

CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA

Fundamento

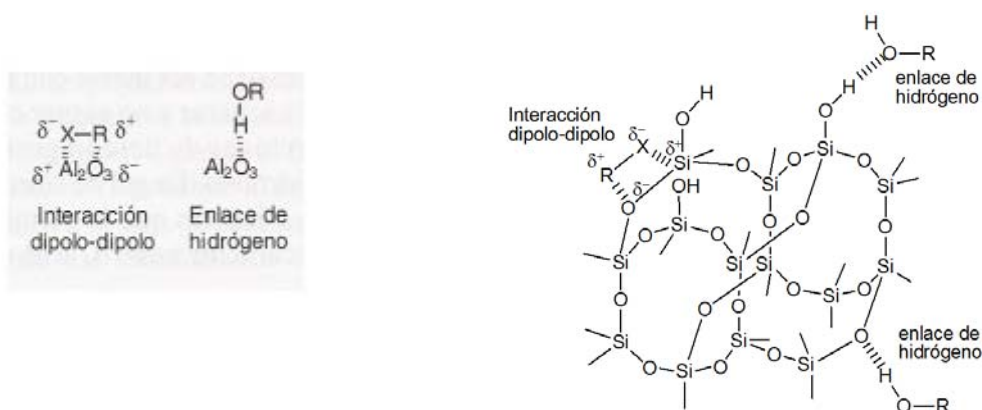
La cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica. Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.

Adsorbentes y eluyentes

Los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. La alúmina anhidra es el más activo de los dos, es decir, es el que retiene con más fuerza a los compuestos; por ello se utiliza para separar compuestos relativamente apolares (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas). El gel de sílice, por el contrario, se utiliza para separar sustancias más polares (alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos). El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente. El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición. El adsorbente interacciona con las sustancias mediante interacción dipolo-dipolo o mediante enlace de hidrógeno si lo presentan.



El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente recuadro se recoge por orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados.

Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada. El eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error".

Determinación del Rf

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de:

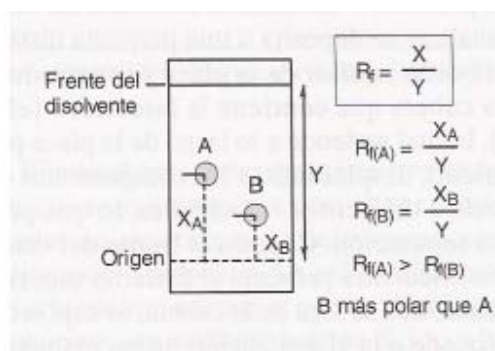
- la polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.
- naturaleza del disolvente. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como Rf, y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa.

Para calcular el Rf se aplica la siguiente expresión:

$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}$

Polaridad	Orden de elución	Tipo de compuesto
Menor	Menor retención	Alcanos Alquenos Eteres Derivados halogenados Aldehidos y cetonas Esteres Aminas Alcoholes Fenoles Acidos carboxilicos
Mayor	Mayor retención	



La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo del Rf.

Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un Rf medio en torno a 0.3-0.5. Para compuestos poco polares, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano/metanol en distintas proporciones.

Revelado de las placas

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto.

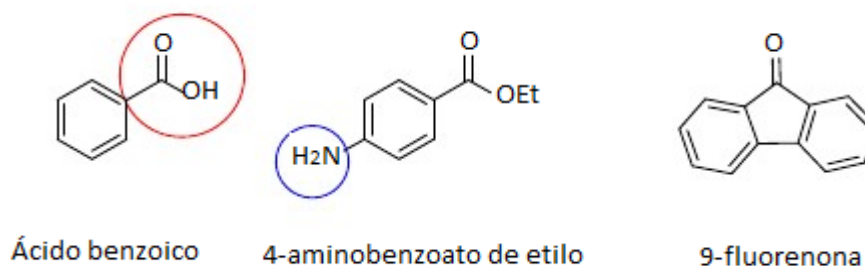
En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados.

Parte experimental

Material por taquilla	Reactivos
Cámara cromatográfica	Disoluciones de 0,5 g en 500 mL de acetato de etilo:
Probeta de 10 mL	(B) Disolución de ácido benzoico
2x Erlenmeyer de 25 mL	(A) Disolución de 4-aminobenzoato de etilo
Regla de 10 cm	(F) Disolución de 9-fluorenona
6x Placas de cromatografía	Hexano 2x
Micropipeta	Acetato de etilo
4x viales de 5 mL	Acetona
1x pipeta + 1x chupete para pipeta	

Procedimiento

En esta práctica se llevará a cabo la cromatografía en placa fina de tres compuestos orgánicos, ácido benzoico, 4-aminobenzoato de etilo y 9-fluorenona.



En un vial poner con una pipeta una pequeña cantidad de una muestra disuelta en acetato de etilo (que cubra el fondo del vial y un poco más). En otros dos viales diferentes poner otra muestra en cada uno de la misma forma. Las tres disoluciones de las muestras en acetato de etilo estarán ya preparadas.

