r =$	0	1	2	3	4	5		

Después del primer equilibrio

	p							
	q	0	0	0	0	0	0	...

Después de la primera transferencia, $n=1$

	0	p						
	q	0	0	0	0	0	0	...
$r =$	0	1	2	3	4	5		

Después del segundo equilibrio

	pq	p^2						
	q^2	pq	0	0	0	0	0	...

Después de la segunda transferencia, $n=2$

	0	pq	p^2					
	q^2	pq	0	0	0	0	0	...
$r =$	0	1	2	3	4	5		

Después del tercer equilibrio

	pq^2	$2p^2q$	p^3					
	q^3	$2pq^2$	p^2q	0	0	0	0	...

Después de la tercera transferencia, $n=3$

	0	pq^2	$2p^2q$	p^3				
	q^3	$2pq^2$	p^2q	0	0	0	0	...
$r =$	0	1	2	3	4	5		

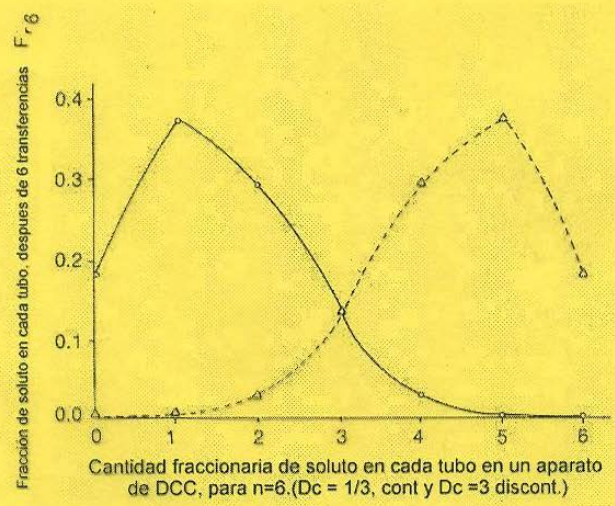
$$F_{r,n} = \frac{n!}{(n-r)! r!} p^r q^{(n-r)}$$

Migración del soluto

$$r_{max} \approx n p = \frac{n D_c V_r}{D_c V_r + 1}$$

Table 15-1. $F_{r,n}$ Valores en una distribución de contracorriente con $n = 6$

Número de tubo = $r =$	0	1	2	3	4	5	6
Término de expansión binomial	q^6	$6 p q^5$	$15 p^2 q^4$	$20 p^3 q^3$	$15 p^4 q^2$	$6 p^5 q$	p^6
Fración de sustancia con $D_c = 3$	$\frac{1}{4096}$	$\frac{18}{4096}$	$\frac{135}{4096}$	$\frac{540}{4096}$	$\frac{1215}{4096}$	$\frac{1548}{4096}$	$\frac{729}{4096}$
Fración de sustancia con $D_c = \frac{1}{3}$	$\frac{729}{4096}$	$\frac{1548}{4096}$	$\frac{1215}{4096}$	$\frac{540}{4096}$	$\frac{135}{4096}$	$\frac{18}{4096}$	$\frac{1}{4096}$



Para dos sustancias A y B:

$$\Delta r_{max} = (r_{max})_A - (r_{max})_B = n(p_A - p_B)$$

$$\Delta r_{max} = n \Delta p$$

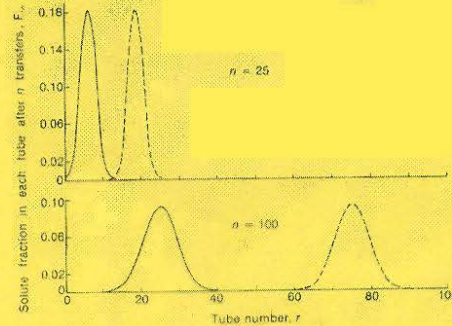
La fracción de soluto cuando el número de extracciones es grande, está dada por:

$$F_{r,n} = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sqrt{npq}} e^{-[(nr-r)^2 / 2npq]} \quad (\text{for } n > 24)$$

La anchura de pico w

$$w = 4\sigma = 4\sqrt{npq}$$

Para la siguiente figura:



peak separation

$$\Delta r_{\max} = n \Delta p$$

$$= n (0.5)$$

For $n = 25$:

$$\Delta r_{\max} = 12.5$$

For $n = 100$:

$$\Delta r_{\max} = 50$$

peak width

$$w = 4\sqrt{npq}$$

$$= 4\sqrt{n} \sqrt{\frac{p}{1-p}}$$

$$w = 8.67$$

$$w = 17.3$$

La Resolución está definida como:

$$\mathcal{R} = \frac{\Delta r_{\max}}{w} = \frac{\Delta r_{\max}}{4\sigma}$$

La dependencia de la resolución en función del número de extracciones:

$$\mathcal{R} = \frac{\Delta r_{\max}}{4\sigma} = \frac{n \Delta p}{4\sqrt{npq}} = \sqrt{n} \frac{\Delta p}{4\sqrt{pq}}$$

Cromatografía

- La cromatografía es un método físico de **separación** en el que los componentes a desglosar se distribuyen entre **dos fases**, una de las cuales constituye un **lecho estacionario** de gran desarrollo superficial y la otra es un **fluido que pasa a través** o a lo largo del lecho estacionario.

Historia de la Cromatografía

- A través de la historia de la química, aparecen fragmentos de la Técnica cromatográfica, pero los primeros experimentos cromatográficos que incluyen todos los elementos esenciales del método son debidos al Bioquímico Mikhail Tswett, quien publicó su primer artículo sobre el tema en 1903. Tswett es algunas veces descrito como "Ruso," otras como "Polaco". En efecto fue un Ruso nacionalizado, nació en Italia, hijo de padre Ruso y madre Italiana, educado en la Universidad de Génova (obtuvo su doctorado en 1896) y fue un miembro de la Facultad de la Escuela Veterinaria en Warsaw. Las sustancias que investigó Tswett fueron los pigmentos de las plantas, y la técnica empleada fue la cromatografía de adsorción con una fase estacionaria de carbonato de calcio y éter de petróleo como fase móvil. Las zonas cromatográficas fueron 'detectadas' simplemente por sus colores naturales, y Tswett llamó a la Técnica Cromatografía (en 1906), Tswett publicó muchos artículos, pero su último trabajo fue interrumpido por la primera guerra mundial.
- La técnica se perdió hasta su redescubrimiento, en 1931 de nuevo por Bioquímicos.

INTRODUCCION HISTORICA

- 1850:** F.F. RUNGE Comprobó que los cationes inorgánicos se separan por migración diferencial.
- 1890:** D.T. DAY Observó que al pasar petróleo por un lecho de tierras adsorbentes el líquido resultante presenta distinta composición que el inicial (indicativo de adsorción de algunos componentes): Cromatografía en Columna (Primera noticia).
- 1903:** TSWETT Utiliza la Cromatografía en Columna para separar los componentes de extractos vegetales coloreados, derivación de término "CROMATOGRAFIA".
- 1931:** KUHN Y LEDERER Separan carotenos y xantofilas en columnas cromatográficas. 1930 con Lederer cuando consigue separar los colorantes de la yema de huevo. Posteriormente los químicos Karrer, Kuhn y Ruzicka desarrollan la cromatografía en el campo de la química orgánica e inorgánica, y obtienen el premio Nobel por sus trabajos en 1937, 1938, 1939 respectivamente.
- 1941** MARTIN Y SYNGE Esbozan la idea de Cromatografía de Gases. En 1952: Archer J.P. Martin / Richard L.M. Synge recibieron el premio Nobel «por la invención de la cromatografía»
- 1944** Consden, Gordon y Martin Descubren la Cromatografía en Papel
- 1949:** MARTIN Y JAMES Utilizan Cromatografía de Gases por primera vez, separación de ácidos grasos volátiles.
- 1954:** N. H. RAY Publica una colección de cromatogramas que demuestran la posibilidad de extender el campo de la Cromatografía de Gases.
- 1955:** EVANS Y TATLOW Realizan separaciones de componentes en muestras de entre 0.5 y 10 g, inicia la Cromatografía de Gases Preparativa.
- 1958:** Sthal Generalizó el procedimiento de cromatografía en capa fina .
- 1958:** GOLAY Propone columnas capilares sin relleno, comenzando su desarrollo.

Clasificación

- Por fases se clasifica en:
- Fase Móvil Fase Estacionaria
- Líquido - Líquido
- Líquido - Sólido
- Gas - Líquido
- Gas - Sólido

Clasificación por técnica

Cromatografía en papel

Normal
de intercambio iónico
electroforesis

Cromatografía en Capa delgada

Normal
modificada

Cromatografía en Columna

Normal
de Intercambio iónico
de Permeación en gel (exclusión)

Cromatografía en Fase de vapor

Con columnas empacadas
con columnas capilares

Cromatografía de Líquidos de Alta resolución

Fase normal
fase inversa

Características

Toda Técnica cromatográfica está compuesta por:

Soporte

Fase Móvil

Fase estacionaria.

Las etapas de las técnicas son:

Aplicación

Desarrollo

Revelado.

Los aspectos más importantes en la aplicación de cualquiera son la limpieza y el uso de reactivos de grado apropiado

Cromatografía en papel

En 1944, A. J. P. Martin y colaboradores desarrollaron una técnica aún más simple en la que una columna fue reemplazada por una tira de papel. Las fibras de celulosa del papel (que contienen una cantidad considerable de agua) sirve como fase estacionaria y un disolvente orgánico, como fase móvil, viaja a lo largo del papel por flujo de capilaridad (como un líquido migra en un papel secante). Los solutos coloridos pueden verse directamente, y muchos otros pueden ser detectados si el papel es rociado con algún reactivo químico que marcará las zonas por formación de color. La simplicidad asombrosa de la cromatografía en papel llevó a su amplia aceptación y aplicación. Sin embargo, tiene una gran desventaja, de no ofrecer elección de fase estacionaria. Si los compuestos por separar no son retenidos por las fibras de celulosa hidratada, se debe usar alguna otra técnica.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

CONCEPTO DE LAS CONSTANTES R

Se ha indicado en el capítulo anterior que el movimiento relativo de alguna sustancia respecto al disolvente en un sistema cromatográfico dado es constante y característico de la sustancia. En la cromatografía sobre papel los valores de los R_f se han citado constantemente:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

En algunos casos, el frente del disolvente sale fuera del papel, y por esto es más conveniente expresar el movimiento de alguna sustancia por comparación con el movimiento de otra (que es similar químicamente). En este caso es mejor aplicar los valores de R_x que los de R_f :

$$R_x = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por la sustancia standard } X}$$

- **Preparación del papel**

Se utiliza papel Whatman del número 1 o del número 3

El papel se corta de manera apropiada, según se vaya a desarrollar la cromatografía. Solo se debe tocar la parte extrema del inicio. Es importante extremar la limpieza.

- **Aplicación**

La muestra se debe aplicar a 2 cm de altura del extremo y se debe procurar que se conozca la cantidad depositada.

- **Desarrollo**

- Es conveniente que la *cuba de desarrollo* siempre esté saturada para que se favorezca el desarrollo. La elección del disolvente será de acuerdo a las características de polaridad de la mezcla, recuerde que la celulosa es polar.
- El papel debe introducirse de tal manera que no quede sumergido en el punto de aplicación. Hay que retirarlo cuando le falten 2 cm al disolvente para cubrir toda la superficie y marcar ese punto.

Secado

El papel se deja secar o se le ayuda con una corriente de aire, mediante una secadora de pelo.

Revelado

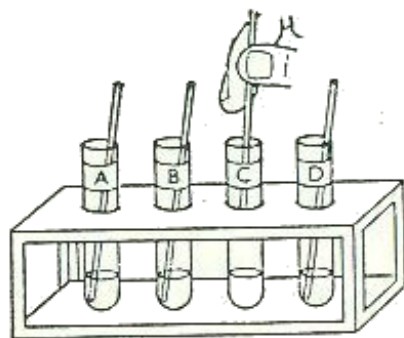
En algunas ocasiones son perceptibles las manchas de los componentes durante el desarrollo, esto se puede perder cuando se seca el papel. Es recomendable observar el papel con luz ultravioleta tanto con onda corta como con onda larga; esto es el revelado físico y permite analizar el desarrollo para, si es necesario, ahora desarrollar en la segunda dimensión.

Físico

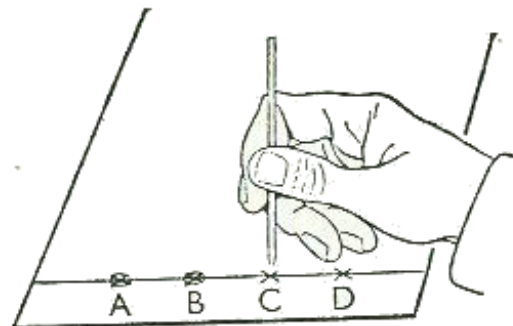
Se usa luz ultravioleta y se analiza por contraste con la superficie del papel.

Químico

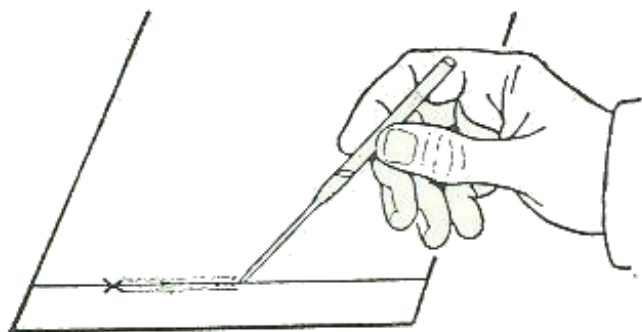
Se utilizan reveladores específicos. Cuya finalidad es formar compuestos estables que permiten un registro permanente.



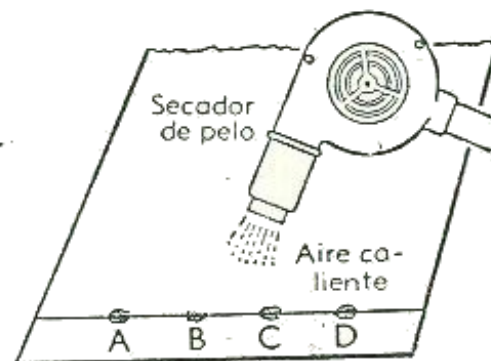
a) Toma de muestras de tubos etiquetados



b) Aplicación de las muestras en el papel

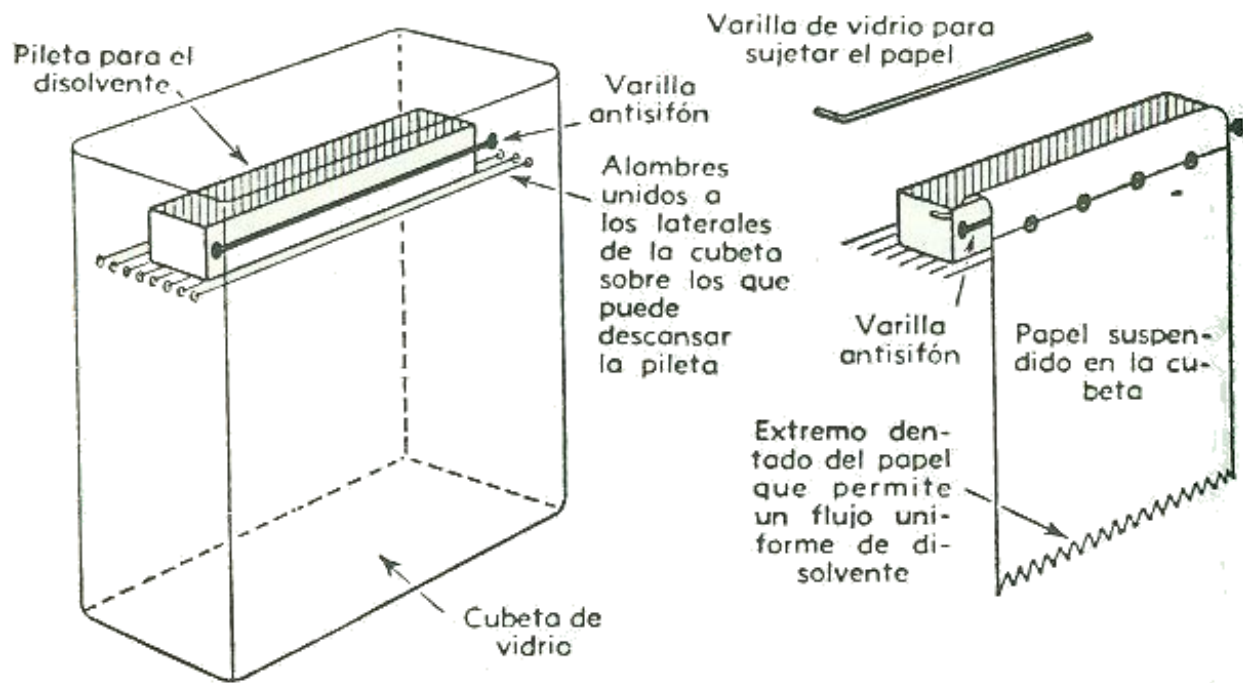


c) Trazado de una mezcla en la cromatografía preparativa



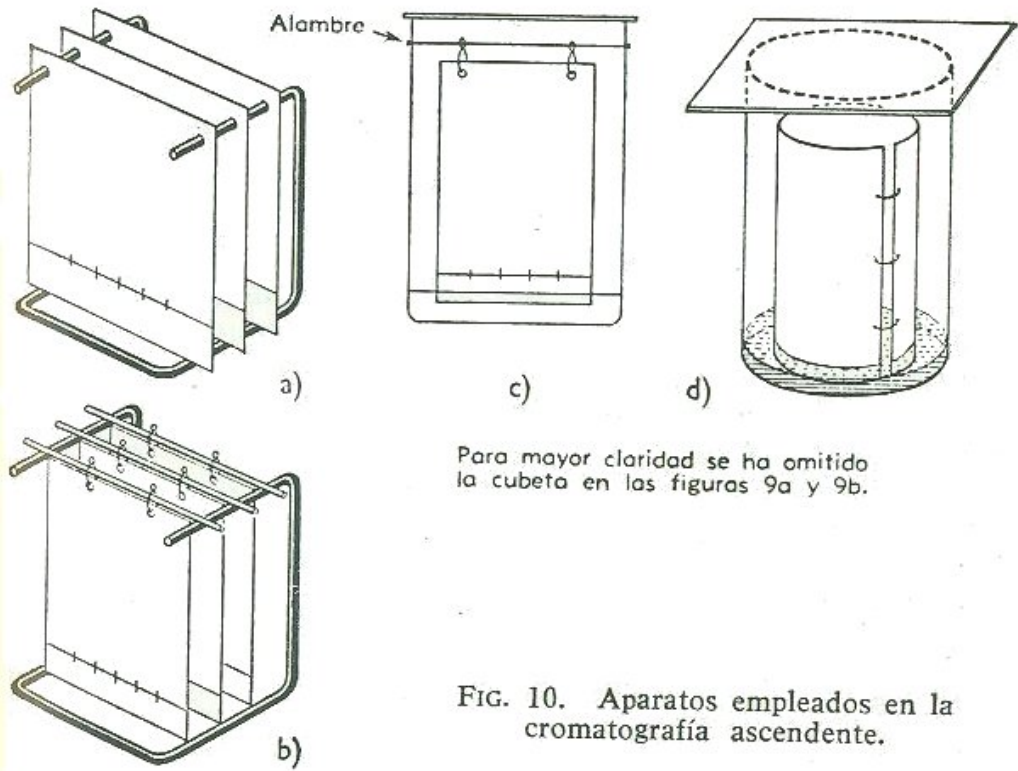
d) Secado de las manchas sobre el papel

FIG. 8. Aplicación de las muestras sobre el papel.



a) *Equipo de la cubeta para la cromatografía de descenso.*

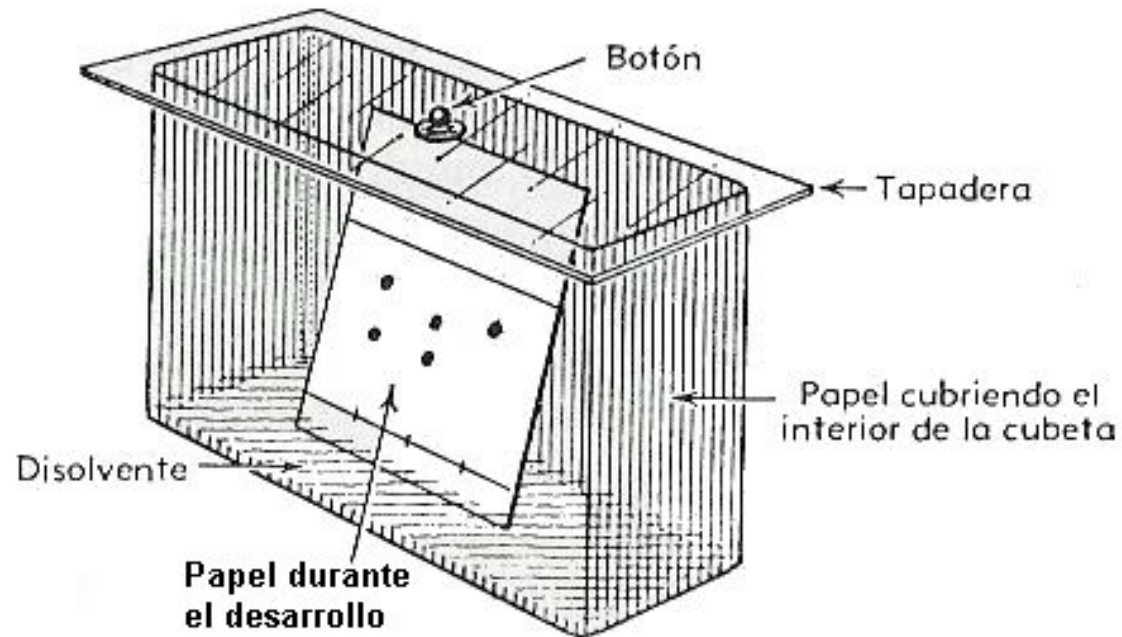
b) *Colocación del papel.*

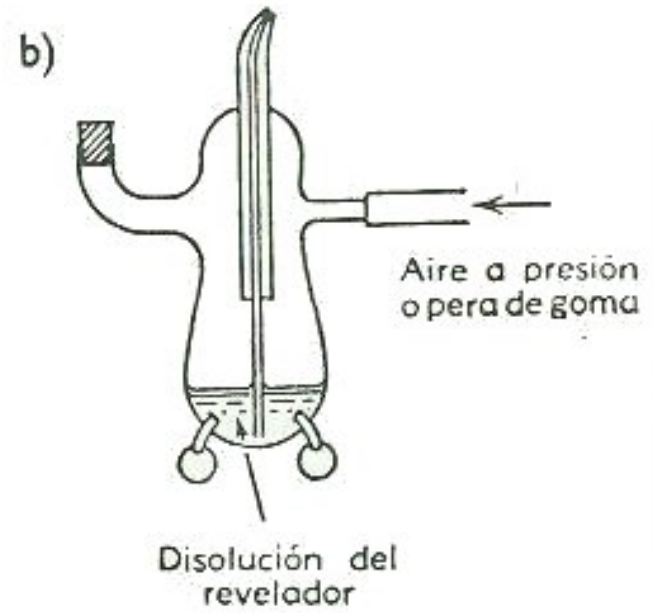
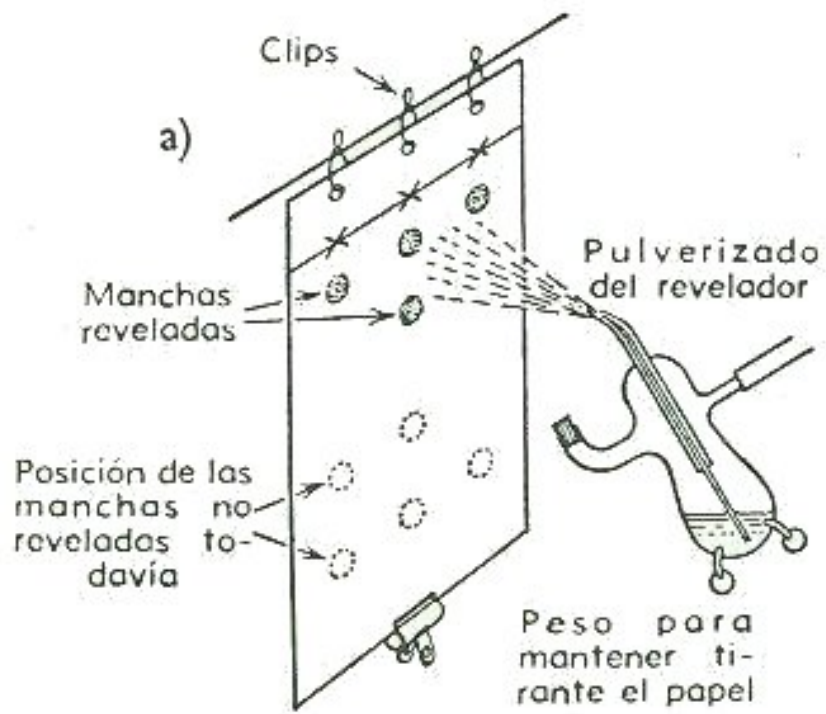


Para mayor claridad se ha omitido la cubeta en las figuras 9a y 9b.

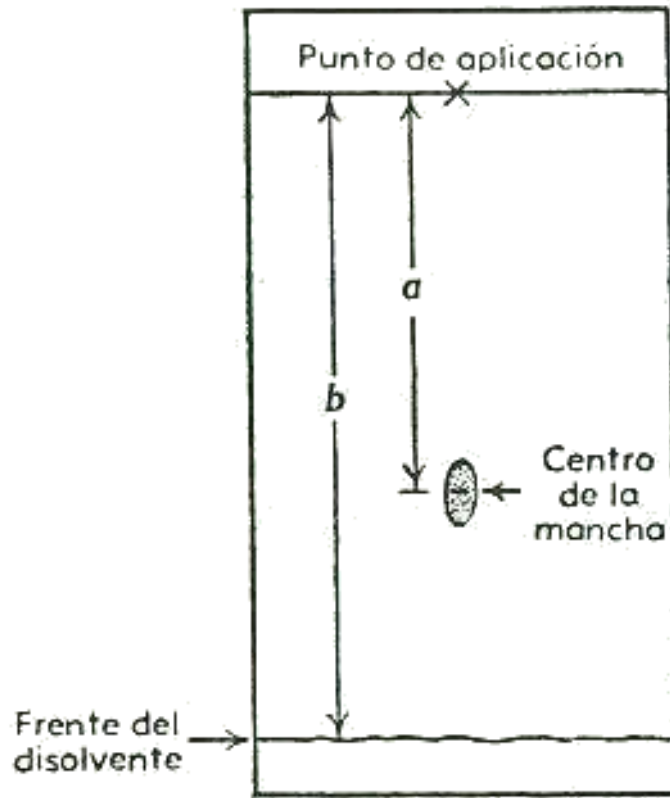
FIG. 10. Aparatos empleados en la cromatografía ascendente.

Desarrollo de la cromatografía en papel



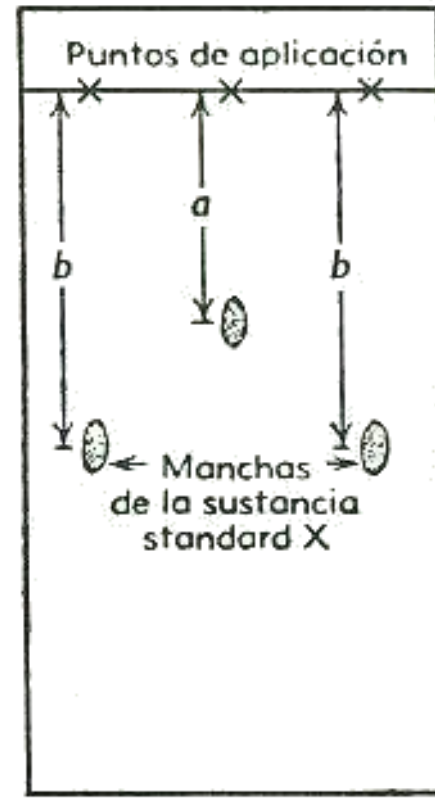


Valor de R_f

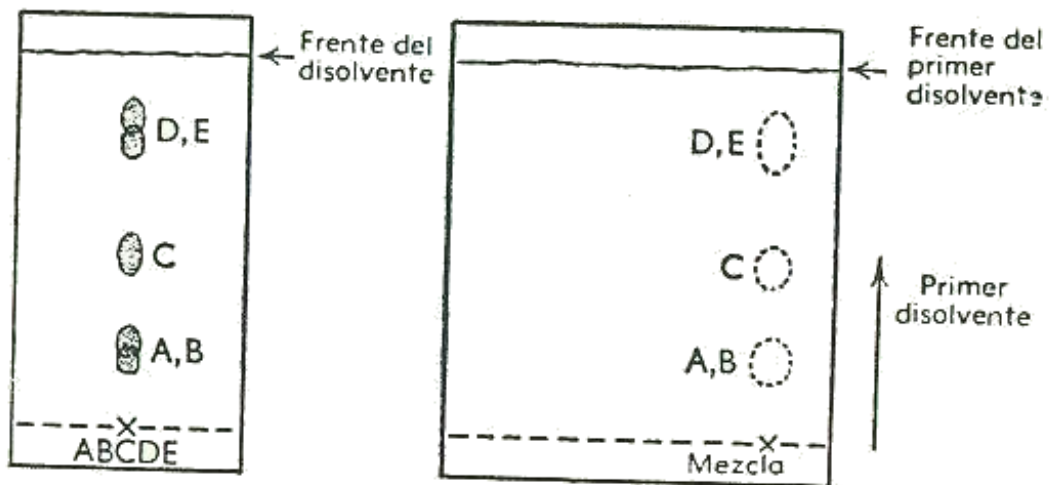


$$R_f = \frac{a}{b}$$

Valor de R_x

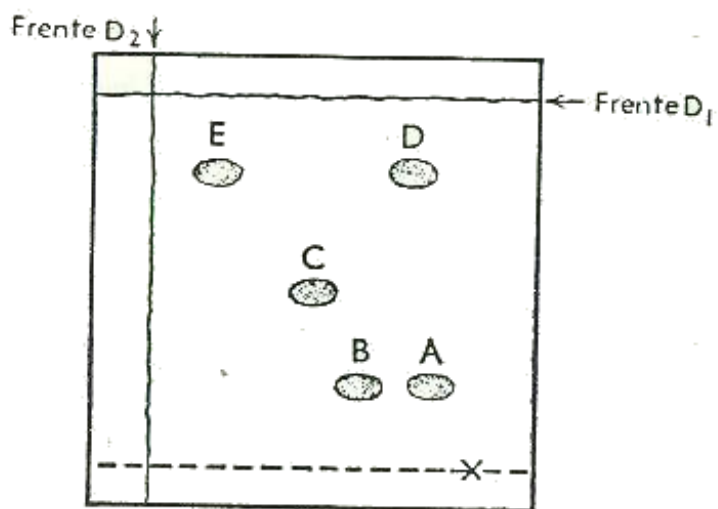


$$R_x = \frac{a}{b}$$



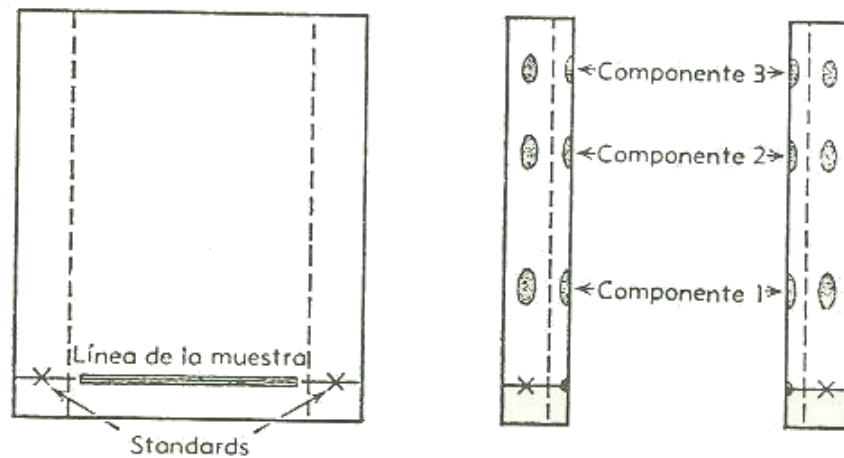
a) *Cromatograma unidimensional*

b) *Cromatograma bidimensional (primer recorrido)*



c) *Cromatograma bidimensional (después del revelado)*

Cromatografía preparativa en papel



a) Preparación del papel. b) Bandas marginales reveladas.

FIG. 15.

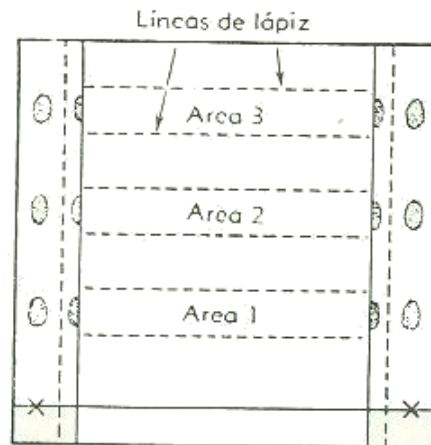
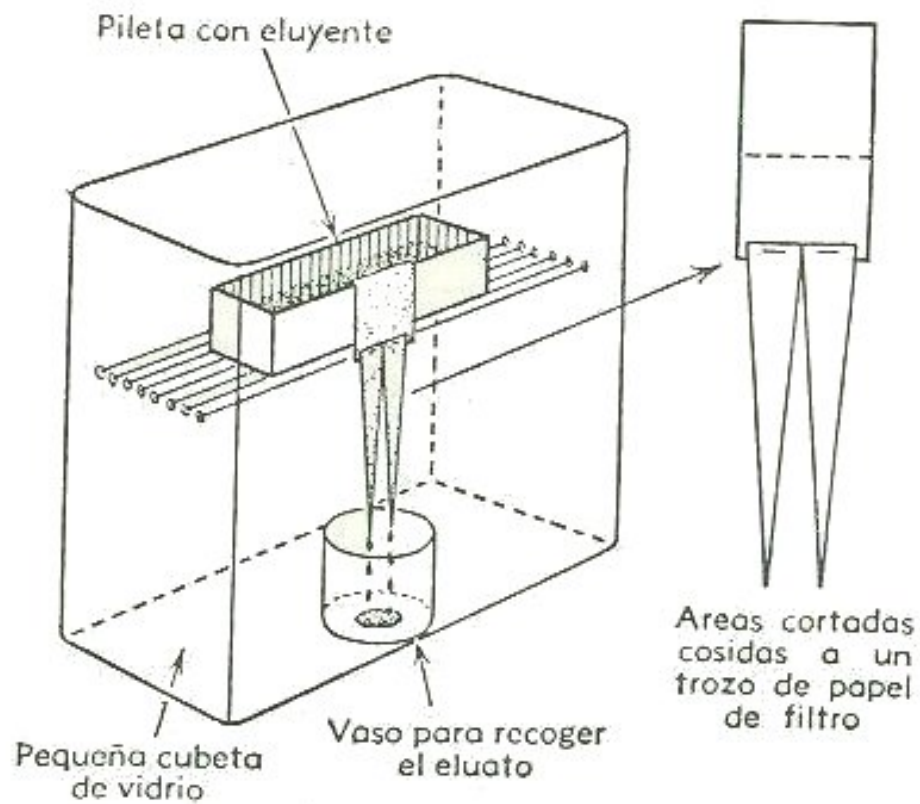


FIG. 16. Trazado de las áreas.

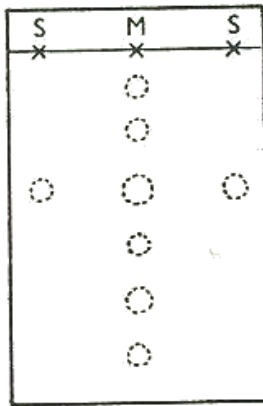


Elución de las sustancias de las tiras de papel de filtro de las áreas separadas.

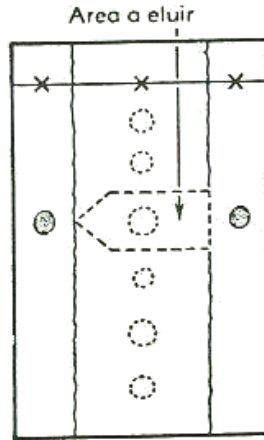
Cromatografía cuantitativa en papel



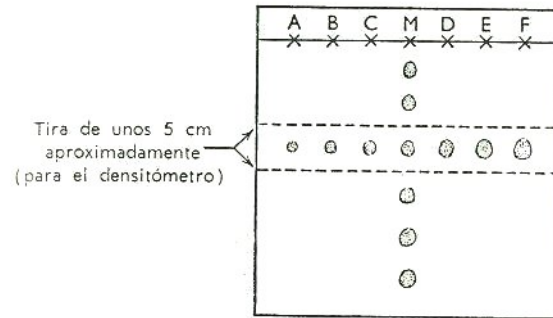
a) Papel antes del desarrollo



b) Papel después del desarrollo



c) Las líneas marginales reveladas indican el área a cortar

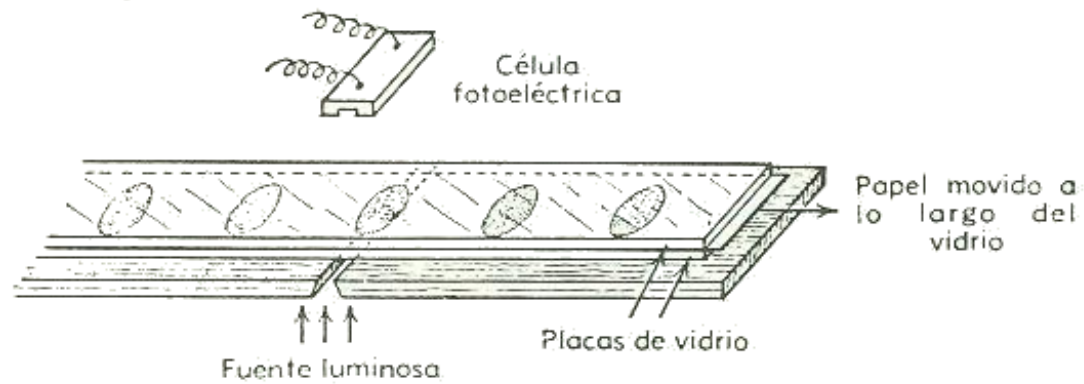


A B C D E F son manchas que contienen una cantidad conocida de compuesto

M es una muestra que contiene una cantidad desconocida de compuesto

Cromatograma después del revelado.

Uso de densitómetro

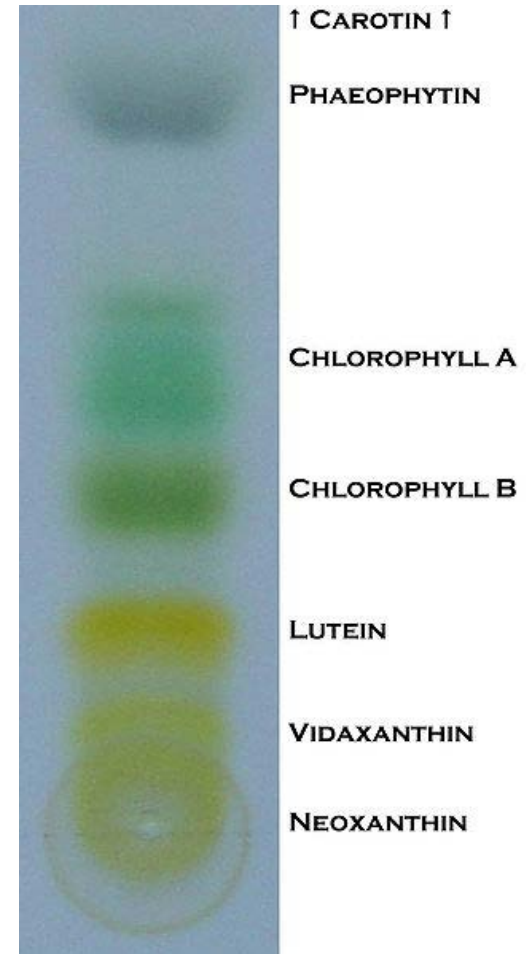


Fotodensitómetro.

área de la mancha $\propto \log$ (concentración)

Cromatografía en papel

separación de clorofilas mediante
cromatografía en papel



CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO SOBRE PAPEL

La versatilidad de la cromatografía sobre papel puede extenderse empleando papeles fabricados con derivados especiales de celulosa (con grupos capaces de intercambiar iones), en lugar de la celulosa habitual. De esta manera es posible realizar separaciones de intercambio iónico. Los derivados más empleados son la carboximetilcelulosa, citrato de celulosa y fosfato de celulosa (que cambian iones de tipo catiónico) y aminoetil y dietilaminoetilcelulosa (que intercambian aniones).

El procedimiento en este caso es análogo a la cromatografía normal; sin embargo, señalaremos una o dos diferencias. El pa-

pel viene preparado de tal manera (los papeles ácidos, por ejemplo, pueden estar en forma de sal amónica o sódica) que es necesario alguna modificación antes de su uso (por ejemplo, pasarlos a la forma ácida). Aparte de estas precauciones, el uso de estos papeles es muy simple. Es muy fácil aplicar la muestra y pueden conseguirse mejores separaciones que con papel ordinario.

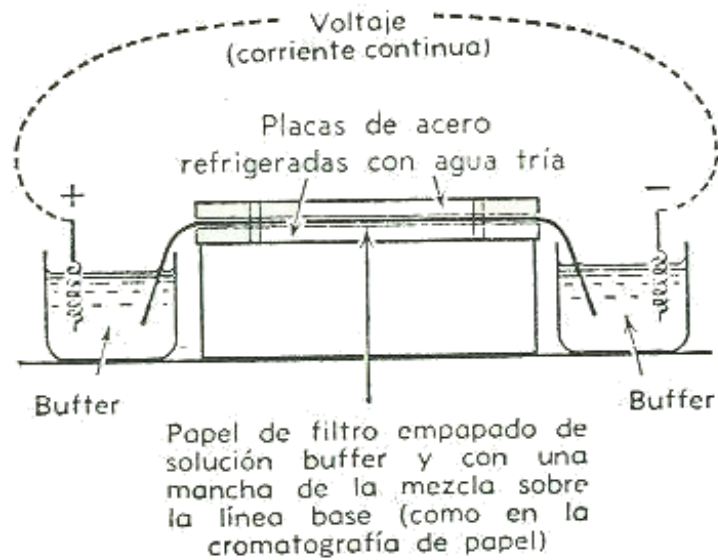
El desarrollo de los cromatogramas de intercambio iónico se realiza con soluciones que contengan iones capaces de desplazar a las sustancias que queremos separar. También puede emplearse, alternativamente, un disolvente libre de iones. En este caso la cromatografía es similar a la corriente sobre papel de filtro (reparto), lo que es muy útil para separaciones bidimensionales.

También pueden realizarse separaciones de intercambio iónico con papeles impregnados con resinas cambiadoras.

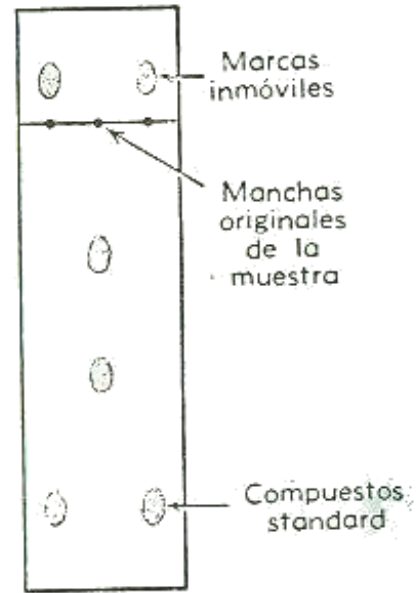
Electroforesis

- La gran mayoría de macromoléculas están cargadas eléctricamente y, al igual que los electrolitos, se pueden clasificar en fuertes y débiles dependiendo de la constante de ionización de grupos ácidos y básicos. Por ejemplo los ácidos nucleicos son poliácidos fuertes.
- Por lo general, para caracterizar la molécula se determina la velocidad a la que esta se mueve en un campo eléctrico y se utiliza para determinar, en el caso de proteínas, la masa molecular o para detectar cambios de aminoácidos y separar cuantitativamente distintas especies moleculares; en el caso de ácidos nucleicos se determina su tamaño, medido en pares de bases

Electroforesis



a) *Aparato para electroforesis de alto voltaje*



b) *Un electrofretograma desarrollado*

Velocidad de una molécula

- Para separar distintas especies moleculares, se crea un campo eléctrico para la molécula colocada en un líquido portador. Al generar este campo existirá una intensidad pasando constantemente del polo positivo al polo negativo, por tanto, actuará una fuerza sobre la molécula y esta experimentará una aceleración hasta obtener una velocidad en la que la resistencia, por viscosidad del medio, neutraliza la fuerza impulsora, es decir, la molécula se desplaza con una velocidad constante.

$$F = qE$$

- Donde q es carga y E es la intensidad del campo eléctrico.
- Se asume que la partícula es esférica y a partir de la [Ley de Stokes](#) se obtiene que

$$F_r = 6\pi R\eta v$$

- donde R es el radio de la esfera, v su velocidad y η la [viscosidad](#) del fluido.

- Por lo tanto la velocidad será:

$$v = \frac{qE}{6\pi R\eta}$$

- Esta velocidad se alcanza a los pocos segundos, por consiguiente se puede concluir que es constante durante todo el experimento

Movilidad molecular

- La movilidad molecular (μ) es una magnitud característica de la partícula o molécula que refleja la velocidad relativa a la fuerza del campo.

$$\mu = \frac{v}{E}$$

- A partir de la ecuación de velocidad se obtiene que:

$$\mu = \frac{q}{6\pi R\eta}$$

- Que también puede ser expresada por:

$$\mu = \frac{Z_e}{6\pi R\eta}$$

- Donde Z el número de electrones y $e = 1,602 \times 10^{-19}C$ es la carga del electrón.

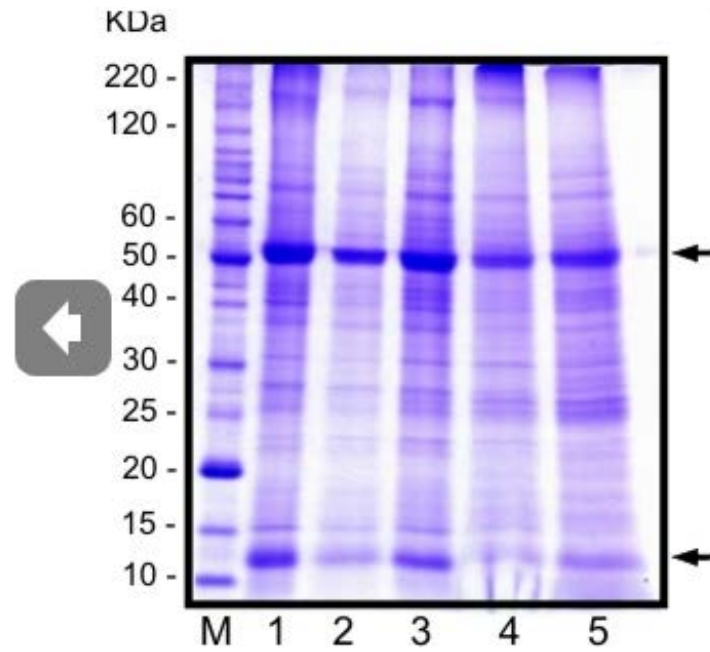
- La movilidad depende de la carga de la partícula que, a su vez, depende del pH del medio en el que se encuentre. Por esta razón es necesario indicar el electrolito o el pH utilizado para determinar la movilidad.

Factores que afectan a la electroforesis

- En general la electroforesis depende directamente del campo eléctrico y este depende de distintos parámetros. Basándose en la ley de Ohm se tiene que

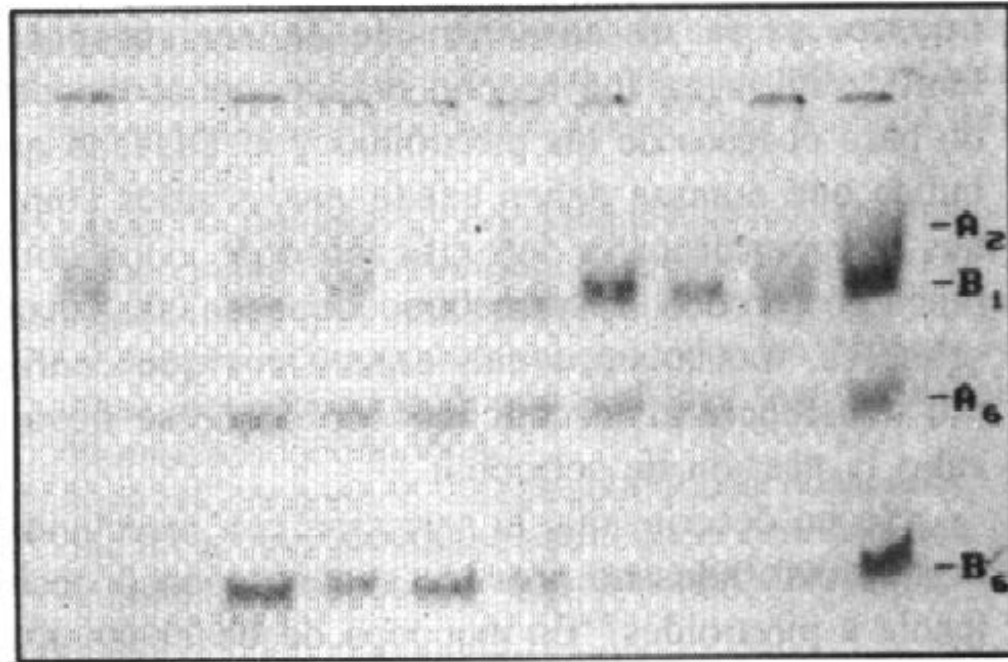
$$V = IR$$

- Diferencia de potencial (V): define el campo eléctrico; la velocidad de avance es directamente proporcional a ella.
- Resistencia (R): la movilidad de las moléculas es inversamente proporcional a ella.
- Intensidad (I) : cuantifica el flujo de carga eléctrica, se relaciona directamente con la distancia recorrida por las moléculas.
- Por último, otro factor que afecta significativamente a la electroforesis es la temperatura, esta es importante puesto que por el efecto Joule el paso de una corriente eléctrica va a producir calor y este es directamente proporcional a la diferencia de potencial y a la resistencia. Por lo tanto, es necesario controlar de manera estricta la temperatura para que esta no afecte a la muestra desnaturalizándola.



Ejemplo de Electroforesis en base al peso molecular

FIGURA 1. Fenotipos de esterasas en electroforesis en gel de poliacrilamida, correspondientes a adultos de la cepa "Tinima" de *Culex quinquefasciatus*.



Evolución de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus* a partir de la selección con el insecticida piretroide lambdacialotrina

CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

En esta técnica el adsorbente se deposita, como una película de 0,25 mm, sobre una placa de vidrio. (o una hoja de plástico o una lámina de aluminio). La placa se coloca en un borde en una cámara a la cual se le ha adicionado la fase móvil a una profundidad de unos cuantos milímetros. La fase móvil cubrirá lentamente la placa desde el borde y la porción sumergida hasta el resto por capilaridad. La muestra es depositada en la placa a una distancia corta arriba del borde sumergido y es eluida por la fase móvil, que arrastra los componentes de la muestra hacia arriba a través del lecho de adsorbente. El desarrollo del cromatograma es detenido cuando el borde arrastrado de fase móvil (conocido en cromatografía en capa delgada como el "frente de disolvente" llega cerca del extremo de la placa. Se localizan las zonas cromatográficas individuales y se caracterizan por medio de sus valores de R_f :

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

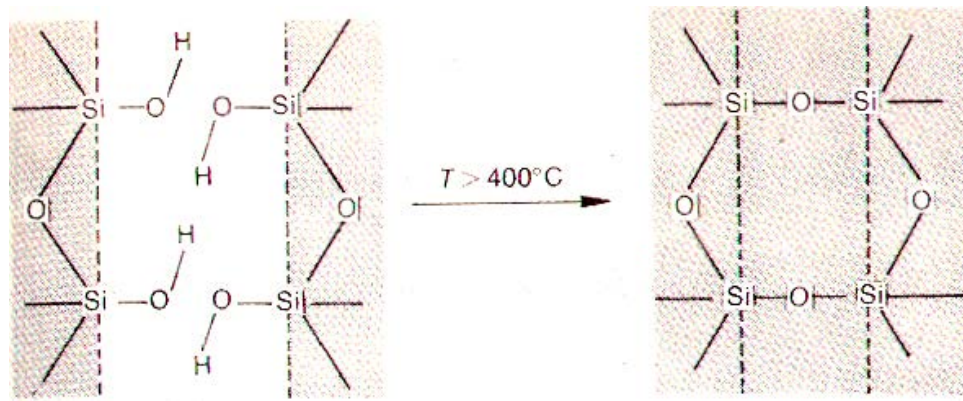
El adsorbente

La característica más importante de cualquier adsorbente es su actividad, que es, el grado en el cual serán retenidas las especies de soluto. La actividad está compuesta de muchos factores de fuerza y densidad de los sitios activos sobre la superficie del adsorbente, área superficial, y el contenido de agua del material adsorbente y todos juegan un papel importante. Además, la actividad aparente de un adsorbente en cualquier aplicación cromatográfica depende en gran manera de la fase móvil.

Las interacciones entre soluto y fase móvil, y entre la fase móvil y el adsorbente pueden ser tan fuertes como las interacciones soluto-adsorbente, y el grado de retención de cualquier soluto en una separación cromatográfica de adsorción puede considerarse en forma amplia afectada por la naturaleza de la fase móvil.

Los adsorbentes

- SILICA, sílica gel, y ácido silícico son los términos que se aplican comúnmente al material producido por acidificación de soluciones de silicato seguidas por lavado y secado del gel resultante. El producto tiene una enorme área superficial ($\sim 500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), y la superficie consiste de grupos Si-OH espaciados por intervalos de cerca de 0,5 nm. Estos grupos son los sitios activos, y la actividad de una sección de adsorbente depende del número y disponibilidad de estos sitios. A no ser cuando el agua adsorbida sobre la superficie ha sido removida por la activación de la sílica mediante calentamiento de $150 \text{ }^\circ\text{C}$ a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ en aire, muchos de los sitios son enmascarados.




- ALUMINA. En contraste pronunciado a la sílica, la alúmina muestra un serio incremento en la actividad cuando se calienta arriba de 1000 °C. Esta es buena evidencia de que los sitios activos de la alúmina, sea la que sea su naturaleza, no son grupos hidroxilo. En efecto, la alúmina presenta características de retención que pueden ser interpretadas en términos de tres tipos de interacción soluto-adsorbente.
- En el primer tipo, los adsorbatos con electrones fácilmente polarizables (bases de Lewis) interaccionan con los campos positivos muy fuertes alrededor de los iones Al^{+3} en la superficie de la alúmina. Las interacciones del segundo tipo resultan en la retención preferencial de solutos ácidos, aparentemente por donación de protones a los sitios básicos (iones O^{-2}) en la superficie de la alúmina. Finalmente, ciertas especies aromáticas son aparentemente retenidas por interacción del tipo de transferencia de carga, posiblemente por transferencia de electrones a los sitios cargados positivamente de Al^{+3} ya mencionados. Parece, generalmente cierto, que cuando dos solutos difieren ampliamente en su estructura electrónica, la alúmina es el adsorbente preferido. Debido a que es superior, por ejemplo, a la sílica en resolución relativa a hidrocarburos aromáticos y olefínicos.

- Se puede producir alúmina fuertemente activa mediante secado del material con aire durante la noche a 400 °C. Es una práctica común producir alúmina de actividad más baja por redistribución de una cantidad conocida de agua sobre la superficie de adsorbente. En la práctica, esto se puede hacer muy fácilmente adicionando una cantidad conocida de líquido a una cantidad pesada de alúmina y agitando la muestra para un equilibrio rápido. La alúmina cromatográfica comúnmente tiene un área superficial de 150 m²·g⁻¹.
- Una monocapa de agua equivale a 3,5 x 10⁻⁴ mL/m². Por tanto, la adición de cerca de 2,5 por ciento en peso de agua a alúmina producirá un adsorbente con cerca de la mitad de una monocapa de agua, y se encuentra que este es un buen adsorbente para cualquier propósito. Hay, en efecto, una escala ampliamente utilizada de actividades de alúmina basada en esta técnica de rehidratación. Conocida como escala de Brockmann, debido a su implementador, define ampliamente la alúmina activada.

Escala de Brockmann

- Grado tanto por ciento de H₂O

I	0	A C T I V I D A D
II	3	
III	6	
<hr/>		
IV	10	
V	15	

El 3% equivale a media monocapa de agua

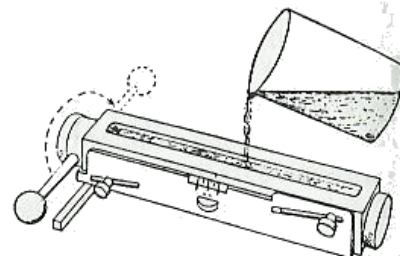
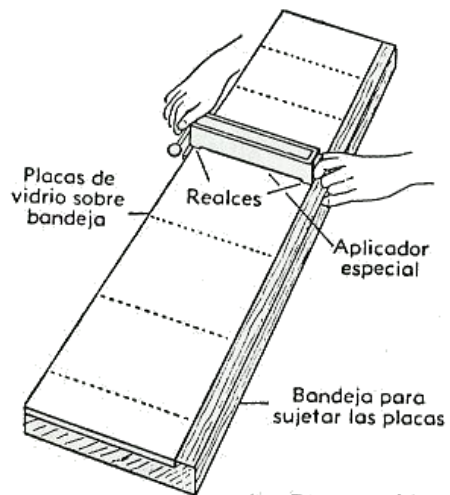
ADSORBENTES MODIFICADOS

- Una Técnica particularmente útil en cromatografía en capa delgada es la adición de nitrato de plata (5 al 15 por ciento en peso) a capas de sílica gel. La retención relativa depende del número de dobles enlaces en cada molécula, y el adsorbente se aplica ampliamente a la caracterización de fracciones de lípidos.

El lecho adsorbente

- Preparación del lecho adsorbente. Las capas delgadas son preparadas aplicando una papilla del adsorbente elegido, sobre un material cuidadosamente limpiado, generalmente vidrio. Para conseguir la mejor limpieza de las placas, éstas se conservan en una solución fuertemente concentrada de carbonato sódico, enjuagándose muy bien, antes de su uso. El aparato utilizado para elaborar las placas en el laboratorio se ilustra en la Figura. Debido a que es construido en material plástico no es corroído por el nitrato de plata. Tiene la ventaja adicional de que siendo diseñado de tal manera que deja el espacio apropiado para el grosor de las placas, éstas quedan bien acomodadas una contra otra dando resistencia al deslizamiento del aplicador, garantizando así un espesor de capa constante. Esta constancia es muy importante; si no se mantiene, la velocidad de migración del disolvente variará y causará resultados erráticos. Después de que se ha completado la etapa de aplicación, las placas se dejan secando en aire durante 30 minutos antes de ser activadas. Para activarlas se calientan en una estufa a una temperatura de 100°C a 105 °C durante un par de horas. Aunque el tiempo requerido para el secado y activación depende del espesor de la capa. que generalmente es de 0,25 mm para separaciones analíticas o de 1,0 mm para separaciones a escala preparativa.

El tamaño de partícula del adsorbente es muy pequeño, generalmente menor de 15 μm . El lecho adsorbente es de casi 30 partículas de espesor. Las capas de adsorbente puro tienen características mecánicas muy pobres y son propensos a la disgregación. Se puede incorporar un aglomerante para resolver este problema, y las placas resultantes pueden (en el caso de almidón como aglomerante) ser marcadas sin desprenderse. El aglomerante más común es el sulfato de calcio, que es adicionado al adsorbente como hemihidrato, $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (plaster de Paris), en la cantidad de 5 a 20 por ciento en peso. Cuando se mezcla con agua, el aglomerante es hidratado, y rápidamente, pasa a formar el dihidrato rígido, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (gypsum). La deshidratación del dihidrato empieza a 100 °C, un fenómeno que limita severamente las condiciones usadas para la activación del adsorbente.

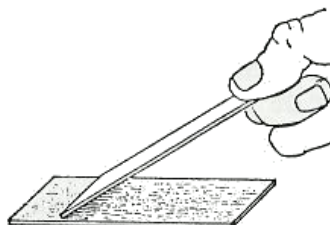


La papilla se coloca en el aplicador (para el manejo se gira como se indica, descargándose la papilla por el fondo del aplicador, que se desliza a lo largo de las placas y forma una película de un espesor determinado por los realces)

a) Preparación de placas grandes.



I. Aplicación de un poco de papilla sobre el porta



II. Extensión de la papilla mediante otro porta

b) Placas sencillas sobre portas de microscopio.

Preparación de placas cromatográficas.

Secado

- El secado a 110 °C durante 30 minutos es el empleado comúnmente, pero arriba de 130 °C el aglomerante es deshidratado tan rápido que las placas son inservibles después de 30 minutos. El almidón común (adicionado en una cantidad de cerca al 5 por ciento) es un aglomerante superior que proporciona capas más durables las cuales, en adición permiten migraciones de la fase móvil más rápidas. El almidón tiene la gran desventaja de ser un material orgánico que reacciona con muchos de los reactivos detectores de zonas.

Activación del adsorbente

- El secado a 110 °C durante 30 minutos es el empleado comúnmente, pero arriba de 130 °C el aglomerante es deshidratado tan rápido que las placas son inservibles después de 30 minutos. El almidón común (adicionado en una cantidad de cerca al 5 por ciento) es un aglomerante superior que proporciona capas más durables las cuales, en adición permiten migraciones de la fase móvil más rápidas. El almidón tiene la gran desventaja de ser un material orgánico que reacciona con muchos de los reactivos detectores de zonas.

La Fase Móvil

- **La regla de la fase móvil en cromatografía de adsorción.** Es peligroso considerar a la fase móvil solamente como el disolvente que transporta la muestra sobre el lecho cromatográfico. A la vez que la fase móvil realiza esa función, también juega un papel muy activo en el proceso de adsorción, compitiendo con los componentes de la muestra por un espacio en la capa adsorbente de moléculas. Si el disolvente es fuertemente adsorbido, será desplazado por la muestra con dificultad. En este caso, el soluto pasará relativamente una gran cantidad de tiempo en la fase móvil y viajará rápidamente a través del lecho cromatográfico. Siguiendo este ejemplo a su conclusión lógica, veremos que, para un soluto determinado y un adsorbente, la velocidad de migración del soluto depende de la fuerza con la cual es adsorbido el disolvente, y no de la solubilidad de la muestra en la fase móvil.

•

- Este hecho generalmente trastorna el punto de vista ordinario del par soluto-disolvente. Por ejemplo, los alcanos son más solubles en heptano que en metanol ("no polar disuelve a no polar"), pero el metanol desplazará a los alcanos (o cualquier otro sin importar su polaridad) a través de una columna cromatográfica de adsorción mucho más rápido que el heptano, simplemente debido a que el metanol es adsorbido tan fuertemente que los alcanos no tienen oportunidad de "estacionarse."

Parámetro, ε^0 , fuerza de disolvente

- Definiendo fuerza de disolvente en términos de las interacciones adsorbente-disolvente hace a este parámetro independiente del soluto. Como un resultado, para un adsorbente determinado, podemos construir una tabla que enliste a los disolventes de acuerdo a su fuerza simplemente obteniendo una medida de su fuerza de adsorción. A esa tabla se la llama serie elutrópica. Snyder ha hecho esto cuantitativamente definiéndola como parámetro de fuerza de disolvente, ε^0 , el cual es proporcional a la energía de adsorción del disolvente por unidad de área. La Tabla da los valores de ε^0 para un número de disolventes comunes.

El parámetro de fuerza de disolvente puede ser ajustado completamente por el uso mezclas de disolventes. Como un ejemplo, la tabla muestra la dependencia de ε° en la composición de mezclas benceno-metanol. Aunque aquí no analizaremos esta teoría, plantearemos el tema para señalar dos puntos importantes. Primero, prácticamente hablando, el disolvente es la variable en cromatografía de adsorción. Obviamente la muestra no puede ser cambiada, y solo hay dos adsorbentes (sílica y alúmina) que merecen mención. De acuerdo a lo anterior, la elección y regulación de la fuerza de disolvente es digna de mucha atención. Segundo, la Figura 3.6 muestra que ε° para el benceno es afectada en sumo grado por la presencia de metanol, un disolvente polar, aún en pequeñas cantidades. Por tanto la pureza del disolvente tiene una importancia tremenda en cromatografía, y se debe tener mucho cuidado en ello.

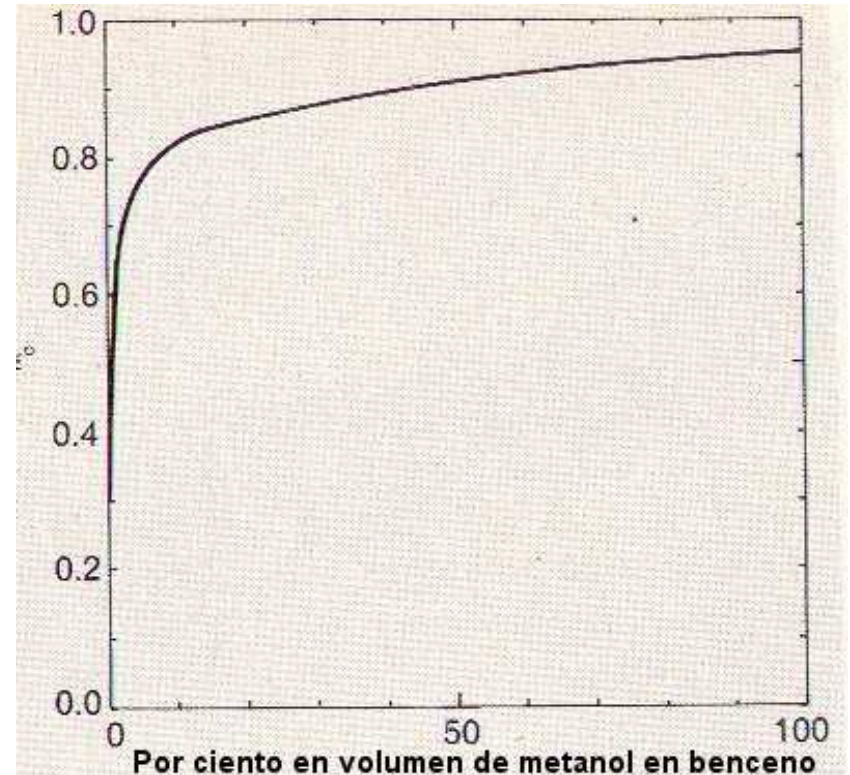
La Fase Móvil

Parámetros de fuerza de disolvente para alúmina

DISOLVENTE	ϵ°
Fluoro alcanos	- 0,25
<i>n</i> -Pentano	0,00
<i>isooctano</i>	0,01
<i>n</i> -Decano	0,04
1-Penteno	0,08
Tetracloruro de carbono	0,18
Xileno	0,26
Eter isopropilico	0,28
Tolueno	0,29
Benceno	0,32
Eter etílico	0,38
Cloroformo	0,40
Tetrahidrofurano	0,45
Metil etil cetona	0,51
Acetona	0,56
Dioxano	0,56
Acetato de Etilo	0,58
Anilina	0,62
Diethylamina	0,63
Acetonitrilo	0,65
Piridina	0,17
Isopropanol, <i>n</i> -propanol	0,82
Etanol	0,88
Metanol	0,95
Etilen glicol	1,11

Tomado de L. R. Snyder: *Principles of Adsorption Chromatography*. Dekker, New York, 1968, p. 194. Multiplicando por 0,8 se obtiene el ϵ° para la SiO₂.

•El parámetro de fuerza de disolvente puede ser ajustado completamente por el uso mezclas de disolventes. Como un ejemplo, la figura muestra la dependencia de ϵ° en la composición de mezclas benceno-metanol. El disolvente es la variable en cromatografía de adsorción. La elección y regulación de la fuerza de disolvente es digna de mucha atención. La Figura muestra que ϵ° para el benceno es afectada en sumo grado por la presencia de metanol, un disolvente polar, aún en pequeñas cantidades. Por tanto la pureza del disolvente tiene una importancia tremenda en cromatografía, y se debe tener mucho cuidado en ello.



El parámetro de fuerza de disolvente (ϵ°), como una función de la composición de la solución de la mezcla benceno-metanol.

Propiedades de las fases móviles cromatográficas más comunes					
Disolvente	Índice de Refracción ^a	Viscosidad, cP ^b	Punto de Ebullición °C	Índice de Polaridad, P'	Fuerza Eluyente ^c , ε
Fluoroalcanos ^d	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	<-2	-0,25
Ciclohexano	1,423	0,90	81	0,04	-0,2
<i>n</i> -Hexano	1,372	0,30	69	0,1	0,01
1-Clorobutano	1,400	0,42	78	1,0	0,26
Tetracloruro de carbono	1,457	0,90	77	1,6	0,18
<i>iso</i> -Propileter	1,365	0,38	68	2,4	0,28
Tolueno	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Dietileter	1,350	0,24	35	2,8	0,38
Tetrahidrofurano	1,405	0,46	66	4,0	0,57
Cloroformo	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanol	1,357	1,08	78	4,3	0,88
Acetato de etilo	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Dioxano	1,420	1,2	101	4,8	0,56
Metanol	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitrilo	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Nitrometano	1,380	0,61	101	6,0	0,64
Etilenglicol	1,431	16,5	182	6,9	1,11
Agua	1,333	0,89	100	10,2	Grande

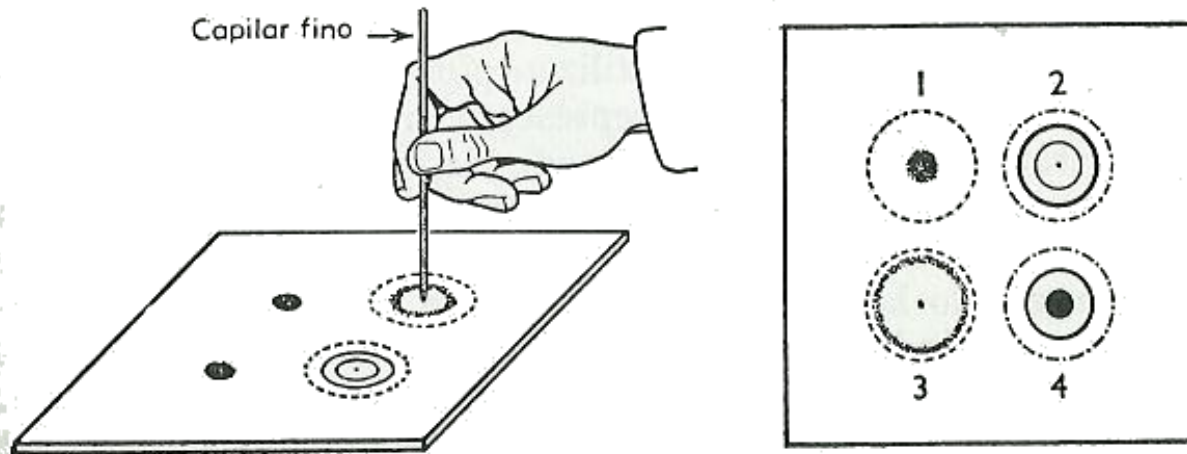
^a A 25 °C

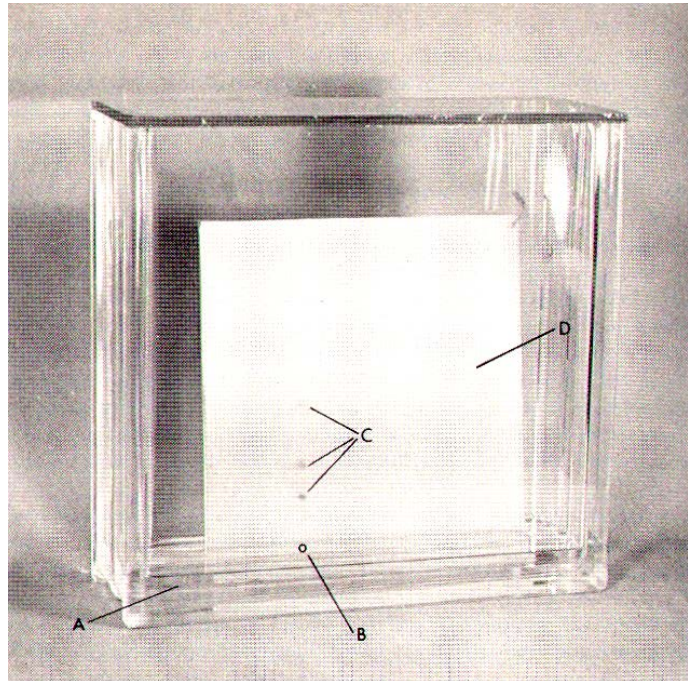
^b El centipoise es una unidad típica de viscosidad; en unidades del SI, 1 cP= 1 mN . s . m⁻²

^c En Al₂O₃. Multiplicando por 0,8 se obtiene el ε⁰ para la SiO₂.

^d Las propiedades dependen de la masa molecular. Se da un intervalo de datos.

Elección del disolvente

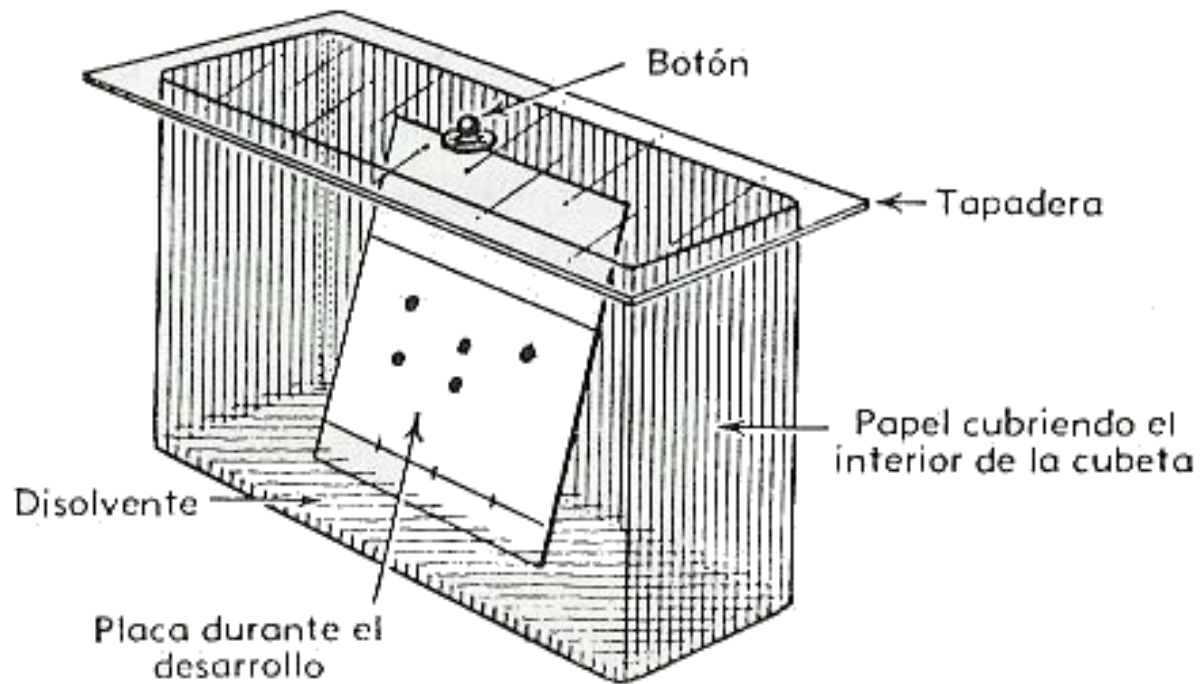




Fotografía de un cromatograma en capa delgada durante el desarrollo. Las letras indican: A, fase móvil; B, punto de aplicación del soluto; C, zonas de soluto; y D, frente del disolvente.

El desarrollo se realiza en una cámara cerrada para asegurar la saturación de la atmósfera con vapor de disolvente. Como una precaución más, para lograr la saturación de la fase de gas, se introduce en la cámara papel filtro, se omitió para permitir la visibilidad.

Desarrollo de las placas



Detección de las zonas cromatográficas

Muchos compuestos son coloridos y pueden observarse directamente sobre la placa cromatográfica o son de naturaleza fluorescente y pueden verse como zonas brillantes de fluorescencia cuando la placa se ilumina con una lámpara ultravioleta. Sin embargo, la gran mayoría de compuestos son incoloros y requieren de una técnica de detección especial.

Un método aplicable universalmente es el de rociar la placa con ácido sulfúrico concentrado, seguido de un calentamiento a 100 °C.

Una segunda técnica universal es la exposición de la placa a vapores de yodo. Los vapores de yodo no reaccionan con los compuestos orgánicos, pero se condensa preferentemente en las zonas de soluto, aparentemente enlazado a las moléculas orgánicas solo por interacciones de van der Waals. Así, las zonas aparecen como manchas naranjas sobre un fondo amarillo. El proceso es completamente reversible - toda vez que la placa es removida de la cámara las manchas desaparecen en unos cuantos minutos - así que esta técnica es particularmente útil cuando las zonas de soluto deben ser recuperadas para análisis posteriores.

Adición de un fluorescente

- Los compuestos orgánicos que absorben radiación ultravioleta arriba de 230 nm pueden ser detectados mediante el uso de indicadores fluorescentes. La placa entera es tratada con el indicador, y por tanto toda la superficie fluoresce cuando es expuesta a la radiación ultravioleta. Sin embargo, en regiones donde algunos compuestos absorben la radiación incidente, la fluorescencia es reducida ampliamente y las zonas de soluto se ven como manchas oscuras contra el fondo fluorescente. Un indicador fluorescente muy útil es una mezcla de **silicato de zinc**, que es excitado por la radiación en la región de 230 nm a 290 nm, y el **sulfuro de zinc**, que lo es de 330 nm a 390 nm. Estos compuestos inorgánicos simplemente son mezclados (al 1 por ciento en peso o menos) con el material de fase estacionaria antes de la aplicación a las placas. Los pigmentos orgánicos fluorescentes, que operan bajo el mismo principio, pueden ser rociados sobre la placa después del desarrollo.
- El producto comercial que contiene fluorescente es Sílica gel GF₂₅₄

Revelado con reactivos específicos

- Para muchos compuestos, hay reactivos específicos que pueden ser rociados sobre la placa para permitir la detección de zona por la formación de algunos colores característicos; un ejemplo es el uso de ninhidrina para detectar los aminoácidos. Cuando son aplicados, estos reactivos específicos ofrecen grandes ventajas. Primera, las especies no resueltas que no forman colores con los reactivos de detección no interfieren en el análisis. Segundo, el proceso de detección se convierte, además, en uno de identificación. Si la mancha no reacciona apropiadamente, el Químico es alertado de que ha hecho algo erróneo.

Cromatografía en Columna

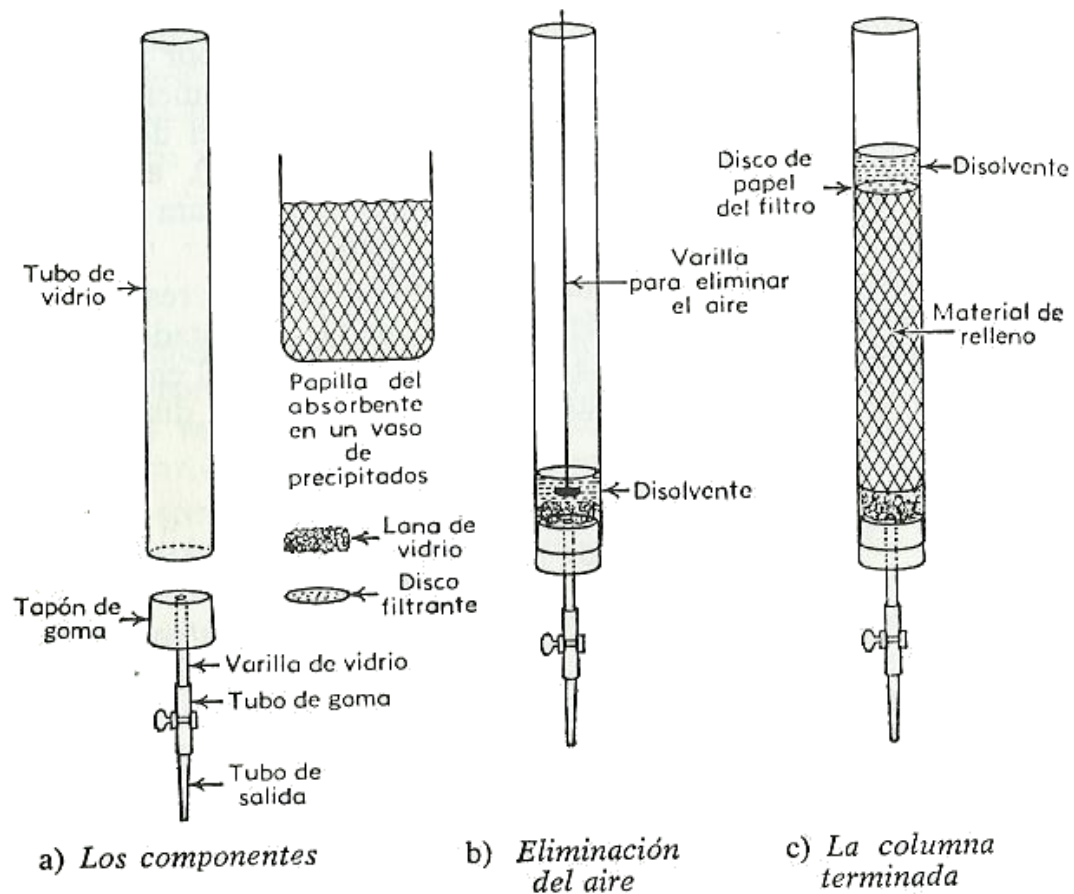
- Normal
- de Intercambio Iónico
- de Permeación en gel
(exclusión)

Cromatografía en columna

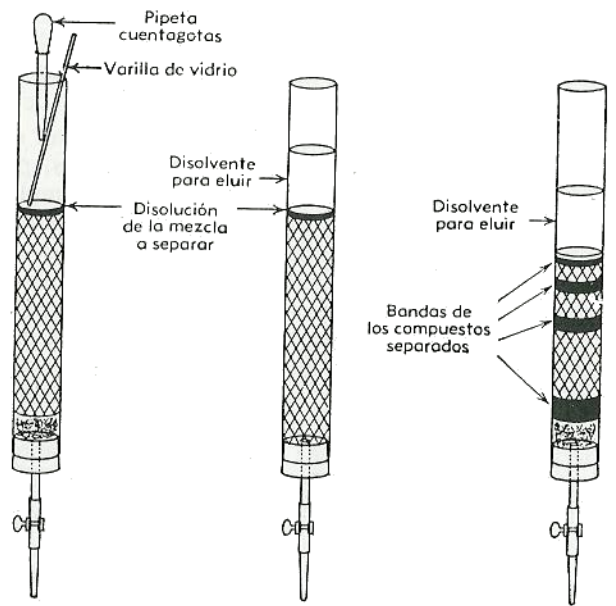
- **Cromatografía en columna**
-
- Son numerosos los adsorbentes empleados en la cromatografía en columna. Las separaciones pueden realizarse por reparto, adsorción o intercambio iónico. Puede usarse cualquier medio adsorbente, siendo los más generales la celulosa, gel de sílice, celita y kieselguhr (para separaciones por reparto) de malla número 200 (75 $m\mu$), alúmina, óxido de magnesio, óxido de calcio y carbón activo (para separaciones por adsorción y de intercambio iónico).
- En todos los casos sólo pueden obtenerse óptimos resultados si se tiene cuidado en la selección del medio. El estado físico del adsorbente ha de ser de tal manera que permita el empaquetamiento uniforme de la columna y el flujo libre de disolvente a través de ella.

Selección del disolvente

- En general se emplean tres tipos de disolventes, según sea la separación de reparto, adsorción o intercambio iónico.
- Los disolventes empleados en la cromatografía de reparto son similares a los que se usan en la cromatografía de papel.
- Para las separaciones por adsorción es fundamental que los disolventes empleados en la elución sean muy puros, pues de otra manera las impurezas podrían alterar el curso completo del desarrollo. Con adsorbentes del tipo de la alúmina y de la gel de sílice la intensidad de la adsorción aumenta al crecer la naturaleza polar del material adsorbido, por lo que en estos casos se emplea normalmente un disolvente apolar, por ejemplo, éter de petróleo. Los grupos polares, tal como los del OH del agua y del etanol, causarían la desorción de la sustancia. Según esto, la elución de la columna puede llevarse al cabo empleando una serie de disolventes en los que vaya aumentando la polaridad. Una serie típica es la que sigue: agua > metanol > etanol > acetona > acetato de etilo > éter dietílico > cloroformo > benceno > ciclohexano > hexano. El efecto contrario ocurre cuando se emplea como adsorbente el carbón activo; en este caso la serie anterior ha de ir en sentido inverso. Con carbón activo la adsorción tiene lugar en solución acuosa.



Montaje de una columna.



a) *Introducción del material*

b) *Introducción del eluyente*

c) *Separación de las bandas*

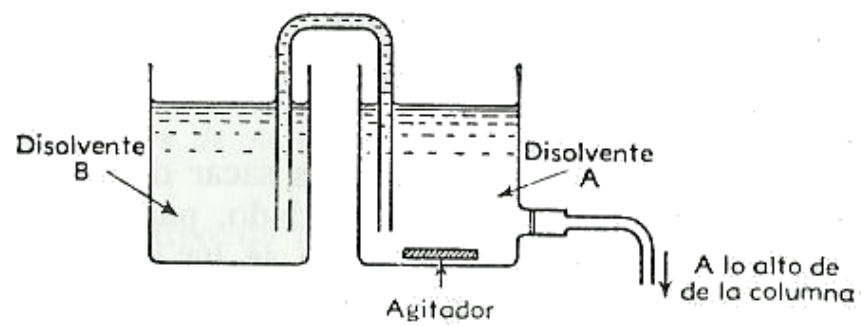


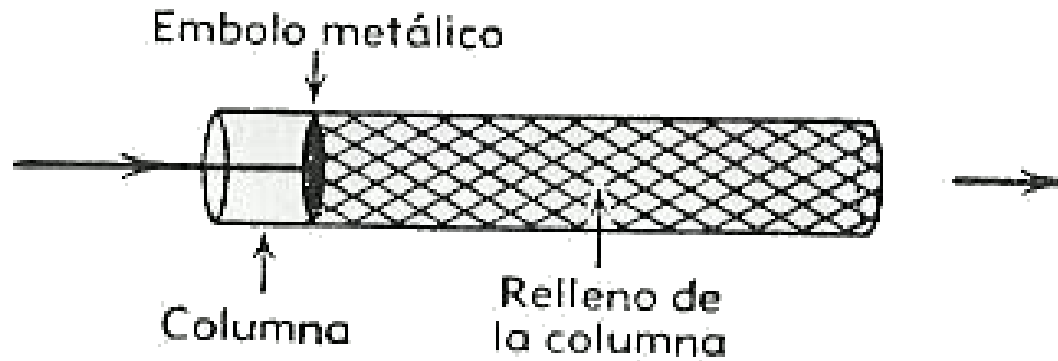
FIG. 27. Aparato para el desplazamiento.

EXAMEN E IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS

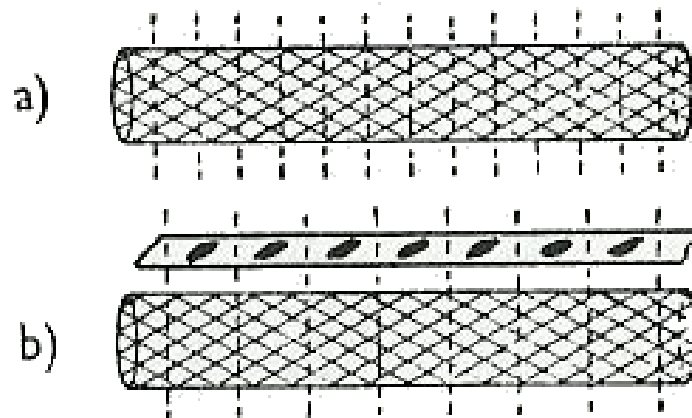
- Cuando una muestra aplicada a la columna es coloreada, se observa fácilmente el progreso de la separación; pero cuando las sustancias son incoloras, es más difícil. Puede emplearse dos procedimientos para identificar y aislar los compuestos separados en la columna. El método más sencillo consiste en eluir durante un tiempo apropiado y después sacar de la columna el cuerpo del adsorbente, con mucho cuidado, para evitar que se desmorone, Figura 3.31. Toda vez que el disolvente se ha evaporado de la columna, se “corta” ésta en rodajas, se extrae con disolvente cada rodaja y se analiza el extracto. Antes de cortar la columna, si los compuestos no son coloreados, se aprieta contra ella una tira de papel para que adsorba un poco de disolvente. Cuando el papel está seco se rocía con un revelador que nos indique la posición de cada uno de los compuestos. El papel se coloca de nuevo al lado de la columna, y de esta manera sabemos qué componente contiene cada sección de la columna. Procedimientos de este tipo no se emplean con gran frecuencia, pero tienen la ventaja de ser más económicos que la elución total con disolvente (a menudo muy cara), Figura 3.32.

-

Extrusión del relleno



Extrusión del relleno.

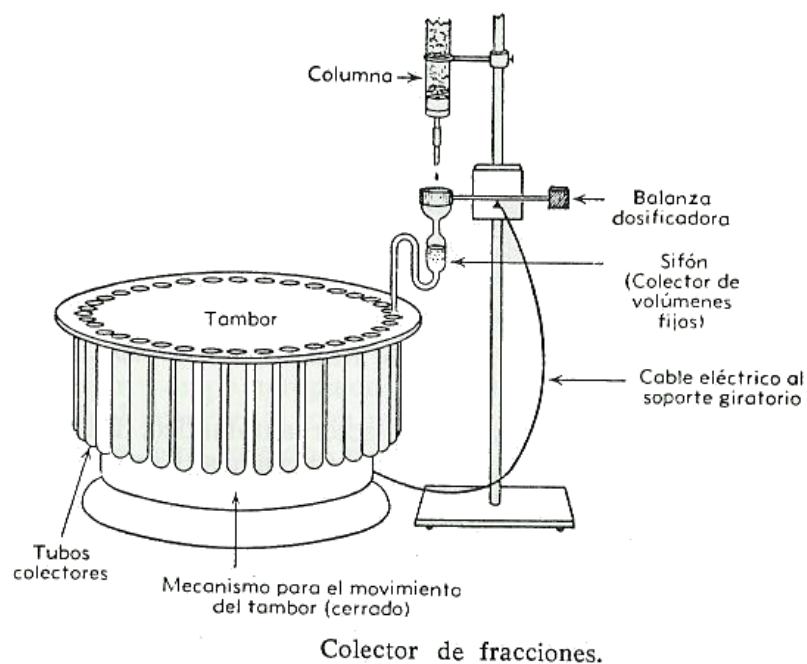


a) *Corte de la columna.* b) *Relación con el papel.*

- La segunda técnica, más extendida que la anterior, consiste en llevar al cabo una separación continua, lo que permite a los compuestos separados salir en el *eluato*. En la práctica, un gran número de pequeñas fracciones de eluato (generalmente del mismo volumen) se recogen y analizan por un método apropiado. Cuando se conoce la composición de cada eluato, pueden unirse algunas de las fracciones que se concentran, mientras que otras se eliminan por no contener ningún compuesto utilizable. Algunas fracciones pueden contener varios componentes, y es necesario recromatografiarlas en otra columna. La pureza de los compuestos obtenidos de esta manera puede comprobarse por cromatografía sobre papel o capa fina, empleando diversos disolventes.
- La toma de un número grande de fracciones es una labor muy ardua y exige mucho tiempo, por lo que en la práctica se emplea algún tipo de aparato colector automático.

Colector de fracciones

- En la Figura se representa un colector de fracciones. Consiste en un disco en el que se coloca una serie de tubos. El disco gira mediante un sistema eléctrico, que en la forma más sencilla desplaza los tubos a intervalos de tiempo regulares. Es más conveniente, sin embargo, recolectar fracciones conteniendo un volumen conocido o un número fijo de gotas. Se representa un tubo sifón que se usa para recolectar volúmenes fijos de eluyente. En este aparato el tubo es el brazo de una balanza, que actúa como control de muestras. Cuando el tubo está por la mitad aproximadamente, se ladea la balanza, con lo que activa un sistema eléctrico que gira el disco, colocando un tubo vacío debajo del sifón. Cuando se ha recolectado el volumen correcto de líquido, el sifón vuelve a su posición habitual y comienza a llenarse de nuevo. Este proceso se repite hasta que se han recolectado suficientes fracciones.



Análisis continuo del eluyente

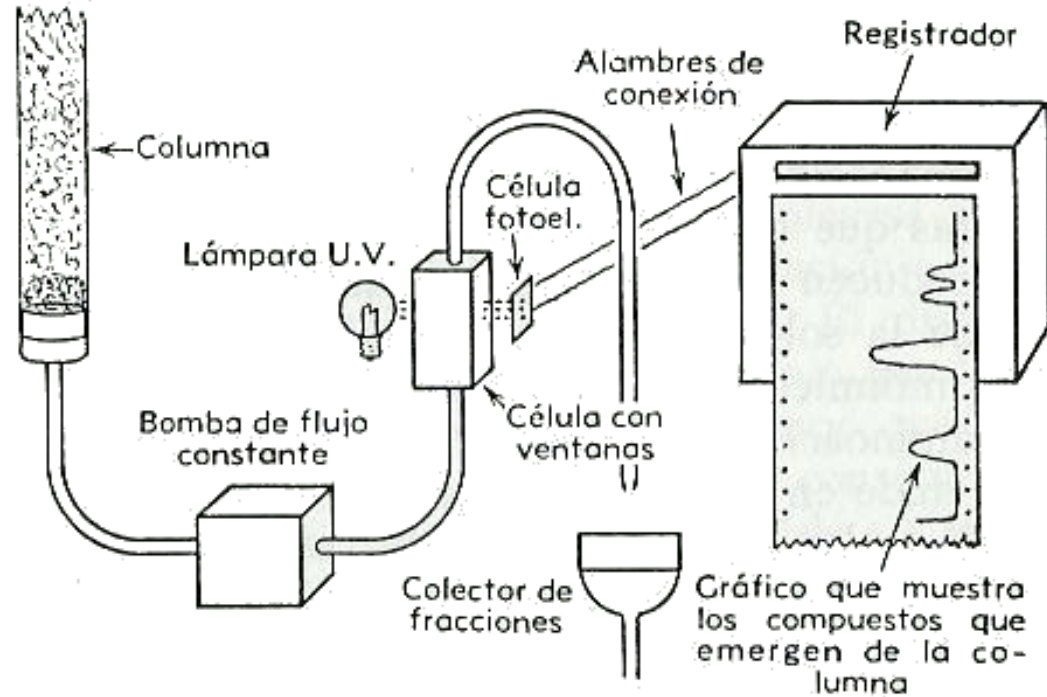


FIG. 31. Análisis continuo de eluyente.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Mientras que la mayoría de los tipos de cromatografía se emplea principalmente para efectuar separaciones de sustancias orgánicas complejas, la cromatografía de intercambio iónico es de gran importancia para separar iones inorgánicos, tanto cationes como aniones, porque esta separación se basa en el intercambio de iones en la fase estacionaria. También es muy útil para separar aminoácidos.
- La fase estacionaria en la cromatografía de intercambio iónico consta de perlas cuya composición es polímero de poliestireno entrecruzado con divinilbenceno. El polímero entrecruzado (resina) tiene grupos fenilo libres unidos a la cadena, que pueden tratarse con facilidad para adicionar grupos funcionales iónicos. En química analítica existen fundamentalmente cuatro tipos de resinas de intercambio iónico; éstas se resumen en la Tabla 3.5

Tipos de resinas de intercambio iónico

Tipo de intercambiador	Grupo funcional intercambiador	Nombre comercial
Catión		
Acido fuerte	Acido sulfónico	Dowex ^a 50; Amberlite ^b IR120; Ionac ^c CGC-240; Rexyn ^d 101; Permutit ^e Q.
Acido débil	Acido carboxílico	Amberlite IRC 50; Ionac CGC-270; Rexyn 120; Permutit H-70.
Anion		
Base fuerte	Ión cuaternario de amonio	Dowex 1; Amberlite IRA 400; Ionac AGA-542; Rexyn 201; Permutit S-1.
Base débil	Grupo amina	Dowex 3; Amberlite IR 45; Ionac AGA-316; Rexyn 203; Permutit W.

a Dow Chemical Company.
 b Mallinckrodt Chemical Works.
 c J.T. Baker Chemical Company.
 d Fisher Scientific Company.
 e Matheson Coleman & Bell

RESINAS DE INTERCAMBIO CATIONICO

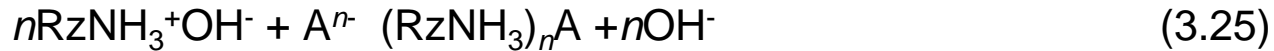
- Estas resinas contienen grupos funcionales ácidos unidos al anillo aromático de la resina. Los *intercambiadores catiónicos ácidos fuertes* tienen grupos de ácido sulfónico, $-\text{SO}_3\text{H}$, que son ácidos fuertes semejantes al ácido sulfúrico. Los *intercambiadores catiónicos débiles* tienen grupos ácidos carboxílicos, $-\text{CO}_2\text{H}$, que se ionizan sólo parcialmente. Los protones de estos grupos pueden intercambiarse con otros cationes:



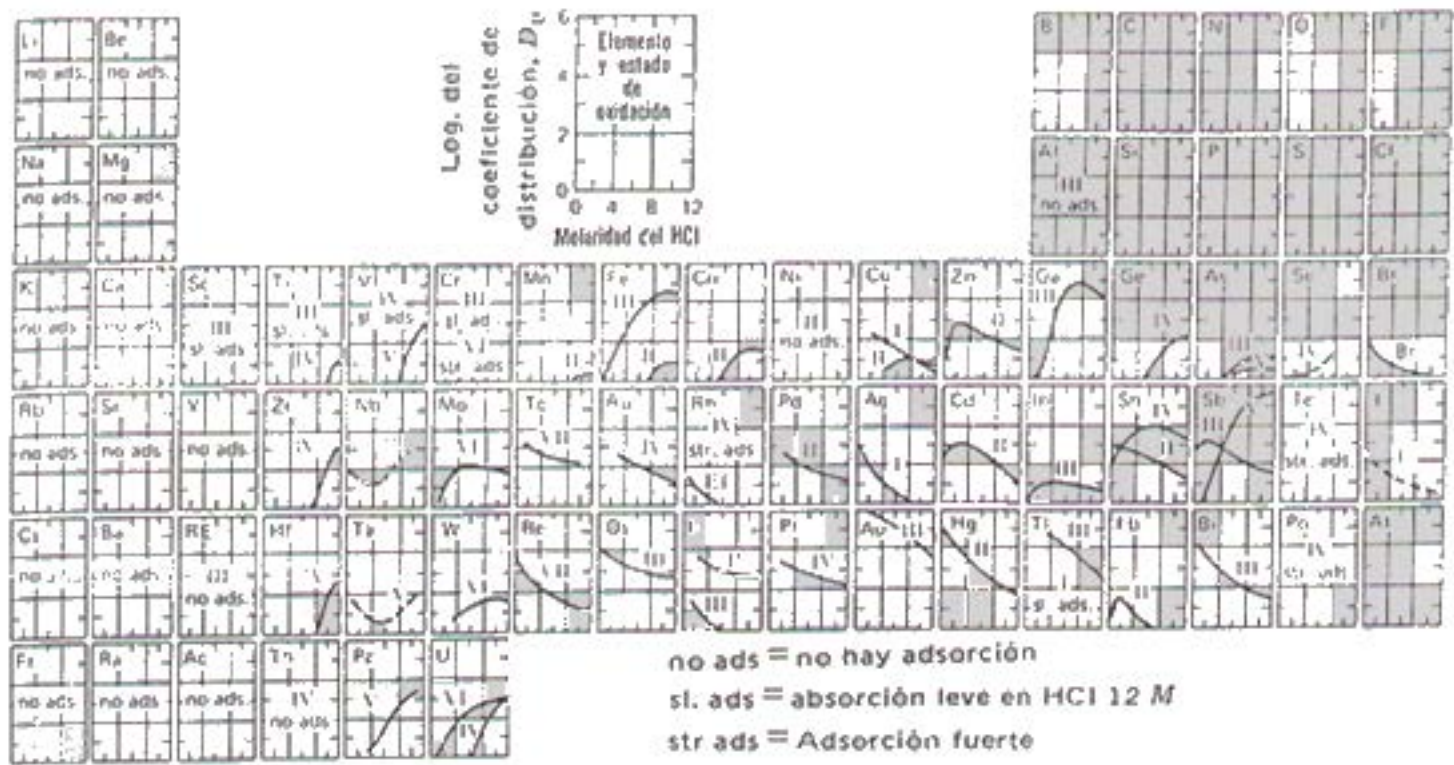
en donde Rz representa la resina. El equilibrio puede desplazarse hacia la derecha o hacia la izquierda aumentando $[\text{H}^+]$ o $[\text{M}^{n+}]$ o disminuyendo uno de ellos con respecto a la cantidad de resina presente.

RESINAS DE INTERCAMBIO ANIONICO

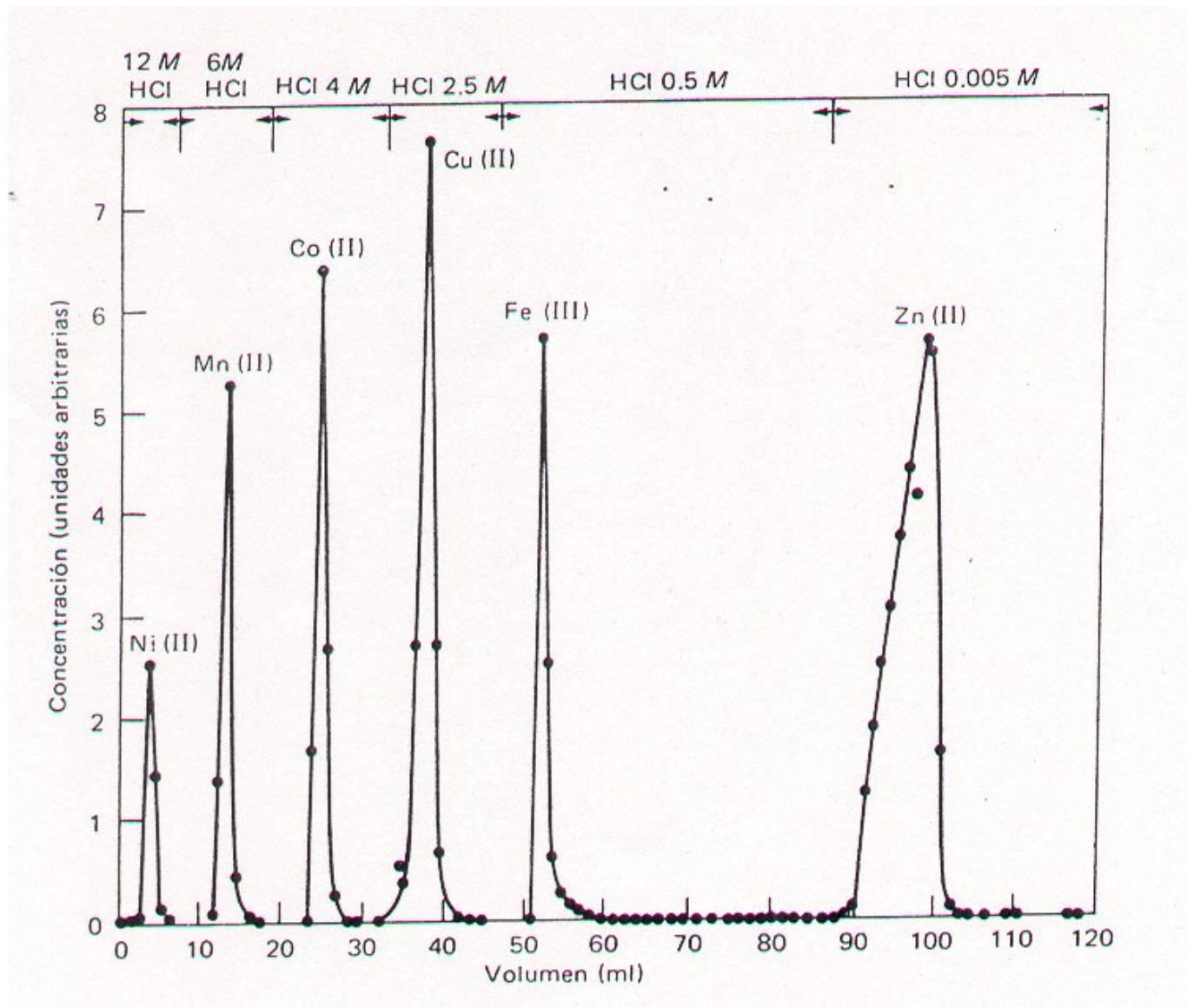
Los grupos básicos de la resina en los que el anión hidroxilo puede intercambiarse con otros aniones constituyen a las resinas de intercambio aniónicas. Estos son grupos básicos fuertes (grupos de amonio cuaternario) y grupos básicos débiles (grupos amina). Las reacciones de intercambio se representan como sigue:



en donde R representa a los grupos orgánicos, que suelen ser grupos metilo. De nuevo, la capacidad de intercambio del *intercambiador básico débil* es mayor que la del *intercambiador básico fuerte*. Los *intercambiadores básicos fuertes* pueden emplearse en el ámbito de pH de 0 a 12, pero los *intercambiadores básicos débiles* se emplean solamente de 0 a 9. Estos últimos intercambiadores no remueven a los ácidos muy débiles.



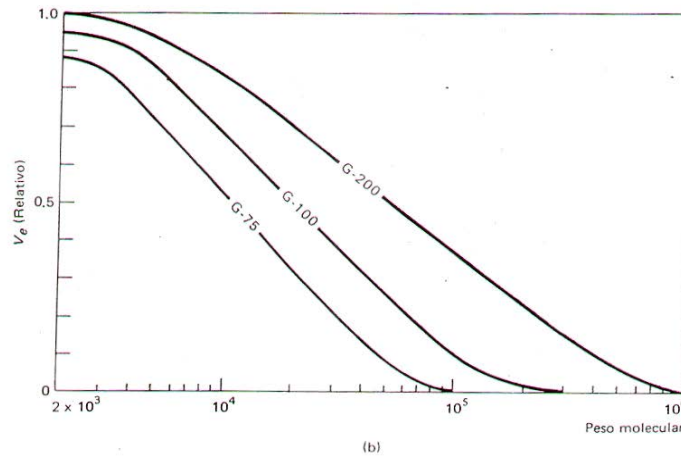
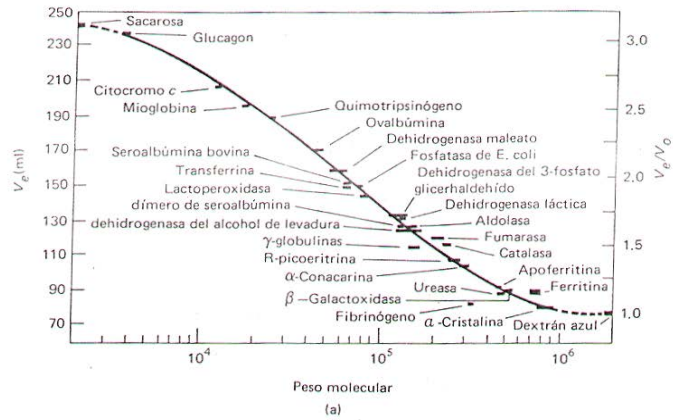
Coeficientes de distribución (log D) de los elementos en resina de intercambio aniónico Dowex -1 en función de la concentración de ácido clorhídrico.



Separación de los elementos de transición del Mn al Zn (columna de Dowex 1; 26 cm X 0,29 cm; velocidad de flujo 0,5 cm/min).

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

- La cromatografía de exclusión molecular (llamada también cromatografía en gel) es un tipo de cromatografía en el que la fase estacionaria es un *tamiz molecular*. Este consta de carbohidratos poliméricos y acrilamida de red abierta, formada por el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Es hidrófilo y por tanto absorbe agua, y al hincharse se abre su estructura. El grado de entrecruzamiento determinará el tamaño de los “huecos”.
- Las moléculas de mayor tamaño que los poros más grandes del gel hinchado no pueden penetrar en las partículas de gel y por tanto pasan sin detenerse a través de la columna, No obstante, las moléculas más pequeñas penetran la red abierta de partículas en grado variable dependiendo de su tamaño y forma, por tanto se retardan en diversos grados y se eluyen por orden de tamaño molecular, de mayor a menor. Los geles que se hinchan mucho, se usan para fraccionar sustancias de alto peso molecular, mientras que los geles más densos (que se hinchan menos) se usan para separar compuestos de bajo peso molecular



El volumen de elución en función del peso molecular de proteínas en columnas Sefadex.

(a) Distintas proteínas en Sefadex G-200, pH 7,5. Tomado de P. Andrews, *Biochem, J.* **96** (1965) 595.

(b) Proteínas globulares en columnas Sefadex distintas. Tomado de *Sephadex gel Filtration in Theory and Practice*, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia, 1968,

Una etapa intermedia en la elución de una columna cromatográfica de exclusión molecular. Los círculos grandes en gris representan el lecho del material poroso. Los círculos negros representan las moléculas de diversos tamaños. Debido a que son parcial o completamente excluidos de la fase móvil que penetra al lecho poroso, las moléculas más grandes hacen su progreso más rápido a través de la columna. Si V_b el volumen ocupado por el lecho de la matriz, V_i el volumen de fase móvil dentro del lecho poroso, y V_o el volumen de fase móvil fuera del lecho poroso; el volumen de retención $V_R = V_o + KV_i$, donde K en cromatografía de exclusión molecular es la fracción de V_i , accesible a un soluto determinado.

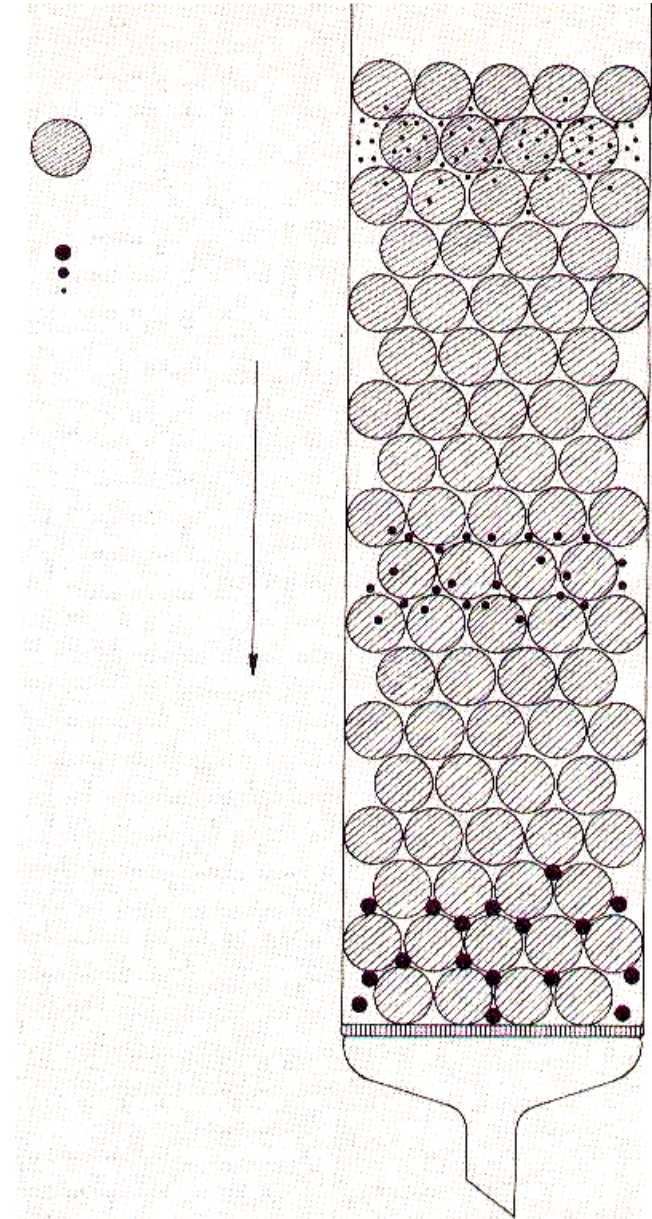


Tabla Geles Sefadex

Tipo de Sefadex	Ganancia de agua, g H ₂ O/g Sefadex seco	Volumen del lecho mL/g Sefadex seco	Orden de fraccionado ^b para péptidos y proteínas globulares, peso molecular
G-10	1,0 ± 0,1	2-3	Arriba de 700
G-15	1,5 ± 0,2	2,5-3,.5	Arriba de 1 500
G-25	2,5 ± 0,2	4-6	5 000
G-50	5,0 ± 0,3	9-11	30 000
G-75	7,5 ± 0,5	12-15	70 000
G-100	10,0 ± 1,0	15-20	150 000
G-150	15,0 ± 1,5	20-30	400 000
G-200	20,0 ± 2,0	30-40	800 000

^b El límite superior es el límite de exclusión.

Bio-Geles

Tipo de Bio-gel	Ganancia de agua, GH ₂ O/g gel seco	Límite de exclusión, peso molecular	Orden de fraccionado, Peso molecular
P-2	1,5	1 800	100-1 800
P-4	2,4	4 000	800-4 000
P-6	3,7	6 000	1 000-6 000
P-10	4,5	20 000	1 500-20 000
P-30	5,7	40 000	2 500-40 000
P-60	7,2	60 000	3 000-60 000
P-100	7,5	100 000	5 000-100 000
P-150	9,2	150 000	15 000-150 000
P-200	14,7	200 000	30 000-200 000
P-300	18,0	400 000	60 000-400 000

Para compuestos semejantes, el volumen de elución para un ámbito amplio de pesos moleculares puede obtenerse aproximadamente mediante la siguiente ecuación empírica:

$$V_e = a + b \log (P. M.)$$

Lo que muestra que el volumen de elución es una función lineal del peso molecular.