



Tecnoparque
nodo Rionegro

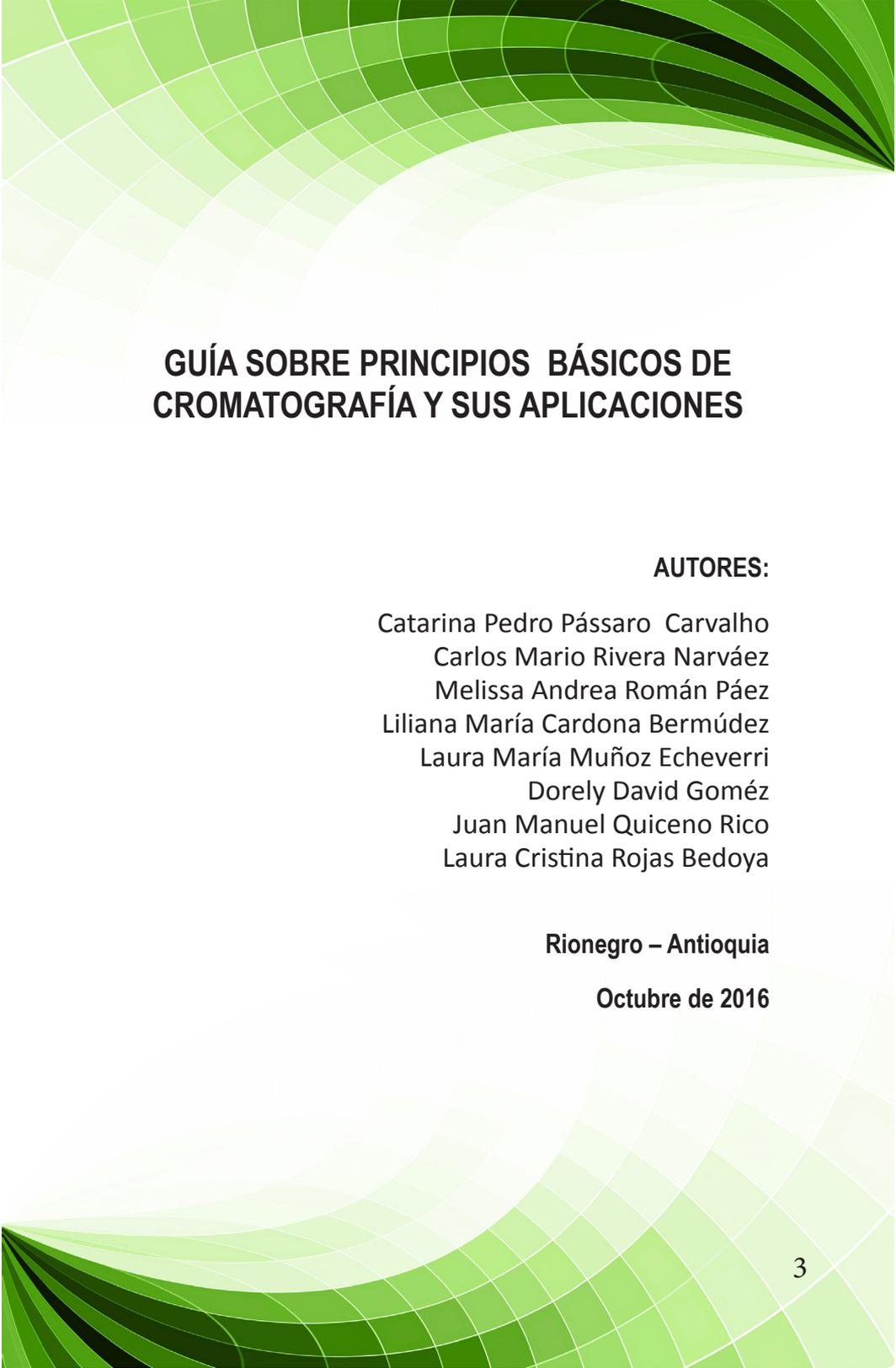
SENNOVA



GUÍA SOBRE PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA Y SUS APLICACIONES



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



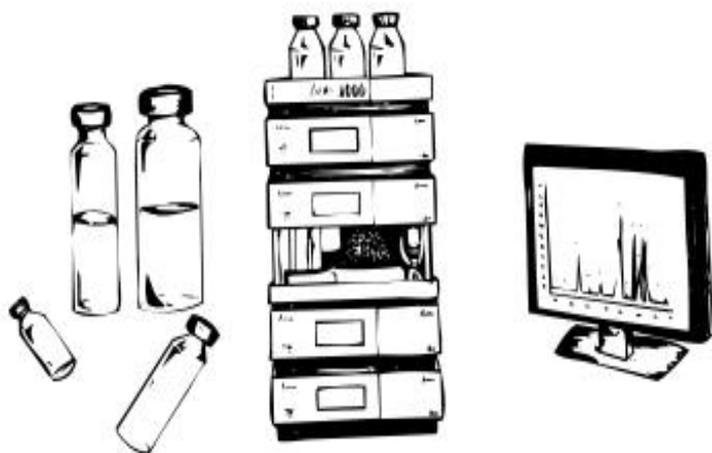
GUÍA SOBRE PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA Y SUS APLICACIONES

AUTORES:

Catarina Pedro Pássaro Carvalho
Carlos Mario Rivera Narváz
Melissa Andrea Román Páez
Liliana María Cardona Bermúdez
Laura María Muñoz Echeverri
Dorely David Gómez
Juan Manuel Quiceno Rico
Laura Cristina Rojas Bedoya

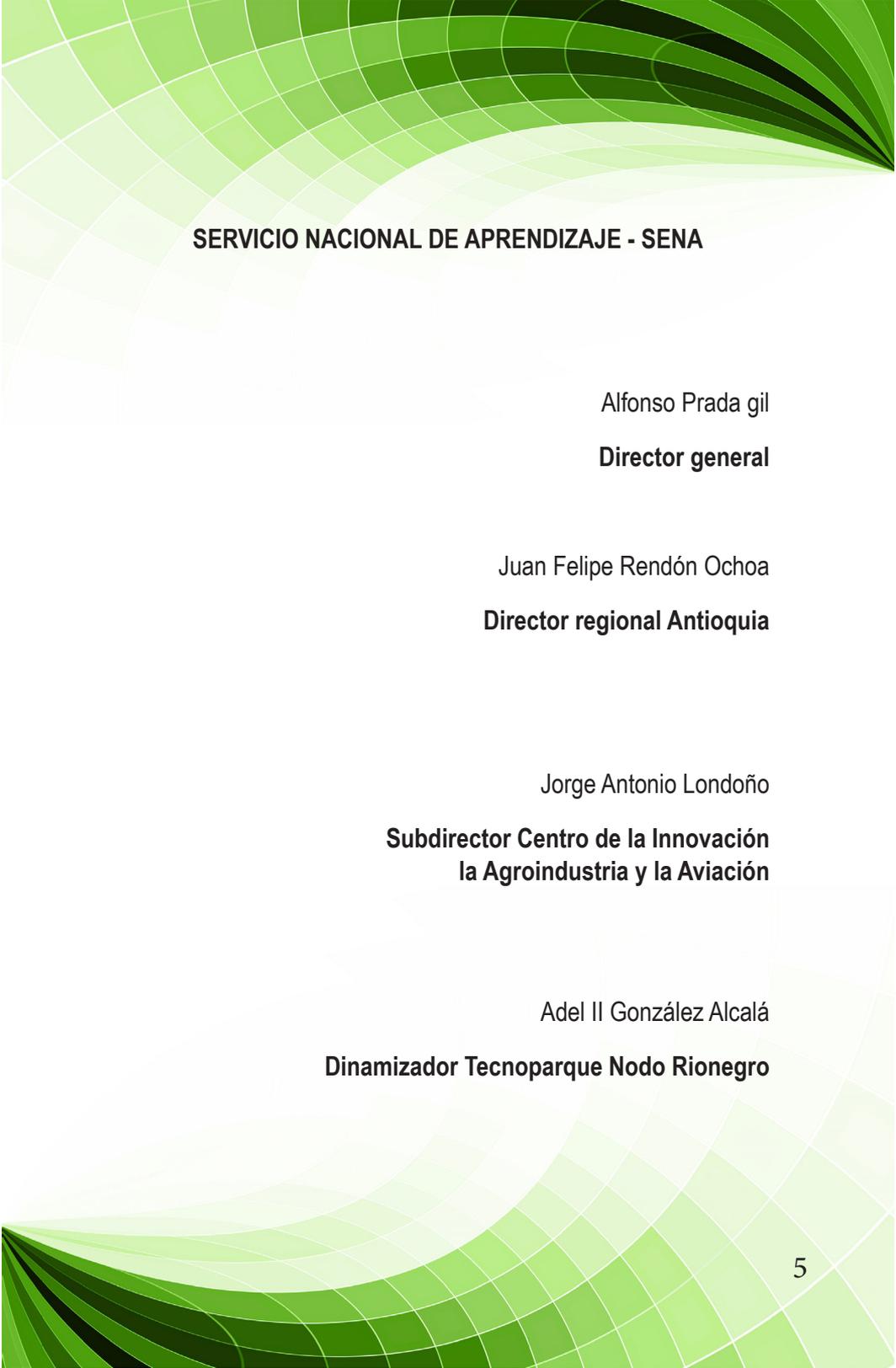
Rionegro – Antioquia

Octubre de 2016



Diseño general de un Equipo de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión UHPLC

Diagrama realizado por Juan Manuel Quiceno R, 2016



SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE - SENA

Alfonso Prada gil

Director general

Juan Felipe Rendón Ochoa

Director regional Antioquia

Jorge Antonio Londoño

**Subdirector Centro de la Innovación
la Agroindustria y la Aviación**

Adel II González Alcalá

Dinamizador Tecnoparque Nodo Rionegro

CONTENIDO

1. ¿QUE ES LA CROMATOGRAFÍA?	11
2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA Y APLICACIONES GENERALES	13
2.1 Según el estado físico de la fase móvil:	14
2.2 Según Mecanismos de separación	17
3. ASPECTOS HISTÓRICOS DE ALGUNOS TIPOS DE CROMATOGRAFÍA	20
4. TÉCNICAS ESPECIALES	22
4.1 Cromatografía con fase invertida	22
4.2 Cromatografía con Fase Normal	22
4.3 Análisis Isocrático	23
4.4 Elución con Gradiente	23
4.5 Elución en Etapas o Escalonada	23
4.6 Cromatografía Bidimensional	23
5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	24

5.1 Instrumentación:.....	25
5.1.1 Características de los detectores:	30
5.2 Ventajas y desventajas de la cromatografía líquida de alta presión...	31
5.3 Aplicaciones.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
ANEXO.....	37
Anexo 1	37
PRÁCTICA DE LABORATORIO.....	37
Anexo 2	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diferentes fases móviles y fases estacionarias	13
Tabla 2 Adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía.....	20
Tabla 3 Tipos de Cromatografía Líquida.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Experimento de Mikhail Tswett.....	10
Figura 2 Cromatografía en Columna.....	14
Figura 3 Cromatografía en papel o capa delgada.....	15
Figura 4 Esquema de un cromatógrafo de gases.....	16
Figura 5 Componentes de un HPLC.....	25
Figura 6 Cromatograma típico obtenido por un HPLC.....	28
Figura 7 Esquema de una columna cromatográfica.....	38
Figura 8 Esquema de un proceso cromatográfico en placa fina.....	40
Figura 9 Desarrollo de una placa cromatográfica.....	42

PRINCIPIOS BÁSICOS SOBRE CROMATOGRAFÍA Y SUS APLICACIONES

RESUMEN

La palabra cromatografía significa literalmente “escribir en colores”, ya que cuando fue desarrollada, los componentes separados eran colorantes. Se trata de una técnica o método físico de separación de dos o más solutos presentes en una mezcla basada en la velocidad de desplazamiento de los mismos. En ella participan dos fases, una móvil (líquida o gaseosa) y otra estacionaria (sólida o líquida). El presente manual estará dirigido a la comprensión y asimilación de los fundamentos básico-teóricos de esta técnica analítica, así como de su metodología, tipos y aplicaciones. (Túnez, Muñoz, s.f.)

SUMMARY

Chromatography word literally means “write in colors” because when it was developed, the separate components were dyes. It is a technical or physical method of separating two or more solutes in a mixture based on the displacement speed thereof. Here two phases, a mobile (liquid or gaseous) and a stationary (solid or liquid) involved. This manual will be directed to the understanding and assimilation of the basic-theoretical foundations of this analytical technique and its methodology, types and applications. (Túnez, Muñoz, s.f.)

INTRODUCCIÓN

El botánico ruso Mikhail Tswett en 1910 describió por vez primera la cromatografía, colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio (CaCO_3). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades.



Figura 1: Experimento de Mikhail Tswett

Figura tomada de blogspot **Cromatografía Líquida de Alta Eficacia**, (2013).

Tras su descubrimiento, la cromatografía quedó prácticamente olvidada hasta 1930 año en que fue redescubierta por Kuhn y Lederer, quienes la aplicaron para la separación de carotenoides; a partir de este momento, el uso de esta técnica se fue extendiendo cada vez más, al tiempo que se desarrollaban diferentes versiones de la misma: cromatografía de reparto (Martin y Synge, 1941), de papel (Consden, Gordon y Martin, 1944), de capa fina (Stahl, 1958), etc. Un hito importante en el desarrollo de la cromatografía lo constituyó el desarrollo de la cromatografía gas-líquido (Martin y James, 1952), técnica que encontró rápidamente aplicaciones de gran importancia, lo que llevó a su vez al desarrollo de la teoría de la separación cromatográfica (Van Deemter, 1956; Giddings,

1965, etc.) así como al desarrollo de una instrumentación que permitía un mayor control de las condiciones de trabajo.

Hoy en día casi no hay campo de la química, biología, medicina, etc. en el que no se utilice la cromatografía en alguna de sus formas, tanto en su vertiente preparativa como en la analítica; por otra parte el desarrollo sobre el uso conjunto de la cromatografía con otras técnicas analíticas, así como el desarrollo de otros tipos de cromatografía, como es por ejemplo la de fluidos supercríticos, hace previsible una extensión aún mayor de su uso. (Conceptos fundamentales de cromatografía, s.f)

1. ¿QUE ES LA CROMATOGRAFÍA?

Actualmente cromatografía es el nombre que se le da a un grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad de sustancias, en la separación de componentes de las mezclas y en la purificación de compuestos. Esta técnica es muy efectiva y por lo tanto se utiliza tanto a nivel de investigación como a nivel industrial.

Este método puede variar de técnica en técnica, pero siempre se basa en el mismo principio: Todos los sistemas de cromatografía contienen una fase estacionaria y una fase móvil.

La cromatografía es esencialmente un método de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (fase estacionaria), y otra móvil (fase móvil) la cual percola a través de la primera. El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo de la fase estacionario

(elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma. (Conceptos fundamentales de cromatografía, s.f)

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que se queda fijo en la misma posición. La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria. Las sustancias que están en un sistema de cromatografía interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. La naturaleza de estas interacciones depende de las propiedades de las sustancias así como también de la composición de la fase estacionaria. La rapidez con que viaja una sustancia a través del sistema de cromatografía depende directamente de la interacción relativa entre las sustancias y las fases móvil y estacionaria. En el caso de una mezcla, si cada componente interactúa diferente con la fase móvil y la fase estacionaria, cada uno de ellos se moverá diferente. (Cromatografía, s.f)

En la siguiente tabla se observan diferentes fases móviles y fases estacionarias en diferentes técnicas de cromatografía:

Tabla 1: diferentes fases móviles y fases estacionarias

Técnica	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Líquido	Sólido

Tabla tomada de (Cromatografía, s.f)

2. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA Y APLICACIONES GENERALES

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Aunque los principios fundamentales son los mismos, se acostumbra clasificar los métodos cromatográficos

2.1 Según el estado físico de la fase móvil:

• **Cromatografía líquida:** La fase móvil es un solvente o mezcla de solventes y la fase estacionaria un sólido que interactúa con las sustancias que se desea separar (cromatografía líquido-sólido), o bien un líquido inmiscible con la fase móvil, depositado en la superficie de un sólido (cromatografía líquido-líquido). Esta forma de cromatografía puede realizarse con diferentes arreglos experimentales: en columna, en capa delgada o en papel y **HPLC**. En el primer caso, la fase estacionaria se encuentra rellenando un tubo; en el segundo, se dispersa sobre una lámina de vidrio o aluminio formando un lecho de espesor uniforme; en la cromatografía en papel, la fase estacionaria es la solución acuosa contenida en el interior de las celdas formadas por las fibras de la celulosa, y es por tanto una forma de cromatografía líquido-líquido.

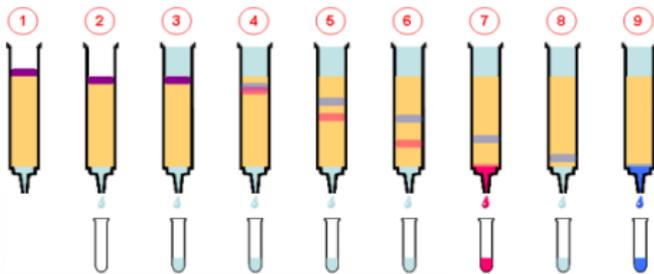


Figura 2: Cromatografía en columna

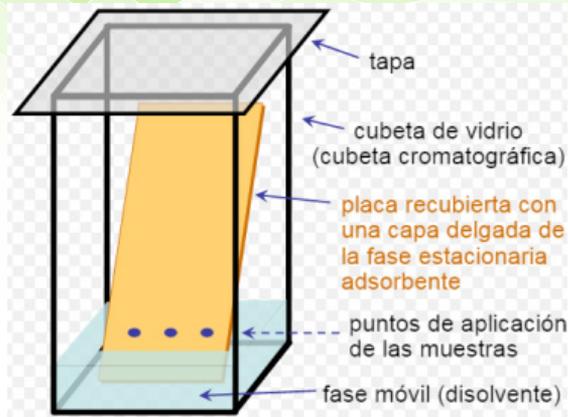


Figura 3: Cromatografía en papel o capa delgada

Figuras 2 y 3 tomadas de <http://biomodel.uah.es>

- Cromatografía de gases:** En este caso la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) y la fase estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido “sostenido” por un sólido inerte (cromatografía gas-líquido). Este tipo de cromatografía siempre es en columna, ya que es la única manera de que la fase móvil gaseosa se mantenga fluyendo, confinada dentro del sistema. La columna puede estar rellena con la fase estacionaria, en forma semejante a la cromatografía líquida, o bien la fase estacionaria puede depositarse sobre las paredes de un tubo muy delgado (0.25mm de diámetro) y largo (hasta 100m). Este tipo de columnas se conocen como columnas capilares y proporcionan la mayor capacidad de separación.

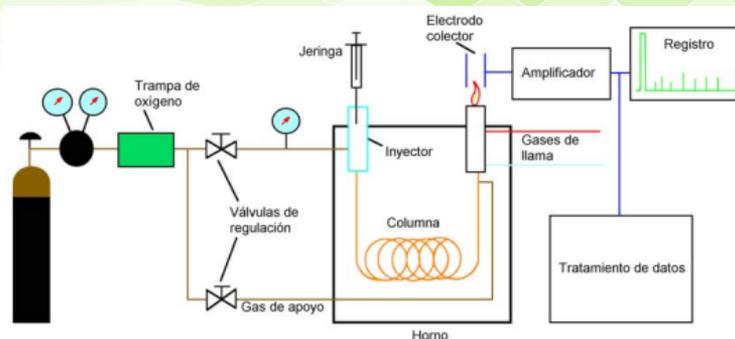


Figura 4: Esquema de un cromatógrafo de gases

Figura tomada de <http://www.monografias.com>

De acuerdo con el mecanismo de retención, la cromatografía se puede clasificar en los siguientes tipos:

- ✓ Adsorción (normal, de fase reversa)
- ✓ Partición líquido-líquido
- ✓ Intercambio iónico
- ✓ Permeación sobre gel
- ✓ De afinidad

Las áreas de aplicación son muy diversas y abarcan prácticamente todas las actividades en las que interviene la química, por ejemplo, se emplea en:

El análisis de drogas y fármacos en fluidos biológicos como la saliva, la sangre, la orina; Seguir la transformación de las sustancias responsables de la transmisión neurológica; Determinar la presencia de contaminantes en el medio ambiente; Descifrar la composición de los combustibles fósiles; Realizar el control de calidad de los productos químicos y farmacéuticos

manufacturados; en fin, la lista de ejemplos es interminable. (Universidad Nacional Autónoma de México, Diciembre de 2007)

- **Cromatografía con fluido supercrítico (SFC):** Técnica de separación en la que la fase móvil es un fluido por encima y relativamente cerca de sus temperatura y presión críticas. En general, los términos y definiciones usados en la cromatografía de gases y líquida son aplicables igualmente a la de fluido supercrítico

Las técnicas cromatográficas también pueden clasificarse en función del mecanismo de separación de los componentes entre las fases, o bien por la forma de operar del sistema.

2.2 Según Mecanismos de separación

En función del mecanismo de separación, las técnicas de cromatografía pueden clasificarse en:

- **Cromatografía de adsorción.** La separación depende de los equilibrios de adsorción-desorción de los componentes de la mezcla, entre la fase estacionaria sólida y la fase móvil líquida o gaseosa. La fuerza con que es adsorbido un componente depende de la polaridad de este, de la actividad del adsorbente y de la polaridad de la fase móvil. En general cuanto más polar es un compuesto más fácilmente será adsorbido. El orden general de elución de algunos compuestos orgánicos, de la actividad de algunos adsorbentes y de la fuerza de elución de algunos disolventes comunes, se recogen en la Tabla 2. La cromatografía de adsorción, es una técnica que está particularmente bien adaptada para la separación de compuestos de polaridad baja y media. La separación de compuestos muy polares mediante cromatografía de adsorción requiere, debido a la gran retención que ofrecen, la utilización de adsorbentes muy poco activos, o

bien, tratamientos químicos previos para la preparación de la muestra, a fin de reducir su polaridad.

- **Cromatografía de reparto.** Está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el reparto existente entre la fase móvil (líquido o gas) y la fase estacionaria (líquida) soportada o ligada sobre un sólido adecuado. La mayor o menor migración de un compuesto en este tipo de cromatografía, será función del coeficiente de reparto de éste entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La cromatografía de reparto es utilizable para la separación de mezclas de compuestos de polaridad media y alta. Ejemplos de este tipo de cromatografía, son las cromatografías sobre papel, sílice hidratada y la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa.

- **Cromatografía por tamaño molecular**, también llamada permeación de gel: Consiste en la separación de las moléculas basándose en su tamaño en lugar de 4 en su solubilidad o polaridad.

Las fases estacionarias empleadas para este tipo de cromatografía son inorgánicas (zeolitas), o geles orgánicos compatibles con disolventes acuosos (agarosa, poliacrilamida) u orgánicos (copolímeros estireno/divinilbenceno). Estas fases estacionarias poseen cavidades en las cuales las moléculas de los compuestos a separar pueden penetrar y ser retenidas, siendo las moléculas mayores las eluidas de la columna en primer lugar; el rango de trabajo de estas fases estacionarias, se define como el intervalo de pesos moleculares que pueden ser separados; otro parámetro que caracteriza a este tipo de fases, es su límite de exclusión, que se define como el peso molecular a partir del cual los compuestos pasarán a través del lecho estacionario sin experimentar retención.

- **Cromatografía de intercambio iónico.** Las separaciones por intercambio iónico, se llevan a cabo con materiales insolubles y de textura porosa, los cuales presentan grupos reactivos asociados a iones lábiles capaces de intercambiarse con los del medio que les rodea, por lo que inevitablemente este tipo de cromatografía ha de realizarse en medio líquido. La cromatografía de intercambio iónico, es utilizable para la separación de sustancias iónicas, tanto inorgánicas como orgánicas. Las separaciones por cambio iónico, están basadas en los diferentes equilibrios de reparto de los iones de la mezcla entre el material cambiador y la disolución. En general, se utilizan tres tipos de materiales para cromatografía de cambio iónico: resinas, geles y celulosas. (Túnez, Muñoz, s.f.)

**TABLA 2- Adsorbentes y disolventes más comunes en cromatografía.
Orden de elución, actividad de adsorbentes y fuerza de elución de los disolventes**

Secuencia	Orden de elución de compuestos	Actividad de adsorbentes	Fuerza de elución de disolventes	
<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">+</p>	Hidrocarburos saturados	Celulosa	Eter de petróleo	
	Hidrocarburos aromáticos		Ciclohexano	
	Derivados halogenados		Benceno	
	Eteres		Tetracloruro de carbono	
			Sulfato cálcico (yeso)	Diclorometano
	Cetonas	Sílice	Cloroformo	
	Aldehídos	Florisil	Eter dietílico	
	Esteres	Oxido de magnesio	Acetato de etilo	
	Alcoholes	Alúmina		
	Aminas			
	Acidos	Carbón activo	Acetona	
			n-propanol	
		Etanol		
		Metanol		
		Agua		
		Acido acético		

Tabla tomada de Conceptos fundamentales de cromatografía, s.f.

3. ASPECTOS HISTÓRICOS DE ALGUNOS TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Cromatografía en papel: Tiene como soporte un papel de celulosa. Es una técnica sencilla y presenta la ventaja de poder utilizar cantidades pequeñas de muestra (miligramos y microgramos).

Cromatografía en capa fina: Lograron separar mezclas de tinturas farmacéuticas. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria se extiende sobre un soporte inerte (silica). Stahl estandarizó el método para elaborar capas finas por métodos mecánicos.

Cromatografía de columna: Consiste en la aplicación de una muestra compleja a una columna de cristal. Contiene una matriz sólida porosa que está inmersa en el solvente. Se bombea una gran cantidad de solvente a través de la columna. Las diferentes mezclas se van retrasando de manera distinta según sus interacciones con la matriz. Se pueden separar de acuerdo a su carga, su hidrofobicidad, su tamaño o su capacidad de unirse a grupos químicos particulares. La pureza de las fracciones obtenidas se suele comprobar mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida.

Cromatografía de intercambio iónico: Esta técnica apareció durante la II Guerra Mundial.

Tenía la finalidad de separar los elementos alcalinotérreos y los elementos de transición. En 1938 Taylor y Urey utilizan este método para separar isótopos de Litio y Potasio utilizando resinas de zeolita. Se usa en la separación de moléculas grandes (proteínas y ácidos nucleicos). Cuando las separaciones exigen condiciones químicas fuertes se emplean intercambiadores iónicos inorgánicos.

Cromatografía de gel-filtración: Fodin y Porath en 1958 descubren que usando como fase estacionaria geles se puede separar polímeros sintéticos de alto peso molecular.

Cromatografía de afinidad: Porath en 1967 utiliza un péptido o proteína unida covalentemente a un ligando y la utiliza para la separación de moléculas proteicas.

Cromatografía de gas: Es una de las técnicas más utilizadas e importantes. Ha revolucionado el campo de la química analítica.

Cromatografía de exclusión o La cromatografía de exclusión molecular: separa las muestras en base a su tamaño.

La matriz de la columna está formada por un polímero entrecruzado con poros de tamaños determinados.

Las muestras de mayor tamaño migran a lo largo de la columna con mayor velocidad que las de tamaño pequeño. Las muestras de menor tamaño, entran en los poros y se mueven a lo largo de la columna lentamente porque tienen que atravesar los laberintos que se encuentran en el interior de las bolas de polímero en su marcha a lo largo de la columna. A menor tamaño mayor resolución y menor gasto en la columna. (Cromatografía, s.f)

4. TÉCNICAS ESPECIALES

4.1 Cromatografía con fase invertida

Procedimiento de elución empleado en cromatografía líquida en el cual la fase móvil es significativamente más polar que la estacionaria; por ejemplo, un material microporoso de base silíceo con cadenas alquilo unidas químicamente. Nota: el término “fase reversa” es una expresión incorrecta que debe evitarse (en inglés, debe decirse Reversed Phase y no Reverse Phase).

4.2 Cromatografía con Fase Normal

Procedimiento de elución en el que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. Este término se usa en cromatografía líquida para resaltar el contraste con la cromatografía con fase invertida.

4.3 Análisis Isocrático

Procedimiento en el que la composición de la fase móvil permanece constante a lo largo del proceso de elución.

4.4 Elución con Gradiente

Procedimiento en el que la composición de la fase móvil cambia, de forma continua o en etapas, a lo largo del proceso de elución.

4.5 Elución en Etapas o Escalonada

Proceso de elución en el que se cambia la composición de la fase móvil en etapas o escalones durante un sólo desarrollo de la cromatografía.

4.6 Cromatografía Bidimensional

Procedimiento en el que parte o todos los componentes de la muestra se someten, una vez separados, a etapas adicionales de separación. Esto se puede hacer, por ejemplo, conduciendo a una fracción en particular que eluye de la columna hacia otra columna (o sistema) que tenga diferentes características de separación. Cuando se combina con etapas de separación adicionales, se puede hablar de cromatografía multidimensional. En la cromatografía plana, cromatografía bidimensional se refiere al proceso cromatográfico que hace que los componentes migren primero en una dirección y luego en otra perpendicular a ella; las dos eluciones se llevan a cabo con eluyentes diferentes. (Loro Ferrer, 2001)

5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil.

La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla, consta de dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. La tabla 3 nos muestra los tipos de cromatografía líquida que existen así como su separación cromatográfica.

Tabla 3: tipos de cromatografía líquida

Nombre	Tipo de fase móvil	Tipo de fase estacionaria	Método de fijación de la fase estacionaria
Partición	Líquido	Líquido	Adsorbida en un sólido poroso sostenido en una columna tubular
Adsorción	Líquido	Sólido	Sostenida en una columna tubular
Papel	Líquido	Líquido	Sostenida en los poros de un papel grueso
Capa delgada	Líquido	Líquido o sólido	Sólido finamente dividido sostenido sobre una placa de vidrio: el líquido puede absorberse sobre las partículas
Gel	Líquido	Líquido	Sostenido en los intersticios de un polímero sólido
Intercambio iónico	Líquido	Sólido	Resina de intercambio iónico finamente dividida en una columna tubular

Tabla tomada de documento Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química, 2007, Técnicas Cromatográficas

En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de vidrio. Después se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Para aumentar la eficiencia en las separaciones, en la cromatografía de alta resolución; el tamaño de las partículas de fase fija se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir.

5.1 Instrumentación:

Un equipo para HPLC puede ser representado por la siguiente figura.

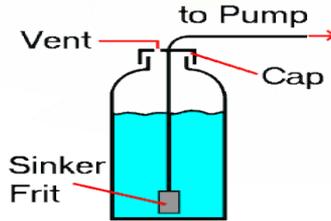
Figura 5: Componentes de un HPLC



Fuente: Elaboración propia

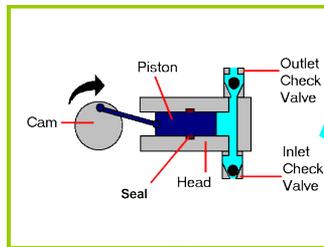
Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

A) Depósitos para la fase móvil (disolventes): El depósito que mantiene la fase móvil a menudo no es más que una botella de vidrio.

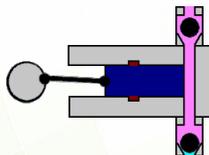


Tomada de Gonzalo Aire, Gabriel, et al, s.f, Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Aplicación en compuestos orgánicos, Monografía

B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil: La mayoría de las bombas de HPLC comerciales se basan en un diseño de pistones alternativos, como se muestra aquí.



Sección transversal de un simple diagrama de una sola bomba de pistones alternativos

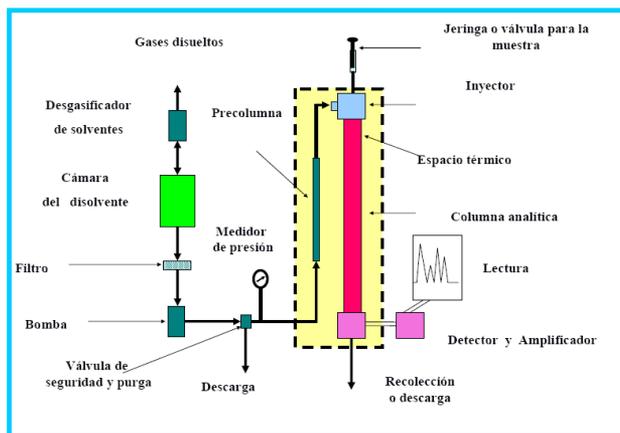


Una sola operación de la bomba de pistón reciprocando.

Tomada de Gonzalo Aire, Gabriel, et al, s.f, Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Aplicación en compuestos orgánicos, Monografía

C) Sistema de inyección de muestras: La válvula de inyección fija o variable a través de bucle es una forma común de introducir la muestra.

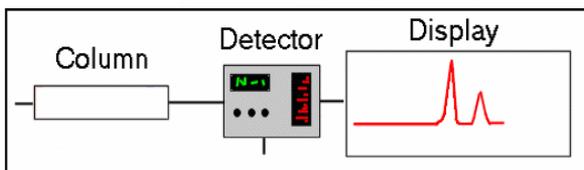
D) Columna cromatográfica: Es el corazón del sistema cromatográfico, en ella se produce la retención de los diferentes compuestos que permite su separación.



Tomada de Gonzalo Aire, Gabriel, et al, s.f, Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Aplicación en compuestos orgánicos, Monografía

E) Termostatos para las columnas

F) Detectores



Tomada de Gonzalo Aire, Gabriel, et al, s.f, Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Aplicación en compuestos orgánicos, Monografía

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importantes es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna.

Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector. El cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma de intensidad en función del tiempo (figura 6); en el cual, lo ideal es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra.

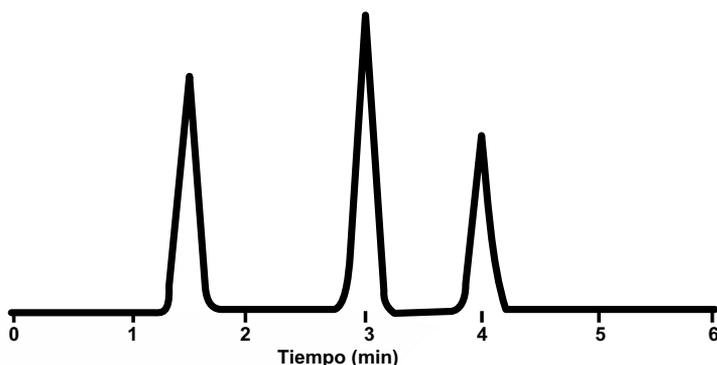


Figura 6 - Cromatograma típico obtenido por un HPLC

Imagen tomada de documento Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química, 2007, Técnicas Cromatográficas

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles:

- ✓ **Detectores de absorbancia ultravioleta**, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.
- ✓ **Detectores de fluorescencia**, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste. (Harris, D. C. 2001)
- ✓ **Detectores electroquímicos**, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

- ✓ **Detectores de índice de refracción**, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula (Harris, D. C. 2001). El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no

resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.

- ✓ **Detectores de conductividad**, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.

5.1.1 Características de los detectores:

- Sensibilidad. Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- Linealidad. Rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria.

El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:

- El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección.
- El límite Superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad.
- Rango Dinámico Lineal. Rango sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.
- Ruido. Es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación

de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.

Límite de Detección. Está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble del nivel de ruido. (Universidad Nacional Autónoma de México, Diciembre de 2007)

5.2 Ventajas y desventajas de la cromatografía líquida de alta presión



Fuente: Elaboración propia

Con esta técnica es usual obtener separaciones en minutos e inclusive en algunos casos en segundos. Por lo tanto se requieren columnas de alta eficacia y sistemas de bombeo de alta presión, ya que separaciones rápidas requieren flujos rápidos de fase móvil y esto a su vez requiere presiones elevadas. Su alta resolución permite obtener y separar mezclas muy complejas; como algunos fluidos biológicos como la orina humana.

Entre las ventajas de esta técnica, la más importante es la diversidad de sus aplicaciones tantos a compuestos orgánicos como inorgánicos.

5.3 Aplicaciones

La HPLC se puede utilizar como técnica preparativa o como técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado. La elección de la fase estacionaria y la fase móvil, del flujo al que se va a impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria e incluso de la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía, permitirán una correcta separación del analito de otros compuestos. Cada componente de una solución tiene unas características determinadas bajo ciertas condiciones cromatográficas, y debe conseguirse que la migración del componente y de los contaminantes a través de la columna sea lo suficientemente distinta para que dicho compuesto sea separado de los demás del extracto, para permitir su posterior identificación y cuantificación.

La cromatografía líquida de alta presión a pesar de ser una técnica relativamente nueva, se cuenta que describe numerosas aplicaciones en la literatura química. En la mayoría de los casos, éstas consisten en determinaciones de sustancias cuyo análisis por otra técnica cromatográfica resulta muy difícil.

- a. **Conservantes antioxidantes:** — Se usa el gradiente de HPLC con un detector colorimétrico para medir simultáneamente los nueve antioxidantes más comunes Hipoclorito , iodo .etc
- b. **Carbohidratos simples:** — Usar HPLC con ELSD elimina la necesidad de usar bases fuertes o alto pH, convirtiéndose en un método no destructivo.

La adición de mono y disacáridos a bebidas y zumos sirve como propósito de enriquecer el sabor. Para determinar si la cantidad añadida es correcta se miden los azúcares usando HPLC de intercambio iónico con detección de pulso amperométrico con detectores de refracción o ultravioletas. Análisis de carbohidratos en las bebidas

- c. **Flavonoides y fenoles:** En el vino la medición de estas sustancias permite la determinación del color, la edad y las variedades de uva usadas. El HPLC en combinación con colorímetros, permiten la determinación de hasta 22 compuestos diferentes simultáneamente.
- d. **Lípidos:** La determinación de lípidos animales y vegetales como: colesterol, triglicéridos, glicéridos y esteroides, se basa en el uso del HPLC
- e. **Catequinas del té:** Las catequinas son flavonoles del té, posiblemente anticancerígenos. Se usa HPLC con hidrólisis enzimática para detectar estas sustancias tan beneficiosas
- f. **Triglicéridos:** HPLC con ELSD permite la separación y caracterización de todos los tipos de triglicéridos.
- g. En los problemas relacionados con la contaminación ambiental, la HPLC se utiliza para la contaminación de algunos pesticidas (insecticidas, larvicidas, herbicidas, etc.). También es posible la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares que son contaminantes atmosféricos muy importantes. Una aplicación más específica relacionada con la contaminación ambiental es Aplicaciones de la Cromatografía Líquida con Detector de Diodos y Fluorescencia al Análisis de Contaminantes Medioambientales. (S. García R. M. Pérez, 2012)

h. Aspectos Analíticos sobre la Determinación de Compuestos Carotenoides en Microalgas mediante Cromatografía de Líquidos con Detector de Diodo (S. García R. M. Pérez, 2012)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Isaac Túnez Fiñana, María del Carmen Muñoz Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, s.f, Cromatografía en capa fina de lípidos, <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/12%20CROMATOGRAF%C3%8DA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20L%C3%8DPIDOS.pdf>
- CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE CROMATOGRAFÍA, s.f, http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf
- CROMATOGRAFÍA, s.f, <http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/curzoz/cromatograf%EDa.pdf>
- http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf
- Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química, Diciembre de 2007, Técnicas Cromatográficas.
- Loro Ferrer Juan Francisco, 2001, Manual de cromatografía, http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/material-de-clase-1/Apuntes_Tecnicas_de_separacion_cromatografica.pdf
- Gonzalo Aire, Gabriel; Quispe Ollero, Elías; Gonzalo Aire, Gabriel; Murga Sulca, Jhonatan Antonio, s.f, Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Aplicación en compuestos orgánicos, Monografía. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYORDE SANMARCOS, Perú.
- S. García R. M. Pérez, 2012, Aplicaciones de la Cromatografía Líquida con Detector de Diodos y Fluorescencia al Análisis de Contaminantes Medioambientales, Departamento de Tecnología, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.
- S. García R. M. Pérez, 2012, Aspectos Analíticos sobre la

Determinación de Compuestos Carotenoides en Microalgas mediante Cromatografía de Líquidos con Detector de Diodo, Departamento de Tecnología, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

- Fundamentos De Química-Práctica 10, Cromatografía Líquida De Adsorción En Columna (CC) y Capa Fina (TLC) <https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/quimbiotec/curso0405/practica10.pdf>, s.f.

ANEXO

Anexo 1

PRÁCTICA DE LABORATORIO

PRÁCTICA # 1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA (CC) Y CAPA FINA (TLC)

En la presente práctica se estudiarán dos tipos de cromatografía líquida: Cromatografía de adsorción en columna (CC) Cromatografía de adsorción en placa fina (TLC)

En ambas técnicas la fase móvil está constituida por un líquido, la fase estacionaria por un sólido y el mecanismo de separación se basa en la diferencia de adsorción de los componentes de la mezcla en la superficie activa de la fase estacionaria. En la primera (CC) la fase estacionaria se sitúa en un tubo (columna), en la segunda (TLC) se deposita sobre una superficie abierta plana. La cromatografía líquida suele emplearse para compuestos de poca volatilidad, tales como moléculas grandes y altamente polares, a los que no es aplicable la cromatografía de gases.

CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA (CC)

En la figura 7 se muestra esquemáticamente una columna cromatográfica. La fase estacionaria consiste en un sólido adsorbente empaquetado en una columna de vidrio. La mezcla a separar (muestra) se deposita sobre la superficie superior de la fase estacionaria quedando adsorbida en ella. A continuación, se permite el paso de la fase móvil (eluyente) a lo largo de la columna a través de la fase estacionaria. Durante el proceso cromatográfico los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil a

distintas velocidades efectuándose la separación. La velocidad de arrastre de cada componente depende de su grado de adsorción en la fase estacionaria y de su afinidad por la fase móvil.

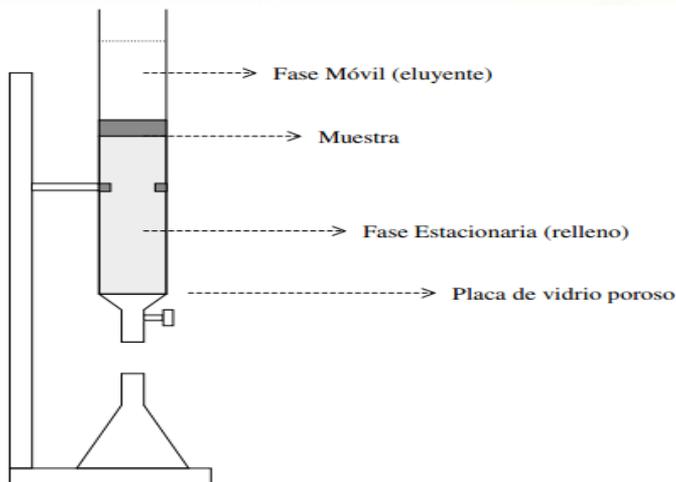


Figura 7.

Para que la separación de los componentes de la mezcla sea efectiva, su velocidad de migración a lo largo de la columna debe ser suficientemente diferente y la longitud de la columna adecuada.

Algunos adsorbentes comúnmente utilizados son: gel de sílice, alúmina, sacarosa y almidón.

La fase móvil consiste en un disolvente o mezcla de disolventes, seleccionado en base a su polaridad con el fin de optimizar la separación de los componentes de la muestra en la columna.

De forma orientativa se puede establecer el siguiente orden de polaridades para los disolventes usados con mayor asiduidad: Éter

de petróleo < ciclohexano < tetracloruro de carbono < benceno < cloroformo < cloruro de metileno < éter etílico < acetato de etilo < acetona < piridina < etanol < metanol < agua < ácido acético.

La fase móvil se desplaza a lo largo de la fase estacionaria debido a la fuerza de la gravedad. El proceso de cromatografía en columna consta de tres pasos:

a) Preparación de la columna: Empaquetamiento de la fase estacionaria en la columna. Se prepara una suspensión del adsorbente (fase estacionaria) en el eluyente (fase móvil) y se vierte en el interior de la columna.

b) Siembra de la muestra: La muestra se deposita (“siembra”) en la superficie superior del adsorbente contenido en la columna con la ayuda de una pipeta. Si la muestra es líquida se puede sembrar directamente, si es sólida se siembra una solución concentrada de la misma en un disolvente adecuado (de baja polaridad).

c) Desarrollo/Elución de la columna: Una vez sembrada la muestra se permite el paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria y se van recogiendo fracciones consecutivas del eluyente, que serán examinadas posteriormente para determinar su composición.

CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN PLACA FINA (TLC)

En la cromatografía en capa fina la fase estacionaria se deposita, formando una capa delgada, sobre un material de soporte tal como placas de vidrio o aluminio.

La fase móvil asciende a lo largo de la fase estacionaria por capilaridad, produciéndose la separación de los componentes de la muestra en base a su diferente distribución entre la fase

móvil y la fase estacionaria, de forma análoga a la descrita en el apartado anterior para la cromatografía en columna. En lo que se refiere a la composición de la fase móvil y la fase estacionaria, las consideraciones que se han hecho para la cromatografía en columna son también aplicables a la cromatografía en placa fina. Así mismo, el campo de aplicación de ambas técnicas es muy similar, de hecho, una de las principales aplicaciones de la TLC es seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo una CC.

Algunas de las ventajas que presenta esta técnica son su bajo coste, su rapidez y su sensibilidad. En la Fig. 8 se muestra de forma esquemática un proceso cromatográfico en placa fina. La altura máxima que alcanza el disolvente en la placa recibe el nombre de frente de disolvente, y se utiliza como referencia para calcular las distancias relativas recorridas por los componentes de la mezcla en el cromatograma.

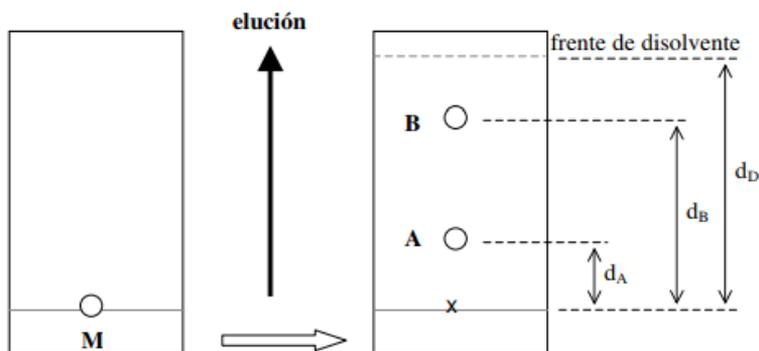


Figura 8

Se denomina factor de retardo (R_f) a la relación existente entre la distancia recorrida por un compuesto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}} \Rightarrow R_{fA} = \frac{d_A}{d_D} \quad \text{y} \quad R_{fB} = \frac{d_B}{d_D}$$

Este factor depende tanto de las condiciones experimentales (temperatura, grado de saturación de la cámara de desarrollo, cantidad de muestra, etc.) como de la composición de la fase móvil y de la fase estacionaria, pero es una constante física (al igual que el punto de fusión) de cada especie química. Por este motivo, para un sistema cromatográfico dado (condiciones experimentales/fase estacionaria/fase móvil), el valor de R_f de un compuesto determinado es constante, permitiendo la identificación de especies.

- ✓ Preparación de la placa Las placas para cromatografía TLC

Se preparan depositando una fina capa de una suspensión del adsorbente sobre un soporte adecuado y secando el disolvente en estufa. No obstante, existe una amplia gama de placas para cromatografía TLC disponibles comercialmente con diferentes tipos de adsorbentes y soportes.

- ✓ Aplicación de la muestra

La aplicación de la muestra se realiza, generalmente, depositando una disolución de la misma (del 0,01 al 0,1 %) a aproximadamente 1 cm del borde inferior de la placa con la ayuda de una pipeta Pasteur o un capilar de vidrio. En el caso de disoluciones diluidas se realizan varias aplicaciones superpuestas permitiendo que el disolvente se seque entre aplicación y aplicación. La disolución de la muestra se transfiere a la placa por simple contacto entre ésta y la punta de la pipeta (o capilar) que la contiene. Esta operación

se debe realizar de forma cuidadosa con el fin de no deteriorar la superficie del adsorbente. Cuando se depositan varias muestras en la cromatopla, éstas deben estar espaciadas un mínimo de 1 cm entre sí. Para facilitar la aplicación se puede dibujar en la placa una línea a lápiz a 1 cm de su borde inferior (línea de aplicación de muestras).

✓ Desarrollo de la placa

Se introduce la placa en una cámara cerrada saturada con los vapores del disolvente (fase móvil) con el que se llevará a cabo el desarrollo. Para favorecer la saturación, se puede introducir en la cámara un papel de filtro cuya parte inferior quede sumergida en la fase móvil. El papel de filtro debe dejar una franja de la pared de la cámara al descubierto, para poder seguir el proceso cromatográfico sin necesidad de destapar la cámara. El disolvente no debe estar en contacto directo con la muestra depositada en la cromatopla, debiendo quedar su nivel por debajo de la línea de aplicación de muestras.

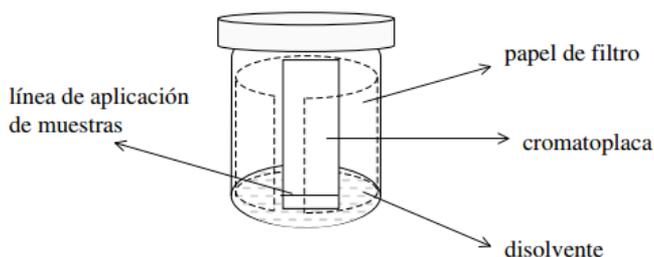


Figura 9.

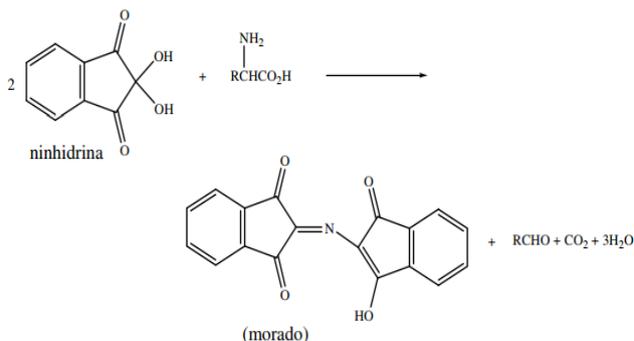
La placa se extrae de la cámara cuando el frente de disolvente está a aproximadamente 1 cm de su borde superior.

✓ Revelado de la placa

Existen diversos procedimientos para detectar los componentes de la muestra en la placa tras el proceso de separación. Uno de los más utilizados consiste en incorporar a la fase estacionaria un material fluorescente y examinar la placa, una vez finalizado el desarrollo, bajo luz ultravioleta (los lugares de la placa donde se encuentran los componentes no muestran fluorescencia).

Otro método consiste en nebulizar la placa con una solución de yodo o de ácido sulfúrico (reaccionan con compuestos orgánicos para dar productos oscuros). En la presente práctica se utilizará un reactivo específico para nebulizar las placas, la ninhidrina, que reacciona con α -aminoácidos dando un producto de color violeta.

Reacción de la ninhidrina. Cuando una solución acuosa de un α -aminoácido se trata con hidrato de tricetohidrendeno (ninhidrina), se produce color violeta:



PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Separación de una mezcla de dos colorantes por cromatografía en columna (CC)

Materiales: - Columna de cromatografía - Matracas Erlenmeyer (4 x 50 ml; 2 x 100) - Vaso de precipitados (100 ml) - Varilla de vidrio - Soporte metálico - Pinza - Nuez - Pipetas Pasteur / pipeta graduada de 1 ml - Aspirador de pipeta
Reactivos/disolventes: - Alúmina activada - Etanol al 96% - Agua destilada –

Mezcla problema: 1,5 ml de una solución de 60 mg de naranja de metilo y 200 mg de azul de metileno en 110 ml de etanol al 96%
Procedimiento

Preparación de la columna: Preparar una suspensión con 15g de de alúmina activada y etanol al 96% (aprox. 20 ml). Comprobar que la llave de la columna está cerrada añadir la suspensión de alúmina activada en etanol al 96%. Golpear suavemente, con un tubo de goma o con el dedo, las paredes externas de la columna para favorecer la eliminación de las burbujas de aire que se puedan haber formado. Abrir la llave de la columna y dejar fluir lentamente el etanol hasta que la altura de éste quede 2 mm por encima de la alúmina. Durante esta elución inicial la alúmina sedimenta y, al finalizar la elución, debe presentar un aspecto uniforme y una superficie lisa y perpendicular al eje longitudinal de la columna. El etanol que se obtiene de la columna durante esta parte del proceso se puede reutilizar.

NOTA: a lo largo del proceso cromatográfico la columna nunca debe “secarse”, es decir, la fase estacionaria debe encontrarse en todo momento cubierta por la fase móvil, ya que de lo contrario la fase estacionaria se contraería y agrietaría.

Siembra de la muestra: Una vez compactada la columna se procederá a “sembrar”, depositar, 1 ml de la muestra sobre la superficie de la alúmina con la ayuda de una pipeta. Finalizada la adición de la muestra se abre la llave de la columna y se eluye hasta que la muestra sea adsorbida y el nivel del líquido quede aproximadamente 1 mm por encima de la superficie del adsorbente. Si la pared interna de la columna se ha manchado con la muestra al depositarla, se lava dejando gotear por ella un poco del eluyente(con la ayuda de la pipeta) y se eluye de nuevo hasta que el nivel del líquido vuelva a quedar 1 mm por encima de la superficie del adsorbente. Finalmente se añade 1 ml de etanol y se eluye de nuevo hasta que el nivel del líquido vuelva a quedar 1 mm por encima de la superficie del adsorbente.

Desarrollo/Elución de la columna: Adicionar, con la ayuda de una pipeta Pasteur y lentamente, 10 ml de etanol en la parte superior libre de la columna y abrir la llave para permitir el flujo del etanol a través de la alúmina. A medida que evoluciona el cromatograma se observa que el azul de metileno eluye a lo largo de la columna, formando una banda de color azul bien diferenciado que se desplaza hacia la parte inferior de la misma, mientras que el naranja de metilo queda retenido en la parte superior. Si es necesario se añadirá más etanol a la columna durante el proceso de elución. Cuando el azul de metileno esté próximo a la salida de la columna se procederá a recoger fracciones en matraces Erlenmeyer numerados de forma consecutiva, hasta que todo el producto se haya recogido y el etanol no presente coloración azul.

Dejar fluir el etanol a través de la columna hasta que la altura de éste quede 2 cm por encima de la alúmina y llenar la parte superior libre de la columna de agua destilada (“cambio de eluyente”), con la ayuda de una pipeta Pasteur y lentamente. Abrir la llave de la columna y dejar fluir el agua a través de la alúmina. A medida que

evoluciona el cromatograma se observa que el naranja de metilo eluye a lo largo de la columna, formando una banda de color naranja bien diferenciada que se desplaza hacia la parte inferior de la misma. Cuando el naranja de metilo esté próximo a la salida de la columna se procederá a la recolección de fracciones siguiendo un procedimiento análogo al anterior para el azul de metileno, hasta que el agua no presente coloración.

Separación de una mezcla de aminoácidos por cromatografía en capa fina (TLC)

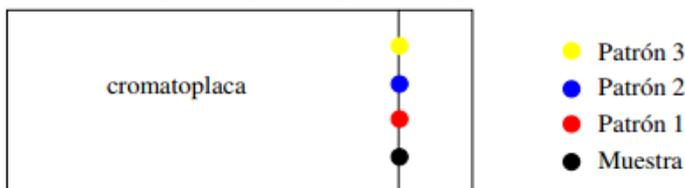
Materiales:

- Cromatoplasmas de gel de sílice de 0,2 mm - Cámara de desarrollo
- Nebulizador para líquido de revelado - Capilares de vidrio
Reactivos/disolventes: - Disoluciones patrón de aminoácidos: 1mg/ml en etanol al 96 %, 0,5 M en HCl. Patrón 1: fenilalanina. Patrón 2: β -alanina. Patrón 3: ácido aspártico. - Disolución de revelado: Ninhidrina al 0,3 % (p/v) en n-butanol/ácido acético al 3 % (v/v) - Fase móvil: N-propanol:NH₃ 30 % (7:3, v/v) - Disolución problema (puede contener uno o varios aminoácidos)

Procedimiento: Preparar capilares de vidrio siguiendo las instrucciones del profesor. Cargar la cámara de desarrollo con la fase móvil (nivel del líquido dentro de la cámara de aproximadamente 0,5 cm). Cerrar la cámara para que la atmósfera interior se sature de disolvente.

Trazar en la cromatoplasma muy suavemente, sin dañar la superficie del adsorbente, y con la ayuda de una regla y un lápiz, la línea de aplicación de muestras a aproximadamente 1 cm del borde

inferior. (NOTA: no usar nunca tinta para marcar la cromatopla). Depositar, con la ayuda de un capilar de vidrio, una microgota de los patrones y la muestra a analizar sobre la línea de aplicación de muestras de la cromatopla, espaciadas un mínimo de 1 cm entre sí y respecto a los bordes laterales de la cromatopla.



Dejar que se seque el disolvente e introducir la cromatopla en la cámara de desarrollo. Dejar que el disolvente ascienda por la cromatopla hasta un nivel de aproximadamente 1 cm por debajo del borde superior.

Extraer la cromatopla de la cámara y marcar el frente del disolvente con la ayuda de un lápiz. Dejar que se seque el disolvente (se puede acelerar el proceso de secado mediante el uso de un secador de mano) y revelar la cromatopla por nebulización con la solución de ninhidrina.

Calcular el valor de R_f tanto de los patrones como de la muestra problema. Establecer la composición de la muestra problema en base a los patrones, mediante la comparación de sus respectivos factores de retardo.

Separación de una mezcla de dos colorantes por cromatografía en capa fina

Materiales: - Cromatoplas de gel de sílice de 0,2 mm - Cámara de desarrollo - Capilares de vidrio Reactivos/disolventes: - Etanol

al 96% - Agua destilada - Mezcla problema: 0,5 ml de una solución de 60 mg de naranja de metilo y 200 mg de azul de metileno en 110 ml de etanol al 96%

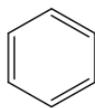
Procedimiento: Llevar a cabo una TLC con la muestra problema separada de cromatografía en columna, utilizando etanol al 96% como eluyente. Justificar las diferencias observadas en la elución de la muestra problema por CC y TLC. Fundamentos De Química, Cromatografía Líquida De Adsorción En Columna (CC) y Capa Fina (TLC), s.f.

EJERCICIOS

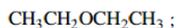
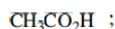
1. ¿Cuál es la principal diferencia entre CC y TLC?
2. ¿Qué tipo de fuerza causa el movimiento de la fase móvil en la cromatografía líquida de adsorción en columna?
3. ¿Qué tipo de fuerza causa el movimiento de la fase móvil en la cromatografía líquida de adsorción en capa fina?
4. ¿Por qué no se puede utilizar tinta para marcar la línea de aplicación de muestras en una cromatoplaaca?
5. Ordenar según polaridad ascendente:



;



;



Anexo 2



Equipo cromatografía de líquidos de ultra-alta presión (UHPLC)



Tecnoparque
nodo Rionegro

SENNOVA



Gigaca

ISBN: 978-958-15-0223-3