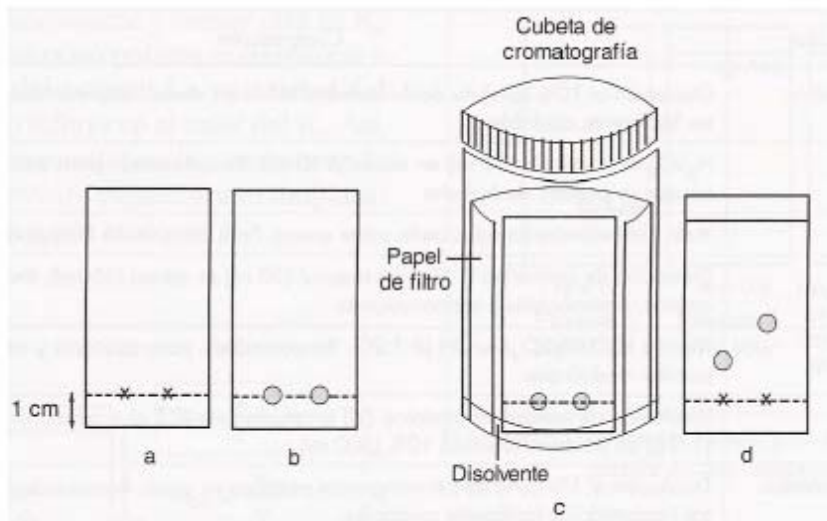
En una placa de TLC nueva se traza con lápiz una línea a 7-10 mm del borde inferior y se señalan sobre ella tres puntos equidistantes y no demasiado cerca del borde (como en la figura a, pero con 3 puntos en lugar de 2).

Con ayuda de una micropipeta de vidrio se toma una muestra de un vial. Se introduce la micropipeta y el líquido sube por ella por capilaridad. Al tocar brevemente la placa con la micropipeta el líquido se absorbe en la placa también por capilaridad. Se pincha brevemente tres veces en el punto para conseguir una mancha de pequeño tamaño que da mejor resolución.

Después de poner una mancha se lava la micropipeta introduciendo la punta en acetona en un vial, se deja que se llene hasta la mitad y se pincha sobre papel de filtro para que absorba la acetona. Repetir el lavado tres veces. La pipeta se reutiliza para la siguiente muestra, repitiendo el proceso de poner la muestra en la placa y el lavado.

La placa de TLC se deposita dentro de una cubeta de cromatografía, a la que previamente se ha añadido una pequeña cantidad del eluyente deseado. Hay que tener cuidado de que el nivel de eluyente esté por debajo del punto donde ha sido "pinchado" el producto (Figura c).

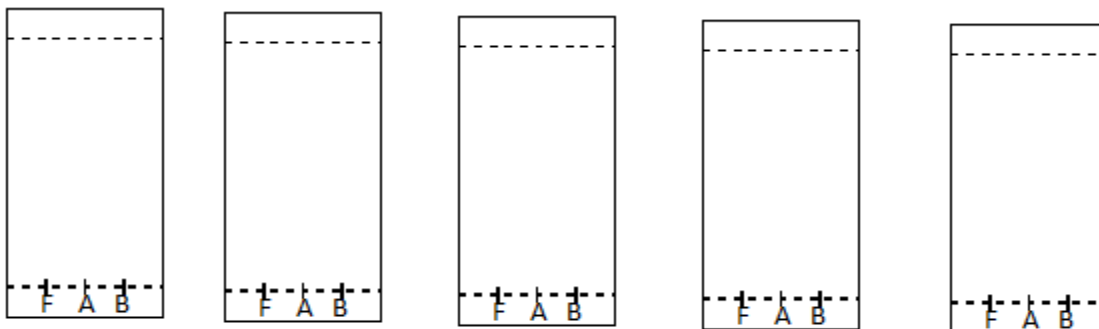
Se tapa la cubeta y se deja que el eluyente ascienda por capilaridad.



Antes de que el frente del disolvente llegue al otro extremo de la placa, ésta se saca de la cubeta con unas pinzas y con un lápiz se hace una señal indicando hasta dónde ha llegado el eluyente (Figura d).

Tras dejar evaporar el disolvente de la placa, revelar la placa mirando en el visor de UV.

Se hacen placas diferentes con distintos eluyentes tal como se indica en el esquema siguiente, estudiando las muestras de: F (fluorenona), A (amina) y B (benzoico). Se dibujan las placas en el esquema de la cuestión 2 y se anotan los valores de R_f de las placas centrales, que se miden sobre las placas.



Hex/AcOEt: 1:0

4:1

2:1

1:1

0:1

R_{fF} :

R_{fA} :

R_{fB} :

Una vez que se ha encontrado el eluyente adecuado para ver las muestras separadas, se estudia una muestra problema (MP) para averiguar los componentes que tiene, que pueden ser uno o varios de los compuestos F, A, B utilizados en la práctica, siguiendo el esquema a continuación. Se dibuja la placa y se ponen los resultados en la cuestión 5.

Hex/AcOEt:

Composición de MP:

R_f dentro de MP:

R_f muestras:

